

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7557941号
(P7557941)

(45)発行日 令和6年9月30日(2024.9.30)

(24)登録日 令和6年9月19日(2024.9.19)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
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 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
請求項の数 12 (全625頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2019-566839(P2019-566839)	(73)特許権者	516212924	
(86)(22)出願日	平成30年6月1日(2018.6.1)		ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテ	
(65)公表番号	特表2020-524485(P2020-524485		ッド	
	A)		WAVE LIFE SCIENCES	
(43)公表日	令和2年8月20日(2020.8.20)		LTD.	
(86)国際出願番号	PCT/US2018/035721		シンガポール 018936 シンガポー	
(87)国際公開番号	WO2018/223081		ル, #12-00 マリナ ワン イースト	
(87)国際公開日	平成30年12月6日(2018.12.6)		タワー, 7 ストライツ ビュー	
審査請求日	令和3年5月31日(2021.5.31)	(74)代理人	100114775	
(31)優先権主張番号	62/514,769		弁理士 高岡 亮一	
(32)優先日	平成29年6月2日(2017.6.2)	(74)代理人	100121511	
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 小田 直	
	米国(US)	(74)代理人	100202751	
(31)優先権主張番号	62/670,698		弁理士 岩堀 明代	
(32)優先日	平成30年5月11日(2018.5.11)	(74)代理人	100208580	
最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 オリゴヌクレオチド組成物及びその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドを含む組成物であって、前記特定のオリゴヌクレオチド型が以下の特徴：

- (a) 共通の塩基配列；
- (b) 骨格結合の共通パターン；
- (c) 骨格キラル中心の共通パターン、

を有し、

前記オリゴヌクレオチドは、S p 立体配置において、結合リンを有する少なくとも1つのヌクレオチド間結合を含み、

前記組成物は、前記特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同一の共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して、前記組成物が富化されるという点において、キラル制御され、かつ

(i) 前記オリゴヌクレオチドは、標的 P N P L A 3 m R N A のレベルを減少させることができ、

(i i) 前記共通の塩基配列が A C U G U A G A A A G G C A U G A と 5 0 % を 超 え る 同 一 性 を 有 し、各々の U が任意で、かつ独立して T と置換可能であり、かつ

(i i i) 前記共通の塩基配列が、P N P L A 3 転写産物中の配列と相補的であり、前記 P N P L A 3 転写産物中の配列は、T A C U G U A G A A A G G C A U G A A T U (配列番号 1 5 3) に相補的である P N P L A 3 転写産物の配列の一部であるかまたは一部を含

み、1個以上のUが任意で、かつ独立してTと置換可能である、組成物。

【請求項2】

前記特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドが以下の特徴：
5つ以上のキラル制御されたヌクレオチド間結合（以下、「キラル制御されたヌクレオチド間結合」という。）で独立して、同一の結合リンの立体化学を有すること；
を共有し、

前記共通の塩基配列を共有する前記組成物中の全てのオリゴヌクレオチドのうち、10%が、前記特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドであり、かつ

前記共通の塩基配列が、PNPLA3転写産物の塩基配列の一部と相補的であり、前記一部が15個以上の核酸塩基を含む、

請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、5以上のキラルのヌクレオチド間結合において、独立して、同一の結合リンの立体化学を共有し、かつ前記共通の塩基配列を共有する前記組成物中の全てのオリゴヌクレオチドのうち、50%～100%が、前記特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドである、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

前記特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、各々のホスホロチオエートのヌクレオチド間結合において、独立して、同一の結合リンの立体化学を共有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

前記特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、同一の構成を有する、請求項2～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

前記組成物は液体の組成物である、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

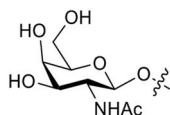
【請求項7】

前記特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、標的部位（以下、「R^{CD}」という。）を各々独立して備える、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記R^{CD}は、以下式で示される、請求項7に記載の組成物。

【化1】



【請求項9】

前記R^{CD}は、前記オリゴヌクレオチドと、またはリンカーを介して前記オリゴヌクレオチドと、結合されている、請求項7に記載の組成物。

【請求項10】

前記リンカーは、以下の構造を有する、請求項9に記載の組成物。

10

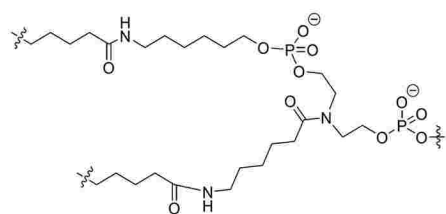
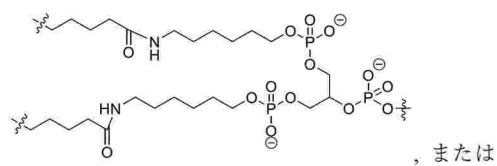
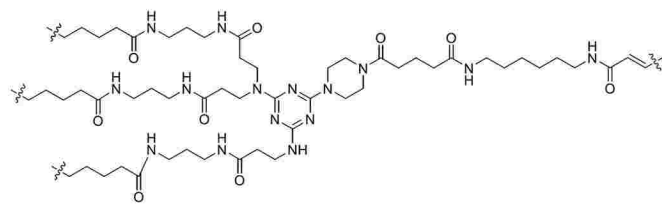
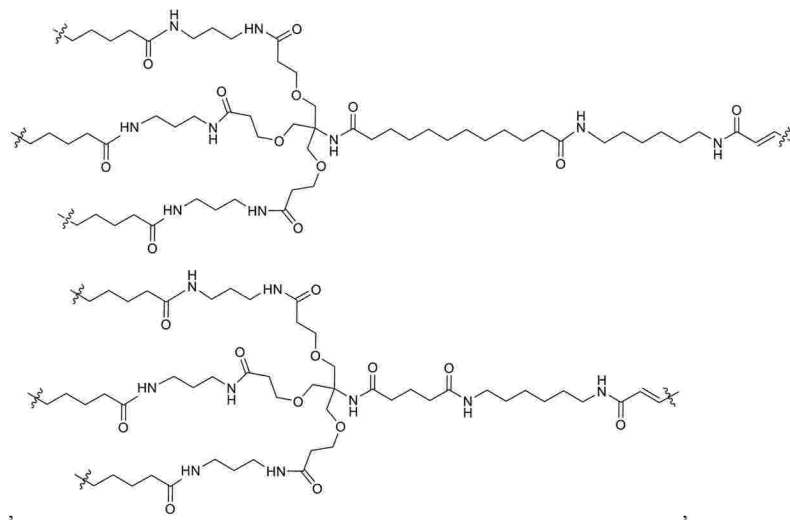
20

30

40

50

【化 2】



【請求項 1 1】

前記 R^{C D}は、以下の構造を有する、請求項 7 に記載の組成物。

10

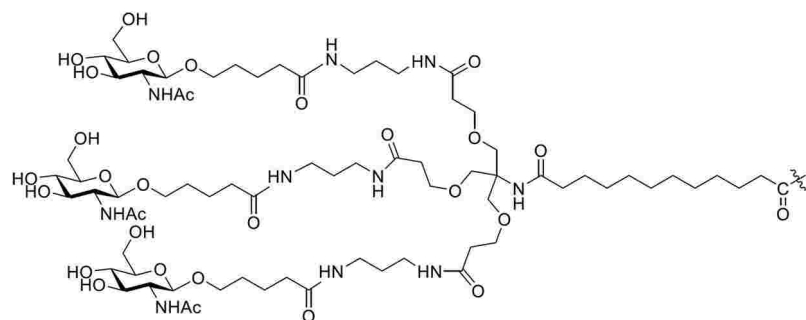
20

30

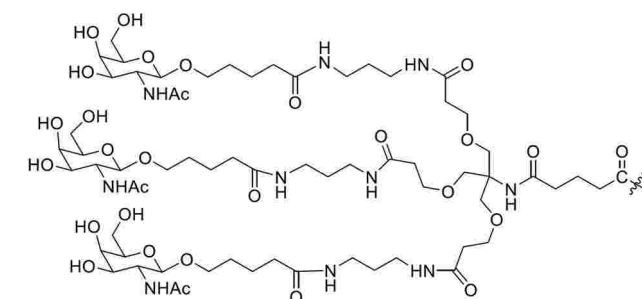
40

50

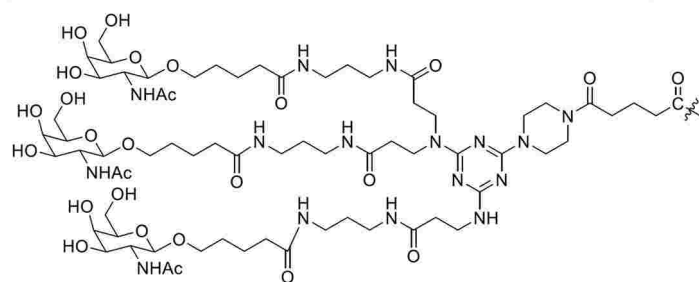
【化 3】



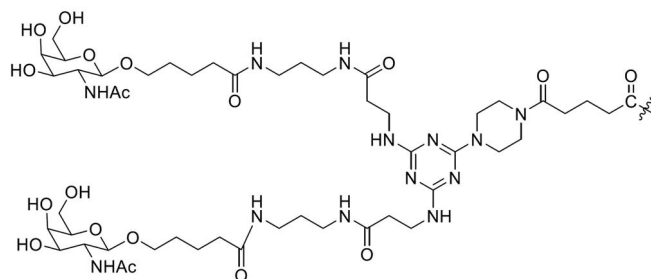
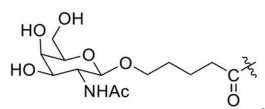
10



20

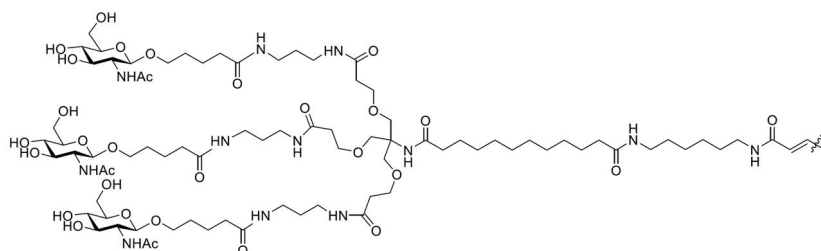


30



40

, または



50

【請求項 12】

ヒトにおける、脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、肝硬変を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、または肝硬変および肝細胞癌を伴う非アルコール性脂肪性肝炎を治療するための組成物の製造における使用であって、前記組成物は、治療有効量の請求項 1～11 のいずれか一項に記載の組成物を含有する、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年6月2日に出願された米国仮特許出願第62/514,769号、及び2018年5月11日に出願された米国仮特許出願第62/670,698号の優先権を主張し、それら各出願の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

PNPLA3 (PNPLA3オリゴヌクレオチド) を標的とするオリゴヌクレオチドは、さまざまな用途（たとえば、治療用途）において有用である。天然起源の核酸（たとえば、非修飾DNAまたは非修飾RNA）の用途は、たとえば、こうした天然起源の核酸がエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによる作用を受けやすいことによって限られたものとなり得る。

【発明の概要】

【0003】

とりわけ、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチドの構造的要素を制御することで、PNPLA3オリゴヌクレオチドの特性及び／または活性に顕著な影響を与え得るという認識を含むものであり、こうした構造的要素は、化学修飾（たとえば、糖の修飾、塩基の修飾、及び／またはヌクレオチド間結合の修飾）またはそのパターン、立体化学（たとえば、骨格のキラルヌクレオチド間結合の立体化学）の改変またはそのパターン、及び／または追加の化学的部分（たとえば、脂質部分、標的化部分、炭水化物部分、アシアロ糖タンパク質受容体またはASGPRに結合する部分（たとえば、GalNAc部分）など）との複合体化などである。一部の実施形態では、特性及び／または活性としては、限定されないが、PNPLA3遺伝子またはその遺伝子産物の発現、活性、またはレベルの減少への関与、誘導が挙げられ、こうした減少は、たとえば、RNA干渉（RNAi干渉）、一本鎖RNA干渉（ssRNAi）、RNase H介在性ノックダウン、翻訳の立体障害などによって媒介される。

【0004】

前述の全般的な説明及び以下の詳細な説明はいずれも単なる例示及び説明であり、特許請求される発明を限定するものではないことを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1A】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1B】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1C】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1D】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1E】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1F】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1G】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1H】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1I】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1J】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図1K】さまざまなssRNAi形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図 1 L】さまざまな s s R N A i 形式及びハイブリッド形式の模式図を示す。

【図 2】さまざまなアンチセンスオリゴヌクレオチド形式の模式図を示す。

【図 3 A】多量体形式の例を示す。オリゴヌクレオチドを、直接的に、及び／またはリンカーを介して、連結することができる。示されるように、多量体は、同じまたは異なる構造／型のオリゴヌクレオチドモノマーを含み得る。一部の実施形態では、多量体のモノマーは、s s R N A i 剤である。一部の実施形態では、多量体のモノマーは、R N a s e H 依存性アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) である。さまざまな位置を介してモノマーを連結することができ、たとえば、5' 末端、3' 末端、またはこれらの間に介在する位置を介してモノマーを連結することができる。

【図 3 B】モノマーを連結して多量体を形成するための化学手法の例を示し、こうしたモノマーは、さまざまな経路を介してその機能を発揮し得る。

【発明を実施するための形態】

【0006】

本発明は、以下の本発明の例示的な実施形態の詳細な説明及び当該説明に含まれる実施例を参照することで、より容易に理解され得る。

【0007】

本発明は、特定の合成方法に限定されず、当然のことながら、当該方法は、多様であり得ることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を記載することのみを目的としており、限定を意図するものではないことも理解されたい。

【0008】

一部の実施形態では、本開示は、立体化学（具体的には、骨格キラル中心の立体化学）が P N P L A 3 オリゴヌクレオチドの特性を予想外に改善し得るという認識を含む。安定性を増加させる構造的要素のいくつかは、活性（たとえば、R N A 干渉）の低下もさせ得るということがこれまでは多く観察されたのとは対照的に、本開示は、立体化学を制御することで、驚くべきことに、活性を顕著に減少させることなく、安定性が増加し得ることを示す。

【0009】

一部の実施形態では、本開示は、ある特定の 5' 末端構造を有するオリゴヌクレオチドを提供する。

【0010】

一部の実施形態では、本開示は、本開示に従って使用すると高い生物学的活性（たとえば、R N A i 活性）を有するオリゴヌクレオチドが生成し得る 5' 末端構造を提供する。

【0011】

一部の実施形態では、本開示は、さまざまな追加の化学的部分（脂質部分及び／または炭水化物部分など）が、オリゴヌクレオチドに組み込まれると、1つ以上の P N P L A 3 オリゴヌクレオチド特性（P N P L A 3 標的遺伝子またはその遺伝子産物のノックダウンなど）を改善し得るという認識を含む。一部の実施形態では、追加の化学的部分は、任意選択である。一部の実施形態では、P N P L A 3 オリゴヌクレオチドは、1つより多い追加の化学的部分を含み得る。一部の実施形態では、P N P L A 3 オリゴヌクレオチドは、2つ以上の追加の化学的部分を含み得、追加の化学的部分は、同一のものであるか、もしくは異なるものであるか、または同じカテゴリー（たとえば、標的化部分、炭水化物部分、A S P G R に結合する部分、脂質部分など）のものであるか、もしくは異なるカテゴリーのものである。一部の実施形態では、ある特定の追加の化学的部分は、所望の細胞、組織、及び／または臓器へのオリゴヌクレオチドの送達を促進する。一部の実施形態では、ある特定の追加の化学的部分は、オリゴヌクレオチドの内部移行を促進し、及び／またはオリゴヌクレオチドの安定性を増加させる。

【0012】

一部の実施形態では、本開示は、アレル特異的な抑制を達成する P N P L A 3 オリゴヌクレオチド組成物を提供し、特定の標的遺伝子の1つのアレルに由来する転写産物が、同じ遺伝子の少なくとも1つの他のアレルと比較して選択的にノックダウンされる。

10

20

30

40

50

【0013】

一部の実施形態では、本開示は、RNAi機序に関与し、及び／またはRNAi機序を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド（たとえば、RNAi剤）のために、ある特定の提供される構造的要素、技術、及び／または特徴が特に有用であることを示す。しかしながら、いずれにせよ、本開示の教示内容は、いずれかの特定の機序に関与するオリゴヌクレオチド、またはいずれかの特定の機序を介して機能するオリゴヌクレオチドに限定されるものではない。一部の実施形態では、本開示は、任意のオリゴヌクレオチドに関するものであり、こうしたオリゴヌクレオチドは、任意の機序を介して機能し、本明細書に記載の任意の配列、構造、もしくは形式（またはその一部）を含む。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチドを提供し、こうしたPNPLA3オリゴヌクレオチドは、任意の機序を介して機能し、本明細書に記載の任意の配列、構造、もしくは形式（またはその一部）を含み、こうした配列、構造、もしくは形式（またはその一部）としては、限定されないが、任意の5'末端構造、5'末端領域、第1の領域（限定されないが、シード領域が挙げられる）、第2の領域（限定されないが、ポストシード領域が挙げられる）、ならびに3'末端領域（3'末端ジヌクレオチド及び／または3'末端キャップであり得る）、任意選択の追加の化学的部分（限定されないが、標的化部分、炭水化物部分、APGRと結合する部分、及び脂質部分が挙げられる）、立体化学または立体化学パターン、修飾または修飾パターン、ヌクレオチド間結合またはヌクレオチド間結合パターン、糖（複数可）の修飾または糖の修飾パターン、塩基（複数可）の修飾または塩基の修飾パターンが挙げられる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNAi機序に関与（例えばRNAi機序を誘導）し得る。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNaseH（リボヌクレアーゼH）機序に関与し得る。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、翻訳阻害剤として作用し得る（たとえば、翻訳を立体的に遮断し得る）。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、治療用であり得る。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、治療用途、診断用途、研究用途、及び／またはナノ材料用途において有用である。一部の実施形態では、標的は、1つ以上の産物（例えば、RNA及び／またはタンパク質産物）の発現及び／または活性の改変が意図されることに関して、特定のアレルである。多くの実施形態では、標的アレルは、存在及び／または発現が1つ以上の疾患及び／または状態の存在、発症、及び／または重篤度と関連（たとえば、相関）するものである。あるいは、またはさらに、一部の実施形態では、標的アレルは、1つ以上の遺伝子産物のレベル及び／または活性の改変が疾患及び／または状態の1つ以上の側面の改善（たとえば、発症の遅延、重篤度の低減、他の治療に対する応答性など）と相関するものである。

【0014】

一部の実施形態では、特定のアレル（疾患関連アレル）の存在及び／または活性が1つ以上の障害、疾患、及び／または状態の存在、発症、及び／または重篤度と関連（たとえば、相関）する場合、同じ遺伝子の異なるアレルが存在し、こうした異なるアレルは、そのように関連することがないか、または関連するにしてもその程度が低い（たとえば、示す相関の有意性が低いか、または示す相関が統計的に有意ではない）。一部のそのような実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド及びその方法は、関連性が低い／関連性のない1つ以上のアレル（複数可）と比較して、関連するアレルを優先的または特異的に標的とし、それによってアレル特異的な抑制を媒介し得る。

【0015】

一部の実施形態では、PNPLA3標的配列は、本明細書に記載のPNPLA3オリゴヌクレオチドが結合する配列である。多くの実施形態では、標的配列は、提供されるオリゴヌクレオチドの配列もしくはそこに存在する連続残基の配列と同一であるか、またはその正確な相補体である（たとえば、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的配列と同一の標的結合配列、または標的配列の正確な相補体である標的結合配列を含む）。一部の実施形態では、標的結合配列は、転写産物（たとえば、mRNA前駆体（pre-mRNA）、mRNAなど）の標的配列の正確な相補体である。標的結合配列／標的配列は、所望の

活性及び／または特性を有する、提供されるオリゴヌクレオチドに対してさまざまな長さのものであり得る。一部の実施形態では、標的結合配列／標的配列は、5～50個の塩基を含む。一部の実施形態では、限定されないが、標的配列及び／またはオリゴヌクレオチド配列の5'末端領域及び／または3'末端領域を含めて、PNPLA3オリゴヌクレオチド（の関連部分）とその標的配列との間の少数の差異／ミスマッチは許容される。多くの実施形態では、標的配列は、標的遺伝子から産生する転写産物（たとえば、mRNA及び／またはmRNA前駆体（pre-mRNA））内に存在する。

【0016】

一部の実施形態では、標的配列は、1つ以上のアレル部位（すなわち、標的遺伝子内でアレル変異が生じる位置）を含む。一部の実施形態では、アレル部位は、変異である。一部の実施形態では、アレル部位は、SNPである。一部のそのような実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の他のアレルと比較して優先的または特異的に1つのアレルに結合する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、疾患関連アレルに優先的に結合する。たとえば、一部の実施形態では、本明細書で提供されるPNPLA3オリゴヌクレオチド（またはその標的結合配列部分）は、特定のアレルバージョンの標的配列と少なくとも部分的に同一の配列を有するか、または特定のアレルバージョンの標的配列の正確な相補体である配列を有する。

【0017】

別段の指定がない限り、配列（限定されないが、塩基配列、ならびに化学パターン、修飾パターン、及び／または立体化学パターンを含む）はすべて、5'から3'の順序で示される。

【0018】

一部の実施形態では、本開示は、標的に特異的なオリゴヌクレオチドであって、本明細書に開示の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列、または本明細書に開示の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列の少なくとも15個の連続ヌクレオチドの領域、を有するか、または含むPNPLA3オリゴヌクレオチドと関連する組成物及び方法を提供し、当該塩基配列の第1のヌクレオチドまたは当該少なくとも15個の連続ヌクレオチドの第1のヌクレオチドは、TまたはDNA Tによって任意で置換され得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ssRNAiを誘導する能力を有する。

【0019】

一部の実施形態では、本開示は、共通塩基配列を有し、1つ以上のヌクレオチド間結合、糖、及び／または塩基修飾を含む第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0020】

一部の実施形態では、ヌクレオチドは、天然のヌクレオチドである。一部の実施形態では、ヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。一部の実施形態では、ヌクレオチドは、ヌクレオチドアナログである。一部の実施形態では、塩基は、修飾塩基である。一部の実施形態では、塩基は、保護された核酸塩基（オリゴヌクレオチド合成において使用される保護された核酸塩基など）である。一部の実施形態では、塩基は、塩基アナログである。一部の実施形態では、糖は、修飾糖である。一部の実施形態では、糖は、糖アナログである。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、修飾ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態では、ヌクレオチドは、塩基、糖、及びヌクレオチド間結合を含み、塩基、糖、及びヌクレオチド間結合はそれぞれ、独立して、かつ任意で、天然起源または非天然起源のものである。一部の実施形態では、ヌクレオチドは、塩基及び糖を含み、塩基及び糖はそれぞれ、独立して、かつ任意で、天然起源または非天然起源のものである。ヌクレオチドの非限定的な例としては、DNA（2'-デオキシ）ヌクレオチド及びRNA（2'-OH）ヌクレオチド、ならびに塩基、糖、及び／またはヌクレオチド間結合に1つ以上の修飾を含むものが挙げられる。糖の非限定的な例としては、リボース及びデオキシリボース、ならびに2'-修飾を有するリボース及びデオキシリボースが挙げられ、こうした2'-修飾としては、限定されないが、2'-F修飾、LNA修飾、2'-OMe修飾、及び2'

10

20

30

40

50

－MOE修飾が挙げられる。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、本開示に記載の式Iの構造を有し得る。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、リンを含まないが、2つの天然糖または非天然糖の連結に役立つ部分である。

【0021】

一部の実施形態では、本開示は、参照条件と比較したときに、PNPLA3遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現、活性、及び／またはレベルの減少、一本鎖RNA干渉、及び／またはRNase H介在性ノックダウンを、より強く誘導するキラル制御されたPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、こうした参照条件は、たとえば、組成物の非存在、または参照組成物（たとえば、同じ塩基配列及び化学修飾を有するオリゴヌクレオチドの立体不規則的な組成物）の存在である。

10

【0022】

一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチドがいずれのキラルヌクレオチド間結合においても共通の立体化学を共有しないという点において立体不規則的である。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチドが1つ以上のキラルヌクレオチド間結合に共通する立体化学を共有するという点においてキラル制御される。一部の実施形態では、キラル制御された第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物は、立体不規則的な第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物と比較して、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼに対する感受性が減少している。

20

【0023】

一部の実施形態では、組成物は、任意の第1の複数のPNPLA3オリゴヌクレオチド及び／または第2の複数のオリゴヌクレオチドのうちの2つ以上の多量体を含み、第1の複数のオリゴヌクレオチド及び第2の複数のオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNase H介在性ノックダウンを独立して介して、同じまたは異なる標的のノックダウンを独立して誘導することができる。

【0024】

一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチド（たとえば、第1の複数のオリゴヌクレオチド）を含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチドが1つ以上のキラルヌクレオチド間結合に独立して共通する立体化学を共有するという点においてキラル制御される。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、35個、40個、45個、50個、またはそれ以上のキラルヌクレオチド間結合に共通する立体化学配置を共有し、こうした立体化学配置はそれぞれ、独立してRpまたはSpである。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、それぞれのキラルヌクレオチド間結合に共通する立体化学配置を共有する。一部の実施形態では、キラルヌクレオチド間結合は、組成物における所定レベルのオリゴヌクレオチドが共通の立体化学配置（独立してRpまたはSp）を共有する場合、キラル制御されたヌクレオチド間結合と称される。

30

40

【0025】

一部の実施形態では、少なくとも5つのヌクレオチド間結合がキラル制御される。一部の実施形態では、少なくとも10個のヌクレオチド間結合がキラル制御される。一部の実施形態では、少なくとも15個のヌクレオチド間結合がキラル制御される。一部の実施形態では、それぞれのキラルヌクレオチド間結合がキラル制御される。

【0026】

一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該第1の複数のPNPLA3オリゴヌクレオチドは、

- 1) 共通塩基配列、

50

2) 骨格結合の共通パターン、及び

3) 骨格キラル中心の共通パターン

を共有し、

当該組成物は、組成物中の所定レベルのオリゴヌクレオチドが、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するという点で、単一オリゴヌクレオチドの実質的に純粋な調製物である。

【0027】

一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、キラル制御されたキラル中心を含む少なくとも1つのヌクレオチド間結合を含む。

【0028】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのレベル及び／またはジアステレオ純度は、分析方法（たとえば、クロマトグラフィー法、分光測定法、分光法、またはそれらの任意の組み合わせ）によって決定することができる。

【0029】

とりわけ、本開示は、立体不規則的なPNPLA3オリゴヌクレオチド調製物が、（たとえば、オリゴヌクレオチド鎖内の個々の骨格キラル中心の立体化学構造（または立体化学）が）互いに異なる複数の別々の化学的実体を含むという認識を含む。骨格キラル中心の立体化学が制御されないと、立体不規則的なオリゴヌクレオチド調製物は、オリゴヌクレオチド立体異性体の含有レベルが不確定の非制御組成物となる。こうした立体異性体は、同じ塩基配列及び／または化学修飾を有し得るものの、こうした立体異性体は、少なくともその骨格立体化学が異なるという理由から、異なる化学的実体であり、こうした立体異性体は、本明細書に示されるように、異なる特性（たとえば、ヌクレアーゼ感受性、活性、分布など）を有し得る。一部の実施形態では、特定の立体異性体は、たとえばその塩基配列、その長さ、その骨格結合パターン、及びその骨格キラル中心パターンによって、定義され得る。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチド内の立体化学を制御することで達成される特性及び活性の改善が、化学修飾の使用によって達成されるものと比較してそれに匹敵するまたはさらに良好なものであり得ることを示す。

【0030】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、5'末端領域、シード領域、ポストシード領域、及び3'末端領域を5'から3'の順序で含み、追加の化学的部分を任意でさらに含む。

【0031】

一部の実施形態では、5'末端領域は、シード領域に対して5'に位置するPNPLA3オリゴヌクレオチドの全部分である。一部の実施形態では、3'末端領域は、ポストシード領域に対して3'に位置するPNPLA3オリゴヌクレオチドの全部分である。

【0032】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'末端基である。

【0033】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'末端基を含む。

【0034】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる5'末端領域、5'末端構造、5'末端基、5'末端ヌクレオチド、または5'末端ヌクレオチドを含み得る。

【0035】

一部の実施形態では、5'末端構造、5'末端領域、5'ヌクレオチド部分、シード領域、ポストシード領域、3'末端ジヌクレオチド、及び／または3'末端キャップは、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意の構造を独立して有する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるか、もしくは当該技術分野において知られる、5'末端の任意の構造、及び／または本明細書に記載されるか、もしくは当該技術分野において知られる、5'ヌクレオチド部分の任意の構造、及び／または本明細書に記載されるか

10

20

30

40

50

、もしくは当該技術分野において知られる、シード領域の任意の構造、及び／または本明細書に記載されるか、もしくは当該技術分野において知られる、ポストシード領域の任意の構造、及び／または本明細書に記載されるか、もしくは当該技術分野において知られる、3'末端ジヌクレオチドの任意の構造、及び／または本明細書に記載されるか、もしくは当該技術分野において知られる、3'末端キャップの任意の構造、を組み合わせることができる。

【0036】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のブロックを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のブロックを含み、ブロックは、1つまたは複数の連続するヌクレオシド、及び／またはヌクレオチド、及び／または糖、または塩基、及び／またはヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、ブロックは、シード領域全体またはその一部を含む。一部の実施形態では、ブロックは、ポストシード領域全体またはその一部を含む。

10

【0037】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ブロックマー（blockmer）である。

【0038】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、交互に並ぶブロックを含むアルトマー（altmer）である。一部の実施形態では、ブロックマーまたはアルトマーは、化学修飾（存在または非存在を含む）によって定義することができ、こうした化学修飾は、たとえば、塩基修飾、糖修飾、ヌクレオチド間結合修飾、立体化学など、またはそのパターンである。

20

【0039】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の糖修飾を含む。一部の実施形態では、糖修飾は、2'位に対するものである。一部の実施形態では、糖修飾は、2'-F、2'-OMe、及び2'-MOEから選択される。2'-Fは、2'フルオロとも呼ばれる。2'-OMeは、2'-O-メチルとも呼ばれる。2'-MOEは、2'-メトキシエチルまたはMOEとも呼ばれる。

【0040】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、2'-Fを2つのみ含む。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、2'-Fを2つのみ含み、これら2つのヌクレオチドは、2番目及び14番目の位置に存在する。

30

【0041】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、2'-Fを2つのみ含み、これら2つのヌクレオチドは、2番目及び14番目の位置に存在し、第1のヌクレオチドは、2'-デオキシである。

【0042】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、2'-Fを2つのみ含み、これら2つのヌクレオチドは、2番目及び14番目の位置に存在し、第1のヌクレオチドは、2'-デオキシTである。

40

【0043】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、2'-Fを2つのみ含み、これら2つのヌクレオチドは、2番目及び14番目の位置に存在し、第1のヌクレオチドは、2'-デオキシであり、5'末端構造は、-OHである。

【0044】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、2'-Fを2つのみ含み、これら2つのヌクレオチドは、2番目及び14番目の位置に存在し、第1のヌクレオチドは、2'-デオキシTであり、5'末端構造は、-OHである。

【0045】

本明細書の実施形態の一部では、PNPLA3オリゴヌクレオチドを参照する場合、「

50

【 0 0 4 6 】

【 0 0 4 7 】

10

【 0 0 4 8 】

20

30

40

50

f m f m m m f m f m f m、m m m f m m m f m f m f m f m、m m m m f f m m f m f m f m m m、m m m、m m m m、m m m m m、m m m m m f f m m f m f m f m m m、m m m m m f m f m f m f m f m f m、m m m m m m、m m m m m m f f m m f m f m f m f m m m、m f m f、m f m f、m f m f m f、f m f m、f m f m f m、f m f m f m f、d f d f、d f d f d f、d f d f d f d f、f d f d、f d f d f d、f d f d f d f d、d f d f m f m f、d f m f m f、m f d f m f、またはd f m f d f、のうちのいずれかの2'-修飾パターンを有するか、または含み、式中、mは、2'-OMeを示し、fは、2'-Fを示し、dは、2'位に置換を有さないことを示す。一部の実施形態では、シード領域及び／またはポストシード領域は、糖修飾のブロックを含み得る。

【0049】

一部の実施形態では、ブロックは、立体化学ブロックである。一部の実施形態では、ブロックは、当該ブロックの各ヌクレオチド間結合が、Rpであるという点で、Rpブロックである。一部の実施形態では、シード領域ブロックは、Rpブロックである。一部の実施形態では、ポストシード領域ブロックは、Rpブロックである。一部の実施形態では、ブロックは、当該ブロックの各ヌクレオチド間結合が、Spであるという点で、Spブロックである。一部の実施形態では、シード領域ブロックは、Spブロックである。一部の実施形態では、ポストシード領域ブロックは、Spブロックである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、Rpブロック及びSpブロックの両方を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のRpブロックを含むが、Spブロックは含まない。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のSpブロックを含むが、Rpブロックは含まない。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のPOブロックを含み、ブロックのヌクレオチド間結合はそれぞれ、天然リン酸結合である。

【0050】

一部の実施形態では、シード領域ブロックは、Spブロックであり、糖部分はそれぞれ、2'-F修飾を含む。一部の実施形態では、シード領域ブロックは、Spブロックであり、ヌクレオチド間結合はそれぞれ、修飾ヌクレオチド間結合であり、糖部分はそれぞれ、2'-F修飾を含む。一部の実施形態では、シード領域ブロックは、Spブロックであり、ヌクレオチド間結合はそれぞれ、ホスホロチオエート結合であり、糖部分はそれぞれ、2'-F修飾を含む。一部の実施形態では、シード領域ブロックは、4つ以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、ヌクレオシド単位は、ある1つのヌクレオシドである。一部の実施形態では、シード領域ブロックは、5つ以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、シード領域ブロックは、6つ以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、シード領域ブロックは、7つ以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、ポストシード領域ブロックは、Spブロックであり、糖部分はそれぞれ、2'-F修飾を含む。一部の実施形態では、ポストシード領域ブロックは、Spブロックであり、ヌクレオチド間結合はそれぞれ、修飾ヌクレオチド間結合であり、糖部分はそれぞれ、2'-F修飾を含む。一部の実施形態では、ポストシード領域ブロックは、Spブロックであり、ヌクレオチド間結合はそれぞれ、ホスホロチオエート結合であり、糖部分はそれぞれ、2'-F修飾を含む。一部の実施形態では、ポストシード領域ブロックは、4つ以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、ポストシード領域ブロックは、5つ以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、ポストシード領域ブロックは、6つ以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態では、シード領域及び／またはポストシード領域は、ブロックを含み得る。一部の実施形態では、シード領域及び／またはポストシード領域は、立体化学ブロックを含む。

【0051】

一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該第1の複数のオリゴヌクレオチドは、

1) 共通塩基配列を有し、

2) 1つ以上の修飾糖部分及び修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0052】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該第1の複数のオリゴヌクレオチドは、

- 1) 転写産物における標的配列に相補的な共通塩基配列を有し、
- 2) 1つ以上の修飾糖部分及び修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0053】

一部の実施形態では、参照条件は、組成物の非存在である。一部の実施形態では、参照条件は、参照組成物の存在である。参照用の複数のオリゴヌクレオチドを含む参照組成物の例は、本開示に詳細に記載される。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、提供される組成物中の第1の複数のオリゴヌクレオチドと比べ、異なる構造的要素（化学修飾、立体化学など）を有する。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、第1の複数のオリゴヌクレオチドが、キラル制御されたヌクレオチド間結合を1つ以上含むという点においてキラル制御される。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、第1の複数のオリゴヌクレオチドが、キラル制御されたヌクレオチド間結合を1〜20個含むという点においてキラル制御される。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、11個、12個、13個、14個、または15個含む。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ化学修飾を有するオリゴヌクレオチドの立体不規則的調製物である。一部の実施形態では、参照組成物は、立体異性体の混合物であり、一方で、提供される組成物は、1つの立体異性体の一本鎖RNA i 剤である。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、提供される組成物中の第1の複数のオリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を有する。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、提供される組成物中の第1の複数のオリゴヌクレオチドと同じ化学修飾を有する。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、提供される組成物中の第1の複数のオリゴヌクレオチドと同じ糖修飾を有する。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、提供される組成物中の第1の複数のオリゴヌクレオチドと同じ塩基修飾を有する。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、提供される組成物中の第1の複数のオリゴヌクレオチドと同じヌクレオチド間結合修飾を有する。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、提供される組成物中の第1の複数のオリゴヌクレオチドと同じ塩基配列及び同じ化学修飾を有する。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、提供される組成物中の第1の複数のオリゴヌクレオチドと同じ立体化学を有するが、異なる化学修飾（たとえば、塩基修飾、糖修飾、ヌクレオチド間結合修飾など）を有する。

【0054】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチドを含む組成物を提供し、オリゴヌクレオチドは、標的RNA配列に相補的または実質的に相補的であり、ヌクレオチドの総数で約15〜約49の長さを有し、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの非天然の塩基、糖、及び／またはヌクレオチド間結合を含む。

【0055】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA i 剤を含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、一本鎖RNA i 剤は、標的RNA配列に相補的または実質的に相補的であり、ヌクレオチドの総数で約15〜約49の長さを有し、標的特異的なRNA干渉を誘導する能力を有し、一本鎖RNA i 剤は、少なくとも1つの非天然の塩基、糖、及び／またはヌクレオチド間結合を含む。

【0056】

一部の実施形態では、長さは、ヌクレオチドの総数で15〜49、約17〜約49、17〜49、約19〜約29、19〜29、約19〜約25、19〜25、約19〜約23

、または19～23である。

【0057】

一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該第1の複数のオリゴヌクレオチドは、

- 1) 転写産物における標的配列に相補的または実質的に相補的な共通塩基配列を有し、
- 2) 1つ以上の修飾糖部分及び修飾ヌクレオチド間結合を含み、

オリゴヌクレオチド組成物は、それが転写産物と接触すると、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件の下で観察されるものと比較して転写産物のノックダウンが改善するという点において特徴付けられる。

【0058】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該第1の複数のオリゴヌクレオチドは、

- 1) 転写産物における標的配列に相補的な共通塩基配列を有し、
- 2) 1つ以上の修飾糖部分及び修飾ヌクレオチド間結合を含み、

オリゴヌクレオチド組成物は、それがRNA干渉系において転写産物と接触すると、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件の下で観察されるものと比較して転写産物のRNAi介在性ノックダウンが改善するという点において特徴付けられる。

【0059】

一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、

- 1) 塩基配列、
- 2) 骨格結合のパターン、
- 3) 骨格キラル中心のパターン、及び
- 4) 骨格リン修飾のパターン

によって定義される特定のオリゴヌクレオチド型のものである。

【0060】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、

- 1) 塩基配列、
- 2) 骨格結合のパターン、
- 3) 骨格キラル中心のパターン、及び
- 4) 骨格リン修飾のパターン

によって定義される特定のオリゴヌクレオチド型のものである。

【0061】

一部の実施形態では、本開示は、ある1つのPNPLA3オリゴヌクレオチド型の第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該オリゴヌクレオチド型は、

- 1) 塩基配列、
- 2) 骨格結合のパターン、
- 3) 骨格キラル中心のパターン、及び
- 4) 骨格リン修飾のパターン

によって定義され、

当該組成物は、特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して当該組成物が富化されるという点においてキラル制御され、

オリゴヌクレオチド組成物は、それが転写産物と接触すると、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件の下で観察され

10

20

30

40

50

るものと比較して転写産物のノックダウンが改善するという点において特徴付けられる。

【0062】

一部の実施形態では、本開示は、ある1つのPNPLA3オリゴヌクレオチド型の第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該オリゴヌクレオチド型は、

- 1) 塩基配列、
- 2) 骨格結合のパターン、
- 3) 骨格キラル中心のパターン、及び
- 4) 骨格リン修飾のパターン

によって定義され、

当該組成物は、特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して当該組成物が富化されるという点においてキラル制御され、

オリゴヌクレオチド組成物は、それがRNA干渉系において転写産物と接触すると、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件の下で観察されるものと比較して転写産物のRNA i 介在性ノックダウンが改善するという点において特徴付けられる。

【0063】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、図1に示される形式のいずれかを有するか、または図1に示される形式のいずれかに示される任意の構造的要素を有する。

【0064】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、図1に示される形式のいずれかを有するか、または図1に示される形式のいずれかに示される任意の構造的要素を有する。

【0065】

とりわけ、本開示は、開示の形式のさまざまなオリゴヌクレオチドが、いくつかの異なる遺伝子のいずれかにおけるいくつかの異なる配列のいずれかに対して標的化されると、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有することを示すデータを提示する。一部の実施形態では、本開示は、開示の形式のさまざまなRNA i 剤が、多くの異なる遺伝子のいずれかにおける多くの異なる配列のいずれかに対してRNA干渉を誘導する能力を有することを示すデータを提示する。

【0066】

一部の実施形態では、本明細書に記載され、及び／または示される構造のいずれかを有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、RNA干渉を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、本明細書に記載され、及び／または示される構造のいずれかを有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、RNAse H 介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。一部の実施形態では、本明細書に記載され、及び／または示される構造のいずれかを有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNAse H 介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意のオリゴヌクレオチドの任意の構造的要素、または本明細書に記載されるか、もしくは図1に示される任意の形式、を含む。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意のオリゴヌクレオチドの任意の構造的要素、または本明細書に記載されるか、もしくは図1に示される任意の形式、を含み、RNA干渉を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意のオリゴヌクレオチドの任意の構造的要素、または本明細書に記載されるか、もしくは図1に示される任意の形式、を含み、RNAse H 介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意のオリゴヌクレオチドの任意の構造的要素、または本明細書に記載されるか、もしくは図1に示される任意の形式、を含み、RNA干渉及び／またはRNAse H 介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。

10

20

30

40

50

【0067】

一部の実施形態では、RNAi剤は、5'末端構造、5'末端領域、シード領域、ポストシード領域、及び3'末端領域、ならびに任意選択の追加の化学的部分、のうちの任意の1つ以上を含む。一部の実施形態では、シード領域は、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意のシード領域である。一部の実施形態では、ポストシード領域は、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる、シード領域と3'末端領域との間の任意の領域であり得る。一部の実施形態では、3'末端領域は、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意の3'末端領域であり得る。一部の実施形態では、任意の任意選択の追加の化学的部分は、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意の任意選択の追加の化学的部分であり得る。本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意の個々の5'末端構造、5'末端領域、シード領域、ポストシード領域、3'末端領域、及び任意選択の追加の化学的部分を、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意の他の5'末端構造、5'末端領域、シード領域、ポストシード領域、3'末端領域、及び任意選択の追加の化学的部分と独立して組み合わせることができる。一部の実施形態では、非限定的な例として、一本鎖RNAi剤の領域は、5'末端構造、5'末端領域、シード領域、ポストシード領域、シード領域の一部、ポストシード領域の一部、または3'末端ジヌクレオチドである。

10

【0068】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、本明細書に開示の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列からなる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、本明細書に開示の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、本明細書に開示の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列の15個の連続塩基の配列を含む配列を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、本明細書に開示の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列の、最大で5つのミスマッチを有する20個の連続塩基の配列を含む配列を含む。

20

【0069】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、一本鎖RNAi干渉を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、一本鎖RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書に開示のオリゴヌクレオチドが標的とする任意の転写産物または遺伝子を標的とする配列を含む。

30

【0070】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、PNPLA3を標的とする。

【0071】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、PNPLA3遺伝子またはその遺伝子産物の活性、レベル、及び／または発現を低減または阻害するために使用することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、遺伝子またはその遺伝子産物の活性、レベル、及び／または発現を低減または阻害するために使用ことができ、遺伝子またはその遺伝子産物の異常または過剰な活性、レベル、及び／または発現、遺伝子またはその遺伝子産物における有害な変異、あるいは遺伝子またはその遺伝子産物の異常な組織分布または細胞間分布もしくは細胞内分布は、障害と関係し、障害を引き起こし、及び／または障害と関連する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、遺伝子またはその遺伝子産物の異常または過剰な活性、レベル、及び／または発現、あるいは遺伝子またはその遺伝子産物の異常な分布と関係し、それを引き起こし、及び／またはそれと関連する障害を治療し、及び／または当該障害を治療するための薬剤

40

50

を製造するために使用することができる。

【0072】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3を標的とする能力を有し、PNPLA3関連障害の治療及び／またはPNPLA3関連障害の治療物の製造に有用な、本明細書に開示のオリゴヌクレオチドの使用方法に関する。

【0073】

一部の実施形態では、遺伝子を標的とする能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の塩基配列の一部である塩基配列を含むか、または標的遺伝子の塩基配列の一部に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含む。一部の実施形態では、一部の長さは、少なくとも15塩基である。一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の塩基配列は、特定の塩基配列との最大ミスマッチ数が特定数である塩基配列を含むか、または当該塩基配列からなり得る。

【0074】

一部の実施形態では、ミスマッチは、2つの配列が最大限にアライメント及び比較されるときに塩基配列間または長さ間の差異である。非限定的な例として、一方の配列の特定の位置の塩基と、もう一方の配列の対応位置の塩基と、の間に差異が存在するのであれば、ミスマッチとして数えられる。したがって、たとえば、一方の配列のある1つの位置に特定の塩基（たとえば、A）が存在し、異なる塩基（たとえば、G、C、またはU）がもう一方の配列の対応位置に存在するのであれば、ミスマッチとして数えられる。たとえば、一方の配列のある1つの位置に塩基（たとえば、A）が存在し、もう一方の対応位置に塩基が存在しないか（たとえば、その位置は、リン酸-糖骨格を含むが、塩基は含まない脱塩基ヌクレオチドである）、またはその位置がスキップされるのであっても、ミスマッチとして数えられる。いずれかの配列（またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖）に一本鎖ニックが存在してもミスマッチとしては数えられないこともあり得、たとえば、一方の配列が5'-AG-3'という配列を含むが、もう一方の配列がAとGとの間に一本鎖ニックを有する5'-AG-3'という配列を含むのであれば、ミスマッチとしては数えられないことになる。塩基修飾は、一般に、ミスマッチとは見なされず、たとえば、一方の配列がCを含み、もう一方の配列が同じ位置に修飾C（たとえば、5mC）を含むのであれば、ミスマッチとしては数えられないこともあり得る。一部の実施形態では、ミスマッチを数えるという目的では、TがUに置き換わっていてもミスマッチとは見なされず、逆もまた同様である。

【0075】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、標的配列（たとえば、mRNAなどのRNA）に相補的または完全に相補的もしくは100%相補的であり、このことは、オリゴヌクレオチドの塩基配列が、標的配列に完全に相補的な（たとえば、ワトソンクリック塩基対形成を介して塩基対形成する）配列とのミスマッチを有さないことを意味する。いかなる特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、一本鎖RNAi剤については、5'末端ヌクレオチド部分または3'末端ジヌクレオチドが標的と塩基対を形成することは必ずしも必要ではないことを明記する。こうしたものは、ミスマッチであり得る。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、少数の内部ミスマッチを有し得るが、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少、及び／またはNaseH介在性ノックダウン及び／またはRNA干渉、を依然として誘導し得る。PNPLA3オリゴヌクレオチド（たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤）の第1の塩基配列が、標的配列に100%相補的な参照塩基配列とのミスマッチを有し、その数が少数であれば、第1の塩基配列は、標的配列に実質的に相補的である。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド（たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤）は、標的配列に相補的または実質的に相補的な塩基配列を有し得る。一部の実施形態では、相補性は、ワトソンクリック塩基対（グアニン-シトシン及びアデニン-チミン／ウラシル）に基づいて決定され、グアニン、シトシン、アデニン、チミン、ウラシルは、任意かつ

10

20

30

40

50

独立して修飾され得るが、非修飾の場合に見られるその対形成水素結合パターンを維持する。一部の実施形態では、別の配列に相補的な配列は、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、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個の塩基を含む。

【0076】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド組成物、またはオリゴヌクレオチド型は、骨格結合の共通パターンを有する。一部の実施形態では、骨格結合の共通パターンは、少なくとも10個の修飾ヌクレオチド間結合を含む。

10

【0077】

一部の実施形態では、骨格結合の共通パターンは、少なくとも10個のホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド組成物、またはオリゴヌクレオチド型は、骨格キラル中心の共通パターンを有する。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp配置のヌクレオチド間結合を少なくとも1つ含む。一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp配置のホスホロチオエートであるヌクレオチド間結合を少なくとも1つ含む。一部の実施形態では、提供される組成物中のオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、提供される組成物は、当該組成物が、所定レベルの個々のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドを含むという点でキラル制御されたPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物であり、ここで、PNPLA3オリゴヌクレオチド型は以下により定義される：

20

- 1) 塩基配列、
- 2) 骨格結合のパターン、
- 3) 骨格キラル中心のパターン、及び
- 4) 骨格リン修飾のパターン。

【0078】

上述され、当分野に置いて理解されるように、一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列は、当該オリゴヌクレオチド中のヌクレオシド残基の同一性及び／または修飾の状態（たとえば、アデニン、シトシン、グアノシン、チミン、及びウラシルなどの標準的な天然ヌクレオチドと比較した、糖及び／または塩基の構成要素の状態）を指すことができ、及び／またはかかる残基のハイブリダイゼーション特性（すなわち、特定の相補的残基とハイブリダイズする能力）を指すことができる。

30

【0079】

一部の実施形態では、特定のオリゴヌクレオチド型は、以下により定義され得る：

- 1 A) 塩基同一性、
- 1 B) 塩基修飾のパターン、
- 1 C) 糖修飾のパターン、
- 2) 骨格結合のパターン、
- 3) 骨格キラル中心のパターン、及び
- 4) 骨格リン修飾のパターン。

40

従って一部の実施形態では、特定のオリゴヌクレオチド型は、同一の塩基を共有し得るが、塩基修飾及び／または糖修飾のそれらのパターンにおいて異なっている。一部の実施形態では、特定のオリゴヌクレオチド型は、同一の塩基及び塩基修飾のパターン（たとえば塩基修飾の不在を含む）を共有し得るが、糖修飾のパターンにおいて異なってもよい。

【0080】

一部の実施形態では、特定のオリゴヌクレオチド型は、同じ塩基配列（長さを含む）、糖及び塩基部分への同じ化学修飾パターン、同じ骨格結合パターン（たとえば、天然リン酸結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロチオエートトリエステル結合、及びそれらの組み合わせのパターン）、同じ骨格キラル中心パターン（たとえば、キラルヌクレオチド

50

間結合の立体化学（ R_p/S_p ）パターン）、及び同じ骨格リン修飾パターン（たとえば、ヌクレオチド間リン原子上の修飾パターン（ $-S-$ など）、及び式Ⅰの $-L-R1$ ）を有するという点で化学的に同一である。

【0081】

とりわけ、本開示は、特性を最適化（たとえば、一本鎖RNA干渉、RNAse H介在性ロックダウンなどを改善）するためのオリゴヌクレオチド組成物及び技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチド及びその組成物の投与と関連する免疫応答を弱めるための方法（すなわち、組成物におけるオリゴヌクレオチドに対する望ましくない免疫応答が、たとえば同等または同一のヌクレオチド配列の参照ヌクレオチド組成物で観察されるものと比較して、低減されるようにオリゴヌクレオチド組成物の投与するもの）を提供する。一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチド及びその組成物による、ある特定のタンパク質への結合を増加させるための方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチド及びその組成物による、ある特定のタンパク質への結合を増加させるための方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチド及びその組成物の送達を増進させるための方法を提供する。とりわけ、本開示は、オリゴヌクレオチドをその標的に最適に送達するには、一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドが所望の位置に輸送され得るようにある特定のタンパク質にオリゴヌクレオチドが結合することと、ある特定のタンパク質からオリゴヌクレオチドが適切に遊離して、その所望の機能（たとえば、その標的とのハイブリダイゼーション、その標的の切断、翻訳の阻害、転写産物プロセッシングの調節など）を発揮し得るようにオリゴヌクレオチドが遊離することと、のバランスが必要であるという認識を含む。本開示に例示されるように、本開示は、とりわけ、化学修飾及び／または立体化学を介してオリゴヌクレオチド特性の改善を達成できるという認識を有する。

【0082】

一部の実施形態では、本開示は、疾患を治療または予防するための方法を提供し、当該方法は、本明細書に記載のPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を対象に投与することを含む。

【0083】

一部の実施形態では、疾患は、提供される組成物が投与された後に、一本鎖RNA干渉を介して標的核酸がロックダウンされることで、治癒、回復、または新たな有益な機能が導入され得る疾患である。

【0084】

一部の実施形態では、共通配列は、表1Aから選択される配列を含む。一部の実施形態では、共通配列は、表1Aから選択される配列である。一部の実施形態では、骨格キラル中心のパターンは、表1Aに記載されるものから選択される。

【0085】

一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物の投与を含む方法を提供し、当該組成物は、複数のオリゴヌクレオチドを含む参照組成物と比較して送達の改善を示し、当該参照組成物に含まれる当該複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、同様に共通塩基配列を有するが、当該複数のオリゴヌクレオチドは、

この参照の当該複数のオリゴヌクレオチドに含まれる個々のオリゴヌクレオチドの立体化学構造が互いに異なり、及び／または

この参照の当該複数のオリゴヌクレオチドに含まれる少なくともいくつかのオリゴヌクレオチドが、組成物の当該複数のオリゴヌクレオチドが示す構造とは異なる構造を有するという点において第1の複数のオリゴヌクレオチドとは構造的に異なる。

【0086】

一部の実施形態では、本開示は、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有し、共通ヌクレオチド配列を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物の投与方法を提供し、この改善には、

第1の複数のオリゴヌクレオチドを構成するPNPLA3オリゴヌクレオチドの投与が、同じ共通ヌクレオチド配列の参照オリゴヌクレオチド組成物と比較して送達が改善することによって特徴付けられるものであることを含む。

【0087】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有し、共通ヌクレオチド配列を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物の投与方法を提供し、この改善には、

第1の複数のオリゴヌクレオチドを構成するPNPLA3オリゴヌクレオチドの投与が、同じ共通ヌクレオチド配列の参照オリゴヌクレオチド組成物と比較して送達が改善することによって特徴付けられるものであることを含む。

10

【0088】

一部の実施形態では、本開示は、表（限定されないが、表1Aを含む）またはその他の箇所で本明細書に開示されるもの、のいずれかから選択されるPNPLA3オリゴヌクレオチドの一本鎖RNAi剤を提供する。一部の実施形態では、本開示は、表（限定されないが、表1Aを含む）またはその他の箇所で本明細書に開示されるもの、のいずれかから選択されるPNPLA3オリゴヌクレオチドの一本鎖RNAi剤を提供し、オリゴヌクレオチドは、脂質部分に複合体化される。

【0089】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、脂質部分を含む。一部の実施形態では、脂質部分は、脂質との複合体化によって組み込まれる。一部の実施形態では、脂質部分は、脂肪酸である。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、脂肪酸に複合体化される。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤は、脂質をさらに含む。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤は、9番目または11番目（5'末端から数えた位置）のヌクレオチドに複合体化された脂質部分を含む。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、塩基において脂肪酸に複合体化される。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤は、脂質部分を含む。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤は、9番目または11番目（5'末端から数えた位置）のヌクレオチドの塩基に複合体化された脂質部分を含む。

20

【0090】

一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤は、前述の組成物のいずれか1つであって、1つ以上の追加の構成要素をさらに含む組成物である。

【0091】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNase H機序とRNAi機序との両方を介して標的転写産物（たとえば、RNA）を分解する能力を有する。

【0092】

一部の実施形態では、脂質部分をPNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化することによって、当該オリゴヌクレオチドの少なくとも1つの特性が改善される。一部の実施形態では、改善される特性としては、活性の増加（例えば、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導し、及び／または一本鎖RNA干渉を誘導し、及び／またはRNase H介在性ノックダウンを誘導する能力の増加）及び／または組織分布の改善が挙げられる。一部の実施形態では、組織は、筋組織である。一部の実施形態では、組織は骨格筋、腓腹筋、三頭筋、心臓または横隔膜である。一部の実施形態では、改善される特性としては、hTLR9アゴニスト活性の低下が挙げられる。一部の実施形態では、改善される特性としては、hTLR9アンタゴニスト活性が挙げられる。一部の実施形態では、改善される特性としては、hTLR9アンタゴニスト活性の上昇が挙げられる。

30

40

【0093】

一般に、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物の特性は、任意の適切なアッセイ

50

を使用して評価することができる。

【0094】

当業者であれば、特定のオリゴヌクレオチド組成物に対して適切なアッセイを認識し、及び／または開発することは容易に可能であろう。

【0095】

定義

本明細書中で使用される場合、他に示されない限り、以下の定義が適用される。本開示の目的に対し、化学元素は、元素の周期律表、CASバージョン、Handbook of Chemistry and Physics、第75版に従って同定される。さらに、有機化学の一般原則は、“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999、及び“March's Advanced Organic Chemistry”, 5th Ed., Ed.: Smith, M. B及びMarch, J., John Wiley & Sons, New York: 2001に記載されている。

【0096】

本明細書中で使用されるとき、「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1つ以上を意味し得る。請求項中で使用されるとき、「1つの(a)」または「1つの(an)」という語は、「含む(comprising)」という語とともに使用される場合には、1つまたはそれ以上を意味し得る。本明細書中で使用されるとき、「別の(another)」は、少なくとも2つ目またはそれ以上を意味し得る。

【0097】

「約」という用語は、該用語が言及する公称値の±10%、一実施形態では±5%、別の実施形態では±2%の近似値を示す、相対的な用語を指す。本開示の分野では、この程度の近似は、その値がより狭い範囲を要することが明記されていない限り、妥当である。

【0098】

脂肪族：本明細書で使用される場合には、「脂肪族」は、完全に飽和した、もしくは1つ以上の不飽和単位を含む、直鎖状の（即ち、非分枝状の）または分枝状の、置換または非置換の炭化水素鎖、または完全に飽和した、もしくは1つ以上の不飽和単位（芳香族ではない）を含む、置換または非置換の単環式、二環式または多環式の炭化水素環、またはそれらの組み合わせを意味する。一部の実施形態では、脂肪族基は1～50個の脂肪族炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、脂肪族基は1～20個の脂肪族炭素原子を含む。別の実施形態では、脂肪族基は1～10個の脂肪族炭素原子を含む。別の実施形態では、脂肪族基は1～9個の脂肪族炭素原子を含む。別の実施形態では、脂肪族基は1～8個の脂肪族炭素原子を含む。別の実施形態では、脂肪族基は1～7個の脂肪族炭素原子を含む。別の実施形態では、脂肪族基は1～6個の脂肪族炭素原子を含む。さらに別の実施形態では、脂肪族基は1～5個の脂肪族炭素原子を含み、さらに他の実施形態では、脂肪族基は1、2、3または4個の脂肪族炭素原子を含む。好適な脂肪族基には、直鎖状のまたは分枝状の、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル基及びそれらのハイブリッド（（シクロアルキル）アルキル、（シクロアルケニル）アルキル、または（シクロアルキル）アルケニルなど）が含まれるが、これらに限定されない。

【0099】

アルケニル：本明細書で使用される「アルケニル」は、本明細書で定義されるように1つまたは複数の二重結合を有するアルキル基を指す。

【0100】

アルキル：本明細書で使用される「アルキル」という用語は、当該技術分野で通常の意味を有し、直鎖アルキル基、分枝鎖アルキル基、シクロアルキル（脂環式）基、アルキル置換シクロアルキル基、及びシクロアルキル置換アルキル基を含む飽和脂肪族基を含み得る。いくつかの実施形態では、アルキルは1～100個の炭素原子を有する。ある特定の実施形態では、直鎖アルキルまたは分枝鎖アルキルはその主鎖中に約1～20個（例えば、直鎖の場合はC1-C20、分枝鎖の場合はC2-C20）、あるいは約1～10個の

炭素原子を有する。いくつかの実施形態では、シクロアルキル環は、環が単環式、二環式または多環式であるその環構造中に約 3 ～ 10 個の炭素原子、あるいは環構造中に約 5、6 または 7 個の炭素を有する。一部の実施形態では、アルキル基は低級アルキル基であってもよく、低級アルキル基は 1 ～ 4 個の炭素原子（例えば、直鎖低級アルキルの場合は C 1 - C 4）を含む。

【0101】

アルキニル：本明細書で使用される「アルキニル」という用語は、本明細書で定義されるように 1 つまたは複数の三重結合を有するアルキル基を指す。

【0102】

アンチセンス：本明細書で使用される「アンチセンス」という用語は、標的核酸に対して相補的であるまたは実質的に相補的である塩基配列を有し、該標的核酸にハイブリダイズする能力を有するオリゴヌクレオチドまたは他の核酸の特徴を指す。一部の実施形態では、標的核酸は、標的遺伝子 mRNA である。一部の実施形態では、ハイブリダイゼーションは、1 つの作用、たとえば、標的核酸もしくはその遺伝子産物のレベル、発現もしくは活性の減少にとって必要であるか、またはその結果をもたらす、本明細書で使用される「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は、標的核酸に相補的なオリゴヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的核酸またはその遺伝子産物のレベル、発現または活性の減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNase H、立体障害及び／または RNA 干渉に関係する機序を介して、標的核酸またはその遺伝子産物のレベル、発現または活性の減少を誘導する能力を有する。

【0103】

およそ：本明細書中で使用される場合、数に関連した場合の「およそ」または「約」という用語は、概して、特に明記もしくは特に文脈から明白でない限り、（かかる数が、0 % より小さいまたは 100 % を越える可能性がある値である場合を除き）当該数のいずれの方向（より大きいまたはより小さい）における、5 %、10 %、15 %、または 20 % の範囲内の数を含むととらえられる。一部の実施形態では、投与量に関連した場合の「約」という用語の使用は、 $\pm 5 \text{ mg/kg/day}$ を意味する。

【0104】

アリール：本明細書において使用される場合、単独で、または「アラルキル」、「アラルコキシ」若しくは「アリールオキシアルキル」内のより大きな部分の一部として使用される「アリール」という用語は、総計 5 ～ 30 個の環員を有する単環式、二環式、または多環式環系を指し、系内の少なくとも 1 個の環は芳香族である。いくつかの実施形態では、アリール基は、総計 5 ～ 14 個の環員を有する単環式、二環式、または多環式環系であり、系内の少なくとも 1 個の環は芳香族であり、系中の各環は 3 ～ 7 個の環員を含む。いくつかの実施形態では、アリール基はビアリール基である。「アリール」は、「アリール環」と互換的に使用され得る。本開示のいくつかの実施形態では、「アリール」は、フェニル、ピフェニル、ナフチル、ピナフチル、アントラシル等を含み、1 つまたは複数の置換基を有し得る芳香環系を指すが、これらに限定されない。また、本明細書で使用される「アリール」という用語の範囲内に含まれるのは、芳香環が 1 個または複数の非芳香環に縮合している基、例えばインダニル、フタルイミジル、ナフチミジル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロナフチル等である。

【0105】

特徴的な部分：本明細書において使用される場合、タンパク質またはポリペプチドの「特徴的な部分」という表現は、連続的アミノ酸、または連続的アミノ酸の集まりを含む部分であり、それら両方ともがタンパク質またはポリペプチドの特徴である。かかる各連続鎖は、概して、少なくとも 2 つのアミノ酸を含むであろう。概して、特徴的部分は、上記で特定される配列同一性に加えて、関連無傷タンパク質と少なくとも 1 つの機能的特徴を共有する部分である。

【0106】

特徴的な構造的要素：「特徴的構造要素」または「構造的要素」という用語は、ポリペプチド、低分子、または核酸のファミリーの全メンバーに存在する、明確に異なる構造的要素を指し、ゆえに当該ファミリーのメンバーを定義するために当業者により使用され得る。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤の構造的要素としては、限定されないが、5'末端構造、5'末端領域、5'ヌクレオチド部分、シード領域、ポストシード領域、3'末端領域、3'末端ジヌクレオチド、3'キャップ、修飾パターン、骨格における立体化学パターン、追加の化学的部分などが挙げられる。

【0107】

同等：「同等」という用語は、得られた結果または観察された現象の比較が可能な、互いに十分に類似した状態または環境の2つ（またはそれ以上）の設定を記載するために、本明細書で使用される。一部の実施形態では、状態または環境の同等な設定は、複数の実質的に同一の特徴、及び1つまたは少数の変更された特徴により特徴付けられる。当業者は、条件の設定は、十分な数と実質的に同一な特性の型により特徴づけられ、当該異なる条件設定または環境設定下で得られた結果と観察された現象における差異が、変更されたそれら特性における変化により引き起こされた、または変化の指標であると合理的に結論づけることが正当化されたときに互いに同等であると認識するであろう。

【0108】

脂環式：「脂環式」、「炭素環式」、「カルボシクリル」、「炭素環式ラジカル」、及び「炭素環」という用語は、互換的に使用され、本明細書で使用されるように、3～30個の環員を別段の指定がない限り有する、本明細書に記載の、飽和または部分不飽和であるが、非芳香族である環式脂肪族の単環式環系、二環式環系、または多環式環系を指す。脂環式基は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、シクロヘプテニル、シクロオクチル、シクロオクテニル、ノルボルニル、アダマンチル、及びシクロオクタジエニルを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、脂環式基は、3～6個の炭素有する。一部の実施形態では、脂環式基は、飽和しており、シクロアルキルである。「脂環式」という用語はまた、1つ若しくは複数の芳香または非芳香環、例えばデカヒドロナフチルまたはテトラヒドロナフチルに縮合している脂肪族環を含むことができる。いくつかの実施形態では、脂環式基は二環式である。いくつかの実施形態では、脂環式基は三環式である。いくつかの実施形態では、脂環式基は多環式である。いくつかの実施形態では、「脂環式」は、完全に飽和している若しくは1つ若しくは複数の不飽和単位を含むが、芳香族ではなく、分子の残りの部分へ単一の結合点を有するC₃–C₆単環式炭化水素、またはC₈–C₁₀二環式炭化水素もしくはC₈–C₁₀多環式炭化水素、または、完全に飽和している若しくは1つ若しくは複数の不飽和単位を含むが、芳香族ではなく、分子の残りの部分へ単一の結合点を有するC₉–C₁₆多環式炭化水素を指す。

【0109】

ヘテロ脂肪族：「ヘテロ脂肪族」という用語は、当技術分野で通常の意味が与えられ、1個以上の炭素原子が独立して1個以上のヘテロ原子（例えば、酸素、窒素、硫黄、ケイ素、リン等）で置換された、本明細書に記載の脂肪族基を指す。一部の実施形態では、C、CH、CH₂、及びCH₃から選択される1個以上の単位は、独立して1個以上のヘテロ原子（その酸化型及び／または置換型を含む）により置換される。一部の実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルキルである。一部の実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルケニルである。

【0110】

ヘテロアルキル：本明細書において使用される場合、「ヘテロアルキル」という用語は、当技術分野で通常の意味が与えられ、1個以上の炭素原子が独立して1個以上のヘテロ原子（例えば、酸素、窒素、硫黄、ケイ素、リン等）で置換された、本明細書に記載の脂肪族基を指す。ヘテロアルキル基の例としては、アルコキシ、ポリ（エチレングリコール）ー、アルキル置換アミノ、テトラヒドロフラニル、ピペリジニル、モルホリニル等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0111】

ヘテロアリール：本明細書において使用される場合、単独で使用される、またはより大きい部分、例えば「ヘテロアラルキル」または「ヘテロアラルコキシ」の一部として使用される「ヘテロアリール」及び「ヘテロa r r」という用語は、総計5～30個の環員を有する単環式、二環式または多環式環系を指し、系内の少なくとも1個の環は芳香族であり、少なくとも1個の芳香環原子はヘテロ原子である。ヘテロアリール基は、いくつかの実施形態では5～10個の環原子（即ち、単環式、二環式または多環式）、いくつかの実施形態では5、6、9、または10個の環原子を有する基である。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基は、環状配列中で共有され、及び炭素原子に加えて1～5個のヘテロ原子を有する、6、10、または14個の π 電子を有する。ヘテロアリール基には、チエニル、フラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、インドリジニル、プリニル、ナフチリジニル及びプテリジニルが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヘテロアリールはヘテロビアリール基、例えばビピリジル等である。本明細書で使用される「ヘテロアリール」及び「ヘテロアラルキル」という用語はまた、ヘテロ芳香環が1個若しくは複数のアリール、脂環式またはヘテロシクリル環に縮合している基を含み、ここでラジカルまたは結合点はヘテロ芳香環上にある。非限定的な例としては、インドリル、イソインドリル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、ジベンゾフラニル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンズチアゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、4H-キノリジニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、及びピリド[2, 3-b]-1, 4-オキサジニ-3(4H)-オンが挙げられる。ヘテロアリール基は、単環式、二環式または多環式であってもよい。「ヘテロアリール」は、「ヘテロアリール環」、「ヘテロアリール基」または「ヘテロ芳香族」という用語と互換的に使用されることができ、これらの用語のいずれかは、置換されていてもよい環を含む。「ヘテロアラルキル」という用語は、ヘテロアリール基で置換されたアルキル基を指し、アルキル部分及びヘテロアリール部分は、独立して置換されていてもよい。

【0112】

ヘテロ原子：本明細書において使用される場合、「ヘテロ原子」という用語は、炭素でも水素でもない原子を意味する。いくつかの実施形態では、ヘテロ原子は、（窒素、硫黄、リン、またはケイ素の任意の酸化形態、任意の塩基性窒素または複素環式環の置換可能な窒素の四級化形態（例えば、3, 4-ジヒドロ-2H-ピロリル中のN）、（ピロリジニル中の）NH、または（N-置換ピロリジニル中の）NR+等を含む）酸素、硫黄、窒素、リン、またはケイ素である。

【0113】

複素環：本明細書において使用される場合、「複素環」、「ヘテロシクリル」、「複素環式ラジカル」、及び「複素環式環」という用語は、相互交換可能に使用され、飽和または部分不飽和であり、1個以上のヘテロ原子環原子を有する単環式、二環式、または多環式環部分（例えば3～30員）を指す。いくつかの実施形態では、ヘテロシクリル基は、炭素原子に加えて1個または複数の、好ましくは上で定義した1～4個のヘテロ原子を有する飽和または部分不飽和のいずれかの、安定な5員～7員単環式または7員～10員二環式複素環式部分である。複素環の環原子に関して使用される場合、「窒素」という用語は置換された窒素を含む。例として、酸素、硫黄、及び窒素から選択される0～3個のヘテロ原子を有する飽和または部分不飽和の環において、窒素は（3, 4-ジヒドロ-2H-ピロリル中の）N、（ピロリジニル中の）NH、または（N-置換ピロリジニル中の）+NRであることができる。複素環式環は、安定な構造をもたらす任意のヘテロ原子または炭素原子でそのペンダント基に結合することができ、任意の環原子は置換されていてもよい。このような飽和または部分不飽和複素環式ラジカルの例としては、テトラヒドロ

フラニル、テトラヒドロチエニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピロリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オキサゾリジニル、ピペラジニル、ジオキサニル、ジオキサラニル、ジアゼビニル、オキサゼビニル、チアゼビニル、モルホリニル、及びキヌクリジニルが挙げられるが、これらに限定されない。「複素環」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロシクリル環」、「複素環式基」、「複素環式基」、「複素環式部分」、及び「複素環式ラジカル」という用語は、本明細書では互換的に使用され、また、ヘテロシクリル環が1つ若しくは複数のアリール、ヘテロアリール、または脂環式環、例えばインドリニル、3H-インドリル、クロマニル、フェナントリジニル、若しくはテトラヒドロキノリニル、に縮合した基を含む。ヘテロシクリル基は、単環式、二環式、または多環式であってもよい。「ヘテロシクリルアルキル」という用語は、ヘテロシクリルで置換されたアルキル基を指し、アルキル部分及びヘテロシクリル部分は、独立して置換されていてもよい。

10

【0114】

低級アルキル：「低級アルキル」という用語は、 C_{1-4} の直線状または分枝状のアルキル基を指す。低級アルキル基の例は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、及びtert-ブチルである。

【0115】

低級ハロアルキル：「低級ハロアルキル」という用語は、1つ以上のハロゲン原子で置換された C_{1-4} の直線状または分枝状のアルキル基を指す。

【0116】

任意で置換された：本明細書において記載される場合、たとえば本開示のオリゴヌクレオチドは、任意で置換された及び／または置換された部分を含有してもよい。一般に、「置換された」は、「任意に」という用語が前にあるか否かにかかわらず、指定された部分の1つまたは複数の水素が好適な置換基で置換されていることを意味する。特に指示しない限り、「置換されていてもよい」基は、基の各置換可能な位置に好適な置換基を有していてもよく、任意の所定の構造中の2つ以上の位置が特定の基から選択される2つ以上の置換基で置換され得る場合、その置換基はあらゆる位置で同じであってもまたは異なってもよい。一部の実施形態では、任意で置換される基は、置換されない。本開示によって想定される置換基の組み合わせは、好ましくは、安定または化学的に実現可能な化合物の形成をもたらす置換基である。本明細書で使用される「安定な」という用語は、化合物の産生、検出、並びに、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される1つまたは複数の目的のためのそれらの回収、精製、及び使用を可能にする条件にさらされた場合に、実質的に改変されない化合物を指す。

20

30

【0117】

置換可能な原子（たとえば、適切な炭素原子）に対する好適な一価置換基は、独立して、ハロゲン； $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$ ； $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$ ； $-O(CH_2)_{0-4}R^\circ$ ； $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$ ； R° で置換されていてもよい $-(CH_2)_{0-4}Ph$ ； R° で置換されていてもよい $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$ ； R° で置換されていてもよい $-CH=CHPh$ ； R° で置換されていてもよい $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -ピリジル； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-N_3$ ； $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$ ； $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ； $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$ ； $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ； $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$ ； $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$ ； $-C(S)R^\circ$ ； $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$ ； $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$ ； $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^\circ$ ， $-SC(S)SR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$ ； $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$ ； $-C(S)NR^\circ_2$ ； $-C(S)SR^\circ$ ； $-SC(S)SR^\circ$ ， $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$ ； $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$ ； $-C(O)C(O)R^\circ$ ； $-C(O)CH_2C(O)$

40

50

R° ; $-C(NOR^{\circ})R^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^{\circ}$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^{\circ}$; $-S(O)_2NR^{\circ}_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^{\circ}$; $-N(R^{\circ})S(O)_2NR^{\circ}_2$; $-N(R^{\circ})S(O)_2R^{\circ}$; $-N(OR^{\circ})R^{\circ}$; $-C(NH)NR^{\circ}_2$; $-Si(R)_3$; $-OSi(R)_3$; $-B(R)_2$; $-OB(R)_2$; $-OB(OR)_2$; $-P(R)_2$; $-P(OR)_2$; $-OP(R)_2$; $-OP(OR)_2$; $-P(O)(R)_2$; $-P(O)(OR)_2$; $-OP(O)(R)_2$; $-OP(O)(OR)_2$; $-OP(O)(OR)(SR)$; $-SP(O)(R)_2$; $-SP(O)(OR)_2$; $-N(R)P(O)(R)_2$; $-N(R)P(O)(OR)_2$; $-P(R)_2[B(R)_3]$; $-P(OR)_2[B(R)_3]$; $-OP(R)_2[B(R)_3]$; $-OP(OR)_2[B(R)_3]$; $-(C_{1-4}$ 直鎖若しくは分枝鎖のアルキレン) $O-N(R^{\circ})_2$; または、 $-(C_{1-4}$ 直鎖若しくは分枝鎖のアルキレン) $C(O)O-N(R^{\circ})_2$ 、(式中、各 R° は、以下に定義されるように置換されていてもよく、独立して、水素、 C_{1-20} 脂肪族、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立して選択される1~5個のヘテロ原子を有する C_{1-20} 、ヘテロ脂肪族、 $-CH_2-(C_{6-14}$ アリール)、 $-O(CH_2)_{0-1}$ (アリール)、 $(C_{6-14}$ アリール)、 $-CH_2-(5\sim 14$ 員ヘテロアリール環)、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立して選択される0~5個のヘテロ原子を有する5~20員の、単環式、二環式、若しくは多環式の、飽和、部分不飽和、若しくはアリール環であり、または、上記定義にかかわらず、独立して出現する2つの $^{\circ}$ は、それらの介在する原子と一緒に、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立して選択される0~5個のヘテロ原子を有する5~20員の、単環式、二環式、若しくは多環式の、飽和、部分不飽和、若しくはアリール環を形成し、これらは以下に定義されるように置換されていてもよい)である。

【0118】

好適な R° 上の一価置換基(または独立して出現する2つの R° がその介在する原子と一緒に形成する環)は、独立して、ハロゲン、 $-(CH_2)_{0-2}R^{\bullet}$ 、 $-(H\text{口}R^{\bullet})$ 、 $-(CH_2)_{0-2}OH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}OR^{\bullet}$ 、 $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^{\bullet})_2$; $-O(H\text{口}R^{\bullet})$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^{\bullet}$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^{\bullet}$ 、 $-(CH_2)_{0-2}SR^{\bullet}$ 、 $-(CH_2)_{0-2}SH$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NH_2$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NHR^{\bullet}$ 、 $-(CH_2)_{0-2}NR^{\bullet}_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SiR^{\bullet}_3$ 、 $-OSiR^{\bullet}_3$ 、 $-C(O)SR^{\bullet}$ 、 $-(C_{1-4}$ 直鎖若しくは分枝鎖のアルキレン) $C(O)OR^{\bullet}$ 、または $-SSR^{\bullet}$ 、(式中、各 $R^{\bullet}$ は、非置換の、若しくは「ハ口」が前に付く場合には1つ若しくは複数のハロゲンでのみ置換され、及び、独立して、 C_{1-4} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、ならびに窒素、酸素及び硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有する5~6員の、飽和、部分不飽和、若しくはアリール環から選択される)である。 R° の飽和炭素原子上の好適な二価置換基は、 $=O$ 及び $=S$ を含む。

【0119】

好適な二価置換基(たとえば、適切な炭素原子に対するもの)は、独立して、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=NNR^*_2$ 、 $=NNHC(O)R^*$ 、 $=NNHC(O)OR^*$ 、 $=NNHS(O)_2R^*$ 、 $=NR^*$ 、 $=NOR^*$ 、 $-O(C(R^*_2))_{2-3}O-$ 、または $-S(C(R^*_2))_{2-3}S-$ 、(式中、独立して出現する各 R^* は、水素、以下に定義されるように置換されていてもよい C_{1-6} 脂肪族、ならびに、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有する非置換の5~6員の、飽和、部分不飽和、若しくはアリール環から選択される)である。「置換されていてもよい」基の隣接の置換可能な炭素に結合している好適な二価置換基は、 $-O(CR^*_2)_{2-3}O-$ 、(式中、独立して出現する各 R^* は、水素、以下に定義されるように置換されていてもよい C_{1-6} 脂肪族、ならびに、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される0~4個のヘテロ原子を有する非置換の5~6員の、飽和、部分不飽和、若しくはアリール環から選択される)を含む。

【0120】

R^* の脂肪族基上の好適な置換基は、独立してハロゲン、 $-R^{\bullet}$ 、 $-(H\text{口}R^{\bullet})$ 、 $-O$

H、 $-OR^{\bullet}$ 、 $-O$ （ハロ $R^{\bullet}$ ）、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^{\bullet}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^{\bullet}$ 、 $-NR^{\bullet}_2$ 、または $-NO_2$ であり、式中、各 $R^{\bullet}$ は、非置換であるか、または「ハロ」が前に付く場合には1個以上のハロゲンでのみ置換され、及び独立して、 C_{1-4} 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ 、または窒素、酸素及び硫黄から独立して選択される0～4個のヘテロ原子を有する5～6員の、飽和、部分不飽和もしくはアリールの環である。

【0121】

部分不飽和：本明細書で使用される「部分不飽和」という用語は、少なくとも1つの二重または三重結合を含む部分を指す。「部分不飽和」という用語は、不飽和の複数の部位を有する環を含むことが意図されるが、本明細書に定義されるアリール部分及びヘテロアリール部分のいずれも含むことを意図するものではない。

【0122】

RNA干渉：本明細書で使用される「RNA干渉」または「RNAi」という用語は、RISC（RNA誘導型サイレンシング複合体）が関与する、転写後の標的遺伝子サイレンシングプロセスを指す。報告によれば、より長いdsRNAがリボヌクレアーゼIII（Dicer）によって切断されて、siRNAと呼ばれる、より短い断片へと変換されると、RNAiのプロセスが天然に生じる。天然に生成するsiRNA（低分子干渉RNA）は、典型的には、長さが約21～23ヌクレオチドであり、約19塩基対の二重鎖及び2つの一本鎖オーバーハングを有し、典型的には、RNAである。報告によれば、こうしたRNAセグメントは、次に、標的核酸（mRNAまたはmRNA前駆体（pre-mRNA）など）の分解を誘導する。報告によれば、Dicerは、翻訳制御に関与する保存された構造を有する前駆体RNAから21ヌクレオチド及び22ヌクレオチドの小分子RNA（stRNA）を切り出すことにも関与している。Hutvagner et al. 2001, Science, 293, 834。RNAiは、標的配列（たとえば、標的mRNAにおけるもの）に相補的または実質的に相補的な配列を含む一本鎖または二本鎖のオリゴヌクレオチドによって媒介され得ることが当業者に知られている。したがって、本開示の実施形態の一部では、本明細書に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドは、RNAi剤として働き得るものであり、一部の実施形態では、本明細書に記載の二本鎖オリゴヌクレオチドは、RNAi剤として働き得るものである。一部の実施形態では、RNAi応答には、RNA誘導型サイレンシング複合体（RISC）と一般に称されるエンドヌクレアーゼ複合体が関与し、RISCは、siRNAのアンチセンス鎖に相補的な一本鎖mRNAの切断を誘導する。一部の実施形態では、RISCは、一本鎖RNAi剤として機能し得る提供されるオリゴヌクレオチドに相補的な標的RNAの切断を誘導する。一部の実施形態では、siRNA二重鎖RNAi剤またはsiRNA一本鎖RNAi剤のアンチセンス鎖に相補的な領域の中央で標的RNAの切断が生じる。一部の実施形態では、RISC経路が関与する機序においてRNA干渉を誘導し得る一本鎖RNAi剤として働く一本鎖オリゴヌクレオチドによってRNA干渉が誘導される。

【0123】

RNAi剤：本明細書で使用される「RNAi剤」、「iRNA剤」という用語、及び同様のものは、標的遺伝子産物（たとえば、標的遺伝子の転写産物（pre-mRNA）またはmRNAなど）が発現中の系または発現する系に投与されると、その標的遺伝子産物のレベル及び／または活性（たとえば、翻訳）を低減するPNPLA3オリゴヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、RNAi剤は、一本鎖オリゴヌクレオチドもしくは二本鎖オリゴヌクレオチドであるか、または一本鎖オリゴヌクレオチドもしくは二本鎖オリゴヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、RNAi剤は、siRNA（短鎖阻害性RNA）、shRNA（短鎖ヘアピンRNAまたは低分子ヘアピンRNA）、dsRNA（二本鎖RNA）、マイクロRNAなどとして当該技術分野において認識される構造を有し得る。一部の実施形態では、RNAi剤は、RNA標的（たとえば、標的遺伝子の転写産物）に特異的に結合し得る。一部の実施形態では、RNAi剤は、その標的に結合すると、RISC（RNA誘導型サイレンシング複合体）に組み込まれ

る。一部の実施形態では、RNA i 剤は、その標的の分解を誘導し、及び／またはその標的の翻訳を抑制し、こうした誘導及び抑制は、一部の実施形態では、RISC (RNA 誘導型サイレンシング複合体) 経路が関与する機序を介して生じる。一部の実施形態では、RNA i 剤は、RISC 複合体／経路を活性化するPNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、RNA i 剤は、アンチセンス鎖配列を含む。一部の実施形態では、RNA i 剤は、(たとえば、一本鎖オリゴヌクレオチドである)オリゴヌクレオチド鎖を1つのみ含む。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤オリゴヌクレオチドは、センス鎖配列もしくはアンチセンス鎖配列であるか、またはセンス鎖配列もしくはアンチセンス鎖配列を含み得、このことは、Sioud 2005 J. Mol. Biol. 348: 1079-1090によって説明されている。一部の実施形態では、RNA i 剤は、RNA A 干渉を誘導する能力を有する化合物である。一部の実施形態では、RNA i 剤は、「正統な」siRNA構造に見られる構造または形式を有し得る。一部の実施形態では、RNA i 剤は、「正統な」siRNA構造とは異なる構造を有し得る。例を少数挙げるにすぎないが、一部の実施形態では、RNA i 剤は、正統なものと比較して長いかまたは短くあり得、平滑末端を有し得、及び／または1つ以上の修飾、ミスマッチ、ギャップ、及び／またはヌクレオチドの置き換えを含み得る。一部の実施形態では、RNA i 剤は、本開示に記載の3'末端キャップを含む。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、出願人は、一部の実施形態では、3'末端キャップによって、以下の2つの機能の両方が可能になり得ることを提唱する：(1) RNA 干渉の実現、ならびに(2) 活性の持続時間及び／または生物学的半減期の長期化(こうしたことは、たとえば、DicerのPAZドメイン及び／または1つ以上のAgoタンパク質のPAZドメインへの結合増加、及び／またはRNA i 剤の分解(たとえば、ヌクレアーゼ(血清もしくは腸液におけるものなど)によるもの)の低減もしくは阻止、によって達成され得る)。一部の実施形態では、本開示のRNA i 剤は、標的mRNAを標的とする(たとえば、標的mRNAに結合、アニーリングなどする)。一部の実施形態では、RNA i 剤がその標的に曝露されると、標的の活性、レベル、及び／または発現が減少し、たとえば、標的が「ノックダウン」または「ノックアウト」される。具体的には、一部の実施形態では、疾患、障害、及び／または状態が、標的遺伝子の過剰発現及び／または活性亢進によって特徴付けられるものである場合、細胞、組織、または対象にRNA i 剤を投与することで、活性を正常なレベルに回復させる上で十分であるか、あるいは疾患、障害、及び／または疾患状態、障害状態、及び／または状態の1つ以上の症状または特徴の軽減、寛解、緩和、抑制、予防、発症遅延、重篤度低減、及び／または発症率低減が可能なレベルにまで活性を低減する上で十分なほどに、標的遺伝子がノックダウンされる。一部の実施形態では、RNA i 剤は、本明細書に記載の一本鎖RNA i 剤であるアンチセンス鎖をセンス鎖と組み合わせて含む二本鎖であり、このアンチセンス鎖は、センス鎖と組み合わさって、RNA 干渉を誘導できるものである。

【0124】

一本鎖RNA干渉：本明細書で使用される「一本鎖RNA i」もしくは「一本鎖RNA干渉」という表現または同様のものは、一本鎖RNA i 剤を、その剤によってRNA i が誘導されるべき系(たとえば、細胞、組織、臓器、対象など)に投与することによって少なくとも部分的に誘導され、かつRISC経路を必要とする遺伝子サイレンシングのプロセスまたは方法を指す。これらの用語は、「二本鎖RNA i」または「二本鎖RNA干渉」と区別するために、ある特定の場合に、本明細書で利用され得るものであり、「二本鎖RNA i」または「二本鎖RNA干渉」では、二本鎖RNA i 剤が系に投与され、さらにプロセッシングを受け得る結果、たとえば、その2つの鎖のうちの1つがRISCに組み込まれることで、たとえば、翻訳の抑制、標的RNAの切断などが生じる。

【0125】

一本鎖RNA i 剤：本明細書で使用される「一本鎖RNA i 剤」という表現は、RISC経路を介して一本鎖RNA干渉(RNA i もしくはiRNA)または遺伝子サイレンシングを誘導することができる一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。一本鎖RNA i 剤は、1

10

20

30

40

50

つ以上の一本鎖ヌクレオチドのポリマーを含み得る。

【0126】

対象：本明細書で使用される「対象」または「被験対象」という用語は、たとえば実験目的、診断目的、予防目的、及び／または治療目的のために、提供される化合物または組成物が本開示に従って投与される任意の生物体を指す。典型的な対象としては、動物（たとえば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及びヒトなどの哺乳類；昆虫；蠕虫；他など）及び植物が挙げられる。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害、及び／または状態に罹患、及び／または感受性があってもよい。

【0127】

実質的：本明細書において使用される場合、「実質的」という用語は、対象の特徴または特性の全て、もしくはほとんど全ての範囲または程度を示す定性的状態を指す。第2の配列に実質的に相補的な塩基配列は、第2の配列と同一ではないが、第2の配列とほとんどまたはほぼ同一である。さらに、当生物学分野の当業者であれば、生物学的現象及び化学的現象が、めったに完結まで行かないこと、及び／または完了まで進行しないこと、または絶対的帰結を達成もしくは回避しないことを理解するであろう。従って、「実質的」という用語は、多くの生物学的減少及び／または化学的現象に本来備わる完全性の潜在的欠如を取り込むために、本明細書で使用される。

【0128】

罹患している：疾患、障害、及び／または状態を「罹患している」個体は、疾患、障害、及び／または状態の1種以上の症状を有すると診断された、及び／または示している。

【0129】

感受性がある：疾患、障害、及び／または状態に対し「感受性がある」個体は、一般社会の個体よりも、当該疾患、障害、及び／または状態を発生させるリスクが高い個体である。一部の実施形態では、疾患、障害、及び／または状態に対し感受性がある個体は、当該疾患、障害、及び／または状態を有すると診断されていなくてもよい。一部の実施形態では、疾患、障害、及び／または状態に対し感受性がある個体は、当該疾患、障害、及び／または状態の症状を示してもよい。一部の実施形態では、疾患、障害、及び／または状態に対し感受性がある個体は、当該疾患、障害、及び／または状態の症状を示さなくてもよい。一部の実施形態では、疾患、障害、及び／または状態に対し感受性がある個体は、当該疾患、障害、及び／または状態を発生させるであろう。一部の実施形態では、疾患、障害、及び／または状態に対し感受性がある個体は、当該疾患、障害、及び／または状態を発生させないであろう。

【0130】

全身的：本明細書において使用される場合、「全身的投与」、「全身的に投与された」、「末梢的投与」、及び「末梢的に投与された」という表現は、レシピエントの全身に入るように化合物または組成物を投与することを指す、当該技術分野で理解される意味を有する。

【0131】

治療剤：本明細書において使用される場合、「治療剤」という表現は、対象に投与されたとき、治療効果を有する、ならびに／または所望の生物学的作用及び／もしくは薬理学的作用を惹起する任意の剤を指す。一部の実施形態では、治療剤を使用して、疾患、障害、及び／または状態の1つ以上の症状もしくは特徴を、緩和、改善、軽減、阻害、予防、発生遅延、重篤度を低下、及び／または発生率を低下させることができる任意の物質である。

【0132】

治療有効量：本明細書において使用される場合、「治療有効量」という語は、治療レジメンの一部として投与されるとき、所望の生物学的応答を惹起する物質（たとえば、治療剤、組成物、及び／または製剤）の量を意味する。一部の実施形態では、物質の治療有効量は、疾患、障害、及び／または状態に罹患する、または感受性のある対象に投与するとき、当該疾患、障害、及び／または状態を治療、診断、予防、及び／または発生を遅延す

10

20

30

40

50

るために十分な量である。当業者により認識されるように、物質の有効量は、所望の生物学的エンドポイント、送達される物質、標的の細胞または組織などの要因に依存して変化し得る。例えば、疾患、障害、及び／または状態を治療するための製剤中の化合物の有効量は、当該疾患、障害、及び／または状態の1つ以上の症状または特徴を、緩和、改善、軽減、阻害、予防、発生遅延、重篤度を低下、及び／または発生率を低下させる量である。一部の実施形態では、治療有効量は、単回投与で投与される。一部の実施形態では、複数の単位用量が、治療有効量を送達するために必要である。

【0133】

治療する：本明細書において使用される場合、「治療する」、「治療」または「治療すること」という用語は、疾患、障害、及び／または状態の1つ以上の症状または特徴を、部分的にもしくは完全に、緩和、改善、軽減、阻害、予防、発生遅延、重篤度を低下、及び／または発生率を低下させるために使用される任意の方法を指す。治療は、疾患、障害、及び／または状態の兆候を示さない対象に対して行われる場合がある。一部の実施形態では、たとえば疾患、障害、及び／または状態に関連した病態を発生させるリスクを低下させる目的で、当該疾患、障害、及び／または状態の初期兆候のみを示す対象に投与される場合もある。

【0134】

不飽和：本明細書で使用される「不飽和」という用語は、部分が1つまたは複数の不飽和単位を有することを意味する。

【0135】

野生型：本明細書において使用される場合、「野生型」という用語は、（突然変異の、疾患性の、改変された等とは対照的に）「正常な」状態または状況において、自然界に存在する構造及び／または活性を有する実体を表す、当該技術分野で理解される意味を有する。当業者であれば、野生型の遺伝子及びポリペプチドが、しばしば、複数の異なる形態（例えば、アレル）で存在することを認識するだろう。

【0136】

核酸：本明細書において使用される場合、「核酸」という用語は、任意のヌクレオチド及びそのポリマーを含む。本明細書において使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド（RNA）またはデオキシリボヌクレオチド（DNA）のいずれかの任意の長さのヌクレオチドの多量体型を指す。これらの用語は、当該分子の一次構造を指しており、従って、二本鎖及び一本鎖のDNA、及び二本鎖及び一本鎖のRNAを含む。これらの用語は、均等物として、限定されないが、メチル化、保護化及び／もしくはキャップ化されたヌクレオチドまたはポリヌクレオチドなどの修飾ヌクレオチド及び／または修飾ポリヌクレオチドから作製されたRNAあるいはDNAいずれかのアナログを含む。当該用語は、ポリリボヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチド（RNA）、及びポリデオキシリボヌクレオチドまたはオリゴデオキシリボヌクレオチド（DNA）；核酸塩基及び／もしくは修飾核酸塩基のNグリコシドまたはCグリコシドから誘導されたRNAまたはDNA；糖類及び／または修飾糖類から誘導された核酸；ならびにリン酸架橋及び／もしくは修飾ヌクレオチド間結合から誘導された核酸、を包含する。当該用語は、核酸塩基、修飾核酸塩基、糖類、修飾糖類、リン酸架橋または修飾ヌクレオチド間結合のいずれかの組み合わせを含む核酸を包含する。例としては、限定されないが、リボース部分を含む核酸、デオキシリボース部分を含む核酸、リボース部分とデオキシリボース部分の両方を含む核酸、リボース部分と修飾リボース部分を含む核酸が挙げられる。別段の指定がない限り、接頭語のポリ-は、2～約10,000個のヌクレオチドモノマー単位を含む核酸を指し、接頭語のオリゴ-は、2～約200個のヌクレオチドモノマー単位を含む核酸を指す。

【0137】

ヌクレオチド：本明細書において使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、複素環式塩基、糖、及び1つ以上のヌクレオチド間結合からなるポリヌクレオチドのモノマー単位を指す。天然塩基（グアニン（G）、アデニン（A）、シトシン（C）、チミン（

10

20

30

40

50

T)、及びウラシル(U))は、プリンまたはピリミジンの誘導体であるが、天然及び非天然の塩基アナログも含まれると理解すべきである。天然糖は、ペントース(五炭糖)のデオキシリボース(DNAを形成する)またはリボース(RNAを形成する)であるが、天然及び非天然の糖アナログも含まれると理解すべきである。ヌクレオチドは、ヌクレオチド間結合を介して結合して、核酸、またはポリヌクレオチドを形成する。多くのヌクレオチド間結合が当分野に公知である(限定されないが、たとえばリン酸塩、ホスホロチオエート、ボラノリン酸塩など)。人工核酸としては、PNA(ペプチド核酸)、ホスホトリエステル、ホスホロチオナート、H-ホスホン酸塩、アミド亜リン酸塩、ボラノリン酸塩、メチルホスホン酸塩、ホスホノ酢酸塩、チオホスホノ酢酸塩、及び本明細書に記載されるものなど、天然核酸のリン酸骨格の他のバリエーションが挙げられる。一部の実施形態では、天然のヌクレオチドは、天然起源の塩基、糖、及びヌクレオチド間結合を含む。本明細書で使用される「ヌクレオチド」という用語は、天然または天然起源のヌクレオチドの代わりに使用される構造アナログ(修飾ヌクレオチド及びヌクレオチドアナログなど)も包含する。

【0138】

修飾ヌクレオチド:「修飾ヌクレオチド」という用語は、天然のヌクレオチドとは構造的に異なるが、天然のヌクレオチドの少なくとも1つの機能を発揮する能力を有する任意の化学的部分を含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、糖、塩基、及び/またはヌクレオチド間結合に修飾を含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、修飾糖、修飾核酸塩基、及び/または修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドの少なくとも1つの機能を発揮する能力を有し、こうした機能は、たとえば、少なくとも相補的な塩基配列を含む核酸と塩基対を形成する能力を有するポリマーのサブ単位を形成することである。

【0139】

アナログ:「アナログ」という用語は、化学的部分が参照の化学的部分または参照クラスの部分とは構造的に異なるが、そのような参照の化学的部分または参照クラスの部分の少なくとも1つの機能を発揮する能力を有する任意の機能的アナログを意味する。非限定的な例としては、ヌクレオチドアナログは、ヌクレオチドとは構造的に異なるが、ヌクレオチドの少なくとも1つの機能を発揮し、核酸塩基アナログは、核酸塩基とは構造的に異なるが、核酸塩基の少なくとも1つの機能を発揮することなどが挙げられる。

【0140】

ヌクレオシド:「ヌクレオシド」という用語は、核酸塩基または修飾核酸塩基が、糖または修飾糖に共有結合される部分を指す。

【0141】

修飾ヌクレオシド:「修飾ヌクレオシド」という用語は、天然のヌクレオシドに由来する部分または天然のヌクレオシドと化学的に類似する部分であるが、その部分を天然のヌクレオシドとは異なるものにする化学修飾を含む部分を指す。修飾ヌクレオシドの非限定的な例としては、塩基及び/または糖に修飾を含むものが挙げられる。修飾ヌクレオシドの非限定的な例としては、糖に2'修飾を有するものが挙げられる。修飾ヌクレオシドの非限定的な例としては、脱塩基ヌクレオシド(核酸塩基を欠くもの)も挙げられる。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、ヌクレオシドの少なくとも1つの機能を発揮する能力を有し、こうした機能は、たとえば、少なくとも相補的な塩基配列を含む核酸と塩基対を形成する能力を有するポリマーの一部分を形成することである。

【0142】

ヌクレオシドアナログ:「ヌクレオシドアナログ」という用語は、天然のヌクレオシドとは化学的に異なるが、ヌクレオシドの少なくとも1つの機能を発揮する能力を有する化学的部分を指す。一部の実施形態では、ヌクレオシドアナログは、糖のアナログ及び/または核酸塩基のアナログを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、ヌクレオシドの少なくとも1つの機能を発揮する能力を有し、こうした機能は、たとえば、相補的な塩基配列を含む核酸と塩基対を形成する能力を有するポリマーの一部分を形成すること

ある。

【0143】

糖：「糖」という用語は、閉状態及び／または開状態の単糖類または多糖類を指す。一部の実施形態では、糖は、単糖類である。一部の実施形態では、糖は、多糖類である。糖類としては、リボース、デオキシリボース、ペントフラノース、ペントピラノース、及びヘキソピラノース部分を挙げられるが、これらに限定されない。本明細書において使用される場合、「糖」という用語は、たとえばグリコールなど、従来の糖分子に代わり使用される構造アナログも包含し、そのポリマーは、核酸アナログのグリコール核酸（GNA）などの骨格を形成する。本明細書で使用される「糖」という用語は、天然または天然起源のヌクレオチドの代わりに使用される構造アナログ（修飾糖及びヌクレオチド糖など）も包含する。

10

【0144】

修飾糖：「修飾糖」という用語は、糖を置き換えることができる部分を指す。修飾糖は、空間配置、電子状態、または糖の他のなんらかの物理化学的特性を模倣する。

【0145】

核酸塩基：「核酸塩基」という用語は、配列特異的な様式で1つの核酸鎖を別の相補的な鎖に結合する水素結合に関与する核酸の部分の指す。もっとも一般的な天然核酸塩基は、アデニン（A）、グアニン（G）、ウラシル（U）、シトシン（C）、及びチミン（T）である。一部の実施形態では、天然核酸塩基は、修飾されたアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、またはチミンである。一部の実施形態では、天然核酸塩基は、メチル化されたアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、またはチミンである。一部の実施形態では、核酸塩基は、たとえばアデニン（A）、グアニン（G）、ウラシル（U）、シトシン（C）、及びチミン（T）以外の核酸塩基などの「修飾核酸塩基」である。一部の実施形態では、修飾核酸塩基は、メチル化されたアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、またはチミンである。一部の実施形態では、修飾核酸塩基模倣体は、空間配置、電子状態、または核酸塩基の他のなんらかの物理化学的特性を模倣し、配列特異的な様式で、1つの核酸鎖を別の核酸鎖に結合する水素結合の特性を保持する。一部の実施形態では、修飾核酸塩基は、融解挙動、細胞内酵素による認識、またはオリゴヌクレオチド二重鎖の活性に実質的に影響を及ぼすことなく、5種のすべての天然塩基（ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、またはグアニン）と対形成することができる。本明細書で使用される「核酸塩基」という用語は、天然または天然起源のヌクレオチドの代わりに使用される構造アナログ（修飾核酸塩基及び核酸塩基アナログなど）も包含する。

20

30

【0146】

修飾核酸塩基：「修飾核酸塩基」、「修飾塩基」という用語、及び同様のものは、核酸塩基とは化学的に異なるが、核酸塩基の少なくとも1つの機能を発揮する能力を有する化学的部分を指す。一部の実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾を含む核酸塩基である。一部の実施形態では、修飾核酸塩基は、核酸塩基の少なくとも1つの機能を発揮する能力を有し、こうした機能は、たとえば、少なくとも相補的な塩基配列を含む核酸と塩基対を形成する能力を有するポリマーの一部分を形成することである。

【0147】

3'末端キャップ：「3'末端キャップ」という用語は、PNPLA3オリゴヌクレオチド（たとえば、RNAi剤）の3'末端に結合した非ヌクレオチドの化学的部分を指す。一部の実施形態では、3'末端ジヌクレオチドが3'末端キャップによって置き換えられ得る。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドの3'末端キャップは、下記の機能のうちの少なくとも1つの機能を発揮する：オリゴヌクレオチドによって誘導されるRNA干渉の実現、オリゴヌクレオチドの分解からのオリゴヌクレオチドの保護またはオリゴヌクレオチドの分解量もしくは分解速度の低減（こうした分解は、たとえば、ヌクレアーゼによるものである）、センス鎖のオフターゲット効果の低減、あるいはオリゴヌクレオチドによって誘導されるRNA干渉の活性、持続時間、または効率の増進。3'末端キャップが「非ヌクレオチド」として記載される場合、3'末端キャップは、ヌクレオチド部分

40

50

またはオリゴヌクレオチド部分ではなく、PNPLA3オリゴヌクレオチドの残りの糖部分に連結されるものであり、この連結は、3'末端キャップをPNPLA3オリゴヌクレオチド鎖の一部と仮定した場合と同様に行われることが意図される。3'末端キャップのある特定の例は、本明細書に記載される。当業者であれば、当該技術分野に知られる他の3'末端キャップを、本開示に従って利用できることを理解する。

【0148】

ブロッキング基：「ブロッキング基」という用語は、官能基の反応性を覆い隠す基を指す。その後、官能基はブロッキング基の除去により覆いを取り払われてもよい。一部の実施形態では、ブロッキング基は、保護基である。

【0149】

部分：「部分」という用語は、分子の官能基の特定のセグメントを指す。化学的部分は、分子中に組み込まれた、または分子に付加された、広く認識されている化学的実体である。

【0150】

固形支持体：「固形支持体」という用語は、核酸合成を可能とする任意の支持体を指す。一部の実施形態では、当該用語は、ガラスまたはポリマーを指し、それらは核酸を合成するために実施される反応ステップにおいて利用される培地中で不溶性であり、そして誘導体化されて反応基を含む。一部の実施形態では、固形支持体は、高度架橋ポリスチレン（HCP：Highly Cross-linked Polystyrene）または制御ポアガラス（CPG：Controlled Pore Glass）である。一部の実施形態では、固形支持体は、制御ポアガラス（CPG）である。一部の実施形態では、固形支持体は、制御ポアガラス（CPG）と高度架橋ポリスチレン（HCP）のハイブリッド支持体である。

【0151】

リンカーまたは結合部分：「リンカー」、「結合部分」という用語、及び同様のものは、一方の化学的部分をもう一方に連結する任意の化学的部分を指す。一部の実施形態では、リンカーは、多量体において一方のオリゴヌクレオチドをもう一方のオリゴヌクレオチドに連結する部分である。一部の実施形態では、リンカーは、末端ヌクレオシドと固形支持体との間、または末端ヌクレオシドと別のヌクレオシド、ヌクレオチド、または核酸との間、に任意で配置される部分である。

【0152】

遺伝子：本明細書で使用される「遺伝子」、「組換え遺伝子」、及び「遺伝子構築物」という用語は、タンパク質またはその一部をコードするDNA分子またはDNA分子の一部を指す。DNA分子は、（エクソン配列として）タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含み得ることに加えて、イントロン配列をさらに含有し得る。本明細書で使用される「イントロン」という用語は、所与の遺伝子に存在するDNA配列であって、タンパク質に翻訳されず、すべての場合ではないが、場合によってはエクソン間に見られるDNA配列を指す。1つ以上のプロモーター、エンハンサー、リプレッサー、及び／または他の制御性配列に遺伝子が機能可能のように連結されことで（または遺伝子がこうしたものを含み得ることで）、当該遺伝子の活性または発現が調節されることが望ましくあり得、このことは、当該技術分野においてよく知られている。

【0153】

相補的DNA：本明細書で使用される「相補的DNA」または「cDNA」は、mRNAの逆転写によって合成される組換えポリヌクレオチドであって、介在配列（イントロン）が除去されている組換えポリヌクレオチドを含む。

【0154】

オリゴヌクレオチド：「オリゴヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドのポリマーまたはオリゴマーを指し、天然及び非天然の核酸塩基、糖、及びヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含有し得る。

【0155】

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってもよい。本明細書において使用される場合、「オリゴヌクレオチド鎖」という用語は、一本鎖オリゴヌクレオチドを包含する。一本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖領域（一本鎖オリゴヌクレオチドの2つの部分によって形成される）を有してもよく、二本鎖オリゴヌクレオチド（2つのオリゴヌクレオチド鎖を含む）は、一本鎖領域を有してもよく、こうした一本鎖領域は、たとえば、2つのオリゴヌクレオチド鎖が互いに相補的ではない領域におけるものである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序（限定されないが、遺伝子発現のRNAase H介在性ノックダウンまたは立体障害が挙げられる）を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNAase H介在性ノックダウンを介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。オリゴヌクレオチドの例としては、構造遺伝子、制御領域及び終結領域を含む遺伝子、たとえばウイルスDNAまたはプラスミドDNAなどの自己複製系、一本鎖RNAi剤及び二本鎖RNAi剤ならびに他のRNA干渉試薬（RNAi剤またはiRNA剤）、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNA、マイクロRNA模倣体、スーパーマイクロRNA（supermirs）、アプタマー、抗マイクロRNA（antimirs）、アンタゴマイクロRNA（antagomir）、ULアダプター、三重鎖形成性オリゴヌクレオチド、グアニン四重鎖オリゴヌクレオチド、RNAアクチベーター、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、及びデコイオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0156】

RNA干渉の誘導に有効である二本鎖及び一本鎖のオリゴヌクレオチドは、本明細書中、RNAi剤またはiRNA剤とも呼称される。一部の実施形態では、これらのRNA干渉誘導オリゴヌクレオチドは、RNAi誘導型サイレンシング複合体（RISC）として知られる細胞質マルチタンパク質複合体と関連する。多くの実施形態では、二本鎖RNAi剤は十分に長く、それにより内因性分子、たとえばDicerにより切断されて、より小さなオリゴヌクレオチドが生成され、それらがRISC機序へと入り、標的配列、たとえば、標的mRNA配列のRISC介在性の切断及び／または翻訳抑制に関与することができる。

【0157】

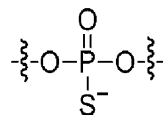
本開示のオリゴヌクレオチドは、様々な長さのものであってもよい。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約2～約200ヌクレオチドの長さの範囲であってもよい。様々な関連実施形態では、一本鎖、二本鎖、及び三本鎖のオリゴヌクレオチドは、約4～約10ヌクレオチド、約10～約50ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約15～約30ヌクレオチド、または約20～約30ヌクレオチドの長さの範囲であってもよい。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、約10～約40ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、約9～約39ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも4ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも5ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも6ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも7ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも8ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも9ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも11ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少な

くとも 12ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 15ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 20ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 25ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 30ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 18ヌクレオチドの長さの相補二重鎖である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 21ヌクレオチドの長さの相補二重鎖である。一部の実施形態では、長さが数えられるヌクレオチドはそれぞれ、アデニン、シトシン、グアノシン、チミン、及びウラシルから選択される任意で置換される核酸塩基を独立して含む。

【0158】

ヌクレオチド間結合：本明細書において使用される場合、「ヌクレオチド間結合」という表現は概して、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは核酸のヌクレオシド単位を連結する結合を指す。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、天然起源のDNA分子及びRNA分子中に見られるホスホジエステル結合（天然リン酸結合）である。一部の実施形態において、「ヌクレオチド間結合」という用語は、修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、「修飾ヌクレオチド間結合」であり、ここで、ホスホジエステル結合の各酸素原子は任意で、及び独立して有機部分または無機部分により置き換えられる。一部の実施形態では、かかる有機部分または無機部分は、限定されないが、 $=S$ 、 $=Se$ 、 $=NR'$ 、 $-SR'$ 、 $-SeR'$ 、 $-N(R'_2)B(R')_3$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、及び $-N(R')-$ から選択され、式中、各 R' は、本開示に規定され、記載されるとおりである。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、ホスホトリエステル結合、ホスホロチオエートジエステル結合（

【化1】



）、または修飾ホスホロチオエートトリエステル結合である。

【0159】

当業者であれば、ヌクレオチド間結合は、当該結合中の酸性部分または塩基性部分の存在によって、所与のpHでアニオンまたはカチオンとして存在し得ることを理解する。

【0160】

一部の実施形態では、「全(ALL) - (Rp)」または「全 - (Sp)」は、オリゴヌクレオチドのすべてのキラル結合リン原子が、それぞれ、同じRpまたはSpの立体配置を有することを示すために使用される。

【0161】

オリゴヌクレオチド型：本明細書において使用される場合、「オリゴヌクレオチド型」という表現は、特定の塩基配列、骨格結合パターン（すなわち、ヌクレオチド間結合型のパターン、例えば、リン酸、ホスホロチオエートなど）、骨格キラル中心パターン（すなわち、結合リン立体化学のパターン（Rp/Sp））、及び骨格リン修飾のパターン（たとえば、式Iの「-XLR¹」基のパターン）を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドを定義するために使用される。一部の実施形態では、共通に指定される「型」のオリゴヌクレオチドは、互いに構造的に同一である。

【0162】

当業者であれば、本開示の合成方法が、PNPLA3オリゴヌクレオチド鎖合成を行う間にある程度の制御をもたらし、それにより当該オリゴヌクレオチド鎖の各ヌクレオチド単位が、結合リンで特定の立体化学及び／もしくは結合リンで特定の修飾、ならびに／または特定の塩基、ならびに／または特定の糖を有するようにあらかじめ設計可能及び／または選択可能であることを認識するであろう。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド鎖は、結合リンで特定の組み合わせの立体中心を有するように前もって設計及び／または選択される。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド鎖は、結合リンで特定の組み合わせの修飾を有するように、設計され及び／または決定される。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド鎖は、特定の組み合わせの塩基を有するように、設計され及び／または選択される。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド鎖は、上述の構造特性のうちの1つ以上の特定の組み合わせを有するように、設計及び／または選択される。一部の実施形態では、本開示は、複数のオリゴヌクレオチド分子を含む、またはからなる組成物を提供する（たとえばキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物）。一部の実施形態では、かかる分子のすべてが同じ型の分子である（すなわち、そのような分子はすべて、構造的に互いに同一である）。しかしながら、多くの実施形態では、提供される組成物は異なる型の複数のオリゴヌクレオチドを、典型的には所定の相対量で含む。

10

【0163】

キラル制御：本明細書において使用される場合、「キラル制御」とは、PNPLA3オリゴヌクレオチド内のキラルヌクレオチド間結合中のキラル結合リンの立体化学指定の制御を指す。一部の実施形態では、制御は、PNPLA3オリゴヌクレオチドの糖部分と塩基部分に無いキラル要素を介して達成される。たとえば一部の実施形態では、制御は、本開示において例示されるように、オリゴヌクレオチド調製の間に1つ以上のキラル補助基を使用して達成され、こうしたキラル補助基は、オリゴヌクレオチド調製の間に使用されるキラルホスホロアミダイトの一部であることが多い。キラル制御とは対照的に、当業者であれば、キラル補助基を使用しない従来のオリゴヌクレオチド合成では、当該従来のオリゴヌクレオチド合成を使用してキラルヌクレオチド間結合を形成させた場合に、キラルヌクレオチド間結合で立体化学を制御することができないことを認識する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド内のキラルヌクレオチド間結合におけるそれぞれのキラル結合リンの立体化学指定が制御される。

20

30

【0164】

キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物：本明細書において使用される場合、「キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物」、「キラル制御された核酸組成物」などの用語は、1) 共通塩基配列、2) 骨格結合の共通パターン、及び3) 骨格リン修飾の共通パターンを共有する複数のオリゴヌクレオチド（または核酸）を含む組成物を指し、ここで、当該複数のオリゴヌクレオチド（または核酸）は、1つ以上のキラルヌクレオチド間結合（キラル制御されたヌクレオチド間結合）で同じ立体化学を共有し、及び当該組成物中の複数のオリゴヌクレオチド（または核酸）のレベルは、前もって決定されている（こうしたことは、たとえば、1つ以上のキラルヌクレオチド間結合を形成するためのキラル制御されたオリゴヌクレオチド調製を介して行われる）。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物におけるすべてのオリゴヌクレオチドの約1%~100%（たとえば、約5%~100%、約10%~100%、約20%~100%、約30%~100%、約40%~100%、約50%~100%、約60%~100%、約70%~100%、約80%~100%、約90%~100%、約95%~100%、約50%~90%、または約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、もしくは約99%、あるいは少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%

40

50

、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%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%)が当該複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物における、共通塩基配列を共有するすべてのオリゴヌクレオチドの約1%~100%(たとえば、約5%~100%、約10%~100%、約20%~100%、約30%~100%、約40%~100%、約50%~100%、約60%~100%、約70%~100%、約80%~100%、約90%~100%、約95%~100%、約50%~90%、または約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、
10
もしくは約99%、あるいは少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、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%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%)が当該複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物における、共通塩基配列、骨格結合の共通パターン、及び骨格リン修飾の共通パターンを共有するすべてのオリゴヌクレオチドの約1%~100%(たとえば、約5%~100%、約10%~100%、約20%~100%、約30%~100%、約40%~100%、約50%~100%、約60%~100%、約70%~100%、約80%~100%、約90%~100%、約95%~100%、約50%~90%、または約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、
20
もしくは約99%、あるいは少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、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%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%)が当該複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、所定レベルは、組成物におけるすべてのオリゴヌクレオチド、あるいは共通塩基配列(たとえば、複数のオリゴヌクレオチドのもの、またはある1つのPNPLA3オリゴヌクレオチド型のもの)を共有する、組成物におけるすべてのオリゴヌクレオチド、あるいは共通塩基配列、骨格結合の共通パターン、及び骨格リン修飾の共通パターンを共有する、組成物におけるすべてのオリゴヌクレオチド、あるいは共通塩基配列、塩基修飾の共通パターン、糖修飾の共通パターン、ヌクレオチド間結合型の共通パターン、及び/またはヌクレオチド間結合修飾の共通パターンを共有する、組成物におけるすべてのオリゴヌクレオチド、の約1%~100%(たとえば、約5%~100%、約10%~100%、約20%~100%、約30%~100%、約40%~100%、約50%~100%、約60%~100%、約70%~100%、約80%~100%、約90%~100%、約95%~100%、約50%~90%、または約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、
30
もしくは約99%、あるいは少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、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%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%)が当該複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、1~50個(たとえば、約1~10個、約1~20個、約5~10個、約5~20個、約10~15個、約10~20個、約10~25個、約10~30個、約または約1つ、約2つ、約3つ、約4つ、約5つ、約6
40
50

つ、約7つ、約8つ、約9つ、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、もしくは約20個、または少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、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、もしくは少なくとも20個)のキラルヌクレオチド間結合において同じ立体化学を共有する。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、キラルヌクレオチド間結合の約1%~100%(たとえば、約5%~100%、約10%~100%、約20%~100%、約30%~100%、約40%~100%、約50%~100%、約60%~100%、約70%~100%、約80%~100%、約90%~100%、約95%~100%、約50%~90%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、もしくは約100%、または少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%)において同じ立体化学を共有する。一部の実施形態では、各キラルヌクレオチド間結合は、キラル制御されたヌクレオチド間結合であり、組成物は、完全にキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物である。一部の実施形態では、全てではないキラルヌクレオチド間結合が、キラル制御されたヌクレオチド間結合であり、組成物は、部分的にキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物である。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、所定レベルの個々のオリゴヌクレオチド型または核酸型を含む。たとえば一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1つのオリゴヌクレオチド型を含む。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、2種以上のオリゴヌクレオチド型を含む。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、複数種のオリゴヌクレオチド型を含む。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、ある1つのオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドの組成物であり、当該組成物は、当該オリゴヌクレオチド型の複数のオリゴヌクレオチドを所定レベルで含む。

【0165】

キラル的に純粋：本明細書において使用される場合、「キラル的に純粋」という表現は、その中のすべてのオリゴヌクレオチドが、結合リンに関して単一のジアステレオマー形態で存在するPNPLA3オリゴヌクレオチド、たとえば、一本鎖RNAi剤の相対量を記載するために使用される。

【0166】

キラル的に均一：本明細書において使用される場合、「キラル的に均一」という表現は、その中のすべてのヌクレオチド単位が、結合リンで同じ立体化学を有するPNPLA3オリゴヌクレオチド分子または型を記載するために使用される。たとえば、そのヌクレオチド単位がすべて結合リンでRpの立体化学を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、キラル的に均一である。同様に、そのヌクレオチド単位がすべて結合リンでSpの立体化学を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、キラル的に均一である。

【0167】

所定の：所定の(または前もって決定された)とは、たとえば制御されることなく無作為に発生する、または実現される事とは対照的に、意図的に選択されたことが意味される。当業者であれば、本明細書を読むことで、本開示が、オリゴヌクレオチド組成物に組み込まれる特定の化学及び／または立体化学の選択が可能となる技術を提供し、さらにかかる化学及び／または立体化学の特性を有するオリゴヌクレオチド組成物の調製制御を可能とする技術を提供することを理解するであろう。かかる提供される組成物は、本明細書に

記載される場合、「所定」である。あるオリゴヌクレオチドを含有し得る組成物は、特定の化学及び／または立体化学を意図して生成するための制御がなされないプロセスを介してたまたま生成された組成物であり、これは「所定の」組成物ではない。一部の実施形態では、所定の組成物は、（たとえば制御されたプロセスの反復を介して）意図して再生産されることができる組成物である。一部の実施形態では、組成物中の複数のオリゴヌクレオチドの所定レベルとは、当該組成物中の複数のオリゴヌクレオチドの絶対量及び／または相対量（比率、割合など）が制御されていることを意味する。一部の実施形態では、組成物における複数のオリゴヌクレオチドの所定レベルは、キラル制御されたオリゴヌクレオチド調製を介して達成される。

【0168】

結合リン：本明細書において定義されるように、「結合リン」という表現は、言及される特定のリン原子が、ヌクレオチド間結合中に存在するリン原子であり、そのリン原子は、天然のDNA及びRNA中に存在するヌクレオチド間結合のホスホジエステルリン酸原子に相当することを示すために使用される。一部の実施形態では、結合リン原子は、修飾ヌクレオチド間結合中にあり、ここで、ホスホジエステル結合の各酸素原子は任意で、及び独立して有機部分または無機部分により置き換えられる。一部の実施形態では、結合リン原子は、式Iの P^L である。一部の実施形態では、結合リン原子は、キラルである。

【0169】

P-修飾：本明細書において使用される場合、「P-修飾」という用語は、立体化学的修飾以外の結合リンでの任意の修飾を指す。一部の実施形態では、P-修飾は、結合リンに共有結合した懸垂部分の付加、置換、または除去を含む。一部の実施形態では、「P-修飾」は、 $-X-L-R^1$ であり、式中、X、L及び R^1 の各々は独立して本開示に定義され、記載されるとおりである。

【0170】

本開示の目的では、化学元素は、元素の周期表、CASバージョン、*Handbook of Chemistry and Physics*, 67th Ed., 1986-87の内表紙に従って特定される。

【0171】

本開示の化合物及び組成物に関し本明細書に記載される方法及び構造は、薬学的に許容可能な酸付加塩または塩基付加塩、ならびにこれら化合物及び組成物のすべての立体異性体にも適用される。

【0172】

ある特定の実施形態の詳細説明

合成オリゴヌクレオチドからは、さまざまな用途において有用な分子ツールが得られる。たとえば、オリゴヌクレオチドは、治療用途、診断用途、研究用途、及び新たなナノ材料用途において有用である。天然起源の核酸（たとえば、非修飾DNAまたは非修飾RNA）の用途は、たとえば、こうした天然起源の核酸がエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによる作用を受けやすいことによって限られている。したがって、こうした欠点を回避すべくさまざまな合成対応物が開発されている。こうした合成対応物としては、化学修飾（たとえば、塩基修飾、糖修飾、骨格修飾など）を含有する合成オリゴヌクレオチドが挙げられ、こうした化学修飾は、とりわけ、こうした分子の分解感受性を下げ、オリゴヌクレオチドの他の特性を改善するものである。構造的な観点からすれば、ヌクレオチド間リン酸結合を修飾するとキラリティーを導入できることに加えて、オリゴヌクレオチドの骨格を形成するリン原子の配置によって、オリゴヌクレオチドのある特定の特性が影響を受け得る。たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの特性（結合アフィニティ、相補的RNAへの配列特異的結合、ヌクレアーゼに対する安定性など）が、とりわけ、骨格リン原子のキラリティーによって影響を受けることが*in vitro*の研究によって示されている。

【0173】

とりわけ、本開示は、オリゴヌクレオチドの構造的要素が、特性及び活性（たとえば、

10

20

30

40

50

標的遺伝子の産物（転写産物及び／またはタンパク質）のレベルを低減するための安定性、特異性、選択性、活性などに顕著な影響を与え得るという認識を含むものであり、こうした構造的要素は、化学修飾（たとえば、糖の修飾、塩基の修飾、及び／またはヌクレオチド間結合の修飾）またはそのパターン、脂質または他の部分への複合体化、及び／または立体化学〔たとえば、骨格キラル中心（キラルヌクレオチド間結合）の立体化学、及び／またはそのパターン〕などである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの特性は、化学修飾（塩基の修飾、糖の修飾、及び／またはヌクレオチド間結合部分の修飾）、化学修飾パターン、立体化学、及び／または立体化学パターンを最適化することによって調整できる。

【0174】

一部の実施形態では、本開示は、構造的要素が制御されたオリゴヌクレオチド（化学修飾が制御され、及び／または骨格立体化学パターンが制御されたもの）を含むオリゴヌクレオチド組成物が、予想外の特性及び活性（限定されないが、本明細書に記載ものを含む）を与えることを示す。一部の実施形態では、化学修飾（たとえば、塩基修飾、糖修飾、ヌクレオチド間結合修飾など）またはそのパターンを有するオリゴヌクレオチドを含む、提供される組成物は、特性及び活性が改善されている。そのような改善される特性の非限定的な例としては、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少の誘導、及び／またはRNA干渉の誘導、及び／またはRNAse H介在性ノックダウンの誘導、が挙げられる。一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNAiについての技術（たとえば、オリゴヌクレオチド、組成物、方法など）を提供する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ssRNAi剤である。

【0175】

一部の実施形態では、RNA干渉は、報告によれば、転写後の標的遺伝子サイレンシング技術であり、この標的遺伝子サイレンシング技術では、RISC（RNA誘導型サイレンシング複合体）経路によって媒介される切断を生じさせるためにRNAi剤が使用されることで、当該RNAi剤に相補的な配列を含むRNA（たとえば、メッセンジャーRNA（mRNA）などの遺伝子転写産物）が標的とされる。天然では、報告によれば、長いdsRNA（二本鎖RNA）（たとえば、哺乳類細胞に導入される外来dsRNA）がリボヌクレアーゼIII（Dicer）によって切断されて、siRNAと呼ばれる、より短い断片へと変換されると、ある型のRNAiが生じる。siRNA（低分子干渉RNAまたは短い阻害性RNA）は、典型的には、約21～23ヌクレオチドの長さを有し、約19塩基対の二重鎖を含む。報告によれば、次に、より小さなRNAセグメントによって標的mRNAの分解が媒介される。報告によれば、RNAi応答は、RNA誘導型サイレンシング複合体（RISC）と一般に称されるエンドヌクレアーゼ複合体を特徴付けるものでもあり、RISCは、siRNAのアンチセンス鎖に相補的な一本鎖mRNAの切断を誘導する。報告によれば、siRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域の中央で標的RNAの切断が生じる。報告によれば、標的転写産物に対してRNAi剤を使用すると、遺伝子の活性、レベル、及び／または発現が減少し、たとえば、標的遺伝子または標的配列が「ノックダウン」または「ノックアウト」される。人工siRNAは、治療用途にも実験用途にも有用である。

【0176】

1つの態様では、RNA干渉剤は、標的RNA配列と相互作用して標的RNAの切断を誘導する一本鎖RNAを含む。理論によって拘束されることを望むものではないが、報告によれば、植物及び無脊椎動物細胞に導入された長い二本鎖RNAは、Dicerとして知られるIII型エンドヌクレアーゼによる分解を受けてsiRNAへと変換される（Sharp et al., Genes Dev. 2001, 15: 485）。報告によれば、Dicer（リボヌクレアーゼIII様酵素）は、dsRNAのプロセッシングを行うことで、特徴的な2つの塩基3'オーバーハングを有する19～23塩基対の短い干渉RNAへとdsRNAを変換する（Bernstein, et al., (2001) Nature 409: 363）。報告によれば、次に、RNA誘導型サイレンシング複合体（

10

20

30

40

50

RISC)にsiRNAが組み込まれ、このRISCにおいて、1つ以上のヘリカーゼによってsiRNA二重鎖がほどかれることで、相補的アンチセンス鎖による標的認識のガイドが可能になる(Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。RISC内の1つ以上のエンドヌクレアーゼが、適切な標的mRNAに結合すると、標的が切断されてサイレンシングが誘導される(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。したがって、1つの態様では、本開示は、RISC複合体の形成を促進して標的遺伝子のサイレンシングを引き起こす一本鎖RNAに関する。

【0177】

一部の実施形態では、当該技術分野において知られる任意のプロセス、または本開示に従って当業者が考え得る任意のプロセスによって適切なRNAi剤を選択することができる。たとえば、選択基準は、下記のステップのうちの1つまたは複数を含み得る：標的遺伝子配列の最初の分析及びRNAi剤の設計（この設計では、種（ヒト、カニクイザル、マウスなど）にまたがる配列類似性、及び他の（非標的）遺伝子に対する相違性、が考慮され得る）、RNAi剤のin vitroでのスクリーニング（たとえば、標的転写産物を発現する細胞において10nMで行うもの）、細胞におけるEC50またはIC50の決定、RNAi剤で処理した細胞の生存率の決定（一部の実施形態では、標的に対するRNAi剤によってこうした細胞の生存率が抑制されないことが望まれる）、ヒトPBMC（末梢血単核球）を用いた試験（たとえば、TNF-アルファのレベルを試験して免疫原性を推定するものであり、この場合、免疫刺激性配列は、通常、あまり望まれない）、ヒト全血アッセイにおける試験（新鮮なヒト血液がRNAi剤で処理され、サイトカイン／ケモカイン〔たとえば、TNF-アルファ（腫瘍壊死因子-アルファ）及び／またはMCP1（単球走化性タンパク質1）〕のレベルが決定され、この場合、免疫刺激性配列は、通常、あまり望まれない）、試験動物における細胞または腫瘍を使用するin vivoでの遺伝子ノックダウンの決定、ならびにRNAi剤の特定の修飾の最適化。

【0178】

報告によれば、いわゆる正統なsiRNA構造は二本鎖RNA分子であり、鎖はそれぞれ、約21ヌクレオチドの長さである。報告によれば、これら2つの鎖は、アンチセンス（または「ガイド」）鎖（標的転写産物における相補的配列を認識し、それに結合する）、及びセンス（または「パッセンジャー」）鎖（アンチセンス鎖に相補的である）である。報告によれば、これらのセンス鎖及びアンチセンス鎖は、大部分が相補的であり、典型的には、両末端に2つのヌクレオチドの3'オーバーハングを2つ形成する。

【0179】

報告によれば、正統なsiRNA構造は二本鎖であるが、RNAi剤は一本鎖の場合もあり得る。一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤は、二本鎖siRNAのアンチセンス鎖に相当するものであり、こうした一本鎖RNAi剤は、対応するパッセンジャー鎖を含まない。

【0180】

一方で、一本鎖RNAi剤について試験された構造的要素のすべてが有効というわけではないことが報告されており、報告によれば、PNPLA3オリゴヌクレオチドに導入される構造的要素によっては、一本鎖RNA干渉活性を妨害し得る。

【0181】

一部の実施形態では、本開示は、RNAi剤として有用なオリゴヌクレオチド及び組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNAi剤として有用なオリゴヌクレオチド及び組成物を提供する。本開示、とりわけ、RNA干渉を誘導する能力を有する新規構造の一本鎖オリゴヌクレオチドを提供する。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、一本鎖RNAi剤が二本鎖RNAi剤を上回る利点を有することを明記する。たとえば、一本鎖RNAi剤は、必要なことは1つの鎖のみの構築であるため、原価が低く抑えられる。さらに、またはあるいは、標的転写産物を標的とするために投与される鎖は1つ（アンチセンス鎖）のみである。dsRNAに

よって誘導されるオフターゲット効果の源泉は、センス鎖がRISCに組み込まれ、望ましくない標的に結合し、それをロックダウンしてしまうことであるが(Jackson et al., 2003 Nat. Biotech. 21: 635-637)、一本鎖RNAi剤は、対応する二本鎖RNAi剤と比較して、誘導するオフターゲット効果が少なくあり得る。さらに、本明細書に開示のいくつかのものを含めて、一本鎖RNAi剤によっては、これまでに二本鎖RNAi剤を用いて標的とすることに成功していない特定の配列を標的とすることができる(たとえば、一本鎖RNAi剤によっては、配列のレベル及び／または配列の産物(転写産物及び／またはタンパク質)のレベルを、二本鎖RNAi剤と比較して、より顕著に低減することができる)。本開示は、とりわけ、一本鎖RNA干渉を誘導することができるオリゴヌクレオチドの新規形式(修飾、立体化学、それらの組み合わせなど)を提供する。

10

【0182】

オリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的産物のレベルの低減を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の転写産物のレベルを低減することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子のmRNAのレベルを低減することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子によってコードされるタンパク質のレベルを低減することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序(限定されないが、遺伝子発現のRNAase H介在性ロックダウンまたは立体障害が挙げられる)を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNAase H介在性ロックダウンを介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへの結合後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本開示に従って、本明細書に記載の構造的要素または当該技術分野において知られる構造的要素を1つ以上含み、こうした構造的要素は、たとえば、塩基配列、修飾、立体化学、ヌクレオチド間結合パターン、骨格結合パターン、骨格キラル中心パターン、骨格リン修飾パターン、追加の化学的部分(限定されないが、1つ以上の標的化部分、脂質部分、及び／または炭水化物部分などが挙げられる)、シード領域、ポストシード領域、5'末端構造、5'末端領域、5'ヌクレオチド部分、3'末端領域、3'末端ジヌクレオチド、3'末端キャップなどである。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドのシード領域は、5'末端から数えると、2番目～8番目のヌクレオチド、2番目～7番目のヌクレオチド、2番目～6番目のヌクレオチド、3番目～8番目のヌクレオチド、3番目～7番目のヌクレオチド、3番目～7番目のヌクレオチド、または4番目～8番目のヌクレオチドもしくは4番目～7番目ヌクレオチドであるか、あるいはそれを含むものであり、オリゴヌクレオチドのポストシード領域は、シード領域の3'側に直接隣接する領域であり、シード領域と3'末端領域との間に介在する。

20

30

40

【0183】

一部の実施形態では、提供される組成物は、PNPLA3オリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供される組成物は、1つ以上の脂質部分、1つ以上の炭水化物部分(別段の指定がない限り、ヌクレオチド間結合でオリゴヌクレオチド鎖を形成するヌク

50

レオシド単位の糖部分以外のもの)、及び／または1つ以上の標的化構成要素を含む。

【0184】

一部の実施形態では、特定のアレル（及び／またはその1つ以上の産物（例えば、RNA及び／またはタンパク質産物））（疾患関連アレル）の存在及び／または活性が1つ以上の疾患及び／または状態の存在、発症、及び／または重篤度と関連（たとえば、相関）する場合、同じ配列（たとえば、遺伝子）の異なるアレルが存在し、こうした異なるアレルは、そのように関連することがないか、または関連するにしてもその程度が低い（たとえば、示す相関の有意性が低い、または示す相関が統計的に有意ではない）。一部のそのような実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド及びその方法は、関連性が低い／関連性のない1つ以上のアレル（複数可）と比較して、関連するアレルを優先的または特異的に標的とし得る。

10

【0185】

一部の実施形態では、標的配列は、本明細書に記載のPNPLA3オリゴヌクレオチドが結合する配列である。多くの実施形態では、標的配列は、提供されるオリゴヌクレオチドの配列もしくはそこに存在する連続残基の配列と同一であるか、またはその正確な相補体である（たとえば、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的配列と同一の標的結合配列、または標的配列の正確な相補体である標的結合配列を含む）。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド（の関連部分）とその標的配列との間の少数の差異／ミスマッチは許容される。多くの実施形態では、標的配列は、標的遺伝子内に存在する。多くの実施形態では、標的配列は、標的遺伝子から産生する転写産物（たとえば、mRNA及び／またはmRNA前駆体（pre-mRNA））内に存在する。

20

【0186】

一部の実施形態では、標的配列は、1つ以上のアレル部位（すなわち、標的遺伝子内でアレル変異が生じる位置）を含む。一部のそのような実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の他のアレルと比較して優先的または特異的に1つのアレルに結合する。一部の実施形態では、標的結合配列は、1つのアレルの標的配列と同一であるか、または1つのアレルの標的配列の正確な相補体である。一部の実施形態では、標的結合配列は、1つのアレルの標的配列と同一である。一部の実施形態では、標的結合配列は、1つのアレルの標的配列の正確な相補体である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、疾患関連アレルに優先的に結合する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、疾患関連アレルに優先的に結合するものであり、疾患関連アレルの標的配列と同一であるが、他のアレル（複数可）に対してはそうではない標的結合配列を含むか、または疾患関連アレルの標的配列の正確な相補体であるが、他のアレル（複数可）に対してはそうではない標的結合配列を含む。たとえば、一部の実施形態では、本明細書で提供されるPNPLA3オリゴヌクレオチド（またはその標的結合配列部分）は、特定のアレルバージョンの標的配列と同一の配列を有するか、または特定のアレルバージョンの標的配列の正確な相補体である配列を有する。一部の実施形態では、標的配列は、特定のアレルの配列である。一部の実施形態では、本明細書で提供されるPNPLA3オリゴヌクレオチド（またはその標的結合配列部分）は、疾患関連アレルのアレル部位と同一の配列を有するか、または疾患関連アレルのアレル部位の正確な相補体である配列を有する。

30

【0187】

当業者であれば理解することであるが、本開示によれば、標的配列はさまざまなアレル部位を含み得る。一部の実施形態では、標的配列は、SNPを含む。一部の実施形態では、標的配列は、変異を含む。一部の実施形態では、SNPは、PNPLA3のSNPである。

【0188】

当該技術分野において知られる多くのものを含めて、さまざまなリンカー、脂質部分、炭水化物部分、及び標的化部分を、本開示に従って利用することができる。一部の実施形態では、脂質部分が標的化部分である。一部の実施形態では、炭水化物部分が標的化部分

50

である。一部の実施形態では、標的化部分は、脂質部分である。一部の実施形態では、標的化部分は、炭水化物部分である。当業者であれば容易に理解することであるが、本開示に記載のものを含めて、さまざまなリンカーを本開示に従って利用することで、2つの部分を連結することができ、たとえば、脂質／炭水化物／標的化構成要素をPNPLA3オリゴヌクレオチド部分と連結することができる。当業者であれば容易に理解することであるが、2つの部分を連結するための記載のリンカーは、他の部分の連結にも使用することができ、たとえば、脂質部分とPNPLA3オリゴヌクレオチド部分とを連結するためのリンカーは、炭水化物部分または標的部分をPNPLA3オリゴヌクレオチド部分と連結するためにも使用することができ、逆もまた同様である。

【0189】

一部の実施形態では、本開示は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物を提供する。たとえば一部の実施形態では、提供される組成物は、所定レベルの1個以上の個々のオリゴヌクレオチド型を含有し、ここで、PNPLA3オリゴヌクレオチド型は以下により定義される：1) 塩基配列；2) 骨格結合のパターン；3) 骨格キラル中心のパターン；及び4) 骨格P-修飾のパターン。一部の実施形態では、特定のオリゴヌクレオチド型は、1A) 塩基同一性；1B) 塩基修飾のパターン；1C) 糖修飾のパターン；2) 骨格結合のパターン；3) 骨格キラル中心のパターン；及び4) 骨格P-修飾のパターン、により定義されてもよい。一部の実施形態では、同じオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、同一である。一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供し、組成物は、所定レベルの複数のオリゴヌクレオチドを含み、複数のオリゴヌクレオチドは、共通塩基配列を共有し、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、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、または少なくとも25個のキラルヌクレオチド間結合（キラル制御されたヌクレオチド間結合）において同じ配置の結合リンを含む。

【0190】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を2～30個含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を5～30個含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を10～30個含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を1つ含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を2つ含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を3つ含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を4つ含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を5つ含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を6つ含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を7つ含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を8つ含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を9つ含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を10個含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を11個含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を12個含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を13個含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間

10

20

30

40

50

結合を14個含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を15個有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を16個有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を17個有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を18個有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を19個有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたヌクレオチド間結合を20個有する。

【0191】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ユニマーである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、P-修飾ユニマーである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオユニマーである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、Rp立体配置のステレオユニマーである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、Sp立体配置のステレオユニマーである。

10

【0192】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、アルトマーである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、P-修飾アルトマーである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーである。

【0193】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ブロックマーである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、P-修飾ブロックマーである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーである。

20

【0194】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。

【0195】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、スキップマーである。

【0196】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ヘミマーである。一部の実施形態では、ヘミマーは、当該オリゴヌクレオチドの残りの部分が有さない構造的特性を保有する配列を5'末端領域または3'末端領域が有するPNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、5'末端領域または3'末端領域は、2~20ヌクレオチドを有するか、または含む。一部の実施形態では、構造的特性は、塩基修飾である。一部の実施形態では、構造的特性は、糖修飾である。一部の実施形態では、構造的特性は、P-修飾である。一部の実施形態では、構造的特性は、キラルヌクレオチド間結合の立体化学である。一部の実施形態では、構造的特性は、塩基修飾、糖修飾、P-修飾、もしくはキラルヌクレオチド間結合の立体化学、またはそれらの組み合わせであるか、またはこれを含む。一部の実施形態では、ヘミマーは、5'末端領域の糖部分のそれぞれが共通修飾を共有するPNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、ヘミマーは、3'末端領域の糖部分のそれぞれが共通修飾を共有するPNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、5'末端領域または3'末端領域の共通糖修飾は、オリゴヌクレオチドにおける他の糖部分のいずれによっても共有されない。一部の実施形態では、ヘミマーの例は、一方の末端領域に、置換または非置換の2'-O-アルキル糖修飾ヌクレオシド、二環式糖修飾ヌクレオシド、β-D-リボヌクレオシドまたはβ-D-デオキシリボヌクレオシド（例えば、2'-MOE修飾ヌクレオシド、及びLNA（商標）またはENA（商標）二環式糖修飾ヌクレオシド）の配列、もう一方の末端領域に、異なる糖部分を有するヌクレオシド（たとえば置換または非置換の2'-O-アルキル糖修飾ヌクレオシド、二環式糖修飾ヌクレオシドまたは天然型ヌクレオシドなど）の配列を含むPNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ユニマー、アルトマー、ブロックマー、ギャップマー、ヘミマー及びスキップマーのうちの1個以上の組み合わせである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ユニマ

30

40

50

一、アルトマー、ブロックマー、ギャップマー、及びスキップマーのうちの1個以上の組み合わせである。たとえば一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、アルトマーとギャップマーの両方である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ギャップマーとスキップマーの両方である。数多くの別のパターンの組み合わせが利用可能であり、それらは、本発明による方法に基づき提供されるオリゴヌクレオチドを合成するために必要とされる構成要素が市販及び／または合成での入手可能性によってのみ限定されることが、化学及び合成分野の当業者により認識されるであろう。一部の実施形態では、ヘミマーの構造は、有益な利益をもたらす。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、5'末端配列に修飾糖部分を含む5'-ヘミマーである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、5'末端配列に修飾2'-糖部分を含む5'-ヘミマーである。 10

【0197】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるLNAを含む。

【0198】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換される核酸塩基を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換される天然型核酸塩基を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換される修飾核酸塩基を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の5-メチルシチジン；5-ヒドロキシメチルシチジン、5-ホルミルシトシン、または5-カルボキシルシトシンを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の5-メチルシチジンを含む。 20

【0199】

一部の実施形態では、塩基(BA)はそれぞれ、独立して、任意で置換または保護されたアデニン、シトシン、グアノシン、チミン、またはウラシル核酸塩基である。当業者であれば理解することであるが、当該技術分野において広く知られるもの(たとえば、オリゴヌクレオチド調製物において使用されるもの(たとえば、WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、WO2017/015555、及びWO2017/062862に記載の保護された核酸塩基が挙げられ、これらの文献のそれぞれの保護された核酸塩基は、参照によって本明細書に組み込まれる))を含めて、さまざまな保護された核酸塩基を、本開示に従って利用することができる。 30

【0200】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換される糖を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、天然型のDNA及びRNA中に存在する1個以上の任意で置換される糖を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるリボースまたはデオキシリボースを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるリボースまたはデオキシリボースを含有し、ここで、当該リボース部分またはデオキシリボース部分のヒドロキシル基の1個以上は任意で、及び独立して、ハロゲン、 $-N(R')_2$ 、 $-OR'$ または $-SR'$ と置き換えられ、式中、各 R' は独立して、上記に定義され、本明細書に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるデオキシリボースを含有し、ここで、当該デオキシリボースの2'位は任意で、及び独立して、ハロゲン、 $-N(R')_2$ 、 $-OR'$ または $-SR'$ と置き換えられ、式中、各 R' は独立して、上記に定義され、本明細書に記載され 40 50

るとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるデオキシリボースを含有し、ここで、当該デオキシリボースの2'位は任意で、及び独立して、ハロゲンで置換される。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるデオキシリボースを含有し、ここで、当該デオキシリボースの2'位は任意で、及び独立して、1個以上の-F、ハロゲンで置換される。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるデオキシリボースを含有し、ここで、当該デオキシリボースの2'位は任意で、及び独立して、-OR'と置換され、式中、各R'は独立して、上記に定義され、本明細書に記載されたとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるデオキシリボースを含有し、ここで、当該デオキシリボースの2'位は任意で、及び独立して、-OR'と置換され、式中、各R'は独立して、任意で置換される₁C-C₆の脂肪族である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるデオキシリボースを含有し、ここで、当該デオキシリボースの2'位は任意で、及び独立して、-OR'と置換され、式中、各R'は独立して、任意で置換される₁C-C₆のアルキルである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるデオキシリボースを含有し、ここで、当該デオキシリボースの2'位は任意で、及び独立して、-OMeで置換される。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の任意で置換されるデオキシリボースを含有し、ここで、当該デオキシリボースの2'位は任意で、及び独立して、-O-メトキシエチルで置換される。

10

20

【0201】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチド鎖である。ある特定の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、部分的にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチド鎖である。ある特定の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、完全にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチド鎖である。ある特定の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、二本鎖オリゴヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、三本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、三重鎖）である。

【0202】

一部の実施形態では、WO2012/030683に記載されるPNPLA3オリゴヌクレオチドを含む構造のいずれか1個が本開示方法に従い修飾され、そのキラル制御された組成物が生成され得る。たとえば、一部の実施形態では、キラル制御された組成物は、WO2012/030683または本開示に記載の1つ以上のP-修飾を任意で組み込むことによって、キラル結合リン原子のうちの任意の1つ以上の立体化学が制御される。たとえば、一部の実施形態では、WO2012/030683に記載のPNPLA3オリゴヌクレオチドの特定のヌクレオチド単位が、事前に選択されることで、そのヌクレオチド単位の結合リンのキラル制御を伴って得られ、及び/またはそのヌクレオチド単位の結合リンのキラル制御を伴ってP-修飾される。

30

【0203】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、核酸アナログを含み、こうした核酸アナログは、たとえば、GNA、LNA、PNA、TNA、F-HNA（F-THPまたは3'-フルオロテトラヒドロピラン）、MNA（マンニトール核酸、たとえば、Leumann 2002 Bioorg. Med. Chem. 10:841-854）、ANA（アニトール（anitool）核酸）、及びモルホリノである。

40

【0204】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、タンパク質の活性、またはタンパク質発現の阻害もしくは促進を直接または間接的に増加させ、または減少させる能力を有するとして特徴付けられる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、細胞増殖、ウイルス複製、及び/または任意のその他の細胞シグナル伝達過程の制御に有用であるという点で特徴付けられる。

50

【0205】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの5'末端及び／または3'末端が修飾される。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの5'末端及び／または3'末端は、末端キャップ部分を用いて修飾される。末端キャップ部分を含む、かかる修飾の例は、本明細書、及びたとえば米国特許出願公開US 2009/0023675 A1に記載されるものなど、当分野において詳述される。

【0206】

一部の実施形態では、1) 共通の塩基配列と長さ、2) 骨格結合の共通パターン、及び3) 骨格キラル中心の共通パターンにより特徴付けられるPNPLA3オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、同じ化学構造を有する。たとえばそれらは同じ塩基配列、同じヌクレオチド修飾パターン、同じ骨格結合パターン（すなわち、たとえばリン酸、ホスホロチオエートなどのヌクレオチド間結合型のパターン）、同じ骨格キラル中心のパターン（すなわち、結合リン立体化学のパターン（Rp/Sp））、及び同じ骨格リン修飾のパターン（たとえば、式Iの「-XLR¹」基のパターン）を有する。

【0207】

一本鎖RNAi剤及びアンチセンスオリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルを低減するオリゴヌクレオチドを提供する。当業者であれば、本開示を読めば、提供されるオリゴヌクレオチドが、一部の実施形態では、RNAi剤として働き得ることを理解するであろう。あるいは、またはさらに、一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNase H依存性機序、及び／またはRNA干渉が関与しない別の生化学的機序、を介して働き得る。

【0208】

とりわけ、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチドに特に望ましく、及び／または有効であり得る、ある特定の構造的属性を定義する。とりわけ、本開示は、RNAi剤として働くPNPLA3オリゴヌクレオチドに特に望ましく、及び／または有効であり得る、ある特定の構造的属性を定義する。一部の実施形態では、本開示は、RNase H依存性機序及び／または他の生化学的機序を介して働くPNPLA3オリゴヌクレオチドに特に望ましく、及び／または有効であり得る、ある特定の構造的属性を定義する。一部の実施形態では、本開示は、一本鎖ssRNAi剤（ssRNAiまたはssRNAi剤）に特に望ましく、及び／または有効であり得る、ある特定の構造的属性を定義し、一部のそのような実施形態では、本明細書にさらに後述されるように、そのような構造的属性は、二本鎖RNAi剤（dsRNAiまたはdsRNAi剤）の対応鎖に特に望ましく、及び／または有効な構造的属性とは異なり得る。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、一本鎖RNAi剤（たとえば、RISCに組み込まれ得、及び／またはRISC介在性の標的化を誘導もしくは増進し得るもの）である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド（たとえば、RNase Hに組み込まれ、及び／または標的のRNase H介在性切断を誘導もしくは増進し、及び／または異なる生化学的機序を介して機能し得るもの）である。

【0209】

一部の実施形態（いくつかの一本鎖オリゴヌクレオチド実施形態を含む）では、RNAi剤として働くオリゴヌクレオチドは、RNase H依存性機序を介して働くオリゴヌクレオチドとは異なる構造的属性及び／または機能特性を1つ以上有し得る。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへの結合後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン（たとえば、スキップ）、によって標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCに依存することなく、機能を発揮するか、またはかなりの割合（たとえば、

10～100%、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または90%超)の機能を発揮することができる。

【0210】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNase Hによって媒介され、RISC(RNA干渉サイレンシング複合体)によっては媒介されない標的RNAの切断を誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である。

【0211】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RISC(RNA干渉サイレンシング複合体)によって媒介され、RNase H酵素によっては媒介されない標的mRNAの切断を誘導する一本鎖RNAi(ssRNAi)剤である。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、RNase Hに依存することなく、機能を発揮するか、またはかなりの割合(たとえば、10～100%、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または90%超)の機能を発揮することができる。

【0212】

二本鎖RNAi剤もまた、RISCを使用し、RNase H酵素を使用せずに、標的mRNAの切断を誘導することができる。一部の実施形態では、ssRNAi剤が単一オリゴヌクレオチド鎖のみを含み、一般に、有意な長さの二本鎖領域を含まないのに対し、dsRNAi剤は有意な長さ(たとえば、少なくとも約15bp、または「正統な」siRNAでは約19bp)の二本鎖領域を含むという点において、一本鎖RNAi剤は二本鎖RNAi剤と異なる。一部の実施形態では、dsRNAiは、二本鎖領域(たとえば、「正統な」siRNAにおけるもの)を形成する2つの別々の相補的な鎖(共有結合では連結されないもの)を含むか、または二本鎖領域(たとえば、shRNAもしくは短鎖ヘアピンRNAにおけるもの)と一緒に形成する2つの相補的配列を含む長い一本鎖を含む。dsRNAiの実施形態の一部では、パッセンジャー鎖は、一本鎖ニックを有し、2つの鎖を形成する。一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNAi剤が有効であるために必要な配列及び／または構造的要素(化学修飾、立体化学など)が、二本鎖RNAi剤が有効であるために必要なものとは異なり得ることを示す。

【0213】

とりわけ、本開示は、二本鎖RNAi剤に適し得るある特定の設計(たとえば、配列及び／または構造的要素)が一本鎖RNAi剤(本明細書に記載の提供される形式の一本鎖RNAi剤を含む)には適し得ず、逆もまた同様であるという認識を含む。一部の実施形態では、本開示は、有効なssRNAiの設計を提供する。一部の実施形態では、本開示は、ある特定の塩基配列を、本開示に従って構造的要素(修飾、立体化学、追加の化学的部分、または部分など)と組み合わせると、予想外に高い活性を有するオリゴヌクレオチドが生じ得ることを示し、たとえば、こうしたオリゴヌクレオチドは、ssRNAi剤として投与されると、同じ配列を含むが、二本鎖であるオリゴヌクレオチドがdsRNAi剤として投与されたときと比較すると特に、予想外に高い活性を有する。一部の実施形態では、本開示は、ある特定の塩基配列を、本開示に従って構造的要素(修飾、立体化学、追加の化学的部分、または部分など)と組み合わせると、予想外に高い活性(たとえば、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルを低減する能力)を有するオリゴヌクレオチドが生じ得ることを示す。

【0214】

一本鎖RNAi(ssRNAi)剤、二本鎖RNAi(dsRNAi)剤、及びRNase H依存性アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)の間の構造的及び機能的な差異
一部の実施形態では、一本鎖RNAi(ssRNAi)剤、二本鎖RNAi(dsRNAi)剤、及びRNase H依存性アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)はすべて、剤もしくはオリゴヌクレオチド(またはその一部)が、相補的な(または実質的に相補的な)標的RNA(たとえば、mRNAまたはmRNA前駆体(pre-mRNA))

に結合した後、標的RNAを切断し、及び／または標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルを低減するものである。一部の実施形態では、RNAi剤は、二本鎖であろうと一本鎖であろうと、RISCまたはRNA干渉サイレンシング複合体（Ago-2（アルゴノート-2）酵素を含む）を利用するものである。一部の実施形態では、RNase H依存性アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一本鎖であり、異なる酵素であるRNase Hを利用するものである。報告によれば、RNase Hは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。米国特許第7,919,472号を参照のこと。Saetrom (2004 Bioinformatics 20:3055-3063)、Kretschmer-Kazemi Far et al. (2003 Nucleic Acids 31:4417-4424)、Bertrand et al. (2002 Biochem. Biophys. Res. Comm. 296:1000-1004)、Vickers et al. (2003 J. Biol. Chem. 278:7108)も併せて参照のこと。一部の実施形態では、RNase H介在性ノックダウンを誘導することができるオリゴヌクレオチドとしては、限定されないが、2'-修飾を含まない連続する2'-デオキシヌクレオチド単位の領域からなるもの、または当該領域を含むものが挙げられる。一部の実施形態では、RNase H介在性ノックダウンを誘導することができるオリゴヌクレオチドは、ギャップによって広がったオリゴヌクレオチド、またはギャップマーである。一部の実施形態では、ギャップマーは、内部領域を含んでおり、この内部領域は、RNase Hによる切断を支援する複数のヌクレオチドを含み、当該内部領域のヌクレオチドとは化学的に異なる複数のヌクレオチドを有する外部領域の間に位置する。一部の実施形態では、ギャップマーは、1つまたは2つのウィングと隣り合うか、またはそれに隣接する、2'-修飾を含まない2'-デオキシヌクレオチドの区間を含む。一部の実施形態では、ギャップは、RNase Hによる対応RNA標的の切断を誘導する。一部の実施形態では、ウィングは、RNase Hによる切断を誘導しないか、RNase Hによる切断の基質としては働かない。ウィングは、長さが異なるものであり得（限定されないが、1~8 ntのものが挙げられる）、さまざまな修飾またはアナログ（限定されないが、2'-修飾（限定されないが、2'-OMe及び2'-MOEが挙げられる）が挙げられる）を含み得る。非限定的な例として、米国特許第9,550,988号、同第7,919,472号、同第5,013,830号、同第5,149,797号、同第5,220,007号、同第5,256,775号、同第5,366,878号、同第5,403,711号、同第5,491,133号、同第5,565,350号、同第5,623,065号、同第5,652,355号、同第5,652,356号、及び同第5,700,922号を参照のこと。一部の実施形態では、そのような修飾またはアナログの1つ以上の存在は、RNase Hによる標的の切断の改変（たとえば、増加、減少、または変化）と相関し得る。

【0215】

一部の実施形態では、二本鎖RNAi剤は、そのアンチセンス鎖でさえ、RNase H依存性アンチセンスオリゴヌクレオチドと構造的に異なる。一部の実施形態では、RNase H依存性アンチセンスオリゴヌクレオチドとsiRNAオリゴヌクレオチドとは、5'末端構造に関しても全体的な二重鎖安定性に関しても、正反対の特徴を有するように思われる。

【0216】

報告によれば、二本鎖RNAi剤は、Dicer酵素によって細胞において天然に生じ得るものであり、Dicer酵素は、より長いRNA分子（侵入ウイルスに由来する二本鎖RNAなど）を切断してdsRNAに変換する。dsRNA剤の正統な構造は、2つのRNA鎖を含み、それぞれのRNA鎖が約19~23 ntの長さを有し、これら2つのRNA鎖がアニリングすることで、約19~21 bpの二本鎖領域及び2つの3'ジヌクレオチドオーバーハングが形成される。二本鎖RNAi剤については、報告によれば、二重鎖からセンス鎖がほどかれた後にアンチセンス鎖がRISCに組み込まれる。二本鎖RNAi剤がアンチセンス鎖とセンス鎖とに天然に分離されることは別として、一本鎖RNA

10

20

30

40

50

i 剤がヒト細胞において天然に生じるということは報告されていない。

【0217】

とりわけ、本開示は、たとえば、有効な dsRNA i 剤のアンチセンス鎖の有効性が当該 dsRNA i 剤と比較して非常に低くあり得ることに加えて、ssRNA i 剤を dsRNA i 剤として構築（たとえば、センス鎖とのアニーリングによって構築）すると、当該 ssRNA i 剤と比較して有効性が非常に低くなり得るという点において、多くの場合、一本鎖 RNA i 剤は、単純に、二本鎖 RNA i 剤の単離されたアンチセンス鎖というわけではないという教示を提供する。一部の実施形態では、二本鎖 RNA i 剤と一本鎖 RNA i 剤とは、多くの顕著な点で異なる。二本鎖 RNA i 剤の構造的なパラメータは、一本鎖 RNA i 剤に必ずしも反映されない。

10

【0218】

一部の実施形態では、本開示は、二本鎖 RNA i 剤に適した標的配列が一本鎖 RNA i 剤には適し得ず、逆もまた同様であることを教示する。たとえば、少なくともいくつかの場合では、二本鎖 RNA i 剤の一本鎖バージョンは、非効果的なものであり得る。非限定的な例として、dsRNA i に由来する配列で構築された ssRNA i 剤が表 46A にいくつか示される。dsRNA i に基づくこうした ssRNA i は、一般に、対応する dsRNA i と比較して有効性が低いものであった。

【0219】

一部の実施形態では、二本鎖 RNA i 剤と一本鎖 RNA i 剤とは、キラル制御されたヌクレオチド間結合の組み込みに対する感受性も異なる。たとえば、Matrangola et al. (2005 Cell 123:607-620) では、単一の Spヌクレオチド間結合（たとえば、単一の Sp PS）を二本鎖 RNA i 剤のセンス鎖に導入すると、RISC の構築及び RNA 干渉活性が大幅に減少することが報告された。対照的に、一部の実施形態では、本明細書に示されるデータは、驚くべきことに、Spヌクレオチド間結合（たとえば、Sp PS）の組み込みが、一本鎖 RNA i 剤に対して以下の 2 つの機能を発揮し得ることを示す：（a）この組み込みは、ヌクレアーゼに対する安定性を向上させ、（b）この組み込みは、RNA 干渉活性を妨害しない。例としてのオリゴヌクレオチドの多くが、キラル制御されたヌクレオチド間結合（たとえば、本明細書では Spヌクレオチド間結合または Sp PS（ホスホロチオエート）が示される）を 1 つ以上含む有効な一本鎖 RNA i 剤として働くことができる。

20

30

【0220】

あるいは、またはさらに、二本鎖 RNA i 剤と一本鎖 RNA i 剤とは、免疫原性が異なり得る。一部の実施形態では、報告によれば、一本鎖 RNA i 剤によっては、二本鎖 RNA i 剤と比較して免疫原性が高い。Sioud J. Mol. Biol. (2005) 348, 1079-1090。一部の実施形態では、報告によれば、いくつかの二本鎖 RNA i 剤は免疫応答を誘導しなかった一方で、対応する一本鎖 RNA i 剤は免疫応答を誘導した。一部の実施形態では、本開示は、免疫原性が低いオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、そのようなオリゴヌクレオチドを ssRNA i 試薬として利用することができる。

【0221】

とりわけ、本開示は、二本鎖 RNA i 剤から、塩基配列を含めて、一本鎖 RNA i 剤を得るという、一本鎖 RNA i 剤のある特定の従来設計は、多くの場合、有効な一本鎖 RNA i 剤を得ることに失敗するという認識を含む。一部の実施形態では、本開示は、驚くべきことに、有効な RNase H 依存性 ASO の塩基配列に由来する ssRNA i 剤から、有効な ssRNA i 剤を得ることができることを示す（表 46A を参照のこと）。

40

【0222】

一部の実施形態では、本開示は、有効な RNase H 依存性 ASO として利用できるオリゴヌクレオチドを提供し、当該オリゴヌクレオチドは、2' -修飾を有さない 2' -デオキシヌクレオチドの領域を含み、RNA 配列またはその一部に相補的または実質的に相補的である。一部の実施形態では、領域は、たとえば、ウィングが片側または両側に隣接

50

する約10ntのコア配列であり得、こうしたウィングは、コアとは化学が異なり、非限定的な例として、2'-修飾またはヌクレオチド間結合修飾を含み得る。

【0223】

オリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序（限定されないが、遺伝子発現のRNAse H介在性ノックダウンまたは立体障害が挙げられる）を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNAse H介在性ノックダウンを介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへの結合後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導することができる。

10

【0224】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の構造的要素もしくは形式またはその一部を有する。

20

【0225】

一部の実施形態では、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の構造的要素もしくは形式またはその一部を有する。

【0226】

一部の実施形態では、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に開示の任意のオリゴヌクレオチドの形式を有し、こうしたオリゴヌクレオチドは、たとえば、表1Aまたは図もしくは表に示されるもの、あるいはその他の箇所で本明細書に開示されるものである。

30

【0227】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、図1に示される形式のいずれかを有する。

【0228】

本開示は、さまざまな形式のさまざまなオリゴヌクレオチドが、複数の異なる種において、複数の異なる遺伝子の中で、複数の異なる配列のいずれかを標的として、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有することを示すデータを提示する。未掲載ではあるが、開示の形式のssRNAi剤の有効性を裏付ける追加のデータが得られた。

40

【0229】

一部の実施形態では、RNAse H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の構造的要素もしくは形式またはその一部を有する。

【0230】

一部の実施形態では、RNAse H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に開示の任意のオリゴヌクレオチドの形式を有し、こうしたオリゴヌクレオチドは、たとえば、表1Aまたは図もしくは表に示されるもの、あるいはその他の箇所で本明細書に開示されるものである。

【0231】

50

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、図 1 に示される形式のいずれかを有する。

【0232】

本開示は、さまざまな形式のさまざまなオリゴヌクレオチドが、複数の異なる種において、複数の異なる遺伝子の中で、複数の異なる配列のいずれかに対して RNAse H 介在性ノックダウンを誘導する能力を有することを示すデータを提示する。未掲載ではあるが、開示の形式の ssRNAi 剤の有効性を裏付ける追加のデータが得られた。

【0233】

一部の実施形態では、一本鎖 RNA 干渉を誘導する能力を有する提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の構造的要素もしくは形式またはその一部を有する。

【0234】

一部の実施形態では、一本鎖 RNA 干渉を誘導する能力を有する提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に開示の任意のオリゴヌクレオチドの形式を有し、こうしたオリゴヌクレオチドは、たとえば、表 1A または図もしくは表に示されるもの、あるいはその他の箇所で本明細書に開示されるものである。

【0235】

一部の実施形態では、提供される一本鎖 RNAi 剤は、図 1 に示される形式のいずれかを有する。

【0236】

本開示は、さまざまな形式のさまざまな RNAi 剤が、複数の異なる遺伝子のいずれかにおいて、複数の異なる配列のいずれかに対して RNA 干渉を誘導する能力を有することを示すデータを提示する。未掲載ではあるが、開示の形式の ssRNAi 剤の有効性を裏付ける追加のデータが得られた。

【0237】

一部の実施形態では、RNAi の標的は、転写産物である。一部の実施形態では、転写産物は、mRNA 前駆体である。一部の実施形態では、転写産物は、成熟 RNA である。一部の実施形態では、転写産物は、mRNA である。一部の実施形態では、転写産物は、変異を含む。一部の実施形態では、変異は、フレームシフトである。一部の実施形態では、転写産物は、未成熟な終結コドンを含む。一部の実施形態では、RNAi の標的は、mRNA ではない RNA である。一部の実施形態では、RNAi の標的は、非コード RNA である。一部の実施形態では、RNAi の標的は、長鎖非コード RNA である。一部の実施形態では、提供される組成物中の提供されるオリゴヌクレオチド、たとえば第 1 の複数のオリゴヌクレオチドは、塩基修飾、糖修飾、及び／またはヌクレオチド間結合修飾を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、塩基修飾と糖修飾を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、塩基修飾とヌクレオチド間結合修飾を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、糖修飾とヌクレオチド間結合修飾を含む。一部の実施形態では、提供される組成物は、塩基修飾、糖修飾、及びヌクレオチド間結合修飾を含む。たとえば塩基修飾、糖修飾、ヌクレオチド間結合修飾などの化学修飾の例は、当分野に広く公知であり、本開示に記載される修飾が挙げられるが、これに限定されない。一部の実施形態では、修飾塩基は、置換された A、T、C、G または U である。一部の実施形態では、糖修飾は、2' - 修飾である。一部の実施形態では、2' - 修飾は、2 - F 修飾である。一部の実施形態では、2' - 修飾は、2' - O¹R であり、式中、R¹ は任意で置換アルキルである。一部の実施形態では、2' - 修飾は、2' - OMe である。一部の実施形態では、2' - 修飾は、2' - MOE である。一部の実施形態では、修飾糖部分は、架橋された二環または多環の環である。一部の実施形態では、修飾糖部分は、5 ~ 20 個の環原子を有する架橋された二環または多環の環であり、式中、1 個以上の還元原子が任意で、及び独立してヘテロ原子である。環構造の例は当分野に広く公知であり、たとえば BNA、LNA などに見出されるものがある。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1 つ以上の修飾ヌクレオチド間結合と 1 つ以上の天然リン酸結合の両方を含む。

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合と天然リン酸結合の両方を含むオリゴヌクレオチドと、その組成物は、たとえば活性などの改善された特性を提供する。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、キラルヌクレオチド間結合である。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合である。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、置換ホスホロチオエート結合である。

【0238】

特に本開示は、立体不規則的オリゴヌクレオチド調製物が、たとえばオリゴヌクレオチド鎖内の個々の骨格キラル中心の立体化学構造において、互いに異なる複数の別個の化学的実体を含むという認識を包含する。骨格キラル中心の立体化学の制御が伴わない場合、立体不規則的なオリゴヌクレオチド調製物は、未確定レベルのオリゴヌクレオチド立体異性体を含む、非制御の組成物を提供する。これらの立体異性体は同じ塩基配列を有し得るが、これらの立体異性体は、少なくともそれらの異なる骨格立体化学に起因する異なる化学実体であり、本明細書に示されるように、異なる特性、例えば、活性などを有し得る。特に本開示は、対象のオリゴヌクレオチドの特定の立体異性体であるか、またはそれを含む、新たな組成物を提供する。一部の実施形態では、特定の立体異性体は、たとえばその塩基配列、長さ、骨格結合パターン、及び骨格キラル中心パターンにより規定されてもよい。当分野に置いて理解されるように、一部の実施形態では、塩基配列は、PNPLA3オリゴヌクレオチド中のヌクレオシド残基の同一性及び／または修飾の状態（たとえば、アデニン、シトシン、グアノシン、チミン、及びウラシルなどの標準的な天然ヌクレオチドと比較した、糖及び／または塩基の構成要素の状態）を指すことができ、及び／またはかかる残基のハイブリダイゼーション特性（すなわち、特定の相補的残基とハイブリダイズする能力）を指すことができる。一部の実施形態では、本開示は、化学的に同一である個々のオリゴヌクレオチド型の所定レベルのオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供するものであり、たとえばそれらは、同じ塩基配列、同じパターンのヌクレオシド修飾（存在する場合、糖部分及び塩基部分への修飾）、同じパターンの骨格キラル中心、及び同じパターンの骨格リン修飾を有する。本開示は特に、特定のオリゴヌクレオチドの個々の立体異性体が、互いに異なる安定性及び／または活性を示し得ることを示す。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド内に特定のキラル構造を含めること及び／または配置することによって達成される適切な改良は、特定の骨格結合、残基修飾などを使用することによって（たとえば、あるタイプの修飾リン酸塩〔たとえば、ホスホロチオエート、置換ホスホロチオエートなど〕、糖修飾〔たとえば、2'-修飾など〕、及び／または塩基修飾〔たとえば、メチル化など〕の使用することによって）、達成されるものに匹敵するか、またはより優れている場合がある。特に、本開示は、一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの1個以上のその他の特性（たとえば結合パターン、ヌクレオシド修飾パターンなど）の調節／最適化と任意で組み合わせて、骨格キラル中心のパターンを最適化することによって、PNPLA3オリゴヌクレオチドの特性（たとえば活性など）を調節することができることを認識している。本開示のさまざまな例によって例示されるように、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、たとえば一本鎖RNA干渉活性の改善、RNAase H介在性ノックダウン、送達の改善などの改善された特性を示し得る。

【0239】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの特性は、立体化学（骨格キラル中心のパターン）及び化学修飾（塩基、糖及び／またはヌクレオチド間結合の修飾）あるいはそのパターンを最適化することによって調節することができる。

【0240】

一部の実施形態では、骨格キラル中心の共通パターン（たとえば、一本鎖RNA i 剤における骨格キラル中心のパターン）は、OSOSO、OSSSO、OSSSOS、SOSO、SOSO、SOSOS、SOSOSO、SOSOSOSO、OSSSSO、SSOSSOSS、SSSOSOSSS、SSSSOSOSSSS、SSSSS、SSSSSS、SSSSSSS、SSSSSSSS、SSSSSSSSS、またはRRRというパター

ンを含み、式中、Sは、S p配置のホスホロチオエートを示し、Oは、ホスホジエステルを示し、Rは、R p配置のホスホロチオエートを示す。

【0241】

一部の実施形態では、非キラル中心は、ホスホジエステル結合である。一部の実施形態では、S p配置のキラル中心は、ホスホロチオエート結合である。一部の実施形態では、非キラル中心は、ホスホジエステル結合である。一部の実施形態では、S p配置のキラル中心は、ホスホロチオエート結合である。

【0242】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の立体化学パターンを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の立体化学パターンを含み、RNA干渉を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の立体化学パターンを含み、RNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の立体化学パターンを含み、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の立体化学パターンを含み、RNA干渉を誘導する能力を有し、立体化学パターンは、シード領域及び／またはポストシード領域に存在する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の立体化学パターンを含み、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有し、立体化学パターンは、シード領域及び／またはポストシード領域に存在する。

【0243】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の修飾または修飾パターンを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の修飾または修飾パターンを含み、RNA干渉を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の修飾パターンを含み、RNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の修飾パターンを含み、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の修飾パターンを含み、RNA干渉を誘導する能力を有し、修飾パターンは、シード領域及び／またはポストシード領域に存在する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載の任意の修飾パターンを含み、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有し、修飾パターンは、シード領域及び／またはポストシード領域に存在する。一部の実施形態では、修飾または修飾パターンは、糖の2'位の修飾または修飾パターンである。一部の実施形態では、修飾または修飾パターンは、糖の修飾または修飾パターンであり、こうした糖の修飾または修飾パターンは、たとえば、糖の2'位におけるもの（限定されないが、2'-デオキシ、2'-F、2'-OMe、2'-MOE、及び2'-OR1（R1は、任意で置換されるC1-6アルキルである）が挙げられる）である。

【0244】

一部の実施形態では、本開示は、2'-F修飾が、とりわけ、一本鎖RNA干渉を改善し得ることを示す。一部の実施形態では、本開示は、S pヌクレオチド間結合が、とりわけ、5'末端及び3'末端に位置すると、オリゴヌクレオチドの安定性を改善し得ることを示す。一部の実施形態では、本開示は、とりわけ、天然リン酸結合及び／またはR pヌクレオチド間結合が、系からのオリゴヌクレオチドの除去を改善し得ることを示す。当業者であれば理解することであるが、本開示によるそのような特性を評価するために、当該技術分野において知られるさまざまなアッセイを利用することができる。

【0245】

一部の実施形態では、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する、提供されるオリゴヌ

クレオチドは、1つ以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの糖部分の5%以上が修飾される。

【0246】

一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、

第1の複数のオリゴヌクレオチドは、同じ塩基配列を有し、

第1の複数のオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾糖部分を含むか、または1つ以上の天然リン酸結合及び1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0247】

一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾糖部分を含む。

10

【0248】

一部の実施形態では、提供される組成物は、転写産物の一本鎖RNA干渉を変化させ、その結果、望ましくない標的及び／または生物学的機能が抑制される。一部の実施形態では、そのような場合、提供される組成物は、ハイブリダイゼーション後に転写産物の切断も誘導することができる。

【0249】

一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、1つ以上の修飾糖部分及び／または1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれが含む非修飾糖部分の割合は約95%以下である。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれが含む非修飾糖部分の割合は約50%以下である。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれが含む非修飾糖部分の割合は約5%以下である。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドの各糖部分は、独立して修飾される。

20

【0250】

一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、2個以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、3個以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、4個以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、5個以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、10個以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む。

30

【0251】

一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれが含む天然リン酸結合の割合は約30%以下である。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれが含む天然リン酸結合の割合は約20%以下である。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれが含む天然リン酸結合の割合は約10%以下である。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれが含む天然リン酸結合の割合は約5%以下である。

40

【0252】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1種以上の同位体の含有レベルが高められる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは標識され、この標識は、たとえば、1種以上の元素（たとえば、水素、炭素、窒素など）の1種以上の同位体によって行われる。一部の実施形態では、提供される組成物中の提供されるオリゴヌクレオチド、たとえば第1の複数のオリゴヌクレオチドは、塩基修飾、糖修飾、及び／またはヌクレオチド間結合修飾を含有し、オリゴヌクレオチドは、重水素の含有レベルが高められる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の位置が重水素で標識される（ $-^1\text{H}$ が $-^2\text{H}$ で置き換えられる）。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは当該オリゴヌクレオチドに複合体化された任意の部分（た

50

例えば、標的化部分、脂質部分など)の1つ以上の ^1H が ^2H で置き換えられる。かかるオリゴヌクレオチドを、本明細書に記載される任意の組成物または方法に使用することができる。

【0253】

本発明は、薬学的に許容可能な同位体標識化合物のすべてを含み、こうした化合物においては、同じ原子番号を有するが、天然に通常見られる原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子によって1個以上の原子が置き換えられる。

【0254】

本発明の化合物に含めるのに適した同位体の例としては、水素の同位体(^2H 及び ^3H など)、炭素の同位体(^{11}C 、 ^{13}C 、及び ^{14}C など)、塩素の同位体(^{36}Cl など)、フッ素の同位体(^{18}F など)、ヨウ素の同位体(^{123}I 、 ^{124}I 、及び ^{125}I など)、窒素の同位体(^{13}N 及び ^{15}N など)、酸素の同位体(^{15}O 、 ^{17}O 、及び ^{18}O など)、リンの同位体(^{32}P など)、ならびに硫黄の同位体(^{35}S など)が挙げられる。

【0255】

式(I)のある特定の同位体標識化合物(たとえば、放射性同位体が組み込まれたもの)は、薬物試験及び／または基質組織分布試験において有用である。放射性同位体である三重水素(すなわち、 ^3H)及び炭素-14(すなわち、 ^{14}C)は、その組み込みが容易であり、その検出手段が整っていることを考慮すると、この目的に特に有用である。

【0256】

重同位体(重水素(すなわち ^2H)など)での置き換えは、代謝安定性の向上(たとえば、*in vivo*半減期の長期化)または必要投与量の低減に起因してある特定の治療利点が生じ得るため、状況によっては好ましくあり得る。

【0257】

陽電子放出同位体(^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 、及び ^{13}N など)での置き換えは、基質の受容体占有を調べるための陽電子放出断層撮影(PET)試験において有用であり得る。

【0258】

同位体標識化合物は、一般に、当業者に知られる従来手法によって調製するか、または以前に利用された非標識試薬の代わりに適切な同位体標識試薬を使用して添付の実施例及び調製事例に記載のものと類似のプロセスによって調製することができる。

【0259】

本発明の化合物は、不斉中心またはキラル中心を含有し得ることから、異なる立体異性体で存在し得る。別段の指定がない限り、本発明の化合物のすべての立体異性体及びラセミ混合物を含むその混合物が、本発明の一部を形成することが意図される。さらに、本発明は、全ての幾何異性体及び位置異性体を包含する。たとえば、本発明の化合物が二重結合または縮合環を組み込んでいる場合、そのシス型とトランス型の両方及びその混合物が、本発明の範囲内に含まれる。

【0260】

本発明のキラル化合物(及びそのキラル前駆体)は、クロマトグラフィー、典型的には高速液体クロマトグラフィー(HPLC)または超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)を使用し、不斉固定相の樹脂上で、0~50%、典型的には2~20%のイソプロパノール、及び0~5%のアルキルアミン、典型的には0.1%ジエチルアミン(DEA)またはイソプロピルアミンを含有する、炭化水素、典型的にはヘプタンまたはヘキサンからなる移動相を用いることにより、エナンチオマー的に濃縮された形態で得ることができる。溶離液を濃縮すると、濃縮された混合物が得られる。

【0261】

ジアステレオマー混合物は、その物理化学的差異に基づいて、当業者に周知の方法によって、例えば、クロマトグラフィー及び／または分別結晶化などによって、個々のジアステレオマーに分離することができる。エナンチオマーは、適切な光学的に活性な化合物(例えば、キラルアルコールまたはモッシャー酸クロリドなどのキラル補助剤)との反応に

10

20

30

40

50

よってエナンチオマー混合物をジアステレオマー混合物に変換し、ジアステレオマーを分離し、個々のジアステレオマーを対応する純粋なエナンチオマーに変換すること（例えば、加水分解すること）によって、分離することができる。エナンチオマーはまた、キラル HPLC カラムの使用によって分離することもできる。あるいは、光学的に活性な出発物質を使用することによって、光学的に活性な試薬、基質、触媒もしくは溶媒を使用する不斉合成によって、または不斉変換により 1 つの立体異性体を他の立体異性体に変換することによって、特定の立体異性体を合成することもできる。

【0262】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの構造的要素の制御することで、所望の生物学的効果に対して顕著な影響を与えることができ、こうした構造的要素は、化学修飾（たとえば、糖の修飾、塩基の修飾、及び／またはヌクレオチド間結合の修飾）またはそのパターン、立体化学（たとえば、骨格のキラルヌクレオチド間結合の立体化学）の改変またはそのパターン、同じ元素の同位体での原子の置き換え、及び／または追加の化学的部分（たとえば、脂質部分、標的化部分など）との複合体化などである。一部の実施形態では、所望の生物学的効果は、2 倍超に増進する。

【0263】

一部の実施形態では、所望の生物学的効果は、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少の誘導である。一部の実施形態では、所望の生物学的効果は、一本鎖 RNA 干渉の改善である。一部の実施形態では、所望の生物学的効果は、RNAse H 介在性ノックダウンの改善である。一部の実施形態では、所望の生物学的効果は、一本鎖 RNA 干渉及び／または RNAse H 介在性ノックダウンの改善である。

【0264】

一部の実施形態では、本開示は、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドを含む PNPLA3 オリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該第 1 の複数のオリゴヌクレオチドは、

- 1) 転写産物における標的配列に相補的な共通塩基配列を有し、
- 2) 1 つ以上の修飾糖部分及び修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0265】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、それが一本鎖 RNA 干渉系において転写産物と接触すると、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件の下で観察されるものと比較して転写産物の RNAi 介在性ノックダウンが改善するという点において特徴付けられる。

【0266】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖 RNA 干渉を誘導する能力を有する第 1 の複数のオリゴヌクレオチドを含む PNPLA3 オリゴヌクレオチド組成物を提供し、PNPLA3 オリゴヌクレオチド型は、

- 1) 塩基配列、
- 2) 骨格結合のパターン、
- 3) 骨格キラル中心のパターン、及び
- 4) 骨格リン修飾のパターン

によって定義され、

当該組成物は、特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して当該組成物が富化されるという点においてキラル制御され、

当該オリゴヌクレオチド組成物は、それが一本鎖 RNA 干渉系において転写産物と接触すると、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件の下で観察されるものと比較して転写産物の RNAi 介在性ノックダウンが改善するという点において特徴付けられる。

【0267】

一部の実施形態では、連続ヌクレオシド単位はそれぞれ、独立して、修飾ヌクレオチド間結合の後及び／または前に位置する。一部の実施形態では、連続ヌクレオシド単位はそ

10

20

30

40

50

れぞれ、独立して、ホスホロチオエート結合の後及び／または前に位置する。一部の実施形態では、連続ヌクレオシド単位はそれぞれ、独立して、キラル制御された修飾ヌクレオチド間結合の後及び／または前に位置する。一部の実施形態では、連続ヌクレオシド単位はそれぞれ、独立して、キラル制御されたホスホロチオエート結合の後及び／または前に位置する。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、式Ⅰの構造を有する。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、式Ⅰ-aの構造を有する。

【0268】

一部の実施形態では、本開示は、所定レベルの第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む一本鎖RNA i 剤を提供し、

第1の複数のオリゴヌクレオチドは、同じ塩基配列を有し、

第1の複数のオリゴヌクレオチドは、S p 修飾ヌクレオチド間結合を連続して2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、またはそれ以上含むシード領域と、S p 修飾ヌクレオチド間結合を連続して2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、またはそれ以上含むポストシード領域と、を含む。

【0269】

一部の実施形態では、シード領域は、S p 修飾ヌクレオチド間結合を連続して2つ以上含む。

【0270】

一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、式Ⅰの構造を有する。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、式Ⅰ-aの構造を有する。

【0271】

本開示に記載されるように、一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、それが一本鎖RNA干渉系において転写産物と接触すると、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件の下で観察されるものと比較して転写産物のRNA i 介在性ノックダウンが改善するという点において特徴付けられる。

【0272】

一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、

- 1) 共通の塩基配列及び長さ、
- 2) 骨格結合の共通パターン、及び
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を有することによって定義され、当該組成物は、当該組成物中の所定レベルのオリゴヌクレオチドが、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するという点で、単一オリゴヌクレオチドの実質的に純粋な調製物である。

【0273】

一部の実施形態では、共通の塩基配列及び長さは、共有塩基配列と呼称される場合がある。一部の実施形態では、共通塩基配列を有するオリゴヌクレオチドは、同じパターンのたとえば糖修飾、塩基修飾などのヌクレオシド修飾を有してもよい。一部の実施形態では、ヌクレオシド修飾のパターンは、位置と修飾の組み合わせにより表される場合がある。一部の実施形態では、骨格結合のパターンは、それぞれのヌクレオチド間結合の位置及び型（たとえば、リン酸、ホスホロチオエート、置換ホスホロチオエートなど）を含む。PNPLA3オリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターンは、5'から3'にかけての結合リン立体化学(Rp/Sp)の組み合わせによって指定することができる。上に例示されるように、非キラル結合の位置は、たとえば、骨格結合のパターンから把握され得る。

【0274】

当業者に理解されるように、オリゴヌクレオチドの立体不規則的調製物またはラセミ調製物は、多くの場合、いずれのキラル補助基、キラル修飾試薬及び／またはキラル触媒も使用しない、非立体選択的及び／または低立体選択的なヌクレオチドモノマーのカップリングにより調製される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの実質的にラセミな（

10

20

30

40

50

またはキラル的に非制御な) 調製物において、全てまたは大部分のカップリングステップが、当該カップリングステップは立体選択性の強化をもたらすように特異的に実施されていないという点で、キラル的に制御されていない。オリゴヌクレオチドの実質的にラセミな調製物の例は、当分野に公知のプロセスである、テトラエチルチウラムジスルフィドまたは (TETD) または 3H-1, 2-ベンゾジチオール (bensodithiol) -3-オン 1, 1-ジオキシド (BDTD) のいずれかを用いた、一般的に使用されるホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成から、亜リン酸トリエステルを硫化することによる、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの調製物である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの実質的にラセミな調製物は、実質的にラセミなオリゴヌクレオチド組成物 (またはキラル非制御なオリゴヌクレオチド組成物) を提供する。

10

【0275】

当業者に理解されるように、一部の実施形態では、カップリングまたは結合のジアステレオ選択性は、同一または同等の条件下での二量体生成のジアステレオ選択性を介して評価することができ、ここで、当該二量体は、同じ 5'-ヌクレオシド及び 3'-ヌクレオシドならびにヌクレオチド間結合を有する。

【0276】

一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該組成物は、単一オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同じオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して富化されるという点においてキラル制御される。一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供し、当該組成物は、単一オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同じオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して富化され、当該単一オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、

20

- 1) 共通の塩基配列及び長さ、
- 2) 骨格結合の共通パターン、及び
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

を共有する。

【0277】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を提供し、オリゴヌクレオチドは、

30

- 1) 共通の塩基配列及び長さ、
- 2) 骨格結合の共通パターン、及び
- 3) 骨格キラル中心の共通パターン

によって特徴付けられる特定のオリゴヌクレオチド型のものであり、

当該組成物は、特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同じ塩基配列と長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して、富化されているという点でキラル制御される。

【0278】

40

一部の実施形態では、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターン及び塩基修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターン及びヌクレオシド修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドは、同一の構造を有する。

【0279】

一部の実施形態では、あるPNPLA3オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターン及び糖修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では

50

、あるPNPLA3オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターン及び塩基修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、あるPNPLA3オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターン及びヌクレオシド修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、あるPNPLA3オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、同一である。

【0280】

一部の実施形態では、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターン及びヌクレオシド修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターン及び糖修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターン及び塩基修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターン及びヌクレオシド修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、共通の塩基配列と長さ、骨格結合の共通パターン、及び骨格キラル中心の共通パターンを有するオリゴヌクレオチドは、同一である。

【0281】

一部の実施形態では、提供される組成物中のオリゴヌクレオチドは、骨格リン修飾の共通パターンを有する。一部の実施形態では、共通塩基配列は、あるPNPLA3オリゴヌクレオチド型の塩基配列である。一部の実施形態では、提供される組成物は、当該組成物が個々のオリゴヌクレオチド型の第1の複数のオリゴヌクレオチドを所定レベルで含むという点においてキラル制御されたPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物であり、PNPLA3オリゴヌクレオチド型は、

- 1) 塩基配列、
- 2) 骨格結合のパターン、
- 3) 骨格キラル中心のパターン、及び
- 4) 骨格リン修飾のパターン

によって定義される。

【0282】

上述され、当分野に置いて理解されるように、一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列は、当該オリゴヌクレオチド中のヌクレオシド残基の同一性及び／または修飾の状態（たとえば、アデニン、シトシン、グアノシン、チミン、及びウラシルなどの標準的な天然ヌクレオチドと比較した、糖及び／または塩基の構成要素の状態）を指すことができ、及び／またはかかる残基のハイブリダイゼーション特性（すなわち、特定の相補的残基とハイブリダイズする能力）を指すことができる。

【0283】

一部の実施形態では、特定のオリゴヌクレオチド型は、同じ塩基配列（長さを含む）、糖及び塩基部分への同じ化学修飾パターン、同じ骨格結合パターン（たとえば、天然リン酸結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロチオエートトリエステル結合、及びそれらの組み合わせのパターン）、同じ骨格キラル中心パターン（たとえば、キラルヌクレオチド間結合の立体化学（Rp/Sp）パターン）、及び同じ骨格リン修飾パターン（たとえば、ヌクレオチド間リン原子上の修飾パターン、たとえば式Iの-S⁻、及び-L-R¹）を有するという点で化学的に同一である。

【0284】

とりわけ、本開示は、オリゴヌクレオチドの構造的要素（たとえば、化学修飾のパターン、骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または骨格リン修飾のパタ

ーン)を組み合わせることで、特性(生物活性など)を驚くほど改善できることを認識するものである。

【0285】

一部の実施形態では、提供されるキラル制御された(及び/または立体化学的に純粋な)調製物は、RNAi剤オリゴヌクレオチドである。

【0286】

一部の実施形態では、提供されるキラル制御された(及び/または立体化学的に純粋な)調製物は、1個以上の修飾された骨格結合、塩基、及び/または糖を含むオリゴヌクレオチドの調製物である。

【0287】

一部の実施形態では、提供される組成物は、糖部分で修飾される1つ以上の残基を含むオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供される組成物は、糖部分の2'位で修飾される(本明細書において、「2'-修飾」と呼称される)残基を1個以上含むオリゴヌクレオチドを含む。そのような修飾の例は、上述及び本明細書に記載され、2'-OMe、2'-MOE、2'-LNA、2'-F、FRNA、FANA、Scetなどが挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、提供される組成物は、2'-修飾される残基を1個以上含むオリゴヌクレオチドを含む。たとえば、一部の実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)修飾される残基を1個以上含む。一部の実施形態では、提供される組成物は、任意の2'-修飾を含まないオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供される組成物は、任意の2'-MOE残基を含まないオリゴヌクレオチドである。すなわち一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、MOE修飾されない。糖修飾の追加例は、本開示に記載される。

【0288】

一部の実施形態では、1個以上は、1個である。一部の実施形態では、1個以上は、2個である。一部の実施形態では、1個以上は、3個である。一部の実施形態では、1個以上は、4個である。一部の実施形態では、1個以上は、5個である。一部の実施形態では、1個以上は、6個である。一部の実施形態では、1個以上は、7個である。一部の実施形態では、1個以上は、8個である。一部の実施形態では、1個以上は、9個である。一部の実施形態では、1個以上は、10個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも1個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも2個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも3個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも4個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも5個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも6個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも7個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも8個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも9個である。一部の実施形態では、1個以上は、少なくとも10個である。

【0289】

一部の実施形態では、2'-修飾のない糖部分は、天然DNAヌクレオシド中に存在する糖部分である。

【0290】

当業者であれば、標的転写産物の様々な領域が、提供される組成物及び方法により標的化され得ることを理解する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、イントロン配列を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、エクソン配列を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、イントロン配列とエクソン配列を含む。

【0291】

当業者に理解されるように、提供されるオリゴヌクレオチド及び組成物は特に、非常に多くの核酸ポリマーを標的とすることができる。たとえば一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド及び組成物は、核酸配列の転写産物を標的とすることができ、ここ

10

20

30

40

50

で、オリゴヌクレオチドの共通塩基配列（たとえば、ある P N P L A 3 オリゴヌクレオチド型の塩基配列）は、その転写産物の配列に対し相補的な配列であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、共通塩基配列は、標的の配列に対し相補的な配列を含む。一部の実施形態では、共通塩基配列は、標的の配列に対し相補的な配列である。一部の実施形態では、共通塩基配列は、標的の配列に対し 1 0 0 % 相補的な配列であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、共通塩基配列は、標的の配列に対し 1 0 0 % 相補的な配列を含む。一部の実施形態では、共通塩基配列は、標的の配列に対し 1 0 0 % 相補的な配列である。

【 0 2 9 2 】

I

【 0 2 9 3 】

一部の実施形態では、共通塩基配列は、特徴的な配列要素に対し相補的な配列であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、共通塩基配列は、特徴的な配列要素に対し相補的な配列を含む。一部の実施形態では、共通塩基配列は、特徴的な配列要素に対し相補的な配列である。一部の実施形態では、共通塩基配列は、特徴的な配列要素に対し 1 0 0 % 相補的な配列であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、共通塩基配列は、特徴的な配列要素に対し 1 0 0 % 相補的な配列を含む。一部の実施形態では、共通塩基配列は、特徴的な配列要素に対し 1 0 0 % 相補的な配列である。本明細書の実施形態の一部では、特徴的な配列要素は、非限定的な例として、シード領域、ポストシード領域、またはシード領域の一部、またはポストシード領域の一部、または 3 ' 末端ジヌクレオチドである。

【 0 2 9 4 】

一部の実施形態では、特徴的な配列要素は、変異を含むか、または変異である。一部の実施形態では、特徴的な配列要素は、変異を含む。一部の実施形態では、特徴的な配列要素は、変異である。一部の実施形態では、特徴的な配列要素は、点変異を含むか、または点変異である。一部の実施形態では、特徴的な配列要素は、点変異を含む。一部の実施形態では、特徴的な配列要素は、点変異である。一部の実施形態では、特徴的な配列要素は、S N P を含むか、または S N P である。一部の実施形態では、特徴的な配列要素は、S N P を含む。一部の実施形態では、特徴的な配列要素は、S N P である。

【 0 2 9 5 】

一部の実施形態では、共通塩基配列は、標的配列と 1 0 0 % マッチし、当該標的配列は、標的配列の類似配列とは 1 0 0 % マッチしない。

【 0 2 9 6 】

たとえば、一部の実施形態では、共通塩基配列は、標的核酸配列の疾患原因となるコピーまたはアレルにおける変異とマッチするが、当該変異部位における疾患原因とならないコピーまたはアレルとはマッチしない。一部の他の実施形態では、共通塩基配列は、標的核酸配列の疾患原因となるアレルにおける S N P とマッチするが、対応部位における疾患原因とならないアレルとはマッチしない。

【 0 2 9 7 】

特に本開示は、塩基配列は、オリゴヌクレオチドの特性に影響を与え得ると認識している。一部の実施形態では、ある塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが、たとえば R N a s e H を含む経路を介した標的の抑制に利用されるとき、当該塩基配列は標的の切断パターンに影響を与え得る。たとえば、異なる配列を有する構造的には類似な（すべてのホスホロチオエート結合、すべての立体化学）オリゴヌクレオチドは、異なる切断パターンを有し得る。

【 0 2 9 8 】

一部の実施形態では、共通塩基配列は、S N P を含む塩基配列である。

【 0 2 9 9 】

当業者であれば理解することであるが、提供されるオリゴヌクレオチド組成物及び方法は、当業者に知られるさまざまな用途を有する。提供される組成物の評価方法、ならびに

10

20

30

40

50

その特性及び用途もまた、当業者によって広く知られ、実践されている。特性、用途、及び／または方法の例としては、限定されないが、WO／2014／012081及びWO／2015／107425に記載のものが挙げられる。

【0300】

一部の実施形態では、キラルヌクレオチド間結合は、式Iの構造を有する。一部の実施形態では、キラルヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。一部の実施形態では、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチド中の各キラルヌクレオチド間結合は、式Iの構造を有する。一部の実施形態では、提供される組成物の単一のオリゴヌクレオチド中の各キラルヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。

【0301】

一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、1個以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、1個以上の修飾塩基部分を含む。当業者には公知であり、及び本開示に記載されるように、様々な修飾を当及び／または部分に導入することができる。たとえば一部の実施形態では、修飾は、US9006198、WO2014／012081、及びWO／2015／107425に記載される修飾であり、それら各々の糖修飾及び塩基修飾は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0302】

一部の実施形態では、糖修飾は、2'-修飾である。普遍的に使用される2'-修飾としては限定されないが、2'-OR¹が挙げられ、式中、R¹は水素ではない。一部の実施形態では、修飾は2'-ORであり、式中、Rは任意で置換される脂肪族である。一部の実施形態では、修飾は、2'-OMeである。一部の実施形態では、修飾は、2'-OMOEである。一部の実施形態では、本開示は、特定のキラル的に純粋なヌクレオチド間結合の含有及び／または配置は、修飾された骨格結合、塩基、及び／または糖の使用を介して達成されるものに匹敵、またはより優れた安定性の改善をもたらし得ることを示す。一部の実施形態では、提供される組成物の提供される単一オリゴヌクレオチドは、糖上に修飾を有さない。一部の実施形態では、提供される組成物の提供される単一オリゴヌクレオチドは、糖の2'-位置上に修飾を有さない（すなわち、2'-位置の2個の基は、-H／-Hまたは-H／-OHのいずれかである）。一部の実施形態では、提供される組成物の提供される単一オリゴヌクレオチドは、2'-MOE修飾を1個も有さない。

【0303】

一部の実施形態では、2'-修飾は、-O-L-または-L-であり、それらは糖部分の2'-炭素を、糖部分の別の炭素に繋げる。一部の実施形態では、2'-修飾は、-O-L-または-L-であり、それらは糖部分の2'-炭素を、糖部分の4'-炭素に繋げる。一部の実施形態では、2'-修飾は、S-cEtである。一部の実施形態では、修飾糖部分は、LNA部分である。

【0304】

一部の実施形態では、2'-修飾は、-Fである。一部の実施形態では、2'-修飾は、FANAである。一部の実施形態では、2'-修飾は、FRNAである。

【0305】

一部の実施形態では、糖修飾は、5'-修飾であり、たとえばR-5'-Me、S-5'-Meなどである。

【0306】

一部の実施形態では、糖修飾は、糖の環のサイズを変化させる。一部の実施形態では、糖修飾は、FHNA中の糖部分である。

【0307】

一部の実施形態では、糖修飾は、糖部分を、別の環式部分または非環式部分と置き換える。このような部分の例は当分野に広く公知であり、限定されないが、モルホリノで（任意でそのホスホロジアミデート結合とともに）使用されるもの、グリコール核酸などが挙げられる。

【0308】

一部の実施形態では、ssRNAi 剤は、図 1 またはその他の箇所で本明細書に記載される任意の形式の任意の ssRNAi からなる群から選択される PNPLA3 オリゴヌクレオチドであるか、または当該オリゴヌクレオチドを含む。当業者であれば、本明細書を読めば、ssRNAi 剤と表記される本明細書に記載のオリゴヌクレオチドはいずれも、別の機序（たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチドとしてのもの、RNase H 機序を介してノックダウンを媒介するもの、翻訳を立体的に妨害するもの、または任意の他の生化学的機序）を介して付加的または代替的に機能し得るという可能性を本開示が明確に排除しないことを理解するであろう。

【0309】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) は、図 2 に記載の任意の形式の任意のオリゴヌクレオチドからなる群から選択される PNPLA3 オリゴヌクレオチドであるか、または当該オリゴヌクレオチドを含む。当業者であれば、本明細書を読めば、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) と表記される本明細書に記載のオリゴヌクレオチドはいずれも、別の機序（たとえば、RISC を利用する ssRNAi としてのもの）を介して付加的または代替的に機能し得るという可能性を本開示が明確に排除しないことを理解するであろう。本開示は、異なる機序 (RNase H を利用するもの、翻訳または他の転写後プロセスを立体的に遮断するもの、標的核酸の立体構造を変えるものなど) を介してさまざまな ASO が機能し得ることも明記する。

【0310】

一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、WV-2111、WV-2113、WV-2114、WV-2148、WV-2149、WV-2152、WV-2153、WV-2156、WV-2157、WV-2387、WV-3069、WV-7523、WV-7524、WV-7525、WV-7526、WV-7527、WV-7528、及び図 1L の形式 S40~S42 のいずれかの任意のオリゴヌクレオチド、または図 1 の形式 30~32、形式 66~69、もしくは形式 101~103 のいずれかの任意のオリゴヌクレオチド、からなる群から選択される PNPLA3 オリゴヌクレオチドであるか、または当該オリゴヌクレオチドを含む。当業者であれば、本明細書を読めば、ハイブリッドオリゴヌクレオチドと表記される本明細書に記載のオリゴヌクレオチドはいずれも、別の機序（たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチドとしてのもの、RNase H 機序を介してノックダウンを媒介するもの、翻訳を立体的に妨害するもの、または任意の他の生化学的機序）を介して付加的または代替的に機能し得るという可能性を本開示が明確に排除しないことを理解するであろう。

【0311】

キラル制御されたオリゴヌクレオチド、及びキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA 干渉を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA 干渉または RISC が関与しない生化学的機序（限定されないが、遺伝子発現の RNase H 介在性ノックダウンまたは立体障害が挙げられる）を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA 干渉及び／または RNase H 介在性ノックダウンを介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子 mRNA へのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／または mRNA スプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御される。

【0312】

本開示は、粗純度が高いか、またはジアステレオマー純度が高い、キラル制御されたオリゴヌクレオチド及びキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、粗純度が高い、キラル制御されたオリゴヌクレオチド及びキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、ジアステレオマー純度が高い、キラル制御されたオリゴヌクレオチド及びキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0313】

一部の実施形態では、ある1つのオリゴヌクレオチド型のものではないオリゴヌクレオチドが組成物に存在するならば、こうしたオリゴヌクレオチドが、当該オリゴヌクレオチド型の調製プロセスに由来する（場合によっては、ある特定の精製手順の後の）不純物であるという点において、一本鎖RNA i 剤は、PNPLA3オリゴヌクレオチド型の実質的に純粋な調製物である。

【0314】

一部の実施形態では、本開示は、キラル結合リンに関し、1個以上のジアステレオマー的に純粋なヌクレオチド間結合を含むオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、式Iの構造を有するジアステレオマー的に純粋なヌクレオチド間結合を1個以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、キラル結合リンに関し、ジアステレオマー的に純粋なヌクレオチド間結合を1個以上含有し、及び1個以上のリン酸ジエステル結合を含むオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では本開示は、式Iの構造を有するジアステレオマー的に純粋なヌクレオチド間結合を1個以上、及びリン酸ジエステル結合を1個以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では本開示は、式I-cの構造を有するジアステレオマー的に純粋なヌクレオチド間結合を1個以上、及びリン酸ジエステル結合を1個以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態ではかかるオリゴヌクレオチドは、本出願に記載される、立体選択的オリゴヌクレオチド合成を使用することにより調製され、キラル結合リンに関して予め設計されたジアステレオマー的に純粋なヌクレオチド間結合を形成する。ヌクレオチド間結合の例としては、式Iの構造を有するものが挙げられ、ヌクレオチド間結合の例は、以下にさらに記載される。

【0315】

一部の実施形態では、本開示は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のヌクレオチド間結合のうちの少なくとも2つが、互いに異なる立体化学及び／または互いに異なるP-修飾を有する。

【0316】

ヌクレオチド間結合

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序（限定されないが、遺伝子発現のRNAase H介在性ノックダウンまたは立体障害が挙げられる）を介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNAase H介在性ノックダウンを介して標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意のヌクレオチド間結合を含む。

【0317】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンとの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意のヌクレオチド間結合を含み得る。

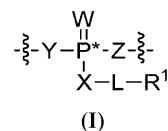
【0318】

ヌクレオチド間結合または非修飾ヌクレオチド間結合の非限定的な例は、ホスホジエステルであり、修飾ヌクレオチド間結合の非限定的な例としては、ホスホジエステルの1つ以上の酸素が、非限定的な例として、硫黄（ホスホロチオエートに見られるもの）、H、アルキル、または別の部分もしくは酸素ではない元素、によって置き換えられているものが挙げられる。ヌクレオチド間結合の非限定的な例は、リンを含まないが、2つの糖の連結に役立つ部分である。ヌクレオチド間結合の非限定的な例は、リンを含まないが、PNPLA3オリゴヌクレオチドの骨格における2つの糖の連結に役立つ部分である。ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド間結合、修飾ヌクレオチド間結合、塩基、修飾塩基、及び塩基アナログ、糖、修飾糖、及び糖アナログ、ならびにヌクレオシド、修飾ヌクレオシド、及びヌクレオシドアナログの非限定的な例は、本明細書にさらに開示される。

【0319】

ある特定の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、以下の式Iの構造を有する：

【化2】



式中、各可変部分は、以下に定義され、及び記載されるとおりである。一部の実施形態では、式Iの結合は、キラルである。一部の実施形態では、本開示は、式Iの修飾ヌクレオチド間結合を1個以上含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、式Iの修飾ヌクレオチド間結合を1個以上含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、及びここで、当該オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のヌクレオチド間結合は、互いに異なるP-修飾を有する。一部の実施形態では、本開示は、式Iの修飾ヌクレオチド間結合を1つ以上含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のヌクレオチド間結合は、互いに異なる-X-L-R¹を有する。一部の実施形態では、本開示は、式Iの修飾ヌクレオチド間結合を1つ以上含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のヌクレオチド間結合は、互いに異なるXを有する。一部の実施形態では、本開示は、式Iの修飾ヌクレオチド間結合を1つ以上含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のヌクレオチド間結合は、互いに異なる-L-R¹を有する。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、特定のオリゴヌクレオチド型のものである提供される組成物におけるPNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、共通の塩基配列及び長さ、共通の骨格結合パターン、及び共通の骨格キラル中心パターンを有する、提供される組成物におけるPNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、特定のオリゴヌクレオチド型の組成物であるキラル制御された組成物中のPNPLA3オリゴヌクレオチドであり、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、当該型のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、キ

ラル制御されたオリゴヌクレオチドは、所定レベルの複数のオリゴヌクレオチドを含む提供される組成物中のPNPLA3オリゴヌクレオチドであり、当該複数のオリゴヌクレオチドは、共通塩基配列、共通パターンの骨格結合、及び共通パターンの骨格キラル中心を共有し、及びキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、共通塩基配列、共通パターンの骨格結合、及び共通パターンの骨格キラル中心を共有する。

【0320】

一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、異なるヌクレオチド間リン結合を含む。

【0321】

一部の実施形態では、ホスホロチオエートトリエステル結合は、キラル補助基を含有し、たとえばそれを使用して、反応の立体選択性を制御する。一部の実施形態では、ホスホロチオエートトリエステル結合は、キラル補助基を含まない。一部の実施形態では、ホスホロチオエートトリエステル結合は、対象への投与まで、及び／または対象への投与の間、意図的に維持される。

【0322】

一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、固形支持体に結合される。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、固形支持体から切り離される。

【0323】

一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルヌクレオチド間結合と、少なくとも2個の連続的な修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルヌクレオチド間結合と、少なくとも2個の連続的なホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含む。

【0324】

一部の実施形態では、本開示は、提供される複数のオリゴヌクレオチドからなる、またはこれを含む組成物を提供する（たとえばキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物）。一部の実施形態では、そのような提供されるオリゴヌクレオチドはすべて同じ型のものである。すなわち、すべてが、同じ塩基配列、骨格結合パターン（すなわち、ヌクレオチド間結合型のパターン、例えば、リン酸、ホスホロチオエートなど）、骨格キラル中心パターン（すなわち、結合リン立体化学のパターン（Rp/Sp））、及び骨格リン修飾パターン（たとえば、本明細書に開示の式Iの「-XLR¹」基のパターン）を有する。一部の実施形態では、同じオリゴヌクレオチド型のすべてが、同一である。しかしながら多くの実施形態において、提供される組成物は複数のオリゴヌクレオチド型を、典型的には所定の相対量で含む。

【0325】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンとの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意のヌクレオチド間結合を含み得る。一部の実施形態では、ASPGRと結合する部分（たとえば、GalNAc部分）は、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意のGalNAcまたはそのバリエーションもしくは修飾物である。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンとの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるか、または当該技術分野において知られる任意のヌクレオチド間結合を、本明細書に記載の任意の他の構造的要素または修飾と組み合わせて含み得、こうした他の構造的要素または修飾としては、限定されないが、塩基配列もしくはその一部、糖、塩基（核酸塩基）、立体化学

10

20

30

40

50

もしくはそのパターン、追加の化学的部分（限定されないが、標的化部分、脂質部分、炭水化物部分などが挙げられる）、シード領域、ポストシード領域、5'末端構造、5'末端領域、5'ヌクレオチド部分、3'末端領域、3'末端ジヌクレオチド、3'末端キャップ、長さ、追加の化学的部分（限定されないが、標的化部分、脂質部分、GalNAcなどが挙げられる）、形式もしくはその任意の構造的要素、及び／または本明細書に記載の任意の他の構造的要素もしくは修飾が挙げられる。一部の実施形態では、本開示は、任意のそのようなオリゴヌクレオチドの多量体に関する。

【0326】

一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾ヌクレオチド間リン結合を含む。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、たとえば、ホスホロチオエートまたはホスホロチオエートトリエステル結合を含む。

10

【0327】

一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、たとえば、以下に記載されるものから選択される：US20110294124、US20120316224、US20140194610、US20150211006、US20150197540、WO2015107425、PCT/US2016/043542、及びPCT/US2016/043598、Whittaker et al. 2008 Tetrahedron Letters 49:6984-6987。

【0328】

ヌクレオチド間結合の非限定的な例としては、当分野に報告されるものなどが挙げられ、限定されないが、以下のいずれかに記載されるものが挙げられる：Gryaznov, S.; Chen, J.-K. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 3143、Jones et al. J. Org. Chem. 1993, 58, 2983、Koshkin et al. 1998 Tetrahedron 54:3607-3630、Lauritsen et al. 2002 Chem. Comm. 5:530-531、Lauritsen et al. 2003 Bioorg. Med. Chem. Lett. 13:253-256、Mesmaeker et al. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1994, 33, 226、Petersen et al. 2003 TRENDS Biotech. 21:74-81、Schultz et al. 1996 Nucleic Acids Res. 24:2966、Ts'o et al. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1988, 507, 220、及びVasseur et al. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4006。

20

30

【0329】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、1個以上のUが、Tと置き換えられる。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、当該配列は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列と50%を超える同一性を有する。

40

【0330】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または骨格リン修飾のパターンを有する。

【0331】

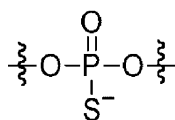
50

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、1個以上のTが、Uで置換される。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、当該配列は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列と50%を超える同一性を有する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、当該配列は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列と60%を超える同一性を有する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、当該配列は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列と70%を超える同一性を有する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドの配列と80%を超える同一性を有する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドの配列と90%を超える同一性を有する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドの配列と95%を超える同一性を有する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。

【0332】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、少なくともも1つのヌクレオチド間結合は、

【化3】



である。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、各ヌクレオチド間結合は、

10

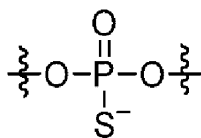
20

30

40

50

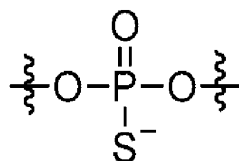
【化 4】



10

である。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドに見られる配列を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、少なくとも1つのヌクレオチド間結合は、

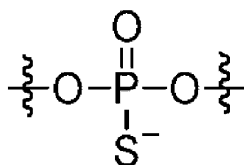
【化 5】



20

である。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、各ヌクレオチド間結合は、

【化 6】



40

である。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、各シトシンは任意で、及び独立して、5-メチルシトシンにより置き換えられる。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、少なくとも1つのシトシンは任意で、及び

50

独立して、5-メチルシトシンにより置き換えられる。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの配列を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、各シトシンは任意で、及び独立して、5-メチルシトシンにより置き換えられる。

【0333】

塩基（核酸塩基）

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序（限定されないが、遺伝子発現のRNase H介在性ノックダウンまたは立体障害を含む）を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNase H介在性ノックダウンを介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の核酸塩基を含む。

【0334】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド中に存在する核酸塩基は、天然の核酸塩基、または天然核酸塩基から誘導された修飾核酸塩基である。例としては、限定されないが、それぞれのアミノ基がアシル保護基により保護されているウラシル、チミン、アデニン、シトシン、及びグアニンと、フルオロウラシル、2-フルオロシトシン、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、2, 6-ジアミノプリン、アザシトシン、疑似イソシトシンや疑似ウラシルなどのピリミジンアナログ、8-置換のプリン、キサンチン、またはヒポキサンチンなどのその他の修飾核酸塩基が挙げられる（最後の2つは、自然分解生成物である）。修飾核酸塩基の例は、Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196及びRevankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313に記載されている。いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、置換されたウラシル、チミン、アデニン、シトシンまたはグアニンである。いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は、例えば、ウラシル、チミン、アデニン、シトシンまたはグアニンの水素結合及び／または塩基対形成に関する、機能的な置き換えである。いくつかの実施形態において、核酸塩基は任意で、置換されたウラシル、チミン、アデニン、シトシン、5-メチルシトシンまたはグアニンである。いくつかの実施形態において、核酸塩基は、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、5-メチルシトシンまたはグアニンである。

【0335】

一部の実施形態では、修飾塩基は任意で、置換されたアデニン、シトシン、グアニン、チミンまたはウラシルである。いくつかの実施形態において、修飾核酸塩基は独立して、1つ以上の修飾によって修飾されたアデニン、シトシン、グアニン、チミンまたはウラシルであり、当該修飾により：

（1）核酸塩基は、アシル、ハロゲン、アミノ、アジド、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアルキル、ヘテロアルケニル、ヘテロアルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、カルボキシル、ヒドロキシル、ビオチン、アビジン、ストレプトア

ビジン、置換シリル、及びこれらの組み合わせから独立して選択される、1個以上の任意で置換される基によって修飾され、

(2) 核酸塩基の1個以上の原子が独立して、炭素、窒素または硫黄から選択される異なる原子で置き換えられ、

(3) 核酸塩基中の1つ以上の二重結合が、独立して水素化されているか、または

(4) 1個以上のアリアル環またはヘテロアリアル環は独立して核酸塩基に挿入される。

【0336】

様々な追加の核酸塩基が当分野で記載されている。

【0337】

糖類

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序（限定されないが、遺伝子発現のRNAase H介在性ノックダウンまたは立体障害を含む）を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNAase H介在性ノックダウンを介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の糖を含む。

【0338】

一部の実施形態では、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する、提供されるオリゴヌクレオチドは、天然糖部分に加えて、1個以上の修飾糖部分を含む。

【0339】

最も普遍的な天然ヌクレオチドは、核酸塩基のアデノシン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、及びチミン（T）またはウラシル（U）に結合したリボース糖から構成される。また、ヌクレオチド内のリン酸基または結合したリン酸が、糖または修飾された糖のさまざまな位置に結合可能である修飾されたヌクレオチドが企図される。非限定的な例としては、リン酸基または結合リンは、糖または修飾糖の2'、3'、4'または5'のヒドロキシル部分に結合可能である。本明細書中で記載される修飾核酸塩基を組み込むヌクレオチドもまたこの文脈において予期される。一部の実施形態において、保護されていない-OH部分を含むヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドが、本開示方法に従い使用される。

【0340】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNAase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNAase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の塩基（核酸塩基）、修飾塩基または塩基アナログを含み得る。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNAase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNAase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の他の構造的要素または修飾、たとえば、限定されないが、塩基配列もしくはその一部、糖；ヌクレオチド間結合；立体化学もし

10

20

30

40

50

くはそのパターン；追加の化学的部分、たとえば、限定されないが、標的化部分、脂質部分、G a l N A c部分など；5'末端構造；5'末端領域；5'ヌクレオチド部分；シード領域；ポストシード領域；3'末端領域；3'末端ジヌクレオチド；3'末端キャップ；糖、塩基もしくはヌクレオチド間結合の修飾パターン；形式もしくはその任意の構造的要素、及び／または本明細書に記載される任意の他の構造的要素もしくは修飾と組み合わせて、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の塩基を含み得、一部の実施形態では、本開示は、任意のそのようなオリゴヌクレオチドの多量体に関する。

【0341】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、任意の糖を含み得る。

10

【0342】

様々な追加の糖が当分野で記載されている。

【0343】

PNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序（限定されないが、遺伝子発現のRNase H介在性ノックダウンまたは立体障害を含む）を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNase H介在性ノックダウンを介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列またはその一部を含むことができ、ここで、一部は、少なくとも15個の連続塩基のスパンまたは1～5個のミスマッチを有する少なくとも15個の連続塩基のスパンである。

20

30

【0344】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列を含み得る。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列またはその一部を含み得る。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列またはその一部を含み得、ここで、一部は、15個の連続塩基のスパンまたは1～5個のミスマッチを有する15個の連続塩基のスパンである。

40

【0345】

一本鎖RNA i 剤の配列は、転写物の標的に対して十分な長さと同ー性を有し、標的特

50

異的RNA干渉を介在する。一部の実施形態では、RNAi剤は、転写物の標的配列の一部に対し相補的である。

【0346】

一本鎖RNAi剤の塩基配列は、標的転写産物の塩基配列に対し相補的である。本明細書で使用されるとき、「標的転写産物配列」、「標的配列」、「標的遺伝子」などは、一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAを含む、遺伝子の転写中に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の連続部分、たとえば、標的遺伝子を指す。

【0347】

本明細書における「相補的」、「完全に相補的」及び「実質的に相補的」という用語は、それらが使用される文脈から理解されるように、一本鎖RNAi剤の鎖と標的配列との間、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドと標的配列との間の塩基マッチングに関して使用され得る。一本鎖RNAi剤またはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは他のオリゴヌクレオチドの鎖は、一本鎖RNAi剤、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは他のオリゴヌクレオチドの各塩基が、最大限アラインメントされたとき、標的鎖上の連続塩基と塩基対合することができる場合、標的配列の鎖に相補的である。非限定的な例として、標的配列が、たとえば、5'-GCAUAGCGAGCGAGGGAAAAAC-3'の塩基配列を有する場合、5'-GUUUUCCCU CGCUCGCUAUGC-3'の塩基配列を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、当該標的配列に相補的または完全に相補的である。当然のことながら、UのTへの置換またはその逆は、相補性の量を変更しないことに留意されたい。

【0348】

本明細書で使用されるとき、標的配列に「実質的に相補的」であるポリヌクレオチドは、大部分またはほとんど相補的であるが、100%相補的ではない。一部の実施形態では、実質的に相補的である配列（たとえば、一本鎖RNAi剤またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの鎖）は、標的配列に100%相補的である配列と比較して1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのミスマッチを有する。一本鎖RNAi剤の場合、本開示は、多くの場合、5'末端ヌクレオチド(N1)が標的配列の相補体と比較してミスマッチを有することに留意する。同様に、一本鎖RNAi剤では、3'末端ジヌクレオチドが、存在する場合には、標的配列の相補体と比較してミスマッチであり得る。非限定的な例として、標的配列が、たとえば、5'-GCAUAGCGAGCGAGGGAAAAAC-3'の塩基配列を有する場合、5'-TUUUUCCCU CGCUCGCUAUTU-3'の塩基配列を有する一本鎖RNAi剤は、当該標的配列に実質的に相補的である。

【0349】

本開示は、表1A及びその他の箇所において、それぞれが定義された塩基配列を有する、様々な一本鎖RNAi剤及びアンチセンスオリゴヌクレオチド及び他のオリゴヌクレオチドを提示する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意の様々な一本鎖RNAi剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び他のオリゴヌクレオチドの塩基配列であるか、これを含むか、またはその一部を含む塩基配列を有する、任意のオリゴヌクレオチドを包含する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意の様々な一本鎖RNAi剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び他のオリゴヌクレオチドの塩基配列であるか、これを含むか、またはその一部を含む塩基配列を有する、任意のオリゴヌクレオチドを包含し、これは、本明細書に記載される任意の化学修飾、立体化学、形式、構造的特徴（たとえば、オリゴヌクレオチドが一本鎖RNAi剤である場合、5'末端構造、5'末端領域、5'ヌクレオチド部分、シード領域、ポストシード領域、3'末端領域、3'末端ジヌクレオチド、3'末端キャップ、または任意の構造、パターンもしくはその一部）、及び／または任意の他の修飾（たとえば、別の部分、たとえば、標的化部分、炭水化物部分、GalNAc部分、脂質部分などとの複合体化；及び／または多量体化）を有する。

【0350】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に開示される任意

のオリゴヌクレオチドの塩基配列であるか、これを含むか、またはその一部を含む、塩基配列を有する。

【0351】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書で列挙される配列のPNPLA3オリゴヌクレオチドを開示する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書で列挙される配列のPNPLA3オリゴヌクレオチドを開示し、ここで、オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、列挙される配列のPNPLA3オリゴヌクレオチドは、一本鎖RNAi剤である。一部の実施形態では、列挙される配列のPNPLA3オリゴヌクレオチドは、RNAse H介在性ノックダウンを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、列挙される配列のPNPLA3オリゴヌクレオチドは、RNA干渉とRNAse H介在性ノックダウンの両方を誘導する。一部の実施形態では、列挙される配列のPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の構造（たとえば、本明細書に記載される任意の5'末端構造、5'末端領域、5'ヌクレオチド部分、シード領域、ポストシード領域、3'末端ジヌクレオチド、3'末端キャップ、もしくはこれらの構造のいずれかの任意の一部、または任意の化学、立体化学、追加の化学的部分など）を含む。オリゴヌクレオチドがssRNAi剤である場合、配列はTが先行してもよく（非限定的な例として、2'-デオキシ T、5'-(R)-Me OH T、5'-(R)-Me PO T、5'-(R)-Me PS T、5'-(R)-Me PH T、5'-(S)-Me OH T、5'-(S)-Me PO T、5'-(S)-Me PS Tまたは5'-(S)-PH T）、または最初の核酸塩基がTに置き換えられ（非限定的な例として、2'-デオキシ T、5'-(R)-Me OH T、5'-(R)-Me PO T、5'-(R)-Me PS T、5'-(R)-Me PH T、5'-(S)-Me OH T、5'-(S)-Me PO T、5'-(S)-Me PS Tまたは5'-(S)-PH T）、及び／または3'末端ジヌクレオチド（たとえば、非限定的な例として：TT、UU、TUなど）が続く。様々な配列で、UをTで置き換えるか、もしくはその逆を行うことができ、または配列は、U及びTの組み合わせを含むことができる。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、約49、約45、約40、約30、約35、約25、約23以下の長さの総ヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、一部は、0～3個のミスマッチを有する少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25の総ヌクレオチドのスパンである。一部の実施形態では、一部は、0～3個のミスマッチを有する少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25の総ヌクレオチドのスパンであり、ここで、ミスマッチが0のスパンは相補的であり、ミスマッチが1以上であるスパンは実質的相補性の非限定的な例である。上に列挙される配列が5'末端でUから始まる一部の実施形態では、Uの削除及び／または別の塩基による置き換えを行うことができる。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列であるか、これを含むか、またはその一部を含む塩基配列を有し、本明細書に開示される形式または形式の一部を有する、任意のオリゴヌクレオチドを包含する。

【0352】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNAse H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNAse H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列を含み得る。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNAse H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNAse H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列またはその一部を含み得る。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNAse H介在性ノックダウン

を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性
ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載され
る任意の塩基配列またはその一部を含み得、ここで、一部は、15個の連続塩基のスパ
ンまたは1～5個のミスマッチを有する15個の連続塩基のスパンである。一部の実施形態
では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌク
レオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチ
ド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA
3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の他の構造的要素または修飾、たと
えば、限定されないが、糖、塩基；ヌクレオチド間結合；立体化学もしくはそのパターン
；追加の化学的部分、たとえば、限定されないが、標的化部分、脂質部分、GalNAc
部分など；5'末端構造；5'末端領域；5'ヌクレオチド部分；シード領域；ポストシード
領域；3'末端領域；3'末端ジヌクレオチド；3'末端キャップ；糖、塩基もしくはヌクレ
オチド間結合の修飾パターン；形式もしくはその任意の構造的要素、及び／または本明細
書に記載される任意の他の構造的要素もしくは修飾と組み合わせて、本明細書に記載され
る任意の塩基配列またはその一部を含み得、一部の実施形態では、本開示は、任意のそ
のようなオリゴヌクレオチドの多量体に関する。

【0353】

様々な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの非限定的な例が、以下の表1Aに記載さ
れる。

表1A．オリゴヌクレオチド。

PNPLA3オリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【表 1】

WAVE ID	Naked Sequence	Sequence	Stereochemistry
WV-3367	AAGGCATGAAGCAGGAACA	mA * mAmGmGmG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mGmAmAmC * mA	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3368	GAAGGGCATGAAGCAGGAAC	mG * mAmAmGmG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mGmGmAmA * mC	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3369	AGAAAGGCATGAAGCAGGAA	mA * mGmAmAmG * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mAmGmAmA * mA	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3370	UAGAAGGCATGAAGCAGGA	mU * mAmGmAmA * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mCmAmGmG * mA	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3371	GUAGAAAGGCATGAAGCAGG	mG * mUmAmGmA * A * G * G * G * C * A * T * G * A * A * mGmCmAmG * mG	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3372	UGUAGAAGGCATGAAGCAG	mU * mGmUmAmG * A * A * G * G * G * C * A * T * G * A * mAmGmCmA * mG	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3373	CUGUAGAAGGCATGAAGCA	mC * mUmGmUmA * G * A * A * G * G * C * A * T * G * mAmAmGmC * mA	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3374	ACUGUAGAAGGCATGAAGC	mA * mCmUmGmU * A * G * A * A * G * G * G * C * A * T * mGmAmAmG * mC	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3375	CACUGTAGAAGGGCAUGAAG	mC * mAmCmUmG * T * A * G * A * A * G * G * G * C * A * mUmGmAmA * mG	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3376	CCACUGTAGAAGGGCAUGAA	mC * mCmAmCmU * G * T * A * G * A * A * G * G * G * C * mAmUmGmA * mA	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3377	UCCGACTCCTGGCCUCCG	mU * mUmCmCmG * A * C * T * C * C * T * G * G * C * C * mUmUmCmC * mG	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3378	UCCGACTCCTGGCCTUCCGC	mU * mCmCmGmA * C * T * C * C * T * G * G * C * C * T * mUmCmCmG * mC	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3379	CCGACTCCTGGCCTCCGCA	mC * mCmGmAmC * T * C * C * T * G * G * C * C * T * T * mCmCmGmC * mA	XOOXXXXXXXXXXXXX
WV-3380	ACCUGAGGATGACCGGGG	mA * mCmCmUmG * A * G * G * A * T * G * G * A * C * C * mGmCmGmG * mG	XOOXXXXXXXXXXXXX

10

20

30

40

50

WV-3381	UGUGCTTGCTCTCTGCCUUG	mU * mGmUmGmC * T * T * G * G * C * T * C * T * G * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3382	CUGGACCTGAGGATGGACCG	mCmUmUmG * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3383	UGUUCGACTCTCTGGCCUUC	mC * mUmGmGmA * C * C * T * G * A * G * G * A * T * G * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3384	GUUCCGACTCTCTGGCCUUC	mGmAmCmC * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3385	CGACUCCTGGCCTTCCGCAC	mU * mGmUmUmC * C * G * A * C * T * C * C * T * G * G * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3386	CCUGCTGTGTTGGCUCCUG	mCmUmUmC * mC	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3387	UCUUGTTACCCCGCCAUUG	mG * mUmUmCmC * G * A * C * T * C * C * T * G * G * C * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3388	CCUGCCTCAGTGTCTCGCC	mCmUmUmC * mC	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3389	CCCUGCCTCAGTGTCTCGGC	mC * mCmUmUmG * C * T * C * A * G * T * G * T * C * T * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3390	UUACCCCGCCCATGGAGACG	mCmUmUmG * mC	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3391	ACCCCGCCCATGGAGACGUU	mU * mUmAmCmC * C * C * T * C * A * * G * T * G * T * C * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3392	GACCUGAGGATGGACCGCG	mA * mCmCmCmC * C * G * C * C * A * T * G * G * A * G * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3393	GGACCTGAGGATGGACCGCG	mG * mAmCmUmU * mU	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3394	UACCCCGCCCATGGAGACGU	mG * mAmCmUmU * G * A * G * G * A * T * G * G * A * C * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3395	GGGACCTCTGCCTGGGCU	mCmUmUmC * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3396	CCUGGCGAGAGGGTGUCCA	mG * mGmAmCmC * C * C * G * C * C * A * T * G * G * A * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3397	CCCCGCGCATGGAGACGUU	mU * mAmCmUmC * mU	X000XXXXXXXXXXXX000X
		mC * mCmUmUmG * G * C * G * A * G * A * G * G * T * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
		mGmUmUmC * mA	X000XXXXXXXXXXXX000X
		mC * mCmCmCmC * G * C * C * A * T * G * G * A * G * A * *	X000XXXXXXXXXXXX000X
		mCmGmUmU * mU	X000XXXXXXXXXXXX000X

10

20

30

40

50

WV-3398	UCUGCTGGACGCCCUUGGG	mU * mCmUmGmC * T * G * G * A * C * A * G * C * C * C *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3399	CUGCACTGGGCTTCUUGGUG	mUmUmGmG * mG mC * mUmGmCmA * C * T * G * G * G * C * T * T * C * C *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3400	UCCUGCTGTGCTTGGCUCCU	mUmGmGmU * mG mU * mCmCmUmG * C * T * G * T * G * C * T * T * G * G *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3401	CUCUGCTGTGCTTGGCUCC	mCmUmCmC * mU mC * mUmCmCmU * G * C * T * G * T * G * C * T * T * G *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3402	UGGACCTGAGGATGGACCGC	mGmCmUmC * mC mU * mGmGmAmC * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3403	UACCTGCTCAGTGUCUCG	mAmCmCmG * mC mU * mAmCmCmC * T * G * C * C * T * C * A * G * T * G *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3404	AGGACCTCTGACUGGGC	mUmCmUmC * mG mA * mGmGmGmA * C * C * C * T * C * T * G * C * A * C *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3405	CUCAGGCAGCGGTGCGCCC	mUmGmGmG * mC mC * mUmCmAmG * G * C * A * G * C * G * G * G * T * C *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3406	CCUCAGTGTCTGCGCCAGGG	mGmCmCmC * mC mC * mCmUmCmA * G * T * G * T * C * T * C * G * G * C *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3407	AUUUGGACCTGGAGCGGG	mCmAmGmG * mG mA * mUmUmUmG * G * G * A * C * C * T * G * G * A * G *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3408	CUUGUTACCCCGCAUGGA	mGmCmGmG * mG mC * mUmUmGmU * T * A * C * C * C * C * C * G * C * C *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3409	ACAUGGCGCAGCCTACCCCC	mAmUmGmG * mA mA * mCmAmUmG * G * G * C * C * A * G * C * C * T * A *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3410	UGCUGTGTGCTCGCTCUGCC	mCmCmCmC * mC mU * mGmCmUmG * T * G * C * T * T * G * G * C * T * C *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3411	ACCUGTGAGTCACCCACUG	mCmUmGmC * mC mA * mCmCmUmG * T * G * A * G * G * T * C * A * C * C *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3412	AUGUCCGACTCTGCGCCUU	mCmAmCmU * mG mA * mUmGmUmU * C * C * G * A * C * T * C * C * T * G *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3413	CUCUGCTGGACAGCCCUUGG	mGmCmCmU * mU mC * mUmCmUmG * C * T * G * A * C * A * G * C * C *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
WV-3414	GCCUGGCGAGAGGGUGUCC	mCmUmUmG * mG mG * mCmCmUmG * G * G * C * G * A * G * A * G * G * G *	X000XXXXXXXXXXXXXXXXX000X
		mUmGmUmC * mC	

10

20

30

40

50

WV-3415	CUGUGGACATTGGCCGGGA	mC * mUmGmGmU * G * G * A * C * A * T * T * G * G * C *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3416	CUGCUCCAGCGGATACCGG	mC * mUmGmCmU * C * C * A * G * C * G * G * A * T *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3417	UUGUUAACCCCGCAUGGAG	mU * mUmGmUmU * A * C * C * C * C * G * C * C * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3418	UGUUAACCCCGCATGGAGA	mU * mGmUmUmA * C * C * C * C * G * C * C * A * T *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3419	AGGCTCTCTACCTGCCUC	mGmGmAmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3420	UGGGCGAGGGGTGCCAGG	mA * mGmCmGmC * T * C * T * C * T * A * C * C * C * T *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3421	AGGCUGGGATCCTCCAGUC	mU * mGmGmCmU * G * G * G * A * T * C * C * T * C * C *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3422	UGGUGGACATTGGCCGGGAG	mAmGmGmU * mC	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3423	AGAGCTGGGATCCTCCAG	mA * mGmAmGmG * C * T * G * G * G * A * T * C * C * T *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3424	GCUGGTGGACATTGGCCGGG	mG * mCmUmGmG * T * G * G * A * C * A * T * T * G * G *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3425	UCUGCTCCAGCGGGAUACCG	mU * mCmUmGmC * T * C * C * A * G * C * G * G * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3426	UCUGCACTGGGCTTCCUGGU	mU * mCmUmGmC * A * C * T * G * G * G * C * T * C *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3427	CGGCUCTCTACCTGCCUCA	mG * mCmGmCmU * C * T * C * T * A * C * C * C * T * G *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3428	CUGCCTCAGTGCTCGGCA	mCmCmUmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3429	GACUCCTGGCCTTCGCACA	mGmGmCmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3430	CGACCTCAGGATCCAUCU	mC * mGmAmCmC * T * C * A * G * G * A * T * C * C * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-3431	GGCUGGGATCCTCCAGUCA	mU * mGmCmC * mU	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
		mG * mGmCmUmG * G * G * A * T * C * C * T * C * C * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
		mCmGmUmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO

10

20

30

40

50

WV-3432	UCUGCTAGACTGCCUCCUC	mU * mCmUmGmC * T * A * G * A * C * T * C * G * C * C *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3433	AUCUUGTTACCCCGCAUG	mUmCmCmU * mC mA * mUmCmUmU * G * T * T * A * C * C * C * C * G *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3434	UGCAGTGGCTTCTGGUGU	mCmCmAmU * mG mU * mGmCmAmC * T * G * G * G * C * T * T * C * C * T *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3435	UGCAGAGACCCTGTCGGAGG	mGmUmG * mU mU * mGmCmAmG * A * G * A * C * C * C * T * G * T * C *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3436	CCCAGACCTTGAGAUCCGG	mGmGmAmG * mG mC * mCmCmAmG * C * A * C * C * T * T * G * A * G * A *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3437	CCUGUGAGGTCACCCACUGC	mUmCmCmG * mC mC * mCmUmGmU * G * A * G * G * T * A * C * C * C *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3438	CUGGCATGGCGACCUAGG	mAmCmUmG * mC mC * mUmGmGmG * C * A * T * G * G * C * G * A * C * C *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3439	CGAACTGCACCCCTTCCAC	mUmCmAmG * mG mC * mGmAmAmC * T * G * C * A * C * C * C * T * T *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3440	AGGAGCCTGGGGGAGAGGG	mCmCmCmA * mC mA * mGmCmGmA * G * C * C * T * G * G * G * C * G * A *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3441	GGGUGGCCTCTGCTTUGGUC	mGmAmGmG * mG mG * mGmGmUmG * G * C * C * T * C * T * G * C * T * T *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3442	UGCUCAGCGGATACCGGA	mUmGmGmU * mC mU * mGmCmUmC * C * A * G * C * G * G * A * T * A *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3443	AAGGACCCCTCTGCACUGG	mCmCmGmG * mA mA * mAmGmGmG * A * C * C * T * C * T * G * C * A *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3444	CUGCUGTGTGGCTCCUGC	mCmUmGmG * mG mC * mUmGmCmU * G * T * G * C * T * T * G * G * C * T *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3445	GACGAACTGCACCCCUCCC	mCmCmUmG * mC mG * mAmCmGmA * A * C * T * G * C * A * C * C * C *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3446	UGCUGTAGCGAGCCTGGCG	mUmUmCmC * mC mU * mGmCmUmG * T * A * G * C * G * A * G * C * C * T *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3447	CACCCCTCCACAGCAUGG	mGmGmGmC * mG mC * mAmCmCmC * C * T * T * C * C * C * A * C * A * G *	X000XXXXXXXXXXXXX000X
WV-3448	GACCCCTGCACTGGGCUUC	mCmAmUmG * mG mG * mAmCmCmC * T * C * T * G * C * A * C * T * G * G *	X000XXXXXXXXXXXXX000X

10

20

30

40

50

WV-3449	AGCUGGTGGACATTGGCCGG	mA * mGmCmUmG * G * T * G * G * A * C * A * T * T * G * mGmCmCmG * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3450	UCUCGGCCAGGGCATUCCCA	mU * mCmUmCmG * G * C * C * A * G * G * G * C * A * T * mUmCmCmC * mA	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3451	GGUCUCTGCTGGACAGCCCU	mG * mGmUmCmU * C * T * G * C * T * G * G * A * C * A * mGmCmCmC * mU	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3452	CGGCCAGGGGATTCCAGCG	mC * mGmGmCmC * A * G * G * G * C * A * T * T * C * C * mCmAmGmC * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3453	UGGGATCCTCCAGGTCACAG	mU * mGmGmGmA * T * C * C * T * C * C * A * C * G * T * mCmAmCmA * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3454	CCUGUTGGTGCTCACUGGC	mC * mCmUmGmU * T * G * G * C * T * G * C * T * C * A * mCmUmGmG * mC	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3455	GCCUGTTGGCTGCTCACUGG	mG * mCmCmUmG * T * T * G * G * C * T * G * C * T * C * mAmCmUmG * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3456	CCAGCACCTTGAGATCCGGG	mC * mCmAmGmC * A * C * C * T * T * G * A * G * A * T * mCmCmGmG * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3457	GGGAGGCTGTGGCUGCUC	mG * mGmGmAmG * G * C * C * T * G * T * T * G * G * C * mUmGmCmU * mC	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3458	CUCAGAGGCTGGGATCCUCC	mC * mUmCmAmG * A * G * G * C * T * G * G * G * A * T * mCmCmUmC * mC	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3459	GCCUCAGTGTCTGGGCCAGG	mG * mCmCmUmC * A * G * T * G * T * C * T * C * G * G * mCmCmAmG * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3460	CACAUGGGCAGCCTACCCC	mC * mAmCmAmU * G * G * G * C * C * A * G * C * C * T * mAmCmCmC * mC	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3461	GGUGGCTCTGCTTTGGUCU	mG * mGmUmGmG * C * C * T * C * T * G * C * T * T * T * mGmGmUmC * mU	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3462	ACGUUGTCACTCACTCCUCC	mA * mCmGmUmU * G * T * C * A * C * T * C * A * C * T * mCmCmUmC * mC	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3463	UAGAAAGGCATGAAGCAGGA	mU * mAmGmAmA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mCmAmGmG * mA	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3464	GUAGAAAGGCATGAAGCAGG	mG * mUmAmGmA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mGmCmAmG * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-3465	UGUAGAAAGGCATGAAGCAG	mU * mGmUmAmG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mAmGmCmA * mG	X000XXXXXXXXXXXX000X

10

20

30

40

50

WV-3861	CUGUAGAAAGGCATGAAGCA	mC * mUmGmUmA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mAmAmGmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X
WV-3862	ACUGUAGAAAGGCATGAAGC	mA * mCmUmGmU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mGmAmAmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X
WV-3863	CACUGTAGAAAGGCAUGAAG	mC * mAmCmUmG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mUmGmAmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X
WV-3864	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	mC * mCmAmCmU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mAmUmGmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X
WV-3865	UAGAAAGGCA TGAAGCAGGAACAU	mU * mAmGmAmA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * mAmCmAmU * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3866	GUAGAAAGGC ATGAAGCAGGAACAU	mG * mUmAmGmA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * mAmAmCmA * mU	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3867	UGUAGAAAGG CATGAAGCAGGAACA	mU * mGmUmAmG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mGmAmAmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3868	CUGUAGAAAG GCATGAAGCAGGAAC	mC * mUmGmUmA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mGmGmAmA * mC	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3869	ACUGUAGAAA GGCATGAAGCAGGAA	mA * mCmUmGmU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mAmGmGmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3870	CACUGTAGAA AGGCATGAAGCAGGA	mC * mAmCmUmG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mCmAmGmG * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3871	CCACUGTAGA AAGGCATGAAGCAGG	mC * mCmAmCmU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mGmCmAmG * mG	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3872	GCCACTGTAG AAAGGCATGAAGCAG	mG * mCmCmAmC * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mAmGmCmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3873	GGCCACTGTA GAAAGGCATGAAGCA	mG * mGmCmCmA * C * T * G * T * A * G * A * A * G * G * C * A * T * G * mAmAmGmC * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3874	AGGCCACTGT AGAAAGGCATGAAGC	mA * mGmGmCmA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mGmAmAmG * mC	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3875	AAGGCCACTG TAGAAAGCAGGAAG	mA * mAmGmGmC * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mUmGmAmA * mG	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3876	UAAGGCCACT GTAGAAAGCAGGA	mU * mAmAmGmG * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mAmUmGmA * mA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO00X X
WV-3986	TCUGAGGAUGGACCGGGGTU	T * fc * mUfG * mAfg * mGfa * mUfG * mGfa * mCfc * mG * fc * mG * fg * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX

WV-3987	TCUGAGGAUGGACCGCGGGTU	T * fc * mUfg * mAfg * mGfa * mUfg * mGfa * mCfc * mGcmGfcmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO0000XX
WV-3988	TCUGAGGAUGGACCGCGGGTU	POT * fc * mUfg * mAfg * mGfa * mUfg * mGfa * mCfc * mG * fc * mG * fg * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3989	TACCUGAGGAUGGACCGCGGTU	T * fa * mCfc * mUfg * mAfg * mGfa * mUfg * mGfa * mC * fc * mG * fc * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3990	TACCUGAGGAUGGACCGCGGTU	T * fa * mCfc * mUfg * mAfg * mGfa * mUfg * mGfa * mCfc * mGcmGfcmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3991	TGACCUGAGGAUGGACCGGCTU	T * fg * mAfc * mCfu * mGfa * mGfg * mAfu * mGfg * mA * fc * mC * fg * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3992	TGACCUGAGGAUGGACCGGCTU	T * fg * mAfc * mCfu * mGfa * mGfg * mAfu * mGfg * mA * fc * mC * fg * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3993	TUUGUUACCCCGCCAUGGCTU	T * fu * mUfg * mUfu * mAfc * mCfc * mCfc * mGfc * mC * fa * mU * fg * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3994	TUUGUUACCCCGCCAUGGCTU	T * fu * mUfg * mUfu * mAfc * mCfc * mCfc * mGfc * mGfc * mCfAmUfgmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3995	TCCCCGCGCAUGGAGAGCUUTU	T * fc * mCfc * mCfc * mCfc * mCfc * mAfu * mGfg * mAfg * mA * fc * mG * fu * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3996	TCCCCGCGCAUGGAGAGCUUTU	T * fc * mCfc * mCfc * mCfc * mCfc * mAfu * mGfg * mAfg * mAfc * mGfcmGfcmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3997	TACCUGAGGAUGGAGAGCGTU	T * fa * mCfc * mCfc * mCfc * mCfc * mAfu * mGfg * mA * fg * mA * fc * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3998	TACCUGAGGAUGGAGAGCGTU	T * fa * mCfc * mCfc * mCfc * mCfc * mAfu * mGfg * mAfc * mGcmGfcmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-3999	TCCCCGCGCAUGGAGAGCGTU	T * fc * mCfc * mCfc * mGfc * mGfa * mUfg * mGfa * mG * fa * mC * fg * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-4000	TCCCCGCGCAUGGAGAGCGTU	T * fc * mCfc * mCfc * mGfc * mGfa * mUfg * mGfa * mGfAmCfcmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-4001	TGCUCCGCGCUCAGUCCCATU	T * fg * mCfu * mCfc * mGfc * mCfu * mCfc * mAfg * mU * fu * mC * fc * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-4002	TGCUCCGCGCUCAGUCCCATU	T * fg * mCfu * mCfc * mGfc * mCfu * mCfc * mAfg * mUfUmCfcmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-4003	TGGACCCUCUGCACUGGGGCTU	T * fg * mGfa * mCfc * mCfu * mGfc * mAfc * mU * fg * mG * fg * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX

10

20

30

40

50

WV-4004	TGACCCUCUGCACUGGGGCTU	T * fg * mGfA * mCfC * mCfU * mCfU * mGfC * mAfC * mUfGmGfC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4005	TGACCCUCUGCACUGGGGCTU	T * fg * mAfC * mCfC * mUfC * mUfG * mCfA * mCfU * mG * fg * mG * fc * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4006	TGACCCUCUGCACUGGGGCTU	T * fg * mAfC * mCfC * mUfC * mUfG * mCfA * mCfU * mGfGmGfCmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4018	TCAUGAAGCAGGAACAUAU	T * fc * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mAfA * mC * fA * mU * fA * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4019	TGCAUGAAGCAGGAACAUAU	T * fg * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mGfA * mA * fc * mA * fU * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4020	TGCAUGAAGCAGGAACAUAU	T * fg * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mA * fA * mC * fA * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4021	TAGGCAUGAAGCAGGAACATU	T * fA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mG * fA * mA * fc * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4022	TAAGCAUGAAGCAGGAACU	T * fA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mG * fg * mA * fA * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4023	TAAAGCAUGAAGCAGGAATU	T * fA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mA * fg * mG * fA * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4024	TGAAAGCAUGAAGCAGGATU	T * fg * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mC * fA * mG * fg * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4025	TAGAAAGCAUGAAGCAGGTU	T * fA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mG * fc * mA * fg * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4026	TUAGAAAGCAUGAAGCAGTU	T * fU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mA * fg * mC * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4027	TGUAGAAAGCAUGAAGCATU	T * fg * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mA * fA * mG * fc * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4028	TUGAAGAAAGCAUGAAGCTU	T * fU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mG * fA * mA * fg * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4029	TCUGAAGAAAGCAUGAAGTU	T * fc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mU * fg * mA * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4030	TACUGAAGAAAGCAUGAATU	T * fA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mA * fU * mG * fA * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4031	TCACUGAAGAAAGCAUGATU	T * fc * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mC * fA * mU * fg * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX

10

20

30

40

50

WV-4032	TCCACUGUAGAAAGGCAUGTU	T * fC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mG * fC * mA * fU * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4033	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mG * fG * mC * fA * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4034	TGGCCACUGUAGAAAGGCATU	T * fG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mA * fG * mG * fC * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4035	TAGGCCACUGUAGAAAGGCTU	T * fA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mA * fA * mG * fG * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4036	TAAAGGCCACUGUAGAAAGGTU	T * fA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mA * fA * mA * fG * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4037	TUAGGCCACUGUAGAAAGTU	T * fU * mAfA * mGfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mG * fA * mA * fA * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4038	TAAAGGCCACUGUAGAAATU	T * fA * mUfA * mAfG * mGfC * mCfA * mCfU * mGfU * mA * fG * mA * fA * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4039	TCAUGAGCAGGAACAUAU	T * fC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mAfA * mCfAmUfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4040	TGCAUGAAGCAGGAACAUAU	T * fG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mGfA * mAfCmAfUmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4041	TGGCAUGAAGCAGGAACAUTU	T * fG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfG * mAfAmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4042	TAGCAUGAAGCAGGAACATU	T * fA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfG * mGfAmAfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4043	TAAAGCAUGAAGCAGGAACU	T * fA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfGmAfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4044	TAAAGGCAUGAAGCAGGAATU	T * fA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfC * mAfGmAfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4045	TGAAAGGCAUGAAGCAGGATU	T * fG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfG * mCfAmGfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4046	TAGAAAGCAUGAAGCAGGTU	T * fA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfA * mGfCmAfGmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4047	TUAGAAAGGCAUGAAGCAGTU	T * fU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfC * mAfU * mGfA * mAfGmAfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4048	TGUAGAAAGGCAUGAAGCATU	T * fG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfG * mCfA * mUfG * mAfAmGfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX

10

20

30

40

50

WV-4049	TUGUAGAAAGCAUGAAGCTU	T * fu * mGfu * mAfg * mAfa * mAfg * mGfc * mAfu * mGfAmAfgmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4050	TCUGUAGAAAGGCAUGAAGTU	T * fc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfg * mCfa * mUfcmAfgmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4051	TACUGUAGAAAGGCAUGAATU	T * fa * mCfu * mGfu * mAfg * mAfa * mAfg * mGfc * mAfumGfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4052	TCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfg * mCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4053	TCACUGUAGAAAGGCAUGTU	T * fc * mCfa * mCfu * mGfu * mAfg * mAfa * mAfg * mGfcmAFUmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4054	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfcmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4055	TGCCACUGUAGAAAGGCGATU	T * fg * mGfc * mCfa * mCfu * mGfu * mAfg * mAfa * mAfgmGfcmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4056	TAGGCCACUGUAGAAAGGCTU	T * fa * mGfg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfamGfcmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4057	TAAGGCCACUGUAGAAAGGTU	T * fa * mAfg * mGfc * mCfa * mCfu * mGfu * mAfg * mAfamAfgmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4058	TUAGGCCACUGUAGAAAGTU	T * fu * mAfa * mGfg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfAmAfgmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4059	TAUAGGCCACUGUAGAAATU	T * fa * mUfa * mAfg * mGfc * mCfa * mCfu * mGfu * mAfamAfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXX
WV-4060	TCAUGAAGCAGGAACAUAACCATU	T * fc * mAfu * mGfa * mAfg * mCfa * mGfg * mAfa * mC * fa * mU * fa * mC * fc * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXX
WV-4061	TGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fg * mCfa * mUfg * mAfa * mGfc * mAfg * mGfa * mA * fc * mA * fu * mA * fc * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXX
WV-4062	TGGCAUGAAGCAGGAACAUAUCTU	T * fg * mGfc * mAfu * mGfa * mAfg * mCfa * mGfg * mA * fa * mC * fa * mU * fa * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXX
WV-4063	TAGGCAUGAAGCAGGAACAUAUTU	T * fa * mGfg * mCfa * mUfg * mAfa * mGfc * mAfg * mG * fa * mA * fc * mA * fu * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXX
WV-4064	TAAGGCAUGAAGCAGGAACAUTU	T * fa * mAfg * mGfc * mAfu * mGfa * mAfg * mCfa * mG * fg * mAfa * fa * mC * fa * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXX
WV-4065	TAAAGCAUGAAGCAGGAACATU	T * fa * mAfa * mGfg * mCfa * mUfg * mAfa * mGfc * mA * fg * mG * fa * mC * fa * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXX

WV-4066	TGAAAGGCAUGAAGCAGGAATU	T * fg * mAfa * mAfG * mGfc * mAfu * mGfa * mAfG * mC * fa * mG * fg * ma * fa * mC * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4067	TAGAAAAGGCAUGAAGCAGGAATU	T * fa * mGfa * mAfa * mGfG * mCfa * mUfg * mAfa * mG * fc * ma * fa * mG * fa * ma * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4068	TUAGAAAAAGCAUGAAGCAGGATU	T * fu * mAfG * mAfa * mAfG * mGfc * mAfu * mGfa * mA * fg * mC * fa * mG * fg * ma * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4069	TGUAGAAAAGCAUGAAGCAGGTU	T * fs * muFa * mGfa * mAfa * mGfG * mCfa * mUfg * mA * fg * mG * fc * ma * fa * fg * mG * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4070	TUGUAGAAAGCAUGAAGCAGT U	T * fu * mgFu * mAfG * mAfa * mGfC * mGfc * mAfu * mG * fa * ma * fg * mC * fa * mG * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4071	TCUGUAGAAAAGCAUGAAGCATU	T * fc * muFg * muFa * mGfa * mAfa * mGfG * mCfa * mU * fg * ma * fa * mG * fc * ma * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4072	TACUGUAGAAAGGCAUGAAGCTU	T * fa * mCFu * mGFu * mAfg * mAfa * mAfa * mGfc * mA * fu * mG * fa * ma * fg * mC * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4073	TCACUGUAGAAAAGGCAUGAAGT	T * fc * mAfc * muFg * muFa * mGfa * mAfa * mGfG * mC * fa * muJ * fg * ma * fa * mG * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4074	TCCACUGUAGAAAAGGCAUGAATU	T * fc * mGfa * mCFu * mGFu * mAfG * mAfa * mAfa * mG * fc * ma * fu * mG * fa * ma * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4075	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT	T * fg * mCfc * mAfc * muFg * muFa * mGfa * mAfa * mG * fg * mC * fa * mu * fg * ma * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4076	TGSCCACUGUAGAAAAGGCAUGTU	T * fs * mGfc * mCfa * mCFu * mGFu * mAfg * mAfa * mA * fg * mG * fc * ma * fu * mG * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4077	TAGGCCACUGUAGAAAAGGCAUTU	T * fa * mGfs * mCfc * mAfc * muFs * muFa * mGfa * mA * fa * mG * fg * mC * fa * mu * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4078	TAAGGCCACUGUAGAAAGGCATU	T * fa * mAfs * mGfc * mCfa * mCFu * mGFu * mAfg * mA * fa * ma * fg * mG * fc * ma * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4079	TUAAGGCCACUGUAGAAAGGCTU	T * fu * mAfa * mGfg * mCfc * mAfc * mUfg * muFa * mG * fa * ma * fa * mG * fg * mC * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4080	TUAUAGGCCACUGUAGAAAGGTU	T * fa * muFa * mAfs * mGfc * mGfc * mCfa * mCFu * mGfu * mA * fg * ma * fa * ma * fg * mG * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4081	TGAUAGGCCACACUGUAGAAAGTU	T * fg * mAfu * mAfa * mGfg * mCfc * mAfc * mUfg * muU * fa * mG * fa * ma * fa * mG * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX
WV-4082	TGGAUAGGCCACACUGUAGAAATU	T * fu * mGfa * muFa * mAfg * mGfc * mCfa * mCFu * mG * fu * ma * fg * ma * fa * ma * T * mu	XXOXOXOXOXOXOXXXXXXXXXXXX

WV-4083	TCAUGAAGCAGGAACAUAACCATU	T * fc * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfg * mAfA * mCfAmUfAmCfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4084	TGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fg * mCfA * mUfG * mAfA * mGfc * mAfG * mGfA * mAfCmAfUfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4085	TGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fg * mGfc * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfg * mAfCmAfUfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4086	TAGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fa * mGfg * mCfA * mUfG * mAfA * mGfc * mAfG * mGfAmUfAmCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4087	TAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fa * mAfG * mGfc * mAfU * mGfA * mAfG * mCfA * mGfGmAfAmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4088	TAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fa * mAfA * mGfg * mCfA * mUfG * mAfA * mGfc * mAfGmAfAmCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4089	TGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fg * mAfA * mAfG * mGfc * mAfU * mGfA * mAfG * mCfAmGfGmAfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4090	TAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fa * mGfA * mAfA * mGfg * mCfA * mUfG * mAfA * mGfCmAfAmGfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4091	TUAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fu * mAfG * mAfA * mAfG * mGfc * mAfU * mGfA * mAfGmAfAmCfAmGfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4092	TGUAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fg * mUfA * mGfA * mAfA * mGfg * mCfA * mUfG * mAfAmGfCmAfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4093	TUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fu * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfc * mAfU * mGfAmAfAmCfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4094	TCUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfg * mCfA * mUfGmAfAmGfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4095	TACUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fa * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfc * mAfUfAmGfAmAfAmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4096	TCACUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fc * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfg * mCfAmUfGmAfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4097	TCCACUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fc * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfG * mGfCmAfAmUfGfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4098	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fg * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmAfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-4099	TGGCCACUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGGAACAUAACCTU	T * fg * mGfc * mCfA * mCfU * mGfU * mAfG * mAfA * mAfGmAfAmGfCmAfUmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX

10

20

30

40

50

WV-4100	TAGCCACUGUAGAAAGGCAUT U	T * fA * mGfG * mCfC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfA * mAfAmGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-4101	TAAAGGCCACUGUAGAAAGGCAT U	T * fA * mAFg * mGfC * mCfA * mCfu * mGfu * mAFg * mAfAmAfGmGfCmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-4102	TUAAGGCCACUGUAGAAAGGCT U	T * fu * mAfA * mGfg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfAmAfAmGfGmc * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-4103	TAUAAAGGCCACUGUAGAAAGGT U	T * fA * mUFA * mAfg * mGfc * mCfA * mCfu * mGfu * mAfGmAfAmAfGmtG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-4104	TGAUAGGCCACUGUAGAAAAGT U	T * fg * mAFU * mAfA * mGfg * mCfC * mAfc * mUFG * mUfAmGfAmAfAmG * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-4105	TGGAUAAGGCCACUGUAGAAAT U	T * fg * mGfA * mUFA * mAfg * mGfc * mCfA * mCFU * mGfUmAfGmAfAmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-5305	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCFC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfA * mAfAmGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-5306	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfAmAfAmGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-5307	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCFC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfAmGfAmAfAmGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX XX
WV-5308	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCFC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfAmGfAmAfAmGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX XX
WV-5309	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfAmGfAmAfAmGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX XX
WV-5310	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCfCmAfCmUfGmUfa mGfAmAfAmGfGmc fAmUfGmA * T * mU	XXOOOOOOOOOOOOOOOOOO OXX
WV-5311	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-5312	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-5313	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCFC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-5314	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUGAT U	T * fg * mCFC * mAfc * mUg * mUfa * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX X
WV-5315	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCFC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfA * mAfAmGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX

WV-5316	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfAmAfmGfmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXO000000000XX
WV-5317	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfAmGfAmAfmAfmGfmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXO0000000000000XX
WV-5318	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfAmGfA	XXOXOXO000000000000000XX
WV-5319	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfgmUfAmGfA	XXOXO00000000000000000XX
WV-5320	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfgmUfAmGfAmAfmAfmGfmCfAmU * T * mU	XXO000000000000000000000XX
WV-5321	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mC * mC * mAC * mUG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXO0000000XX
WV-5322	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mC * mC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000XX
WV-5323	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000XX
WV-5324	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000XX
WV-5325	TAGGCAUGAAGCAGGAACATU	T * fa * mGfg * mCfa * mUfg * mAfa * mGfc * mAfAmGfAmAfcma * T * mU	XXOXOXOXOXOXO00000000XX
WV-5326	TAGGCAUGAAGCAGGAACAUATU	T * fa * mGfg * mCfa * mUfg * mAfa * mGfc * mAfAmGfAmAfcma * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000000XX
WV-6153	TCCUGAGGAUGGACCGCGGGT	T * fc * mCfu * mGfa * mGfg * mAfu * mGfg * mAfc * mC * fg * mC * fg * mG * fg * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000000XX
WV-6154	TGUGCUUGGCUCCUGCCUGGGT	T * fg * mUfg * mCfu * mUfg * mGfc * mUfc * mCfu * mG * fc * mC * fu * mG * fg * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000000XX
WV-6155	TGUUUIUACCCCGCCAUGGAT	T * fc * mUfu * mGfu * mUfa * mCfc * mCfc * mCfc * mC * fa * mA * fu * mG * fg * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000000XX
WV-6156	TUACCCCGCCAUGGAGACGUTU	T * fu * mAfc * mCfc * mCfc * mGfc * mGfc * mUfg * mG * fa * mG * fa * mC * fg * mC * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000000XX
WV-6157	TCCCCCGCCAUGGAGACGUUUT	T * fc * mCfc * mCfc * mGfc * mCfa * mUfg * mGfa * mG * fa * mC * fg * mU * fu * mU * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000000XX
WV-6158	TACUGAGGAUGACCGCGGGT	T * fa * mCfc * mUfg * mAfg * mGfa * mUfg * mCfa * mC * fc * mG * fc * mG * fg * mG * T * mU	XXOXOXOXOXOXO000000000XX

10

20

30

40

50

[illegible]

[illegible]

[illegible]

WV-6596	TGCCACUGUAGAAAGGCTU	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmC * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6597	TGCCACUGUAGAAAGGCAGG	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFA * G * mG	XXOXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6598	TGCCACUGUAGAAAGCGG	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmC * G * mG	XXOXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6599	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mC * fc * mA * fc * mU * fg * mU * fa * mG * fa * mA * fA * mG * fC * mA * fA * mU * fg * mA * T * mU	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-6600	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fcmCfAmUfgmUfa mGfAmAfAmGfcmCFamUfgmAT * mU	XOOOOOOOOOOO OOOOOOOOO
WV-6601	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfG * mCfA * mUfg * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6602	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mC * fcmA * fcmU * fgmU * fAmG * fAmA * fAmG * fgmC * fAmU * fgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6603	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	TfG * mGfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	OXXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6604	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fcmGfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	X X
WV-6605	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mC * fc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	XXXXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6606	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfcmAFC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	X X
WV-6607	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mA * fc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6608	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfcmUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	XXOXOOOXOXOXOXOXXX
WV-6609	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfC * mU * fg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6610	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfC * mUfgmUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	XXOXOXOOOXOXOXOXXX
WV-6611	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mU * fa * mGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXX
WV-6612	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfg * mUfAmGfa * mAfa * mGfGmCFamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOOOXOXOXXX

WV-6613	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mG * fa * mAfa * mGfmCfamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6614	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfAmAfa *	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6615	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mA * fA * mGfmCfamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6616	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfAmCfamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6617	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6618	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6619	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfa * mUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6620	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamU * fgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6621	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamUfg * mA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6622	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATA	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6623	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATG	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamUfgmA * T * mG	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6624	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATC	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamUfgmA * T * mC	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6625	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTA	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamU * T * mA	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6626	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTG	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamU * T * mG	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6627	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTC	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfamU * T * mC	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6628	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCmC * mAfc * mUmg * mUfa * mGmA * mAfa * mGmGmCmAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6629	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCmC * mAfc * mUmg * mUfa * mGmA * mAfa * mGfmCmAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX

WV-6630	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCmC * mAfC * mUfg * fuMa * mGmA * mAfa * mGfmCfAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6631	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCmC * mAfC * mUfg * mUfa * mGmA * mAfa * mGfmCfAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6632	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * mG * mCfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6633	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * fCfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6634	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCmC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6635	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * fAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6636	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6637	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * fuG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6638	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUmG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6639	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUfg * fuJa * mGfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6640	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUfg * mUma * mGfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6641	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUfg * mUfa * fgfa * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6642	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGmA * mAfa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6643	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * fafa * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6644	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAma * mGfmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6645	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * fgGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6646	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGmGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX

WV-6647	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfamUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6648	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCmAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6649	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAfUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6650	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUmGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6651	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6652	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	fU * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6653	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	fA * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6654	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	fg * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6655	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	fC * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6656	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	mU * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6657	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	mA * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6658	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	mG * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6659	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	mC * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6660	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6661	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * Geo * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6662	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * m5CeoCf * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6663	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCm5Ceo * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfgmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX

WV-6664	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * Aeofc * mUFG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6665	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAmS5Ceo * mLufG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6666	TGCCACTGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * Teofg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6667	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mUGeo * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6668	TGCCACUGTAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * Teofa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6669	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUAeo * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6670	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * Geofa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6671	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGAeo * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6672	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGfa * mAfo * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6673	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGfa * mAAeo * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6674	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6675	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6676	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6677	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6678	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6679	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX
WV-6680	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * f _g * mCfC * mAfC * mLufG * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamUfgmA * T * mL	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX

WV-6681	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * m5Ceofc * Aeofc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6682	TGCCACTGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * Aeofc * Teofg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6683	TGCCACTGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * m5Ceofc * mAfC * Teofg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6684	TGCCACTGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * m5Ceofc * Aeofc * Teofg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6685	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Teo * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6686	AGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Aeo * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6687	GGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Geo * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6688	CGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	m5Ceo * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6689	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6690	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * m5ICfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6691	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCm5IC * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6692	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * IaIc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6693	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAm5IC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6694	TGCCACTGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfC * ITfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6695	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6696	TGCCACUGTAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * ITfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-6697	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmcFamUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOXOX

WV-6698	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * Igfa * mAfa * mGfcmCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6699	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGla * mAfa * mGfcmCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6700	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * lAfa * mGfcmCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6701	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfcmCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6702	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * lgfmcCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6703	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGLgmCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6704	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmg5lCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6705	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgClamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6706	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgCfalTfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6707	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6708	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgCfamUfGla * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6709	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	IT * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6710	AGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	IA * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6711	GGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	Ig * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6712	CGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	m5lC * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6713	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * m5lCfc * lAfC * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X
WV-6714	TGCCACTGUAGAAAGGCAUGAT U	T * fg * mCfc * lAfC * lTfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmgCfamUfGmA * T * mLu	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXXXX X

50

WV-7116	GGACCTGAGGATGGACCGCG	L001Geo * Geo * AeO * m5Ceo * m5Ceo * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * m5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo * T * fG * mCfc * mAfc * mU * fG * mU * fA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	OXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7316	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7317	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	VPT * fG * mCfc * mAfc * mU * fG * mU * fA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7403	CCCCCAGGCA	rCrCrCrCrArGrGrCrArGrGrA	OOOOOOOOOO
WV-7462	GGAGCAAGCACAGCAG	rGrCrArArGrCrArCrArGrGrA	OOOOOOOOOOOOOO
WV-7463	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mU * fG * mU * fA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7464	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7465	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS
WV-7466	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS
WV-7467	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS
WV-7468	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS
WV-7469	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS
WV-7470	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS
WV-7471	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS
WV-7472	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS
WV-7473	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS
WV-7474	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fG * mCfc * mAfc * mAfa * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmC * fAmU * fGmA * T * mU	SSOSOSOSOSOSOSOSOS

10

20

30

40

50

7474	U	mGfmcFamUfGmA * T * SmU	S
WV-7475	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT	T * SfG * mCfC * mAfC * mU * SfG * mUfA * mGfA * mAfA *	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7476	U	mGfmcFamUfGmA * T * SmU	S
WV-7477	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * SmUfA * mGfA * mAfA *	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7478	U	mGfmcFamUfGmA * T * SmU	S
WV-7479	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mG * SfA * mAfA *	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7480	U	mGfmcFamUfGmA * T * SmU	S
WV-7481	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mA * SfA *	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7482	U	mGfmcFamUfGmA * T * SmU	S
WV-7483	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA *	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7484	U	mG * SfGmCfAmUfGmA * T * SmU	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7485	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA *	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7486	U	mGfmcC * SfAmUfGmA * T * SmU	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7487	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA *	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7488	U	mGfmcFamUfG * SmA * T * SmU	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7489	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGAT	T * SfG * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA *	SXOXXSXOXOXOXO000000X
WV-7509	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA *	SSOSOSOSOSOS00000SS
WV-	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA *	SSOSOSOSOSOS00000SS

7510		SmAfa * SmGfGmc * SfAmU * ST * SmU	
WV-7511	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * SfG * SmCfc * SmA * SfC * SmU * SfG * SmU * SfA *	SSOSSSSSSOSSOSSOSS
WV-7512	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	SmGfA * SmAfa * SmGfGmc * SfAmU * ST * SmU	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7513	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa *	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7514	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	mGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7515	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa *	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7516	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	mCfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7517	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa *	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7518	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	mGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7519	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa *	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7520	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	mGfGmCfAmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7521	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa *	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7522	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7523	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa *	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7524	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7525	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa *	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7526	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	mGfGmCfAmUfGmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7527	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa *	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7528	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	mGfGmCfAmUfGmU * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOX
WV-7529	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	Mod0011001mU * mG * mU * mG * mC * T * T * G * G * C	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7530	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * T * C * T * G * mC * mC * mU * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7531	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	Mod0011001mU * mC * mU * mG * T * T * A * C * C *	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7532	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	C * C * m5C * G * C * mC * mA * mU * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7533	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	Mod0011001mA * mC * mC * mC * mC * m5C * G * C * C *	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7534	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	A * T * G * G * A * G * mC * mC * mG * mU * mU	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7535	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	Mod0011001mU * mA * mC * mC * mC * mC * m5C * G * C * C *	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

7579			C * A * T * G * G * A * mG * mA * mC * mG * mU	OX
WV-7580	CUGCACTGGGCTTCUGGUG	Mod001L001mC * mU * mG * mC * mA * C * T * G * G * G * C * T * C * mU * mG * mG * mU * mG	OX	
WV-7581	UGGACCTGAGGATGGACCGC	Mod001L001mU * mG * mG * mA * mC * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G * mA * mC * mC * mG * mC	OX	
WV-7582	AGGGACCTCTGCACUGGGC	Mod001L001mA * mG * mG * mG * mA * C * C * C * T * C * T * G * C * A * C * mU * mG * mG * mG * mC	OX	
WV-7583	CUUGUTACCCCGCCAUGGA	Mod001L001mC * mU * mU * mG * mU * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * C * mA * mU * mG * mG * mA	OX	
WV-7584	AGGCUUGGGATCTCCACGUC	Mod001L001mA * mG * mC * mU * G * G * G * A * T * C * C * T * C * C * mA * mC * mG * mU * mC	OX	
WV-7585	AAGGGACCTCTGCACUGGG	Mod001L001mA * mA * mG * mG * mA * A * C * C * C * T * C * T * G * C * A * mC * mU * mG * mG	OX	
WV-7586	TGTGCTTGGCTCTGCCTGG	Mod001L001Teo * Geo * Teo * Geo * m5Ceo * T * T * G * G * C * T * C * C * T * G * m5Ceo * m5Ceo * Teo * Geo * Geo	OX	
WV-7587	TCTTGTTACCCCGCCATGG	Mod001L001Teo * m5Ceo * Teo * Teo * Geo * T * T * A * C * C * C * m5C * G * C * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * Geo	OX	
WV-7588	ACCCCGCCATGGAGACGTT	Mod001L001Aeo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * G * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo * Teo	OX	
WV-7589	TACCCCGCCATGGAGACGT	Mod001L001Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * C * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * Geo * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo	OX	
WV-7590	CTGCACTGGGCTTCCTGGTG	Mod001L001m5Ceo * Teo * Geo * m5Ceo * Aeo * C * T * G * G * C * C * T * T * C * C * Teo * Geo * Teo * Geo	OX	
WV-7591	TGGACCTGAGGATGGACCGC	Mod001L001Teo * Geo * Aeo * m5Ceo * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo	OX	
WV-7592	AGGGACCTCTGCACCTGGGC	Mod001L001Aeo * Geo * Geo * Aeo * C * C * C * T * C * T * G * C * A * C * Teo * Geo * Geo * m5Ceo	OX	
WV-7593	CTTGTTACCCCGCCATGGA	Mod001L001m5Ceo * Teo * Teo * Geo * Teo * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * C * Aeo * Teo * Geo * Aeo	OX	
WV-	AGGCTGGGATCTCCACGTC	Mod001L001Aeo * Geo * m5Ceo * Teo * G * G * G * C * C * m5Ceo * m5Ceo * Teo * G * G * G * m5Ceo	OX	

10

20

30

40

50

7594		A * T * C * C * T * C * C * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo * m5Ceo	
WV-7595	AAGGGACCCCTCTGCACTGGG	Mod001L001Aeo * Aeo * Geo * Geo * A * C * C * C * T * C * T * G * C * A * * m5Ceo * Teo * Geo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7615	UGUGCTTGCTCTGCGCUGG	L001mU * mG * mC * mU * mG * T * T * G * C * T * C * C * T * G * mC * mU * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7616	UCUUGTTACCCCGCGCAUGG	L001mU * mC * mU * mG * T * T * A * C * C * C * C * C * m5C * G * C * mC * mU * mU * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7617	ACCCCGCCATGGAGACGUU	L001mA * mC * mC * mC * mC * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * G * mA * mC * mG * mU * mU	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7618	UACCCCGCCATGGAGACGU	L001mU * mA * mC * mC * mC * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * mG * mA * mC * mG * mU	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7619	CUGCACTGGGCTTCUGGUG	L001mC * mU * mG * mC * mA * C * T * G * G * C * T * T * C * C * mU * mG * mU * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7620	UGGACCTGAGGATGGACCGC	L001mU * mG * mG * mA * mC * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G * mA * mC * mG * mC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7621	AGGGACCTCTGCACUGGGC	L001mA * mG * mG * mG * mA * C * C * C * T * C * T * G * C * A * C * mU * mG * mG * mC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7622	CUUGUTACCCCGCCAUGGA	L001mC * mU * mU * mG * T * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * C * mA * mU * mG * mG * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7623	AGGCUGGGATCTCCACGUC	L001mA * mG * mG * mC * mU * G * G * G * A * T * C * C * T * C * C * mA * mC * mG * mU * mC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7624	AAGGGACCTCTGCACUGGG	L001mA * mA * mG * mG * mG * A * C * C * C * T * C * T * G * C * A * mC * mU * mG * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7625	TGTGCTTGGCTCTGCCTGG	L001Teo * Geo * Teo * Geo * m5Ceo * T * T * G * G * C * T * C * C * T * G * m5Ceo * m5Ceo * Teo * Geo * Teo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7626	TCTTGTTACCCCGCCATGG	L001Teo * m5Ceo * Teo * Teo * Geo * T * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7627	ACCCCGCCATGGAGACGTT	L001Aeo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * G * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-7628	TACCCCGCCATGGAGACGT	L001Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * m5Ceo * C * m5C * G * C * C * A * T * G * G * A * Geo * Aeo * m5Ceo * Geo * Teo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-	CTGCACTGGGCTTCTGCTG	L001m5Ceo * Teo * Geo * m5Ceo * Aeo * C * T * G * G * G	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

10

20

30

40

50

7629			* C * T * T * C * * Teo * Geo * Geo * Teo * Geo	
WV-7630	TGGACCTGAGGATGGACCGC	L001Teo * Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * C * T * G * A * G * G * A * T * G * G * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7631	AGGGACCTCTGCACTGGGC	L001Aeo * Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * C * C * T * C * T * G * C * A * C * Teo * Geo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7632	CTTGTTACCCCGCCATGGA	L001m5Ceo * Teo * Geo * Teo * T * A * C * C * C * C * m5C * G * C * C * Aeo * Geo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7633	AGGCTGGGATCTCCACGTC	L001Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * Teo * G * G * A * T * C * C * T * C * C * Aeo * m5Ceo * Teo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7634	AAGGGACCTCTGCACTGGG	L001Aeo * Aeo * Geo * Teo * Geo * A * C * C * T * C * T * G * C * A * m5Ceo * Teo * Geo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7674	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmUmG * SmA * T * SmU	SXOXOXOXOXOXOXOXXXXX	
WV-7675	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfa * SmGfG * SmCfa * SmUfG * SmAT * SmU	SSOSOSOSOSOSOSOSOSOS	
WV-7676	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfGmC * SfCmA * SfCmU * SfGmU * SfAmG * SfAmA * SfAmG * SfGmC * SfAmU * SfGmA * ST * SmU	SOSOSOSOSOSOSOSOSOSS	
WV-7776	TGCCACUGUAGAAAGGCATTU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * GeoGeom5CeoAeoTeo * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX	
WV-7777	TGCCACUGUAGAAAGGCATGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * GeoGeom5CeoAeoTeoGeoAeo * T * mU	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX	
WV-7778	CAUGAAGCAGGAACAUAACC	mC * mAmUmGmA * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * mUmAmCmC * mA	XOXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7779	GCAUGAAGCAGGAACAUAACC	mG * mCmAmUmG * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * mAmUmAmC * mC	XOXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7780	GGCAUGAAGCAGGAACAUAAC	mG * mGmCmAmU * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mCmAmUmA * mC	XOXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7781	AGGCATGAAGCAGGAACAUA	mA * mGmGmCmA * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * mAmGmAmU * mA	XOXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7782	AAGCATGAAGCAGGAACAUA	mA * mAmGmGmC * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * mAmAmCmA * mU	XOXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-7783	AAAGCATGAAGCAGGAACA	mA * mAmAmGmG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mGmAmAmC * mA	XOXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV-	GAAAGGCATGAAGCAGGAAC	mG * mAmAmAmG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A *	XOXXXXXXXXXXXXXXXXX	

10

20

30

40

50

7784		mGmGmAmA * mC	
WV-7785	AGAAAGGCATGAAGCAGGAA	mA * mGmAmAmA * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C *	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7786	GCCACTGTAGAAAGGCAUGA	mG * mCmCmAmC * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G *	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7787	GGCCACTGTAGAAAGGCAUG	mCmAmUmG * mA	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7788	AGGCCACTGTAGAAAGGCAU	mG * mGmCmCmA * C * T * G * T * A * G * A * A * G *	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7789	AAGGCCACTGTAGAAAGGCA	mGmCmAmU * mG	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7790	UAAGGCCACTGTAGAAAGGC	mA * mGmGmCmC * A * C * T * G * T * A * G * A * A *	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7791	AUAAGGCCACTGTAGAAAGG	mGmGmCmA * mU	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7792	GAUAAGGCCACTGTAGAAAG	mA * mAmGmGmC * C * A * C * T * G * T * A * G * A *	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7793	GGAUAAAGGCCACTGTAGAAA	mU * mAmAmGmG * C * C * A * C * T * G * T * A * G *	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7794	CATGAAGCAGGAACATACCA	mAmAmGmG * mC	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7795	GCATGAAGCAGGAACATACC	mA * mUmAmAmG * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G *	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7796	GGCATGAAGCAGGAACATAC	mG * mAmUmAmA * G * G * C * C * A * C * T * G * T *	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7797	AGGCATGAAGCAGGAACATA	mGmAmAmA * mG	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7798	AAGGCATGAAGCAGGAACAT	mG * mGmAmUmA * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T *	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7799	AAAGGCATGAAGCAGGAACA	m5Ceo * Aeom5CeoAeo * A * G * C * A * G * G * A * A * C	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-7800	GAAAGGCATGAAGCAGGAAC	Geo * m5CeoAeoTeoGeo * A * A * G * C * A * G * G * A * A	X000XXXXXXXXXXXXX
WV-	AGAAAGGCATGAAGCAGGAA	* C * Aeom5CeoAeo * m5Ceo	X000XXXXXXXXXXXXX
		Geo * m5CeoAeoTeo * G * A * A * G * C * A * G * G * A	X000XXXXXXXXXXXXX
		* A * m5CeoAeoTeoAeo * m5Ceo	X000XXXXXXXXXXXXX
		Aeo * GeoAeo5CeoAeo * T * G * A * A * G * C * A * G * G	X000XXXXXXXXXXXXX
		* A * Aeom5CeoAeoTeo * Aeom5CeoAeo	X000XXXXXXXXXXXXX
		Aeo * Aeom5CeoAeo * T * G * A * A * G * C * A * G * G	X000XXXXXXXXXXXXX
		* G * Aeom5CeoAeo * Teo	X000XXXXXXXXXXXXX
		Aeo * Aeom5CeoAeo * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G	X000XXXXXXXXXXXXX
		* GeoAeoAeom5Ceo * Aeom5Ceo	X000XXXXXXXXXXXXX
		Geo * Aeom5CeoAeo * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A	X000XXXXXXXXXXXXX
		* GeoAeoAeo * m5Ceo	X000XXXXXXXXXXXXX
		Aeo * GeoAeoAeoAeo * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C	X000XXXXXXXXXXXXX

10

20

30

40

50

7801			* AeoGeoGeoAeo * Aeo	
WV-7802	TAGAAAGCATGAAGCAGGA		Teo * AeoGeoAeoAeo * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7803	GTAGAAAGCATGAAGCAGG		* m5CeoAeoGeoAeo * Aeo Geo * TeoAeoGeoAeo * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7804	TGTAGAAAGCATGAAGCAG		* Geom5CeoAeoGeo * Geo Teo * GeoTeoAeoGeo * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7805	CTGTAGAAAGCATGAAGCA		* AeoGeom5CeoAeo * Geo m5Ceo * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7806	ACTGTAGAAAGCATGAAGC		* G * AeoAeoGeom5Ceo * Aeo Aeo * m5CeoTeoGeoTeo * A * G * A * A * A * G * G * C * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7807	CACTGTAGAAAGCATGAAG		* T * GeoAeoAeoGeo * m5Ceo m5Ceo * AeoOm5CeoTeoGeo * T * A * G * A * A * A * G * G	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7808	CCACTGTAGAAAGCATGAA		* C * A * TeoGeoAeoAeo * Geo m5Ceo * m5CeoAeoOm5CeoTeo * G * T * A * G * A * A * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7809	GCCACTGTAGAAAGCATGA		G * G * C * AeoTeoGeoAeo * Aeo Geo * m5CeoOm5CeoAeoOm5Ceo * T * G * T * A * G * A * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7810	GGCCACTGTAGAAAGCATG		A * G * G * m5CeoAeoTeoGeo * Aeo Geo * Geom5CeoOm5CeoAeo * C * T * G * T * A * G * A * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7811	AGGCCACTGTAGAAAGGCAT		* A * G * Geom5CeoAeoTeo * Geo Aeo * GeoGeom5CeoOm5Ceo * A * C * T * G * T * A * G * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7812	AAGGCCACTGTAGAAAGGCA		* A * A * GeoGeom5CeoAeo * Teo Aeo * AeoGeoGeom5Ceo * C * A * C * T * G * T * A * G * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7813	TAAGGCCACTGTAGAAAGGC		* A * AeoGeoGeom5Ceo * Aeo Teo * AeoAeoGeoGeo * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7814	ATAAGGCCACTGTAGAAAGG		* AeoAeoGeoGeo * m5Ceo Aeo * TeoAeoAeoGeo * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7815	GATAAGGCCACTGTAGAAAG		* AeoAeoAeoGeo * Geo Geo * AeoTeoAeoAeo * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7816	GGATAAGGCCACTGTAGAAA		* GeoAeoAeoAeo * Geo Geo * GeoAeoTeoAeo * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-7817	CAUGAAGCAGGAACAUACCA		* AeoGeoAeoAeo * Aeo m5IC * mAmUmGmA * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A	X000XXXXXXXXXXXX000X
WV-	GCAUGAAGCAGGAACAUACC		* mUmAmCmC * IA IG * mCmAmUmG * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C *	X000XXXXXXXXXXXX000X

10

20

30

40

50

7818	GGCAUGAAGCAGGAACAUAC	mAmUmAmC * m5IC	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7819		IG * mGmCmAmU * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mCmAmUmA * m5IC	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7820	AGGCATGAAGCAGGAACAU	IA * mGmGmCmA * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * mAmCmAmU * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7821	AAGCATGAAGCAGGAACAT	IA * mAmGmGmC * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * mAmCmA * IT	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7822	AAAGCATGAAGCAGGAACA	IA * mAmAmGmG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mGmAmC * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7823	GAAAGCATGAAGCAGGAAC	IG * mAmAmAmG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mGmGmA * m5IC	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7824	AGAAAGCATGAAGCAGGAA	IA * mGmAmAmA * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mAmGmGmA * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7825	TAGAAAGCATGAAGCAGGA	IT * mAmGmAmA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mCmAmG * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7826	GUAGAAAGCATGAAGCAGG	IG * mUmAmGmA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mGmCmAmG * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7827	TGUAGAAAGCATGAAGCAG	IT * mGmUmAmG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mAmGmCmA * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7828	CUGUAGAAAGCATGAAGCA	m5IC * mUmGmUmA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * * mAmGmC * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7829	ACUGUAGAAAGCATGAAGC	IA * mCmUmGmU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mGmAmG * m5IC	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7830	CACUGTAGAAAGGCAUGAAG	m5IC * mAmCmUmG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * * mUmGmAmA * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7831	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	m5IC * mCmAmCmU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * * mAmUmGmA * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7832	GCCACTGTAGAAAGGCAUGA	IG * mCmCmAmC * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * mCmAmUmG * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7833	GGCCACTGTAGAAAGGCAUG	IG * mGmCmCmA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * mGmCmAmU * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV- 7834	AGGCCACTGTAGAAAGGCAT	IA * mGmGmCmA * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * mGmGmCmA * IT	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX
WV-	AAGGCCACTGTAGAAAGGCA	IA * mAmGmGmC * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * * A * A * A * A * A * A * A * A * A * A * A * A * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXOXXX

10

20

30

40

50

7835		mAmGmGmC * IA	
WV-7836	TAAGGCCACTGTAGAAAGGC	IT * mAmAmGmG * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7837	AUAAGGCCACTGTAGAAAGG	mAmAmGmG * m5IC	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7838	GAUAAGGCCACTGTAGAAAG	IA * mUmAmAmG * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7839	GGUAAGGCCACTGTAGAAA	mAmAmAmG * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7840	CATGAAGCAGGAACATACCA	IG * mAmUmAmA * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7841	GCATGAAGCAGGAACATACC	mGmAmAmA * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7842	GGCATGAAGCAGGAACATAC	IG * mGmAmUmA * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7843	AGGCATGAAGCAGGAACATA	mAmGmAmA * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7844	AAGGCATGAAGCAGGAACAT	m5IC * AeoTeoGeoAeo * A * G * C * A * G * A * A * C *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7845	AAAGGCATGAAGCAGGAACA	A * TeoAeom5Ceom5Ceo * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7846	GAAAGGCATGAAGCAGGAAC	IG * m5CeoAeoTeo * G * A * A * G * C * A * G * A * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7847	AGAAAGGCATGAAGCAGGAA	C * AeoTeoAeom5Ceo * m5IC	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7848	TAGAAAGGCATGAAGCAGGA	IG * Geom5CeoAeoTeo * G * A * A * G * C * A * G * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7849	GTAGAAAGGCATGAAGCAGG	A * m5CeoAeoTeoAeo * m5IC	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7850	TGTAGAAAGGCATGAAGCAG	IA * GeoGeom5CeoAeo * T * G * A * A * G * C * A * G *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-7851	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	A * Aeo5CeoAeoGeo * A * A * A * G * C * A * T * G * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
WV-	ACTGTAGAAAGGCATGAAGC	m5IC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
		G * AeoAeoGeom5Ceo * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXXO
		IA * m5CeoTeoGeoTeo * A * G * A * A * A * G * G * C * A *	XOOOXXXXXXXXXXXXXO

10

20

30

40

50

7852		T * GeoAeoAeoGeo * m5IC	
WV-7853	CACTGTAGAAAGGCATGAAG	m5IC * Aeo m5CeoTeoGeo * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * TeoGeoAeoAeo * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-7854	CACTGTAGAAAGGCATGAA	m5IC * m5CeoAeo m5CeoTeo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * AeoTeoGeoAeo * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-7855	GCCACTGTAGAAAGGCATGA	IG * m5Ceo m5CeoAeo m5Ceo * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * m5CeoAeoTeoGeo * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-7856	GGCCACTGTAGAAAGGCATG	IG * Geom5Ceo m5CeoAeo * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * Geom5CeoAeoTeo * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-7857	AGGCCACTGTAGAAAGGCAT	IA * GeoGeom5Ceo m5Ceo * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * GeoGeom5CeoAeo * IT	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-7858	AAGGCCACTGTAGAAAGGCA	IA * AeoGeoGeom5Ceo * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * AeoGeoGeom5Ceo * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-7859	TAAGGCCACTGTAGAAAGGC	IT * AeoAeoGeoGeo * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * AeoAeoGeoGeo * m5IC	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-7860	ATAAGGCCACTGTAGAAAGG	IA * TeoAeoAeoGeo * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * AeoAeoAeoGeo * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-7861	GATAAGGCCACTGTAGAAAG	IG * AeoTeoAeoAeo * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * GeoAeoAeoAeo * IG	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-7862	GGATAAGGCCACTGTAGAAA	IG * GeoAeoTeoAeo * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * AeoGeoAeoAeo * IA	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX

WV-8030	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * SmC * SmG * SmC * SmG	OSSSSSSSRSRSRSSSSS
WV-8031	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001mG * SmGmAm5Ceo mC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo m5Ceo mG * SmC * SmG	OSOOOSSRSRSRSRSOOS
WV-8032	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOSOSSSSSSS
WV-8033	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001mG * SmGmAm5Ceo mC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo m5Ceo mGmC * SmG	OSOOOSSRSRSRSRSOOS
WV-	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001Geo * SGeo * SAeo * Sm5Ceo * Sm5Ceo * ST * SG	OSSSSSSSRSRSRSSSSS

10

20

30

40

50

8034			* RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Sm5Ceo * SGeo * Sm5Ceo * SGeo		
WV- 8035	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001Geo * RGeo * RAeo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo	ORRRRRSRSSRSRRRR	
WV- 8036	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001Geo * SGeoAeom5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * CeoGeom5Ceo * SGeo	OSOOOSRSRSRSOOS	
WV- 8037	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001Geo * SGeoAeom5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * CeoGeom5Ceo * SGeo	OSOOOSRSRSRSOOS	
WV- 8038	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001Geo * RGeoAeom5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * CeoGeom5Ceo * RGeo	OROOOSRSRSRSOOOR	
WV- 8039	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001Geo * RGeoAeom5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * CeoGeom5Ceo * RGeo	OROOOSRSRSRSOOOR	
WV- 8040	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001mG * RmG * RmA * RmC * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * RmC * RmC	ORRRRRSRSSRSRRRR	
WV- 8041	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001mG * SmG * RmA * RmC * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * RmC * RmC	OSRRRRSRSSRSRRRS	
WV- 8042	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001mG * SmGmAmCmC * ST * SG * RA * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmCmCmGmC * SmG	OSOOOSRSRSRSOOS	
WV- 8043	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Sm5Ceo * SGeo	OSSSSSRSRSRSSSSS	
WV- 8044	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * RGeo * Rm5Ceo * RGeo	OSSSSSRSRSRSRRRR	
WV- 8045	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * CeoGeom5Ceo * SGeo	OSSSSSRSRSRSOOS	

10

20

30

40

50

WV-8046	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * SGeo	OSSSSSSSRSSRSSRSOOOS
WV-8047	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * RGeo	OSSSSSSSRSSRSSRSOOOR
WV-8048	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod001L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * RGeo	OSSSSSSSRSSRSSRSOOOR
WV-8049	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU	VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmU * SfG * SmU * Sfa * SmGfa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfG * Sma * STGaNc6T * SmU	SSOSOSSSSSSOSOSSSSSSSS
WV-8050	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SGeoGeom5CeoAeoTeoGaNc6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOOOOOO OS
WV-8051	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SGeo * SGeo * Sm5Ceo * SAeo * STeo * SGeo * SAeo * STGaNc6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS
WV-8052	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SGeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo * RTeo * RGeo * RAeo * RTGaNc6T * SmU	SSOSOSOSOSOSORRRRRRRS
WV-8053	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SG * SG * SC * SA * ST * SG * SA * STGaNc6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS
WV-8054	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU	VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SG * SG * SC * SA * SmU * SG * SA * STGaNc6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS
WV-8055	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU	T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmU * SfG * SmU * Sfa * SmGfa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfG * Sma * STGaNc6T * SmU	SSOSOSSSSSSOSOSSSSSSSS
WV-8056	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SGeoGeom5CeoAeoTeoGaNc6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOOOOOO OS
WV-8057	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SGeo * SGeo * Sm5Ceo * SAeo * STeo * SGeo * SAeo * STGaNc6T * SmU	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS
WV-	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG	T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa	SSOSOSOSOSOSORRRRRRRS

10

20

30

40

50

8058	ATU		* SGeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo * RTeo * RGeo * RAeo * RTGaNC6T * SmU		SSOSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS
WV- 8059	TGCCACUGUAGAAAGGCATG ATU		T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfa * SG * SG * SC * SA * ST * SG * SA * STGaNC6T * SmU		SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS
WV- 8060	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU		T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfa * SG * SG * SC * SA * STGaNC6T * SmU		SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS
WV- 8061	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU		T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfG * Sma * STGaNC6T * SmU		SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSS
WV- 8063	TGCCACUGUAGAAAGGCAUT UTTTTTGGTAATCCACTTTTCAG AGG		VPT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmU * TgaNC6T * mUTTTTTeo * Geo * Teo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	XXOXOXOXOXOXOXOXXXXX XXX	
WV- 8065	TGCCACUGUAGAAAGGCAUT UTTTTTGGTAATCCACTTTTCAG AGG		VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * STGaNC6T * SmUTTTTTeo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSSO OOOXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV- 8067	TGCCACUGUAGAAAGGCAUT UTTTTTGGTAATCCACTTTTCAG AGG		VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * ST * SmUTTTTTeo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo * Geol003Mod001	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSSO OOOXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX O	
WV- 8069	TGCCACUGUAGAAAGGCAUT UTTTTTGGTAATCCACTTTTCAG AGG		T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * STGaNC6T * SmUTTTTTeo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSSO OOOXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
WV- 8071	TGCCACUGUAGAAAGGCAUT UTTTTTGGTAATCCACTTTTCAG AGG		T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * ST * SmUTTTTTeo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo * Geol003Mod001	SSOSOSOSOSOSOSSSSSSSSO OOOXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX O	
WV- 8072	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * T * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo	OXXXXXSRSSRSR5SSXXX	
WV- 8073	GGACCTGAGGATGGACCGCG		Mod001L001Geo * Geo * Aeo * m5Ceo * T * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo	OXXXXXSRSSRSR5SSXXX	

10

20

30

40

50

WV-8074	GGACCTGAGGATGGACCGCG	m5Ceo * Geo Mod001L001Geo * Geo * Aeom * m5Ceo * m5Ceo * T * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * m5Ceo * Geo * m5Ceo * Geo	OXXXXXSRSSRSRXXXX
WV-8075	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU	VPT * SFG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * SmC * Sfa * SmU * Sfg * Sma * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSSSSSSS
WV-8076	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU	T * Sfg * SmCfc * SmAfc * SmU * Sfg * SmU * Sfa * SmGfa * SmAfa * SmG * Sfg * SmC * Sfa * SmU * Sfg * Sma * ST * SmU	SSOSSSSSSSOSSSSSSS
WV-8077	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	T * Sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SGeoGeom5CeoAeoTeoGeoAeoT * SmU	SSOSOSOSOSOSOOOOO OS
WV-8078	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	T * Sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SGeo * SGeo * Sm5Ceo * SAeo * STeo * SGeo * SAeo * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSSSSSSS
WV-8079	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	T * Sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SGeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo * RGeo * RAeo * RT * SmU	SSOSOSOSOSOSRRRRRRRS
WV-8080	TGCCACUGUAGAAAGGCGATG ATU	T * Sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SG * SG * SC * SA * ST * SG * SA * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSSSSSSS
WV-8081	TGCCACUGUAGAAAGGCGAUG ATU	T * Sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SG * SG * SC * SA * SmU * SG * SA * ST * SmU	SSOSOSOSOSOSSSSSSS
WV-8082	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Geo * GeoAeom5Ceom5Ceo * T * G * A * G * G * A * T * G * G * A * m5Ceom5CeoGeom5Ceo * Geo	XOOOXXXXXXXXXXXXOXX
WV-8083	GGACCTGAGGATGGACCGCG	mG * SmGmAm5CeomC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeomGmC * SmG	SOOOSRSRSRSRSOOOS
WV-8084	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Geo * SGeo * SAeo * Sm5Ceo * Sm5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Sm5Ceo * SGeo * Sm5Ceo * SGeo	SSSSSSRSRSRSRSSSSS
WV-8085	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Geo * RGeo * RAeo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * Rm5Ceo * RGeo	RRRRRSRSRSRRRR
WV-8086	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Geo * SGeoAeom5Ceom5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceom5CeoGeom5Ceo * SGeo	SOOOSRSRSRSRSOOOS

10

20

30

40

50

WV-8087	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Geo * SgeoAeom5Cgeom5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Cgeom5Ceo	SGeo	SOOORSSRSSRSSOOS
WV-8088	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Geo * RGeoAeom5Cgeom5Ceo * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Cgeom5Ceo	SGeo	ROOOSRSSRSSOOR
WV-8089	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Geo * RGeoAeom5Cgeom5Ceo * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Cgeom5Ceo	SGeo	ROOORSSRSSRSSOOR
WV-8090	GGACCTGAGGATGGACCGCG	mG * SmG * SmA * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * SmG * SmC * SmG		SSSSSSRSSRSSSSSS
WV-8091	GGACCTGAGGATGGACCGCG	mG * RmG * RmA * RmC * RmC * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * RmG * RmC * RmG		RRRRRSSRSSRRRR
WV-8092	GGACCTGAGGATGGACCGCG	mG * SmG * RmA * RmC * RmC * RT * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * RmC * RmC * SmG		SRRRRSSRSSRRRS
WV-8093	GGACCTGAGGATGGACCGCG	mG * SmGmAmCmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmCmCmGmC * SmG		SOOOSRSSRSSOOS
WV-8094	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU		SSOSOSOSOSOSSSSSSS
WV-8095	TGCCACUGUAGAAAGGCAUG ATU	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU		SSOSOSOSOSOSSSSSSS
WV-8096	CUGUGACGUGGAGGAUCCCA GCCUCUG	rCrUrGrArGrCrUrGrArGrArGrArUrCrCrArGrCrCrUrCrUg		O00000000000000000 O0000000
WV-8111	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod0011001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * RG * SA * SmC * SmG * SmC * SmG * SmG * SmG		OSSSSSRSSRSSSSSS
WV-8112	GGACCTGAGGATGGACCGCG	Mod0011001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo		OSSSSSRSSRSSRRRR
WV-8132	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod0011001m5Ceo * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * G * G * C * A * T * G * AeomAeom5Ceo * Aeom		OXO00XXXXXXX0000X
WV-8133	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod0011001m5Ceo * RTGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeomAeom5Ceo * RAeo		OR00ORSSSSRSSSOOR
WV-8134	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	Mod0011001m5Ceo * m5CeoAeom5CeoTeo * G * T * A * G * A * A * G * C * AeomTeoGeoAeo * Aeom		OXO00XXXXXXX0000X
WV-8135	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	Mod0011001m5Ceo * Rm5CeoAeom5CeoTeo * RG * ST * SA * A * A * G * C * Aeom5CeoAeom5CeoTeo		OR00ORSSSSSSRSSSOOR

8135	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	SG * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * RAeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8136		Mod001L001m5Ceo * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * G * C * A * T * G * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo	ORRRRRSSSSRSR5RRRR
WV-8137	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * RTeo * RGeo * RTeo * RAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeo * RAeo * RGeo * Rm5Ceo * RAeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8138	CAUGAAGCAGGAACAUACCA	mC * mA * mU * mG * mA * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * mU * mA * mC * mC * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8139	GCAUGAAGCAGGAACAUACC	mG * mC * mA * mU * mG * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * mA * mU * mC * mC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8140	GGCAUGAAGCAGGAACAUAC	mG * mG * mC * mA * mU * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mC * mA * mU * mA * mC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8141	AGGCATGAAGCAGGAACAU	mA * mG * mG * mC * mA * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mA * mC * mA * mU * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8142	AAGGCATGAAGCAGGAACAU	mA * mA * mG * mG * mC * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * G * mA * mA * mC * mA * mU	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8143	AAAGGCATGAAGCAGGAACA	mA * mA * mA * mG * mG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mG * mA * mA * mC * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8144	GAAAGCATGAAGCAGGAAC	mG * mA * mA * mA * mG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * A * mG * mA * mA * mA * mC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8145	AGAAAGGCATGAAGCAGGAA	mA * mG * mA * mA * mG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mA * mG * mG * mA * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8146	UAGAAAGGCATGAAGCAGGA	mU * mA * mG * mA * mA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mC * mA * mG * mA * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8147	GUAGAAAGGCATGAAGCAGG	mG * mU * mA * mG * mA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mG * mC * mA * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8148	UGUAGAAAGGCATGAAGCAG	mU * mG * mA * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mA * mG * mC * mA * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8149	CUGUAGAAAGGCATGAAGCA	mC * mU * mG * mU * mA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8150	ACUGUAGAAAGGCATGAAGC	mA * mC * mU * mG * mU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mG * mA * mA * mG * mC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8151	CACUGTAGAAAGGCAUGAAG	mC * mA * mC * mU * mG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * A * mU * mG * mA * mA * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

10

20

30

40

50

WV- 8152	CCACUGTAGAAGGCAUGAA	mC * mC * mA * mC * mU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mA * mU * mG * mA * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8153	GCCACTGTAGAAAGGCAUGA	mG * mC * mC * mA * mC * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * mC * mA * mU * mG * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8154	GGCCACTGTAGAAAGGCAUG	mG * mG * mC * mC * mA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * mG * mC * mA * mU * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8155	AGGCCACTGTAGAAAGGCAU	mA * mG * mG * mC * mA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * A * mG * mG * mC * mA * mU	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8156	AAGGCCACTGTAGAAAGGCA	mA * mA * mG * mG * mC * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * mA * mG * mG * mC * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8157	UAAGGCCACTGTAGAAAGGC	mU * mA * mA * mG * mG * C * C * A * C * T * G * T * A * G * G * A * mA * mA * mG * mG * mC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8158	AUAAGGCCACTGTAGAAAGG	mA * mU * mA * mA * mG * G * C * C * A * C * T * G * T * A * A * G * mA * mA * mA * mG * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8159	GAUAAGGCCACTGTAGAAAG	mG * mA * mU * mA * mA * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * mG * mA * mA * mA * mG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8160	GGAUAAGGCCACTGTAGAAA	mG * mG * mA * mU * mA * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * mA * mG * mA * mA * mA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8161	CATGAAGCAGGAACATACCA	m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * Aeo * A * G * C * A * G * G * A * A * * C * A * Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8162	GCATGAAGCAGGAACATACC	Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * A * A * G * C * A * G * G * A * * A * C * Aeo * Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8163	GGCATGAAGCAGGAACATAC	Geo * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * G * A * A * G * C * A * G * G * * A * A * m5Ceo * Aeo * Teo * Aeo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8164	AGGCATGAAGCAGGAACATA	Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * Aeo * T * G * A * A * G * C * A * G * * G * A * Aeo * m5Ceo * Aeo * Teo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8165	AAGGCATGAAGCAGGAACAT	Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo * A * T * G * A * A * A * G * C * A * * G * G * Aeo * Aeo * m5Ceo * Aeo * Teo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8166	AAAGGCATGAAGCAGGAACA	Aeo * Aeo * Aeo * Geo * Geo * C * A * T * G * A * A * G * C * A * * G * Geo * Aeo * Aeo * m5Ceo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8167	GAAAGGCATGAAGCAGGAAC	Geo * Aeo * Aeo * Aeo * Geo * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * Geo * Aeo * Aeo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV- 8168	AGAAAGGCATGAAGCAGGAA	Aeo * Geo * Aeo * Aeo * Geo * G * C * A * T * G * A * A * G * C * Aeo * Geo * Aeo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

10

20

30

40

50

WV-8169	TAGAAAGGCATGAAGCAGGA	Teo * Aeo * Geo * Aeo * Aeo * A * G * G * C * A * T * G * A * A * * G * m5Ceo * Aeo * Geo * Geo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8170	GTAGAAAGGCATGAAGCAGG	Geo * Teo * Aeo * Geo * Aeo * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * Geo * m5Ceo * Aeo * Geo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8171	TGTAGAAAGGCATGAAGCAG	Teo * Geo * Teo * Aeo * Geo * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8172	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8173	ACTGTAGAAAGGCATGAAGC	Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * Teo * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * Geo * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8174	CACTGTAGAAAGGCATGAAG	m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * Teo * Geo * Aeo * Aeo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8175	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * Aeo * Teo * Geo * Aeo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8176	GCCACTGTAGAAAGGCATGA	Geo * m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8177	GGCCACTGTAGAAAGGCATG	Geo * Geo * m5Ceo * m5Ceo * Aeo * C * T * G * T * A * G * A * * A * A * G * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8178	AGGCCACTGTAGAAAGGCAT	Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * m5Ceo * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * Geo * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8179	AAGGCCACTGTAGAAAGGCA	Aeo * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8180	TAAAGCCACTGTAGAAAGGC	Teo * Aeo * Aeo * Geo * Geo * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * Aeo * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8181	ATAAGGCCACTGTAGAAAGG	Aeo * Teo * Aeo * Aeo * Geo * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * Aeo * Aeo * Geo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8182	GATAAGGCCACTGTAGAAAG	Geo * Aeo * Teo * Aeo * Aeo * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * Geo * Aeo * Aeo * Geo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8183	GGATAAGGCCACTGTAGAAA	Geo * Geo * Aeo * Teo * Aeo * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * Aeo * Geo * Aeo * Aeo	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8184	CAUGAAGCAGGAACAUAACA	m5IC * mA * mU * mG * mA * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * mU * mA * mC * mC * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8185	GCAUGAAGCAGGAACAUAACC	IG * mC * mA * mU * mG * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * mA * mU * mA * mC * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

10

20

30

40

50

WV-8186	GGCAUGAAGCAGGAACAUAC	IG * mG * mC * mA * mU * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * mC * mA * mU * mA * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8187	AGGCATGAAGCAGGAACAU	IA * mG * mG * mC * mA * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * mA * mC * mA * mU * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8188	AAGGCATGAAGCAGGAACAT	IA * mA * mG * mG * mC * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * mA * mA * mC * mA * IT	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8189	AAAGGCATGAAGCAGGAACA	IA * mA * mA * mG * mG * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * mG * mA * mA * mC * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8190	GAAAGGCATGAAGCAGGAAC	IG * mA * mA * mA * mG * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * mG * mG * mA * mA * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8191	AGAAAGGCATGAAGCAGGAA	IA * mG * mA * mA * mA * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * mA * mG * mG * mA * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8192	TAGAAAGGCATGAAGCAGGA	IT * mA * mG * mA * mA * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * mC * mA * mG * mG * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8193	GUAGAAAGGCATGAAGCAGG	IG * mU * mA * mG * mA * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * mG * mC * mA * mG * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8194	TGUAGAAAGGCATGAAGCAG	IT * mG * mU * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mA * mG * mC * mA * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8195	CUGUAGAAAGGCATGAAGCA	m5IC * mU * mG * mU * mA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8196	ACUGUAGAAAGGCATGAAGC	IA * mC * mU * mG * mU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mG * mA * mA * mG * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8197	CACUGTAGAAAGGCAUGAAG	m5IC * mA * mC * mU * mG * T * A * G * A * A * G * G * C * A * mU * mG * mA * mA * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8198	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	m5IC * mC * mA * mC * mU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mA * mU * mG * mA * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8199	GCCACTGTAGAAAGGCAUGA	IG * mC * mC * mA * mC * T * G * T * A * G * A * A * G * G * mC * mA * mU * mG * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8200	GGCCACTGTAGAAAGGCAUG	IG * mG * mC * mC * mA * C * T * G * T * A * G * A * A * A * G * mG * mC * mA * mU * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8201	AGGCCACTGTAGAAAGGCAT	IA * mG * mG * mC * mC * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * mG * mG * mC * mA * IT	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8202	AAGGCCACTGTAGAAAGGCA	IA * mA * mG * mG * mC * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * mA * mG * mG * mC * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

10

20

30

40

50

WV-8203	TAAGGCCACTGTAGAAAGGC	IT * mA * mA * mG * mG * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * * mA * mA * mG * mG * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8204	AUAAGGCCACTGTAGAAAGG	IA * mU * mA * mA * mG * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * mA * mA * mA * mG * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8205	GAUAAGGCCACTGTAGAAAG	IG * mA * mU * mA * mA * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * mG * mA * mA * mA * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8206	GGUAAGGCCACTGTAGAAA	IG * mG * mA * mU * mA * A * G * G * C * C * A * C * T * G * T * mA * mG * mA * mA * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8207	CATGAAGCAGGAACATACCA	m5IC * Aeo * Teo * Geo * Aeo * A * G * C * A * G * G * A * A * C * A * Teo * Aeo * m5Ceo * m5Ceo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8208	GCATGAAGCAGGAACATACC	IG * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * A * A * G * C * A * G * G * A * A * C * Aeo * Teo * Aeo * m5Ceo * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8209	GGCATGAAGCAGGAACATAC	IG * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * G * A * A * G * C * A * G * G * A * A * m5Ceo * Aeo * Teo * Aeo * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8210	AGGCATGAAGCAGGAACATA	IA * Geo * Geo * m5Ceo * Aeo * T * G * A * A * G * C * A * G * G * A * Aeo * m5Ceo * Aeo * Teo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8211	AAGGCATGAAGCAGGAACAT	IA * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * A * T * G * A * A * G * C * A * G * G * Aeo * Aeo * m5Ceo * Aeo * IT	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8212	AAAGGCATGAAGCAGGAACA	IA * Aeo * Aeo * Geo * Geo * C * A * T * G * A * A * G * C * A * G * Geo * Aeo * Aeo * m5Ceo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8213	GAAAGGCATGAAGCAGGAAC	IG * Aeo * Aeo * Aeo * Geo * G * C * A * T * G * A * A * G * C * A * Geo * Aeo * Aeo * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8214	AGAAAGGCATGAAGCAGGAA	IA * Geo * Aeo * Aeo * Aeo * G * G * C * A * T * G * A * A * G * C * Aeo * Geo * Geo * Aeo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8215	TAGAAAGGCATGAAGCAGGA	IT * Aeo * Geo * Aeo * Aeo * A * G * G * C * A * T * G * A * A * G * m5Ceo * Aeo * Geo * Geo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8216	GTAGAAAGGCATGAAGCAGG	IG * Teo * Aeo * Geo * Aeo * A * A * G * G * C * A * T * G * A * A * Geo * m5Ceo * Aeo * Geo * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8217	TGTAGAAAGGCATGAAGCAG	IT * Geo * Teo * Aeo * Geo * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8218	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5IC * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * Aeo * Geo * m5Ceo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8219	ACTGTAGAAAGGCATGAAGC	IA * m5Ceo * Teo * Geo * Teo * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * Geo * Aeo * Aeo * Geo * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

10

20

30

40

50

WV-8220	CAC	TGTAGAAAGGCATGAAG	m5IC * Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * Teo * Aeo * Aeo * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8221	CCA	CTGTAGAAAGGCATGAA	m5IC * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * G * T * A * G * A * A * A * G * C * Aeo * Teo * Geo * Aeo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8222	GCC	ACTGTAGAAAGGCATGA	IG * m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * T * G * T * A * G * A * A * A * G * G * m5Ceo * Aeo * Teo * Geo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8223	GGC	CACTGTAGAAAGGCATG	IG * Geo * m5Ceo * m5Ceo * Aeo * C * T * G * T * A * G * A * A * G * Geo * m5Ceo * Aeo * Teo * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8224	AGG	CACTGTAGAAAGGCAT	IA * Geo * Geo * m5Ceo * m5Ceo * A * C * T * G * T * A * G * A * A * A * Geo * Geo * m5Ceo * Aeo * IT	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8225	AAG	CCACTGTAGAAAGGCA	IA * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * C * A * C * T * G * T * A * G * A * A * Aeo * Geo * Geo * m5Ceo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8226	TAAG	GCCACTGTAGAAAGGC	IT * Aeo * Aeo * Geo * Geo * C * C * A * C * T * G * T * A * G * A * Aeo * Aeo * Geo * m5IC	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8227	ATAAG	GCCACTGTAGAAAGG	IA * Teo * Aeo * Geo * Geo * G * C * C * A * C * T * G * T * A * G * Aeo * Aeo * Geo * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8228	GATAAG	GCCACTGTAGAAAG	IG * Aeo * Teo * Aeo * Aeo * G * G * C * C * A * C * T * G * T * A * Geo * Aeo * Aeo * IG	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8229	GGATAAG	CCACTGTAGAAA	IG * Geo * Aeo * Teo * Aeo * A * G * C * C * A * C * T * G * T * Aeo * Aeo * Aeo * IA	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

WV-8071	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTTGG TAATCCACTTTTCAGAGG	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * ST * SmUTTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geol003Mod001	SSO SO SO SO SO SSO SSSSSSSOOOOO XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8069	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTTGG TAATCCACTTTTCAGAGG	T * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmUTTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	SSO SO SO SO SO SSO SSSSSSSOOOOO XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8067	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTTGG TAATCCACTTTTCAGAGG	VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * ST * SmUTTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo * Geol003Mod001	SSO SO SO SO SO SSO SSSSSSSOOOOO XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

WV-8065	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTTGG TAATCCACTTTCAGAGG	VPT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * STGaNCGT * SmUTTTTTeo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * VPT * fg * mCfC * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfmCFamU * TgANCGT * mUTTTTTeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	SSO SO SO SO SO SO SSSSSSSSOOOOO XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8063	TGCCACUGUAGAAAGG CAUTUTTTTTGG TAATCCACTTTCAGAGG		XXO XO XO XO XO XOXO XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
WV-8233	UUGGUAGUUUCUGCUUCAU GCCUUUCACAGUGGCCUUAUCCC	rU rU rG rG rU rA rU rG rU rU rC rU rC rU rG rC rU rU rC rA rU rG rC rU rU rU rU rC rA rC rA rG rU rG rG rC rU rU rA rU rC rC rU rG rG rU rA rU rG rU rU rC rU rG rC rU rU rC rA rU rC rC rC rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG rC rC rU rU rA rU rC rC L001m5Cceo * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * AeoAeoGeom5Cceo * Aeo	O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O O X O O X X X X X X X X X X X X X X X X
WV-8234	UUGGUAGUUUCUGCUUCAU CCCCUUCACAGUGGCCUUAUCCC		
WV-8235	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA		
WV-8236	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	L001m5Cceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Cceo * RAeo	O R O O O R S S S S R S S R S S O O O R
WV-8237	CCA CTGTAGAAAAGGCATGAA	L001m5Cceo * m5CeoAeom5CceoTeo * G * T * A * G * A * A * G * G * C * AeoTeoGeoAeo * Aeo	O X O O O X X X X X X X X X X X X X X X X
WV-8238	CCA CTGTAGAAAAGGCATGAA	L001m5Cceo * Rm5CeoAeom5CceoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * RAeo	O R O O O R S S S S S S S S S S O O O R
WV-8239	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	L001m5Cceo * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * A * G * C * A * T * G * Aeo * Aeo * Geo * m5Cceo * Aeo	O X X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
WV-8240	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	L001m5Cceo * RTeo * RGeo * RTeo * RAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeom * RAeo * RGeo * Rm5Cceo * RAeo	O R R R R S S S S S S S S S S R R R R R
WV-2477	CCUUCUCCUIGAAAGGUUCUCC	DmC * fC * mUfu * mCfC * mCfU * mGfa * XXOXXOXXOXXOXXOXXOXXOXXOXXOXXOXX	

		mAfG * mGfU * mU * fC * mC * fU * mC * mC	
WV-8241	TGCCACUGUAGAAAGGC AUGATU	POSfMRdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8244	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeomGTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmAmAmGmC * SmA	S OOO SSSSS RSS RSS OOOS
WV-8245	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * RTeogeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoaAeoGeom5Ceo * RAeo	R OOOOR SSSS RSS RSS OOOR
WV-8246	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5IC * STeomGTeomA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmAmAmGmC * SIA	S OOO SSSSS RSS RSS OOOS
WV-8247	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5IC * RTeogeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoaAeoGeom5Ceo * RIA	R OOOOR SSSS RSS RSS OOOR
WV-8248	CCACUGTAGAAAGGCATGAA	mC * Sm5CeomAm5CeomU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SmATeomGmA * SmA	S OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8249	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	m5Ceo * Rm5CeoaAeom5CeoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeotGeoAeo * RAeo	R OOOOR SSSSS SSS RSS OOOR
WV-8250	CCACUGTAGAAAGGCATGAA	m5IC * Sm5CeomAm5CeomU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SmATeomGmA * SIA	S OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8251	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	m5IC * Rm5CeoaAeom5CeoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeotGeoAeo * RIA	R OOOOR SSSSS SSS RSS OOOR
WV-8252	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * RTeoo * RGeo * RGeo * RAeo * RAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoo * RAeo * RGeo * Rm5Ceoo * RAeo	RRRRR SSSS RSS RSSRRRR
WV-8253	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	m5Ceoo * Rm5Ceoo * RAeo * Rm5Ceoo * RTeoo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoo * RGeo * RAeo * RAeo	RRRRR SSSSS SSS RSSRRRR
WV-8255	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU TTTTTGGTAATCCACTTCAGAGG	VPT * fg * mCfc * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfA * mGfGmCfAmU * AMC6T * mUTTTTTGeo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	XX OXOX OXOX OXOX OOOOXX OOOOO XXXX XXXXX XXXXXXXXX
WV-8256	GGACCTGAGGATGGACCGCG	L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * SmC * SmC * SmG * SmC * SmG	O SSSSS S RSS RSSR SSSS S
WV-8257	GGACCTGAGGATGGACCGCG	L001mG * SmG * SmA * SmC * SmC * ST * SG * RA * SG * SG * RA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceoo * Rm5Ceoo * RGeo * Rm5Ceoo * RGeo	O SSSSS S RSS RSS RSSRRRR

10

20

30

40

50

WV- 8258	GGACCTGAGGATGGACCGCG	L001mG * SmG * SmA * SmC * mC * ST * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * RG * SA * SmC * SmC * SmG * SmC * SmC * SmG	O SSSSS SR SSSSS R SSSSS S
WV- 8259	GGACCTGAGGATGGACCGCG	L001mG * SmG * SmA * SmC * mC * ST * SG * RA * SG * SG * SA * ST * SG * RG * SA * Sm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * RGeo	O SSSSS SR SSSSS RSRRRR
WV- 8260	TGCCACUGUAGAAAGG CAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfG * Sma * SAMC6T * SmU	SS OSOSOS OSOSO SSSSS SSSS
WV- 8263	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	5MSdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8264	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PO5MSdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8265	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PS5MSdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8266	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PH5MSdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8267	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	5MRdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8268	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PO5MRdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8269	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PS5MRdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8270	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	PH5MRdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8271	TGCCACUGUAGAAAGG CAUGATU	5MSdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO OXX
WV- 8272	TGCCACUGUAGAAAGG CAUGATU	PO5MSdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO OXX
WV- 8273	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MSdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO OXX
WV- 8274	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PH5MSdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO OXX
WV- 8275	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO OXX
WV-	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * fg * mCfc * mAfc * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa * mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX

10

20

30

40

50

8276			mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	OOOO OXX
WV- 8277	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	P55MRdT * fg * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa *	mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	OOOO OXX
WV- 8278	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PH5MRdT * fg * mCfC * mAfC * mUfG * mUfA * mGfA * mAfa *	mGfGmCfAmUfGmA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO OXX
WV- 8279	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	Mod001L001m5Ceo * m5Ceo * AeO * m5Ceo * TeO * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * AeO * TeO * Geo * AeO * AeO		O XXXX XXXX XXXXXXXX
WV- 8280	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	Mod001L001m5Ceo * Rm5Ceo * RAeo * Rm5Ceo * RTeO * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeo * RTeO * RGeo * RAeo * RAeo		ORRRR SSSSS S RSSRRR
WV- 8323	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	L001m5Ceo * m5Ceo * AeO * m5Ceo * TeO * G * T * A * G * A * A * G * G * C * AeO * TeO * Geo * AeO * AeO		O XXXX XXXX XXXXXXXX
WV- 8324	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	L001m5Ceo * Rm5Ceo * RAeo * Rm5Ceo * RTeO * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeo * RTeO * RGeo * RAeo * RAeo		ORRRR SSSSS S RSSRRR
WV- 8436	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfa *	mGmGmCmAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8437	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfa *	mGmGmCmAmUmG * mA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO XXX
WV- 8438	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * fg * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfa * mG * mG * mC * mA * mU * mU * T * mU		XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXX
WV- 8439	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * fg * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAfa * mG * mG * mC * mA * mU * mU * mG * mA * T * mU		XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8440	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * mG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAma *	mGmGmCmAmU * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOOX
WV- 8441	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * mG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAma *	mGmGmCmAmUmG * mA * T * mU	XX OXOX OXOX OXOX OOOO XXX
WV- 8442	TGCCACUGUAGAAAGGCAUTU	T * mG * mC * mA * mU * T * mU		XX OXOX OXOX OXO XXXXXX
WV- 8443	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * mG * mCmC * mAmC * mUmG * mUmA * mGmA * mAma * mG * mG * mC * mA * mU * mG * mA * T * mU		XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXX
WV- 8558	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeo * SAeo * SGeo * SGeo * SAeo		OR OOR SSSS RSSR SSSS S
WV- 8559	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	Mod001L001m5Ceo * Rm5CeoAom5CeoTeo * RG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeo * STeo * SGeo * SAeo * SAeo		OR OOR SSSSS SSR SSSS S

10

20

30

40

50

WV-8560	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * RTGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OR OOO SSSS RSSR SSSSS S
WV-8561	CCACTGTAGAAAAGGCAUGAA	Mod001L001m5Ceo * Rm5CeoAeom5CeoTeo * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SmA * SmU * SmG * SmA * SmA	OR OOO SSSSS SSR SSSSS S
WV-8562	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STGeoTeoA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeo * SAeo * SGeo * Sm5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS RSSR SSSSS S
WV-8563	CCACUGTAGAAAAGGCATGAA	Mod001L001mC * Sm5CeoAeom5CeoIU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeo * STGeo * SGeo * SAeo * SAeo	OS OOO SSSSS SSSR SSSSS S
WV-8564	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STGeoTeoA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS RSSR SSSSS S
WV-8565	CCACUGTAGAAAAGGCAUGAA	Mod001L001mC * Sm5CeoAeom5CeoIU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SmA * SmU * SmG * SmA * SmA	OS OOO SSSSS SSSR SSSSS S
WV-8566	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS RSS RSS OOOS
WV-8567	CCACTGTAGAAAAGGCATGAA	Mod001L001m5Ceo * Sm5CeoAeom5CeoTeo * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * SAeo	OS OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8596	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STGeoTeoA * SG * SA * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS SSSR SSSSS S
WV-8597	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * STGeoTeoA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS R SSSSS SSSS
WV-8598	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * SG * * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV-8599	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001m5Ceo * STGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS R SSSSS OOOS
WV-8600	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	Mod001L001mC * TeoGeoTeoA * G * A * A * G * C * A * T * G * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8601	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	mC * STGeoTeoA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOO SSSSS RSSR SSSSS S
WV-8602	CCACUGTAGAAAAGGCAUGAA	mC * Sm5CeoAeom5CeoIU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SG * * RG * SC * SmA * SmU * SmG * SmA * SmA	S OOO SSSSS SSSR SSSSS S
WV-8603	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * STGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	S OOO SSSSS RSS RSS OOOS
WV-8604	CCACTGTAGAAAAGGCATGAA	m5Ceo * Sm5CeoAeom5CeoTeo * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoGeoAeo * SAeo	S OOO SSSSS SSS RSS OOOS

10

20

30

40

50

WV- 8605	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOO SSSSS SSSR SSSS S
WV- 8606	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SG * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	S OOO SSSSS R SSSSS SSSS
WV- 8607	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	S OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV- 8608	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	S OOO SSSSS R SSSSS OOOS
WV- 8609	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	mC * TeoGeoTeomA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	X OOO XXXX XXXX XXXX
WV- 8620	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS RSSR SSSS S
WV- 8621	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	L001mC * Sm5CeoAeom5CeomU * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SmA * SmU * SmG * SmA * SmA	OS OOO SSSSS SSSR SSSS S
WV- 8622	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS RSS RSS OOOS
WV- 8623	CCACTGTAGAAAGGCATGAA	L001m5Ceo * Sm5CeoAeom5CeoTeo * SG * ST * SA * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * SG * RG * SC * SAeoTeoAeo * SAeo	OS OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV- 8624	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS SSSR SSSS S
WV- 8625	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * STeoGeoTeomA * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOO SSSSS R SSSSS SSSS
WV- 8626	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SG * SG * SC * SA * RT * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS SSS RSS OOOS
WV- 8627	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS R SSSSS OOOS
WV- 8628	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	L001mC * TeoGeoTeomA * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXX XXXX
WV- 8689	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	Mod001L001mC * m5CeoAeom5CeomU * G * T * A * G * A * A * A * G * C * mA * mU * mG * mA * mA	OX OOO XXXXX XXXX XXXX
WV- 8690	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	mC * m5CeoAeom5CeomU * G * T * A * G * A * A * G * C * mA * mU * mG * mA * mA	X OOO XXXX XXXX XXXX
WV- 8697	CCACUGTAGAAAGGCAUGAA	L001mC * m5CeoAeom5CeomU * G * T * A * G * A * A * A * G * C * mA * mA * mU * mG * mA * mA	OX OOO XXXX XXXX XXXX

10

20

30

40

50

WV-8698	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * Smg * SfG * Smc * Sfa * Smu * Sfg * Sma * STGaNC6t * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8699	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * Smg * SfG * Smc * Sfa * Smu * Sfg * Sma * SAMC6t * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8700	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * Smg * SfG * Smc * Sfa * Smu * Sfg * Sma * STGaNC6t * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8701	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * Smg * SfG * Smc * Sfa * Smu * Sfg * Sma * SAMC6t * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-8807	CUGCUUCAGUCCUUUCACAGUGG	rC rU rG rC rU rC rA rU rC rC rC rC rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG	OOOOO OOOOO OOOOO OOOOO
WV-8808	CUGCUUCAUCCCCUUCACAGUGG	rC rU rG rC rU rC rA rU rC rC rC rC rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG	OOOOO OOOOO OOOOO OOOOO
WV-8843	UGTAGAAAAGGCATGAAGCAG	mU * GeoTeoAeomG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mA * mG * mC * mA * mG	X OOO XXXXX XXXX XXXXX
WV-8844	UGUAGAAAAGGCATGAAGCAG	mU * mC * mU * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mAgeom5GeoAeo * mG	XXXXX XXXXX XXXX OOOX
WV-8845	TGTAGAAAAGGCATGAAGCAG	Teo * GeoTeoAeoGeo * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * mA * mG * mC * mA * mG	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8846	UGUAGAAAAGGCATGAAGCAG	mU * mC * mU * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * A * Aeogem5GeoAeo * Geo	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8847	CUGUAGAAAAGGCATGAAGCA	mC * mU * mG * mU * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mAAeoGeom5Geo * mA	XXXXX XXXXX XXXX OOOX
WV-8848	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	m5Geo * TeogeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8849	CUGUAGAAAAGGCATGAAGCA	mC * mU * mG * mU * mA * mG * A * A * A * G * G * C * A * T * G * AeoaAoGeom5Geo * Aeoa	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8850	ACTGUAGAAAAGGCATGAAGC	mA * m5GeoTeoGeomU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mG * mA * mA * mG * mC	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX
WV-8851	ACUGUAGAAAAGGCATGAAGC	mA * mC * mU * mG * mU * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mGAeoAeoGeo * mC	XXXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8852	ACTGTAGAAAAGGCATGAAGC	Aeo * m5GeoTeoGeoTeo * A * G * A * A * A * G * G * C * A * T * mG * mA * mA * mG * mC	X OOO XXXXX XXXXX XXXXX

WV-8853	ACUGUAGAAAGGCATGAAGC	mA * mC * mU * mG * mU * A * G * A * A * G * A * A * G * G * C * A * T * GeoAeoAeoGeo * m5Ceo	XXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8854	CACTGTAGAAAGGCAUGAAG	mC * Aeom5CeoTeomG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mU * mG * mA * mA * mG	X OOO XXXXX XXXXX XXXX
WV-8855	CACUGTAGAAAGGCAUGAAG	mC * mA * mC * mU * mG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mUGeoAeoAeo * mG	XXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8856	CACTGTAGAAAGGCAUGAAG	m5Ceo * Aeom5CeoTeoGeo * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * mU * mG * mA * mA * mG	X OOO XXXXX XXXXX XXXX
WV-8857	CACUGTAGAAAGGCATGAAG	mC * mA * mC * mU * mG * T * A * G * A * A * A * G * G * C * A * TeoGeoAeoAeo * Geo	XXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8858	CCACUGTAGAAAGGCATGAA	mC * mC * mA * mC * mU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * mATeoGeoAeo * mA	XXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-8859	CCACTGTAGAAAGGCAUGAA	m5Ceo * m5CeoAeom5CeoTeo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * * mA * mU * mG * mA * mA	X OOO XXXXX XXXXX XXXX
WV-8860	CCACUGTAGAAAGGCATGAA	mC * mC * mA * mC * mU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * C * AeoTeoGeoAeo * Aeo	XXXX XXXXX XXXXX OOOX
WV-9400	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUma * SmGma * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNc6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9401	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUma * SmGma * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNc6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9402	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUma * SmGma * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNc6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9403	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUma * SmGma * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNc6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9404	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCmc * SmAmc * SmUmg * SmUma * SmGma * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNc6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9405	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCmc * SmAmc * SmUmg * SmUma * SmGma * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNc6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9406	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCmc * SmAmc * SmUmg * SmUma * SmGma * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA *	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS

10

20

30

40

50

WV-9407	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	STGaNC6T * SmU PS5MRdT * SFG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfa * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9431	TGTAGAAAGGGATGAAGCAG	Teo * Geo * Teo * Aeo * Geo * A * A * A * G * G * A * T * G * A * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo * Geo	XXXX XXXX XXXXXXXX
WV-9432	CTGTAGAAAGGGATGAAGCA	m5Ceo * Teo * Geo * Teo * Aeo * G * A * A * A * G * G * A * T * G * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo * Aeo	XXXX XXXX XXXXXXXX
WV-9433	ACTGTAGAAAGGGATGAAGC	Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * Teo * A * A * A * A * G * G * A * T * Geo * Aeo * Aeo * Geo * m5Ceo	XXXX XXXX XXXXXXXX
WV-9434	CACTGTAGAAAGGGATGAAG	m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * Geo * T * A * G * A * A * A * G * G * G * A * Teo * Geo * Aeo * Aeo * Geo	XXXX XXXX XXXXXXXX
WV-9435	CCACTGTAGAAAGGGATGAAG	m5Ceo * m5Ceo * Aeo * m5Ceo * Teo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * Aeo * Teo * Aeo * Aeo	XXXX XXXX XXXXXXXX
WV-9436	TGTAGAAAGGGATGAAGCAG	Teo * GeoTeoAeoGeo * A * A * A * G * G * A * T * G * A * A * G * AeoGeo m5CeoAeo * Geo	X OOO XXXX XXXXX OOX
WV-9437	CTGTAGAAAGGGATGAAGCA	m5Ceo * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * A * T * G * AeoAeoGeo m5Ceo * Aeo	X OOO XXXX XXXXX OOX
WV-9438	ACTGTAGAAAGGGATGAAGC	Aeo * m5CeoTeoGeoTeo * A * G * A * A * A * G * G * A * T * GeoAeoAeoGeo * m5Ceo	X OOO XXXX XXXXX OOX
WV-9439	CACTGTAGAAAGGGATGAAG	m5Ceo * Aeo m5CeoTeoGeo * T * A * G * A * A * A * G * G * A * TeoGeoAeoAeo * Geo	X OOO XXXX XXXXX OOX
WV-9440	CCACTGTAGAAAGGGATGAAG	m5Ceo * m5CeoAeo m5CeoTeo * G * T * A * G * A * A * A * G * G * AeoTeoGeoAeo * Aeo	X OOO XXXX XXXXX OOX
WV-9441	UGTAGAAAGGGATGAAGCAG	mU * GeoTeoAeo mG * A * A * G * G * A * T * G * A * A * mG * mC * mA * mG	X OOO XXXX XXXX XXXX
WV-9442	CTGTAGAAAGGGATGAAGCA	mC * TeoGeoTeo mG * A * A * A * A * G * G * A * T * G * A * mA * mG * mC * mA	X OOO XXXX XXXX XXXX
WV-9443	ACTGUAGAAAGGGATGAAGC	mA * m5CeoTeoGeo mU * A * G * A * A * A * G * G * A * T * mG * mA * mA * mG * mC	X OOO XXXX XXXX XXXX
WV-9444	CACTGTAGAAAGGGATGAAG	mC * Aeo m5CeoTeo mG * T * A * G * A * A * A * G * G * A * mU * mG * mA * mA * mG	X OOO XXXX XXXX XXXX
WV-9445	CCACUGTAGAAAGGGATGAAG	mC * m5CeoAeo m5Ceo mU * G * T * A * G * A * A * A * G * G * mA * mU * mG * mA	X OOO XXXX XXXX XXXX

10

20

30

40

50

WV-9495	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9496	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9497	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9498	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9499	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	T * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9500	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9501	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PO5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9502	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	PS5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9550	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Mod001L001T * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfG * SmA * ST * SmU	OSS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9551	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Mod001L0015MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfG * SmA * ST * SmU	OSS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9552	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Mod001L001T * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * ST * SmU	OSS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9553	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	Mod001L0015MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUma * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * ST * SmU	OSS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	5MRdT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUfa * SmGfa * SmAfa	SS OSOS OSOSOSO

10

20

30

40

50

9554			* SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * ST * SmU	SSSSS SSSS
WV-9555	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		T * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * ST * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9556	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		5MRdT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * ST * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9670	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOOO SSSSR SSSSR OOOS
WV-9671	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOOO SSSSR SSSSR OOOS
WV-9672	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * SG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOO SSSSS R SSSSR OOOS
WV-9859	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001m5Ceo * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SAeo	OS OOOO SSSS RSSRSR OOOS
WV-9860	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001mC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * G * C * A * T * G * Aeo * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXX XXXX
WV-9861	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOOO SSSS RSSRSR SSSS
WV-9862	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOOO SSSSR SSSSR SSSS
WV-9866	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		VPT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9867	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		VPT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9868	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001mC * TeoGeoTeoAeo * G * A * A * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA	OX OOO XXXXX XXXX XXXX
WV-9869	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * RT * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOOO SSSS RSSR SSSS S
WV-9870	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001mC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA	OS OOOO SSSSR SSSSR SSSS
WV-9883	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		VPT * SfG * SmCfC * SmAfc * SmUfG * SmUmA * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-9884	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		VPT * SfG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfa * SmG * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS

10

20

30

40

50

WV-9889	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA	SmLU	m5Ceo *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *RT *SG *RAeoAeoGeom5Ceo *SAeo	S OOR SSSS RSRSR OOOS
WV-9890	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		m5Ceo *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *ST *SG *RAeoAeoGeom5Ceo *SAeo	S OOR SSSSR SSSSR OOOS
WV-9891	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		mC *TeoGeoTeoAeo *G *A *A *G *C *A *T *G *mA *mA *mG *mC *mA	X OOO XXXXX XXXX XXXX
WV-9892	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		mC *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *RT *SG *SmA *SmA *SmG *SmC *SmA	S OOR SSSS RSR SSSS S
WV-9893	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		mC *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *ST *SG *SmA *SmA *SmG *SmC *SmA	S OOR SSSSR SSSSS SSSS
WV-9894	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		mC *TeoGeoTeoAeo *G *A *A *G *C *A *T *G *Aeo *mA *mG *mC *mA	X OOO XXXXX XXXX XXXX
WV-9895	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		mC *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *RT *SG *RAeo *SmA *SmG *SmC *SmA	S OOR SSSS RSRSR SSSS
WV-9896	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		mC *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *ST *SG *RAeo *SmA *SmG *SmC *SmA	S OOR SSSSR SSSSR SSSS
WV-10247	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		L001m5Ceo *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *RT *SG *RAeoAeoGeom5Ceo *SAeo	OS OOR SSSS RSRSR OOOS
WV-10248	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		L001m5Ceo *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *ST *SG *RAeoAeoGeom5Ceo *SAeo	OS OOR SSSSR SSSSR OOOS
WV-10249	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		L001mC *TeoGeoTeoAeo *G *A *A *G *C *A *T *G *mA *mA *mG *mC *mA	OX OOO XXXXX XXXX XXXX
WV-10250	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		L001mC *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *RT *SG *SmA *SmA *SmG *SmC *SmA	OS OOR SSSS RSR SSSS S
WV-10251	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		L001mC *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *ST *SG *SmA *SmA *SmG *SmC *SmA	OS OOR SSSSR SSSSS SSSS
WV-10252	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		L001mC *TeoGeoTeoAeo *G *A *A *G *C *A *T *G *Aeo *mA *mA *mG *mC *mA	OX OOO XXXXX XXXX XXXX
WV-10253	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		L001mC *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *RT *SG *RAeo *SmA *SmG *SmC *SmA	OS OOR SSSS RSRSR SSSS
WV-10254	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		L001mC *STeoGeoTeoAeo *RG *SA *SA *SG *RG *SC *SA *ST *SG *RAeo *SmA *SmG *SmC *SmA	OS OOR SSSSR SSSSR SSSS
WV-	TCCUUCUCCUAGAGGUUCUCCTU		VPT *fc *mCfu *mUfc *mCfc *mUfg *mAfa *mGfg *mU *fu *	XX OXOX OXOX OXO

10

20

30

40

50

10320			mC * fc * mU * fc * mC * mC * TGaNC6T * mU	XXXXXXXXXX
WV-10321	TCCUUCUUAGAGGUUCCUCCTU		VPT * fc * mCmU * mUmC * mCmC * mUmG * mAmA * mGfG * mU * mU * mC * mC * mC * mC * TGaNC6T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXXXX
WV-10322	TCCUUCUUAGAGGUUCCUCCTU		PO5MRdT * fc * mCfU * mUfC * mCfC * mUfG * mAfA * mGfG * mU * fu * mC * fc * mU * fc * mC * TGaNC6T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXXXX
WV-10323	TCCUUCUUAGAGGUUCCUCCTU		PO5MRdT * fc * mCmU * mUmC * mCmC * mUmG * mAmA * mGfG * mU * mU * mC * mC * mU * mC * mC * TGaNC6T * mU	XX OXOX OXOX OXO XXXXXXXXXX
WV-10324	TCCUUCUUAGAGGUUCCUCCTU		VPT * fC * SmCfU * SmUfC * SmCfC * SmUfG * SmAfA * SmGfG * SmU * fU * SmC * fC * SmU * fC * SmC * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10325	TCCUUCUUAGAGGUUCCUCCTU		VPT * fC * SmCmU * SmUmC * SmCmC * SmUmG * SmAmA * SmGfG * SmU * SmU * SmC * SmC * SmU * SmC * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10326	TCCUUCUUAGAGGUUCCUCCTU		PO5MRdT * fC * SmCfU * SmUfC * SmCfC * SmUfG * SmAfA * SmGfG * SmU * fU * SmC * fC * SmU * fC * SmC * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10327	TCCUUCUUAGAGGUUCCUCCTU		PO5MRdT * fC * SmCmU * SmUmC * SmCmC * SmUmG * SmAmA * SmGfG * SmU * SmU * SmC * SmC * SmU * SmC * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10432	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		5tzdT * fG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * fG * SmC * fA * SmU * fG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10433	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		5tzdT * fG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * STGaNC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10434	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		5tzdT * fG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * fG * SmC * fA * SmU * fG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-10435	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU		5tzdT * fG * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUmA * SmGmA * SmAfA * SmG * SmC * SmA * SmU * SmG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-11957	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001m5IC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SIA	OS OOOO SSSSR SSSSR OOOS
WV-11958	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		Mod001L001m5IC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmG * SmC * SIA	OS OOOO SSSSR SSSSR SSSS
WV-11959	CTGTAGAAAGGCATGAAGCA		m5IC * STeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SIA	S OOOO SSSSR SSSSR OOOS

10

20

30

40

50

WV-11960	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	m5IC * \$TeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SIA	S OOOO SSSSR SSSSS
WV-11961	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	L001m5IC * \$TeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5Ceo * SIA	OS OOOO SSSSR SSSSR
WV-11962	CTGTAGAAAAGGCATGAAGCA	L001m5IC * \$TeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SIA	OS OOOO SSSSR SSSSS
WV-12070	TGCCACUGUAGAAAAGGCAUGATU	5tpzdT * \$fG * \$mCfC * \$mAfC * \$mUfG * \$mUfA * \$mGfA * \$mAfA * \$mG * \$fG * \$mC * \$fA * \$mU * \$fG * \$mA * \$TGaNC6T * \$mU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12071	TGCCACUGUAGAAAAGGCAUGATU	5tpzdT * \$fG * \$mCfC * \$mAfC * \$mUfG * \$mUfA * \$mGfA * \$mAfA * \$mG * \$fG * \$mC * \$fA * \$mU * \$fG * \$mA * \$TGaNC6T * \$mU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12072	TGCCACUGUAGAAAAGGCAUGATU	5mvpdT * \$fG * \$mCfC * \$mAfC * \$mUfG * \$mUfA * \$mGfA * \$mAfA * \$mG * \$fG * \$mC * \$fA * \$mU * \$fG * \$mA * \$TGaNC6T * \$mU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12073	TGCCACUGUAGAAAAGGCAUGATU	5pacetdT * \$fG * \$mCfC * \$mAfC * \$mUfG * \$mUfA * \$mGfA * \$mAfA * \$mG * \$fG * \$mC * \$fA * \$mU * \$fG * \$mA * \$TGaNC6T * \$mU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12098	CACTGTAGAAAAGGCATGAAGCAGG	Mod001L001m5Ceo * \$Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5CeoAeoGeo * SGeo	OS OOOOO R SSSSR SSSSR OOOOO S
WV-12099	CACTGTAGAAAAGGCATGAAGCAGG	Mod001L001mC * \$Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OS OOOOO R SSSSR SSSS SSSSS S
WV-12100	CACTGTAGAAAAGGCATGAAGCAGG	m5Ceo * \$Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5CeoAeoGeo * SGeo	S OOOOO R SSSSR SSSSR OOOOO S
WV-12101	CACTGTAGAAAAGGCATGAAGCAGG	mC * \$Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	S OOOOO R SSSSR SSSS SSSSS S
WV-12102	CACTGTAGAAAAGGCATGAAGCAGG	L001m5Ceo * \$Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeoAeoGeom5CeoAeoGeo * SGeo	OS OOOOO R SSSSR SSSSR OOOOO S
WV-12103	CACTGTAGAAAAGGCATGAAGCAGG	L001mC * \$Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SmA * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OS OOOOO R SSSSR SSSS SSSSS S
WV-12104	CACTGTAGAAAAGGCATGAAGCAGG	Mod001L001m5Ceo * \$Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * C * A * T * G * AeoAeoGeom5CeoAeoGeo * Geo	OX OOOOO XXXX XXXXX OOOOO X
WV-12105	CACTGTAGAAAAGGCATGAAGCAGG	Mod001L001mC * \$Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA * mG	OX OOOOO XXXX XXXX XXXXXX
WV-	CACTGTAGAAAAGGCATGAAGCAGG	m5Ceo * \$Aeom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * G * C * A *	X OOOOO XXXXX

10

20

30

40

50

12106		T * G * AeAoGeoGm5CeoAeoGeo * Geo	XXXXX OOOO X
WV- 12107	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	mC * Aom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * C * A * T G * mA * mG * mC * mA * mG * mG	X OOOO XXXX XXXX XXXXXX
WV- 12108	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	L001m5Ceo * Aom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * G * C * A * T * G * AeAoGeoGm5CeoAeoGeo * Geo	OX OOOO XXXX XXXXX OOOO X
WV- 12109	CACTGTAGAAAGGCATGAAGCAGG	L001mC * Aom5CeoTeoGeoTeoAeo * G * A * A * A * G * C * A * T * G * mA * mA * mG * mC * mA * mG * mG	OX OOOO XXXX XXXX XXXXXX
WV- 12115	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGAUU	T * SfG * SmCFc * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGFa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV- 12116	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGAUU	T * SfG * SmCn001fC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGFa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SMAx OSOS OSOSO SSSSS SSSS
WV- 12117	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGAUU	T * SfG * SmCFc * SmAn001fC * SmUfG * SmUfA * SmGFa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SSOSnAx OSOSOSO SSSSS SSSS
WV- 12118	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGAUU	T * SfG * SmCFc * SmAfC * SmUn001fG * SmUfA * SmGFa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SS OSOSnAx OSOSO SSSSS SSSS
WV- 12119	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGAUU	T * SfG * SmCFc * SmAfC * SmUfG * SmUn001fA * SmGFa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SS OSOSnAxXSOSO SSSSS SSSS
WV- 12120	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGAUU	T * SfG * SmCFc * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGFa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SS OSOS OSOSnXSO SSSSS SSSS
WV- 12121	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGAUU	T * SfG * SmCFc * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGFa * SmAn001fA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SS OSOS OSOSOSnX SSSSS SSSS
WV- 12122	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGAUU	T * SfG * SmCn001fC * SmAn001fC * SmUn001fG * SmUn001fA * SmGn001fA * SmAn001fA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SmU * SmU	SMAxSMAxSMAxSMAxSMAx SSSSS SSSS
WV- 12254	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGATU	SpztdT * SfG * SmCFc * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGFa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV- 12255	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGATU	StzpodT * SfG * SmCFc * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGFa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV- 12256	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGATU	SmvpdT * SfG * SmCFc * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGFa * SmAfa * Smvpd * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV- 12257	TGCCACUGUAGAAAGCGAUGATU	SpaceIdT * SfG * SmCFc * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGFa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SfG * SmA * SAMC6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-	CCUIGCUICAUGCCUUUCUACAGUG	rC rC rU rG rC rU rC rA rU rG rC rU rU rU rC rU rA rA rG rU	OOOOO OOOOO

12420	CCUGCUUCAUCCCCUUCUACAGUG	rG	00000 00000 000
WV-12421		rC rC rU rG rC rU rU rC rA rU rC rC rC rU rU rA rA rG rU rG	00000 00000 00000 00000 000
WV-12573	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfG * SmA * Sbbclc6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12574	TGCCACUGUAGAAAGGCAUGATU	VPT * SfG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfG * SmA * Sbbclc6T * SmU	SS OSOS OSOSOSO SSSSS SSSS
WV-12874	CUUCAUGCCCUUCUACAGUGGCCU	rC rU rU rC rA rU rG rC rC rU rU rC rA rG rU rC rA rG rG rC rC	00000 00000 00000 00000 000
WV-12875	CUUCAUCCCCUUCUACAGUGGCCU	rC rU rU rC rA rU rC rC rC rU rU rC rU rA rC rA rG rU rG rC rC rU	00000 00000 00000 00000 000

WV-9261	GCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	L009 * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T *	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-9262	TCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	T * L009 * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-9263	TGCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * L009fc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-9264	TGCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCL009 * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-9265	TGCCCUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * L009fc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-9266	TGCCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAL009 * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-9267	TGCCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * L009fg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-9268	TGCCACUUAAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUL009 * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-9269	TGCCACUGAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * L009fa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-9270	TGCCACUGUGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUL009 * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX OX0000000XX
WV-	TGCCACUGUAAAA	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * L009fa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOXOX

10

20

30

40

50

9271	GGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAL009 * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	OXO00000XX
WV- 9272	TGCCACUGUAGAA GGCAUGATU	L010 * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9273	GCCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * L010 * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9274	TCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	T * fg * L010fc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9275	TGCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9276	TGCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9277	TGCCCUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9278	TGCCAUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9279	TGCCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9280	TGCCACUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9281	TGCCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9282	TGCCACUGUAGAA AGGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9283	TGCCACUGUAGAA GGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 9284	TGCCACUGUAGAA GGCAUGATU	T * fg * mCfc * mAfc * mUfg * mUfa * mGfa * mAfa * mGfGmCfAmUfgmA * T * mU	XXOXOXOXOX OXO00000XX
WV- 13443	TGCCACUGUAGAA AGGCAUGATU	VPT * Sfg * SmCmC * SmAmC * SmUmG * SmUma * SmGma * SmAfa * SmG * SmG *	SSOSOSOSOS SOSSSSSSSS
WV- 13555	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod001L001mC * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA *	OSOOOORSSS SRSSSRSSSSSS
WV- 13556	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod001L001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC *	OSOOOORSSS SRSSSRSSSSSS

10

20

30

40

50

WV-13557	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod0011001m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * RAeo * SmG * SmA * SmG * SmA * SmG	OROOOORSSS SRSSSRSSSSSS
WV-13558	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod0011001m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * Saeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OROOOORSSS SRSSSRSSSSSS
WV-13559	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	Mod0011001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * Saeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOORSSS SRSSSRSSSSSS
WV-13560	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001mC * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOORSSS RSSSSRSSSSSS
WV-13561	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOORSSS SRSSSRSSSSSS
WV-13562	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OROOOORSSSR SSSSSRSSSSSS
WV-13563	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * Saeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OROOOORSSS RSSSSSSSSSS
WV-13564	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	L001m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * Saeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	OSOOOORSSS SRSSSRSSSSSS
WV-13565	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	mC * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	SOOOOORSSS RSSSSSRSSSSSS
WV-13566	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	SOOOOORSSS RSSSSSRSSSSSS
WV-13567	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	ROOOOORSSSR SSSSSRSSSSSS
WV-13568	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	m5Ceo * RAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * Saeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	ROOOOORSSS SRSSSSSSSSSS
WV-13569	CACTGTAGAAAGG CATGAAGCAGG	m5Ceo * SAeom5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * Saeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG * SmG	SOOOOORSSSR SSSSSSSSSSSS
WV-13588	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mpdT * SFG * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * Sfg * SmC * Sfa * SmU * Sfg * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOS SOSSSSSSSSSS
WV-13589	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mpdT * Sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * Sfg * SmC * Sfa * SmU * Sfg * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOS SOSSSSSSSSSS
WV-13590	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mpdT * Sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * Sfg * SmC * Sfa * SmU * Sfg * SmA * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOS SOSSSSSSSSSS
WV-13591	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mpdT * Sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * Sfg * SmC * Sfa * SmU * Sfg * SmA * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOS SOSSSSSSSSSS

10

20

30

40

50

WV-13592	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mrpdt * sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * sfg * SmC * SFA * SmU * sfg * SmA * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOS OSOSSSSSSSS SSOSOSOSOSQ SOSSSSSSSSS
WV-13593	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU	5mrpdt * sfg * SmCfc * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * sfg * SmC * SFA * SmU * sfg * SmA * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOS OSOSSSSSSSS SSOSOSOSOSQ SOSSSSSSSSS
WV-13668	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001mA * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13669	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13670	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OROOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13671	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OROOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13672	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	Mod001L001Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13673	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	L001mA * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13674	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	L001Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13675	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	L001Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OROOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13676	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	L001Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OROOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13677	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	L001Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	OSOOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13678	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	mA * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	SOOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13679	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	SOOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13680	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	ROOOORSSSS RSSSSRRSSSS
WV-13681	ACTGTAGAAAAGG CATGAAGCAG	Aeo * Rm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	ROOOORSSSS RSSSSRRSSSS

10

20

30

40

50

WV-13682	ACTGTAGAAAGG CATGAAGCAG		* SmG * SmC * SmA * SmG Aeo * Sm5CeoTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * SAeo * SmA * SmG * SmC * SmA * SmG	S0000RSSSS RSSSSSSSSSS
WV-13800	CTGTAGAAAAGG ATGAAGCA		Mod001L00Im5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	0R000RSSSR SSSSRSSSS
WV-13801	CTGTAGAAAAGG ATGAAGCA		L00Im5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	0R000RSSSS RSSSSRSSSS
WV-13802	CTGTAGAAAAGG ATGAAGCA		m5Ceo * RTeoGeoTeoAeo * RG * SA * SA * SA * SG * RG * SC * SA * ST * SG * RAeo * SmA * SmG * SmC * SmA	R000RSSSS RSSSSRSSSS
WV-14090	GCUUCAUGCCUU UCUACAGUGGCCU		rGrCrUrUrCrArUrGrCrCrUrUrCrC rUrArCrArGrUrGrGrCrU	00000 00000 00000 00000 0000
WV-14091	GCUUCAUCCCUUCU ACAGUGGCCU		rGrCrUrUrCrArUrCrCrCrUrUrCrC rUrArCrArGrUrGrGrCrCrU	00000 00000 00000 00000 0000
WV-14102	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU		VPT * SFG * SmCfC * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * Sfg * SmC * Sfa * SmU * Sfg * SmA * Saame6T * SmU	SS0S0S0S0S0 S0SSSSSSSSS
WV-14103	TGCCACUGUAGAAA GGCAUGATU		VPT * SFG * SmCfC * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * Sfg * SmC * Sfa * SmU * Sfg * SmA * Spac6dT * SmU	SS0S0S0S0S0 S0SSSSSSSSS
WV-14336	TGCCACUGUAGAAA GGCAUTU		VPT * SFG * SmCfC * SmAfc * SmUfg * SmUfa * SmGfa * SmAfa * SmG * Sfg * SmC * Sfa * SmU * STGaN6T * SmU	SS0S0S0S0S0 S0SSSSSSSS
WV-14337	TGCCACUGUAGAAA GGCAUTU		5mrpdT * Sfg * SmCfC * SmAfc * SmUfg * SmUfa	SS0S0S0S0S0 S0SSSSSSSS

10

20

30

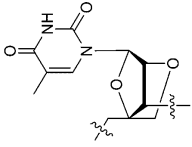
40

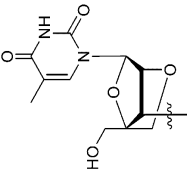
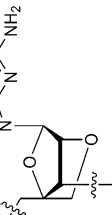
50

			* SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmU	
WV-14338	TGCCACUGUAGAAA GGCAUTU		5mispdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * STGaNC6T * SmU	SSOSOSOSOS0 SOSSSSSSS
WV-14339	TGCCACUGUAGAAA GGCAUTU		VPT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOS0 SOSSSSSSS
WV-14340	TGCCACUGUAGAAA GGCAUTU		5mispdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOS0 SOSSSSSSS
WV-14341	TGCCACUGUAGAAA GGCAUTU		5mispdT * SfG * SmCfC * SmAfC * SmUfG * SmUfA * SmGfA * SmAfA * SmG * SfG * SmC * SfA * SmU * SAMC6T * SmU	SSOSOSOSOS0 SOSSSSSSS

本開示は、一部の配列が、その長さにより、複数の行に分割されることを注記する。しかしながら、これらの配列は、表 1 A 中のすべてのオリゴヌクレオチドと同様に、一本鎖である（別途記載しない限り）。

表中に列記される部分及び修飾（またはこれらの部分もしくは修飾を含む構築物オリゴヌクレオチド）に使用される化合物：

IT	 5' 末端基の間及び／またはヌクレオチド間結合の場合（たとえば、WV-3819） ; 5' 末端で

	 ある場合及び5'末端基がない場合（たとえば、WV-3818） ；3'末端である場合（たとえば、WV-7821）。
IG	 5'末端基の間及びまたはヌクレオチド間結合の場合（たとえば、WV-6689） ；5'

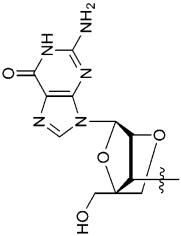
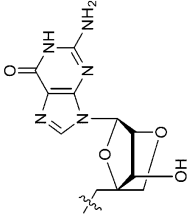
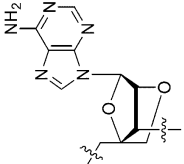
10

20

30

40

50

	末端である場合及び5'末端基がない場合（たとえば、WV-6711）  ；3'末端である 場合（たとえば、WV-7827）  。
IA	5'末端基の間及びまたはヌクレオチド間結合の場合（たとえば、WV-6692）  ；5'末端

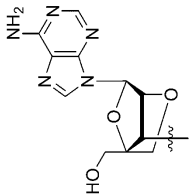
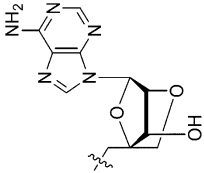
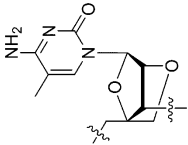
10

20

30

40

50

	である場合及び5'末端基がない場合（たとえば、WV-6710）  ；3'末端である場合（た
1m5C	たとえば、WV-7817）。  5'末端基の間及び／またはヌクレオチド間結合の場合（たとえば、WV-6690）  ；5'末端で

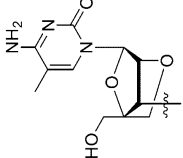
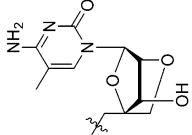
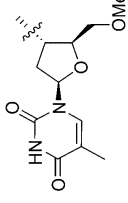
10

20

30

40

50

	 ある場合及び5'末端基がない場合（たとえば、WV-7817）  ば、WV-7818）
MeOT	
Mod001	

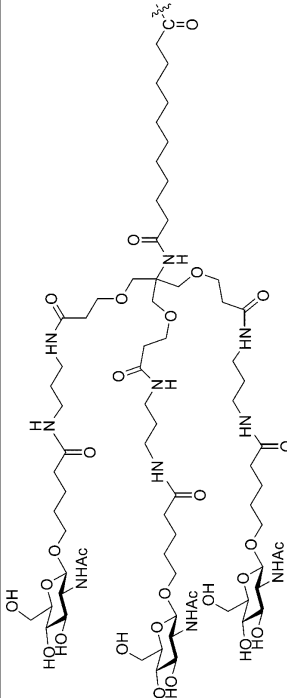
10

20

30

40

50

	
Mod022	C H ₃ C H ₂ C H ₂ - ; 例示するように、リン酸結合（OまたはP O）またはホスホロチオエート結合（ホスホロチオエートがキラル制御されていない場合には* ; またキラル制御され、S p 立体配置を有する場合にはS p、キラル制御され、R p 立体配置を有する場合にはR pと示され得る）のいずれかを介してオリゴヌクレオチド鎖の5' 末端に繋がれている。
PH	
Mod023	 例示するように、リン酸結合（OまたはP O）またはホスホロチオエート結合（ホスホロチオエートがキラル制御されていない場合には* ; またキラル制御され、S p 立体配置を有する場合にはS p、キラル制御され、R p 立体配置を有する場合にはR pと示され得る）のいずれかを介してオリゴヌクレオチド鎖の5' 末端に繋がれている。

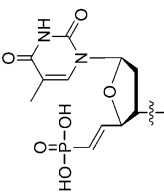
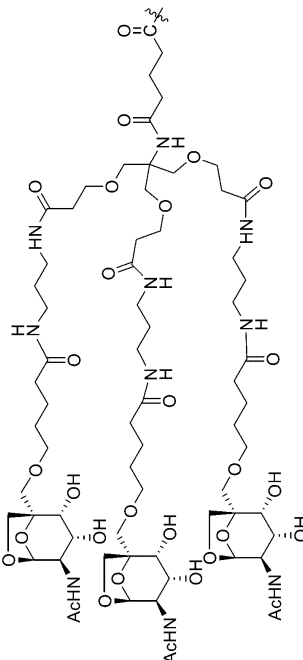
10

20

30

40

50

VPT	
Mod034	

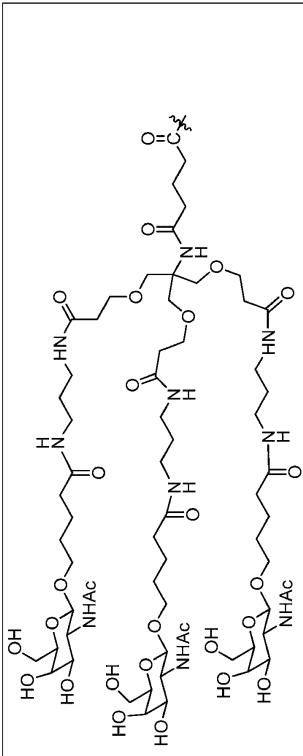
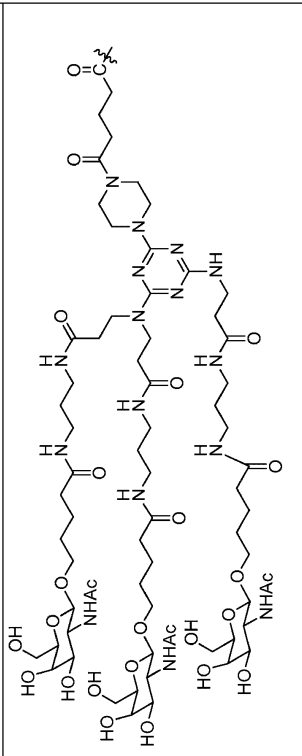
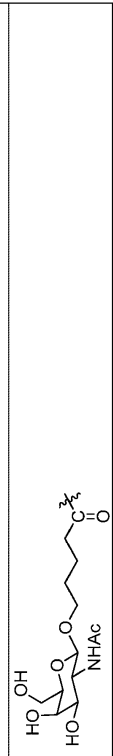
10

20

30

40

50

Mod035	
Mod036	
Mod038	
Mod039	

10

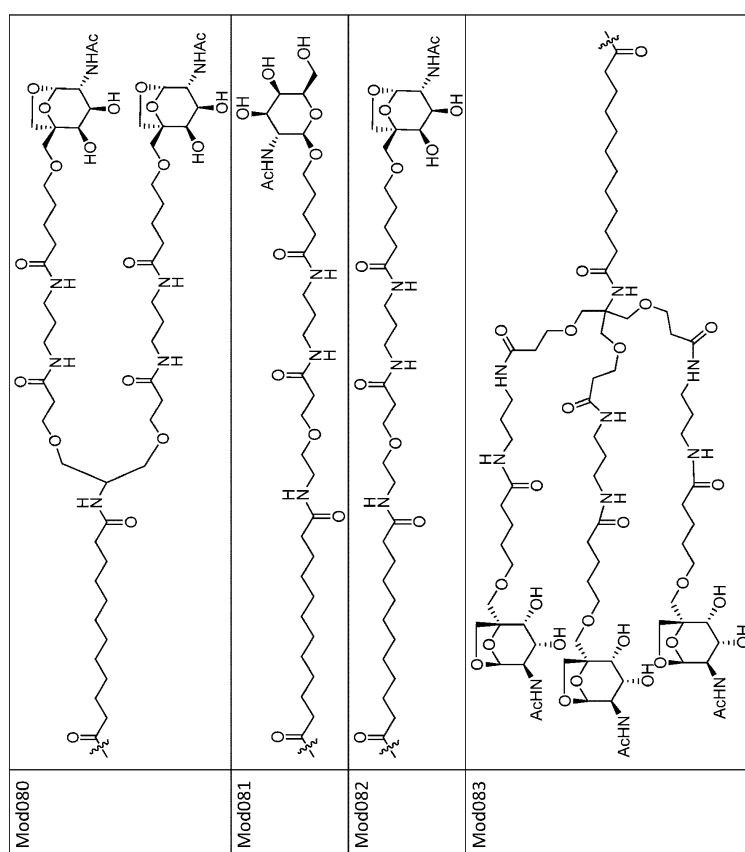
20

30

40

50

Mod040	
Mod041	
Mod079	



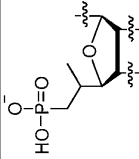
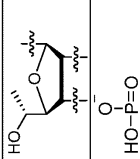
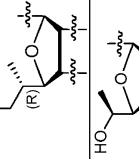
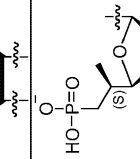
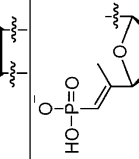
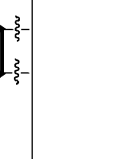
10

20

30

40

50

5mp	
5MR	
5mrp	
5MS	
5msp	
5mvp	

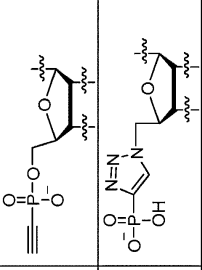
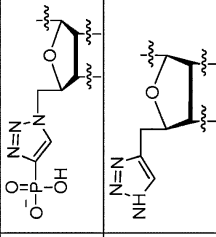
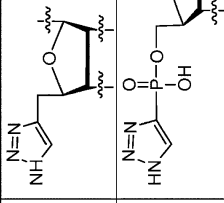
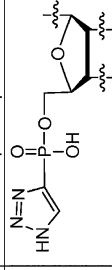
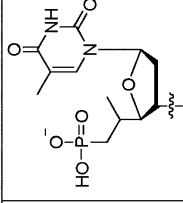
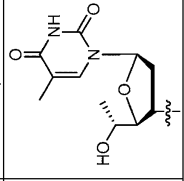
10

20

30

40

50

5pacet	
5ptz	
5tz	
5tzpo	
5mpdT	
5MRdT	

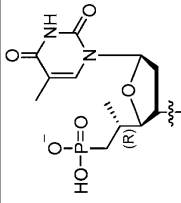
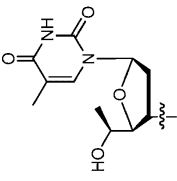
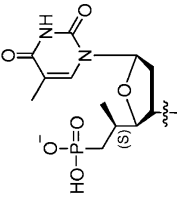
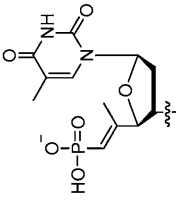
10

20

30

40

50

			
5mrpdT	5MSdT	5mspdT	5mvpdT

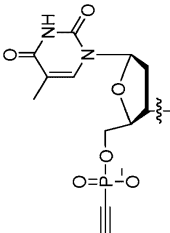
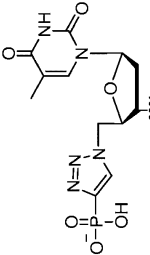
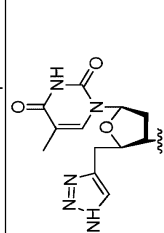
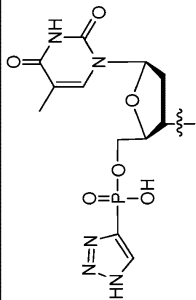
10

20

30

40

50

5'acetdT	
5'ptzdT	
5'tzdT	
5'tzpodT	

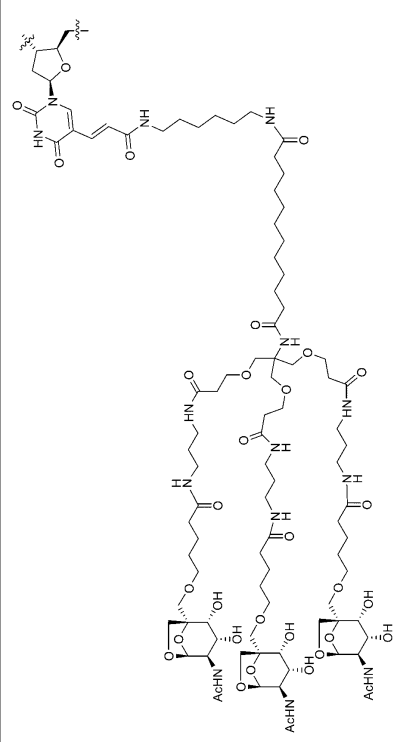
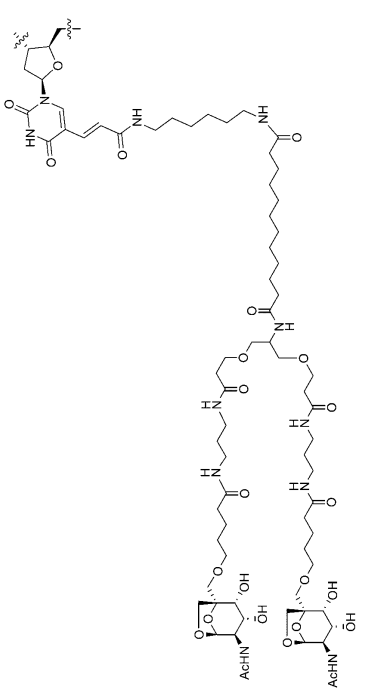
10

20

30

40

50

tbc1c6T	
bbc1c6T	
L009	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ —。L009がModを伴わずにオリゴヌクレオチドの5'末端に存在する場合、L009の—

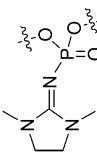
10

20

30

40

50

	端は、－OHに繋がれ、他端は、示される結合を介して（たとえば、WV－9 2 6 1では、立体不規則的ホスホロチオエート結合（「*」）を介して）オリゴヌクレオチド鎖の5'炭素に繋がれている。
	一部の実施形態では、リンカー、たとえば、L 0 0 9、L 0 1 0などは、糖を置き換えることができ、ヌクレオチド間結合にいずれかの末端で結合している。たとえば、 WV－9 2 6 6は、... *mAL 0 0 9 *mU f G *...を含み、これは、5'から3'へ、ホスホロチオエート（*）、2'－OMe（m）が塩基（A）に結合した糖、ホスホジエステル結合（示さず）、L 0 0 9リンカー（L 0 0 9）、ホスホロチオエート（*）、2'－OMeがUの塩基に結合した糖（mU）、ホスホジエステル結合（示さず）、2'－F（f）が塩基（G）に結合した糖及びホスホロチオエートを表す。 WV－9 2 6 7は、... *mA f C *L 0 0 9 f G *...を含み、これは、5'から3'へ、ホスホロチオエート（*）、2'－OMe（m）が塩基（A）に結合した糖、ホスホジエステル結合（示さず）、2'－F（f）が塩基（C）に結合した糖、ホスホロチオエート、L 0 0 9リンカー（L 0 0 9）、ホスホジエステル結合（示さず）、2'－F（f）が塩基（G）に結合した糖、及びホスホロチオエートを表す。
L010	 。L 0 1 0は、DNAにおいて典型的であるのと同じように繋がれている（1つ目の糖の5'炭素は、ヌクレオチド間結合を介して2つ目の糖の3'炭素に繋がれ、1つ目の糖の3'炭素は、ヌクレオチド間結合を介して3つ目の糖の5'炭素に繋がれている）。L 0 1 0がModを伴わずにオリゴヌクレオチドの5'末端に存在する場合、L 0 1 0の5'炭素は、－OHに繋がれ、3'炭素は、示される結合を介して（たとえば、WV－9 2 5 0では、立体不規則的ホスホロチオエート結合（「*」）を介して）オリゴヌクレオチド鎖の5'炭素に繋がれている。
一部の実施形態では、L 0 1 0は、糖を置き換えることができ、L 0 1 0は、ヌクレオチド間結合にいずれかの末端で結合している。	
n001, nX	

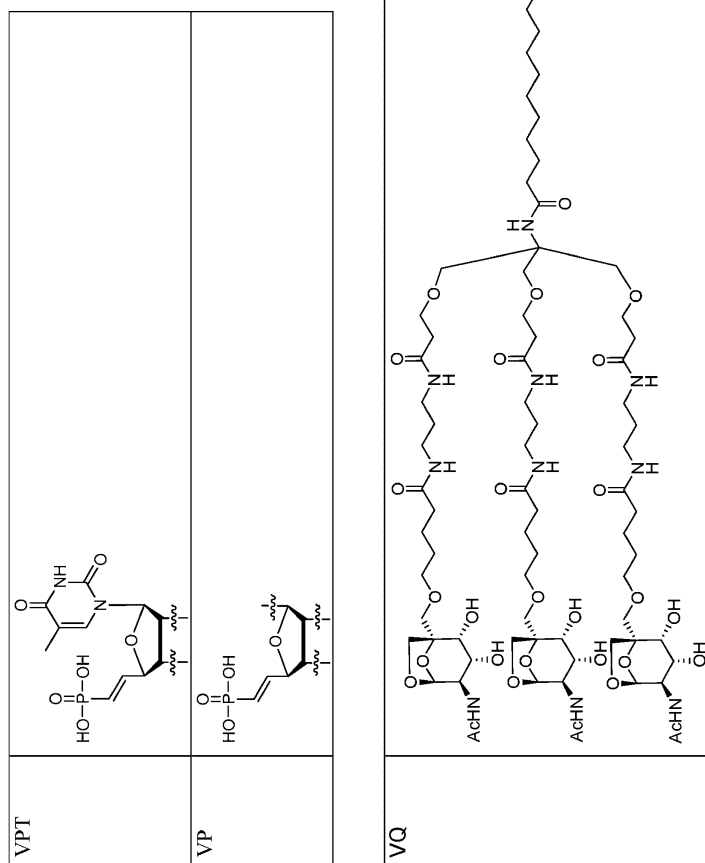
10

20

30

40

50



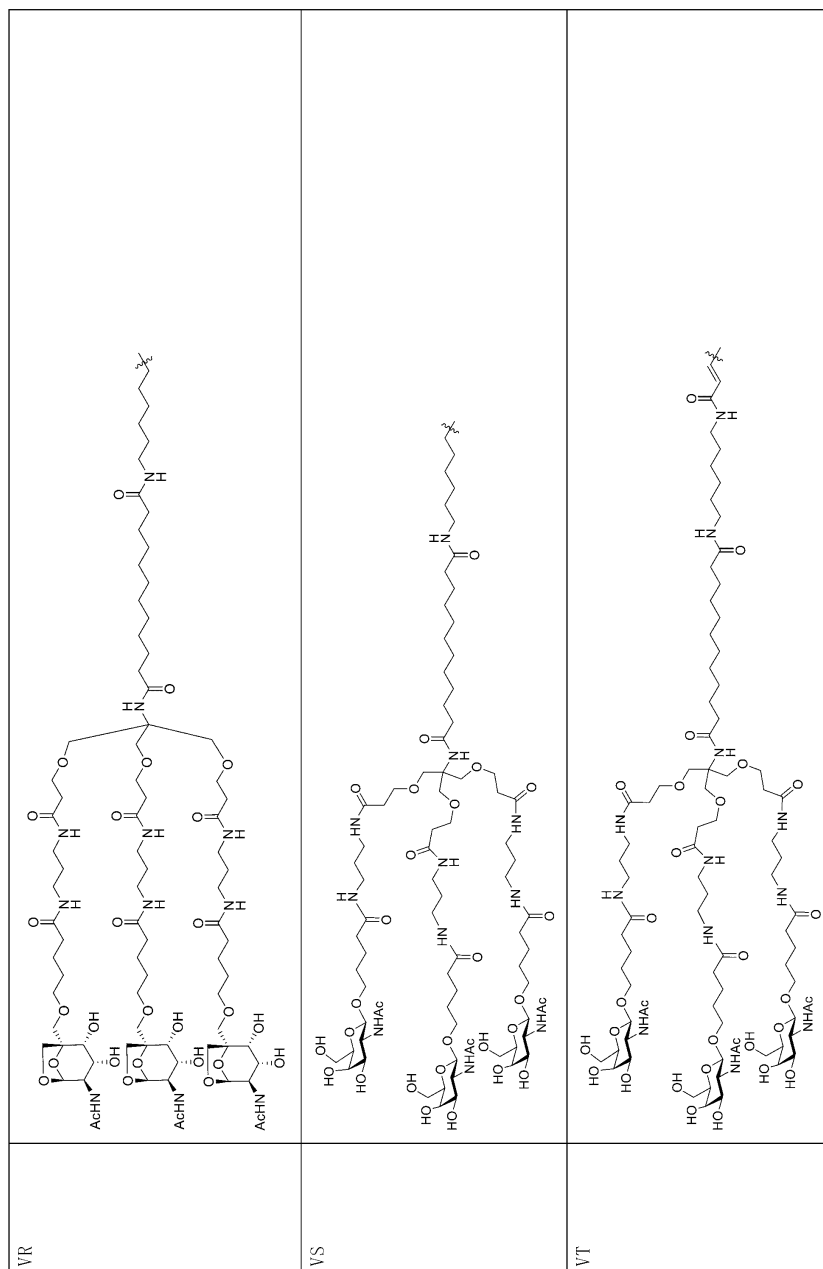
10

20

30

40

50



10

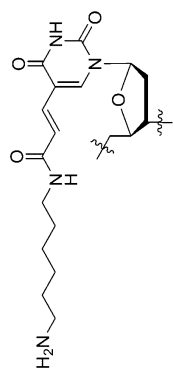
20

30

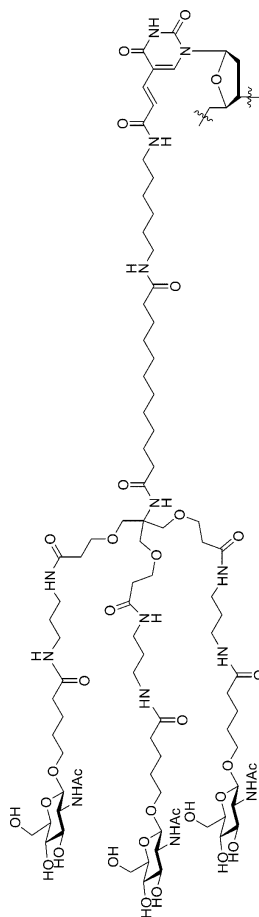
40

50

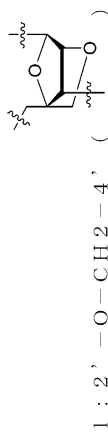
追加の略語：



AMC 6 T:
e o : 2' - MOE
F, f : 2' - F



GaNC6T:



10

20

30

40

50

XXXXXXXX); WV-2426では、-NH-を介してどのModにも繋がれていないが、-Hに繋がれ、リン酸結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に繋がれている(OXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX); WV-8070では、L003は、



アミノ基を介してMod001に繋がれ(アミド基を形成)、リン酸結合を介してオリゴヌクレオチド鎖の3'末端に繋がれている(…XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX(…XXXXX))。

m: 2'-OMe

m5: 5位のCにメチルがあるもの(核酸塩基は5-メチルシトシン)

m5Ceo: 5-メチル2'-メトキシエチルC

OMe: 2'-OMe

O、PO: ホスホジエステル(リン酸); 末端基(典型的に「PO」; たとえば、WV-4260: POT*fC*…)または結合、たとえば、リンカーとオリゴヌクレオチド鎖との間の結合、ヌクレオチド間結合などであり得る。

*、PS: ホスホロチオエート; 末端基(典型的に「PS」; たとえば、WV-2653: PST*fA*…)または結合、たとえば、リンカーとオリゴヌクレオチド鎖との間の結合、ヌクレオチド間結合などであり得る。

R、Rp: Rp立体配置におけるホスホロチオエート

S、Sp: Sp立体配置におけるホスホロチオエート

X: 立体的に不規則的ホスホロチオエート

【0354】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、表1Aに列記されるまたは本明細書に別途記載される一本鎖RNAi剤である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの例示的な特性が実証された。

【0355】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、図1に例示される形式のいずれかの構造を有する。

【0356】

本開示は、一本鎖RNA干渉を介在する能力を有するオリゴヌクレオチドの多くの非限

10

20

30

40

50

定的な例（たとえば、一本鎖RNA i 剤）を提示する。実際、実験データ（図示せず）は、想定される様々な一本鎖RNA i 剤がRNA干渉を介在する能力を有することを示した。いくつかの実験では、RNA被験基質WV-2372（異なる遺伝子APOC3を標的とする）の使用を含む、*in vitro* Ago-2アッセイを使用した。RNA被験基質を表すバンドは、オリゴヌクレオチドWV-1308及びWV-2420の存在下では存在せず、これは、これらのオリゴヌクレオチドが、RNA干渉を介在する能力を有する一本鎖RNA i 剤であることを示す。残りのレーン是对照である：陰性対照ASO WV-2134の非存在下における基質、陰性対照ASO WV-2134の存在下における基質（RNA干渉を介在せず）、被験オリゴヌクレオチドWV-1308の非存在下における基質、被験オリゴヌクレオチドWV-2420の非存在下における基質、基質単独、基質なしでWV-2134追加、及び基質なしでWV-1308追加。また、Hep3B細胞における3' RACEアッセイで、APOC3 mRNAを被験基質として使用して、*in vitro* Ago-2アッセイを実施した（データ図示せず）。被験オリゴヌクレオチドWV-3021の存在下でAPOC3 mRNAの切断産物が検出され、当該産物は、WV-3021の位置10と位置11の間での切断に対応する部位でのmRNAの切断に対応した。人工的な切断産物も検出された。実験データ（図示せず）は、二重機序のオリゴヌクレオチドWV-2111がRNase HとRNA干渉の両方によるノックダウンを介在する能力を有することを示した。実験では、いくつかのオリゴヌクレオチドがRNA干渉を介在する能力を有した。RNA被験基質は、WV-2372であった。実験は、被験オリゴヌクレオチドWV-1308、WV-2114、WV-2386、及びWV-2387の存在下でRNA被験基質が消失することを示した。これは、これら全てのオリゴヌクレオチドが、RNA干渉を介在する一本鎖RNA i 剤として機能する能力を有することを示している。残りのレーン是对照である。したがって、実験は、オリゴヌクレオチドWV-1308、WV-2114、WV-2386、及びWV-2387が全てRNA干渉を介在できることを示した。したがって、実験は、いくつかの一本鎖RNA i 剤（たとえば、WV-1308、WV-2420、WV-3021、WV-2111、WV-2114、WV-2386、及びWV-2387）がRNA干渉を介在できることを示した。本開示は、様々な配列、形式、修飾、5'末端領域、シード領域、ポストシード領域、及び3'末端領域のいずれかを有し、一本鎖RNA干渉を介在する能力を有するオリゴヌクレオチドの多くの非限定的な例（たとえば、一本鎖RNA i 剤）を提示する。

【0357】

オリゴヌクレオチドの形式

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序（限定されないが、遺伝子発現のRNase H介在性ノックダウンまたは立体障害を含む）を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNase H介在性ノックダウンを介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の形式またはその一部またはその構造的要素を有し得る。

【0358】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまた

は当分野に公知の任意の形式またはその構造的要素を有し得る。

【0359】

一部の実施形態では、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の形式またはその構造的要素を有し得る。

【0360】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の形式またはその構造的要素を有し得る。

10

【0361】

様々なssRNAi形式の追加の非限定的な例は、本明細書に記載される様々な一本鎖RNAi剤によって具体化される。

【0362】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAiは、図1に示される任意の一本鎖RNAi形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNAi剤もしくは一本鎖RNAi形式の任意の5'末端によって表される、5'末端を含む。

【0363】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAiは、図1に示される任意の一本鎖RNAi形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNAi剤もしくは一本鎖RNAi形式の任意の5'末端構造または5'末端領域によって表される、5'末端構造または5'末端領域を含む。

20

【0364】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAiは、図1に示される任意の一本鎖RNAi形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNAi剤もしくは一本鎖RNAi形式の任意の5'ヌクレオチドによって表される、5'ヌクレオチドを含む。

【0365】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAiは、図1に示される任意の一本鎖RNAi形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNAi剤もしくは一本鎖RNAi形式の任意の5'ヌクレオシドによって表される、5'ヌクレオシドを含む。

30

【0366】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAiは、図1に示される任意の一本鎖RNAi形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNAi剤もしくは一本鎖RNAi形式の任意のシード領域によって表される、シード領域を含む。

【0367】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAiは、図1に示される任意の一本鎖RNAi形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNAi剤もしくは一本鎖RNAi形式の任意のポストシード領域によって表される、ポストシード領域を含む。

【0368】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAiは、図1に示される任意の一本鎖RNAi形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNAi剤もしくは一本鎖RNAi形式の任意のポストシード領域またはその構成要素によって表される、ポストシード領域またはその構成要素を含む。

40

【0369】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAiは、図1に示される任意の一本鎖RNAi形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNAi剤もしくは一本鎖RNAi形式の任意の3'末端ジヌクレオチドによって表される、3'末端ジヌクレオチドを含む。

【0370】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAiは、図1に示される任意の一本鎖RNAi

50

A i 形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 剤もしくは一本鎖RNA i 形式の任意のシード領域のヌクレオチド間結合のパターンによって表される、ヌクレオチド間結合のパターンを有するシード領域を含む。

【0371】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 剤もしくは一本鎖RNA i 形式の任意のポストシード領域のヌクレオチド間結合のパターンによって表される、ヌクレオチド間結合のパターンを有するポストシード領域を含む。

【0372】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 剤もしくは一本鎖RNA i 形式の任意のポストシード領域またはその構成要素のヌクレオチド間結合のパターンによって表される、ヌクレオチド間結合のパターンを有するポストシード領域またはその構成要素を含む。

【0373】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 剤もしくは一本鎖RNA i 形式の任意の3'末端ジヌクレオチドのヌクレオチド間結合のパターンによって表される、ヌクレオチド間結合のパターンを有する3'末端ジヌクレオチドを含む。

【0374】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 剤もしくは一本鎖RNA i 形式の任意のシード領域の化学修飾パターンによって表される、化学修飾パターンを有するシード領域を含む。

【0375】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 剤もしくは一本鎖RNA i 形式の任意のポストシード領域の化学修飾パターンによって表される、化学修飾パターンを有するポストシード領域を含む。

【0376】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 剤もしくは一本鎖RNA i 形式の任意のポストシード領域またはその構成要素の化学修飾パターンによって表される、化学修飾パターンを有するポストシード領域またはその構成要素を含む。

【0377】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 剤もしくは一本鎖RNA i 形式の任意の3'末端ジヌクレオチドの化学修飾パターンによって表される、化学修飾パターンを有する3'末端ジヌクレオチドを含む。

【0378】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式または本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 剤もしくは一本鎖RNA i 形式の任意の化学修飾によって表される、化学修飾を含む。

【0379】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示されるまたは本明細書に記載される任意の一本鎖RNA i 形式の任意の化学修飾によって表される化学修飾を含み、ここで、化学修飾は、リン酸、リンカー、または標的化部分を含む部分の複合体化である。

【0380】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、図1に示されるまたは本明細書に

10

20

30

40

50

記載される任意の一本鎖RNA形式の任意の化学修飾によって表される化学修飾を含み、ここで、化学修飾は、リン酸、リンカー、または標的化部分を含む部分の複合体化であり、標的化部分は、GalNAc部分を含む。一部の実施形態では、GalNAcは、保護されたGalNAcまたは脱保護されているGalNAcである。

【0381】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子及び／またはその遺伝子産物の発現、活性及び／またはレベルを減少させる能力を有し、本明細書に記載される任意のオリゴヌクレオチドの形式を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、RNase H介在性機序または翻訳の立体障害に関係する機序を介して、標的遺伝子及び／またはその遺伝子産物の発現、活性及び／またはレベルを減少させる能力を有し、本明細書に記載される任意のオリゴヌクレオチドの形式を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、RNase H介在性機序または翻訳の立体障害に関係する機序を介して、標的遺伝子及び／またはその遺伝子産物の発現、活性及び／またはレベルを減少させる能力を有し、非対称形式を有する。一部の実施形態では、非対称形式を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、第1のウィング、コア及び第2のウィングを含み、コアは、標的mRNAにアニーリングして、RNase Hによって認識される構造を形成する能力を有する5つ以上連続する2'-デオキシヌクレオチドの領域を含み、第1及び第2のウィングの構造は異なる。一部の実施形態では、第1及び第2のウィングは、それらの2'-修飾及び／またはヌクレオチド間結合、もしくはヌクレオチド間結合の立体化学のパターンが異なる。

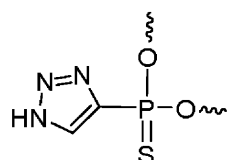
【0382】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子及び／またはその遺伝子産物の発現、活性及び／またはレベルを減少させる能力を有し、中性ヌクレオチド間結合（たとえば、中性骨格）を含む。

【0383】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、中性骨格を含む。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、トリアゾール、中性トリアゾール、またはアルキンであるか、またはこれを含む、ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、核酸（限定されないが、PNPLA3オリゴヌクレオチドを含む）は、トリアゾール、中性トリアゾール、またはアルキンを含むヌクレオチド間結合を含み、ここで、ヌクレオチド間結合は、立体制御されており、R_pまたはS_pの立体配置である。一部の実施形態では、トリアゾールを含むヌクレオチド間結合は、

【化7】



の式を有する。一部の実施形態では、中性トリアゾールを含むヌクレオチド間結合は、

10

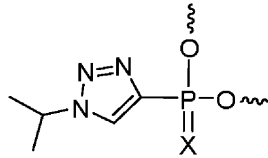
20

30

40

50

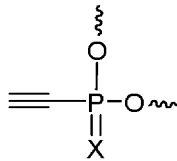
【化 8】



10

の式を有し、式中、Xは、OまたはSである。一部の実施形態では、アルキンを含むヌクレオチド間結合は、

【化 9】

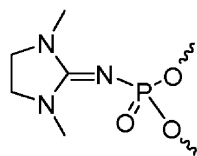


20

の式を有し、式中、Xは、OまたはSである。

一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、環式グアニジンを含む。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、環式グアニジンを含み、

【化 10】



30

40

の構造を有する。一部の実施形態では、中性ヌクレオチド間結合または環式グアニジンを含むヌクレオチド間結合は、立体化学的に制御されている。一部の実施形態では、中性ヌクレオチド間結合は、PNPLA3オリゴヌクレオチドの活性、送達及び／もしくは安定性、及び／またはPNPLA3オリゴヌクレオチドがエンドソーム脱出を実施する能力を改善する。

【0384】

当業者に認識されるように、いくつかの場合、

50

【化 1 1】



10

は、結合位置を示すために使用され得（

【化 1 2】



20

として）、いくつかの場合、

【化 1 3】



30

は、立体不規則的結合を示すために使用され得る。

【 0 3 8 5】

PNPLA3オリゴヌクレオチドの長さ

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序（限定

40

50

されないが、遺伝子発現のRNAase H介在性ノックダウンまたは立体障害を含む）を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNAase H介在性ノックダウンを介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、任意の長さを有し得、ここで、PNPLA3オリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチドが標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有するような長さである。

10

【0386】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドの長さは、オリゴヌクレオチドが標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有するような長さである。

【0387】

一部の実施形態では、RNAi剤の長さは、RNAi剤が配列特異的な様式で特定の標的転写産物のRNA干渉を誘導する能力を有するような長さである。一部の実施形態では、RNAi剤は、標的転写産物を認識するのに十分な同一性の十分な数の核酸塩基を含む。一部の実施形態では、RNAi剤はまた、RNAi干渉を介在するのに適した長さである。

20

【0388】

配列の標的部分は、少なくとも、その位置で、またはその位置近傍で、iRNA誘導切断の基質として機能するのに十分な長さである。たとえば、標的配列は、一般に、約9～36ヌクレオチド（「nt」）の長さ、たとえば、約15～30ヌクレオチドの長さであり、その間の全ての部分範囲を含む。様々な長さの一本鎖RNAi剤の例が、表1Aに示される。

【0389】

図1は、19～25の長さを有する一本鎖RNAi剤の非限定的な例を例示する。これらの長さの各々のいずれかを有する一本鎖RNAi剤を構築し、これらが標的遺伝子をノックダウンする能力があることがわかった。したがって、提供される一本鎖RNAi剤は、様々な異なる長さのいずれかであり得る。

30

【0390】

19塩基長であるssRNAi剤の形式の非限定的な例としては、図1の形式20～21が挙げられる。

【0391】

20塩基長であるssRNAi剤の形式の非限定的な例としては、図1の形式19が挙げられる。

【0392】

40

一本鎖RNAi剤を含むPNPLA3オリゴヌクレオチドの5'末端

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドの5'末端の構造は、オリゴヌクレオチドが標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの減少を誘導する能力を有するような構造である。

【0393】

一部の実施形態では、RNAi剤の5'末端の構造は、RNAi剤が配列特異的な様式で特定の標的転写産物のRNA干渉を誘導する能力を有するような構造である。

【0394】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の5'末端領域、5'末端構造、5'末端基、5'末端ヌクレオシド、また

50

は5'末端ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、RNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の5'末端領域、5'末端構造、5'末端基、5'末端ヌクレオシド、または5'末端ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、RNA干渉を誘導する能力を有する、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の5'末端領域、5'末端構造、5'末端基、5'末端ヌクレオシド、または5'末端ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の5'末端領域、5'末端構造、5'末端基、5'末端ヌクレオシド、または5'末端ヌクレオチドを含み得る。

10

【0395】

とりわけ、本開示は、任意で追加の特徴と組み合わせた、本開示によるオリゴヌクレオチドの5'末端構造が、予想外の利点を提供することができることを認めるものである。一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチドの1つ以上の特性及び／または活性（たとえば、安定性、活性、製造コストなど）を驚くほど改善することができる5'末端基（天然RNAに見出されるリボース（または天然DNAに見出されるデオキシリボース）の5'-HO-CH₂-に対応する）を提供する。

【0396】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの5'-OH基は、修飾されておらず、すなわち、遊離-OHとして存在する。一部の実施形態では、5'末端基は、5'-HO-CH₂-である。とりわけ、本開示は、ある特定の活性、たとえば、RNAi活性には、5'リン酸基の存在が必要であるという文献の報告にもかかわらず、遊離5'-OH基を有する提供されるオリゴヌクレオチドが、5'リン酸（またはその誘導体）基を含むこと以外の点では同一のオリゴヌクレオチドに匹敵する特性及び／または活性（たとえば、ss-RNAi剤として使用した場合の安定性、RNAi活性など）を達成する能力を有することを示す。

20

【0397】

一部の実施形態では、5'末端基は、リン原子を含まない。一部の実施形態では、5'末端基は、リン酸基、またはその誘導体もしくは生物学的等価体を含まない。一部の実施形態では、5'末端基は、酸性基を含まない。一部の実施形態では、5'末端基は、カルボキシル基を含まない。一部の実施形態では、5'末端は、リン原子もカルボキシル基も含まない。一部の実施形態では、5'末端基は、5'-HO-C₂H₄-である。とりわけ、本開示は、5'リン酸またはその誘導体もしくは生物学的等価体を有さない提供されるオリゴヌクレオチドが、驚くべきことに、5'リン酸を有すること以外では同一であるオリゴヌクレオチドに匹敵する活性、たとえば、RNAi経路を介した標的遺伝子のmRNAレベルのノックダウンを達成する能力を有することを示す。

30

【0398】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの5'ヌクレオシド単位（糖部分及び核酸塩基部分を含むが、5'ヌクレオシド単位と5'末端から2番目のヌクレオシド単位との間のヌクレオチド間結合は含まない）は、リン酸基、またはその誘導体もしくは生物学的等価体を含まない。一部の実施形態では、5'ヌクレオシド単位は、リン原子を含まない。一部の実施形態では、5'ヌクレオシドは、酸性基を含まない。一部の実施形態では、5'ヌクレオシド単位は、-COOH基またはその塩形態を含まない。

40

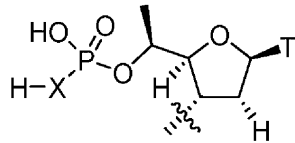
【0399】

一部の実施形態では、5'末端基は、リン酸基、またはその誘導体もしくは生物学的等価体であるか、またはこれを含む。一部の実施形態では、5'ヌクレオシド単位は、リン酸基、またはその誘導体もしくは生物学的等価体である5'基を含む。当業者により認識されるように、そのような基は多くが当分野で公知であり、本開示に従って利用することができる。

【0400】

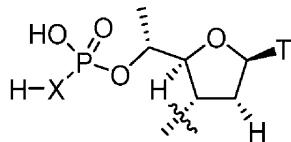
50

一部の実施形態では、5'末端基は、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-(\text{OH})$ またはその塩形態である。一部の実施形態では、提供される5'ヌクレオシド単位は、
【化14】



10

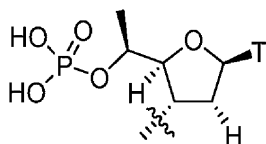
の構造またはその塩形態を有する。一部の実施形態では、提供される5'ヌクレオシド単位は、
【化15】



20

の構造またはその塩形態を有する。一部の実施形態では、Xは、Oである。一部の実施形態では、Xは、Sである。一部の実施形態では、 R^E は、 $-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{S}-\text{H}$ またはその塩形態である。一部の実施形態では、 R^E は、 $-(\text{R})-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{H}$ またはその塩形態である。一部の実施形態では、 R^E は、 $-(\text{S})-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{S}-\text{H}$ またはその塩形態である。一部の実施形態では、 R^E は、 $-(\text{S})-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{H}$ またはその塩形態である。一部の実施形態では、提供される5'ヌクレオシド単位は、
【化16】

30

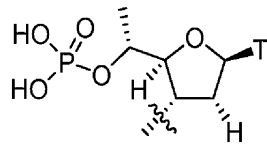


40

の構造またはその塩形態を有する。一部の実施形態では、提供される5'ヌクレオシド単位は、

50

【化 17】



10

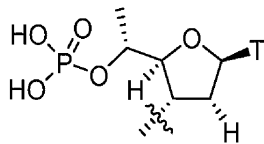
の構造またはその塩形態を有する。

【0401】

当業者により容易に認識されるように、提供される化合物、たとえば、オリゴヌクレオチド、またはその部分構造、たとえば、オリゴヌクレオチドの5'末端構造、ヌクレオチド間結合などは、部分的に、場合によっては主に、たとえば、その中の1つ以上の酸性部分及び／または塩基性部分に起因して、ある特定のpH、たとえば、生理的なpHで、1つ以上のその塩形態として存在し得る。一部の実施形態では、提供される5'ヌクレオシド単位は、部分的に、場合によっては主に、1つ以上のその塩形態として存在し得る。たとえば、pHに応じて、

20

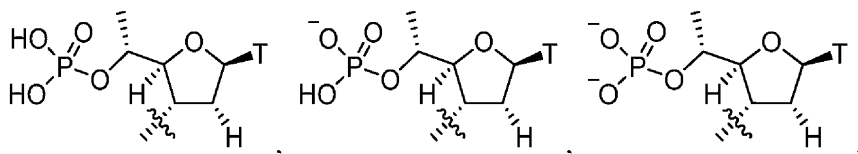
【化 18】



30

は、

【化 19】



40

またはこれらの組み合わせとして存在し得る。特に明記しない限り、提供される化合物または構造が列挙される場合、全ての塩形態が含まれる。

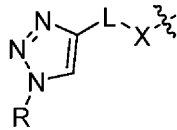
【0402】

一部の実施形態では、 R^E は、 $-L-P(O)(XR)_2$ またはその塩形態である。一部の実施形態では、 R^E は、 $-L-P(O)(XR)_2$ またはその塩形態であり、式中、

50

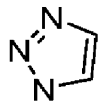
各 X は独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または共有結合である。一部の実施形態では、 R^E は、 $-L-P(O)(OR)_2$ またはその塩形態である。一部の実施形態では、 R^E は、 $-L-P(O)(OR)(SR)$ またはその塩形態である。一部の実施形態では、 R^E は、 $-L-P(O)(OR)(R)$ またはその塩形態である。一部の実施形態では、L は、共有結合であるか、または任意で置換される二価の直線状もしくは分枝状の C_{1-6} 脂肪族であり、式中、1 つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ または $-N(R')$ と置き換えられる。一部の実施形態では、 R^E は、 $-L-R^{5s}$ である。一部の実施形態では、 R^E は、 $-X-L-R$ である。一部の実施形態では、 R^E は、
【化 20】

10



20

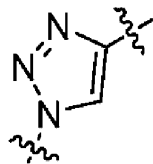
である。一部の実施形態では、 R^E 中の X は、 $-C(R)_2-$ である。一部の実施形態では、X は、 $-O-$ である。一部の実施形態では、X は、 $-S-$ である。一部の実施形態では、X は、 $-N(R)-$ である。一部の実施形態では、L は、任意で置換される、二価または多価の
【化 21】



30

基を含む。一部の実施形態では、L は、任意で置換される
【化 22】

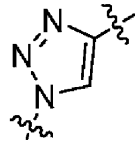
40



基を含む。一部の実施形態では、L は、

50

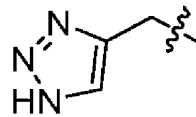
【化 2 3】



10

基を含む。一部の実施形態では、Rは独立して、-H、またはC₁-10アルキル、C₁-10アリル、及びC₆-14アリールから選択される、任意で置換される基である。一部の実施形態では、Rは、-Hである。一部の実施形態では、R^Eは、任意で置換される

【化 2 4】

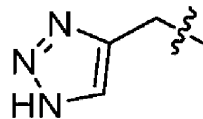


20

である。一部の実施形態では、R^Eは、

【化 2 5】

30



40

である。

【0403】

多くのリン酸誘導体及び／または生物学的等価体、ならびに5'ヌクレオシド単位が文献に記載されており、本開示に従って利用することができ、たとえば、いくつかのそのような構造は、たとえば、US2016-0194349、US2016-0186175、US20130323836などに記載されている。一部の実施形態では、5'末端基R^F、または5'ヌクレオシド単位は、たとえば、Allerson et al. 2005 J. Med. Chem. 48:901-04; Lima et al. 2012 Cell

50

150:883-894; Prakash et al. 2015 Nucl. Acids Res. 43:2993-3011; 及び／または Prakash et al. 2016 Bioorg. Med. Chem. Lett. 26:26:2817-2820 (たとえば、TVP、TPOなど)に記載されている。

【0404】

架橋型のモルホリノ及びシクロヘキセニルのヌクレオチド及びヌクレオシドは、たとえば、米国特許出願公開2016-0186175に記載されており、本開示に従って利用することができる。

【0405】

可変部分の実施形態の例が、本開示に広く記載されている。2つ以上の可変部分を有する構造について、特に明記しない限り、各可変部分は独立して、本明細書に記載される任意の実施形態であり得る。

10

【0406】

一部の実施形態では、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、または当技術分野で既知の任意の5'末端を含有し得る。

【0407】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、または当技術分野で既知の任意の5'末端を含有し得る。

20

【0408】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、または、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、または当技術分野で既知の任意の5'末端を含有し得る。

【0409】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤の5'末端は、リン含有部分(例えば、5'末端は、リンを含む)を含む。5'末端がリン含有部分を含むssRNAi形式の非限定的な例としては、図1の形式1~15、20~21、23~31、80~82、92~95、97~102、及び104~107が挙げられる。

30

【0410】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤の5'末端は、リン含有部分(例えば、5'末端は、リンを含む)を含まない。5'末端がリン含有部分を含まないssRNAi形式の非限定的な例としては、図1の形式16~19、22、32~79、83~91、96、及び103が挙げられる。

【0411】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤の5'末端は、リン酸を含む部分、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、H-ホスホネート、または、リン酸含有ヌクレオチド間結合と同様もしくは同一の他の部分を含む。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤の5'末端は、リン酸を含む部分を含むが、これはホスホジエステルではなく、一部の実施形態におけるかかる部分は、リン酸模倣体、修飾されたリン酸、またはリン酸アナログと呼ばれる。

40

【0412】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤の5'末端は、リン酸を含む部分を含まない。

【0413】

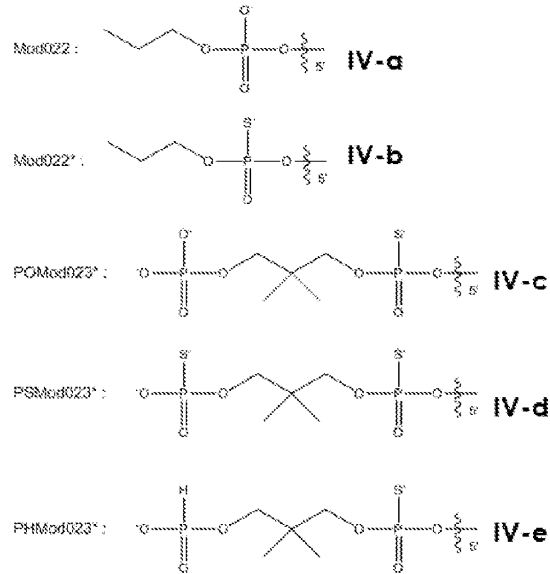
一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(R)-Me OH T、5'-(R)-Me PO T、5'-(R)-Me PS T、5'-(R)-Me PH T、5'-(S)-Me OH T、5'-(S)-Me PO T、5'-(S)-Me PS 50

T、及び5'-(S)-PH Tから選択される構造を有する。

【0414】

5'末端構造においてリン含有部分を含む、提供される一本鎖RNA i剤の一部の実施形態では、これは、式IV-a (Mod022、C3 PO及びn-プロピルとしても知られる)、IV-b (Mod022*)、IV-c (POMod023*)、IV-d (PSMod023*)、及びIV-e (PHMod023*) から選択される構造で表される：

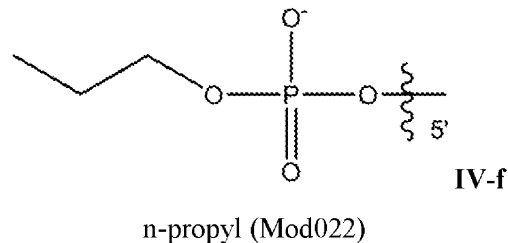
【化26】



【0415】

5'末端構造においてリン含有部分を含む提供される一本鎖RNA i剤の一部の実施形態では、これは、式IV-f (n-プロピル、C3 POまたはMod22としても知られる)の構造の選択された構造で表される：

【化27】

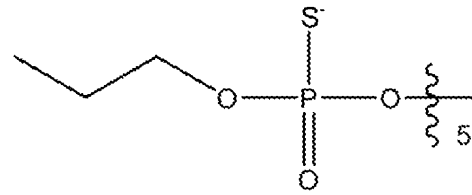


式中、5'は、糖の5'炭素への結合点を示す。

【0416】

5'末端構造においてリン含有部分を含む提供される一本鎖RNA i剤の一部の実施形態

では、これは、以下の構造（C3 P S または Mod 022*としても知られる）の構造の選択された構造で表される：
【化28】

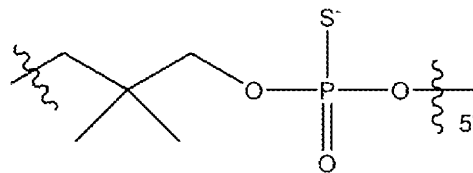


n-propyl (Mod022*)

10

式中、5' は、糖の5'炭素への結合点を示す（例えば、N1の）。
【0417】

5'末端構造においてリン含有部分を含む提供される一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、これは、式IV-g（ジメチルC3もしくはC3ジメチルPSまたはMod023*としても知られる）の構造の選択された構造で表される：
【化29】



IV-g

DimethylC3 (Mod023*)

30

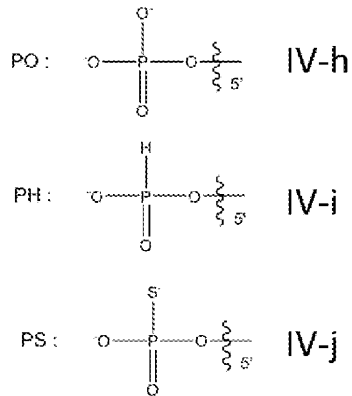
式中、5' は、糖の5'炭素への結合点を示す（例えば、N1の）。
【0418】

一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤は、5'末端構造を含み、該構造は、PO（ホスホロジエステル）、式IV-h；PH（H-ホスホネート）、式IV-i；及びPS（ホスホロチオエート）、式IV-jのいずれかから選択される：

40

50

【化 3 0】

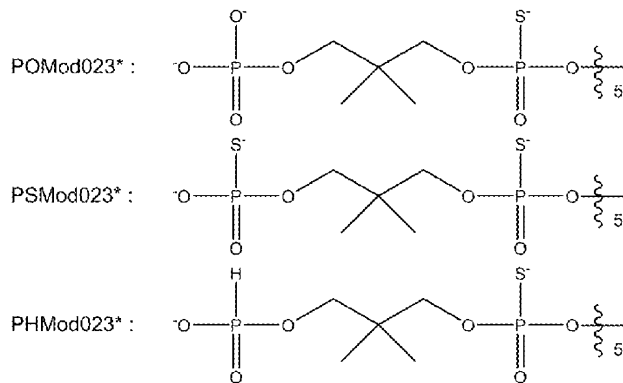


10

5'末端構造においてリン含有部分を含む提供される一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、これは、以下のいずれかから選択される構造で表される：

20

【化 3 1】



30

40

式中、5'は、糖の5'炭素への結合点を示す（例えば、N1の）。

【0 4 1 9】

一部の実施形態では、式IV-a～IV-jのいずれかにおけるPは、SpまたはRp立体配置におけるように立体不規則的または立体規定的である。

【0 4 2 0】

一部の実施形態では、5'末端構造は、以下のいずれかから選択される：リン酸、リン酸アナログ、5'-一リン酸（(HO)2(O)P-O-5'）、5'-二リン酸（(HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'）、5'-三リン酸（(HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'）、5'-グアノシンキャップ（7

50

ーメチル化または非メチル化) ($7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$)、5'-アデノシンキャップ (App)、及び任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造 ($N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'$)、5'-モノチオホスフェート (ホスホロチオエート、 $(HO)_2(S)P-O-5'$)、5'-モノジチオホスフェート (ホスホロジチオエート、 $(HO)(HS)(S)P-O-5'$)、5'-ホスホロチオレート ($(HO)_2(O)P-S-5'$)、酸素/硫黄置換ーリン酸、ニリン酸、及び三リン酸の任意のさらなる組み合わせ (例えば、5'-アルファーチオ三リン酸、5'-ガンマーチオ三リン酸等)、5'-ホスホロアミデート ($(HO)_2(O)P-NH-5'$ 、 $(HO)(NH_2)(O)P-O-5'$)、5'-アルキルホスホネート ($R=$ アルキル=メチル、エチル、イソプロピル、プロピル等、例えば、 $RP(OH)(O)-O-5'$ 、 $(OH)_2(O)P-5'-CH_2-$)、5'-アルキルエーテルホスホネート ($R=$ アルキルエーテル=メトキシメチル ($MeOCH_2-$)、エトキシメチル等、例えば、 $RP(OH)(O)-O-5'-$)。

【0421】

一部の実施形態では、リン含有部分を含む5'末端は、それらを含む一本鎖RNA i 剤が、RNA干渉において活性がより高い場合があるという点で、特別な利点を有し得る。

【0422】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-ヌクレオチドまたは修飾された5'-ヌクレオチド、5'-ヌクレオチドアナログ、5'-ヌクレオシドもしくは修飾された5'-ヌクレオシド、または5'-ヌクレオシドアナログの構造を有する。

【0423】

一部の実施形態では、5'末端構造は、以下のいずれかの構造を有する：5'-グアノシンキャップ、5'-アデノシンキャップ、5'-モノチオホスフェート、5'-モノジチオホスフェート、5'-ホスホロチオレート、5'-ホスホロアミデート、5'-アルキルホスホネート、及び5'-アルキルエーテルホスホネート、5'-ーリン酸、5'-ニリン酸、及び5'-三リン酸、5'-三リン酸、ーリン酸、ニリン酸、または三リン酸の少なくとも1つの酸素原子が硫黄原子で置換されている、当該ーリン酸、ニリン酸、または三リン酸、5'-アルファーチオ三リン酸及び5'-ガンマーチオ三リン酸、アルキルホスホネート、アルキルホスホネートは、式 $RP(OH)(O)-O-5'$ または $(OH)_2(O)P-5'-CH_2-$ を有し、式中、RはC₁-C₃アルキルであるもの、アルキルエーテルホスホネート、または式 $RP(OH)(O)-O-5'$ のアルキルエーテルホスホネート、式中、Rはアルキルエーテルである。

【0424】

様々な5'-ヌクレオシドが、例えば、米国特許出願第14/959,714号、US 2016-0194349 A1として公開、米国特許出願第14/983,907号、US 2016-0186175 A1として公開、または米国特許出願第13/696,796号、US 20130323836として公開、に記載されている。

【0425】

一部の実施形態では、5'末端構造はビニルホスホネートである。

【0426】

ある特定の実施形態では、当該5'末端化合物が式VII-cを有し、式中、GがF、OCH₃、またはO(CH₂)₂-OCH₃であるオリゴマー化合物を提供する。

【0427】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(R)-Me OH T、5'-(R)-Me PO T、5'-(R)-Me PS T、5'-(R)-Me PH T、5'-(S)-Me OH T、5'-(S)-Me PO T、5'-(S)-Me PS T、及び5'-(S)-PH Tから選択される構造を有する。

【0428】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(R)-Me OH Tの構造を有する。

【0429】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(R)-Me P O Tの構造を有する。

【0430】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(R)-Me P S Tの構造を有する。

【0431】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(R)-Me P H Tの構造を有する。

【0432】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(S)-Me O H Tの構造を有する。

【0433】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(S)-Me P O Tの構造を有する。

10

【0434】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(S)-Me P S Tの構造を有する。

【0435】

一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(R)-Me P O Tの構造を有する。

【0436】

一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(R)-Me P S Tの構造を有する。

【0437】

一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(R)-Me P H Tの構造を有する。

20

【0438】

一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(S)-Me O H Tの構造を有する。

【0439】

一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(S)-Me P O Tの構造を有する。

【0440】

一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(S)-Me P S Tの構造を有する。

30

【0441】

一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(S)-Me P H Tの構造を有する。

【0442】

一部の実施形態では、5'末端構造は、5'-(S)-Me P H Tの構造を有する。さらに、いくつかの参考文献、例えば、EP 1520022 B1、パラグラフ6は、5'リン酸は、siRNA二本鎖の標的相補的な鎖（例えば、アンチセンス鎖）で、RISC活性に必要であることを報告している。米国特許第8,729,036号、カラム2はまた、5'リン酸が、RNA干渉にとって必須であることが報告されることを注記した。米国特許第8,729,036号、カラム3はまた、5'リン酸が、HeLa S100抽出物中で一本鎖アンチセンスsiRNAがRNAiを引き起こすのに必要であることを報告した。しかしながら、本開示は、5'リン酸を含まない様々な一本鎖RNAi剤が、RNA干渉を誘導する能力を有することを示している。

40

【0443】

一部の実施形態では、5'末端は、リン酸含有部分、例えば、T-VPもしくはT-PO、または、任意の他の適切なRNAi剤の5'末端化合物、例えば、Allerson et al. 2005 J. Med. Chem. 48:901-04、Lima et al. 2012 Cell 150:883-894、Prakash et al. 2015 Nucl. Acids Res. 43:2993-3011、及び／またはPrakash et al. 2016 Bioorg. Med. Chem. Lett. 26:26:281

50

7-2820に記載のものを含む。

【0444】

一部の実施形態では、リン含有部分を含まない5'末端は、当該一本鎖RNA i 剤の合成がより容易であり得るという点、及びリン含有部分を分解から保護する必要がない場合があるという点で特別な利点を有し得る。一部の実施形態では、リン含有部分を含まない提供される一本鎖RNA i 剤の5'末端は、標的細胞内で当該一本鎖RNA i 剤の5'末端でリン含有部分に結合することができる哺乳類キナーゼの基質の役割を果たすことができる部分を含む。

【0445】

一部の実施形態では、5'末端は、リン含有部分を含まない。

10

【0446】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシである。

【0447】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシTである。

【0448】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシUである。

【0449】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシAである。

20

【0450】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシGである。

【0451】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシCである。

【0452】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシである。

30

【0453】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシTである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシUである。

【0454】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシAである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシGである。

【0455】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシCである。

40

【0456】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-OMeである。

【0457】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Tである。

【0458】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第

50

1 のヌクレオシドは 2' - OMe U である。

【0459】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - OMe A である。

【0460】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - OMe G である。

【0461】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - OMe C である。

【0462】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - OMe である。

【0463】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - OMe T である。

【0464】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - OMe U である。一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - OMe A である。

【0465】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - OMe G である。

【0466】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - OMe C である。

【0467】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - F である。

【0468】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - F T である。

【0469】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - F U である。

【0470】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - F A である。

【0471】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - F G である。

【0472】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - F C である。

【0473】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - F である。

【0474】

一本鎖 RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖 RNA i 剤は 5' 末端 OH を含み、第 1 のヌクレオシドは 2' - F T である。

10

20

30

40

50

【0475】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-F Uである。

【0476】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-F Aである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-F Gである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端OHを含み、第1のヌクレオシドは2'-F Cである。

【0477】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシである。

【0478】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Tである。

【0479】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Uである。

【0480】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Aである。

【0481】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Gである。

【0482】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Cである。

【0483】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシである。

【0484】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Tである。

【0485】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Uである。

【0486】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Aである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Gである。

【0487】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-デオキシ Cである。

【0488】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-Fである。

【0489】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Tである。

10

20

30

40

50

【0490】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Uである。

【0491】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Aである。

【0492】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Gである。

【0493】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Cである。

【0494】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-Fである。

【0495】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Tである。

【0496】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Uである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Aである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Gである。

【0497】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-F Cである。

【0498】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMeである。

【0499】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Tである。

【0500】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Uである。

【0501】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Aである。

【0502】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Gである。

【0503】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Cである。

【0504】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMeである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Tである。

【0505】

10

20

30

40

50

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Uである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Aである。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Gである。

【0506】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、該一本鎖RNA i 剤は5'末端リン酸を含み、第1のヌクレオシドは2'-OMe Cである。

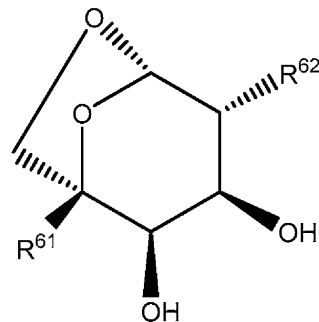
【0507】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、ASPGRに結合するさらなる成分を含む。一部の実施形態では、該さらなる成分は、当該オリゴヌクレオチドの5'末端上である。

【0508】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、さらなる成分を含み、それは、式(K)の化合物であるか、または式(K)の化合物を含む。

【化32】



(K)

式中、Rは、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CN}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SH}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、またはアリールもしくはヘテロアリールであり、ここで、該アリールもしくはヘテロアリールは、Rで任意に置換されるか、

あるいは、Rは、 $-\text{Z}-\text{X}-\text{Y}$ であり、ここで、Xは、リンカーまたは薬物送達系であり、Yは、存在しないか、または、小分子、アミノ酸配列、核酸配列、抗体、オリゴマー、ポリマー、遺伝子的に誘導された物質、リポソーム、ナノ粒子、染料、蛍光プローブ、もしくはそれらの組み合わせからなる群から選択されるリガンドであり、Zは、存在しないか、あるいは、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-$

R) - C (O) -, -CH₂-N (R) - S (O)₂ -, -CH₂-N (R) - C (O) - O -, -CH₂-N (R) - C (O) - N (R) -, -CH₂-O - C (O) -, -CH₂-O - C (O) - N (R) -, -CH₂-O - C (O) - O -, またはアリールもしくはヘテロアリールであり、ここで、該アリールまたはヘテロアリールは、Rで任意に置換され、

R⁶²は、-OH、-N₃、-N (R)₂、-N (R) - C (O) - R、-N (R) - C (O) - N (R)₂、-N (R) - C (O) - OR、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、該テトラゾール及びトリアゾールは、Rで任意に置換され、

ここで、Rが-CH₂-OHの場合、Rは、-N₃、-N (R)₂、-N (R) - C (O) - R、-N (R) - C (O) - N (R)₂ - N (R) - C (O) - OR、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、該テトラゾール及びトリアゾールは、Rで任意に置換され、

10

各Rは、独立して、-H、-(C₁-C₅)アルキル、ハロ置換(C₁-C₅)アルキル、または(C₃-C₆)シクロアルキルであり、ここで、該アルキルまたはシクロアルキルの-CH₂-基は、-O-、-S-、及び-N (R)-から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、該アルキルの-CH₃は、-N (R)₂、-OR、及び-S (R)から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており

各Rは、独立して、-H、-(C₁-C₂₀)アルキル、または(C₃-C₆)シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの1~6個の-CH₂-基は、-O-、-S-、または-N (R)-で置き換えられてもよく、該アルキルの-CH₃は、-N (R)₂、-OR、及び-S (R)から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、1~6個のハロ原子で置換されてもよく、

20

各Rは、独立して、-H、(C₃-C₂₀)シクロアルキル、または(C₁-C₂₀)アルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの1~6個の-CH₂-基は、-O-、-S-、または-N (R)-で置き換えられてもよく、該アルキルの-CH₃は、-N (R)₂、-OR、及び-S (R)から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、1~6個のハロ原子で置換されてもよい。

30

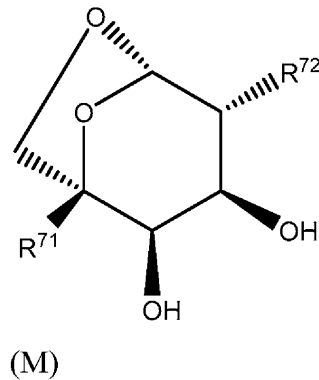
【0509】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、さらなる成分を含み、それは、式(M)の化合物であるか、または式(M)の化合物を含む。

40

50

【化 3 3】



10

式中、Rは、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CN}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SH}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-\text{R}$ 、またはアリールもしくはヘテロアリールであり、ここで、該アリールもしくはヘテロアリールは、Rで任意に置換されるか、

20

あるいは、Rは、 $-\text{Z}-\text{X}-\text{Y}$ 、 $-\text{Z}-\text{Y}$ 、 $-\text{X}-\text{Y}$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{Y}$ 、または $-\text{Z}-\text{X}$ であり、ここで、Xは、リンカーまたは薬物送達系であり、Yは、Rであるか、または、小分子、アミノ酸配列、核酸配列、抗体、オリゴマー、ポリマー、遺伝子的に誘導された物質、リポソーム、ナノ粒子、染料、蛍光プローブ、もしくはそれらの組み合わせからなる群から選択されるリガンドであり、Zは、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、またはアリールもしくはヘテロアリールであり、ここで、該アリールまたはヘテロアリールは、Rで任意に置換され、

30

Rは、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{OR}$ 、 $-\text{N}(\text{R})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、該テトラゾール及びトリアゾールは、Rで任意に置換され、

40

ここで、Rが $-\text{CH}_2-\text{OH}$ の場合、Rは、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-\text{OR}$ 、 $-\text{N}(\text{R})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、該テトラゾール及びトリアゾールは、Rで任意に置換され、

各Rは、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキル、ハロ置換 (C_1-C_5) アルキル、または (C_3-C_6) シクロアルキルであり、ここで、該アルキルまたはシクロアルキルの1つ以上の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、及び $-\text{N}(\text{R})-$ から独立して選択され

50

るヘテロ原子基で各々置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R)_2$ 、 $-OR$ 、及び $-S(R)$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、各Rは、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、または (C_3-C_6) シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの1~6個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R)-$ から独立して選択されるヘテロ原子基で各々置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R)_2$ 、 $-OR$ 、及び $-S(R)$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各Rは、独立して、 $-H$ 、 (C_3-C_{20}) シクロアルキル、または (C_1-C_{60}) アルキルであり、ここで、該シクロアルキルの1~6個の $-CH_2-$ 基または該アルキルの1~20個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R)-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R)_2$ 、 $-OR$ 、及び $-S(R)$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各Rは、独立して、 H 、 $-C\equiv CH$ 、 $-C=CH_2$ 、 $-CH_3$ 、 $-N_3$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-OH$ 、 $-S(O)-(R)$ 、 $-S(O)_2-(R)$ 、 $-C(O)-OH$ 、 $-S-S-$ アリール、 $-S-S-$ ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール、またはヘテロアリールであり、ここで、各アリールまたはヘテロアリールは、Rで任意に置換される。

【0510】

一部の実施形態では、 R^{61} もしくは R^{71} は、 $-X-Y$ であり、及び／または R^{62} もしくは R^{72} は、 $-NH-C(O)-CH_3$ である。

【0511】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、以下からなる群から選択されるさらなる成分を含む：

ベンジル(4-(2-(1-(1-(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル)-1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル)メトキシ)エチル)アミノ)-4-オキソブチル)カルバメート、

ベンジル(4-(1, 3-ビス(1-(1-(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル)-1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル)メトキシ)プロパン-2-イル)アミノ)-4-オキソブチル)カルバメート、

ベンジル(4-(1, 3-ビス(1-(1-(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル)-1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル)メトキシ)-2-(1-(1-(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル)-1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル)メトキシ)メチル)プロパン-2-イル)アミノ)-4-オキソブチル)カルバメート、

N-(2-(1-(1-(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル)-1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル)メトキシ)エチル)-4-アミノブタンアミド、

10

20

30

40

50

4-アミノ-N- {1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] プロパン-2-イル} ブタンアミド、

4-アミノ-N- (1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] - 2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) ブタンアミド、

4-アミノ-N- [1, 31-ビス (1- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] メチル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) - 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30-オクタオキサヘントリアコンタン-16-イル] ブタンアミド、

4-アミノ-N- {1, 31-ビス (1- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] メチル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) - 16- [15- (1- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] メチル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) - 2, 6, 10, 14-テトラオキサペンタデカ-1-イル] - 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30-オクタオキサヘントリアコンタン-16-イル} ブタンアミド、

N- { (1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 1- [(ヘキシルオキシ) メチル] - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル} アセトアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (2, 5, 8, 11, 14-ペンタオキサペンタデカ-1-イル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] アセトアミド、

N- ((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (ヒドロキシメチル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル) - 2, 2, 2-トリフルオロアセトアミド、化合物、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (ヒドロキシメチル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] - 2, 2, 2-トリフルオロアセトアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (ヒドロキシメチル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] プロパンアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (ヒドロキシメチル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] メタンスルホンアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (ヒドロキシメチル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] - 2, 2-ジフルオロアセトアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (ヒドロキシメチル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] - 3, 3, 3-トリフルオロプロパンアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (ヒドロキシメ

10

20

30

40

50

チル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] - N-メチルアセトアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (ヒドロキシメチル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] - N-メチルメタンスルホンアミド、

tert-ブチル [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (ヒドロキシメチル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] メチルカルバメート、

(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 1- (ヒドロキシメチル) - 4- (メチルアミノ) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-2, 3-ジオール塩酸塩、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (15-フェニル-2, 5, 8, 11, 14-ペンタオキサペンタデカ-1-イル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] アセトアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 1- (13-アジド-2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカ-1-イル) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] アセトアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (2, 5, 8, 11-テトラオキサテトラデカ-13-エン-1-イル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] アセトアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (2, 5, 8, 11-テトラオキサテトラデカ-13-イン-1-イル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] アセトアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 1- (13-アミノ-2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカ-1-イル) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] アセトアミド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- (13-ヒドロキシ-2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカ-1-イル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] アセトアミド、

1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-酸、

S- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} エタンチオエート、

N- {[(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 2, 3-ジヒドロキシ-1- [13- (ピリジン-2-イル) ジスルファニル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカ-1-イル] - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル} アセトアミド、

N- (1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] - 2- {[(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) - 6- (ピリジン-2-イル) ジスルファニル) ヘキサナムド、

N- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 1- (13- {4- [(3- [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] - 2- {[(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチル

10

20

30

40

50

アミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} - 2-アミノプロポキシ) メチル] - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-1-イル} - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-1-イル) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-4-イル] アセトアミド塩酸塩、

6-アジド-N- (1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] - 2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) ヘキサナムド、

N- (1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] - 2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) ヘプタ-6-エンアミド、

N- (1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] - 2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) ヘプタ-6-インアミド、

7- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] - 2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] - 7-オキソヘプタン酸 (ナトリウム塩)、

ベンジル {6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] - 2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] - 6-オキソヘキシル} カルバメート、

6-アミノ-N- (1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] - 2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1-イル] - 2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} - 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] - 6-オキソヘキシル} カルバメート、

10

20

30

40

50

S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] メチル} プロパン - 2 - イル) ヘキサナムイド酢酸塩、

N - {6 - [(1, 3 - ビス [(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] - 2 - {[(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] メチル} プロパン - 2 - イル) アミノ] - 6 - オキソヘキシル} - 6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサナムイド、

N - {6 - [(1, 3 - ビス [(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] - 2 - {[(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] メチル} プロパン - 2 - イル) アミノ] - 6 - オキソヘキシル} - 6 - [(プロモアセチル) アミノ] ヘキサナムイド、

4 - {[(2 R) - 5 - (カルバモイルアミノ) - 2 - {[(2 R) - 2 - シクロペンチル - 2 - {[6 - (2, 5 - ジオキソ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル) ヘキサノイル] アミノ} アセチル] アミノ} ペンタノイル] アミノ} ベンジル {6 - [(1, 3 - ビス [(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] - 2 - {[(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] メチル} プロパン - 2 - イル) アミノ] - 6 - オキソヘキシル} カルバメート、

N - (1, 3 - ビス [(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] - 2 - {[(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] メチル} プロパン - 2 - イル) - 3, 19 - ジオキソ - 1 - (ピリジン - 2 - イルジスルファニル) - 7, 10, 13, 16 - テトラオキサ - 4, 20 - ジアザヘキサコサン - 26 - アミド、

N - (1, 3 - ビス [(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] - 2 - {[(1 - {1 - [(1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ - 1 - イル] - 2, 5, 8, 11 - テトラオキサトリデカン - 13 - イル} - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾール - 4 - イル) メトキシ] メチル} プロパン - 2 - イル) - 3, 31 - ジオキソ - 1 - (ピリジン - 2 - イルジスルファニル)

10

20

30

40

50

ー7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28-オクタオキサ-4, 32-ジアザオクタトリアコンタン-38-アミド、

N- {6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] -6-オキソヘキシル} -6- (ピリジン-2-イルジスルファニル) ヘキサナムド、

10

2- (ピリジン-2-イルジスルファニル) エチル {6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] -6-オキソヘキシル} カルバメート、

20

N- {6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] -6-オキソヘキシル} -6- (4, 4, 5, 5-テトラメチル-1, 3, 2-ジオキサボロラン-2-イル) ヘキサナムド、

30

N- {6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] -6-オキソヘキシル} -N'- (1, 3-ジヒドロキシプロパン-2-イル) ヘプタンジアミド、

6-アジド-N- {6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] -6-オキソヘキシル} ヘキサナムド、

40

6- (ベンジルオキシ) -N- {6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデ

50

カン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- {
 [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-
 ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5,
 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-
 4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] -6-オキソヘキシル}
 ヘキサナムド、

(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -1- {13- [4- ({
 3- [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2,
 3-ビス (アセチルオキシ) -6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-
 イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-
 トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R,
 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ビス (アセチルオキシ) -6, 8-ジ
 オキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサト
 リデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチ
 ル} -2- ({6 [(6ヒドロキシヘキサノイル) アミノ] ヘキサノイル} アミノ) プロ
 ポキシ} メチル) -1H-1, 2, 3-トリアゾール-1-イル] -2, 5, 8, 11-
 テトラオキサトリデカ-1-イル] -3- (アセチルオキシ) -6, 8-ジオキサビシク
 ロ [3.2.1] オクタ-2-イルアセテート、

ベンジル [6- ({6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R,
 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.
 2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-
 イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1-
 [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-
 6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-
 テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル)
 メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] -6-オキソヘキシル} アミノ) -6-
 オキソヘキシル] カルバメート、

6-アミノ-N- {6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R,
 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.
 2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-
 イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1-
 [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-
 6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-
 テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル)
 メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] -6-オキソヘキシル} ヘキサナム
 ドアセテート、

4- (ベンジルオキシ) -N- (1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R,
 5S) -4- アミノ-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.
 1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -
 1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1- [(1S,
 2R, 3R, 4R, 5S) -4- アミノ-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサ
 ビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカ
 ン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プ
 ロパン-2-イル) ブタンアミド、

N- (1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチ
 ルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-
 1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2,
 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R,
 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサ
 ビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカ

10

20

30

40

50

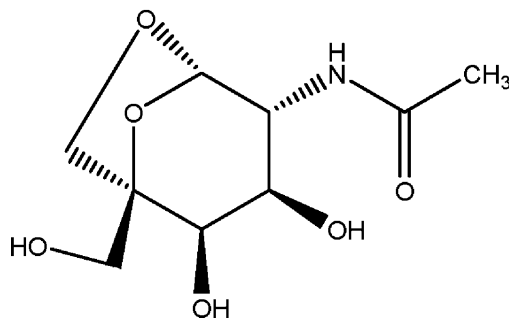
ン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) -4-ヒドロキシブタンアミド、及び

N- (2- { [6- ({6- [(1, 3-ビス [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] -2- { [(1- {1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -2, 5, 8, 11-テトラオキサトリデカン-13-イル} -1H-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メトキシ] メチル} プロパン-2-イル) アミノ] -6-オキソヘキシル} アミノ) -6-オキソヘキシル] オキシ} -1, 3-ジオキサン-5-イル) -6- (ピリジン-2-イルジスルファニル) ヘキサンアミド

【0512】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、式(N)のさらなる成分を含む。

【化34】



(N).

【0513】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、以下から選択されるさらなる成分を含む：

10

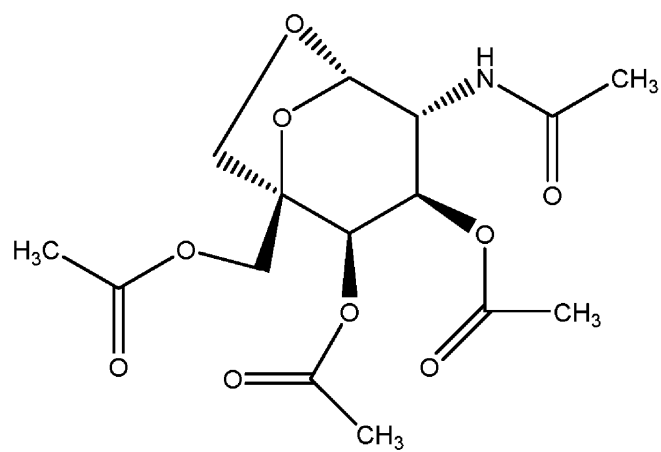
20

30

40

50

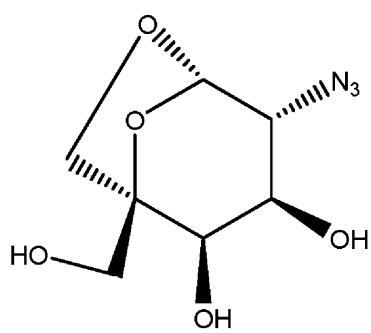
【化 3 5】



10

20

【化 3 6】

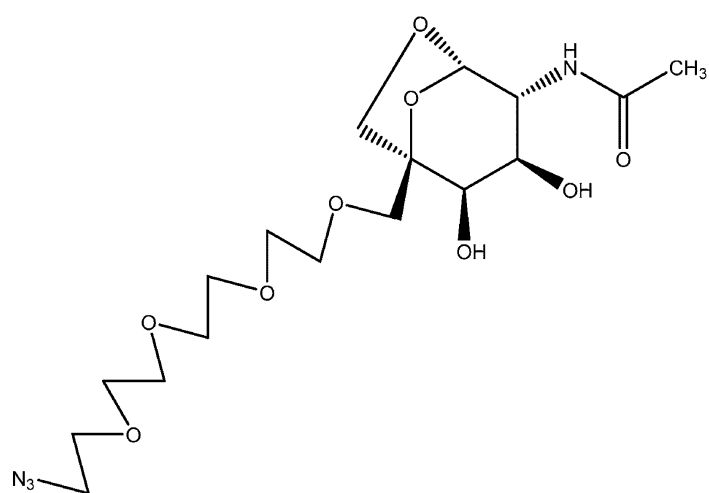
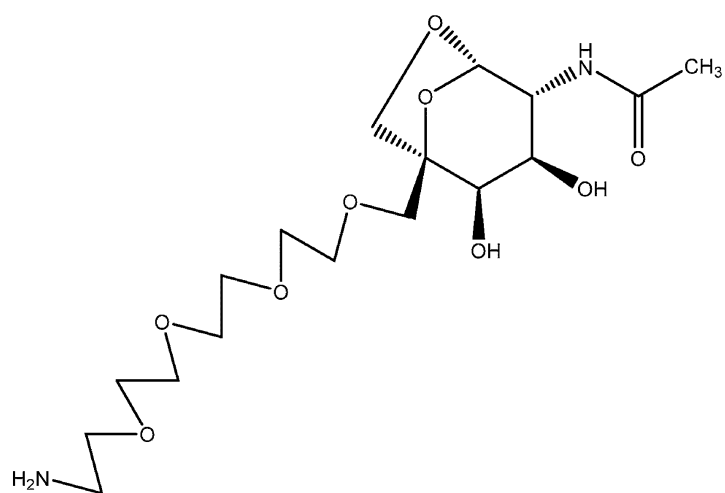
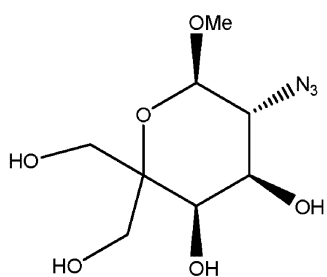


30

40

50

10



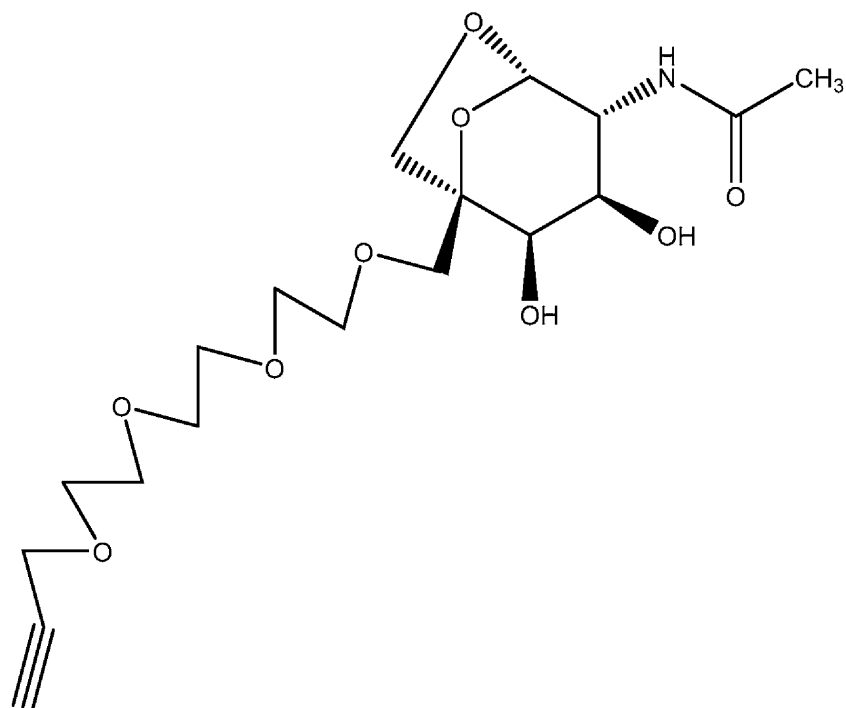
20

30

40

及び

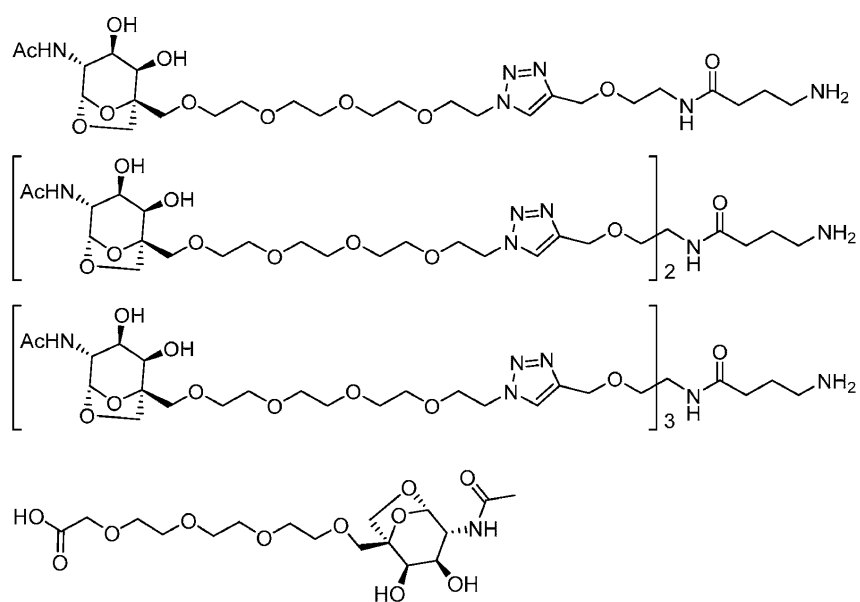
【化 3 8】



【 0 5 1 4】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、以下の式のいずれかから選択されるさらなる成分を含む：

【化 3 9】



10

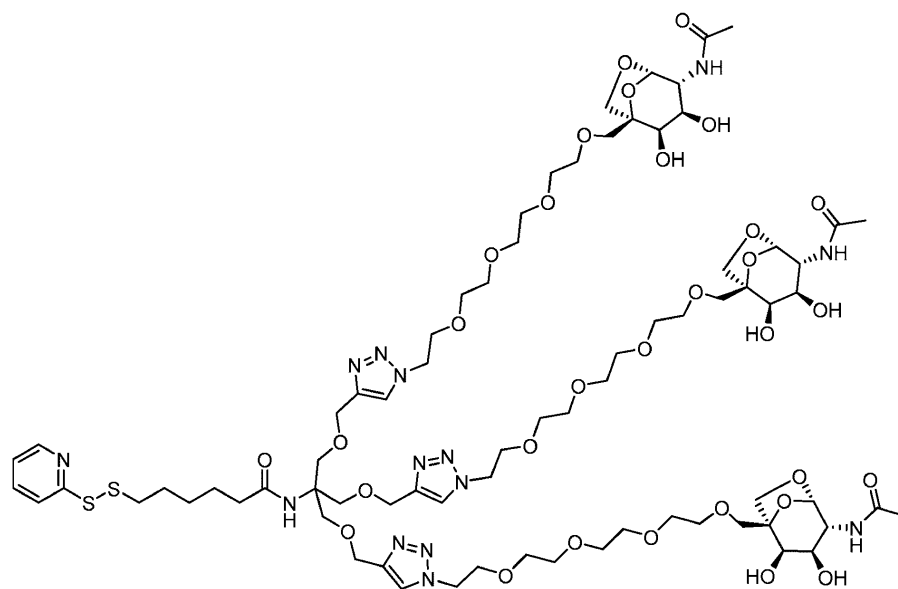
20

30

40

50

【化 4 0】



10

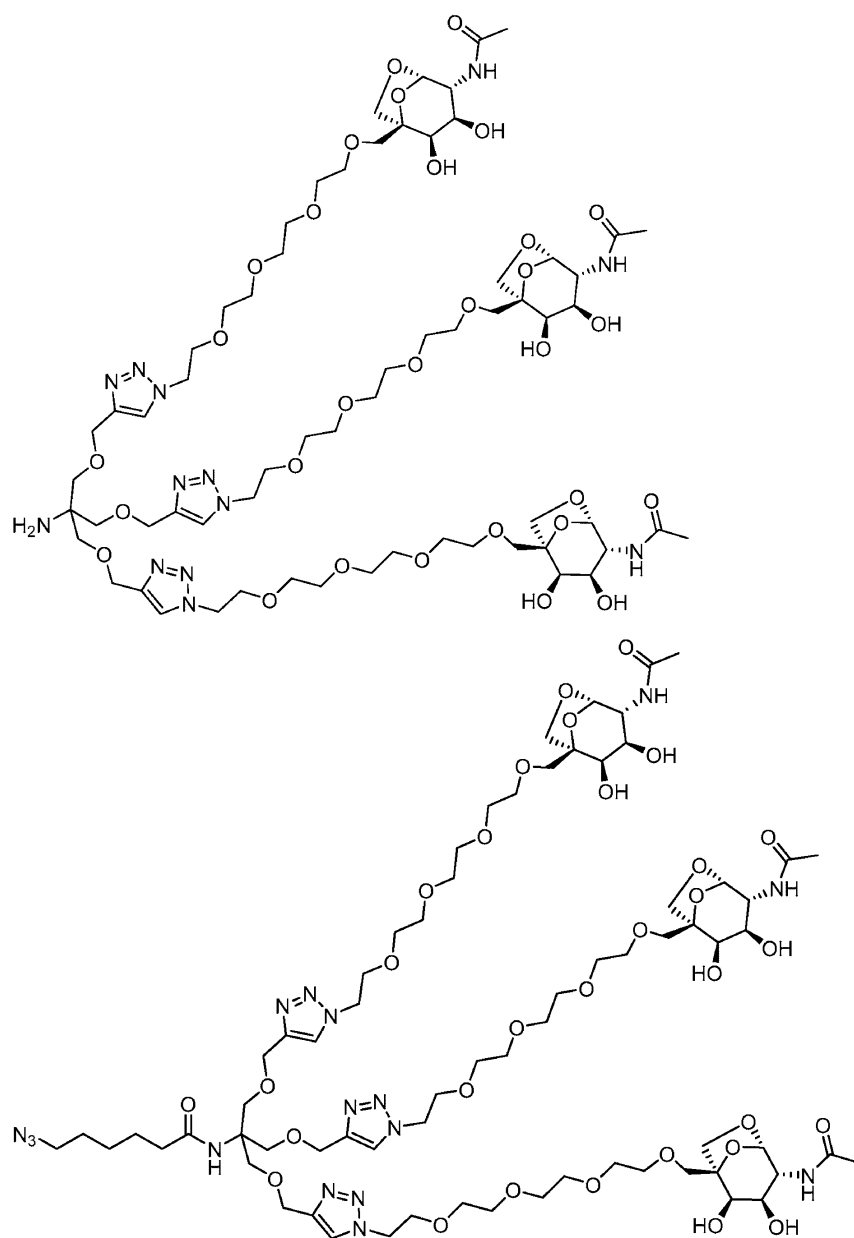
20

30

40

50

【化 4 1】



10

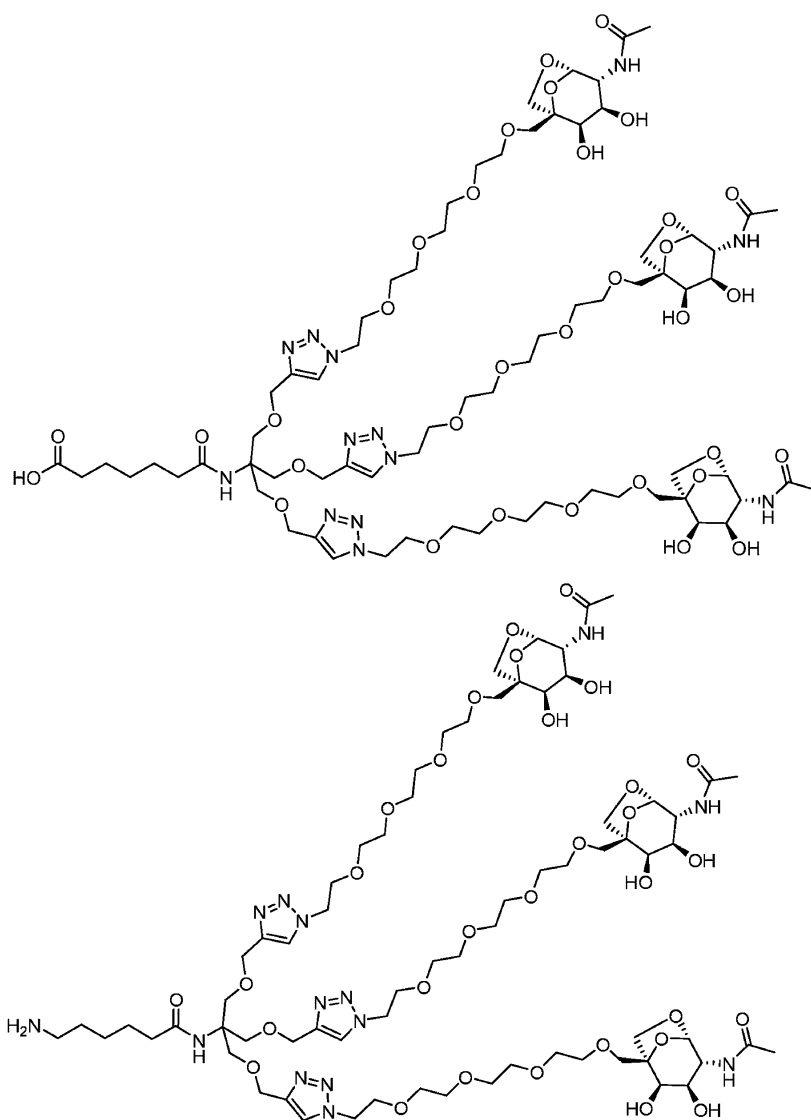
20

30

40

50

【化 4 2】



10

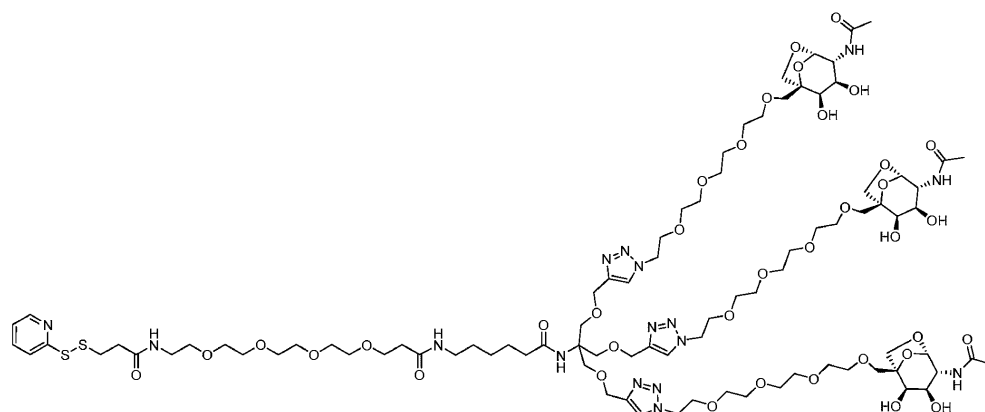
20

30

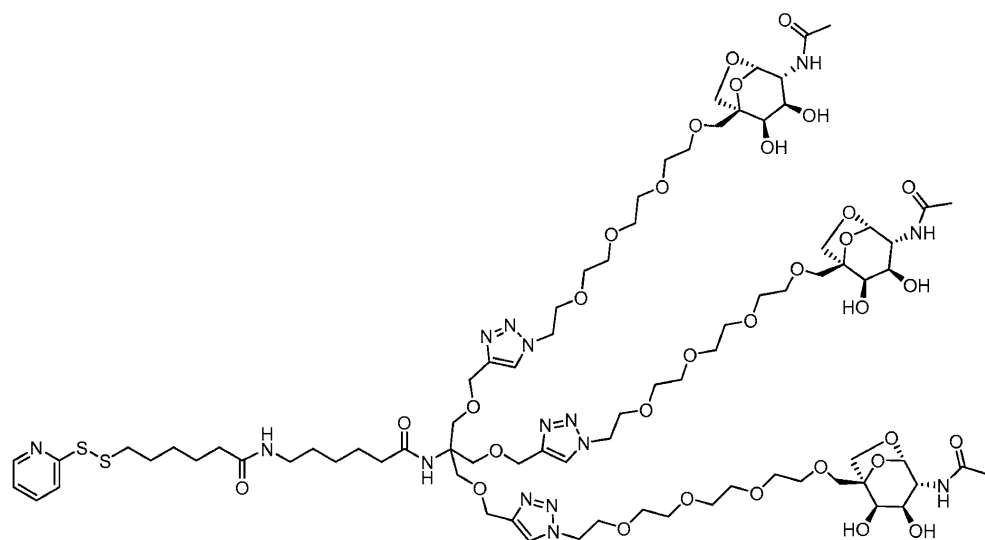
40

50

【化 4 3】



10



20

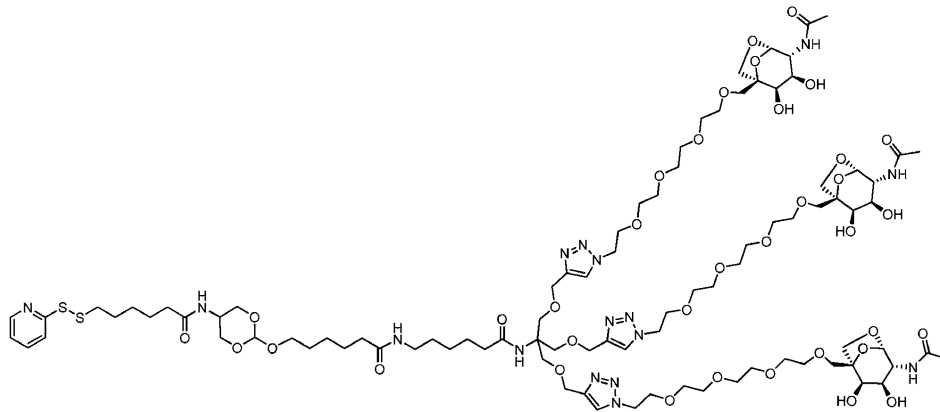
30

及び

40

50

【化 4 4】



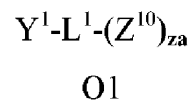
10

【 0 5 1 5】

一部の実施形態では、本開示は、式 O 1 を有する化合物：

20

【化 4 5】



30

または該化合物の薬学的に許容される塩に関し、式中、 Y^1 は、PNPLA3 を標的とするオリゴヌクレオチドであり、

za は、1、2、または3であり、

L^1 は、式 L 1 1、L 1 2、L 1 3、L 4 3、L 4 4、L 4 5、L 4 6、L 4 7、L 4 8、L 4 9、L 5 0、L 5 1、L 5 2、L 5 3 または L 5 4 の化合物であり、 Y^1 及び Z^{10} との結合位置が示されており、

40

50

【化 4 6】



L12

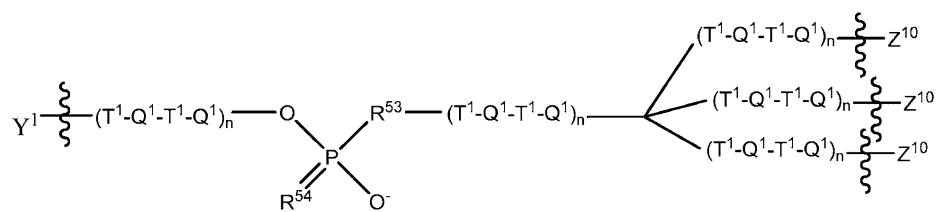
20

30

40

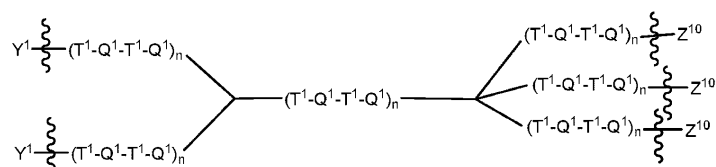
50

【化 4 7】

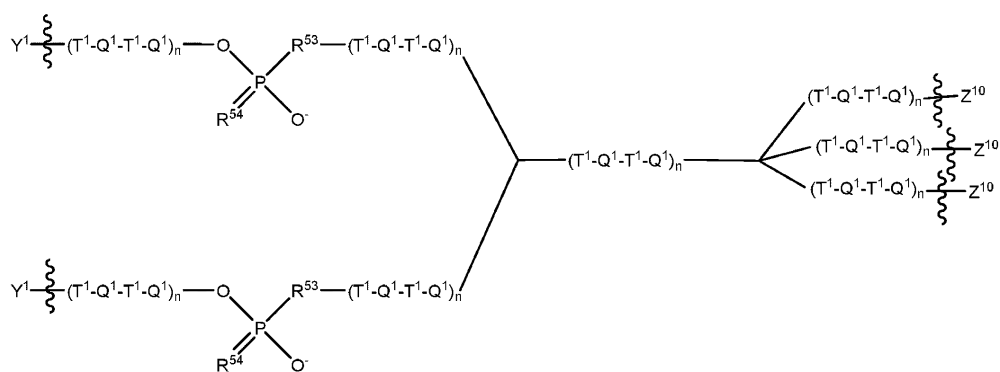


10

L13



L43



20

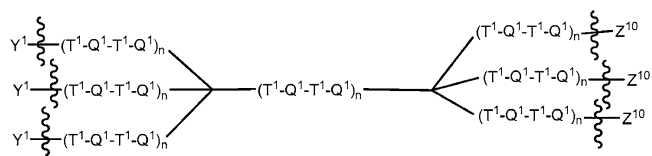
L44

30

40

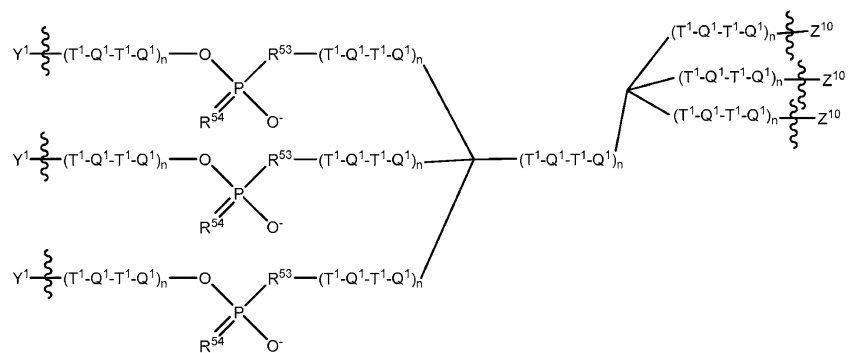
50

【化 4 8】



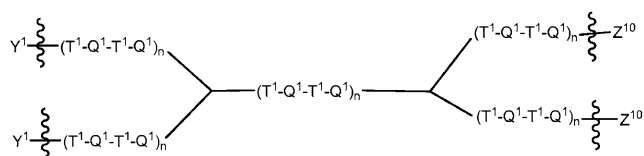
L45

10

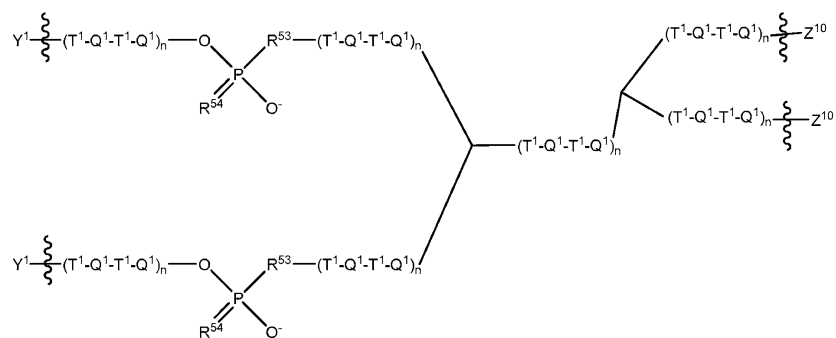


L46

20



L47



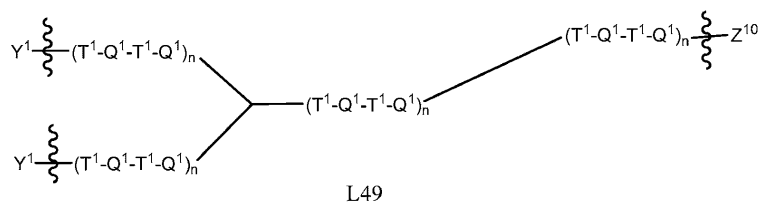
L48

30

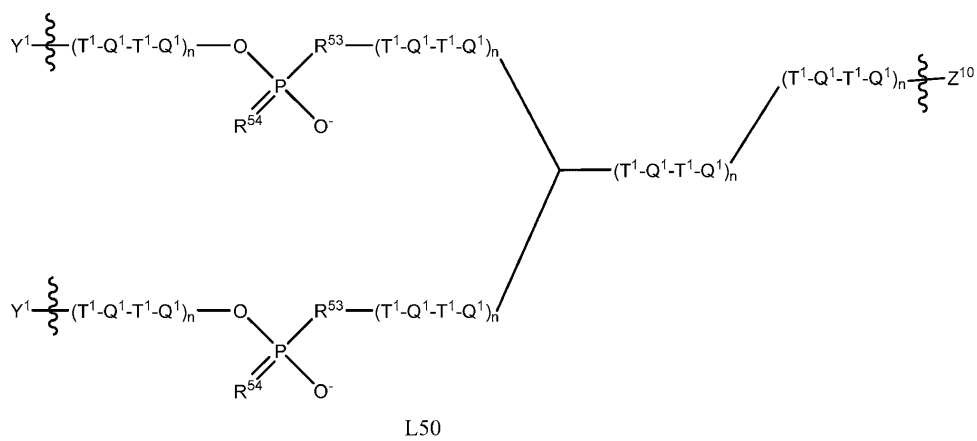
40

50

【化 4 9】



10



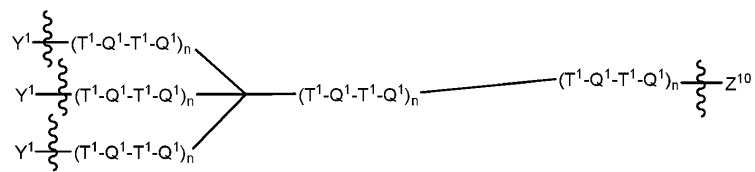
20

30

40

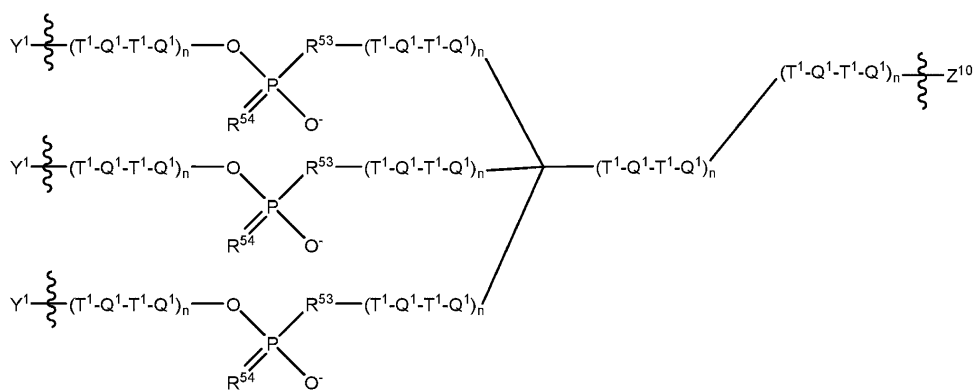
50

【化 5 0】



L51

10



L52

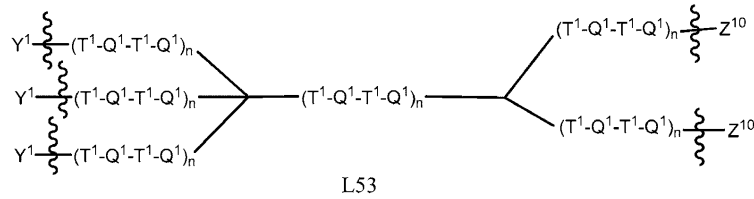
20

30

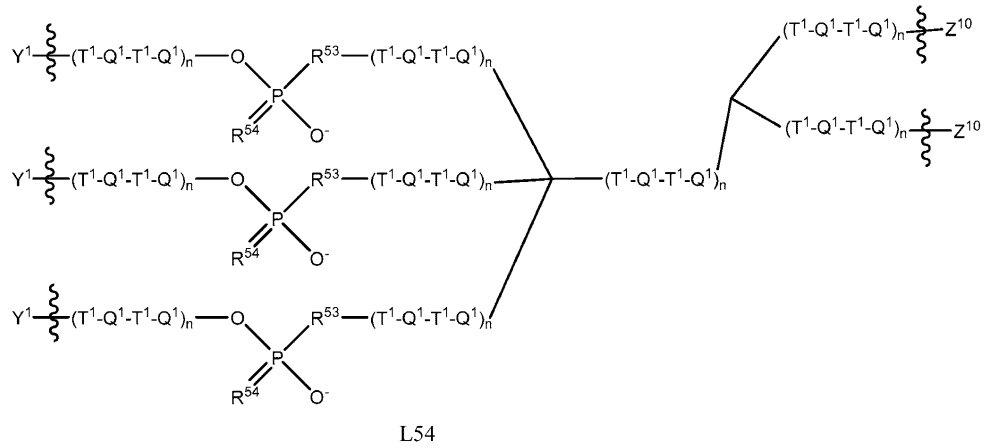
40

50

【化 5 1】



10



20

式中、各 T^1 は、独立して、存在しないか、アルキレン、アルケニレン、またはアルキニレンであり、ここで、該アルキレン、アルケニレン、またはアルキニレンの1つ以上の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

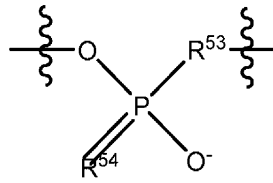
30

各 Q^1 は、独立して、存在しないか、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-NR^{49}-$ 、 $-NR^{49}-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^{49}-$ 、 $-NR^{49}-C(O)-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NR^{49}C(O)NR^{49}-$ 、二価のヘテロアリール基、または $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、及び $-NR^{49}-$ から選択されるヘテロ原子基（ここで、少なくとも2つの炭素原子が該ヘテロ原子基 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 及び $-NR^{49}-$ を任意の他のヘテロ原子基から分離している）、または次式の構造であり、

40

50

【化 5 2】



10

ここで、 R^{53} は $-O$ または $-NH-$ であり、 R^{54} は $-O$ または $-S$ であり、

各 R^{49} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも 2 つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの 1 ～ 6 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49a})-$ で置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49a})_2$ 、 $-OR^{49a}$ 、及び $-S(R^{49a})$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも 2 つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各 R^{49a} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_6)$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、

20

R^{53} は、 $-O$ または $-NH$ であり、

R^{54} は、 $-O$ または $-S$ であり、

各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または 40 であり、 n が 0 より大きい場合、各 $(T^1-Q^1-T^1-Q^1)$ の各 T^1 及び各 Q^1 は独立して選択され、

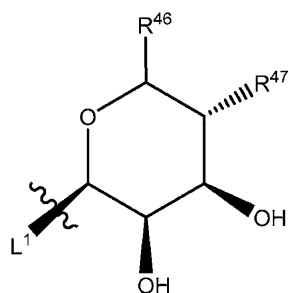
30

各 Z^{10} は、独立して、式 Z^{12} 、 Z^{13} 、 Z^{14} 、 Z^{15} 、 Z^{16} 、 Z^{17} 、 Z^{18} 、 Z^{19} 、 Z^{20} 、もしくは Z^{21} の化合物、またはその幾何異性体もしくは位置異性体であり、 L^1 との結合位置が示されており、

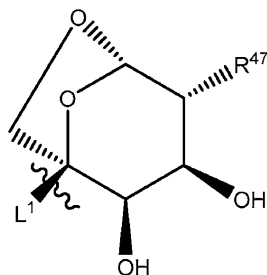
40

50

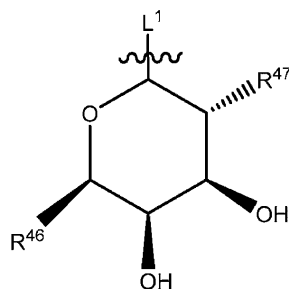
【化 5 3】



Z12



Z13



Z16

ここで、各 R^{46} は、独立して、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CN}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SH}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、またはアリールもしくはヘテロアリールであり、ここで、該アリールまたはヘテロアリールは、 R^{51} で任意に置換され、

各 R^{47} は、独立して、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{OR}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{48}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、該テトラゾール及びトリアゾールは、 R^{48} で任意に置換され、

各 R^{48} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキル、ハロ置換 (C_1-C_5) アルキル、ハロ置換 $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルケニル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキニル、ハロ置換 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルケニル、ハロ置換 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキニル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、該アルキルまたはシクロアルキルの $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、及び $-\text{N}(\text{R}^{52})-$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、該アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{52})_2$ 、 $-\text{OR}^{52}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{52})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されてお

10

20

30

40

50

り、

各 R^{51} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_3-C_{20})$ シクロアルキル、 $-(C_1-C_{60})$ アルケニル、 $-(C_1-C_{60})$ アルキニル、または $-(C_1-C_{60})$ アルキルであり、ここで、該シクロアルキルの 1～6 個の $-CH_2-$ 基または該アルキルの 1～20 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子は、少なくとも 2 つの炭素原子で分離されており、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49})_2$ 、 $-OR^{49}$ 、及び $-S(R^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも 2 つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

各 R^{52} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、 $-(C_1-C_{20})$ アルケニル、 $-(C_1-C_{20})$ アルキニル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも 2 つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの 1～6 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49})_2$ 、 $-OR^{49}$ 、及び $-S(R^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも 2 つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよい。

【0516】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも 15 塩基を含む。

【0517】

一部の実施形態では、 Y^1 の塩基配列は、表 1 A に列挙される任意の P N P L A 3 オリゴヌクレオチドの塩基配列を含むか、もしくは当該塩基配列であり、または Y^1 の塩基配列は、表 1 A に列挙される任意の P N P L A 3 オリゴヌクレオチドの配列の 15 個の連続塩基を含む。

【0518】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも 1 つのホスホジエステルヌクレオチド間結合を含む。

【0519】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも 1 つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0520】

一部の実施形態では、 Y^1 は、キラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも 1 つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0521】

一部の実施形態では、 Y^1 は、S p 立体配置にキラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも 1 つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0522】

一部の実施形態では、 Y^1 は、R p 立体配置にキラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも 1 つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0523】

一部の実施形態では、 Y^1 は、キラル制御された修飾ヌクレオチド間結合またはキラル制御されたホスホロチオエートの場合、組成物内で少なくとも 70 % のジアステレオ純度を有するリンクラル中心を含む。

【0524】

一部の実施形態では、 Y^1 は、キラル制御された修飾ヌクレオチド間結合またはキラル制御されたホスホロチオエートの場合、少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 99.5 % のジアステレオ純度を有するリンクラル中心を含む。

【0525】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも1つの糖修飾を含む。

【0526】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも1つの塩基修飾を含む。

【0527】

一部の実施形態では、 Y^1 は、骨格結合のパターンをさらに含む。

【0528】

一部の実施形態では、 Y^1 は、骨格キラル中心のパターンをさらに含む。

【0529】

一部の実施形態では、 Y^1 は、化学修飾のパターンをさらに含む。

10

【0530】

一部の実施形態では、 Y^1 は、骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び化学修飾のパターンをさらに含む。

【0531】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び化学修飾のパターンは、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンである。

【0532】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び化学修飾のパターンは、表1Aに列挙されるオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンであり、 Y^1 の塩基配列は、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列を含むか、もしくは当該塩基配列であり、または Y^1 の塩基配列は、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの配列の15個の連続塩基を含む。

20

【0533】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性の減少を媒介する能力を有する。

【0534】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNAse H、立体障害及び／またはRNA干渉によって媒介される機序を介して、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性の減少を媒介する能力を有する。

30

【0535】

一部の実施形態では、

各 T^1 は、独立して、存在しないか、アルキレンであり、ここで、該アルキレンの1つ以上の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、及び $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 Q^1 は、独立して、存在しないか、 $-C(O)$ 、 $-C(O)-NR^{49}$ 、 $-NR^{49}-C(O)$ 、または $-O-$ 、及び $-NR^{49}$ から選択されるヘテロ原子基であり、ここで、少なくとも2つの炭素原子が、ヘテロ原子基 $-O-$ 及び $-NR^{49}$ を任意の他のヘテロ原子基から分離しており、

40

各 R^{49} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_6)$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

各 n は、独立して、0、1、2、3または4であり、 n が0より大きい場合、各 $(T^1-Q^1-T^1-Q^1)$ の各 T^1 及び各 Q^1 は独立して選択され、

各 R^{46} は、 $-CH_2-OH$ であり、

各 R^{47} は、 $-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$ であり、

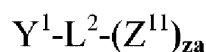
50

各 R^{48} は、独立して、 $-H$ 、または $-(C_1-C_5)$ アルキルである。

【0536】

一部の実施形態では、本開示は、式 O2 を有する化合物：

【化54】



O2

10

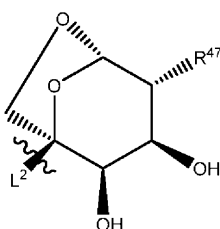
またはその薬学的に許容可能な塩に関し、式中、 Y^1 は、PNPLA3 を標的とするオリゴヌクレオチドであり、

za は、1、2、または3であり、

L^2 は、結合基であり、

Z^{11} は、式 (B) の化合物であり、 L^2 との結合位置が示されており、

【化55】



(B)

30

各 R^{47} は、独立して、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-N(R^{48})_2$ 、 $-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$ 、 $-N(R^{48})-C(O)-N(R^{48})_2$ 、 $-N(R^{48})-C(O)-OR^{48}$ 、 $-N(R^{48})-S(O)_2-R^{48}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、該テトラゾール及びトリアゾールは、 R^{48} で任意に置換され、

40

各 R^{48} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_5)$ アルキル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルキル、ハロ置換 $-(C_3-C_6)$ シクロアルキル、 $-(C_1-C_5)$ アルケニル、 $-(C_1-C_5)$ アルキニル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルケニル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルキニル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、該アルキルまたはシクロアルキルの $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{52})-$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{52})_2$ 、 $-OR^{52}$ 、及び $-S(R^{52})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 R^{49} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シ

50

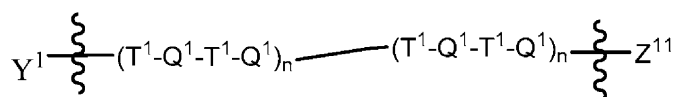
クロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{N}(\text{R}^{49a})-$ で置き換えられてもよく、該アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{49a})_2$ 、 $-\text{OR}^{49a}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{49a})$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各 R^{49a} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、

各 R^{52} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルケニル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルキニル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{N}(\text{R}^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、該アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{49})_2$ 、 $-\text{OR}^{49}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよい。

【0537】

一部の実施形態では、 L^2 は、式 $\text{L}1$ 、 $\text{L}2$ 、 $\text{L}3$ 、 $\text{L}4$ 、 $\text{L}5$ 、 $\text{L}6$ 、 $\text{L}7$ 、 $\text{L}8$ 、 $\text{L}9$ 、 $\text{L}10$ 、 $\text{L}11$ 、 $\text{L}12$ 、 $\text{L}13$ または $\text{L}14$ の化合物であり、 Y^1 及び Z^{11} との結合位置が示されており、

【化56】



$\text{L}1$

10

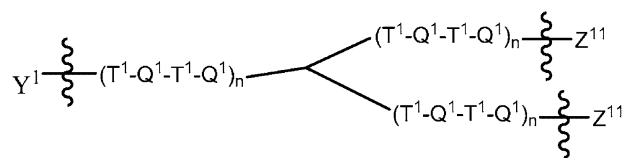
20

30

40

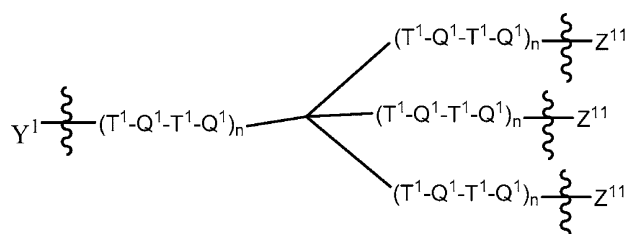
50

【化 5 7】

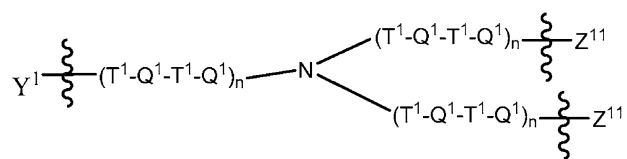


L2

10

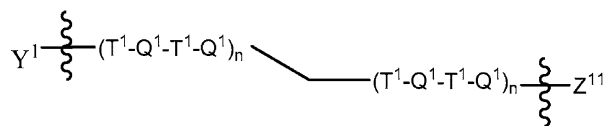


L3

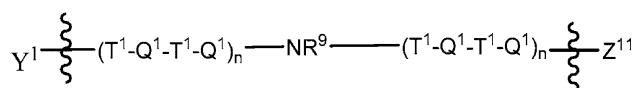


L4

20

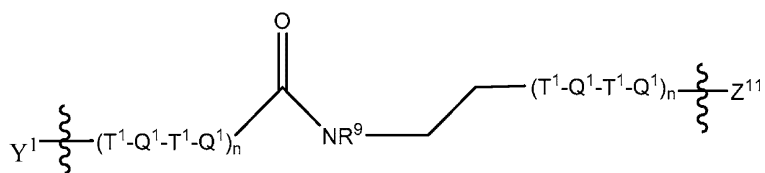


L5



L6

30

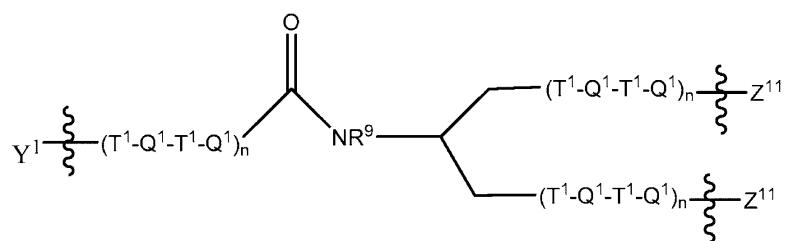


L7

40

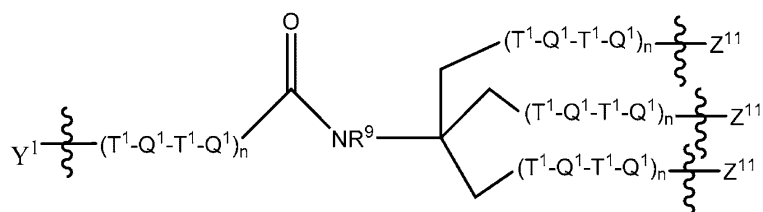
50

【化 5 8】



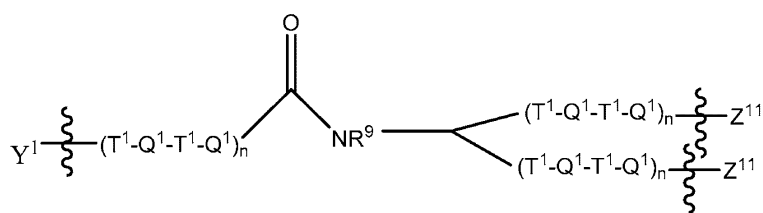
L8

10

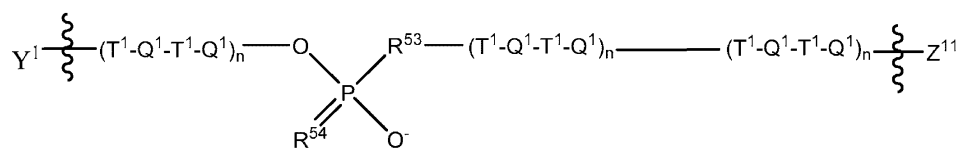


L9

20

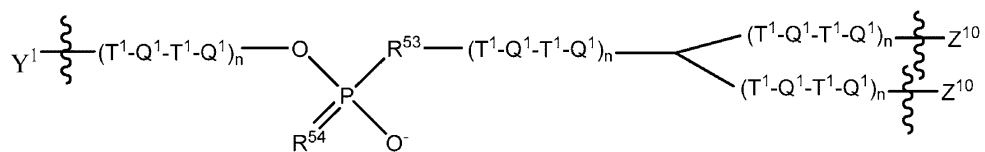


L10



L11

30

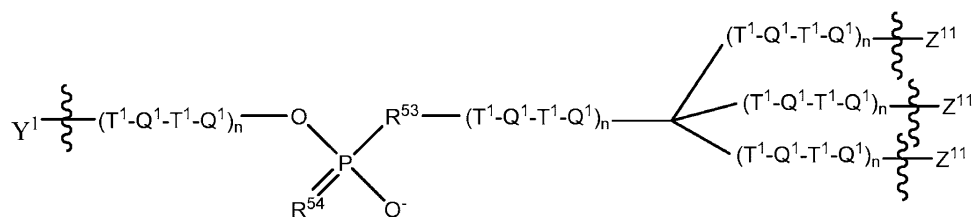


L12

40

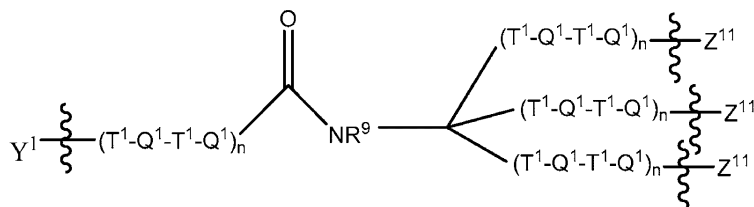
50

【化 5 9】



L13

10



L14

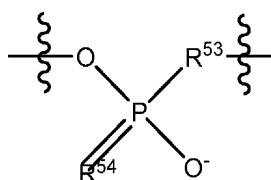
20

式中、各 T^1 は、独立して、存在しないか、アルキレン、アルケニレン、またはアルキニレンであり、ここで、該アルキレン、アルケニレン、またはアルキニレンの1つ以上の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 Q^1 は、独立して、存在しないか、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-NR^{49}-$ 、 $-NR^{49}-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^{49}-$ 、 $-NR^{49}-C(O)-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NR^{49}-C(O)-NR^{49}-$ 、二価のヘテロアリール基、または $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、及び $-NR^{49}-$ から選択されるヘテロ原子基（ここで、少なくとも2つの炭素原子が該ヘテロ原子基 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 及び $-NR^{49}-$ を任意の他のヘテロ原子基から分離している）、または次式の構造であり、

30

【化 6 0】



40

ここで、 R^{53} は $-O$ または $-NH$ であり、 R^{54} は $-O$ または $-S$ であり、

各 R^{49} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49a})-$

50

で置き換えられてもよく、該アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{49a})_2$ 、 $-\text{OR}^{49a}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{49a})$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各 R^{49a} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり；

R^{53} は、 $-\text{O}$ または $-\text{NH}$ であり；

R^{54} は、 $-\text{O}$ または $-\text{S}$ であり；

各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40であり、 n が0より大きい場合、各 $(\text{T}^1-\text{Q}^1-\text{T}^1-\text{Q}^1)$ の各 T^1 及び各 Q^1 は独立して選択される。

【0538】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも15塩基を含む。

【0539】

一部の実施形態では、 Y^1 の塩基配列は、表1Aに列举される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列を含むか、もしくは当該塩基配列であり、または Y^1 の塩基配列は、表1Aに列举される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの配列の15個の連続塩基を含む。

【0540】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも1つのホスホジエステルヌクレオチド間結合を含む。

【0541】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0542】

一部の実施形態では、 Y^1 は、キラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0543】

一部の実施形態では、 Y^1 は、 S_p 立体配置にキラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0544】

一部の実施形態では、 Y^1 は、 R_p 立体配置にキラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0545】

一部の実施形態では、 Y^1 は、キラル制御された修飾ヌクレオチド間結合またはキラル制御されたホスホロチオエートの場合、組成物内で少なくとも70%のジアステレオ純度を有するリンクラル中心を含む。

【0546】

一部の実施形態では、 Y^1 は、キラル制御された修飾ヌクレオチド間結合またはキラル制御されたホスホロチオエートの場合、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または99.5%のジアステレオ純度を有するリンクラル中心を含む。

【0547】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも1つの糖修飾を含む。

【0548】

一部の実施形態では、 Y^1 は、少なくとも1つの塩基修飾を含む。

【0549】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの骨格結合のパターンは、表1Aに列举される任意のオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターンである。

10

20

30

40

50

【0550】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターンは、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターンである。

【0551】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの化学修飾のパターンは、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドの化学修飾のパターンである。

【0552】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンは、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンである。

10

【0553】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び化学修飾のパターンは、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンである。

【0554】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び化学修飾のパターンは、表1Aに列挙されるオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドのものである Y^1 の骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンであり、 Y^1 の塩基配列は、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列を含むか、もしくは当該塩基配列であり、または Y^1 の塩基配列は、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの配列の15個の連続塩基を含む。

20

【0555】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性の減少を媒介する能力を有する。

【0556】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNase H、立体障害及び／またはRNA干渉によって媒介される機序を介して、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性の減少を媒介する能力を有する。

30

【0557】

一部の実施形態では、各 R^{47} は $-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$ であり、各 R^{48} は独立して、 $-H$ 、または $-(C_1-C_5)$ アルキルである。

【0558】

一部の実施形態では、

各 T^1 は、独立して、存在しないか、アルキレンであり、ここで、

アルキレンの1つ以上の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、及び $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

40

各 Q^1 は、独立して、存在しないか、 $C(O)$ 、 $C(O)-NR^{49}$ 、 $NR^{49}-C(O)$ 、または O 、及び NR^{49} から選択されるヘテロ原子基であり、ここで、少なくとも2つの炭素原子が、ヘテロ原子基 O 及び NR^{49} を任意の他のヘテロ原子基から分離しており、

各 R^{49} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_6)$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

各 n は、独立して、0、1、2、3または4であり、 n が0より大きい場合、各 $(T^1-Q^1-T^1-Q^1)$ の各 T^1 及び各 Q^1 は独立して選択される。

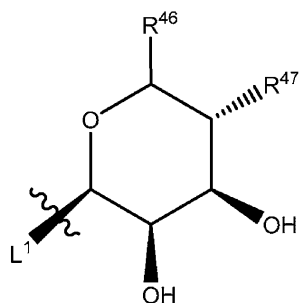
【0559】

50

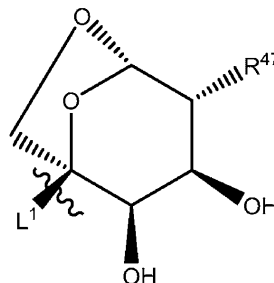
一部の実施形態では、本開示は、(a) PNP LA 3 を標的とする能力を有するオリゴヌクレオチドと、(b) 結合基と、(c) Z^{10} 及び Z^{11} から独立して選択される 1、2、または 3 つの部分とを含む、化合物に関し、ここで、該結合基は、該オリゴヌクレオチドと該 1、2 または 3 つの部分とを結合し、式中、

各 Z^{10} は、独立して、式 Z^{12} 、 Z^{13} 、 Z^{14} 、 Z^{15} 、 Z^{16} 、 Z^{17} 、 Z^{18} 、 Z^{19} 、 Z^{20} 、もしくは Z^{21} の化合物、またはその幾何異性体もしくは位置異性体であり、 L^1 との結合位置が示されており、

【化 61】

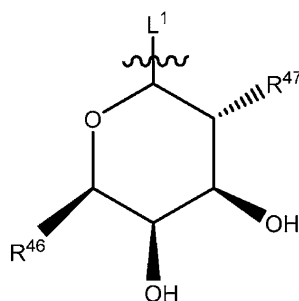


Z^{12}



Z^{13}

;



Z^{16}

ここで、各 R^{46} は、独立して、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CN}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SH}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、またはアリアルもしくはヘテロアリアルであり、ここで、該アリアルまたはヘテロアリアルは、 R^{51} で任意に置換され、

各 R^{47} は、独立して、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})$

$-R^{48}$ 、 $-N(R^{48})-C(O)-N(R^{48})_2$ 、 $-N(R^{48})-C(O)-OR^{48}$ 、 $-N(R^{48})-S(O)_2-R^{48}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、該テトラゾール及びトリアゾールは、 R^{48} で任意に置換され、

各 R^{48} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_5)$ アルキル、ハロ置換 (C_1-C_5) アルキル、ハロ置換 $-(C_3-C_6)$ シクロアルキル、 $-(C_1-C_5)$ アルケニル、 $-(C_1-C_5)$ アルキニル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルケニル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルキニル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、該アルキルまたはシクロアルキルの $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{52})-$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{52})_2$ 、 $-OR^{52}$ 、及び $-S(R^{52})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 R^{51} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_3-C_{20})$ シクロアルキル、 $-(C_1-C_{60})$ アルケニル、 $-(C_1-C_{60})$ アルキニル、または $-(C_1-C_{60})$ アルキルであり、ここで、該シクロアルキルの1～6個の $-CH_2-$ 基または該アルキルの1～20個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49})_2$ 、 $-OR^{49}$ 、及び $-S(R^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

各 R^{52} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、 $-(C_1-C_{20})$ アルケニル、 $-(C_1-C_{20})$ アルキニル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49})_2$ 、 $-OR^{49}$ 、及び $-S(R^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

各 R^{49} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49a})-$ で置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49a})_2$ 、 $-OR^{49a}$ 、及び $-S(R^{49a})$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各 R^{49a} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_6)$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、

各 R^{49a} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_6)$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、

Z^{11} は、式 (B) の化合物であり、 L^2 との結合位置が示されており、

10

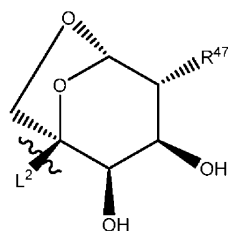
20

30

40

50

【化 6 2】



(B)

10

各 R^{47} は、独立して、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-N(R^{48})_2$ 、 $-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$ 、 $-N(R^{48})-C(O)-N(R^{48})_2$ 、 $-N(R^{48})-C(O)-OR^{48}$ 、 $-N(R^{48})-S(O)_2-R^{48}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、該テトラゾール及びトリアゾールは、 R^{48} で任意に置換され、

20

各 R^{48} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_5)$ アルキル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルキル、ハロ置換 $-(C_3-C_6)$ シクロアルキル、 $-(C_1-C_5)$ アルケニル、 $-(C_1-C_5)$ アルキニル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルケニル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルキニル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、該アルキルまたはシクロアルキルの $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{52})-$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{52})_2$ 、 $-OR^{52}$ 、及び $-S(R^{52})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも 2 つの炭素原子で分離されており、

30

各 R^{49} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも 2 つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの 1~6 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49a})-$ で置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49a})_2$ 、 $-OR^{49a}$ 、及び $-S(R^{49a})$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも 2 つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各 R^{49a} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_6)$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、

46. 各 R^{52} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、 $-(C_1-C_{20})$ アルケニル、 $-(C_1-C_{20})$ アルキニル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも 2 つの炭素原子で分離された該アルキルまたはシクロアルキルの 1~6 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、該アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49})_2$ 、 $-OR^{49}$ 、及び $-S(R^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、該ヘテロ原子基は、少なくとも 2 つの炭素原子で分離されており、ここで、該アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよい。特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御された PNP LA 3 オリゴヌクレオチド組成物であって、当該特定のオリゴヌクレオチド型は、

40

a) 共通塩基配列及び長さであって、当該塩基配列は、PNP LA 3 標的遺伝子に相補

50

的である、当該共通塩基配列及び長さ、

b) 骨格結合の共通パターン、

c) 骨格キラル中心の共通パターンであって、当該骨格キラル中心の共通パターンは、キラル制御されたキラル中心を含む少なくとも1つのヌクレオチド間結合を含む、当該骨格キラル中心の共通パターンによって特徴付けられ、

当該組成物は、特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同じ共通塩基配列と長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して、富化されているという点でキラル制御され、

当該オリゴヌクレオチド組成物は、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性を減少させる能力を有する、当該組成物。

10

【0560】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNase H、立体障害及び／またはRNA干渉によって媒介される機序を介して、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性を減少させる能力を有する。

【0561】

一部の実施形態では、本開示は、先行請求項のいずれか1項に記載の化合物を含む、組成物に関する。

【0562】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNAi剤であるPNPLA3オリゴヌクレオチドを含む組成物に関し、当該一本鎖RNAi剤は、PNPLA3標的RNA配列に相補的または実質的に相補的であり、

20

約15～約49ヌクレオチドの長さを有し、

標的特異的なRNA干渉を誘導する能力を有し、

当該一本鎖RNAi剤は、少なくとも1つの非天然の塩基、糖、及び／またはヌクレオチド間結合を含み、

当該組成物は、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性を減少させる能力を有する。

【0563】

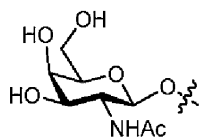
一部の実施形態では、1つまたは複数のオリゴヌクレオチドは、架橋二環式ケタールをさらに含む。

30

【0564】

一部の実施形態では、R^{CD}は、

【化63】



40

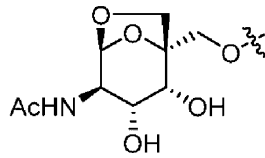
である。

【0565】

一部の実施形態では、R^{CD}は、

50

【化 6 4】



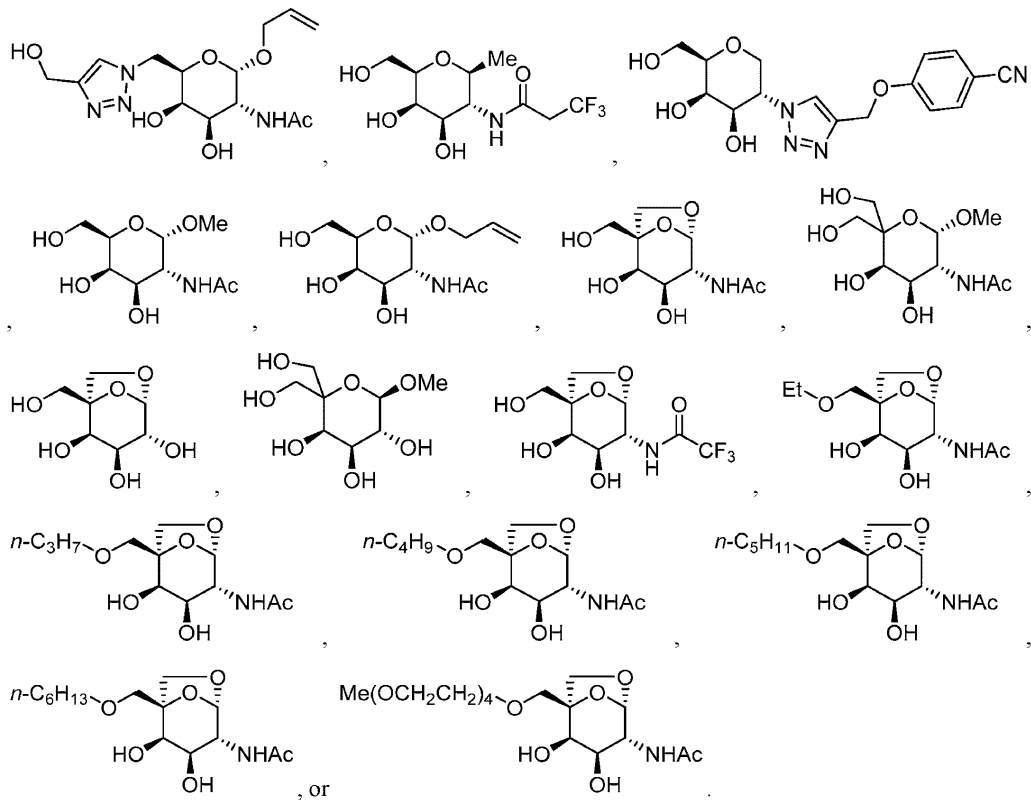
10

である。

【 0 5 6 6 】

一部の実施形態では、 R^{CD} は、 $R^{CD}-H$ が、

【化 6 5】



20

30

40

であるような構造のものである。

【 0 5 6 7 】

一部の実施形態では、 R^{CD} は、リンカーを介して、1つまたは複数のオリゴヌクレオチドに繋がれる。

【 0 5 6 8 】

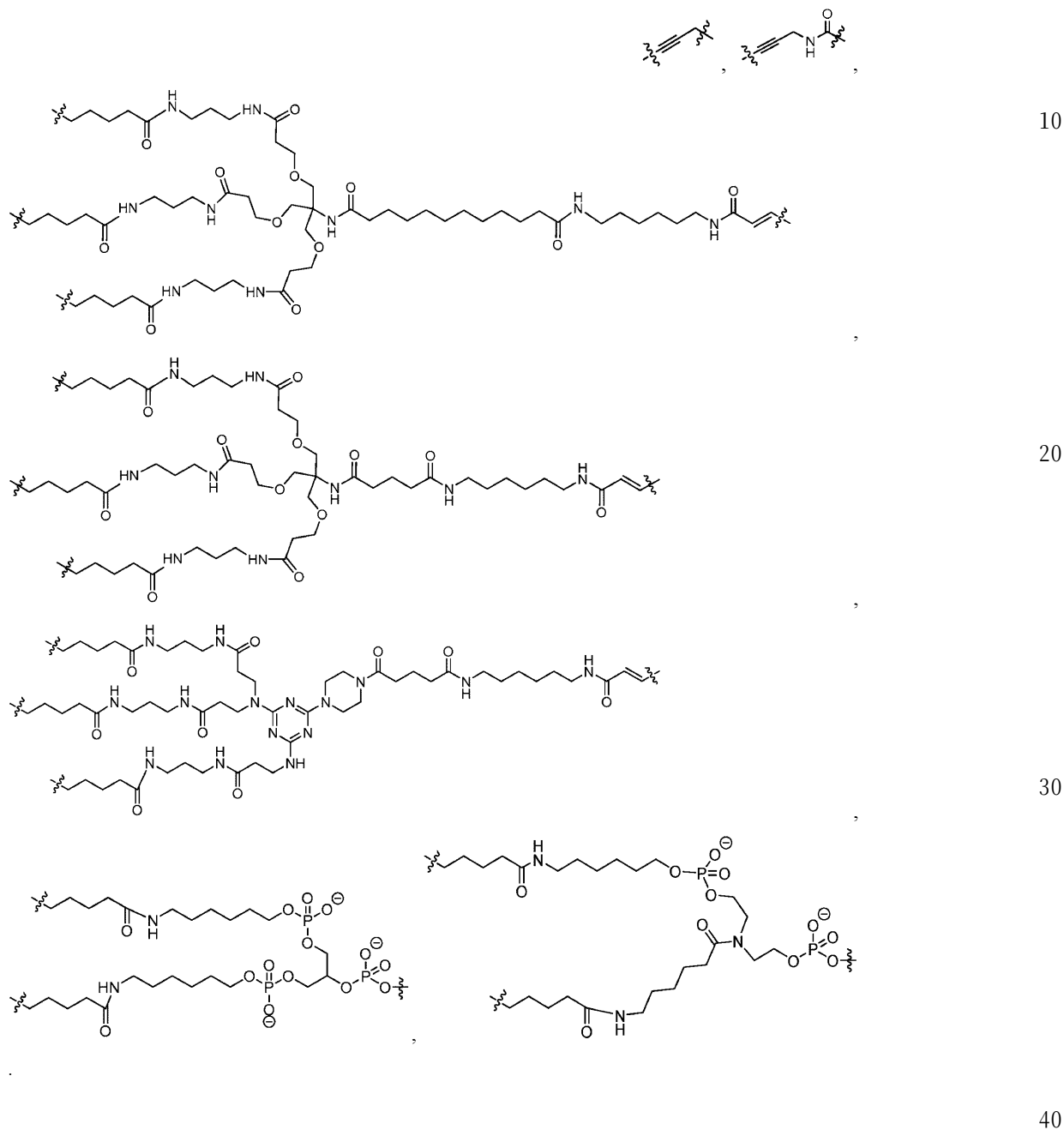
一部の実施形態では、リンカーは、 L^M である。

50

【 0 5 6 9 】

一部の実施形態では、リンカーは、

【化 6 6 】

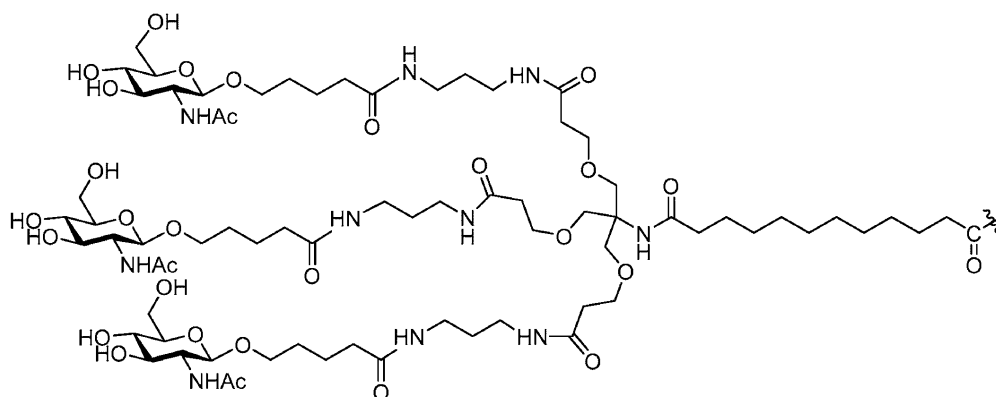


の構造を有する。

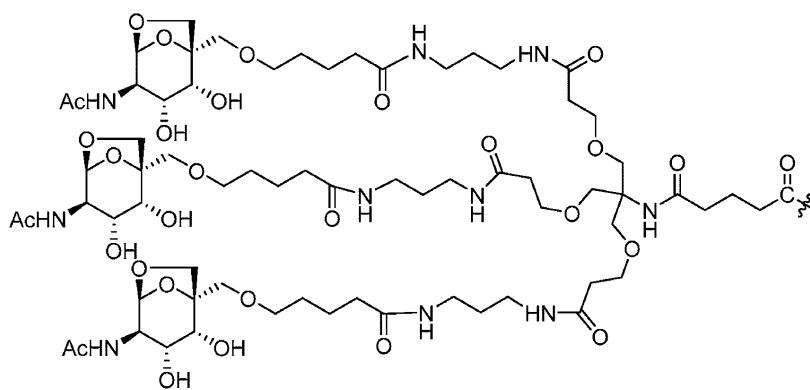
【 0 5 7 0 】

一部の実施形態では、 R^{CD} は、以下から選択される：

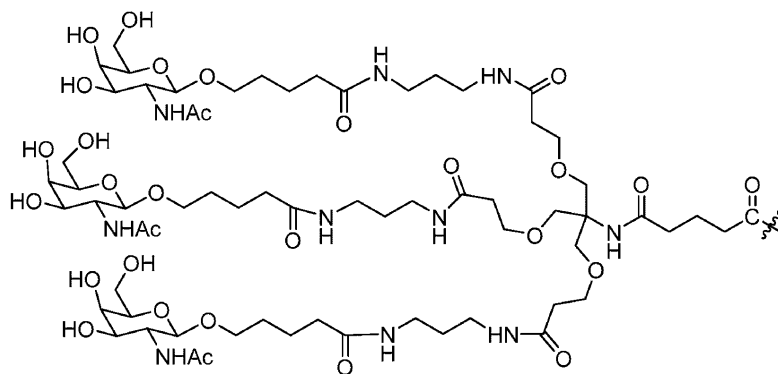
【化 6 7】



10



20

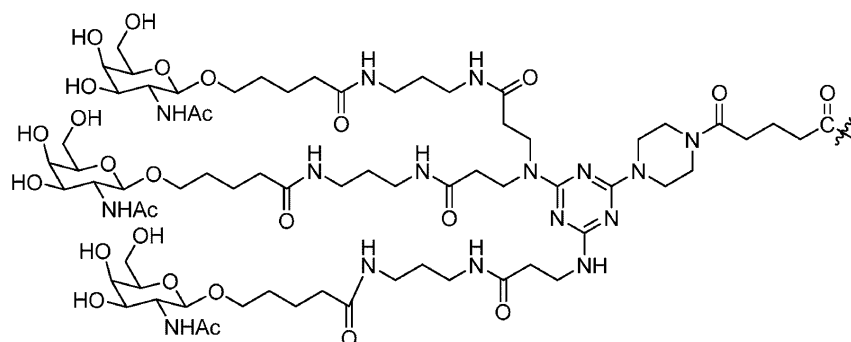


30

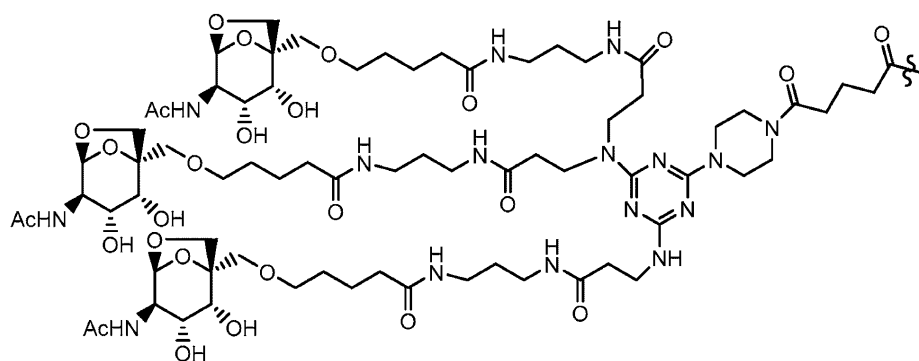
40

50

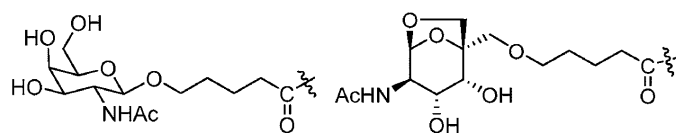
【化 6 8】



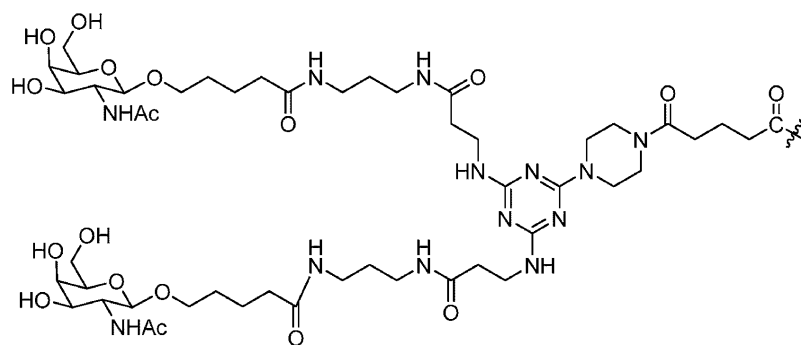
10



20



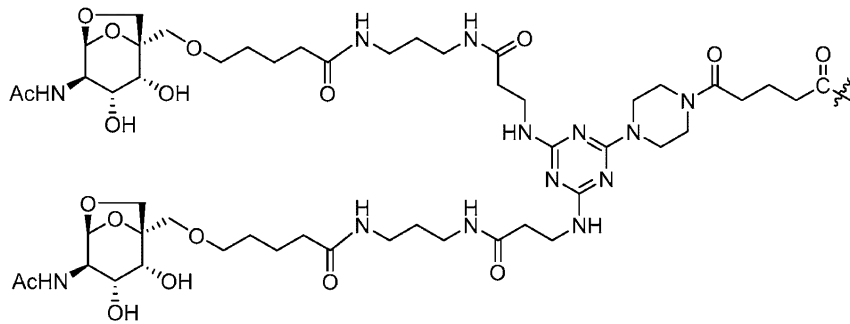
30



40

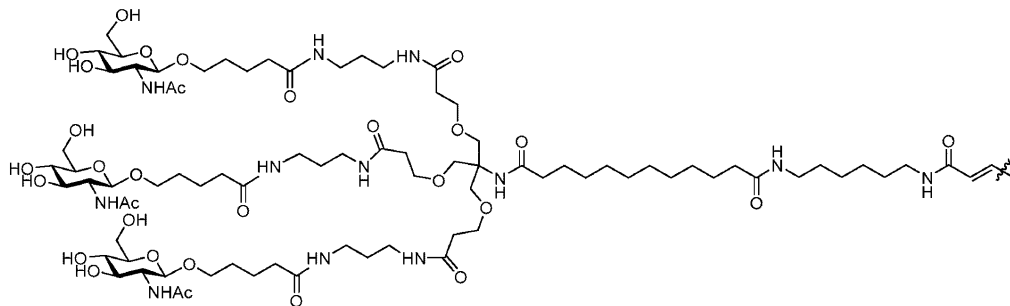
50

【化 6 9】



10

, or



20

【0571】

一部の実施形態では、本開示は、少なくとも1つの薬学的に許容可能な賦形剤と混合された、先行請求項のいずれか1項に記載の組成物を治療有効量で含む、医薬組成物に関する。

【0572】

一部の実施形態では、組成物は、抗炎症性剤、抗糖尿病剤、及びコレステロール／脂質調整剤からなる群から選択される少なくとも1つの追加の医薬品をさらに含む。

30

【0573】

一部の実施形態では、当該追加の医薬品は、アセチル-CoAカルボキシラーゼ（ACC）阻害剤、ジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ1（DGAT-1）阻害剤、ジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ2（DGAT-2）阻害剤、モノアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ阻害剤、ホスホジエステラーゼ（PDE）-10阻害剤、AMPK活性化剤、スルホニル尿素、メグリチニド、 α -アミラーゼ阻害剤、 α -グルコシドヒドロラーゼ阻害剤、 α -グルコシダーゼ阻害剤、PPAR γ アゴニスト、PPAR α/γ アゴニスト、ビグアニド、グルカゴン様ペプチド1（GLP-1）調節剤、リラグルチド、アルビグルチド、エキセナチド、アルビグルチド、リキシセナチド、デュラグルチド、セマグルチド、タンパク質チロシンホスファターゼ-1B（PTP-1B）阻害剤、SIRT-1活性化剤、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP-IV）阻害剤、インスリン分泌促進剤、脂肪酸酸化阻害剤、A2アンタゴニスト、c-junアミノ末端キナーゼ（JNK）阻害剤、グルコキナーゼ活性化剤（GKa）、インスリン、インスリン模倣剤、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤、VPAC2受容体アゴニスト、SGLT2阻害剤、グルカゴン受容体調節剤、GPR119調節剤、FGF21誘導体もしくはアナログ、TGR5受容体調節剤、GPBAR1受容体調節剤、GPR40アゴニスト、GPR120調節剤、高親和性ニコチン酸受容体（HM74A）活性化剤、SGLT1阻害剤、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ酵素の阻害剤もし

40

50

くは調節剤、フルクトース 1, 6-ジホスファターゼの阻害剤、アルドースレダクターゼの阻害剤、ミネラルコルチコイド受容体阻害剤、TORC2の阻害剤、CCR2及び／またはCCR5の阻害剤、PKCアイソフォーム（例えば、PKC α 、PKC β 、PKC γ ）の阻害剤、脂肪酸シンターゼの阻害剤、セリンパルミトイルトランスフェラーゼの阻害剤、GPR81、GPR39、GPR43、GPR41、GPR105、Kv1.3、レチノール結合タンパク質4、グルココルチコイド受容体、ソマトスタイン受容体の調節剤、PDHK2もしくはPDHK4の阻害剤もしくは調節剤、MAP4K4の阻害剤、IL1ベータを含むIL1ファミリーの調節剤、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、スクアレンシンターゼ阻害剤、フィブラート、胆汁酸隔離剤、ACAT阻害剤、MTP阻害剤、リポオキシゲナーゼ阻害剤、コエステロール吸収阻害剤、PCSK9調節剤、コレステリルエステル転移タンパク質阻害剤ならびにRXRアルファの調節剤からなる群から選択される。

【0574】

一部の実施形態では、組成物は、システアミンもしくはその薬学的許容可能な塩、システアミンもしくはその薬学的許容可能な塩、抗酸化化合物、レシチン、ビタミンB複合体、胆汁塩製剤、カンナビノイド-1（CB1）受容体のアンタゴニスト、カンナビノイド-1（CB1）受容体のインバースアゴニスト、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体）活性制御剤、ベンゾチアゼピンもしくはベンゾチエピン化合物、タンパク質チロシンホスファターゼPTPRUを阻害するRNAアンチセンス構築物、ヘテロ原子結合置換ピペリジン及びその誘導体、ステアロイル補酵素アルファデルター9デサチュラーゼを阻害する能力を有するアザシクロペンタン誘導体、アディポネクチンの分泌促進活性もしくは誘導活性を有するアシルアミド化合物、第四級アンモニウム化合物、グラチラマー酢酸塩、ペントラキシンタンパク質、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、n-アセチルシステイン、イソフラボン化合物、マクロライド抗生物質、ガレクチン阻害剤、抗体、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの追加の医薬品をさらに含む。

【0575】

一部の実施形態では、本開示は、ヒトにおける、非アルコール性脂肪性肝疾患もしくは非アルコール性脂肪性肝炎の評価スコアリングシステムの重症度の少なくとも1点の減点、非アルコール性脂肪性肝炎活性の血清マーカーレベルの低下、非アルコール性脂肪性肝炎疾患活性の低下、または非アルコール性脂肪性肝炎の医学的結果の低減のための方法であって、そのような減点、低下または低減を必要とするヒトに、それを必要とする患者に対して治療有効量の先行請求項のいずれか1項に記載の組成物を投与するステップを含む、方法に関する。

【0576】

一部の実施形態では、本開示は、ヒトにおける、脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、肝硬変を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、または肝硬変及び肝細胞癌を伴う非アルコール性脂肪性肝炎を治療するための方法であって、そのような治療を必要とするヒトに、それを必要とする患者に対して治療有効量の先行請求項のいずれか1項に記載の組成物を投与するステップを含む、方法に関する。

【0577】

一部の実施形態では、本開示は、ヒトにおける、高脂血症、I型糖尿病、II型真性糖尿病、特発性I型糖尿病（Ib型）、成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）、早期発症性2型糖尿病（EOD）、若年発症性非定型糖尿病（YOAD）、若年発症成人型糖尿病（MODY）、栄養不良に関連する糖尿病、妊娠糖尿病、冠状動脈性心疾患、虚血性脳卒中、血管形成術後の再狭窄、末梢血管疾患、間欠性跛行、心筋梗塞、脂質異常症、食後脂肪血症、耐糖能異常（IGT）の状態、空腹時血漿グルコース障害の状態、代謝性アシドーシス、ケトン症、関節炎、肥満症、骨粗鬆症、高血圧、うっ血性心不全、左心室肥大、末梢性動脈疾患、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、白内障、糖尿病性腎症、糸球体硬化症

10

20

30

40

50

、慢性腎不全、糖尿病性ニューロパシー、メタボリックシンドローム、X症候群、月経前症候群、狭心症、血栓症、アテローム性動脈硬化症、一過性脳虚血発作、脳卒中、血管再狭窄、高血糖症、高インスリン血症、高トリグリセリド血症、インスリン抵抗性、グルコース代謝障害、勃起不全、皮膚及び結合組織障害、足部潰瘍及び潰瘍性大腸炎、内皮機能不全及び血管コンプライアンス低下、高アポBリポタンパク血症、アルツハイマー、統合失調症、認知障害、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、及び過敏性腸症候群、非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）、または非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）を治療するための方法であって、そのような治療を必要とするヒトに、それを必要とする患者に対して治療有効量の先行請求項のいずれか1項に記載の組成物を投与するステップを含む、方法に関する。

10

【0578】

一部の実施形態では、本開示は、ヒトにおける、脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、肝硬変を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、または肝硬変及び肝細胞癌を伴う非アルコール性脂肪性肝炎を治療するための方法であって、そのような治療を必要とするヒトに、

a. 先行請求項のいずれか1項に記載の第1の組成物と、

b. 抗炎症性剤、抗糖尿病剤、及びコレステロール／脂質調整剤からなる群から選択される少なくとも1つの追加の医薬品、ならびに少なくとも1つの薬学的に許容可能な賦形剤を含む第2の組成物と

を含む、治療有効量の2つの別個の医薬組成物を投与するステップを含む、方法に関する。

20

【0579】

一部の実施形態では、当該第1の組成物及び当該第2の組成物は、同時に投与される。

【0580】

一部の実施形態では、当該第1の組成物及び当該第2の組成物は、逐次的に任意の順で投与される。

【0581】

一部の実施形態では、本開示は、ヒトにおける、門脈圧亢進症、肝タンパク質合成能力、高ビリルビン血症、または脳障害を低減するための方法であって、そのような治療を必要とするヒトに、それを必要とする患者に対して治療有効量の先行請求項のいずれか1項に記載の組成物を投与するステップを含む、方法に関する。

30

【0582】

一部の実施形態では、本開示は、細胞における、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、活性及び／またはレベルを減少させる方法であって、当該細胞を、先行請求項のいずれか1項に記載の化合物または組成物と接触させるステップを含む、方法に関する。

【0583】

一部の実施形態では、本開示は、患者における、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、活性及び／またはレベルを減少させる方法であって、細胞を、先行請求項のいずれか1項に記載の化合物または組成物と接触させるステップを含む、方法に関する。

40

【0584】

一部の実施形態では、本明細書で使用される用語であるGalNAcは、GalNAcと構造的に同様である、及び／またはGalNAcの少なくとも1つの機能（例えば、ASPGRへの結合）を行う化学物質を指す。

【0585】

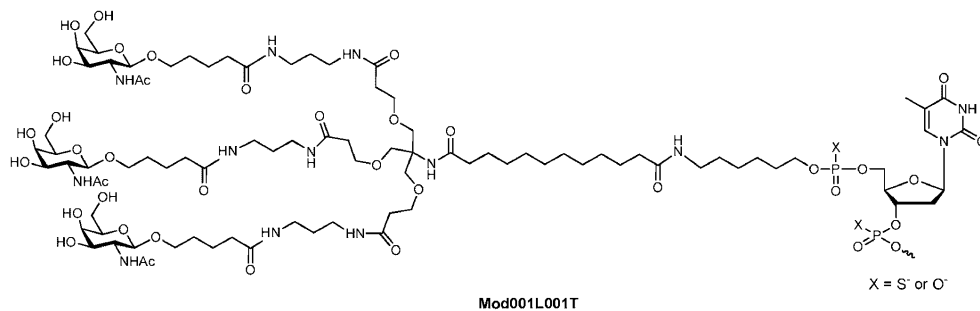
一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の5'末端は、GalNAcまたはそのバリエーションもしくは誘導体を含む。

【0586】

PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の5'末端におけるGalNAc部分（例えば、5'GalNAc部分）の非限定的な例が以下に示され、ここで、該5'

50

末端構造は：
【化 70】



10

で表される。

【0587】

一部の実施形態では、GalNAc部分、例えば、GalNAcまたはそのバリエーションもしくは誘導体は、以下のいずれかに記載されている：Migawa et al. 2016 Bioorg. Med. Chem. Lett. 26:2914-7、Ostergaard et al. 2015 Bioconjug. Chem. 26:1451-1455、Prakash et al. 2014 Nucl. Acids Res. 42:8796-8807、Prakash et al. 2016 J. Med. Chem. 59:2718-33、Shemesh et al. 2016 Mol. Ther. Nucl. Acids 5:e319、St-Pierre et al. 2016 Bioorg. Med. Chem. 24:2397-409、及び／またはYu et al. 2016 Mol. Ther. Nucl. Acids 5:e317。

20

【0588】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化された化学物質（例えば、さらなる成分）は、ASPGRに結合する。

30

【0589】

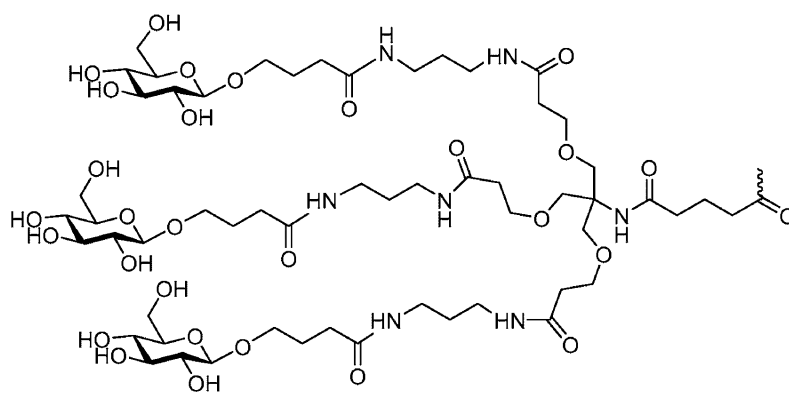
一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化された化学物質（例えば、さらなる成分）は、ASPGRに結合し、Mod031、Mod034、Mod035、Mod036、Mod038、Mod039、Mod040、またはMod041のいずれかを含む。

【0590】

一部の実施形態では、さらなる成分は、Mod079、Mod080、Mod081、Mod082、またはMod083のいずれかであってもよいし、そのいずれかを含んでもよい。一部の実施形態では、さらなる成分は、以下のいずれかであってもよいし、以下のいずれかを含んでもよい：

40

【化 7 1】



10

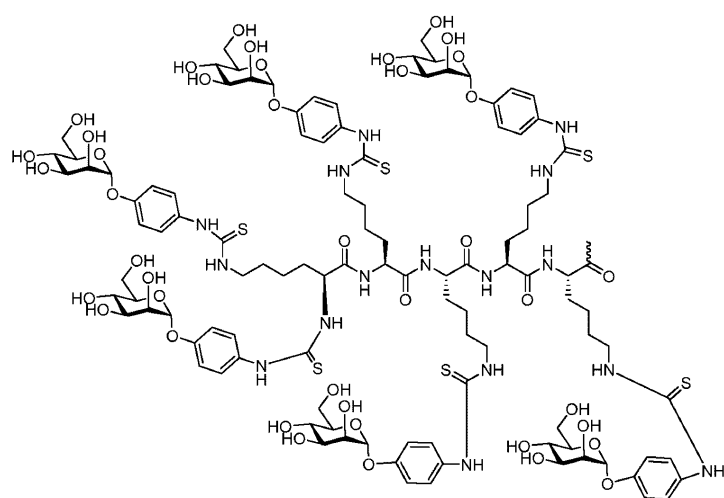
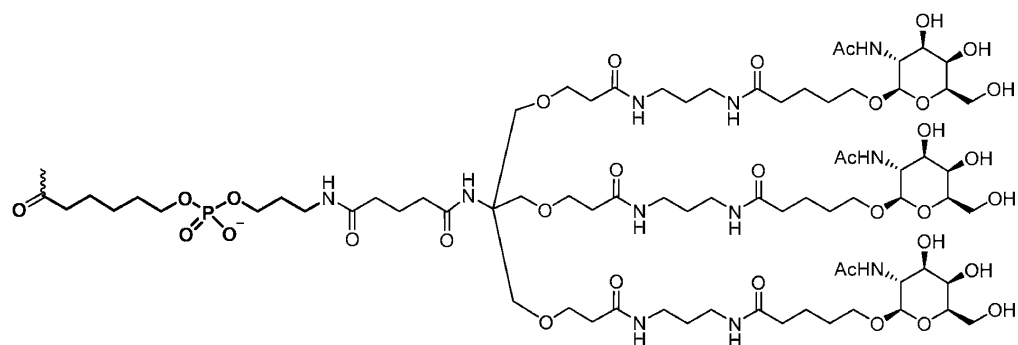
20

30

40

50

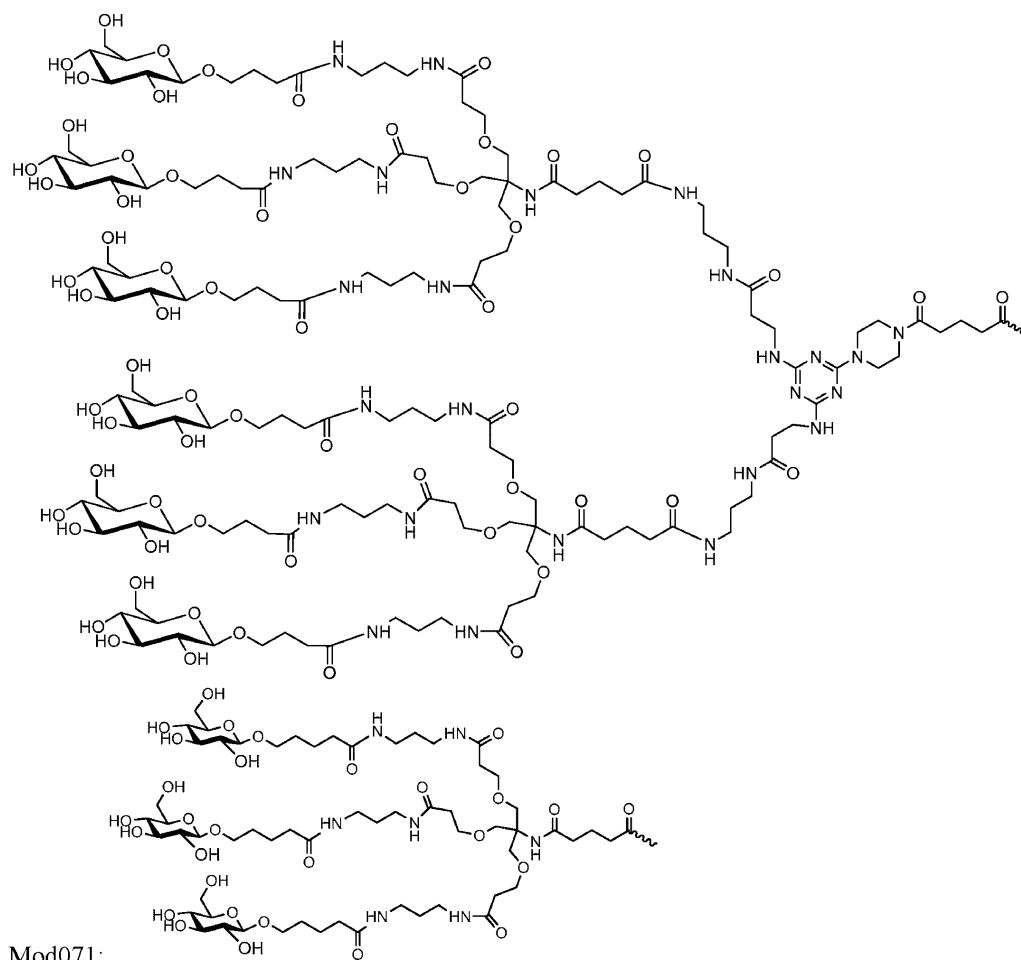
Mod060:



Mod065:

【化 7 3】

Mod070:



Mod071:

10

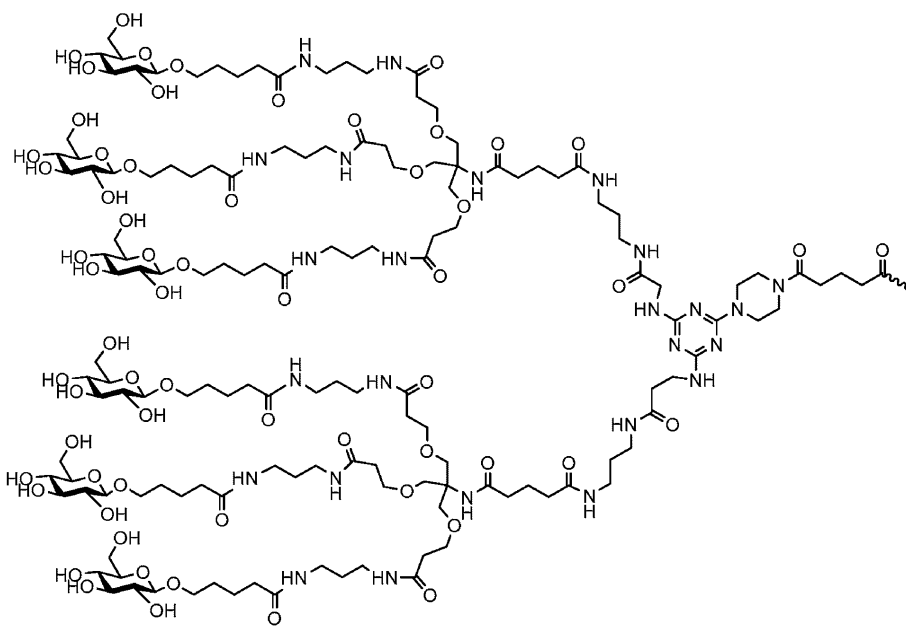
20

30

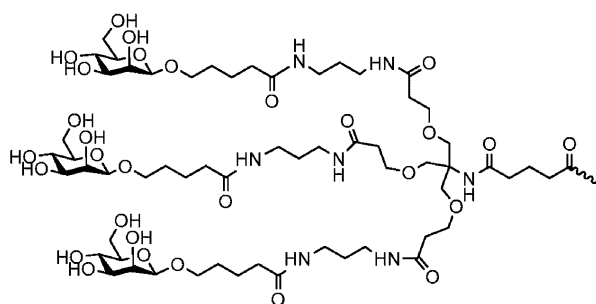
40

50

【化 7 4】



Mod072:



Mod073:

10

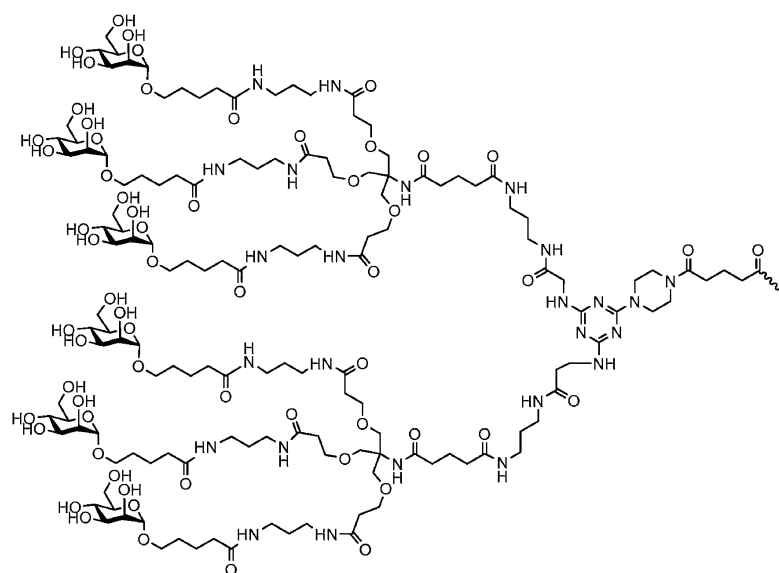
20

30

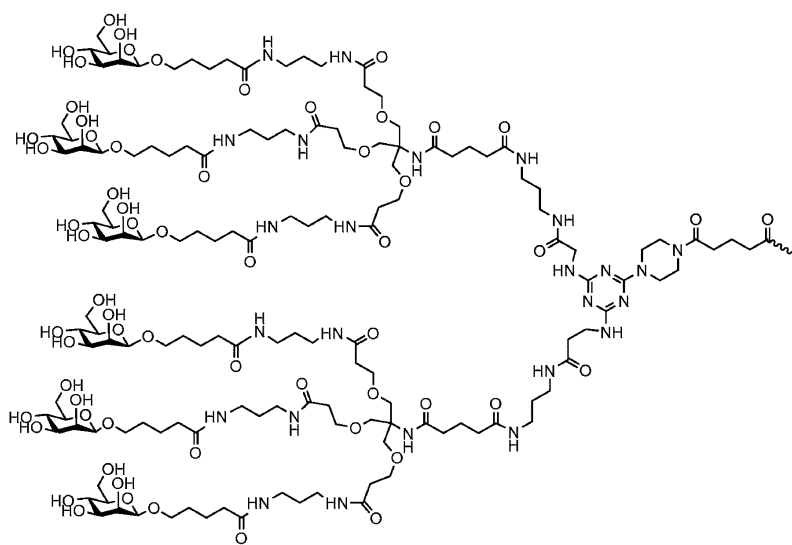
40

50

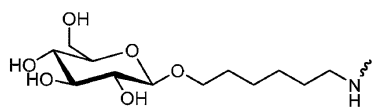
【化 7 5】



Mod074:

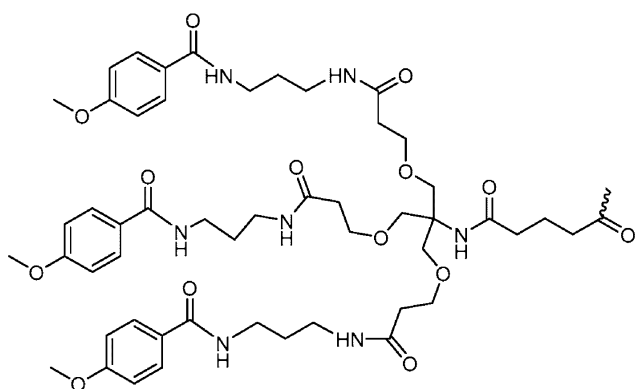


Mod075:

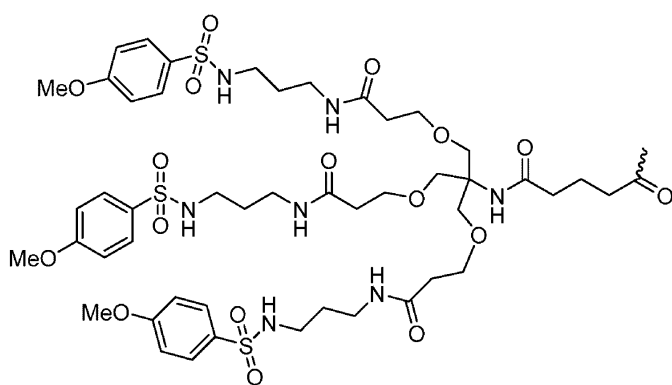


Mod076:

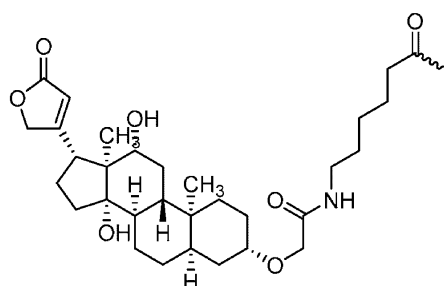
【化 7 6】



Mod077:



Mod084:



Mod085:

10

20

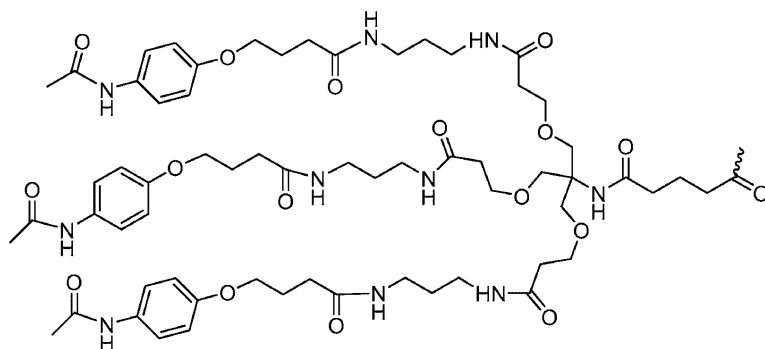
30

40

50

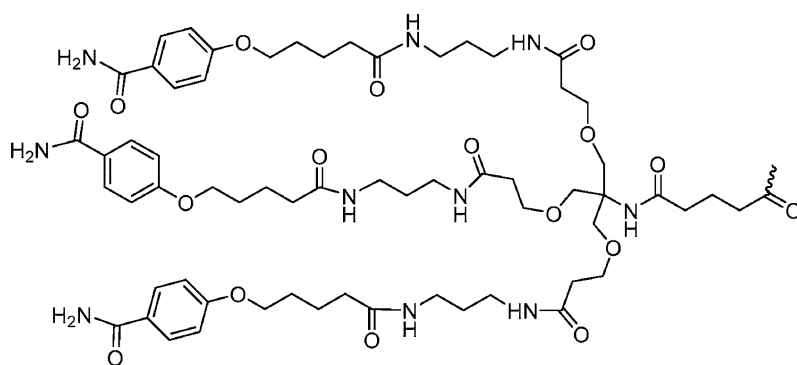
【化 7 7】

Mod087:



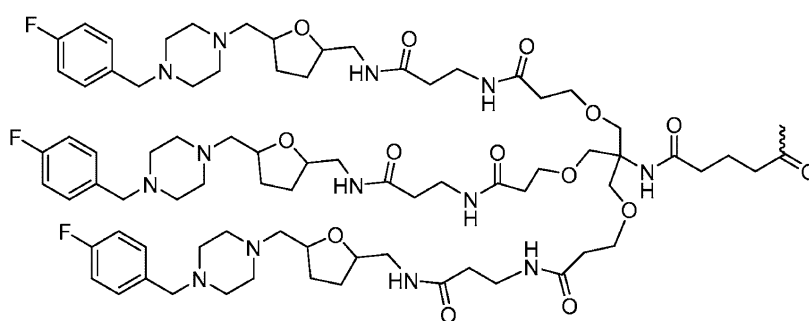
10

Mod088:



20

or Mod089:



30

【 0 5 9 1】

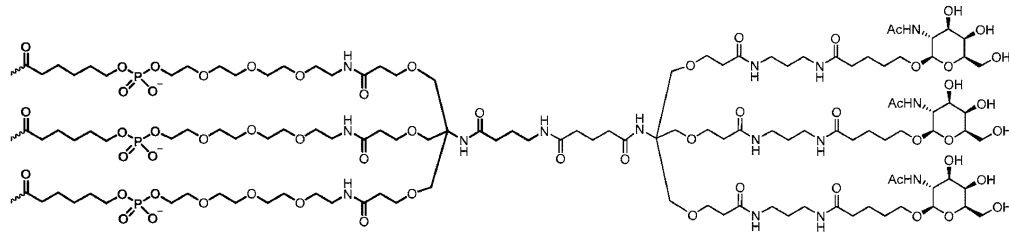
一部の実施形態では、さらなる成分は、以下であってもよいし、以下を含んでもよい：

40

50

【化 7 8】

Mod061:



10

ここで、Mod061は、3つの同一または非同一のオリゴヌクレオチドに複合体化される。

【0592】

PNPLA3オリゴヌクレオチドの5'-ヌクレオシドまたは5'-ヌクレオチド
 一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉を介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉やRISC（RNase H介在性ノックダウンもしくは遺伝子発現の立体障害を含むがこれに限定されない）が関与しない生化学的機序を介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉及び／またはRNase H介在性ノックダウンを介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、標的遺伝子のmRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／または、mRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって、誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、もしくは当技術分野で既知の任意の5'-ヌクレオシドまたは任意の5'-ヌクレオチドを含有し得る。

20

30

【0593】

一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の該5'-ヌクレオシド、例えば、5'末端のヌクレオシド（例えば、N1の）は、任意のヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド、または当技術分野で既知のユニバーサルヌクレオシドでよい。

40

【0594】

一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の該5'-ヌクレオシド、例えば、5'末端のヌクレオシド（例えば、N1の）は、当該塩基における2'修飾を含み得る。

【0595】

一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の該5'末端のヌクレオシド（例えば、N1の）は、2'-デオキシ（DNA）、2'-F、2'-OMe、もしくは2'-MOE、または逆位ヌクレオシドもしくはヌクレオチドを含み得る。

【0596】

当該ssRNAi剤の5'末端におけるヌクレオシドが2'-デオキシ（DNA）であるssRNAi剤形式の非限定的な例としては、図1の形式1～5、16～18、22～2

50

9、32～78、84～93、97、及び103～107が挙げられる。

【0597】

当該ssRNAi剤の5'末端におけるヌクレオシドが2'-FであるssRNAi剤形式の非限定的な例としては、図1の形式11～15、19、79～83、及び98～100が挙げられる。

【0598】

当該ssRNAi剤の5'末端におけるヌクレオシドが2'-OMeであるssRNAi剤形式の非限定的な例としては、図1の形式6～10、20～21、30～31、94～96、及び101～102が挙げられる。

【0599】

一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の5'末端における核酸塩基（例えば、N1の）はTである。一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の5'末端における核酸塩基（例えば、N1の）はUである。一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の5'末端における核酸塩基（例えば、N1の）はAである。一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の5'末端における核酸塩基（例えば、N1の）はGである。一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤の5'末端における核酸塩基（例えば、N1の）はCである。

【0600】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤は、5'ミスマッチを有し、当該一本鎖RNAi剤の5'末端（N1位）の核酸塩基は、標的転写産物の対応する位置からのミスマッチを有する。当技術分野で報告されているように、5'-ヌクレオシド部分と標的転写産物の対応する位置の相補性は、有効な二本鎖siRNAに必要なではない。本明細書に記載される一本鎖RNAi剤の様々な例もまた、5'ミスマッチを有し、なおRNA干渉を誘導する能力を有する。5'位（N1）で標的mRNAの配列とのミスマッチを有する有効なssRNAi剤が構築されている。5'位で標的mRNAの配列とのミスマッチを有する有効なssRNAi剤が構築されており、該ssRNAi剤のN1位はTである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤はN1で5'ミスマッチを有し、ここで、N1の核酸塩基はTである。

【0601】

一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドはLNAである。

【0602】

一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドは5'-H（デオキシ）である。当該5'位のヌクレオシドが5'-H（デオキシ）である有効なssRNAi剤が構築されている。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドはデオキシT、A、G、またはCである。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドはデオキシTである。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドはデオキシAである。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドは2'-Fである。当該5'位のヌクレオシドが2'-Fである有効なssRNAi剤が構築されている。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドは2'-F Aである。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドは2'-F Gである。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドは2'-OMeである。当該5'位のヌクレオシドが2'-OMeである有効なssRNAi剤が構築されている。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドは2'-OMe Uである。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドは2'-OMe Aである。一部の実施形態では、5'位のヌクレオシドは2'-OMe Cである。

【0603】

一本鎖RNAi剤を含めたPNPLA3オリゴヌクレオチドのシード領域

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、または、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、もしくは当技術分野で既知の任意のシード領域またはその一部もしくは構造的要素を含み得る。

【0604】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤のシード領域は、転写産物標的への当該RNA i 剤の結合に特に重要なRNA i 剤の部分である。Lim et al. 2005 Nature 433:769-773。多くの場合、RNA i 剤アンチセンス鎖のシード領域とmRNA標的の完全な相補性は、高RNA i 活性に必要であると報告されている。例えば、シード領域の6位での単一のミスマッチが、二本鎖RNA i 活性を無効にすると報告されている。Lim et al. 2005 Nature 433:769-773。対照的に、dsRNA i のアンチセンス鎖は、シード領域以外、例えば、5'位、ポストシード領域内、及び3'末端ジヌクレオチド内でのミスマッチにはより適すると報告されている。

【0605】

一部の実施形態では、該シード領域の各ヌクレオチドは2'-OMeである。

【0606】

一部の実施形態では、該シード領域の各ヌクレオチドは2'-OMeであり、該ポストシード領域の各ヌクレオチドは2'-OMeである。

【0607】

一部の実施形態では、該シード領域の1つのヌクレオチドは2'-Fであり、該シード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeである。

【0608】

一部の実施形態では、該シード領域の1つのヌクレオチドは2'-Fであり、該シード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeであり、該ポストシード領域の1つのヌクレオチドは2'-Fであり、該ポストシード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeである。

【0609】

一部の実施形態では、2位(5'末端から数えて)のヌクレオチドは2'-Fであり、該シード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeであり、該ポストシード領域の1つのヌクレオチドは2'-Fであり、該ポストシード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeである。

【0610】

一部の実施形態では、2位(5'末端から数えて)のヌクレオチドは2'-Fであり、該シード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeであり、14位(5'末端から数えて)のヌクレオチドは2'-Fであり、該ポストシード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeである。

【0611】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、任意の数のNが2'-デオキシ、2'-F、2'-OMe、及び/または2'-OHである場合があり、及び/または当該糖の2'位に任意の他の修飾を有するシード領域を含む場合があるシード領域を含む。

【0612】

一本鎖RNA i 剤のシード領域の様々な非限定的な例を表1A、図、及び本明細書の他の場所に示す。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の1つ以上のヌクレオチドは独立して2'-Fである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の2つ以上のヌクレオチドは独立して2'-Fである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の3つ以上のヌクレオチドは独立して2'-Fである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の4つ以上のヌクレオチドは独立して2'-Fである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の5つ以上のヌクレオチドは独立して2'-Fである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の6つ以上のヌクレオチドは独立して2'-Fである。

【0613】

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の1つ以上のヌクレオチド間結合は独立してPS（ホスホロチオエート）である。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の2つ以上のヌクレオチド間結合は独立してPSである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i剤は、シード領域を含み、この場合、シード

【 0 6 2 3 】

【 0 6 2 4 】

【 0 6 2 5 】

【 0 6 2 6 】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の1つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してS_pである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の2つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してS_pである。一部の実施形態

では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の3つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してSpである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の4つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してSpである。

【0627】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の1つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してRpである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の2つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してRpである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の3つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してRpである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の4つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してRpである。

10

【0628】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の1つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してPSである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の2つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してPSである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の3つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してPSである。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、シード領域の任意の4つ以上の非連続ヌクレオチド間結合は独立してPSである。

20

【0629】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾のパターンは、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式のシード領域におけるヌクレオチドの2'修飾のパターンを含む。

【0630】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、fmfmfmを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

30

【0631】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、fmfmfmfを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0632】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、mfmmfを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0633】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、fmfmfを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

40

【0634】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、mfmmfを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0635】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、mfmmfを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

50

【0636】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f m f m f mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0637】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f m f m fを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0638】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f m f m f mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

10

【0639】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f M f m f mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

【0640】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f M f m f mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

20

【0641】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f M f m f mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

【0642】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f M f mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

【0643】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f m f M f mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

30

【0644】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f m f M f mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

【0645】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f m f M mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

40

【0646】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f M f M f mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

【0647】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f M f M f Mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

【0648】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、

50

当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m f M f Mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeであり、Mは2'-MOEである。

【0649】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f d f d f dを含み、ここで、dは2'-デオキシであり、mは2'-OMeである。

【0650】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f d f d f d fを含み、ここで、dは2'-デオキシであり、mは2'-OMeである。

【0651】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、d f d f d fを含み、ここで、dは2'-デオキシであり、mは2'-OMeである。

【0652】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f d f d fを含み、ここで、dは2'-デオキシであり、mは2'-OMeである。

【0653】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f f m m m mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0654】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f m m m mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0655】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f f m m mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0656】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f f m mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0657】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f f m m m m m mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0658】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、f f m m m m m mを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0659】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m m m m mを含み、ここで、mは2'-OMeである。

【0660】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、m m m m m m m mを含み、ここで、mは2'-OMeである。

10

20

30

40

50

【0661】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、mmmmmmを含み、ここで、mは2'-OMeである。

【0662】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、当該ヌクレオチドの2'修飾パターンは、mfmfmfを含み、ここで、fは2'-Fであり、mは2'-OMeである。

【0663】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、図1に示される任意の一本鎖RNA i 形式のシード領域におけるヌクレオチド間結合のパターンを含む。

10

【0664】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、XOXOXOを含み、ここで、Xはホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

【0665】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、XOXOXOXを含み、ここで、Xはホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

20

【0666】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、OXOXOXを含み、ここで、Xはホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

【0667】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、XOXOXを含み、ここで、Xはホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

【0668】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、OXOXOXを含み、ここで、Xはホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

30

【0669】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、OXOXOXOを含み、ここで、Xはホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

【0670】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、OXOXOを含み、ここで、Xはホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

40

【0671】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、OXOXを含み、ここで、Xはホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

【0672】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、XXOXOXを含み、ここで、Xはホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

【0673】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、

50

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、

ヌクレオチド間結合のパターンは、S O S S Sを含み、ここで、SはS p 立体配置のホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

【0687】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、S O S S Sを含み、ここで、SはS p 立体配置のホスホロチオエートであり、Oはホスホジエステルである。

【0688】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、図1に示される第1の本鎖RNA i 形式のシード領域におけるヌクレオチド間結合のパターンを含み、当該ヌクレオチドの2'修飾のパターンは、図1に示される第2の本鎖RNA i 形式のシード領域におけるヌクレオチドの2'修飾のパターンを含む。

10

【0689】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域を含み、この場合、ヌクレオチド間結合のパターンは、図1に示される第1の本鎖RNA i 形式のシード領域におけるヌクレオチド間結合のパターンを含み、当該ヌクレオチドの2'修飾のパターンは、図1に示される第1の本鎖RNA i 形式のシード領域におけるヌクレオチドの2'修飾のパターンを含む。

【0690】

一本鎖RNA i 剤を含めたPNPLA3オリゴヌクレオチドのポストシード領域

20

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、または、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、もしくは当技術分野で既知の任意のポストシード領域またはその一部もしくは構造的要素を含み得る。

【0691】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも1つの2'-F修飾を含むヌクレオチドの配列を含む。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも2~20個の2'-F修飾を含むヌクレオチドの配列を含む。

【0692】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも1つの2'-OMeの修飾を含むヌクレオチドの配列を含む。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも2~20個の2'-OMeの修飾を含むヌクレオチドの配列を含む。

30

【0693】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、合わせて少なくとも1つの2'-OMe及び／または2'-Fの修飾を含むヌクレオチドの配列を含む。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、合わせて少なくとも2~20個の2'-OMe及び／または2'-Fの修飾を含むヌクレオチドの配列を含む。

【0694】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、2'-F及び2'-OMeの修飾または2'-OMe及び2'-Fの修飾を有する少なくとも2~10個の連続ヌクレオチド対を含む。

40

【0695】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、交互2'修飾のパターンを含み、この場合、該パターンは、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMeを含む。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、交互2'修飾のパターンを含み、この場合、該パターンは、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMeを含む。一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、交互2'修飾のパターンを含み、この場合、該パターンは、2'-F、2'-OMe、2'-F、

50

2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMeを含む。一本鎖RNA i剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、交互2'修飾のパターンを含み、この場合、該パターンは、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMeを含む。一本鎖RNA i剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、交互2'修飾のパターンを含み、この場合、該パターンは、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMeを含む。一本鎖RNA i剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、交互2'修飾のパターンを含み、この場合、該パターンは、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMeを含む。一本鎖RNA i剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、交互2'修飾のパターンを含み、この場合、該パターンは、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMe、2'-F、2'-OMeを含む。一本鎖RNA i剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、交互2'修飾のパターンを含み、この場合、該パターンは、f m f m f m f m f mを含む。

20

【 0 6 9 6 】

[illegible]

【 0 6 9 7 】

一部の実施形態では、該シード領域の各ヌクレオチドは 2'-OMe である。

【 0 6 9 8 】

一部の実施形態では、該シード領域の各ヌクレオチドは2'-OMeであり、該ポストシード領域の各ヌクレオチドは2'-OMeである。

【 0 6 9 9 】

一部の実施形態では、該シード領域の1つのヌクレオチドは2'-Fであり、該シード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeである。

【 0 7 0 0 】

一部の実施形態では、該シード領域の1つのヌクレオチドは2'-Fであり、該シード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeであり、該ポストシード領域の1つのヌクレオチドは2'-Fであり、該ポストシード領域の他のヌクレオチドの各々は2'-OMeである。

【 0 7 0 1 】

一部の実施形態では、2 位（5' 末端から数えて）のヌクレオチドは 2'-F であり、該シード領域の他のヌクレオチドの各々は 2'-OMe であり、該ポストシード領域の 1 つのヌクレオチドは 2'-F であり、該ポストシード領域の他のヌクレオチドの各々は 2'-OMe である。

【 0 7 0 2 】

一部の実施形態では、2 位 (5' 末端から数えて) のヌクレオチドは 2' - F であり、該シード領域の他のヌクレオチドの各々は 2' - OMe であり、14 位 (5' 末端から数えて) のヌクレオチドは 2' - F であり、該ポストシード領域の他のヌクレオチドの各々は 2' - OMe である。

【 0 7 0 3 】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、少なくとも一部の例において、2'-Fヌクレオチドの数を減らすこと（例えば、それらを2'-OMe、2'-デオキシ、または2'-Fではない任意の他のヌクレオチドで置き換えること）が、2'-Fに関連する潜在毒性を低下させる一方で、*in vitro*での有効性を認め、また、安定性を認め、または安定性を増加させ得ることを示唆する。

【0704】

一部の実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは9つのホスホロチオエート及び／または少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは9つのホスホジエステルのヌクレオチド間結合を含む。

【0705】

一本鎖RNA i 剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、連続したホスホロチオエートの1つ以上のセット及び／または連続したホスホジエステルの1つ以上のセットを含む。

【0706】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかの修飾のパターンを有する糖の範囲を含むポストシード領域を含む：m f m f m f m f m f m f m、m f m f m f m f m f m、m f m f m f m f m、m f m f m f m、m f m f m、m f m、f m f m f m f m f m f m、f m f m f m f m f m、f m f m f m f m、f m f m f m、及びf m f m、ここで、mは2'-OMeであり、fは2'-Fである。

【0707】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかの修飾のパターンを有する糖の範囲を含むポストシード領域を含む：d d d f d f d f d f d f d、d d d f d f d f d f d、d d d f d f d f d、d d d f d f d、及びd d d f d、ここで、dは2'-デオキシであり、fは2'-Fである。

【0708】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかの修飾のパターンを有する糖の範囲を含むポストシード領域を含む：d f d f d f d f d f d f d、f d f d f d f d f d f d、及びf d f d f d f d f d。

【0709】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかの修飾のパターンを有する糖の範囲を含むポストシード領域を含む：f d f d f d f d、f d f d f d、及びf d f d。

【0710】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：X O X O X O X O O O O、O X O X O X O O O O、X O X O X O X O O O、X O X O X O X O O、X O X O X O O O O、O X O X O X O O、X O X O X O O O、O X O X O O O O、O X O X O O O、及びX O X O O、ここで、Oはホスホジエステルであり、Xは立体不規則的ホスホロチオエートである。

【0711】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、O O O O O O O Oのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む。

【0712】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：O O O O O O、O O O O O、O O O O、及びO O O。

【0713】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：O O O O O O O O X X X X X X、O O O O O O O O X X X X X、O O O O O O O O X X X X、O O O O O O O O X X X、O O O O O O O O X X、O O O O O O O O X、O O O O O O O O X X X X X X、O O O O O O X

10

20

30

40

50

XXXXX、OOOOOXXXXXXXXX、OOOOXXXXXXXXX、OOOXXXXXXXXX、O
OXXXXXXXXX、OXXXXXXXXX、OOOOOOX、OOOOOX、OOOOX、及びO
OOX。

【0714】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレ
オチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：OOOOOOOXXXXXXXX、OOO
OOOOXXXXXXXX、OOOOOOOXXX、OOOOOOXXXXXXXX、OOOOOOXX
XX、OOOOOXXXXXXXX、OOOOOXXXXXXXX、OOOOOXXX、OOOOXXX
X、OOOOXXX、OOOXXXXXXXX、OOOXXXX、及びOOOXXX。

【0715】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、少なくとも1つのキラルヌクレオチド間結
合を含むポストシード領域を含む。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、少なく
とも1つのキラル制御されたヌクレオチド間結合を含むポストシード領域を含む。一部の
実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、ホスホロチオエートである少なくとも1つのキラル制
御されたヌクレオチド間結合を含むポストシード領域を含む。一部の実施形態では、一
本鎖RNA i 剤は、Sp 立体配置のホスホロチオエートである少なくとも1つのキラル制
御されたヌクレオチド間結合を含むポストシード領域を含む。一部の実施形態では、一
本鎖RNA i 剤は、Rp 立体配置のホスホロチオエートである少なくとも1つのキラル制
御されたヌクレオチド間結合を含むポストシード領域を含む。

【0716】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレ
オチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：OSSSOSSSSSSSSSSSS、
OSSSOSSSSSSSSSSSSSS、OSSSOSSSSSSSSSSSS、OSSSOSSSSSSSS
S、OSSSOSSSSSSSSSS、OSSSOSSSSSSSS、OSSSOSSSSSS、OSSSO
SSSS、OSSSOSSS、OSSSOSS、及びOSSSO、ここで、Oはホスホジエステル
であり、Sは、Sp 立体配置のホスホロチオエートである。

【0717】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレ
オチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：OSOSOSOSSSSSSSSSSS、
OSOSOSOSSSSSSSSSSS、OSOSOSOSSSSSSSSS、OSOSOSOSSSSS
S、OSOSOSOSSSSSSS、OSOSOSOSSSSS、及びOSOSOSOSSS。

【0718】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレ
オチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：SOSOSOSSSSSSSSSSS、O
SOSOSSSSSSSSSSSSS、SOSOSSSSSSSSSSS、OSOSSSSSSSSSSS、SO
SSSSSSSSSSSS、及びOSSSSSSSSSS。

【0719】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレ
オチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：SOSOSOSSSSSSSSSSS、S
OSOSOSSSSSSSSSSS、SOSOSOSSSSSSSSS、SOSOSOSSSSSSS、SO
SOSOSSSSSSS、SOSOSOSSSSS、SSSSSSSSSS、SSSSSSSSSS、SSSS
SS、SSSSSS、SSSS、SSS、及びSS。

【0720】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレ
オチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：OSSSSSSO、OSSSSSS、O
SSSSS、SSSSSSO、SSSSSO、及びSSSSO。

【0721】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレ
オチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：SOSOSOSOSOSOOOOOOS
、SOSOSOSOSOSOOOOOO、SOSOSOSOSOSOOOOOO、SOSOSOSOS

10

20

30

40

50

S O O O O、S O S O S O S O S O O O、及びS O S O S O S O S O O。

【0722】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：O S O S O S O S O O O O O O S、S O S O S O S O O O O O O S、O S O S O S O O O O O O O S、S O S O S O O O O O O O S、O S O S O O O O O O S、S O S O O O O O O O S、及びO S O O O O O O O S。

【0723】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：X O O O X O O X X X X X、X O O O X O O X X X X、X O O O X O O X X X、X O O O X O O X X、X O O O X O O X、X O O O X O O、O O O X O O X X X X X、O O X O O X X X X X、O X O O X X X X X、X O O X X X X X、及びO O X X X X X。

【0724】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：X O X O X O X X X X X X、X O X O X O X X X X X、X O X O X O X X X X、X O X O X O X X、X O X O X O X、O X O X O X X X X X X、X O X O X X X X X X、O X O X X X X X X、X O X X X X X X、及びO X X X X X X。

【0725】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：X X X O O O X O X O X X X、X X X O O O X O X O X X、X X X O O O X O X O X、X X X O O O X O X O、X X X O O O X O X、X X X O O O X O、X X O O O X O X O X X X、X O O O X O X O X X X、O O O X O X O X X X、O O X O X O X X X、O X O X O X X X、X O X O X X X、X X O O O X O X O X X、X X O O O X O X O X、X O O O X O X O X X、及びX O O O X O X O X。

【0726】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：X O O O X O X O、X O O O X O X、X O O O X O、O O O X O X O、O O O X O X、及びO O O X O。

【0727】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：X O X O O O X O X O X X X、X O X O O O X O X O X X、X O X O O O X O X O X、X O X O O O X O X O、X O X O O O X O X、X O X O O O X O、X O X O O O X、O X O O O X O X O X X X、X O O O X O X O X X X、O O O X O X O X X X、O O X O X O X X X、O X O X O X X X、O X O O O X O X O X X、O X O O O X O X O X、X O O O X O X O X X、及びX O O O X O X O X。

【0728】

一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、以下のいずれかのパターンを有するヌクレオチド間結合の区間を含むポストシード領域を含む：O O O O O O S、O O O O O S O、O O O O S O O、O O O S O O O、O O S O O O O、O S O O O O O、及びS O O O O O O。

【0729】

一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、(a) 第1の相補的標的mRNA領域にアニーリングする能力を有するシード領域、及び(b) 2'-デオキシ領域を含むポストシード領域を含み、この場合、該ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及びRNAase H介在性ノックダウンの両方を誘導する能力を有し、該2'-デオキシ領域は、少なくとも5つの連続した2'-デオキシを含む。一部の実施形態では、該2'-デオキシは、DNAでも修飾ヌクレチド、例えば、2'-デオキシを備えた修飾ヌクレオ

10

20

30

40

50

チドでもよく、この場合、該DNAまたは修飾ヌクレオチドは、天然の糖及び／または天然の塩基、及び／または修飾塩基、及び／または任意のヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、該2'-デオキシ領域は、一続きの連続したヌクレオチドを含み、この場合、各ヌクレオチドは2'-デオキシであり、各ヌクレオチド間結合はホスホロチオエートである。一部の実施形態では、該2'-デオキシ領域は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21ヌクレオチドの一続きの連続したヌクレオチドを含み、この場合、各ヌクレオチドは2'-デオキシであり、各ヌクレオチド間結合はホスホロチオエートである。

【0730】

一本鎖RNAi剤のポストシード領域の非限定的な例として：形式2、7、8、9、12及び13（これらは、各々、6つの連続したホスホジエステルのセット、及び6つの連続したホスホジチオエートのセットを含む）、形式3（6つの連続したホスホロジチオエート）、形式4、5及び6、形式10及び11；ならびに本明細書に開示される様々な他の一本鎖RNAi剤。

10

【0731】

一本鎖RNAi剤の一部の実施形態では、ポストシード領域は、最も3'側にミスマッチを含む。

【0732】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤は、以下の任意の1つ以上でミスマッチを含み得る：5'位、3'末端ジヌクレオチドの一方または両方、ならびにシード領域と3'末端領域の間の領域の最も3'側。

20

【0733】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、または、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、もしくは当技術分野で既知の任意のポストシード領域またはその一部もしくは構造的要素を含み得る。

【0734】

一本鎖RNAi剤を含めたPNPLA3オリゴヌクレオチドの3'末端領域

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉を介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉やRISC（RNase H介在性ノックダウンもしくは遺伝子発現の立体障害を含むがこれに限定されない）が関与しない生化学的機序を介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉及び／またはRNase H介在性ノックダウンを介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、標的遺伝子のmRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／または、mRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって、誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、もしくは当技術分野で既知の任意の3'末端領域を含有し得る。

30

40

【0735】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドの3'末端領域は、当該オリゴヌクレオチドが、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有するようなものである。

【0736】

50

一部の実施形態では、RNA i 剤の3'末端領域は、当該RNA i 剤が、特定の標的転写産物のRNA干渉を配列特異的に誘導する能力を有するようなものである。

【0737】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、または、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、もしくは当技術分野で既知の任意の3'末端領域及び／または3'末端ジヌクレオチド及び／または3'末端キャップを含み得る。一部の実施形態では、3'末端領域は、GalNAc部分を含み得る。一部の実施形態では、GalNAc部分は、任意のGalNAc、または本明細書に記載される、もしくは当技術分野で既知のそのバリエーション、誘導体、もしくは修飾体である。

10

【0738】

一部の実施形態では、3'末端領域及び／または3'末端ジヌクレオチド及び／または3'末端キャップは、以下の2つの機能を果たす：(a) 当該オリゴヌクレオチドのエキソ及び／またはエンドヌクレアーゼに対する感受性の低減、ならびに(b) 当該オリゴヌクレオチドの機能の許可、この場合、該機能は、RNA干渉の誘導、RNase H介在性ノックダウンの誘導、または、RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンの両方の誘導である。

【0739】

従って、一本鎖RNA i 剤の3'末端領域は、3'末端ジヌクレオチド及び／または3'末端キャップを含み得る。

20

【0740】

哺乳類細胞では、Dicerは、二本鎖RNA(dsRNA)を処理して、各鎖が一本鎖3'オーバーハングで終わる二本鎖領域を含む19~23塩基対のsiRNAにすると報告されている。該3'オーバーハングは、1~4nt長であり得るが、通常は、3'末端ジヌクレオチドである。Bernstein et al. 2001 Nature 409:363、Elbashir et al. 2001 Nature 411:494-498、Elbashir et al. 2001 EMBO J. 20:6877。これら2つのジヌクレオチドのオーバーハングは、標的特異性には寄与しないと報告されている。それらはしかしながら、当該siRNAの末端をヌクレアーゼ分解から保護し、時には活性を改善するのに役立つと報告されている。Elbashir et al. 2001 Nature 411:494-498、Elbashir et al. 2001 EMBO J. 20:6877-6888、及びKraynack et al. 2006 RNA 12:163-176。従って、機能的二本鎖RNA i 剤にとって、3'末端ジヌクレオチドが標的遺伝子配列に相補的な配列を含む必要はないことが報告されている。

30

【0741】

人工二本鎖RNA i 剤では、3'の一本鎖ジヌクレオチドのオーバーハングが、他の一本鎖ジヌクレオチド、ヌクレオチド、及び3'末端キャップを含めた様々な部分で実験的に置き換えられたと報告されている。21量体の3'末端ジヌクレオチドは、多くの場合、UU、TT、dTdT、sdT、dTsdT、sdTsdT、またはsdTdT等の人工ジヌクレオチドで置き換えられると報告されている。siRNAの各末端の最大4つのヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドで置き換えることは耐容性良好であると報告されている一方、デオキシリボヌクレオチドでの完全な置換はRNA i 活性をもたらさない。国際PCT公開第WO 00/44914号、及びBeach et al. 国際PCT公開第WO 01/68836号は、siRNAが、少なくとも1つの窒素または硫黄のヘテロ原子を含むように、リン酸-糖骨格またはヌクレオシドのいずれかに対する修飾を含んでもよいことを予め報告した。Kreutzer et al. カナダ特許出願第2,359,180号もまた、二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼPKR、具体的には2'-アミノまたは2'-O-メチルヌクレオチド、及び2'-Oまたは4'-Cメチレン架橋を含むヌクレオチドの活性化に対抗するためにdsRNA構築物で使用するある特定の化学修飾を

40

50

報告している。さらなる3'末端ヌクレオチドのオーバーハングとしては、dT（デオキシチミジン）、2'-O、4'-C-エチレンチミジン（eT）、及び2-ヒドロキシエチルホスフェート（hp）が挙げられる。他の人工3'オーバーハング（3'末端ジヌクレオチド）としては、配列AA、CC、GG、及びUGのジヌクレオチドが挙げられる。Elbashir et al. 2001 EMBO J. 20:6877-6888。一部の実施形態では、3'末端ジヌクレオチドはAAであると報告されている。

【0742】

代替的に、二本鎖RNAi剤では、3'末端ジヌクレオチドの一方または両方は、19bpの平滑末端二本鎖を形成する2本の19nt鎖を含む機能的siRNAを残して削除する（かつ置き換えない）ことができると報告されている。二本鎖RNAi剤の3'末端ジヌクレオチドを削除しかつ置き換えないと、鎖の末端がヌクレアーゼに対して弱くなり、これを補うため、人工3'末端キャップを加えることができると報告されている。該3'末端キャップは、非ヌクレオチドであると報告されている。それらは、ヌクレオチドのすべての成分（リン酸、糖、及び塩基）を含まないためにヌクレオチドではない。二本鎖RNAi剤のジヌクレオチドのオーバーハングは、時には、3'末端キャップで機能的に置き換えることができ、1つまたは2つの3'末端キャップを備えた平滑末端の19bp二本鎖を残し、当該分子をヌクレアーゼから保護することができると報告されている。一般に、3'末端キャップは、該RNAi剤が媒介するRNA干渉を妨げてはならないと報告されており、多くの3'末端キャップはまた、追加の利点、例えば、RNAi活性の増加及び／またはヌクレアーゼに対する安定性を与える。

【0743】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本出願は、少なくとも一部の例では、今までに記載された3'末端キャップが、PAZドメインと相互作用すると理論づけられると報告されていることを注記する。一部の実施形態では、3'末端キャップは、PAZリガンドであると報告されている。WO 2015/051366。報告によれば、Dicerは、RNaseIII酵素であり、6つの認識可能なドメインからなる。報告によれば、N末端またはその近傍は、約550aaのDEXHボックスRNAヘリカーゼドメインであり、この直後は、DUF283と呼ばれる約100aaの保存ドメインであり、C末端からDUF283ドメインまでがPAZ（Piwi/Argonaute/Zwille）ドメインであり、これが一本鎖ジヌクレオチドのオーバーハングを認識する。Myers et al. 2005. in RNA interference Technology, ed. Appasani, Cambridge University Press, Cambridge UK, p. 29-54、Bernstein et al. 2001 Nature 409:363-366、及びSchauer et al. 2002 Trends Plant Sci. 7:487-491、Lingel et al. 2003 Nature 426:465-469、Song et al. 2003 Nature Struct. Biol. 10:1026-1032、Yan et al. 2003 Nature 426:468-474、Lingel et al. 2004 Nature Struct. Mol. Biol. 11:576-577、Ma et al. 2004 Nature 429:318-322。報告によれば、DicerのPAZドメインは、RNAに結合し、切断のための触媒ドメインを位置づけることもできる。Zhang et al. 2004 Cell 118:57-68。一部の実施形態では、3'末端キャップは、PAZドメインと相互作用するPAZリガンドである。

【0744】

一部の実施形態では、3'末端キャップは、以下の2つの機能を可能にすることができる：（1）RNA干渉を可能にすること、及び（2）活性の持続時間及び／または生物学的半減期を増加させることであって、これは、例えば、DicerのPAZドメインへの結合の増加及び／またはRNAi剤の分解（例えば、血清もしくは腸液中のもの等のヌクレアーゼによる）の低減もしくは防止によって達成され得る。

【0745】

様々な3'末端ジヌクレオチドは、表1Aに記載されるオリゴヌクレオチドに記載されている。

【0746】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、一对の3'末端ヌクレオチドを含む。末端から2番目のヌクレオチドは2'-OMeであり、5'ヌクレオチドは2'-OMeである。

【0747】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、一对の3'末端ヌクレオチドを含み、末端から2番目のヌクレオチドは2'-デオキシであり、5'ヌクレオチドは2'-OMeである。この構造の本明細書に開示される一本鎖RNA i 剤の非限定的な例としては、図1の形式10、11、13、及び14；ならびに本明細書に開示される様々な他の一本鎖RNA i 剤が挙げられる。

【0748】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、一对の3'末端ヌクレオチドを含み、末端から2番目のヌクレオチドは2'-デオキシであり、5'ヌクレオチドは2'-OMeであり、該末端から2番目のヌクレオチドはリンカーを含む。

【0749】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、一对の3'末端ヌクレオチドを含み、末端から2番目のヌクレオチドはリンカーを含む。

【0750】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、一对の3'末端ヌクレオチドを含み、末端から2番目のヌクレオチドは2'-デオキシであり、5'ヌクレオチドは2'-OMeであり、該末端から2番目のヌクレオチドは追加の化学的部分に複合体化されたリンカーを含む。

【0751】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、一对の3'末端ヌクレオチドを含み、末端から2番目のヌクレオチドは2'-デオキシTであり、5'ヌクレオチドは2'-OMe Uであり、該末端から2番目のヌクレオチドは追加の化学的部分に複合体化されたリンカーを含む。

【0752】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、一对の3'末端ヌクレオチドを含み、末端から2番目のヌクレオチドは、標的化部分、脂質部分、炭水化物部分、二環式ケタール、及びGalNAc部分から選択される追加の化学的部分に複合体化されたリンカーを含む。

【0753】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、一对の3'末端ヌクレオチドを含み、末端から2番目のヌクレオチドは2'-デオキシであり、5'ヌクレオチドは2'-OMeであり、該末端から2番目のヌクレオチドは、標的化部分、脂質部分、炭水化物部分、二環式ケタール、及びGalNAc部分から選択される追加の化学的部分に複合体化されたリンカーを含む。

【0754】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、一对の3'末端ヌクレオチドを含み、末端から2番目のヌクレオチドは2'-デオキシTであり、5'ヌクレオチドは2'-OMe Uであり、該末端から2番目のヌクレオチドは、標的化部分、脂質部分、炭水化物部分、二環式ケタール、及びGalNAc部分から選択される追加の化学的部分に複合体化されたリンカーを含む。

【0755】

一部の実施形態では、3'末端領域または3'末端キャップは、GN3、または、例えば、Allerson et al. 2005 J. Med. Chem. 48:901-04

10

20

30

40

50

、Lima et al. 2012 Cell 150:883-894、Prakash et al. 2015 Nucl. Acids Res. 43:2993-3011、及び／またはPrakash et al. 2016 Bioorg. Med. Chem. Lett. 26:26:2817-2820に記載の任意の他の適切なRNA i 剤の3'末端領域化合物を含む。

【0756】

様々な3'末端キャップが文献に記載されている。

【0757】

一般に、3'末端キャップは、3'末端のヌクレオチド間結合に結合される。該3'末端のヌクレオチド間結合は、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、及び本明細書に記載される任意のヌクレオチド間結合から選択され得る。

【0758】

提供される一本鎖RNA i 剤用の3'末端キャップは、例えば、本明細書に記載される任意の3'末端キャップから選択され得る。

【0759】

一部の実施形態では、3'末端キャップは、2'，3'-環状リン酸、C3（またはC6、C17、C12）アミノリンカー、チオールリンカー、カルボキシルリンカー、非ヌクレオチドスペーサー（C3、C6、C9、C12、脱塩基、トリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール）、ピオチン、及びフルオレセインから選択される。

【0760】

一部の実施形態では、3'末端キャップは、C3、アミノC3、C6、C8、C10、及びC12が挙げられるがこれらに限定されないWO 2015/051366に記載される任意の3'末端キャップから選択される。一部の実施形態では、3'末端キャップは、米国特許第8,097,716号、第8,084,600号、第8,344,128号、第8,404,831号、及び第8,404,832号に記載される、トリエチレングリコール、シクロヘキシル（またはCyclohex）、フェニル、BP（ビフェニル）、アダマンタン、及びリトコール酸（またはリトコール）から選択される。

【0761】

提供されるRNA i 剤に適した様々な機能的3'末端キャップは、例えば、EP 1520022 B1、米国特許第8,097,716号、第8,084,600号、第8,404,831号、第8,404,832号、及び第8,344,128号、ならびにWO 2015/051366に記載されている。

【0762】

さらに、本開示は、一本鎖RNA i 剤で機能する様々な5'末端構造及び3'末端領域ならびにそれらの組み合わせが本明細書に開示されることを注記する。しかしながら、対照的に、多くの5'末端構造及び3'末端キャップ、ならびにそれらの組み合わせは、様々な二本鎖RNA i 剤のRNA干渉能を低減または排除することが以前に報告されていることが知られている。例えば、Czauderna et al. 2003 Nucl. Acids Res. 31:2705-2716、Hadwiger et al. 2005, pages 194-206, in RNA interference Technology, ed. K. Appasani, Cambridge University Press, Cambridge, UK、Deleavey et al. 2009 Curr. Prot. Nucl. Acid Chem. 16.3.1-16.3.22、Terrazas et al. 2009 Nucleic Acids Res. 37:346-353、Harboth et al. 2003 Antisense Nucl. Acid Drug Dev 13:83-105、Song et al. 2003 Nature Med. 9:347-351、米国特許第5,998,203号、Lipardi et al. 2001 Cell 107:299-307、Schwarz et al. 2002 Mol. Cell 10:537-548、及びWO 2015/051366を参照されたい。

【0763】

二環式ケタール、PNPLA3オリゴヌクレオチドのさらなる任意の構造的要素

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、または当技術分野で既知の任意の構造的要素またはそのパターンを含有し得る。

【0764】

二環式ケタール、PNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化される任意選択の追加の化学的部分

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉を介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉やRISC (RNAse H介在性ノックダウンもしくは遺伝子発現の立体障害を含むがこれに限定されない) が関与しない生化学的機序を介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉及び／またはRNAse H介在性ノックダウンを介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、標的遺伝子のmRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／または、mRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって、誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的化部分、脂質部分、炭水化物部分、二環式ケタール、GalNAc部分等が挙げられるがこれらに限定されない本明細書に記載される、または当技術分野で既知の任意選択の追加の化学的部分を含有し得る。

【0765】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、標的化部分、脂質部分、炭水化物部分、二環式ケタール、GalNAc部分等が挙げられるがこれらに限定されない本明細書に記載される、または当技術分野で既知の任意選択の追加の化学的部分を含有し得る。

【0766】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNAse H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、または、RNA干渉及びRNAse H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、標的化部分、脂質部分、炭水化物部分、二環式ケタール、GalNAc部分等が挙げられるがこれらに限定されない本明細書に記載される、または当技術分野で既知の任意選択の追加の化学的部分を含有し得る。

【0767】

一部の実施形態では、追加の化学的部分は、一本鎖RNA i 剤に複合体化される。

【0768】

PNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化される任意選択の追加の化学的部分：標的化部分

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物はさらに、標的化部分（例えば、標的化化合物、薬剤、リガンド、または成分）を含む。標的化部分は、脂質またはPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤に複合体化されても複合体化されなくてもよい。一部の実施形態では、標的化部分は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤に複合体化される。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、脂質及び標的化部分の両方に複合体化される。本明

細書に記載される場合、一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、提供されるオリゴヌクレオチドである。ゆえに一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、脂質とオリゴヌクレオチドに加えて、標的要素をさらに含有する。様々な標的化部分を本開示に従って使用することができる。例えば、脂質、抗体、ペプチド、炭水化物等である。

【0769】

標的化部分は、本開示に従う多くの種類の方法によって提供される技術に組み込まれ得る。一部の実施形態では、標的化部分は、提供されるオリゴヌクレオチドと物理的に混合されて提供される組成物を形成する。一部の実施形態では、標的化部分は、オリゴヌクレオチドに化学的に複合体化される。

10

【0770】

一部の実施形態では、提供される組成物は、2つ以上の標的化部分を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、2つ以上の複合体化標的化部分を含む。一部の実施形態では、該2つ以上の複合体化標的化部分は同じである。一部の実施形態では、該2つ以上の複合体化標的化部分は異なる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以下の標的構成要素を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、異なる型の複合体化標的化部分を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、同じ型の標的化部分を含有する。

【0771】

一部の実施形態では、提供される組成物は、2つ以上の標的化部分を含む。一部の実施形態では、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する提供されるオリゴヌクレオチドは、2つ以上の複合体化標的化部分を含む。一部の実施形態では、該2つ以上の複合体化標的化部分は同じである。一部の実施形態では、該2つ以上の複合体化標的化部分は異なる。一部の実施形態では、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以下の標的構成要素を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、異なる型の複合体化標的化部分を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、同じ型の標的化部分を含有する。

20

【0772】

標的化部分は、任意でリンカーを介してオリゴヌクレオチドに複合体化され得る。当分野の様々なタイプのリンカーが、本開示に従い利用され得る。一部の実施形態では、リンカーはリン酸基を含有し、それを例えば、オリゴヌクレオチド合成で使用される化学と類似した化学方法を介した標的化部分の複合体化に使用することができる。一部の実施形態では、リンカーは、アミド基、エステル基、またはエーテル基を含有する。一部の実施形態では、リンカーは、 $-L-$ の構造を有する。標的化部分は、脂質と比較し、同じまたは異なるリンカーのいずれかを介して複合体化され得る。

30

【0773】

標的化部分は、任意でリンカーを介して、様々な適切な位置でオリゴヌクレオチドに複合体化され得る。一部の実施形態では、標的化部分は、5'-OH基を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化部分は、3'-OH基を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化部分は、1つ以上の糖部分を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化部分は、1つ以上の塩基を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化部分は、1つ以上のヌクレオチド間結合を介して組み込まれる。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、独立してその5'-OH、3'-OH、糖部分、塩基部分、及び／またはヌクレオチド間結合を介して複合体化される複数の複合体化標的化部分を含み得る。標的化部分及び脂質は、同じ位置、近傍の位置、及び／または離れた位置のいずれかで複合体化され得る。一部の実施形態では、標的構成要素は、PNPLA3オリゴヌクレオチドの一端で複合体化され、脂質は、他方の端で複合体化される。

40

【0774】

一部の実施形態では、提供される組成物はさらに、標的化構成要素または標的化部分を含む。標的化構成要素は、PNPLA3オリゴヌクレオチドに組み込まれても（標的化部

50

分) 組み込まれなくてもよい。一部の実施形態では、標的化構成要素は脂質である。一部の実施形態では、標的化構成要素は炭水化物または二環式ケタールである。一部の実施形態では、標的化構成要素は、本開示に記載される $-R^{LD}$ である。一部の実施形態では、標的化構成要素は、本開示に記載される $-R^{CD}$ である。

【0775】

標的化構成要素は、本開示に従う多くの種類の方法、例えば、脂質及び炭水化物用に記載されるものによって、提供される技術に組み込まれ得る。一部の実施形態では、標的化構成要素は、提供されるオリゴヌクレオチドと物理的に混合されて、提供される組成物を形成する。一部の実施形態では、標的化構成要素は、オリゴヌクレオチド部分に化学的に複合体化される。

【0776】

一部の実施形態では、提供される組成物は、2つ以上の標的化構成要素を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、2つ以上の複合体化標的化構成要素を含む。一部の実施形態では、該2つ以上の複合体化標的化構成要素は同じである。一部の実施形態では、該2つ以上の複合体化標的化構成要素は異なる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以下の標的化構成要素を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、異なる型の複合体化標的化構成要素を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、同じ型の標的化構成要素を含有する。

【0777】

標的化構成要素は、例えば、脂質及び炭水化物について記載されるように、任意でリンカーを介してオリゴヌクレオチドに複合体化され得る。当分野の様々なタイプのリンカーが、本開示に従い利用され得る。一部の実施形態では、リンカーはリン酸基を含有し、それを例えば、オリゴヌクレオチド合成で使用される化学と類似した化学方法を介した標的化構成要素の複合体化に使用することができる。一部の実施形態では、リンカーは、アミド基、エステル基、またはエーテル基を含有する。一部の実施形態では、リンカーは、 $-L-$ の構造を有する。標的化構成要素は、脂質と比較し、同じまたは異なるリンカーのいずれかを介して複合体化され得る。

【0778】

標的化構成要素は、任意でリンカーを介して、様々な適切な位置でオリゴヌクレオチドに複合体化され得る。一部の実施形態では、標的化構成要素は、5'-OH基を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化構成要素は、3'-OH基を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化構成要素は、1つ以上の糖部分を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化構成要素は、1つ以上の塩基を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化構成要素は、1つ以上のヌクレオチド間結合を介して組み込まれる。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、独立してその5'-OH、3'-OH、糖部分、塩基部分、及び／またはヌクレオチド間結合を介して複合体化される複数の複合体化標的化構成要素を含み得る。標的化構成要素及び脂質は、同じ位置、近傍の位置、及び／または離れた位置のいずれかで複合体化され得る。一部の実施形態では、標的化構成要素は、PNPLA3オリゴヌクレオチドの一端で複合体化され、脂質は、他方の端で複合体化される。

【0779】

一部の実施形態では、標的化構成要素は、標的細胞の表面上のタンパク質と相互作用する。一部の実施形態では、かかる相互作用により、標的細胞内への内在化が促進される。一部の実施形態では、標的化構成要素は、糖部分を含有する。一部の実施形態では、標的化構成要素は、ポリペプチド部分を含有する。一部の実施形態では、標的化構成要素は、抗体を含有する。一部の実施形態では、標的化構成要素は、抗体である。一部の実施形態では、標的化構成要素は、阻害剤を含有する。一部の実施形態では、標的化構成要素は、低分子阻害剤由来の部分である。一部の実施形態では、阻害剤は、標的細胞の表面上のタンパク質の阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素阻害剤である。

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、阻害剤は、標的細胞の表面上に発現される炭酸脱水酵素阻害剤である。一部の実施形態では、炭酸脱水酵素は、I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XVまたはXVIである。一部の実施形態では、炭酸脱水酵素は、膜結合型である。一部の実施形態では、炭酸脱水酵素は、IV、IX、XIIまたはXIVである。一部の実施形態では、阻害剤は、IV、IX、XII及び／またはXIVに対する阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素III阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素IV阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素IX阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素XII阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素XIV阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、スルホンアミド（例えば、Supuran, CT. Nature Rev Drug Discover 2008, 7, 168-181に記載されるものであり、そのスルホンアミドは参照により本明細書に組み込まれる）を含有するかまたはこれである。一部の実施形態では、阻害剤は、スルホンアミドである。一部の実施形態では、標的細胞は、筋肉細胞である。

【0780】

一部の実施形態では、標的化構成要素は R^{TD} であり、 R^{TD} は、本開示に記載される R^{LD} または R^{CD} である。

【0781】

一部の実施形態では、標的化構成要素は、本開示に規定され、及び記載される R^{LD} である。一部の実施形態では、本開示は、 R^{LD} を含有するオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{LD} を含有するオリゴヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{LD} を含有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{LD} を含有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

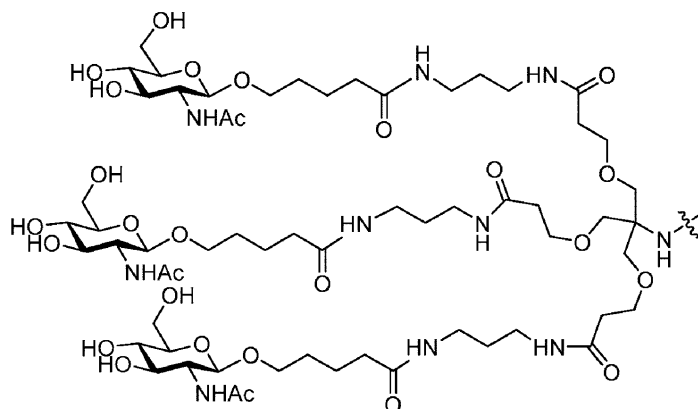
【0782】

一部の実施形態では、標的化構成要素は、本開示に規定され、及び記載される R^{CD} である。一部の実施形態では、本開示は、 R^{CD} を含有するオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{CD} を含有するオリゴヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{CD} を含有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{CD} を含有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0783】

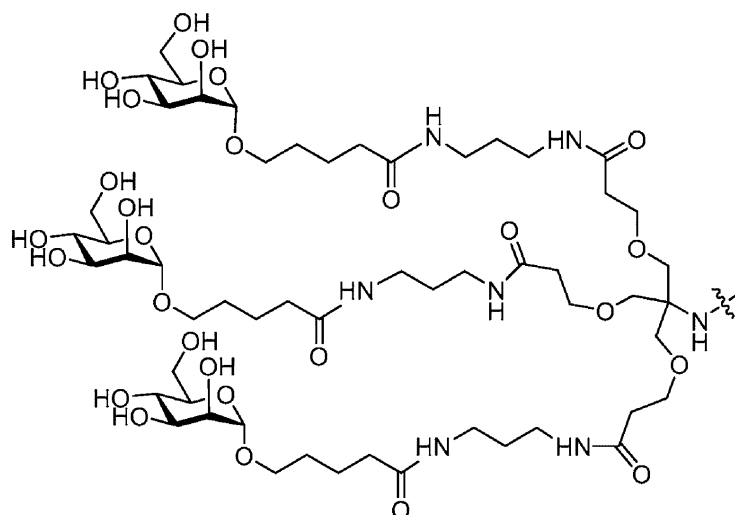
一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化79】



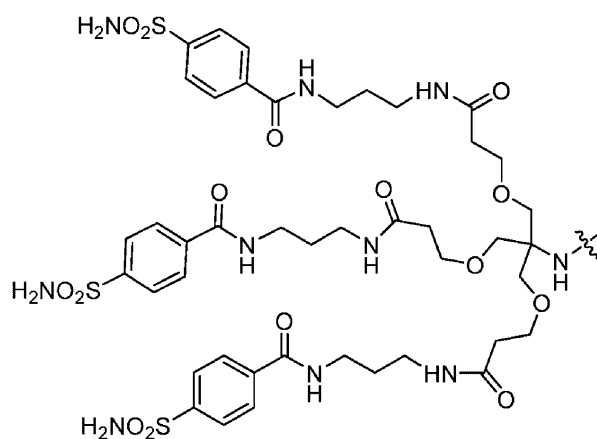
を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 8 0】



10

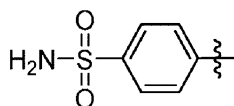
を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、
【化 8 1】



20

30

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、
【化 8 2】

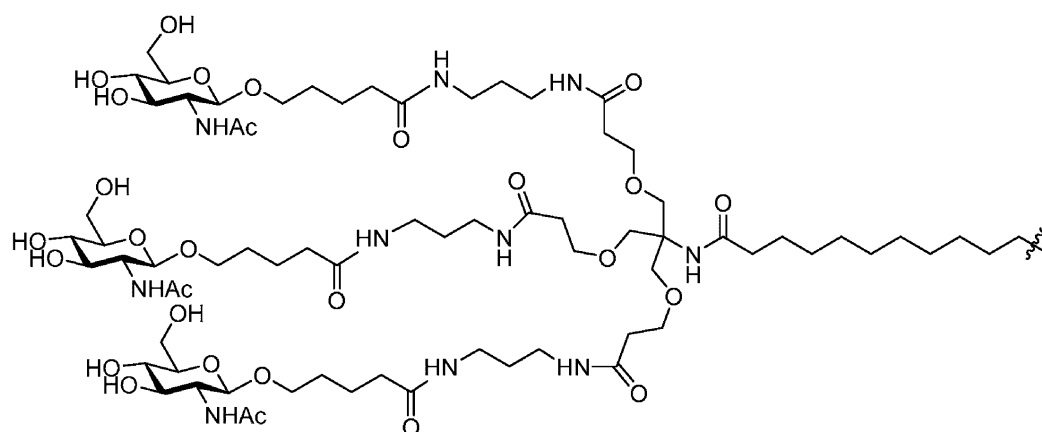


40

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

50

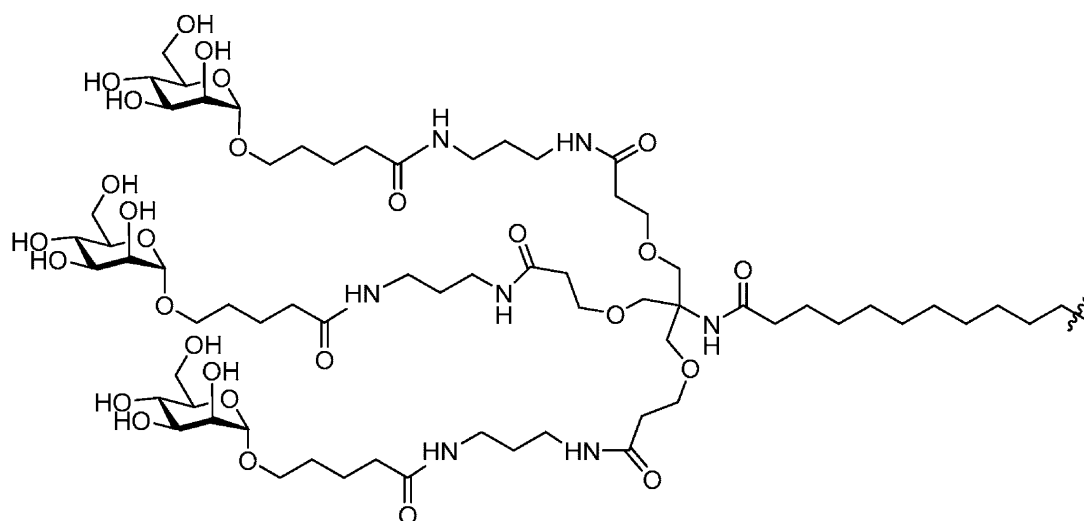
【化 8 3】



10

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 8 4】



20

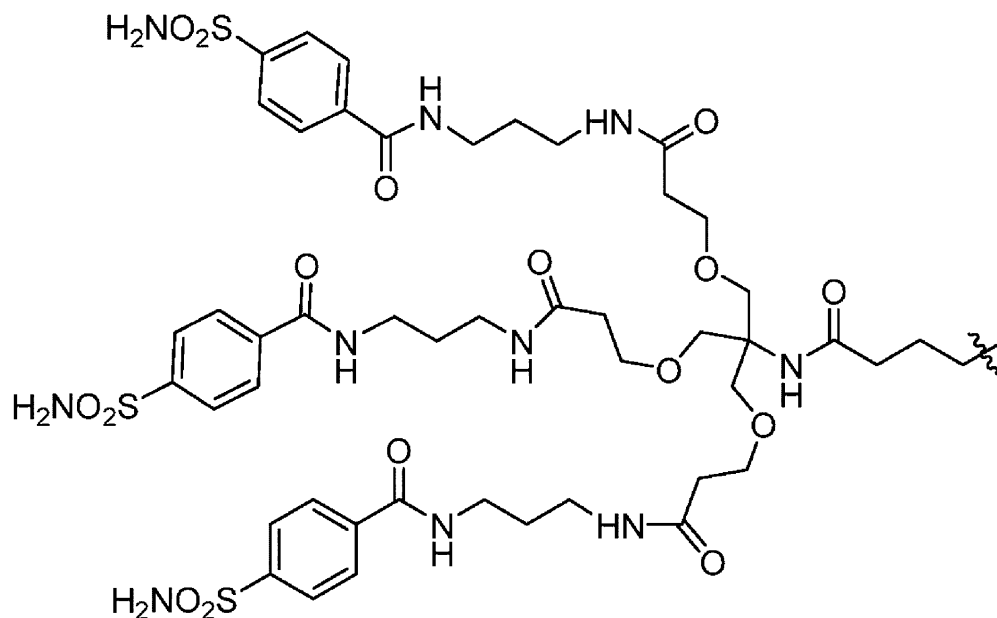
30

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

40

50

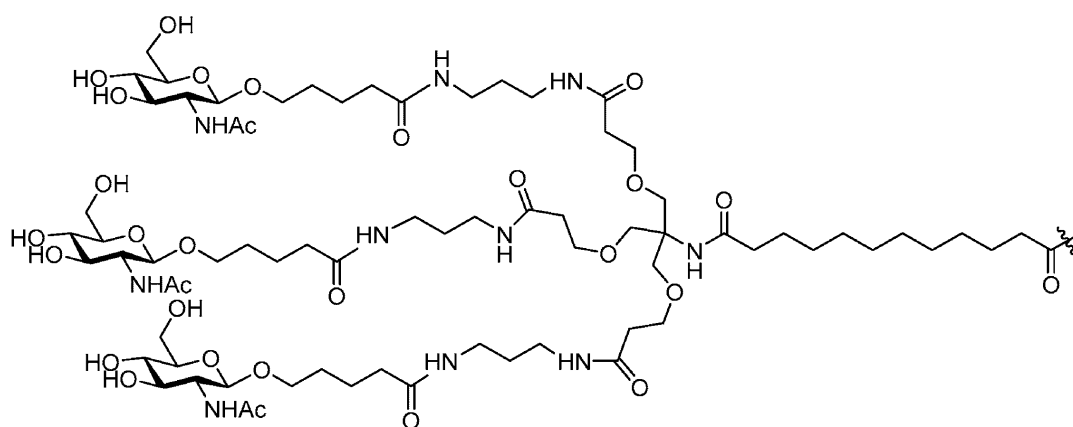
【化 8 5】



10

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 $\text{R}^{\text{T D}}$ は、

【化 8 6】



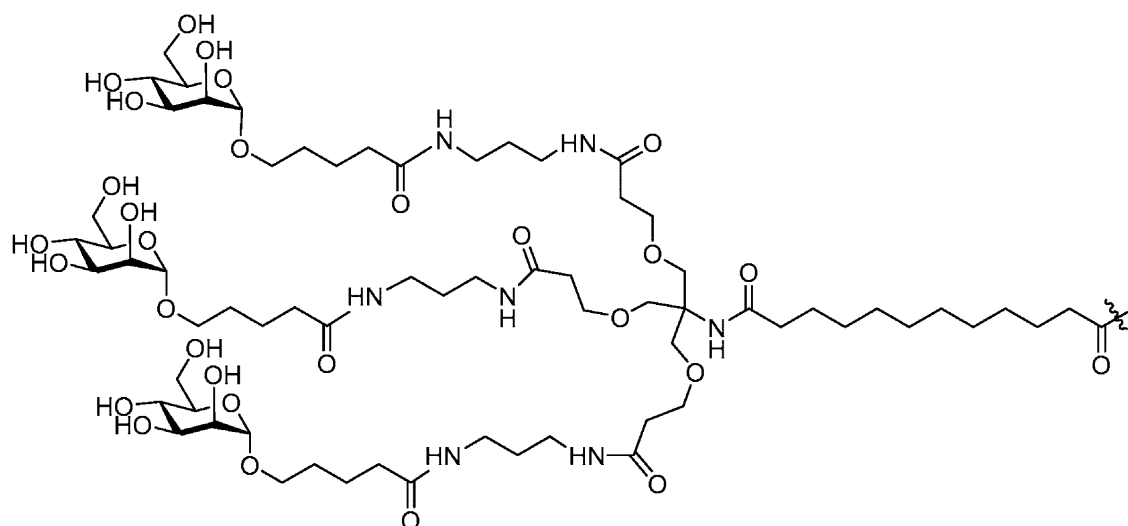
30

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 $\text{R}^{\text{T D}}$ は、

40

50

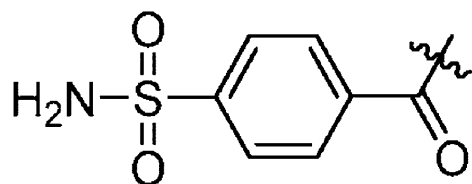
【化 8 7】



10

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、
【化 8 8】

20



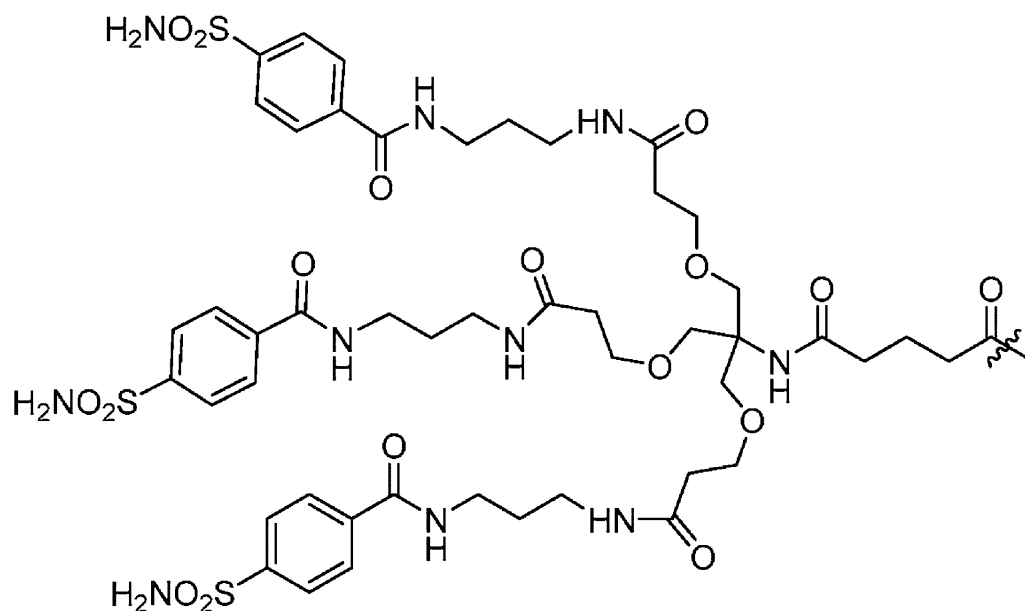
30

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

40

50

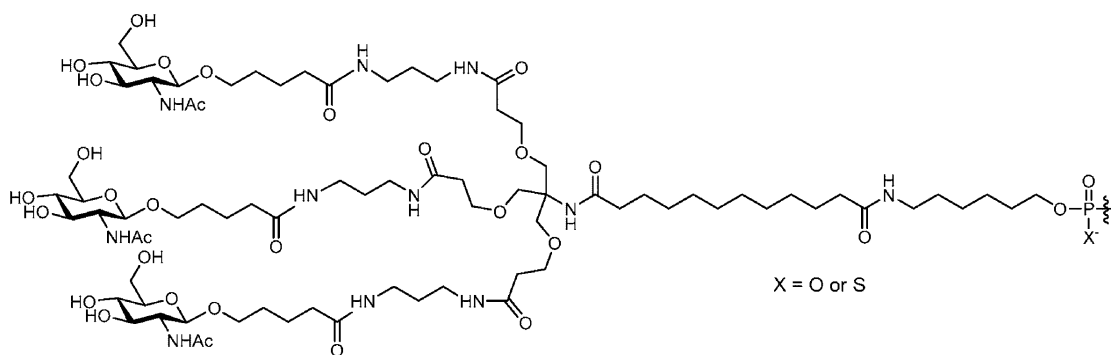
【化 8 9】



10

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

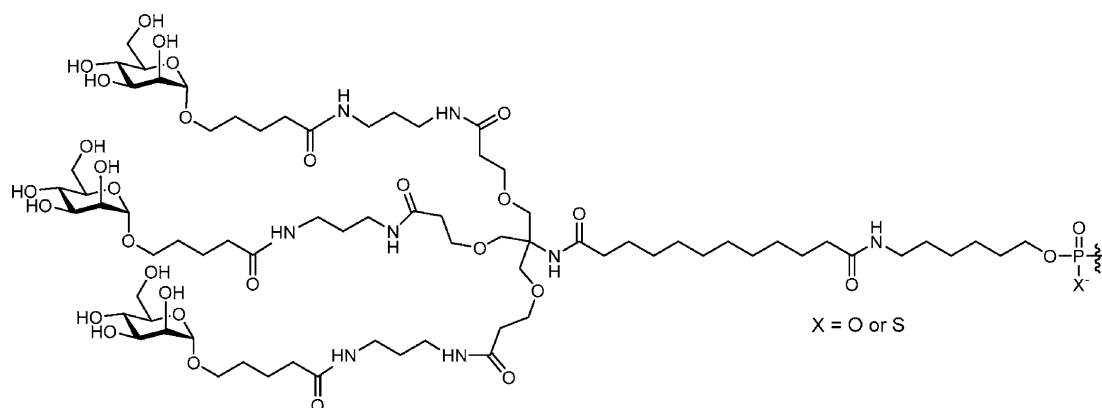
【化 9 0】



30

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 9 1】

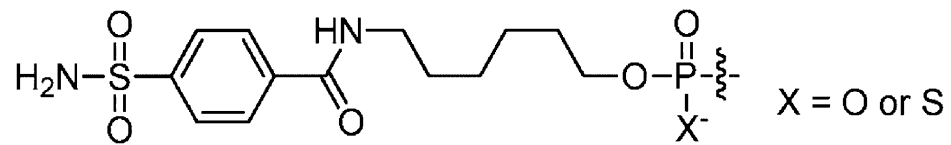


40

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

50

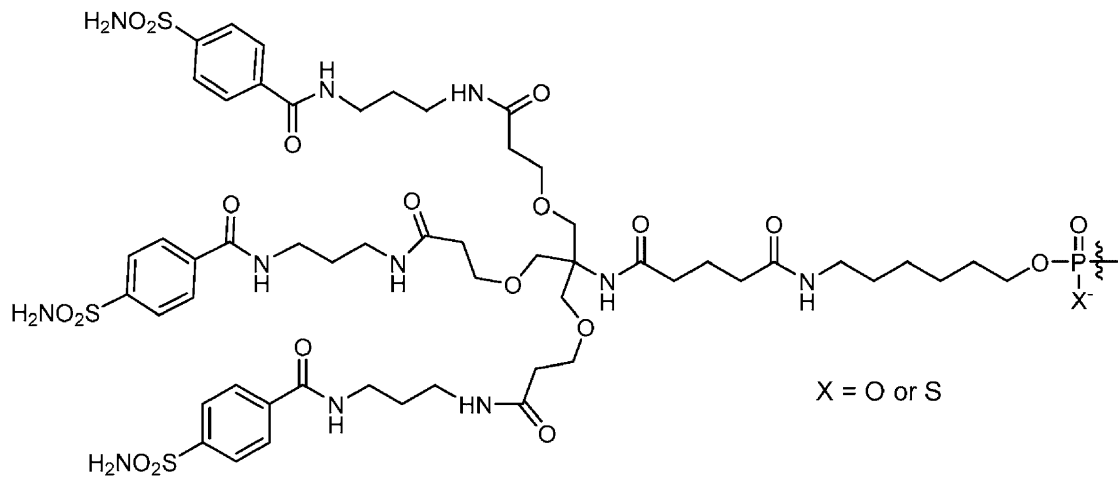
【化 9 2】



10

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 9 3】



20

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、標的化構成要素であり、脂質部分を含むか、または脂質部分である。一部の実施形態では、XはOである。一部の実施形態では、XはSである。

30

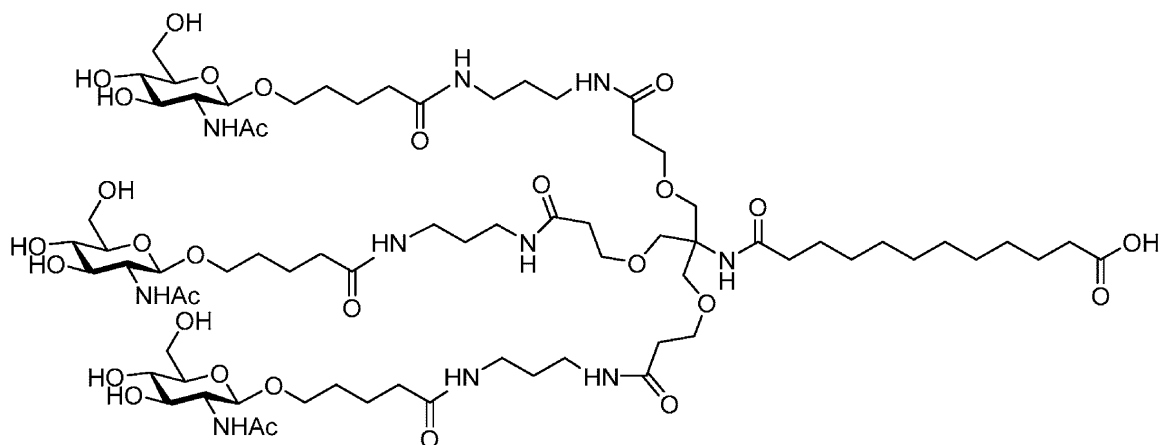
【0784】

一部の実施形態では、本開示は、様々な部分をオリゴヌクレオチド部分に複合体化するための技術（例えば、試薬、方法等）を提供する。一部の実施形態では、本開示は、標的化構成要素をオリゴヌクレオチド部分に複合体化するための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、複合体化のための標的化構成要素を含有する酸、例えば、 $R^{LD}-COOH$ を提供する。一部の実施形態では、本開示は、複合体化のためのリンカー、例えば、 L^M を提供する。当業者であれば、多くの公知で広く実施されている技術を、本開示に従いオリゴヌクレオチド部分との複合体化に利用可能であることを理解する。一部の実施形態では、提供される酸は、

40

50

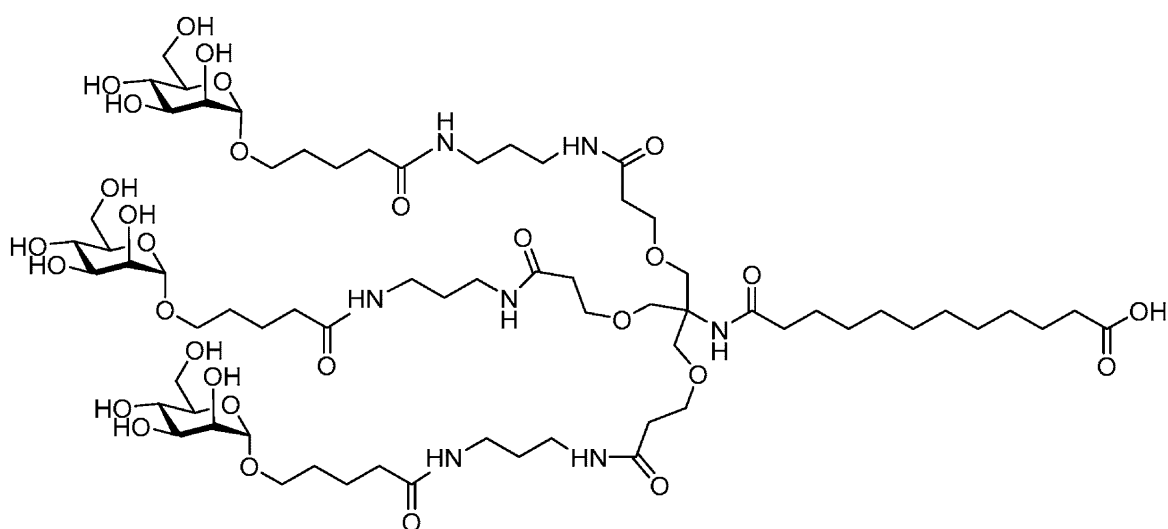
【化 9 4】



10

である。一部の実施形態では、提供される酸は、

【化 9 5】

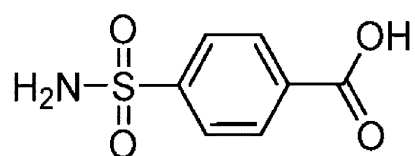


20

30

である。一部の実施形態では、提供される酸は、

【化 9 6】

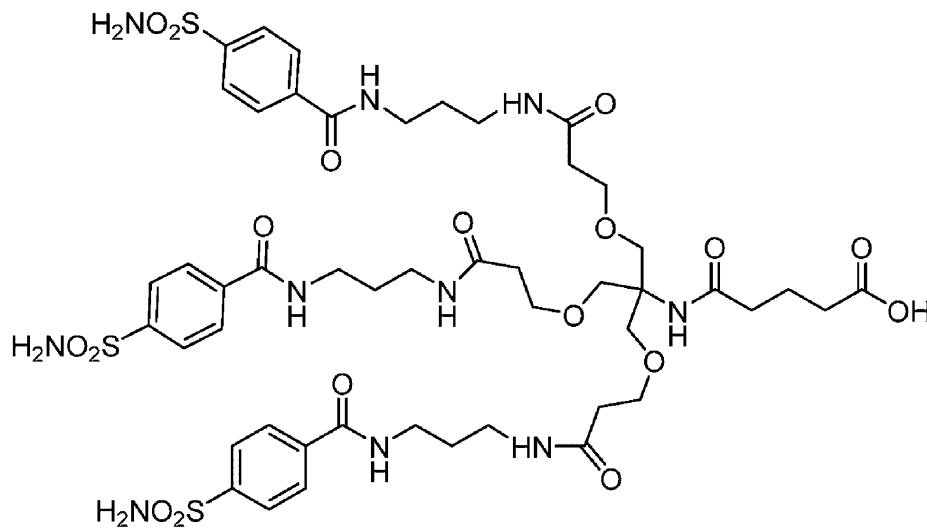


40

である。一部の実施形態では、提供される酸は、

50

【化 9 7】



である。一部の実施形態では、提供される酸は、脂肪酸であり、これは、標的化構成要素として脂質部分を提供し得る。一部の実施形態では、本開示は、かかる酸を調製するための方法及び試薬を提供する。

【0785】

一部の実施形態では、標的化部分は脂質部分であり、例えば、コレステロールまたはその誘導体の部分である（R^{TD}-Hは、任意で置換されるコレステロールまたはその誘導体である）。

【0786】

一部の実施形態では、標的化部分はペプチドである。一部の実施形態では、標的化部分はタンパク質またはそのドメインである。一部の実施形態では、標的化部分は抗体またはその一部である。

【0787】

P N P L A 3オリゴヌクレオチドに複合体化される任意選択の追加の化学的部分：脂質部分

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド組成物はさらに、1つ以上の脂質または脂質部分を含む。一部の実施形態では、脂質は脂質部分である。一部の実施形態では、脂質部分はP N P L A 3オリゴヌクレオチドに直接または間接的に複合体化される脂質であるか、またはこれを含む。一部の実施形態では、脂質の複合体化は、1つ以上の予想外の大幅に改善された特性（例えば、活性、毒性、分布、薬物動態等）を達成し得る。当業者が理解するように、様々な炭水化物部分が文献に記載されており、本開示に従って利用され得る。

【0788】

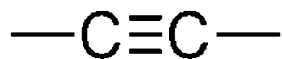
脂質部分は、様々な位置、例えば、糖単位、ヌクレオチド間結合単位、核酸塩基単位等で、任意に1つ以上の二価または多価のリンカー（これは、2つ以上の炭水化物部分をオリゴヌクレオチドに連結させるために使用され得る）を介してオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチドへの脂質の組み込みのための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、脂質部分を、任意に1つ以上のリンカーを介して、核酸塩基単位において、ヌクレオチド間結合及び／または糖単位での組み込みの代替として、及び／またはその追加として、組み込むための技術を提供し、それにより、非常に大きな柔軟性及び／または改良された特性及び／または活性を提供する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、核酸塩基単位において当該オリゴヌクレオチドに組み込まれた少なくとも1つの脂質部分を、任意にリンカーを介して含む。

【0789】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、
 $A^C - [-L^M - (R^D)_a]_b$ 、または $[(A^C)_a - L^M]_b - R^D$ 、
 の構造を有し、
 式中、
 A^C は、PNPLA3オリゴヌクレオチド鎖であり（ $[H]_b - A^C$ は、PNPLA3オリ
 ゴヌクレオチドである）；
 a は、1～1000であり、
 b は、1～1000であり、
 各 L^M は、独立してリンカーであり、
 各 R^D は、独立して R^{LD} または R^{CD} であり、
 R^{CD} は、 C_{1-100} 脂肪族基ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素、及びケイ素か
 ら独立して選択される1～30個のヘテロ原子を有する C_{1-100} ヘテロ脂肪族基から選
 択される、任意で置換される直線状または分枝状の基であり、ここで1つ以上のメチレン
 単位は、任意に及び独立して、 C_{1-6} アルキレン、 C_{1-6} アルケニレン、
 【化98】

10

20



30

$-C(R')_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S$
 $)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N$
 $(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-C(O$
 $)S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-P(O)(OR')-$ 、 $-P(O)(SR')-$ 、 $-P(O$
 $)(R')-$ 、 $-P(O)(NR')-$ 、 $-P(S)(OR')-$ 、 $-P(S)(SR')-$ 、
 $-P(S)(R')-$ 、 $-P(S)(NR')-$ 、 $-P(R')-$ 、 $-P(OR')-$ 、 $-P(SR$
 $')-$ 、 $-P(NR')-$ 、 $-P(OR')[B(R'_3)]-$ 、 $-OP(O)(OR')O$
 $-$ 、 $-OP(O)(SR')O-$ 、 $-OP(O)(R')O-$ 、 $-OP(O)(NR')O-$
 $-$ 、 $-OP(OR')O-$ 、 $-OP(SR')O-$ 、 $-OP(NR')O-$ 、 $-OP(R')O-$ 40
 、または $-OP(OR')[B(R'_3)]O-$ で置き換えられ、1つ以上の炭素原子は任意
 に及び独立して、 C_y で置き換えられ、
 R^{LD} は、 C_{1-100} 脂肪族基から選択される、任意で置換される直線状または分枝状の
 基であり、ここで、1つ以上のメチレン単位は、任意に及び独立して、 C_{1-6} アルキレン
 、 C_{1-6} アルケニレン、

50

【化 9 9】



10

、
 $-C(R')_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)$
 $-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N$ 20
 $(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-C(O)$
 $S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-P(O)(OR')$ 、 $-P(O)(SR')$ 、 $-P(O)$
 (R') 、 $-P(O)(NR')$ 、 $-P(S)(OR')$ 、 $-P(S)(SR')$ 、
 $-P(S)(R')$ 、 $-P(S)(NR')$ 、 $-P(R')$ 、 $-P(OR')$ 、 $-P(SR')$ 、
 $-P(NR')$ 、 $-P(OR')[B(R_3)]$ 、 $-OP(O)(OR')O-$
 $-OP(O)(SR')O-$ 、 $-OP(O)(R')O-$ 、 $-OP(O)(NR')O-$
 $-OP(OR')O-$ 、 $-OP(SR')O-$ 、 $-OP(NR')O-$ 、 $-OP(R')O-$
 、または $-OP(OR')[B(R'_3)]O-$ で置き換えられ、1つ以上の炭素原子は任意
 に及び独立して、 C_y で置き換えられ、

L^M は、共有結合であるか、または、 C_{1-100} 脂肪族基ならびに酸素、窒素、硫黄、リ
 ン、ホウ素、及びケイ素から独立して選択される1～30個のヘテロ原子を有する C_{1-1}
 00 ヘテロ脂肪族基から選択される、任意で置換される二価もしくは多価の直線状もしくは
 は分枝状の基であり、ここで、1つ以上のメチレン単位は、任意に及び独立して、 C_{1-6}
 アルキレン、 C_{1-6} アルケニレン、

30

40

50

【化 1 0 0】



10

、
 $-\text{C}(\text{R}')_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}')-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{S})-$ 、 $-\text{C}(\text{NR}')-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$ 、 $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$ 、 $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{SR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}')-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{NR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{OR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{SR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{R}')-$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{NR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{R}')-$ 、 $-\text{P}(\text{OR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{SR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{NR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{OR}')[\text{B}(\text{R}_3)]-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{R}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{NR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{OR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{SR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{NR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{R}')\text{O}-$ 、または $-\text{OP}(\text{OR}')[\text{B}(\text{R}'_3)]\text{O}-$ で置き換えられ、1つ以上の炭素原子は任意に及び独立して、 Cy^{L} で置き換えられ、

Cy^{L} は、 C_3-20 脂環式環、 C_6-20 アリール環、酸素、窒素、硫黄、リン、及びケイ素から独立して選択される1~10個のヘテロ原子を有する5~20員のヘテロアリール環、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素、及びケイ素から独立して選択される1~10個のヘテロ原子を有する3~20員のヘテロシクリル環から選択される、任意で置換される四価の基であり、

各 R' は、独立して、 $-\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、または $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ であり、

各 R は、独立して、 $-\text{H}$ であるか、または C_1-30 脂肪族、酸素、窒素、硫黄、リン、及びケイ素から独立して選択される1~10個のヘテロ原子を有する C_1-30 ヘテロ脂肪族、 C_6-30 アリール、 C_6-30 アリール脂肪族、酸素、窒素、硫黄、リン、及びケイ素から独立して選択される1~10個のヘテロ原子を有する C_6-30 アリールヘテロ脂肪族、酸素、窒素、硫黄、リン、及びケイ素から独立して選択される1~10個のヘテロ原子を有する5~30員のヘテロアリール、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、及びケイ素から独立して選択される1~10個のヘテロ原子を有する3~30員のヘテロシクリルから選択される、任意で置換される基であるか、あるいは、

2つの R 基は、任意に及び独立して、一緒になって共有結合を形成するか、または、同じ原子上の2つ以上の R 基は、任意に及び独立して、当該原子と一緒に、当該原子の他に、酸素、窒素、硫黄、リン、及びケイ素から独立して選択される0~10個のヘテロ原子を有する任意で置換される3~30員の単環式、二環式、もしくは多環式環を形成するか、または、

2つ以上の原子上の2つ以上の R 基は、任意に及び独立して、それらの介在する原子と一

30

40

50

緒になって、当該介在する原子の他に、酸素、窒素、硫黄、リン、及びケイ素から独立して選択される0～10個のヘテロ原子を有する任意で置換される3～30員の単環式、二環式、もしくは多環式環を形成する。

【0790】

一部の実施形態では、 R^{CD} は、炭水化物部分または二環式ケタールである。一部の実施形態では、 R^{CD} は、少なくとも1つの単糖、二糖、または多糖単位を含む。一部の実施形態では、 R^{CD} は、少なくとも1つのGalNAc部分またはその誘導体を含む。

【0791】

一部の実施形態では、 R^{LD} は脂質部分である。一部の実施形態では、 R^{LD} は、1つ以上の任意で置換される C_{6-20} 脂肪族鎖を含む。一部の実施形態では、 R^{LD} は、1つ以上の非置換の C_{6-20} 脂肪族鎖を含む。

10

【0792】

一部の実施形態では、少なくとも1つの L^M は、提供されるオリゴヌクレオチドの糖単位に直接結合される。一部の実施形態では、 L^M は、糖単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに脂質部分を組み込む。一部の実施形態では、 L^M は、糖単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに炭水化物部分を組み込む。一部の実施形態では、 L^M は、糖単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに R^{LD} 基を組み込む。一部の実施形態では、 L^M は、糖単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに R^{CD} 基を組み込む。

20

【0793】

一部の実施形態では、少なくとも1つの L^M は、提供されるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合単位に直接結合される。一部の実施形態では、 L^M は、ヌクレオチド間結合単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに脂質部分を組み込む。一部の実施形態では、 L^M は、ヌクレオチド間結合単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに炭水化物部分を組み込む。一部の実施形態では、 L^M は、ヌクレオチド間結合単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに R^{LD} 基を組み込む。一部の実施形態では、 L^M は、ヌクレオチド間結合単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに R^{CD} 基を組み込む。

【0794】

一部の実施形態では、少なくとも1つの L^M は、提供されるオリゴヌクレオチドの核酸塩基単位に直接結合される。一部の実施形態では、 L^M は、核酸塩基単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに脂質部分を組み込む。一部の実施形態では、 L^M は、核酸塩基単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに炭水化物部分を組み込む。一部の実施形態では、 L^M は、核酸塩基単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに R^{LD} 基を組み込む。一部の実施形態では、 L^M は、核酸塩基単位に直接結合し、PNPLA3オリゴヌクレオチドに R^{CD} 基を組み込む。

30

【0795】

一部の実施形態では、 $[H]_b-A^c$ は、本開示に記載のPNPLA3オリゴヌクレオチドである。

【0796】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドへの脂質の組み込みは、分布及び／または薬物動態を改善する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドへの脂質の組み込みは、 C_{max} （投与後の薬剤のピーク血漿濃度）、 t_{max} （ C_{max} に到達するまでの時間）、 C_{min} （次の投薬が行われる前に薬剤が到達する最低（トラフ）濃度）、排出半減期（薬剤濃度が、その元の値の半分に到達するために必要とされる時間）、消失速度定数（薬剤が身体から除去される速度）、曲線下面積（（単回投与後または定常状態での）濃度－時間曲線の積分）、及びクリアランス（薬剤が除去された、単位時間当たりの血漿量）から選択される1つ以上の薬物動態の測定を改善する。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、例えば半減期等の薬物動態特性の最適化は、最大化とは識別され得ることを注記する。一部の実施形態では、概

40

50

して、特定の薬物は、その所望の機能の実行を可能にするのに十分な半減期を有するが、一方でオフターゲット効果及び他の毒性を最小化するためには十分に短いことが望ましいだろう。一部の実施形態では、最適化された半減期は、毒性を最小にしながら、活性を可能にするために十分に長い。長期化された半減期または最大限の半減期は、望ましくない場合がある。

【0797】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物はさらに、1つ以上の脂質を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物はさらに、1つ以上の脂肪酸を含む。一部の実施形態では、該脂質は、該組成物中で、提供されるオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。一部の実施形態では、2つ以上の同じまたは異なる脂質が1つのオリゴヌクレオチドに、同じもしくは異なる化学及び／または位置を介して組み込まれ得る。

10

【0798】

多くの脂質が本開示に従って提供される技術で使用され得る。一部の実施形態では、脂質は R^{LD} 基を含む。一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で置換される $C_{10}-C_{80}$ の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基であり、ここで、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、 C_1-C_6 アルキレン、 C_1-C_6 アルケニレン、

【化101】

20



30

、 C_1-C_6 ヘテロ脂肪族部分、 $-C(R')_2-$ 、及び $-C_y-$ から選択される任意で置換される基により置き換えられる。一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基であり、ここで、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、 C_1-C_6 アルキレン、 C_1-C_6 アルケニレン、

40

50

【化 1 0 2】



10

C₁ - C₆ ヘテロ脂肪族部分、-C(R')₂-、及び-Cy-から選択される任意で置換される基により置き換えられる。一部の実施形態では、R^{L D}は、炭素原子と水素原子からなる炭化水素基である。一部の実施形態では、-Cy-は、C₃ - 20 脂環式環、C₆ - 20 アリール環、酸素、窒素、硫黄、リン、及びケイ素から独立して選択される1 ~ 10 個のヘテロ原子を有する5 ~ 20 員のヘテロアリール環、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素、及びケイ素から独立して選択される1 ~ 10 個のヘテロ原子を有する3 ~ 20 員のヘテロシクリル環から選択される、任意で置換される二価の基である。

20

【0 7 9 9】

一部の実施形態では、R^{L D}は、任意で置換されるC₁₀ - C₆₀の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基であり、ここで、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、C₁ - C₆ アルキレン、C₁ - C₆ アルケニレン、

【化 1 0 3】

30



40

、
C₁ - C₆ ヘテロ脂肪族部分、-C(R')₂-、及び-Cy-から選択される任意で置換される基により置き換えられる。一部の実施形態では、R^{L D}は、任意で置換されるC₁₀ - C₆₀の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基であり、ここで、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、C₁ - C₆ アルキレン、C₁ - C₆ アルケニレン、

50

【化 1 0 4】



10

、
C₁ - C₆ ヘテロ脂肪族部分、- C (R ')₂ -、及び - C_y - から選択される任意で置換される基により置き換えられる。一部の実施形態では、R^{L D} は、炭素原子と水素原子からなる炭化水素基である。

20

【 0 8 0 0】

一部の実施形態では、R^{L D} は、任意で置換される C₁₀ - C₄₀ の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基であり、ここで、1 つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、C₁ - C₆ アルキレン、C₁ - C₆ アルケニレン、
【化 1 0 5】

30

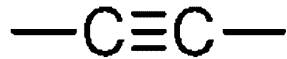


40

、
C₁ - C₆ ヘテロ脂肪族部分、- C (R ')₂ -、及び - C_y - から選択される任意で置換される基により置き換えられる。一部の実施形態では、R^{L D} は、任意で置換される C₁₀ - C₆₀ の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基であり、ここで、1 つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、C₁ - C₆ アルキレン、C₁ - C₆ アルケニレン、

50

【化 106】



10

、 C_1-C_6 ヘテロ脂肪族部分、 $-C(R')_2-$ 、及び $-C_y-$ から選択される任意で置換される基により置き換えられる。一部の実施形態では、 R^{LD} は、炭素原子と水素原子からなる炭化水素基である。

20

【0801】

R^{LD} の脂肪族基は、様々な適切な長さであってもよい。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{80}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{75}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{70}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{65}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{60}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{50}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{40}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{35}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{30}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{25}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{24}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{23}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{22}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{21}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{12}-C_{22}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{13}-C_{22}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{14}-C_{22}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{15}-C_{22}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{16}-C_{22}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{17}-C_{22}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{18}-C_{22}$ である。一部の実施形態では、それは $C_{10}-C_{20}$ である。一部の実施形態では、当該範囲の下限は、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、または C_{18} である。一部の実施形態では、当該範囲の上限は、 C_{18} 、 C_{19} 、 C_{20} 、 C_{21} 、 C_{22} 、 C_{23} 、 C_{24} 、 C_{25} 、 C_{26} 、 C_{27} 、 C_{28} 、 C_{29} 、 C_{30} 、 C_{35} 、 C_{40} 、 C_{45} 、 C_{50} 、 C_{55} 、または C_{60} である。一部の実施形態では、それは C_{10} である。一部の実施形態では、それは C_{11} である。一部の実施形態では、それは C_{12} である。一部の実施形態では、それは C_{13} である。一部の実施形態では、それは C_{14} である。一部の実施形態では、それは C_{15} である。一部の実施形態では、それは C_{16} である。一部の実施形態では、それは C_{17} である。一部の実施形態では、それは C_{18} である。一部の実施形態では、それは C_{19} である。一部の実施形態では、それは C_{20} である。一部の実施形態では、それは C_{21} である。一部の実施形態では、それは C_{22} である。一部の実施形態では、それは C_{23} である。一部の実施形態では、それは C_{24} である。一部の実施形態では、それは C_{25} である。一部の実施形態では、それは C_{30} である。一部の実施形態では、それは C_{35} である。一部の実施形態では、それは C_{40} である。一部の実施形態では、それは C_{45} である。一部の実施形態では、それは C_{50} である。一部の実施形態では、それは C_{55} である。一部の実施形態では、それは C_{60} である。

30

40

50

【0802】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の R^{LD} 基を含有する。一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の R^{LD} 基を含有する。

【0803】

一部の実施形態では、脂質は、 R^{LD} 基を含有する部分として、任意でリンカーを介して生物活性剤に複合体化される。一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の R^{LD} 基を含有する部分として、任意でリンカーを介して生物活性剤に複合体化される。一部の実施形態では、脂質は、 R^{LD} 基として、任意でリンカーを介して生物活性剤に複合体化される。一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の R^{LD} 基を含有する部分として、任意でリンカーを介して生物活性剤に複合体化される。

10

【0804】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で置換される、 $C_{10}-C_{40}$ の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{40}$ の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0805】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で置換される、 $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0806】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で1つ以上の C_1-4 脂肪族基で置換される、 $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で1つ以上の C_1-4 脂肪族基で置換される $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で1つ以上の C_1-2 脂肪族基で置換される、 $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で1つ以上の C_1-2 脂肪族基で置換される $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で1つ以上のメチル基で置換される、 $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で1つ以上のメチル基で置換される $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

20

30

【0807】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、非置換の $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、非置換の $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0808】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の任意で置換される $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の任意で置換される $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0809】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で置換される、 $C_{10}-C_{60}$ の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

40

【0810】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で置換される、 $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0811】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で1つ以上の C_1-4 脂肪族基で置換される、 $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では

50

、脂質は、任意で1つ以上の C_{1-4} 脂肪族基で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で1つ以上の C_{1-2} 脂肪族基で置換される、 $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で1つ以上の C_{1-2} 脂肪族基で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で1つ以上のメチル基で置換される、 $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で1つ以上のメチル基で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0812】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、非置換の $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、非置換の $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0813】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0814】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で置換される、 $C_{10}-C_{80}$ の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{80}$ の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0815】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で置換される、 $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0816】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で1つ以上の C_{1-4} 脂肪族基で置換される、 $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で1つ以上の C_{1-4} 脂肪族基で置換される $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で1つ以上の C_{1-2} 脂肪族基で置換される、 $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で1つ以上の C_{1-2} 脂肪族基で置換される $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、 R^{LD} は、任意で1つ以上のメチル基で置換される、 $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、任意で1つ以上のメチル基で置換される $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0817】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、非置換の $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖である。一部の実施形態では、脂質は、非置換の $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0818】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の任意で置換される $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の任意で置換される $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0819】

一部の実施形態では、 R^{LD} は、 C_{10} の飽和直線状脂肪族鎖であるか、またはこれを含有する。一部の実施形態では、 R^{LD} は、 C_{10} の部分不飽和直線状脂肪族鎖であるか、ま

10

20

30

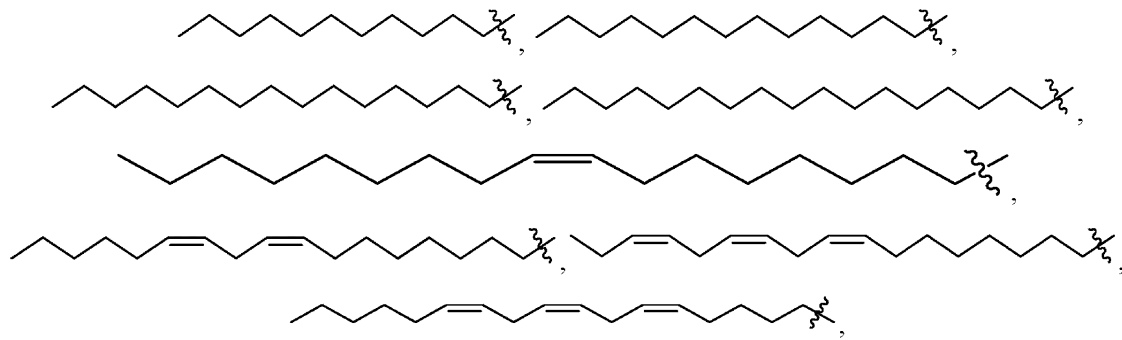
40

50

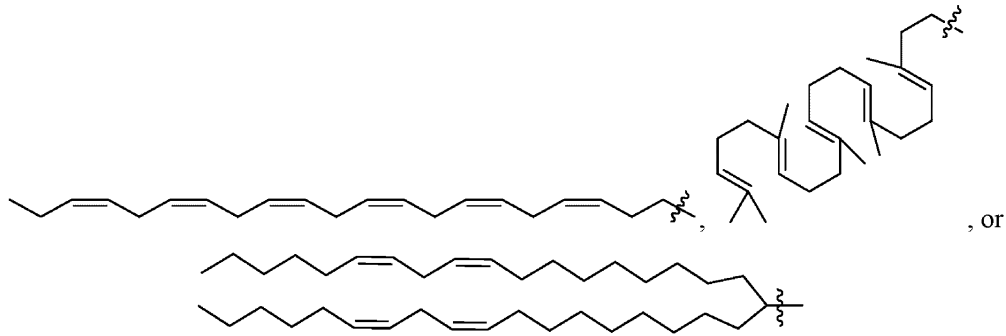
40

50

質は、 $R^{LD}-C(O)OH$ の構造を有する。一部の実施形態では、 R^{LD} は、
【化107】



10



20

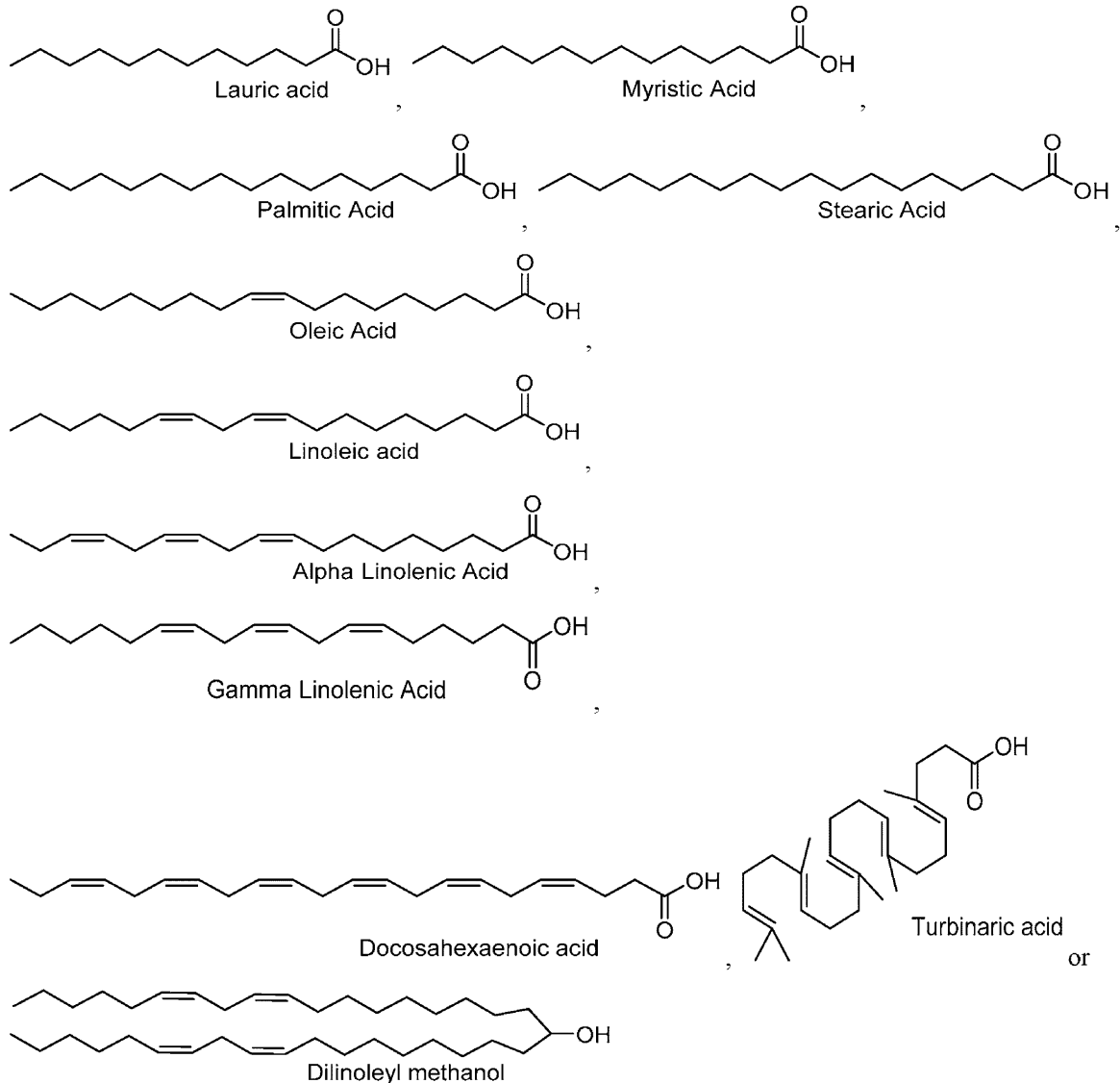
一部の実施形態では、脂質は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、ガンマ-リノレン酸、ドコサヘキサエン酸（DHAまたはシス-DHA）、ツルビナル酸（*turbinaric acid*）、アラキドン酸、及びジリノレイル（*dilinoleyl*）である。一部の実施形態では、脂質は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、ガンマ-リノレン酸、ドコサヘキサエン酸（DHAまたはシス-DHA）、ツルビナル酸、及びジリノレイルである。一部の実施形態では、脂質は、以下の構造を有する：

30

40

50

【化 1 0 8】



【 0 8 2 2】

一部の実施形態では、脂質は、以下のいずれかであるか、いずれかを含有するか、またはいずれかからなる：少なくとも部分的に疎水性または両親媒性の分子、リン脂質、トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、脂溶性ビタミン、ステロール、脂肪及びワックス。一部の実施形態では、脂質は、以下のいずれかである：脂肪酸、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、ステロール脂質、プレノール脂質、サッカロ脂質 (saccharolipid)、ポリケチド、及びその他の分子。

【 0 8 2 3】

脂質は、本開示に従う多くの形式の方法によって、提供される技術に取り込まれることができる。一部の実施形態では、脂質は、提供されるオリゴヌクレオチドと物理的に混合され、提供される組成物を生成する。一部の実施形態では、脂質は、オリゴヌクレオチド部分と化学的に複合体化される。

【 0 8 2 4】

一部の実施形態では、提供される組成物は、2種以上の脂質を含有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、2種以上の複合体化脂質を含有する。一部の実施形態では、2種以上の複合体化脂質は、同一である。一部の実施形態では、2種以上の複合体化脂質は、異なる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1種を超えない脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオ

チドは、異なる型の複合体化脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、同じ型の脂質を含有する。

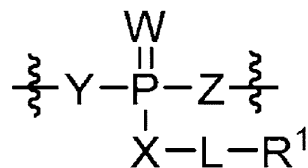
【0825】

脂質は、任意でリンカーを介して、オリゴヌクレオチドに複合体化され得る。当分野の様々なタイプのリンカーが、本開示に従い利用され得る。一部の実施形態では、リンカーは、本開示に記載される L^M である。一部の実施形態では、リンカーはリン酸基を含有し、それを例えば、オリゴヌクレオチド合成で使用される化学と類似した化学方法を介した脂質の複合体化に使用することができる。一部の実施形態では、リンカーは、アミド基、エステル基、またはエーテル基を含有する。

【0826】

一部の実施形態では、リンカーは、 $-L^M-$ の構造を有する。一部の実施形態では、 L^M は L^D である。一部の実施形態では、 L^D は、

【化109】



の構造を有する T^D であり、ここで、各可変要素は、独立して、規定され、記載されたとおりである。一部の実施形態では、 T^D は、式 I の構造を有する。一部の実施形態では、 $P N P L A 3$ オリゴヌクレオチド部分の $5' - O -$ を備えた P は、ホスホロチオエート結合 ($-O P (O) (S^-) O -$) を形成する。一部の実施形態では、 $P N P L A 3$ オリゴヌクレオチド部分の $5' - O -$ を備えた P は、 $S p$ のホスホロチオエート結合を形成する。一部の実施形態では、 $P N P L A 3$ オリゴヌクレオチド部分の $5' - O -$ を備えた P は、 $R p$ のホスホロチオエート結合を形成する。一部の実施形態では、 $P N P L A 3$ オリゴヌクレオチド部分の $5' - O -$ を備えた P は、リン酸結合 ($-O P (O) (O^-) O -$) を形成する。一部の実施形態では、 $P N P L A 3$ オリゴヌクレオチド部分の $5' - O -$ を備えた T^D は、ホスホロジチオエート結合を形成する。一部の実施形態では、 L^D は $-L - T^D -$ である。一部の実施形態では、 Y は、 $-L -$ に結合し、 $-Z -$ は共有結合であるため、 P は、オリゴヌクレオチド部分のヒドロキシル基に直接結合する。一部の実施形態では、 P は $5'$ 末端ヒドロキシル ($5' - O -$) に結合し、リン酸基 (天然のリン酸結合) またはホスホロチオエート基 (ホスホロチオエート結合) を形成する。一部の実施形態では、ホスホロチオエート結合はキラル制御され、 $R p$ または $S p$ のいずれかであってもよい。別段の特定が無い限り、リンカーのキラル中心 (例えば、 T^D 中の P) は、立体不規則的であっても、キラル制御されてもよく、及びそれらは、例えば、組成物がキラル制御されているか否かの決定に際して、骨格のキラル中心の一部とはみなされない。一部の実施形態では、 L^D は $-N H - (C H_2)_6 - T^D -$ である。一部の実施形態では、 L^D は $-C (O) - N H - (C H_2)_6 - T^D -$ である。

【0827】

一部の実施形態では、リンカーは、 $-L -$ の構造を有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドへの複合体化後、脂質は、 $-L - R^{L^D}$ の構造を有する部分を形成し、式中、 L 及び R^{L^D} の各々は独立して本明細書に規定され、記載されたとおりである。

【0828】

一部の実施形態では、 $-L -$ は、二価の脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、 $-L -$ は、リン酸基を含有する。一部の実施形態では、 $-L -$ は、ホスホロチオエート基を含有する。一部の実施形態では、 $-L -$ は、 $-C (O) N H - (C H_2)_6 - O P (=O$

) (S⁻)-の構造を有する。一部の実施形態では、-L-は、-C(O)NH-(CH₂)₆-OP(=O)(O⁻)-の構造を有する。

【0829】

脂質は、任意でリンカーを介して、様々な適切な位置でオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。一部の実施形態では、脂質は、5'-OH基を介して複合体化される。一部の実施形態では、脂質は、3'-OH基を介して複合体化される。一部の実施形態では、脂質は、1つ以上の糖部分を介して複合体化される。一部の実施形態では、脂質は、1つ以上の塩基を介して複合体化される。一部の実施形態では、脂質は、1つ以上のヌクレオチド間結合を介して組み込まれる。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、複数の複合体化脂質を含有してもよく、当該複数の複合体化脂質は、独立して、その5'-OH、3'-OH、糖部分、塩基部分、及び／またはヌクレオチド間結合を介して複合体化される。

10

【0830】

一部の実施形態では、リンカーは、組成物の2つの部分を結合させる部分である。非限定的な例として、リンカーは、PNPLA3オリゴヌクレオチド部分を脂質に物理的に結合させる。適切なリンカーの非限定的な例としては、非荷電リンカー、荷電リンカー、アルキルを含有するリンカー、リン酸を含有するリンカー、分枝状リンカー、非分枝状リンカー、少なくとも1つの切断基を含有するリンカー、少なくとも1つの酸化還元切断基を含有するリンカー、少なくとも1つのリン酸系の切断基を含有するリンカー、少なくとも1つの酸切断基を含有するリンカー、少なくとも1つのエステル系切断基を含有するリンカー、少なくとも1つのペプチド系切断基を含有するリンカーが挙げられる。

20

【0831】

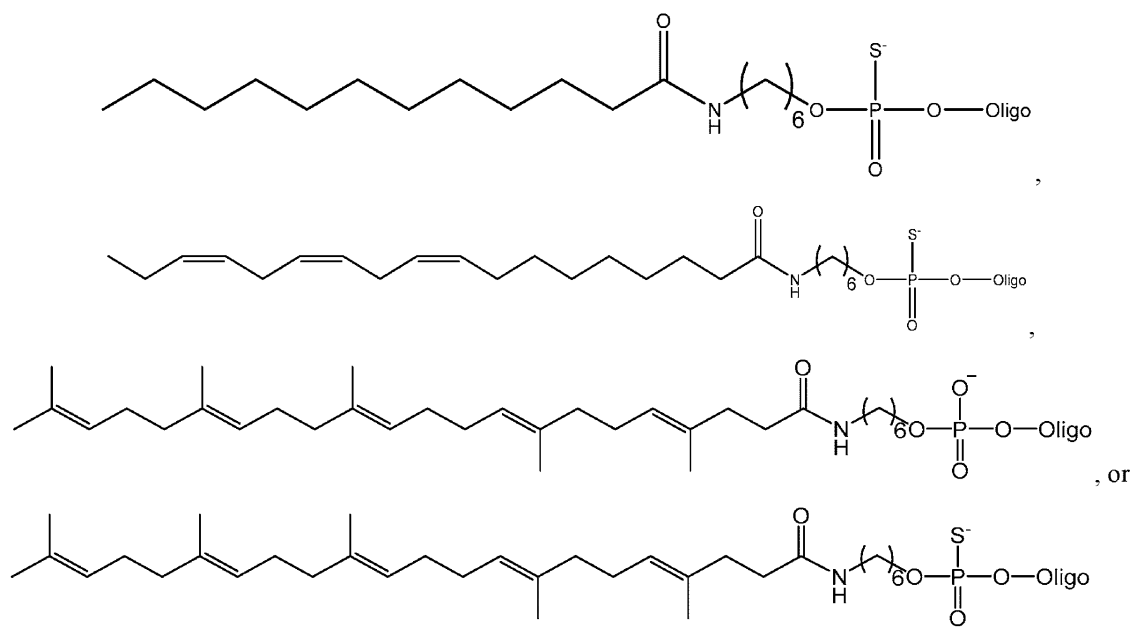
一部の実施形態では、脂質は、任意でリンカー部分を介して活性化合物に複合体化される。当業者であれば、本開示に従い活性化合物に脂質を複合体化させるために様々な技術が利用され得ることを認識する。例えば、カルボキシル基を含有する脂質に関し、かかる脂質は、カルボキシル基を介して複合体化され得る。一部の実施形態では、脂質は、-L-の構造を有するリンカーを介して複合体化され、ここで、Lは、式Iにおいて規定され、記載されるとおりである。一部の実施形態では、Lは、リン酸ジエステル部分または修飾リン酸ジエステル部分を含有する。一部の実施形態では、脂質複合体化により形成される化合物は、(R^{L D}-L)_a- (活性化合物)の構造を有し、ここで、aは1または1よりも大きい整数であり、各R^{L D}及びLは、独立して本明細書に規定され、記載されるとおりである。一部の実施形態では、aは、1である。一部の実施形態では、aは、1よりも大きい。一部の実施形態では、aは、1~50である。一部の実施形態では、活性化合物は、PNPLA3オリゴヌクレオチドである。例えば、一部の実施形態では、複合体は、以下の構造のいずれかを有する：

30

40

50

【化 1 1 0】



式中、オリゴは、オリゴヌクレオチドを示す。

【0 8 3 2】

一部の実施形態では、リンカーは、非荷電リンカー、荷電リンカー、アルキルを含有するリンカー、リン酸を含有するリンカー、分枝状リンカー、非分枝状リンカー、少なくとも1つの切断基を含有するリンカー、少なくとも1つの酸化還元切断基を含有するリンカー、少なくとも1つのリン酸系の切断基を含有するリンカー、少なくとも1つの酸切断基を含有するリンカー、少なくとも1つのエステル系切断基を含有するリンカー、及び少なくとも1つのペプチド系切断基を含有するリンカーから選択される。一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^M は、 $-L^{LD}-$ の構造を有する。一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^M は、 $-L-$ の構造を有する。一部の実施形態では、リンカーは、式Iの結合を含有する。一部の実施形態では、リンカーは、 $-C(O)NH-(CH_2)_6-L^I-$ であり、式中、 L^I は、本明細書に記載される式Iの構造を有する。一部の実施形態では、リンカーは、 $-C(O)NH-(CH_2)_6-O-P(=O)(SR^1)-O-$ である。一部の実施形態では、 R^1 は、 $-H$ であり、リンカーは、 $-C(O)NH-(CH_2)_6-O-P(=O)(SH)-O-$ であり、一部の条件、例えば、あるpHでは、 $-C(O)NH-(CH_2)_6-O-P(=O)(S^-)-O-$ である。一部の実施形態では、リンカーは、 $-C(O)NH-(CH_2)_6-O-P(=S)(SR^1)-O-$ である。一部の実施形態では、 R^1 は、 $-H$ であり、リンカーは、 $-C(O)NH-(CH_2)_6-O-P(=S)(SH)-O-$ であり、一部の条件、例えば、あるpHでは、 $-C(O)NH-(CH_2)_6-O-P(=S)(S^-)-O-$ である。一部の実施形態では、リンカーは、 $-C(O)NH-(CH_2)_6-O-P(=S)(OR^1)-O-$ であり、式中、 R^1 は、 $-CH_2CH_2CN$ である。一部の実施形態では、リンカーは、 $-C(O)NH-(CH_2)_6-O-P(=S)(SR^1)-O-$ であり、式中、 R^1 は、 $-CH_2CH_2CN$ である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、リンカーと連結され、H-リンカー-オリゴヌクレオチドの構造を形成する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、脂質と複合体化され、脂質-リンカー-オリゴヌクレオチドの構造、例えば、 $R^{LD}-L^{LD}$ -オリゴヌクレオチドを形成する。一部の実施形態では、リンカーの-O-末端は、PNPLA3オリゴヌクレオチドに繋がれる。一部の実施形態では、リンカーの-O-末端は、5'末端オリゴヌクレオチドに繋がれる（-O-は、5'-OH中の酸素である）。

【0833】

一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^M は、 PO （ホスホジエステル結合）、 PS （ホスホロチオエート結合）、または $PS2$ （ホスホロジチオエート結合）を含有する。 PS リンカーを含む非限定的な例を以下に示す。一部の実施形態では、リンカーは、 $-O-P(O)(OH)-O-$ [ホスホジエステル]、 $-O-P(O)(SH)-O-$ [ホスホロチオエート]、または $-O-P(S)(SH)-O-$ [ホスホロジチオエート] である。一部の実施形態では、リンカーは、以下に図示される、 $C6$ アミノ部分（ $-NH-(CH_2)_6-$ ）を含有する。一部の実施形態では、リンカーは、 PO 、 PS 、または $PS2$ に結合された $C6$ アミノを含有する。一部の実施形態では、リンカーは、 PO 、 PS 、または $PS2$ に結合された $C6$ アミノである。一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^{LD} または L は、 $-C(O)-NH-(CH_2)_6-P(O)(OH)-$ である。一部の実施形態では、リンカー、例えば L^{LD} または L は、 $-C(O)-NH-(CH_2)_6-P(O)(OH)-$ であり、ここで、 $-C(O)-$ は、脂質部分に繋がれ、 $-P(O)(OH)-$ は $PNPLA3$ オリゴヌクレオチド部分に繋がれる。一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^{LD} または L は、 $-C(O)-NH-(CH_2)_6-P(O)(OH)-$ であり、ここで、 $-C(O)-$ は、脂質部分に繋がれ、 $-P(O)(OH)-$ は $PNPLA3$ オリゴヌクレオチド部分の $5'$ - $O-$ に繋がれる。一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^{LD} または L は、 $-C(O)-NH-(CH_2)_6-P(O)(SH)-$ である。一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^{LD} または L は、 $-C(O)-NH-(CH_2)_6-P(O)(SH)-$ であり、ここで、 $-C(O)-$ は、脂質部分に繋がれ、 $-P(O)(SH)-$ は $PNPLA3$ オリゴヌクレオチド部分に繋がれる。一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^{LD} または L は、 $-C(O)-NH-(CH_2)_6-P(S)(SH)-$ である。一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^{LD} または L は、 $-C(O)-NH-(CH_2)_6-P(S)(SH)-$ であり、ここで、 $-C(O)-$ は、脂質部分に繋がれ、 $-P(S)(SH)-$ は $PNPLA3$ オリゴヌクレオチド部分の $5'$ - $O-$ に繋がれる。一部の実施形態では、リンカー、例えば、 L^{LD} または L は、 $-C(O)-NH-(CH_2)_6-P(S)(SH)-$ であり、ここで、 $-C(O)-$ は、脂質部分に接続され、 $-P(S)(SH)-$ は $PNPLA3$ オリゴヌクレオチド部分の $3'$ - $O-$ に繋がれる。当業者に認識されるように、ある pH では、 $-P(O)(OH)-$ 、 $-P(O)(SH)-$ 、 $-P(S)(SH)-$ はそれぞれ、 $-P(O)(O^-)-$ 、 $-P(O)(S^-)-$ 、 $-P(S)(S^-)-$ として存在し得る。一部の実施形態では、脂質部分は、 R^{LD} である。

10

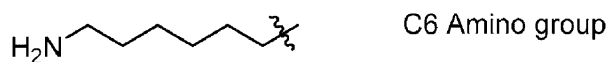
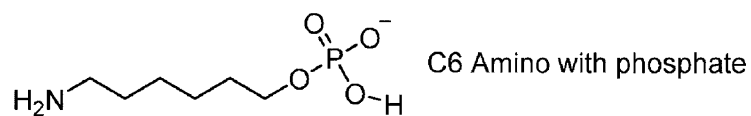
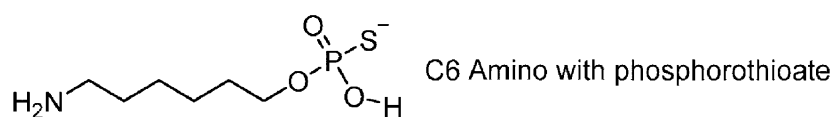
20

30

40

50

【化 1 1 1】



10

【 0 8 3 4】

様々な化学及びリンカーを、本開示に従う複合体化に使用することができる。例えば、一部の実施形態では、脂質は、以下に記載の化学、または同様のプロセスを用いて組み込まれる：

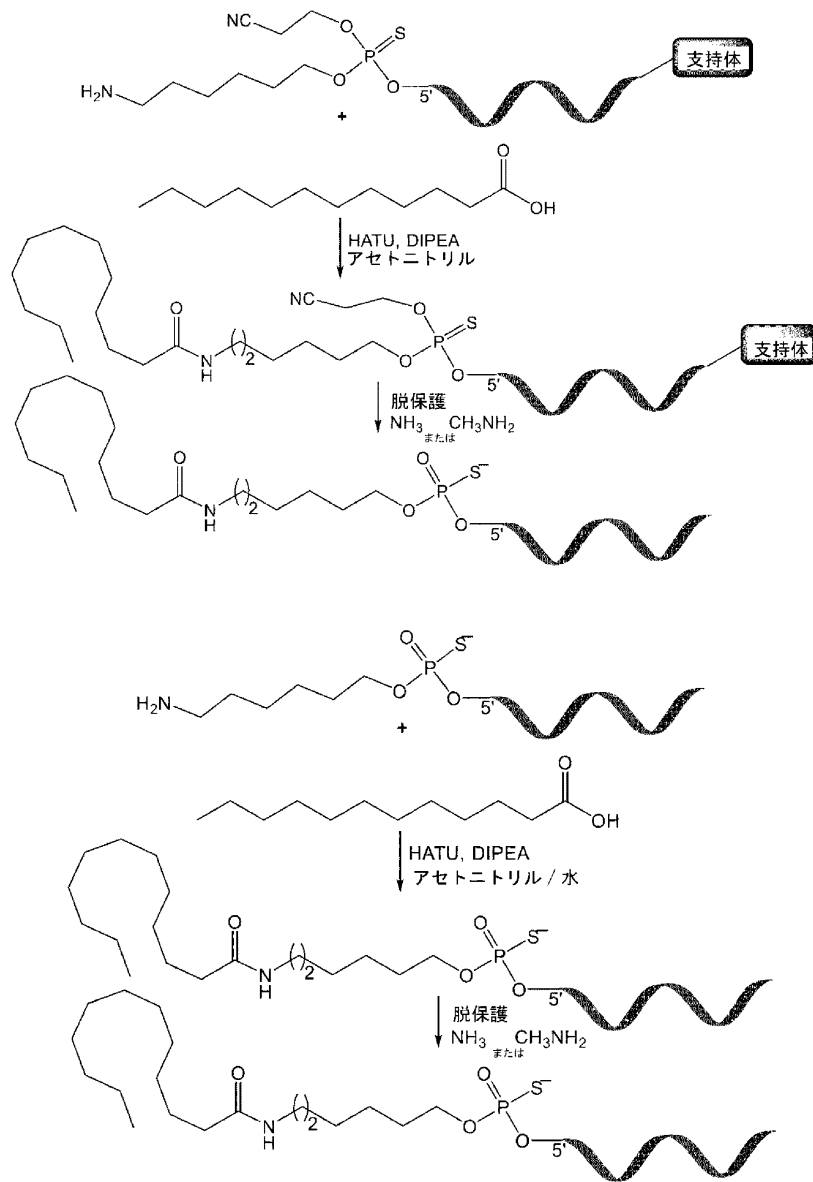
20

30

40

50

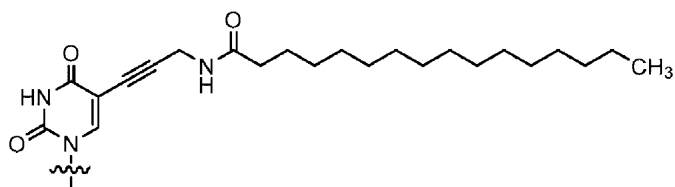
【化 1 1 2】



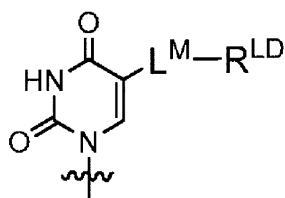
【0 8 3 5】

一部の実施形態では、脂質は、核酸塩基を介して直接PNPLA3オリゴヌクレオチドに組み込まれる。例えば：

【化 1 1 3】



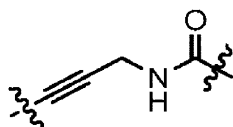
一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、核酸塩基に直接結合した $-L^M$ 10
 $-R^{LD}$ を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、
 【化 1 1 4】



を含む。一部の実施形態では、リンカー (L^M) は、
 【化 1 1 5】 20

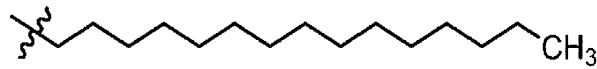


である。一部の実施形態では、リンカー (L^M) は、
 【化 1 1 6】 30



である。一部の実施形態では、脂質部分、 R^{LD} は、
40

【化 1 1 7】

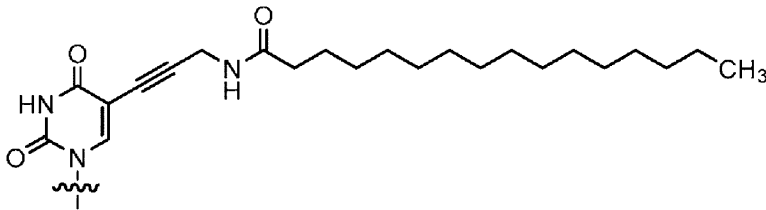


10

である。

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、

【化 1 1 8】



20

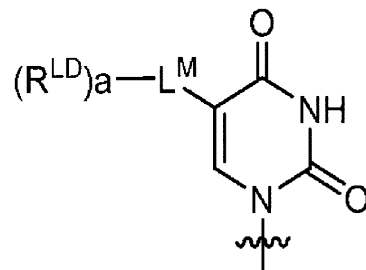
を含む。

【0 8 3 6】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド部分に、任意にリンカーを介して繋がれた炭水化物部分を、核酸塩基において含む。一部の実施形態では、該核酸塩基はTである。一部の実施形態では、対核酸塩基は、保護されたTである。一部の実施形態では、該核酸塩基は、任意で置換されるTである。一部の実施形態では、この結合は、Tまたは任意で置換されるTの5-炭素においてである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の $-L^M-(R^{LD})_a$ を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、核酸塩基に結合された1つ以上の $-L^M-(R^{LD})_a$ を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

30

【化 1 1 9】

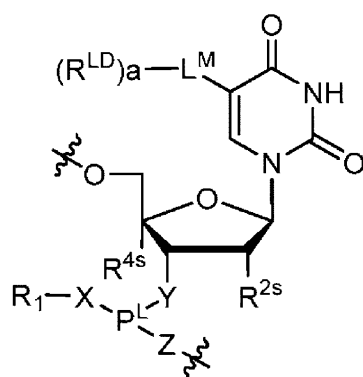


40

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

50

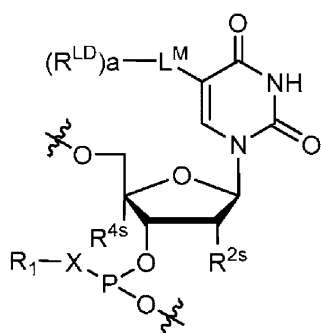
【化 1 2 0】



10

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

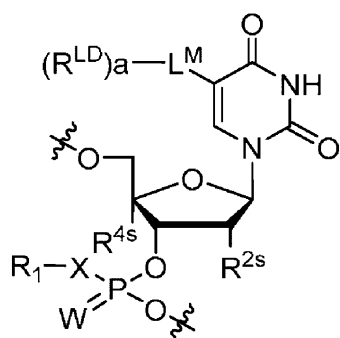
【化 1 2 1】



20

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

【化 1 2 2】

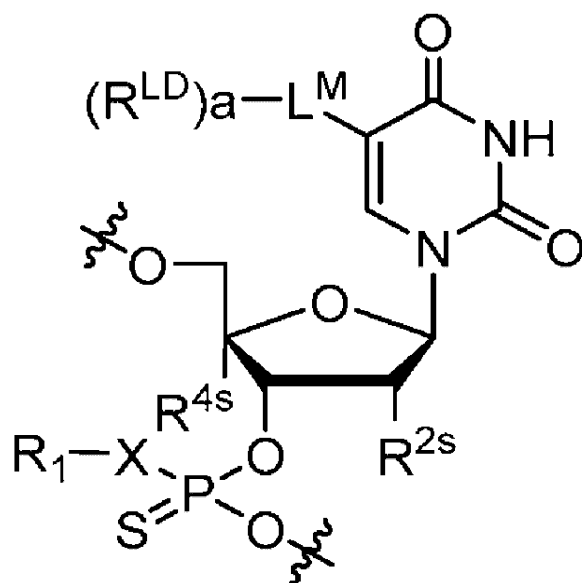


40

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

50

【化 1 2 3】

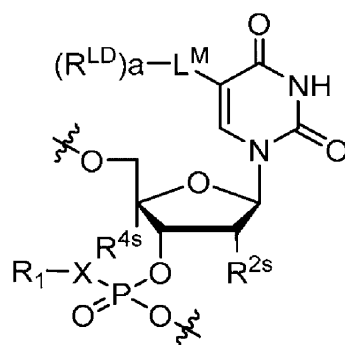


10

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

20

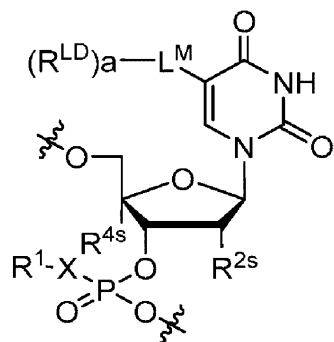
【化 1 2 4】



30

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

【化 1 2 5】

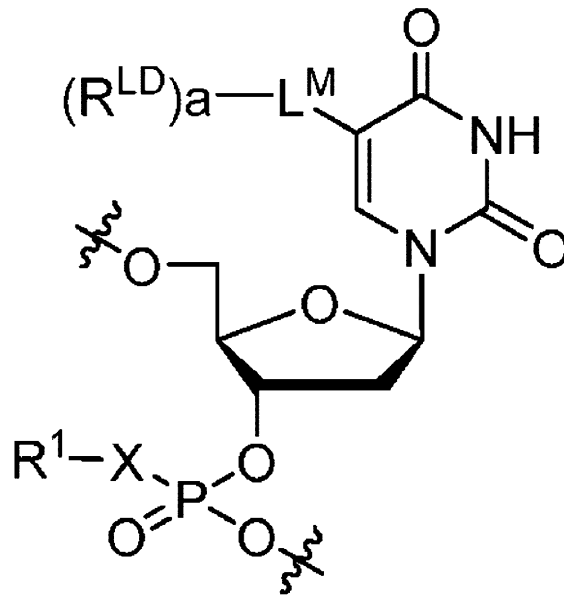


40

を含み、ここで、XはOまたはSであり、R¹はHであり、他の可変要素の各々は独立し

50

て、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、 R^{2s} 及び R^{4s} は水素である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の
 【化 1 2 6】

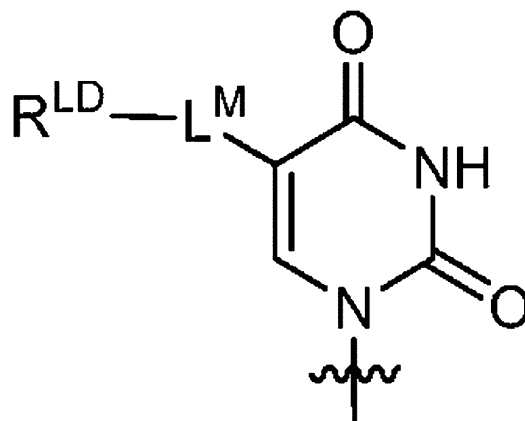


を含み、ここで、 X は O または S であり、 R^1 は H であり、他の可変要素の各々は独立して、本開示に記載されるとおりである。

【0 8 3 7】

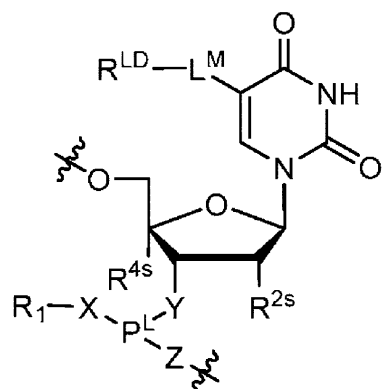
一部の実施形態では、 a は、1 である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、核酸塩基に結合された 1 つ以上の $-L^M-R^{CD}$ を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、該核酸塩基は T である。一部の実施形態では、対核酸塩基は、保護された T である。一部の実施形態では、該核酸塩基は、任意で置換される T である。一部の実施形態では、この結合は、 T または任意で置換される T の 5-炭素においてである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1 つ以上の

【化 1 2 7】



を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

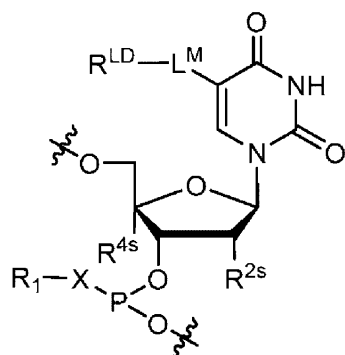
【化128】



10

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

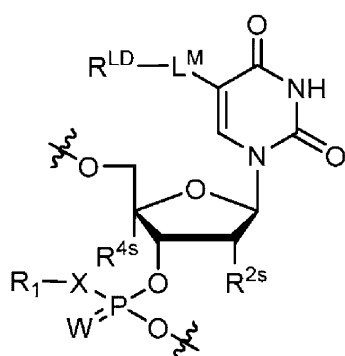
【化129】



30

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

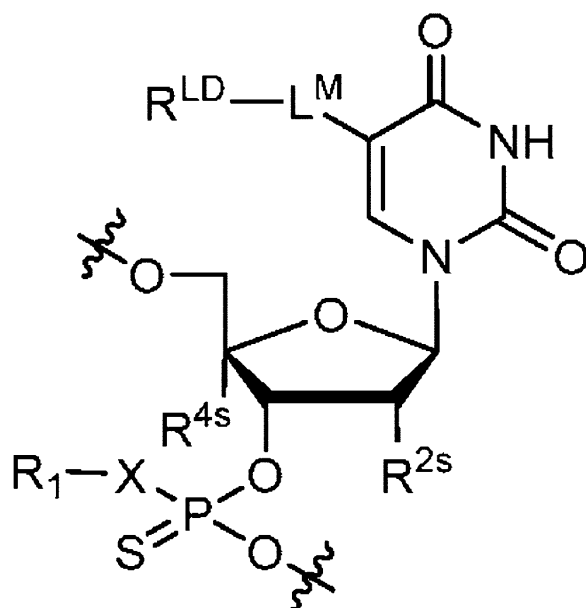
【化130】



40

50

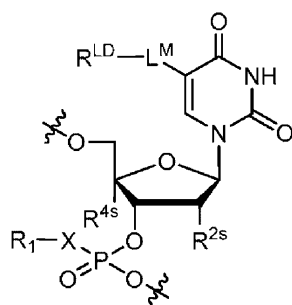
を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の
【化131】



10

20

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の
【化132】



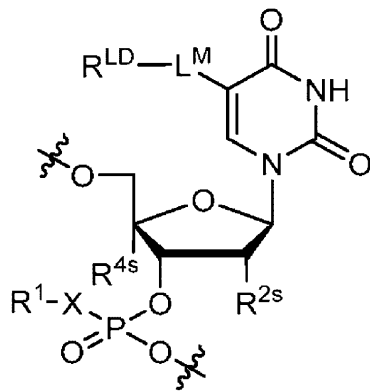
30

を含み、ここで、各可変要素は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

40

50

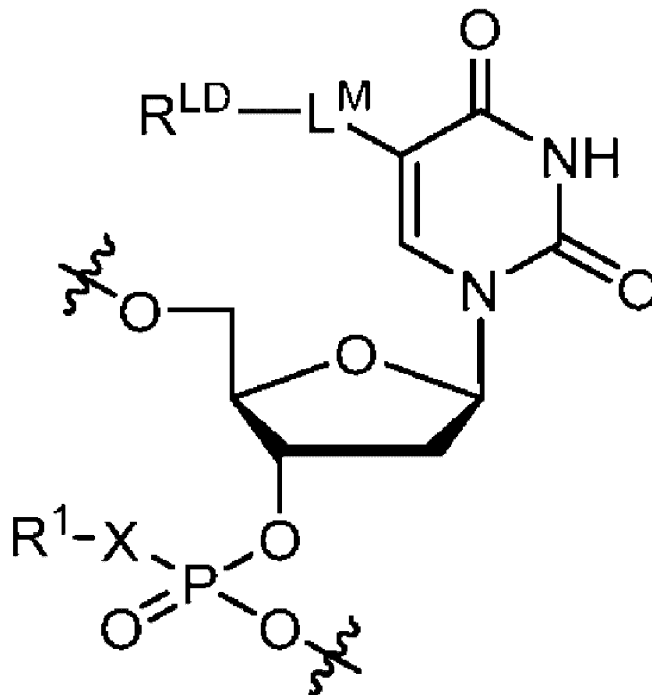
【化 1 3 3】



10

を含み、ここで、XはOまたはSであり、R¹はHであり、他の可変要素の各々は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、R^{2s}及びR^{4s}は水素である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の

【化 1 3 4】



20

30

を含み、ここで、XはOまたはSであり、R¹はHであり、他の可変要素の各々は独立して、本開示に記載されるとおりである。

【0 8 3 8】

一部の実施形態では、本開示は、C₁₀ - C₄₀の直線状、飽和もしくは部分不飽和脂肪族鎖を含む、またはC₁₀ - C₄₀の直線状、飽和もしくは部分不飽和脂肪族鎖である脂質部分を含む、PNPLA3オリゴヌクレオチドを含む組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、1つ以上のC₁ - 4脂肪族基で任意に置換されるC₁₀ - C₄₀の直線状、飽和もしくは部分不飽和脂肪族鎖を含む、または1つ以上のC₁ - 4脂肪族基で任意に置換されるC₁₀ - C₄₀の直線状、飽和もしくは部分不飽和脂肪族鎖である脂質部分を含む、PNPLA3オリゴヌクレオチドを含む組成物を提供する。

40

50

【0839】

一部の実施形態では、組成物は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸、アラキドン酸、及びジリノレイルアルコールから選択される化合物の複合体化を介して形成される脂質部分を含むPNPLA3オリゴヌクレオチドを含む。

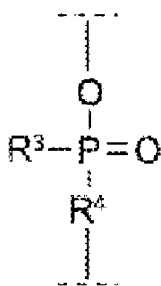
【0840】

一部の実施形態では、リンカーは、組成物の2つの部分を結合させる部分である。非限定的な例として、リンカーは、PNPLA3オリゴヌクレオチドを脂質に物理的に結合させる。適切なリンカーの非限定的な例としては、非荷電リンカー、荷電リンカー、アルキルを含有するリンカー、リン酸を含有するリンカー、分枝状リンカー、非分枝状リンカー、少なくとも1つの切断基を含有するリンカー、少なくとも1つの酸化還元切断基を含有するリンカー、少なくとも1つのリン酸系の切断基を含有するリンカー、少なくとも1つの酸切断基を含有するリンカー、少なくとも1つのエステル系切断基を含有するリンカー、少なくとも1つのペプチド系切断基を含有するリンカーが挙げられる。一部の実施形態では、リンカーは、非荷電リンカーまたは荷電リンカーである。一部の実施形態では、リンカーはアルキルを含む。

【0841】

一部の実施形態では、リンカーはリン酸を含む。様々な実施形態において、リン酸は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに結合する酸素）を、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）及び炭素（架橋メチレンホスホネート）で置き換えることによって修飾することもできる。この置換は、いずれかの結合酸素または両方の結合酸素で起こり得る。一部の実施形態では、架橋酸素は、ヌクレオシドの3'-酸素であり、炭素との置き換えが行われている。一部の実施形態では、架橋酸素は、ヌクレオシドの5'-酸素であり、窒素との置き換えが行われている。様々な実施形態において、リン酸を含むリンカーは、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデート、ボラノホスホエート、または以下の式（I）の化合物のうちのいずれか1つ以上を含有する：

【化135】



（I）、式中、 R^3 は、OH、SH、 NH_2 、 BH_3 、 CH_3 、 C_{1-6} アルキル、 C_{6-10} アリール、 C_{1-6} アルコキシ及び C_{6-10} アリール-オキシから選択され、ここで、 C_{1-6} アルキル及び C_{6-10} アリールは、非置換であるか、または任意で独立して、ハロ、ヒドロキシル、及び NH_2 から独立して選択される1〜3個の基で置換され、及び R^4 は、O、S、NH、または CH_2 から選択される。

【0842】

一部の実施形態では、リンカーは、直接結合、または酸素もしくは硫黄等の原子、例えば、 NR^1 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 SO 、 SO_2 、 SO_2NH 等の単位、または置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリール

アルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリール等の原子鎖を含み、ここで、1個以上のメチレンは、O、S、S(O)、SO₂、N(R₁)₂、C(O)、切断可能な結合基、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換の複素環で中断または終了されてもよく、ここで、R¹は、水素、アシル、脂肪族または置換脂肪族である。

【0843】

一部の実施形態では、リンカーは分枝状リンカーである。一部の実施形態では、分枝状リンカーの分枝点は、少なくとも三価でもよいが、四価、五価もしくは六価の原子、またはこのような複数の原子価を示す基でもよい。一部の実施形態では、分枝点は、-N、-N(Q)-C、-O-C、-S-C、-SS-C、-C(O)N(Q)-C、-OC(O)N(Q)-C、-N(Q)C(O)-C、または-N(Q)C(O)O-Cであり、ここで、Qは独立して、出現ごとにHであるか、または任意で置換されるアルキルである。他の実施形態において、該分枝点は、グリセロールまたはグリセロール誘導体である。

【0844】

1つの実施形態では、リンカーは、少なくとも1つの切断可能な結合基を含む。非限定的な例として、切断可能な結合基は、細胞外で十分安定であり得るが、標的細胞に入ると切断されて、リンカーがともに保持している2つの部分を放出する。非限定的な例として、切断可能な結合基、例えば、ジスルフィド結合は、pHの影響を受けやすい。非限定的な例として、リンカーは、酵素によって切断される能力を有する切断可能な結合基を含み得る。非限定的な例として、リンカーは、ペプチド結合を含んでもよく、これは、例えば肝細胞及び滑膜細胞等、ペプチダーゼが豊富な細胞型を標的にするときを利用することができる。非限定的な例として、切断可能な候補結合基の適合性は、分解剤（または条件）が、該候補結合基を切断する能力を試験することで評価され得る。一部の実施形態では、リンカーは、酸化還元切断可能な結合基、当該リン酸基を分解または加水分解する薬剤によって切断可能なリン酸系の切断可能な結合基を含み、リンカーは、酸で切断可能な結合基、エステル系の切断可能な結合基、及び／またはペプチド系の切断基を含む。

【0845】

非限定的な例として、米国特許出願第20150265708号に記載のリンカーをはじめとする、当分野において報告された任意のリンカーを使用することができる。

【0846】

一部の実施形態では、脂質は、本開示に従って、当技術分野で既知の任意の方法を用いてPNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化される。

標的化部分

【0847】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド組成物

はさらに、標的化構成要素または部分を含む。標的化部分は、PNPLA3オリゴヌクレオチド部分に複合体化されても複合体化されなくてもよい。一部の実施形態では、標的化部分は、脂質である。一部の実施形態では、標的化部分は、炭水化物または二環式ケタールである。一部の実施形態では、標的化部分は、本開示に記載される $-R^{LD}$ である。一部の実施形態では、標的化部分は、本開示に記載される $-R^{CD}$ である。

【0848】

標的化部分は、本開示に従って、多くの種類の方法、例えば、脂質及び炭水化物用に記載されるものによって、提供される技術に組み込まれ得る。一部の実施形態では、標的化部分は、提供されるオリゴヌクレオチドと物理的に混合されて、提供される組成物を形成する。一部の実施形態では、標的化部分は、PNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化される。一部の実施形態では、標的化部分は、PNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化されない。

【0849】

一部の実施形態では、提供される組成物は、2つ以上の標的化部分を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、2つ以上の複合体化標的化部分を含む。一部の実施形態では、該2つ以上の複合体化標的化部分は同じである。一部の実施形態では、該2つ以上の複合体化標的化部分は異なる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以下の標的化部分を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、異なる型の複合体化標的化部分を含有する。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、同じ型の標的化部分を含有する。

【0850】

標的化部分は、例えば、脂質及び炭水化物について記載されるように、任意でリンカーを介してオリゴヌクレオチドに複合体化され得る。当分野の様々なタイプのリンカーが、本開示に従い利用され得る。一部の実施形態では、リンカーはリン酸基を含有し、それを例えば、オリゴヌクレオチド合成で使用される化学と類似した化学方法を介した標的化部分の複合体化に使用することができる。一部の実施形態では、リンカーは、アミド基、エステル基、またはエーテル基を含有する。一部の実施形態では、リンカーは、 $-L-$ の構造を有する。標的化部分は、脂質と比較し、同じまたは異なるリンカーのいずれかを介して複合体化され得る。

【0851】

標的化部分は、任意でリンカーを介して、様々な適切な位置でオリゴヌクレオチドに複合体化され得る。一部の実施形態では、標的化部分は、5'-OH基を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化部分は、3'-OH基を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化部分は、1つ以上の糖部分を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化部分は、1つ以上の塩基を介して複合体化される。一部の実施形態では、標的化部分は、1つ以上のヌクレオチド間結合を介して組み込まれる。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、独立してその5'-OH、3'-OH、糖部分、塩基部分、及び／またはヌクレオチド間結合を介して複合体化される複数の複合体化標的化部分を含み得る。標的化部分及び脂質は、同じ位置、近傍の位置、及び／または離れた位置のいずれかで複合体化され得る。一部の実施形態では、標的化部分は、PNPLA3オリゴヌクレオチドの一端で複合体化され、脂質は、他方の端で複合体化される。

【0852】

一部の実施形態では、標的化部分は、標的細胞の表面上のタンパク質と相互作用する。一部の実施形態では、かかる相互作用により、標的細胞内への内在化が促進される。一部の実施形態では、標的化部分は、糖部分を含有する。一部の実施形態では、標的化部分は、ポリペプチド部分を含有する。一部の実施形態では、標的化部分は、抗体を含有する。一部の実施形態では、標的化部分は、抗体である。一部の実施形態では、標的化部分は、阻害剤を含有する。一部の実施形態では、標的化部分は、低分子阻害剤由来の部分である。一部の実施形態では、阻害剤は、標的細胞の表面上のタンパク質の阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は

、標的細胞の表面上に発現される炭酸脱水酵素阻害剤である。一部の実施形態では、炭酸脱水酵素は、I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XVまたはXVIである。一部の実施形態では、炭酸脱水酵素は、膜結合型である。一部の実施形態では、炭酸脱水酵素は、IV、IX、XIIまたはXIVである。一部の実施形態では、阻害剤は、IV、IX、XII及び／またはXIVに対する阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素III阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素IV阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素IX阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素XII阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、炭酸脱水酵素XIV阻害剤である。一部の実施形態では、阻害剤は、スルホンアミド（例えば、Supuran, C.T. Nature Rev Drug Discover 2008, 7, 168-181に記載されるものであり、そのスルホンアミドは参照することにより本明細書に組み込まれる）を含有するか、またはスルホンアミドである。一部の実施形態では、阻害剤は、スルホンアミドである。一部の実施形態では、標的細胞は、筋肉細胞である。

【0853】

一部の実施形態では、標的化部分は R^{TD} であり、 R^{TD} は、本開示に記載される R^{LD} または R^{CD} である。

【0854】

一部の実施形態では、標的化部分は、本開示に規定され、及び記載される R^{LD} である。一部の実施形態では、本開示は、 R^{LD} を含有するオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{LD} を含有するオリゴヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{LD} を含有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{LD} を含有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0855】

一部の実施形態では、標的化部分は、本開示に規定され、及び記載される R^{CD} である。一部の実施形態では、本開示は、 R^{CD} を含有するオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{CD} を含有するオリゴヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{CD} を含有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、 R^{CD} を含有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0856】

一部の実施形態では、 R^{TD} は、

10

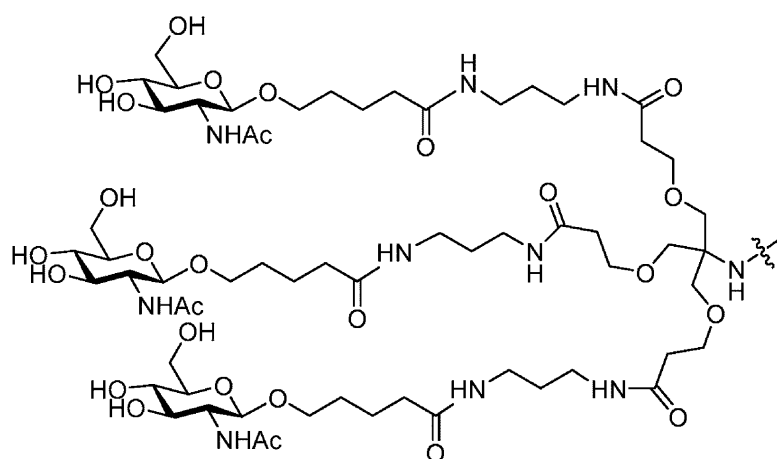
20

30

40

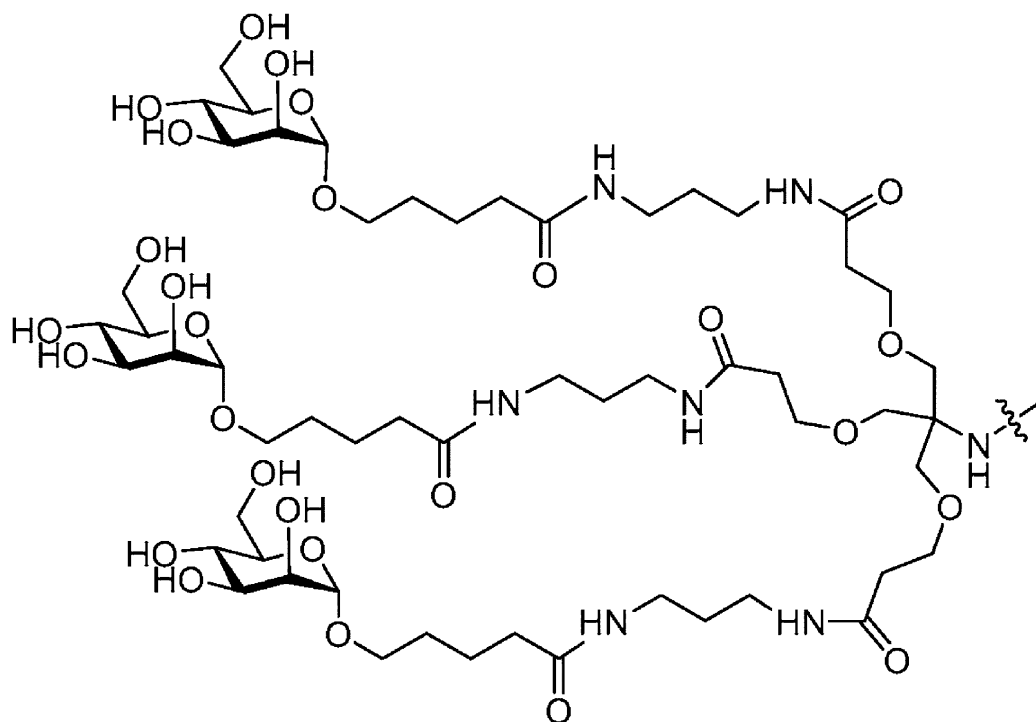
50

【化 1 3 6】



10

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、
【化 1 3 7】



20

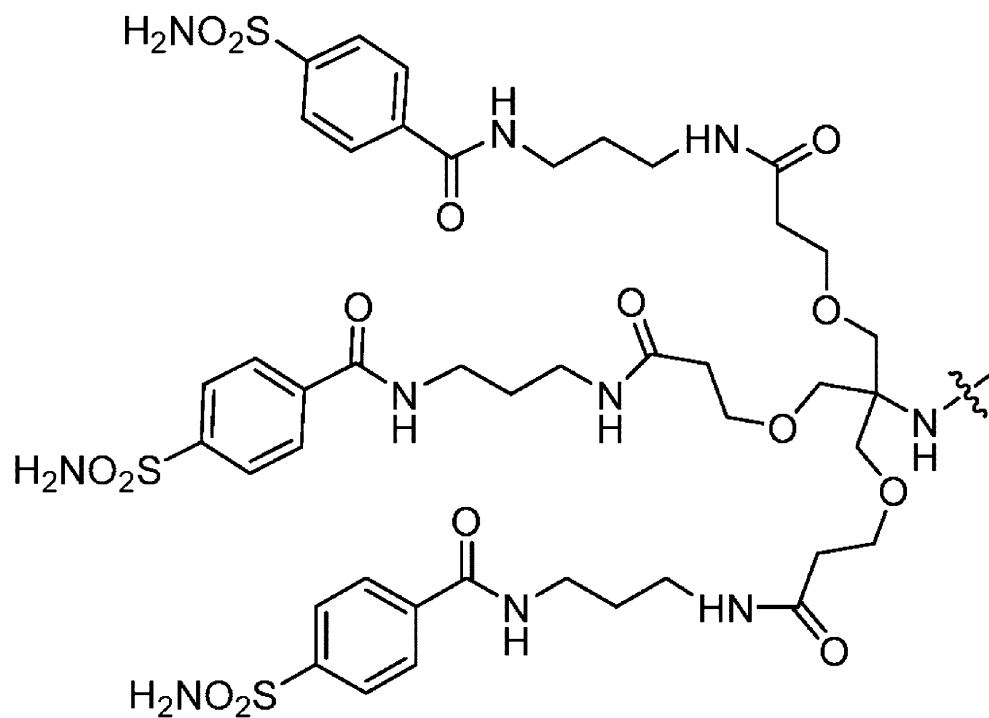
30

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

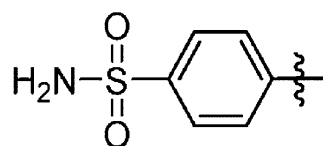
40

50

【化 1 3 8】



を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、R^{TD}は、
【化 1 3 9】



を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、R^{TD}は、

10

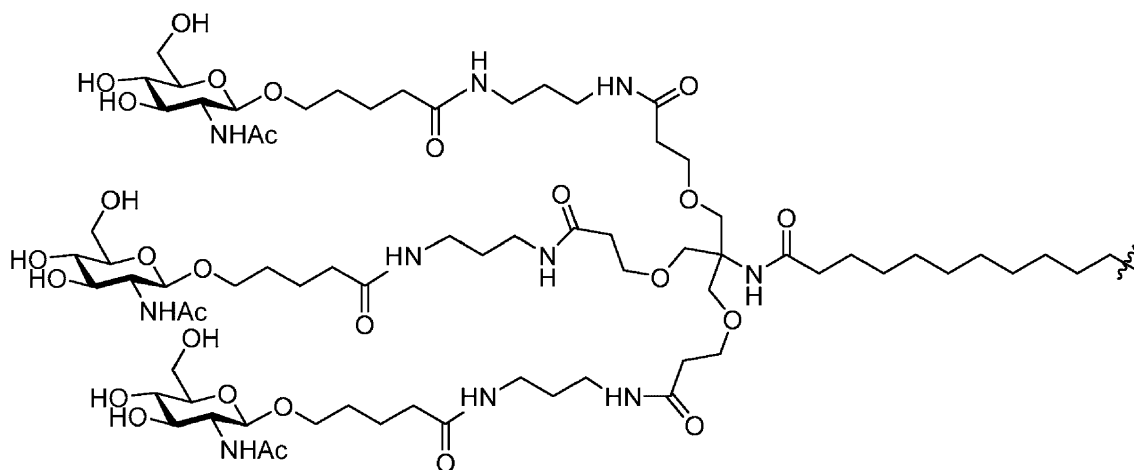
20

30

40

50

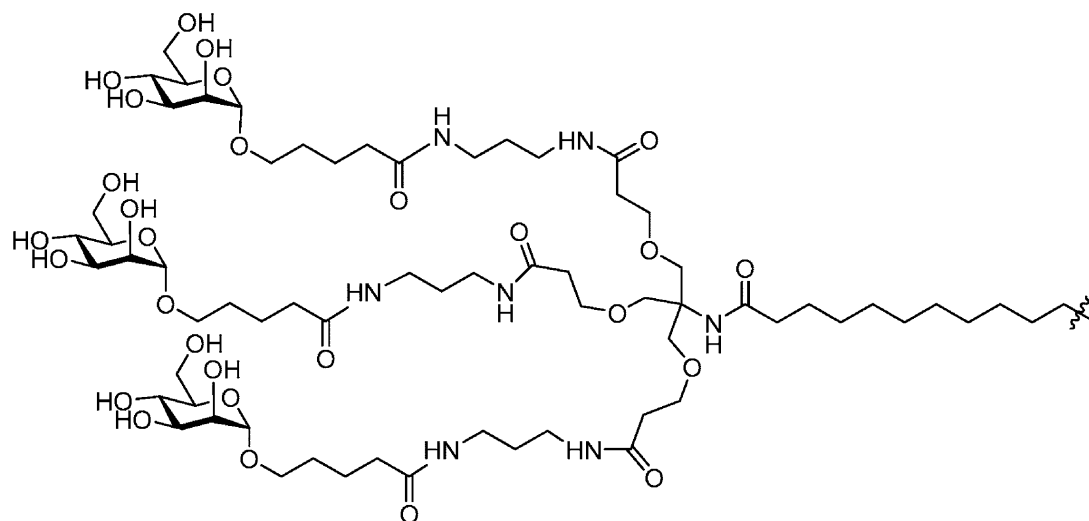
【化 1 4 0】



10

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 1 4 1】



20

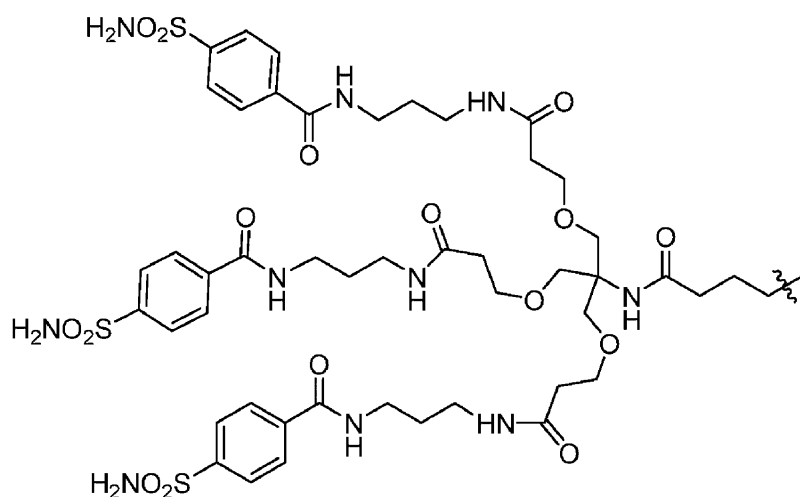
30

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

40

50

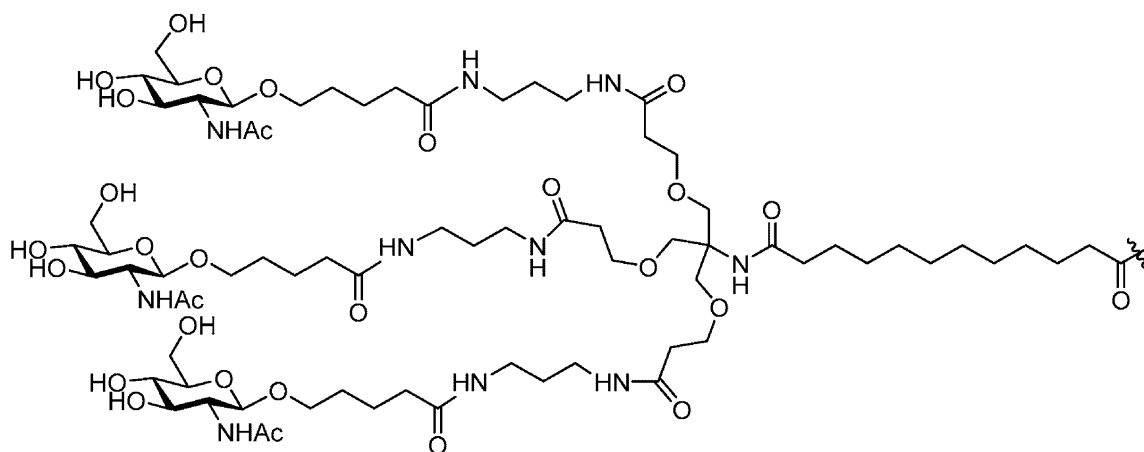
【化 1 4 2】



10

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 1 4 3】

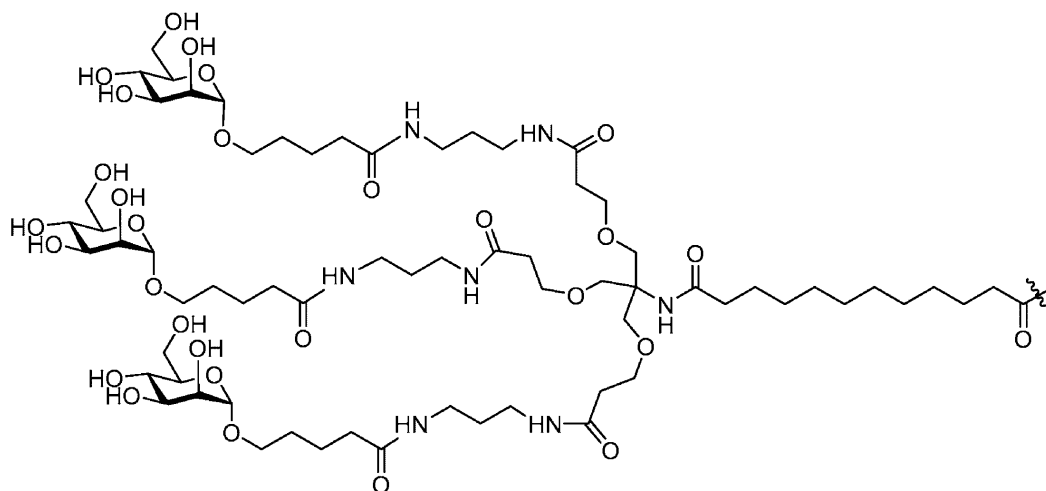


20

30

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 1 4 4】

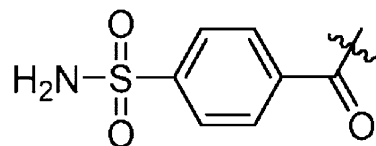


40

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

50

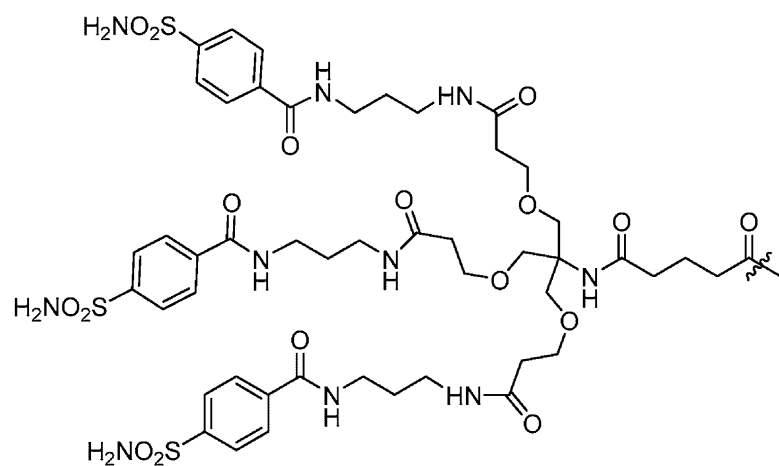
【化 1 4 5】



10

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

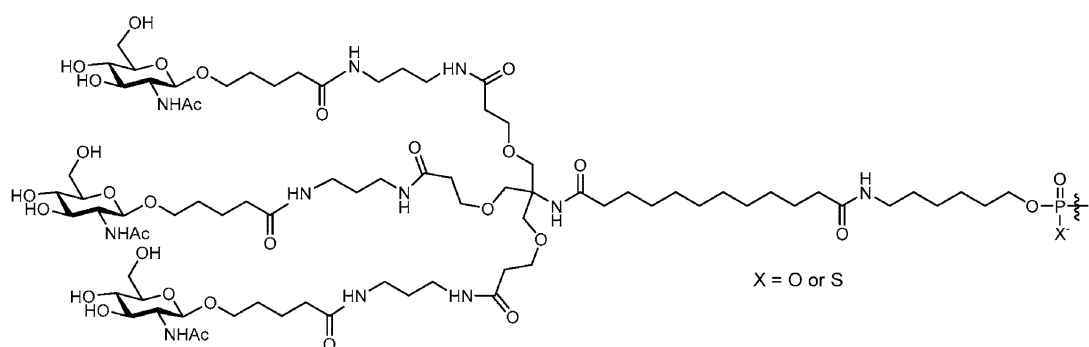
【化 1 4 6】



20

を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 1 4 7】

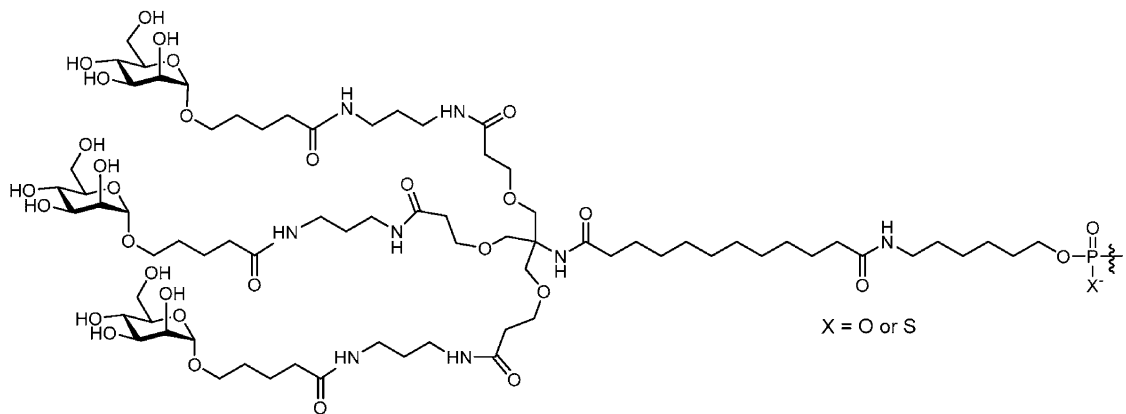


30

40

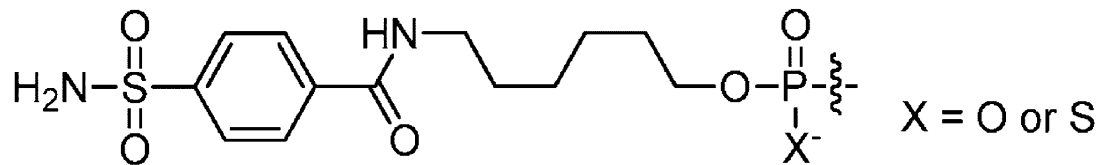
50

【化 1 4 8】



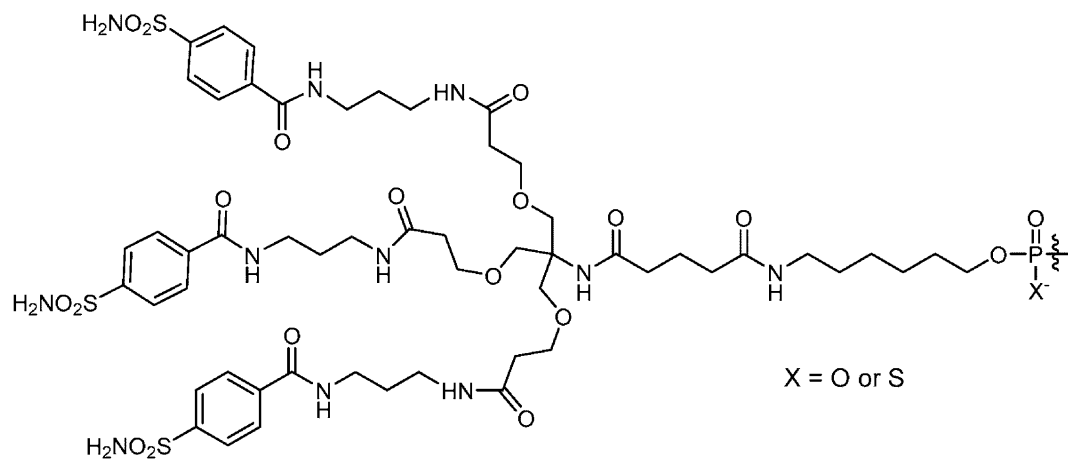
を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 1 4 9】



を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、

【化 1 5 0】



を含むか、またはこれである。一部の実施形態では、 R^{TD} は、標的化部分であり、これは、脂質部分を含むか、または脂質部分である。一部の実施形態では、 X は O である。一部の実施形態では、 X は S である。

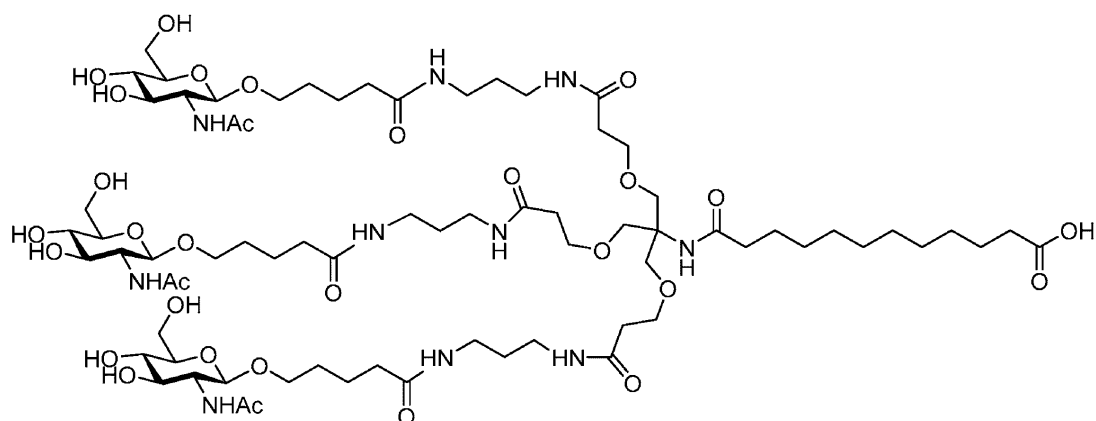
【0 8 5 7】

一部の実施形態では、本開示は、様々な部分をオリゴヌクレオチド部分に複合体化するための技術（例えば、試薬、方法等）を提供する。一部の実施形態では、本開示は、標的化部分をオリゴヌクレオチド部分に複合体化するための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、複合体化のための標的化部分を含有する酸、例えば、 $R^{LD}-COOH$

50

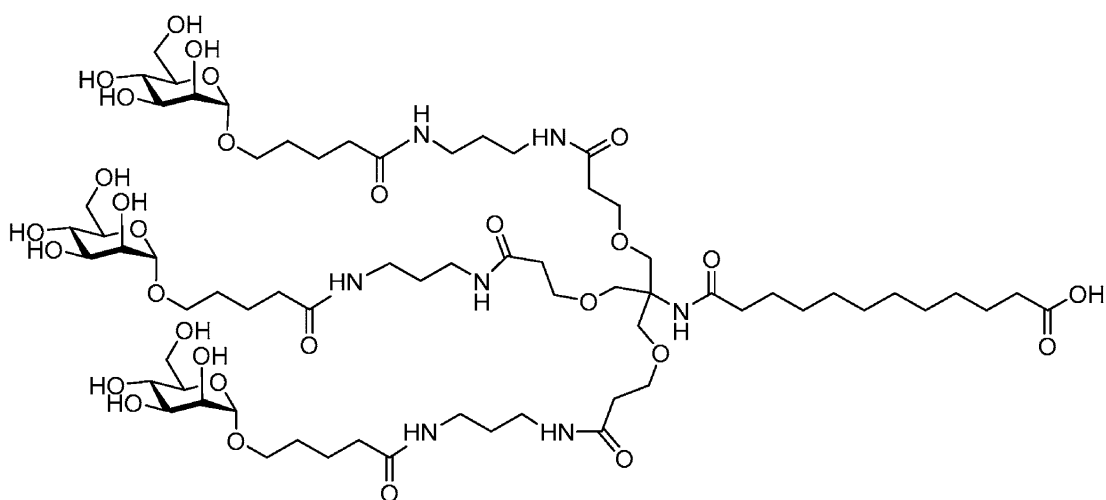
を提供する。一部の実施形態では、本開示は、複合体化のためのリンカー、例えば、 L^M を提供する。当業者であれば、多くの公知で広く実施されている技術を、本開示に従いオリゴヌクレオチド部分との複合体化に利用可能であることを理解する。一部の実施形態では、提供される酸は、

【化 1 5 1】



である。一部の実施形態では、提供される酸は、

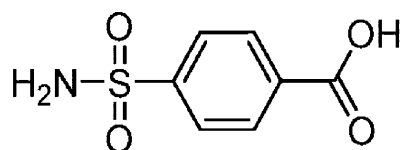
【化 1 5 2】



である。

一部の実施形態では、提供される酸は、

【化 1 5 3】



10

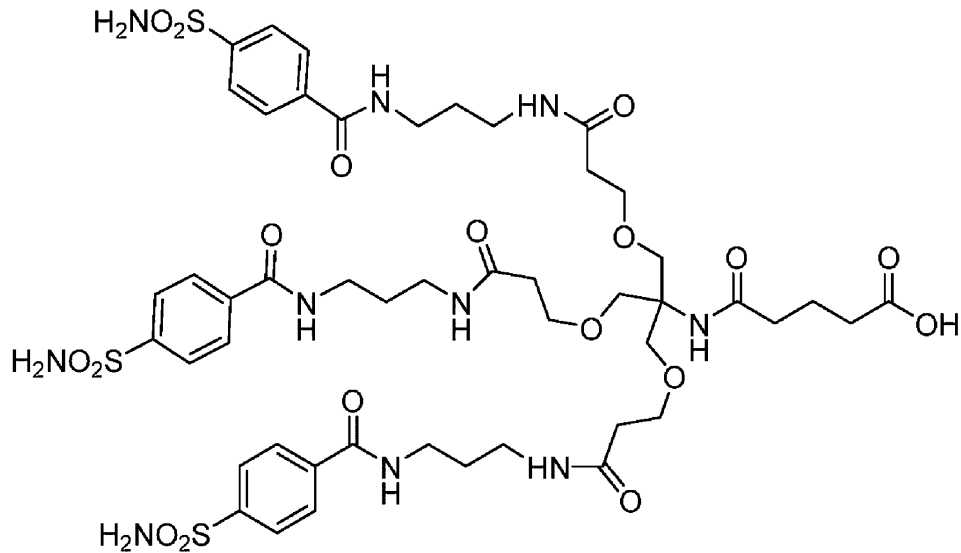
20

30

40

50

である。一部の実施形態では、提供される酸は、
【化 1 5 4】



10

である。一部の実施形態では、提供される酸は、脂肪酸であり、これは、標的化部分として脂質部分を含み得る。一部の実施形態では、本開示は、かかる酸を調製するための方法及び試薬を提供する。

20

【0858】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、または当技術分野で既知の任意の脂質を含有し得る。

【0859】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の脂質を含有し得る。

30

【0860】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、脂質部分を含有する。一部の実施形態では、脂質部分は、脂質との複合体化によって組み込まれる。一部の実施形態では、脂質は、脂肪酸である。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、脂肪酸に複合体化される。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、シード領域内のヌクレオチドに複合体化された脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、ポストシード領域内のヌクレオチドに複合体化された脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、1 番目、2 番目、3 番目、4 番目、5 番目、6 番目、7 番目、8 番目、9 番目、10 番目、11 番目、12 番目、13 番目、14 番目、15 番目、16 番目、17 番目、18 番目、19 番目、20 番目、21 番目、22 番目、23 番目、24 番目、または25 番目のヌクレオチド（5' 末端から数えて）に複合体化された脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、9 番目または11 番目のヌクレオチド（5' 末端から数えて）に複合体化された脂質を含有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、脂肪酸に塩基で複合体化される。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、9 番目または11 番目のヌクレオチド（5' 末端から数えて）の塩基に複合体化された脂質を含有する。

40

50

【0861】

一部の実施形態では、脂肪酸は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれ以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、10個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、11個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、12個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、13個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、14個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、15個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、16個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、17個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、18個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、19個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、20個以上の炭素原子を含有する。一部の実施形態では、脂肪酸は、30個以上の炭素原子を含有する。

10

【0862】

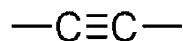
一部の実施形態では、脂質は、パルミチン酸である。一部の実施形態では、脂質は、ステアリン酸またはツルビナル酸である。一部の実施形態では、脂質は、ステアリン酸である。一部の実施形態では、脂質は、ツルビナル酸である。

【0863】

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{80}$ の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基を含有し、式中、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、 C_1-C_6 アルキレン、 C_1-C_6 アルケニレン、

20

【化155】



30

、
 C_1-C_6 ヘテロ脂肪族部分、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、及び $-C(O)O-$ から選択される、任意で置換される基により置き換えられ、式中、各可変部分は独立して、本明細書に定義及び記載されるとおりである。

【0864】

40

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0865】

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0866】

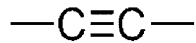
一部の実施形態では、脂質は、1つ以上の C_{1-4} 脂肪族基で任意で置換される、 $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0867】

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の飽和脂肪族基または部

50

分不飽和脂肪族基を含有し、式中、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、 C_1-C_6 アルキレン、 C_1-C_6 アルケニレン、
【化156】



10

、 C_1-C_6 ヘテロ脂肪族部分、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、及び $-C(O)O-$ から選択される、任意で置換される基により置き換えられ、式中、各可変部分は独立して、本明細書に定義及び記載されるとおりである。

【0868】

20

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0869】

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0870】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以上の C_1-4 脂肪族基で任意で置換される、 $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0871】

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{40}$ の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基を含有し、式中、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、 C_1-C_6 アルキレン、 C_1-C_6 アルケニレン、
【化157】

30



40

$-C\equiv C-$ 、 C_1-C_6 ヘテロ脂肪族部分、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、及び $-C(O)O-$ から選択される、任意で置換される基により置き換えられ、式中、各可変部分は独立して、本明細書に定義及び記載されるとおりである。

【0872】

50

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0873】

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0874】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以上の C_{1-4} 脂肪族基で任意で置換される、 $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0875】

一部の実施形態では、脂質は、非置換の $C_{10}-C_{80}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

10

【0876】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0877】

一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0878】

一部の実施形態では、脂質は、非置換の $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

20

【0879】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0880】

一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0881】

一部の実施形態では、脂質は、非置換の $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0882】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

30

【0883】

一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の任意で置換される $C_{10}-C_{60}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0884】

一部の実施形態では、脂質は、 $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0885】

一部の実施形態では、脂質は、 $C_{10}-C_{30}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

40

【0886】

一部の実施形態では、脂質は、 $C_{10}-C_{20}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0887】

一部の実施形態では、脂質は、 $C_{10}-C_{16}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0888】

一部の実施形態では、脂質は、 $C_{12}-C_{16}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

50

【0889】

一部の実施形態では、脂質は、 $C_{14}-C_{16}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0890】

一部の実施形態では、脂質は、1つ以上の C_{1-4} 脂肪族基で任意で置換される、 $C_{10}-C_{40}$ の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。

【0891】

一部の実施形態では、脂質は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、ガンマ-リノレン酸、ドコサヘキサエン酸（DHAまたはシス-DHA）、ツルビナル酸及びジリノレイルからなる群から選択される。

10

【0892】

一部の実施形態では、脂質は、オリゴヌクレオチドに複合体化されない。

【0893】

一部の実施形態では、脂質は、オリゴヌクレオチドに複合体化される。

【0894】

一部の実施形態では、脂質は、リンカーにより、オリゴヌクレオチドに複合体化される。一部の実施形態では、リンカーは、 $-L-$ の構造を有する。

【0895】

一部の実施形態では、標的化部分がPNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化される。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の標的化部分を含有する。一部の実施形態では、標的化部分は、リンカーを介して複合体化される。

20

【0896】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の脂質部分と、1つ以上の標的化部分とを含有する。

【0897】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i剤は、脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i剤は、脂質部分を含有し、ここで、脂質は、直線状の C_{16} である。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i剤は、脂質を含有し、ここで、脂質は、パルミチン酸である。

30

【0898】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i剤は、塩基に複合体化された脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i剤は、脂質を含有し、ここで、脂質は、塩基に複合体化された直線状の C_{16} である。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i剤は、脂質を含有し、ここで、脂質は、塩基に複合体化されたパルミチン酸である。

【0899】

一部の実施形態では、本開示は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物に関し、ここで、組成物は、脂質をさらに含有する。一部の実施形態では、脂質は、ステアリン酸またはツルビナル酸である。一部の実施形態では、脂質は、オリゴヌクレオチドに複合体化される。

40

【0900】

一部の実施形態では、脂質をPNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化することにより、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つの特性が改善される。一部の実施形態では、その特性は、活性の増加（たとえば、一本鎖RNA干渉を介在する能力の増加）、または組織分布の改善である。一部の実施形態では、脂質の複合体化により、活性が改善される。一部の実施形態では、脂質の複合体化により、1つ以上の標的組織への送達が改善される。一部の実施形態では、組織は、筋肉組織である。一部の実施形態では、組織は、骨格筋、腓腹筋、三頭筋、心臓または横隔膜である。

【0901】

50

一部の実施形態では、脂質は、任意で置換されるC10-C80の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基を含有し、式中、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、C1-C6アルキレン、C1-C6アルケニレン、C1-C6ヘテロ脂肪族部分、-C(R)₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR)-、-C(O)N(R)-、-N(R)C(O)N(R)-、-N(R)C(O)-、-N(R)C(O)O-、-OC(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R)-、-N(R)S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、及び-C(O)O-から選択される、任意で置換される基により置き換えられ、式中、各可変部分は独立して、本明細書に定義及び記載されるとおりである。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換されるC10-C60の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換されるC10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、1つ以上のC1-4脂肪族基で任意で置換される、C10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換されるC10-C60の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基を含有し、式中、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、C1-C6アルキレン、C1-C6アルケニレン、C1-C6ヘテロ脂肪族部分、-C(R)₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR)-、-C(O)N(R)-、-N(R)C(O)N(R)-、-N(R)C(O)-、-N(R)C(O)O-、-OC(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R)-、-N(R)S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、及び-C(O)O-から選択される、任意で置換される基により置き換えられ、式中、各可変部分は独立して、本明細書に定義及び記載されるとおりである。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換されるC10-C60の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換されるC10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、1つ以上のC1-4脂肪族基で任意で置換される、C10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換されるC10-C40の飽和脂肪族基または部分不飽和脂肪族基を含有し、式中、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、C1-C6アルキレン、C1-C6アルケニレン、C1-C6ヘテロ脂肪族部分、-C(R)₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR)-、-C(O)N(R)-、-N(R)C(O)N(R)-、-N(R)C(O)-、-N(R)C(O)O-、-OC(O)N(R)-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R)-、-N(R)S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、及び-C(O)O-から選択される、任意で置換される基により置き換えられ、式中、各可変部分は独立して、本明細書に定義及び記載されるとおりである。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換されるC10-C60の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、任意で置換されるC10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、1つ以上のC1-4脂肪族基で任意で置換される、C10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、非置換のC10-C80の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の任意で置換されるC10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の任意で置換されるC10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の任意で置換されるC10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の任意で置換されるC10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部

10

20

30

40

50

分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、非置換のC10-C40の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、1つ以下の任意で置換されるC10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、2つ以上の任意で置換されるC10-C60の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、C10-C40の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、1つ以上のC1-4脂肪族基で任意で置換される、C10-C40の直線状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含有する。一部の実施形態では、脂質は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファ-リノレン酸、ガンマ-リノレン酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸及びジリノレイルからなる群から選択される。一部の実施形態では、脂質は、オリゴヌクレオチドに複合体化されない。一部の実施形態では、脂質は、オリゴヌクレオチドに複合体化される。

【0902】

一部の実施形態では、脂質をPNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化することにより、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つの特性が驚くべくほど改善される。一部の実施形態では、その特性は、活性の増加（たとえば、一本鎖RNA干渉を介在する能力の増加）、または組織分布の改善である。一部の実施形態では、組織は、筋肉組織である。一部の実施形態では、組織は、骨格筋、腓腹筋、三頭筋、心臓または横隔膜である。一部の実施形態では、脂質部分を含有するオリゴヌクレオチドは、たとえば、ミセルを形成する。一部の実施形態では、改善される特性の例は、たとえば、図のうちの1つ以上に示される。

【0903】

一部の実施形態では、例示的なオリゴヌクレオチドをマウスでアッセイする場合、試験されるオリゴヌクレオチドは、試験量、たとえば、10mg/kg、30mg/kgなどで、オスのC57BL/10ScSnDMDmdxマウス（4～5週齢）に尾静脈を介して静脈内注射される。一部の実施形態では、注射後に、試験時間、たとえば、何日か目、たとえば、2日目、7日目及び／または14日目などに、組織が採取され、一部の実施形態では、当該組織は、液体窒素中で新鮮凍結され、解析を行うまで-80℃で保存される。

【0904】

本開示に従ってオリゴヌクレオチドレベルを評価するには、様々なアッセイを使用することができる。一部の実施形態では、ハイブリッド-ELISAを使用し、標準曲線として被験物質の連続希釈を使用して組織中のオリゴヌクレオチドレベルを定量する：たとえば、手順の一例では、無水マレイン酸活性化96ウェルプレート（Pierce社 15110）を、2.5%NaHCO₃中、500nMの捕捉プローブ（Gibco社 25080-094）50lで2時間、37℃でコーティングした。このプレートを次いでPBST（PBS+0.1%Tween-20）で3回洗浄し、5%無脂肪乳-PBSTで1時間、37℃でブロックした。被験物質のオリゴヌクレオチドをマトリクス内に連続希釈した。全ての試料中のオリゴヌクレオチド量が100ng/ml未満となるように、元の試料と共にこの標準物質を溶解バッファー（4Mグアニジン；0.33%N-ラウリルサルコシン；25mMクエン酸ナトリウム；10mM DTT）で希釈した。20lの希釈試料を、PBSTで希釈した333nMの検出プローブ180lと混合し、次いでPCR装置（65℃、10分、95℃、15分、4℃）で変性させた。50lの変性試料を、ブロッキングしたELISAプレートに3個ずつ分配し、4℃で一晩インキュベートした。PBSTで3回洗浄した後、PBST中の1:2000のストレプトアビジン-APをウェルあたり50l加え、室温で1時間インキュベートした。PBSTで十分に洗浄した後、100lのAttoPhos（Promega社、S1000）を添加し、暗所で10分間室温でインキュベートし、プレートリーダー（Molecular Device社、M5）蛍光チャンネル：Ex435nm、Em555nmで読み取った。試料中のオリゴヌクレオチドを、4パラメータ回帰分析によって、標準曲線に従い計算した。

【0905】

本開示に記載及び実証されるように、一部の実施形態では、脂質複合体化により、標的組織への送達が改善される。一部の実施形態では、脂質の複合体化により、筋肉への送達改善される。一部の実施形態では、脂質の複合体化は、脂肪酸との複合体化を含有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ツルビナル酸と複合体化される。一部の実施形態では、ツルビナル酸との複合体化は、オリゴヌクレオチドの筋肉への送達を改善するのに特に効果的である。

【0906】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、血漿及び組織ホモジネートの両方において安定である。

【0907】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、位置9または11（5'末端から数えて）に複合体化された脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、脂質を含有し、ここで、脂質は、位置9または11（5'末端から数えて）に複合体化された直線状のC₁₆である。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、脂質を含有し、ここで、脂質は、位置9または11（5'末端から数えて）に複合体化されたパルミチン酸である。

【0908】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、位置9または11（5'末端から数えて）の塩基に複合体化された脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、脂質を含有し、ここで、脂質は、位置9または11（5'末端から数えて）の塩基に複合体化された直線状のC₁₆である。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、脂質を含有し、ここで、脂質は、位置9または11（5'末端から数えて）の塩基に複合体化されたパルミチン酸である。

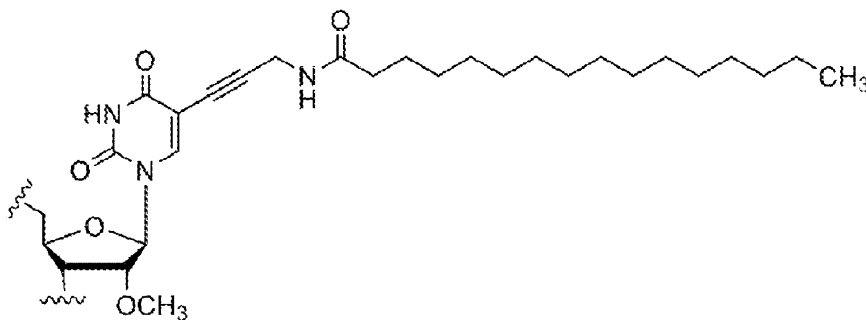
【0909】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、位置9または11（5'末端から数えて）のU塩基に複合体化された脂質を含有する。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、脂質を含有し、ここで、脂質は、位置9または11（5'末端から数えて）のU塩基に複合体化された直線状のC₁₆である。一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、脂質を含有し、ここで、脂質は、位置9または11（5'末端から数えて）のU塩基に複合体化されたパルミチン酸である。

【0910】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i は、ImU、または5'-脂質-2'-OMeUの構造を含有する。

【化158】



【0911】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、任意の追加の化学的部分、たとえば、限定さ

れないが、米国特許第5,614,503号、同第5,780,009号、同第6,074,863号、同第6,258,581号、同第6,489,117号、同第6,677,445号、同第6,828,435号、同第6,846,921号、同第7,416,849号、同第7,494,982号、同第7,981,871号、同第8,106,022号、同第8,148,344号、同第8,318,508号、同第8,389,707号、同第8,450,467号、同第8,507,455号、同第8,703,731号、同第8,828,956号、同第8,901,046号、同第9,107,904号、同第9,352,048号、同第9,370,581号、同第9,370,582号、同第9,387,257号、同第9,388,415号、同第9,388,416号、同第9,393,316号、及び同第9,404,112号のいずれかに記載される脂質を含有し得る。

10

【0912】

P N P L A 3オリゴヌクレオチドに複合体化される任意の追加の化学的部分：炭水化物部分または二環式ケタール、たとえば、限定されないが、G a l N A c部分

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド組成物は、1つ以上の炭水化物もしくは炭水化物部分または二環式ケタール部分を含有する。一部の実施形態では、炭水化物部分は、炭水化物である。一部の実施形態では、炭水化物部分は、P N P L A 3オリゴヌクレオチドに直接的もしくは間接的に複合体化された炭水化物であるか、またはこれを含有する。一部の実施形態では、炭水化物部分は、所望の位置、たとえば、細胞、組織、臓器などへのオリゴヌクレオチドの標的化送達を容易にする。一部の実施形態では、提供される炭水化物部分は、肝臓への送達を容易にする。当業者により認識されるように、様々な炭水化物部分が文献に記載されており、本開示に従って利用することができる。

20

【0913】

炭水化物部分は、1つ以上の二価または多価（2つ以上の炭水化物部分をオリゴヌクレオチドに繋げるために使用され得る）のリンカーを任意に介して、たとえば、糖単位、ヌクレオチド間結合単位、核酸塩基単位などの様々な位置でオリゴヌクレオチドに組み込むことができる。一部の実施形態では、本開示は、炭水化物をオリゴヌクレオチドへ組み込むための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、1つ以上のリンカーを任意に介して、ヌクレオチド間結合及び／または糖単位での代替の組み込み及び／または追加の組み込みとして、核酸塩基単位に炭水化物部分を組み込むための技術を提供し、これにより、極めて大きな柔軟性及び／または改善された特性及び／または活性を提供する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、リンカーを任意に介して、核酸塩基単位でオリゴヌクレオチドに組み込まれた少なくとも1つの炭水化物部分を含有する。

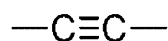
30

【0914】

一部の実施形態では、リンカーは、 L^M であり、式中、 L^M は、共有結合であるか、または C_{1-100} 脂肪族基、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～30個のヘテロ原子を有する C_{1-100} ヘテロ脂肪族基から選択される、任意で置換される二価もしくは多価の直線状もしくは分枝状の基であり、式中、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、 C_{1-6} アルキレン、 C_{1-6} アルケニレン、

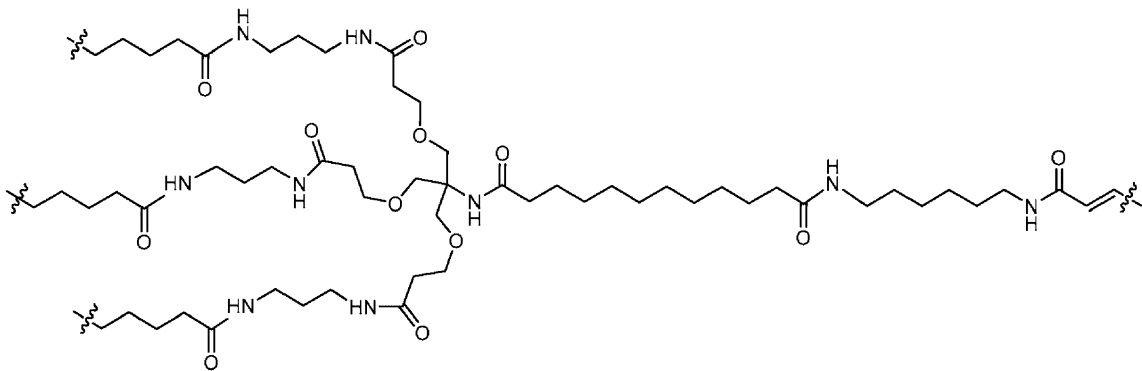
40

【化159】



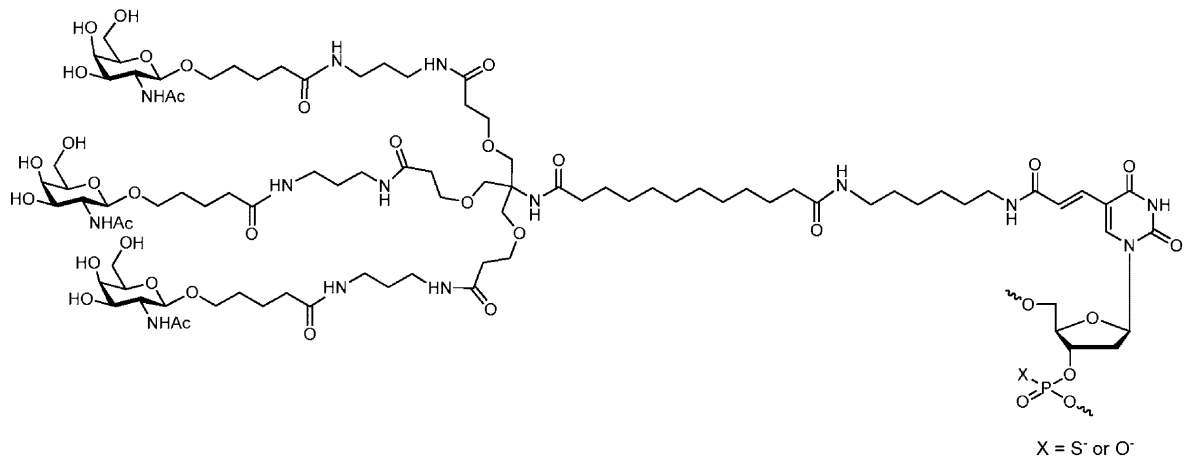
50

、
 $-C(R')_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)$
 $-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N$
 $(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-C$
 $(O)S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-P(O)(OR')$ 、 $-P(O)(SR')$ 、 $-P(O$
 $(R'))-$ 、 $-P(O)(NR')$ 、 $-P(S)(OR')$ 、 $-P(S)(SR')$ 、
 $-P(S)(R')$ 、 $-P(S)(NR')$ 、 $-P(R')$ 、 $-P(OR')$ 、 $-P$
 (SR') 、 $-P(NR')$ 、 $-P(OR')[B(R_3)]$ 、 $-OP(O)(OR')O$
 $-$ 、 $-OP(O)(SR')O-$ 、 $-OP(O)(R')O-$ 、 $-OP(O)(NR')O-$
 $-$ 、 $-OP(OR')O-$ 、 $-OP(SR')O-$ 、 $-OP(NR')O-$ 、 $-OP(R')O-$ 10
 、または $-OP(OR')[B(R_3)]O-$ と置き換えられ；及び1つ以上の炭素原子が
 任意で、及び独立して、 Cy と置き換えられる。一部の実施形態では、 L^M は、二価であ
 る。一部の実施形態では、 L^M は、多価である。一部の実施形態では、 L^M は、
 【化160】



20

であり、式中、 L^M は、核酸塩基に直接結合され、たとえば、以下のとおりである：
 【化161】



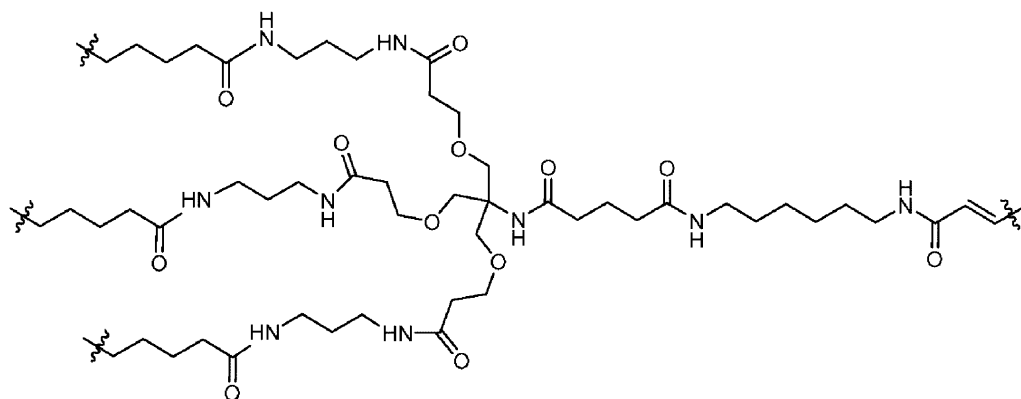
30

40

X = S⁻ or O⁻

。一部の実施形態では、 L^M は、

【化 1 6 2】

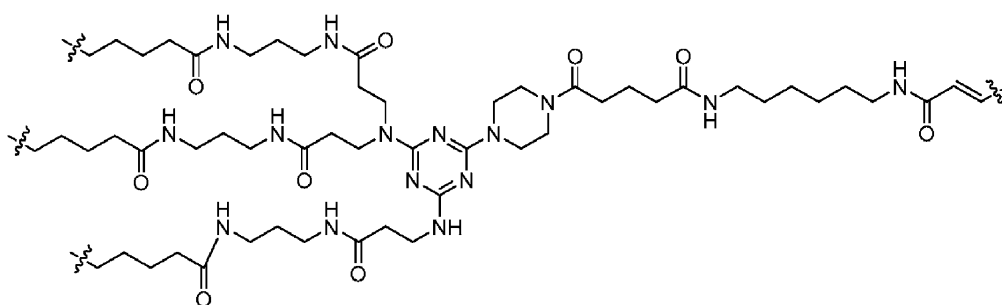


10

である。

一部の実施形態では、 L^M は、

【化 1 6 3】

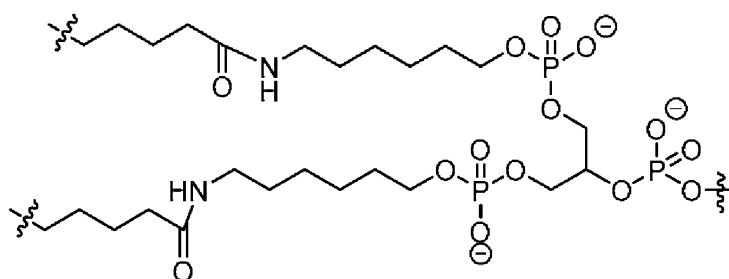


20

である。

一部の実施形態では、 L^M は、

【化 1 6 4】



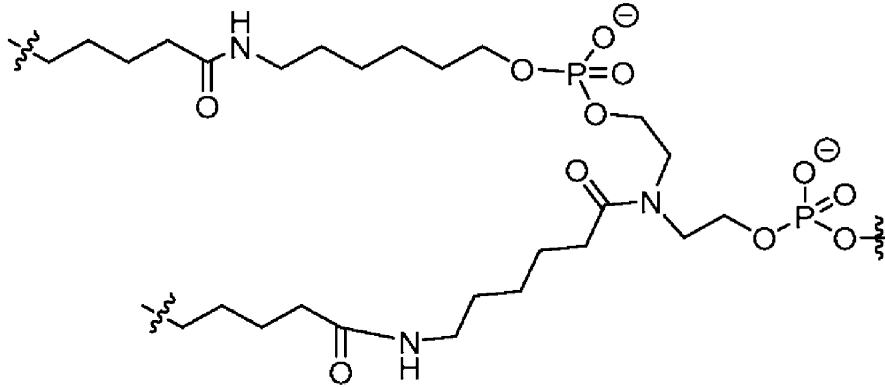
30

である。一部の実施形態では、 L^M は、

40

50

【化 1 6 5】



10

である。

【0 9 1 5】

一部の実施形態では、炭水化物部分または二環式ケタールもしくは二環式ケタール部分は、 R^{CD} であり、式中、 R^{CD} は、 C_{1-100} 脂肪族基、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～30個のヘテロ原子を有する C_{1-100} ヘテロ脂肪族基から選択される、任意で置換される直線状または分枝状の基であり、

20

【化 1 6 6】



30

40

、
 $-C(R')_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)$
 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N$
 $(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-C$
 $(O)S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-P(O)(OR')$ 、 $-P(O)(SR')$ 、 $-P(O)$
 (R') 、 $-P(O)(NR')$ 、 $-P(S)(OR')$ 、 $-P(S)(SR')$ 、
 $-P(S)(R')$ 、 $-P(S)(NR')$ 、 $-P(R')$ 、 $-P(OR')$ 、 $-P$
 (SR') 、 $-P(NR')$ 、 $-P(OR')[B(R_3)]$ 、 $-OP(O)(OR')O$

50

—OP(O)(SR')O— 、 —OP(O)(R')O— 、 —OP(O)(NR')O— 、 —OP(OR')O— 、 —OP(SR')O— 、 —OP(NR')O— 、 —OP(R')O— 、
 または —OP(OR')[B(R')]O— と置き換えられ；及び1つ以上の炭素原子が任意で、及び独立して、 Cy^L と置き換えられる。一部の実施形態では、 R^{CD} は、 C_{1-100} 脂肪族基、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～30個のヘテロ原子を有する C_{1-100} ヘテロ脂肪族基から選択される、任意で置換される直線状または分枝状の基であり、式中、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、 C_{1-6} アルキレン、 C_{1-6} アルケニレン、
 【化167】

10



20

$\text{—C(R')}_2\text{—}$ 、 —O— 、 —S— 、 —S—S— 、 —N(R')— 、 —C(O)— 、 —C(S)— 、 —C(NR')— 、 —C(O)N(R')— 、 —N(R')C(O)N(R')— 、 —N(R')C(O)O— 、 —S(O)— 、 $\text{—S(O)}_2\text{—}$ 、 $\text{—S(O)}_2\text{N(R')—}$ 、 —C(O)S— 、 —C(O)O— 、 —P(O)(OR')— 、 —P(O)(SR')— 、 —P(O)(R')— 、 —P(O)(NR')— 、 —P(S)(OR')— 、 —P(S)(SR')— 、 —P(S)(R')— 、 —P(S)(NR')— 、 —P(R')— 、 —P(OR')— 、 —P(SR')— 、 —P(NR')— 、 —P(OR')[B(R')]— 、 —OP(O)(OR')O— 、 —OP(O)(SR')O— 、 —OP(O)(R')O— 、 —OP(O)(NR')O— 、 —OP(OR')O— 、 —OP(SR')O— 、 —OP(NR')O— 、 —OP(R')O— 、
 または —OP(OR')[B(R')]O— と置き換えられ；及び1つ以上の炭素原子が独立して、四価の単糖、二糖または多糖部分と置き換えられる。一部の実施形態では、 R^{CD} は、 C_{1-100} 脂肪族基、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～30個のヘテロ原子を有する C_{1-100} ヘテロ脂肪族基から選択される、任意で置換される直線状または分枝状の基であり、式中、1つ以上のメチレン単位が任意で、及び独立して、 C_{1-6} アルキレン、 C_{1-6} アルケニレン、

30

40

50

【化 1 6 8】



10

20

、
 $-\text{C}(\text{R}')_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}')$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{S})-$ 、 $-\text{C}(\text{NR}')$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{SR}')$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}')$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{NR}')$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{OR}')$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{SR}')$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{R}')$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{NR}')$ 、 $-\text{P}(\text{R}')$ 、 $-\text{P}(\text{OR}')$ 、 $-\text{P}(\text{SR}')$ 、 $-\text{P}(\text{NR}')$ 、 $-\text{P}(\text{OR}')[\text{B}(\text{R}')] -$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{R}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{NR}')\text{O}-$ 30
 $-\text{OP}(\text{OR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{SR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{NR}')\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{R}')\text{O}-$ 、
 または $-\text{OP}(\text{OR}')[\text{B}(\text{R}')] \text{O}-$ と置き換えられ；及び1つ以上の炭素原子が
 独立して、四価のGalNac部分、またはGalNac誘導体の四価部分と置き換えら
 れる。

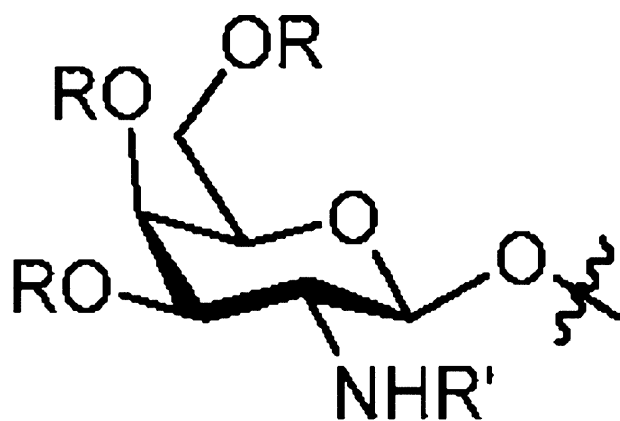
【0 9 1 6】

一部の実施形態では、 R^{CD} は、任意で置換される

40

50

【化 1 6 9】

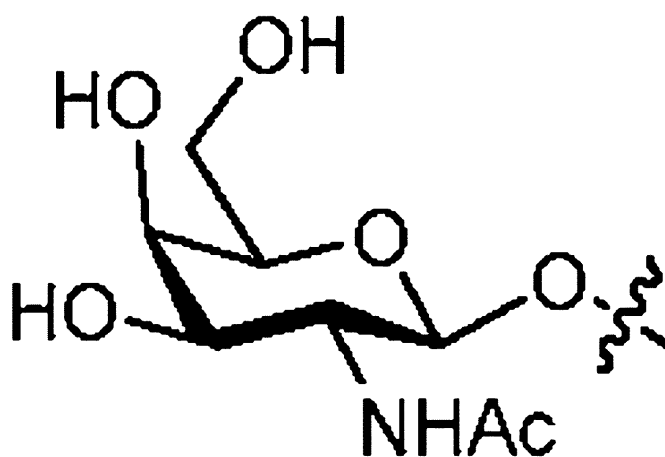


10

20

である。一部の実施形態では、 R' は、 $-C(O)R$ である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、単糖部分である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、一価の GalNac 部分である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、

【化 1 7 0】



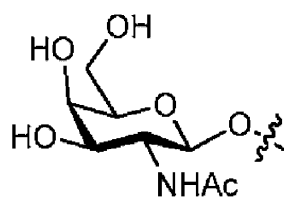
30

40

である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、任意で置換される

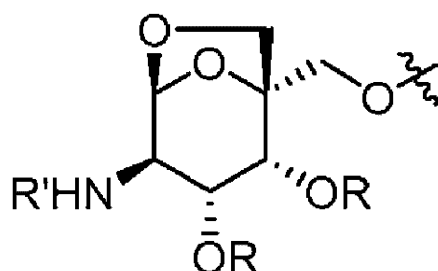
50

【化 1 7 1】



10

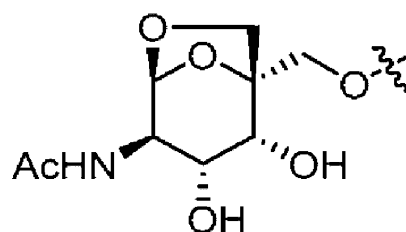
である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、任意で置換される
【化 1 7 2】



20

である。一部の実施形態では、 R' は、 $-C(O)R$ である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、任意で置換される
【化 1 7 3】

30



40

である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、二糖部分である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、多糖部分である。

【0 9 1 7】

一部の実施形態では、 R^{CD} は、 R^G-L の構造を有し、式中、 R^G は、 $-H$ であるか、または C_3-C_{20} 環式脂肪族、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する3～20員のヘテロシクリルから

50

選択される、任意で置換される基である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、 R^G-L- の構造を有し、式中、 R^G は、 C_3-C_{20} 環式脂肪族、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する3～20員のヘテロシクリルから選択される、任意で置換される基である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、 R^G-L- の構造を有し、式中、 R^G は、 C_3-C_{20} 環式脂肪族、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する3～20員のヘテロシクリルから選択される、任意で置換される基であり、少なくとも1つのヘテロ原子は、酸素である。一部の実施形態では、 R^G は置換され、各 R^G の少なくとも1つの置換基は、酸素原子を介して R^G に結合される。一部の実施形態では、 R^G は置換され、各 R^G の少なくとも1つの置換基は、窒素原子を介して R^G に結合される。一部の実施形態では、 R^G は独立して置換され、各 R^G の各炭素原子は独立して、酸素原子または窒素原子を介して置換基に結合される。一部の実施形態では、 R^G は独立して置換され、各 R^G の各炭素原子は独立して、酸素原子または窒素原子を介して置換基に結合される。一部の実施形態では、 R^G は、1～10個の酸素原子を有する、任意で置換される3～20員のヘテロシクリルである。一部の実施形態では、 R^G は、1個の酸素原子を有する、任意で置換される3～6員のヘテロシクリルである。一部の実施形態では、各 R^G は独立して、1～10個の酸素原子を有する、任意で置換される3～20員のヘテロシクリルである。一部の実施形態では、 R^G は独立して、1個の酸素原子を有する、任意で置換される3～6員のヘテロシクリルである。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の各炭素は独立して、酸素原子または窒素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の2個以上の炭素原子は独立して、酸素原子または窒素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の2個以上の炭素原子は独立して、酸素原子または窒素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の3個以上の炭素原子は独立して、酸素原子または窒素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の4個以上の炭素原子は独立して、酸素原子または窒素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の5個以上の炭素原子は独立して、酸素原子または窒素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の2個以上の炭素原子は独立して、酸素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の3個以上の炭素原子は独立して、酸素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の4個以上の炭素原子は独立して、酸素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G のヘテロシクリル環の5個以上の炭素原子は独立して、酸素原子に結合される。一部の実施形態では、 R^G-H は、 $-CHO$ または $-C(O)-$ 基を含有する C_3-C_{20} ポリオールである。

【0918】

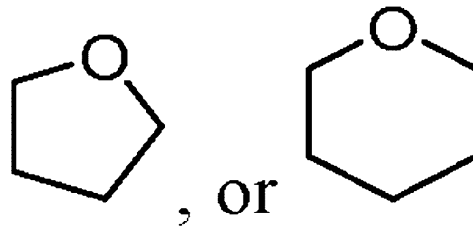
一部の実施形態では、 R^{CD} は、 R^G-L- の構造を有し、式中、 R^G は、 $-H$ であるか、または C_3-C_{20} 環式脂肪族、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する3～20員のヘテロシクリルから選択される、置換された基であり、ここで、置換基の1～20個は、 R 基である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、 R^G-L- の構造を有し、式中、 R^G は、 $-H$ であるか、または C_3-C_{20} 環式脂肪族、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する3～20員のヘテロシクリルから選択される、置換された基であり、ここで、置換基の1～20個は、 $-OR$ 基または $-N(R)_2$ 基である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、 R^G-L- の構造を有し、式中、 R^G は、 $-H$ であるか、または C_3-C_{20} 環式脂肪族、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する3～20員のヘテロシクリルから選択される、置換された基であり、ここで、置換基の1～20個は、 $-OH$ 及び $-N(R)_2$ である。一部の実施形態では、 R^{CD} は、 R^G-L- の構造を有し、式中、 R^G は、 $-H$ であるか、または C_3-C_{20} 環式脂肪族、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する3～20員のヘテロシクリルから選択される、置換された基であり、ここで、置換基の1～20個は、

—OH及び—NHRである。一部の実施形態では、 R^{CD} は、 R^G-L- の構造を有し、式中、 R^G は、—Hであるか、または C_3-C_{20} 環式脂肪族、ならびに酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する3～20員のヘテロシクリルから選択される、置換された基であり、ここで、置換基の1～20個は、—OH及び—NHC(O)Rである。

【0919】

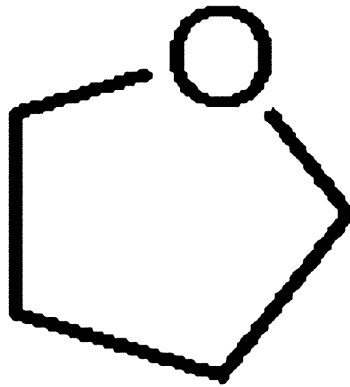
一部の実施形態では、 R^G は、酸素、窒素、硫黄、リン、ホウ素及びケイ素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する、置換された3～20員のヘテロシクリルである。一部の実施形態では、 R^G は、酸素及び窒素から独立して選択される1～10個のヘテロ原子を有する、置換された3～20員のヘテロシクリルである。一部の実施形態では、 R^G は、1～10個の酸素を有する、置換された3～20員のヘテロシクリルである。一部の実施形態では、 R^G は、置換された

【化174】



である。一部の実施形態では、 R^G は、置換された

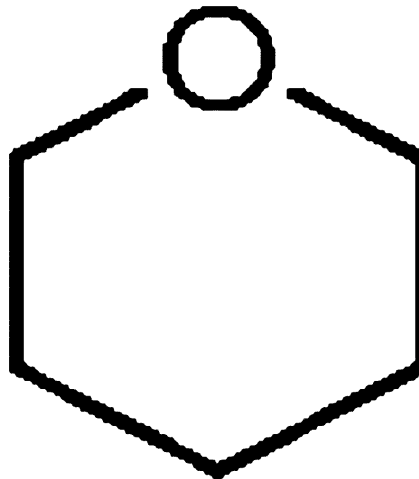
【化 1 7 5】



10

20

である。一部の実施形態では、 R^G は、置換された
【化 1 7 6】



30

40

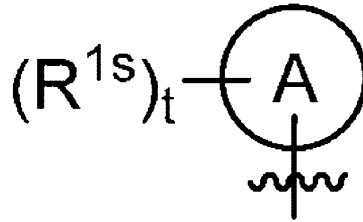
50

である。

【0920】

一部の実施形態では、 R^G は、

【化177】



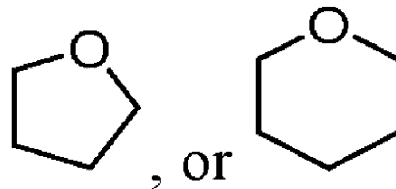
10

であり、式中、各可変部分は独立して、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態では、 t は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。一部の実施形態では、 t は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。一部の実施形態では、 t は、少なくとも1である。一部の実施形態では、 t は、少なくとも2である。一部の実施形態では、 t は、少なくとも3である。一部の実施形態では、 t は、少なくとも4である。一部の実施形態では、 t は、少なくとも5である。一部の実施形態では、 t は、少なくとも6である。一部の実施形態では、各 R^{1s} は独立して、 $-OR'$ または $-N(R')_2$ である。一部の実施形態では、各 R' は独立して、 $-C(O)R$ である。一部の実施形態では、各 R^{1s} は独立して、 $-OR'$ または $-NHR'$ である。一部の実施形態では、各 R^{1s} は独立して、 $-OH$ または $-NHR'$ である。一部の実施形態では、各 R^{1s} は独立して、 $-OH$ または $-NHC(O)R$ である。一部の実施形態では、環 A は、任意で置換される

20

30

【化178】

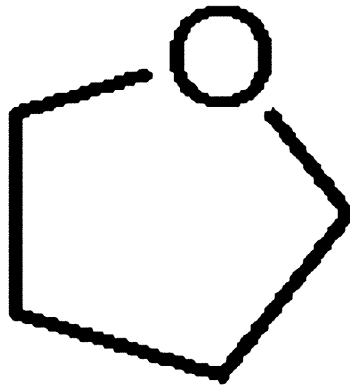


40

である。一部の実施形態では、環 A は、任意で置換される

50

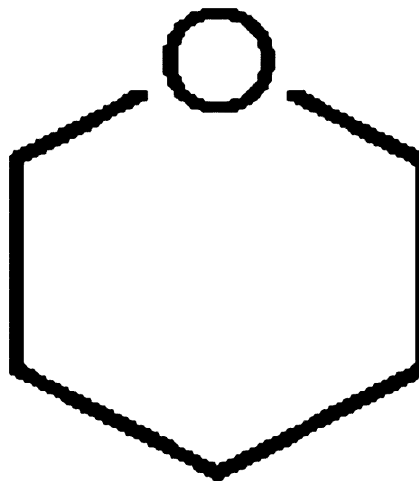
【化 1 7 9】



10

20

である。一部の実施形態では、環 A は、任意で置換される
【化 1 8 0】



30

40

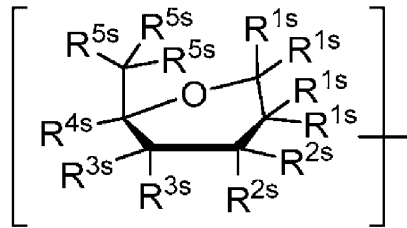
50

である。

【0921】

一部の実施形態では、 R^G は、

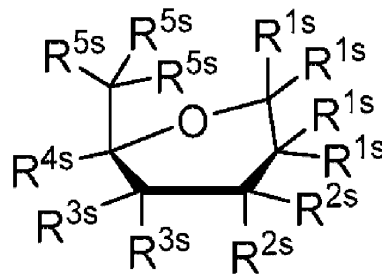
【化181】



10

であり、式中、各可変部分は独立して、本開示に記載されるとおりである（すなわち、 R^{G-H} は、

【化182】



20

である）。一部の実施形態では、 R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 及び R^{5s} のうちの少なくとも1、2、3、4、5、または6つは独立して、 $-OR'$ または $-N(R')$ である。一部の実施形態では、 R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 及び R^{5s} のうちの少なくとも1、2、3、4、5、または6つは独立して、 $-OR'$ または $-NHR'$ である。一部の実施形態では、 R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 及び R^{5s} のうちの少なくとも1、2、3、4、5、または6つは独立して、 $-OH$ または $-NHR'$ である。一部の実施形態では、 R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 及び R^{5s} のうちの少なくとも1、2、3、4、5、または6つは独立して、 $-OH$ または $-NHC(O)R$ である。一部の実施形態では、 R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 及び R^{5s} のうちの少なくとも1、2、3、4、5、または6つは、 $-OH$ である。

30

【0922】

一部の実施形態では、 R^G の環式脂肪族または複素環式環の各環炭素原子は独立して、置換される。一部の実施形態では、 R^G の環式脂肪族または複素環式環の環炭素原子の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個以下は、置換されない。一部の実施形態では、置換されていない環炭素原子は、1個以下である。一部の実施形態では、置換されていない環炭素原子は、2個以下である。一部の実施形態では、置換されていない環炭素原子は、3個以下である。一部の実施形態では、置換されていない環炭素原子は、4個以下である。一部の実施形態では、置換されていない環炭素原子は、5個以下である。一部の実施形態では、置換されていない環炭素原子は、6個以下である。一部の実施形態では、置換されていない環炭素原子は、7個以下である。一部の実施形態では、置換されて

40

50

50

(R')₂で置換される。一部の実施形態では、少なくとも5個の環炭素原子が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、少なくとも6個の環炭素原子が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、少なくとも7個の環炭素原子が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、少なくとも8個の環炭素原子が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、少なくとも9個の環炭素原子が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、少なくとも10個の環炭素原子が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、R^Gの環式脂肪族または複素環式環の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも1個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも2個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも3個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも4個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも5個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも6個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも7個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも8個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも9個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも10個の環炭素原子が-OHで置換される。一部の実施形態では、R^Gの環式脂肪族または複素環式環の環炭素原子の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95パーセントは、-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、少なくとも10%の環炭素原子が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、少なくとも20%の環炭素原子が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも30%が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも40%が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも50%が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも60%が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも70%が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも80%が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも90%が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも95%が-OHまたは-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、R^Gの環式脂肪族または複素環式環の環炭素原子の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%は、-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも10%が-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも20%が-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも30%が-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも40%が-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも50%が-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも60%が-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも70%が-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも80%が-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも90%が-OHで置換される。一部の実施形態では、環炭素原子の少なくとも95%が-OHで置換される。一部の実施形態では、少なくとも1個の環炭素原子が-N(R')₂で置換される。一部の実施形態では、少なくとも1個の環炭素原子が-NHC(O)Rで置換される。一部の実施形態では、少なくとも1個の環炭素原子が-NHC(O)Rで置換され、式中、Rは、任意で置換されるC₁-6脂肪族である。一部の実施形態では、少なくとも1個の環炭素原子が-NHAcで置換される。

【0923】

一部の実施形態では、R^Gは、任意で置換される

10

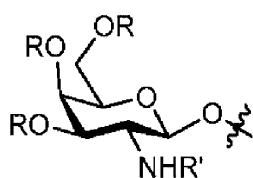
20

30

40

50

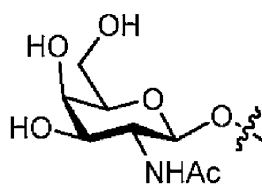
【化 1 8 3】



10

である。一部の実施形態では、 R' は、 $-C(O)R$ である。一部の実施形態では、 R^G は

【化 1 8 4】

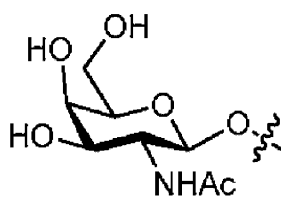


20

である。一部の実施形態では、 R^G は、任意で置換される

【化 1 8 5】

..



30

である。

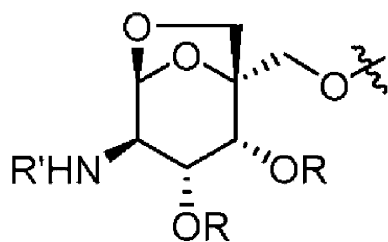
【 0 9 2 4】

一部の実施形態では、 R^G は、任意で置換される

40

50

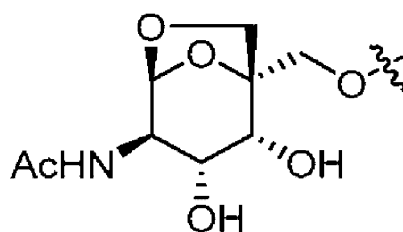
【化 1 8 6】



10

である。一部の実施形態では、 R' は、 $-C(O)R$ である。一部の実施形態では、 R' は、任意で置換される

【化 1 8 7】



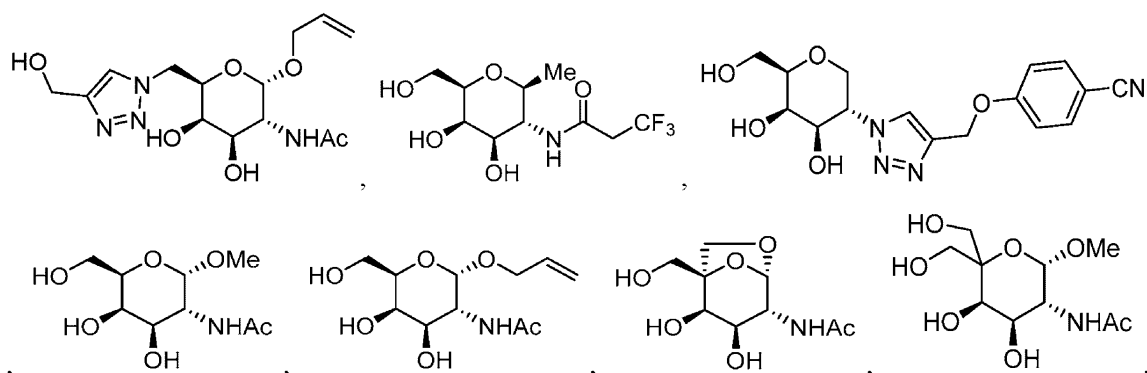
20

である。

【0 9 2 5】

一部の実施形態では、 R^{CD} 、または R^G は、 $R^{CD}-H$ 、または R^G-H が、

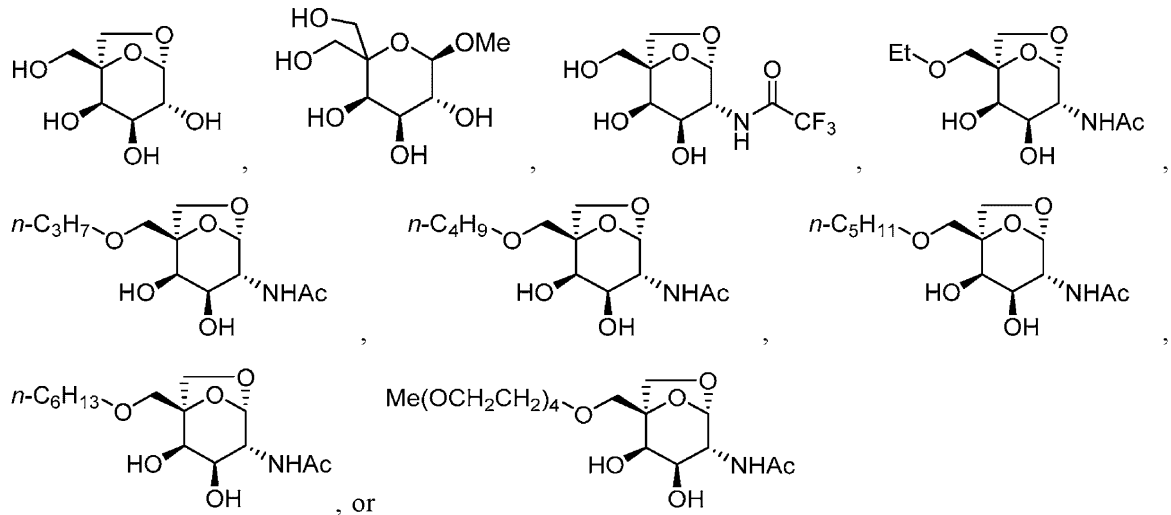
【化 1 8 8】



30

40

50



10

であるような構造のものである。一部の実施形態では、 R^{CD} 、または R^G は、 $R^{CD}-H$ 、または R^G-H がアシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）のリガンドであるような構造のものである。様々な他のASGPRリガンドが当分野で公知であり、本開示に従って利用することができる。一部の実施形態では、記載される炭水化物部分は、提供されるオリゴヌクレオチドの肝臓への標的化送達に有用である。

20

【0926】

一部の実施形態では、 L は、共有結合である。一部の実施形態では、 L は、任意で置換される二価の C_{1-6} 脂肪族であり、式中、1つ以上のメチレン単位が独立して、及び任意で $-O-$ と置き換えられる。一部の実施形態では、 L は、 $-O-CH_2-$ である。

【0927】

一部の実施形態では、 R^{CD} は、 R^G-H のオリゴマー部分またはポリマー部分であり、式中、各 R^G は独立して、本開示に記載されるとおりである。

【0928】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の標的化部分を含有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、一本鎖RNAi剤である。

30

【0929】

一部の実施形態では、標的化部分は、アシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）のリガンドである。

【0930】

一部の実施形態では、標的化部分は、Sanhuesa et al. J. Am. Chem. Soc., 2017, 139 (9), pp 3528-3536に開示されているアシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）のリガンドである。

【0931】

一部の実施形態では、標的化部分は、Liras et al. US 20160207953に開示されているアシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）のリガンドである。

40

【0932】

一部の実施形態では、標的化部分は、Liras et al. US 20160207953に開示されている、置換された-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-2,3-ジオール誘導体である。

【0933】

一部の実施形態では、標的化部分は、Liras et al. US 20150329555に開示されているアシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）のリガンドである。

【0934】

50

一部の実施形態では、標的化部分は、Liras et al. US 20150329555に開示されている、置換された-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-2, 3-ジオール誘導体である。

【0935】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤に複合体化される追加の化学的部分は、GalNAc部分である。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤に複合体化される追加の化学的部分は、任意の位置で複合体化されるGalNAc部分である。

【0936】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤に複合体化される追加の化学的部分は、リンカーを介して5'-H Tに複合体化される、GalNAc部分である。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤に複合体化される追加の化学的部分は、リンカーを介して5'-H Tに複合体化され、任意の位置で複合体化されるGalNAc部分である。

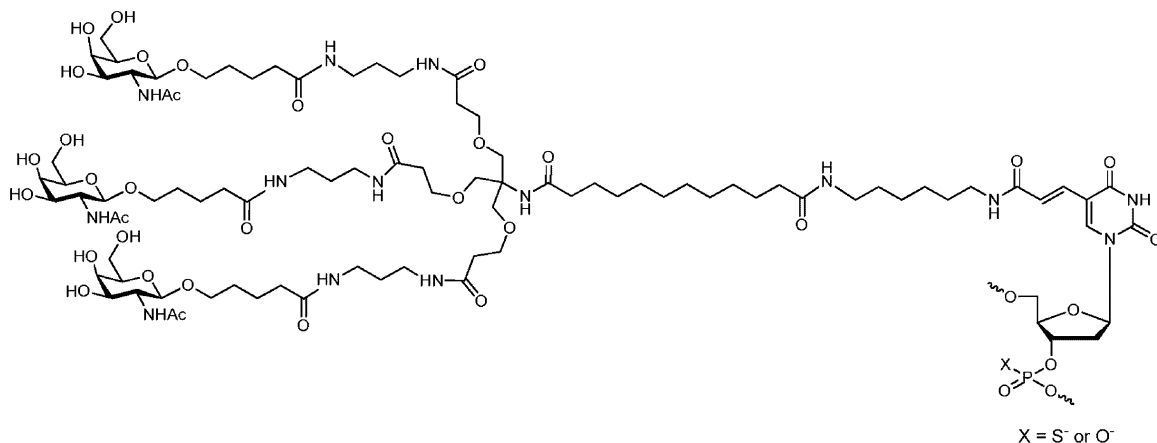
【0937】

一部の実施形態では、追加の化学的部分は、任意の位置でのGANC6T (TGANC6Tとしても知られ、アミノC6リンカーを介したGalNAc部分の5'-H Tへの複合体化) である。

【0938】

一部の実施形態では、追加の化学的部分は、GANC6T、たとえば、アミノC6リンカーを介したGalNAc部分の5'-H Tへの複合体化である（たとえば、最後から2番目または最後から3番目のヌクレオチドにおけるもの[5'から3'へ数えて]）；たとえば、3'末端ジヌクレオチドの5'ヌクレオチド（たとえば、3'末端ジヌクレオチドの5'ヌクレオチドは、3'末端ジヌクレオチドの2つのヌクレオチドのうち、オリゴヌクレオチドの5'末端により近いヌクレオチド）または3'末端ジヌクレオチドの5'ヌクレオチドのすぐ5'側のヌクレオチド：

【化189】



【0939】

いくつかの実施形態または一本鎖RNAi剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、GalNAc部分をオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤に複合体化するリンカーを含有する。いくつかの実施形態または一本鎖RNAi剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、GalNAc部分をオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤に複合体化するリンカーを含有し、ここで、リンカーは、糖の2'位に結合している。いくつかの実施形態または一本鎖RNAi剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、GalNAc部分をオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤に複合体化するリンカーを含有し、ここで、リンカーは、塩基に結合している。いくつかの実施形態または一本鎖RNAi剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、G

a l N A c 部分をオリゴヌクレオチドまたは一本鎖 R N A i 剤に複合体化するリンカーを含有し、ここで、リンカーは、T 塩基に結合している。いくつかの実施形態または一本鎖 R N A i 剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖 R N A i 剤は、G a l N A c 部分をオリゴヌクレオチドまたは一本鎖 R N A i 剤に複合体化するリンカーを含有する。

【0940】

一部の実施形態では、G a l N A c 部分に結合しているリンカーは、生体切断可能リンカーである。そのようなリンカーは、G a l N A c 部分の細胞内での除去を可能にし、このため、G a l N A c 部分は、A g o - 2 活性または R N A 干渉を妨害しない。

【0941】

一部の実施形態では、G a l N A c 部分は、最後から2番目または最後から3番目のヌクレオチドで P N P L A 3 オリゴヌクレオチドまたは一本鎖 R N A i 剤に複合体化される。

【0942】

一部の実施形態では、G a l N A c 部分は、一本鎖 R N A i 剤の最後から2番目のヌクレオチド（3'末端ジヌクレオチドのより5'側の位置）、または一本鎖 R N A i 剤の最後から3番目のヌクレオチド（3'末端ジヌクレオチドのすぐ5'側のヌクレオチド）で複合体化され得る。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、一本鎖 R N A i 剤の最後から2番目または最後から3番目のヌクレオチド（たとえば、3'末端ジヌクレオチドのより5'側の位置）が A g o - 2 のポケットに隣接し得、G a l N A c 部分は、当該ポケットへの挿入が可能であり得ることから、G a l N A c 部分は、A g o - 2 活性を妨害しないことを示唆する。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、G a l N A c 部分が最後から2番目または最後から3番目のヌクレオチドに結合している場合、R N A i 活性を可能にするために G a l N A c 部分を切断する必要はなく、そのため、より堅固な非生体切断可能リンカーを使用して G a l N A c 部分をオリゴヌクレオチドまたは一本鎖 R N A i 剤に結合させることが許容され得ることを示唆する。したがって、より堅固なリンカーは切断の影響を受けにくく、これにより、G a l N A c 部分によるオリゴヌクレオチドまたは一本鎖 R N A i 剤の送達増加の可能性が高くなる。

【0943】

一部の実施形態では、G a l N A c 部分は、A M C 6 リンカーを介して結合される。

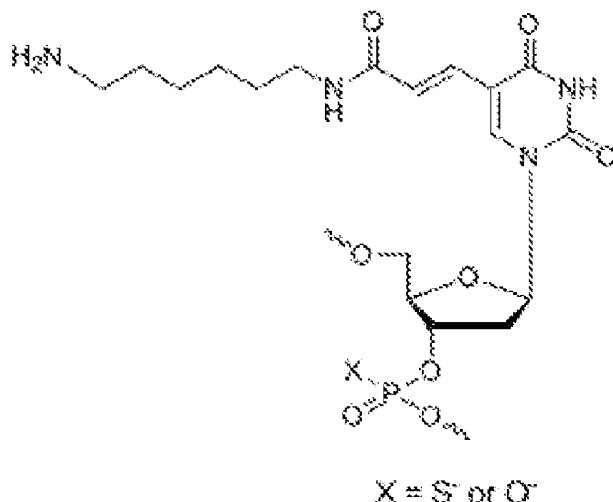
【0944】

一部の実施形態では、G a l N A c 部分は、T 塩基に結合した A M C 6 リンカーを介して結合される（A M C 6 T）。

【0945】

一部の実施形態では、A M C 6 T は、以下の構造を有する：

【化190】



10

20

30

40

50

一部の非限定的な例では、A M C 6 Tは、最後から2番目または最後から3番目のヌクレオチド〔5'から3'へ数えて〕のいずれかにあり、たとえば、3'末端ジヌクレオチドの5'ヌクレオチド、または3'末端ジヌクレオチドの5'ヌクレオチドのすぐ5'側のヌクレオチドにある。

【0946】

一本鎖RNA i剤のいくつかの実施形態では、一本鎖RNA i剤は、最後から2番目または最後から3番目のヌクレオチドにA M C 6 Tを含有する。

【0947】

本明細書に開示されるように、G a N C 6 Tは、有効な一本鎖RNA i剤の構成要素である。一部の非限定的な例では、G a N C 6 Tは、最後から2番目または最後から3番目のヌクレオチド〔5'から3'へ数えて〕のいずれかにあり、たとえば、3'末端ジヌクレオチドの5'ヌクレオチド、または3'末端ジヌクレオチドの5'ヌクレオチドのすぐ5'側のヌクレオチドにある。本明細書に開示される一部の非限定的な例では、G a N C 6 Tは、ヌクレオチド位置21のうち20（5'末端から数えて）、または25のうち24（5'末端から数えて）にある。

【0948】

一部の実施形態では、P N P L A 3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i剤は、三アンテナ型G a l N A c酸に複合体化される（たとえば、C10、C3またはトリアジンリンカーを介して）：

10

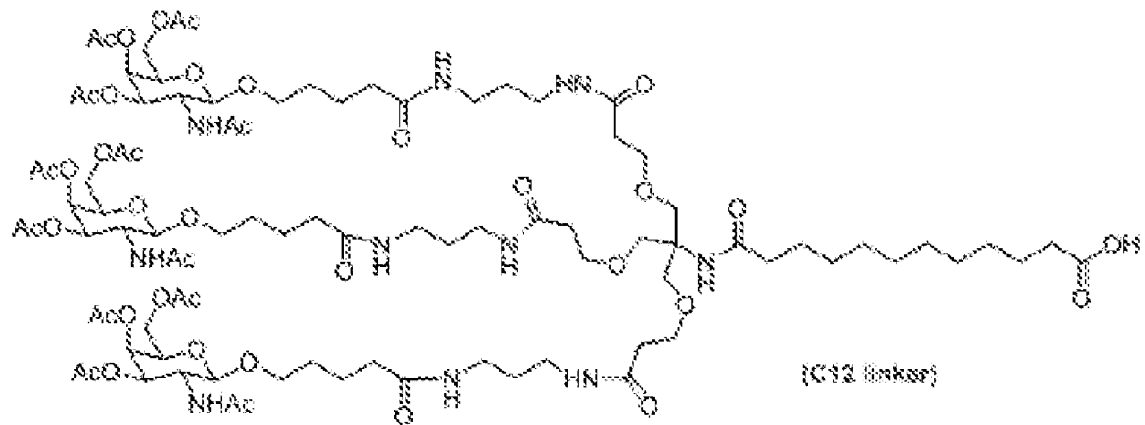
20

30

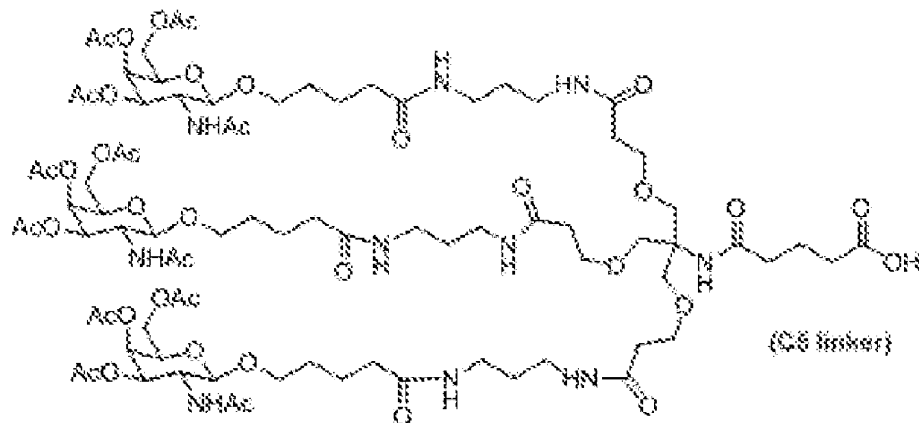
40

50

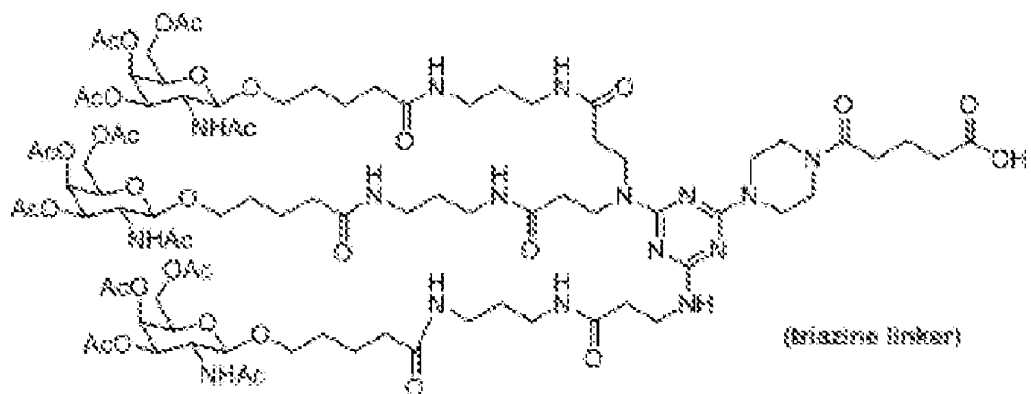
【化 1 9 1】



10



20



30

これらの構造は、 $-OAc$ ($-O$ -アセテート基) を含有するので、保護されたバージョンを表す。一部の実施形態では、 Ac 基は、当該化合物のオリゴヌクレオチドへの複合体化後の脱保護中に除去される。一部の実施形態では、脱保護は、たとえば、実施例 37B に記載されるように、濃縮水酸化アンモニウムを用いて実施される。これらの構造の脱保護されたバージョンでは、 $-OAc$ は、 $-OH$ により置き換えられる。

40

【0949】

一部の実施形態では、 $GalNAc$ 部分は、5'末端に複合体化される。これらの追加の化学的部分のそれぞれ(C12、C5またはトリアジンリンカーのそれぞれを伴う三アンテナ型 $GalNAc$ 酸)を、 $RNase H$ 機序を介して作動する、第XI因子(FXI)を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化した。

【0950】

いくつかのオリゴヌクレオチドを構築した。各々は、 $RNase H$ 機序を介して作動

50

する、第X I 因子 (F X I) を標的とする P N P L A 3 オリゴヌクレオチドを含有し、C 1 2、C 5 またはトリアジンリンカーのそれぞれにより、それぞれ異なる三アンテナ型 G a l N A c 酸に複合体化されている。三アンテナ型 G a l N A c 酸は、オリゴヌクレオチドの肝臓への送達を改善することが実験的に明らかにされた (データ図示せず)。

【0951】

一部の実施形態では、本開示は、三アンテナ型 G a l N A c 酸に複合体化される任意のオリゴヌクレオチドに関する。一部の実施形態では、本開示は、C 1 0、C 3 またはトリアジンリンカーを介して、三アンテナ型 G a l N A c 酸に複合体化される任意のオリゴヌクレオチドに関する。一部の実施形態では、本開示は、三アンテナ型 G a l N A c 酸に複合体化される任意のオリゴヌクレオチドに関し、ここで、オリゴヌクレオチドは、R N a s e H または R N A 干渉機序によって介在される、標的転写産物のノックダウンを誘導する。一部の実施形態では、本開示は、C 1 0、C 3 またはトリアジンリンカーを介して、三アンテナ型 G a l N A c 酸に複合体化される任意のオリゴヌクレオチドに関し、ここで、オリゴヌクレオチドは、R N a s e H または R N A 干渉機序によって介在される、標的転写産物のノックダウンを誘導する。

【0952】

一部の実施形態では、本開示は、三アンテナ型 G a l N A c 酸に複合体化される任意のオリゴヌクレオチドに関し、ここで、オリゴヌクレオチドは、R N a s e H または R N A 干渉機序によって介在される、標的転写産物のノックダウンを誘導し、この R N A 干渉機序は、1、2 またはそれ以上の鎖を含有する R N A i 剤によって誘導される。一部の実施形態では、本開示は、C 1 0、C 3 またはトリアジンリンカーを介して、三アンテナ型 G a l N A c 酸に複合体化される任意のオリゴヌクレオチドに関し、ここで、オリゴヌクレオチドは、R N a s e H または R N A 干渉機序によって介在される、標的転写産物のノックダウンを誘導し、この R N A 干渉機序は、1、2 またはそれ以上の鎖を含有する R N A i 剤によって誘導される。

【0953】

加えて、本開示は、一本鎖 R N A 干渉を誘導する能力を有する提供されるオリゴヌクレオチドにおいて、一本鎖 R N A i 剤の 5' 末端の最初のヌクレオチドが、標的転写産物の配列の対応する部分に一致する必要はないことを示す。

【0954】

本開示による様々な方法を使用して、一本鎖 R N A 干渉を誘導する能力を有するオリゴヌクレオチドを調製し、特徴付けた。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、表 1 A に列挙される P N P L A 3 オリゴヌクレオチドタイプの一本鎖 R N A i 剤である。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、図 1 に例示される形式のいずれかとして列挙される P N P L A 3 オリゴヌクレオチドタイプの一本鎖 R N A i 剤である。

【0955】

一部の実施形態では、P N P L A 3 オリゴヌクレオチドは、R N a s e H 介在性ノックダウンと R N A 干渉の両方によって、標的転写産物のノックダウンを誘導する能力を有する。そのような P N P L A 3 オリゴヌクレオチドは、本明細書中、二重機序またはハイブリッドオリゴヌクレオチドと記載される。

【0956】

一部の実施形態では、P N P L A 3 オリゴヌクレオチド、R N A 干渉を誘導する P N P L A 3 オリゴヌクレオチド、R N a s e H 介在性ノックダウンを誘導する P N P L A 3 オリゴヌクレオチド、または R N A 干渉と R N a s e H 介在性ノックダウンの両方を誘導する P N P L A 3 オリゴヌクレオチドは、任意の追加の化学的部分、たとえば、限定されないが、以下のいずれかに記載または参照される任意の G a l N A c 部分を含有し得る：
5, 382, 524, 5, 491, 075, 5, 545, 553, 5, 705, 367, 5, 733, 765, 5, 786, 184, 5, 798, 233, 5, 854, 042, 5, 871, 990, 5, 945, 322, 6, 165, 469, 6, 187, 310

、 6, 3 4 2, 3 8 2、 6, 4 6 5, 2 2 0、 6, 5 0 3, 7 4 4、 6, 6 9 9, 7 0 5
、 6, 7 2 3, 5 4 5、 6, 7 8 0, 6 2 4、 6, 8 2 5, 0 1 9、 6, 9 0 5, 8 6 7
、 6, 9 1 1, 3 3 7、 7, 0 2 6, 1 4 7、 7, 0 7 8, 2 0 7、 7, 1 3 8, 2 5 8
、 7, 1 6 6, 7 1 7、 7, 1 6 9, 5 9 3、 7, 1 6 9, 9 1 4、 7, 1 8 9, 8 3 6
、 7, 1 9 2, 7 5 6、 7, 2 0 2, 3 5 3、 7, 2 0 8, 3 0 4、 7, 2 1 1, 6 5 7
、 7, 2 1 7, 5 4 9、 7, 2 2 0, 8 4 8、 7, 2 3 8, 5 0 9、 7, 3 3 8, 9 3 2
、 7, 3 7 1, 8 3 8、 7, 3 8 4, 7 7 1、 7, 4 6 2, 4 7 4、 7, 5 9 8, 0 6 8
、 7, 6 0 8, 4 4 2、 7, 6 8 2, 7 8 7、 7, 7 2 3, 0 9 2、 8, 0 3 9, 2 1 8
、 8, 1 3 7, 9 4 1、 8, 2 6 8, 5 9 6、 8, 8 7 1, 7 2 3、 または 9, 2 2 2,
0 8 0。

10

【 0 9 5 7 】

二重機序またはハイブリッドオリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意のオリゴヌクレオチドの構造的要素を含有し得る。

【 0 9 5 8 】

本明細書に開示されるように、いくつかのオリゴヌクレオチドは、RNase H介在性ノックダウンとRNA干渉の両方によって、転写産物標的のノックダウンを誘導する能力を有する。

20

【 0 9 5 9 】

本明細書に開示されるように、いくつかのオリゴヌクレオチド（たとえば、限定されないが、二重機序またはハイブリッドオリゴヌクレオチドもしくはハイブリッドRNAi剤として本明細書に記載されるもの）は、RNase H介在性ノックダウンとRNA干渉の両方によって、転写産物標的のノックダウンを誘導する能力を有する。

【 0 9 6 0 】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、ハイブリッドオリゴヌクレオチドが、RNase H介在性ノックダウンによってのみノックダウンを誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉によってのみノックダウンを誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドのいずれかに対して、特別な利点を有することができることを示唆する。たとえば、いくつかのハイブリッドオリゴヌクレオチドを同じ細胞内に導入した場合、全てではない一部のハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RISC経路に関与することができ、RISC経路に関与しないものは、RNase H介在性経路への関与に利用することができる。たとえば、いくつかのハイブリッドオリゴヌクレオチドを同じ細胞内に導入した場合、全てではない一部のハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNase H介在性経路に関与することができ、RNase H介在性経路に関与しないものは、RISC経路への関与に利用することができる。いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、ハイブリッドオリゴヌクレオチドが、RNase H介在性ノックダウンによってのみノックダウンを誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチド、またはRNA干渉によってのみノックダウンを誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも効果的なノックダウンを介在することができることを示唆する。これは、ハイブリッドオリゴヌクレオチドが両方の経路を介してノックダウンを誘導する能力を有するからである。少なくともいくつかの細胞では、RNase H活性及びRNA干渉のレベルは、細胞区画ごとに異なり得る。一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNase H介在性ノックダウンまたはRNA干渉を介して、様々な細胞区画でノックダウンを誘導することができる。一部の実施形態では、RNase Hがオリゴヌクレオチドで飽和している場合、過剰なオリゴヌクレオチドは、RNA干渉介在性ノックダウンに利用可能であり得る。一部の実施形態では、Ago-2がオリゴヌクレオチドで飽和している場合、過剰なオリゴヌクレオチドは、RNase H介在性ノックダウンに

30

40

50

利用可能であり得る。

【0961】

一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNase H介在性ノックダウンを介したノックダウンと、RNA干渉を介したノックダウンの両方が可能な構造を含有する。

【0962】

報告によれば、RNase HとRNAiは両方とも標的mRNAのノックダウンに関与するが、両者は異なる機序を伴う。報告によれば、RNase Hは、天然に、一本鎖DNA分子に関与し、一本鎖DNA分子は、mRNA標的に結合して、翻訳を立体的に妨げること、またはRNA/DNA二重鎖がRNase Hの基質として作用してmRNA標的が切断されることのいずれかによって、発現を低下させる。

10

【0963】

対照的に、報告によれば、RNAiは、天然に、二本鎖RNA分子に関与し、Dicerによって、アンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、2つの3'オーバーハングを有する、二本鎖RNA分子が天然に生成される。これらの鎖は、二重鎖がほどけて、アンチセンスがアルゴノート2を含むRISC(RNA干渉サイレンシング複合体)に組み込まれることで分離する。アンチセンス鎖は、RISCのガイドとして作用し、相補的なmRNA標的を識別し、それを切断する。本明細書に示されるように、一本鎖RNAi剤の特定の形式もまた有効であるが、一本鎖RNAi剤は、Dicerによって天然に生成されない。

【0964】

20

報告によれば、RNase H及びRISCは、構造的に異なる2種類の分子を天然に好む。RNase Hは、一本鎖DNA分子を天然に使用してmRNA標的を標的とし、DNA/RNA二重鎖を形成する。報告によれば、RISCは、一本鎖RNAアンチセンス鎖を天然に使用してmRNA標的を標的とし、RNA/RNA二重鎖を形成することが報告されている。Crooke et al. 1995 Biochem. J. 312:599-608; 及び Elbashir et al. Nature 2001 411:494。

【0965】

Crooke et al. 1995 Biochem. J. 312:599-608はまた、E. coli RNase H1を結晶化し、研究したことを報告しており、好ましい基質がRNA/RNA二重鎖であることを報告した。DNA鎖では、2'-OMe及び2'-Fなどの2'-修飾は、RNase H活性を低下または排除することが報告されている。加えて、RNA干渉の場合、RNAをDNAで完全に置換すると、二本鎖RNAi剤のRNA干渉活性が消失することが報告されている。Elbashir et al. 2001 EMBO J. 20:6877-6888。したがって、報告によれば、RNase H介在性ノックダウンには、DNA(2'-デオキシ)の区間が必要であることが報告されているのに対し、RNA干渉は、ヌクレオチドの区間をDNA(2'-デオキシ)に置き換えると消失し得る。

30

【0966】

対照的に、本明細書に示されるように、2'-OMe及び2'-F修飾は、一本鎖RNAi剤に極めて好適である。したがって、出願人は、(a) 2'-修飾ヌクレオチドを含有するシード領域; 及び (b) 2'-デオキシ(2'-デオキシ)ヌクレオチドのストレッチを含有するポストシード領域を含有する、いくつかのオリゴヌクレオチドを設計し、構築した。これらは、RNAiとRNase H介在性ノックダウン機序の両方を介して機能することが本明細書に示される。

40

【0967】

一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、(a) 第1の相補的標的mRNA領域にアニーリングし、RNA干渉を介在する能力を有するシード領域; 及び (b) 第2の相補的標的mRNA領域にアニーリングし、RNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する2'-デオキシ(2'-デオキシ)領域を含有するポストシード領

50

域を含有する。シード領域は、RNAまたは修飾ヌクレオチド、たとえば、2'修飾（たとえば、限定されないが、2'-F、2'-OMe及び2'-MOE）を含むヌクレオチドを任意選択で含有することができ、ここで、RNAまたは修飾ヌクレオチドは、天然糖及び／または天然塩基、及び／または修飾塩基、及び／またはヌクレオチド間結合を含有する。

【0968】

RNase H介在性ノックダウンに有効なDNA（2'-デオキシ）領域の最小長は、少なくとも一部の例では、約5つの連続的なDNA（2'-デオキシ）であると報告されており、この最小デオキシ長は、部分的に精製された哺乳類RNase H酵素を使用した *in vitro*での効率的なRNase H活性化に必要な最小長と相関することが報告されている。Monia et al. 1993 JBC 268:14514-14522。

10

【0969】

一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、（a）第1の相補的標的mRNA領域にアニーリングする能力を有するシード領域；及び（b）2'-デオキシ領域を含有するポストシード領域を含有し、ここで、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導する能力を有し、2'-デオキシ領域は、少なくとも5つの連続的な2'-デオキシを含有する。一部の実施形態では、2'-デオキシは、DNA、または修飾ヌクレオチド、たとえば、2'-デオキシを含む修飾ヌクレオチドであり得、ここで、DNAまたは修飾ヌクレオチドは、天然糖及び／または天然塩基、及び／または修飾塩基、及び／または任意のヌクレオチド間結合を含有する。一部の実施形態では、2'-デオキシ領域は、連続的なヌクレオチドのストレッチを含有し、ここで、各ヌクレオチドは、2'-デオキシであり、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。一部の実施形態では、2'-デオキシ領域は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または21ヌクレオチドの連続的なヌクレオチドのストレッチを含有し、ここで、各ヌクレオチドは、2'-デオキシであり、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。

20

【0970】

一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、（a）第1の相補的標的mRNA領域にアニーリングする能力を有するシード領域；及び（b）2'-デオキシ領域を含有するポストシード領域を含有し、ここで、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導する能力を有し、2'-デオキシ領域は、少なくとも5つの連続的な2'-デオキシを含有する。一部の実施形態では、2'-デオキシは、DNA、または修飾ヌクレオチド、たとえば、2'-デオキシを含む修飾ヌクレオチドであり得、ここで、DNAまたは修飾ヌクレオチドは、天然糖及び／または天然塩基、及び／または修飾塩基、及び／または任意のヌクレオチド間結合を含有する。一部の実施形態では、2'-デオキシ領域は、連続的なヌクレオチドの区間を含有するか、または当該区間であり、ここで、各ヌクレオチドは、2'-デオキシであり、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。一部の実施形態では、2'-デオキシ領域は、連続的なヌクレオチドのストレッチを含有するか、または当該ストレッチであり、ここで、各ヌクレオチドは、2'-デオキシであり、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。一部の実施形態では、2'-デオキシ領域は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または21ヌクレオチドの連続的なヌクレオチドのストレッチを含有し、ここで、各ヌクレオチドは、2'-デオキシであり、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。

30

40

【0971】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、WO 2015/107425が、RNase H切断を誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチドのホスホロチオエートのキラル中心の配置によって、RNase Hによって介在される切断を調節することができることを報告したことを注記する。たとえば、1つのRpの両側に少なくとも2つまたは3つのSpが位置する配置は、切断パターンを変更することができ、これにより、切断部位の数が減少し、RNase H介在性切断の部位が制御

50

される。

【0972】

一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、(a) 第1の相補的標的mRNA領域にアニーリングする能力を有するシード領域；及び(b) 2'-デオキシ領域を含有するポストシード領域を含有し、ここで、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導する能力を有し、2'-デオキシ領域は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または21ヌクレオチドの連続的なヌクレオチドのストレッチを含有し、ここで、各ヌクレオチドは、2'-デオキシであり、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。

10

【0973】

一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、(a) 第1の相補的標的mRNA領域にアニーリングする能力を有するシード領域；及び(b) 2'-デオキシ領域を含有するポストシード領域を含有し、ここで、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、RNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導する能力を有し、2'-デオキシ領域は、少なくとも9ヌクレオチドの連続的なヌクレオチドのストレッチを含有し、各ヌクレオチドは、2'-デオキシであり、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートである。

【0974】

一部の実施形態では、第1及び第2の相補的標的mRNA領域は、同じ標的mRNAの領域である。

20

【0975】

一部の実施形態では、第1及び第2の相補的標的mRNA領域は、異なる標的mRNAの領域である。

【0976】

ハイブリッドオリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態では、シード領域は、相補的標的mRNA領域にアニーリングし、RNase H介在性ノックダウンを誘導する能力を有するDNA領域を含有する。

【0977】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、多くの例において、一本鎖DNAに結合した一本鎖RNA標的を、RNase Hが切断することを注記する。一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、標的RNA転写産物に結合する能力を有する一本鎖2'-デオキシ部分を含有し、RNase Hの基質を形成する。一部の実施形態では、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、標的RNA転写産物に結合する能力を有する一本鎖2'-デオキシ部分（本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意のヌクレオチド間結合であり得る、ヌクレオチド間結合を含有する）を含有し、RNase Hの基質を形成する。

30

【0978】

一本鎖RNA i 剤のいくつかの実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも4つの連続的な2'-デオキシを含有するヌクレオチドの配列を含有する。一本鎖RNA i 剤のいくつかの実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも5つの連続的な2'-デオキシを含有するヌクレオチドの配列を含有する。一本鎖RNA i 剤のいくつかの実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも6つの連続的な2'-デオキシを含有するヌクレオチドの配列を含有する。一本鎖RNA i 剤のいくつかの実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも7つの連続的な2'-デオキシを含有するヌクレオチドの配列を含有する。一本鎖RNA i 剤のいくつかの実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも8つの連続的な2'-デオキシを含有するヌクレオチドの配列を含有する。一本鎖RNA i 剤のいくつかの実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも9つの連続的な2'-デオキシを含有するヌクレオチドの配列を含有する。一本鎖RNA i 剤のいくつかの実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも10～20の連続的な2'-デオキシを含有するヌクレオチドの配

40

50

列を含有する。

【0979】

ハイブリッドオリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも9つの連続的な2'-デオキシを含有する。一本鎖RNAi剤のいくつかの実施形態では、ポストシード領域は、少なくとも10の連続的な2'-デオキシを含有する。RNA干渉またはRNase Hノックダウンを介在する様々な一本鎖RNAi剤及びアンチセンスオリゴヌクレオチドの能力は、本明細書に記載され、非限定的な例として、図及び表に示される。

【0980】

実験データ（図示せず）及び本明細書に別途詳細に記載されるものは、推定二重機序オリゴヌクレオチドが、RNA干渉とRNase Hノックダウンの両方を介在する能力を有することを実証した。RNA干渉は、2つの異なる*in vitro* Ago-2アッセイのいずれかで試験し、RNase Hノックダウンは、*in vitro* RNase Hアッセイで試験した。

【0981】

実験には、RNase Hアッセイが使用され、陽性対照としてWV-1868（ASO、RNase Hノックダウン機序を介在）、陰性対照としてWV-2110（一本鎖RNAi剤）を用いた。RNA分子WV-2372は、被験基質として使用される。RNase Hアッセイでは、二重機序オリゴヌクレオチドWV-2111は、RNase Hノックダウンを介在した。

【0982】

アレル特異的抑制

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、アレル特異的抑制（またはアレル特異的ノックダウン）を介在する能力を有する。

【0983】

一部の実施形態では、いくつかの疾患状態において、患者（たとえば、ヒト患者）は、同じ遺伝子のコピーを2つ含有し得、ここで、一方のコピーは野生型であり（疾患に関連しない）、別の染色体上の他方のコピーは突然変異を有する（疾患に関連する）。一部の実施形態では、野生型アレル及び変異型アレルは、突然変異の特定の配列によって区別することができ、または有害な突然変異以外の配列（たとえば、SNP）によって区別することもできる。野生型遺伝子の発現は必要または有益であり得るが、変異型遺伝子の発現は有害または疾患に関連し得るので、変異型と野生型の両方のアレルをノックダウンすることは、時折望ましくないこともある。

【0984】

一部の実施形態では、標的配列は、野生型転写産物よりも変異型転写産物（たとえば、有害な突然変異または標的SNPを含有するもの）を優先的に認識するように設計される。

【0985】

一部の実施形態では、アレル特異的オリゴヌクレオチドは、アレル特異的抑制またはアレル特異的ノックダウンとして言及されるプロセスにおいて、野生型アレルのノックダウンを最小限に抑えながら、変異型アレルのノックダウンを最大化する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、遺伝子の変異型アレルを選択的に標的とする能力を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、野生型アレルと比較して、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50倍の特異性で変異型アレルをノックダウンする能力を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、遺伝子の変異型アレルを選択的に標的とすることができ、ここで、変異型アレルは、1つのアレルによって表され、野生型アレルは、異なるアレルによって表される。一部の実施形態では、突然変異は、二重突然変異であり得る（たとえば、同じゲノム内で一緒に起こることが多い近接した2

10

20

30

40

50

つの突然変異)。一部の実施形態では、突然変異は、PNPLA3にある。一部の実施形態では、突然変異は、PNPLA3の二重突然変異である。一部の実施形態では、I148M突然変異がPNPLA3にある。一部の実施形態では、アレルト異的オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、アレルト異的オリゴヌクレオチドは、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。一部の実施形態では、アレルト異的オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の形式または構造を有するか、またはそれを含む、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。

【0986】

一部の実施形態では、アレルト異的RNAi剤は、アレルト異的抑制として言及されるプロセスにおいて、野生型アレルのノックダウンを最小限に抑えながら、変異型アレルのノックダウンを最大化する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、遺伝子の変異型アレルを選択的に標的とする能力を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、野生型アレルと比較して、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45または50倍の特異性で変異型アレルをノックダウンする能力を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、遺伝子の変異型アレルを選択的に標的とすることができ、ここで、変異型アレルは、1つのアレルによって表され、野生型アレルは、異なるアレルによって表される。一部の実施形態では、突然変異は、二重突然変異であり得る（たとえば、同じゲノム内で一緒に起こることが多い近接した2つの突然変異）。一部の実施形態では、突然変異は、PNPLA3にある。一部の実施形態では、突然変異は、PNPLA3の二重突然変異である。一部の実施形態では、I148M突然変異がPNPLA3にある。

【0987】

一部の実施形態では、アレルト異的RNAi剤を設計する方法の非限定的な例は、塩基配列内にSNPまたは単一のヌクレオチド多型を組み込むことであり、ここで、変異型アレルは、SNPの1つのアレルによって表され、野生型アレルは、SNPの異なるアレルによって表される。一部の実施形態では、SNPは、疾患に関連する突然変異の部位ではない位置にある場合もあるが、それでもなお、2つのアレルを区別するのに役立つ。

【0988】

一部の実施形態では、アレルト異的RNAi剤を設計する方法の非限定的な例は、塩基配列内に突然変異を組み込むことであり、ここで、変異型アレルは、1つのアレルによって表され、野生型アレルは、異なるアレルによって表される。一部の実施形態では、突然変異は、二重突然変異であり得る（たとえば、同じゲノム内で一緒に起こることが多い近接した2つの突然変異）。一部の実施形態では、突然変異は、PNPLA3にある。一部の実施形態では、突然変異は、PNPLA3の二重突然変異である。一部の実施形態では、I148M突然変異がPNPLA3にある。

【0989】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、遺伝子の変異型アレルと野生型アレルを区別するSNPまたは他の配列を含有し、野生型アレルと比較して変異型アレルを選択的にノックダウンする能力を有する。

【0990】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の標的配列は、標的転写産物の1つのアレルを表す。

【0991】

本開示に示されるように、提供される一本鎖RNAi剤は、アレルト異的RNA干渉を誘導する能力を有し、ここで、ssRNAiは、ある配列（たとえば、変異型配列）を有する標的mRNAをノックダウンすることができるが、関連する異なる配列（たとえば、変異型配列の野生型バージョン）を有する標的mRNAをノックダウンすることがないか、または有意にノックダウンすることがない。一部の実施形態では、変異型と野生型の配

10

20

30

40

50

列は、1つの塩基位置で異なる。一部の実施形態では、変異型と野生型の配列は、2つの塩基位置で異なる。一部の実施形態では、変異型と野生型の配列は、3つの塩基位置で異なる。

【0992】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、標的遺伝子のあるアレルに対してRNA干渉を誘導する能力を有するが、同じ濃度で、標的遺伝子の異なるアレルに対してはRNA干渉を介在しない。

【0993】

一部の実施形態では、アレル特異的抑制を誘導する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、その塩基配列中に1つ以上のSNPを特定の位置に含む。これらの特定の位置は、ミスマッチに敏感であることが公知であるか、またはそう推測されている位置であり得、たとえば、これらの位置の1つ以上におけるミスマッチは、RNAi活性のレベルを変更することができる。たとえば、Miller et al. 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7195-7200; Brummelkamp et al. 2002 Cancer Cell 2:243、及びNaito et al. 2004 Nucl. Acids Res. 32:W124-W129を参照のこと。多くの場合、mRNA標的に対するシード領域の完全な相補性が、高いRNAi活性には必要または有益であり、対照的に、5'ヌクレオチド部分または3'末端ジヌクレオチドにおける相補性は、多くの場合必要とされない。一部の実施形態では、アレル特異的一本鎖RNAi剤は、シード領域内にSNPを有する。

【0994】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、アレル特異的抑制を介在する能力を有する。

【0995】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、アレル特異的抑制を介在する能力を有する。

【0996】

一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤は、アレル特異的抑制を介在する能力を有する。

【0997】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、PNPLA3のアレル特異的抑制を介在する能力を有する。

【0998】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、PNPLA3のアレル特異的抑制を介在する能力を有する。

【0999】

一部の実施形態では、一本鎖RNAi剤は、PNPLA3のアレル特異的抑制を介在する能力を有する。

【1000】

一部の実施形態では、一部の実施形態では、アレル特異的一本鎖RNAi剤は、シード領域内にSNPを有し、これは、シードと3'末端ジヌクレオチドとの間に位置する。

【1001】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、任意の位置に1つ以上のSNPを含む塩基配列を有する。

【1002】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19から選択される任意の位置に1つ以上のSNPを含む塩基配列を有する。

【1003】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、シード領域内部の任意の位置に1つ以上のSNPを含む塩基配列を有する。

【1004】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、シード領域以外の任意の位置に1つ以上のSNPを含む塩基配列を有する。

【1005】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、ポストシード領域内の任意の位置に1つ以上のSNPを含む塩基配列を有する。

【1006】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、以下の位置：8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18のいずれかに1つ以上のSNPを含む塩基配列を有する。

10

【1007】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、以下の位置：14または17のいずれかに1つ以上のSNPを含む塩基配列を有する。

【1008】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、以下の位置：9または10のいずれかに1つ以上のSNPを含む塩基配列を有する。

【1009】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、2つ以上のSNPを含む塩基配列を有する。

【1010】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、2つのSNPを含む塩基配列を有する。

20

【1011】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、位置14及び17にそれぞれ1つずつの2つのSNPを含む塩基配列を有する。

【1012】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、ある遺伝子の野生型アレルと比較して、同じ遺伝子の変異型アレルに対するアレル特異的抑制を誘導する能力を有する。

【1013】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、PNPLA3の野生型アレルと比較して、PNPLA3の変異型アレルに対するアレル特異的抑制を誘導する能力を有する。

30

【1014】

表70Aは、異なるPNPLA3一本鎖RNA i 剤によって誘導された*in vitro* 効力及びアレル特異的抑制を示す。Huh7及びHep3B細胞において試験したオリゴヌクレオチドは、以下である：WV-3387。表70B及び表70Cは、PNPLA3を標的とする異なる一本鎖RNA i 剤の*in vitro* 効力及びIC50を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、以下である：WV-4054及びWV-4098。WV-4054は、位置14及び17におけるrs738408T及びrs738409GのSNPのペアに相補的な配列を有し、これらの2つのSNPを含有する細胞（Huh7）に対して、アレル特異的RNA干渉を介在することができる。このオリゴヌクレオチドは、これらのSNPを含まず、代わりにrs738408C及びrs738409Cを含む異なる細胞（Hep3B）では、試験濃度で有意なRNA i 干渉を介在しない。加えて、一本鎖RNA i 剤WV-4098もまた、相補的配列（Huh7細胞でrs738408T及びrs738409GのSNPを含む）をノックダウンすることができるが、非相補的配列（Hep3B細胞でrs738408C及びrs738409CのSNPを含む）は試験濃度でノックダウンしない。

40

【1015】

表71は、PNPLA3に対する一本鎖RNA i 剤によって誘導された*in vitro*

50

o 効力及びアレル特異的ノックダウンを示す。試験したオリゴヌクレオチドは、以下である：表 7 1 A の WV-2477、WV-3387、及び WV-4054、表 7 1 B の非アレル特異的対照 ASO WV-3387、ならびに表 7 1 C のアレル特異的 ssRNA i WV-4054。

【1016】

表 9 0 A ~ 9 0 F は、PNPLA3 を標的とする、異なるオリゴヌクレオチドのインビトロアレル特異的抑制を示す。試験したオリゴヌクレオチドの I 1 4 8 M の二重突然変異を、試験したオリゴヌクレオチド形式の絵図とともに、表 9 0 A に示す。I 1 4 8 M 二重突然変異を含むオリゴヌクレオチドを以下に対して試験した：Hep3B 細胞（野生型）及び Huh7 細胞（二重突然変異を含む）。オリゴヌクレオチドをリポフェクタミンにより送達し、細胞を 48 時間の時点で検証した。試験したオリゴヌクレオチドは、以下である：表 9 0 B の WV-7778 ~ WV-7793、ならびに WV-3858 ~ WV-3864、表 9 0 C の WV-7794 ~ WV-7816、表 9 0 D の WV-7817 ~ WV-7839、表 9 0 E の WV-7840 ~ WV-7862、ならびに表 9 0 F の WV-993、WV-3390、及び WV-4054（WV-4054 は、一本鎖 RNA i 剤である）。これらのデータでは、使用されたオリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング形式を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、ここで、コアは、2'-デオキシホスホロチオエート（立体化学は不規則）であり、ウィングは、完全に 2'-OMe、完全に 2'-MOE、または 5' 及び 3' 末端 LNA を除いて全て 2'-OMe、または 5' 及び 3' 末端 LNA を除いて全て 2'-MOE であった。ウィングはまた、ホスホジエステルならびに 5' 及び 3' 末端の立体不規則的ホスホロチオエートである。

【1017】

データは、多くのオリゴヌクレオチドがアレル特異的抑制（たとえば、アレル特異的ノックダウン）を誘導する能力を有していたことを示している。表 9 0 B ~ 9 0 E に示されるオリゴヌクレオチドは、Huh7 細胞の変異型アレルの有意なノックダウンを示し、Hep3B 細胞の野生型アレルのノックダウンは比較的少なかった。アレル特異的抑制を介在するには、ウィング内であっても、単一のミスマッチで十分であるが、少なくとも一部の例では、2 つのミスマッチが両方とも DNA コア内に存在する場合、アレル特異的抑制が増大した。

【1018】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、多くの例において、立体制御されたキラルヌクレオチド間結合の導入（立体不規則的キラルヌクレオチド間結合の代わり）が、PNPLA3 オリゴヌクレオチドのアレル特異的抑制、安定性、有効性、特異性、送達、及び／またはアルブミン結合を増加させることができることを注記する。

【1019】

一部の実施形態では、アレル特異的抑制を介在する能力を有する PNPLA3 オリゴヌクレオチドは、1 つ以上の立体的に純粋なキラルヌクレオチド間結合を含有する。

【1020】

一部の実施形態では、アレル特異的抑制を介在する能力を有する PNPLA3 オリゴヌクレオチドは、1 つ以上の立体的に純粋な Sp 立体配置のキラルヌクレオチド間結合を含有する。

【1021】

一部の実施形態では、アレル特異的抑制を介在する能力を有する PNPLA3 オリゴヌクレオチドは、1 つ以上の立体的に純粋な Sp 立体配置のキラルヌクレオチド間結合、及び 1 つ以上の立体的に純粋な Rp 立体配置のキラルヌクレオチド間結合を含有する。

【1022】

一部の実施形態では、アレル特異的抑制を介在する能力を有する PNPLA3 オリゴヌクレオチドは、1 つ以上の立体的に純粋なホスホロチオエートを含有する。

【1023】

一部の実施形態では、アレルト異的抑制を介在する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、1つ以上の立体的に純粋なSp立体配置のホスホロチオエートを含有する。

【1024】

一部の実施形態では、アレルト異的抑制を介在する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、1つ以上の立体的に純粋なRp立体配置のホスホロチオエートを含有する。

【1025】

一部の実施形態では、アレルト異的抑制を介在する能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、1つ以上の立体的に純粋なSp立体配置のホスホロチオエート、及び1つ以上の立体的に純粋なRp立体配置のホスホロチオエートを含有する。

【1026】

一部の実施形態では、標的遺伝子またはその遺伝子産物のアレルト異的抑制の能力を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の構造または形式を含有し得る。

【1027】

オリゴヌクレオチドの多量体

一部の実施形態では、多量体は、以下のうちの2つ以上を含有する：PNPLA3オリゴヌクレオチド、RNA干渉を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、RNase H介在性ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチド、及び／またはまたはRNA干渉とRNase H介在性ノックダウンの両方を誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の形式またはその構造的要素を有し得る。

【1028】

一部の実施形態では、提供される組成物は、1つ以上の提供されるオリゴヌクレオチド型の組み合わせを含有する。提供される組成物中の提供されるオリゴヌクレオチドの1個以上の型の各々の選択及び量は、当該組成物の使用目的に依存することが、化学及び医薬分野の当業者により、認識されるであろう。すなわち関連技術分野の当業者は、組成物中に含有される提供されるオリゴヌクレオチドの量及び型によって、組成物が全体としてある望ましい特性（例えば、生物学的に好ましい特性、治療上好ましい特性等）を有するように、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を設計するであろう。

【1029】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド型は、WO/2014/012081及びWO/2015/107425に記載されるものから選択される。これらの各々のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド型、オリゴヌクレオチド組成物、及びその方法は、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、WO/2014/012081及びWO/2015/107425に記載されるものから選択されるPNPLA3オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドを含有する。

【1030】

一部の実施形態では、本開示は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を含有する組成物に関し、ここで、オリゴヌクレオチドの配列は、本明細書に開示される任意のキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の配列を含有するか、またはそれからなる。

【1031】

一部の実施形態では、本開示は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を含有する組成物に関し、ここで、オリゴヌクレオチドの配列は、表1Aに列挙されるまたは本明細書に別途記載される任意の一本鎖RNAi剤組成物の配列を含有するか、またはそれからなる。

【1032】

一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチド、たとえば、一本鎖RNAi剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドの多量体を含有する組成物に関し、その少なくとも1つは、本明細書に記載されるような構造、配列または

10

20

30

40

50

他の特徴を有する。

【1033】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドの多量体を含有する組成物に関し、ここで、多量体は、少なくとも約16 kDのサイズである。

【1034】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドの多量体を含有する組成物に関し、炭水化物部分、脂質部分、標的化部分、または他の化合物をさらに含有する。

【1035】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドの多量体を含有する組成物に関し、炭水化物部分、脂質部分、標的化部分、または他の化合物をさらに含有し、その総重量は、少なくとも約16 kDのサイズである。

【1036】

一部の実施形態では、多量体は、少なくとも2つの一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態では、多量体は、少なくとも3つの一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態では、多量体は、少なくとも4つの一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態では、多量体は、少なくとも5つの一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態では、多量体は、少なくとも6つの一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態では、多量体は、少なくとも7つの一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態では、多量体は、少なくとも8つの一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態では、多量体は、少なくとも9つの一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態では、多量体は、少なくとも10の一本鎖RNA i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び／または他のオリゴヌクレオチドを含有し得る。

【1037】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、オリゴヌクレオチドの多量体化により、リンパ系を介した輸送に十分な総分子量を有する多量体を提供することができることを示唆している。Supersaxoらは、薬物の分子量とリンパ系に吸収される用量の割合との間には線形関係があり、16 kDより大きい分子量を持つ分子は、皮下注射部位を流れるリンパ系によって主に吸収されることを報告した。Supersaxo et al. 1990 Pharm. Res. 7:167-9。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、約8 kDの分子量を有する。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドを含有する多量体は、少なくとも約16 kDの分子量を有する。

【1038】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、報告によれば、薬物、たとえば、限定されないが、経口アベイラビリティが限られた薬物の送達、または放出プロファイルを調整または拡大する手段として、皮下注射が広く利用されていることを注記する。McLennan et al. 2005 Drug Disc. Today: Technologies 2:89-96。皮下注射は、皮膚の真皮下にある間質領域への送達をもたらす、薬物はそこから循環系またはリンパ系に入ると報告されており、輸送は、分子量、粒径、電荷、親水性、及び間質内成分との相互作用による影響を受けると報告されている。また、薬物濃度、注射量、イオン強度、粘度、及びpHな

10

20

30

40

50

どの薬物製剤の特徴も全て、皮下注射部位からの拡散に関与することが報告されている。McLennan et al. 2005; Paniagua et al. 2012 Lymphology 45:144-153; 及び Bagby et al. 2012 Pharmaceutics 4:276-295。

【1039】

一部の実施形態では、分子量、粒径、電荷、親水性、及び間質内成分との相互作用、薬物濃度、注射量、イオン強度、粘度、及び／またはpHのうちの1つ以上の特徴は、PNPLA3オリゴヌクレオチドを含有する組成物の有効性、生体利用効率または送達を改善または最大化するように調節される。

【1040】

上述されるように、16kDより大きい分子量を持つ分子は、リンパ系によって主に吸収されることが報告されている。Supersaxo et al. 1990 Pharm. Res. 7:167-9。一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチドの多量体を含有する組成物に関し、ここで、多量体は、少なくとも約16kDの総分子量を有する。一部の実施形態では、本開示は、2つ以上の異なるタイプまたはサイズのオリゴヌクレオチドの多量体を含有する組成物に関し、ここで、多量体の異なるタイプのうちの1つ以上は、少なくとも約16kDの総分子量を有する。

【1041】

一部の実施形態では、多量体の各オリゴヌクレオチドは、同じ標的または異なる標的を標的とすることができる。多量体の各オリゴヌクレオチドが同じ標的または異なる標的を標的とすることができる、一部の実施形態では、多量体の投与を使用して、過剰発現または複数の標的遺伝子に関与する疾患を治療することができる。多量体の各オリゴヌクレオチドが同じ標的または異なる標的を標的とすることができる、一部の実施形態では、多量体の投与を使用して、異なる標的遺伝子の過剰発現に関与する異なる疾患を治療することができる。

【1042】

一部の実施形態では、多量体の各オリゴヌクレオチドは、同じ標的の同じ配列を標的とすることができる。一部の実施形態では、多量体の各オリゴヌクレオチドは、同じ標的の異なる配列を標的とすることができる。

【1043】

多量体の非限定的な例は、表89Aに示される。

【1044】

一部の実施形態では、多量体は、互いに直接繋がれた（たとえば結合または直接結合、たとえば共有結合などを介して）、またはリンカーを介して繋がれた2つ以上のオリゴヌクレオチドを含有する。

【1045】

本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意のリンカーを使用して、多量体のオリゴヌクレオチドを結合することができる。多量体の構築及び様々なリンカーの使用についての様々なアプローチは、表89B及び89Cに例示される。

【1046】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、少なくとも一部の例では、Rp立体配置のホスホロチオエートがヌクレアーゼ切断を特に受けやすいことを注記する。多量体タイプ2のいくつかの実施形態では、多量体は、本質的に単一の長いオリゴヌクレオチドであり、ここで、オリゴヌクレオチドは、短いリンカーオリゴヌクレオチドによって繋がれた複数のより短いオリゴヌクレオチドを含有する。多量体タイプ2のいくつかの実施形態では、多量体は、本質的に単一の長いオリゴヌクレオチドであり、ここで、オリゴヌクレオチドは、短いリンカーオリゴヌクレオチドによって繋がれた複数のより短いオリゴヌクレオチドを含有し、短いリンカーオリゴヌクレオチドは、1つ以上のRp立体配置のヌクレオチド間結合を含有する。多量体タイプ2のいくつかの実施形態では、多量体は、本質的に単一の長いオリゴヌクレオチドであり、ここで、オ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドは、短いリンカーオリゴヌクレオチドによって繋がれた複数のより短いオリゴヌクレオチドを含有し、短いリンカーオリゴヌクレオチドは、1つ以上のR_p立体配置のホスホロチオエートを含有する。

【1047】

リンカーの非限定的な例としては、以下が挙げられる：切断可能なリンカーまたは生分解性リンカー；切断不可または非生分解性リンカー；R_p立体配置のキラル中心を含有する1つ以上のヌクレオチド間結合を含有するリンカー；R_p立体配置のキラルリンを含有する1つ以上のヌクレオチド間結合を含有するリンカー；1つ以上のR_p立体配置のホスホロチオエートを含有するリンカー；2つ以上のR_p立体配置のホスホロチオエートを含有するリンカー；3つ以上のR_p立体配置のホスホロチオエートを含有するリンカー；光切断性リンカー；1-(5-(N-マレイミドメチル)-2-ニトロフェニル)エタノールN-ヒドロキシスクシンイミドエステル；マレイミド部分を含有するリンカー；N-ヒドロキシスクシンイミドエステル部分を含有するリンカー；塩基でPNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化されるリンカー；ヌクレオチド間結合でPNPLA3オリゴヌクレオチドに複合体化されるリンカー；糖で複合体化されるリンカー；ホスホジエステル；ホスホトリエステル；メチルホスホネート；P3'→N5'ホスホロアミダート；N3'→P5'ホスホロアミダート；N3'→P5'チオホスホロアミダート；ホスホロチオエート結合；チオ尿素リンカー；米国特許第9,572,891号に記載されるようなC5またはC6リンカー；アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル、及びヘテロアリールを含有するリンカー；置換されたアルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル、及びヘテロアリールを含有するリンカー；米国特許第9,512,163号の式(A)の構造のリンカー；C1-C12ヒドロカルビル鎖を含有するリンカー；ポリ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；ヒドロカルビル鎖；置換ヒドロカルビル鎖；以下のうちの1つ以上を含有するリンカー：アルキル、置換または非置換のアルケニル、置換または非置換のアルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、またはアルキニルヘテロアリール；以下から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを含有するリンカー：A L A L、A P I S F F E L G、F L、G F N、R / K X X、G R W H T V G L R W E、Y L、G F、及びF F (Xは、任意のアミノ酸である)；式-(CH₂)_n-S-S-(CH₂)_m-を含有するリンカー(式中、n及びmは独立して、0~10の整数である)；低pHで不安定な結合を含有するリンカー；アミン、イミン、エステル、安息香酸イミン、アミノエステル、ジオルトエステル、ポリホスホエステル、ポリホスファゼン、アセタール、ビニルエーテル、ヒドラゾン、アジドメチル-メチルマレイン酸無水物、チオプロピオネート、マスク化エンドソーム溶解剤またはシトラコニル基を含有する、低pHで不安定な結合を含有するリンカー；分枝鎖リンカー；切断剤、例えば、pH、酸化還元電位または分解分子の存在の影響

10

20

30

40

50

を受けやすい切断可能リンカー；酸化還元切断可能なリンカー；リン酸塩系の切断可能なリンカー； $-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})(\text{OH})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})(\text{SH})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})(\text{OH})-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{S})(\text{OH})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{H})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})(\text{H})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})(\text{H})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{S})(\text{H})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})(\text{H})-\text{S}-$ 、または $-\text{O}-\text{P}(\text{S})(\text{H})-\text{S}-$ を含有するリン酸塩系の切断可能なリンカー；酸切断可能なリンカー；エステル系リンカー；ペプチド系の切断可能なリンカー；ならびにこれらのリンカーのいずれかを含有する部分。

10

【1048】

一部の実施形態では、リンカーは、標的オリゴヌクレオチドよりも、哺乳類抽出物中のエンドペプチダーゼによる切断を受けやすいポリペプチドを含有する。一部の実施形態では、エンドペプチダーゼは、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、テルモリシン、ペプシン、またはエンドペプチダーゼV8である。一部の実施形態では、エンドペプチダーゼは、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンL、カテプシンC、パパイン、カテプシンSまたはエンドソーム酸性インスリナーゼである。

【1049】

オリゴヌクレオチドの多量体化の様々なリンカー及び方法は、非限定的な例として、以下に記載されている：米国特許第9,370,582号、同第9,371,348号、同第9,512,163号、同第9,572,891号、及び同第6,031,091号、ならびに国際特許出願公開第WO1998000435号、同第WO2014043544号、及び同第WO2013040429号。

20

【1050】

本開示はまた、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意のリンカーを使用して、1つ以上のオリゴヌクレオチドを互いに結合すること、または1つ以上の部分（非限定的な例として、標的化部分、炭水化物部分、GalNAc部分、脂質部分など）を1つ以上のオリゴヌクレオチド（非限定的な例として、エクソンスキッピングを誘導または阻害する能力を有する一本鎖RNAi剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、二本鎖RNAi剤、PNPLA3オリゴヌクレオチドなど）に結合することができることを注記する。

30

【1051】

オリゴヌクレオチド及び組成物の調製方法の例

提供されるオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物を調製するための方法は、当分野に広く公知であり、たとえば、限定されないが、WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、PCT/US2016/043542、及びPCT/US2016/043598に記載されているものがあり、これらの各々の方法及び試薬は、参照により本明細書に組み込まれる。

【1052】

キラル制御されたオリゴヌクレオチド。

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、キラル制御されている。

40

【1053】

一部の実施形態では、本開示は、参照条件〔たとえば、組成物の非存在、参照組成物（たとえば、同じ塩基配列、同じ化学修飾などを有するオリゴヌクレオチドの立体不規則的組成物、別の立体異性体などのPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤）の存在、及びそれらの組み合わせ〕と比較したとき、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する、キラル制御されたオリゴヌク

50

レオチド組成物を提供する。

【1054】

一部の実施形態では、本開示は、参照条件[たとえば、組成物の非存在、参照組成物(たとえば、同じ塩基配列、同じ化学修飾などを有するオリゴヌクレオチドの立体不規則的組成物、別の立体異性体などのPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤)の存在、及びそれらの組み合わせ]と比較したとき、一本鎖RNA干渉またはRNAase Hを介して転写産物のノックダウンの改善を介在する、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【1055】

とりわけ、本開示は、1つ以上の特定のヌクレオチド型を含有する、キラル制御されたssRNAi剤及びキラル制御された組成物を提供する。一部の実施形態では、「オリゴヌクレオチド型」という文言は、特定の塩基配列、骨格結合パターン、骨格キラル中心パターン、及び骨格リン修飾のパターン(たとえば、「-XLR¹」基)を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドを定義する。共通に指定される「型」のオリゴヌクレオチドは、塩基配列、骨格結合パターン、骨格キラル中心パターン、及び骨格リン修飾のパターンに関して、互いに構造的に同一である。一部の実施形態では、あるPNPLA3オリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドは、同一である。

【1056】

一部の実施形態では、本開示で提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、対応する立体不規則的なオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の混合物の特性とは異なる特性を有する。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、立体不規則的なオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の混合物の脂溶性とは異なる脂溶性を有する。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、HPLCで異なる保持時間を有する。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、対応する立体不規則的なオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の混合物のピーク保持時間とは有意に異なるピーク保持時間を有し得る。当分野で一般的に実施されるようなHPLCを使用したオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の精製中に、特定のキラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、完全にではないにしても、大部分が失われる。当分野で一般的に実施されるようなHPLCを使用したオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の精製中に、特定のキラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、完全にではないにしても、大部分が失われる。その結果の1つは、立体不規則的なオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の混合物(特定のキラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤)の特定のジアステレオマーがアッセイで試験されないことである。別の結果は、バッチごとに、避けられない機器の誤差及び人為的ミスに起因して、推定上「純粋な」立体不規則的なオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤が、組成物中のジアステレオマーならびにその相対量及び絶対量がバッチごとに異なるという点で、一貫性のない組成を有するということである。本開示に提供される、キラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤及びキラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤組成物は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤が単一のジアステレオマー(ジアステレオ異性体)としてキラル制御される様式で合成され、さらにオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤が所定のレベルの1つ以上の個々のオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の型を含有するので、そのような問題を克服する。

【1057】

化学及び合成分野の当業者であれば、本開示の合成方法は、結合リンでの特定の立体化学及び／または結合リンでの特定の修飾、及び／または特定の塩基、及び／または特定の糖を有するように一本鎖RNAi剤の各ヌクレオチド単位を前もって設計及び／または選択することができるように、提供される一本鎖RNAi剤の各合成ステップ中において、ある程度の制御を提供することを認識するであろう。一部の実施形態では、提供される一

10

20

30

40

50

本鎖RNA i 剤は、ヌクレオチド間結合の結合リンで特定の組み合わせの立体中心を有するように前もって設計及び／または選択される。

【1058】

一部の実施形態では、本開示の方法を使用して作製される提供される一本鎖RNA i 剤は、特定の組み合わせの結合リン修飾を有するように設計及び／または決定される。一部の実施形態では、本開示の方法を使用して作製される提供される一本鎖RNA i 剤は、特定の組み合わせの塩基を有するように設計及び／または決定される。一部の実施形態では、本開示の方法を使用して作製される提供される一本鎖RNA i 剤は、特定の組み合わせの糖を有するように設計及び／または決定される。一部の実施形態では、本開示の方法を使用して作製される提供される一本鎖RNA i 剤は、上述の構造特性のうちの1つ以上の特定の組み合わせを有するように設計及び／または決定される。

10

【1059】

本開示の方法は、高度なキラル制御を呈する。たとえば、本開示の方法は、提供される一本鎖RNA i 剤内の一つ一つの結合リンの立体化学的配置の制御を容易にする。一部の実施形態では、本開示の方法は、式Iの構造を独立して有する1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合を含有する、一本鎖RNA i 剤を提供する。

【1060】

一部の実施形態では、本開示の方法は、ユニマーである、一本鎖RNA i 剤を提供する。一部の実施形態では、本開示の方法は、立体配置Rpのユニマーである、一本鎖RNA i 剤を提供する。一部の実施形態では、本開示の方法は、立体配置Spのユニマーである、一本鎖RNA i 剤を提供する。

20

【1061】

一部の実施形態では、本開示の方法は、キラル制御された一本鎖RNA i 剤組成物、すなわち、所定のレベルの個々の一本鎖RNA i 剤の型を含有する一本鎖RNA i 剤組成物を提供する。いくつかの実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、1つの一本鎖RNA i 剤の型を含有する。いくつかの実施形態では、一本鎖RNA i 剤は、2つ以上の一本鎖RNA i 剤の型を含有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤組成物は、複数のオリゴヌクレオチド及び／または一本鎖RNA i 剤の型を含有する。本開示に従って作製されたキラル制御されたオリゴヌクレオチド及び一本鎖RNA i 剤組成物の例は、本明細書に記載される。

30

【1062】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、キラルヌクレオチド間結合を含有する（たとえば、立体制御されている）。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、立体制御されたキラルヌクレオチド間結合と、立体制御されていないキラルヌクレオチド間結合を含有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、立体制御されたキラルヌクレオチド間結合と、キラルではないヌクレオチド間結合を含有する。立体制御された（キラル制御された）オリゴヌクレオチドの形式の様々な非限定的な例は、表71A～表71Cに示される。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S1の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S2の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S3の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S4の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S5の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S6の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S7の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S8の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S9の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S10の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S11の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、形式S12の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチド

40

50

は、形式 S 1 3 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 1 4 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 1 5 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 1 6 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 1 7 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 1 8 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 1 9 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 0 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 1 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 2 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 3 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 4 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 5 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 6 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 7 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 8 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 2 9 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 0 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 1 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 2 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 3 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 4 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 5 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 6 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 7 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 8 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 3 9 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 4 0 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 4 1 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 4 2 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 4 3 の構造を有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチド
は、形式 S 4 4 の構造を有する。

【1063】

一部の実施形態では、本開示の方法は、結合リンの立体配置に関して、キラル的に純粋な組成物を提供する。すなわち、一部の実施形態では、本開示の方法は、オリゴヌクレオチドが、結合リンの立体配置に関して単一のジアステレオマーの形態で組成物中に存在する、組成物を提供する。

【1064】

一部の実施形態では、本開示の方法は、結合リンの立体配置に関して、キラル的に均一な組成物を提供する。すなわち、一部の実施形態では、本開示の方法は、組成物中の全てのヌクレオチド単位が、結合リンの立体配置に関して同じ立体化学を有する組成物、たとえば、全てのヌクレオチド単位が結合リンで R p 立体配置であるか、または全てのヌクレオチド単位が結合リンで S p 立体配置である、組成物を提供する。

【1065】

一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチドまたは一本鎖 RNA i 剤は、少なくとも 1 つの S p を含有する（たとえば、S p 立体配置のキラル中心を有するホスホロチオエートまたは他のヌクレオチド間結合）。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチドまたは一本鎖 RNA i 剤は、少なくとも 5 つの S p を含有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチドまたは一本鎖 RNA i 剤は、少なくとも 10 の S p を含有する。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチドまたは一本鎖

10

20

30

40

50

RNA i 剤は、少なくとも 15～25 の Sp を含有する。

【1066】

本明細書に示されるように、1つ以上の Spヌクレオチド間結合または1つ以上の Sp PS（ホスホロチオエート）の組み込みは、一本鎖 RNA i 剤に対して以下の2つの機能を果たす：（a）ヌクレアーゼに対する安定性を高めること；及び（b）RNA干渉活性を妨害しないこと。一本鎖 RNA i 剤及び二本鎖 RNA i 剤は多くの面で異なるが、本開示は、報告によれば、多くの化学修飾が二本鎖 RNA i 剤に対して試みられているが、修飾は、（a）ヌクレアーゼに対して分子を安定化させること；及び（b）RNA干渉活性を可能にするものの両方をもたらさないことを注記する。多くの化学修飾は、一方の機能を果たすが、他方の機能は果たさない。二本鎖 RNA i 剤のいくつかの化学修飾は、報告によれば、ヌクレアーゼに対して当該分子を安定化させたが、RNA i 活性を妨害または消失させた。二本鎖 RNA i 剤の他の化学修飾は、報告によれば、RNA i 活性を妨害しなかったが、ヌクレアーゼに対する当該分子の安定化はなされなかった。たとえば、Cz auderna et al. 2003 Nucl. Acids Res. 31:2705–2716；Hadwiger et al. 2005, pages 194–206, in RNA interference Technology, ed. K. Appasa ni, Cambridge University Press, Cambridge, UK；Deleavey et al. 2009 Curr. Prot. Nucl. Acid Chem. 16. 3. 1–16. 3. 22；Terrazas et al. 2009 Nucl. Acids Res. 37:346–353；Schwarz et al. 2002 Mol. Cell 10:537–548；及び Lipardi et al. 2001 Cell 107:299–307を参照のこと。二本鎖 RNA i 剤の化学修飾のごく少数が両方の機能を果たす能力を有していた。さらに、Matranga et al. 2005 Cell 123:607–620は、二本鎖 RNA i 剤のセンス鎖への単一の Spヌクレオチド間結合（たとえば、単一の Sp PS）の導入により、RISCアセンブリ及びRNA干渉活性が大幅に減少することを示した。このように、単一の Spヌクレオチド間結合（たとえば、単一の Sp PS）による二本鎖 RNA i 剤の化学修飾は、（b）RNA干渉活性を可能にしなかった。したがって、本開示は、一本鎖 RNA i 剤への Spヌクレオチド間結合または Sp PSの組み込みの効果（複数可）を試験するように努めた。本明細書に示されるデータは、驚くべきことに、Spヌクレオチド間結合または Sp PSの組み込みが、一本鎖 RNA i 剤に対して以下の2つの機能を果たすことを示している：（a）ヌクレアーゼに対する安定性を高めること、及び（b）RNA干渉活性を妨害しないこと。

【1067】

表45に示されるデータに示されるように、ヌクレアーゼに対する一本鎖 RNA i 剤の安定性は、5'末端及び／または3'末端の立体不規則的ホスホロチオエートを Sp 立体配置のホスホロチオエートに変換することによって、増大した。安定性の更なる増大は、本明細書に特定されるヌクレアーゼ切断部位の立体不規則的ホスホロチオエートを Sp 立体配置のホスホロチオエートに変換することによって、得られた。

【1068】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、Sp 立体配置のホスホロチオエートまたは他のキラルヌクレオチド間結合の組み込みがヌクレアーゼから一本鎖 RNA i 剤を保護し得ることを示唆している。実験は、異なる遺伝子であるAPOC3を標的とする立体不規則的一本鎖 RNA i 剤WV-2817で特定されたヌクレアーゼ切断部位を明らかにした。これらの主な切断部位は、2つのピリミジン間にある（5'-U'U-3'、5'-U'U-3'または5'-T'U-3'、式中「'」は切断部位を示す）。追加の主なヌクレアーゼ切断部位は、立体不規則的一本鎖 RNA i 剤WV-3242で特定した：5'-U'U-3'、5'-C'U-3'、及び5'-T'U-3'。6つの主なヌクレアーゼ切断部位のうち、5つは2つの隣接するピリミジンの間にあり、1つはピリミジンに隣接していた。表45に示される実験データは、ヌクレアーゼ切断部位のうちの1つ

以上をS pヌクレオチド間結合（またはS p立体配置のキラルヌクレオチド間結合、たとえば、S p P SまたはS p立体配置のホスホロチオエート）で置き換えると、一本鎖RNA i剤の安定性が大幅に増大したことを示している。

【1069】

複数のS pヌクレオチド間結合（たとえば、S p P S）を含有する一本鎖RNA i剤を試験して、S pによりRNA i活性が消失するかどうかについても決定した。本開示は、以前の研究では、多くの立体不規則的オリゴヌクレオチドが、立体制御されたバージョンに変換されると、その酵素活性または生物学的活性を低下または完全に失い得ることを示していることを注記する。多くの先に記載されるオリゴヌクレオチドの場合、S pヌクレオチド間結合の導入は、活性を低下または消失させ得る。

10

【1070】

表44は、驚くべきことに、安定性の増大に加えて、複数のヌクレオチド間結合（立体不規則的またはホスホジエステル）をS pヌクレオチド間結合（たとえば、S p P S）で置き換えても、一本鎖RNA i剤のRNA干渉活性は低下または排除されなかったことを示している。これらの結果もまた、報告によれば、立体不規則的オリゴヌクレオチドへのS p P Sの導入は、多くの例において、生物学的活性を低下させることが知られていることから、驚くべきことである。したがって、1つ以上のS pヌクレオチド間結合またはS p P Sの導入は、一本鎖RNA i剤の安定性を増大させることと、RNA i活性を低下または消失させないことの両方をもたらした。

【1071】

20

表69A～Cはまた、驚くべきことに、安定性の増大に加えて、複数のヌクレオチド間結合（立体不規則的またはホスホジエステル）をS pヌクレオチド間結合（たとえば、S p P S）で置き換えると、安定性が増大し、同時に一本鎖RNA i剤のRNA干渉活性が低下または排除されなかったことを示している。一部の例では、活性が増大した。これらの結果もまた、報告によれば、立体不規則的オリゴヌクレオチドへのS p P Sの導入は、多くの例において、生物学的活性を低下させることが知られていることから、驚くべきことである。したがって、1つ以上のS pヌクレオチド間結合またはS p P Sの導入は、一本鎖RNA i剤の安定性を増大させることと、RNA i活性を低下または消失させないことの両方をもたらした。

【1072】

30

いくつかの実施形態または一本鎖RNA i剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA iは、1つ以上のS pヌクレオチド間結合を含有する。いくつかの実施形態または一本鎖RNA i剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA iは、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i剤の5'及び／または3'末端に1つ以上のS pヌクレオチド間結合を含有する。いくつかの実施形態または一本鎖RNA i剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA iは、ヌクレアーゼ切断を受けやすい部位に1つ以上のS pヌクレオチド間結合を含有する。

【1073】

いくつかの実施形態または一本鎖RNA i剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA iは、1つ以上のS p P Sを含有する。いくつかの実施形態または一本鎖RNA i剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA iは、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i剤の5'及び／または3'末端に1つ以上のS p P Sを含有する。いくつかの実施形態または一本鎖RNA i剤では、オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA iは、ヌクレアーゼ切断を受けやすい部位に1つ以上のS p P Sを含有する。

40

【1074】

とりわけ、本開示は、一本鎖RNA i剤の立体選択的（立体不規則的またはラセミではない）調製の課題を認識するものである。とりわけ、本開示は、複数の（たとえば、5個、6個、7個、8個、9個または10個超）のヌクレオチド間結合を含有する一本鎖RNA i剤、特に複数の（たとえば、5個、6個、7個、8個、9個または10個超）のキラルヌクレオチド間結合を含有する一本鎖RNA i剤の立体選択的調製のための方法及び試

50

薬を提供する。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤の立体不規則的調製物またはラセミ調製物において、少なくとも1つのキラルヌクレオチド間結合は、90:10、95:5、96:4、97:3、または98:2未満のジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤の立体選択的調製物またはキラル制御された調製物に関し、各キラルヌクレオチド間結合は、90:10、95:5、96:4、97:3、または98:2超のジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤の立体選択的調製物またはキラル制御された調製物に関し、各キラルヌクレオチド間結合は、95:5超のジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤の立体選択的調製物またはキラル制御された調製物に関し、各キラルヌクレオチド間結合は、96:4超のジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤の立体選択的調製物またはキラル制御された調製物に関し、各キラルヌクレオチド間結合は、97:3超のジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤の立体選択的調製物またはキラル制御された調製物に関し、各キラルヌクレオチド間結合は、98:2超のジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤の立体選択的調製物またはキラル制御された調製物に関し、各キラルヌクレオチド間結合は、99:1超のジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態では、一本鎖RNA i 剤中のキラルヌクレオチド間結合のジアステレオ選択性は、たとえば、本質的に同じ、または同等の条件下での二量体形成などのモデル反応を介して測定することができ、この場合において当該二量体は、キラルヌクレオチド間結合と同じヌクレオチド間結合を有し、当該二量体の5'-ヌクレオシドは、キラルヌクレオチド間結合の5'-末端の方向のヌクレオシドと同じであり、及び当該二量体の3'-ヌクレオシドは、キラルヌクレオチド間結合の3'-末端の方向のヌクレオシドと同じである。

【1075】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、複数のオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤の型を含有するように設計された組成物である。一部の実施形態では、本開示の方法は、キラル制御された一本鎖RNA i 剤のライブラリの生成を可能にするものであり、これにより、予め選択された量の任意の1つ以上のキラル制御された一本鎖RNA i 剤の型を、任意の1つ以上の他のキラル制御された一本鎖RNA i 剤の型と混合して、キラル制御された一本鎖RNA i 剤組成物を生成することができる。一部の実施形態では、予め選択された量の一本鎖RNA i 剤の型は、上記のジアステレオマー純度のいずれか1つを有する組成物である。

【1076】

一部の実施形態では、本開示は、キラル制御された一本鎖RNA i 剤を作製するための方法を提供し、当該方法は、以下のステップを含有する：

- (1) カップリング、
- (2) キャッピング、
- (3) 修飾化、
- (4) 脱ブロッキング、及び
- (5) 所望の長さが達成されるまでステップ(1)～(4)の繰り返し。

【1077】

提供される方法について記載される場合、「サイクル」という語は、当業者に理解される通常の意味を有する。一部の実施形態では、ステップ(1)～(4)の一巡がサイクルと称される。

【1078】

一部の実施形態では、本開示は、キラル制御された一本鎖RNA i 剤組成物を作製するための方法を提供し、当該方法は、以下のステップを含有する：

- (a) ある量の第1のキラル制御された一本鎖RNA i 剤を提供するステップ；及び
- (b) ある量の1つ以上の追加のキラル制御された一本鎖RNA i 剤を任意で提供するステップ。

【1079】

一部の実施形態では、第1のキラル制御された一本鎖RNA i 剤は、本明細書に記載されるような一本鎖RNA i 剤の型である。一部の実施形態では、1つ以上の追加のキラル制御された一本鎖RNA i 剤は、本明細書に記載されるような1つ以上の一本鎖RNA i 剤の型である。

【1080】

関連する化学及び合成技術分野の当業者は、本開示の方法を使用して合成した場合、提供される一本鎖RNA i 剤の構造的変形及び立体化学的配置に対する多様性の度合い及び制御を認識するであろう。たとえば、最初のサイクルが完了した後、後続サイクルについて個々に選択されたヌクレオチド単位を使用して後続サイクルを実施することができ、一部の実施形態では、後続サイクルは、最初のサイクルの核酸塩基及び／または糖とは異なる核酸塩基及び／または糖を含有する。同様に、後続サイクルのカップリングステップで使用されるキラル補助基は、最初のサイクルで使用されるキラル補助基と異なってもよく、これにより、第2のサイクルは、異なる立体化学的配置のリン結合を生成する。一部の実施形態では、新たに形成されたヌクレオチド間結合中の結合リンの立体化学は、立体化学的に純粋なホスホラミダイトを使用して制御される。さらに、後続サイクルの修飾化ステップで使用される修飾試薬は、最初のサイクルまたは前のサイクルで使用される修飾試薬と異なってもよい。この反復的な組み立てアプローチの累積的な効果により、提供される一本鎖RNA i 剤の各構成要素を構造的及び立体配置的に高度に調整することができる。このアプローチの更なる利点は、カップリングのステップが「n-1」不純物の形成を最小に抑えることであり、さもなければ、提供される一本鎖RNA i 剤、特に長さのより長い一本鎖RNA i 剤の単離が極めて困難になるであろう。

【1081】

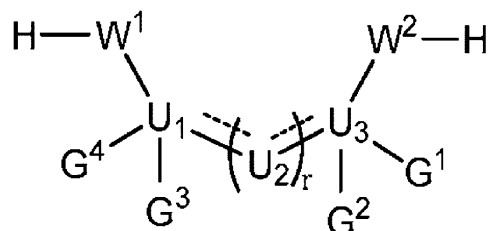
一部の実施形態では、キラル制御された一本鎖RNA i 剤を作製するための方法のサイクルの例は、本開示に記載されるスキーム例に例示される。一部の実施形態では、キラル制御された一本鎖RNA i 剤を作製するための方法のサイクルの例は、スキームIに例示される。一部の実施形態では、

【化192】



は、固形支持体を表し、場合により、固形支持体に結合している成長するキラル制御された一本鎖RNA i 剤の一部である。例示されるキラル補助基は、式3-Iの構造：

【化193】

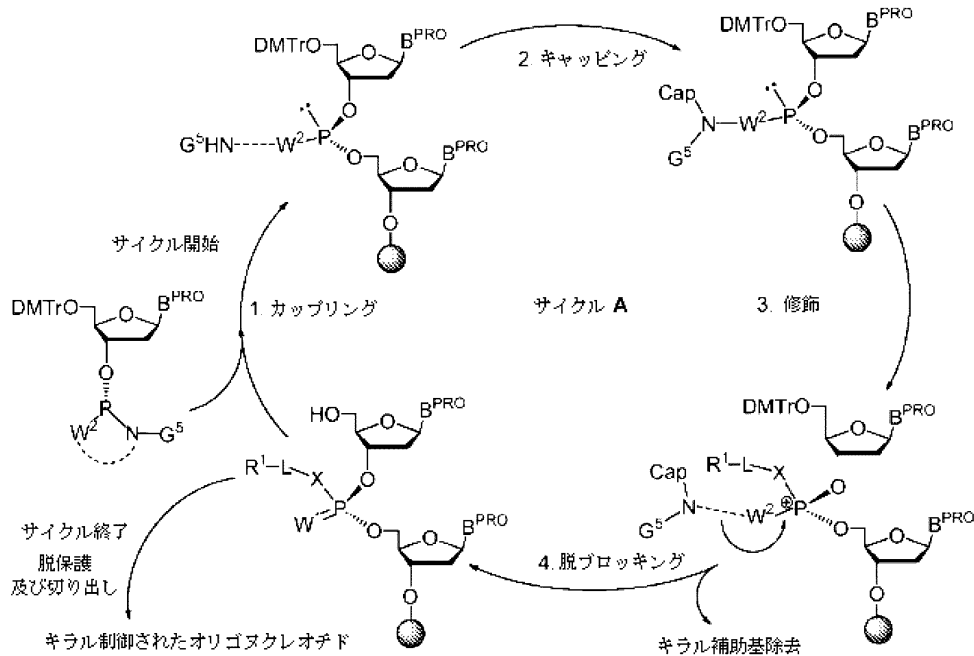


式3-I

を有し、詳細は、以下に記載される。「キャップ」は、キャッピングステップによって窒素原子に導入される任意の化学的部分であり、一部の実施形態では、アミノ保護基である。当業者は、最初のサイクルでは、開始時に固形支持体に結合しているヌクレオシドは1つのみであり得、サイクル終了は、任意で脱ブロッキングの前に実施することができることを理解する。当業者によって理解されるように、 B^{PRO} は、一本鎖RNA i 剤合成で使用される保護塩基である。スキームIの上記サイクルの各ステップは、以下にさらに記載される。

スキームI. キラル制御された一本鎖RNA i 剤の合成。

【化194】



【1082】

固形支持体上での合成

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤の合成は、固相上で実施される。一部の実施形態では、固形支持体上に存在する反応性基は、保護される。一部の実施形態では、固形支持体上に存在する反応性基は、保護されていない。一本鎖RNA i 剤の合成中、固形支持体は、数回の合成サイクルで様々な試薬により処理され、個々のヌクレオチド単位を用いて、成長する一本鎖RNA i 剤鎖の段階的な伸長が達成される。固形支持体に直接結合している鎖の末端のヌクレオチド単位は、本明細書で使用される場合、「第1のヌクレオチド」と呼ばれる。第1のヌクレオチドは、CPG、ポリマーまたは他の固形支持体のいずれかとヌクレオチドとの間に共有結合を有するリンカー部分、すなわち、ジラジカルを介して、固形支持体に結合している。リンカーは、オリゴヌクレオチド鎖を組み立てるために実施される合成サイクル中、そのままの状態で作保持され、鎖の組み立て後に切断されて支持体からオリゴヌクレオチドを遊離させる。

【1083】

固相核酸合成のための固形支持体としては、たとえば、米国特許第4,659,774号、同第5,141,813号、同第4,458,066号；Caruthersの米国特許第4,415,732号、同第4,458,066号、同第4,500,707号、同第4,668,777号、同第4,973,679号、及び同第5,132,418号

；Andrusらの米国特許第5,047,524号、同第5,262,530号；ならびにKosterの米国特許第4,725,677号（RE34,069として再発行）に記載されている支持体が挙げられる。一部の実施形態では、固相は、有機ポリマー支持体である。一部の実施形態では、固相は、無機ポリマー支持体である。一部の実施形態では、有機ポリマー支持体は、ポリスチレン、アミノメチルポリスチレン、ポリエチレングリコール-ポリスチレングラフト共重合体、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、ポリビニルアルコール、高度に架橋したポリマー（HCP）、または他の合成ポリマー、セルロース及びデンプンなどの炭水化物もしくは他の高分子炭水化物、または他の有機ポリマー及び任意の共重合体、上記の無機材料もしくは有機材料の複合材料もしくは組み合わせである。一部の実施形態では、無機ポリマー支持体は、シリカ、アルミナ、シリカゲル支持体またはアミノプロピルCPGである制御ポリガラス（CPG）である。他の有用な固形支持体としては、フルオラス固形支持体（たとえば、WO/2005/070859を参照のこと）、長鎖アルキルアミン（LCAA）制御多孔質ガラス（CPG）固形支持体（たとえば、S. P. Adams, K. S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Holder and G. R. Galluppi, J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 661-663; G. R. Gough, M. J. Bruden and P. T. Gilham, Tetrahedron Lett., 1981, 22, 4177-4180を参照のこと）が挙げられる。膜支持体及び高分子膜（たとえば、Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides, Proteins and Nucleic Acids, ch 21 pp 157-162, 1994, Ed. Roger Epton及び米国特許第4,923,901号を参照のこと）もまた、核酸の合成に有用である。膜は、一旦形成したら、核酸合成の使用のために、化学的に官能化することができる。膜への官能基の結合に加えて、いくつかの実施形態では、膜と合成鎖との間の立体障害を最小に抑えるために、膜に結合されるリンカーまたはスペーサー基の使用も用いられる。

【1084】

他の好適な固形支持体としては、当分野において一般に公知であり、固相方法での使用に好適なものが挙げられ、たとえば、Primer（商標）200支持体として販売されているガラスである制御多孔質ガラス（CPG）、オキサリル制御多孔質ガラス（たとえば、Alul, et al., Nucleic Acids Research, 1991, 19, 1527を参照のこと）、TentaGel支持体-アミノポリエチレングリコール誘導支持体（たとえば、Wright, et al., Tetrahedron Lett., 1993, 34, 3373を参照のこと）、及びPoros-ポリスチレン/ジビニルベンゼンの共重合体が挙げられる。

【1085】

表面活性化されたポリマーは、いくつかの固形支持体媒体上における天然核酸及び修飾核酸ならびにタンパク質の合成での使用が実証されている。固体支持体の材料は、どのようなポリマーであってもよく、多孔度が均一で、十分なアミン含有量、及び十分な柔軟性を有して、統合性を失うことなく、付随するどのような操作にも耐えうるものが好ましい。選択される好適な材料の例としては、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、及びニトロセルロースが挙げられる。研究者の設計に応じて、他の材料を固形支持体として使用することができる。いくつかの設計を考慮すると、たとえば、コーティング金属、特に金または白金が選択され得る（たとえば、米国特許出願公開第20010055761号を参照のこと）。一本鎖RNA i 剤合成の一実施形態では、たとえば、ヌクレオシドは、ヒドロキシルまたはアミノ残基で官能化された固形支持体に固定化される。あるいは、固形支持体は、トリメトキシトリチル基（TMT）などの酸に不安定なトリアルコキシトリチル基を提供するように誘導体化される。理論によって拘束されることを望むものではないが、トリアルコキシトリチル保護基の存在は、DNA合成装置で一般的に使用される条件下で、初期の脱トリチル化を可能にすることが予想される。アンモニア水溶液中の一本鎖RNA i 剤材料を早

10

20

30

40

50

く切り離すには、ジグリコートリンカーが任意で支持体上に導入される。

【1086】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNAi剤は、別の方法として、5'→3'方向に合成される。一部の実施形態では、核酸は、成長する核酸の5'末端を介して固形支持体に結合されることにより、反応にはその3'基を提示する（すなわち、5'-ヌクレオシドのホスホラミダイトの使用または酵素反応（たとえば、ヌクレオシドの5'-三リン酸を使用したライゲーション及び重合））。5'→3'合成を考慮する場合、本開示の反復ステップは、変わらない（すなわち、キャッピング及びキラルリン上の修飾）。

【1087】

結合部分

結合部分またはリンカーは、遊離求核部分を含有する化合物に固形支持体を繋げるために任意で使用される。好適なリンカーは、例えば、固相合成技術において固体支持体を初期ヌクレオシド分子の官能基（例えば、ヒドロキシル基）に結合させるように機能する短分子が知られている。一部の実施形態では、結合部分は、スクシンアミド酸リンカー、またはコハク酸リンカー（ $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ）、またはオキサリルリンカー（ $-\text{CO}-\text{CO}-$ ）である。一部の実施形態では、結合部分及びヌクレオシドは、エステル結合を介して一緒に結合される。一部の実施形態では、結合部分及びヌクレオシドは、アミド結合を介して一緒に結合される。一部の実施形態では、結合部分は、ヌクレオシドを別のヌクレオチドまたは核酸に繋げる。好適なリンカーは、たとえば、*Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach*, Ekstein, F. Ed., IRL Press, N. Y., 1991, Chapter 1及び*Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis*, Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28に記載されている。

【1088】

リンカー部分は、遊離求核部分を含有する化合物を別のヌクレオシド、ヌクレオチド、または核酸に繋げるために使用される。一部の実施形態では、結合部分は、ホスホジエステル結合である。一部の実施形態では、結合部分は、H-ホスホネート部分である。一部の実施形態では、結合部分は、本明細書に記載されるような修飾リン結合である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドを固形支持体に結合するために、ユニバーサルリンカー（UnyLinker）が使用される（Ravikumar et al., Org. Process Res. Dev., 2008, 12(3), 399-410）。一部の実施形態では、他のユニバーサルリンカーが使用される（Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28）。一部の実施形態では、様々な直交するリンカー（ジスルフィドリンカーなど）が使用される（Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28）。

【1089】

とりわけ、本開示は、一本鎖RNAi剤合成で採用される一連の反応条件に適合するようにリンカーを選択または設計することができることを認識する。一部の実施形態では、補助基は、一本鎖RNAi剤の分解を回避し、脱硫化を回避するために、脱保護の前に選択的に除去される。一部の実施形態では、DPSE基は、F⁻イオンによって選択的に除去され得る。一部の実施形態では、本開示は、DPSE脱保護条件下、たとえば、MeCN中0.1M TBAPF、THFまたはMeCN中0.5M HF-Et₃Nなどで安定なリンカーを提供する。一部の実施形態では、提供されるリンカーは、SPリンカーである。一部の実施形態では、本開示は、SPリンカーが、DPSE脱保護条件下、たとえば、MeCN中0.1M TBAPF、THFまたはMeCN中0.5M HF-Et₃Nなどで安定しており、さらに、たとえば、無水塩基性条件下、たとえば、MeCN中0.1M DBUで安定であることを示している。

10

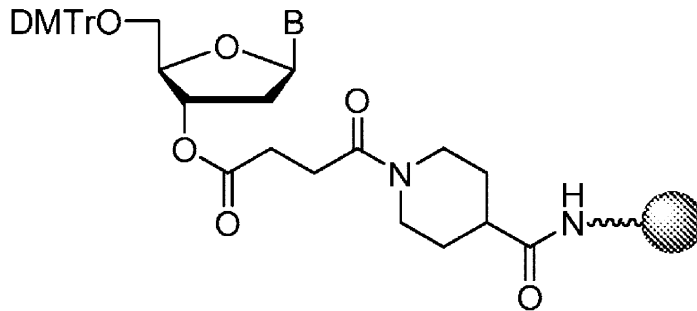
20

30

40

50

【化 1 9 5】



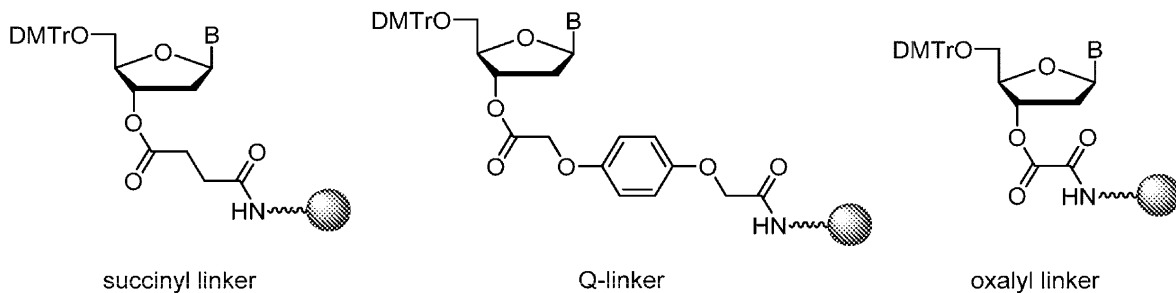
succinyl-piperidine (SP) linker

10

【1 0 9 0】

一部の実施形態では、リンカーの例は、以下のものである：

【化 1 9 6】



succinyl linker

Q-linker

oxalyl linker

20

。一部の実施形態では、スクシニルリンカー、Qリンカーまたはオキサリルリンカーは、F⁻を使用した1つ以上のDPSE脱保護条件に対して安定ではない。

【1 0 9 1】

一般的な条件—合成用溶媒

提供されるオリゴヌクレオチドの合成は、一般に、非プロトン性有機溶媒中で実施される。一部の実施形態では、溶媒は、たとえば、アセトニトリルなどのニトリル溶媒である。一部の実施形態では、溶媒は、たとえば、ピリジンなどの塩基性アミン溶媒である。一部の実施形態では、溶媒は、たとえば、テトラヒドロフランなどのエーテル溶媒である。一部の実施形態では、溶媒は、たとえば、ジクロロメタンなどのハロゲン化炭化水素である。一部の実施形態では、溶媒の混合物が使用される。ある特定の実施形態では、溶媒は、上記の種類の溶媒のいずれか1つ以上の混合物である。

【1 0 9 2】

一部の実施形態では、非プロトン性有機溶媒が塩基性でない場合、塩基は、反応ステップに存在する。塩基が存在するいくつかの実施形態では、塩基は、たとえば、ピリジン、キノリン、またはN,N-ジメチルアニリンなどのアミン塩基である。他のアミン塩基の例としては、ピロリジン、ピペリジン、N-メチルピロリジン、ピリジン、キノリン、N,N-ジメチルアミノピリジン(DMAP)、またはN,N-ジメチルアニリンが挙げられる。

【1 0 9 3】

一部の実施形態では、塩基は、アミン塩基以外である。

【1 0 9 4】

一部の実施形態では、非プロトン性有機溶媒は、無水である。一部の実施形態では、無水の非プロトン性有機溶媒は、新たに蒸留される。一部の実施形態では、新たに蒸留され

30

40

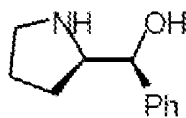
50

る無水の非プロトン性有機溶媒は、たとえば、ピリジンなどの塩基性アミン溶媒である。一部の実施形態では、新たに蒸留される無水の非プロトン性有機溶媒は、たとえば、テトラヒドロフランなどのエーテル溶媒である。一部の実施形態では、新たに蒸留される無水の非プロトン性有機溶媒は、たとえば、アセトニトリルなどのニトリル溶媒である。

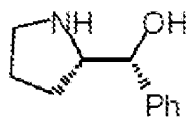
【1095】

キラル試薬／キラル補助基

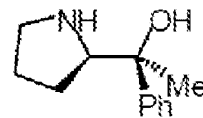
一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドの生成において立体選択性を与えるために、キラル試薬が使用される。当業者及び本明細書ではキラル補助基とも称される多くの異なるキラル試薬が本開示の方法に従って使用され得る。そのようなキラル試薬の例としては、本明細書ならびに上で引用されたWada I、II及びIIIに記載されている。本開示の一部の実施形態では、キラル試薬は、以下の式のうちの1つの化合物である：



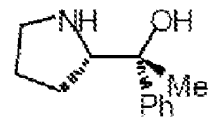
Formula O



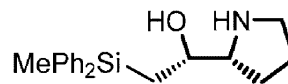
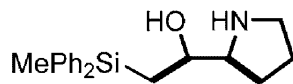
Formula P



Formula Q



Formula R



DPSE

。

【1096】

本明細書で実証されるように、キラルヌクレオチド間結合を調製するために使用される場合、立体選択性を得るために、概ね立体化学的に純粋なキラル試薬が利用される。

【1097】

追加のキラル補助基及びその使用は、たとえば、Wada I (JP 4348077; WO 2005/014609; WO 2005/092909)、Wada II (WO 2010/064146)、Wada III (WO 2012/039448)、キラル制御 (WO 2010/064146) などに見出すことができる。

【1098】

活性化

アキラルなH-ホスホネート部分は、第1の活性化試薬で処理されて、第1の中間体を形成する。一実施形態において、第1の活性化試薬は、縮合ステップ中に、反応混合物に添加される。第1の活性化試薬の使用は、反応に使用される溶媒などの反応条件による。第1の活性化試薬の例としては、ホスゲン、クロロギ酸トリクロロメチル、ビス(トリクロロメチル)カーボネート(BTC)、塩化オキサリル、 Ph_3PCl_2 、 $(\text{PhO})_3\text{PCl}_2$ 、N, N'-ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド(BopCl)、1, 3-ジメチル-2-(3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル)-2-ピロリジン-1-イル-1, 3, 2-ジアザホスホリジニウムヘキサフルオロホスフェート(MNTP)、または3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル-トリス(ピロリジン-1-イル)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyNTP)がある。

【1099】

アキラルなH-ホスホネート部分の例は、上のスキームに示される化合物である。DBUは、1, 8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エンを表す。 H^+DBU は

、たとえば、第1級、第2級、第3級または第4級である、アンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、複素環式芳香族イミニウムイオン、または複素環式イミニウムイオンであってもよいし、一価の金属イオンであってもよい。

【1100】

キラル試薬との反応

第1の活性化ステップの後、活性化されたアキラルなH-ホスホネート部分は、キラル試薬と反応する。

【1101】

立体特異的な縮合ステップ

キラル中間体は、第2の活性化試薬及びヌクレオシドで処理されて、縮合中間体を形成する。ヌクレオシドは、固形支持体上であってもよい。第2の活性化試薬の例は、4,5-ジシアノイミダゾール(DCI)、4,5-ジクロロイミダゾール、1-フェニルイミダゾリウムトリフレート(PhIMT)、ベンジミダゾリウムトリフレート(BIT)、ベンゾトリアゾール、3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(NT)、テトラゾール、5-エチルチオテトラゾール(ETT)、5-ベンジルチオテトラゾール(BTT)、5-(4-ニトロフェニル)テトラゾール、N-シアノメチルピロリジニウムトリフレート(CMPT)、N-シアノメチルピペリジニウムトリフレート、N-シアノメチルジメチルアンモニウムトリフレートである。式 $Z-Va$ ($(Z-Vb)$ 、 $(Z-Va')$ 、または $(Z-Vb')$)のキラル中間体は、単量体として単離され得る。通常、 $Z-Va$ ($(Z-Vb)$ 、 $(Z-Va')$ 、または $(Z-Vb')$)のキラル中間体は、単離せず、同じポット内で、ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドとの反応を受けて、縮合中間体であるキラル亜リン酸化合物をもたらす。他の実施形態において、方法が固相合成を介して実施される場合、化合物を含有する固形支持体は、濾過されて、副生成物、不純物、及び／または試薬を取り除く。

【1102】

キャッピングステップ

最終的な核酸が二量体よりも大きい場合、未反応の-OH部分をブロッキング基でキャッピングし、また化合物中のキラル補助基もブロッキング基でキャッピングして、キャッピングされた縮合中間体を形成する。最終的な核酸が二量体である場合、キャッピングステップは、必要ない。

【1103】

修飾化ステップ

化合物は、求電子試薬との反応によって修飾される。キャッピングされた縮合中間体は、修飾化ステップが実行され得る。一部の実施形態では、修飾化ステップは、硫黄求電子試薬、セレン求電子試薬またはホウ素化剤を使用して実施される。修飾化ステップの例は、酸化及び硫化のステップである。

【1104】

方法のいくつかの実施形態では、硫黄求電子試薬は、以下の式のうちの1つを有する化合物である：

S_8 (式 $Z-B$)、 $Z^{z1}-S-S-Z^{z2}$ 、または $Z^{z1}-S-V_Z-Z^{z2}$ ；
式中、 Z^{z1} 及び Z^{z2} は独立して、アルキル、アミノアルキル、シクロアルキル、複素環式、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アシル、アミド、イミド、またはチオカルボニルであるか、または Z^{z1} 及び Z^{z2} は、一緒になって、置換または非置換であり得る、3～8員の脂環式環または複素環式環を形成し； V_Z は、 SO_2 、O、または NR^f であり、 R^f は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアリールである。

【1105】

追加の硫黄求電子試薬は、当分野で公知である。

【1106】

一部の実施形態では、キラル補助基は、修飾化ステップの後、成長するオリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チド鎖から脱落する。一部の実施形態では、キラル補助基は、修飾化ステップの後、ヌクレオチド間リン原子に繋がれたままである。

【1107】

方法のいくつかの実施形態では、修飾化ステップは、酸化ステップである。方法のいくつかの実施形態では、修飾化ステップは、本出願に上記される同様の条件を使用する酸化ステップである。一部の実施形態では、酸化ステップは、たとえば、JP 2010-265304 A 及び WO 2010/064146 に開示されている。

【1108】

鎖伸長サイクル及び脱保護ステップ

キャッピングされた縮合中間体は、成長する核酸鎖の5'末端にあるブロッキング基を除去するために脱ブロッキングされて、化合物をもたらす。化合物は、任意で、鎖伸長サイクルを再開して、縮合中間体、キャッピングされた縮合中間体、修飾されキャッピングされた縮合中間体、及び5'-脱保護され修飾されキャッピングされた中間体を形成することができる。鎖伸長サイクルを少なくとも1巡した後、5'-脱保護され修飾されキャッピングされた中間体は、キラル補助基リガンド及び他の保護基、たとえば、核酸塩基、修飾核酸塩基、糖及び修飾糖の保護基の除去によってさらに脱ブロッキングされて、核酸をもたらす。他の実施形態において、5'-OH部分を含有するヌクレオシドは、本明細書に記載されるような前の鎖伸長サイクルからの中間体である。さらに他の実施形態において、5'-OH部分を含有するヌクレオシドは、別の公知の核酸合成方法から得られた中間体である。固形支持体が使用される実施形態では、次いで、リン原子修飾核酸が固形支持体から切断される。ある特定の実施形態では、核酸は、精製を目的として、固形支持体上に結合させたままとし、次いで、精製後に固形支持体から切断される。

【1109】

さらに他の実施形態において、5'-OH部分を含有するヌクレオシドは、別の公知の核酸合成方法から得られる中間体である。さらに他の実施形態において、5'-OH部分を含有するヌクレオシドは、本出願に記載されているような別の公知の核酸合成方法から得られる中間体である。さらに他の実施形態において、5'-OH部分を含有するヌクレオシドは、スキームIに例示される1つ以上のサイクルを含有する別の公知の核酸合成方法から得られる中間体である。一部の実施形態では、本開示は、出発材料として、安定した市販の材料を使用するオリゴヌクレオチド合成方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、アキラルな出発材料を使用して立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体を生成するオリゴヌクレオチド合成方法を提供する。

【1110】

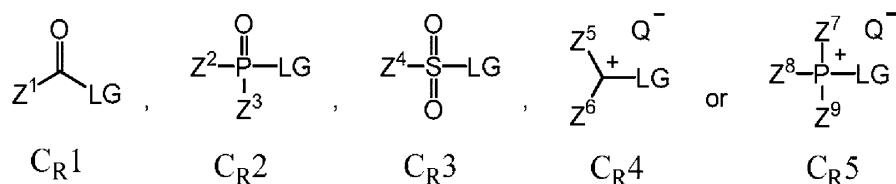
一部の実施形態では、本開示の方法は、脱保護ステップ下で分解を起こさない。さらに、方法は、リン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体を生成するのに特殊なキャッピング剤を必要としない。

【1111】

縮合試薬

本開示の方法に従って有用な縮合試薬(C_R)は、以下の一般式のうちのいずれか1つのものである：

【化198】



式中、Z¹、Z²、Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁶、Z⁷、Z⁸、及びZ⁹は独立して、アルキル、アミノアルキル、シクロアルキル、複素環式、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルオキシ、アリールオキシ、またはヘテロ

アリールオキシから選択される、任意で置換される基であるか、または Z^2 及び Z^3 、 Z^5 及び Z^6 、 Z^7 及び Z^8 、 Z^8 及び Z^9 、 Z^9 及び Z^7 、または Z^7 及び Z^8 及び Z^9 のいずれかは、一緒になって、3～20員の脂環式環または複素環式環を形成し； Q^- は、対アニオンであり； LG は、脱離基である。

【1112】

一部の実施形態では、縮合試薬 C_R の対イオンは、 Cl^- 、 Br^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 TfO^- 、 Tf_2N^- 、 AsF_6^- 、 ClO_4^- 、または SbF_6^- であり、式中、 Tf は、 CF_3SO_2 である。一部の実施形態では、縮合試薬 C_R の脱離基は、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール、イミダゾール、アルキルトリアゾール、テトラゾール、ペンタフルオロベンゼン、または1-ヒドロキシベンゾトリアゾールである。

10

【1113】

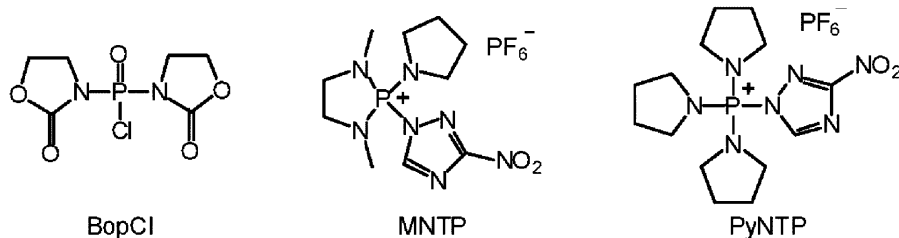
一部の実施形態では、縮合試薬は、WO/2006/066260に記載されるものから選択される。

【1114】

一部の実施形態では、縮合試薬は、1, 3-ジメチル-2-(3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル)-2-ピロリジン-1-イル-1, 3, 2-ジアザホスホリジニウムヘキサフルオロホスフェート (MNTP)、または3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル-トリス(ピロリジン-1-イル)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyNTP) である：

20

【化199】



30

。

【1115】

ヌクレオシドカップリングパートナーの塩基及び糖の選択

本明細書に記載される場合、本開示の方法に従って使用されるヌクレオシドカップリングパートナーは、互いに同じでもよいし、互いに異なってもよい。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの合成に使用されるヌクレオシドカップリングパートナーは、互いに同じ構造及び／または立体化学的配置のものである。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの合成に使用される各ヌクレオシドカップリングパートナーは、オリゴヌクレオチドの特定の他のヌクレオシドカップリングパートナーと同じ構造及び／または立体化学的配置のものではない。本開示の方法に従って使用される核酸塩基及び糖の例は、本明細書に記載される。関連する化学及び合成技術分野の当業者は、本明細書に記載される核酸塩基及び糖のいかなる組み合わせも本開示の方法による使用が企図されることを認識するであろう。

40

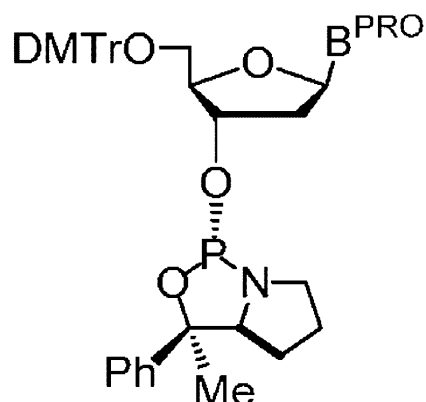
【1116】

カップリングステップ

本開示に従って使用されるカップリング手順ならびにキラル試薬及び縮合試薬の例は、とりわけ、Wada I (JP4348077; WO2005/014609; WO2005/092909)、Wada II (WO2010/064146)、Wada III (WO2012/039448)、及びキラル制御 (WO2010/064146) に概説されている。本開示に従って使用されるキラルヌクレオシドカップリングパートナー

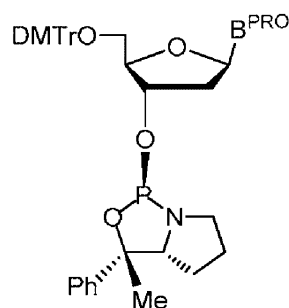
50

はまた、本明細書中、「Wada アミダイト」と称される。一部の実施形態では、カップリングパートナーは、
【化 200】



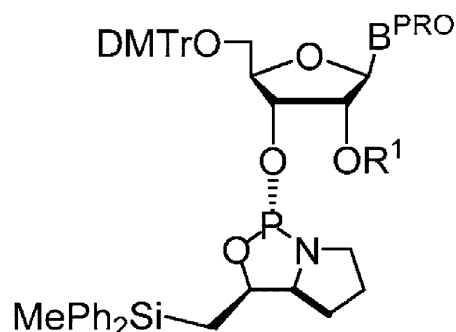
10

の構造を有し、式中、 B^{PRO} は、保護された核酸塩基である。一部の実施形態では、カップリングパートナーは、
【化 201】



20

の構造を有し、式中、 B^{PRO} は、保護された核酸塩基である。一部の実施形態では、カップリングパートナーは、
【化 202】

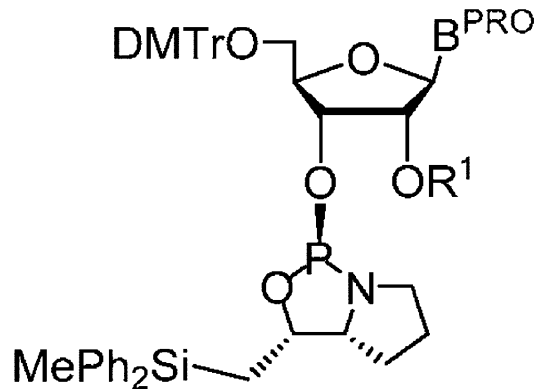


40

の構造を有し、式中、 B^{PRO} は、保護された核酸塩基であり、 R^1 は、本明細書に定義及び記載されるとおりである。一部の実施形態では、カップリングパートナーは、

50

【化 2 0 3】



の構造を有し、式中、 B^{PRO} は、保護された核酸塩基であり、 R^1 は、本明細書に定義及び記載されるとおりである。一部の実施形態では、 R^1 は、任意で置換される C_{1-6} アルキルである。一部の実施形態では、 R^1 は、Meである。

【1117】

追加の例は、WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、WO/2017/015555、及びWO/2017/062862に記載されており、これらの各々のホスホラミダイトは、参照により本明細書に組み込まれる。

【1118】

一部の実施形態では、カップリングのステップは、PNPLA3オリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位の遊離ヒドロキシル基をヌクレオシドカップリングパートナーと好適な条件下で反応させてカップリングを起こすことを含有する。一部の実施形態では、カップリングのステップの前に、脱ブロッキングのステップを行う。たとえば、一部の実施形態では、成長するオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基をブロッキング（すなわち、保護）し、その後それをヌクレオシドカップリングパートナーと反応させるために脱ブロッキングしなければならない。

【1119】

成長するオリゴヌクレオチドの適切なヒドロキシル基を脱ブロッキングしたら、キラル試薬を含有する溶液及び活性化剤を含有する溶液の送り込みに備えて、支持体を洗浄し、乾燥する。一部の実施形態では、キラル試薬及び活性化剤は、同時に送り込まれる。一部の実施形態では、同時の送り込みは、ニトリル溶媒（たとえば、アセトニトリル）などの極性非プロトン溶媒中の、ある量のキラル試薬溶液（たとえば、ホスホラミダイト溶液）及びある量の活性化剤溶液（たとえば、CMP T溶液）を送り込むことを含有する。

【1120】

一部の実施形態では、カップリングのステップは、キラル亜リン酸エステル生成物が95%を超えるジアステレオマー過剰率で存在する、粗生成物組成物を提供する。一部の実施形態では、キラル亜リン酸エステル生成物が96%を超えるジアステレオマー過剰率で存在する。一部の実施形態では、キラル亜リン酸エステル生成物が97%を超えるジアステレオマー過剰率で存在する。一部の実施形態では、キラル亜リン酸エステル生成物が98%を超えるジアステレオマー過剰率で存在する。一部の実施形態では、キラル亜リン酸エステル生成物が99%を超えるジアステレオマー過剰率で存在する。

キャッピングステップ：

キラル制御されたオリゴヌクレオチドを作製するために提供される方法は、キャッピングのステップを含む。一部の実施形態では、キャッピングのステップは、単一のステップである。一部の実施形態では、キャッピングのステップは、2ステップである。一部の実施

形態では、キャッピングのステップは、2ステップよりも多い。一部の実施形態では、キャッピングのステップは、キラル補助基の遊離アミンをキャッピングするステップと、あらゆる残留未反応5'ヒドロキシル基をキャッピングするステップを含有する。一部の実施形態では、キラル補助基の遊離アミン及び未反応5'ヒドロキシル基は、同じキャッピング基でキャッピングされる。一部の実施形態では、キラル補助基の遊離アミン及び未反応5'ヒドロキシル基は、異なるキャッピング基でキャッピングされる。ある特定の実施形態では、異なるキャッピング基でのキャッピングは、オリゴヌクレオチドの合成中、1つのキャッピング基を他のキャッピング基より先に選択的に除去することを可能にする。一部の実施形態では、両方の基のキャッピングは、同時に生じる。一部の実施形態では、両方の基のキャッピングは、繰り返し生じる。ある特定の実施形態では、キャッピングは繰り返し生じ、遊離アミンをキャッピングする第1のステップと、それに続く、遊離5'ヒドロキシル基をキャッピングする第2のステップとを含有し、遊離アミンと遊離5'ヒドロキシル基の両方は、同じキャッピング基でキャッピングされる。たとえば、一部の実施形態では、キラル補助基の遊離アミンは、無水物（たとえば、フェノキシ酢酸無水物、すなわち、 Pac_2O ）を使用してキャッピングされ、その後、5'ヒドロキシル基が同じ無水物を使用してキャッピングされる。ある特定の実施形態では、同じ無水物による5'ヒドロキシル基のキャッピングは、異なる条件下（たとえば、1つ以上の追加の試薬の存在下）で生じる。一部の実施形態では、5'ヒドロキシル基のキャッピングは、エーテル溶媒中のアミン塩基（たとえば、THF中NMI（N-メチルイミダゾール））の存在下で生じる。「キャッピング基」という文言は、本明細書において、「保護基」及び「ブロッキング基」という文言と相互交換可能に使用される。一部の実施形態では、アミンキャッピング基は、中間体亜リン酸エステル種の転位及び／または分解を防ぐようにアミンを効果的にキャッピングすることを特徴とする。一部の実施形態では、キャッピング基は、ヌクレオチド間結合リンの分子内切断を防ぐために、キラル補助基のアミンを保護する能力で選択される。一部の実施形態では、5'ヒドロキシル基のキャッピング基は、「ショートマー」の発生を防ぐようにヒドロキシル基を効果的にキャッピングすることを特徴とする。「ショートマー」とは、たとえば、「 $n-m$ 」（ m 及び n は整数であり、 $m < n$ ； n は、標的オリゴヌクレオチドにおける塩基の数である）の不純物であって、PNPLA3オリゴヌクレオチド鎖が最初のサイクルで反応せず後続の1つ以上のサイクルで反応する反応から生じるものである。かかるショートマー、特に「 $n-1$ 」の存在は、粗オリゴヌクレオチドの純度に有害な影響を及ぼし、オリゴヌクレオチドの最終的な精製を時間のかかるものにし、概して収率を低くする。一部の実施形態では、特定のキャップは、特定の条件下で特定のタイプの反応を促進する傾向に基づいて選択される。たとえば、一部の実施形態では、キャッピング基は、E1脱離反応を促進する能力によって選択され、この反応により、成長するオリゴヌクレオチドからキャップ及び／または補助基が切断される。一部の実施形態では、キャッピング基は、E2脱離反応を促進する能力によって選択され、この反応により、成長するオリゴヌクレオチドからキャップ及び／または補助基が切断される。一部の実施形態では、キャッピング基は、 β 脱離反応を促進する能力によって選択され、この反応により、成長するオリゴヌクレオチドからキャップ及び／または補助基が切断される。

【1121】

修飾化ステップ：

本明細書で使用される場合、「修飾化ステップ」、「修飾ステップ」及び「P-修飾ステップ」という文言は、相互交換可能に使用され、修飾ヌクレオチド間結合を導入するために使用されるいずれか1つ以上のステップを一般に指す。一部の実施形態では、式Iの構造を有する修飾ヌクレオチド間結合。本開示のP-修飾ステップは、提供されるオリゴヌクレオチドの組み立てが完了した後ではなく、提供されるオリゴヌクレオチドの組み立て中に生じる。したがって、提供されるオリゴヌクレオチドの各ヌクレオチド単位は、ヌクレオチド単位が導入されるサイクル中に、結合リンで個別に修飾され得る。一部の実施形態では、好適なP-修飾試薬は、硫黄求電子試薬、セレン求電子試薬、酸素求電子試薬、ホウ素化試薬、またはアジド試薬である。

【1122】

たとえば、一部の実施形態では、セレン試薬は、元素セレン、セレン塩、または置換ジセレニドである。一部の実施形態では、酸素求電子試薬は、元素酸素、ペルオキシド、または置換ペルオキシドである。一部の実施形態では、ホウ素化試薬は、ボラン-アミン（たとえば、N，N-ジイソプロピルエチルアミン（ $\text{BH}_3 \cdot \text{DIEA}$ ）、ボラン-ピリジン（ $\text{BH}_3 \cdot \text{Py}$ ）、ボラン-2-クロロピリジン（ $\text{BH}_3 \cdot \text{CPy}$ ）、ボラン-アニリン（ $\text{BH}_3 \cdot \text{An}$ ）、ボラン-エーテル試薬（たとえば、ボラン-テトラヒドロフラン（ $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ ）、ボラン-ジアルキルスルフィド試薬（たとえば、 $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ ）、アニリン-シアノボラン、またはトリフェニルホスフィン-カルボアルコキシボランである。一部の実施形態では、アジド試薬は、後続の還元反応を経てアミン基を提供する能力を有するアジド基を含有する。

10

【1123】

一部の実施形態では、P-修飾試薬は、本明細書に記載されるような硫化試薬である。一部の実施形態では、修飾化のステップは、リンを硫化してホスホロチオエート結合またはホスホロチオエートトリエステル結合を提供することを含有する。一部の実施形態では、修飾化のステップは、式Iのヌクレオチド間結合を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドを提供する。

【1124】

一部の実施形態では、本開示は、硫化試薬、及び同試薬を作製する方法、及び同試薬の使用方法を提供する。

20

【1125】

一部の実施形態では、かかる硫化試薬は、チオスルホン酸試薬である。

【1126】

様々な硫化試薬及びチオスルホン酸試薬が当分野で公知である。

【1127】

一部の実施形態では、本開示に従って使用される硫化試薬は、硫化中にリンに移動する部分が単一の硫黄原子（たとえば、 $-\text{S}-$ または $=\text{S}$ ）ではなく、置換硫黄（たとえば、 $-\text{SR}$ ）であることを特徴とする。

【1128】

一部の実施形態では、本開示に従って使用される硫化試薬は、試薬の活性を、所定の電子吸引基または電子供与基で試薬を修飾することによって調節できることを特徴とする。

30

【1129】

一部の実施形態では、本開示に従って使用される硫化試薬は、結晶性であることを特徴とする。一部の実施形態では、本開示に従って使用される硫化試薬は、高い結晶化度を有することを特徴とする。ある特定の実施形態では、本開示に従って使用される硫化試薬は、たとえば、再結晶を介して、試薬の精製が容易であることを特徴とする。ある特定の実施形態では、本開示に従って使用される硫化試薬は、硫黄含有不純物が実質的にないことを特徴とする。一部の実施形態では、硫黄含有不純物が実質的にない硫化試薬は、効率の向上を示す。

【1130】

一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1つ以上のリン酸ジエステル結合を含有する。そのようなキラル制御されたオリゴヌクレオチドを合成するために、1つ以上の修飾化ステップを酸化ステップに任意に置き換えて、対応するリン酸ジエステル結合を導入する。一部の実施形態では、酸化ステップは、通常オリゴヌクレオチド合成と同様に実施される。一部の実施形態では、酸化ステップは、 I_2 の使用を含有する。一部の実施形態では、酸化ステップは、 I_2 及びピリジンの使用を含有する。一部の実施形態では、酸化ステップは、 $0.02\text{M } \text{I}_2$ のTHF/ピリジン/水（70:20:10-v/v/v）共溶媒系の使用を含有する。サイクルの例をスキームI-cに示す。

40

【1131】

50

一部の実施形態では、ホスホロチオエートは、硫化試薬、たとえば、3-フェニル-1,2,4-ジチアゾリン-5-オンによる硫化により、直接形成される。一部の実施形態では、ホスホロチオエートの直接導入後、キラル補助基は、ヌクレオチド間リン原子に結合したままとなる。一部の実施形態では、キラル補助基を除去するために、追加の脱保護ステップが必要となる（たとえば、TBFA、HF-Et₃Nを使用したDPSE型キラル補助基など）。

【1132】

一部の実施形態では、ホスホロチオエート前駆体を使用して、ホスホロチオエート結合を含有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを合成する。

【1133】

一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1つ以上のリン酸ジエステル結合及び1つ以上のホスホロチオエートジエステル結合を含有する。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1つ以上のリン酸ジエステル結合及び1つ以上のホスホロチオエートジエステル結合を含有し、ここで、少なくとも1つのリン酸ジエステル結合は、3'から5'へ合成される場合、全てのホスホロチオエートジエステル結合の後で導入される。そのようなキラル制御されたオリゴヌクレオチドを合成するために、一部の実施形態では、1つ以上の修飾化ステップを酸化ステップに任意に置き換えて、対応するリン酸ジエステル結合を導入し、ホスホロチオエート前駆体をホスホロチオエートジエステル結合の各々に対して導入する。一部の実施形態では、ホスホロチオエート前駆体は、所望のオリゴヌクレオチド長が達成された後、ホスホロチオエートジエステル結合に変換される。一部の実施形態では、サイクル終了中または終了後の脱保護／放出ステップにより、ホスホロチオエート前駆体をホスホロチオエートジエステル結合に変換する。

【1134】

一部の実施形態では、ホスホロチオエート前駆体は、本明細書に記載されるようなリン保護基、たとえば、2-シアノエチル（CEまたはCne）、2-トリメチルシリルエチル、2-ニトロエチル、2-スルホニルエチル、メチル、ベンジル、o-ニトロベンジル、2-（p-ニトロフェニル）エチル（NPEまたはNpe）、2-フェニルエチル、3-（N-tert-ブチルカルボキサミド）-1-プロピル、4-オキソペンチル、4-メチルチオ-1-ブチル、2-シアノ-1,1-ジメチルエチル、4-N-メチルアミノブチル、3-（2-ピリジル）-1-プロピル、2-〔N-メチル-N-（2-ピリジル）〕アミノエチル、2-（N-ホルミル、N-メチル）アミノエチル、4-〔N-メチル-N-（2,2,2-トリフルオロアセチル）アミノ〕ブチルである。例をさらに以下に示す。

【1135】

上記したとおり、一部の実施形態では、硫化は、成長するオリゴヌクレオチドからキラル試薬を切断する条件下で生じる。一部の実施形態では、硫化は、成長するオリゴヌクレオチドからキラル試薬を切断しない条件下で生じる。

【1136】

一部の実施形態では、硫化試薬は、好適な溶媒中に溶解し、カラムに送り込む。ある特定の実施形態では、溶媒は、ニトリル溶媒などの極性非プロトン性溶媒である。一部の実施形態では、溶媒は、アセトニトリルである。一部の実施形態では、硫化試薬の溶液は、ニトリル溶媒（たとえば、アセトニトリル）中で、硫化試薬（たとえば、本明細書に記載されるようなチオスルホン酸誘導体）をBSTFA（N,O-ビス-トリメチルシリル-トリフルオロアセトアミド）と混合することによって調製される。一部の実施形態では、BSTFAは、含まない。たとえば、本発明者らは、一般式R^{s2}-S-S(O)₂-R^{s3}の硫化試薬が比較的より反応性であり、BSTFAの非存在下でも硫化反応に問題なく関与できることを見出した。ほんの一例を挙げると、本発明者らは、R^{s2}がp-ニトロフェニルであり、R^{s3}がメチルである場合、BSTFAは必要でないことを実証した。本開示を考慮し、当業者は、BSTFAを必要としない他の状況及び／または硫化試薬を

10

20

30

40

50

決定することが容易にできるであろう。

【1137】

一部の実施形態では、硫化ステップは、室温で実施される。一部の実施形態では、硫化ステップは、より低温、たとえば、約0℃、約5℃、約10℃、または約15℃などで実施される。一部の実施形態では、硫化ステップは、約20℃を超える高温で実施される。

【1138】

一部の実施形態では、硫化反応は、約1分～約120分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約1分～約90分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約1分～約60分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約1分～約30分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約1分～約25分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約1分～約20分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約1分～約15分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約1分～約10分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約5分～約60分間行われる。

10

【1139】

一部の実施形態では、硫化反応は、約5分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約10分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約15分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約20分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約25分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約30分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約35分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約40分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約45分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約50分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約55分間行われる。一部の実施形態では、硫化反応は、約60分間行われる。

20

【1140】

本開示の方法に従って作製される硫化修飾生成物のいくつかは、予想外に安定であることが期せずして見出された。一部の実施形態では、予想外に安定な生成物は、ホスホロチオエートトリエステルである。一部の実施形態では、予想外に安定な生成物は、式I-cの構造を有する1つ以上のヌクレオチド間結合を含有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドである。

【1141】

関連分野の当業者は、本明細書に記載される硫化方法及び本明細書に記載される硫化試薬が、Wada II (WO2010/064146) に記載されるものなどのホスホネートオリゴヌクレオチドの修飾に関しても有用であることを認識するであろう。

30

【1142】

一部の実施形態では、硫化反応は、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、または98%の段階的硫化効率を有する。一部の実施形態では、硫化反応は、少なくとも純度98%の粗ジヌクレオチド生成物組成物を提供する。一部の実施形態では、硫化反応は、少なくとも純度90%の粗テトラヌクレオチド生成物組成物を提供する。一部の実施形態では、硫化反応は、少なくとも純度70%の粗ドデカヌクレオチド生成物組成物を提供する。一部の実施形態では、硫化反応は、少なくとも純度50%の粗イコサヌクレオチド生成物組成物を提供する。

40

【1143】

結合リンを修飾するステップが完了したら、オリゴヌクレオチドは、サイクルの再開に備えて、別の脱ブロッキングステップを経る。一部の実施形態では、キラル補助基は、硫化後、そのまま保持されるので、後続の脱ブロッキングステップ中に脱ブロッキングされる。この脱ブロッキングステップは、サイクル再開前に必ず生じる。脱ブロッキング、カップリング、キャッピング、及び修飾化のプロセスは、成長するオリゴヌクレオチドが所望の長さには達するまで繰り返し、所望の長さには達した時点で、オリゴヌクレオチドを固形支持体から直ぐに切断するか、または精製のためにオリゴヌクレオチドを支持体に結合させたままにして後で切断するかのどちらかが可能である。一部の実施形態では、1つ以上の保護基は、ヌクレオチド塩基の1つ以上に存在し、オリゴヌクレオチドの支持体からの

50

切断及び塩基の脱保護は、単一のステップで生じる。一部の実施形態では、1つ以上の保護基は、ヌクレオチド塩基の1つ以上に存在し、オリゴヌクレオチドの支持体からの切断及び塩基の脱保護は、2つ以上のステップで生じる。一部の実施形態では、脱保護及び支持体からの切断は、たとえば、1つ以上のアミン塩基を使用して、塩基性条件下で生じる。ある特定の実施形態では、1つ以上のアミン塩基は、プロピルアミンを含有する。ある特定の実施形態では、1つ以上のアミン塩基は、ピリジンを含有する。

【1144】

一部の実施形態では、支持体からの切断及び／または脱保護は、約30℃～約90℃の高温で生じる。一部の実施形態では、支持体からの切断及び／または脱保護は、約40℃～約80℃の高温で生じる。一部の実施形態では、支持体からの切断及び／または脱保護は、約50℃～約70℃の高温で生じる。一部の実施形態では、支持体からの切断及び／または脱保護は、約60℃の高温で生じる。一部の実施形態では、支持体からの切断及び／または脱保護は、周囲温度で生じる。

【1145】

精製手順の例は、本明細書に記載され、及び／または関連分野で一般に公知である。

【1146】

注目すべきは、各サイクル中に、成長するオリゴヌクレオチドからキラル補助基を除去することは、少なくとも、(1)潜在的に敏感な官能基がリン上に導入される場合、オリゴヌクレオチド合成の最後に、補助基を別個のステップで除去する必要がないこと；ならびに(2)副反応を起こしやすく、及び／または後続の化学反応を妨害する傾向のある不安定なリン-補助基中間体が回避されるという理由から有利である。したがって、各サイクル中にキラル補助基を除去すると、合成全体がより効率的になる。

【1147】

サイクルとの関係で脱ブロッキングのステップを上記したが、追加の一般的方法是は、以下に記載される。

【1148】

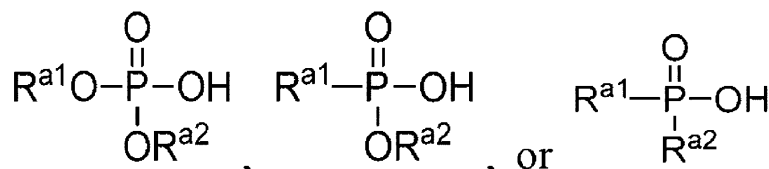
脱ブロッキングステップ

一部の実施形態では、カップリングのステップの前に、脱ブロッキングのステップを行う。たとえば、一部の実施形態では、成長するオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基をブロッキング（すなわち、保護）し、その後それをヌクレオシドカップリングパートナーと反応させるために脱ブロッキングしなければならない。

【1149】

一部の実施形態では、酸性化を使用してブロッキング基を除去する。一部の実施形態では、酸は、プレnstetted酸またはルイス酸である。有用なプレnstetted酸は、有機溶媒または水（80%酢酸の場合）中で-0.6（トリフルオロ酢酸）～4.76（酢酸）のpKa（水中25℃）値を有する、カルボン酸、アルキルスルホン酸、アリールスルホン酸、リン酸及びその誘導体、ホスホン酸及びその誘導体、アルキルホスホン酸及びその誘導体、アリールホスホン酸及びその誘導体、ホスフィン酸、ジアルキルホスフィン酸、ならびにジアリールホスフィン酸である。酸性化ステップに使用される酸の濃度（1～80%）は、酸の酸性度に依存する。強酸条件では脱プリン／脱ピリミジンが生じ、プリニル塩基またはピリミジニル塩基がリボース環及びまたは他の糖環から切断されるので、酸の強さを考慮に入れるなければならない。一部の実施形態では、酸は、 $R^{a1}COOH$ 、 $R^{a1}SO_3H$ 、 $R^{a3}SO_3H$ 、

【化204】



10

20

30

40

50

から選択され、式中、 R^{a1} 及び R^{a2} の各々は独立して、水素であるか、または任意で置換されるアルキルもしくはアリールであり、 R^{a3} は、任意で置換されるアルキルまたはアリールである。

【1150】

一部の実施形態では、酸性化は、有機溶媒中のルイス酸によって達成される。そのような有用なルイス酸の例は、 $Zn(X^a)_2$ であり、式中、 X^a は、Cl、Br、I、または CF_3SO_3 である。

【1151】

一部の実施形態では、酸性化のステップは、縮合中間体からプリン部分を除去することなくブロッキング基を除去するのに有効な量のプレンステッド酸またはルイス酸を添加することを含有する。

10

【1152】

酸性化ステップに有用な酸にはまた、有機溶媒中の10%リン酸、有機溶媒中の10%塩酸、有機溶媒中の1%トリフルオロ酢酸、有機溶媒中の3%ジクロロ酢酸もしくはトリクロロ酢酸、または水中の80%酢酸が挙げられるが、これらに限定されない。このステップに使用されるあらゆるプレンステッド酸またはルイス酸の濃度は、その酸の濃度が、核酸塩基の糖部分からの切断を起こす濃度を超えないように選択される。

【1153】

一部の実施形態では、酸性化は、有機溶媒中の1%トリフルオロ酢酸を添加することを含有する。一部の実施形態では、酸性化は、有機溶媒中の約0.1%～約8%トリフルオロ酢酸を添加することを含有する。一部の実施形態では、酸性化は、有機溶媒中の3%ジクロロ酢酸またはトリクロロ酢酸を添加することを含有する。一部の実施形態では、酸性化は、有機溶媒中の約0.1%～約10%ジクロロ酢酸またはトリクロロ酢酸を添加することを含有する。一部の実施形態では、酸性化は、有機溶媒中の3%のトリクロロ酢酸を添加することを含有する。一部の実施形態では、酸性化は、有機溶媒中の約0.1%～約10%トリクロロ酢酸を添加することを含有する。一部の実施形態では、酸性化は、水中の80%酢酸を添加することを含有する。一部の実施形態では、酸性化は、水中の約50%～約90%、または約50%～約80%、約50%～約70%、約50%～約60%、約70%～約90%酢酸を添加することを含有する。一部の実施形態では、酸性化は、酸性溶媒へのカチオンスカベンジャーの更なる添加を含有する。ある特定の実施形態では、カチオンスカベンジャーは、トリエチルシランまたはトリイソプロピルシランであり得る。一部の実施形態では、ブロッキング基は、有機溶媒中の1%トリフルオロ酢酸を添加することを含有する酸性化によって脱ブロッキングされる。一部の実施形態では、ブロッキング基は、有機溶媒中の3%ジクロロ酢酸を添加することを含有する酸性化によって脱ブロッキングされる。一部の実施形態では、ブロッキング基は、有機溶媒中の3%トリクロロ酢酸を添加することを含有する酸性化によって脱ブロッキングされる。一部の実施形態では、ブロッキング基は、ジクロロメタン中の3%トリクロロ酢酸を添加することを含有する酸性化によって脱ブロッキングされる。

20

30

【1154】

ある特定の実施形態では、本開示の方法は、合成装置で完了し、成長するオリゴヌクレオチドのヒドロキシル基を脱ブロッキングするステップは、ある量の溶媒を合成装置カラムに送り込むことを含有し、カラムは、オリゴヌクレオチドが結合している固形支持体を含有する。一部の実施形態では、溶媒は、ハロゲン化溶媒（たとえば、ジクロロメタン）である。ある特定の実施形態では、溶媒は、ある量の酸を含有する。一部の実施形態では、溶媒は、ある量の有機酸、たとえば、トリクロロ酢酸などを含有する。ある特定の実施形態では、酸は、約1%～約20%w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は、約1%～約10%w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は、約1%～約5%w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は、約1%～約3%w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は、約3%w/vの量で存在する。ヒドロキシル基を脱ブロッキングするための方法は、本明細書にさらに記載される。一部の実施形

40

50

態では、酸は、3 % w / v で存在し、ジクロロメタンである。

【1155】

一部の実施形態では、キラル補助基は、脱ブロッキングステップの前に除去される。一部の実施形態では、キラル補助基は、脱ブロッキングステップ中に除去される。

【1156】

一部の実施形態では、サイクル終了は、脱ブロッキングステップの前に実施される。一部の実施形態では、サイクル終了は、脱ブロッキングステップの後に実施される。

【1157】

ブロッキング基／保護基の除去の一般条件

核酸塩基または糖部分上に位置するヒドロキシルまたはアミノ部分などの官能基は、合成中、ブロッキング（保護）基（部分）で通常ブロッキングされ、後に脱ブロッキングされる。一般に、ブロッキング基は、分子の化学官能基を特定の反応条件に対して不活性にし、後に、分子の残り部分を実質的に損傷することなく、分子のかかる官能基から除去することができる。（たとえば、Green and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1991を参照のこと）。たとえば、アミノ基は、窒素ブロッキング基によりブロッキングすることができる。化学官能基はまた、それを前駆体形態で含むことによって、ブロッキングすることができる。したがって、アジド基はアミンに容易に変換されることから、アジド基をアミンのブロッキング形態とみなすことができる。核酸合成に利用される更なる代表的な保護基は、公知である（たとえば、Agrawal et al., *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, Eds., Humana Press, New Jersey, 1994, Vol. 26, pp. 1-72を参照のこと）。

【1158】

核酸からブロッキング基を除去する様々な方法が公知であり、使用される。一部の実施形態では、全てのブロッキング基が除去される。一部の実施形態では、ブロッキング基の一部が除去される。一部の実施形態では、反応条件は、特定のブロッキング基を選択的に除去するために調整することができる。

【1159】

一部の実施形態では、核酸塩基のブロッキング基は、存在する場合、提供されるオリゴヌクレオチドの組み立て後、酸性試薬で切断可能である。一部の実施形態では、核酸塩基のブロッキング基は、存在する場合、酸性条件下でも塩基性条件下でも切断されず、たとえば、フッ化物塩またはフッ化水素酸複合体で切断可能である。一部の実施形態では、核酸塩基のブロッキング基は、存在する場合、提供されるオリゴヌクレオチドの組み立て後、塩基または塩基性溶媒の存在下で切断可能である。ある特定の実施形態では、核酸塩基のブロッキング基の1つ以上は、提供されるオリゴヌクレオチドの組み立て後、塩基または塩基性溶媒の存在下で切断可能であるが、提供されるオリゴヌクレオチドの組み立て中に生じるそれより前の1つ以上の脱保護ステップの特定の条件に対して安定であることを特徴とする。

【1160】

一部の実施形態では、核酸塩基にブロッキング基は必要でない。一部の実施形態では、核酸塩基にブロッキング基が必要である。一部の実施形態では、特定の核酸塩基は、1つ以上のブロッキング基を必要とするが、他の核酸塩基は、1つ以上のブロッキング基を必要としない。

【1161】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、合成後、固形支持体から切断される。一部の実施形態では、固形支持体からの切断は、プロピルアミンの使用を含有する。一部の実施形態では、固形支持体からの切断は、ピリジン中のプロピルアミンの使用を含有する。一部の実施形態では、固形支持体からの切断は、ピリジン中の20%プロピルアミンの使用を含有する。一部の実施形態では、固形支持体からの切断は、無水ピリジン中のプロ

ピルアミンの使用を含有する。一部の実施形態では、固形支持体からの切断は、無水ピリジン中の20%プロピルアミンの使用を含有する。一部の実施形態では、固形支持体からの切断は、アセトニトリル、NMP、DMSO、スルホン、及び／またはルチジンなどの極性非プロトン性溶媒の使用を含有する。一部の実施形態では、固形支持体からの切断は、溶媒、たとえば、極性非プロトン性溶媒、及び1つ以上の一級アミン（たとえば、C₁–C₁₀アミン）、及び／またはメトキシルアミン、ヒドラジン、及び純無水アンモニアのうちの1つ以上の使用を含有する。

【1162】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護は、プロピルアミンの使用を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護は、ピリジン中のプロピルアミンの使用を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護は、ピリジン中の20%プロピルアミンの使用を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護は、無水ピリジン中のプロピルアミンの使用を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護は、無水ピリジン中の20%プロピルアミンの使用を含む。

【1163】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、切断中に脱保護される。

【1164】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、ほぼ室温で実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、高温で実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃または100℃より高い温度で実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃または100℃で実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約40～80℃で実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約50～70℃で実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約60℃で実施される。

【1165】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、0.1時間、1時間、2時間、5時間、10時間、15時間、20時間、24時間、30時間、または40時間を超えて実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約0.1～5時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約3～10時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約5～15時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約10～20時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約15～25時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約20～40時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約2時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約5時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約10時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約15時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリ

ゴヌクレオチドの脱保護は、約 18 時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約 24 時間実施される。

【1166】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、室温で、0.1 時間、1 時間、2 時間、5 時間、10 時間、15 時間、20 時間、24 時間、30 時間、または 40 時間を超えて実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、室温で、約 5 ~ 48 時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、室温で、約 10 ~ 24 時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、室温で、約 18 時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、高温で、0.1 時間、1 時間、2 時間、5 時間、10 時間、15 時間、20 時間、24 時間、30 時間、または 40 時間を超えて実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、高温で、約 0.5 ~ 5 時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約 60 °C で、約 0.5 ~ 5 時間実施される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、約 60 °C で、約 2 時間実施される。

【1167】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断、またはオリゴヌクレオチドの脱保護は、プロピルアミンの使用を含み、室温または高温で、0.1 時間、1 時間、2 時間、5 時間、10 時間、15 時間、20 時間、24 時間、30 時間、または 40 時間を超えて実施される。条件の例は、ピリジン中の 20 % プロピルアミンで、室温、約 18 時間、及びピリジン中の 20 % プロピルアミンで、60 °C、約 18 時間である。

【1168】

一部の実施形態では、固形支持体からの切断の前に、キラル補助基がヌクレオチド間リン原子にまだ結合している場合は、キラル補助基を除去するステップが実施される。一部の実施形態では、例えば、1 つ以上の DPSE 型キラル補助基が、オリゴヌクレオチド合成サイクル中に、ヌクレオチド間リン原子に結合したままである。残りのキラル補助基を除去するのに好適な条件は、当分野に広く公知であり、例えば、Wada I、Wada II、Wada III、キラル制御などに記載されているものである。一部の実施形態では、残りの DPSE 型キラル補助基のための条件は、TB AF または HF-Et₃N、例えば、MeCN 中 0.1 M TB AF、THF または MeCN 中 0.5 M HF-Et₃N などである。一部の実施形態では、本開示は、キラル補助基を除去するプロセス中に、リンカーが切断され得ることを認識する。一部の実施形態では、本開示は、キラル補助基の除去中に良好な安定性を提供する、SP リンカーなどのリンカーを提供する。とりわけ、本開示によって提供されるある特定のリンカーは、収率及び／または純度の改善をもたらした。

【1169】

一部の実施形態では、サイクルの例は、スキーム I に示される。
スキーム I. DPSE キラル補助基を使用するサイクルの例。

10

20

30

40

50

DMTrO

B^{PRO}

R

MePh₂Si

HO

B^{PRO}

X

NC

CMIMT

TfO

反転

(1) カップリング

DMTrO

B^{PRO}

X

TfO

MePh₂Si

NH₂

サイクル F

(2,3) キャッピング及び硫化

DMTrO

B^{PRO}

X

MePh₂Si

NH₂

(4) 脱トリチル化

DMTrO

B^{PRO}

X

MePh₂Si

NH₂

(5) 脱保護及び切り出し

S

P

O

O

B

X

B

X

MePh₂Si

NH₂

F

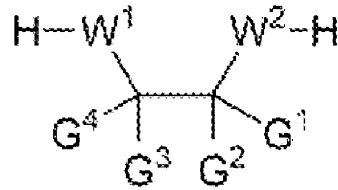
立体定義されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、Xは、Hまたは2'-修飾である。一部の実施形態では、Xは、Hまたは $-OR^1$ であり、式中、 R^1 は、水素ではない。一部の実施形態では、Xは、Hまたは $-OR^1$ であり、式中、 R^1 は、任意で置換される C_{1-6} アルキルである。一部の実施形態では、Xは、Hである。一部の実施形態では、Xは、 $-OMe$ である。一部の実施形態では、Xは、 $-OCH_2CH_2OCH_3$ である。一部の実施形態では、Xは、 $-F$ である。

異なるタイプのサイクルを組み合わせ、オリゴヌクレオチドの化学修飾及び立体化学の完全な制御を提供することができることは、当業者により理解される。一部の実施形態では、例えば、PNPLA3オリゴヌクレオチド合成プロセスは、1つ以上のサイクルを含み得る。一部の実施形態では、提供される方法は、DPSE型キラル補助基を使用する、少なくとも1つのサイクルを含む。

一部の実施形態では、本開示は、提供されるオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物を調製するための方法を提供する。一部の実施形態では、提供される方法は、

【化 2 0 6】

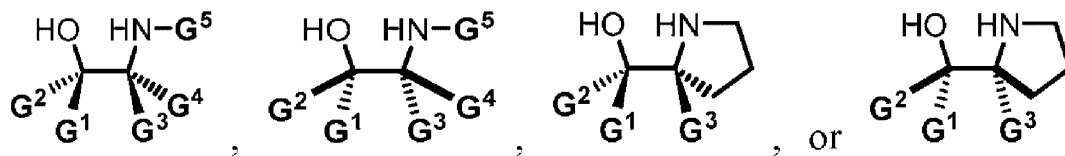


10

の構造を有する、提供されるキラル試薬を提供するステップを含み、式中、 W^1 は、 $-N$ G^5 であり、 W^2 は、 O であり、 G^1 及び G^3 の各々は独立して、水素であるか、または C_{1-10} 脂肪族、ヘテロシクリル、ヘテロアリール及びアリールから選択される、任意で置換される基であり、 G^2 は、 $-C(R)_2Si(R)_3$ であり、 G^4 及び G^5 は、一緒になって、単環式または多環式、縮合環または非縮合環である、任意で置換される、最大約 20 個の環原子の飽和、部分不飽和または不飽和のヘテロ原子含有環を形成し、各 R は独立して、水素であるか、または C_1-C_6 の脂肪族、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、及びヘテロシクリルから選択される、任意で置換される基である。一部の実施形態では、提供されるキラル試薬は、

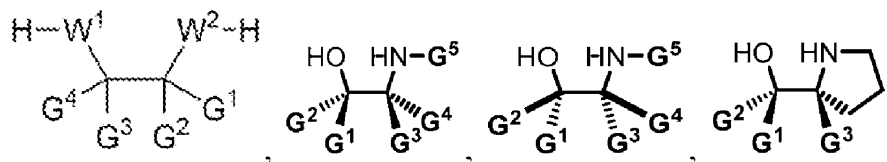
20

【化 2 0 7】



の構造を有する。一部の実施形態では、提供される方法は、

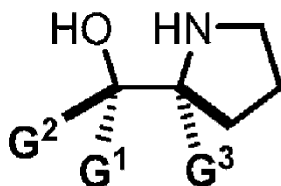
【化 2 0 8】



30

または

【化 2 0 9】

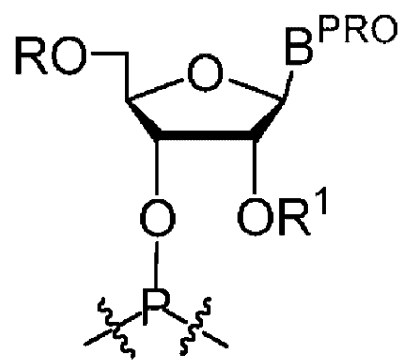


40

の構造を有するキラル試薬（式中、 $-W^1H$ 及び $-W^2H$ 、またはヒドロキシル及びアミノ基は、ホスホラミダイトのリン原子と結合を形成する）の部分を含むホスホラミダイトを提供することを含む。一部の実施形態では、 $-W^1H$ 及び $-W^2H$ 、またはヒドロキシル及びアミノ基は、ホスホラミダイト、例えば、

50

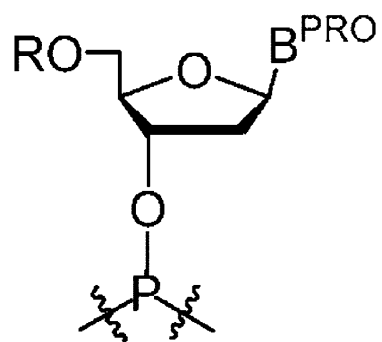
【化 2 1 0】



10

または

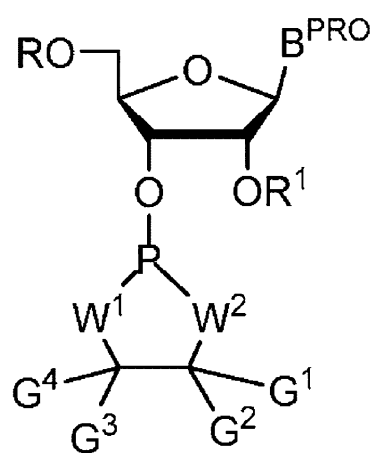
【化 2 1 1】



20

のリン原子と結合を形成する。一部の実施形態では、ホスホラミダイトは
【化 2 1 2】

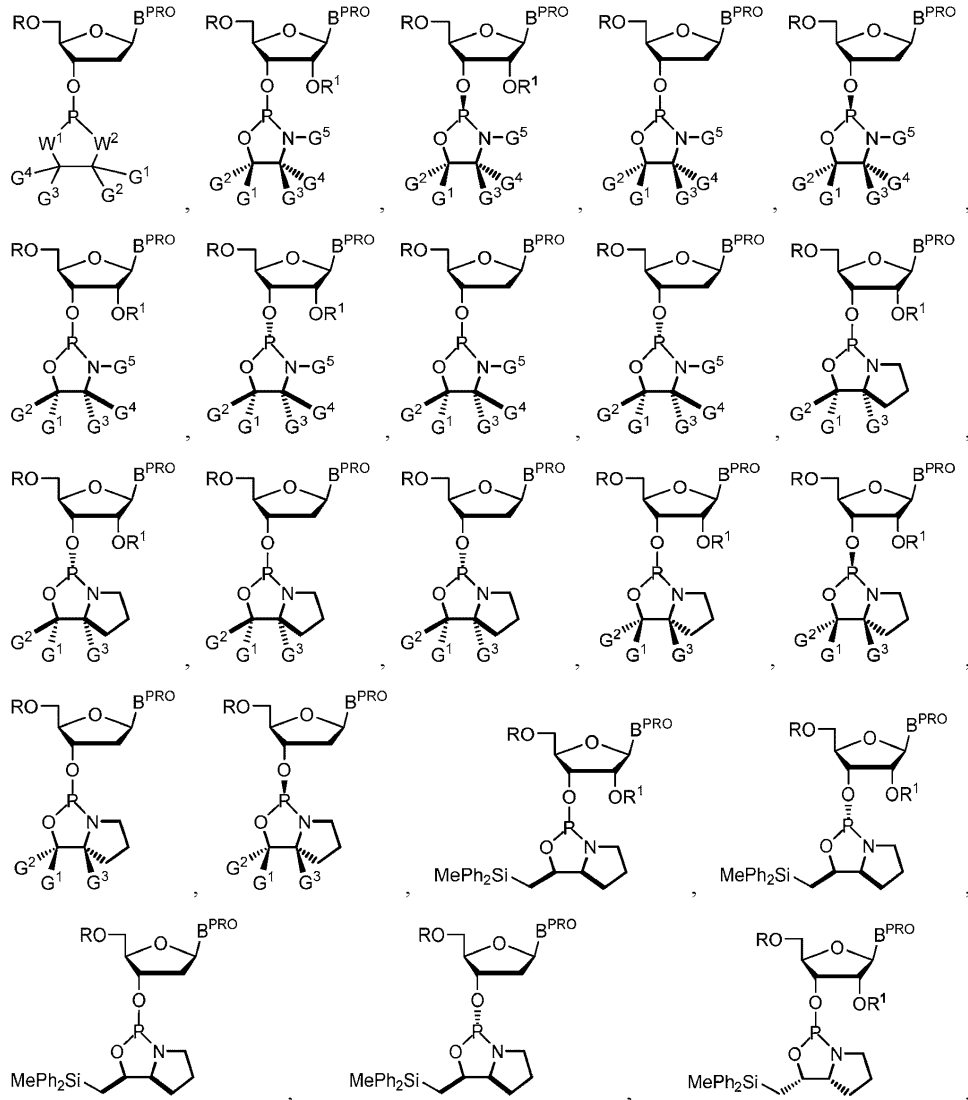
30



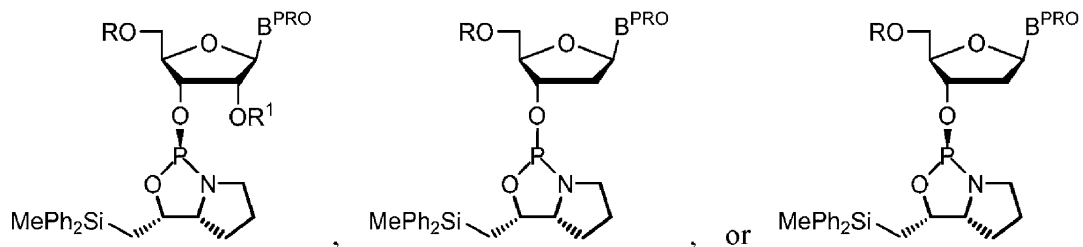
40

50

【化 2 1 3】



【化 2 1 4】



の構造を有する。一部の実施形態では、Rは、保護基である。一部の実施形態では、Rは、DMTrである。一部の実施形態では、G²は、 $-\text{C}(\text{R})_2\text{Si}(\text{R})_3$ であり、式中、 $-\text{C}(\text{R})_2-$ は、任意で置換される $-\text{CH}_2-$ であり、 $-\text{Si}(\text{R})_3$ の各Rは独立して、C₁–10脂肪族、ヘテロシクリル、ヘテロアリール及びアリールから選択される、任意で置換される基である。一部の実施形態では、 $-\text{Si}(\text{R})_3$ の少なくとも1つのRは独立して、任意で置換されるC₁–10アルキルである。一部の実施形態では、 $-\text{Si}(\text{R})_3$ の少なくとも1つのRは独立して、任意で置換されるフェニルである。一部の実施形態では、 $-\text{Si}(\text{R})_3$ の1つのRは独立して、任意で置換されるフェニルであり、他の2つのRの各々は独立して、任意で置換されるC₁–10アルキルである。一部の実施形態

では、 $-Si(R)_3$ の1つのRは独立して、任意で置換される C_{1-10} アルキルであり、他の2つのRの各々は独立して、任意で置換されるフェニルである。一部の実施形態では、 G^2 は、任意で置換される $-CH_2Si(Ph)(Me)_2$ である。一部の実施形態では、 G^2 は、任意で置換される $-CH_2Si(Me)(Ph)_2$ である。一部の実施形態では、 G^2 は、 $-CH_2Si(Me)(Ph)_2$ である。一部の実施形態では、 G^4 及び G^5 は、一緒になって、任意で置換される、1個の窒素原子(G^5 が結合しているもの)を含む飽和5～6員環を形成する。一部の実施形態では、 G^4 及び G^5 は、一緒になって、任意で置換される、1個の窒素原子を含む飽和5員環を形成する。一部の実施形態では、 G^1 は、水素である。一部の実施形態では、 G^3 は、水素である。一部の実施形態では、 G^1 及び G^3 は両方とも水素である。一部の実施形態では、 G^1 及び G^3 は両方とも水素であり、 G^2 は、 $-C(R)_2Si(R)_3$ であり、式中、 $-C(R)_2-$ は、任意で置換される $-CH_2-$ であり、 $-Si(R)_3$ の各Rは独立して、 C_{1-10} 脂肪族、ヘテロシクリル、ヘテロアリアル及びアリアルから選択される、任意で置換される基であり、 G^4 及び G^5 は、一緒になって、任意で置換される、1個の窒素原子を含む飽和5員環を形成する。一部の実施形態では、提供される方法は、フルオロ含有試薬を提供することをさらに含む。一部の実施形態では、提供されるフルオロ含有試薬は、合成後のオリゴヌクレオチドから、キラル試薬、またはキラル試薬から形成される生成物を除去する。 $-SiR_3$ 基を除去するための F^- 源を含む、様々な公知のフルオロ含有試薬、例えば、 $TBAF$ 、 HF_3-Et_3N などを本開示に従って利用することができる。一部の実施形態では、フルオロ含有試薬は、良好な結果、例えば、高濃度アンモニアなどの従来の方法と比較して、より短い処理時間、より低い温度、より少ない脱硫化などを提供する。一部の実施形態では、ある特定のフルオロ含有試薬について、本開示は、改善した結果、例えば、キラル試薬（またはオリゴヌクレオチド合成中にキラル試薬から形成された生成物）の除去中に、支持体からのオリゴヌクレオチドの切断が少ないリンカーを提供する。一部の実施形態では、提供されるリンカーは、 SP リンカーである。一部の実施形態では、本開示は、 $HF-NR_3$ などの HF 系錯体を利用して、キラル試薬（またはオリゴヌクレオチド合成中にキラル試薬から形成された生成物）の除去中の切断を制御できることを実証した。一部の実施形態では、 $HF-NR_3$ は、 $HF-NEt_3$ である。一部の実施形態では、 $HF-NR_3$ は、従来のリンカー、例えば、スクシニルリンカーの使用を可能にする。

【1173】

一部の実施形態では、 $PNPLA3$ オリゴヌクレオチドの生成方法は、以下の非限定的な例に示されるものなどの $DPS E$ 型キラル補助基を使用する、少なくとも1つのサイクルを含む：

10

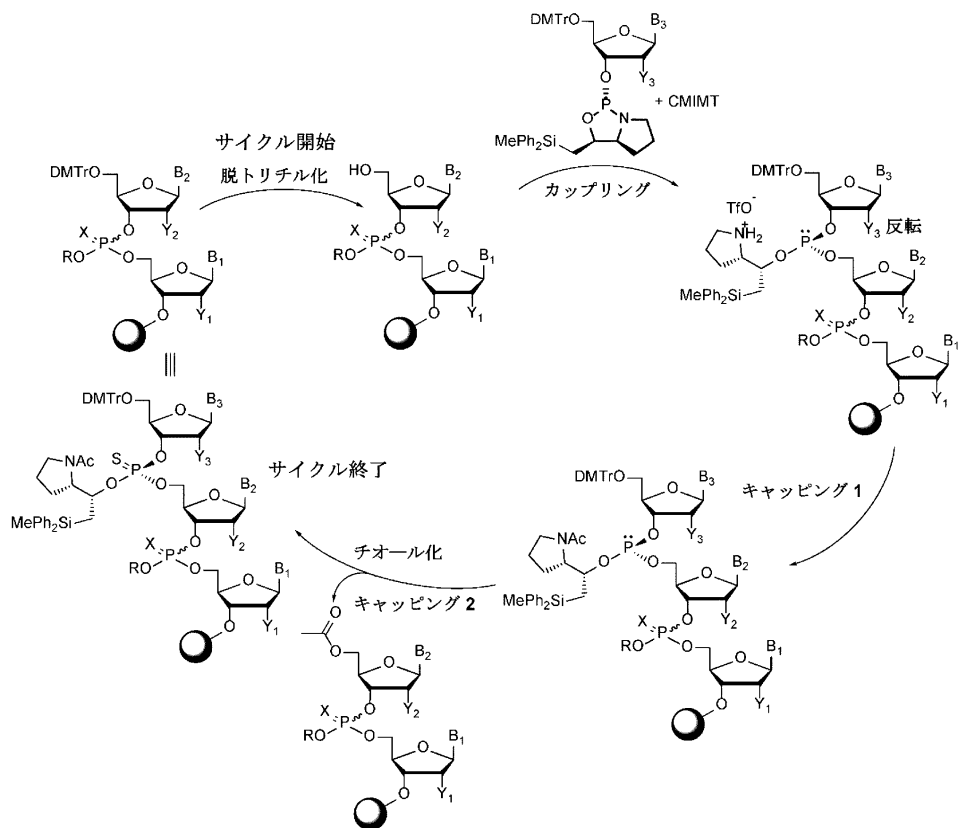
20

30

40

50

【化 2 1 5】



10

20

【1 1 7 4】

脱トリチル化：

オリゴヌクレオチドの合成は、2'-F-U-DMTrをロードしたCPG固形支持体から始め、(トルエン中3%ジクロロ酢酸(DCA))を使用して固形支持体上に結合している最初の核酸塩基からジメトキシトリチル基(DMT)を除去し、436nmの波長でのUV観察コマンドモードを続けた。脱トリチル化には424cm/時の線形流量を使用した。

30

【1 1 7 5】

カップリング：

カップリングステップについて、全てのアミダイトを、0.2Mの濃度で、アセトニトリル(ACN)または20%イソブチロニトリル(IBN)/ACNのいずれかに溶解し、溶液を、使用する4時間前に、モレキュラーシーブ(3Å)NLTで乾燥させた(10%、v/v)。二重活性化剤(CMIMT及びETT)カップリング法をオリゴヌクレオチドの製造に利用した。両方の活性化剤を0.6Mの濃度でACN中に溶解させた。CMIMTは、立体定義されたヌクレオチドの効率的なカップリングに使用されており、ETTは、ランダム/標準アミダイト/ヌクレオチドのカップリングに使用されている活性化剤である。立体定義されたヌクレオチドのカップリングのために、10分間のリサイクル時間(線形リサイクルモード、212cm/時)で、2.5当量のアミダイトを使用した。カップリングステップにおいて、CMIMT活性化剤と立体定義されたアミダイトとのモル比は、6.1:1(CMIMT/アミダイト=6.1/1)に維持した。全てのランダムアミダイトをETT活性化剤とともに8分間カップリングした。ETTとランダム/標準アミダイトのモル比は、4.5:1であった。

40

【1 1 7 6】

50

キャップ 1 :

キャップ 1 は、チオール化前に実施されるステップである。D P S E 上の補助基アミンのキャッピングのために、1 ~ 1.5 C V キャップ B 溶液を 4 分の接触時間で使用する。キャップ B 溶液による D P S E キラル補助基のキャッピングは、初段階での失敗及び F L P 後不純物の含有量を減らすのに役立つ。

【1177】**チオール化 :**

キャップ 1 のステップに続いて、リントリエステル結合 P (I I I) を、チオール化試薬のピリジン中 0.2 M キサンタンヒドリド (X H) (0.6 C V) により 6 分の接触時間で安定化させ、安定した P (V) 結合を形成した。

【1178】**酸化 :**

ここで、キャップ 1 のステップは、標準的なヌクレオチドサイクルには必要ないことに留意されたい。そのため、固形支持体上での標準ヌクレオチドのカップリング後、リントリエステル結合 P (I I I) を、0.05 M のヨウ素／水／ピリジン溶液 (3.5 当量) により 2 分の接触時間で酸化し、安定した P (V) 結合を形成した。

【1179】**キャップ 2 (チオ後／酸素キャッピング) :**

概して、D M T r 放出カチオンに基づいたカップリングステップでは、97 ~ 100 % のカップリング効率が観察された。欠失配列の形成を防ぐために、固形支持体上のカップリングしていない残存ヒドロキシル基 (デトリットモニターによると典型的に 1 ~ 3 %) を、キャップ A 及びキャップ B 溶液を 0.4 C V で使用して 0.8 分かけてブロッキングした。場合により、前キャッピングステップでキャッピングされずに残った任意の補助基アミンもこのステップでキャッピングされる。

【1180】**サイクルの繰り返し**

所望の長さのオリゴヌクレオチドが固形支持体上に合成されるまで、合成サイクル (D P S E サイクル = 脱トリチル化 → カップリング → キャップ 1 → チオール化 → キャップ 2 及び標準サイクル = 脱トリチル化 → カップリング → 酸化 → キャップ 2) を繰り返した。

【1181】

一部の実施形態では、本開示は、選択された標的配列を指向する P N P L A 3 オリゴヌクレオチド組成物を製造するための方法を含み、当該方法は、一本鎖 R N A 干渉を誘導する能力を有し、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドを含み、その各々が標的配列に相補的な塩基配列を有する、提供されるオリゴヌクレオチド組成物を製造することを含む。一部の実施形態では、提供される方法は、薬学的許容可能な担体を提供することをさらに含む。

【1182】

当業者により認識されるように、提供されるオリゴヌクレオチドはまた、本開示に従って提供される試薬及び方法を使用して、公知の液相合成により調製することもできる。

【1183】

非限定的な例として、提供されるオリゴヌクレオチドはまた、当分野に公知の任意のプロセス、例えば、限定されないが、以下に記載のものにより調製することができる： J P 4348044、WO2005092909、USPN9394333、WO2011005761、USPN8470987、USPN8859755、USPN8822671、WO2013012758、EP13817386、WO2014012081、WO2015107425、WO2017015555、及び WO2017062862。

【1184】**本明細書に開示される一本鎖オリゴヌクレオチドを含む二本鎖オリゴヌクレオチド**

一部の実施形態では、P N P L A 3 オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような一本鎖オリゴヌクレオチドと、それに対して少なくとも部分的に相補的な別のオリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドとを含む、二本鎖オリゴヌクレオチドまたは分子を包含する。一部の実施形態では、本開示は、そのような二本鎖オリゴヌクレオチドを含む組成物に関する。

【1185】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような一本鎖オリゴヌクレオチドと、それに対して少なくとも部分的に相補的な別のオリゴヌクレオチドとを含む、二本鎖分子を包含し、例えば、当該分子の一方または両方の末端は、3'または5'オーバーハングを有する。

【1186】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような一本鎖オリゴヌクレオチドと、それに対して完全に相補的な別のオリゴヌクレオチドとを含む、二本鎖分子を包含する。

10

【1187】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような一本鎖オリゴヌクレオチドと、それに対して少なくとも部分的に相補的な別のオリゴヌクレオチドとを含み、RNA干渉を誘導する能力を有する、二本鎖分子を包含する。

【1188】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような一本鎖オリゴヌクレオチドと、それに対して少なくとも部分的に相補的な別のオリゴヌクレオチドとを含み、RNA干渉を誘導する能力を有する、二本鎖分子を包含し、例えば、RNA干渉を誘導する能力を有する当該分子の一方または両方の末端は、3'または5'オーバーハングを有する。

20

【1189】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような一本鎖オリゴヌクレオチドと、それに対して完全に相補的な別のオリゴヌクレオチドとを含み、RNA干渉を誘導する能力を有する、二本鎖分子を包含する。

【1190】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような一本鎖オリゴヌクレオチドと、それに対して少なくとも部分的に相補的な別のオリゴヌクレオチドとを含み、RNA干渉及びRNAse H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する、二本鎖分子を包含する。

【1191】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような一本鎖オリゴヌクレオチドと、それに対して少なくとも部分的に相補的な別のオリゴヌクレオチドとを含み、RNA干渉及びRNAse H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する、二本鎖分子を包含し、例えば、RNA干渉及びRNAse H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する当該分子の一方または両方の末端は、3'または5'オーバーハングを有する。

30

【1192】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような一本鎖オリゴヌクレオチドと、それに対して完全に相補的な別のオリゴヌクレオチドとを含み、RNA干渉及びRNAse H介在性ノックダウンを誘導する能力を有する、二本鎖分子を包含する。

【1193】

提供される第1のオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの任意の形式、構造的要素または塩基配列を有し得、第1のオリゴヌクレオチドに少なくとも部分的に相補的な第2のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド鎖をさらに含むことができる。一部の実施形態では、第1及び／または第2のオリゴヌクレオチドは、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの任意の形式、構造的要素または塩基配列（またはオリゴヌクレオチドの塩基配列に対して少なくとも相補的な塩基配列）を含むことができる。一部の実施形態では、構造的要素は、5'末端構造、5'末端領域、5'ヌクレオチド、シード領域、ポストシード領域、3'末端領域、3'末端ジヌクレオチド、3'末端キャップ、もしくはこれらの構造のいずれかの任意の部分、GC含量、長いGCストレッチ、及び／または任意の修飾、化学、立体化学、修

40

50

飾、化学もしくは立体化学のパターン、または追加の化学的部分（例えば、限定されないが、標的化部分、脂質部分、G a l N A c 部分、炭水化物部分などを含む）、任意の構成要素、または上記のいずれかの任意の組み合わせである。

【1194】

生物学的用途

本明細書に記載される場合、提供される組成物及び方法は、転写産物の一本鎖RNA干渉を含む、ノックダウンを改善する能力を有する。一部の実施形態では、提供される組成物及び方法は、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件からのパターンである参照パターンと比較し、転写産物の一本鎖RNA干渉を改善する。改善は、任意の所望される生物学的機能の改善であり得る。

10

【1195】

一部の実施形態では、本開示は、標的転写産物の一本鎖RNA干渉を改善する方法を提供し、当該方法は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することを含み、この場合において標的転写産物の一本鎖RNA干渉は、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件と比較し、改善する。

【1196】

一部の実施形態では、本開示は、標的の一本鎖RNA干渉を介在する方法を提供するものであり、当該方法は、以下のステップを含む：

組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件下で生成されたセットとは異なる一本鎖RNA干渉産物のセットが生成されるために十分な条件下で、標的転写産物を含む一本鎖RNA干渉系と、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を、ある期間、ある量で接触させる。

20

【1197】

一部の実施形態では、本開示は、限定されないが、本開示に引用される参照文献中に記載される疾患を含む、疾患を治療または予防するための組成物及び方法を提供する。

【1198】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載されるPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を対象に投与することを含む、疾患を治療または予防するための方法を提供する。

【1199】

一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を対象に投与することを含む、疾患を治療または予防するための方法を提供するものであり、当該オリゴヌクレオチドは：

- 1) 転写産物中の標的配列に対し相補的な共通塩基配列を有し、及び
- 2) 1個以上の修飾糖部分及び修飾ヌクレオチド間結合を含み、

当該オリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖RNA干渉系において転写産物と接触したときに、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件下で観察されるものと比較し、転写産物のRNA i 媒介性ノックダウンを改善させる点で特徴付けられる。

【1200】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を対象に投与することを含む、疾患を治療または予防するための方法を提供するものであり、当該オリゴヌクレオチドは、以下により定義される特定のオリゴヌクレオチド型のものであり：

- 1) 塩基配列、
- 2) 骨格結合のパターン、
- 3) 骨格キラル中心のパターン、及び
- 4) 骨格リン修飾のパターン、

その組成物は、特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して富化されているという

40

50

点でキラル制御されており、この場合において：

当該オリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖RNA干渉系において転写産物と接触したときに、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件下で観察されるものと比較し、転写産物のRNAi媒介性ノックダウンを改善させる点で特徴付けられる。

【1201】

一部の実施形態では、疾患は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する提供される組成物を投与することにより、修復、回復、または新たな有益な機能が導入され得る疾患である。

【1202】

一部の実施形態では、疾患は、提供される組成物が投与された後、遺伝子転写産物の一本鎖RNA干渉系が改善されることにより当該遺伝子が効果的にノックダウンされる疾患である。

【1203】

一部の実施形態では、疾患は、がんである。

【1204】

一部の実施形態では、本開示は、共通塩基配列を含む共通塩基配列を共有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することによる、疾患の治療方法を提供するものであり、そのヌクレオチド配列は、標的転写産物中の標的配列に対し相補的であり、立体制御されたオリゴヌクレオチド組成物をオリゴヌクレオチド組成物として使用することを含む改善を提供するものであり、当該立体制御オリゴヌクレオチド組成物は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA干渉系において転写産物と接触されたとき、転写産物のRNAi媒介性ノックダウンを、組成物の非存在、参照組成物の存在、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件下で観察されるものと比較し、改善させる、という点で特徴付けられる。

【1205】

一部の実施形態では、疾患は、がんである。

【1206】

一部の実施形態では、疾患治療は、一本鎖RNA干渉系を改善することにより遺伝子機能のノックダウンを含む。

【1207】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、標的mRNA転写産物を標的とする。

【1208】

一部の実施形態では、共通塩基配列は、細胞内の転写産物とハイブリダイズする能力を有する。一部の実施形態では、共通塩基配列は、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意の遺伝子の転写産物とハイブリダイズする。

【1209】

障害の治療

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子もしくはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を、RNA干渉やRISC（RNAse H介在性ノックダウンもしくは遺伝子発現の立体障害を含むがこれに限定されない）が関与しない生化学的機序を介して誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNAse H介在性ノックダウンを介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的

10

20

30

40

50

な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョン、によって、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。

【1210】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、PNPLA3を標的とする。

【1211】

一部の実施形態では、PNPLA3は、遺伝子、またはその遺伝子産物（限定されないが、転写産物またはタンパク質を含む）であり、以下としても知られている：PNPLA3、アディポヌトリン、ADPN、C22orf20、アシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼまたはカルシウム非依存性ホスホリパーゼA2-イプシロン、iPLA2（2）イプシロン、パタチン様ホスホリパーゼドメイン含有3；外部ID：MGI：2151796；HomoloGene：11883；GeneCards：PNPLA3；種；ヒト：Entrez；80339；Ensembl；ENSG00000100344；UniProt；Q9NST1；RefSeq（mRNA）；NM_025225；RefSeq（タンパク質）；NP_079501；位置（UCSC）；Chr 22：43.92-43.96Mb；種；マウス：Entrez；116939；Ensembl；ENSMUSG00000041653；UniProt；Q91WW7；RefSeq（mRNA）；NM_054088；RefSeq（タンパク質）；NP_473429.2 NP_473429；位置（UCSC）；Chr 15：84.17-84.19Mb。アディポヌトリン（ADPN）、アシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼまたはカルシウム非依存性ホスホリパーゼA2-イプシロン（iPLA2-イプシロン）としても知られるパタチン様ホスホリパーゼドメイン含有タンパク質3（PNPLA3）は、報告によれば、ヒトでは、PNPLA3遺伝子によってコードされる酵素である。PNPLA3は、パタチン様ホスホリパーゼファミリーに属する481アミノ酸のタンパク質である。このファミリーの前駆物質であるパタチンは、報告によれば、バレイショ塊茎の主なタンパク質であり、非特異的な脂質アシル加水分解酵素活性を有する。PNPLA3（パタチン様ホスホリパーゼドメイン含有3）のバリエーション（I148M）は、報告によれば、肝臓の脂肪レベルの増加及び肝臓炎症に強い関連があった。PNPLA3-I148Mのマーカーは、報告によれば、SNPrs738409である。PNPLA3-I148Mと肝臓脂肪量との関連は、報告によれば、BMI、糖尿病状態、エタノールの使用、ならびに世界及び地域の系統について調整した後も、有意に高いままであり、3つの全民族群における肝臓TG量の有意な上昇に関連した。PNPLA3-I148Mアレルの頻度は、報告によれば、3つの民族群におけるNAFLDの相対罹患率を反映しており、最も高い頻度はヒスパニック系（0.49）であり、欧米人（0.23）及びアフリカ系アメリカ人（0.17）で観察された頻度は低かった。Collins et al. 2003 Genome Res. 13（1）：27-36、Collins et al. 2005 Genome Biol. 5（10）：R84；Dunham et al. 1999 Nature. 402（6761）：489-95；Gerhard et al. 2004 Genome Res. 14（10B）：2121-7、Jenkins et al. 2005 J. Biol. Chem. 279（47）：48968-75、Kienesberger et al. 2009 J. Lipid Res. 50 Suppl.：S63-8、Lake et al. 2006 J. Lipid Res. 46（11）：2477-87、Liu et al. 2004 J. Clin. Endocrinol. Metab. 89（6）：2684-9、Strausberg et al. 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99（26）：16899-903、Wilson et al. 2006 J. Lipid Res. 47（9）：1940-9。

【1212】

一部の実施形態では、PNPLA3関連障害は、PNPLA3遺伝子またはその遺伝子産物の異常もしくは過剰な活性、レベル及び／または発現、または異常な組織もしくは細

10

20

30

40

50

胞内もしくは細胞間分布に関連、起因及び／または附随する障害である。PNPLA3関連障害の非限定的な例としては、以下が挙げられる：肝疾患、脂肪肝（たとえば、肝臓における脂肪の蓄積、または肝臓脂肪の増加もしくは過剰）、肝臓脂肪症（たとえば、単純脂肪肝）、脂肪性肝炎、肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患（たとえば、NAFLD）、及び／または肝疾患に関連または続発する1つ以上の疾患及び／または1つ以上の症状若しくは状態、例えば、限定されないが、炎症、肝細胞の破壊（たとえば、肝細胞の壊死）、肝臓の癒痕化（たとえば、線維症）、肝臓の不可逆的な進行性癒痕化（たとえば、肝硬変）、インスリン抵抗性、糖尿病、脂質異常症、ヘッジホッグ（Hh）シグナル伝達経路のタンパク質活性増大、疲労、虚弱、悪心、腹痛、クモ様血管、黄疸、掻痒、浮腫、腹水、精神錯乱、肥満症、肝細胞癌。

10

【1213】

一部の実施形態では、PNPLA3関連障害の非限定的な例としては、以下が挙げられる：高脂血症、I型糖尿病、II型真性糖尿病、特発性I型糖尿病（Ib型）、成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）、早期発症性2型糖尿病（EOD）、若年発症性非定型糖尿病（YOAD）、若年発症成人型糖尿病（MODY）、栄養不良に関連する糖尿病、妊娠糖尿病、冠状動脈性心疾患、虚血性脳卒中、血管形成術後の再狭窄、末梢血管疾患、間欠性跛行、心筋梗塞、脂質異常症、食後脂肪血症、耐糖能異常（IGT）の状態、空腹時血漿グルコース障害の状態、代謝性アシドーシス、ケトン症、関節炎、肥満症、骨粗鬆症、高血圧、うっ血性心不全、左心室肥大、末梢性動脈疾患、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、白内障、糖尿病性腎症、糸球体硬化症、慢性腎不全、糖尿病性ニューロパシー、メタボリックシンドローム、X症候群、月経前症候群、狭心症、血栓症、アテローム性動脈硬化症、一過性脳虚血発作、脳卒中、血管再狭窄、高血糖症、高インスリン血症、高トリグリセリド血症、インスリン抵抗性、グルコース代謝障害、勃起不全、皮膚及び結合組織障害、足部潰瘍及び潰瘍性大腸炎、内皮機能不全及び血管コンプライアンス低下、高アポBリポタンパク血症、アルツハイマー、統合失調症、認知障害、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、及び過敏性腸症候群、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、または非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）。

20

【1214】

一部の実施形態では、PNPLA3関連障害の非限定的な例としては、以下が挙げられる：脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、肝硬変を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、または肝硬変及び肝細胞癌を伴う非アルコール性脂肪性肝炎。

30

【1215】

本開示は、PNPLA3を標的とする能力を有し、PNPLA3関連障害の治療及び／またはPNPLA3関連障害の治療物の製造に有用な、本明細書に開示のオリゴヌクレオチドの使用方法に関する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の塩基配列は、特定の塩基配列との最大ミスマッチ数が特定数である塩基配列を含むか、または当該塩基配列からなり得る。

【1216】

PNPLA3関連障害の治療

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチド（たとえば、PNPLA3標的配列またはPNPLA3標的配列に相補的な配列を含むPNPLA3オリゴヌクレオチド）に関する。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3の標的的特異的ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドに関する。一部の実施形態では、本開示は、RNase H及び／またはRNA干渉によって介在される、PNPLA3の標的的特異的ノックダウンを誘導するPNPLA3オリゴヌクレオチドに関する。PNPLA3を標的とする能力を有するそのような様々なオリゴヌクレオチドが本明細書に開示される。

40

【1217】

一部の実施形態では、PNPLA3関連障害の非限定的な例としては、以下が挙げられ

50

る：肝疾患、脂肪肝（たとえば、肝臓における脂肪の蓄積、または肝臓脂肪の増加もしくは過剰）、肝臓脂肪症（たとえば、単純脂肪肝）、脂肪性肝炎、肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患（たとえば、NAFLD）、及び／または肝疾患に関連または続発する1つ以上の疾患及び／または1つ以上の症状若しくは状態、例えば、限定されないが、炎症、肝細胞の破壊（たとえば、肝細胞の壊死）、肝臓の瘢痕化（たとえば、線維症）、肝臓の不可逆的な進行性瘢痕化（たとえば、肝硬変）、インスリン抵抗性、糖尿病、脂質異常症、ヘッジホッグ（Hh）シグナル伝達経路のタンパク質活性増大、疲労、虚弱、悪心、腹痛、クモ様血管、黄疸、掻痒、浮腫、腹水、精神錯乱、肥満症、肝細胞癌。

【1218】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3関連障害の患者の障害を治療または改善する方法であって、当該患者に、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドの治療上有効な量を投与するステップを含む、方法に関する。

10

【1219】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3関連障害の患者の障害を治療または改善する方法であって、当該患者に、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドの治療上有効な量を投与するステップを含む、方法に関し、ここで、PNPLA3関連障害は、肝疾患、脂肪肝、脂肪症、脂肪性肝炎、肝炎、及び非アルコール性脂肪性肝疾患から選択される。

【1220】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3遺伝子発現を低下させるPNPLA3オリゴヌクレオチドを細胞に導入するための方法であって、当該細胞をPNPLA3オリゴヌクレオチドに接触させることを含む、方法に関する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。

20

【1221】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3遺伝子発現を低下させることを、それを必要とする哺乳類において行うための方法であって、当該哺乳類に、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドを含む核酸脂質粒子を投与することを含む、方法に関する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。

【1222】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3遺伝子発現を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドのin vivo送達のための方法であって、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドを哺乳類に投与することを含む、方法に関する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。一部の実施形態では、哺乳類は、ヒトである。一部の実施形態では、哺乳類は、PNPLA3関連障害を患っている、及び／または罹患している。一部の実施形態では、哺乳類は、以下から選択されるPNPLA3関連障害を患っている、及び／または罹患している：肝疾患、脂肪肝、脂肪症、脂肪性肝炎、肝炎、及び非アルコール性脂肪性肝疾患。

30

【1223】

一部の実施形態では、本開示の方法は、高脂血症、I型糖尿病、II型真性糖尿病、特発性I型糖尿病（Ib型）、成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）、早期発症性2型糖尿病（EOD）、若年発症性非定型糖尿病（YOAD）、若年発症成人型糖尿病（MODY）、栄養不良に関連する糖尿病、妊娠糖尿病、冠状動脈性心疾患、虚血性脳卒中、血管形成術後の再狭窄、末梢血管疾患、間欠性跛行、心筋梗塞、脂質異常症、食後脂肪血症、耐糖能異常（IGT）の状態、空腹時血漿グルコース障害の状態、代謝性アシドーシス、ケトン症、関節炎、肥満症、骨粗鬆症、高血圧、うっ血性心不全、左心室肥大、末梢性動脈疾患、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、白内障、糖尿病性腎症、糸球体硬化症、慢性腎不全、糖尿病性ニューロパシー、メタボリックシンドローム、X症候群、月経前症候群、狭心症、血栓症、アテローム性動脈硬化症、一過性脳虚血発作、脳卒中、血管再狭窄、高

40

50

血糖症、高インスリン血症、高トリグリセリド血症、低密度リボタンパク質（LDL）コレステロールレベルの上昇（高コレステロール血症）、インスリン抵抗性、グルコース代謝障害、勃起不全、皮膚及び結合組織障害、足部潰瘍及び潰瘍性大腸炎、内皮機能不全及び血管コンプライアンス低下、高アポBリボタンパク血症、アルツハイマー、統合失調症、認知障害、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、及び過敏性腸症候群、非アルコール性脂肪性肝炎（NAFLD）、または非アルコール性脂肪性肝疾患（NASH）のヒトにおける治療用であり、ここで、方法は、本開示のPNPLA3オリゴヌクレオチドの治療上有効な量を対象に投与することを含む。

【1224】

一部の実施形態では、方法は、門脈圧亢進症、肝タンパク質合成能力、高ビリルビン血症、または脳障害を低減し、ここで、方法は、本開示のPNPLA3オリゴヌクレオチドの治療上有効な量を対象に投与することを含む。

【1225】

本開示はまた、本開示のPNPLA3オリゴヌクレオチドの治療上有効な量を対象に投与するヒトにおける、非アルコール性脂肪性肝疾患もしくは非アルコール性脂肪性肝炎の評価スコアリングシステムの重症度の少なくとも1点の減点、非アルコール性脂肪性肝炎活性の血清マーカーレベルの低下、非アルコール性脂肪性肝炎疾患活性の低下、または非アルコール性脂肪性肝炎の医学的結果の低減の治療のための方法に関する。

【1226】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3関連障害に伴う1つ以上の症状を治療及び／または改善することを、それを必要とする哺乳類において行うための方法であって、当該哺乳類に、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドの治療上有効な量を投与することを含む、方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3関連障害に対する感受性を低下させることを、それを必要とする哺乳類において行うための方法であって、当該哺乳類に、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドの治療上有効な量を投与することを含む、方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3関連障害の発生を予防または遅延させることを、それを必要とする哺乳類において行うための方法であって、当該哺乳類に、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドの治療上有効な量を投与することを含む、方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3関連障害に伴う1つ以上の症状を治療及び／または改善することを、それを必要とする哺乳類において行うための方法であって、当該哺乳類に、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドを含有する核酸脂質粒子の治療上有効な量を投与することを含む、方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3関連障害に対する感受性を低下させることを、それを必要とする哺乳類において行うための方法であって、当該哺乳類に、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドを含有する核酸脂質粒子の治療上有効な量を投与することを含む、方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3関連障害の発生を予防または遅延させることを、それを必要とする哺乳類において行うための方法であって、当該哺乳類に、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドを含有する核酸脂質粒子の治療上有効な量を投与することを含む、方法に関する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。一部の実施形態では、哺乳類は、ヒトである。一部の実施形態では、哺乳類は、PNPLA3関連障害を患っている、及び／または罹患している。一部の実施形態では、哺乳類は、以下から選択されるPNPLA3関連障害を患っている、及び／または罹患している：肝疾患、脂肪肝、脂肪症、脂肪性肝炎、肝炎、及び非アルコール性脂肪性肝疾患。

【1227】

一部の実施形態では、本開示は、細胞におけるPNPLA3発現を阻害する方法であって、（a）当該細胞を、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドと接触させること、及び（b）ステップ（a）で生成された細胞を、PNPLA3遺伝子のmRNA転写産物の分解を得るのに十分な時間維持することを含み、それにより、当該細胞

10

20

30

40

50

におけるPNPLA3遺伝子の発現を阻害する、方法に関する。一部の実施形態では、PNPLA3発現は、少なくとも30%阻害される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。

【1228】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3発現によって介在される障害の治療を必要とするヒトに、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドの治療上有効な量を投与することを含む、治療方法に関する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。

【1229】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3関連障害を治療するために対象において使用するための、PNPLA3を標的とするPNPLA3オリゴヌクレオチドを含む化合物に関する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。一部の実施形態では、PNPLA3関連障害は、以下から選択される：肝疾患、脂肪肝、脂肪症、脂肪性肝炎、肝炎、または非アルコール性脂肪性肝疾患。

【1230】

一部の実施形態では、対象は、第2の薬剤（例えば、追加の治療薬）の投与を受ける。一部の実施形態では、第2の薬剤は、PNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、PNPLA3を標的とする。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。

【1231】

本開示のオリゴヌクレオチドは、単独で、または1つ以上の追加の治療薬と組み合わせて投与することができる。「組み合わせて投与される」または「併用療法」とは、本開示のオリゴヌクレオチド及び1つ以上の追加の治療薬が、治療される哺乳類に同時投与されることを意味する。組み合わせて投与される場合、各構成要素は、同時に投与されてもよいし、異なる時点で任意の順序で逐次投与されてもよい。したがって、各構成要素は、別々に投与されてもよいが、所望の治療効果が得られるように十分に近い時間内に投与され得る。そのため、本明細書に記載される組成物ならびに予防及び治療の方法は、組み合わせ剤の使用を含む。

【1232】

組み合わせ剤は、治療上有効な量で哺乳類に投与される。「治療上有効な量」とは、単独または追加の治療薬と組み合わせて哺乳類に投与した場合、所望の疾患／状態（例えば、肥満症、糖尿病、及び心血管病態）を治療するのに十分な本開示のPNPLA3オリゴヌクレオチドの量を意味する。

【1233】

したがって、本開示のオリゴヌクレオチドは、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）及び／または非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の治療薬（すなわち、抗NASH剤及び抗NAFLD剤）、例えば、オルリスタット、TZD及び他のインスリン抵抗性改善剤、FGF21アナログ、メトホルミン、オメガ3酸エチルエステル（例えば、Lovaza）、フィブラート、HMG CoA-レダクターゼ阻害剤、エジチムブ、プロブコール、ウルソデオキシコール酸、TGR5アゴニスト、FXRアゴニスト、ビタミンE、ベタイン、ペントキシフィリン、CB1アンタゴニスト、カルニチン、N-アセチルシステイン、還元型グルタチオン、ロルカセリン、ナルトレキソンとブプロプリオンの組み合わせ、SGLT2阻害剤、フェンテルミン、トピラマート、インクレチン（GLP及びGIP）アナログ及びアンギオテンシン受容体遮断剤などと共投与され得る。非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）及び／または非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の治療に好ましい薬剤（すなわち、抗NASH剤及び抗NAFLD剤）は、アセチル-CoAカルボキシラーゼ（ACC）阻害剤、ケトヘキソキナーゼ（KHK）阻害剤、GLP-1受容体アゴニスト、FXRアゴニスト、CB1アンタゴニスト、ASK1阻害剤、CCR2及び／またはCCR5の阻害剤、PNPLA3阻害剤、DGAT1阻害剤、DGAT

2 阻害剤、FGF21アナログ、FGF19アナログ、SGLT2阻害剤、PPARアゴニスト、AMPK活性化剤、SCD1阻害剤またはMPO阻害剤である。同一の出願人による2017/12/01に出願の特許出願第PCT/IB2017/057577号は、GLP-1受容体アゴニストに関する。最も好ましいのは、FXRアゴニスト、アポトーシスシグナル調節キナーゼ1(ASK1)阻害剤、PPARアゴニスト、GLP-1受容体アゴニスト、SGLT阻害剤、ACC阻害剤及びKHK阻害剤である。

【1234】

さらに、本開示のオリゴヌクレオチドは、抗糖尿病剤（例えば、インスリン、メトホルミン、DPPIV阻害剤（例えば、シタグリプチン）、GLP-1受容体アゴニスト、アナログ及び模倣物、SGLT1及びSGLT2阻害剤（例えば、エルツグリホジン））と共投与され得る。好ましい薬剤は、メタホルミン、シタグリプチンリン及びエルツグリホジンである。好適な抗糖尿病剤としては、WO2009144554、WO2003072197、WO2009144555、及びWO2008065508に記載のものなどのアセチル-CoAカルボキシラーゼ（ACC）阻害剤、WO09016462またはWO2010086820に記載のものなどのジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ1(DGAT-1)阻害剤、AZD7687またはLCQ908、WO2015/140658に記載のものなどのジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ2(DGAT-2)阻害剤、モノアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ阻害剤、ホスホジエステラーゼ(PDE)-10阻害剤、AMPK活性化剤、スルホニル尿素（例えば、アセトヘキサミド、クロルプロパミド、ジアビネーゼ、グリベンクラミド、グリピジド、グリブリド、グリメピリド、グリクラジド、グリペンチド、グリキドン、グリソラミド、トラザミド、及びトルブタミド）、メグリチニド、 α -アミラーゼ阻害剤（例えば、テンダミスタット、トレスタチン及びAL-3688）、 α -グルコシドヒドロラーゼ阻害剤（例えば、アカルボース）、 α -グルコシダーゼ阻害剤（例えば、アディポシン、カミグリボース、エミグリテート、ミグリトール、ボグリボース、プラディマイシン-Q、及びサルボスタチン）、PPAR γ アゴニスト（例えば、バラグリタゾン、シグリタゾン、ダルグリタゾン、エングリタゾン、イサグリタゾン、ピオグリタゾン及びロシグリタゾン）、PPAR α/γ アゴニスト（例えば、CLX-0940、GW-1536、GW-1929、GW-2433、KRP-297、L-796449、LR-90、MK-0767及びSB-219994）、ビグアニド（例えば、メトホルミン）、グルカゴン様ペプチド1(GLP-1)受容体アゴニスト（例えば、エキセセンジン-3及びエキセセンジン-4）、リラグルチド、アルビグルチド、エキセナチド(Byetta(登録商標))、アルビグルチド、リキシセナチド、デュラグルチド、セマグルチド、NN-9924、TTP-054、TTP-273、タンパク質チロシンホスファターゼ-1B(PTP-1B)阻害剤（例えば、トロズスクエミン、ヒルチオサル抽出物、及びZhang, S., et al., Drug Discovery Today, 12(9/10), 373-381(2007)に開示されている化合物)、SIRT-1活性化剤（例えば、レスベラトロール、GSK2245840またはGSK184072）、ジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)阻害剤（例えば、WO2005116014のもの、シタグリプチン、ビルダグリプチン、アログリプチン、デュトグリプチン、リナグリプチン及びサクサグリプチン）、インスリン分泌促進剤、脂肪酸酸化阻害剤、A2アンタゴニスト、c-junアミノ末端キナーゼ(JNK)阻害剤、WO2010103437、WO2010103438、WO2010013161、WO2007122482に記載のものなどのグルコキナーゼ活性化剤(GKa)、TTP-399、TTP-355、TTP-547、AZD1656、ARRY403、MK-0599、TAK-329、AZD5658またはGKM-001、インスリン、インスリン模倣物、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤（例えば、GSK1362885）、VPAC2受容体アゴニスト、E. C. Chao et al. Nature Reviews Drug Discovery 9, 551-559(July 2010)に記載のものなどのSGLT2阻害剤、例えば、ダパグリフロジン、カナグリフロジン、エンパグリフロジン、トホグリフロジ

10

20

30

40

50

ン (CSG452)、エルツグリフロジン、ASP-1941、THR1474、TS-071、ISIS388626及びLX4211ならびにWO2010023594に記載のもの、Demong, D. E. et al. Annual Reports in Medicinal Chemistry 2008, 43, 119-137に記載のものなどのグルカゴン受容体調節剤、GPR119調節剤、特に、WO2010140092、WO2010128425、WO2010128414、WO2010106457、Jones, R. M. et al. in Medicinal Chemistry 2009, 44, 149-170に記載のものなどのアゴニスト (例えば、MBX-2982、GSK1292263、APD597及びPSN821)、Kharitonov, A. et al. et al., Current Opinion in Investigational Drugs 2009, 10 (4) 359-364に記載のものなどのFGF21誘導体またはアナログ、TGR5 (GPBAR1とも称される) 受容体調節剤、特に、Zhong, M., Current Topics in Medicinal Chemistry, 2010, 10 (4), 386-396に記載のもの及びINT777などのアゴニスト、Medina, J. C., Annual Reports in Medicinal Chemistry, 2008, 43, 75-85に記載のものなどのGPR40アゴニスト、例えば、限定するものではないが、TAK-875、GPR120調節剤、特にアゴニスト、高親和性ニコチン酸受容体 (HM74A) 活性化剤、及びGSK1614235などのSGLT1阻害剤が含まれる。本開示のオリゴヌクレオチドと組み合わせることができる抗糖尿病剤の更なる代表的な一覧は、例えば、WO2011005611の28頁35行から30頁19行に見出すことができる。好ましい抗糖尿病剤は、メトホルミン及びDPP-IV阻害剤 (例えば、シタグリブチンリン、ビルダグリブチン、アログリブチン、デュトグリブチン、リナグリブチン及びサクサグリブチン) である。他の抗糖尿病剤としては、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ酵素の阻害剤もしくは調節剤、フルクトース1, 6-ジホスファターゼの阻害剤、アルドースレダクターゼの阻害剤、ミネラルコルチコイド受容体阻害剤、TORC2の阻害剤、CCR2及び/またはCCR5の阻害剤、PKCアイソフォーム (例えば、PKC α 、PKC β 、PKC γ) の阻害剤、脂肪酸シンテターゼの阻害剤、セリンパルミトイルトランスフェラーゼの阻害剤、GPR81、GPR39、GPR43、GPR41、GPR105、Kv1.3、レチノール結合タンパク質4、グルココルチコイド受容体、ソマトスタイン受容体 (例えば、SSTR1、SSTR2、SSTR3及びSSTR5) の調節剤、PDHK2もしくはPDHK4の阻害剤もしくは調節剤、MAP4K4の阻害剤、IL1ベータを含むIL1ファミリーの調節剤、RXRアルファの調節剤が含まれ得る。加えて、好適な抗糖尿病剤には、Carpino, P. A., Goodwin, B. Expert Opin. Ther. Pat, 2010, 20 (12), 1627-51に列記される機序が含まれる。

【1235】

好適な抗肥満剤としては、11 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ-1 (11 β -HSD1型) 阻害剤、ステアロイル-CoAデサチュラーゼ-1 (SCD-1) 阻害剤、MCR-4アゴニスト、コレシストキニン-A (CCK-A) アゴニスト、モノアミン再取り込み阻害剤 (シブトラミンなど)、交感神経様作用剤、 β 3アドレナリン作動性アゴニスト、ドーパミンアゴニスト (プロモクリプチンなど)、メラノサイト刺激ホルモンアナログ、5HT2cアゴニスト、メラニン凝集ホルモンアンタゴニスト、レプチン (OBタンパク質)、レプチンアナログ、レプチンアゴニスト、ガラニンアンタゴニスト、リパーゼ阻害剤 (テトラヒドロリプスタチン、すなわち、オルリスタットなど)、食欲抑制剤 (ボンベシンアゴニストなど)、神経ペプチド-Yアンタゴニスト (例えば、NPYY5アンタゴニスト)、PYY3-36 (そのアナログを含む)、甲状腺ホルモン剤、デヒドロエピアンドロステロンまたはそのアナログ、グルココルチコイドアゴニストまたはアンタゴニスト、オレキシアンタゴニスト、グルカゴン様ペプチド-1アゴニスト、毛様体神経栄養因子 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (

10

20

30

40

50

Tarrytown, NY) 及び Procter & Gamble Company (Cincinnati, OH) から入手可能な Axokine (商標) など)、ヒトアグーチ関連タンパク質 (AGRP) 阻害剤、グレリンアンタゴニスト、ヒスタミン3アンタゴニストまたはインバースアゴニスト、ニューロメジンUアゴニスト、MTP/ApoB阻害剤 (例えば、ジルロタピドなどの小腸選択的MTP阻害剤)、オピオイドアンタゴニスト、オレキシンアンタゴニスト、ナルトレキソンとブプロプリオンの組み合わせなどが含まれる。

【1236】

本開示の組み合わせ態様における使用に好ましい抗肥満剤としては、小腸選択的MTP阻害剤 (例えば、ジルロタピド、ミトラタピド及びインプリタピド、R56918 (CAS番号403987) 及びCAS番号913541-47-6)、CKKaアゴニスト (例えば、PCT国際公開第WO2005/116034号または米国特許出願公開第2005-0267100A1号に記載のN-ベンジル-2-[4-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-2,3,6,10b-テトラアザベンゾ[e]アズレン-6-イル]-N-イソプロピルアセトアミド)、5HT2cアゴニスト (例えば、ロルカセリン)、MCR4アゴニスト (例えば、US6,818,658に記載の化合物)、リパーゼ阻害剤 (例えば、Cetilistat)、PYY3-36 (本明細書で使用される時、「PYY3-36」は、ペグ化PYY3-36、例えば、米国特許出願公開第2006/0178501号に記載のものなどのアナログを含む)、オピオイド拮抗薬 (例えば、ナルトレキソン)、ナルトレキソンとブプロプリオンの組み合わせ、オレオイル-エストロン (CAS番号180003-17-2)、オビネピチド (TM30338)、プラムリントイド (Symlin (登録商標))、テソフェンシン (NS2330)、レプチン、リラグルチド、プロモクリプチン、オリリスタット、エキセナチド (Byetta (登録商標))、AOD-9604 (CAS番号221231-10-3)、フェンテルミン及びトピラマート (商品名: Qsymia)、ならびにシブトラミンが含まれる。好ましくは、本開示のオリゴヌクレオチド及び併用療法は、運動及びしっかりとした食生活とともに行われる。

【1237】

当業者であれば、本開示のオリゴヌクレオチドが以下の段落に記載されるような心血管または脳血管の治療とともに使用されてもよいことを認識するだろう。本開示のオリゴヌクレオチドはまた、PCI、ステント術、薬剤溶出性ステント、幹細胞療法を含む心血管療法、及び埋め込み型のペースメーカー、除細動器、または心臓再同期療法などの医療装置とともに使用されてもよい。

【1238】

本開示のオリゴヌクレオチドは、以下と組み合わせ使用され得る：コレステロール調節剤 (コレステロール低下剤を含む)、例えば、リパーゼ阻害剤、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、HMG-CoAシンターゼ阻害剤、HMG-CoAレダクターゼ遺伝子発現阻害剤、HMG-CoAシンターゼ遺伝子発現阻害剤、MTP/ApoB分泌阻害剤、CETP阻害剤、胆汁酸吸収阻害剤、コレステロール吸収阻害剤、コレステロール合成阻害剤、スクアレンシンターゼ阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、スクアレンシクラーゼ阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ/スクアレンシクラーゼ組み合わせ阻害剤、フィブラート、ナイアシン、イオン交換樹脂、抗酸化剤、ACAT阻害剤または胆汁酸隔離剤またはミポメルセンなどの薬剤。

【1239】

好適なコレステロール/脂質低下剤及び脂質プロファイル治療法の例としては、以下が挙げられる：HMG-CoAレダクターゼ阻害剤 (例えば、プラバスタチン、ロバスタチン、アトルバスタチン、シムバスタチン、フルバスタチン、NK-104 (別名イタバスタチン、またはニスヴァスタチンまたはニスバスタチン) 及びZD-4522 (別名ロスバスタチン、またはアタバスタチンまたはビスバスタチン)；スクアレンシンターゼ阻害剤；フィブラート；胆汁酸隔離剤 (クエストランなど)；ACAT阻害剤；MTP阻害剤

；リポオキシゲナーゼ阻害剤；コエステロール吸収阻害剤；及びコレステリルエステル転移タンパク質阻害剤。他のアテローム性動脈硬化剤には、P C S K 9 調整剤が含まれる。

【1240】

P N P L A 3 オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤の投与

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉またはRISCが関与しない生化学的機序（限定されないが、遺伝子発現のRNAse H介在性ノックダウンまたは立体障害を含む）を介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA干渉及び／またはRNAse H介在性ノックダウンを介して、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子mRNAへのアニーリング後の翻訳の立体的な遮断、及び／またはmRNAスプライシングの改変もしくは妨害、及び／またはエクソンインクルージョンもしくはエクソンエクスクルージョンによって、標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現及び／またはレベルの低下を誘導する能力を有する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるまたは当分野に公知の任意のビヒクルとともに、任意の投与レジメン及び任意の方法で、投与される。

【1241】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、標的転写産物のノックダウンの改善において同等に有効な別手段による同等参照オリゴヌクレオチド組成物よりも低い投与量及び／または頻度で投与される。一部の実施形態では、立体制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的転写産物のノックダウンの改善において同等に有効な別手段による立体不規則的同等参照オリゴヌクレオチド組成物よりも低い投与量及び／または頻度で投与される。

【1242】

一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチド及びその組成物の特性、例えば、改善された一本鎖RNA干渉活性などが、化学修飾及び／または立体化学によって最適化され得ることを認識する。一部の実施形態において、本開示は、化学修飾及び立体化学によってオリゴヌクレオチドの特性を最適化するための方法を提供する。

【1243】

化学修飾及び／または立体化学を制御することによって、本開示は、改善されたオリゴヌクレオチド組成物及び方法を提供する。一部の実施形態では、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する提供されるオリゴヌクレオチドは、化学修飾を含む。一部の実施形態では、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する提供されるオリゴヌクレオチドは、塩基修飾、糖修飾、ヌクレオチド間結合修飾、またはそれらの任意の組み合わせを含む。一部の実施形態では、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する提供されるオリゴヌクレオチドは、塩基修飾を含む。一部の実施形態では、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有する提供されるオリゴヌクレオチドは、糖修飾を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、糖部分上に2'-修飾を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、1個以上の修飾ヌクレオチド間結合と1個以上の天然リン酸結合を含む。天然リン酸結合を、P N P L A 3 オリゴヌクレオチドのさまざまな位置に組み込む能力を有する。一部の実施形態では、天然リン酸結合は、5'-末端領域内に組み込まれる。一部の実施形態では、天然リン酸結合は、P N P L A 3 オリゴヌクレオチドの中央に組み込まれる。一部の実施形態では、本開示は、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することを含む方法を提供し、その組成物は、複数のオリゴヌクレオチドを含む参照組成物と比較して改善された送達を呈し、複数のオリゴヌクレオチドの各々は共通の塩基配列も有するが、以下の点で第1の複数のオリゴヌクレオチドと構造的に異なる：

参照の複数のオリゴヌクレオチド内の個々のオリゴヌクレオチドは、立体化学構造において互いに異なる、及び／または

参照の複数のオリゴヌクレオチド内の少なくとも一部のオリゴヌクレオチドは、組成物の複数のオリゴヌクレオチドにより表される構造とは異なる構造を有する。

【1244】

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有し、共通ヌクレオチド配列を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を投与する方法を提供し、以下の改善を含む：

同じ共通ヌクレオチド配列の参照オリゴヌクレオチド組成物と比較して改善された送達を特徴とする、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むPNPLA3オリゴヌクレオチドを投与すること。

10

【1245】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド、組成物、及び方法は、全身送達の改善を提供する。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド、組成物、及び方法は、細胞質送達の改善を提供する。一部の実施形態では、送達の改善は、細胞集合への送達である。一部の実施形態では、送達の改善は、組織への送達である。一部の実施形態では、送達の改善は、臓器への送達である。一部の実施形態では、送達の改善は、生物体への送達である。送達の改善をもたらす、構造的要素（例えば、化学修飾、立体化学、その組み合わせなど）、オリゴヌクレオチド、組成物及び方法の例は、本開示に広く記載されている。

20

【1246】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を特定及び／または特徴付けする方法を提供し、方法は、次のステップを含む：

第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む少なくとも1つの組成物を提供すること、及び参照組成物を基準として送達を評価すること。

【1247】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチド組成物を特定及び／または特徴付けする方法を提供し、方法は、次のステップを含む：

第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む少なくとも1つの組成物を提供すること、及び参照組成物を基準として細胞取り込みを評価すること。

30

【1248】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物の特性は、参照オリゴヌクレオチド組成物と比較される。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む。

【1249】

一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、立体不規則的なオリゴヌクレオチド組成物である。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、すべてのヌクレオチド間結合がホスホロチオエートであるオリゴヌクレオチドの立体不規則的な組成物である。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、すべてリン酸結合のDNAオリゴヌクレオチド組成物である。

40

【1250】

一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列と同じ化学修飾を有するオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列と同じ化学修飾パターンを有するオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列と化学修飾を有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されていない（または立体不規則的な）組成物である。

【1251】

一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列を有するが、化学修飾は異なるオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列、塩基修飾、ヌクレオチド間結合修飾を有するが、糖修飾は異なるオリゴヌクレオチドの組成

50

物である。一部の実施形態では、参照組成物は、より少ない2' - 修飾された糖修飾を有する。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列、塩基修飾、糖修飾を有するが、ヌクレオチド間結合修飾は異なるオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、より多くのヌクレオチド間結合修飾を有する。一部の実施形態では、参照組成物は、より少ない天然リン酸結合を有する。一部の実施形態では、参照組成物は、天然リン酸結合を有さないオリゴヌクレオチドを含む。

【1252】

一部の実施形態では、参照組成物は、参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物であり、当該参照の複数のオリゴヌクレオチド内の個々のオリゴヌクレオチドは、立体化学構造において互いに異なっている。一部の実施形態では、参照組成物は、参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物であり、当該参照の複数のオリゴヌクレオチド内の少なくとも一部のオリゴヌクレオチドは、参照組成物と比較して、組成物の複数のオリゴヌクレオチドにより表される構造とは異なる構造を有する。

【1253】

一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有し、同じ共通ヌクレオチド配列を有するが、参照組成物と比較してオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドにおいて1個以上の修飾糖部分のうちの少なくとも1個の糖修飾部分を欠く参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有し、同じ共通ヌクレオチド配列を有するが、修飾糖部分は有さない参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有し、同じ共通ヌクレオチド配列を有するが、天然リン酸結合は含有しない参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ化学修飾パターンを有する、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの一本鎖RNAi剤である。一部の実施形態では、参照組成物は、別の立体異性体のPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。

【1254】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物の参照オリゴヌクレオチド組成物は、提供される組成物中に脂質が存在しない同等の組成物である。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、立体不規則的なオリゴヌクレオチド組成物である。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、すべてのヌクレオチド間結合がホスホロチオエートであるオリゴヌクレオチドの立体不規則的な組成物である。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、すべてリン酸結合のDNAオリゴヌクレオチド組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列と同じ化学修飾を有するオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列と同じ化学修飾パターンを有するオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列と化学修飾を有するオリゴヌクレオチドのキラル制御されていない（または立体不規則的な）組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列を有するが、化学修飾は異なるオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列、塩基修飾、ヌクレオチド間結合修飾を有するが、糖修飾は異なるオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、より少ない2' - 修飾された糖修飾を有する。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列、塩基修飾、糖修飾を有するが、ヌクレオチド間結合修飾は異なるオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、より多くのヌクレオチド間結合修飾を有する。一部の実施形態では、参照組成物は、より少ない天然リン酸結合を有する。一部の実施形態では、参照組成物は、天然リン酸結合を有さないオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、参照組成物は、参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物であり、当該参照の複数のオリゴヌクレオチド内の個々のオリゴヌクレオチドは、立体化学構造において互いに異なっている。一部の実施形態では、参照組成物は、参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物であり、当該参照の複数の

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド内の少なくとも一部のオリゴヌクレオチドは、参照組成物と比較して、組成物の複数のオリゴヌクレオチドにより表される構造とは異なる構造を有する。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有し、同じ共通ヌクレオチド配列を有するが、参照組成物と比較してオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチドにおいて1個以上の修飾糖部分のうちの少なくとも1個の糖修飾部分を欠く参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有し、同じ共通ヌクレオチド配列を有するが、修飾糖部分は有さない参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖RNA干渉を誘導する能力を有し、同じ共通ヌクレオチド配列を有するが、天然リン酸結合は含有しない参照の複数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ化学修飾パターンを有する、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの一本鎖RNA i 剤である。一部の実施形態では、参照組成物は、別の立体異性体のPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤である。

【1255】

一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、1個以上の構造的要素（例えば修飾、立体化学、パターンなど）を含み、参照の複数のオリゴヌクレオチドはすべて、当該構造的要素を有さない。このような構造的要素は、本開示に記載される任意のものであってもよい。

【1256】

一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、5'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、3'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのSpキラルヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのSpホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、5'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのSpホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、3'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのSpホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くの修飾塩基を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのメチル化塩基を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、5'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのメチル化塩基を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、3'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも多くのメチル化塩基を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも少ない2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも少ない2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、5'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも少ない2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドは、3'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも少ない2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチド内の個々のオリゴヌクレオチドは、立体化学構造において互いに異なる。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチド内の少なくとも一部のオリゴヌクレオチドは、組成物の複数のオリゴヌクレオチドにより表される構造とは異なる構造を

10

20

30

40

50

有する。一部の実施形態では、参照組成物は実質的に、塩基配列を共有するオリゴヌクレオチドのラセミ調製物である。一部の実施形態では、参照組成物は、別のオリゴヌクレオチド型のPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より多くのホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合のみを含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ない修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ない修飾糖部分を含み、この場合において当該修飾は、2'-OR¹である。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より多くの修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より多くの修飾糖部分を含み、当該修飾は、2'-OR¹である。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ないホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ないメチル化塩基を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より多くの2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ない天然リン酸結合を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、5'末端及び／または3'末端領域で、より少ない天然リン酸結合を含む。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも少ない2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも少ない2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、5'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも少ない2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、提供される組成物のオリゴヌクレオチドは、3'末端領域で、参照組成物のPNPLA3オリゴヌクレオチドよりも少ない2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチド内の個々のオリゴヌクレオチドは、立体化学構造において互いに異なる。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチド内の少なくとも一部のオリゴヌクレオチドは、組成物の複数のオリゴヌクレオチドにより表される構造とは異なる構造を有する。一部の実施形態では、参照組成物は実質的に、塩基配列を共有するオリゴヌクレオチドのラセミ調製物である。一部の実施形態では、参照組成物は、別のオリゴヌクレオチド型のPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤である。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より多くのホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合のみを含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ない修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ない修飾糖部分を含み、この場合において当該修飾は、2'-OR¹である。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より多くの修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より多くの修飾糖部分を含み、当該修飾は、2'-OR¹である。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ないホスホロチオエート結合を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ないメチル化塩基を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より多くの2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、より少ない天然リン酸結合を含む。一部の実施形態では、参照組成物のオリゴヌクレオチドは、5'末端及び／または3'末端領域で、より少ない天然リン酸結合を含む。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、より少ない、-Fを含むヌクレオチド単位を含む。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、より少ない2'-F修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、参照の複数のオリゴヌクレオチドは、より少ないキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【1257】

一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1つのオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供される

10

20

30

40

50

キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、ただ1つのオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、ただ1つのオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、2個以上のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、かかる組成物を使用して、提供される方法は、2個以上の標的を標的化することができる。一部の実施形態では、2個以上のオリゴヌクレオチド型を含むPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、2個以上の標的を標的化する。一部の実施形態では、2個以上のオリゴヌクレオチド型を含むPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、2個以上のミスマッチを標的化する。一部の実施形態では、単一のオリゴヌクレオチド型が2個以上の標的、例えば突然変異などを標的化する。一部の実施形態では、1つのオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドの標的領域は、例えば2個の突然変異またはSNPなど、2個以上の「標的部位」を含む。

10

【1258】

一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドは、任意で修飾塩基または修飾糖を含む。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、いずれの修飾塩基も修飾糖も有さない。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、いずれの修飾塩基も有さない。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドは、修飾塩基と修飾糖を含む。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドは、修飾塩基を含む。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のオリゴヌクレオチドは、修飾糖を含む。オリゴヌクレオチドに対する、修飾塩基及び修飾糖は当分野に広く公知であり、限定されないが、本開示に記載されるものが挙げられる。一部の実施形態では、修飾塩基は、5-mCである。一部の実施形態では、修飾糖は、2'-修飾糖である。オリゴヌクレオチド糖の適した2'-修飾は、当業者に広く知られている。一部の実施形態では、2'-修飾としては、限定されないが、2'-O¹Rが挙げられ、式中、R¹は水素ではない。一部の実施形態では、2'-修飾は、2'-O¹Rであり、式中、R¹は任意で置換されるC₁₋₆の脂肪族である。一部の実施形態では、2'-修飾は、2'-MOEである。一部の実施形態では、修飾は、2'-ハロゲンである。一部の実施形態では、修飾は、2'-Fである。一部の実施形態では、修飾塩基または修飾糖は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の活性、安定性、及び／または選択性をさらに強化することができ、その骨格キラル中心の共通パターンは、予想外の活性、安定性、及び／または選択性を提供する。

20

30

【1259】

一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、いずれの修飾糖も有さない。一部の実施形態では、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、いずれの2'-修飾糖も有さない。一部の実施形態では、本開示は驚くべきことに、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を使用することにより、安定性、活性、及び／または切断パターンの制御に修飾糖は必須ではないことを明らかとした。さらに一部の実施形態では、本開示は驚くべきことに、修飾糖を有さないオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、安定性、活性、ターンオーバー、及び／または切断パターンの制御という観点で、より優れた特性をもたらすことを明らかとした。例えば一部の実施形態では驚くべきことに、修飾糖を有さないオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、修飾糖を有するオリゴヌクレオチドの組成物よりも、より迅速に切断産物から解離し、大幅に高いターンオーバーをもたらすことが明らかとなった。

40

【1260】

本明細書に詳細に考察されるように、本開示はとくに、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物、つまり少なくとも1つの型のオリゴヌクレオチドを複数含む組成物を提供

50

する。特定の「型」の各オリゴヌクレオチド分子は、以下の点に関し、前もって選択された（例えば所定の）構造要素から構成される：（１）塩基配列、（２）骨格結合パターン、（３）骨格キラル中心のパターン、及び（４）骨格P-修飾部分のパターン。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、単一の合成プロセスで調製されるオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供される組成物は、単一のオリゴヌクレオチド分子内に２個以上のキラル立体配置を有するオリゴヌクレオチドを含む（例えば、オリゴヌクレオチドに沿って異なる残基が異なる立体化学を有する）。一部のかかる実施形態では、かかるオリゴヌクレオチドは、単一の合成プロセスで取得することができ、２個以上のキラル立体配置を有する個々のオリゴヌクレオチド分子を生成するための第２の複合体化ステップは必要ない。

10

【1261】

本明細書に提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖RNAi剤として使用することができる。加えて、本明細書に提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、研究目的及び／または診断目的の試薬として使用することができる。当業者であれば、本明細書の本開示が、特定の用途に限定されず、合成オリゴヌクレオチドの使用が望ましい任意の状況に応用可能であることを容易に認識するであろう。とくに提供される組成物は、様々な治療応用、診断応用、農学的応用、及び／または研究応用に有用である。

【1262】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に詳述される１個以上の構造的修飾を含むオリゴヌクレオチド組成物及び／またはその残基を含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、１個以上の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、１個以上の人工の核酸または残基を含むオリゴヌクレオチドを含み、人工の核酸または残基としては、限定されないが、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ及びロックド核酸（LNA）、グリコン核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、ゼノ核酸（XNA）、マニトール核酸（MNA）、アニトール核酸（ANA）、及びF-HNA、ならびにそれらの任意の組み合わせが挙げられる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、Braasch et al., 2002 Biochem. 41:4503-4510、または米国特許第5,698,685号、同第5,166,315号、同第5,185,444号、もしくは同第5,034,506号に記載されているもののようなモルホリノを含む。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、米国特許第8,088,904号、同第8,440,803号、もしくは同第8,796,437号、またはWO2017/011276に記載されているもののようなF-HNAを含む。修飾糖を含む様々な修飾ヌクレオチドは、例えば、WO2016/154096及びWO2016/141236に記載されている。

20

30

【1263】

いずれの実施形態においても、本開示は、遺伝子発現、免疫反応等のオリゴヌクレオチドに基づく調節に有用である。したがって、本開示の立体的に規定されるオリゴヌクレオチド組成物は、所定の型の（即ち、キラル制御されており、任意でキラル的に純粋である）オリゴヌクレオチドを含むものであり、従来の立体不規則的またはキラル的に不純な相当物の代わりに使用され得る。一部の実施形態では、提供される組成物は、目的の効果の強化及び／または望ましくない副作用の低減を示す。本開示の生物学的用途及び臨床的／治療的な応用のある特定の実施形態を、以下に明示的に検討する。

40

【1264】

様々な投与計画を利用して、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を投与してもよい。一部の実施形態では、複数単位用量が、時間の間隔をあけて投与される。一部の実施形態では、所与の組成物は推奨される投与計画を有しており、当該計画には１回以上の投与が含まれ得る。一部の実施形態では、投与計画は複数の投与を含み、その各々が、同じ長さの期間により互いに分離される。一部の実施形態では、投与計画は、複数の投与と、個々の投与を分ける少なくとも２つの異なる期間を含む。一部の実施形態で

50

は、投与計画内のすべての投与量は、同じ単位用量である。一部の実施形態では、投与計画内の異なる投与量は、異なる量である。一部の実施形態では、投与計画は、1番目の投与量で1回目の投与、その後に1番目の投与量とは異なる2番目の投与量で、1回以上の追加の投与が行われる。一部の実施形態では、投与計画は、1番目の投与量で1回目の投与、その後に1番目の投与量（または別の前投与量）と同じ、または異なる2番目の投与量（または継続投与量）で、1回以上の追加の投与が行われる。一部の実施形態では、投与計画は、少なくとも1日間、少なくとも1つの単位用量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、少なくとも1日、場合により2日以上の間隔にわたり、2以上の投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、少なくとも週の間隔にわたり、複数用量を投与することを含む。一部の実施形態では、期間は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40以上（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100以上）週である。一部の実施形態では、投与計画は、1週を越える期間、1週当たり1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40以上（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100以上）週の間、1週当たり、1つの投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、2週間を越える間、2週ごとに1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40以上（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100以上）週の間隔にわたり、2週ごとに1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、1カ月間、1月当たり1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、1カ月を越える間、1月当たり1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月以上の間、1月当たり1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、約10週間、1週当たり1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、約20週間、1週当たり1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、約30週間、1週当たり1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、投与計画は、約26週間、1週当たり1投与量を投与することを含む。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、投与計画に従って投与され、当該投与計画は、同じ配列のキラル制御されていない（例えば、立体不規則的な）オリゴヌクレオチド組成物、及び／または同じ配列の異なるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物に対し利用されるものとは異なる。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、投与計画に従って投与され、当該投与計画は、所与の単位時間にわたる総暴露レベルの低下を達成させた点、1つ以上のより少ない単位用量を含む点、及び／または所与の単位時間にわたる投与回数がより少ないという点で、同じ配列のキラル制御されていない（例えば、立体不規則的な）オリゴヌクレオチド組成物と比較して減少している。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、投与計画に従って投与され、当該投与計画は、同じ配列のキラル制御されていない（例えば、立体不規則的な）オリゴヌクレオチド組成物よりも長い期間に延長されている。学説に拘束されることは望まないが、出願人は、一部の実施形態において、短い投与計画、及び／または投与間隔がより長期間であることは、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の安定性、生体利用効率、及び／または有効性の改善に起因し得ると注記する。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、対応するキラル制御されてい

10

20

30

40

50

いオリゴヌクレオチド組成物と比較し、長い投与計画を有する。一部の実施形態では、P N P L A 3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤は、対応するキラル制御されていないオリゴヌクレオチド組成物と比較して、少なくとも2回の投与の間隔が短い。学説により限定されることは望まないが、一部の実施形態では、長い投与計画、及び／または投与間隔が短期間であることは、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の安全性の改善に起因し得ると出願人は注記する。

【1265】

一部の実施形態では、送達（及びその他の特性）の改善に伴い、提供される組成物は、例えば臨床効果などの生物学的効果を達成するために低い用量で、及び／または低い頻度で投与され得る。

【1266】

単回投与は、様々な量のオリゴヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、単回投与は、ある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を、用途に適し、望ましい場合には、様々な量で含み得る。一部の実施形態では、単回投与は、約1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300以上（例えば、約350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000以上）mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約1mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約5mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約10mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約15mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約20mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約50mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約100mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約150mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約200mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約250mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、単回投与は、約300mgのある型のキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも少量の単回投与で、及び／または少量の総投与で、投与される。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも有効性が改善されたことによって少量の単回投与で、及び／または少量の総投与で、投与される。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも多い量の単回投与で、及び／または多い量の総投与で、投与される。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも安全性が改善されたことによって多い量の単回投与で、及び／または多い量の総投与で、投与される。

【1267】

生物活性オリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、本開示は、一本鎖RNAi剤として機能する能力を有するオリゴヌクレオチドを包含する。

【1268】

一部の実施形態では、提供される組成物は、構造遺伝子、遺伝子制御領域及び／もしくは遺伝子末端領域、ならびに／または例えばウイルスもしくはプラスミドDNAなどの自己複製系の鎖に対して、完全または部分的に相補的なオリゴヌクレオチドを1個以上含む。一部の実施形態では、提供される組成物は、RNAi剤または他のRNA干渉試薬（R

NAi 剤または iRNA 剤)、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、自己開裂 RNA、リボザイム、その断片及び／またはそのバリエーション（例えば、ペプチジルトランスフェラーゼ 23S rRNA、RNase P、グループ I 及びグループ II イントロン、GIR1 分岐リボザイム、レッドザイム、ヘアピンリボザイム、ハンマーヘッド型リボザイム、HDV リボザイム、哺乳類 CPEB3 リボザイム、VS リボザイム、glmS リボザイム、CoTC リボザイム等）、マイクロ RNA、マイクロ RNA 模倣物、スーパーマイクロ RNA、アプタマー、抗マイクロ RNA、アンタゴマイクロ RNA、U1 アダプター、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、RNA アクチベーター、長鎖非コーディング RNA、短鎖非コーディング（例えば、piRNAs）、免疫調節性オリゴヌクレオチド（例えば免疫刺激性オリゴヌクレオチド、免疫阻害性オリゴヌクレオチド）、GNA、LNA、ENA、PNA、TNA、モルホルノ、G-四重鎖（RNA 及び DNA）、抗ウイルスオリゴヌクレオチド、ならびにデコイオリゴヌクレオチドである、またはそのようなものとして作用する、1 個以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1269】

一部の実施形態では、提供される組成物は、1 個以上のハイブリッド（例えばキメラ）オリゴヌクレオチドを含む。本開示の文脈において、「ハイブリッド」という用語は広く、オリゴヌクレオチドの混合された構造構成要素を指す。ハイブリッドオリゴヌクレオチドとは、例えば（1）ヌクレオチドの混合クラスを有する PNPLA3 オリゴヌクレオチド分子、例えば単一分子内の部分 DNA 及び部分 RNA（例えば DNA-RNA）、（2）異なるクラスの核酸の相補的ペアであり、それにより例えば分子内または分子間またはその両方で DNA:RNA 塩基対形成が発生する、（3）2 種以上の骨格結合またはヌクレオチド間結合を伴う PNPLA3 オリゴヌクレオチドを指す場合がある。

【1270】

一部の実施形態では、提供される組成物は、単一分子内に 2 以上のクラスの核酸残基を含むオリゴヌクレオチドを 1 個以上含む。例えば本明細書に記載される実施形態のいずれかにおいて、PNPLA3 オリゴヌクレオチドは、DNA 部分と RNA 部分を含有してもよい。一部の実施形態では、PNPLA3 オリゴヌクレオチドは、非修飾部分と修飾部分を含有してもよい。

【1271】

提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、例えば本明細書に記載されるものなどの様々な修飾のうちのいずれかを含むオリゴヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、例えば意図される用途の点から、特定の修飾が選択される。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチド（または一本鎖オリゴヌクレオチドの二本鎖部分）の 1 つの鎖または両方の鎖が修飾されることが望ましい。一部の実施形態では、当該 2 つの鎖（または部分）は、異なる修飾を含む。一部の実施形態では、当該 2 つの鎖は、同じ修飾を含む。当業者は、本発明の方法によって可能となる修飾の程度及び種類により、修飾の多数の再配置が実行可能であることを認識するであろう。かかる修飾の例を本明細書に記載するが、限定を意味しない。

【1272】

本明細書において使用される場合、「アンチセンス鎖」という表現は、対象の標的配列に対し実質的に、または 100% 相補的な PNPLA3 オリゴヌクレオチドを指す。「アンチセンス鎖」という表現は、2 つの別々の鎖から形成されるオリゴヌクレオチドの両方のアンチセンス領域、及びヘアピンまたはダンベル型構造を形成する能力を有する単分子オリゴヌクレオチドを含む。siRNA などの二本鎖 RNAi 剤に関して、アンチセンス鎖は、RISC に優先的に組み込まれる鎖であり、RNA 標的の RISC 介在性ノックダウンを標的とする。二本鎖 RNAi 剤に関して、「アンチセンス」及び「ガイド鎖」という用語は本明細書において相互交換可能に使用され、「センス鎖」または「パッセンジャー鎖」という用語は、アンチセンス鎖ではない鎖に関して、本明細書において相互交換可能に使用される。

【1273】

「センス鎖」という用語は、例えばメッセンジャーRNAまたはDNA配列などの標的配列と、全体的または部分的に同じヌクレオチド配列を有するPNPLA3オリゴヌクレオチドを指す。

【1274】

「標的配列」とは、その発現または活性が調節される任意の核酸配列を意味する。標的核酸は、DNAまたはRNA、例えば、内因性DNAもしくはRNA、ウイルスDNAもしくはウイルスRNA、または遺伝子、ウイルス、細菌、真菌、哺乳類、もしくは植物によってコードされる他のRNAであり得る。一部の実施形態では、標的配列は、疾患または障害と関連する。RNA干渉及びRNase H介在性ノックダウンに関して、標的配列は、一般に、RNA標的配列である。

10

【1275】

「特異的にハイブリダイズすることができる」及び「相補的」とは、核酸が、古典的なワトソンクリックまたは他の非古典的な型のいずれかによって、別の核酸配列と水素結合を形成することができることを意味する。本開示の核酸分子と関連して、核酸分子とその相補性配列の結合自由エネルギーは、核酸の関連機能、例えばRNAi活性などを進行させるために充分である。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は当分野において公知である（例えば、Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LIT pp. 123-133、Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83: 9373-9377、Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-3785を参照のこと）。

20

【1276】

相補性のパーセントは、第2の核酸配列との水素結合（例えば、ワトソンクリック塩基対）を形成することができる核酸分子中の連続する残基のパーセンテージを示す（例えば、10個のうち5、6、7、8、9、10個であれば、50%、60%、70%、80%、90%、及び100%相補性である）。「完全に相補的」または100%相補的とは、核酸配列のすべての連続残基が、第2の核酸配列中の同数の連続残基と水素結合を形成するであろうことを意味する。完全相補的未満とは、2つの鎖のヌクレオシド単位の一部、但しすべてではない、が互いに水素結合を形成できる状態を意味する。「実質的に相補的」とは、非相補的であるように選択される、例えばオーバーハングのようなポリヌクレオチド鎖の領域を除いて、90%以上の相補性を示すポリヌクレオチド鎖を指す。特異的結合は、特異的結合が望ましい条件下、例えばin vivoアッセイまたは治療的処置の場合、またはin vitroアッセイの場合などの生理学的条件下、アッセイが行われる条件下で、オリゴマー化合物の非標的配列への非特異的結合を避けるために十分な程度の相補性を必要とする。一部の実施形態では、非標的配列は、対応する標的配列と少なくとも5個のヌクレオチドが異なる。

30

【1277】

治療として使用されるとき、提供されるオリゴヌクレオチドは、医薬組成物として投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、提供されるオリゴヌクレオチドまたはその薬学的許容可能な塩の治療有効量と、薬学的に許容可能な希釈剤、薬学的に許容可能な賦形剤、及び薬学的に許容可能な担体から選択される薬学的に許容可能な不活性成分を少なくとも1つ含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、静脈注射、経口投与、口腔投与、吸入、鼻腔内投与、局所投与、眼投与または耳投与に対し、製剤化される。さらなる実施形態では、医薬組成物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、吸入剤、点鼻液剤、坐剤、懸濁剤、ゲル剤、コロイド剤、分散剤、懸濁剤、溶液、乳剤、軟膏、ローション、点眼剤または点耳剤である。

40

【1278】

医薬組成物

治療として使用されるとき、本明細書に記載の提供されるオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド組成物は、医薬組成物として投与される。一部の実施形態では、医薬組

50

成物は、提供されるオリゴヌクレオチドまたはその薬学的許容可能な塩の治療有効量と、薬学的に許容可能な希釈剤、薬学的に許容可能な賦形剤、及び薬学的に許容可能な担体から選択される薬学的に許容可能な不活性成分を少なくとも1つ含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、静脈注射、経口投与、口腔投与、吸入、鼻腔内投与、局所投与、眼投与または耳投与に対し、製剤化される。一部の実施形態では、医薬組成物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、吸入剤、点鼻液剤、坐剤、懸濁剤、ゲル剤、コロイド剤、分散剤、懸濁剤、溶液、乳剤、軟膏、ローション、点眼剤または点耳剤である。

【1279】

一部の実施形態では、本開示は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド、または薬学的に許容可能な賦形剤と混合したその組成物を含む医薬組成物を提供する。当業者であれば、医薬組成物は、上記の該キラル制御されたオリゴヌクレオチドの薬学的に許容可能な塩、またはその組成物を含むことを認識するだろう。

【1280】

様々な超分子ナノ担体を使用して、核酸を送達することができる。ナノ担体の例としては、リポソーム、カチオン性ポリマー複合体及び様々な高分子が挙げられるが、これらに限定されない。様々なポリカチオンと核酸の複合体形成は、細胞内送達のための別のアプローチ法である。これには、PEG化ポリカチオン、ポリエチレンアミン（PEI）複合体、カチオン性ブロックコポリマー、及びデンドリマーの使用が挙げられる。PEI及びポリアミドアミンデンドリマーを含むいくつかのカチオン性ナノ担体は、エンドソームからの内容物の放出を助ける。他の手法には、ポリマーナノ粒子、ミクロスフェア、リポソーム、デンドリマー、生分解性ポリマー、複合体、プロドラッグ、硫黄または鉄などの無機コロイド、抗体、インプラント、生分解性インプラント、生分解性ミクロスフェア、浸透圧制御インプラント、脂質ナノ粒子、エマルジョン、油性溶液、水溶液、生分解性ポリマー、ポリ（ラクチド-コグリコール酸）、ポリ（乳酸）、液体デポー、ポリマーミセル、量子ドット及びリポプレックスの使用が含まれる。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドは、別の分子と複合体化される。

【1281】

本明細書に記載の例示的送達戦略に加え、さらなる核酸送達戦略が公知である。

【1282】

治療及び／または診断応用において、本開示化合物は、全身投与及び局所投与または局的投与を含む様々な投与方法用途で製剤化され得る。技術及び製剤は概して、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed. 2000)に見出すことができる。

【1283】

提供されるオリゴヌクレオチド、及びその組成物は、広い用量範囲に渡って有効である。例えば成人の治療においては、1日当たり約0.01～約1000mg、約0.5～約100mg、約1～約50mg、及び1日当たり約5～約100mgの用量が、使用され得る用量例である。正確な用量は、投与経路、化合物が投与される形態、被治療対象、被治療対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するだろう。

【1284】

薬学的に許容可能な塩は概して当業者に公知であり、例えば、酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ベシル酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、重酒石酸塩、臭化物、エデト酸カルシウム、カルンシレート（carnsylate）、炭酸塩、クエン酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、エシレート、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニレート、ヘキシルレゾルシン酸塩、ヒドラバミン、臭化水素酸塩、塩化水素酸塩、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、粘液酸塩、ナプシル酸塩、硝酸塩、パモ酸塩（エンボン酸塩）、パントテン酸塩、リン酸塩／ニリン酸塩、ポリガラクトツロ酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、塩基性酢酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、またはテオクル酸塩が挙げられるが、これに限定

されない。他の薬学的に許容可能な塩は、例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)に見出され得る。好ましい薬学的に許容可能な塩としては、例えば、酢酸塩、安息香酸塩、臭化物、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、臭化水素酸塩、塩化水素酸塩、マレイン酸塩、メシル酸塩、ナブシル酸塩、パモ酸塩（エンボン酸塩）、リン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、または酒石酸塩が挙げられる。

【1285】

一部の実施形態では、提供される一本鎖RNA i 剤は、米国特許出願第61/774759号、2013年12月19日に出願された同第61/918,175号、同第61/918,927号、同第61/918,182号、同第61/918941号、同第62/025224号、同第62/046487号、または国際出願第PCT/US04/042911号、同第PCT/EP2010/070412号、もしくは同第PCT/IB2014/059503号に記載されている医薬組成物に製剤化される。

10

【1286】

治療される特定の状態に依存して、かかる剤は、液または固形の剤形で製剤化され、全身的にまたは局所的に投与され得る。剤は、例えば、当業者に公知の時限的または持続的な低放出形態で送達され得る。製剤及び投与の技術は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)に見出される。適切な経路としては、経口、口腔、吸入スプレー、舌下、直腸内、経皮、経膈、経粘膜、経鼻または経腸投与が挙げられ、筋肉内、皮下、髄内注射、ならびにくも膜下腔内、直接的脳（心）室内、静脈内、関節内、胸骨内、髄液包内、肝内、病巣内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内、もしくは眼内注射を含む非経口送達、または他の送達方法が挙げられ得る。

20

【1287】

注射用では、本発明の剤は、例えばハanks液、リンゲル溶液、または生理食塩水などの生理的に適合した緩衝液中などの水溶液中に製剤化及び希釈され得る。かかる経粘膜投与用では、浸透される関門に適切な浸透剤が、製剤に使用される。かかる浸透剤は概して、当分野で公知である。

【1288】

全身投与に適切な剤型内に、本発明の実施のために本明細書に開示された化合物を製剤化するための薬学的に許容可能な不活性担体の使用は、本発明の範囲内である。担体の適切な選択及び適切な製造を実施することで、本発明の組成物、特に溶液として製剤化された組成物は、例えば静脈内注射などの非経口投与が可能となる。

30

【1289】

化合物は、当技術分野に公知の薬学的に許容可能な担体を使用して、経口投与用途に適した剤型内に容易に製剤化される能力を有する。かかる担体は、本開示化合物を、被治療対象（例えば、患者）の経口摂取用途の錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとしての処方を可能にする。

【1290】

経鼻または吸入送達用途では、本開示の剤は、当業者に公知の方法により製剤化することもでき、例えば、生理食塩水などの可溶化、希釈、または分散物質、ベンジルアルコールなどの保存剤、吸収促進剤、及びフッ化炭素の例が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【1291】

ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド及び組成物は、CNSに送達される。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド及び組成物は、脳脊髄液に送達される。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド及び組成物は、脳実質に投与される。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド及び組成物は、髄腔内投与または脳室内投与によって動物／対象に送達される。中枢神経系内における、本明細書に記述されるオリゴヌクレオチド及び組成物の広汎な分布は、実質内投与、髄腔内投与または脳室内投与により実現

50

されてもよい。

【1292】

ある特定の実施形態では、非経口投与は、例えば、シリンジ、ポンプなどによる注入による。ある特定の実施形態では、注入はボーラス注入である。ある特定の実施形態では、注入剤は、例えば線条体、尾状核、皮質、海馬及び小脳などの組織に直接投与される。

【1293】

ある特定の実施形態では、ボーラス注入によるなど、医薬品を特異的に局在させる方法は、半数効果濃度（EC50）を20分の1、25分の1、30分の1、35分の1、40分の1、45分の1または50分の1にまで低下させる。ある特定の実施形態では、本明細書にさらに記述されるアンチセンス化合物中の医薬品。ある特定の実施形態において、標的組織は脳組織である。ある特定の実施形態において、標的組織は線条体組織である。ある特定の実施形態では、EC50を低下させることが望ましいが、その理由は、それを必要とする患者において薬理学的な結果を得るのに必要な投与量を減少させるからである。

10

【1294】

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1カ月毎、2カ月毎、90日毎、3カ月毎、6カ月毎に1回、1年に2回または1年に1回注入または点滴することにより送達される。

【1295】

本発明の使用に適切な医薬組成物としては、活性成分がその意図される目的を達成するために有効な量で含有される組成物が挙げられる。有効な量の決定は、特に、本明細書で提供される詳細な開示に照らすことで、当業者の能力の範囲内にある。

20

【1296】

活性成分に加えて、これらの医薬組成物は、薬学的に使用され得る調製物中に、活性化化合物のプロセッシングを促進する賦形剤及び助剤を含む適切な薬学的に許容可能な担体を含み得る。経口投与用途に製剤化された調製物は、錠剤、糖衣剤、カプセル剤、または溶液の形態であってもよい。

【1297】

経口使用のための医薬調製物は、活性剤と固形賦形剤を混合し、任意で得られた混合物を粉砕し、及び当該顆粒混合物を処理して、適切な助剤を添加後、望ましい場合には、錠剤または糖衣剤コアを得ることで取得可能である。適切な賦形剤は、特に、ラクトース、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース（CMC）ナトリウム、及び／またはポリビニルピロリドン（PVP：ポビドン）などの充填剤である。望ましい場合には、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくは例えばアルギン酸ナトリウムなどのその塩など、崩壊剤が添加され得る。

30

【1298】

糖衣剤コアは、適切なコーティングと一緒に提供される。この目的に対し、高濃度糖溶液が使用され得、これは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール（PEG）、及び／または二酸化チタン、ラッカー液、ならびに適切な有機溶媒または溶媒混合物を任意で含有してもよい。色素または顔料が、異なる組み合わせの活性化化合物投与を識別または特徴付けするために、錠剤または糖衣剤コーティングに添加され得る。

40

【1299】

経口的に使用され得る医薬調製物としては、ゼラチン、及び例えばグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤で製造される密封軟カプセル剤、ならびにゼラチンで製造されたプッシュフィットカプセル剤が挙げられる。プッシュフィットカプセル剤は、例えばラクトースなどの充填剤、例えばデンプンなどの結合剤、及び／または例えばタルクもしくは

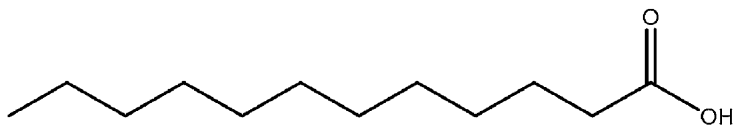
50

はステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、及び任意で安定剤との混合物中で、活性成分を含み得る。軟カプセル剤中、活性化合物は、例えば脂肪油、流動パラフィンまたは液体ポリエチレングリコール（PEG）などの適切な液体中に溶解または懸濁され得る。加えて、安定剤が添加され得る。

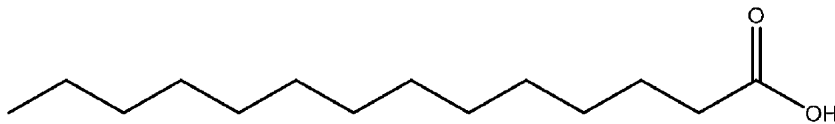
【1300】

組成物は、活性化合物を脂質と組み合わせることによって得ることができる。一部の実施形態では、脂質は、活性化合物に複合体化される。一部の実施形態では、脂質は、活性化合物に複合体化されない。一部の実施形態では、脂質は、 $C_{10}-C_{40}$ の直鎖状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含む。一部の実施形態では、脂質は、1つ以上の C_{1-4} 脂肪族基で任意で置換される、 $C_{10}-C_{40}$ の直鎖状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含む。一部の実施形態では、脂質は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸及びジリノレイルからなる群から選択される。一部の実施形態では、脂質は、以下のいずれかの構造を有する：

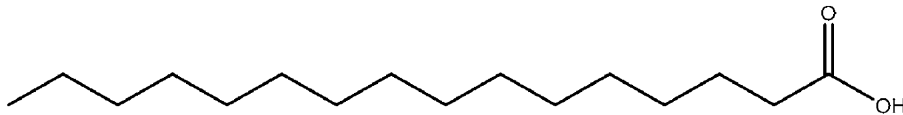
【化216】



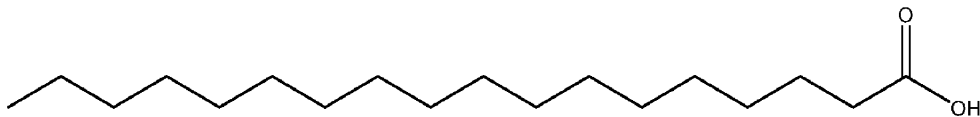
Lauric acid



Myristic Acid

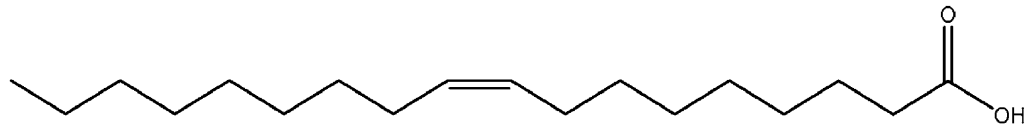


Palmitic Acid

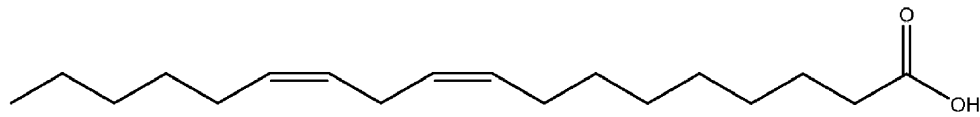


Stearic Acid

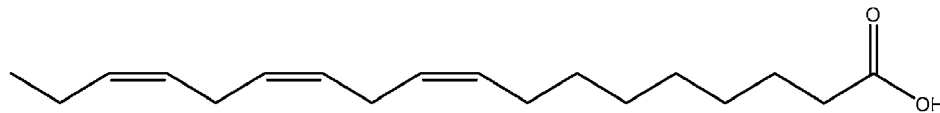
【化 2 1 7】



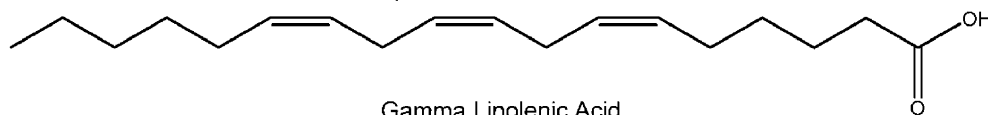
Oleic Acid



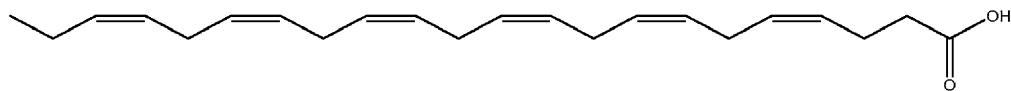
Linoleic acid



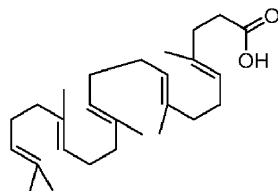
Alpha Linolenic Acid



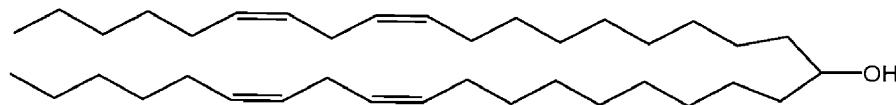
Gamma Linolenic Acid



Docosahexaenoic acid



Turbinaric acid



Dilinoleyl alcohol

一部の実施形態では、活性化合物は、本明細書に記載される任意のオリゴヌクレオチドまたは他の核酸である。一部の実施形態では、活性化合物は、表 1 A に列記される任意の核酸の任意の配列を含むか、またはそれからなる配列の核酸である。一部の実施形態では、組成物は、脂質及び活性化合物を含み、別の脂質、及び標的化合物または部分から選択される別の構成成分をさらに含む。一部の実施形態では、脂質には、限定するものではないが、以下が含まれる：アミノ脂質、両親媒性脂質、アニオン性脂質、アポリポタンパク質、カチオン性脂質、低分子量カチオン性脂質、CLiNDMA及びDLiNDMAなどのカチオン性脂質、イオン化可能なカチオン性脂質、クローキング構成成分、ヘルパー脂質、リポペプチド、中性脂質、中性双性イオン脂質、疎水性小分子、疎水性ビタミン、PEG脂質、1つ以上の親水性ポリマーで修飾された非電荷脂質、リン脂質、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミンなどのリン脂質、ステルス脂質、ステロール、コレステロール、及び標的化脂質、ならびに本明細書に記載されるまたは当分野で報告されている任意の他の脂質。一部の実施形態では、組成物は、脂質と、別の脂質の少なくとも1つの機能を介在する能力を有する別の脂質の一部とを含む。一部の実施形態では、標的化合物または部分は、化合物（例えば、脂質及び活性化合物を含む組成物）を特定の細胞もしくは組織または細胞もしくは組織のサブセットに標的化する能力

を有する。一部の実施形態では、標的化部分は、特定の標的、受容体、タンパク質、または他の細胞内構成要素の細胞特異的発現または組織特異的発現の利点を利用するように設計される。一部の実施形態では、標的化部分は、組成物を細胞もしくは組織に標的化し、及び／または標的、受容体、タンパク質、もしくは他の細胞内構成要素に結合する、リガンド（例えば、小分子、抗体、ペプチド、タンパク質、炭水化物、アプタマーなど）である。

【1301】

活性化化合物の送達のための組成物の調製に使用されるある特定の例示的な脂質は、活性化化合物の機能を可能にする（例えば、妨害したり干渉したりしない）。脂質の非限定的な例としては、以下が挙げられる：ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸及びジリノレイル。

【1302】

本開示に記載されるように、脂質複合体化、例えば脂肪酸との複合体化は、オリゴヌクレオチドの1つ以上の特性を改善し得る。

【1303】

一部の実施形態では、活性化化合物の送達のための組成物は、所望に応じて、活性化化合物を特定の細胞または組織に標的化する能力を有する。一部の実施形態では、活性化化合物の送達のための組成物は、活性化化合物を筋細胞または筋組織に標的化する能力を有する。一部の実施形態では、本開示は、活性化化合物の送達に関連する組成物及び方法に関し、ここで、組成物は、活性化化合物 脂質を含む。筋細胞または筋組織に対する様々な実施形態では、脂質は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸及びジリノレイルからなる群から選択される。使用される脂質の例としては、ステアリン酸、オレイン酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、シス-DHA、ツルビナル酸及びジリノレイル酸が挙げられる。これらの表において、「TBD」は、特定の組成物が送達に効果的であるが、数値結果が標準範囲外であったため、最終結果は未定のままであることを示す。しかしながら、表で「TBD」と示される組成物は、活性化化合物の送達に有効であった。

【1304】

活性化化合物と、ステアリン酸、オレイン酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、シス-DHAまたはツルビナル酸のいずれかとを含む組成物は、活性化化合物を腓腹筋組織に送達することができた。活性化化合物と、ステアリン酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、シス-DHAまたはツルビナル酸のいずれかとを含む組成物は、活性化化合物を心筋組織に送達することができた。活性化化合物と、ステアリン酸、オレイン酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、シス-DHAまたはツルビナル酸のいずれかとを含む組成物は、活性化化合物を大腿四頭筋組織に送達することができた。活性化化合物と、ステアリン酸、オレイン酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、シス-DHAまたはツルビナル酸のいずれかとを含む組成物は、活性化化合物を腓腹筋組織に送達することができた。活性化化合物と、ステアリン酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、シス-DHAまたはツルビナル酸のいずれかとを含む組成物は、活性化化合物を心筋組織に送達することができた。活性化化合物と、ジリノレイル、ステアリン酸、オレイン酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、シス-DHAまたはツルビナル酸のいずれかとを含む組成物は、活性化化合物を隔壁膜筋組織に送達することができた。

【1305】

したがって：ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸及びジリノレイルから選択される脂質と、活性化化合物とを含む組成物は、活性化化合物を肝臓以外の細胞及び組織、例えば、筋細胞及び組織に送達する能力を有する。

【1306】

治療または予防される特定の状態または疾患状態に依存して、当該状態を治療または予防するために通常に投与される追加の治療剤を、本開示のオリゴヌクレオチドと一緒に投与してもよい。例えば、化学療法剤または他の抗増殖剤を本開示のオリゴヌクレオチドと組み合わせて、増殖性疾患及びがんを治療してもよい。公知の化学療法剤の例としては、アドリマイシン、デキサメタゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、トポテカン、タキソール、インターフェロン類、及び白金誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【1307】

使用例

一部の実施形態では、本開示は、脂質とPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤を含む組成物の使用を包含する。一部の実施形態では、本開示は、提供される組成物を投与することを含む、標的位置にPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤を送達するための方法を提供する。一部の実施形態では、提供される方法は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤を細胞に送達する。一部の実施形態では、提供される方法は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤を筋細胞に送達する。一部の実施形態では、提供される方法は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤を組織内の細胞に送達する。一部の実施形態では、提供される方法は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤を臓器内の細胞に送達する。一部の実施形態では、提供される方法は、対象内の細胞中にPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤を送達し、当該対象に提供される組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、提供される方法は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤を細胞質内に送達する。一部の実施形態では、提供される方法は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤を核内に送達する。

【1308】

一部の実施形態では、本開示は、細胞もしくは組織、または哺乳類（例えば、ヒト対象）内の細胞もしくは組織へのPNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤の送達に関係する方法に関し、当該方法は、生物活性剤及び脂質、以下から選択される1つ以上の追加の構成要素を含む組成物の使用に関する：ポリヌクレオチド、染料、挿入剤（例えばアクリジン）、架橋剤（例えばソラレンまたはマイトマイシンC）、ポルフィリン（例えばTPPC4、テキサフィリンまたはサフィリン）、多環芳香族炭化水素（例えばフェナジンまたはジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ、キレート剤、EDTA、アルキル化剤、リン酸塩、アミノ、メルカプト、PEG（例えばPEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカー、酵素、ハプテン（例えばビオチン）、輸送／吸収促進剤（例えばアスピリン、ビタミンE、または葉酸）、合成リボヌクレアーゼ、タンパク質、例えば糖タンパク質、もしくはペプチド、例えば共リガンドに対する特異的アフィニティを有する分子、もしくは抗体、例えば抗体、ホルモン、ホルモン受容体、非ペプチド種、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、または薬剤。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤と、C₁₀-C₆₀直鎖状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含む脂質とを含む組成物に関連する、組成物または方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNAi剤と、1つ以上のC₁-4脂肪族基で任意で置換される、C₁₀-C₆₀直鎖状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含む脂質とを含む組成物に関連する、組成物または方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物と、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファリノレン酸、ガンマーリノレン酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸及びジリノレイルからなる群から選択される脂質とを提供し、ここで、組成物は、哺乳類（例えば、ヒト対象）の筋細胞もしくは筋組織、または筋細胞もしくは筋組織へのオリゴヌクレオチドの送達に好適である。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドまたは一本鎖RNA i 剤は、1つ以上のキラルヌクレオチド間結合を含むPNPLA3オリゴヌクレオチドであり、及び提供される組成物は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤である。一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、1つ以上のキラルヌクレオチド間結合を含むPNPLA3オリゴヌクレオチドであり、提供される組成物は、オリゴヌクレオチドの非キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物である。

【1309】

一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤を細胞または組織に送達する方法に関し、ここで、方法は、以下のステップを含む：PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤と脂質とを含む組成物を提供すること、及び細胞または組織を組成物と接触させること。一部の実施形態では、本開示は、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤を対象に投与する方法に関し、ここで、方法は、以下のステップを含む：PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤と脂質とを含む組成物を提供すること、及び組成物を対象に投与すること。一部の実施形態では、脂質は、C₁₀–C₆₀の直鎖状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含む。一部の実施形態では、脂質は、1つ以上のC₁–₄脂肪族基で任意で置換される、C₁₀–C₆₀の直鎖状の飽和脂肪族鎖または部分不飽和脂肪族鎖を含む。一部の実施形態では、脂質は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファーリノレン酸、ガンマーリノレン酸、ドコサヘキサエン酸（シス–DHA）、ツルピナル酸及びジリノレイルからなる群から選択される。

【1310】

一部の実施形態では、PNPLA3オリゴヌクレオチドまたは一本鎖RNA i 剤は、その配列が細胞核酸中の標的要素に対し実質的に相補的な要素であるか、またはそれを含む、PNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的要素は、筋肉の疾患、障害、または状態に関連する配列要素であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、筋肉の疾患、障害または状態は、DMDである。一部の実施形態では、細胞核酸は、転写産物であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、細胞核酸は、一次転写産物であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、細胞核酸は、ゲノム核酸あるか、またはそれを含む。本開示は、ある特定の脂質及び他の化合物が、例えば、哺乳類またはヒト対象内の細胞及び組織への一本鎖RNA i 剤の送達に有用であるという認識を包含する。そのような剤を送達するための多くの技術には、望ましい細胞または組織に標的化することができないという難点があり得る。

【1311】

肝臓外の組織に一本鎖RNA i 剤を送達することは、未だ困難である。Julianoは、臨床レベルでの進化にもかかわらず、*in vivo*で、特に肝臓部位外でオリゴヌクレオチドを効率的に送達するのは未だ大きな課題であると報告している。Juliano 2016 Nucl. Acids Res. Doi:10.1093/nar/gkw236。Louも、肝臓外の臓器にRNA i 剤を送達することは、疾患宿主に対する技術を使用することの未だ最も大きなハードルであると報告している。Lou 2014 SciBX 7 (48)、doi:10.1038/scibx.2014.1394。

【1312】

本開示は、ある特定の脂質及び他の化合物が、非限定的な例で筋細胞及び筋組織を含む、肝臓外の細胞及び組織を含む、特定の細胞及び組織への、オリゴヌクレオチドを含む一本鎖RNA i 剤の送達に特に有効であるということを含む、いくつかの驚くべき発見を包含するものである。

【1313】

一部の実施形態では、提供される組成物は、望ましくない標的及び／または生物学的機能が抑制されるように、一本鎖RNA干渉系を変更する。一部の実施形態では、そのような例では、提供される組成物は、ハイブリダイゼーション後の転写産物の切断を誘導することもできる。

【1314】

一部の実施形態では、提供される組成物は、所望される標的及び／または生物学的機能が強化されるように、一本鎖RNA干渉系を変更する。一部の実施形態では、提供される組成物は、化学修飾、立体化学及び／またはその組み合わせを組み込むことにより、接触後の標的転写産物の切断を効果的に抑制または妨害する。

【1315】

一部の実施形態では、複数の各オリゴヌクレオチドは、1個以上の修飾糖部分及び修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、複数の各オリゴヌクレオチドは、2個以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、複数の各オリゴヌクレオチドは、3個以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、複数の各オリゴヌクレオチドは、4個以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、複数の各オリゴヌクレオチドは、5個以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、複数の各オリゴヌクレオチドは、10個以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、複数の各オリゴヌクレオチドは、15個以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、複数の各オリゴヌクレオチドは、20個以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態では、複数の各オリゴヌクレオチドは、25個以上の修飾糖部分を含む。

【実施例】

【1316】

前述したものは、本開示のある特定の非限定的な実施形態に関する記載である。したがって、本明細書に記載される本開示の実施形態は、本開示の原理の適用を単に例示するものであると理解されるべきである。例示した実施形態の詳細に関する本明細書での言及は、特許請求の範囲の限定を意図するものではない。

【1317】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物を調製するある特定の方法は、当該技術分野において広く知られていて、本開示において利用され得、WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、WO/2017/015555、及びWO/2017/062862に記載されるものを含むが、これらに限定されず、その方法及び試薬の各々が、参照により本明細書に組み込まれる。

【1318】

出願人は、提供されるオリゴヌクレオチド及びその組成物、ならびにある特定の提供されるオリゴヌクレオチド及びその組成物を調製する方法、評価する方法、アッセイする方法、及び使用する方法などの、ある特定の実施例について本明細書で記載する。

【1319】

実施例1. オリゴヌクレオチドを評価するためのプロトコル例。

当業者が十分に理解するように、多くの技術（例えば、試薬、方法など）を利用して、提供されるオリゴヌクレオチドの活性及び特性を評価し得る。以下は、細胞中のオリゴヌクレオチド活性を評価するための、Lipofectamine（登録商標）2000（Invitrogen）を使用する96ウェルプレート形式でのオリゴヌクレオチド（例として、ssRNAiとして機能し得るある特定のオリゴヌクレオチドを使用する）のリバーストランスフェクションについて記載している1つのプロトコル例である：

1. 各ssRNAiを、好ましくは複数回（例えば、8回）の用量で、例えば、25 μ Lの最終体積で調製する。初期濃度の例は150 nMであり得、例えば、無血清Opti-MEM（登録商標）培地中で通常は4倍の段階希釈。

2. Lipofectamine（登録商標）2000を望ましくは使用前に穏やかに混合し、次いで別個の容器中で25 μ Lの無血清Opti-MEM（登録商標）培地中に0.25 μ LのLipofectamine（登録商標）2000を希釈する。さらに穏やかに混合し、続いてインキュベーションを、例えば、室温で5分間行うことができる。

3. インキュベーション後、希釈したLipofectamine（登録商標）200

10

20

30

40

50

0（例えば、25 μ L）を、（希釈した）ssRNAi分子（通常は同等の体積、例えば、25 μ L）に添加し得る。組み合わせたものを望ましくは穏やかに混合し、例えば、室温で15分間インキュベートして、複合体を形成させてよい。

4．次いで、例えば、15,000個のHep3B細胞を含有する抗生物質を含まない100 μ Lの完全増殖培地を、各ssRNAi分子-Lipofectamine（登録商標）2000複合体に添加することによって複合体を細胞と接触させる。これによって150 μ Lの最終体積となり、最終オリゴ濃度は、25、6.25、1.56、0.39、0.097、0.024、0.0061、及び0.0015 nMである。プレートを前後に揺動させることによって、穏やかに混合する。

5．細胞を、例えば、37℃でCO₂インキュベーター中において48時間インキュベートする。

6．細胞を採取して、例えば、TurboCapture mRNA kit（Qiagen）を使用し、ベンダーが提供するプロトコールに従ってmRNAを単離する。

7．例えば、Roche cDNA synthesis Kit（Roche）を使用し、ベンダーが提供するプロトコールに従ってcDNAを調製する。

8．例えば、LightCycler（登録商標）480 Probes Master mix（Roche）中において、HPRT1プローブと多重化した遺伝子特異的Taqmanプローブを使用するTaqmanアッセイにより、ベンダーが提供するプロトコールに従って標的のノックダウンを定量する。通常は、例えば、HPRT1（ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1）などのハウスキーピング遺伝子に対してデータを正規化する。

9．複数回用量の強度／濃度を利用した場合、用量反応曲線を、例えば、Prismソフトウェアを使用して各ssRNAi剤について作成し得る。所望により、IC₅₀を決定し得る。

【1320】

類似したプロトコールを、他の遺伝子を標的とする異なるオリゴヌクレオチドに使用することができ、このプロトコールは異なる細胞を使用し得る。

【1321】

あるいはまたはさらに、オリゴヌクレオチドの1つ以上の活性及び特性を、本開示においては他の技術（例えば、試薬、キット、方法など）を使用して評価し得る。様々な種類のアッセイから生成した、ある特定のデータを表に提供し、例えば、本明細書で提供する技術の予想外に高い活性、安定性、選択性などを示す。

【1322】

様々なモデルが、対象中において提供する技術の評価するために利用可能である。一部の実施形態では、提供する技術は、動物に投与する場合に高い活性、安定性、及び／または選択性を示す。当業者は、本明細書に記載されるようなオリゴヌクレオチド療法から恩恵を受ける可能性があるある特定の関連ヒト疾患、障害及び／または状態に適切な、及び／またはそれについて予測すると見なされる動物系を認識している。

【1323】

実施例2．ある特定の提供するオリゴヌクレオチドのIC₅₀例。

実施例1に提示したものなどのプロトコールを使用して測定した、ある特定のオリゴヌクレオチド（PNPLA3に対してアンチセンスオリゴヌクレオチドとして機能し得る）のIC₅₀を以下の表に提供する。

10

20

30

40

50

【表 2】

Wave ID	IC 50 (nM)	Position	Oligonucleotide Start Position
WV-3380	1.5	CDS	1508
WV-3393	1.1	CDS	1510
WV-3402	1.7	CDS	1511
WV-3421	1.4	3'UTR	1721
WV-3399	0.77	3'UTR	1853
WV-3404	1.6	3'UTR	1862
WV-3443	1.6	3'UTR	1863
WV-3391	0.65	3'UTR	2129
WV-3394	1.4	3'UTR	2130

10

WV-3408	0.92	3'UTR	2135
WV-3387	1.2	3'UTR	2136
WV-3381	1.4	3'UTR	2656

【1 3 2 4】

実施例 3 . 部分を組み込むための化合物例ートリアンテナ型 G a l N A c (C 1 2、C 5、またはトリアジンリンカーを有する) の合成。

20

一部の実施形態では、本開示は、提供するオリゴヌクレオチド中に様々な部分（例えば、炭水化物部分、脂質部分、標的化部分など）を組み込むための技術（例えば、試薬、方法、複合体など）を提供する。本明細書に記載されるのは、炭水化物部分を組み込むための、ある特定の実施例である。一部の実施形態では、炭水化物部分は、標的化部分として機能してよい。

【1 3 2 5】

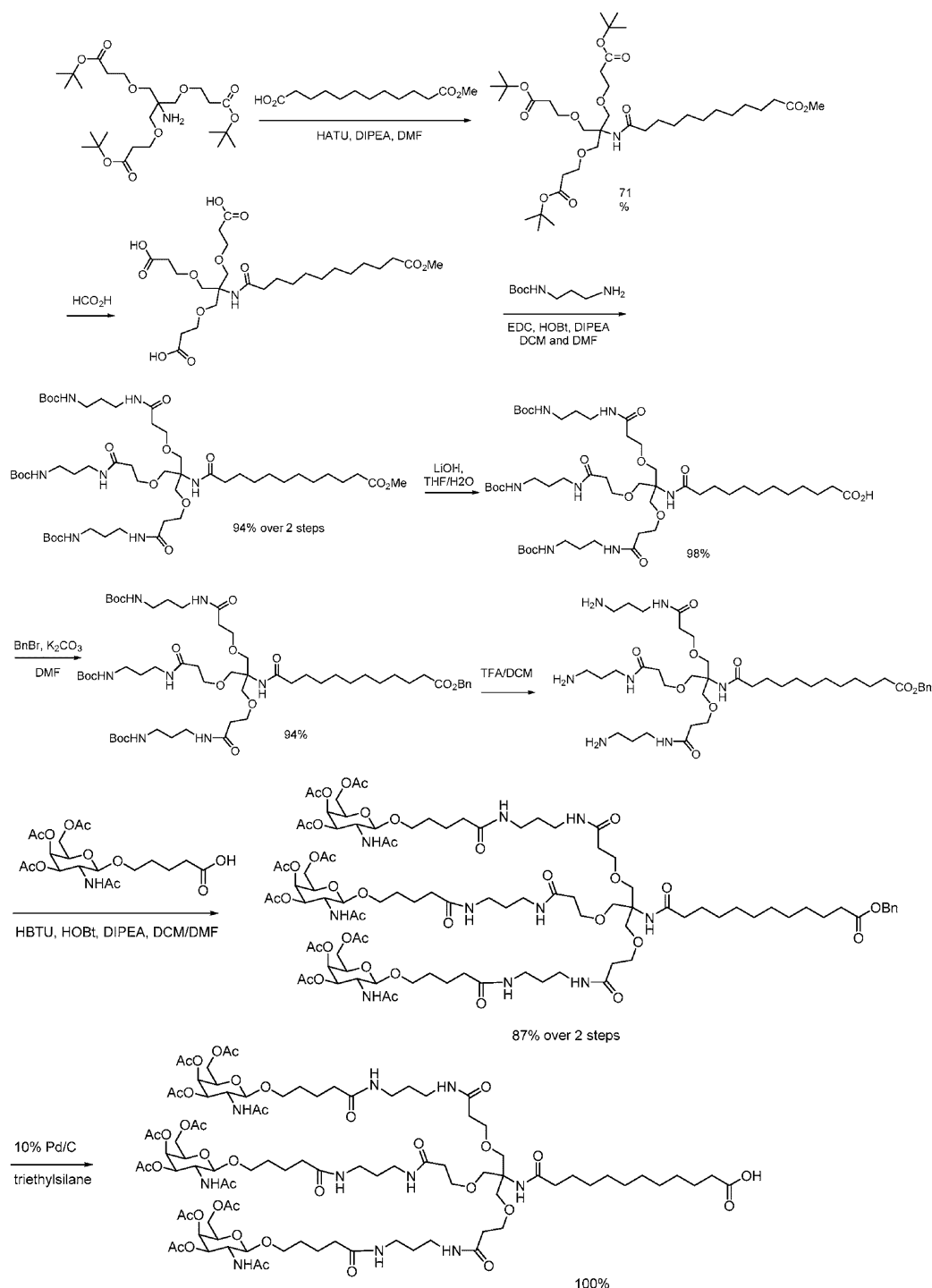
実施例 3-1 . 1- (((2 R, 3 R, 4 R, 5 R, 6 R) - 3-アセトアミド- 4, 5-ジアセトキシ- 6- (アセトキシメチル) テトラヒドロ- 2 H-ピラン- 2-イル) オキシ) - 1 6, 1 6-ビス ((3- ((3- (5- (((2 R, 3 R, 4 R, 5 R, 6 R) - 3-アセトアミド- 4, 5-ジアセトキシ- 6- (アセトキシメチル) テトラヒドロ- 2 H-ピラン- 2-イル) オキシ) ペンタンアミド) プロピル) アミノ) - 3-オキソプロポキシ) メチル) - 5, 1 1, 1 8-トリオキソ- 1 4-オキサ- 6, 1 0, 1 7-トリアザノナコサン- 2 9-酸の合成。

30

40

50

【化 2 1 8】



【1 3 2 6】

ステップ1：3，3' - ((2 - アミノ - 2 - ((3 - (tert - ブトキシ) - 3 - オキソプロポキシ) メチル) プロパン - 1，3 - ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸ジ - tert - ブチル (5.0 g、9.89 mmol) 及び 12 - メトキシ - 12 - オキソドデカン酸 (2.416 g、9.89 mmol) の DMF (45 mL) 溶液に、HATU (3.76 g、9.89 mmol) 及び DIPEA (2.58 mL、14.83 mmol) を添加した。反応混合物を室温で 5 時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮し、ブラインで希釈して EtOAc で抽出し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させて、濃縮して残渣を得て、これを 10% EtOAc のヘキサン溶液 ~ 40% EtOAc のヘキサン溶液で溶出する

10

20

30

40

50

ISCO (120 g 金シリカゲルカートリッジ) によって精製し、3, 3'-((2-((3-(tert-ブトキシ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-2-(12-メトキシ-12-オキソドデカンアミド)プロパン-1, 3-ジイル)ビス(オキシ))ジプロパン酸ジ-tert-ブチル (5.13 g、7.01 mmol、収率70.9%) を無色の油として得た。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 6.03 (s, 1H), 3.74 - 3.61 (m, 15H), 2.45 (t, J = 6.3 Hz, 6H), 2.31 (td, J = 7.5, 3.9 Hz, 2H), 2.19 - 2.10 (m, 2H), 1.64 - 1.59 (m, 4H), 1.46 (s, 27H), 1.32 - 1.24 (m, 12H); MS (ESI), 732.6 (M+H)⁺.

【1327】

ステップ2: 3, 3'-((2-((3-(tert-ブトキシ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-2-(12-メトキシ-12-オキソドデカンアミド)プロパン-1, 3-ジイル)ビス(オキシ))ジプロパン酸ジ-tert-ブチル (5.0 g、6.83 mmol) のギ酸 (50 mL) 溶液を、室温で48時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、トルエン (3×) と共蒸発させて白色固体を得て、これを高真空下で2日間乾燥させた。LC-MS及びH NMRは、反応が完了していないことを示した。粗生成物をギ酸 (50 mL) 中に再溶解させた。反応混合物を室温で24時間攪拌した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を減圧下で蒸発させ、トルエン (3×) と共蒸発させて高真空中で乾燥し、3, 3'-((2-((2-カルボキシエトキシ)メチル)-2-(12-メトキシ-12-オキソドデカンアミド)プロパン-1, 3-ジイル)ビス(オキシ))ジプロパン酸 (4.00 g) を白色固体として得た。MS (ESI): 562.4 (M-H)⁻.

【1328】

ステップ3: 0℃の3, 3'-((2-((2-カルボキシエトキシ)メチル)-2-(12-メトキシ-12-オキソドデカンアミド)プロパン-1, 3-ジイル)ビス(オキシ))ジプロパン酸 (3.85 g、6.83 mmol) 及びHOBt (3.88 g、28.7 mmol) のDCM (60 mL) 及びDMF (15 mL) 溶液に、(3-アミノプロピル)カルバミン酸tert-ブチル (4.76 g、27.3 mmol)、EDAC HCl塩 (5.24 g、27.3 mmol) 及びDIPEA (8.33 mL、47.8 mmol) を添加した。反応混合物を0℃で15分間攪拌し、室温で20時間攪拌した。LC-MSは、反応が完了しなかったことを示した。(3-アミノプロピル)カルバミン酸tert-ブチル (1.59 g、9.12 mmol) 及びEDC HCl塩 (1.75 g、9.13 mmol) を、反応混合物中に添加した。反応混合物を室温で4時間、絶えず攪拌した。溶媒を蒸発させて残渣を得て、これをEtOAc (300 mL) 中に溶解し、水 (1×)、飽和重炭酸ナトリウム (2×)、10%クエン酸 (2×) 及び水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮して残渣を得て、これをDCM~30% MeOHのDCM溶液で溶出するISCO (80 g 金カートリッジ) によって精製し、15, 15-ビス(13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸メチル (6.61 g、6.40 mmol、2ステップで収率94%) を白色固体として得た。MS (ESI): 1033.5 (M+H)⁺.

【1329】

ステップ4: 15, 15-ビス(13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸メチル (6.56 g、6.35 mmol) のTHF (75 mL) 溶液に、LiOH (0.457 g、19.06 mmol) の水 (25 mL) 溶液を添加した。混合物を室温で一晩攪拌した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を蒸発させ、1NのHCl (45 mL) を使用して酸性化し、DCM (3×) で抽出して無水硫酸ナトリウム上で乾燥さ

10

20

30

40

50

せ、濃縮して15, 15-ビス(13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸(6.31g、6.20mmol、収率98%)を白色固体として得た。MS (ESI): 1019.6 (M+H)⁺。

【1330】

ステップ5: 15, 15-ビス(13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸(6.31g、6.20mmol)及び(ブロモメチル)ベンゼン(1.272g、7.44mmol)のDMF(40mL)溶液に、K₂CO₃(2.57g、18.59mmol)を添加した。混合物を40℃で4時間攪拌し、室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させた。反応混合物をEtOAcで希釈し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮して残渣を得て、これをDCM~30%MeOHのDCM溶液で溶出するISCO(80gカートリッジ)によって精製し、15, 15-ビス(13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸ベンジル(6.41g、5.78mmol、収率93%)を無色の油として得た。¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.80 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 7.39 – 7.30 (m, 5H), 6.95 (s, 1H), 6.74 (t, J = 5.8 Hz, 3H), 5.07 (s, 2H), 3.53 (J, J = 7.3 Hz, 6H), 3.51 (s, 6H), 3.02 (q, J = 6.7 Hz, 6H), 2.94 – 2.85 (m, 6H), 2.29 (dt, J = 26.1, 6.9 Hz, 8H), 2.02 (q, J = 9.7, 8.6 Hz, 2H), 1.56 – 1.39 (m, 10H), 1.35 (s, 27H), 1.20 (br s, 14H); MS (ESI): 1019.6 (M+H)⁺。

【1331】

ステップ6: 15, 15-ビス(13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸ベンジル(2.42g、2.183mmol)のDCM(40mL)溶液に、2, 2, 2-トリフルオロ酢酸(8mL、105mmol)を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、トルエン(2×)と共蒸発させてエーテルで粉碎し、高真空下で一晩乾燥させた。次のステップにTFA塩を直接使用する。

【1332】

ステップ7: 5-(((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタン酸(3.91g、8.73mmol)、HBTU(3.48g、9.17mmol)及びHOBT(1.239g、9.17mmol)のDCM(25mL)溶液に、DIPEA(6.08mL、34.9mmol)、続いて12-((1, 19-ジアミノ-10-((3-((3-アミノプロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 15-ジオキソ-8, 12-ジオキサ-4, 16-ジアザノナデカン-10-イル)アミノ)-12-オキソドデカン酸ベンジル(1.764g、2.183mmol)のDMF(4.0mL)溶液を添加した。混合物を室温で5時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これを5カラム量の5%MeOHのDCM溶液で溶出してHOBtを除去し、続いて5%~30%MeOHのDCM溶液で溶出するISCO(40g金カラム)によって精製し、1-(((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-16, 16-ビス((3-((3-(5-(((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)

テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル) オキシ) ペンタンアミド) プロピル) アミノ)-3-オキソプロポキシ) メチル)-5, 11, 18-トリオキソ-14-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-ベンジルエステル (3.98 g、収率87%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.82-7.74 (m, 6H), 7.69 (t, J = 5.6 Hz, 3H), 7.33-7.27 (m, 5H), 6.94 (s, 1H), 5.16 (d, J = 3.4 Hz, 3H), 5.03 (s, 2H), 4.92 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 3H), 4.43 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.02-3.95 (m, 9H), 3.82 (dt, J = 11.2, 8.8 Hz, 3H), 3.65 (dt, J = 10.5, 5.6 Hz, 3H), 3.51-3.44 (m, 12H), 3.36 (dt, J = 9.6, 6.0 Hz, 3H), 3.01-2.95 (m, 12H), 2.29 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 6.3 Hz, 6H), 2.05 (s, 9H), 1.99 (t, J = 7.0 Hz, 8H), 1.94 (s, 9H), 1.84 (s, 9H), 1.72 (s, 9H), 1.50-1.14 (m, 34H); MS (ESI): 1049.0 (M/2+H)⁺.

【1333】

ステップ8: Arでフラッシュした丸底フラスコに、10% Pd/C (165 mg、0.835 mmol) 及び EtOAc (15 mL) を添加した。ベンジル保護トリス GalNAc (1.75 g、0.835 mmol) のメタノール (15 mL) 溶液を添加し、続いてトリエチルシラン (2.67 mL、16.70 mmol) を滴下して添加した。混合物を室温で3時間攪拌した。LC-MSは反応が完了したことを示し、反応物を EtOAc で希釈してセライトに通して濾過し、20% MeOH の EtOAc 溶液で洗浄して、減圧下で濃縮し、1-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル) テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル) オキシ)-16, 16-ビス((3-((3-(5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル) テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル) オキシ) ペンタンアミド) プロピル) アミノ)-3-オキソプロポキシ) メチル)-5, 11, 18-トリオキソ-14-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-酸 (1.67 g、0.832 mmol、収率100%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.95 (s, 1H), 7.83-7.74 (m, 6H), 7.69 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 6.93 (s, 1H), 5.16 (d, J = 3.4 Hz, 3H), 4.92 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 3H), 4.43 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.01-3.94 (m, 9H), 3.82 (dt, J = 11.3, 8.8 Hz, 3H), 3.66 (dt, J = 10.7, 5.6 Hz, 3H), 3.54-3.43 (m, 12H), 3.41-3.33 (m, 3H), 3.03-2.94 (m, 12H), 2.24 (t, J = 7.4 Hz, 10H), 2.14 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.06 (s, 9H), 2.00 (t, J = 7.2 Hz, 8H), 1.95 (s, 9H), 1.84 (s, 9H), 1.73 (s, 9H), 1.51-1.14 (m, 34H)。MS (ESI): 1003.8 (M/2+H)⁺.

【1334】

実施例3-2.22-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル) テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル) オキシ)-7, 7-ビス((3-((3-(5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル) テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル) オキシ) ペンタンアミド) プロピル) アミノ)-3-オキソプロポキシ) メチル)-5, 12, 18-トリオキソ-9-オキサ-6, 13, 17-トリアザドコサン酸の合成。

10

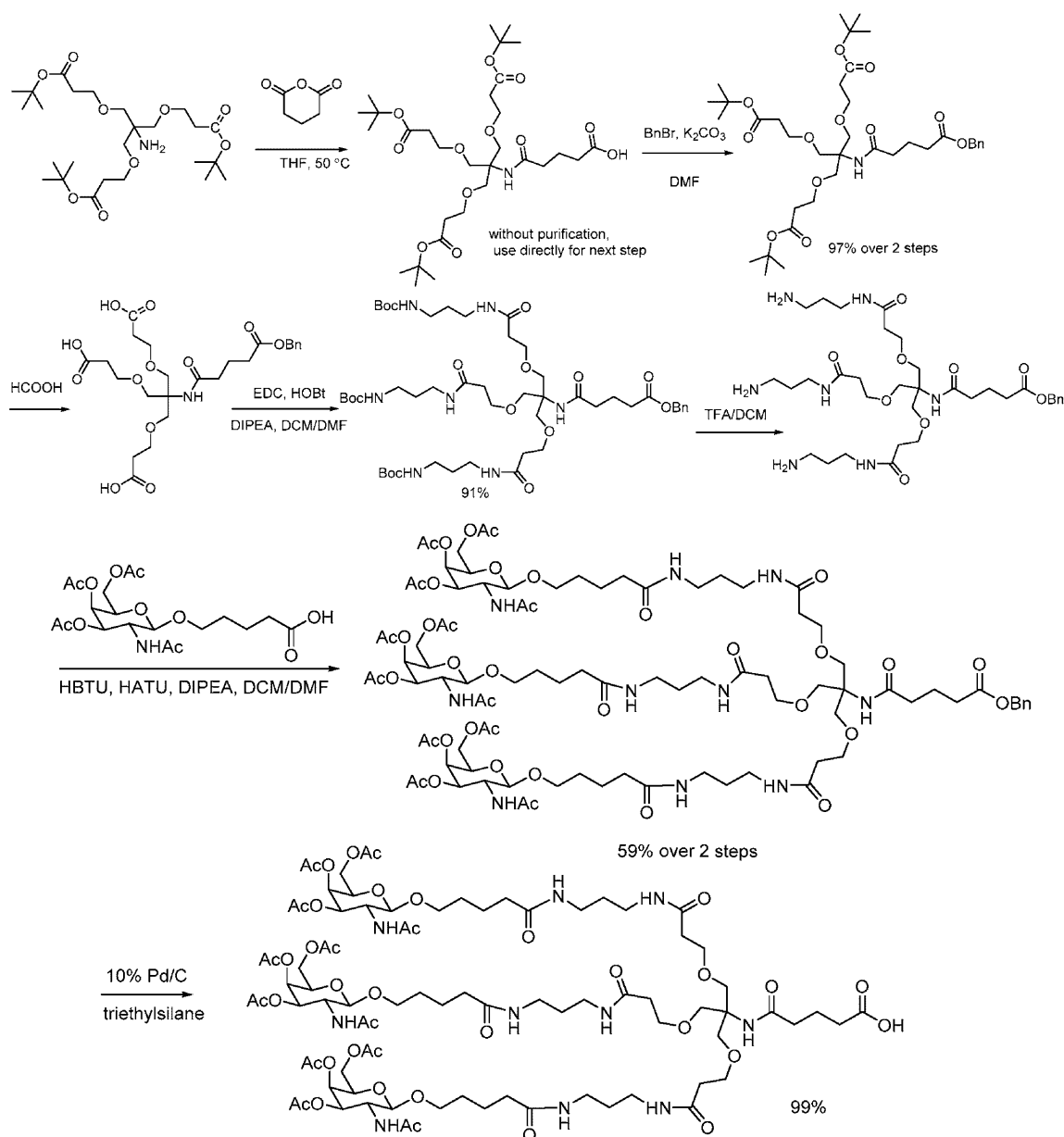
20

30

40

50

【化 2 1 9】



【1 3 3 5】

ステップ1：3, 3' - ((2-アミノ-2- ((3- (tert-ブトキシ) -3-オキソプロポキシ) メチル) プロパン-1, 3-ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸ジ-tert-ブチル (4.0 g、7.91 mmol) 及びジヒドロ-2H-ピラン-2, 6 (3H) -ジオン (0.903 g、7.91 mmol) のTHF (40 mL) 溶液を50 °Cで3時間攪拌し、室温で3時間攪拌した。LC-MSは、所望の生成物を示した。溶媒を蒸発させて酸を得て、それを精製することなく次のステップに直接使用した。

【1 3 3 6】

ステップ2：5- ((9- ((3- (tert-ブトキシ) -3-オキソプロポキシ) メチル) -2, 2, 16, 16-テトラメチル-4, 14-ジオキソ-3, 7, 11, 15-テトラオキサヘプタデカン-9-イル) アミノ) -5-オキソペンタン酸 (4.90 g、7.91 mmol) 及び (プロモメチル) ベンゼン (1.623 g、9.49 mmol) のDMF溶液に、無水K₂CO₃ (3.27 g、23.73 mmol) を添加した。混合物を40 °Cで4時間攪拌し、室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させた。反応混合物をEtOAcで希釈し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で

濃縮して残渣を得て、これを10% EtOAcのヘキサン溶液～50% EtOAcのヘキサン溶液で溶出するISCOによって精製し、3, 3' - ((2 - (5 - (ベンジルオキシ) - 5 - オキソペンタンアミド) - 2 - ((3 - (tert - ブトキシ) - 3 - オキソプロポキシ) メチル) プロパン - 1, 3 - ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸ジ - tert - ブチル (5.43 g、7.65 mmol、収率97%) を無色の油として得た。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム - d) δ 7.36 - 7.28 (m, 5H), 6.10 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.70 (s, 6H), 3.64 (t, J = 8.0 Hz, 6H), 2.50 - 2.38 (m, 8H), 2.22 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.95 (p, J = 7.4 Hz, 2H), 1.45 (s, 27H); MS, 710.5 (M+H)⁺.

10

【1337】

ステップ3: 3, 3' - ((2 - (5 - (ベンジルオキシ) - 5 - オキソペンタンアミド) - 2 - ((3 - (tert - ブトキシ) - 3 - オキソプロポキシ) メチル) プロパン - 1, 3 - ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸ジ - tert - ブチル (5.43 g、7.65 mmol) のギ酸 (50 mL) 溶液を、室温で48時間攪拌した。LC - MSは、反応が完了しなかったことを示した。溶媒を減圧下で蒸発させた。粗生成物をギ酸 (50 mL) 中に再溶解させ、室温で6時間攪拌した。LC - MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を減圧下で蒸発させ、減圧下でトルエン (3×) と共蒸発させ、真空中で乾燥し、3, 3' - ((2 - (5 - (ベンジルオキシ) - 5 - オキソペンタンアミド) - 2 - ((2 - カルボキシエトキシ) メチル) プロパン - 1, 3 - ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸 (4.22 g、7.79 mmol、収率102%) を白色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO - d₆) δ 12.11 (s, 3H), 7.41 - 7.27 (m, 5H), 6.97 (s, 1H), 5.07 (s, 2H), 3.55 (t, J = 6.4 Hz, 6H), 3.53 (s, 6H), 2.40 (t, J = 6.3 Hz, 6H), 2.37 - 2.26 (m, 2H), 2.08 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.70 (p, J = 7.4 Hz, 2H); MS, 542.3 (M+H)⁺.

20

【1338】

ステップ4: 0℃の3, 3' - ((2 - (5 - (ベンジルオキシ) - 5 - オキソペンタンアミド) - 2 - ((2 - カルボキシエトキシ) メチル) プロパン - 1, 3 - ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸 (4.10 g、7.57 mmol) 及びHOBt (4.60 g、34.1 mmol) のDCM (60 mL) 及びDMF (15 mL) 溶液に、(3 - アミノプロピル) カルバミン酸tert - ブチル (5.94 g、34.1 mmol)、EDAC HCl塩 (6.53 g、34.1 mmol) 及びDIPEA (10.55 mL、60.6 mmol) を添加した。反応混合物を0℃で15分間攪拌し、室温で20時間攪拌した。LC - MSは、反応が完了しなかったことを示した。EDAC HCl塩 (2.0 g) 及び(3 - アミノプロピル) カルバミン酸tert - ブチル (1.0 g) を、反応混合物中に添加した。反応混合物を室温で4時間攪拌した。溶媒を蒸発させて残渣を得て、これをEtOAc (300 mL) 中に溶解し、水 (1×)、飽和重炭酸ナトリウム (2×)、10% クエン酸 (2×) 及び水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮して残渣を得て、これをDCM～30% MeOHのDCM溶液で溶出するISCO (80 g 金カートリッジ) によって精製し、15, 15 - ビス (13, 13 - ジメチル - 5, 11 - ジオキソ - 2, 12 - ジオキサ - 6, 10 - ジアザテトラデシル) - 2, 2 - ジメチル - 4, 10, 17 - トリオキソ - 3, 13 - ジオキサ - 5, 9, 16 - トリアザヘニコサン - 21 - 酸ベンジル (6.99 g、6.92 mmol、収率91%) を白色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, クロロホルム - d) δ 7.38 - 7.33 (m, 5H), 6.89 (brs, 3H), 6.44 (s, 1H), 5.23 (brs, 3H), 5.12 (s, 2H), 3.71 - 3.62 (m, 12H), 3.29 (q, J = 6.2 Hz, 6H), 3.14 (q, J = 6.5 Hz, 6H), 2.43 (dt, J = 27.0, 6.7 Hz, 8H), 2.24 (t, J = 7.2

30

40

50

H z, 2 H), 1.96 (p, J = 7.5 Hz, 2 H), 1.64 – 1.59 (m, 6 H), 1.43 (d, J = 5.8 Hz, 27 H); MS (ESI): 1011.5 (M+H)⁺.

【1339】

ステップ5: 15, 15-ビス(13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザヘニコサン-21-酸ベンジル(0.95 g, 0.940 mmol)のDCM(5 mL)溶液に、TFA(5 mL)を添加した。反応混合物を室温で4時間攪拌した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を減圧下で蒸発させて、5-(1, 19-ジアミノ-10-(3-(3-アミノプロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 15-ジオキソ-8, 12-ジオキサ-4, 16-ジアザノナデカン-10-イル)アミノ)-5-オキソペンタン酸ベンジルを無色の油として得た。精製することなく次のステップに直接使用する。

【1340】

ステップ6: 5-(2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタン酸(1.684 g, 3.76 mmol)、HBTU(1.246 g, 3.29 mmol)及びHOBt(0.052 g, 0.376 mmol)のDCM(40 mL)溶液に、続いて10-(5-(ベンジルオキシ)-5-オキソペンタンアミド)-N1, N19-ジクロロ-10-(3-(3-(クロロアンモニオ)プロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 15-ジオキソ-8, 12-ジオキサ-4, 16-ジアザノナデカン-1, 19-ジアミニウム(0.767 g, 0.940 mmol)のDMF(2.0 mL)溶液。混合物を室温で5時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これをDCM~30% MeOHのDCM溶液で溶出するISCO(40 g 金カラム)によって精製し、22-(2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-7, 7-ビス(3-(3-(5-(2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 12, 18-トリオキソ-9-オキサ-6, 13, 17-トリアザドコサンベンジルエステル(1.11 g, 0.556 mmol, 収率59%)を白色固体として得た。MS (ESI): 1000.0 (M/2+H)⁺.

【1341】

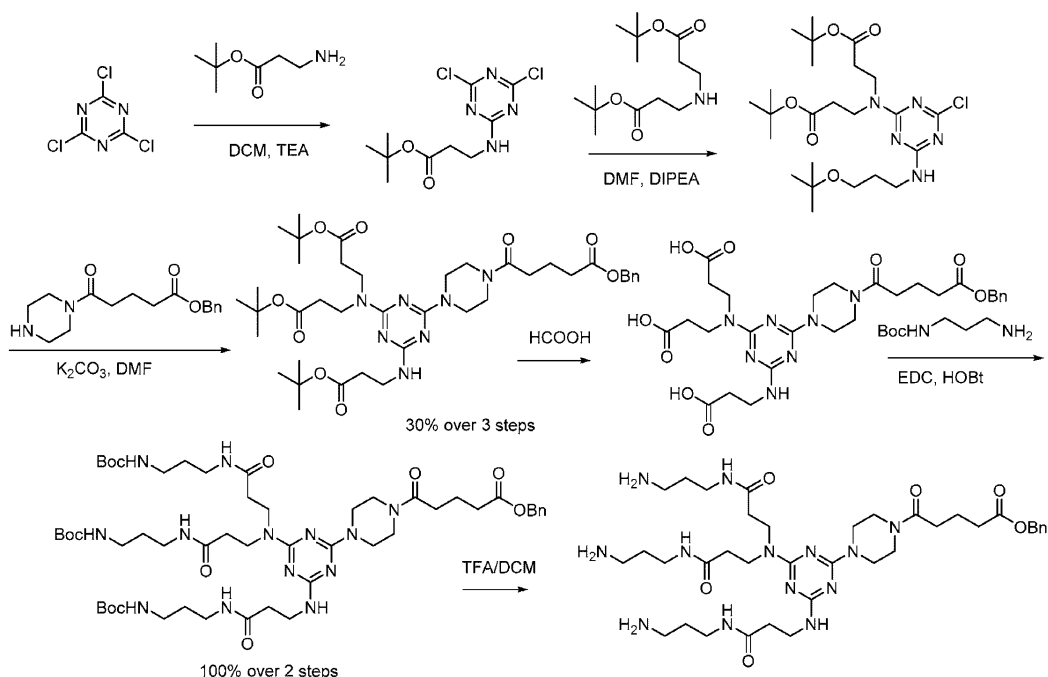
ステップ7: Arでフラッシュした丸底フラスコに、10% Pd/C(100 mg, 0.500 mmol)及びEtOAc(10 mL)を添加した。22-(2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-7, 7-ビス(3-(3-(5-(2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 12, 18-トリオキソ-9-オキサ-6, 13, 17-トリアザドコサンベンジルエステル(1.00 g, 0.500 mmol)のメタノール(10 mL)溶液を添加し、続いてトリエチルシラン(1.599 mL, 10.01 mmol)を滴下して添加した。混合物を室温で3時間攪拌した。LC-MSは反応が完了したことを示し、反応物をEtOAcで希釈してセライトに通して濾過し、20% MeOHのEtOAc溶液で洗浄して、減圧下で濃縮し、22-(2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-7, 7-ビス(3-(3-(5-(2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-

2-イル) オキシ) ペンタンアミド) プロピル) アミノ) -3-オキソプロポキシ) メチル) -5, 12, 18-トリオキソ-9-オキサ-6, 13, 17-トリアザドコサン-1-酸 (0.9433 g, 0.494 mmol, 収率99%) を白色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.85 – 7.78 (m, 6H), 7.72 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 7.03 (s, 1H), 5.20 (d, J = 3.4 Hz, 3H), 4.95 (dd, J = 11.2, 3.5 Hz, 3H), 4.47 (d, J = 8.3 Hz, 3H), 4.05–3.99 (m, 9H), 3.85 (dt, J = 11.0, 8.8 Hz, 3H), 3.69 (dt, J = 10.6, 5.8 Hz, 3H), 3.52 (dd, J = 12.3, 5.6 Hz, 12H), 3.39 (dt, J = 11.2, 6.3 Hz, 3H), 3.02 (p, J = 6.3 Hz, 12H), 2.26 (t, J = 6.4 Hz, 6H), 2.17 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.11 – 2.07 (m, 11H), 2.03 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.98 (s, 9H), 1.87 (s, 9H), 1.76 (s, 9H), 1.53 – 1.18 (m, 20H); MS (ESI): 1909.4 (M+H)⁺.

【1342】

実施例3-3.5-(4-(4-(3-(3-(5-(2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル) オキシ) ペンタンアミド) プロピル) アミノ)-3-オキソプロピル) アミノ)-6-(ビス(3-(3-(5-(2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル) オキシ) ペンタンアミド) プロピル) アミノ)-1, 3, 5-トリアジン-2-イル) ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸の合成。

【化220】



10

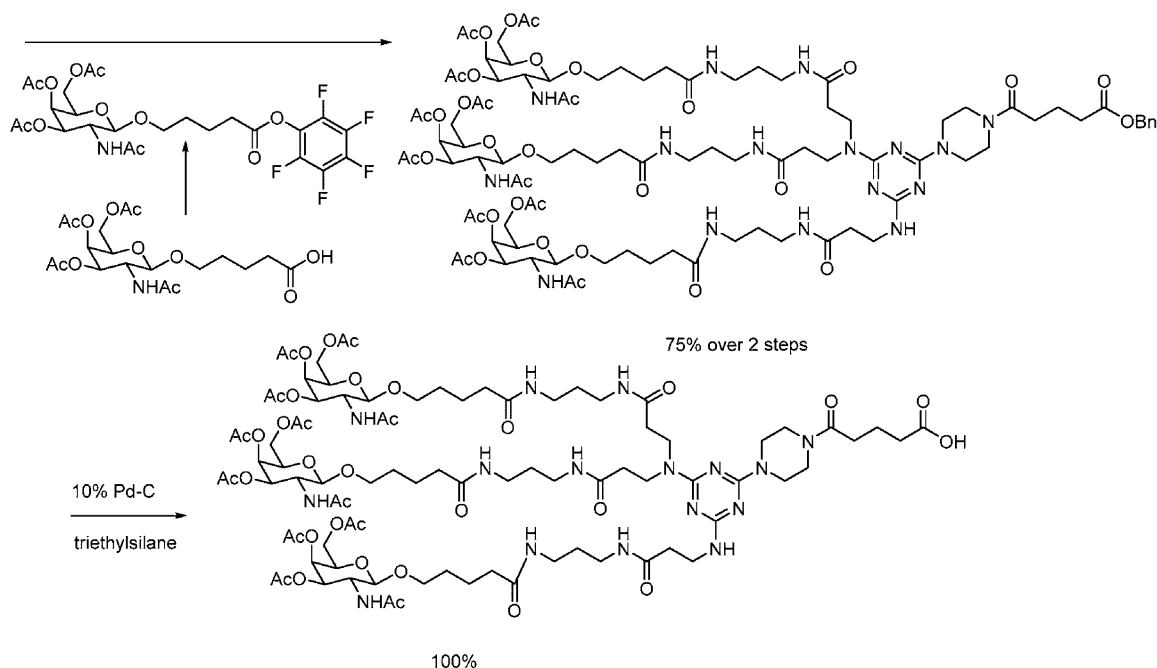
20

30

40

50

【化 2 2 1】



10

20

【1 3 4 3】

ステップ1～3：0℃の固体試薬2，4，6-トリクロロ-1，3，5-トリアジン（0.700g、3.80mmol）のDCM（25mL）溶液に、3-アミノプロパン酸tert-ブチルHCl塩（0.690g、3.80mmol）及びTEA（0.635mL、4.56mmol）を添加した。反応混合物を0℃で1時間攪拌した。LC-MSは所望の生成物を示した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これを次のステップに直接使用した。3-（（4，6-ジクロロ-1，3，5-トリアジン-2-イル）アミノ）プロパン酸tert-ブチル（1.114g、3.80mmol）のDMF（15mL）溶液に、3，3'-アザンジイルジプロパン酸ジtert-ブチル（1.039g、3.80mmol）及びDIPEA（1.324mL、7.60mmol）を添加した。反応混合物を室温で2時間攪拌した。LC-MSは、所望の生成物を示した。LC-MSは、所望の生成物を示した。上記反応混合物に、5-オキソ-5-（ピペラジン-1-イル）ペンタン酸ベンジル（1.103g、3.80mmol）及びK₂CO₃（1.576g、11.40mmol）を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。EtOAcで希釈し、濾過して減圧下で濃縮して残渣を得て、これを10% EtOAcのヘキサン溶液～50% EtOAcのヘキサン溶液で溶出するISCO（40g金）によって精製し、3，3'-（（4-（4-（5-（ベンジルオキシ）-5-オキソペンタノイル）ピペラジン-1-イル）-6-（（3-（tert-ブトキシ）-3-オキソプロピル）アミノ）-1，3，5-トリアジン-2-イル）アザンジイル）ジプロピオン酸ジtert-ブチル（0.90g、30%）を無色の油として得た。¹H NMR（500 MHz，クロロホルム-d）δ 7.43 - 7.31（m，5H），5.12（s，2H），3.81 - 3.66（m，8H），3.60（dd，J = 7.6，4.8 Hz，4H），3.40（t，J = 5.1 Hz，2H），2.57 - 2.44（m，8H），2.39（t，J = 7.4 Hz，2H），2.06 - 1.95（m，2H），1.45（s，9H），1.43（s，18H）；MS（ESI）：784.7（M+H）⁺。

30

40

【1 3 4 4】

ステップ4：3，3'-（（4-（4-（5-（ベンジルオキシ）-5-オキソペンタノイル）ピペラジン-1-イル）-6-（（3-（tert-ブトキシ）-3-オキソプロピル）アミノ）-1，3，5-トリアジン-2-イル）アザンジイル）ジプロパン酸ジtert-ブチル（0.90g、30%）を無色の油として得た。¹H NMR（500 MHz，クロロホルム-d）δ 7.43 - 7.31（m，5H），5.12（s，2H），3.81 - 3.66（m，8H），3.60（dd，J = 7.6，4.8 Hz，4H），3.40（t，J = 5.1 Hz，2H），2.57 - 2.44（m，8H），2.39（t，J = 7.4 Hz，2H），2.06 - 1.95（m，2H），1.45（s，9H），1.43（s，18H）；MS（ESI）：784.7（M+H）⁺。

50

tert-ブチル (0.90 g、1.148 mmol) のギ酸 (20 mL) 溶液を、室温で一晩攪拌した。LC-MSは反応が完了しなかったことを示し、溶媒を蒸発させた。ギ酸 (20 mL) を反応混合物に添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を濃縮し、トルエン (2×) と共蒸発させて真空下で一晩乾燥し、3, 3' - ((4 - (4 - (5 - (ベンジルオキシ) - 5 - オキソペンタノイル) ピペラジン-1-イル) - 6 - ((2 - カルボキシエチル) アミノ) - 1, 3, 5 - トリアジン-2-イル) アザンジイル) ジプロパン酸 (0.75 g、1.218 mmol、収率106%) を白色固体として得た。MS (ESI), 616.5 (M+H)⁺。

【1345】

ステップ5: 0℃の3, 3' - ((4 - (4 - (5 - (ベンジルオキシ) - 5 - オキソペンタノイル) ピペラジン-1-イル) - 6 - ((2 - カルボキシエチル) アミノ) - 1, 3, 5 - トリアジン-2-イル) アザンジイル) ジプロパン酸 (0.707 g、1.148 mmol) 及びHOBt (0.651 g、4.82 mmol) のDCM (60 mL) 及びDMF (15 mL) 溶液に、(3-アミノプロピル) カルバミン酸tert-ブチル (0.840 g、4.82 mmol)、EDAC HCl塩 (0.924 g、4.82 mmol) 及びDIPEA (1.400 mL、8.04 mmol) を添加した。反応混合物を0℃で15分間攪拌し、室温で20時間攪拌した。LC-MSは、反応が完了しなかったことを示した。(3-アミノプロピル) カルバミン酸tert-ブチル (0.28 g) 及びEDC HCl塩 (0.46 g) を、反応混合物中に添加した。反応混合物を室温で4時間、絶えず攪拌した。溶媒を蒸発させて残渣を得て、これをEtOAc (300 mL) 中に溶解し、水 (1×)、飽和重炭酸ナトリウム (2×)、10%クエン酸 (2×) 及び水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮して残渣を得て、これをDCM~30% MeOHのDCM溶液で溶出するISCO (80 g 金カートリッジ) によって精製し、5 - (4 - (4 - (ビス(3 - ((3 - ((tert-ブトキシカルボニル) アミノ) プロピル) アミノ) - 3 - オキソプロピル) アミノ) - 6 - ((3 - ((3 - ((tert-ブトキシカルボニル) アミノ) プロピル) アミノ) - 3 - オキソプロピル) アミノ) - 1, 3, 5 - トリアジン-2-イル) ピペラジン-1-イル) - 5 - オキソペンタン酸ベンジル (1.24 g、1.144 mmol、収率100%) を白色固体として得た。MS (ESI): 1084.8 (M+H)⁺。

【1346】

ステップ6: 5 - (4 - (4 - (ビス(3 - ((3 - ((tert-ブトキシカルボニル) アミノ) プロピル) アミノ) - 3 - オキソプロピル) アミノ) - 6 - ((3 - ((3 - ((tert-ブトキシカルボニル) アミノ) プロピル) アミノ) - 3 - オキソプロピル) アミノ) - 1, 3, 5 - トリアジン-2-イル) ピペラジン-1-イル) - 5 - オキソペンタン酸ベンジル (328.3 mg、0.303 mmol) のDCM (5.0 mL) 溶液に、TFA (3.0 mL) を添加した。反応混合物を室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、精製することなく次のステップに直接使用する。MS (ESI): 784.6 (M+H)⁺。

【1347】

ステップ7: 5 - ((2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 4, 5 - ジアセトキシ - 6 - (アセトキシメチル) テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2-イル) オキシ) ペンタン酸 (0.570 g、1.273 mmol) のDCM (6 mL) 溶液に、DIPEA (0.40 mL、2.296 mmol) 及び2, 2, 2 - トリフルオロ酢酸パーフルオロフェニル (0.535 g、1.910 mmol) を添加した。反応混合物を室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、次のステップに直接使用する。MS (ESI): 614.3 (M+H)⁺。5 - (4 - (4 - ((3 - ((3 - アミノプロピル) アミノ) - 3 - オキソプロピル) アミノ) - 6 - (ビス(3 - ((3 - アミノプロピル) アミノ) - 3 - オキソプロピル) アミノ) - 1, 3, 5 - トリアジン-2-イル) ピペラジン-1-イル) - 5 - オキソペンタン酸ベンジル (0.238 g、0.3

10

20

30

40

50

0.3 mmol) の DCM (15 mL) 及び DMF (3 mL) 溶液に、DIPEA (0.633 mL、3.64 mmol)、及び (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 5 - アセトアミド - 2 - (アセトキシメチル) - 6 - ((5 - オキソ - 5 - (パーフルオロフェノキシ)ペンチル)オキシ)テトラヒドロ - 2H - ピラン - 3, 4 - ジイルジアセテート (0.781 g、1.273 mmol) の DCM (6 mL) 溶液を添加した。反応混合物を室温で4時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これを DCM ~ 40% MeOH の DCM 溶液で溶出するISCO (40 g 金) によって精製し、5 - (4 - (4 - ((3 - ((3 - (5 - ((2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 4, 5 - ジアセトキシ - 6 - (アセトキシメチル)テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ) - 3 - オキソプロピル)アミノ) - 6 - (ビス(3 - ((3 - (5 - ((2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 4, 5 - ジアセトキシ - 6 - (アセトキシメチル)テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ) - 3 - オキソプロピル)アミノ) - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル)ピペラジン - 1 - イル) - 5 - オキソペンタンベンジルエステル (0.47 g、0.227 mmol、収率 74.9%) を白色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.82 - 7.78 (m, 6H), 7.70 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 7.35 - 7.28 (m, 5H), 6.63 (brs, 1H), 5.20 (d, J = 3.3 Hz, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.95 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 3H), 4.47 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.05 - 3.96 (m, 9H), 3.85 (dt, J = 11.1, 8.8 Hz, 3H), 3.72 - 3.53 (m, 12H), 3.43 - 3.36 (m, 6H), 3.05 - 2.97 (m, 12H), 2.41 - 2.27 (m, 10H), 2.08 (s, 9H), 2.03 (d, J = 7.0 Hz, 6H), 1.98 (s, 9H), 1.87 (s, 9H), 1.75 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 1.53 - 1.19 (m, 13H); MS (ESI): 1037.0 (M+H) / 2⁺.

[1348]

ステップ8: 5 - (4 - (4 - ((3 - ((3 - (5 - ((2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 4, 5 - ジアセトキシ - 6 - (アセトキシメチル)テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ) - 3 - オキソプロピル)アミノ) - 6 - (ビス(3 - ((3 - (5 - ((2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 4, 5 - ジアセトキシ - 6 - (アセトキシメチル)テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ) - 3 - オキソプロピル)アミノ) - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル)ピペラジン - 1 - イル) - 5 - オキソペンタンベンジルエステル (0.39 g、0.188 mmol) の EtOAc (10 mL) 溶液に、10% Pd-C (50 mg)、続いて Ar 下で 10 mL の MeOH を添加した。トリエチルシラン (0.601 mL、3.76 mmol) を、反応混合物にゆっくりと添加した。反応混合物を室温で2時間攪拌した。セライトに通して濾過し、50% MeOH の EtOAc 溶液で洗浄して溶媒を減圧下で蒸発させ、5 - (4 - (4 - ((3 - ((3 - (5 - ((2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 4, 5 - ジアセトキシ - 6 - (アセトキシメチル)テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ) - 3 - オキソプロピル)アミノ) - 6 - (ビス(3 - ((3 - (5 - ((2R, 3R, 4R, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 4, 5 - ジアセトキシ - 6 - (アセトキシメチル)テトラヒドロ - 2H - ピラン - 2 - イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ) - 3 - オキソプロピル)アミノ) - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル)ピペラジン - 1 - イル) - 5 - オキソペンタン酸 (0.373 g、収率 100%) を白色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.82 - 7.78 (m, 6H), 7.71 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 6.64 (s, 1H), 5.20 (d, J = 3.3 Hz, 3H), 4.95 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 3H), 4.47 (d,

10

20

30

40

50

$J = 8.5 \text{ Hz}$, 3H), 4.06 – 3.96 (m, 9H), 3.85 (dt, $J = 11.1$, 8.8 Hz, 3H), 3.73 – 3.56 (m, 11H), 3.45 – 3.35 (m, 5H), 3.09 – 2.98 (m, 13H), 2.37 – 2.28 (m, 10H), 2.25 (t, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 2H), 2.09 (s, 9H), 2.03 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 6H), 1.98 (s, 9H), 1.88 (s, 9H), 1.76 (s, 9H), 1.74 – 1.67 (m, 2H), 1.55 – 1.40 (m, 15H); MS (ESI): 1983.4 (M+H)⁺。

【1349】

実施例4A. 部分を組み込むための化合物例。

18, 18-ビス(17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザテトラコサン-24-酸の合成。

10

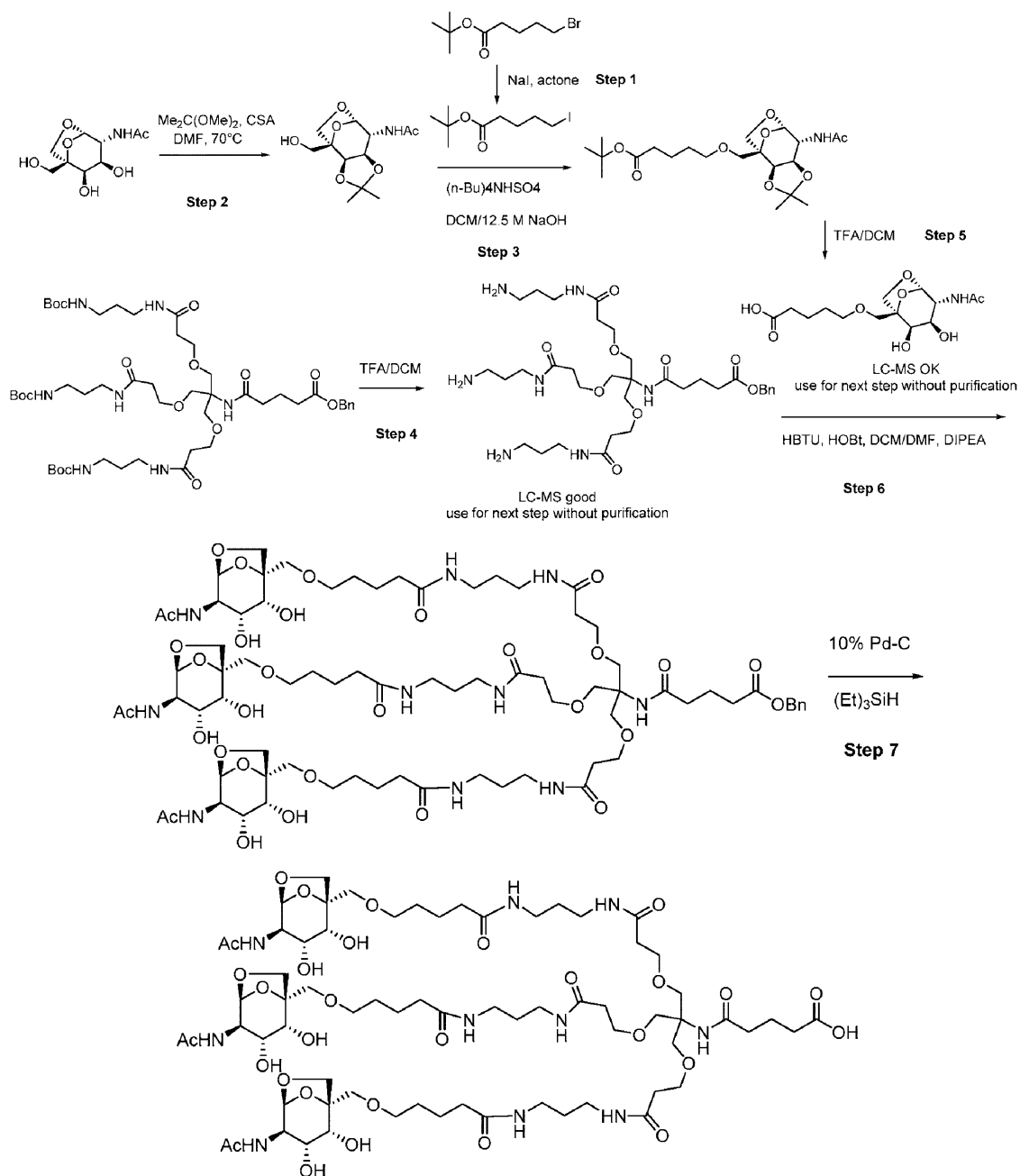
20

30

40

50

【化 2 2 2】



10

20

30

【1 3 5 0】

ステップ1：5-ブロモペンタン酸tert-ブチル（4.0 g、16.87 mmol）のアセトン（80 mL）溶液に、NaI（7.59 g、50.6 mmol）を添加した。反応混合物を 57°C で2時間攪拌し、濾過してEtOAcで洗浄した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これをEtOAc中に溶解し、水、ブラインで洗浄して Na_2SO_4 上で乾燥させ、濃縮して残渣を得て、これを20% EtOAcのヘキサン溶液～50% EtOAcのヘキサン溶液で溶出するISCO（40 gカラム）によって精製し、5-ヨードペンタン酸tert-ブチル（4.54 g、15.98 mmol、収率95%）を黄色油として得た。 $^1\text{H NMR}$ （500 MHz，クロロホルム-d） δ 3.19（t， $J = 6.9$ Hz，2H），2.24（t， $J = 7.3$ Hz，2H），1.86（p， $J = 7.1$ Hz，2H），1.70（p， $J = 7.4$ Hz，2H），1.45（s，9H）。

40

【1 3 5 1】

ステップ2：N-（（1S，2R，3R，4R，5S）-2，3-ジヒドロキシー-1-

50

(ヒドロキシメチル) - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 4 - イル) アセトアミド (600 mg、2. 57 mmol) の DMF (15 mL) 溶液に、2, 2 - ジメトキシプロパン (2087 μ l、17. 03 mmol)、続いて (+/-) - カンファ - 10 - スルホン酸 (264 mg、1. 135 mmol) を添加した。反応混合物を 70°C で 24 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却し、次いでメタノール (2. 5 mL) を添加した。反応混合物を室温で 30 分間攪拌し、TEA (0. 10 mL) で中和した。溶媒を蒸発させ、残渣をトルエンと共蒸発させた。残渣を EtOAc ~ 10% MeOH の EtOAc 溶液で溶出する ISCO (24 g 金) によって精製し、N - ((3aR, 4S, 7S, 8R, 8aR) - 4 - (ヒドロキシメチル) - 2, 2 - ジメチルヘキサヒドロ - 4, 7 - エポキシ [1, 3] ジオキソロ [4, 5 - d] オキセピン - 8 - イル) アセトアミド (666 mg、2. 437 mmol、収率 95%) を得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO - d₆) δ 8. 09 (d, J = 8. 1 Hz, 1H), 5. 15 - 5. 05 (m, 2H), 4. 26 (d, J = 5. 8 Hz, 1H), 4. 09 (dd, J = 7. 3, 5. 8 Hz, 1H), 3. 80 - 3. 60 (m, 5H), 1. 83 (s, 3H), 1. 37 (s, 3H), 1. 26 (s, 3H); MS, 274. 3 (M+H)⁺.

【1352】

ステップ 3: 5 - ヨードペンタン酸 tert - ブチル (1310 mg、4. 61 mmol) 及び N - ((3aR, 4S, 7S, 8R, 8aR) - 4 - (ヒドロキシメチル) - 2, 2 - ジメチルヘキサヒドロ - 4, 7 - エポキシ [1, 3] ジオキソロ [4, 5 - d] オキセピン - 8 - イル) アセトアミド 7 (420 mg、1. 537 mmol) の DCM (10. 5 mL) 溶液に、硫酸水素テトラブチルアンモニウム (783 mg、2. 305 mmol)、続いて 12. 5 M の水酸化ナトリウム溶液 (7 mL) を添加した。反応混合物を室温で 24 時間攪拌した。反応混合物を DCM 及び水で希釈し、DCM (2 $\times$) で抽出した。有機層を 1 N の HCl 溶液で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を減圧下で濃縮して、残渣を得た。得られた粗物質を酢酸エチル (30 mL) に添加し、5 分間超音波処理した。得られた沈殿物を濾過し、酢酸エチル (10 mL $\times$ 2) で洗浄した。LC - MS は、フィルターが所望の生成物を含有しないことを示し、これはテトラブチルアンモニウム塩であった。濾液を減圧下で濃縮して残渣を得て、これを 50% EtOAc のヘキサン溶液 ~ EtOAc で溶出する ISCO (40 g シリカゲル金カートリッジ) によって精製し、5 - ((3aR, 4S, 7S, 8R, 8aR) - 8 - アセトアミド - 2, 2 - ジメチルヘキサヒドロ - 4, 7 - エポキシ [1, 3] ジオキソロ [4, 5 - d] オキセピン - 4 - イル) メトキシ) ペンタン酸 tert - ブチル (0. 470 g、1. 094 mmol、収率 71. 2%) を帯黄色油として得た。¹H NMR (500 MHz, クロロホルム - d) δ 5. 56 (d, J = 9. 1 Hz, 1H), 4. 21 (d, J = 5. 9 Hz, 1H), 4. 12 (dtd, J = 7. 7, 3. 8, 1. 7 Hz, 1H), 3. 99 (t, J = 6. 3 Hz, 1H), 3. 90 (d, J = 9. 5 Hz, 1H), 3. 77 (d, J = 2. 0 Hz, 2H), 3. 67 (d, J = 9. 5 Hz, 1H), 3. 52 (ddt, J = 30. 5, 9. 2, 5. 8 Hz, 2H), 2. 23 (t, J = 7. 1 Hz, 2H), 2. 03 (d, J = 14. 5 Hz, 3H), 1. 65 - 1. 55 (m, 7H), 1. 44 (s, 9H), 1. 35 (s, 3H); MS, 452. 4 (M+Na)⁺.

【1353】

ステップ 4: 15, 15 - ビス (13, 13 - ジメチル - 5, 11 - ジオキソ - 2, 12 - ジオキサ - 6, 10 - ジアザテトラデシル) - 2, 2 - ジメチル - 4, 10, 17 - トリオキソ - 3, 13 - ジオキサ - 5, 9, 16 - トリアザヘニコサン - 21 - 酸ベンジル (0. 168 g、0. 166 mmol) の DCM (3 mL) 溶液に、TFA (3 mL) を添加した。反応混合物を室温で 3 時間攪拌した。LC - MS は、反応が完了したことを示した。溶媒を減圧下で蒸発させて、5 - ((1, 19 - ジアミノ - 10 - ((3 - ((3 - アミノプロピル) アミノ) - 3 - オキソプロポキシ) メチル) - 5, 15 - ジオキソ

ー8, 12-ジオキサ-4, 16-ジアザノナデカン-10-イル) アミノ) -5-オキソペンタン酸ベンジルを無色の油として得た。MS, 710.5 (M+H)⁺。精製することなく次のステップに直接使用する。

【1354】

ステップ5: 5-((3aR, 4S, 7S, 8R, 8aR)-8-アセトアミド-2, 2-ジメチルヘキサヒドロ-4, 7-エポキシ[1, 3]ジオキソロ[4, 5-d]オキセピン-4-イル)メトキシ)ペンタン酸tert-ブチル(285mg、0.664mmol)のDCM(5mL)溶液に、TFA(5mL)を添加して室温で4時間攪拌した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を蒸発させて、5-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)メトキシ)ペンタン酸を得た。MS (ESI): 334.3 (M+H)⁺。精製することなく次のステップに直接使用する。

【1355】

ステップ6: 5-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)メトキシ)ペンタン酸(221mg、0.664mmol)のDCM(10mL)溶液に、DIPEA(2313μL、13.28mmol)、HBTU(208mg、0.548mmol)、HOBT(67.3mg、0.498mmol)、5-((1, 19-ジアミノ-10-((3-((3-アミノプロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 15-ジオキソ-8, 12-ジオキサ-4, 16-ジアザノナデカン-10-イル)アミノ)-5-オキソペンタン酸ベンジル(118mg、0.166mmol)(GL08-02)のDMF(3.0mL)及びDCM(5.0mL)溶液を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。LC-MSは所望の生成物を示した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これをDCM~80%MeOHのDCM溶液で溶出するISCO(24g金カートリッジ)によって精製し、18, 18-ビス(17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザテトラコサン-24-酸ベンジル(272mg、0.164mmol、収率99%)を得た(管30~42の生成物(40%MeOHのDCM溶液~60%MeOHのDCM溶液))。¹H NMR(500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.89 (d, J = 7.8 Hz, 3H), 7.81 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 7.75 (s, 3H), 7.34 (q, J = 7.5, 6.9 Hz, 5H), 7.05 (s, 1H), 5.07 (s, 5H), 4.83 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 4.56 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 3.73 (dd, J = 23.3, 9.2 Hz, 6H), 3.64 (d, J = 7.0 Hz, 6H), 3.58 - 3.35 (m, 27H), 3.02 (p, J = 6.2 Hz, 12H), 2.33 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.26 (t, J = 6.4 Hz, 6H), 2.10 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.04 (t, J = 7.4 Hz, 6H), 1.82 (s, 9H), 1.72 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.52 - 1.39 (m, 18H); MS (ESI), 1656.3 (M+H)⁺。

【1356】

ステップ7: 18, 18-ビス(17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザテトラコサン-24-酸

ベンジル (270 mg、0.163 mmol) の EtOAc (10 mL) 溶液に、10% Pd-C (50 mg)、及び MeOH (5.0 mL)、及び トリエチルシラン (1042 μ l、6.52 mmol) を添加した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、濾過して濃縮し、18, 18-ビス (17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル)-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザテトラコサン-24-酸 (246 mg、0.157 mmol、収率96%) を白色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.99 (brs, 1H), 7.89 (d, J = 7.9 Hz, 3H), 7.82 (t, J = 5.4 Hz, 3H), 7.75 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 7.03 (s, 1H), 5.07 (d, J = 1.6 Hz, 3H), 4.83 (brs, 3H), 4.56 (brs, 3H), 3.79 – 3.68 (m, 6H), 3.64 (d, J = 7.2 Hz, 6H), 3.58 – 3.34 (m, 27H), 3.02 (p, J = 6.3 Hz, 12H), 2.27 (t, J = 6.4 Hz, 6H), 2.17 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.08 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.04 (t, J = 7.3 Hz, 6H), 1.82 (s, 9H), 1.65 (p, J = 7.5 Hz, 2H), 1.54 – 1.40 (m, 18H); MS (ESI), 1566.3 (M+H)⁺.

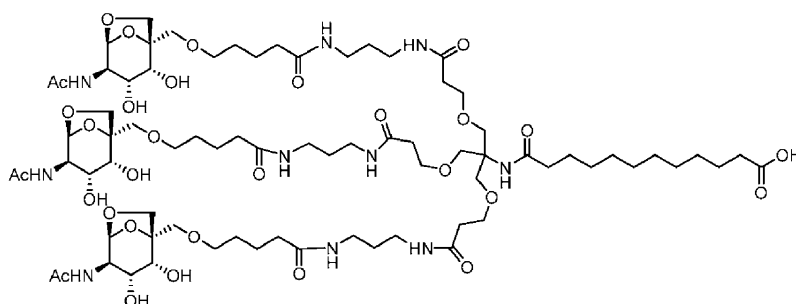
【1357】

実施例 4B.

18, 18-ビス (17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル)-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸の合成

【1358】

【化223】



【1359】

18, 18-ビス (17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル)-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸を、18, 18-ビス (17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1

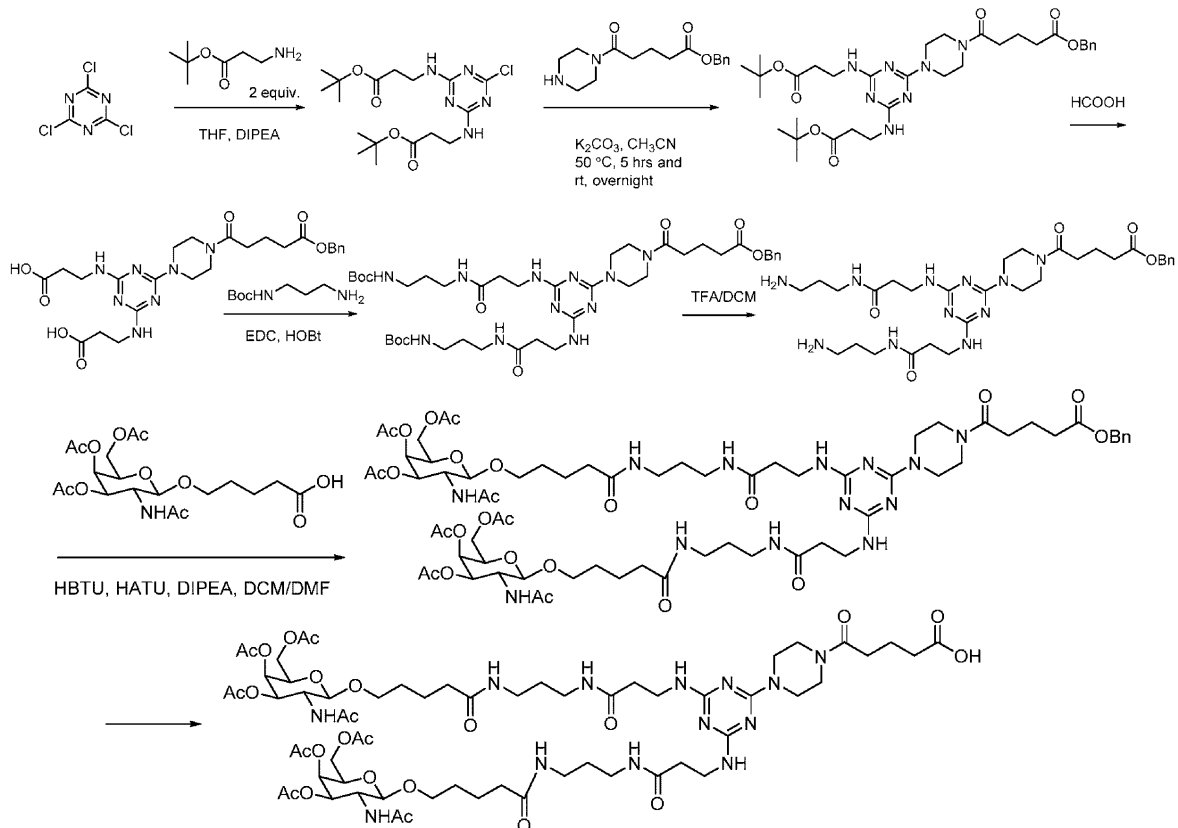
S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - アセトアミド - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 1 - イル) - 7, 13, 20 - トリオキソ - 2, 16 - ジオキサー - 8, 12, 19 - トリアザテトラコサン - 24 - 酸と同じ手順を使用して合成した。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.90 (d, J = 7.8 Hz, 3H), 7.83 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 7.76 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 6.98 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 5.09 (s, 3H), 3.81 - 3.69 (m, 6H), 3.69 - 3.62 (m, 6H), 3.62 - 3.40 (m, 24H), 3.04 (p, J = 6.1 Hz, 9H), 2.28 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 2.18 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.06 (t, J = 7.7 Hz, 6H), 1.84 (s, 6H), 1.48 (tq, J = 14.9, 7.4 Hz, 16H), 1.23 (s, 8H)。MS (ESI), 1664.0 (M+H)⁺。

【1360】

実施例5. 部分を組み込むための化合物例。

5 - (4 - (4, 6 - ビス ((3 - ((3 - (5 - ((2 R, 3 R, 4 R, 5 R, 6 R) - 3 - アセトアミド - 4, 5 - ジアセトキシ - 6 - (アセトキシメチル) テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル) オキシ) ペンタンアミド) プロピル) アミノ) - 3 - オキソプロピル) アミノ) - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル) ピペラジン - 1 - イル) - 5 - オキソペンタン酸の合成。

【化224】



【1361】

ステップ1～2: 固体試薬2, 4, 6-トリクロロ-1, 3, 5-トリアジン (0.500 g、2.71 mmol) のTHF (30 mL) 溶液に、3-アミノプロパン酸tert-ブチルHCl塩 (0.985 g、5.42 mmol) 及びDIPEA (2.36 mL、13.56 mmol) を添加した。反応混合物を室温で5時間攪拌した。LC-MSは所望の生成物を示した、MS (ESI): 402.4 (M+H)⁺。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これを次のステップに直接使用した。3, 3' - ((6 - クロロ - 1

、3,5-トリアジン-2,4-ジイル)ビス(アザンジイル))ジプロピオン酸ジ-tert-ブチル(1.052g、2.71mmol)のアセトニトリル(50mL)溶液に、5-オキソ-5-(ピペラジン-1-イル)ペンタン酸ベンジル(1.103g、3.80mmol)及び K_2CO_3 (2.248g、16.27mmol)を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌し、50℃で攪拌した。EtOAcで希釈し、濾過して減圧下で濃縮して残渣を得て、これを20%EtOAcのヘキサン溶液~50%EtOAcのヘキサン溶液で溶出するISCO(40g金)によって精製し、3,3'-((6-(4-(5-(ベンジロキシ)-5-オキソペンタノイル)ピペラジン-1-イル)-1,3,5-トリアジン-2,4-ジイル)ビス(アザンジイル))ジプロピオン酸ジ-tert-ブチル(1.13g、64%)を白色固体として得た。¹H NMR(400 MHz, クロロホルム-d) δ 7.43-7.30(m, 5H), 5.15(s, 2H), 3.75(brs, 4H), 3.63(brs, 6H), 3.43(brs, 2H), 2.51(q, J=7.0, 6.5 Hz, 6H), 2.42(t, J=7.4 Hz, 2H), 2.09-1.96(m, 2H), 1.48(s, 18H); MS(ESI): 656.6 (M+H)⁺。

【1362】

ステップ3: 3,3'-((6-(4-(5-(ベンジロキシ)-5-オキソペンタノイル)ピペラジン-1-イル)-1,3,5-トリアジン-2,4-ジイル)ビス(アザンジイル))ジプロピオン酸ジ-tert-ブチル(1.10g、1.68mmol)のギ酸(20mL)溶液を室温で一晩攪拌した。LC-MSは反応が完了しなかったことを示し、溶媒を蒸発させた。ギ酸(20mL)を反応混合物に添加し、反応混合物を室温で5時間攪拌した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を濃縮し、トルエン(2×)と共蒸発させて真空下で一晩乾燥し、3,3'-((6-(4-(5-(ベンジロキシ)-5-オキソペンタノイル)ピペラジン-1-イル)-1,3,5-トリアジン-2,4-ジイル)ビス(アザンジイル))ジプロピオン酸(0.91g、収率100%)を白色固体として得た。MS(ESI), 544.2 (M+H)⁺。

【1363】

ステップ4: 0℃の3,3'-((6-(4-(5-(ベンジロキシ)-5-オキソペンタノイル)ピペラジン-1-イル)-1,3,5-トリアジン-2,4-ジイル)ビス(アザンジイル))ジプロピオン酸(0.91g、1.68mmol)及びHOBt(0.76g、4.36mmol)のDCM(30mL)及びDMF(3mL)溶液に、(3-アミノプロピル)カルバミン酸tert-ブチル(0.840g、4.36mmol)、EDC HCl塩(0.836g、4.36mmol)及びDIPEA(1.460mL、8.39mmol)を添加した。反応混合物を0℃で15分間攪拌し、室温で20時間攪拌した。溶媒を蒸発させて残渣を得て、これをEtOAc(300mL)中に溶解し、水(1×)、飽和重炭酸ナトリウム(2×)、10%クエン酸(2×)及び水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮して残渣を得て、これをDCM~30%MeOHのDCM溶液で溶出するISCO(80g金カートリッジ)によって精製し、5-(4-(4,6-ビス((3-((3-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)プロピル)アミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸ベンジル(1.11g、収率77%)を白色固体として得た。MS(ESI): 857.5 (M+H)⁺。

【1364】

ステップ5: 5-(4-(4,6-ビス((3-((3-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)プロピル)アミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸ベンジル(212.3mg、0.250mmol)のDCM(5.0mL)溶液に、TFA(3.0mL)を添加した。反応混合物を室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、精製することなく次のステップに直接使用する。MS(ESI): 656.3 (M+H)⁺。

【1365】

ステップ6: 5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタン酸(333mg、0.740mmol)のDCM(5mL)溶液に、DIPEA(2.16mL、12.4mmol)、HBTU(235mg、0.620mmol)、HOBt(67mg、0.50mmol)、5-(4-(4, 6-ビス((3-(3-アミノプロピル)アミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸ベンジル(163mg、0.250mmol)のDCM(3.0mL)溶液を添加した。反応混合物を室温で3時間攪拌した。LC-MSは所望の生成物を示した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これをDCM~50%MeOHのDCM溶液で溶出するISCO(24g金カートリッジ)によって精製し、若干HOBtを含有する(2R, 2'R, 3R, 3'R, 4R, 4'R, 5R, 5'R, 6R, 6'R)-(((3, 3'-((6-(4-(5-(ベンジルオキシ)-5-オキソペンタノイル)ピペラジン-1-イル)-1, 3, 5-トリアジン-2, 4-ジイル)ビス(アザンジイル))ビス(プロパノイル))ビス(アザンジイル))ビス(プロパン-3, 1-ジイル))ビス(アザンジイル))ビス(5-オキソペンタン-5, 1-ジイル))ビス(オキシ))ビス(5-アセトアミド-2-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-6, 3, 4-トリイル)テトラアセテート(460mg)を得た。MS(ESI), 1515.7 (M+H)⁺。

【1366】

ステップ7: (2R, 2'R, 3R, 3'R, 4R, 4'R, 5R, 5'R, 6R, 6'R)-(((3, 3'-((6-(4-(5-(ベンジルオキシ)-5-オキソペンタノイル)ピペラジン-1-イル)-1, 3, 5-トリアジン-2, 4-ジイル)ビス(アザンジイル))ビス(プロパノイル))ビス(アザンジイル))ビス(プロパン-3, 1-ジイル))ビス(アザンジイル))ビス(5-オキソペンタン-5, 1-ジイル))ビス(オキシ))ビス(5-アセトアミド-2-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-6, 3, 4-トリイル)テトラアセテート(0.44g、0.290mmol)のEtOAc(20mL)溶液に、10%Pd-C(40mg)、続いてAr下で2.0mLのMeOHを添加した。トリエチルシラン(2.784mL、17.43mmol)を、反応混合物にゆっくりと添加した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、セライトに通して濾過して、50%MeOHのEtOAc溶液で洗浄した。溶媒を減圧下で蒸発させて、5-(4-(4, 6-ビス((3-(3-(5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸(0.43g、収率100%)を白色固体で得た。MS(ESI): 1425.0 (M+H)⁺。

【1367】

実施例6. 部分を組み込むための化合物例。

5-(4-(4, 6-ビス((3-(3-(5-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)メトキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸の合成。

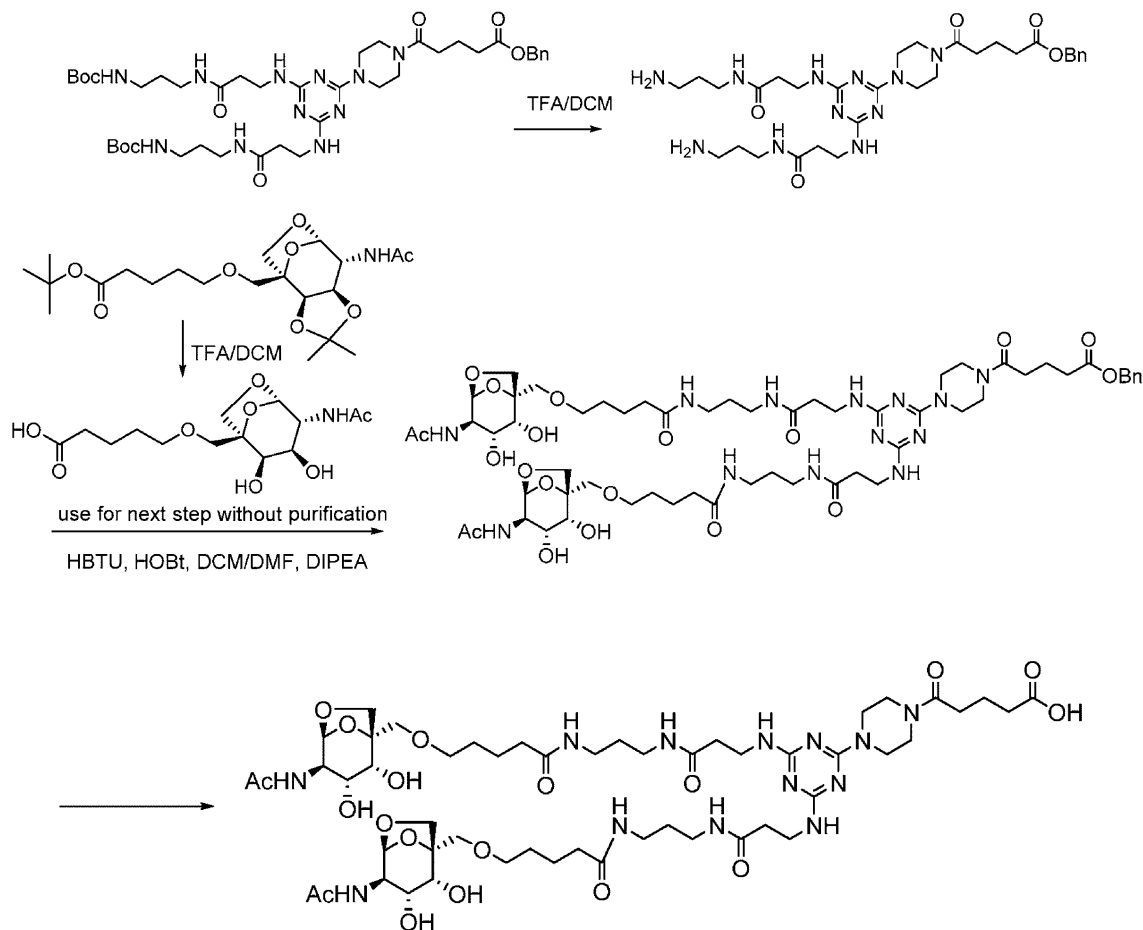
10

30

40

50

【化 2 2 5】



10

20

【1 3 6 8】

ステップ1: 5-((4, 6-bis((3-((3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)amino)-3-oxopropyl)amino)-1, 3, 5-triazine-2-yl)piperazine-1-yl)-5-oxopentanoic acid benzyl ester (212, 3 mg, 0.250 mmol) の DCM (5.0 mL) 溶液に、TFA (3.0 mL) を添加した。反応混合物を室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、精製することなく次のステップに直接使用する。MS (ESI): 656.3 (M+H)⁺。

30

【1 3 6 9】

ステップ2: 5-((3aR, 4S, 7S, 8R, 8aR)-8-acetamido-2, 2-dimethylhexahydro-4, 7-epoxispiro[1, 3]dioxospiro[4, 5-d]oxepin-4-yl)methylpentanoic acid tert-butyl ester (373 mg, 0.870 mmol) の DCM (5 mL) 溶液に、TFA (5 mL) を添加して室温で4時間攪拌した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を蒸発させて、5-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-acetamido-2, 3-dihydroxy-6, 8-dioxaspiro[3.2.1]octan-1-yl)methylpentanoic acidを得た。MS (ESI): 334.3 (M+H)⁺。精製することなく次のステップに直接使用する。

40

【1 3 7 0】

ステップ3: 55-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-acetamido-2, 3-dihydroxy-6, 8-dioxaspiro[3.2.1]octan-1-yl)methylpentanoic acid (289 mg, 0.870 mmol) の DCM (5 mL) 溶液に、DIPEA (2.16 mL, 12.4 mmol)、HBTU (330 mg, 0.870 mmol)、HOBT (67 mg, 0.50 mmol)、5-((4, 6-bis((3-((3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propyl)amino)-3-oxopropyl)amino)-1, 3, 5-triazine-2-yl)piperazine-1-yl)-5-oxopentanoic acid benzyl ester (212, 3 mg, 0.250 mmol) を添加した。反応混合物を室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、精製することなく次のステップに直接使用する。MS (ESI): 656.3 (M+H)⁺。

50

(3-アミノプロピル)アミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸ベンジル(163 mg、0.250 mmol)のDCM(3.0 mL)溶液を添加した。反応混合物を室温で3時間攪拌した。LC-MSは所望の生成物を示した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これをDCM~50%MeOHのDCM溶液で溶出するISCO(24 g金カートリッジ)によって精製し、5-(4-(4,6-ビス((3-((3-(5-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-アセトアミド-2,3-ジヒドロキシ-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)メトキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸ベンジル(227 mg、71%)を得た。MS(ESI), 1287.0 (M+H)⁺。

10

【1371】

ステップ4: 5-(4-(4,6-ビス((3-((3-(5-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-アセトアミド-2,3-ジヒドロキシ-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)メトキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸ベンジル(0.167 g、0.130 mmol)のEtOAc(10 mL)溶液に、10%Pd-C(50 mg)、続いてAr下で2.0 mLのMeOHを添加した。トリエチルシラン(1.66 mL、10.39 mmol)を、反応混合物にゆっくりと添加した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、セライトに通して濾過して、50%MeOHのEtOAc溶液で洗浄した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、セライトに通して濾過して、50%MeOHのEtOAc溶液で洗浄した。溶媒を減圧下で蒸発させて、5-(4-(4,6-ビス((3-((3-(5-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-アセトアミド-2,3-ジヒドロキシ-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)メトキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)-5-オキソペンタン酸(32 mg、収率21%)を白色固体で得た。MS(ESI): 1196.7 (M+H)⁺。

20

【1372】

実施例7. ある特定のホスホラミダイトの調製例。

30

一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチド調製のためのモノマー(ホスホラミダイト)及びその方法を提供する。一部の実施形態では、提供するホスホラミダイトは、特有の及び/または大幅に改善された活性及び/または特性を提供する5'末端構造を含む。一部の実施形態では、提供するホスホラミダイトは、オリゴヌクレオチド中への組込みのために所望の化学的部分、例えば、炭水化物部分、脂質部分などを含む。一部の実施形態では、提供するホスホラミダイトは、所望の化学的部分、例えば、炭水化物部分、脂質部分などの組込みのためにリンカー/ハンドルを含む。本開示においては多くの技術を利用してホスホラミダイトを調製することができ、WO/2010/064146、WO/2011/005761、WO/2013/012758、WO/2014/010250、US2013/0178612、WO/2014/012081、WO/2015/107425、WO/2017/015555、及びWO/2017/062862に記載されるものを含むが、これらに限定されず、その方法及び試薬の各々が、参照によって本明細書に組み込まれる。例として以下に提供するのは、ある特定のホスホラミダイトの調製である。

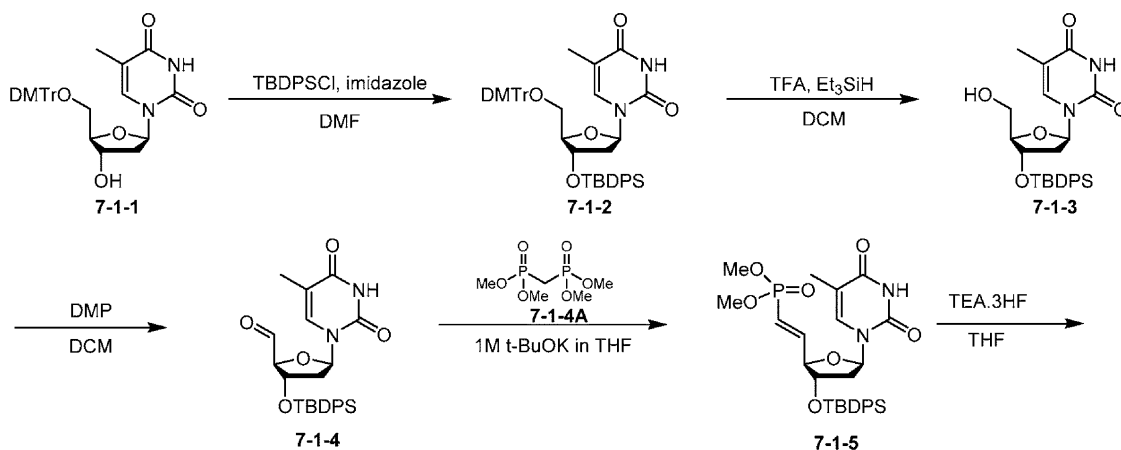
40

【1373】

実施例7-1. チミジン-5'-ジメチルビニルホスホネート-2'-デオキシ-3'-CNEホスホラミダイトの調製。

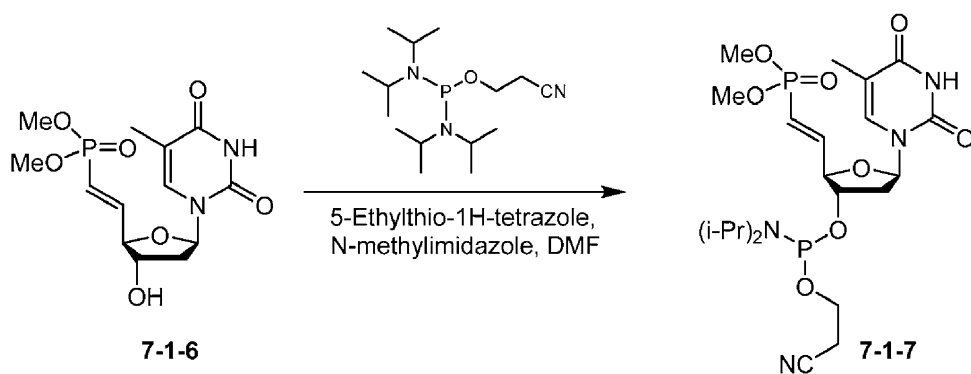
50

【化 2 2 6】



10

【化 2 2 7】

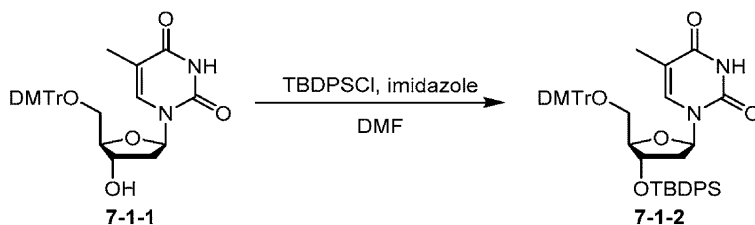


20

【1 3 7 4】

化合物 7-1-2 の調製。

【化 2 2 8】



30

【1 3 7 5】

化合物 7-1-1 (20.00 g、36.72 mmol、1.00 当量) の DMF (100.00 mL) 溶液に、イミダゾール (25.00 g、367.20 mmol、10.00 当量)、続いて TBDPSCI (50.47 g、183.60 mmol、47.17 mL、5.00 当量) を添加した。反応混合物を 25℃ で 16 時間攪拌した。TLC (ジクロロメタン：メタノール = 1 : 1) は、化合物 7-1-1 が完全に消費されたことを示した。EtOAc (300 mL) を添加し、混合物を水 (60 mL × 3) で洗浄した。有機相を Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濾過して濃縮した。残渣を、シリカゲル上でのカラムクロマトグラフィー (石油エーテル：酢酸エチル = 20 : 1、1 : 1、1 : 4) によって

40

50

【 1 3 7 6 】

10

Chemical reaction scheme showing the deprotection of compound **7-1-2** to compound **7-1-3**. The reaction conditions are TFA, Et₃SiH, and DCM.

Compound **7-1-2** (left) is a bicyclic nucleoside derivative. It features a 2,4-dimethyl-6-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl group attached to a ribose ring. The 5' position of the ribose is protected with a DMTrO group, and the 3' position is protected with an OTBDPS group.

Compound **7-1-3** (right) is the product of the deprotection reaction. It is identical to **7-1-2**, except that the DMTrO group at the 5' position has been removed, replaced by a hydroxyl group (HO-).

20

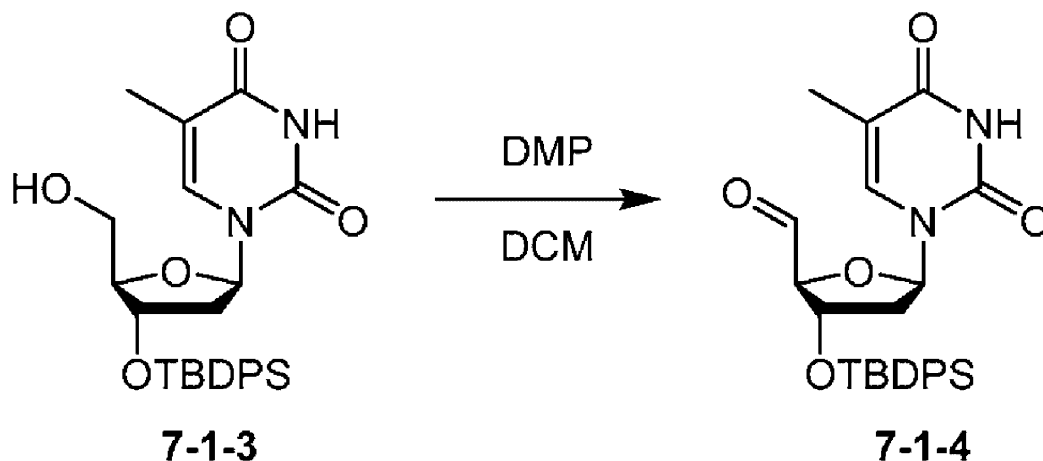
化合物 7-1-2 (25.00 g、31.93 mmol、1.00 当量) の DCM (250 mL) 溶液に、TFA (8.37 g、73.44 mmol、5.44 mL、2.30 当量) を添加した。溶液の色が赤色に変化した。Et₃SiH (8.17 g、70.24 mmol、11.19 mL、2.20 当量) を 25℃ で添加した。反応混合物を 25℃ で 2 時間攪拌すると、赤色の溶液は無色になった。TLC (石油エーテル：酢酸エチル = 1 : 1) は、化合物 7-1-2 が完全に消費されたことを示した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を EtOAc (100 mL) 中に溶解させた。有機相を NaHCO₃ (40 mL)、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させて、濾過して濃縮した。残渣を、シリカゲル上でのカラムクロマトグラフィー (石油エーテル：酢酸エチル = 20 : 1、1 : 1) によって精製した。化合物 7-1-3 (9.80 g、収率 56.20%、純度 88%) を白色固体として得た。¹H NMR: (CDCl₃, 400 MHz) δ = 8.108 (s, 1H), 7.643 (s, 1H), 7.403–7.412 (m, 6H), 7.269 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 6.217 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.451 (s, 1H), 3.975 (s, 1H), 3.631 (d, J = 12 Hz, 1H), 3.255 (s, 1H), 2.264–2.296 (m, 1H), 2.136–2.184 (m, 1H), 1.957 (s, 1H), 1.859 (s, 3H), 1.090 (s, 9H)。

30

40

化合物 7-1-4 の調製。

【化 2 3 0】



10

【1 3 7 9】

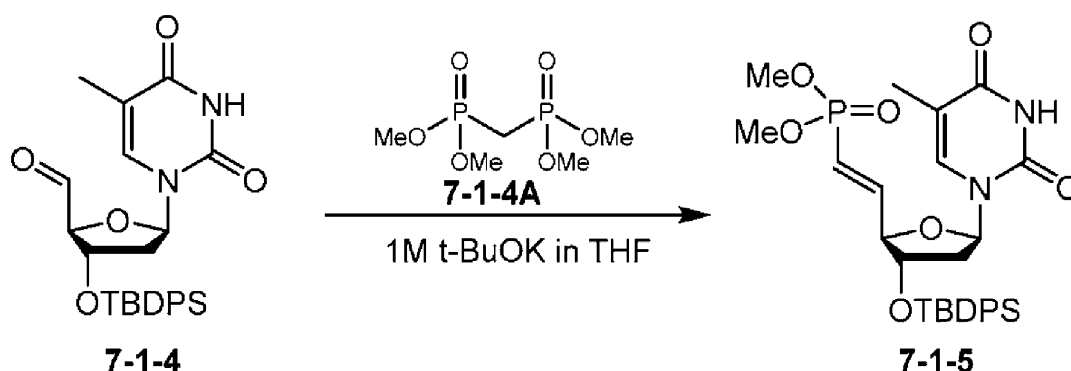
化合物 7-1-3 (18.00 g、37.45 mmol、1.00 当量) の DCM (500 mL) 溶液に、DMP (17.47 g、41.20 mmol、12.75 mL、1.10 当量) を 0℃ で添加した。反応混合物を 25℃ で 3 時間攪拌した。TLC (石油エーテル：酢酸エチル = 1 : 1) は、反応が完了したことを示した。Na₂SO₃ (飽和、100 mL) 及び NaHCO₃ (飽和 100 mL) を順次添加した。混合物を DCM (100 mL × 3) で抽出した。有機相を Na₂SO₄ 上で乾燥させて濃縮した。化合物 7-1-4 (17.92 g、粗) を黄色油として得た。

20

【1 3 8 0】

化合物 7-1-5 の調製。

【化 2 3 1】



30

【1 3 8 1】

化合物 7-1-4A (16.08 g、69.26 mmol、1.85 当量) の THF (29 mL) 溶液に、t-BuOK (1M、69.26 mL、1.85 当量) を 0℃ で添加した。混合物を 0℃ で 10 分間攪拌し、次いで最高 25℃ まで 30 分間加温した。上記の混合物を、化合物 7-1-4 (17.92 g、37.44 mmol、1.00 当量) の THF (36 mL) 溶液に 0℃ で添加した。反応混合物を 0℃ で 1 時間攪拌し、次いで最高 25℃ まで 80 分加温した。TLC (ジクロロメタン：メタノール = 20 : 1) は、反応が完了したことを示した。反応混合物に水 (200 mL) を添加し、EtOAc (300 mL × 4) で抽出した。有機相を乾燥させ (Na₂SO₄)、濾過して濃縮した。残渣を、シリカゲル上でのカラムクロマトグラフィー (PE (10% DCM) : EA = 10 : 1、1 : 8) によって精製した。化合物 7-1-5 (15.00 g) を黄色固体として得た。

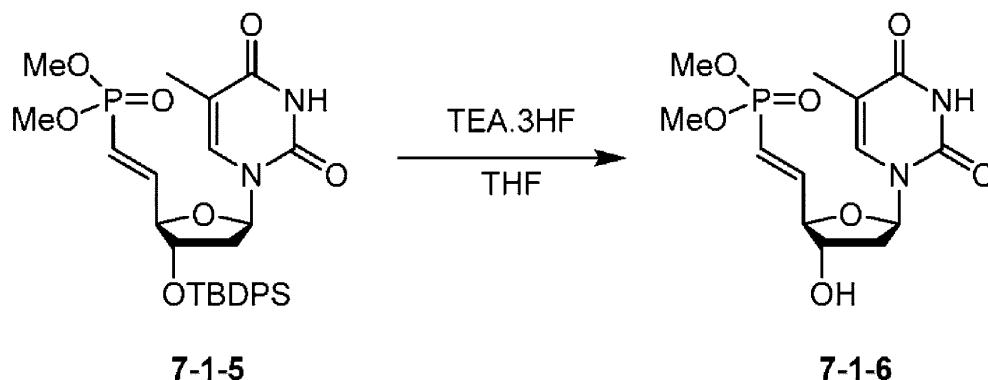
40

【1 3 8 2】

化合物 7-1-6 の調製。

50

【化 2 3 2】



10

【1 3 8 3】

化合物 7-1-5 (21.00 g、35.92 mmol、1.00 当量) の THF (60 mL) 溶液に、N,N-ジエチルエタンアミン、三フッ化水素酸塩 (28.95 g、179.59 mmol、29.24 mL、5.00 当量) を 25℃ で添加した。反応混合物を 25℃ で 20 時間攪拌した。TLC (ジクロロメタン：メタノール=10:1) は、反応が完了したことを示した。反応混合物を減圧下で濃縮し、混合物を pH=7 まで Na_2CO_3 (水溶液、飽和) で中和した。水相を凍結乾燥した。凍結乾燥固体を、DCM:MeOH=10:1 (300 mL×2) で洗浄した。有機相を濃縮した。得られた残渣を、シリカゲル上でのカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン：メタノール=100:1、100:8) によって精製した。化合物 7-1-6 (5.20 g、15.02 mmol、収率 41.81%) を白色固体として得た。 ^1H NMR: (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 9.521 (s, 1H), 7.120 (s, 1H), 6.974–7.074 (m, 1H), 6.372–6.405 (m, 1H), 5.961–6.050 (m, 1H), 4.684 (s, 1H), 4.504–4.518 (m, 1H), 4.393–4.409 (m, 1H), 3.726–3.775 (m, 6H), 3.151–3.180 (m, 2H), 2.411–2.427 (m, 1H), 1.930–2.218 (m, 1H), 1.927 (s, 3H)。

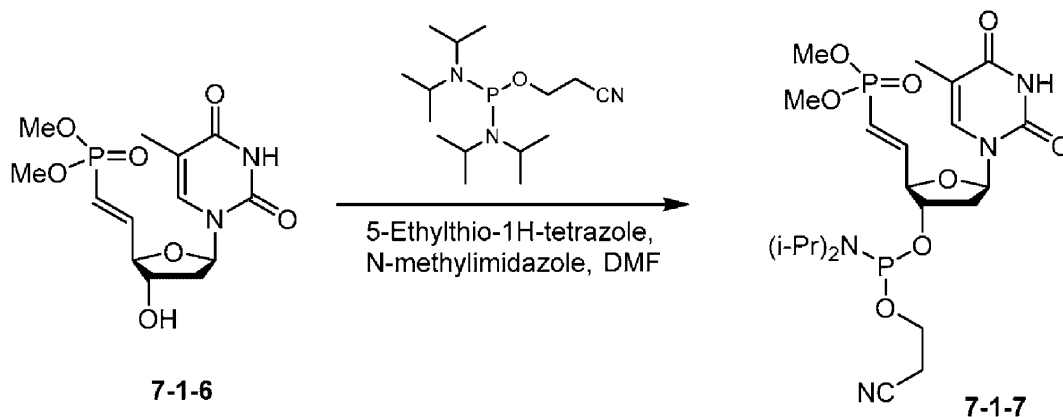
20

30

【1 3 8 4】

化合物 7-1-7 の調製。

【化 2 3 3】



40

【1 3 8 5】

化合物 7-1-6 (3.80 g、10.97 mmol、1.00 当量) の DMF (23 mL) 溶液に、5-エチルスルファニル-2H-テトラゾール (1.43 g、10.97

50

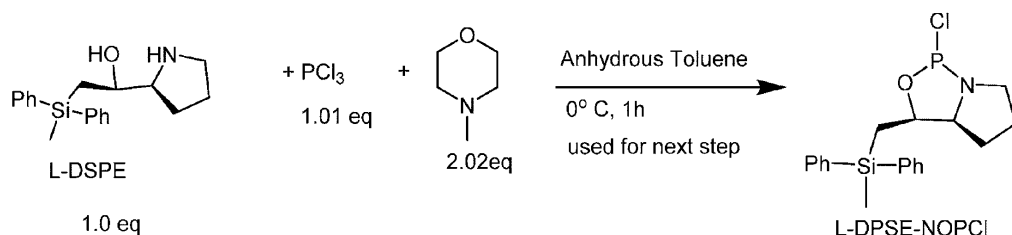
mmol、1.00当量)、1-メチルイミダゾール(1.80g、21.94mmol、1.75mL、2.00当量)及び3-ビス(ジイソプロピルアミノ)ホスファニルオキシプロパンニトリル(4.96g、16.46mmol、5.22mL、1.50当量)を添加した。反応混合物を25℃でN₂下において3時間攪拌した。TLC(ジクロロメタン:メタノール=10:1)は、反応が完了したことを示した。反応混合物をEtOAc(200mL)で希釈した。反応混合物を飽和NaHCO₃水溶液(20mL×4)で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥させ、濾過して減圧下で濃縮した。カラムを、MeOH(20分)、EA(20分)、石油エーテル(20分)、及び石油エーテル/酢酸エチル(20分)で溶出した。このように得られた残渣を、シリカゲルクロマトグラフィー(石油エーテル:EtOAc=10:1、1:1、次いでEtOAc/アセトニトリル=1000:1、100:2、100:4で溶出)によって精製した。化合物7-1-7(4.80g、8.78mmol、収率80.04%)を黄色固体として得た。MS: LCMS, 計算値 C₂₂H₃₆N₄O₈P₂, 546.2008; +Veモードでの実測値 568.95; 569.43 [M+Na]。¹H NMR: (CDCl₃, 400MHz) δ = 9.489 (s, 1H), 7.233 (s, 1H), 6.835–7.035 (m, 1H), 6.303–6.337 (m, 1H), 5.931–5.983 (m, 1H), 4.388–4.504 (m, 1H), 3.703–3.846 (m, 1H), 3.666–3.694 (m, 6H), 3.533–3.559 (m, 2H), 2.594–2.702 (m, 2H), 2.162–2.578 (m, 2H), 1.863 (s, 3H), 1.111–1.189 (m, 12H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.66, 162.54, 150.47, 150.40, 148.68, 148.61, 148.41, 148.35, 135.10, 135.01, 118.73, 118.25, 117.76, 117.61, 116.91, 116.85, 116.38, 111.74, 84.83, 84.79, 84.75, 84.72, 84.62, 84.56, 84.53, 84.50, 84.40, 84.33, 77.40, 77.29, 77.09, 76.77, 76.03, 75.87, 75.49, 75.48, 75.34, 75.32, 58.21, 58.19, 58.16, 58.12, 58.00, 57.92, 52.59, 52.55, 52.54, 52.52, 52.49, 52.46, 45.33, 45.27, 43.43, 43.40, 43.30, 43.27, 38.45, 38.40, 38.37, 36.45, 24.62, 24.57, 24.54, 24.49, 24.46, 22.96, 22.94, 22.88, 22.85, 20.47, 20.39, 20.37, 20.30, 20.11, 20.04, 12.50, 12.48。³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 149.40, 149.38, 19.99, 19.64, 14.10。

【1386】

実施例7-2. 立体的に純粋なL-DPSE-5'-DMT-5'VP-dTアミダイト、7-2-8。

L-DPSE-NOPClの調製。

【化234】



【1387】

L-DPSE (8.82g、28.5mmol)を、ロータリーエバポレーター中にお

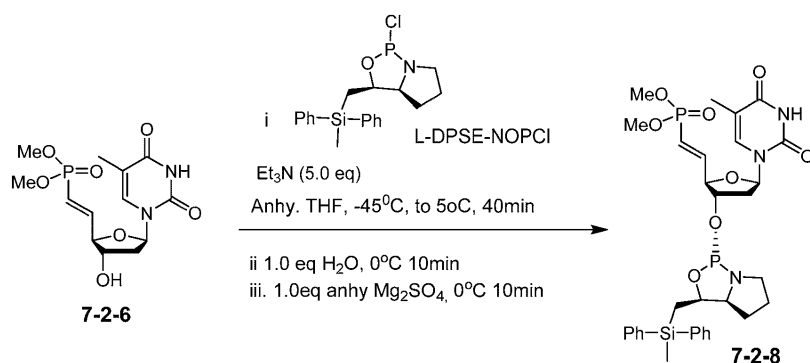
いて35℃で無水トルエン(60mL)との共沸蒸発によって乾燥させ、さらに高真空中で一晩乾燥させた。この乾燥させたL-DPSE及び4-メチルモルホリン(5.82g、6.33mL、57.5mmol)を無水トルエン(50mL)中に溶解させた溶液を、250mLの三口丸底フラスコ内に置いたPCl₃(4.0g、2.5mL、29.0mmol)の無水トルエン(25mL)溶液に添加し、これをアルゴン下で-5℃に冷却し(開始温度:-2℃、最高温度:5℃、10分追加)、反応混合物を0℃でさらに40分間攪拌した。その後、沈殿した白色固体を、特別なフィルター管(Chemglass:Medium Frit、Airfree、Schlenk)を使用してアルゴン下において真空中で濾過した。溶媒を、浴温(25℃)でアルゴン下においてロータリーエバポレーターによって除去して油性の粗混合物を得て、真空中で一晩(約15時間)乾燥させ、次のステップに使用した。

10

【1388】

L-DPSE-5'-DMT-5'VP-dTアミダイトの調製。

【化235】



20

【1389】

化合物7-2-6(7.0g、20.2mmol)を、45℃で75mLの無水トルエンとの共蒸発によって2回乾燥させ、高真空中で一晩維持した。次いで、乾燥した化合物7-2-6を、アルゴン下で250mLの三口フラスコ中において脱水THF(70mL)中に溶解し、続いてトリエチルアミン(14mL、101mmol)を添加して、混合物を-45℃まで冷却した。この冷却した反応混合物に、前ステップからの粗L-DPSE-NOPCl(THF50mL中、28.5mmol、1.4当量)の溶液をシリンジによって滴下して添加した(約10分、内部温度を-40~-35℃に維持する)。次いで、反応混合物を徐々に5℃まで加温した。5℃になってから30分後、TLC及びLC-MS分析は、SMから生成物への完全転化(全反応時間2時間)を示した。反応混合物を氷浴中で冷却し、水(0.36mL、20.2mmol)の添加によってクエンチして10分間攪拌し、続いて無水Mg₂SO₄(3.0g、20.2mmol)を添加した。反応物をAirfree、Schlenkフィルター管に通して濾過し、脱水THF(50mL)で洗浄して28℃の回転蒸発下で蒸発させ、粗生成物の淡黄色固体を得て、これを高真空中で一晩乾燥させた。乾燥した粗生成物を、溶媒として5%TEAを含む酢酸エチル/ヘキサン混合物を使用して、120シリカカラム(これを、5%TEAを含む3カラム体積の酢酸エチルで予め不活性化した)によって精製した。カラム精製後、画分をTLC及びLC-MSによって分析し、一緒にプールした。溶媒をロータリーエバポレーター中において28℃で蒸発させ、残渣を高真空中で乾燥させて生成物を白色固体として得た。収量:11.8g(87%)。¹H NMR(400MHz,クロロホルム-d) δ 7.46(ddt, J=16.5, 7.6, 2.7Hz, 4H), 7.33-7.17(m, 6H), 6.93-6.88(m, 1H), 6.75(ddd, J=22.6, 17.2, 4.4Hz, 1H), 6.16(dd, J=7.5, 6.3Hz, 1H), 5.85(ddd, J=19.2, 17.1, 1.8Hz, 1H), 4.71(dt, J=8.7, 5.7Hz, 1H), 4.38(dp,

30

40

50

$J = 10.7, 3.6 \text{ Hz}, 1\text{H}$), $4.15 \text{ (tt, } J = 5.6, 2.7 \text{ Hz, } 1\text{H})$, $3.68 \text{ (dd, } J = 11.1, 3.7 \text{ Hz, } 6\text{H})$, $3.55 - 3.29 \text{ (m, } 2\text{H})$, $3.09 \text{ (tdd, } J = 10.8, 8.8, 4.3 \text{ Hz, } 1\text{H})$, $2.11 \text{ (ddd, } J = 13.9, 6.3, 3.3 \text{ Hz, } 1\text{H})$, $1.96 \text{ (s, } 1\text{H})$, $1.87 \text{ (d, } J = 1.2 \text{ Hz, } 3\text{H})$, $1.85 - 1.73 \text{ (m, } 2\text{H})$, $1.70 - 1.49 \text{ (m, } 2\text{H})$, $1.38 \text{ (ddd, } J = 15.9, 10.4, 6.3 \text{ Hz, } 2\text{H})$, $1.26 - 1.11 \text{ (m, } 2\text{H})$, $0.60 \text{ (s, } 3\text{H})$. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ $152.41, 19.95$. $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ $171.07, 163.62, 163.59, 150.21, 150.19, 148.49, 148.43, 136.61, 135.84, 135.15, 134.57, 134.33, 129.48, 129.42, 127.97, 127.93, 127.81, 118.38, 116.50, 111.52, 85.02, 84.72, 84.70, 84.51, 84.48, 79.25, 79.16, 77.40, 77.28, 77.08, 76.76, 74.93, 74.91, 74.83, 74.81, 68.01, 67.98, 60.35, 52.60, 52.55, 52.47, 52.42, 47.03, 46.67, 38.12, 38.08, 27.18, 25.85, 25.82, 21.01, 17.58, 17.54, 14.19, 12.58, -3.00, -3.27$. MS: LCMS, 計算値 $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8\text{P}_2\text{Si}$, 685.7255 : +Veモードでの実測値: $686.21 [\text{M}+\text{H}]$, $708.14 [\text{M}+\text{Na}]$.

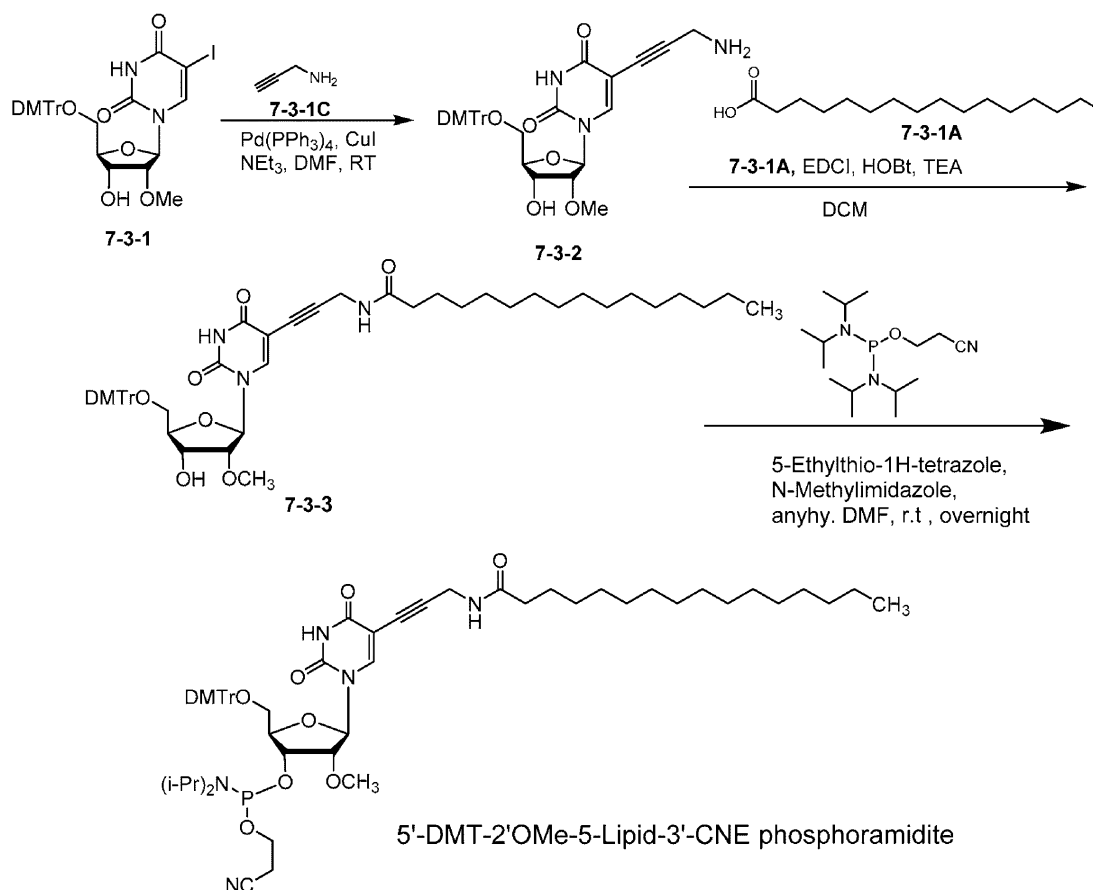
10

20

【1390】

実施例7-3. 5'-DMT-2'-OMe-5-脂質-3'-CNEホスホラミダイトの合成—核酸塩基による所望の部分の組み込み。

【化236】



30

40

【1391】

化合物7-3-2の調製。

50

The reaction scheme illustrates the conversion of compound **7-3-1** to compound **7-3-2**. Compound **7-3-1**, which contains a pyrimidine ring substituted at C6 with an iodine atom and at N9 with a DMTrO group, reacts with propargylamine (**7-3-1C**). The reaction conditions are Pd(PPh₃)₄, CuI, NEt₃, DMF, RT. This process results in the substitution of the iodide with the propargylamino group (-CH₂C≡CH-NH₂), yielding compound **7-3-2**.

Reaction Scheme:

7-3-1 + **7-3-1C** → **7-3-2**

Reagents: Pd(PPh₃)₄, CuI, NEt₃, DMF, RT.

10

【 1 3 9 2 】

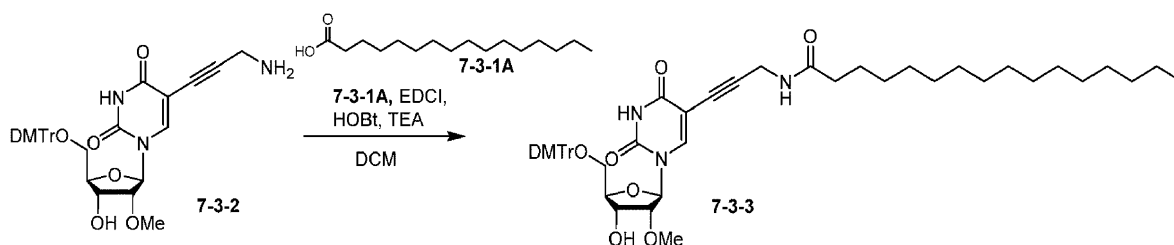
化合物 7-3-1 (13.00 g、18.94 mmol)、プロパー-2-イン-1-アミン (2.09 g、37.87 mmol、2.43 mL)、CuI (901.63 mg、4.73 mmol)、Pd(PPh₃)₄ (2.19 g、1.89 mmol) 及び TEA (3.83 g、37.87 mmol、5.25 mL) の DMF (130 mL) 溶液混合物を脱気して N₂ で 3 回パージし、次いで混合物を 25℃ で 12 時間、N₂ 雰囲気下かつ暗所において攪拌した。LC-MS は、化合物 7-3-1 が完全に消費され、所望の MS を有する 1 つのメインピークを検出したことを示した。混合物を真空中で濃縮した。残渣を、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、ジクロロメタン/メタノール = 100/1~0:1) によって精製した。化合物 7-3-2 (11.00 g、粗) を黄色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.23 (s, 1H), 7.48 - 7.14 (m, 13H), 6.83 (br d, J = 7.3 Hz, 5H), 5.94 (br s, 1H), 4.48 (br t, J = 5.8 Hz, 2H), 4.05 (br d, J = 6.4 Hz, 2H), 3.93 (br d, J = 2.9 Hz, 1H), 3.81 - 3.70 (m, 8H), 3.62 (s, 4H), 3.52 (br d, J = 11.0 Hz, 2H), 3.35 (br d, J = 9.0 Hz, 1H)。LCMS: (M+H⁺): 614.2。TLC (ジクロロメタン/メタノール = 10:1) R_f = 0.19。

20

【 1 3 9 3 】

化合物 7-3-3 の調製。

【化 2 3 8】



40

【 1 3 9 4 】

パルミチン酸 (5.06 g、19.72 mmol) の DCM (130 mL) 溶液に、TEA (3.63 g、35.85 mmol、4.97 mL)、EDCI (5.15 g、26.89 mmol)、HOBt (3.63 g、26.89 mmol)、及び化合物 7-3-3 (11.00 g、17.93 mmol) を添加した。混合物を 25℃ で 1 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 7-3-3 が完全に消費され、所望の MS を有する 1 つのメインピークを検出したことを示した。混合物を真空中で濃縮した。残渣を、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、ジクロロメタン：酢酸エチル = 10 / 1 ~ 0 : 1、ジクロロメタン：酢酸エチル = 100 / 1 ~ 0 : 1) によって精製した。化合物 7-3-3 (6.20 g

50

、収率 40.58%) を黄色固体として得た。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ = 8.25 (s, 1H), 7.50 – 7.14 (m, 10H), 6.90 – 6.77 (m, 4H), 5.93 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.01 (br s, 1H), 4.53 – 4.44 (m, 1H), 4.06 (br d, J = 6.8 Hz, 1H), 3.94 (dd, J = 2.0, 5.1 Hz, 1H), 3.83 – 3.73 (m, 9H), 3.63 (s, 3H), 3.55 – 3.48 (m, 1H), 3.39 (dd, J = 2.5, 11.1 Hz, 1H), 2.79 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 1.85 – 1.76 (m, 2H), 1.50 – 1.41 (m, 2H), 1.24 (br s, 22H), 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 3H)。 $^{13}\text{CNMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ = 172.37, 162.32, 158.66, 158.58, 158.55, 149.58, 144.63, 142.49, 135.55, 135.44, 130.14, 130.00, 129.94, 128.08, 127.86, 126.91, 113.51, 113.35, 99.62, 89.56, 87.56, 86.85, 83.77, 83.68, 74.14, 68.49, 61.77, 58.82, 55.24, 45.30, 36.10, 31.89, 29.84, 29.67, 29.63, 29.49, 29.37, 29.33, 25.42, 22.66, 14.79, 14.11, 9.74。LCMS : ($\text{M} + \text{H}^+$) : 850.4。

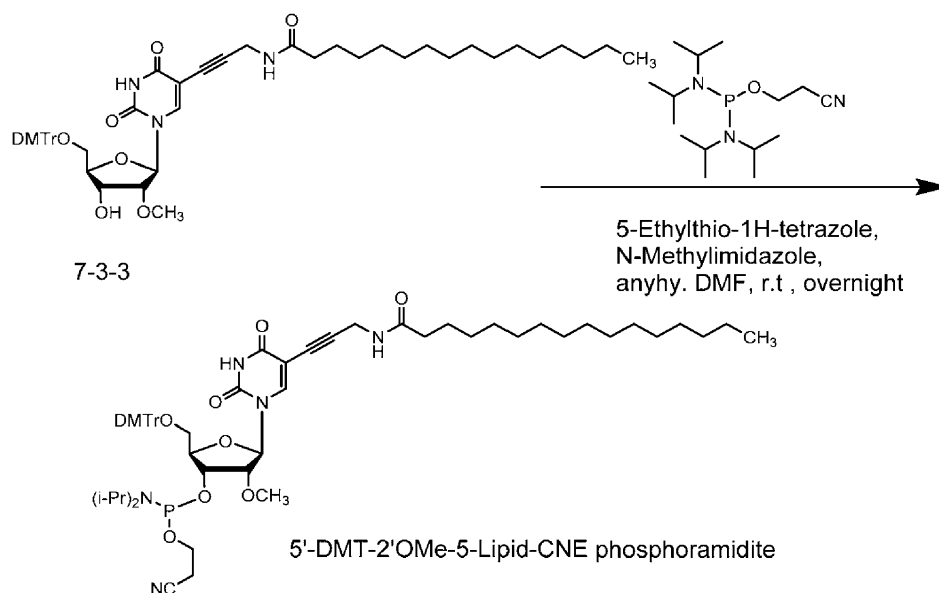
10

【1395】

5'-DMT-2'OMe-5-脂質-3'-CNEホスホラミダイトの調製。

20

【化239】



30

【1396】

40

化合物 7-3-3 (2.8 g、3.29 mmol) を無水トルエンと 2 回 (25 mL × 2) 共蒸発させて、高真空で一晩乾燥させた。乾燥した泡状固体を無水 DMF (5 mL) 中に溶解し、5-エチルチオ-1H-テトラゾール (0.43 g、3.29 mmol)、N-メチルイミダゾール (0.052 mL、0.66 mmol)、続いて 2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (1.49 g、4.93 mmol) を添加した。反応混合物を、室温でアルゴン雰囲気下において一晩攪拌した。TLC が完了を示した後、反応物を EtOAc (70 mL) で希釈して飽和 NaHCO₃ 水溶液 (10 mL) で洗浄し、Mg₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、高真空中で夜間に乾燥させた。乾燥した粗生成物を、溶出液として 5% TEA を含有するヘキサン/酢酸エチル/アセトニトリルを含む 80 g シリカカラム (これを、5% TE

50

Aを含む3カラム体積の酢酸エチルで予め不活性化した)を使用して、Combi-Flash Rf (Teledyne ISCO) によって精製し、5'-DMT-2'OMe-5-脂質-3'CNEホスホラミダイトを泡状固体として得た。収量3.1g(90%)。
 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 150.58 (s) 150.26 (s)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172.20, 172.18, 161.78, 161.66, 158.70, 158.68, 149.45, 149.35, 144.71, 144.57, 142.69, 142.62, 137.91, 135.63, 135.53, 135.49, 135.40, 130.16, 130.11, 128.08, 128.06, 128.01, 127.00, 126.97, 117.71, 117.51, 113.39, 113.36, 113.32, 99.75, 99.46, 89.30, 89.26, 88.49, 88.00, 87.05, 86.84, 83.86, 83.04, 82.98, 82.93, 82.66, 77.39, 77.27, 77.07, 76.75, 74.45, 74.30, 69.88, 69.77, 69.64, 62.10, 61.24, 58.94, 58.92, 58.65, 58.47, 58.44, 57.97, 57.76, 55.30, 55.27, 43.35, 43.32, 43.23, 43.19, 36.11, 36.09, 33.26, 31.90, 29.88, 29.67, 29.65, 29.63, 29.58, 29.50, 29.37, 29.33, 25.41, 24.70, 24.64, 24.61, 24.57, 24.54, 24.50, 22.66, 20.47, 20.40, 20.34, 20.27, 14.82, 14.09。 ^1H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 7.40 (dd, $J = 10.5$, 7.6 Hz, 2H), 7.35 – 7.12 (m, 7H), 6.78 (ddd, $J = 9.0$, 4.2, 2.7 Hz, 4H), 4.82 (dt, $J = 22.1$, 4.9 Hz, 1H), 4.57 – 4.38 (m, 1H), 4.24 – 4.10 (m, 1H), 4.06 – 3.96 (m, 1H), 3.86 – 3.67 (m, 7H), 3.67 – 3.58 (m, 2H), 3.57 – 3.39 (m, 6H), 3.25 (ddd, $J = 13.5$, 11.3, 2.8 Hz, 1H), 2.55 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 2.30 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 1.71 (qd, $J = 7.4$, 7.0, 1.4 Hz, 2H), 1.38 (dtt, $J = 10.5$, 7.7, 2.8 Hz, 2H), 1.09 (dd, $J = 6.7$, 5.1 Hz, 17H), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.80 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H)。MS: LCMS: 計算値, $\text{C}_{59}\text{H}_{82}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}$; 1051.5730; 実測値 + Veモード: m/z : 1153.69 [M+Et₃N]。

【1397】

実施例7-4. 5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT-CNEアミダイトの合成。

10

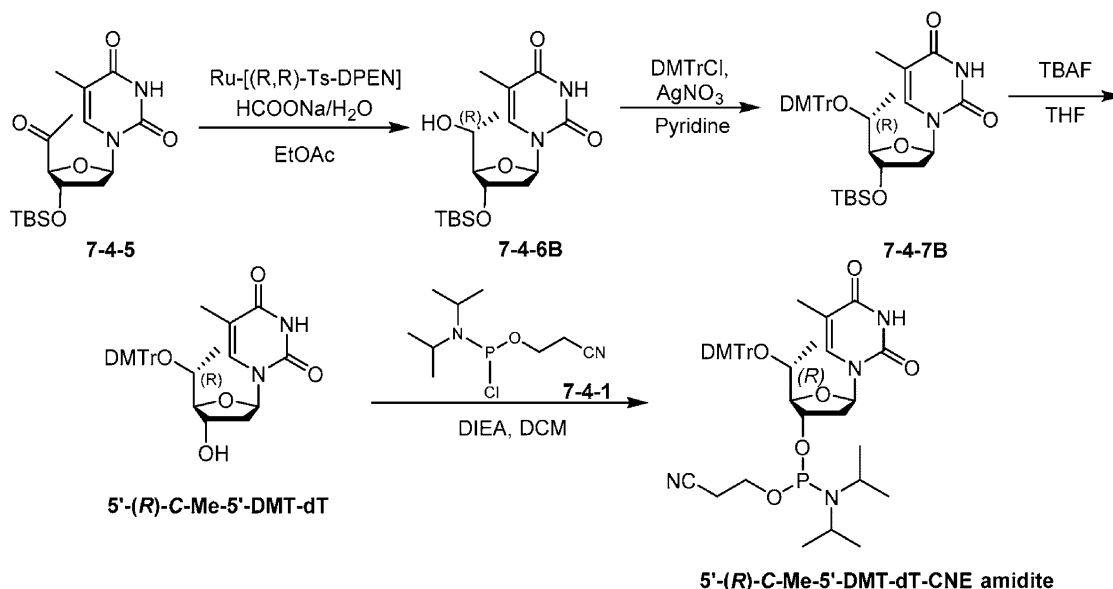
20

30

40

50

【化 2 4 0】



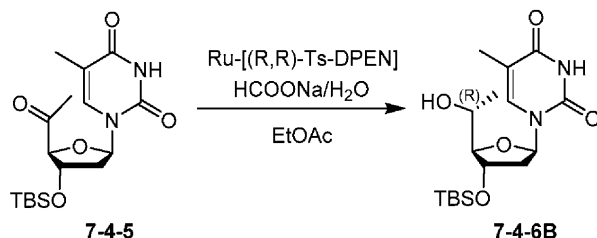
10

【1 3 9 8】

化合物 7-4-6B の調製。

20

【化 2 4 1】



【1 3 9 9】

30

化合物 7-4-5 (46.00 g、124.83 mmol) の、水 (1.84 L) 中に溶解させた EtOAc (460.00 mL) 及びギ酸ナトリウム (353.17 g、5.19 mol) の混合物溶液に、次いで [(1R, 2R) - 2-アミノ-1, 2-ジフェニル-エチル] - (p-トリルスルホニル) アミノ] - クロロールテニウム、1-イソプロピル-4-メチル-ベンゼン (1.59 g、2.50 mmol) を添加した。得られた 2 相混合物を、12 時間 25℃ で N₂ 下において攪拌した。TLC は、出発物質が消費されたことを示した。混合物を EtOAc (50 mL * 3) で抽出した。組み合わせた有機物をブライン (30 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濾過して濃縮して粗物質を得た。残渣を石油エーテル / 酢酸エチル = 5 : 1 からの再結晶によって精製し、化合物 7-4-6B (36.00 g、収率 77.83%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ = 11.31 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 6.16 (dd, J = 5.5, 8.8 Hz, 1H), 5.05 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.49 (br d, J = 5.1 Hz, 1H), 3.78 - 3.70 (m, 1H), 3.55 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 2.20 - 2.09 (m, 1H), 1.96 (br dd, J = 5.7, 13.0 Hz, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.11 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.09 (s, 6H)。HPLC : HPLC 純度 : 97.7%。SFC : SFC 純度 : 99.1%。TLC (石油エーテル / 酢酸エチル = 1 : 1) R_f = 0.37。

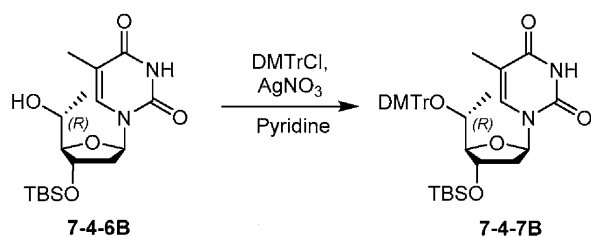
40

【1 4 0 0】

50

化合物 7-4-7B の調製。

【化 2 4 2】



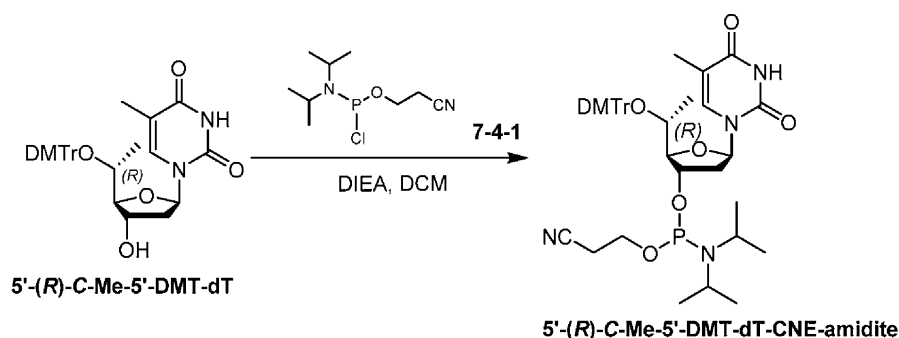
0 - 3.34 (m, 1H), 2.09 - 2.02 (m, 2H), 1.40 (s, 3H), 0.77 (d, $J=6.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6): $\delta = 163.98, 158.58, 150.81, 146.95, 137.11, 136.79, 135.76, 130.49, 130.41, 128.20, 128.15, 127.04, 113.54, 113.52, 110.16, 89.87, 86.24, 83.35, 70.28, 70.05, 60.20, 55.47, 55.35, 21.20, 17.82, 14.52, 12.08$. HPLC: HPLC 純度: 98.7%. LC-MS: $(M-H^+) = 557.2$; LCMS 純度: 98.9%. SFC: SFC 純度: 100.0%. TLC (石油エーテル / 酢酸エチル = 1:1, 5% TEA) $R_f = 0.02$.

10

【1404】

5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE-アミダイトの調製。

【化244】



20

【1405】

5'-(R)-C-Me-5'-OMT-dT (5g, 8.95mmol) をトルエン (50mL) と共に乾燥させた。DIEA (1.39g, 10.74mmol, 1.87mL) 及び 5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT (5g, 8.95mmol) の無水 DCM (50mL) 溶液に、化合物 7-4-1 (2.76g, 9.40mmol) を N_2 下において 0℃ で添加した。混合物を 15℃ で 2 時間攪拌した。TLC は出発物質が消費されたことを示し、2 つの新しいスポットを見出した。混合物を飽和 $NaHCO_3$ 水溶液 (20mL) の添加によってクエンチし、DCM (30mL * 3) で抽出した。組み合わせた有機相を Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過して濃縮し、粗生成物を得て、これを Teledyne 製の Combiflash 機器上で精製した。40g シリカゲルカートリッジカラムを、5% Et_3N (300mL) を含有する 10% $EtOAc$ / 石油エーテルで溶出することによって最初に前処理した。粗生成物を、5% Et_3N を含有する 2:1 体積: 体積の塩化メチレン: 石油エーテルの混合物中に溶解し、カラム上に負荷した。負荷後、精製プロセスを次の勾配: 5% Et_3N を含有する 10~50% の $EtOAc$ / 石油エーテルを使用して実行した。画分を収集した。溶媒の蒸発後、5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE-アミダイトを白色固体として得た (3.6g、収率 53%)。 ^1H NMR (400MHz, クロロホルム- d) $\delta = 8.11$ (br s, 1H), 7.53 (br d, $J=7.7$ Hz, 3H), 7.42 (br t, $J=8.2$ Hz, 4H), 7.32 - 7.17 (m, 4H), 7.07 - 6.99 (m, 1H), 6.84 (br d, $J=8.2$ Hz, 4H), 6.31 (br dd, $J=5.5, 8.7$ Hz, 1H), 4.94 (br s, 1H), 3.96 - 3.73 (m, 10H), 3.72 - 3.41 (m, 4H), 2.65 (td, $J=6.1, 18.0$ Hz, 2H), 2.53 - 2.37 (m, 1H), 2.10 (br d, $J=8.2$ Hz, 1H), 1.47 (br s, 4H), 1.33 - 1.16 (m, 15H), 1.00 - 0.90 (m, 3H)。 ^{31}P NMR (162MHz, クロロホルム- d) $\delta = 148.81$ (s, 1P), 148.35 (s, 1P)。

30

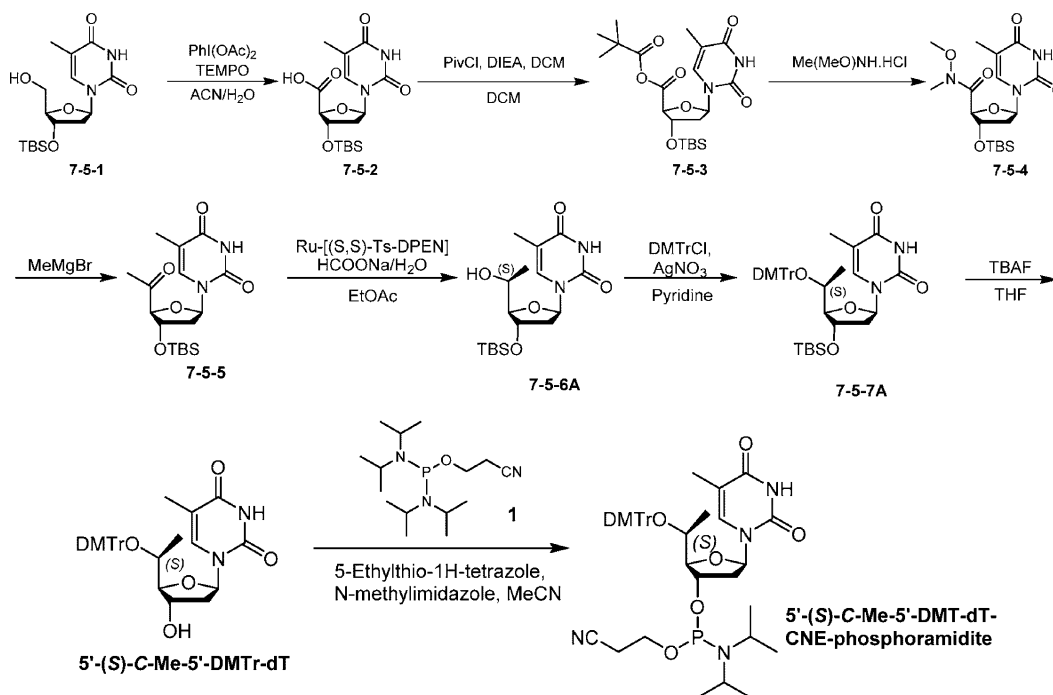
40

50

【1406】

実施例7-5. 5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT-CNEアミダイトの合成。

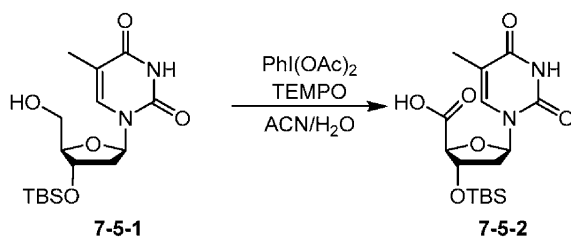
【化245】



【1407】

化合物7-5-2の調製。

【化246】



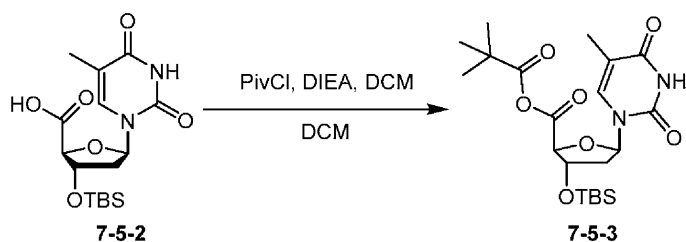
【1408】

化合物7-5-1 (63.00 g、176.72 mmol) のH₂O (250.00 mL) 及びMeCN (250.00 mL) 混合物溶液に、PhI(OAc)₂ (125.23 g、388.79 mmol) 及びTEMPO (5.56 g、35.34 mmol) を10℃で添加した。混合物を25℃で2時間攪拌した。TLC (石油エーテル/酢酸エチル=1:1、R_f=0) は、出発材料が消費されたことを示した。混合物を濃縮し、MTBE (1 L) を添加した。混合物を0.5時間攪拌し、次いで濾過した。ケーキをMTBE (1 L×2) で洗浄して乾燥させ、化合物7-5-2を白色固体として得た (126 g、収率96.23%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO) : δ = 11.21 (s, 1H), 7.89 (d, J=1.0 Hz, 1H), 6.18 (dd, J=5.9, 8.6 Hz, 1H), 4.61–4.41 (m, 1H), 4.17 (d, J=0.9 Hz, 1H), 2.51–2.26 (m, 3H), 2.09–1.85 (m, 2H), 1.74–1.58 (m, 3H), 0.90–0.58 (m, 10H), 0.00 (d, J=2.0 Hz, 6H)。LC-MS: (M+H⁺) : 371.1。TLC (石油エーテル/酢酸エチル=1:1) R_f = 0。

【1409】

化合物 7-5-3 の調製。

【化 2 4 7】



10

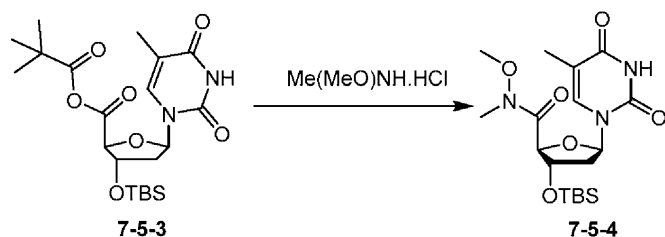
【1 4 1 0】

化合物 7-5-2 (50.00 g、134.96 mmol) の DCM (500.00 mL) 溶液に、DIEA (34.89 g、269.92 mmol、47.15 mL) 及び 2,2-ジメチルプロパノイルクロリド (21.16 g、175.45 mmol) を添加した。混合物を $-10 \sim 0^\circ\text{C}$ で 1.5 時間攪拌した。TLC は、出発物質が消費されたことを示した。DCM 中の混合物を次のステップに直接使用した。TLC (石油エーテル／酢酸エチル = 1 : 1) $R_f = 0.15$ 。

【1 4 1 1】

化合物 7-5-4 の調製。

【化 2 4 8】



20

【1 4 1 2】

化合物 7-5-3 の DCM 溶液に、TEA (40.94 g、404.55 mmol、56.08 mL) 及び N-メトキシメタンアミン塩酸塩 (19.73 g、202.27 mmol) を添加した。混合物を 0°C で 1 時間攪拌した。TLC は、出発物質が消費されたことを示した。TLC は、出発物質が消費されたことを示した。混合物を HCl (1N、100 mL) で、次いで NaHCO_3 水溶液 (100 mL) で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過して濃縮し、粗生成物を得て、これをシリカゲルクロマトグラフィー (石油エーテル／酢酸エチル = 30 / 1、0 / 1) によって精製し、化合物 7-5-4 を白色固体として得た (95.5 g、収率 85.63%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.29$ (s, 1H), 8.19 (br s, 1H), 6.46 (dd, $J = 5.1, 9.3$ Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.38 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 2.18 - 2.08 (m, 1H), 2.00 - 1.90 (m, 1H), 1.87 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H), 0.88 - 0.74 (m, 10H), 0.00 (d, $J = 3.7$ Hz, 6H)。TLC (石油エーテル / 酢酸エチル = 1 : 1) $R_f = 0.43$ 。

30

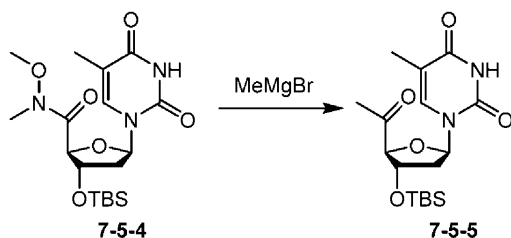
40

【1 4 1 3】

化合物 7-5-5 の調製。

50

【化 2 4 9】



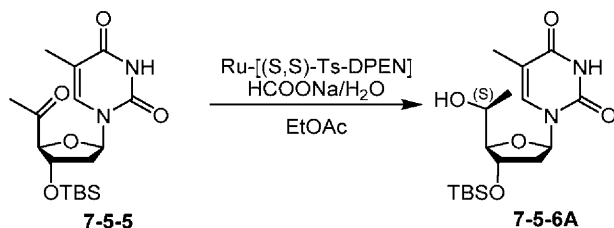
【1 4 1 4】

化合物 7-5-4 (115.00 g、278.09 mmol) の THF (1.20 L) 溶液に、MeMgBr (3 M、185.39 mL) を 0℃ で添加した。混合物を 0℃ で 2 時間攪拌した。TLC は、出発物質が消費されたことを示した。混合物に水 (1 L) を 0℃ で添加し、混合物を EtOAc (300 mL * 2) で抽出した。組み合わせた有機相を Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濾過して濃縮し、化合物 7-5-5 を白色固体として得た (100.00 g、収率 97.58%)。混合物をさらに精製することなく直接使用した。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.81 (br s, 1H), 7.95 (s, 1H), 6.41 (dd, J = 5.6, 8.1 Hz, 1H), 4.60 – 4.40 (m, 2H), 2.40 – 2.16 (m, 4H), 1.98 (s, 3H), 1.02 – 0.83 (m, 10H), 0.14 (d, J = 3.3 Hz, 6H), 0.20 – 0.00 (m, 1H)。TLC (石油エーテル / 酢酸エチル = 1 : 1) R_f = 0.68。

【1 4 1 5】

化合物 7-5-6 A の調製。

【化 2 5 0】



【1 4 1 6】

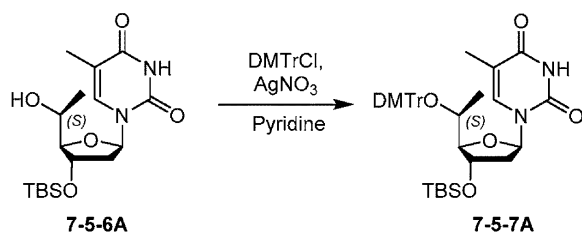
化合物 7-5-5 (46.00 g、124.83 mmol) の、水 (1.84 L) 中に溶解させた EtOAc (460.00 mL) 及びギ酸ナトリウム (353.17 g、5.19 mol) の混合物溶液に、N-[(1S, 2S)-2-アミノ-1, 2-ジフェニル-エチル]-4-メチル-ベンゼンスルホンアミドクロロルテニウム、1-イソプロピル-4-メチル-ベンゼン (1.59 g、2.50 mmol) を添加した。得られた 2 相混合物を、12 時間 25℃ で N₂ 下において攪拌した。TLC は、出発物質が消費されたことを示した。混合物を EtOAc (500 mL * 3) で抽出した。組み合わせた有機物をブライン (300 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濾過して濃縮して粗生成物を得た。混合物を MPLC (石油エーテル: MTBE = 10:1 ~ 1:1) によって 7 回精製し、化合物 7-5-6 A を黄色油として得た (25.6 g、収率 57.53%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.28 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 6.16 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.46 – 4.29 (m, 1H), 3.79 (br t, J = 6.8 Hz, 1H), 3.59 (br s, 1H), 3.32 (s, 1H), 2.21 – 2.09 (m, 1H), 2.06 – 1.97 (m, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.17 – 1.08 (m, 4H), 0.91 – 0.81 (m, 1

OH), 0.08 (s, 6H). SFC: SFC 純度: 98.6%. TLC (石油エーテル / 酢酸エチル = 1:1) R_f = 0.38.

【1417】

化合物 7-5-7A の調製。

【化251】



10

【1418】

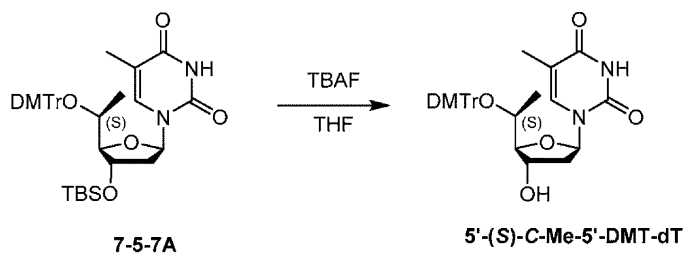
化合物 7-5-6A (12.80 g, 34.55 mmol) を、ピリジン (100 mL) 及びトルエン (100 mL * 2) と共にロータリーエバポレータ上での共沸蒸留によって乾燥させた。化合物 7-5-6A (12.80 g, 34.55 mmol) 及び DMTrCl (1.89 g, 5.59 mmol) のピリジン (120.00 mL) 及び THF (400.00 mL) 混合物溶液を脱気して N₂ で 3 回パージし、次いで AgNO₃ (10.09 g, 59.43 mmol) を添加した。混合物を 25 °C で 15 時間攪拌した。TLC は、出発物質が消費されたことを示した。MeOH (5 mL) を添加して 15 分間攪拌し、次いで混合物を濾過してケーキをトルエン (300 mL * 3) で洗浄した。濾液を濃縮し、化合物 7-5-7A を黄色油として得た (46.50 g, 粗)。混合物を一切精製することなく次のステップに直接使用した。TLC (石油エーテル / 酢酸エチル) R_f = 0.63.

20

【1419】

5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT の調製。

【化252】



30

【1420】

化合物 7-5-7A (46.50 g, 69.11 mmol) の THF (460.00 mL) 溶液に、TBAF (1M, 131.31 mL) を添加した。混合物を 25 °C で 5 時間攪拌した。TLC は、出発物質が消費されたことを示した。混合物を濃縮し、次いで飽和 NaCl (5% 水溶液, 200 mL) を添加して、水相を EtOAc (200 mL * 3) で抽出した。組み合わせた有機層を Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濾過して濃縮し、粗生成物を得て、これを MPLC (石油エーテル / 酢酸エチル 5:1, 1:1, 1:4, 5% TEA) によって精製し、5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT を白色固体として得た (29.0 g, 収率 75.12%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ = 11.35 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.58 – 7.53 (m, 1H), 7.44 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.37 – 7.24 (m, 6H), 7.23 – 7.17 (m, 1H), 6.87 (t, J = 8.3 Hz, 4H), 6.13 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 5.21 (d, J = 4.9 Hz,

40

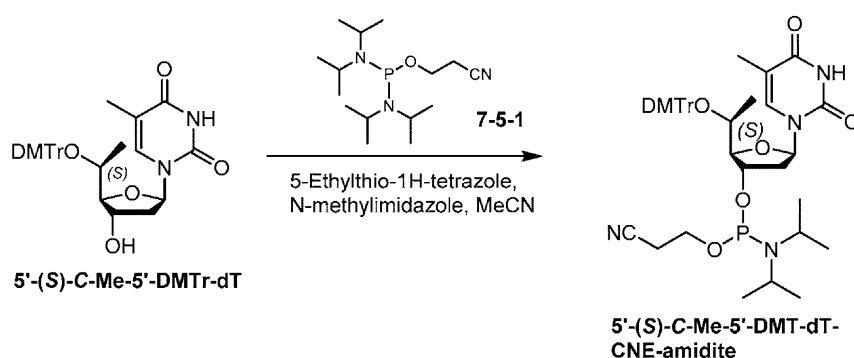
50

1 H), 4.23 (br s, 1H), 3.73 (d, $J=2.9$ Hz, 6H), 3.67 (t, $J=3.7$ Hz, 1H), 3.57 – 3.46 (m, 1H), 2.23 – 2.04 (m, 2H), 1.67 (s, 3H), 1.70 – 1.65 (m, 1H), 0.71 (d, $J=6.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ = 170.78, 164.16, 158.64, 158.59, 150.86, 146.71, 137.00, 136.75, 135.97, 130.65, 130.52, 128.38, 128.07, 127.11, 113.48, 110.11, 89.78, 86.41, 83.87, 70.58, 70.22, 60.21, 55.48, 21.20, 18.08, 14.53, 12.54. HPLC: HPLC 純度: 98.4%. LCMS: (M-H⁺) = 557.2; LCMS 純度: 99.0%. SFC: SFC 純度: 99.4%. TLC (石油エーテル/酢酸エチル=1:1, 5% TEA) R_f = 0.01.

【1421】

5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE-アミダイトの調製。

【化253】



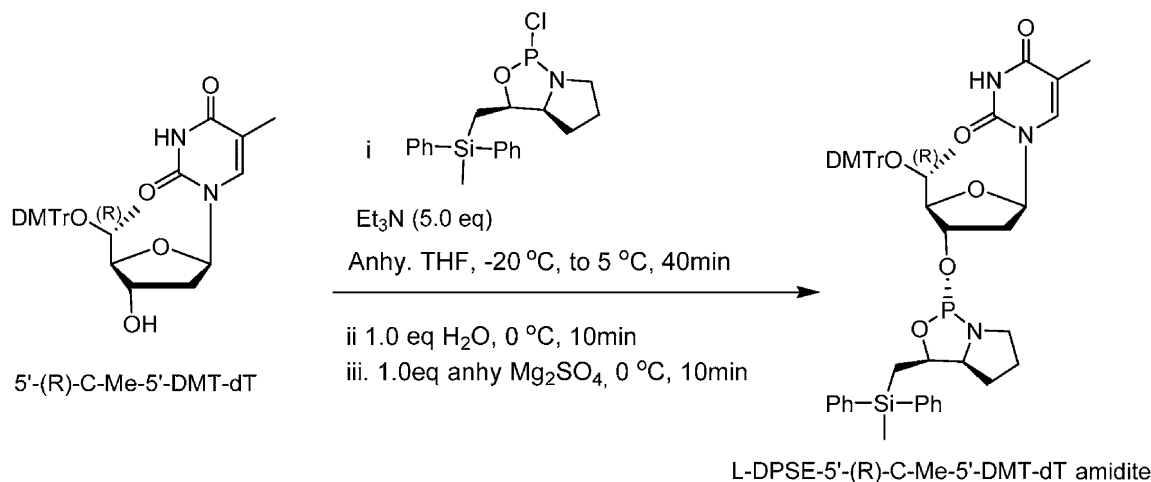
【1422】

5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT (5.00 g、8.95 mmol) の MeCN (50.00 mL) 溶液に、5-エチルスルファニル-2H-テトラゾール (1.17 g、8.95 mmol)、1-メチルイミダゾール (1.47 g、17.90 mmol、1.43 mL) 及び化合物 7-5-1 (4.05 g、13.43 mmol、4.26 mL) を添加した。反応混合物を 20℃で N_2 下において 2 時間攪拌した。TLC 及び LC-MS は、一部の出発物質が消費されて、所望の物質を形成したことを示した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣を EtOAc (20 mL) で希釈した。反応混合物を飽和 NaHCO_3 水溶液 (20 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過して濃縮して粗生成物を得て、これを MPLC (石油エーテル 5% TEA: 酢酸エチル 10:1 ~ 1:1) によって精製し、5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT-CNE-アミダイトを白色固体として得た (4.3 g、収率 63.31%)。 ^1H NMR (400 MHz, クロロホルム- d) δ = 8.19 (br s, 1H), 7.69 – 7.60 (m, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.43 – 7.33 (m, 2H), 7.32 – 7.07 (m, 8H), 6.73 (ddd, $J=3.7, 5.8, 9.0$ Hz, 4H), 6.27 – 6.15 (m, 1H), 4.49 – 4.37 (m, 1H), 3.82 – 3.65 (m, 8H), 3.63 – 3.55 (m, 2H), 3.53 – 3.39 (m, 3H), 2.50 (t, $J=6.3$ Hz, 1H), 2.46 – 2.31 (m, 1H), 2.29 – 2.19 (m, 1H), 2.16 – 2.04 (m, 1H), 1.68 (s, 3H), 1.20 – 1.00 (m, 13H), 0.95 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 0.92 – 0.74 (m, 4H). ^{31}P NMR (162 MHz, クロロホルム- d) δ = 149.11 (s, 1P), 148.99 (s, 1P)。

【1423】

実施例 7-6. L-DPSE-5'-(R)-C-Me-5'-DMT-dT アミダイトの合成。

【化 2 5 4】



10

【1 4 2 4】

5'-(R)-C-Me-5'-OMT-dT (11.17 g、20 mmol) を、45 °C で 80 mL の無水トルエンとの共蒸発によって 2 回乾燥させ、高真空で一晩維持した。次いで、乾燥した 5'-(R)-C-Me-5'-OMT-dT を、アルゴン下で 500 mL の三口フラスコ中において脱水 THF (80 mL) 中に溶解し、続いてトリエチルアミン (13.93 mL、100 mmol) を添加して、混合物を -40 °C まで冷却した。この冷却した反応混合物に、ストックからの粗 L-DPSE-NOPCl (THF 40 mL 中、30 mmol、1.4 当量) の溶液をシリンジによって滴下して添加した (約 15 分、内部温度を -40 ~ -35 °C に維持する)。次いで、混合物を徐々に 5 °C まで加温した。5 °C になってから 30 分後、TLC 及び LC-MS 分析は、SM から生成物への完全転化 (全反応時間 2 時間) を示した。反応混合物を氷浴中で冷却し、反応物を水 (0.36 mL、20 mmol) の添加によってクエンチした。混合物を 10 分間攪拌し、続いて無水 Mg₂SO₄ (3.0 g、20 mmol) を添加した。反応物を Airfree、Schlenk フィルター管に通して濾過し、脱水 THF (60 mL) で洗浄して溶媒を 28 °C の回転蒸発下で蒸発させ、粗生成物をオフホワイト固体として得て、これを高真空下で一晩乾燥させた。乾燥した粗生成物を、溶媒として 5% TEA を含有する酢酸エチル/ヘキサン混合物を含む 220 シリカカラム (これを、5% TEA を含む 3 カラム体積の酢酸エチルで予め不活性化した) を使用して、Combi-Flash Rf (Teledyne ISCO) によって精製した。画分を TLC 及び LC-MS によって分析し、一緒にプールした。溶媒をロータリーエバポレーター中において 28 °C で蒸発させ、残渣を高真空下で乾燥させて生成物を白色固体として得た。収量: 16.3 g (91%)。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 7.50 - 7.36 (m, 6H), 7.35 - 7.06 (m, 13H), 6.85 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.73 (dq, J = 8.7, 3.2 Hz, 4H), 6.13 (dd, J = 9.3, 5.3 Hz, 1H), 5.10 (td, J = 7.8, 7.1, 3.4 Hz, 1H), 4.80 (dt, J = 8.6, 5.8 Hz, 1H), 4.04 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 2.3 Hz, 6H), 3.57 - 3.36 (m, 3H), 3.29 - 3.05 (m, 2H), 2.05 (dd, J = 13.6, 5.5 Hz, 1H), 1.96 (s, 2H), 1.73 - 1.50 (m, 3H), 1.47 - 1.32 (m, 2H), 1.30 (d, J = 1.2 Hz, 3H), 1.17 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 0.75 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.60 (s, 3H)。³¹P NMR (162 MHz, CDC

20

30

40

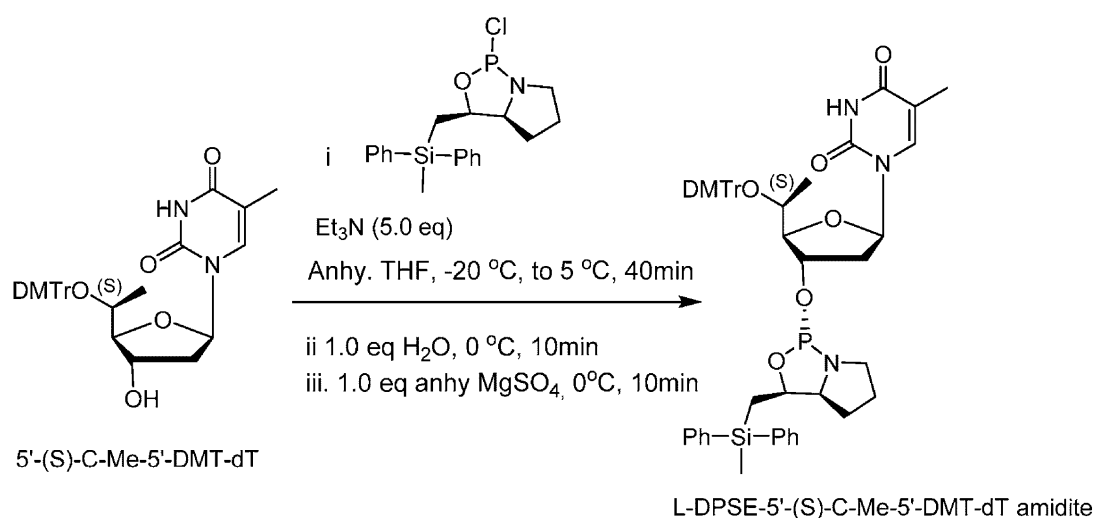
50

l_3) δ 151.34 (s)。MS: LCMS: 計算値, $C_{51}H_{56}N_3O_8PSi$, 897.3574; 実測値 + Ve モード: m/z : 898.52 [M+H]⁺; 999.95 [M+Et₃N]⁺。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.12, 163.83, 158.65, 158.61, 150.21, 146.50, 136.96, 136.71, 136.59, 135.94, 135.54, 134.60, 134.34, 130.24, 130.15, 129.45, 129.39, 128.02, 127.96, 127.94, 127.88, 127.79, 126.86, 113.17, 113.11, 110.93, 89.27, 89.25, 86.48, 83.68, 79.09, 78.99, 77.42, 77.30, 77.10, 76.78, 71.78, 71.70, 70.26, 68.39, 68.36, 60.39, 55.24, 47.19, 46.83, 46.09, 39.48, 39.44, 27.35, 25.97, 25.93, 21.05, 18.33, 17.85, 17.81, 14.23, 11.73, 11.45。

【1425】

実施例 7-7. L-DPSE-5'-(S)-C-Me-5'-DMT-dT アミダイトの合成。

【化 255】



【1426】

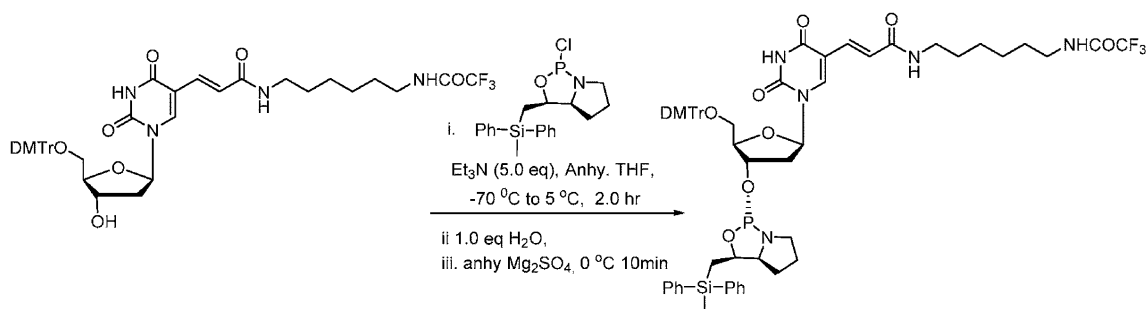
5'-(S)-C-Me-5'-OMT-dT (1.20 g、2 mmol) を、45 °C で 20 mL の無水トルエンとの共蒸発によって 2 回乾燥させ、高真空で一晩維持した。次いで、乾燥した 5'-(S)-C-Me-5'-OMT-dT を、アルゴン下で 100 mL の三口フラスコ中において脱水 THF (20 mL) 中に溶解し、続いてトリエチルアミン (1.4 mL、10 mmol) を添加して、混合物を -40 °C まで冷却した。この冷却した反応混合物に、ストックからの粗 L-DPSE-NOPCL (THF 3.0 mL 中、3 mmol、1.5 当量) の溶液をシリンジによって約 5 分滴下して添加した (内部温度を -40 °C に維持し、次いで徐々に 5 °C まで加温した)。5 °C になってから 30 分後、TLC 及び LC-MS 分析は、SM から生成物への完全転化 (全反応時間 1.5 時間) を示した。反応混合物を氷浴中で冷却し、反応物を水 (0.036 mL、2 mmol) の添加によってクエンチした。混合物を 10 分間攪拌し、続いて無水 MgSO₄ (0.3 g、2 mmol) を添加した。反応物を Air free、Schlenk フィルター管に通して濾過し、脱水 THF (20 mL) で洗浄した。溶媒を 28 °C の回転蒸発下で蒸発させ、オフホワイト固体を得て、これを高真空下で一晩乾燥させた。乾燥した粗生成物を、溶媒として 5% TEA を含有する酢酸エチル/ヘキサン混合物を含む 40 g シリカカラム (これを、

5 % T E A を含む 3 カラム体積の酢酸エチルで予め不活性化した) を使用して、C o m b i - F l a s h R f (T e l e d y n e I S C O) によって精製した。カラム精製後、画分を T L C 及び L C - M S によって分析して一緒にプールし、ロータリーエバポレーター中において 28 °C で蒸発させた。残渣を高真空下で乾燥させ、L - D P S E - 5 ' - (S) - C - M e - 5 ' - D M T - d T アミダイトを白色固体として得た。収量: 1.27 g (70%)。³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 149.73 (s)。MS: LC-MS; 計算値: C₅₁H₅₆N₃O₈PSi, 897.3574; 実測値 + V e モード: m/z: 898.56 [M+H]。

【1427】

実施例 7-8. L-DPSE-5'-DMT-5-C6-アミノリンカーアミダイトの合成-核酸塩基による所望の部分の組み込み。

【化256】



【1428】

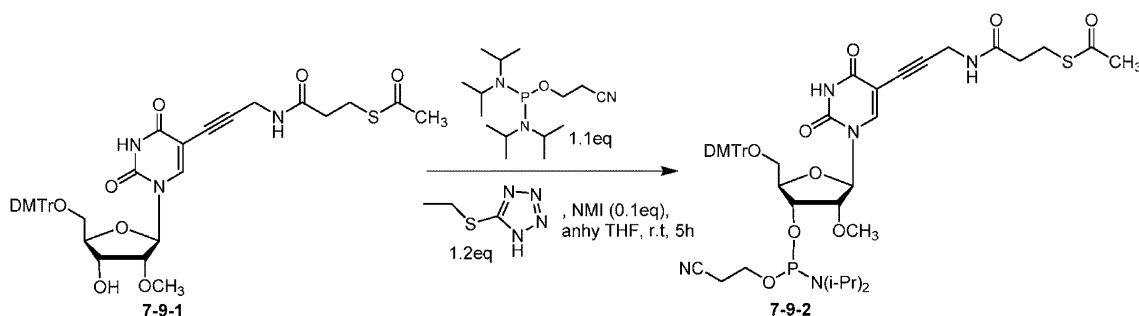
5'-DMT-5-C6アミノTFA-dT (25 g, 31.5 mmol, Berry & Associates Inc製) を、45 °C で 100 mL の無水トルエンとの共蒸発によって 2 回乾燥させ、高真空で一晩維持した。次いで、乾燥した物質を、アルゴン下で 500 mL の三口フラスコ中において脱水 THF (100 mL) 中に溶解し、続いてトリエチルアミン (21.92 mL, 157 mmol) を添加して、次いで -70 °C まで冷却した。この冷却した反応混合物に、ストックからの粗 L-DPSE-NOPCL (THF 44 mL 中、44 mmol, 1.4 当量) の溶液をシリンジによって滴下して添加した (約 15 分、内部温度を -60 ~ -50 °C に維持する)。混合物を徐々に 5 °C まで加温した。5 °C になってから 30 分後、TLC 及び LC-MS 分析は、SM から生成物への完全転化 (全反応時間 2 時間) を示した。反応混合物を氷浴中で冷却し、水 (0.56 mL, 31.5 mmol) の添加によってクエンチして 10 分間攪拌し、続いて無水 Mg₂SO₄ (3.8 g, 31.5 mmol) を添加した。反応物を Airfree、Schlenk フィルター管に通して濾過し、脱水 THF (80 mL) で洗浄して 28 °C の回転蒸発下で蒸発させ、粗生成物をオフホワイト固体として得て、これを高真空下で一晩乾燥させた。乾燥した粗生成物を、溶媒として 5 % T E A を含有する酢酸エチル/ヘキサン混合物を含む 220 シリカカラム (これを、5 % T E A を含む 3 カラム体積の酢酸エチルで予め不活性化した) を使用して、C o m b i - F l a s h R f (T e l e d y n e I S C O) によって精製した。カラム精製後、画分を T L C 及び L C - M S によって分析し、一緒にプールした。溶媒をロータリーエバポレーター中において 28 °C で蒸発させ、残渣を高真空下で乾燥させて生成物を白色固体として得た。収量: 30 g (88%)。MS: LC-MS; 計算値: C₆₀H₆₇F₃N₅O₁₀PSi, 1133.4347; +V e モードでの実測値: 1235.55 (M+Et3N)。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 7.78 (s, 1H), 7.40 (ddd, J = 9.8, 6.5, 2.2 Hz, 5H), 7.32 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.30 - 7.09 (m, 15H), 6.99 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 8.9, 2.7 Hz, 4H), 6.54 (d, J = 15.5 Hz, 1H

), 5.12 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.66 – 4.49 (m, 2H), 4.04 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.81 (q, $J = 3.0$ Hz, 1H), 3.67 (s, 6H), 3.41 (ddt, $J = 14.8, 10.2, 7.7$ Hz, 1H), 3.30 – 3.13 (m, 4H), 3.12 – 2.91 (m, 4H), 1.96 (s, 2H), 1.92 – 1.69 (m, 2H), 1.58 (ddt, $J = 15.1, 11.6, 8.0$ Hz, 1H), 1.50 – 1.29 (m, 5H), 1.18 (tq, $J = 15.8, 8.8, 8.0$ Hz, 9H), 0.52 (s, 3H). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 150.88 (s). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.18, 165.77, 161.89, 158.76, 158.74, 157.85, 157.49, 157.12, 156.76, 149.17, 144.52, 139.69, 136.68, 135.86, 135.53, 135.44, 134.54, 134.30, 131.15, 129.97, 129.89, 129.44, 129.38, 128.09, 127.93, 127.91, 127.18, 122.36, 120.31, 117.44, 114.58, 113.42, 113.39, 111.72, 110.53, 86.65, 86.04, 86.02, 85.67, 79.28, 79.19, 77.42, 77.31, 77.11, 76.79, 73.20, 73.12, 68.05, 68.02, 63.09, 60.41, 55.27, 46.96, 46.60, 45.81, 40.48, 39.56, 38.88, 29.33, 28.52, 27.23, 25.83, 21.04, 17.55, 17.52, 14.20。

【1429】

実施例7-9. 5-アルキニルチオアセテート-5'-DMT-3'CNE-2'OMe-Uアミダイトの合成。

【化257】



【1430】

化合物7-9-1 (5.0 g、6.72 mmol) を無水トルエンと2回 (40 mL × 2) 共蒸発させて、高真空で一晩乾燥させた。乾燥した黄色固体を無水THF (14 mL、約0.5 mmol/mL) 中にアルゴン下で溶解し、溶液に5-エチルチオ-1H-テトラゾール (1.05 g、8.07 mmol)、N-メチルイミダゾール (0.045 g、0.044 mL、0.67 mmol)、続いて2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (2.23 g、2.34 mL、7.39 mmol) を添加した。反応混合物を、室温でアルゴン下において5時間攪拌した。TLC (溶媒系: 40% CH_3CN / EtOAc / 5% TEA) を上記溶媒系で予め平衡化し、これが5時間で反応の完了を示して、これをLC-MSでも確認した。反応混合物をEtOAc (100 mL) で希釈し、溶液を分液ロートに移して飽和 NaHCO_3 水溶液 (40 mL) で洗浄し、無水 Mg_2SO_4 上で乾燥させた。乾燥した溶液を浴温28℃の回転蒸発下で蒸発させ、粗生成物をオフイエロー固体として得て、これをさらに高真空で一晩乾燥させた。乾燥した粗生成物を、80 g フラッシュシリカカラムを使用してComb i-Flash Rf (Teledyne ISCO) 中で精製し、このカラムは5% TEA

を含む2カラム体積（CV125mL、60mL／分）の酢酸エチルで予め不活性化し、続いて2カラム体積の20%EtOAc／ヘキサンで平衡化しておいた。化合物を、溶媒系として5%TEAを含有するヘキサン／EtOAc／CH₃CN混合物を使用して精製した。精製カラム後、画分をTLC及びLC-MSによって分析した。所望の画分を一緒にプールし、ロータリーエバポレーター中において28℃で蒸発させて高真空中で乾燥させ、7-9-2-CNEアミダイトを白色固体として得た。収量：4.8g（76%）。MS：LC-MS；計算値：C₄₈H₅₈N₅O₁₁PS，943.35；+Veモードでの実測値：m/z 1045.92（M+Et3N）。¹H NMR（400 MHz，クロロホルム-d）δ 8.36 - 8.07（m，1H），7.47 - 7.09（m，10H），6.78（dt，J = 9.1，3.8 Hz，4H），5.87（dd，J = 26.6，3.1 Hz，1H），4.73（d，J = 14.9 Hz，1H），4.57 - 4.30（m，1H），4.21 - 4.00（m，2H），3.86 - 3.32（m，17H），3.23（ddd，J = 13.0，11.2，2.5 Hz，1H），2.91（td，J = 7.0，2.4 Hz，2H），2.54（q，J = 6.1 Hz，1H），2.27（d，J = 24.2 Hz，4H），1.96（d，J = 7.1 Hz，3H），1.21 - 0.82（m，14H）。³¹P NMR（162 MHz，CDCl₃）δ 150.60（s），150.24（s）。¹³C NMR（101 MHz，CDCl₃）δ 195.80，169.61，161.45，158.70，158.68，149.06，144.75，144.61，142.82，135.67，135.58，135.48，135.38，130.18，130.16，130.12，128.14，128.11，128.09，128.02，127.01，117.69，117.53，113.42，113.38，113.34，99.60，99.33，88.98，88.95，88.50，88.06，87.06，86.85，83.89，82.99，82.62，77.34，77.22，77.02，76.70，74.55，74.40，69.74，69.62，62.04，61.26，60.38，58.97，58.59，58.47，58.45，57.89，57.68，55.34，55.31，43.33，43.21，35.44，35.41，30.54，29.95，24.71，24.65，24.63，24.58，24.56，24.49，21.04，20.50，20.43，20.38，20.31，14.20。

【1431】

当業者には容易に十分理解される通り、化合物7-9-2を、本開示においてはホスホラミダイトとしてオリゴヌクレオチド合成に利用し、それによってオリゴヌクレオチド中に保護チオール基を組み込むことができる。脱保護後、遊離チオール基を利用して、本開示においては1つ以上のジスルフィド結合を形成することによって、オリゴヌクレオチドモノマーを連結して多量体を形成し得る。

【1432】

当業者には十分に理解される通り、本開示においては多くの技術（例えば、化学、試薬、リンカー、方法など）を利用して、オリゴヌクレオチド（様々な5'末端構造を有するものを含む）を調製し、かつ様々な化学的部分、例えば、炭水化物部分、脂質部分、標的化部分などをオリゴヌクレオチド中に組み込むことができ、例えば、WO／2010／064146、WO／2011／005761、WO／2013／012758、WO／2014／010250、US2013／0178612、WO／2014／012081、WO／2015／107425、WO／2017／015555、及びWO／2017／062862に記載されるものであるが、これらに限定されない。本明細書に記載されるのは、様々な部分を含むものを含む、オリゴヌクレオチドを調製するための技術例である。

【1433】

表61～表73に示す通り、様々なオリゴヌクレオチドを構築し、インビトロを含む、PNPLA3のノックダウンを媒介するそれらの能力について試験した。いずれの理論に

10

20

30

40

50

よっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、表 6 1～表 7 3 中におけるオリゴヌクレオチドの少なくともいくつかは、RISC 媒介 ssRNAi 機序を介してノックダウンを媒介する能力を有し得ることを示唆している。加えて、これらの表におけるオリゴヌクレオチドのいくつかは、ハイブリッド型を有する。加えて、本明細書に記載したオリゴヌクレオチドの少なくともいくつかは、アレル特異的様式で PNPLA3 のノックダウンを媒介する能力を有する。

【1434】

表 6 1. 表 6 1 は、PNPLA3 を標的とする、異なる一本鎖 RNAi 剤のインビトロ有効性を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、以下である：WV-4054 及び WV-4098。オリゴヌクレオチドを、ホモ接合野生型（PNPLA3 の I/I aa）である Hep3B（I/I）細胞中で、及びホモ接合変異体（PNPLA3 の M/M aa）である Huh7 細胞中で試験した。Huh7 細胞中の WV-4054 の IC50 は、0.239 nM であって、Huh7 細胞中の WV-4098 の IC50 は、0.158 nM であった。オリゴヌクレオチド WV-4054 及び WV-4098 は長さが異なるが、両方とも PNPLA3 のアレル特異的ノックダウンを媒介する能力を有する。RNA 干渉機序を介してノックダウンを媒介する WV-4098 の能力は、AGO-2（RNA 干渉に必要である）の CRISPR ノックアウトが、遺伝子発現をノックダウンする WV-4098 の能力を妨げたが、AGO-1、AGO-3 及び AGO-4（RNA 干渉に必要なではない）のノックアウトは妨げなかった（データは示さず）という知見によって支持される。

表 6 1 A. オリゴヌクレオチドの活性。

【表 3】

Conc. (exp 10) (nM)	WV-4054-Hep3b		WV-4054-Huh7	
0.796	1.226	1.121	0.280	0.449
0.495	0.910	1.010	0.478	0.402
0.194	1.068	1.024	0.419	0.367
-0.107	0.843	1.160	0.405	0.449
-0.408	0.976	0.942	0.422	0.584
-0.709	0.798	0.917	0.750	0.601
-1.010	0.832	1.038	0.798	0.755
-1.612	1.053	0.923	0.969	0.792
-2.214	0.956	0.929	0.809	0.798

【1435】

表 6 2. 表 6 2 は、PNPLA3 を標的とする、異なる一本鎖 RNAi 剤のインビトロ効力及び IC50 を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-2477（陽性対照）、WV-3380（陽性対照）、WV-4018、WV-4019、WV-4020、WV-4021、WV-4022、WV-4023、WV-4024、及び WV-4025 であり、各々を Hep3B（Hep）及び Huh7（Huh）細胞中で試験した。PNPLA3 アッセイ用のオリゴヌクレオチドを、Lipofectamine（登録商標）2000 トランスフェクション試薬（ThermoFisher, Grand Island, NY）を使用して送達した。この表及び他の表において、オリゴヌクレオチドを、2、8、25 及び 33 nM の濃度で試験した。

表 6 2. オリゴヌクレオチドの活性。

10

20

30

40

50

【表 4】

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
Control		94.6	103.5	102.8	102.1	108.7
WV-2477-Hep		91.4	110.2	103.5	101.4	102.1
WV-2477_Huh		86.2	90.5	96.4	84.5	98.4
WV-3380-Hep	51.1	46.3	30.8	26.4	4.9	8.8
WV-3380-Huh		59.7	53.5	58.9	10.3	
WV-4018-Hep	61.1	47.0		94.0	72.7	65.5
WV-4018-Huh	43.4	46.9	61.8	51.6	63.6	66.7
WV-4019-Hep	75.3	88.3	117.3	119.7	84.7	79.6
WV-4019-Huh	67.7	68.1	77.7	77.2	67.7	74.0
WV-4020-Hep	74.7	68.8	87.1	92.7	52.1	59.5
WV-4020-Huh	70.0	81.6	71.0	91.2	54.6	77.2
WV-4021-Hep	64.6	81.2	76.8	85.9	45.4	56.6
WV-4021-Huh	68.6	64.0	69.1	69.6	64.0	68.1
WV-4022-Hep	66.0	75.3		97.3	56.3	62.9
WV-4022-Huh	49.5	62.7	63.6	58.9	58.1	77.2
WV-4023-Hep	62.9	90.8	76.3	79.6	46.7	47.6
WV-4023-Huh	70.5	66.7	71.5	75.1	64.0	67.7
WV-4024-Hep	74.7	77.4	99.3	100.7	54.7	75.8
WV-4024-Huh	70.0	63.1	104.0	91.2	79.9	88.7
WV-4025-Hep	61.1	65.5	65.5		83.5	55.1
WV-4025-Huh	58.9	71.5	69.1	66.3	79.9	63.6

【1 4 3 6】

表 6 3 . 表 6 3 は、PNPLA3 を標的とする、異なる一本鎖 RNA i 剤のインビトロ効力及び IC₅₀ を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-2477（陽性対照）、WV-3380（陽性対照）、WV-4026、WV-4027、WV-4028、WV-4029、WV-4030、WV-4031、WV-4032、及び WV-4033 であり、各々を Hep3B（Hep）及び Huh7（Huh）細胞中で試験した。

表 6 3 . オリゴヌクレオチドの活性。

【表 5】

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
Control		94.6	103.5	102.8	102.1	108.7
WV-2477-Hep		91.4	110.2	103.5	101.4	102.1
WV-2477_Huh		86.2	90.5	96.4	84.5	98.4
WV-3380-Hep	51.1	46.3	30.8	26.4	4.9	8.8
WV-3380-Huh		59.7	53.5	58.9	10.3	
WV-4026-Hep		104.2	115.7	105.7	103.5	86.5
WV-4026-Huh	74.0	76.1	84.5	70.5	71.5	68.1
WV-4027-Hep	64.6	76.3	71.2	77.4	39.0	51.1

10

20

30

40

50

WV-4027-Huh	69.1	75.1	55.7	69.1	60.1	61.4
WV-4028-Hep	79.0	71.2	102.8	107.2	70.2	53.6
WV-4028-Huh	74.0	70.0	64.5	65.4	83.9	76.7
WV-4029-Hep	79.6	87.7	81.8	100.0	57.8	79.6
WV-4029-Huh		74.0	74.6	79.4	116.2	102.6
WV-4030-Hep		85.9	93.3	105.0	68.8	80.1
WV-4030-Huh	51.6	67.7	75.1	69.1	71.5	
WV-4031-Hep	85.9	101.4	104.2	122.3	51.1	56.3
WV-4031-Huh	73.5	72.0	100.4	91.2	95.7	95.0
WV-4032-Hep	78.5	73.7		121.4	51.8	62.0
WV-4032-Huh	81.0	82.2	100.4	105.4	107.7	124.5
WV-4033-Hep	84.1	85.3	100.0		83.5	83.5
WV-4033-Huh	52.4	38.9	57.3	59.7	107.7	81.0

【1437】

表64.表64は、PNPLA3を標的とする、異なる一本鎖RNA i 剤のインビトロ効力及びIC₅₀を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-2477（陽性対照）、WV-3380（陽性対照）、WV-4034、WV-4035、WV-4036、WV-4037、WV-4038、WV-4039、WV-4040、WV-4041であり、各々をHep3B（Hep）及びHuh7（Huh）細胞中で試験した。

表64.オリゴヌクレオチドの活性。

【表6】

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
Control		94.6	103.5	102.8	102.1	108.7
WV-2477-Hep		91.4	110.2	103.5	101.4	102.1
WV-2477_Huh		86.2	90.5	96.4	84.5	98.4
WV-3380-Hep	51.1	46.3	30.8	26.4	4.9	8.8
WV-3380-Huh		59.7	53.5	58.9	10.3	
WV-4034-Hep	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
WV-4034-Huh	73.0	76.7	91.2	78.8	101.1	119.4
WV-4035-Hep	81.8	77.4	92.7	104.2	57.8	84.7
WV-4035-Huh	75.1	81.6	82.2	63.1	101.1	115.4
WV-4036-Hep	76.3	77.4	82.9	77.4	49.7	54.0
WV-4036-Huh	74.6	75.1	72.5	67.2	75.6	87.4
WV-4037-Hep	79.6	68.3	75.8	97.3	80.7	72.7
WV-4037-Huh	69.6	82.7	76.7	87.4	94.4	81.0
WV-4038-Hep	64.2	71.2	74.2	97.9	83.5	83.5
WV-4038-Huh	69.1	85.1	78.3	67.2	86.8	69.6
WV-4039-Hep	69.3	70.2	46.0	77.9	48.6	45.7
WV-4039-Huh	63.1	79.9	64.0	58.9	61.0	50.6
WV-4040-Hep	74.2	67.8	92.7	75.8	50.0	59.9
WV-4040-Huh	88.0	70.0	73.5	78.3	71.0	66.3
WV-4041-Hep	77.4	75.8	82.9	95.9	61.1	60.7

WV-4041-Huh	99.1	93.7	83.9	82.7	67.2	61.0

10

20

30

40

50

【1438】

表65.表65は、PNPLA3を標的とする、異なる一本鎖RNA i 剤のインビトロ効力及びIC₅₀を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-3380（陽性対照）、WV-2477（陽性対照）、WV-4042、WV-4043、WV-4044、WV-4045、WV-4046、WV-4047、WV-4048、及びWV-4049であり、各々をHep3B（Hep）及びHuh7（Huh）細胞中で試験した。

表65.オリゴヌクレオチドの活性。

【表7】

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
Control	111.9	113.4	113.4	119.1	100.1	111.9
WV-2477-Hep	99.4	100.1	115.8	107.3	103.7	119.1
WV-2477-Huh	96.9	91.6	89.7	109.7	96.9	91.0
WV-3380-Hep	39.8	52.6	35.7	26.3	5.9	
WV-3380-Huh	54.5	60.5		46.8	22.7	
WV-4042-Hep	63.8	67.5	86.6	72.8	49.0	49.4
WV-4042-Huh		66.2		48.4	25.4	28.2
WV-4043-Hep	64.3	60.8	83.6	68.4	52.9	41.8
WV-4043-Huh	48.4	64.8	48.4	56.8	47.1	52.6
WV-4044-Hep	70.8	66.5	83.0	73.3	20.6	33.7
WV-4044-Huh	86.7	109.0	72.9	81.4	38.5	33.3
WV-4045-Hep	86.0	80.2	100.8	103.0	44.8	42.1
WV-4045-Huh	81.4	79.2	80.9	76.5	45.2	62.6
WV-4046-Hep	117.4	96.7	92.1	82.5	24.9	22.9
WV-4046-Huh	83.7	73.9	71.9	56.4	44.6	41.9
WV-4047-Hep	86.0	76.4	98.8	111.1	53.3	51.8
WV-4047-Huh	63.5	94.2	78.7	71.9	56.0	38.0
WV-4048-Hep	79.1	70.3	95.4	98.8	37.4	27.2
WV-4048-Huh	93.6	76.5	81.4	81.4	46.5	44.9
WV-4049-Hep		107.3	107.3	111.9	36.1	55.9
WV-4049-Huh	87.3	98.2	88.5	89.7	62.6	62.2

【1439】

表66.表66は、PNPLA3を標的とする、異なる一本鎖RNA i 剤のインビトロ効力及びIC₅₀を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-2477（陽性対照）、WV-3380（陽性対照）、WV-4050、WV-4051、WV-4052、WV-4053、WV-4054、WV-4055、WV-4056、WV-4057であり、各々をHep3B（Hep）及びHuh7（Huh）細胞中で試験した。

表66.オリゴヌクレオチドの活性。

【表8】

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
Control	111.9	113.4	113.4	119.1	100.1	111.9
WV-2477-Hep	99.4	100.1	115.8	107.3	103.7	119.1

WV-2477-Huh	96.9	91.6	89.7	109.7	96.9	91.0
WV-3380-Hep	39.8	52.6	35.7	26.3	5.9	
WV-3380-Huh	54.5	60.5		46.8	22.7	
WV-4050-Hep	71.8	75.9	98.8	75.9	54.8	55.2
WV-4050-Huh	69.0	80.9	63.0	57.6	46.8	57.6
WV-4051-Hep	73.8	80.8	92.8	69.4	40.4	59.1
WV-4051-Huh	67.1	74.9	54.9	58.8	47.4	37.5
WV-4052-Hep	79.1	77.0	113.4	97.4	51.5	44.8
WV-4052-Huh	67.1	67.1	84.9	80.3	75.5	52.6
WV-4053-Hep	89.0	69.8	100.0		63.4	57.1
WV-4053-Huh	56.0	64.3	76.0	68.0	84.3	59.2
WV-4054-Hep	100.0	100.0	100.0	100.0	106.6	111.9
WV-4054-Huh	30.6	31.7		38.8	53.0	47.8
WV-4055-Hep	92.1	105.8	100.0		58.7	72.3
WV-4055-Huh	69.9	80.9	95.5	81.4	77.6	71.9
WV-4056-Hep	86.6	81.3		116.6	54.0	65.6
WV-4056-Huh	84.9		78.7	101.0	62.2	76.5
WV-4057-Hep	105.8	95.4	110.3	105.1	46.1	50.8
WV-4057-Huh	87.9	79.8	107.5	92.3	72.9	50.5

【1440】

表67.表67は、PNPLA3を標的とする、異なる一本鎖RNA i剤のインビトロ効力及びIC₅₀を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-2477（陽性対照）、WV-3380（陽性対照）、WV-4058、WV-4059、WV-4060、WV-4061、WV-4062、WV-4063、WV-4064、及びWV-4065である。オリゴヌクレオチドを、Hep3B（Hep）及びHuh7（Huh-7またはHuhまたはP-Huh7またはP-Huh-7）細胞中で試験した。

表67.オリゴヌクレオチドの活性。

【表9】

	2 nM		8.25 nM		33 nM	
Control	111.9	113.4	113.4	119.1	100.1	111.9
WV-2477-Hep	99.4	100.1	115.8	107.3	103.7	119.1
WV-2477-Huh	96.9	91.6	89.7	109.7	96.9	91.0
WV-3380-Hep	39.8	52.6	35.7	26.3	5.9	
WV-3380-Huh	54.5	60.5		46.8	22.7	
WV-4058-Hep	67.0	78.0	73.3	62.5	67.0	56.3
WV-4058-Huh	73.9	79.8	86.7	70.9	55.6	59.6
WV-4059-Hep	64.7	70.3	74.8	53.7	74.3	63.4
WV-4059-Huh	74.4	63.0	65.7	74.4	44.3	43.9
WV-4060-Hep	80.8	68.9		107.3	43.0	63.4
WV-4060-Huh	77.6	39.9	72.9	66.2	66.6	79.2
WV-4061-Hep	115.8	93.4		108.8	57.5	66.1
WV-4061-Huh	70.9	60.0	87.9	68.0	61.7	70.4

10

20

30

40

50

WV-4062-Hep	97.4	91.5	111.9		78.0	59.5
WV-4062-Huh		81.4	94.2	83.2	101.7	82.6
WV-4063-Hep	86.6	82.5	98.1	119.9	47.0	54.0
WV-4063-Huh		79.2	76.5	77.6	58.8	75.5
WV-4064-Hep	72.8	83.6	111.1	91.5	61.2	56.3
WV-4064-Huh	71.4	59.2	53.4	52.6	50.1	66.2
WV-4065-Hep	109.6	107.3	87.2	101.5	33.7	68.4
WV-4065-Huh	92.3	86.1	89.1	97.5	67.1	76.0

10

【1441】

表68.表68は、PNPLA3を標的とする、異なる一本鎖RNA i 剤のインビトロ効力を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-4098、WV-7462、WV-7464、WV-7467、及びWV-7469である。

表68.オリゴヌクレオチドの活性。

オリゴヌクレオチドの濃度を提供する。使用した細胞及び使用したオリゴヌクレオチドも提供する。数値はPNPLA3のmRNAレベル(PNPLA3/HPRT1)を表し、100は100%のmRNAレベル(ノックダウン無し)を表すことになり、0は0%のmRNAレベル(または100%ノックダウン)を表すことになる。反復のデータを示す。

20

パート1. Hep3B細胞中での活性。

【表10】

Conc.	WV-4098		WV-7462		WV-7464	
0.006	97.9	94.5	112.3	100.9	106.4	107.3
0.025	134.1	100.9	96.2	87.9	155.5	99.2
0.01	99.5	97.9	92.5	95.0	108.9	109.4
0.4	84.4	94.2	74.2	90.5	96.5	105.6
1.6	88.3	84.4	99.6	82.4	80.8	97.0
6.25	131.4	137.0	120.3	142.1	81.2	121.1

30

Conc.	WV-7467		WV-7469	
0.006	103.9	105.9	93.9	100.7
0.025	99.9	108.8	97.4	84.9
0.01	91.0	106.0	90.8	107.1
0.4	100.5	100.1	75.8	81.1
1.6	83.8	82.0	76.0	72.5
6.25	100.0	100.3	77.0	82.8

40

パート2. Huh7(P-Huh7)細胞中での活性。

【表11】

Conc.	WV-4098		WV-7462		WV-7464	
0.006	105.8	115.7	129.8	116.1	110.5	131.0
0.025	102.1	105.0	110.0	94.3	116.6	127.3

50

0.01	77.2	95.8	93.3	72.8	79.1	104.5
0.4	83.8	65.4	66.2	66.4	93.8	54.2
1.6	40.8	54.7	50.9	46.1	58.1	45.0
6.25	43.0	34.2	49.8	32.9	48.9	34.3

Conc.	WV-7467		WV-7469	
0.006	109.2	129.2	86.0	87.3
0.025	99.9	107.2	90.5	102.1
0.01	73.3	63.7	72.0	65.6
0.4	88.0	66.7	54.0	46.2
1.6	49.1	33.4	41.2	28.6
6.25	48.5	38.8	32.0	28.5

10

【1442】

表69. 表69A及びBは、PNPLA3を標的とする、異なる一本鎖RNAi剤のインビトロ効力及びIC₅₀を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、表69AのWV-4098、WV-4075、WV-7465、WV-7466、及びWV-7468、なら

20

びに表69BのWV-3380、WV-4098、及びWV-7469である。

表69A. オリゴヌクレオチドの活性。

オリゴヌクレオチドの濃度を提供する。使用した細胞及び使用したオリゴヌクレオチドも提供する。数値はPNPLA3のmRNAレベル(PNPLA3/HPRT1)を表し、100は100%のmRNAレベル(ノックダウン無し)を表すことになり、0は0%のmRNAレベル(または100%ノックダウン)を表すことになる。反復のデータを示す。

パート1. Hep3B細胞中での活性。

【表12】

Conc.	WV-4098		WV-4075		WV-7463	
0.006	97.9	94.5	77.4	80.1	90.8	106.9
0.025	134.1	100.9	91.1	109.1	119.9	97.2
0.01	99.5	97.9	85.3	86.6	106.7	90.9
0.4	84.4	94.2	83.1	95.8	79.4	86.3
1.6	88.3	84.4	110.5	112.5	127.0	112.5
6.25	131.4	137.0	115.8	135.8	148.7	164.1

30

Conc.	WV-7465		WV-7466		WV-7468	
0.006	101.1	102.2	124.3	98.9	97.9	97.0
0.025	118.5	116.3	140.4	121.2	118.1	112.1
0.01	102.0	110.0	126.4	113.2	100.2	88.8
0.4	131.3	132.4	112.0	139.2	92.7	96.6

40

1.6	108.2	95.5	102.5	98.1	83.9	97.7
6.25	98.1	107.2	126.6	128.5	120.7	134.7

50

パート 2 . H u h 7 細胞中での活性。

【表 1 3】

Conc.	WV-4098		WV-4075		WV-7463	
0.006	105.8	115.7	111.3	119.4	116.9	131.9
0.025	102.1	105.0	101.8	95.8	116.9	119.4
0.01	77.2	95.8	96.5	94.1	95.3	77.9
0.4	83.8	65.4	85.9	81.0	62.6	50.7
1.6	40.8	54.7	58.6	67.8	50.1	45.6
6.25	43.0	34.2	70.8	57.7	60.0	67.1

10

Conc.	WV-7465		WV-7466		WV-7468	
0.006	119.6	126.5	100.1	124.8	69.3	95.2
0.025	114.8	111.8	95.0	106.6	69.8	84.9
0.01	104.9	101.4	50.1	61.3	54.2	48.5
0.4	84.5	64.3	64.1	43.3	55.5	38.1
1.6	55.3	55.2	40.2	35.3	37.4	33.5
6.25	79.4	57.3	50.2	46.5	60.3	41.4

20

表 6 9 B . オリゴヌクレオチドの活性。

オリゴヌクレオチドの濃度を提供する。使用した細胞及び使用したオリゴヌクレオチドも提供する。数値は P N P L A 3 の m R N A レベル (P N P L A 3 / H P R T 1) を表し、100 は 100 % の m R N A レベル (ノックダウン無し) を表すことになり、0 は 0 % m の R N A レベル (または 100 % ノックダウン) を表すことになる。反復のデータを示す。

【表 1 4】

Conc.	Hep3B-WV3380		Huh7-WV-3380	
0.006	83.9	88.2	87.5	101.8
0.025	92.3	88.7	90.1	105.4
0.01	75.3	70.6	75.5	
0.4	40.2	49.4	79.1	69.3
1.6	22.6	20.8	52.2	52.2
6.25	5.3	4.4	18.6	15.5

30

Conc.	Hep3B-WV-4098		Huh7-WV-4098	
0.006	97.9	94.5	105.8	115.7
0.025	134.1	100.9	102.1	105.0
0.01	99.5	97.9	77.2	95.8
0.4	84.4	94.2	83.8	65.4
1.6	88.3	84.4	40.8	54.7

40

50

6.25	131.4	137.0	43.0	34.2

Conc.	Hep3B-WV-7469		Huh-WV-7469	
0.006	93.9	100.7	86.0	87.3
0.025	97.4	84.9	90.5	102.1
0.01	90.8	107.1	72.0	65.6
0.4	75.8	81.1	54.0	46.2
1.6	76.0	72.5	41.2	28.6
6.25	77.0	82.8	32.0	28.5

【1443】

表69Cは、ラット肝臓ホモジネート安定性アッセイ（24時間）を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-4098、WV-7463、WV-7462、WV-7316、WV-4075、WV-7469、WV-7464、WV-7468、WV-7467、WV-7466、WV-7465であった。

表69C．オリゴヌクレオチドの安定性。

数値は、ラット肝臓ホモジネートで24時間処理した後の、残存する全長オリゴヌクレオチドのパーセンテージを示す。100は、残存する全長オリゴヌクレオチドが100%であることを表すことになり、0は、残存する全長オリゴヌクレオチドが0%であることを表すことになる。異なるオリゴヌクレオチドは、異なる数の立体制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する。反復のデータを示す。

【表15】

WV-4075			WV-4098			WV-7316		
23.5	23.5	24.3	19.2	18.3	17.4	16.8	18.7	18.3

WV-7462			WV-7463			WV-7464		
21.1	20.7	21.4	15.0	16.2	15.4	45.7	43.6	45.8
WV-7465			WV-7466			WV-7467		
85.6	86.1	87.6	65.2	69.6	69.8	54.7	57.1	56.0

WV-7468			WV-7469		
55.7	55.6	50.0	43.0	45.0	41.8

【1444】

表70．表70は、異なる一本鎖RNA i剤のIC50を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、Huh7及びHep3B細胞中のWV-2477、WV-4054、及びWV-3387である。WV-2477は、どちらの細胞中에서도PNPLA3を有意にノックダウンしなかった。WV-4054は、SNPのペア、rs738408T及びrs738409Gに相補的な配列を有し、これらの2つのSNPを含む細胞（Huh7）に対してアレル特異的RNA干渉を媒介することができる。このオリゴヌクレオチドは、これらのSNPを含まず、代わりにrs738408C及びrs738409Cを有する異なる細胞（Hep3B）中において試験濃度で有意なRNA i干渉を媒介しない。加えて、一本鎖RNA i剤のWV-4098はまた、試験濃度で相補的配列（Huh7細胞中においてSNPのrs738408T及びrs738409Gを有する）をノックダウンすることができるが、非相補的配列（Hep3B細胞中においてSNPのrs738408C及びrs738409Cを有する）をノックダウンすることができない。

表 70. オリゴヌクレオチドの IC50。

【表 16】

Oligonucleotide-cell tested	IC50 (nM)	95 % CI
WV-4054-Hep3b	NA	---
WV-4054-Huh7	0.239	0.15 to 0.38
WV-4098-Hep3b	NA	----
WV-4098-Huh7	0.158	0.10 to 0.22

10

【1445】

表 71. 表 71A～表 71D は、立体制御された（例えば、キラル制御された）オリゴヌクレオチド（例えば、一本鎖 RNA i 剤）の型の非限定的な例を示す。

【1446】

表 72. 表 72 は、ssRNA i WV-4054 の初代カニクイザル肝細胞中におけるインビトロ効力を示す。

【1447】

表 74. 表 74 は、Hep3B の 24 時間アッセイでの、RNase H によって媒介される PNPLA3 のノックダウンにおけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-1868（陰性対照）、WV-3367、WV-3368、WV-3369、WV-3370、WV-3371、WV-3372、WV-3373、WV-3374、WV-3375、WV-3376、WV-3377、WV-3378、WV-3379、及び WV-3380 である。WV-1868 は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（RNase H 媒介ノックダウンを介して作用する）であるが、他の試験したオリゴヌクレオチドは RNA i 剤である。使用した細胞は、PCH 細胞であった。

20

【1448】

表 73. 表 73 は、PNPLA3 ssRNA i 剤 WV-7467、WV-7469、WV-7466、及び WV-7468、ならびに ASO WV-6825 の構造を示す。

30

【1449】

表 74～表 90 に示す通り、様々なオリゴヌクレオチドを構築し、インビトロを含む、PNPLA3 のノックダウンを媒介するそれらの能力について試験した。いずれの理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、表 74～表 90 中におけるオリゴヌクレオチドの少なくともいくつかは、RNase H 媒介機序を介してノックダウンを媒介する能力を有し得ることを示唆している。加えて、これらの表におけるオリゴヌクレオチドのいくつかは、ハイブリッド型を有する。

【1450】

表 74. 表 74 は、PNPLA3 に対する ASO のインビトロ効力を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-1868、及び WV-3367～WV-3380 である。使用した細胞は、Hep3B 細胞であった。

40

表 74. オリゴヌクレオチドの活性。

【表 17】

Wave ID	2.0 nM	8.2 nM	33 nM
Control	.96	1.08	1.13
WV-1868	1.18	1.06	.85
WV-3367	1.07	1.04	.77

50

WV-3368	1.17	.96	.58
WV-3369	1.12	.98	1.03
WV-3370	1.23	.88	.67
WV-3371	1.24	1.19	.65
WV-3372	1.08	1.17	1.05
WV-3373	1.22	1.14	1.15
WV-3374	1.19	.99	.76
WV-3375	1.14	1.0	.63
WV-3376	1.14	.72	.39
WV-3377	.92	.52	.12
WV-3378	1.07	.48	.15
WV-3379	1.18	.45	.16
WV-3380	.31	.12	.06

10

【1451】

表75. 表75は、PNPLA3に対するASOのインビトロ効力を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-1868、及びWV-3381～WV-3394である。

表75. オリゴヌクレオチドの活性。

【表18】

Wave ID	2.0 nM	8.2 nM	33 nM
Control	.95	1.07	1.12
WV-1868	1.18	1.07	.85
WV-3381	.48	.11	.18
WV-3382	.99	.33	.18
WV-3383	1.02	.55	.31
WV-3384	1.16	.42	.13
WV-3385	1.03	.42	.18
WV-3386	.57	.22	.23
WV-3387	.23	.08	.11
WV-3388	1.08	.95	1.03
WV-3389	1.07	1.15	.79
WV-3390	.63	.25	.05
WV-3391	.46	.18	.14
WV-3392	.42	.13	.08
WV-3393	.33	.11	.05
WV-3394	.46	.20	.10

20

30

【1452】

表76. 表76A及びBは、PNPLA3に対するASOのインビトロ効力を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、表76AがWV-1868、及びWV-3395～WV-3408、表76BがWV-1868、及びWV-3409～WV-3422である。

表76A. オリゴヌクレオチドの活性。

【表19】

Wave ID	2.0 nM	8.2 nM	33 nM
Control	.96	1.07	1.12
WV-1868	1.18	1.06	.85
WV-3395	.33	.28	.33
WV-3396	1.02	.51	.23
WV-3397	.83	.37	.14

40

50

WV-3398	1.07	.22	.06
WV-3399	.4	.22	.26
WV-3400	.87	.52	.18
WV-3401	1.09	.43	.12
WV-3402	.37	.12	.06
WV-3403	1.2	1.08	.92
WV-3404	.29	.15	.25
WV-3405	.86	.33	.21
WV-3406	1.18	1.26	1.14
WV-3407	.95	.56	.23
WV-3408	.31	.15	.21

10

表 7 6 B . オリゴヌクレオチドの活性。

【表 2 0】

Wave ID	2.0 nM	8.2 nM	33 nM
Control	.96	1.07	1.12
WV-1868	1.17	1.06	.85
WV-3409	.6	.31	.45
WV-3410	.89	.23	.19
WV-3411	.63	.12	.07
WV-3412	.87	.34	.08
WV-3413	.85	.31	.05
WV-3414	1.07	.75	.32
WV-3415	1.02	.25	.44
WV-3416	.55	.28	.25
WV-3417	.68	.23	.31
WV-3418	.55	.15	.28
WV-3419	.81	.63	.38
WV-3420	1.12	.87	.27
WV-3421	.48	.17	.23
WV-3422	1.01	.6	.38

20

30

【1 4 5 3】

表 7 7 . 表 7 7 は、PNPLA3 に対する ASO のインビトロ効力を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-1868、及び WV-3423 ~ WV-3436 である。

表 7 7 . オリゴヌクレオチドの活性。

40

50

【表 2 1】

Wave ID	2.0 nM	8.2 nM	33 nM
Control	1.05	1.15	1.03
WV-1868	1.07	1.07	1.03
WV-3423	.62	.42	.3
WV-3424	.69	.4	.2
WV-3425	1.02	.68	.35
WV-3426	.92	.46	.37
WV-3427	.87	.74	.6
WV-3428	1.08	.88	.97
WV-3429	1.02	.6	.37
WV-3430	1.13	.94	.48
WV-3431	.63	.38	.23
WV-3432	.97	.63	.31

10

WV-3433	.63	.26	.18
WV-3434	.81	.31	.2
WV-3435	.58	.33	.28
WV-3436	.93	.71	.5

20

【1 4 5 4】

表 7 8 . 表 7 8 は、P N P L A 3 に対する A S O のインビトロ効力を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-1 8 6 8、及びWV-3 4 3 7～WV-3 4 5 0である。

表 7 8 . オリゴヌクレオチドの活性。

【表 2 2】

Wave ID	2.0 nM	8.2 nM	33 nM
Control	1.05	1.15	1.03
WV-1868	1.06	1.06	1.03
WV-3437	1.06	.54	.22
WV-3438	.93	.85	1
WV-3439	1.01	.75	.56
WV-3440	1.04	1.03	.67
WV-3441	1.16	.8	.38
WV-3442	1.03	.57	.29
WV-3443	.45	.25	.2
WV-3444	.65	.38	.23
WV-3445	1.18	.78	.42
WV-3446	.8	.45	.25
WV-3447	.86	.59	.25
WV-3448	.81	.52	.22
WV-3449	.74	.43	.2
WV-3450	.96	.95	.92

30

40

【1 4 5 5】

表 7 9 . 表 7 9 は、H e p 3 B の 2 4 時間アッセイでの、R N a s e H によって媒介される P N P L A 3 のノックダウンにおけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-1 8 6 8（対照）、WV-3 4 5 1、WV-3 4 5 2、WV-3 4 5 3、WV-3 4 5 4、WV-3 4 5 5、WV-3 4 5 6、WV

50

－ 3 4 5 7、WV－ 3 4 5 8、WV－ 3 4 5 9、WV－ 3 4 6 0、WV－ 3 4 6 1、及び WV－ 3 4 6 2である。WV－ 1 8 6 8は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（RNAse H媒介ノックダウンを介して作用する）であるが、他の試験したオリゴヌクレオチドはRNAi剤である。

表 7 9．オリゴヌクレオチドの活性。

【表 2 3】

Wave ID	2.0 nM	8.2 nM	33 nM
Control	1.05	1.15	1.04
WV-1868	1.06	1.06	1.02
WV-3451	.97	.55	.24
WV-3452	1.01	.52	.18
WV-3453	.43	.19	.19
WV-3454	.51	.22	.1
WV-3455	.62	.35	.18
WV-3456	.78	.52	.22
WV-3457	.74	.37	.11
WV-3458	.64	.28	.22
WV-3459	1.15	1.09	.9

10

WV-3460	.77	.4	.43
WV-3461	1.13	.54	.23
WV-3462	.93	.42	.2

20

【 1 4 5 6 】

表 8 1．表 8 1は、PNPLA3を標的とする、異なるオリゴヌクレオチドのインビトロ効力及びIC₅₀を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV－ 2 4 7 7（RNA干渉媒介機序を介して標的をノックダウンする）及びWV－ 3 3 8 7（RNAse H媒介ノックダウンを介して標的をノックダウンする）である。

表 8 1．オリゴヌクレオチドの活性。

【表 2 4】

Conc. (nM) (exp 10)	WV-2477-Hep3b		WV-2447-Huh7		WV-3387-Hep3b		WV-3387-Huh7	
0.796	1.031		1.029	0.928	0.148	0.095	0.154	0.186
0.495		0.982		0.884	0.143	0.092	0.163	0.218
0.194	1.144	0.989	1.103	0.994	0.221	0.162	0.183	
-0.107	1.068	1.201	1.259	1.008	0.273	0.254	0.321	0.361
-0.408	1.193	1.075	0.947	1.111	0.350	0.385	0.515	0.490
-0.709	1.113	1.003		0.974	0.560	0.534	0.537	0.708
-1.010	1.193	1.010	0.866	0.902	0.644	0.704	0.652	0.974
-1.612		0.989	1.044	1.051	0.861	0.820	1.029	0.825
-2.214	1.185	0.976	0.954	1.051	0.929	0.956	0.947	0.866

30

40

	IC50 (nM)	95 % CI
WV-2477-Hep3b	NA	---
WV-2477-Huh7	NA	---
WV-3387-Hep3b	0.205	0.16 to 0.254
WV-3387-Huh7	0.311	0.186 to 0.602

50

【1457】

表82. 表82は、Hep3Bアッセイでの、RNase Hによって媒介されるPNPLA3のノックダウンにおけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-3380（陽性対照）、WV-3387、WV-3391、WV-3393、WV-3402、WV-3411、WV-3416、WV-3443、及びWV-3454である。

表82. オリゴヌクレオチドの活性。

【表25】

Wave ID	IC50 (nM)
WV-3380	4.28
WV-3387	1.29
WV-3391	2.31
WV-3393	2.21
WV-3402	1.55
WV-3411	5.32
WV-3416	4.68
WV-3443	1.22

10

WV-3454	3.39

20

【1458】

表83. 表83は、Huh7細胞中のPNPLA3に対するASOのIC50を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-3380、WV-3387、WV-3391、WV-3393、WV-3402、WV-3411、WV-3416、WV-3443、及びWV-3454である。

表83. オリゴヌクレオチドの活性。

【表26】

Wave ID	HEP3B IC50 (nM)	Huh7 IC50 (nM)
WV-3380	4.28	3.86
WV-3387	1.29	1.91
WV-3391	2.31	2.96
WV-3393	2.21	5.5
WV-3402	1.55	2.85
WV-3411	5.32	8.27
WV-3416	4.68	9.0
WV-3443	1.22	2.55
WV-3454	3.39	4.30

30

【1459】

表84. 表84は、PNPLA3に対するASOのインビトロ効力を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-3380、WV-3393、WV-3402、WV-3421、WV-3390、WV-3399、WV-3404、WV-3443、WV-3391、WV-3394、WV-3408、WV-3387、及びWV-3381である。

表84. オリゴヌクレオチドのIC50。

40

50

【表 2 7】

Wave ID	IC 50 nM
WV-3380	1.5
WV-3393	1.1
WV-3402	1.7
WV-3421	1.4
WV-3399	0.77
WV-3404	1.6
WV-3443	1.6
WV-3391	0.65
WV-3394	1.4
WV-3408	0.92
WV-3387	1.2
WV-3381	1.4

10

【1 4 6 0】

表 8 5 . 表 8 5 は、PNPLA3 に対する ASO の IC 50 を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-3380、WV-3381、WV-3387、WV-3391、WV-3393、WV-3394、WV-3399、WV-3402、WV-3404、WV-3408、WV-3421、及び WV-3443 である。

20

表 8 5 . オリゴヌクレオチドの IC 50。

オリゴヌクレオチドは様々な配列を有していて、PNPLA3 のコードセグメント (CDS) または 3' 非翻訳領域 (3' UTR) 中に存在した。

【表 2 8】

Wave ID	IC 50 nM	Position
WV-3380	1.5	CDS
WV-3393	1.1	CDS
WV-3402	1.7	CDS
WV-3421	1.4	3'UTR
WV-3399	0.77	3'UTR
WV-3404	1.6	3'UTR
WV-3443	1.6	3'UTR
WV-3391	0.65	3'UTR
WV-3394	1.4	3'UTR
WV-3408	0.92	3'UTR
WV-3387	1.2	3'UTR
WV-3381	1.4	3'UTR

30

【1 4 6 1】

表 8 6 . 表 8 6 は、PNPLA3 に対する ASO のインビトロ効力を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-3421、WV-3393、WV-3380、及び WV-3402 である。表 8 6 及び表 8 7 に示すデータでは、ヒト配列を有するオリゴヌクレオチドをカニクイザル細胞中で試験した。楕円はミスマッチを示し、オリゴ配列は。ヒト配列と一致するが、カニクイザル配列とはミスマッチを有する。

40

表 8 6 . オリゴヌクレオチドの活性。

数値は、PNPLA3 mRNA の相対レベル (PNPLA3 / GAPDH) を表す。1.0 は、100% の mRNA レベルまたは 0% ノックダウンを表すことになり、0.0 は、0.0% の mRNA レベルまたは 100% ノックダウンを表すことになる。数値は概算であり、エラーバーは含まれていない。カニクイザル細胞をインビトロで処理した。

50

【表 29】

Oligonucleotide	0 nM	0.01 nM	1 nM	8 nM	25 nM
WV-3421	.99	.78	.52	.18	.12
WV-3380	1.01	1.12	.99	.55	.29
WV-3393	.99	1.02	.94	.48	.37
WV-3402	.96	1.01	.82	.56	.39

10

【1462】

表 87. 表 87 は、PNPLA3 に対する ASO のインビトロ効力を示す。試験したオリゴヌクレオチドは、WV-3404、WV-3399、WV-3443、及び WV-3421 である。

表 87. オリゴヌクレオチドの活性。

数値は、PNPLA3 mRNA の相対レベル (PNPLA3 / GAPDH) を表す。1.0 は、100% の mRNA レベルまたは 0% ノックダウンを表すことになり、0.0 は、0.0% の mRNA レベルまたは 100% ノックダウンを表すことになり。数値は概算であり、エラーバーは含まれていない。カニクイザル細胞をインビトロで処理した。

【表 30】

20

Oligonucleotide	0 nM	0.01 nM	1 nM	8 nM	25 nM
WV-3404	1.01	.95	.81	.33	.36
WV-3443	1.01	1.07	1.14	.52	.39
WV-3399	1.04	.97	.83	.84	.80

【1463】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、さらなる実験から、様々な推定一本鎖 RNA i 剤が実際に RNA 干渉を媒介する能力を有したという結論、及び RNase H 媒介機序を介してノックダウンを媒介する能力を有するように設計した様々なオリゴヌクレオチドが、実際に RNase H 媒介機序を介してノックダウンを媒介したという結論を支持する追加のデータも提供したことについて注記する。異なる標的に対する PNPLA3 オリゴヌクレオチドが、RNase H 媒介機序を介してノックダウンを行ったという知見は、同じまたは類似した型であるが、PNPLA3 を有し、PNPLA3 をノックダウンする能力を有する別のオリゴヌクレオチドが、同様に RNase H 媒介機序を介してもノックダウンを行う可能性が高くあり得るという考えを支持している。

30

【1464】

40

1 つの実験において、インビトロ RNase H アッセイを、陽性対照として APOC3 オリゴヌクレオチド WV-1868 (ASO、PNPLA3 以外の遺伝子である APOC3 の RNase H ノックダウン機序を媒介する)、及び陰性対照として APOC3 オリゴヌクレオチド WV-2110 (一本鎖 RNA i 剤) を用いて実施した。RNA 分子 WV-2372 を、試験基質として使用する。RNase H アッセイにおいて、二重機序の APOC3 オリゴヌクレオチド WV-2111 は、RNase H ノックダウンを媒介した (データは示さず)。

【1465】

別の実験において、インビトロ Ago-2 アッセイ (一本鎖 RNA 干渉について) を実施した。このアッセイを、別の遺伝子 APOC3 に対するものであるが、PNPLA3 オ

50

リゴヌクレオチドについて記載した様々な型に類似した、またはそれらと同一の型を有する一本鎖RNA i 剤を用いて実施した。異なる標的に対するPNPLA3オリゴヌクレオチドがRNA干渉を行ったという知見は、同じまたは類似した型であるが、PNPLA3を有し、PNPLA3をノックダウンする能力を有する別のオリゴヌクレオチドが、同様にRNA干渉の実施を介しても行う可能性があるという考えを支持している。

【1466】

RNA試験基質は、WV-2372 (APOC3) であった。結果において、RNA試験基質を表わすバンドは、APOC3オリゴヌクレオチドWV-1308及びWV-2420の存在下では存在せず、このことは、これらのオリゴヌクレオチドがRNA干渉を媒介する能力を有する一本鎖RNA i 剤であることを示している。様々な対照を使用した：陰性対照ASO WV-2134の不存在下での基質、RNA干渉を媒介しない陰性対照ASO WV-2134の存在下での基質、試験オリゴヌクレオチドWV-1308の不存在下での基質、試験オリゴヌクレオチドWV-2420の不存在下での基質、基質のみ、WV-2134を添加して基質は無し、及びWV-1308を添加して基質は無し（データは示さず）。

【1467】

別の実験において、インビトロAgo-2アッセイ（一本鎖RNA干渉について）を、Hep3B細胞中において3' RACEアッセイでの試験基質としてAPOC3 mRNAを使用して実施した。試験オリゴヌクレオチドWV-3021の存在下でAPOC3 mRNAの切断産物を検出し、これはWV-3021の10位と11位との間の切断に対応する部位でのmRNA切断に対応し（データは示さず）、その結果、RNA干渉と一致する。人工切断産物も検出した。

【1468】

他の実験において、二重機序（ハイブリッド型）のAPOC3オリゴヌクレオチドWV-2111は、RNase H及びRNA干渉の両方によってノックダウンを媒介する能力を有することが分かった。WV-2111に対するRNA基質は、GCUGGCCUC CCAAUAAAGCUGGACAの配列を含み、APOC3オリゴヌクレオチドWV-2111の配列に相補的であり、これはWV-2111の存在下において以下の位置で切断されることを見出した：GC/UGGC/C/U/CC/CAAUA//AAGCUGGACA（ここで、/は、RNase H活性に特有の位置での切断部位を示し、//は、Ago-2 (RNA干渉) 活性に特有の位置での切断部位を示す）。これらのデータは、WV-2111がRNase H及びRNA干渉機序の両方を介してノックダウンを媒介するという考えを支持している。

【1469】

いくつかのオリゴヌクレオチドも、Ago-2インビトロアッセイにおいてRNA干渉を媒介できることを見出した。RNA試験基質がAPOC3オリゴヌクレオチドWV-2372であって、この基質は、APOC3オリゴヌクレオチドWV-1308、WV-2114、WV-2386、またはWV-2387（各々別個に試験した）の存在下で消失し、このことは、これらのオリゴヌクレオチドの各々がRNA干渉を媒介する一本鎖RNA i 剤として作用する能力を有することを示している。

【1470】

いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、本明細書では一本鎖RNA i 剤と称するオリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、RISC (RNA干渉サイレンシング複合体) を介してノックダウンを媒介するが、少なくとも一部の実験では、本明細書で一本鎖RNA i 剤と称するオリゴヌクレオチドが、標的タンパク質レベルの観察したノックダウンを、対応するmRNAレベルの観察したノックダウンを超えて媒介できたことを示唆し、いずれの特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、本開示は、この観察結果が、標的遺伝子またはタンパク質をノックダウンする能力を有する、本明細書で一本鎖RNA i 剤と称する一部のオリゴヌクレオチドが、RISC媒介機序及び/または立体障害を介してノックダウンでき得るという推測と

一致することを示唆している。

【1471】

本開示は、様々な配列、型、修飾、5'末端領域、シード領域、ポストシード領域、及び3'末端領域のいずれかを有するオリゴヌクレオチドの多くの非限定的な例を提示し、これらは一本鎖RNA干渉を媒介する能力を有する（例えば、一本鎖RNA i 剤）。

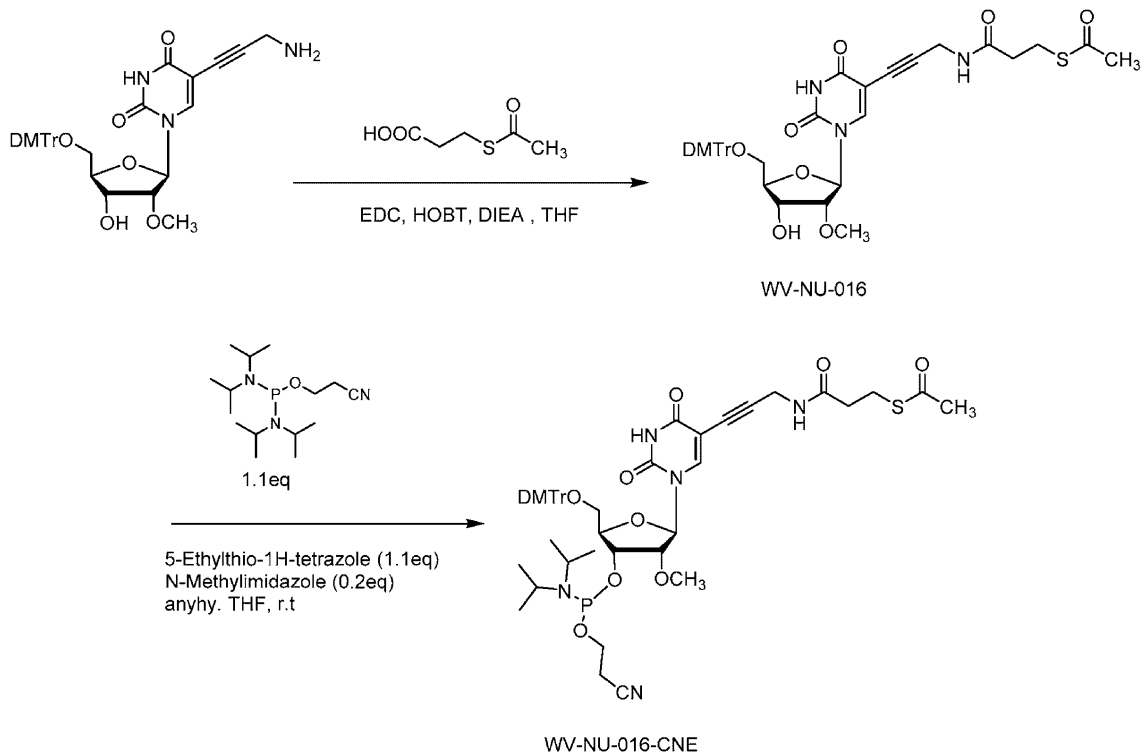
【1472】

図3．図3A及び図3Bは、多量体型の例を示す。オリゴヌクレオチドは、直接及び／またはリンカーを介して結合され得る。図示される通り、多量体は、同じまたは異なる構造／種類のオリゴヌクレオチドモノマーを含み得る。一部の実施形態では、多量体のモノマーはssRNA i 剤である。一部の実施形態では、多量体のモノマーは、RNAse H依存的アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）である。モノマーは、様々な位置、例えば、5'末端、3'末端、またはその間の位置を介して結合され得る。

【1473】

すぐ以下に示すのは、ジスルフィドリンカーの形成によってオリゴヌクレオチドモノマーを連結するのに有用なホスホラミダイトである。オリゴヌクレオチドモノマー中への組み込み後、チオエステルを加水分解して遊離チオールを放出し得、それが別のオリゴヌクレオチドモノマーのチオールと反応してジスルフィド結合を形成し、それによってオリゴヌクレオチドモノマーを互いに連結し得る。複数のチオール基を、様々な数のモノマーの多量体を形成できるようにオリゴヌクレオチド中に組み込んでよい。

【化258】



【1474】

表90は、PNPLA3を標的とする、異なるオリゴヌクレオチドのインビトロアレル特異的抑制を示す。オリゴヌクレオチドの例は、1つのアレルの標的配列に完全に相補的であり、その標的配列は、1つまたは2つのSNP部位を含む。1つのSNP部位は、タンパク質配列のI148Mの変化と関連する。両方のSNPを含む標的配列に完全に相補的な標的結合配列を含むオリゴヌクレオチドを、Hep3B細胞（野生型、C及びC、I148）ならびにHu h7細胞（二重変異を有する、T及びG、M148）中で評価した。二重変異を、様々な位置（8位及び11位、9位及び12位、10位及び13位など）で、ならびに様々な修飾を用いて試験し、PNPLA3のアレル特異的ノックダウンの能

力を有するオリゴヌクレオチドを特定した。

【1475】

表90Bに示す通り、WV-7778~WV-7793及びWV-3858~WV-3864を試験した。これらのオリゴヌクレオチドでは、ウィングの先頭及び最後のヌクレオチド間結合は、立体不規則的なPSであり、その他はPOであり、5'ウィング及び3'ウィングは2'-OMeを含む。いくつかのオリゴヌクレオチドは、PNPLA3のアレル特異的ノックダウンを示した。

表90B．オリゴヌクレオチドの活性。

【表31】

	Hep3B		Huh7	
mock	100	100	100	100
WV-7778	92.8	86.9	63.6	52.7
WV-7779	92.6	85.8	59.2	48.0
WV-7780	102.3	97.1	36.4	34.8
WV-7781	111.8	102.4	46.1	38.9
WV-7782	108.5	94.7	43.3	35.0
WV-7783	110.2	97.5	36.6	33.7
WV-7784	105.0	95.9	41.2	41.9
WV-7785	108.7	107.4	73.8	57.5
WV-3858	103.3	103.6	55.1	52.3
WV-3859	94.7	96.1	41.8	41.2
WV-3860	104.2	94.1	46.7	45.6
WV-3861	101.8	99.2	47.1	45.2
WV-3862	97.1	96.5	44.0	42.3
WV-3863	99.7	86.0	42.0	51.5
WV-3864	97.8	96.8	53.5	38.9
WV-7786	99.1	104.3	37.0	38.0
WV-7787	84.2	87.5	23.0	25.1
WV-7788	80.4	88.0	35.5	28.5
WV-7789	82.7	85.7	25.4	25.5
WV-7790	80.8	85.1	27.4	29.8
WV-7791	87.1	80.1	40.8	42.1
WV-7792	78.1	73.1	42.5	46.5
WV-7793	68.3	65.1	49.9	44.9

【1476】

表90Cに示す通り、WV-7794~WV-7816を試験した。これらのオリゴヌクレオチドでは、ウィングの先頭及び最後のヌクレオチド間結合は、立体不規則的なPSであり、その他はPOであり、5'ウィング及び3'ウィングは2'-MOEを含む。いくつかのオリゴヌクレオチドは、PNPLA3のアレル特異的ノックダウンを示した。

表90C．オリゴヌクレオチドの活性。

【表32】

	Hep3B	Huh7

10

20

30

40

50

mock	100	100	100	100
WV-7794	47.6	44.5	25.0	20.6
WV-7795	58.5	52.8	14.3	14.8
WV-7796	54.6	56.4	16.3	15.5
WV-7797	75.1	74.2	13.5	12.8
WV-7798	78.4	79.8	11.9	13.7
WV-7799	89.9	92.4	23.5	25.7
WV-7800	93.6	92.2	34.1	29.9
WV-7801	90.3	90.3	38.4	29.3
WV-7802	101.1	101.3	25.1	29.6
WV-7803	102.0	103.2	24.8	25.8
WV-7804	95.9	97.2	27.8	32.7
WV-7805	100.5	95.5	21.9	22.0
WV-7806	110.6	105.4	22.0	21.2
WV-7807	96.2	101.5	21.1	23.8
WV-7808	95.5	101.0	21.5	18.8
WV-7809	85.3	84.2	17.1	15.7
WV-7810	92.0	95.9	25.2	21.6
WV-7811	100.1	100.0	26.6	27.1
WV-7812	79.5	82.1	22.3	21.1
WV-7813	83.7	76.2	23.7	18.2
WV-7814	87.8	82.8	44.3	39.2
WV-7815	78.1	74.8	45.3	37.1
WV-7816	59.5	52.4	24.5	20.5

10

20

【1477】

30

表90Dに示す通り、WV-7817～WV-7839を試験した。これらのオリゴヌクレオチドでは、先頭及び最後のヌクレオチドはLNAであり、5'ウィングは、オリゴヌクレオチドの5'末端にLNA、続いていくつかの2'-OMeを有し、3'ウィングは、いくつかの2'-OMeに続いてオリゴヌクレオチドの3'末端にLNAを有する。いくつかのオリゴヌクレオチドは、PNPLA3のアレル特異的ノックダウンを示した。

表90D. オリゴヌクレオチドの活性。

【表33】

	Hep3B		Huh7	
	100	100	100	100
mock				
WV-7817	71.4	60.1	34.0	30.2
WV-7818	68.1	75.8	44.0	30.0
WV-7819	68.5	76.6	20.7	20.7
WV-7820	87.7	86.0	24.0	22.4
WV-7821	90.1	89.3	17.7	15.3
WV-7822	101.2	87.2	19.6	11.7
WV-7823	83.3	87.7	22.9	17.8
WV-7824	99.0	101.9	31.1	31.6

40

50

WV-7825	94.0	89.5	28.7	22.6
WV-7826	95.6	87.5	21.2	17.6
WV-7827	113.3	104.4	22.1	19.3
WV-7828	108.1	102.8	25.7	23.6
WV-7829	99.8	97.9	20.5	21.7
WV-7830	95.9	87.8	18.5	19.2
WV-7831	89.8	89.2	21.3	23.4
WV-7832	76.2	71.7	9.4	11.8
WV-7833	68.2	76.8	14.1	10.4
WV-7834	69.5	71.2	17.4	16.5
WV-7835	69.6	68.7	11.0	9.4
WV-7836	59.8	67.8	18.3	21.0
WV-7837	60.8	63.7	25.6	28.4
WV-7838	48.2	50.5	16.8	13.5
WV-7839	35.0	39.1	10.5	11.8

10

【1478】

表90Eに示す通り、WV-7840～WV-7862を試験した。これらのオリゴヌクレオチドでは、先頭及び最後のヌクレオチドはLNAであり、5'ウィングは、オリゴヌクレオチドの5'末端にLNA、続いていくつかの2'-MOEを有し、3'ウィングは、いくつかの2'-MOE（または5-メチル2'-MOE）に続いてオリゴヌクレオチドの3'末端にLNAを有する。いくつかのオリゴヌクレオチドは、PNPLA3のアレル特異的ノックダウンを示した。

20

表90E. オリゴヌクレオチドの活性。

【表34】

	Hep3B		Huh7	
mock	100	100	100	100
WV-7840	32.7	37.7	12.8	14.8
WV-7841	45.9	49.8	8.1	10.6
WV-7842	43.2	50.4	7.6	7.0
WV-7843	53.7	61.0	8.7	10.6
WV-7844	69.2	69.0	14.3	14.9
WV-7845	80.8	83.7	15.0	13.7
WV-7846	77.1	86.3	16.5	15.7
WV-7847	85.2	96.4	18.5	15.6
WV-7848	87.2	89.4	21.7	18.0
WV-7849	65.0	74.2	17.2	16.7
WV-7850	98.8	107.4	15.3	18.7
WV-7851	105.0	95.8	11.4	15.9
WV-7852	113.7	86.9	14.2	14.2
WV-7853	108.5	90.7	10.1	14.3
WV-7854	109.6	94.9	11.3	12.4

30

40

50

WV-7855	81.9	82.8	7.4	5.4
WV-7856	86.3	82.0	11.5	11.2
WV-7857	95.3	78.1	14.6	15.6
WV-7858	63.0	66.3	8.6	9.8
WV-7859	65.4	61.5	12.9	15.9
WV-7860	69.4	70.0	30.4	34.2
WV-7861	51.9	49.0	14.8	26.8
WV-7862	37.4	41.3	10.4	11.2

10

【1479】

表90Fに示す通り、WV-993、WV-3390、及びWV-4054を試験した。

表90F．オリゴヌクレオチドの活性。

【表35】

	Hep3B		Huh7	
mock	100.0	100.0	100.0	100.0
UT (untreated)	92.4	98.7	93.1	107.0
WV-993 10nM	108.0	117.8	115.8	137.6
WV-3390 2nM	84.5	84.1	46.5	57.6
WV-3390 10nM	50.0	53.9	15.7	24.4
WV-4054 2nM	95.8	95.1	30.0	35.7
WV-4054 10nM	85.5	91.8	30.2	37.5

20

【1480】

表90Gに示す通り、WV-3860～WV-3864を試験した。オリゴヌクレオチドは、8位及び11位（WV-3860）、9位及び12位（WV-3861）、10位及び13位（WV-3862）、11位及び14位（WV-3863）、ならびに12位及び15位（WV-3864）にミスマッチ（野生型と変異体アレルとの間の）を有した。いくつかのオリゴヌクレオチドは、PNPLA3のアレル特異的ノックダウンを、特に8nMの濃度で示した。

表90G．オリゴヌクレオチドの活性。

【表36】

nM	WV-3860 Hep3B	WV-3861 Hep3B	WV-3862 Hep3B	WV-3863 Hep3B
50	37.7	44.4	44.3	47.7
20	83.9	89.7	87.7	93.9
8	95.8	95.4	101.9	103.4
3.2	105.9	93.0	94.3	90.7
1.28	100.9	93.4	81.0	95.4
0.512	90.5	96.6	94.9	88.3

40

50

0.205	110.1	99.0	93.2	95.4	95.7	89.5	89.7	92.5
0.082	96.6	95.6	94.8	96.2	95.3	97.8	86.7	93.9
0.033	98.5	88.1	98.0	95.3	103.7	93.2	93.3	87.8
0.013	97.1	95.6	91.1	92.4	100.9	90.9	91.7	90.9

nM	WV-3864 Hep3B		WV-3860 Huh7		WV-3861 Huh7		WV-3862 Huh7	
50	31.8	43.9	11.4	9.3	12.4	8.4	6.8	8.4
20	98.4	99.4	23.7	25.9	25.9	24.4	16.8	14.0
8	100.7	107.4	47.9	51.3	46.0	44.0	40.7	42.6
3.2	94.9	102.7	84.1	67.6	63.7	68.7	56.9	77.6
1.28	96.3	95.6	100.5	83.9	80.4	83.7	77.3	81.0
0.512	89.7	102.4	100.5	97.3	85.9	87.5	78.0	85.6
0.205	96.3	93.8	101.6	99.9	83.7	76.6	73.4	85.7
0.082	89.5	92.1	81.4	87.3	85.3	84.1	78.9	89.3
0.033	92.7	94.2	114.4	90.6	100.4	87.6	87.5	84.6
0.013	91.7	106.0	107.0	93.7	82.3	88.1	78.3	91.6

nM	WV-3863 Huh7		WV-3864 Huh7	
50	5.6	10.6	8.4	8.3
20	20.0	13.4	16.5	13.9
8	37.4	40.8	47.9	43.3
3.2	67.5	60.5	75.6	65.5
1.28	84.9	82.5	86.2	87.0
0.512	79.4	81.1	95.6	91.0
0.205	83.0	86.3	89.1	96.1
0.082	79.5	92.5	89.4	77.9
0.033	79.7	102.1	104.6	86.4
0.013	94.6	96.8	93.0	104.9

【1481】

表90Hに示す通り、WV-7804～WV-7808を試験した。オリゴヌクレオチドは、8位及び11位（WV-7804）、9位及び12位（WV-7805）、10位及び13位（WV-7806）、11位及び14位（WV-7807）、ならびに12位及び15位（WV-7808）にミスマッチを有した。一部のオリゴヌクレオチドは、PNPLA3のアレル特異的ノックダウンを、特に3.2 nM及び8 nMの濃度で示した。

表90H. オリゴヌクレオチドの活性。

【表37】

nM	WV-7804 Hep3B		WV-7805 Hep3B		WV-7806 Hep3B		WV-7807 Hep3B	
50	63.3	69.5	60.3	62.7	69.6	65.1	75.0	75.5
20	84.6	98.4	81.8	86.1	90.1	89.4	95.3	95.4

10

20

30

40

50

8	101.1	102.9	96.9	98.5	100.8	94.7	101.2	95.5
3.2	92.9	95.1	90.7	98.1	98.9	92.1		88.8
1.28	95.5	98.6	91.3	97.0	95.9	90.9	97.3	103.6
0.512	96.2	110.4	95.5	97.9	95.9	94.8	100.9	92.7
0.205	92.0	99.5	90.5	100.7	99.3	94.7	96.4	99.8
0.082	97.6	93.6	92.2	107.6	92.3	93.8	93.4	103.7
0.033	98.4	101.4	98.5	104.0	99.6	90.1	89.2	93.3
0.013	96.7	100.4	95.0	105.8	90.1	97.5	90.6	87.5

10

nM	WV-7808 Hep3B	WV-7804 Huh7		WV-7805 Huh7		WV-7806 Huh7	
50	72.2	4.4	7.5	1.7	8.4	9.8	3.8
20	98.9	3.5	11.1	7.1	11.9	2.8	7.2
8	117.8	25.1	23.3	19.6	11.6	13.8	12.5
3.2	109.5	45.3	48.0	36.1	38.4	28.8	39.7
1.28	116.3	68.9	77.1	59.2	76.2	68.7	68.5
0.512	110.9	74.6	76.0	75.3	78.4	66.6	82.4
0.205	109.3	73.6	86.5	69.8	81.1	69.7	80.3
0.082	116.8	82.9	89.4	75.0	86.9	78.6	79.7
0.033	111.1	81.8	96.1	78.0	95.8	89.4	87.3
0.013	104.6	86.7	90.4	79.6	95.0	88.6	98.0

20

nM	WV-7807 Huh7		WV-7808 Huh7	
50	3.0	3.9	1.8	1.4
20	12.6	9.1	1.9	5.2
8	25.1	14.9	14.2	9.1
3.2	46.9	41.5	37.1	33.2
1.28	78.0	70.4	63.6	65.2
0.512	85.3	73.7	71.0	77.4
0.205	98.8	68.5	79.2	92.3
0.082	92.6	75.3	88.0	71.2
0.033	85.6	81.9	84.1	83.5
0.013	85.5	94.7	95.3	78.1

30

【1482】

表90Iに示す通り、WV-7827~WV-7831を試験した。オリゴヌクレオチドは、8位及び11位(WV-7827)、9位及び12位(WV-7828)、10位及び13位(WV-7829)、11位及び14位(WV-7830)、ならびに12位及び15位(WV-7831)にミスマッチを有した。いくつかのオリゴヌクレオチドは、PNPLA3のアレル特異的ノックダウンを、特に3.2nM及び8nMの濃度で示した。

表90I. オリゴヌクレオチドの活性。

40

50

【表 3 8】

nM	WV-7827 Hep3B		WV-7828 Hep3B		WV-7829 Hep3B		WV-7830 Hep3B	
50	37.01	34.29	36.95	32.75	25.05	33.48	36.76	54.22
20	79.06	85.05	85.88	77.16	82.21	79.79	79.33	87.62
8	97.28	89.87	93.46	91.76	99.65	98.83	97.94	97.83
3.2	94.15	89.12	97.63	90.63	92.57	92.37		104.59
1.28	97.02	95.4	94.2	88.81	93.55	94.13	100.19	113.12
0.512	105.31	93.06	97.26	96.7	95.81	104.04	107.33	109.89
0.205	107.16	97.39	92	91.65	103.76	102.33	104.56	100.78
0.082	100.92	101.71	94.43	88.97	93.95	105.59	94.95	110.09
0.033	98.82	95.76	92.83	92.84	91.46	103.11	97.7	93.54
0.013	96.78	93.38	92.91	90.28	86.25	104.33	96.73	98.6

10

nM	WV-7831 Hep3B		WV-7827 Huh7		WV-7828 Huh7		WV-7829 Huh7	
50	53.44	62.49	3.75	3.01	2.29	1.48	5.61	7.19
20	97.35	92.9	6.33	5.79	16.31	9.08	16.41	9.26
8	103.88	103.69	13.45	13.44	9.77	24.96	31.07	18.62
3.2	104.8	99.48	34.11	44.07	31.43	31.51	54.15	31.49
1.28	99.77	102.88	57.91	67.23	63.32	69.34	78.28	65.69
0.512	102.56	99.81	80.58	87.32	83.18	75.78	94.09	75.96
0.205	111.83	98.89	71.87	84.73	74.94	76.52	87.05	90.6
0.082	102.02	93.55	74.43	76.07	82.31	87.03	97.43	87.48
0.033	93.54	101.84	77.64	80.62	89.1	89.96	108.41	81.93
0.013	101.47	100.78	77.47	74.02	83.14	79.83	100.58	88.97

20

nM	WV-7830 Huh7		WV-7831 Huh7	
50	4.11	5.5	3.5	5.45
20	6.32	5.86	5.62	10.22
8	12.5	16.99	15.15	23.97
3.2	35.34	40.2	35	40.3
1.28	56.82	76.27	73.64	73.96
0.512	86.38	77.53	83.87	88.08
0.205	80.08	79.81	85.02	86.98
0.082	95.69	98.61	82.31	111.77
0.033	86.65	93.2	85.86	85.82
0.013	94.2	85.75	81.84	93.28

30

40

【1 4 8 3】

表 9 0 J に示す通り、WV-9 9 3（陰性対照）、WV-3 3 9 0（陽性対照）、WV-4 0 5 4、WV-7 8 5 0～WV-7 8 5 4 を試験した。オリゴヌクレオチドは、8 位及び 1 1 位（WV-7 8 5 0）、9 位及び 1 2 位（WV-7 8 5 1）、1 0 位及び 1 3 位（WV-7 8 5 2）、1 1 位及び 1 4 位（WV-7 8 5 3）、ならびに 1 2 位及び 1 5 位（WV-7 8 5 4）にミスマッチを有した。いくつかのオリゴヌクレオチドは、P N P L A 3 の強いアレル特異的のノックダウンを、特に 3 . 2 n M 及び 8 n M の濃度で示した。

表 9 0 J . オリゴヌクレオチドの活性。

50

【表 3 9】

nM	WV-7850 Hep3B		WV-7851 Hep3B		WV-7852 Hep3B		WV-7853 Hep3B	
50	38.95	43.11	38.2	54.32	34.89	44.6	28.33	29.79
20	65.77	72.48	80.99	84.09	69.74	74.87	66.38	50.49
8	92.95	82.91	93.58	96.06	89.54	101.29	85.15	81.31
3.2	91.26	86.61	90.46	94.37	97.29	91.77		96.08
1.28	111.06	94.39	98.64	92.99	89.98	111.31	96.26	97.11
0.512	106.14	87.28	94.61	94.09	96.79	95.82	109.19	105.33
0.205	84.62	87.72	100.09	99.5	111.54	99.81	95.06	94.02
0.082	97.3	89.13	90.19	87.13	92.11	100.64	95.93	104.77
0.033	88.83	89.09	96.09	101.92	96.1	95.83	95.56	95.83
0.013	91.98	92.51	100.59	92.81	98.94	109.53	99.05	97.36

10

nM	WV-7854 Hep3B		WV-7850 Huh7		WV-7851 Huh7		WV-7852 Huh7	
50	16.7	18.84	2.74	4.3	2.13	1.26	8.39	7.43
20	63.04	59.9	5.33	5.88	6.09	4.64	7.76	5.84
8	82.27	80.67	11.67	9.74	1.12	14.86	9.96	10.6
3.2	92.77	89.43	25.14	13.84	31.45	25.89	28.6	25.4
1.28	90.63	83.96	57.25	62.49	55.19	52.3	49.96	56.13
0.512	88.27	86.56	75.21	73.3	81.73	81.67	72.77	87.64
0.205	89.69	88.92	71.16	74.28	91.84	94.95	82.61	85.11
0.082	95.16	89.43	84.71	75.77	91	79.62	96.22	83.67
0.033	99.41	94.3	80.67	93.66	84.27	79.5	72.16	70.12
0.013	88	96.49	96.84	104.2	86.94	81.37	94.13	88.49

20

nM	WV-7853 Huh7		WV-7854 Huh7	
50	2.91	3.83	0.56	5.35
20	5.38	4.3	2.43	7.48
8	6.36	8.51	9.91	10.31
3.2	27.05	23.79	23.52	22.24
1.28	47.78	62.17	47.66	45.94
0.512	70.13	93.78	76.63	66.5
0.205	96.01	74.6	84.06	72.69
0.082	82.68	90.37	79.33	82.72
0.033	89.38	93.35	89.39	83.68
0.013	86.29	95.77	98.79	96.55

30

40

【1 4 8 4】

表 9 0 K 及び表 9 0 L に示す通り、WV-3 8 6 0 ~ WV-3 8 6 4、WV-7 8 0 4 ~ WV-7 8 0 8、WV-7 8 2 7 ~ WV-7 8 3 1、及び WV-7 8 5 0 ~ WV-7 8 5 4 を試験した。WV-4 0 5 4 は、高いアレル特異的活性を示した。

表 9 0 K . オリゴヌクレオチドの活性。

50

【表 4 0】

nM	WV-3390 Hep3B		WV-3390 Huh7	
50	8.21	7.25	8.29	8.93
20	6.38	7.65	8.38	6.55
8	12.25	18.67	14.29	10.45
3.2	45.11	53.94	44.3	57.9
1.28	77.33	87.7	75.75	79.58
0.512	89.66	91.59	75.55	114.48
0.205	88.47	99.01	77.44	93.14
0.082	90.52	101.67	81.19	91
0.033	100.47	102.34	78.08	106.05
0.013	111.98	101.98	93.49	92.23

10

nM	WV-4054 Hep3B		WV-4054 Huh7	
8	77.1	75.46	25.4	28.99
3.2	64.83	77.36	19.76	30.45
1.28	75.7	80.58	20.26	28
0.512	83.19	91.18	27.99	30.12
0.205	96.79	100.8	48.79	51.24
0.082	96.97	105.15	51.71	65.92
0.033	98.21	96.76	82.73	90.69
0.013	100.71	110.73	89.25	101.52

20

nM	WV-993 Hep3B		WV-993 Huh7	
50	46.96	63.05	64.33	84.69
20	85.99	93.33	85.91	92.58
8	94.55	112.34	108.31	90.19
3.2	94.42	101.21	98.4	102.07
1.28	90.96	98.52	104.92	108.34
0.512	87.71	95.84	96.98	87.06
0.205	91.78	93.62	114.92	90.64
0.082	86.49	96.33	109.17	101.77
0.033	87.45	104.34	102.65	92.43
0.013	90.55	100.97	114.84	108.07

30

表 9 0 L . H u h 7 細胞中の様々なオリゴヌクレオチドの I C 5 0 （変異体アレル）。

【表 4 1】

40

Mismatch Positions	Oligonucleotides 2'OMe	IC ₅₀ (nM)	Oligonucleotides 2'MOE	IC ₅₀ (nM)
8,11	WV-3860	10.6	WV-7804	4.0

50

9, 12	WV-3861	10.4	WV-7805	3.0
10, 13	WV-3862	10.6	WV-7806	2.6
11, 14	WV-3863	7.8	WV-7807	4.0
12, 15	WV-3864	9.5	WV-7808	2.9

Mismatch Positions	Oligonucleotides 2'MOE LNA	IC ₅₀ (nM)	Oligonucleotides 2'OMe LNA	IC ₅₀ (nM)
8,11	WV-7850	1.6	WV-7827	3.8
9, 12	WV-7851	2.2	WV-7828	2.8
10, 13	WV-7852	1.9	WV-7829	3.0
11, 14	WV-7853	1.8	WV-7830	2.6
12, 15	WV-7854	1.3	WV-7831	3.3

表 9 1 . オリゴヌクレオチドの活性。

P N P L A 3 mRNAレベル

(P N P L A 3 / H P R T 1)

【表 4 2】

Conc (nM) exp 10	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.114	-0.512	-0.910	-1.308
WV-7808	0.200	0.366	0.424	0.576	0.803	0.910	1.217	1.131
	0.081	0.221	0.374	0.613	0.987	1.050	1.314	1.080
WV-8690	0.199	0.388	0.503	0.808	0.897	1.000	1.148	1.068
	0.208	0.313	0.754	0.932	1.058	1.236	1.286	1.138
WV-8858	0.233	0.446	0.595	0.838	0.911	0.916	0.965	1.213
	0.240	0.340	0.727	1.036	1.039	1.403	0.874	
WV-8859	0.086	0.292	0.279	0.710	0.850	1.071	0.956	1.091
	0.083	0.217	0.505	0.754	0.981	1.258	1.131	1.454
WV-8860	0.234	0.386	0.385	0.751	0.867	0.947	1.358	1.057
	0.162	0.321	0.503	1.002	1.100	1.075	1.250	1.241

表 9 2 . オリゴヌクレオチドの活性。

10

20

30

40

50

【表 4 3】

	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.115	-0.513	-0.911	-1.308
WV-7807	0.102	0.331	0.588	0.790	1.037	0.989	1.271	1.147
	0.137	0.397	0.453	0.814	1.160	1.099	1.257	1.027
WV-8854	0.117	0.375	0.678	0.831	0.962	1.021	1.258	1.277
	0.112	0.363	0.559	0.793	1.134	1.237	1.226	1.186
WV-8855	0.174	0.553	0.745	0.873	0.890	0.968	0.954	1.088
	0.181	0.462	0.690	0.737	1.102	1.168	0.930	1.006
WV-	0.055	0.239	0.496	0.779	0.815	0.937	1.029	1.027

10

8856	0.069	0.288	0.654	0.884	1.172	1.146	0.937	1.222
WV-8857	0.237	0.445	0.967	0.928	0.976	0.790	0.992	1.119
	0.188	0.504	0.783	0.932	1.031	1.046	1.086	1.067

表 9 3 . オリゴヌクレオチドの活性。

20

【表 4 4】

	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.114	-0.512	-0.910	-1.308
WV-7806	0.15	0.24	0.29	0.71	0.92	1.03	1.02	1.10
	0.14	0.16	0.30	0.56	0.67	0.84	1.02	0.89
WV-8850	0.57	0.61	0.59	1.09	1.08	1.04	1.11	1.29
	0.44	0.52	0.60	0.65	0.81	0.76	0.96	0.93
WV-8851	0.18	0.41	0.43	0.95	0.93	1.00	1.08	1.05
	0.17	0.27	0.63	0.71	0.70	1.01	0.90	0.85
WV-8852	0.55	0.29	0.32	0.83	1.04	1.23	0.90	1.28
	0.14	0.18	0.26	0.49	0.77	0.83	1.09	0.92
WV-8853	0.21	0.38	0.41	0.76	1.24	0.92	1.08	0.93
	0.13	0.20	0.44	0.61	0.94	0.64	0.87	0.95

30

表 9 4 . オリゴヌクレオチドの活性。

40

50

【表 4 5】

	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.114	-0.512	-0.910	-1.308
WV-7805	0.29	0.33	0.44	0.72	0.95	0.96	0.93	0.99
	0.15	0.27	0.41	0.73	1.12	1.19	0.78	0.87
WV-8609	0.33	0.37	0.48	0.90	0.84	0.81	1.02	1.04
	0.13	0.29	0.56	0.76	0.89	1.15	1.07	0.91
WV-8847	0.24	0.37	0.58	0.78	0.89	1.20	0.91	0.97
	0.14	0.23	0.64	0.79	0.90	1.16	0.94	1.19
WV-8848	0.19	0.32	0.47	0.69	0.93	0.88	0.92	0.92
	0.19	0.16	0.46	0.74	0.88	0.79	1.03	1.09
WV-8849	0.24	0.39	0.55	0.79	1.17	0.97	1.16	0.95
	0.28	0.29	0.54	0.82	1.05	1.13	1.17	1.05

10

表 9 5 .

【表 4 6】

	1.477	1.079	0.681	0.283	-0.114	-0.512	-0.910	-1.308
WV-7804	0.29	0.37	0.51	0.81	0.85	1.16	0.87	0.89
	0.19	0.22	0.47	0.82	0.85	0.94	1.05	1.06
WV-8843	0.53	0.72	0.62	1.00	0.98	0.85	0.92	0.98
	0.45	0.51	0.61	0.93	0.93	1.01	0.90	1.01
WV-8844	0.25	0.44	0.58	0.78	0.71	0.86	0.86	1.00
	0.22	0.21	0.48	0.76	1.02	1.06	0.74	1.16
WV-8845	0.23	0.42	0.52	0.82	0.99	0.87	0.77	1.11
	0.17	0.25	0.44	0.76	0.90	0.97	0.99	0.88
WV-8846	0.20	0.38	0.55	0.60	0.90	0.76	0.88	0.98
	0.17	0.25	0.39	0.71	1.11	0.92	0.83	1.04

20

30

表 9 8 . オリゴヌクレオチドの活性。

1 0 n M。

40

50

【表 4 7】

	Hep3B		Huh7	
mock	100	100	100	100
WV-7794	47.6	44.5	25.0	20.6
WV-7795	58.5	52.8	14.3	14.8
WV-7796	54.6	56.4	16.3	15.5
WV-7797	75.1	74.2	13.5	12.8
WV-7798	78.4	79.8	11.9	13.7
WV-7799	89.9	92.4	23.5	25.7
WV-7800	93.6	92.2	34.1	29.9
WV-7801	90.3	90.3	38.4	29.3
WV-7802	101.1	101.3	25.1	29.6
WV-7803	102.0	103.2	24.8	25.8
WV-7804	95.9	97.2	27.8	32.7
WV-7805	100.5	95.5	21.9	22.0
WV-7806	110.6	105.4	22.0	21.2
WV-7807	96.2	101.5	21.1	23.8
WV-7808	95.5	101.0	21.5	18.8
WV-7809	85.3	84.2	17.1	15.7
WV-7810	92.0	95.9	25.2	21.6
WV-7811	100.1	100.0	26.6	27.1
WV-7812	79.5	82.1	22.3	21.1
WV-7813	83.7	76.2	23.7	18.2
WV-7814	87.8	82.8	44.3	39.2
WV-7815	78.1	74.8	45.3	37.1
WV-7816	59.5	52.4	24.5	20.5

表 9 9 . オリゴヌクレオチドの活性。

1 0 n M。

【表 4 8】

	Hep3B		Huh7	
mock	100	100	100	100
WV-7778	92.8	86.9	63.6	52.7
WV-7779	92.6	85.8	59.2	48.0
WV-7780	102.3	97.1	36.4	34.8
WV-7781	111.8	102.4	46.1	38.9
WV-7782	108.5	94.7	43.3	35.0
WV-7783	110.2	97.5	36.6	33.7
WV-7784	105.0	95.9	41.2	41.9
WV-7785	108.7	107.4	73.8	57.5
WV-3858	103.3	103.6	55.1	52.3

WV-3859	94.7	96.1	41.8	41.2
WV-3860	104.2	94.1	46.7	45.6
WV-3861	101.8	99.2	47.1	45.2
WV-3862	97.1	96.5	44.0	42.3
WV-3863	99.7	86.0	42.0	51.5
WV-3864	97.8	96.8	53.5	38.9
WV-7786	99.1	104.3	37.0	38.0
WV-7787	84.2	87.5	23.0	25.1
WV-7788	80.4	88.0	35.5	28.5
WV-7789	82.7	85.7	25.4	25.5
WV-7790	80.8	85.1	27.4	29.8
WV-7791	87.1	80.1	40.8	42.1
WV-7792	78.1	73.1	42.5	46.5
WV-7793	68.3	65.1	49.9	44.9

10

表 100. オリゴヌクレオチドの活性。

残存する mRNA %

(RhPNPLA3 / hSF RS9)

48 時間でのサル肝細胞。

【表 49】

20

	10nM		3nM		1nM	
Mock	100	100	100	100	100	100
WV-3421	28.7	35.4	44.6	31.8	61.3	53.8
WV-7794	64.1	74.4	104.3	96.2	115.5	121.3
WV-7795	80.8	88.4	130.2	115.9	109.0	130.0
WV-7796	51.3	53.4	83.8	95.5	106.9	103.3
WV-7797	51.4	48.5	97.3	81.4	115.1	126.7
WV-7798	65.2	56.8	84.8	86.8	106.8	104.0
WV-7799	96.5	102.5	104.7	117.6	108.9	129.6
WV-7800	66.1	78.8	113.3	111.3	114.9	128.1
WV-7801	113.1	117.7	116.0	112.7	113.3	118.5
WV-7802	101.6	110.7	105.8	120.3	113.3	123.9
WV-7803	52.5	59.6	73.6	79.4	106.5	129.4
WV-7804	95.5	91.3	111.3	137.4	116.5	122.1
WV-7805	84.7	97.8	111.7	111.1	114.3	118.7
WV-7806	91.2	87.2	129.7	121.3	124.8	121.8
WV-7807	64.5	89.2	108.5	119.7	108.6	123.7
WV-7808	39.4	48.1	94.7	105.8	105.1	125.5
WV-7809	46.5	36.8	77.0	64.9	85.1	101.2
WV-7810	46.7	46.5	62.1	78.5	75.8	94.7
WV-7811	70.4	78.7	88.2	84.0	101.1	96.6
WV-7812	47.2	53.3	74.5	80.7	97.7	77.8
WV-7813	43.0	38.3	76.5	71.2	97.0	89.7

30

40

50

WV-7814	49.8	51.2	102.8	96.1	105.9	131.8
WV-7815	56.0	52.5	88.3	83.8	83.4	94.9
WV-7816	29.3	19.7	51.5	57.5	84.4	68.4

表 1 0 1 . オリゴヌクレオチドの活性。

PNPLA3 mRNAレベル
(PNPLA3 / GAPDH)

【表 5 0】

10

	0.12 nM	0.4 nM	1.1. nM
WV-993	99.8	77.9	74.5
WV-3421	74.9	44.6	24.0
WV-7805	105.4	99.2	83.8
WV-9890	108.6	78.4	78.3
WV-12100	104.6	102.7	93.2
WV-9893	93.7	103.8	79.8
WV-12101	124.1	67.6	36.6

20

表 1 0 2 A . オリゴヌクレオチドの活性。

初代カニクイザル肝細胞。

【表 5 1】

Conc. (nM)	WV-9893		WV-3421		WV-12101	
1.079181	116.7	90.2	13.6	6.5	20.1	27.6
0.681241	135.5	98.9	13.9	5.4	20.1	
0.283301	86.5	126.1	32.9	23.7	11.0	37.7
-0.11464	105.3	108.9	70.7	46.7	40.7	
-0.51258	121.9	114.1	89.3	81.5	70.0	97.1
-0.91052	112.7	137.8	124.2	113.7	81.7	114.1
-1.30846	116.0	110.1	134.7	80.5	81.0	72.6
-1.7064	120.5	106.7	105.7	140.0	82.5	77.1
-2.10434	120.5	108.0	131.0	95.2	98.4	88.2
-2.50228	94.8	99.6	89.2	85.4	106.7	89.7

30

表 1 0 2 B . オリゴヌクレオチドの T_m。

40

様々なオリゴヌクレオチドの T_mを、完全に相補的であった、または 2 つのミスマッチ (変異体アレルを表す) を除いて完全に相補的であった RNA との二本鎖状態で測定した。使用した条件は、1 × PBS (pH 7. 2) 中で 1 μM の二本鎖、温度範囲: 1 5 °C ~ 9 0 °C、温度率: 0 . 5 °C / 分、測定間隔: 0 . 5 °C であった。

50

【表 5 2】

ASO	Length	Duplex Tm(°C) WV-12420 Full match	Duplex Tm(°C) WV-12421 Two mismatches	Δ difference Full match vs two mismatches
WV-7805	20-mer	63.52	47.62	15.9
WV-9891	20-mer	61.62	44.77	16.9

10

WV-9890	20-mer	61.57	46.67	14.9
WV-9893	20-mer	58.67	43.52	15.2
WV-12106	24-mer	71.52	59.72	11.8
WV-12107	24-mer	69.57	57.77	11.8
WV-12100	24-mer	70.77	59.57	11.2
WV-12101	24-mer	67.52	56.62	10.9

20

表 1 0 3 . オリゴヌクレオチドの活性。

H u h 7 細胞 .

【表 5 3】

Conc. (nM)	1	0.52288	0.04576	-0.4314	-0.9085	-1.3856	-1.8627
WV-7805	7.0	23.5	64.7	80.4	88.2	92.5	99.5
	5.1	24.7	78.9	74.1	86.7		
WV-9890	1.6	35.0		90.4	90.3	92.6	104.6
	13.1	29.2	73.7	88.5	87.1	95.8	105.5
WV-12100	12.4	33.8	63.6	90.6		102.3	101.5
	10.2	27.6	76.6	80.0	83.6	80.7	85.0
WV-9893	10.4	28.7	74.3	86.3	87.7	116.1	93.8
	4.3	36.4	80.4	91.5	110.3	108.6	106.5
WV-12101		4.6	19.8	60.3	85.8	92.0	108.3
		6.8	19.2	60.0	81.1	81.0	85.6

30

表 1 0 4 . オリゴヌクレオチドの活性。

n M

40

50

【表 5 4】

Conc. (nM)	50	20	8	3.2	1.28	0.51	0.20	0.081	0.032	0.013
WV-7850	39.0	65.8	93.0	91.3	111.1	106.1	84.6	97.3	88.8	92.0
Hep3B	43.1	72.5	82.9	86.6	94.4	87.3	87.7	89.1	89.1	92.5
WV-7851	38.2	81.0	93.6	90.5	98.6	94.6	100.1	90.2	96.1	100.6
Hep3B	54.3	84.1	96.1	94.4	93.0	94.1	99.5	87.1	101.9	92.8
WV-7852	34.9	69.7	89.5	97.3	90.0	96.8	111.5	92.1	96.1	98.9
Hep3B	44.6	74.9	101.3	91.8	111.3	95.8	99.8	100.6	95.8	109.5
WV-7853	28.3	66.4	85.2		96.3	109.2	95.1	95.9	95.6	99.1
Hep3B	29.8	50.5	81.3	96.1	97.1	105.3	94.0	104.8	95.8	97.4
WV-7854	16.7	63.0	82.3	92.8	90.6	88.3	89.7	95.2	99.4	88.0
Hep3B	18.8	59.9	80.7	89.4	84.0	86.6	88.9	89.4	94.3	96.5
WV-7850	2.7	5.3	11.7	25.1	57.3	75.2	71.2	84.7	80.7	96.8
Huh7	4.3	5.9	9.7	13.8	62.5	73.3	74.3	75.8	93.7	104.2
WV-	2.1	6.1	1.1	31.5	55.2	81.7	91.8	91.0	84.3	86.9

10

20

7851 Huh7	1.3	4.6	14.9	25.9	52.3	81.7	95.0	79.6	79.5	81.4
WV-7852	8.4	7.8	10.0	28.6	50.0	72.8	82.6	96.2	72.2	94.1
Huh7	7.4	5.8	10.6	25.4	56.1	87.6	85.1	83.7	70.1	88.5
WV-7853	2.9	5.4	6.4	27.1	47.8	70.1	96.0	82.7	89.4	86.3
Huh7	3.8	4.3	8.5	23.8	62.2	93.8	74.6	90.4	93.4	95.8
WV-7854	0.6	2.4	9.9	23.5	47.7	76.6	84.1	79.3	89.4	98.8
Huh7	5.4	7.5	10.3	22.2	45.9	66.5	72.7	82.7	83.7	96.6

30

表 1 0 5 . オリゴヌクレオチドの活性。

40

50

【表 5 5】

nM	50	20	8	3.2	1.28	0.51	0.204	0.081	0.032	0.013
WV-7827	37.0	79.1	97.3	94.2	97.0	105.3	107.2	100.9	98.8	96.8
Hep3B	34.3	85.1	89.9	89.1	95.4	93.1	97.4	101.7	95.8	93.4
WV-7828	37.0	85.9	93.5	97.6	94.2	97.3	92.0	94.4	92.8	92.9
Hep3B	32.8	77.2	91.8	90.6	88.8	96.7	91.7	89.0	92.8	90.3
WV-7829	25.1	82.2	99.7	92.6	93.6	95.8	103.8	94.0	91.5	86.3
Hep3B	33.5	79.8	98.8	92.4	94.1	104.0	102.3	105.6	103.1	104.3
WV-7830	36.8	79.3	97.9		100.2	107.3	104.6	95.0	97.7	96.7
Hep3B	54.2	87.6	97.8	104.6	113.1	109.9	100.8	110.1	93.5	98.6
WV-7831	53.4	97.4	103.9	104.8	99.8	102.6	111.8	102.0	93.5	101.5
Hep3B	62.5	92.9	103.7	99.5	102.9	99.8	98.9	93.6	101.8	100.8
WV-7827	3.8	6.3	13.5	34.1	57.9	80.6	71.9	74.4	77.6	77.5
Huh7	3.0	5.8	13.4	44.1	67.2	87.3	84.7	76.1	80.6	74.0
WV-7828	2.3	16.3	9.8	31.4	63.3	83.2	74.9	82.3	89.1	83.1
Huh7	1.5	9.1	25.0	31.5	69.3	75.8	76.5	87.0	90.0	79.8
WV-7829	5.6	16.4	31.1	54.2	78.3	94.1	87.1	97.4	108.4	100.6
Huh7	7.2	9.3	18.6	31.5	65.7	76.0	90.6	87.5	81.9	89.0
WV-7830	4.1	6.3	12.5	35.3	56.8	86.4	80.1	95.7	86.7	94.2
Huh7	5.5	5.9	17.0	40.2	76.3	77.5	79.8	98.6	93.2	85.8
WV-7831	3.5	5.6	15.2	35.0	73.6	83.9	85.0	82.3	85.9	81.8
Huh7	5.5	10.2	24.0	40.3	74.0	88.1	87.0	111.8	85.8	93.3

表 106 . オリゴヌクレオチドの活性。

【表 5 6】

nM	50	20	8	3.2	1.28	0.51	0.204	0.081	0.032	0.013
WV-7804	63.3	84.6	101.1	92.9	95.5	96.2	92.0	97.6	98.4	96.7
Hep3B	69.5	98.4	102.9	95.1	98.6	110.4	99.5	93.6	101.4	100.4

10

20

30

40

50

WV-7805	60.3	81.8	96.9	90.7	91.3	95.5	90.5	92.2	98.5	95.0
Hep3B	62.7	86.1	98.5	98.1	97.0	97.9	100.7	107.6	104.0	105.8
WV-7806	69.6	90.1	100.8	98.9	95.9	95.9	99.3	92.3	99.6	90.1
Hep3B	65.1	89.4	94.7	92.1	90.9	94.8	94.7	93.8	90.1	97.5
WV-7807	75.0	95.3	101.2		97.3	100.9	96.4	93.4	89.2	90.6
Hep3B	75.5	95.4	95.5	88.8	103.6	92.7	99.8	103.7	93.3	87.5
WV-7808	72.2	98.9	117.8	109.5	116.3	110.9	109.3	116.8	111.1	104.6
Hep3B										
WV-7804	4.4	3.5	25.1	45.3	68.9	74.6	73.6	82.9	81.8	86.7
Huh7	7.5	11.1	23.3	48.0	77.1	76.0	86.5	89.4	96.1	90.4
WV-7805	1.7	7.1	19.6	36.1	59.2	75.3	69.8	75.0	78.0	79.6
Huh7	8.4	11.9	11.6	38.4	76.2	78.4	81.1	86.9	95.8	95.0
WV-7806	9.8	2.8	13.8	28.8	68.7	66.6	69.7	78.6	89.4	88.6
Huh7	3.8	7.2	12.5	39.7	68.5	82.4	80.3	79.7	87.3	98.0
WV-7807	3.0	12.6	25.1	46.9	78.0	85.3	98.8	92.6	85.6	85.5
Huh7	3.9	9.1	14.9	41.5	70.4	73.7	68.5	75.3	81.9	94.7
WV-7808	1.8	1.9	14.2	37.1	63.6	71.0	79.2	88.0	84.1	95.3
Huh7	1.4	5.2	9.1	33.2	65.2	77.4	92.3	71.2	83.5	78.1

10

20

表 107. オリゴヌクレオチドの活性。

【表 57】

nM	WV-7805 Hep3B	WV-7805 Huh7
20	81.8	86.1
8	96.9	98.5
3.2	90.7	98.1
1.28	91.3	97.0
0.512	95.5	97.9
0.2048	90.5	100.7
0.08192	92.2	107.6
0.032768	98.5	104.0
0.013107	95.0	105.8

30

40

表 108. オリゴヌクレオチドの活性。

PNPLA3オリゴヌクレオチドの一部の試験において、APOC3オリゴヌクレオチドWV-1868（APOC3を標的とし、PNPLA2と異なる遺伝子）を陰性対照として使用する。

50

【表 5 8】

nM	2		8.25		33	
Control	1.002	1.082	1.192	1.105	1.031	1.038
WV-1868	1.105	1.016	1.120	0.995	1.023	1.023

WV-3451	0.962	0.975	0.484	0.617	0.218	0.256
WV-3452	1.060	0.948	0.526	0.505	0.189	0.172
WV-3453	0.388	0.487	0.181	0.197	0.217	0.156
WV-3454	0.509	0.502	0.260	0.186	0.138	0.064
WV-3455	0.613	0.617	0.342	0.347	0.197	0.155
WV-3456	0.724	0.843	0.468	0.545	0.218	0.223
WV-3457	0.714	0.776	0.367	0.362	0.132	0.096
WV-3458	0.672	0.618	0.251	0.309	0.256	0.180
WV-3459	1.184	1.105	1.097	1.067	0.820	0.975
WV-3460	0.849	0.689	0.436	0.367	0.461	0.382
WV-3461	0.989	1.243	0.471	0.600	0.261	0.198
WV-3462	0.833	1.040	0.417	0.446	0.286	0.120

10

	2		8.25		33	
Control	1.002	1.082	1.192	1.105	1.031	1.038
WV-1868	1.105	1.016	1.120	0.995	1.023	1.023
WV-3437	1.045	1.067	0.564	0.501	0.256	0.181
WV-3438	0.861	0.989	0.935	0.760	1.009	0.982
WV-3439	1.009	1.016	0.770	0.734	0.576	0.530
WV-3440		1.038	1.060	0.982	0.729	0.613
WV-3441	1.082	1.234	0.680	0.903	0.313	0.433
WV-3442	1.120	0.935	0.477	0.643	0.223	0.347
WV-3443	0.477	0.410	0.278	0.204	0.229	0.171
WV-3444	0.714	0.592	0.350	0.396	0.234	0.209
WV-3445	1.304	1.060	0.776	0.760	0.439	0.388
WV-3446	0.849	0.729	0.455	0.430	0.247	0.235
WV-3447	0.786	0.929	0.568	0.604	0.201	0.292
WV-3448	0.776	0.837	0.458	0.568	0.218	0.226
WV-3449	0.776	0.704	0.404	0.449	0.252	0.130
WV-3450	1.084	0.851	1.077	0.839	0.924	0.905

20

30

	2		8.25		33	
Control	1.002	1.082	1.192	1.105	1.031	1.038
WV-1868	1.105	1.016	1.120	0.995	1.023	1.023
WV-3423	0.634	0.600	0.407	0.419	0.315	0.280
WV-3424	0.634	0.754	0.350	0.445	0.124	0.286
WV-3425	1.002	1.023	0.729	0.643	0.347	0.345
WV-3426	1.023	0.797	0.487	0.427	0.364	0.367
WV-3427	0.849	0.897	0.709	0.781	0.621	0.572
WV-3428	1.052	1.089	0.831	0.922	0.942	1.002
WV-3429	1.060	0.982	0.588	0.604	0.401	0.340
WV-3430	1.074	1.184	0.935	0.942	0.505	0.449

40

50

WV-3431	0.600	0.675	0.391	0.364	0.208	0.237
WV-3432	0.975	0.955	0.630	0.639	0.276	0.326
WV-3433	0.596	0.685	0.240	0.270	0.215	0.146
WV-3434	0.885	0.714	0.261	0.342	0.206	0.193
WV-3435	0.584	0.584	0.350	0.311	0.288	0.261
WV-3436	1.074	0.797	0.760	0.661	0.515	0.477

	2		8.25		33	
Control	0.910	1.000	0.996	1.136	1.105	1.136
WV-1868	1.278	1.075	0.936	1.176	0.809	0.879
WV-3409	0.690	0.498	0.329	0.274	0.488	0.405
WV-3410	0.832	0.936	0.217	0.231	0.241	0.134
WV-3411	0.685	0.588	0.114	0.116	0.037	0.108
WV-3412		0.873	0.383	0.286	0.089	0.070
WV-3413	0.855	0.838	0.336	0.263	0.030	0.071
WV-3414	1.105	1.024	0.798	0.709	0.290	0.333
WV-3415	1.024		0.298	0.185	0.484	0.393
WV-3416	0.541	0.568	0.273	0.260	0.246	0.241
WV-3417	0.734	0.622	0.331	0.137	0.298	0.300
WV-3418	0.530	0.568	0.185	0.114	0.258	0.298
WV-3419	0.962	0.639	0.680	0.588	0.377	0.362
WV-3420		1.113	0.956	0.771	0.375	0.159
WV-3421	0.502	0.443	0.169	0.148	0.218	0.228
WV-3422	0.923	1.083	0.680	0.516	0.365	0.372

	2		8.25		33	
Control	0.910	1.000	0.996	1.136	1.105	1.136
WV-1868	1.278	1.075	0.936	1.176	0.809	0.879
WV-3395	0.419	0.247	0.336	0.198	0.338	0.331
WV-3396	1.024	0.982	0.452	0.553	0.249	0.195
WV-3397	0.685	0.976	0.365		0.182	0.096
WV-3398	1.053		0.159	0.273	0.061	0.052
WV-3399	0.357	0.440	0.284	0.141	0.221	0.282
WV-3400	0.867	0.861	0.553	0.458	0.184	0.160
WV-3401	1.252	0.904	0.481	0.383	0.133	0.093
WV-3402	0.437	0.302	0.122	0.096	0.070	0.046
WV-3403	1.176	1.218	1.003	1.144	0.879	0.929
WV-3404	0.195	0.367	0.155	0.135	0.269	0.215
WV-3405	1.024	0.695	0.377	0.258	0.194	0.208
WV-3406	1.287	1.075	1.314	1.201	1.314	0.969
WV-3407	0.949	0.917	0.609	0.498	0.326	0.125
WV-3408	0.239	0.360	0.107	0.187	0.265	0.161

10

20

30

40

50

	2		8.25		33	
Control	0.910	1.000	0.996	1.136	1.105	1.136
WV-1868	1.278	1.075	0.936	1.176	0.809	0.879
WV-3381	0.560	0.391	0.103	0.108	0.146	0.199
WV-3382	0.949	1.024	0.393	0.271	0.132	0.211
WV-3383	1.031	0.996	0.617	0.458	0.455	0.133
WV-3384	1.252	1.060	0.402	0.416	0.136	0.133
WV-3385	0.962	1.098	0.407	0.410	0.221	0.123
WV-3386	0.680	0.440	0.186	0.246	0.265	0.176
WV-3387	0.269	0.191	0.100	0.067	0.081	0.141
WV-3388	1.168	0.982	0.849	1.053	1.168	0.892
WV-3389	1.083	1.031	1.399	0.879	0.771	0.804
WV-3390	0.676	0.580	0.226	0.265	0.035	0.051
WV-3391	0.505	0.396	0.187	0.153	0.107	0.176
WV-3392	0.462	0.362	0.139	0.116	0.093	0.070
WV-3393	0.273	0.391	0.102	0.111	0.060	0.044
WV-3394	0.509	0.405	0.263	0.133	0.109	0.097

10

20

表 109A. オリゴヌクレオチドの活性。
【表 59】

Conc (nM)	20	8	3.2	1.28	0.512	0.205	0.0819	0.0328	0.0131	0.0052
WV-8148 Hep3B	111.7	111.5	102.6	105.8	102.9	103.1	92	96.5	99.6	118.7
	97.3	114.3	107.8	106.6	105.8	106.6	90.9	100.8	95.3	105.5
WV-8149 Hep3B	128.4	118	104.2	99.8	104.8	103.2	97.1	102.1	104.6	96.5
	135.8	131.3	108.8	108.5	94.5	106.1	107.8	99.3	103.3	102.4
WV-8150 Hep3B	120.7	123.7	115	99.8	98.6	100.9	88.5	92.3	103.1	102
	113	111.8	98.4	102.1	102.3	100	103	100.8	104	107.9
WV-8151 Hep3B	112.3	147	108.4	103.4	104.6	104.6	111.1	100.1	102.4	100
	119.6	124.3	106.6	101.6	110.1	104.1	113.7	100.3	100.3	104.7
WV-8152 Hep3B	119.1	139.2	113	107	112.7	121	112.4	111.7	88.5	114.7
	133.7	149	118.1	103.2	101.7	101.8	102.5	94.6	98.3	104.2
WV-8148 Huh7	26.6	41.6	64.4	90.6	91.8	86.5	98.2	90.5	99.6	94.1
	35.5	54	65.7	87.4	85.8	87.5	86.8	100.9	99.3	90.2
WV-8149 Huh7	23.2	33.1	64.6	83.6	87.2	94.4	82.9	94.8	79.1	92.5
	27.5	44.3	65.5	89.5	84.5	87.9	82.9	92	94.6	85.1
WV-8150 Huh7	26.3	26.6	55	80.4	86.7	91.5	86.9	90.1	88.4	84.7
	20	29.6	52.7	92.1	83.4	91.9	97	84	86.9	93.5
WV-8151 Huh7	13.4	28.7	59.7	82	90.6	92.4	90.2	84.4	78.1	85.7
	23.6	32.8	63.6	77.7	101.1	92.6	91.6	100.9	83.4	90.2
WV-8152 Huh7	13.2	36.7	58.3	90.9	94.4	95.7	76.1	84.3	90.3	85.2
	18.1	47.5	61	84.7	93.9	86.2	96	92.6	84	90.1

30

40

50

nM	20	8	3.2	1.28	0.512	0.205	0.0819	0.0328	0.0131	0.0052
WV-8194 Hep3B	102.9	103.8	85.5	90.8	90.8	102.3	96.8	101.1	95.8	95.5
	93.3	95.7	87.8	90	78.5	77.4	86.4	78.1	81	88.2
WV-8195 Hep3B	107.9	103.7	96.6	91.5	91.7	92.1	94.1	105.6	107.4	95.7
	123	101.5	92.9	89.4	92	86	88.3	101.9	104.3	99.3
WV-8196 Hep3B	86.5	108.1	106	90.1	96.1	87.3	93.3	87.9	100.1	103.5
	112.8	126.8	98.2	86.9	83.2	82.4	88.8	95.5	92.8	101.9
WV-8197 Hep3B	140.8	123.5	108.9	87	91.5	92.8	106.1	98.1	107.7	94.5
	143.8	132.1	98.1	85.6	85.3	80.7	84.6	88	95.2	93.5
WV-8198 Hep3B	99.5	101	89.4	85.4	88.6	94.9	88.4	95.8	95	97.2
	119.8	90.9	85.3	95.8	93.3	80.1	82.9	82.4	86.9	88
WV-8194 Huh7	8.1	13.3	32.2	69.5	91.6	100.4	89.2	91.8	90.4	81.5
	7.4	31.2	38	76	86.9	93.6	92.5	92	87.5	104.3
WV-8195 Huh7	7.3	27	41.1	64.1	83.2	96.5	95.1	84.7	89.8	87.3
	14	20	37.1	57.8	95	94.3	85.4	90.7	97.6	85.8
WV-8196 Huh7	8.9	19.5	26.7	64.4	78.5	88.3	83.2	88.1	81.1	81.1
	14.3	19.9	37.1	57.3	91.7	91.8	88.5	84.5	84	91.9
WV-8197 Huh7	4.1	27.3	40.8	65.6	88.8	91.7	95.6	96	90.6	93.3
	14.8	26.8	44	62.4	83.9	96.5	89.1	97.9	92.9	81.8
WV-8198 Huh7	7.9	19.9	36.5	68.6	94.6	90.6	90	94	90.9	89.9
	6.9	26.7	47.9	63.8	83.1	99.5	97.2	97.1	88.1	97.8

10

20

Conc (nM)	20	8	3.2	1.28	0.512	0.205	0.0819	0.0328	0.0131	0.0052
WV-8171 Hep3B	102.4	98.1	108.8	104.7	111.4	107.4	102.2	112	95.9	92.4
	94.9	94.6	89.8	102.6	97.2	101.8	96.4	98.9	97.7	90.6
WV-8172 Hep3B	105	105.3	116.3	108.9	120	105.5	101.4	100.9	94.3	99.9
	92.8	90.5	92.7	90.1	96.8	90.6	97.9	92.5	96.7	84.7
WV-8173 Hep3B	96.9	90.2	99.1	108.6	107.1	103.6	105.9	100.6	95.6	100.2
	104.3	96.4	99	98.2	99.9	103.3	95.7	96.4	97.7	95.1
WV-8174 Hep3B	98	85.2	93.3	96.1	83.8	84.7	83	86.3	93.7	105.9
	115.5	112.5	95.7	98.7	86.6	97.4	93.6	82.7	90.4	99.2
WV-8175 Hep3B	98.2	91	90.6	88	95.9	94.2	86.7	96	106.2	91.3
	102.6	91.1	89.4	87.1	93.7	98.8	102.7	83.9	95.7	88.1
WV-8171 Huh7	22.1	39.4	56.7	76.8	76	87.5	75.8	95.2	83.1	77.8
	19.2	58.8	66.5	77.9	89.6	88.9	93.8	91	90.8	97.2
WV-8172 Huh7	13.9	30	54.5	80.4	88.1	87.6	79.8	85.4	82	98.4
	20.6	43.1	54.6	78.4	89.4	92.4	93.6	99.8	109.4	105.5
WV-8173 Huh7	37.2	44.1	78.6	106.3	113.7	106.6	105.3	103.7	97.6	93.3
	41	75.8	85.6	100.6	111.3	103.2	114.4	117.5	107.3	107.7
WV-8174 Huh7	30.2	47.6	66.3	69.3	92.1	85.6	85.6	76.1	87.3	89.8
	19	40.9	52.4	77.2	92.2	96.6	88.8	92	92.1	91.8
WV-8175	11.5	26.5	45.9	69.1	86.1	85.6	82.6	92.9	97	83.7

30

40

Huh7	12.5	26.7	45.2	77.6	86.4	94.5	102.9	91.7	92	85.9
nM	20	8	3.2	1.28	0.512	0.205	0.0819	0.0328	0.0131	0.0052
WV-8217	88.4	85.5	87.5	86.9	89.2	90	98.6	98.5	97.1	86.5
Hep3B	93.3	83.5	76.7	80.1	78	77.9	77.6	74.8	79.8	86.6
WV-8218	100.6	94.9	92	93.1	99.6	96	98.2	95.5	92.9	87.4
Hep3B	99.3	96.4	99.2	96.3	95.5	100.8	100.5	93.6	96.7	96.3
WV-8219	147.3	128.9	107.6	106.1	104.8	106.8	98.6	101.5	96.5	110.7
Hep3B	126.8	103.2	94.8	93.5	94.2	96	100.6	103.3	96.7	102.9
WV-8220	104.2	115.4	103.9	97	106.9	102.2	99.4	105.1	99.1	95.3
Hep3B	100	89.8	96.8	95.5	107.4	106.4	104.3	95.9	117	101
WV-8221Hep3B	110.2	104.7	97.7	102.6	104.1	106.4	102.6	100.3	102	98.4
	94.5	98.5	101.6	99.7	99.4	108.4	103	107.1	100.3	103.3
WV-8217	26.8	37.9	58.2	81.9	94	101.3	112	105.2	97.8	28.2
Huh7	27.7	41	57.6	90.7	109.2	102.4	110.5	109.9	105.5	105.2
WV-8218	21.6	45.8	56.1	77.7	86.9	97.3	82.6	88.5	86.1	73.9
Huh7	20.9	28.8	55.3	78.1	106.9	107.3	107.6	95.6	104.1	82.8
WV-8219	31.5	31	42.7	62.7	92	91.7	85.7	75.7	77.2	85.7
Huh7	26	31.8	47.9	75	85.5	92.1	83.6	89.7	93.1	91.3
WV-8220	4.8	16.3	31.8	66.1	78.6	77.8	79.7	71.7	81.1	80.3
Huh7	11.8	30.1	54.4	77.4	105.6	98.6	90.5	85.7	93.9	85.5
WV-8221	6.2	21.4	31.8	48.6	78.3	85.8	75.5	83.8	85.3	93
Huh7	4.6	19.1	35.2	59.6	104.8	105.8	99.2	100.1	93.2	88.7

10

20

表 109B. オリゴヌクレオチドの活性。

Huh7細胞中でのIC50（変異体アレル）：

30

【表60】

Oligonucleotide	IC50 (nM)	Oligonucleotide	IC50 (nM)
WV-8148	7.3	WV-8197	3.2
WV-8149	9.2	WV-8198	3.5
WV-8150	5.5	WV-8217	5.4
WV-8151	7.9	WV-8218	5.9
WV-8152	12.6	WV-8219	3.1
WV-8171	11.2	WV-8220	5.5
WV-8172	5.2	WV-8221	2.6
WV-8173	12	WV-8194	3.5
WV-8174	6.6	WV-8195	3
WV-8175	4.2	WV-8196	2.8

40

表 110. オリゴヌクレオチドの活性。

Huh7細胞：

50

【表 6 1】

	50	20	8	3.2	1.28	0.512	0.204	0.081	0.032	0.013
WV-3861	23.1	43.8	72.8	101.4	102.4	103.3	85.5	91.9	93.7	92.0
	30.1	52.2	89.3	103.4	95.9	93.4	99.4	104.5	89.7	104.8
WV-7805	8.0	13.3	32.7	65.4	87.0	83.1	91.2	84.1	76.1	85.3
	10.1	22.7	49.1	82.1	87.8	81.8	82.5	77.8	87.9	79.1

WV-7828	5.3	15.3	26.8	60.5	88.1	85.0	92.1	85.8	84.2	90.3
	4.3	10.0	41.1	54.4	79.6	90.2	89.0	90.2	99.3	83.6
WV-7851	4.1	4.4	20.0	42.9	63.8	85.3	77.7	79.3	84.6	93.4
	6.7	6.6	20.3	47.5	86.7	79.7	97.4	97.4	85.0	89.4
WV-8149	18.4	29.4	35.5	71.2	88.8	91.2	75.3	84.9	86.5	90.6
	46.2	21.9	47.2	80.7	86.5	93.9	83.9	90.5	101.4	95.3
WV-8172	20.5	13.7	30.4	53.8	73.3	85.2	74.8	80.7	87.0	84.4
	20.3	21.9	41.3	59.0	78.7	83.5	91.1	92.5	91.8	104.3
WV-8195	23.2	11.4	15.4	64.8	71.9	74.1	82.8	87.0	88.5	76.4
	22.7	14.6	23.5	62.1	80.2	85.0	99.0	99.6	104.0	100.4
WV-8218	6.6	13.1	13.4	53.7	73.0	93.6	94.6	93.8	88.0	92.3
	20.2	14.0	30.6	57.7	97.4	117.6	99.8	101.2	114.2	109.0
	50	20	8	3.2	1.28	0.512	0.204	0.081	0.032	0.013
WV-3864	3.7	22.4	60.6	94.6	92.3	99.2	88.2	97.2	92.0	104.1
	18.9	27.5	68.5	114.8	95.1	113.1	100.1	117.6	110.2	118.9
WV-7808	6.6	12.6	34.8	66.1	73.0	88.8	93.9	90.6	91.2	94.2
	6.4	14.2	32.3	80.2	106.0	106.7	107.6	89.2	103.4	97.6
WV-7831	4.8	7.9	27.1	62.1	80.6	82.5	91.4	92.8	93.6	93.7
	8.0	13.1	29.4	62.2	90.7	122.5	105.5	120.7	115.5	97.9
WV-7854	2.0	7.1	21.5	49.2	74.1	83.3	116.8	75.8	83.4	95.0
	5.0	5.3	17.0	50.4	100.7	99.7	103.2	99.8	101.7	90.1
WV-8152		14.4	33.7	80.7	82.8	80.8	84.3	86.5	89.7	88.2
		23.4	40.1	77.3	106.3	96.3	97.7	99.9	97.1	79.5
WV-8175	17.6	13.5	18.2	48.5	69.7	87.0	72.8	91.4	86.5	81.6
	22.4	16.5	19.2	51.1	108.5	89.7	87.4	102.0	91.2	95.4
WV-8198	16.6	8.3	15.1	43.7	78.0	81.9	82.7	75.3	91.5	88.2
	7.1	5.1	23.9	46.3	93.6	103.2	103.6	93.8	125.9	96.0
WV-8221	16.0	9.6	12.4	31.8	73.1	101.6	96.7	77.9	86.7	94.3
	13.0	10.9	16.2	44.1	85.5	102.0	110.9	123.8	101.9	102.9

表 1 1 1 . オリゴヌクレオチドの活性。

脱塩基部位、特に（ホスファニル）オキシ）プロパンー１ーオール（PS）または３'－（ホスファニル）オキシ）テトラヒドロフランを有する、いくつかのPNPLA3 ssRNAi 剤も調製して試験した。2 nMでのオリゴヌクレオチド投与の結果を示し、オリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチドを、0、0 nM、0.05 nM、0.128 nM、0.32 nM、及び0.8 nMでも試験した（データは示さず）。数値は概算であり、残存PNPLA3 mRNAレベル（PNPLA3／HPRT1）を表し、100は、100%残存mRNAレベル（0%ノックダウン）を表すことになり、0は、0%残存mRNAレベル（100%ノックダウン）を表すことになる。本明細書における様々な表において、別段の注記がない限り、mRNAのレベルを測定する。

【表62】

Oligonucleotide	2 nM	Oligonucleotide	2 nM

WV-4098	30	WV-9277	44
WV-9273	72	WV-9278	55
WV-9274	73	WV-9279	39
WV-9275	74	WV-9280	82
WV-9276	52	WV-9281	68

表112．オリゴヌクレオチドの活性。

C3修飾を有する、いくつかのAPOC3 siRNA剤も調製して試験した。2 nMでのオリゴヌクレオチド投与の結果を示し、オリゴヌクレオチドを、0、0 nM、0.05 nM、0.128 nM、0.32 nM、及び0.8 nMでも試験した（データは示さず）。数値は概算であり、残存PNPLA3 mRNAレベル（PNPLA3／HPRT1）を表し、100は、100%残存mRNAレベル（0%ノックダウン）を表すことになり、0は、0%残存mRNAレベル（100%ノックダウン）を表すことになる。本明細書における様々な表において、別段の注記がない限り、mRNAのレベルを測定する。

【表63】

Oligonucleotide	2 nM	Oligonucleotide	2 nM
WV-4098	31	WV-4098	31
WV-9261	62	WV-9272	81
WV-9262	69	WV-9284	75
WV-9263	72		
WV-9264	62		
WV-9265	56		
WV-9266	64		
WV-9267	43		
WV-9268	69		
WV-9269	71		

表113．オリゴヌクレオチドの活性。

25 nMでのデータを示し、オリゴヌクレオチドを、0 nM、1.6 nM、及び6.2 nMでも試験した（データは示さず）。オリゴヌクレオチドを、初代カニクイザル肝細胞中においてインビトロで試験した。

【表 6 4】

Oligonucleotide	25 nM
WV-3421	13
WV-9434	63
WV-9439	55
WV-9444	37
WV-3421	12
WV-9435	62
WV-9440	37
WV-9445	34
WV-3421	17
WV-9431	92
WV-9436	70
WV-9441	73
WV-9432	53
WV-9437	36
WV-9442	54
WV-9433	77

10

WV-9438	44
WV-9443	69

20

表 1 1 4 . オリゴヌクレオチドの活性。

初代カニクイザル肝細胞。4 nMでのデータを示す。オリゴヌクレオチドを、0 nM、0.1 nM、0.25 nM、0.66 nM、1.6 nM、及び10 nMでも試験した（データは示さず）。数値は、残存PNPLA3 mRNAレベル（PNPLA3 / HPRT 1）を表し、数値は概算である。

【表 6 5】

	Hep3b (wt)	Huh7 (mutant)
WV-9890	88	37
WV-12100	103	27
WV-9893	67	10
WV-12101	69	8

30

WV-9893及びWV-12101は、非対称型を有する。

非対称型を有するが、立体不規則的である追加のオリゴヌクレオチドを試験して、これはP9 / P12（9位及び12位）に二重変異を有する。WV-8609、WV-8847、WV-8848、WV-8849は全て、およそ4～5 nMのIC50を有した。

40

表 1 1 5 A . オリゴヌクレオチドの活性。

いくつかのPNPLA3オリゴヌクレオチドは、その一部が非対称構造を有し、それらをラット肝臓ホモネート中において安定性について2日目に試験した。数値は、残存する全長オリゴヌクレオチドの%を表し、数値は概算である。

50

【表 6 6】

WV-7805	58
WV-8603	46
WV-8608	73
WV-9889	69
WV-9890	76
WV-8609	26
WV-8601	61
WV-8605	65
WV-8606	105
WV-9891	43
WV-9892	52
WV-9893	115

10

表 1 1 5 B . オリゴヌクレオチドの活性。

いくつかのオリゴヌクレオチドも調製し、これらは異なる遺伝子、第 X I 因子（F X I または F 1 1）のマウスホモログを標的とし、G a l N A c または P F E リガンドのいずれかのトリ、バイまたはモノアンテナ型リガンドであった追加成分を含んでいた。これらを、0 . 3、1 または 3 m p K Q D × 3 でマウスに投与した。以下の数値は、対照と比較した 3 m p k での m F X I / m H P R T 1 m R N A レベルを表す。マウスにはまた、0 . 3 m p k 及び 1 m p k でオリゴヌクレオチドを投与した（データは示さず）。

20

【表 6 7】

Oligonucleotide	Ligand	mFX1/mHPRT1
WV-3969	Tri-GalNAc	23
WV-5287	Tri-PFE ligand	22
WV-7299	Bi-GalNAc	22
WV-7300	Bi-PFE ligand	20
WV-7297	Mono-GalNAc	74
WV-7298	Mono-PFE ligand	43

30

表 1 1 5 C . オリゴヌクレオチド。

40

50

【表 6 8】

Oligo-nucleotide	Sequence	Naked Sequence	Stereo-chemistry
WV-7297	Mod038L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX
WV-7298	Mod039L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX
WV-7299	Mod040L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX
WV-7300	Mod041L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX
WV-5287	Mod034L001Teo * Geo * Geo * Teo * Aeo * A * T * m5C * m5C * A * m5C * T * T * T * m5C * Aeo * Geo * Aeo * Geo * Geo	TGGTAA TCCACTT TCAGAGG	XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX

10

本表の様々な成分（例えば、*、Mod038など）は、表1Aのものと同一である。これらのオリゴヌクレオチドの全ては一本鎖であるが、配列は書式設定のために複数行に分割している。

20

PFEリガンドまたはGalNAcのいずれかのトリ、ビスまたはモノアンテナ型リガンドを含む、様々なオリゴヌクレオチドを構築した。

一部の試験では、モノ、ビスまたはトリアンテナ型GalNAc（Ref. GalNAcもしくは参照GalNAcとも称する）またはPFEリガンド（PFE ASPGRリガンド、PFE GalNAc、架橋二環式ケタールもしくは二環式リガンドとも記載する）と複合化したオリゴヌクレオチドを含む化合物を構築した。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PNPLA3オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、異なる遺伝子APOC3を標的とする。

30

そのようなAPOC3オリゴヌクレオチドは、以下を含む：

表115D. オリゴヌクレオチド。

【表 6 9】

Oligo-nucleotide	Ligand	Alternative designation of ligand and linker	Example describing example	Example describing example

40

50

		(L001 is a linker)	synthesis of ligand	synthesis of oligonucleotide with ligand
WV-8877	None	-	-	-
WV-7107	None	-	-	37A
WV-6558	Ref. GalNAc Tri-antennary	Mod001L001	38 (protected version)	37A, 37B
WV-9542	PFE ligand Tri-antennary	Mod083L001	31, 40	37C
WV-9543	Ref. GalNAc Bis-antennary	Mod079L001	35 (protected version)	37D
WV-9544	PFE ligand Bis-antennary	Mod080L001	32, 33	37E
WV-9545	Ref. GalNAc Mono-antennary	Mod081L001	36 (protected version)	37F
WV-9546	PFE ligand Mono-antennary	Mod082L001	34	37G

10

Ref. GalNAc トリアンテナ型はトリ GalNAc と称され、PFE リガンド トリアンテナ型はトリ PFE リガンドとも称され、Ref. GalNAc ビスアンテナ型はビス GalNAc と称され、PFE リガンドビスアンテナ型はビス PFE リガンドとも称され、Ref. GalNAc モノアンテナ型はモノ GalNAc と称され、PFE リガンドモノアンテナ型はモノ PFE リガンドとも称される。Mod001、Mod079、Mod080、Mod081、Mod082、Mod083 及び L001 の構造を表 1A の説明に、及び本明細書の他の本文中に提供する。リガンドを、実施例 27 にも記載する。Mod083 を、実施例 4A 及び 4B にも記載する。

20

実施例 29、35、及び 36 の GalNAc 構造は、それらが -OAc (-O-アセテート基)を含む場合、保護型を表す。列挙したオリゴヌクレオチドを構築する際に、Ac 基を、化合物とオリゴヌクレオチドとの複合化後の脱保護中に除去する。脱保護を、例えば、濃縮水酸化アンモニウムを用いて、例えば、実施例 37B に記載した通りに実施する。これらの構造の脱保護型において、-OAc は -OH によって置き換えられる。WV-8877 (陰性対照) は、異なる遺伝子を標的とし、遺伝子は APOC3 または PNPLA3 ではない。

30

GalNAc または PFE リガンドと、異なる結合価 (モノ、ビスまたはトリアンテナ型) で複合化した APOC3 オリゴヌクレオチドの WV-7107 及び陰性対照を別々に、ヒト APOC3 導入遺伝子を持つ Tg (トランスジェニック) マウス (B6.Cg-Tg (APOC3) 2Bres/J) に 1 日目に投与し、APOC3 ノックダウンを血清 h APOC3 タンパク質の減少によってモニターした。

【表 70】

40

WAVE ID	Sequence	Naked Sequence	Stereochemistry
WV-	Mod001L001Aco * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST *	AGCTTCTTGTC	OSOOORSSRS

50

WAVE ID	Sequence	Naked Sequence	Stereochemistry
6558	SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	CAGCTTTAT	SRSSROOOS
WV-9542	Mod083L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSRS SRSSROOOS
WV-9543	Mod079L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSRS SRSSROOOS
WV-9544	Mod080L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSRS SRSSROOOS
WV-9545	Mod081L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSRS SRSSROOOS
WV-9546	Mod082L001Aeo * SGeom5CeoTeoTeo * RC * ST * ST * SG * RT * SC * SC * RA * SG * SC * RTeoTeoTeoAeo * STeo	AGCTTCTTGTC CAGCTTTAT	OSOOORSSRS SRSSROOOS

10

本表の様々な成分（例えば、*、Mod083など）は、表1Aのものと同一である。これらのオリゴヌクレオチドの全ては一本鎖であるが、配列は書式設定のために複数行に分割している。

様々なリガンド（限定するものではないが、Ref. GalNAc トリアンテナ型、PFE リガンド トリアンテナ型、Ref. GalNAc ビスアンテナ型、PFE リガンド ビスアンテナ型、Ref. GalNAc モノアンテナ型、PFE リガンド モノアンテナ型を含む）を含むPNPLA3オリゴヌクレオチドは、対応するAPOC3オリゴヌクレオチドについて記載されている方法と同様の方法を介して構築した。

表115E. オリゴヌクレオチドの活性

全てのオリゴヌクレオチドを、動物に3mg/kg単回用量（皮下）で1日目に投与した。加えて、WV-6558及びWV-9542も、動物に1mg/kg単回用量（皮下）で1日目に投与した。血清を、0日目、8日目、15日目、22日目、29日目、36日目、43日目、及び50日目に収集した。各群は5匹の動物を含有していた。PBS及びWV-8877（APOC3ではない遺伝子を標的とする）は、陰性対照であった。

数値はAPOC3タンパク質の相対レベルを示し、1.00はPBSと比較して100%を表す。

この試験を含む、様々なインビボ試験において、試験した動物は、ヒトAPOC3遺伝子を発現するトランスジェニックマウスであった。

【表71】

Day	0	8	15	22	29	36	43	50
PBS	1.52	0.95	1.50	0.56	0.96	1.07	1.57	1.74
	0.59	0.73	0.74	0.87	0.90	0.90	0.73	0.71
	1.21	0.99	1.10	1.34	0.89	0.82	0.62	0.78

40

50

	0.67	1.14	0.89	0.99	0.89	0.86	0.95	0.86
	1.01	1.20	0.76	1.24	1.35	1.36	1.13	0.91
WV-8877	1.56	1.24	1.67	1.59	2.37	1.56	1.47	2.27
	0.78	0.73	0.85	0.80	1.15	0.61	0.75	1.19
	1.08	0.81	1.42		1.84	1.21	1.73	3.05
	0.71	1.21	0.74	0.62	1.02	1.07	0.95	1.48
	1.28	1.21	0.60	0.80	1.13	1.50	0.86	
WV-6558	2.74	0.06	0.05	0.06	0.11	0.38	0.69	1.43
	1.15	0.17	0.05	0.04	0.09	0.27	0.01	0.81
	0.38	0.04	0.05	0.10	0.18	0.45	0.53	1.07
	0.44							
	0.41	0.04	0.04	0.08	0.09	0.11	0.13	0.22
WV-9542	1.10	0.23	0.05	0.07	0.13	0.23	0.32	0.78
	0.71	0.03	0.02	0.04	0.06	0.09	0.20	0.28
	0.59	0.05	0.04	0.08	0.16	0.72	0.90	0.80
	0.32	0.03	0.02	0.04	0.09	0.37	0.54	0.55
	0.40	0.03	0.03	0.06	0.21	0.39	0.49	0.58
WV-9543	0.48	0.03	0.05	0.09	0.08	0.21	0.27	0.49
	1.19	0.06	0.06	0.09	0.06	0.09	0.57	0.96
	0.79	0.05	0.04	0.17	0.06	0.15	0.42	0.80
	0.79	0.09	0.03	0.28	0.20	0.17	0.28	0.59
	0.48	0.04	0.02	0.08	0.06	0.12	0.17	0.32
WV-9544	0.91		0.04	0.06	0.06	0.19	0.26	0.67
	0.94	0.10	0.03	0.08	0.09	0.15	0.34	0.76
	1.72	0.19	0.04	0.07	0.09	0.25	0.60	0.83
	1.92	0.28	0.07	0.10	0.11	0.13	0.26	0.56
	0.81	0.04	0.05	0.11	0.12	0.20	0.32	0.73
WV-9545	0.49	0.03	0.07	0.16	0.21	0.32	0.66	0.60
	1.14	0.22	0.04	0.10	0.15	0.58	0.76	0.97
	0.58	0.03	0.04	0.15	0.27	0.67	1.16	0.97
	0.64	0.03	0.04	0.19	0.42	0.98	1.38	0.96
	0.60	0.05	0.03	0.08				
WV-9546	3.33	0.20	0.06	0.27	0.24	0.49	1.13	1.31
	1.03	0.11	0.04	0.09	0.14	0.46	0.55	0.68
	1.20	0.28	0.12	0.20	0.31	0.95	1.75	1.39
	0.71	0.15	0.04	0.19	0.39	0.26	0.75	0.36
	0.18	0.04	0.02	0.20	0.28	0.21	0.56	0.56

表 1 1 5 F . パート I . 肝臓中におけるオリゴヌクレオチドの蓄積

肝臓中におけるオリゴヌクレオチドの蓄積も、単回 3 m g / k g 用量の 3 0 分後に分析した。数値は、μ g オリゴヌクレオチド / g 組織を示す。試験した動物は、ヒト A P O C 3 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスであった。

10

20

30

40

50

【表 7 2】

PBS	WV-6558	WV-9542	WV-9543	WV-9544	WV-9545	WV-9546
0	2.95	1.73	3.52	3.82	2.02	4.27
0	2.46	1.69	2.49	4.19	1.99	1.37
0	2.48	0.45	1.14	2.74	1.30	1.29
0	1.85	1.09	2.12	2.26	1.14	1.25
0	1.79	1.43	4.26	1.88	1.07	0.82

10

同じ実験において：肝臓中におけるオリゴヌクレオチドの蓄積を、単回 1 mg / kg 用量の 30 分後に WV-6558 及び WV-9542 についても分析した。数値は、μg オリゴヌクレオチド / g 組織を示す。

【表 7 3】

PBS	WV-6558 1mpk	WV-9542 1mpk
0	1.92	0.46
0	1.77	1.08
0	1.43	0.56
0	0.68	0.30
0	0.18	0.67

20

表 1 1 5 F . パート I I . 肝臓中におけるオリゴヌクレオチドの蓄積

肝臓中におけるオリゴヌクレオチドの蓄積を、単回 3 mg / kg 用量の 8 日後にも分析した。数値は、μg オリゴヌクレオチド / g 組織を示す。試験した動物は、ヒト A P O C 3 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスであった。

【表 7 4】

PBS	WV-6558	WV-9542	WV-9543	WV-9544	WV-9545	WV-9546
0	3.30	2.93	6.83	4.56	3.55	3.83
0	3.49	2.20	6.56	4.45	2.23	4.05
0	3.18	1.34	4.58	2.72	1.94	2.28
0	2.41	1.61	3.87	2.31	3.03	2.12
0	1.43	2.90	4.10	2.36	1.85	3.50

30

同じ実験において：肝臓中におけるオリゴヌクレオチドの蓄積を、単回 1 mg / kg (1 mpk) 用量の 8 日後にも WV-6558 及び WV-9542 について分析した。数値は、μg オリゴヌクレオチド / g 組織を示す。

40

50

【表 7 5】

PBS	WV-6558 1mpk	WV-9542 1mpk
0	0.72	1.08
0	0.74	1.20
0	0.60	0.75
0	0.55	0.57
0	0.63	0.63

10

データは、APOC3オリゴヌクレオチドと複合化した様々なリガンドの有効性を示し、これらの同じリガンドを、PNPLA3オリゴヌクレオチド上にも複合化し得る。

表 1 1 6 . オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3 RNAi 剤を、ラット肝臓ホモジネート中で安定性について試験した。数値は、5 日目の残存する全長オリゴヌクレオチドのパーセントを表し、オリゴヌクレオチドを2 日目でも試験して（データは示さず）、数値は概算である。一部のオリゴヌクレオチドは5 ' - DNA-T を含み、一部のオリゴヌクレオチドは5 ' - R c - M e - T を含む。

20

【表 7 6】

WV-8095	62
WV-9495	61
WV-9499	86
WV-8701	49
WV-9496	71
WV-9500	99

表 1 1 7 . オリゴヌクレオチドの活性。

30

トリアンテナ型GalNAc 複合体である追加成分を有する、様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドも有効性について試験した（限定するものではないが、WV-7805、WV-8132、WV-8566、WV-8599、WV-9859、及びWV-9670を含む）。オリゴヌクレオチドを、インビトロでHuh7-148OE細胞（PNPLA3の変異体アレルを含む）上において10nMで試験した。数値は、PNPLA3 mRNAレベル（PNPLA3/HPRT1）を表し、数値は概算である。多くの場合、オリゴヌクレオチドは、カニクイザル（非ヒト霊長類またはNHP）肝細胞中における野生型PNPLA3の有意なノックダウンを示さなかった。例えば、WV-8132、WV-8600、WV-9868及びWV-9860は、最高10nMで試験した場合に、カニクイザル（非ヒト霊長類またはNHP）肝細胞中における野生型PNPLA3の有意なノックダウンを示さなかった（データは示さず）。

40

表 1 1 8 . オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の細胞中においてインビトロで試験した。本表において、100.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

50

【表 7 7】

Negative control	100	Negative control	100
WV-993	117	WV-993	117
WV-7805	20	WV-8600	47
WV-8132	54	WV-8564	47
WV-8566	67	WV-8596	62
WV-8599	82	WV-8597	38
WV-9859	56		
WV-9670	57		

Negative control	100	Negative control	100
WV-993	117	WV-993	117
WV-9868	48	WV-9860	65
WV-9869	50	WV-9861	58
WV-9870	53	WV-9862	62

表 1 1 9 . オリゴヌクレオチドの活性。

様々な PNPLA3 オリゴヌクレオチドを、RNase H アッセイにおいてインビトロで試験した。

PNPLA3 オリゴヌクレオチドを、野生型アレル (WV-8808) または 148 アレル (WV-8807) であった標的 RNA の存在下でインキュベートした。数値は、残存する標的 RNA (WV-8808 または WV-8807) のパーセンテージを表す。本表において、100.00 は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の 100% PNPLA3 mRNA レベルを表すことになり、0.00 は、0% PNPLA3 mRNA を表すことになる。

【表 7 8】

Time (mins)	0	5	10	15	20	30	45	60
WV-7805+WV-8807	100.0	94.1	93.4	88.6	90.6	82.8	74.5	73.4
WV-8603+WV-8807	100.0	93.1	89.7	84.4	91.0	82.4	73.0	66.4
WV-8608+WV-8807	100.0	95.4	92.2	89.8	87.4	81.4	79.7	72.1
WV-9889+WV-8807	100.0	90.9	87.7	81.9	85.7	74.4	72.9	66.4
WV-9890+WV-8807	100.0	92.7	89.6	85.4	88.7	77.0	75.8	66.8
WV-7805+WV-8808	100.0	99.5	97.7	98.1	96.9	96.2	95.6	93.4
WV-8603+WV-8808	100.0	102.2	99.4	100.3	99.1	98.5	99.2	95.6
WV-8608+WV-8808	100.0	98.8	97.5	96.9	95.9	96.9	95.5	94.1
WV-9889+WV-8808	100.0	99.9	99.2	99.5	98.6	97.8	97.2	96.3
WV-9890+WV-8808	100.0	107.5	100.7	100.8	99.1	104.2	98.3	97.5
Time (mins)	0	5	10	15	20	30	45	60
WV-8601+WV-8807	100.0	93.1	90.9	90.4	91.4	88.2	85.6	80.1
WV-8605+WV-8807	100.0	98.3	96.0	96.4	96.0	96.0	87.1	86.7
WV-8606+WV-8807	100.0	90.1	91.6	90.7	90.9	86.6	82.4	79.1
WV-8609+WV-8807	100.0	92.1	89.0	83.8	85.5	75.6	75.7	69.0
WV-8601+WV-8808	100.0	99.0	100.2	100.2	97.8	97.6	97.2	94.1
WV-8605+WV-8808	100.0	100.7	99.7	100.9	98.4	99.1	98.5	94.6
WV-8606+WV-8808	100.0	101.2	97.6	98.1	96.3	97.0	96.5	93.9
WV-8609+WV-8808	100.0	96.7	93.7	98.6	96.8	95.6	96.2	94.5
Time (mins)	0	5	10	15	20	30	45	60
WV-9891+WV-8807	100.0	91.6	88.3	86.1	87.9	79.8	75.6	75.2

WV-9892+WV-8807	100.0	93.2	86.9	83.5	84.3	74.2	64.2	58.6
WV-9893+WV-8807	100.0	94.6	88.6	86.6	88.6	77.4	69.0	65.6
WV-9891+WV-8808	100.0	98.3	98.6	96.9	95.0	94.2	92.8	89.8
WV-9892+WV-8808	100.0	100.7	101.8	100.7	99.3	97.9	97.4	95.7
WV-9893+WV-8808	100.0	100.1	100.3	100.2	99.3	96.3	96.1	93.5
Time (mins)	0	5	10	15	20	30	45	60
WV-9894+WV-8807	100.0	96.2	90.1	85.1	84.7	79.5	76.8	74.9
WV-9895+WV-8807	100.0	97.0	92.5	87.1	84.3	77.0	71.8	70.7
WV-9896+WV-8807	100.0	98.2	93.2	86.0	81.8	74.8	69.2	70.0
WV-9894+WV-8808	100.0	98.8	97.1	97.4	96.1	94.0	95.4	91.4
WV-9895+WV-8808	100.0	99.9	97.1	98.5	99.3	96.1	96.4	93.6
WV-9896+WV-8808	100.0	99.2	99.0	98.3	96.4	95.6	93.8	90.6

PNPLA3 オリゴヌクレオチド WV-980、WV-9893、WV-8606 及び WV-7805 はまた、PNLA3 148 変異を有する Hu h 7 細胞中で PNPLA3 148 変異体 mRNA レベルを有意に減少させた (HPRT1 と比較して、12.5 nM で約 25~55% 残存変異体 PNPLA3 まで) が、これらのオリゴヌクレオチドは、野生型 PNPLA3 を有する Hu h 7 細胞中では野生型 PNPLA3 レベルを有意に減少させなかった (12.5 nM で約 90% またはそれを超える残存野生型 PNPLA3 レベル)。

表 120. オリゴヌクレオチドの活性。

様々な PNPLA3 オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理から 48 時間後の Hep 3 B 細胞中においてインビトロで試験した。本表において、1.00 は、

オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

【表79】

Conc. (nM) (exp10)								
	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816
WV- 3380	0.059	0.193	0.568	0.809	0.809	0.917	1.032	0.983
	0.092	0.365	0.720	0.862		1.004	1.121	
WV- 3986	0.379	0.444	0.673	0.790	0.870	0.870	0.993	0.933
	0.486	0.551	0.752	0.901	1.007	0.939	0.876	1.140
WV- 3987	0.400	0.521	0.742	0.870	0.959	0.889	0.986	0.952
	0.451	0.594	0.914	0.966	1.086	0.972	1.021	1.072
WV- 3988	0.496	0.521	0.742	1.021	0.946	1.079	0.907	0.959
	0.328	0.615	0.920	1.057	1.064	0.979	0.901	1.133

10

Conc. (nM) (exp10)								
	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816
WV- 3393	0.115	0.165	0.438	0.795	0.882	1.028	1.086	0.986
	0.080	0.218	0.555	0.835	0.952	1.064	0.933	1.057
WV-	0.316	0.279	0.547	0.790	0.852	0.993	0.966	1.000

20

3989	0.295	0.412	0.651	0.889	1.049	1.140	0.986	1.173
WV- 3990	0.259	0.444	0.624	0.979	1.109	1.021	1.007	0.993
	0.274	0.559	0.779	0.959	1.079	1.042	1.049	1.164

30

表121. オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理から48時間後のHep3B細胞中においてインビトロで試験した。本表において、1.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

【表80】

Conc. (nM) (exp10)								
	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816
WV- 3402	0.146	0.207	0.457	0.907	0.933	0.959	0.939	0.952
	0.104	0.319	0.697	0.914	0.926	1.028	1.094	1.102
WV- 3991	0.216	0.423	0.582	0.858	0.907	0.966	0.870	0.966
	0.303	0.500	0.722	1.049	0.895	0.979	1.042	1.035
WV- 3992	0.303	0.384	0.594	0.823	0.818	0.907	0.847	0.852
	0.321	0.423	0.673	0.914	0.933	0.907	0.959	1.057

40

表122. オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理から48時間後のHep3B細胞中においてインビトロで試験した。本表において、1.00は、

50

オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

【表81】

Conc. (nM) (exp 10)								
	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816
WV- 3387	0.091	0.205	0.527	0.811	1.070	0.881	0.977	0.971
	0.081	0.135	0.391	0.851	1.033	0.964	0.944	1.070
WV- 3993	0.998	0.912	1.026	1.062	1.308	1.019	1.019	0.957
	0.869	0.912	1.123	1.077	1.084	1.048	1.055	1.100
WV- 3994	0.944	0.991	1.195	1.040	1.107	1.012	1.123	0.971
	0.857	0.991	1.146	1.077	1.092	1.138	1.033	1.154

10

表123. オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理から48時間後のHep3B細胞中においてインビトロで試験した。本表において、1.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

20

【表82】

Conc. (nM) (exp10)								
	1.398	0.796	0.194	-0.408	-1.010	-1.612	-2.214	-2.816

WV- 3391	0.176	0.264	0.502	0.912	0.944	1.170	1.077	0.887
	0.141	0.230	0.531	0.788	1.040	1.146	1.005	1.005
WV- 3995	0.925	1.026	0.977	1.131	1.162	0.984	1.123	0.811
	0.751	0.957		1.123		1.162	1.062	0.971
WV- 3996	0.893	0.899	0.833	0.991	1.203	1.146	1.138	0.964
	0.875	0.899	0.851	1.187		1.123	1.040	1.131

30

表124. オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の細胞中においてインビトロで試験した。本表において、100.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

40

【表 8 3】

	0.312 nM		1.25 nM		5 nM	
Control	76.5	84.9	111.7	106.6	113.9	99.1
WV-3380	86.7	79.0	58.4	60.3	27.2	28.6
wv-4054	60.3	49.1	67.6	53.4	65.5	45.5
wv-4098	62.0	43.3	57.7	50.9	38.5	52.8
WV-6585	58.8	56.9	71.3	90.8	89.4	79.0
WV-6586	82.1	53.7	82.5	79.5	89.0	66.2
WV-6587	49.9	45.3	103.1	56.0	74.7	77.9
WV-6588	58.6	60.9	82.1	84.9	86.5	85.3
WV-6589	61.8	51.3	92.2	94.4	77.8	83.5
WV-6590	63.7	64.3	62.9	83.9	85.5	60.8
WV-6591	83.3	71.4	74.7	75.2	76.3	94.2
WV-6592	49.7	39.8	51.4	40.4	54.3	39.4
WV-6593	68.1	77.7	58.3	89.3	64.6	70.7
WV-6594	82.1	53.7	58.7	59.1	61.6	62.2
WV-4054	58.7	35.6	55.3	49.8	66.0	60.3
WV-6595	40.9	52.4	58.0	54.5	60.5	56.2
WV-6596	48.6	40.2	57.2	49.4	46.9	49.2
WV-6597	27.7	31.4	41.8	52.7	61.3	45.0
WV-6598	40.1	35.4	59.1	53.6	44.5	42.3
WV-6599	37.3	54.3	73.0	61.8	76.6	69.6
WV-6600	64.7	67.5	88.7	105.6	95.3	115.7
WV-6601	74.2	48.0	64.4	51.4	97.0	81.9
WV-6602	64.7	51.6	64.0	63.3	95.8	64.1
WV-6603	57.8	40.4	85.7	73.9	67.1	71.1
WV-6604	50.7	50.5	57.8	47.0	72.0	47.1
WV-6605	52.1	52.5	58.2	57.8	58.9	57.8
WV-6606	27.1	56.6	52.4	51.1	77.7	53.9
WV-6607	35.7	41.6	44.0	37.0	76.2	53.7

表 1 2 5 . オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の細胞中においてインビトロで試験した。本表において、100.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

10

20

30

40

50

【表 8 4】

	0.312 nM		1.25 nM		5 nM	
Control	76.5	84.9	111.7	106.6	113.9	99.1
WV-3380	86.7	79.0	58.4	60.3	27.2	28.6
wv-4054	60.3	49.1	67.6	53.4	65.5	45.5
wv-4098	62.0	43.3	57.7	50.9	38.5	52.8
WV-6608	74.0	71.3	64.3	80.2	90.8	81.4
WV-6609	88.6	51.9	71.6	57.7	66.3	61.2
WV-6610	51.1	59.5	65.1	51.7	61.2	60.6
WV-6611	40.9	47.5	61.7	57.3	63.2	75.1
WV-6612	50.9	59.8	50.6	53.3	75.4	54.3
WV-6613	39.0	49.1	49.5	35.6	53.8	43.5
WV-6614	51.6	65.2	43.6	59.6	47.8	67.1
WV-6615	45.7	70.0	40.0	41.6	44.1	53.2
WV-5305	61.4	82.3	73.1	100.3	83.3	101.0
WV-6616	63.6	49.3	67.0	74.3	62.0	70.1
WV-6617	67.5	45.2	44.0	54.6	54.9	59.2
WV-6618	53.4	44.2	45.4	46.4	66.5	32.9
WV-6619	56.7	28.9	64.4	50.3	49.7	42.9
WV-6620	61.8	55.6	57.8	90.1	37.8	52.5
WV-6621	63.3	51.1	55.0	73.3	31.4	54.7
WV-6622	67.5	34.7	55.2	48.0	27.4	61.7
WV-6623	57.1	56.5	73.3	88.7	78.4	95.9

表 1 2 6 . オリゴヌクレオチドの活性。

様々な P N P L A 3 オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の細胞中においてインビトロで試験した。本表において、1 0 0 . 0 0 は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の 1 0 0 % P N P L A 3 m R N A レベルを表すことになり、0 . 0 0 は、0 % P N P L A 3 m R N A を表すことになる。

【表 8 5】

	0.312 nM		1.25 nM		5 nM	
Control	76.5	84.9	111.7	106.6	113.9	99.1
WV-3380	86.7	79.0	58.4	60.3	27.2	28.6
wv-4054	60.3	49.1	67.6	53.4	65.5	45.5
wv-4098	62.0	43.3	57.7	50.9	38.5	52.8
WV-6624	59.2	71.5	52.2	78.3	64.7	59.0

10

20

30

40

50

WV-6625	53.7	50.7	49.4	41.9	53.1	51.1
WV-6626	62.3	58.2	65.0	70.4	39.7	53.9
WV-6627	57.5	51.1	66.9	59.1	49.2	52.9
WV-6628	44.8	48.6	61.5	59.8	50.4	63.3
WV-6629	61.4	54.4	59.5	86.7	52.5	58.3
WV-6630	40.8	54.1	44.5	46.3	56.3	54.3
WV-6631	61.0	61.4	47.6	111.2	75.1	70.1
WV-6632	67.5	96.3	93.1	79.0	84.8	86.5
WV-6633	61.1	56.4	51.8	37.1	40.6	46.0
WV-6634	66.7	65.7	52.8	51.9	39.1	39.0
WV-6635	90.3	63.6	72.6	68.6	66.7	70.6
WV-6636	68.0	40.3	57.7	55.9	45.1	50.6
WV-6637	68.0	46.2	46.9	60.4	40.2	69.4
WV-6638	46.2	38.0	64.8	41.3	40.3	32.9

10

表 1 2 7 . オリゴヌクレオチドの活性。

様々な P N P L A 3 オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の細胞中においてインビトロで試験した。本表において、1 0 0 . 0 0 は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の 1 0 0 % P N P L A 3 m R N A レベルを表すことになり、0 . 0 0 は、0 % P N P L A 3 m R N A を表すことになる。

20

【表 8 6】

	0.312 nM		1.25 nM		5 nM	
Control	76.5	84.9	111.7	106.6	113.9	99.1
WV-3380	86.7	79.0	58.4	60.3	27.2	28.6
wv-4054	60.3	49.1	67.6	53.4	65.5	45.5
wv-4098	62.0	43.3	57.7	50.9	38.5	52.8
WV-6639	94.8	81.0	113.1	90.2	68.5	69.4
WV-6640	91.3	78.0	60.4	87.5	87.7	61.7
WV-6641	76.4	113.6	83.1	87.6	59.6	65.0
WV-6642	95.0	104.3	90.6	98.5	74.8	73.5
WV-6643	126.6	90.1	96.8	77.1	60.0	75.3
WV-6644	125.8	94.5	89.9	85.1	81.4	63.5
WV-6645	93.1	74.3	97.7	66.4	68.9	40.8
WV-6646	83.5	80.4	85.1	60.9	56.7	33.7
WV-6647	92.9	77.8	91.8	79.8	125.9	62.3
WV-6648	104.4	88.7	92.0	111.5	67.3	73.3
WV-6649	106.9	85.8	79.7	85.5	78.4	74.5
WV-6650	94.6	79.2	87.4	91.5	66.5	97.9
WV-6651	116.4	74.8	92.2	96.8	58.0	57.3
WV-6652	114.1	70.2	110.9	94.0	88.6	66.4
WV-6653	116.1	89.1	90.0	100.0	77.3	72.9
WV-6654	84.9	99.0	101.1	128.1	67.4	70.9

30

40

50

WV-6655	102.0	99.5	116.9	83.8	114.7	85.6
WV-6656	115.3	119.9	114.7	85.2	101.0	108.4
WV-6657	88.6	94.1	114.1	109.7	94.6	100.4
WV-6658	114.4	92.2	131.2	134.7	133.3	90.6
WV-6659	116.9	104.2	122.1	96.6	99.8	122.3
WV-6660	104.7	79.5	124.1	100.2	79.7	88.5

表 1 2 9 . オリゴヌクレオチドの活性。

10

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の細胞中においてインビトロで試験した。本表において、100.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

【表 8 7】

	0	0.1nM	0.4 nM	3.0 nM	12.5 nM
WV-4098	96.1	76.8	61.7	58.2	53.6
	105.7	73.2	58.3	47.9	57.9
WV-7776	107.4	92.5	117.0	85.0	74.7
	85.4	93.1	102.7	73.4	62.5
WV-7777	107.4	107.4	88.2	63.2	71.7
	90.9	90.9	73.4	73.1	59.8

20

表 1 3 0 . オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、Hu h 7細胞中においてインビトロで試験した。PNPLA3 mRNAの残存レベルを示し、PNPLA3はHPRT1に対する相対値である。本表において、100.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

30

【表 8 8】

	WV-4098	WV-7465	WV-8076
0	103.4	112.5	101.0
	86.2	95.5	109.7
0.02 nM	82.5	62.8	67.2
	91.2	61.6	79.1
0.1 nM	54.4	39.5	46.5
	56.3	48.4	72.2
0.4 nM	49.6	31.2	46.6
	48.1	42.7	43.9
3.125 nM	21.9	39.2	82.0
	33.7	37.1	79.7

40

表 1 3 1 . オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、Hu h 7細胞中においてインビトロで試験した。PNPLA3 mRNAの残存レベルを示し、PNPLA3はHPRT1に対する

50

相対値である。本表において、100.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

【表89】

	WV-4098	WV-8080	WV-8081
0	103.4	83.3	79.2
	86.2	109.8	89.9
0.02 nM	82.5	58.1	97.2
	91.2	89.1	92.4
0.1 nM	54.4	71.2	91.7
	56.3	72.1	95.5
0.4 nM	49.6	79.8	94.4
	48.1	97.9	108.2
3.125 nM	21.9	59.3	115.6
	33.7	62.0	122.4

10

表132. オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、Huh7細胞中においてインビトロで試験した。PNPLA3 mRNAの残存レベルを示し、PNPLA3はHPR1に対する相対値である。本表において、100.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

20

【表90】

	WV-4098	WV-8077	WV-8078	WV-8079
0	103.4	108.4	94.0	80.9
	86.2	107.6	98.3	87.7
0.02 nM	82.5	102.1	96.4	71.1
	91.2		99.8	69.3
0.1 nM	54.4	87.6	93.9	75.6
	56.3	87.9	118.3	97.5
0.4 nM	49.6	83.4	91.0	88.6
	48.1	97.1	116.6	120.6
3.125 nM	21.9	79.8	73.7	105.4
	33.7	74.8	87.7	

30

表133. オリゴヌクレオチドの活性。

様々なPNPLA3オリゴヌクレオチドを、Huh7細胞中で試験した。PNPLA3 mRNAの残存レベルを示し、PNPLA3はHPR1に対する相対値である。本表において、100.00は、オリゴヌクレオチドを用いた処理後の100%PNPLA3 mRNAレベルを表すことになり、0.00は、0%PNPLA3 mRNAを表すことになる。

40

【表91】

	WV-4098	WV-7465
0	103.4	112.5

50

	86.2	95.5
0.02 nM	82.5	62.8
	91.2	61.6
0.1 nM	54.4	39.5
	56.3	48.4
0.4 nM	49.6	31.2
	48.1	42.7
3.125 nM	21.9	39.2
	33.7	37.1

10

WV-8061、WV-8291、WV-8698、及びWV-8700を含む、いくつかのPNPLA3オリゴヌクレオチドをまた、サイトカイン放出についてインビトロで試験した。4つのPNPLA3 ssRNAi剤のうち、ドナー試料のいずれにおいてもサイトカイン放出（IL-1 β 、IL-6、MCP-1、IL-12p40、IL-12p70、IL-1 α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF α ）を誘導したものは一切なかった。対照的に、陽性対照は、低濃度（0.78 μ g/ml）でさえもサイトカイン活性化を誘導した。

【1485】

20

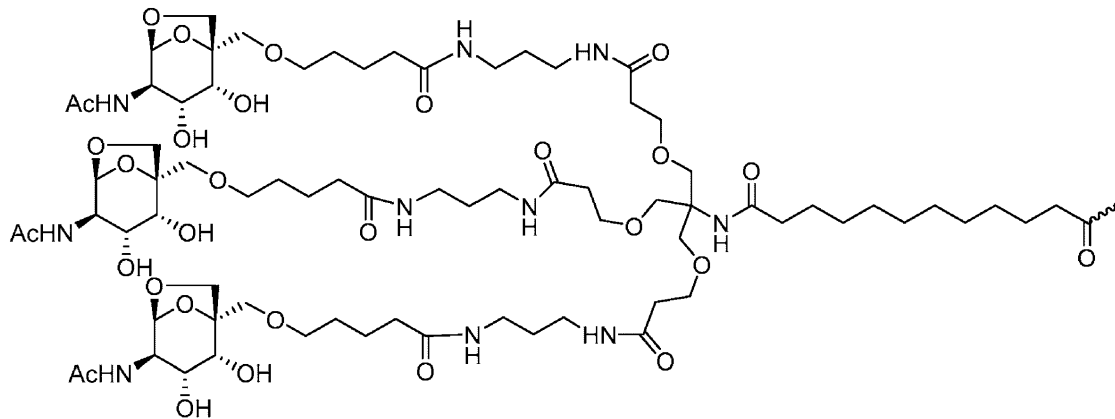
実施例27．オリゴヌクレオチドの追加成分の例。

様々な追加成分を含む、様々なオリゴヌクレオチドを設計して構築した。本明細書に記載した様々な追加のPNPLA3オリゴヌクレオチドを、これらの追加成分と複合化することもできる。

これらの追加成分としては、本明細書に列挙したものが挙げられる：

トリアンテナ型リガンドは、トリPFE ASPGRリガンドまたはトリPFEリガンドまたはトリPFEとしても知られる：

【化259】



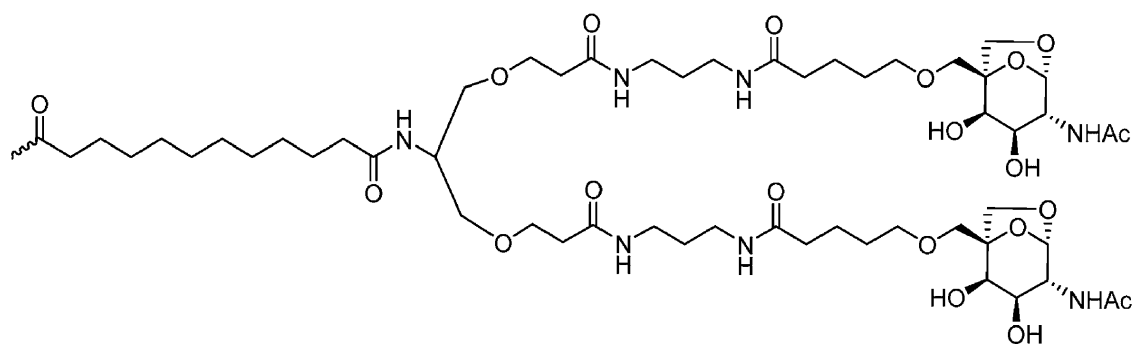
30

40

ビスアンテナ型（またはバイアンテナ型）リガンドは、ビス（もしくはバイ）アンテナ型PFEリガンドまたはビス（もしくはバイ）アンテナ型PFE ASPGRリガンドまたはビスPFEとしても知られる：

50

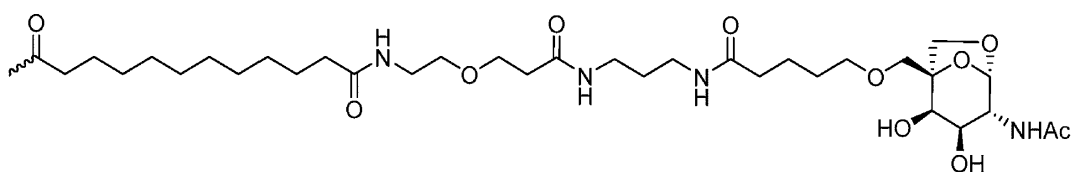
【化 2 6 0】



10

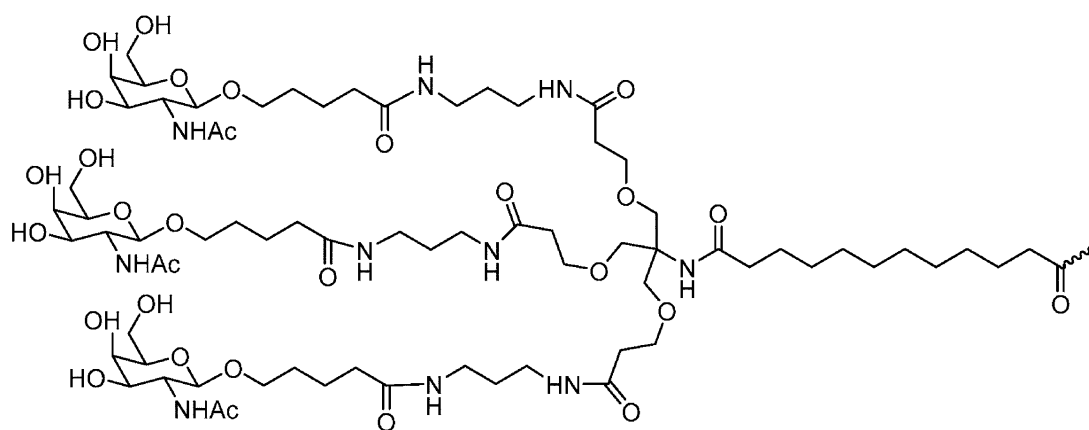
モノアンテナ型リガンドは、モノアンテナ型 P F E リガンドまたはモノアンテナ型 P F E A S P G R リガンドまたはモノ P F E としても知られる：

【化 2 6 1】



20

トリアンテナ型 G a l N A c またはトリ G a l N A c ：
【化 2 6 2】



30

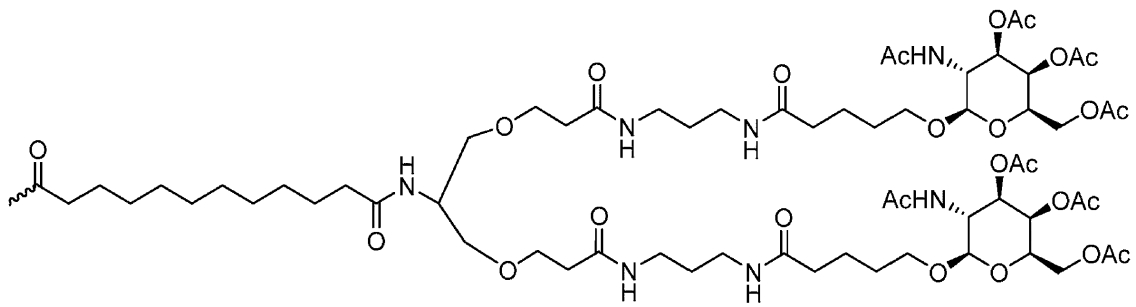
以下の保護型：

ビスアンテナ型（バイアンテナ型）G a l N A c またはビス G a l N A c ：

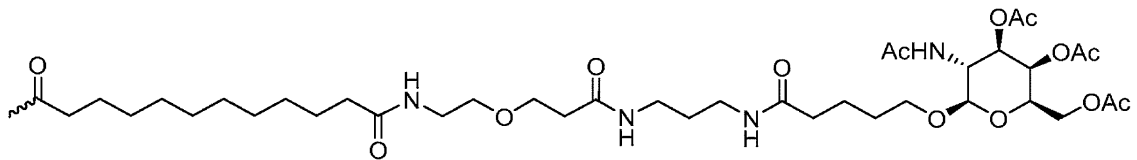
40

50

【化 2 6 3】



10

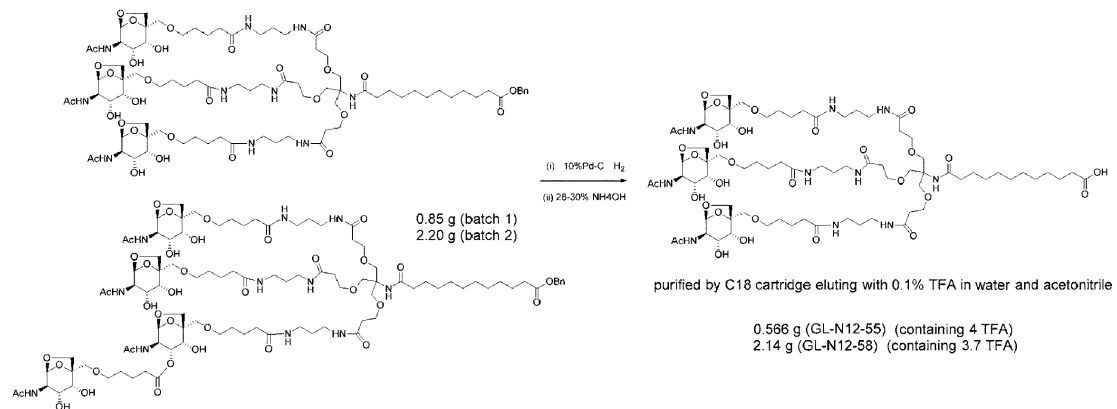
モノアンテナ型 GalNAc またはモノ GalNAc :
【化 2 6 4】

20

これらの構造は、それらが $-OAc$ ($-O$ -アセテート基) を含む場合、保護型を表す。一部の実施形態では、 Ac 基を、化合物とオリゴヌクレオチドとの複合化後の脱保護中に除去する。一部の実施形態では、脱保護を、濃縮水酸化アンモニウムを用いて、例えば、実施例 37B に記載した通りに実施する。これらの構造の脱保護型において、 $-OAc$ は $-OH$ によって置き換えられる。

様々な追加成分を生成するためのプロセスに関する、非限定的な例のいくつかを以下に記載する：

【化 2 6 5】

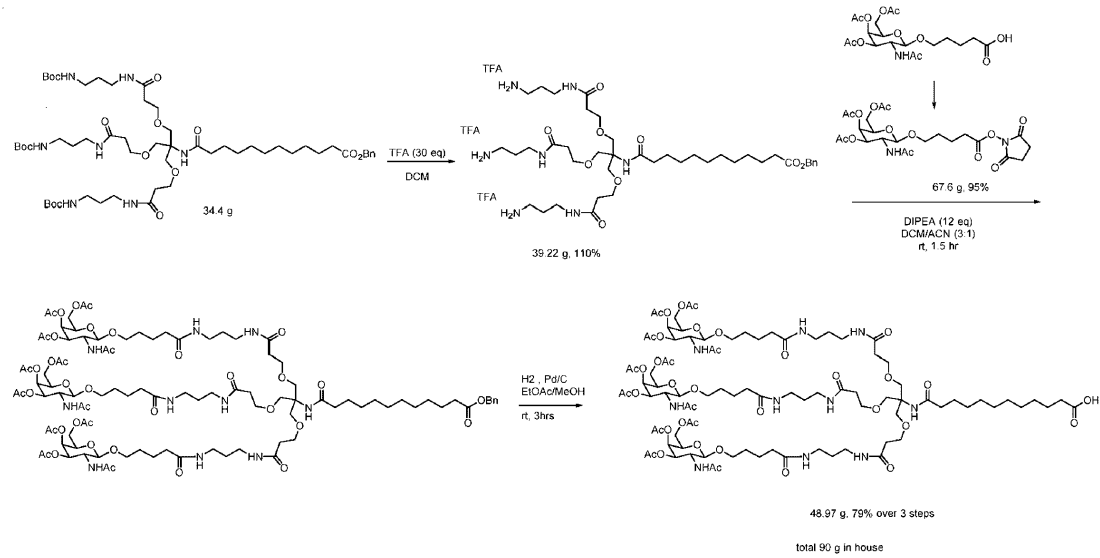


30

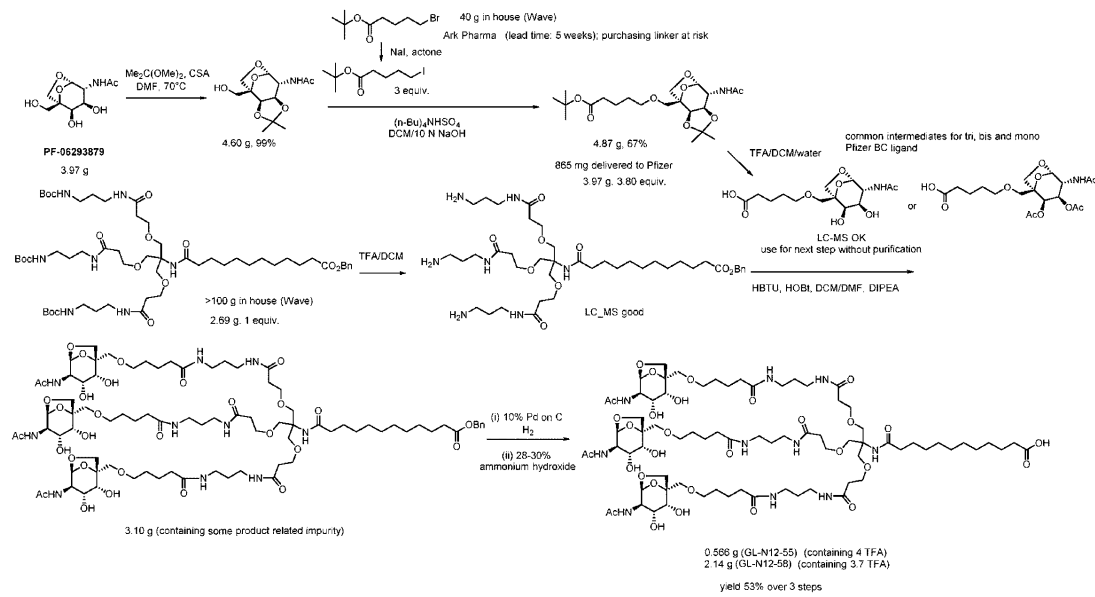
40

50

【化 2 6 6】



10



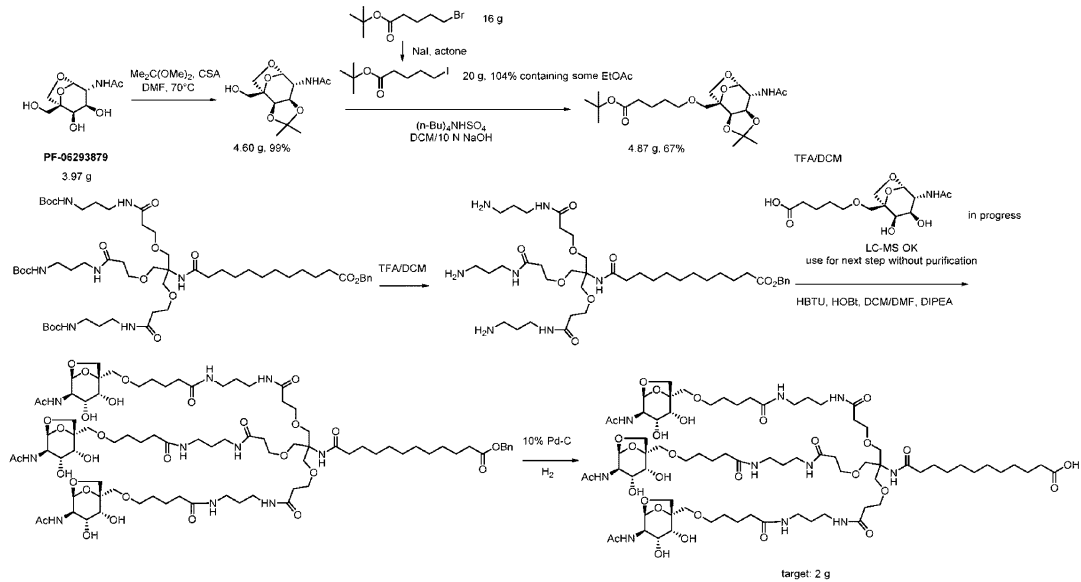
20

30

40

50

【化 2 6 7】



10

本明細書に記載した様々な追加分を、記載した様々なオリゴヌクレオチドと複合化し得る。

20

【1 4 8 6】

実施例 28. 分析方法の例。

1. 5分間のLRMS（低分解能質量分析）の実施：Waters Acquity HSS T3、2.1mm×50mm、C18、1.7μm；移動相：A：0.1%ギ酸／水（v/v）；移動相B：0.1%ギ酸／アセトニトリル（v/v）；流速1.25ml／分；初期条件：A95%：B5%；0.0～0.1分まで初期ホールド；0.1～1.0分までA5%：B95%ヘリニア勾配；1.0～1.1分までA5%：B95%をホールド；1.1～1.5分で初期条件へ戻す。

：3.0分間のLRMS（低分解能質量分析）の実施：Waters Acquity HSS T3、2.1mm×50mm、C18、1.7μm；移動相：A：0.1%ギ酸／水（v/v）；移動相B：0.1%ギ酸／アセトニトリル（v/v）；流速1.25ml／分；初期条件：A95%：B5%；0.0～0.1分まで初期ホールド；0.1～2.6分までA5%：B95%ヘリニア勾配；2.6～2.95分までA5%：B95%をホールド；2.95～3.0分で初期条件へ戻す。

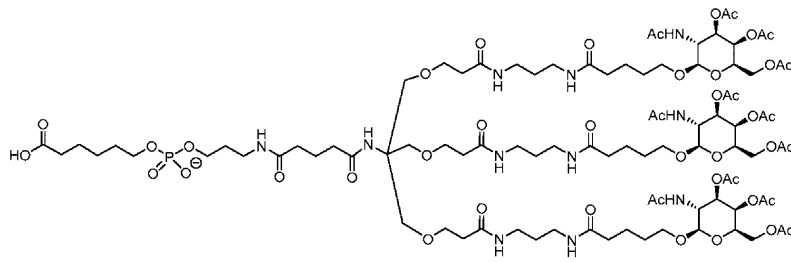
30

5-カルボキシペンチル5, 9, 16, 22-テトラオキソ-11, 11-ビス{[3-オキソ-3-({3-[(5-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル] オキシ} ペンタノイル) アミノ] プロピル} アミノ} プロポキシ] メチル} -26-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル] オキシ} -13-オキサ-4, 10, 17, 21-テトラアザヘキサコサ-1-イルホスフェート

40

50

【化 2 6 8】

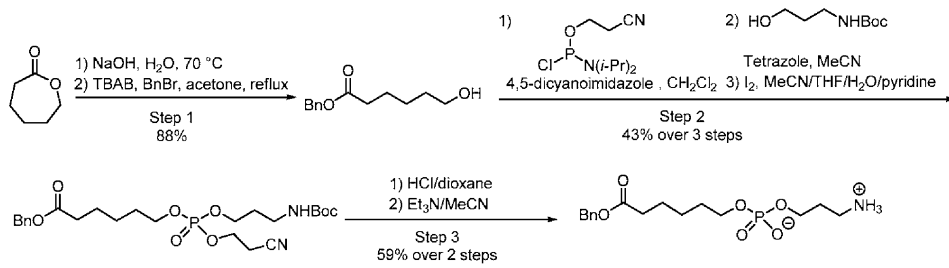


10

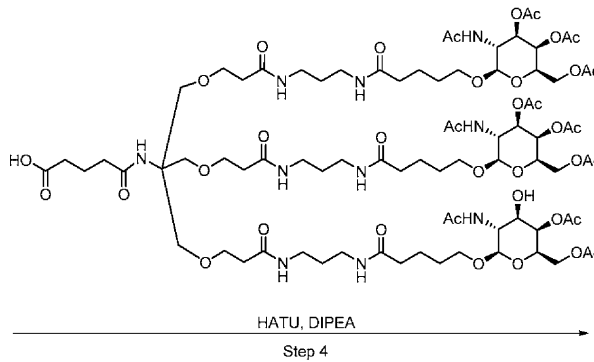
反応スキーム：

【化 2 6 9】

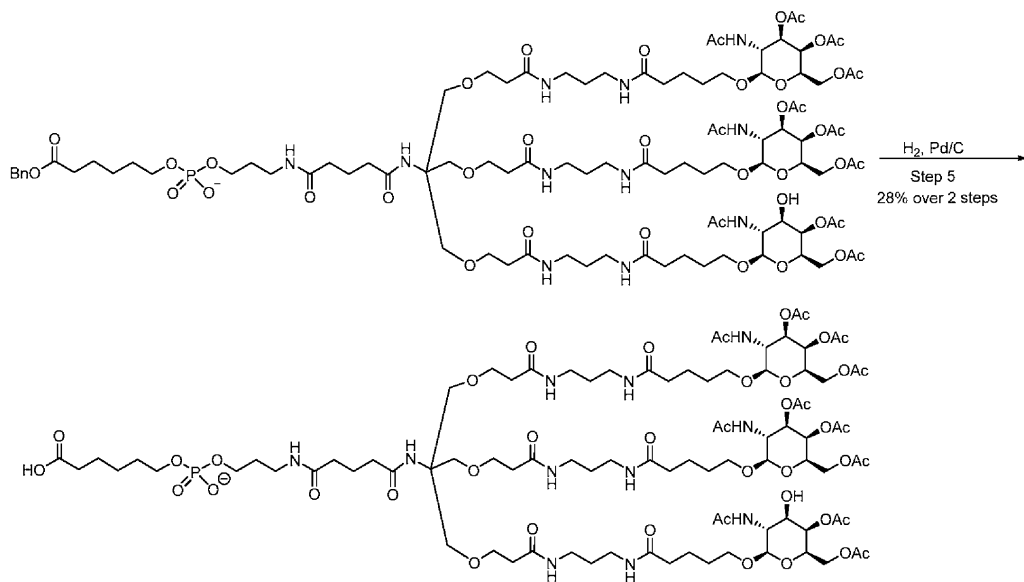
Reaction Scheme:



20



30



40

【1 4 8 7】

ステップ1：6-ヒドロキシヘキサノエート。水（401mL）中の水酸化ナトリウム

50

(9.02 g、22.6 mmol) 及び 6-ヘキサノラクトン (25 mL、0.23 mmol) の混合物を 70℃ で一晩加熱した。TLC は、出発物質の完全な消費を示した。ロータリーエバポレーターにより、水を 50℃ で注意深く除去し、得られた白色固体をトルエンと共沸した。高真空下で一晩乾燥させた後、この固体をアセトン (100 mL) 中に懸濁し、テトラブチルアンモニウムブロミド (3.64 g、11.3 mmol) 及び臭化ベンジル (32.2 mL、271 mmol) を添加した。TLC 分析が中間体のカルボン酸の完全な消費を示すまで、反応混合物を還流下で加熱した (96 時間)。溶媒を真空中で除去し、残渣を塩酸と酢酸エチルに分配した。水層を酢酸エチル (×2) で抽出した。合わせた有機抽出物を飽和炭酸水素ナトリウム (×2)、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。粗残渣をシリカゲルプラグ (20~70 % 酢酸エチル/ヘプタン) によって精製して、表題化合物を無色の油として得た (43.9 g、88%)。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.40–7.30 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 3.63 (t, 2H), 2.38 (t, 2H), 1.73–1.65 (m, 2H), 1.62–1.53 (m, 2H), 1.44–1.35 (m, 2H), 1.28 (br. s., 1H)。

【1488】

ステップ 2: 6-((3-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)プロポキシ)(2-シアノエトキシ)ホスホリル)オキシ)ヘキサン酸ベンジル。0℃ の 2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (20.3 g、67.5 mmol) の無水ジクロロメタン (150 mL) 溶液に、0℃ の 4, 5-ジシアノイミダゾール (アセトニトリル中 1M、31.5 mL、31.5 mmol) をゆっくりと添加した。次いで、6-ヒドロキシヘキサノエート (10.0 g、45.0 mmol) を、不活性雰囲気下、0℃ で混合物に滴下して添加した。TLC 分析が反応物質の消費を示すまで、混合物を 0℃ で攪拌した (1 時間)。反応物を飽和炭酸水素ナトリウム (80 mL) でクエンチした。次いで、二相混合物を分離し、水層をジクロロメタン (2×60 mL) で抽出した。合わせた有機相をブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固して、粗生成物 (23.0 g、>100%) を薄黄色の油として得、これを次のステップに直接使用した。この粗物質をアセトニトリル (50 mL) 中に溶解し、3-(Boc-アミノ)-1-プロパノール (10.0 g、57.2 mmol) 及びテトラゾール (19.1 g、272 mmol) の無水アセトニトリル (300 mL) 溶液を 10 分間かけて滴下して添加した。得られた無色溶液を周囲温度で 1.5 時間攪拌した。TLC は、出発物質が完全に消費されたことを示した。次いで、I₂ の溶液 (THF/H₂O/ピリジン (78:20:2) 中 0.4 M、90 mL、54.4 mmol) を上記反応混合物にゆっくりと添加したが、添加の終了時に、茶色の色は消えなかった。TLC 分析が反応の完了を示すまで、混合物を周囲温度で攪拌した (1 時間)。混合物を飽和亜硫酸ナトリウムでクエンチし、真空中で濃縮して、有機溶媒を除去した。残りの混合物を水で希釈し、酢酸エチル (×2) で抽出した。合わせた有機相を飽和塩化アンモニウム及びブラインで洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。粗物質をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (20~75 酢酸エチル/石油エーテル) によって精製して、表題化合物を無色の油として得た (10.0 g、3 ステップで 43%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.41–7.28 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.23 (ddd, 2H), 4.18–4.04 (m, 4H), 3.24 (q, 2H), 2.75 (ddd, 2H), 2.38 (t, 2H), 1.87 (dq, 2H), 1.76–1.64 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.31–1.20 (m, 2H)。

【1489】

ステップ 3: 3-アンモニオプロピル(6-(ベンジルオキシ)-6-オキソヘキシル)ホスフェート。6-((3-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)プロポキシ)(2-シアノエトキシ)ホスホリル)オキシ)ヘキサン酸ベンジル (9.00 g、17.6 mmol) の無水 1, 4-ジオキサン (36 mL) 溶液に塩酸 (100 mL、40

0 mmol、ジオキサン中 4 M) を 0℃ で滴下して添加した。得られた無色溶液を周囲温度で 1.5 時間攪拌した。混合物を濃縮乾固して、粗生成物 (7.90 g) を無色のゴム状物質として得、これを次のステップに直接使用した。この粗物質のアセトニトリル (72 mL) 溶液にトリエチルアミン (36 mL、0.26 mmol) を添加した。得られた白色懸濁液を 25℃ で 16 時間攪拌した。次いで、混合物を濃縮し、粗物質をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (5~50% メタノール/ジクロロメタン、1% 水酸化アンモニウム) によって精製して、表題化合物を白色固体として得た (3.70 g、2 ステップで 59%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.41–7.27 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.95 (dt, 2H), 3.85 (q, 2H), 3.08 (t, 2H), 2.39 (t, 2H), 1.94 (dq, 2H), 1.78–1.56 (m, 4H), 1.51–1.34 (m, 2H)。LCMS (m/z) C₁₆H₂₇NO₆P⁺ (M+H)⁺ 360.1; 保持時間 = 0.677 分 (UPLC 1.5 分間の方法)。

【1490】

ステップ 4: 6-(ベンジルオキシ)-6-オキソヘキシル 26-{[4,6-ジ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}-5,9,16,22-テトラオキソ-11,11-ビス{[3-オキソ-3-{3-[(5-{[3,4,6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}ペンタノイル)アミノ]プロピル}アミノ]プロポキシ]メチル}-13-オキサ-4,10,17,21-テトラアザヘキサコサ-1-イルホスフェート。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (305 mg、2.36 mmol、0.41 mL) 及び 3-アンモニオプロピル 6-(ベンジルオキシ)-6-オキソヘキシルホスフェート (297 mg、0.825 mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (5 mL) 溶液を、18,18-ビス(17-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-アセトアミド-2,3-ジヒドロキシ-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-5,11-ジオキソ-2,16-ジオキサ-6,10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S,2R,3R,4R,5S)-4-アセトアミド-2,3-ジヒドロキシ-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-7,13,20-トリオキソ-2,16-ジオキサ-8,12,19-トリアザテトラコサン-24-酸 (1.50 g、0.790 mmol) の DMF (10 mL) 溶液に添加した。次いで、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム 3-オキシドヘキサフルオロホスフェート (328 mg、0.065 mmol) を室温で反応混合物に添加した。1 時間後、反応物を飽和塩化アンモニウム (30 mL) でクエンチし、ジクロロメタン (4×30 mL) で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物をさらに精製することなく進めた。LCMS (m/z) C₉₈H₁₅₅N₁₁O₄₃PNa₂²⁺ (M+2Na)²⁺ 1125.5; 保持時間 = 0.71 分 (UPLC 1.5 分間の方法)。

【1491】

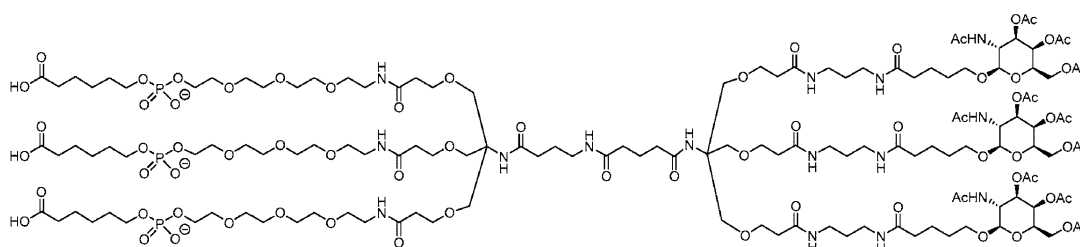
ステップ 5: 実施例 29. 粗トリス-ベンジルエステル 6-(ベンジルオキシ)-6-オキソヘキシル 26-{[4,6-ジ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}-5,9,16,22-テトラオキソ-11,11-ビス{[3-オキソ-3-{3-[(5-{[3,4,6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}ペンタノイル)アミノ]プロピル}アミノ]プロポキシ]メチル}-13-オキサ-4,10,17,21-テトラアザヘキサコサ-1-イルホスフェート (1.77 g、0.790 mmol) をメタノール (0.05 M) 中に溶解し、H-cube (10% Pd/C、流速 1.0 mL/分、完全な H₂ 下、60℃) を使用して水素化した。生成物はきれいに得られ、バルク物質を分取 HPLC [カラム: Phenomenex Gemini X B C18 150 mm×3.0 mm 5 μm によって精製した。グラジエント条件: 移動

相 A = 0.1% 10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム (pH 7) / 水、移動相 B = 0.1% 10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム (pH 7) / アセトニトリル (22 ~ 100 ~ 22% B / A、27.0 mL / 分)。バルク物質を、酢酸トリエチルアンモニウムを含有する白色固体として得た (^1H NMR 積分により 14 当量) (475 mg)。生成物の純度は 49 重量% であると計算され、収量は 233 mg (14%) であると決定された。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 5.34 (d, 3H), 5.07 (dd, 3H), 4.57 (d, 3H), 4.22–4.05 (m, 9H), 4.02 (t, 3H), 3.94–3.81 (m, 7H), 3.72–3.63 (m, 12H), 3.54 (dt, 3H), 3.35 (s, 6H), 3.26–3.20 (m, 17H), 3.19 (q, 84H, 酢酸トリエチルアンモニウム), 2.43 (t, 6H), 2.30–2.17 (m, 13H), 2.14 (s, 9H), 2.03 (s, 9H), 1.95 (s, 9H), 1.93 (s, 9H), 1.93 (s, 42H, 酢酸トリエチルアンモニウム), 1.90–1.78 (m, 4H), 1.74–1.57 (m, 22H), 1.49–1.38 (m, 2H), 1.30 (t, 126H)。LCMS (m/z) $\text{C}_{93}\text{H}_{154}\text{N}_{11}\text{O}_{44}\text{P}^{2+}$ (M+2H) $^{2+}$ 1080.5; 保持時間: 0.65 分 (UPLC 1.5 分間の方法)。

【1492】

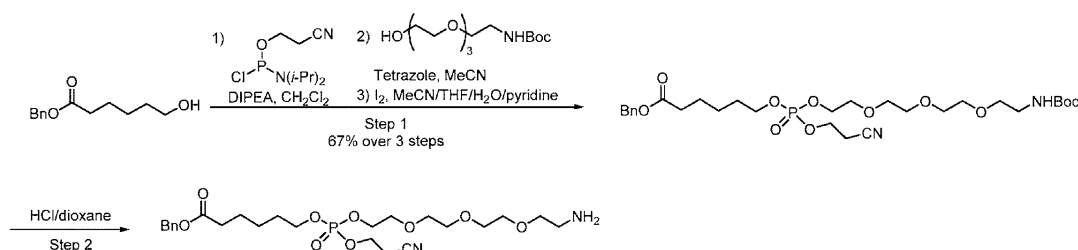
18- { [27- ({ (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -3- (アセチルアミノ) -4, 5-ビス (アセチルオキシ) -6- [(アセチルオキシ) メチル] テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル} オキシ) -12, 12-ビス ({3- [(3- { [5- ({ (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -3- (アセチルアミノ) -4, 5-ビス (アセチルオキシ) -6- [(アセチルオキシ) メチル] テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル} オキシ) ペンタノイル] アミノ} プロピル) アミノ] -3-オキソプロポキシ} メチル) -6, 10, 17, 23-テトラオキソ-14-オキサ-5, 11, 18, 22-テトラアザヘプタコサン-1-オイル] アミノ} -43-カルボキシ-18- (25-カルボキシ-19, 19-ジオキシド-5-オキソ-2, 9, 12, 15, 18, 20-ヘキサオキサ-6-アザ-19- λ ~5~-ホスファペンタコサ-1-イル) -37, 37-ジオキシド-13, 23-ジオキソ-3, 6, 9, 16, 20, 27, 30, 33, 36, 38-デカオキサ-12, 24-ジアザ-37- λ ~5~-ホスファトリテトラコンター-1-イル 5-カルボキシペンチルホスフェート

【化270】

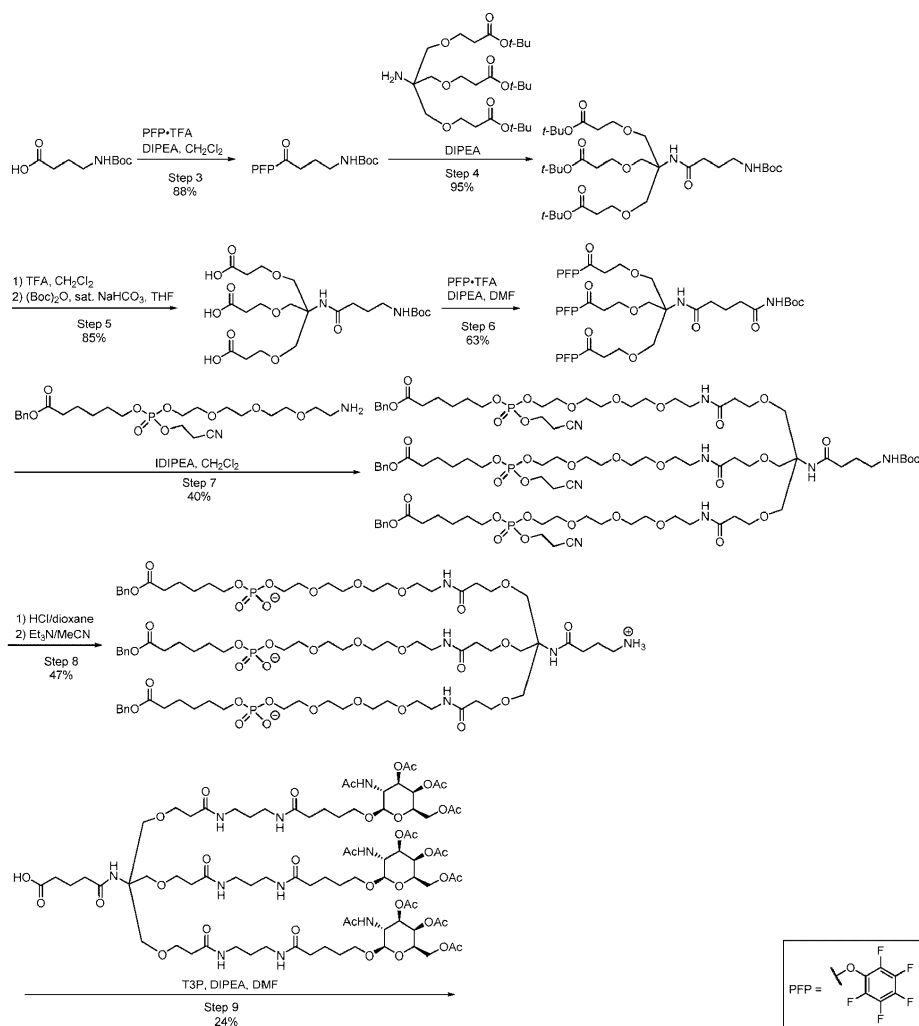


反応スキーム:

【化271】



【化 2 7 2】

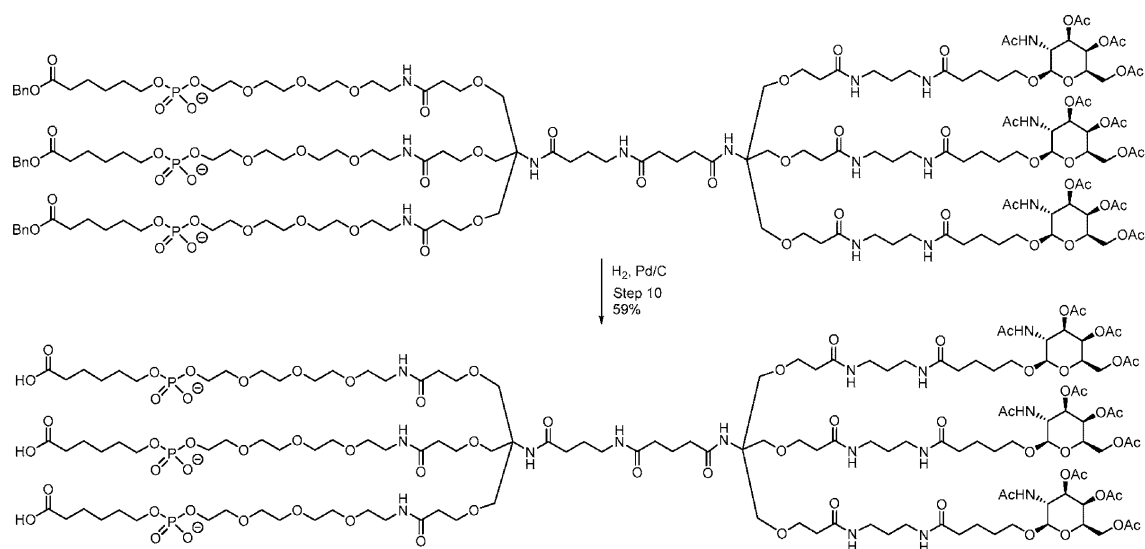


10

20

30

【化 2 7 3】



40

50

【1493】

ステップ1：6-((2-(2-(2-(2-アミノエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)(2-シアノエトキシ)ホスホリル)オキシ)ヘキサン酸ベンジル。この化合物は、実施例29ステップ2と同様の方法で、(2-(2-(2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)カルバミン酸tert-ブチル(6.03g、20.5mmol)及び2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト(6.87mL、30.8mmol)及び6-ヒドロキシヘキサノエート(6.85g、30.8mmol)から調製した。シリカゲルフラッシュクロマトグラフィー(50~100%酢酸エチル/ヘプタン、次いで、5%メタノール/酢酸エチル)による精製の後、表題化合物を黄色の油として得た(8.64g、3ステップで67%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.40-7.31 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 5.04 (s, 1H), 4.31-4.15 (m, 4H), 4.08 (q, 2H), 3.71 (ddd, 2H), 3.69-3.58 (m, 8H), 3.53 (t, 2H), 3.31 (q, 2H), 2.77 (t, 2H), 2.37 (t, 2H), 1.76-1.63 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.48-1.36 (m, 2H)。LCMS (m/z) C₂₉H₄₇N₂NaO₁₁P⁺ (M+Na)⁺ 653.5; 保持時間 = 0.93分 (UPLC 1.5分間の方法)。

10

【1494】

ステップ2：2-(2-(2-(2-(((6-(ベンジルオキシ)-6-オキソヘキシル)オキシ)(2-シアノエトキシ)ホスホリル)オキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エタン-1-アミニウムクロリド。0℃の6-((2-(2-(2-(2-アミノエトキシ)エトキシ)エトキシ)エトキシ)(2-シアノエトキシ)ホスホリル)オキシ)ヘキサン酸ベンジル(8.64g、14.1mmol)の1,4-ジオキサン(33mL)溶液に塩酸(1,4-ジオキサン中4M、87mL、348mmol)溶液を添加した。得られた混合物を周囲温度で1時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、8.76g(>100%)の表題化合物を黄色の油として得た。粗生成物をさらに精製することなく使用した。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.45-7.26 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.29-4.19 (m, 4H), 4.12 (q, 2H), 3.79-3.69 (m, 4H), 3.67 (m, 8H), 3.13 (t, 2H), 2.88 (ddd, 2H), 2.41 (t, 2H), 1.81-1.59 (m, 4H), 1.51-1.37 (m, 2H)。LCMS (m/z) C₂₄H₄₀N₂O₉P⁺ (M+H)⁺ 531.5; 保持時間 = 0.70分 (UPLC 1.5分間の方法)。

20

30

【1495】

ステップ3：4-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]ブタン酸ペンタフルオロフェニル。4-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)酪酸(12.0g、59.0mmol)のジクロロメタン溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(20.6mL、118mmol)を周囲温度で添加し、続いて、トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル(12.2mL、70.9mmol)を0℃で添加した。反応混合物を周囲温度まで加温し、17時間攪拌した。次いで、反応混合物を濃縮した。シリカゲルフラッシュクロマトグラフィー(10~60%酢酸エチル/ヘプタン)による粗物質の精製により、表題化合物を白色固体として得た(19.1g、88%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 4.65 (s, 1H), 3.25 (q, 2H), 2.72 (t, 2H), 1.96 (p, 2H), 1.45 (s, 9H)。LCMS (m/z) C₁₅H₁₆F₅NNaO₄⁺ (M+Na)⁺ 392.3; 保持時間 = 1.01分 (UPLC 1.5分間の方法)。

40

【1496】

ステップ4：11,11-ビス[(3-tert-ブトキシ-3-オキソプロポキシ)メチル]-2,2-ジメチル-4,9-ジオキサ-3,13-ジオキサ-5,10-ジアザヘキサデカン-16-酸tert-ブチル。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1

50

3.0 g、101 mmol、17.6 mL) を、4-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]ブタン酸ペンタフルオロフェニル(9.68 g、26.2 mmol)のTHF(25 mL)溶液に添加した。次いで、3-{2-アミノ-3-(3-tert-ブトキシ-3-オキソプロポキシ)-2-[(3-tert-ブトキシ-3-オキソプロポキシ)メチル]プロポキシ}プロパン酸tert-ブチル(この化合物は、報告された文献の手順に従って調製された: Cardonna, C. M.; Gawley, R. E. J. Org. Chem. 2002, 67, 1411)(10.2 g、20.2 mmol)を、THF(50 mL)溶液としてゆっくりとした流れで反応物に添加し、反応物を50℃で78時間攪拌した。反応物を濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィー(0~20%メタノール/ジクロロメタン、再度0~100%酢酸エチル/ヘプタン)によって2回精製して、表題化合物を無色の油として得た(13.3 g、95%)。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.27-6.13(m, 1H), 5.02-4.84(m, 1H), 3.70(s, 6H), 3.64(t, 6H), 3.16(q, 2H), 2.45(t, 6H), 2.20(t, 2H), 1.78(quin, 2H), 1.45(s, 36H)。

【1497】

ステップ5: 11, 11-ビス[(2-カルボキシエトキシ)メチル]-2, 2-ジメチル-4, 9-ジオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 10-ジアザヘキサデカン-16-酸。トリフルオロ酢酸(46 g、0.40 mol、30 mL)を、11, 11-ビス[(3-tert-ブトキシ-3-オキソプロポキシ)メチル]-2, 2-ジメチル-4, 9-ジオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 10-ジアザヘキサデカン-16-酸tert-ブチル(13.3 g、19.2 mmol)のジクロロメタン(100 mL)溶液に添加し、得られた溶液を室温で攪拌した。20時間後、反応混合物を濃縮した。次いで、得られた残渣をテトラヒドロフラン(30 mL)及び炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(160 mL)の混合物中に懸濁し、これに二炭酸ジ-tert-ブチル(12.6 g、57.7 mmol)を添加した。得られた懸濁液を40℃まで加熱した。二炭酸ジ-tert-ブチルの2つの追加アリコート(それぞれ3.70 g、17.0 mmol)を、30分で1回目、次いで、90分で2回目を反応混合物に添加し、反応物を40℃で攪拌した。20時間後、反応混合物を酢酸エチルで1回洗浄し、洗浄液を捨てた。水層のpHを1N塩酸でpH=3に調整した。次いで、水層を酢酸エチル(×2)で抽出し、合わせた抽出物を硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮して、表題化合物を無色の油として得、これを精製することなく後続のステップに使用した。¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ ppm 4.45-4.30(m, 12H), 3.70(q, 2H), 3.23(t, 6H), 2.84(t, 2H), 2.34(quin, 2H), 2.18(s, 9H)。

【1498】

ステップ6: 3-(2-[(4-アミノブタノイル)アミノ]-3-[3-オキソ-3-(ペンタフルオロフェノキシ)プロポキシ]-2-{[3-オキソ-3-(ペンタフルオロフェノキシ)プロポキシ]メチル}プロポキシ)プロパン酸ペンタフルオロフェニル。N, N-ジイソプロピルエチルアミン(17.0 g、132 mmol、23.0 mL)を、11, 11-ビス[(2-カルボキシエトキシ)メチル]-2, 2-ジメチル-4, 9-ジオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 10-ジアザヘキサデカン-16-酸(7.49 g、13.0 mmol)のN, N-ジメチルホルムアミド(100 mL)溶液に添加した。次いで、トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル(20.4 g、72.7 mmol、12.5 mL)を反応混合物に15分かけて滴下して添加し、時間の経過とともに黄色に変化した薄いピンク色の溶液を得た。1時間後、反応物を飽和炭酸水素ナトリウムでクエンチした。得られた混合物を酢酸エチル(×2)で抽出した。合わせた有機抽出物をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(0~80%酢酸エチル/ヘプタン)によって精製して、表題化合物を無色の油として得た(8.76 g、2ステップで63%)。¹H NMR(400

10

20

30

40

50

MHz, (CD₃)₂SO) δ ppm 7.10 (s, 1H), 6.73 (t, 1H), 3.70 (t, 6H), 3.64 (s, 6H), 2.98 (t, 6H), 2.87 (q, 2H), 2.03 (t, 2H), 1.53 (quin, 2H), 1.36 (s, 9H)。

【1499】

ステップ7: 27- ({4- [(tert-ブトキシカルボニル) アミノ] ブタノイル } アミノ) -8, 46-ビス (2-シアノエトキシ) -27- [19- (2-シアノエトキシ) -19-オキシド-5, 26-ジオキソ-28-フェニル-2, 9, 12, 15, 18, 20, 27-ヘプタオキサー-6-アザ-19-λ~5~-ホスファオクタコサー-1-イル] -22, 32-ジオキソ-7, 9, 12, 15, 18, 25, 29, 36, 39, 42, 45, 47-ドデカオキサー-21, 33-ジアザ-8, 46-ジホスファトリペンタコンタン-1, 53-二酸ジベンジル8, 46-ジオキシド。出発物質の両方をトルエンと2回共沸し、使用前に高真空下に一晚置いた。3- (2- [(4-アミノブタノイル) アミノ] -3- [3-オキソ-3- (ペンタフルオロフェノキシ) プロポキシ] -2- { [3-オキソ-3- (ペンタフルオロフェノキシ) プロポキシ] メチル} プロポキシ) プロパン酸ペンタフルオロフェニル (3.97 g、3.89 mmol) のジクロロメタン (15 mL) 溶液に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (6.8 mL、39 mmol) を添加した。次いで、2- (2- (2- (2- (((6- (ベンジルオキシ) -6-オキソヘキシル) オキシ) (2-シアノエトキシ) ホスホリル) オキシ) エトキシ) エトキシ) エタン-1-アミニウムクロリド (8.76 g 粗、14.0 mmol) のジクロロメタン (25 mL) 溶液を0℃で添加した。反応混合物を周囲温度まで加温し、TLC分析が出発物質の消費を示すまで攪拌した (15時間)。溶媒を真空中で除去し、残渣を酢酸エチル中に再度溶解させた。溶液を水、飽和炭酸水素ナトリウム、次いで、水で再度洗浄し、合わせた水層を酢酸エチルで1回で抽出した。合わせた有機抽出物を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。粗物質をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (0~22% メタノール/ジクロロメタン) によって精製して、表題化合物を無色のゴム状物質として得た (3.23 g、40%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.38-7.30 (m, 15H), 6.71 (s, 3H), 6.52 (s, 1H), 5.19 (t, 1H), 5.11 (s, 6H), 4.32-4.14 (m, 12H), 4.08 (q, 6H), 3.76-3.60 (m, 42H), 3.55 (t, 6H), 3.43 (q, 6H), 3.14 (dd, 2H), 2.77 (t, 6H), 2.42 (t, 6H), 2.38 (t, 6H), 2.23 (t, 2H), 1.79-1.64 (m, 14H), 1.46-1.38 (m, 15H)。LCMS (m/z) C₉₄H₁₅₁F₅N₈O₃₆P₃²⁺ (M+2H)²⁺ 1031.0; 保持時間 = 1.00分 (UPLC 1.5分間の方法)。

【1500】

ステップ8: 29- [(4-アンモニオブタノイル) アミノ] -29- (19, 19-ジオキシド-5, 26-ジオキソ-28-フェニル-2, 9, 12, 15, 18, 20, 27-ヘプタオキサー-6-アザ-19-λ~5~-ホスファオクタコサー-1-イル) -10, 10-ジオキシド-3, 24, 34-トリオキソ-1-フェニル-2, 9, 11, 14, 17, 20, 27, 31, 38, 41, 44-ウンデカオキサー-23, 35-ジアザ-10-λ~5~-ホスファヘキサテトラコンタン-46-イル6- (ベンジルオキシ) -6-オキソヘキシルホスフェート。0℃の27- ({4- [(tert-ブトキシカルボニル) アミノ] ブタノイル } アミノ) -8, 46-ビス (2-シアノエトキシ) -27- [19- (2-シアノエトキシ) -19-オキシド-5, 26-ジオキソ-28-フェニル-2, 9, 12, 15, 18, 20, 27-ヘプタオキサー-6-アザ-19-λ~5~-ホスファオクタコサー-1-イル] -22, 32-ジオキソ-7, 9, 12, 15, 18, 25, 29, 36, 39, 42, 45, 47-ドデカオキサー-21, 33-ジアザ-8, 46-ジホスファトリペンタコンタン-1, 53-二酸ジベンジル8, 46-ジオキシド (3.22 g、1.56 mmol) の1, 4-ジオキサン (18 mL) 溶液に、塩酸

(1, 4-ジオキサン中4 M、16 mL、63 mmol) 溶液を添加した。得られた混合物を周囲温度で1時間攪拌した。次いで、溶媒を除去して、油性残渣を得た。この粗物質をアセトニトリル(18 mL)中に懸濁し、トリエチルアミン(12 mL、86 mmol)を添加した。反応混合物を周囲温度で40時間攪拌し、その後、真空中で濃縮した。粗物質を、Phenomenex NX-C18カラムを用いた逆相HPLC(5~100%アセトニトリル/水(0.1%水酸化ナトリウム含有))によって精製し、凍結乾燥して、表題化合物を無色の油として得た(1.33 g、2ステップで47%)。¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.41-7.27 (m, 15H), 5.11 (s, 6H), 4.03-3.92 (m, 6H), 3.85 (q, 6H), 3.71-3.58 (m, 42H), 3.55 (t, 6H), 3.38 (t, 6H), 2.99 (t, 2H), 2.44 (t, 6H), 2.42-2.29 (m, 8H), 1.92 (p, 2H), 1.72-1.57 (m, 12H), 1.48-1.37 (m, 6H)。LCMS (m/z) C₈₀H₁₃₄N₅O₃₄P₃²⁺ (M+2H)²⁺ 901.5; 保持時間 = 0.77分 (UPLC 1.5分間の方法)。

[1501]

ステップ9: 29- { [27- ({ (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -3- (アセチルアミノ) -4, 5-ビス (アセチルオキシ) -6- [(アセチルオキシ) メチル] テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル} オキシ) -12, 12-ビス ({3- [(3- { [5- ({ (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -3- (アセチルアミノ) -4, 5-ビス (アセチルオキシ) -6- [(アセチルオキシ) メチル] テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル} オキシ) ペンタノイル] アミノ} プロピル) アミノ] -3-オキソプロポキシ} メチル) -6, 10, 17, 23-テトラオキソ-14-オキサ-5, 11, 18, 22-テトラアザヘプタコサン-1-オイル] アミノ} -29- (19, 19-ジオキシド-5, 26-ジオキソ-28-フェニル-2, 9, 12, 15, 18, 20, 27-ヘプタオキサ-6-アザ-19-λ~5~-ホスファオクタコサ-1-イル) -10, 10-ジオキシド-3, 24, 34-トリオキソ-1-フェニル-2, 9, 11, 14, 17, 20, 27, 31, 38, 41, 44-ウンデカオキサ-23, 35-ジアザ-10-λ~5~-ホスファヘキサテトラコンタン-46-イル6- (ベンジルオキシ) -6-オキソヘキシルホスフェート。出発物質の両方をトルエンと3回共沸し、使用前に高真空中に一晩置いた。アミン29- [(4-アンモニオブタノイル) アミノ] -29- (19, 19-ジオキシド-5, 26-ジオキソ-28-フェニル-2, 9, 12, 15, 18, 20, 27-ヘプタオキサ-6-アザ-19-λ~5~-ホスファオクタコサ-1-イル) -10, 10-ジオキシド-3, 24, 34-トリオキソ-1-フェニル-2, 9, 11, 14, 17, 20, 27, 31, 38, 41, 44-ウンデカオキサ-23, 35-ジアザ-10-λ~5~-ホスファヘキサテトラコンタン-46-イル6- (ベンジルオキシ) -6-オキソヘキシルホスフェート (270 mg、0.147 mmol) の無水ジメチルホルムアミド (0.5 mL) 溶液に、ジメチルホルムアミド (1.5 mL) 中の18, 18-ビス (17- ((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル) -5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデシル) -1- ((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル) -7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザテトラコサン-24-酸 (337 mg、0.177 mmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.21 mL、1.18 mmol)、次いで、プロピルホスホン酸無水物溶液 (酢酸エチル中50重量%、0.26 mL、0.44 mmol) を添加した。反応混合物を50℃で17時間攪拌した。周囲温度まで冷却したら、水を添加し、混合物を85:15 CH₂Cl₂:i-PrOH (100 mL×3) で抽出した。有機抽出物を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。粗物質を、Phenomenex NX-C18カラム (35~100アセトニトリル/水 (10 mM 酢酸トリエチルアンモニウム含有)) を用いた逆相HPLCによって

10

20

30

40

50

精製し、凍結乾燥して、酢酸トリエチルアンモニウムを含有する202mgの所望の生成物(12.3当量、 ^1H NMR積分に基づく)を得た。この生成物の純度は66重量%であると計算され、収量は133mg(24%)であると決定された。この物質を、さらに精製することなく、次のステップに使用した。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7.43–7.24 (m, 15H), 5.33 (d, 3H), 5.11 (s, 6H), 5.07 (dd, 3H), 4.57 (d, 3H), 4.22–3.80 (m, 25H), 3.75–3.57 (m, 59H), 3.57–3.47 (m, 12H), 3.41–3.34 (m, 12H), 3.20 (q, 74H, 酢酸トリエチルアンモニウム), 2.48–2.35 (m, 18H), 2.27–2.17 (m, 12H), 2.14 (s, 9H), 2.02 (s, 9H), 1.96, (s, 111H, 酢酸トリエチルアンモニウム) 1.95 (s, 9H), 1.93 (s, 9H), 1.77–1.54 (m, 33H), 1.44 (m 9H), 1.31 (t, 111H, 酢酸トリエチルアンモニウム)。LCMS (m/z) $\text{C}_{164}\text{H}_{266}\text{N}_{15}\text{O}_{72}\text{P}_3^{2+}$ ($M+2\text{H}$) $^{2+}$ 1845.8; 保持時間 = 1.07分 (UPLC 3分間の方法)。

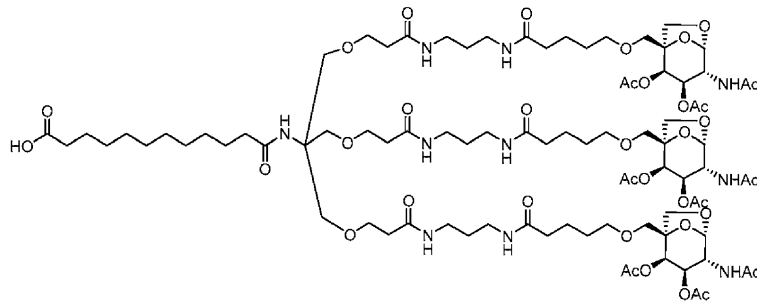
【1502】

ステップ10: 実施例30. メタノール(2mL)中の29- { [27- ({ (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -3- (アセチルアミノ) -4, 5-ビス(アセチルオキシ) -6- [(アセチルオキシ) メチル] テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル} オキシ) -12, 12-ビス({3- [(3- { [5- ({ (2R, 3R, 4R, 5R, 6R) -3- (アセチルアミノ) -4, 5-ビス(アセチルオキシ) -6- [(アセチルオキシ) メチル] テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル} オキシ) ペンタノイル] アミノ} プロピル) アミノ] -3-オキソプロポキシ} メチル) -6, 10, 17, 23-テトラオキソ-14-オキサ-5, 11, 18, 22-テトラアザヘプタコサン-1-オイル] アミノ} -29- (19, 19-ジオキシド-5, 26-ジオキソ-28-フェニル-2, 9, 12, 15, 18, 20, 27-ヘプタオキサ-6-アザ-19- λ ~5~-ホスファオクタコサ-1-イル) -10, 10-ジオキシド-3, 24, 34-トリオキソ-1-フェニル-2, 9, 11, 14, 17, 20, 27, 31, 38, 41, 44-ウンデカオキサ-23, 35-ジアザ-10- λ ~5~-ホスファヘキサテトラコンタン-46-イル6- (ベンジルオキシ) -6-オキソヘキシルホスフェート(200mg、0.0330mmol、66重量%) 及び10%パラジウム炭素(7.0mg、0.0066mmol)の混合物を水素圧力(50psi)下、25℃で20時間攪拌した。触媒を0.45 μm ナイロンアクロディスクに通して濾過し、メタノール(40mL)で洗浄した。次いで、濾液を濃縮し、得られた油をアセトニトリル及び水(22mL)の1:1混合物中に溶解し、塩酸(1N)でpH5.70に調整した。溶液を一晩凍結乾燥させて、表題化合物を吸湿性の白色固体として得た(13当量のトリエチルアミン塩酸塩)(110mg、59%)。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ ppm 5.34 (d, 3H), 5.07 (dd, 3H), 4.57 (d, 3H), 4.20–3.91 (m, 14H), 3.93–3.84 (m, 9H), 3.75–3.62 (m, 63H), 3.60–3.50 (m, 10H), 3.43–3.35 (m, 8H), 3.27–3.14 (m, 80H, トリエチルアミン塩酸塩), 3.12–2.90 (m, 2H), 2.57–2.38 (m, 12H), 2.30–2.20 (m, 18H), 2.14 (s, 9H), 2.03 (s, 9H), 1.95–1.94 (m, 18H), 1.89–1.83 (m, 1H), 1.73–1.55 (m, 34H), 1.46–1.40 (m, 9H), 1.31 (t, 120H, トリエチルアミン塩酸塩)。LCMS (m/z) $\text{C}_{143}\text{H}_{249}\text{N}_{15}\text{O}_{72}\text{P}_3^{3+}$ ($M+3\text{H}$) $^{3+}$ 1141.2; 保持時間 = 1.06分 (UPLC 3分間の方法)。

【1503】

1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4- (アセチルアミノ) -2, 3-ビス(アセチルオキシ) -6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタ-1-イル] -18

， 18-ビス {17- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-(アセチルアミノ) -
2, 3-ビス (アセチルオキシ) -6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタ-1
-イル] -5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデカ-1
-イル} -7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリア
ザヘントリアコンタン-31-酸
【化 274】



10

合成スキーム：

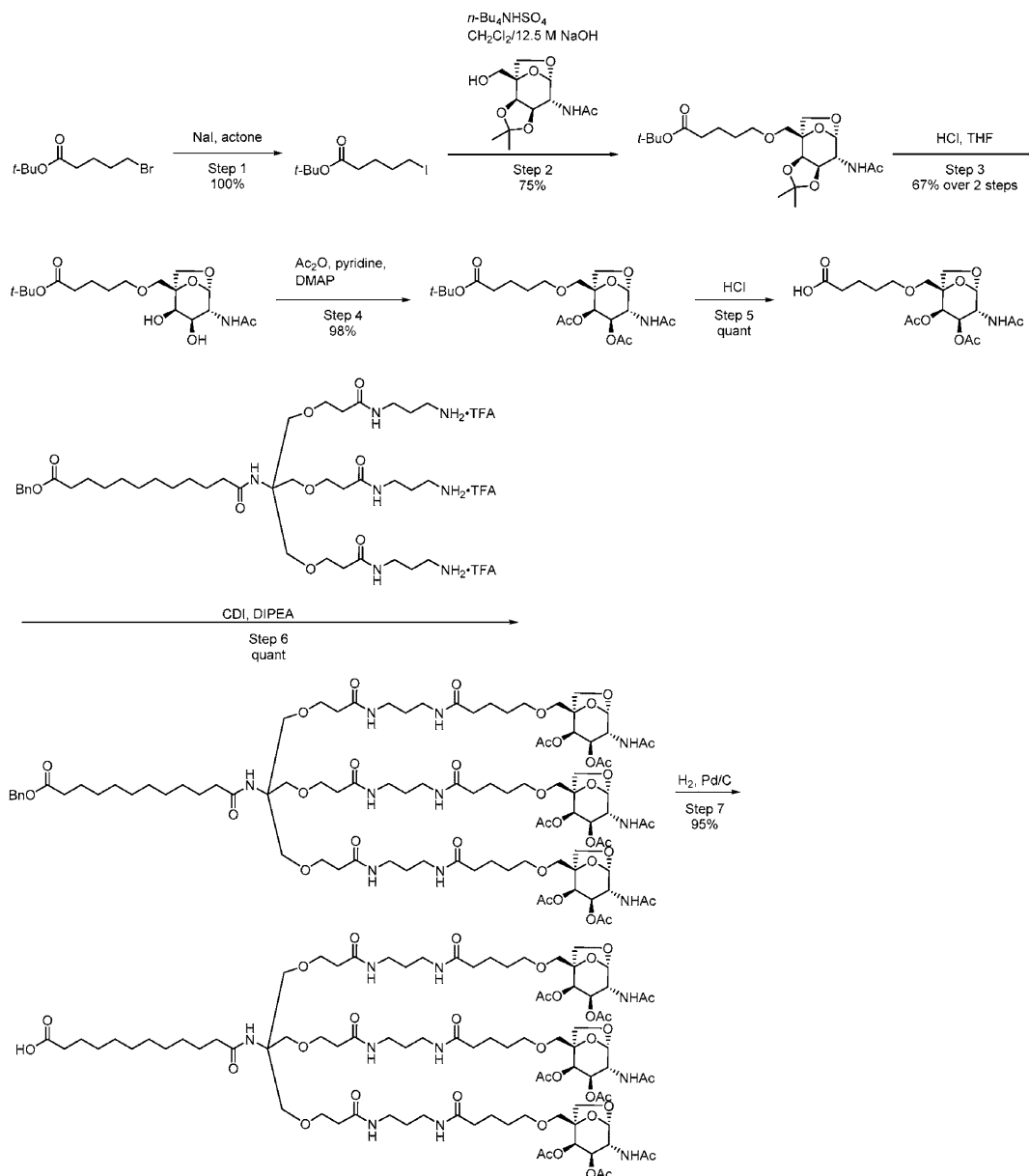
20

30

40

50

【化 2 7 5】



【1504】

ステップ1：5-ヨードペンタン酸tert-ブチル。5-ブロモペンタン酸tert-ブチル（60.0g、250mmol）のアセトン（400mL）溶液にヨウ化ナトリウム（94.8g、633mmol）を添加した。反応混合物を57℃で4時間攪拌し、室温まで冷却し、濾過し、ジクロロメタンで洗浄した。溶媒を減圧下で蒸発させて、残渣を得、これをジクロロメタンに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム（200mL）及びブライン（100mL）で洗浄した。分離した有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮して、表題化合物を黄色の油として得た（69.3g、100%）。 $^1\text{H NMR}$ （600MHz， CDCl_3 ） δ ppm 3.20（t，2H），2.25（t，2H），1.86（p，2H），1.70（p，2H），1.45（s，9H）。

【1505】

ステップ2：5- { [(1S，2R，6R，7R，8S) - 7 - (アセチルアミノ) - 4，4-ジメチル-3，5，9，11-テトラオキサトリシクロ [6.2.1.0~2，6~] ウンデカ-1-イル] メトキシ } ペンタン酸tert-ブチル。5-ヨードペンタン酸tert-ブチル（59g、0.21mol）及びN-（（3aR，4S，7S，8

R, 8a R) - 4 - (ヒドロキシメチル) - 2, 2 - ジメチルヘキサヒドロ - 4, 7 - エポキシ [1, 3] ジオキソロ [4, 5 - d] オキセピン - 8 - イル) アセトアミド (20 g、69 mmol) のジクロロメタン (210 mL) 溶液に、氷浴中、硫酸水素テトラブチルアンモニウム (35.3 g、104 mmol)、続いて、12.5 M 水酸化ナトリウム溶液 (160 mL) を添加した。反応混合物を室温で24時間攪拌した。反応混合物をジクロロメタン (200 mL) と水 (200 mL) に分配した。分離した有機相を1 N 塩酸 (300 mL) によって洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をジエチルエーテル (500 mL) 中、周囲温度で30分間粉碎した。得られた固体を濾過によって除去し、濾過ケーキをジエチルエーテル (100 mL) ですすいだ。濾液を濃縮し、真空中で一晩乾燥させ、表題化合物の粗物質を黄色の油として得 (50.9 g、45.5 重量% 純度、1, 3, 5 - トリメトキシベンを内部標準として用いた q NMR によって決定)、これを精製することなく次のステップに使用した。LCMS (m/z) $C_{21}H_{36}NO_8^+$ (M+H)⁺ 430.3; 保持時間 = 0.88 分 (UPLC 1.5 分間の方法)。

【1506】

ステップ3: 5 - { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター - 1 - イル] メトキシ } ペンタン酸 tert - ブチル。テトラヒドロフラン (105 mL) 中の 5 - { [(1S, 2R, 6R, 7R, 8S) - 7 - (アセチルアミノ) - 4, 4 - ジメチル - 3, 5, 9, 11 - テトラオキサトリシクロ [6.2.1.0~2, 6~] ウンデカ - 1 - イル] メトキシ } ペンタン酸 tert - ブチル (50.9 g、45.5 重量%、53.9 mmol) の粗物質の氷冷溶液に、濃塩酸 (16 mL) の水 (49 mL) 溶液を滴下漏斗により5分かけて添加した。反応溶液を、窒素下、室温で6時間攪拌した。反応混合物を2 - メチル - テトラヒドロフラン (300 mL) で希釈し、ブライン (100 mL) ブラインで洗浄した。水相をジクロロメタン (300 mL) で抽出した。分離した有機相のそれぞれを、飽和炭酸水素ナトリウム (75 mL) 及びブライン (75 mL) の混合物で洗浄し、次いで、ブライン (120 mL) で洗浄した。有機相を合わせ、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮し、ヘプタン (100 mL) に続き、メチル - tert - ブチル - エーテル (100 mL) により共沸した。得られた粗物質をメチル - tert - ブチル - エーテル (200 mL) 中、室温で15分間粉碎した。得られた沈殿物を濾過によって収集し、メチル - tert - ブチル - エーテル (200 mL) ですすぎ、真空中で乾燥させて、表題化合物を白色固体として得た (17.9 g、2ステップで66%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.79 (d, 1H), 5.36 (d, 1H), 4.07 - 3.88 (m, 4H), 3.79 - 3.62 (m, 4H), 3.60 - 3.46 (m, 2H), 3.37 (d, 1H), 2.30 - 2.19 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.75 - 1.51 (m, 4H), 1.45 (s, 9H)。LCMS (m/z) $C_{18}H_{32}NO_8^+$ (M+H)⁺ 390.5; 保持時間 = 0.70 分 (UPLC 1.5 分間の方法)。

【1507】

ステップ4: 5 - { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ビス (アセチルオキシ) - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター - 1 - イル] メトキシ } ペンタン酸 tert - ブチル。無水酢酸 (18.7 g、183 mmol) を、ジクロロメタン (150 mL) 中の 5 - { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4 - (アセチルアミノ) - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター - 1 - イル] メトキシ } ペンタン酸 tert - ブチル (18.6 g、49.7 mmol) 及びピリジン (14.0 g、183 mmol)、及びジメチルアミノピリジン (1.12 g、9.16 mmol) の氷冷溶液に滴下して添加した。混合物を室温で2.5時間攪拌した。反応混合物を塩酸 (1 N、150 mL) でクエンチし、ジクロロメタン (200 mL) で抽出した。有機相を塩酸 (1 N、150 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム (150 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮し、ヘプタン (4 × 1

10

20

30

40

50

00 mL) と共沸して、粗物質を得、これをシリカゲルプラグ (210 g シリカゲル、100% ヘプタン (1 L)、次いで、25% 酢酸エチル/ヘプタン (2 L)、次いで、100% 酢酸エチル (2 L)) によって精製して、表題化合物を白色固体として得た (21.2 g、98%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.65 (d, 1H), 5.41–5.39 (m, 2H), 5.09 (dd, 1H), 4.34 (t, 1H), 3.93 (d, 1H), 3.75 (d, 1H), 3.65 (d, 1H), 3.50 (d, 1H), 3.45 (td, 1H), 3.38 (td, 1H), 2.21 (t, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.64–1.52 (m, 4H), 1.44 (s, 9H)。LCMS (m/z) C₂₂H₃₅NNaO₁₀⁺ (M+Na)⁺ 496.1; 保持時間 = 0.85 分 (UPLC 1.5 分間の方法)。

10

【1508】

ステップ5: 5- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ} ペンタン酸。氷浴中に置いた 5- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ} ペンタン酸 tert-ブチル (21.1 g、44.6 mmol) のジクロロメタン (110 mL) 溶液に、塩酸 (11 g、0.31 mol、78 mL、1, 4-ジオキサン中 4.0 M) を添加した。冷却浴を取り外し、反応物を、窒素下、周囲温度で 4 時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、ジエチルエーテル (200 mL)、酢酸エチル (200 mL)、及びヘプタン (3×200 mL) と共沸し、最後に、真空により一晩乾燥させて、表題化合物を白色固体として得た (18.6 g、定量的)。¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ ppm 8.84 (br. s., 1H), 6.50 (d, 1H), 5.35 (d, 1H), 5.30 (d, 1H), 5.00 (dd, 1H), 4.17–4.07 (m, 1H), 3.93 (d, 1H), 3.78–3.56 (m, 2H), 3.52 (d, 1H), 3.49–3.34 (m, 2H), 2.26 (t, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.60–1.47 (m, 4H)。LCMS (m/z) C₁₈H₂₈NO₁₀⁺ (M+H)⁺ 418.0; 保持時間 = 0.60 分 (UPLC 1.5 分間の方法)。

20

30

【1509】

ステップ6: 1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] -18, 18-ビス {17- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] -5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデカ-1-イル} -7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸ベンジル。5- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ} ペンタン酸 (1.53 g、3.63 mmol) のアセトニトリル (6 mL) 溶液に 1, 1'-カルボニルジイミダゾール (0.580 g、3.56 mmol) を添加し、反応混合物を室温で攪拌した。3 時間後、12- ((1, 19-ジアミノ-10- ((3- ((3-アミノプロピル) アミノ)-3-オキソプロポキシ) メチル)-5, 15-ジオキソ-8, 12-ジオキサ-4, 16-ジアザノナデカン-10-イル) アミノ)-12-オキソドデカン酸ベンジルトリストリフルオロ酢酸塩 (1.58 g、1.03 mmol、75.4 重量%) をアセトニトリル (6 mL) 溶液として反応混合物に添加し、続いて、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.540 g、4.14 mmol) を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を濃縮し、ジクロロメタン (70 mL) で希釈し、塩酸 (1 N、30 mL)、ブライン (30 mL)、及び飽和炭酸水素ナトリウム (30 mL) で洗浄した。有機

40

50

相を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。得られた残渣をシリカゲルプラグ（20 g シリカゲル、ジクロロメタン（100 mL）、10%メタノール／ジクロロメタン（200 mL）、続いて、25%メタノール／ジクロロメタン（200 mL）で溶出）によって精製して、表題化合物を白色のガラス状物質として得た（2.25 g、定量的収量）。¹H NMR（600 MHz, CD₃OD）δ ppm δ 7.73–7.30（m, 5H）, 5.44（d, 3H）, 5.32（s, 3H）, 5.12–5.09（m, 5H）, 4.18（d, 3H）, 4.00（d, 3H）, 3.71（dd, 6H）, 3.68–3.67（m, 12H）, 3.51–3.45（m, 6H）, 3.41–3.38（m, 3H）, 3.21（q, 12H）, 2.42（t, 6H）, 2.35（t, 2H）, 2.22–2.17（m, 6H）, 2.16（s, 9H）, 1.94（s, 18H）, 1.72–1.58（m, 16H）, 1.58–1.42（m, 8H）, 1.38–1.29（m, 12H）。LCMS（m/z）C₉₅H₁₅₀N₁₀O₃₆²⁺（M+2H）²⁺ 1004.7；保持時間 = 0.86分（UPLC 3分間の方法）

【1510】

ステップ7：実施例31. メタノール（14 mL）中の1-〔（1S, 2R, 3R, 4R, 5S）-4-（アセチルアミノ）-2, 3-ビス（アセチルオキシ）-6, 8-ジオキサビシクロ〔3.2.1〕オクタ-1-イル〕-18, 18-ビス〔17-〔（1S, 2R, 3R, 4R, 5S）-4-（アセチルアミノ）-2, 3-ビス（アセチルオキシ）-6, 8-ジオキサビシクロ〔3.2.1〕オクタ-1-イル〕-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデカ-1-イル〕-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸ベンジル（2.36 g、1.18 mmol）及び10%パラジウム炭素（0.376 mg）の混合物を、Parr反応器で、水素圧力（50 psi）下、25℃で4.5時間攪拌した。反応混合物をセライトに通して濾過し、触媒を除去した。セライトをメタノール（20 mL）で洗浄し、合わせた濾液を濃縮し、メチルtert-ブチルエーテル（3×20 mL）と共沸した。粗物質をメチルtert-ブチルエーテル（20 mL）中で一晩粉碎した。得られた白色固体を濾過によって収集し、真空中で乾燥させて、表題化合物を白色固体として得た（2.14 g、95%）。¹H NMR（600 MHz, CD₃OD）δ ppm 5.45（d, 3H）, 5.32（s, 3H）, 5.11（dd, 3H）, 4.18（d, 3H）, 4.01（d, 3H）, 3.72（dd, 6H）, 3.70–3.64（m, 12H）, 3.52–3.47（m, 6H）, 3.42–3.39（m, 3H）, 3.22（q, 12H）, 2.42（t, 6H）, 2.28（t, 2H）, 2.19（t, 6H）, 2.16（s, 9H）, 1.95（s, 18H）, 1.73–1.50（m, 24H）, 1.38–1.29（m, 12H）。LCMS（m/z）C₈₈H₁₄₃N₁₀O₃₆⁺ 1916.2（M+H）⁺；保持時間 = 1.35分（UPLC 3分間の方法）。

【1511】

1-〔（1S, 2R, 3R, 4R, 5S）-4-（アセチルアミノ）-2, 3-ビス（アセチルオキシ）-6, 8-ジオキサビシクロ〔3.2.1〕オクタ-1-イル〕-18-〔17-〔（1S, 2R, 3R, 4R, 5S）-4-（アセチルアミノ）-2, 3-ビス（アセチルオキシ）-6, 8-ジオキサビシクロ〔3.2.1〕オクタ-1-イル〕-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデカ-1-イル〕-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸

10

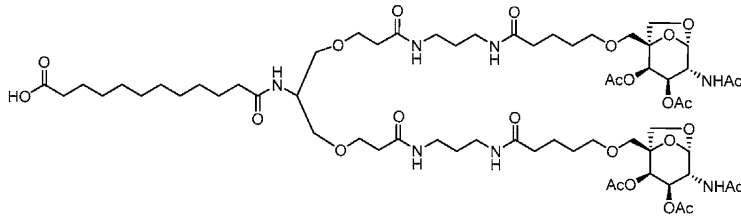
20

30

40

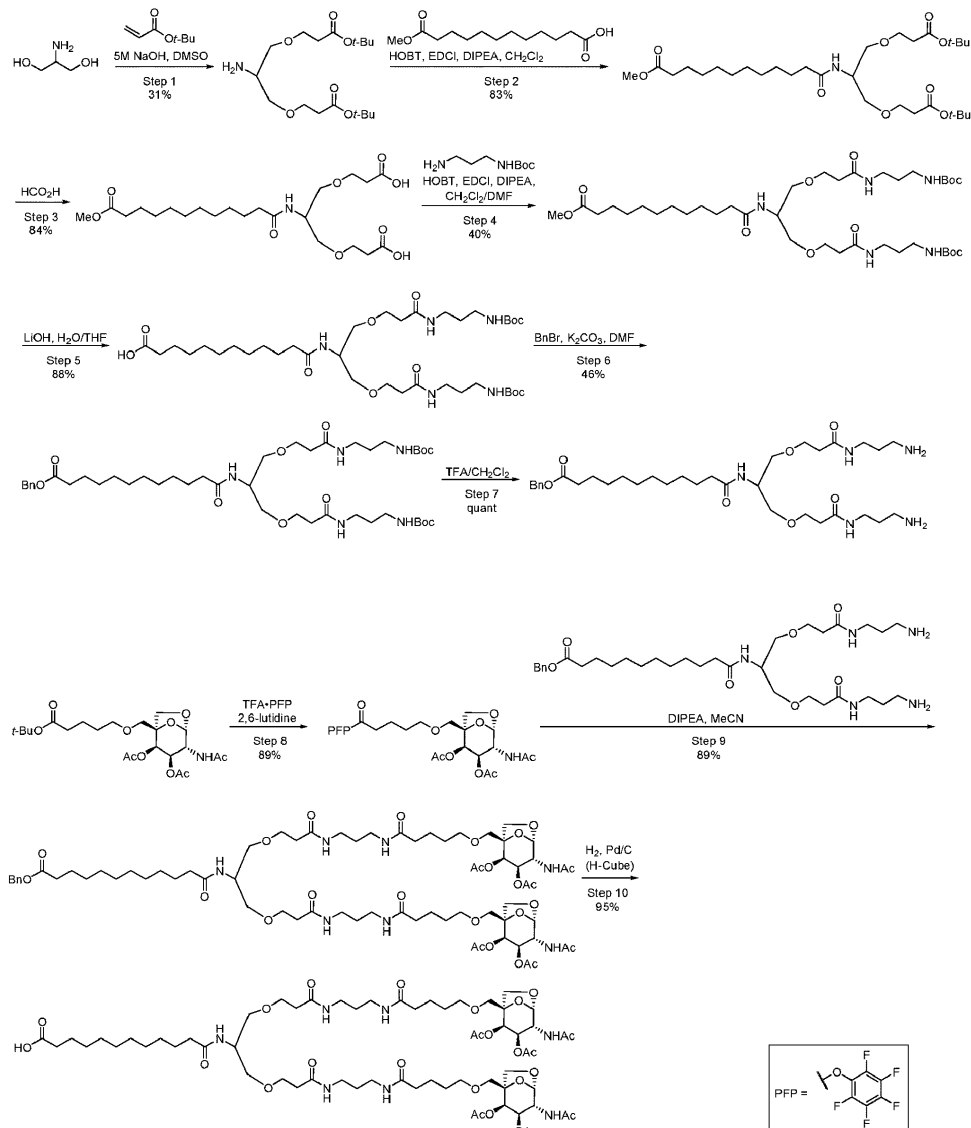
50

【化 2 7 6】



反応スキーム：

【化 2 7 7】



【1 5 1 2】

ステップ1：3，3'-[(2-アミノプロパン-1，3-ジイル)ビス(オキシ)]ジプロパン酸ジ-tert-ブチル。2-プロペン酸1，1-ジメチルエチル(1.44k

10

20

30

40

50

g、11.3 mol) を、2-アミノ-1,3-プロパンジオール (500 g、5.49 mol) のジメチルスルホキシド (1.5 L) 攪拌溶液に -5℃で1時間かけて滴下して添加した。次いで、反応混合物を25℃まで加温し、TLC分析が出発物質の消費を示すまで、その温度での攪拌を続けた (16時間)。反応混合物を水 (3 L) で希釈し、混合物を酢酸エチル (5 L×1、2.5 L×2) で抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮して、残渣 (1.30 kg) を得た。粗物質をカラムクロマトグラフィー (5%酢酸エチル/石油エーテル、次いで、10%メタノール/ジクロロメタン) によって精製して、表題化合物を黄色の油として得た (600 g、31%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.69–3.60 (m, 4H), 3.45–3.37 (m, 2H), 3.29 (dd, 2H), 3.18–3.00 (m, 1H), 2.44 (t, 4H), 1.42 (s, 18H)。

【1513】

ステップ2: 12-オキソ-12-[(2,2,16,16-テトラメチル-4,14-ジオキソ-3,7,11,15-テトラオキサヘプタデカン-9-イル)アミノ]ドデカン酸メチル。この反応は、2バッチで並行して実施した。1,12-ドデカン二酸モノメチルエステル (128 g、0.524 mmol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (70.7 g、0.524 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (271 g、2.10 mol) 及び1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (201 g、1.05 mol) を、3,3'-[(2-アミノプロパン-1,3-ジイル)ビス(オキシ)]ジプロパン酸ジ-tert-ブチル (182 g、0.524 mol) のジクロロメタン (1.6 L) 攪拌溶液に20℃で添加し、TLC分析が出発物質の消費を示すまで、反応物を室温で攪拌した (12時間)。この反応混合物の2つのバッチを合わせ、水 (2 L) で希釈し、室温で10分間攪拌した。有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。得られた粗残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (20~50%酢酸エチル/石油エーテル) によって精製して、表題化合物を薄黄色の油として得た (500 g、83%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.21 (d, 1H), 4.14–4.03 (m, 1H), 3.68–3.54 (m, 7H), 3.49 (dd, 2H), 3.32 (dd, 2H), 2.49–2.30 (m, 4H), 2.21 (t, 2H), 2.10 (t, 2H), 1.53 (br. s., 4H), 1.37 (s, 18H), 1.09–1.27 (m, 12H)。

【1514】

ステップ3: 3,3'-[{2-[(12-メトキシ-12-オキソドデカノイル)アミノ]プロパン-1,3-ジイル}ビス(オキシ)]ジプロパン酸。12-オキソ-12-[(2,2,16,16-テトラメチル-4,14-ジオキソ-3,7,11,15-テトラオキサヘプタデカン-9-イル)アミノ]ドデカン酸メチル (546 g、0.950 mol) のギ酸 (2.5 L) 溶液を、TLC分析が出発物質の消費を示すまで、30~35℃で攪拌した (18時間)。混合物を濃縮して粗残渣を得、これを石油エーテル/酢酸エチル (10:1、1.5 L) 中、20℃で12時間粉碎した。得られたスラリーを濾過し、濾過ケーキを真空中で乾燥させて、表題化合物を白色固体として得た (370 g、84%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 10.02 (br. s., 2H), 6.33 (d, 1H), 4.27–4.16 (m, 1H), 3.73 (t, 4H), 3.66 (s, 3H), 3.59 (dd, 2H), 3.45 (dd, 2H), 2.59 (t, 4H), 2.30 (t, 2H), 2.20 (t, 2H), 1.66–1.53 (m, 4H), 1.26 (br. s., 12H)。

【1515】

ステップ4: 15-(13,13-ジメチル-5,11-ジオキソ-2,12-ジオキサ-6,10-ジアザテトラデカ-1-イル)-2,2-ジメチル-4,10,17-トリオキソ-3,13-ジオキサ-5,9,16-トリアザオクタコサン-28-酸メチル。1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (348 g、1.82 mol)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (205 g、1.52 mol)、及び

ジイソプロピルエチルアミン (470 g、3.64 mol) を、3,3'-[{2- [(12-メトキシ-12-オキソドデカノイル) アミノ] プロパン-1,3-ジイル} ビス (オキシ)] ジプロパン酸 (280 g、0.606 mmol) のDCM/DMF (2 L/250 mL) 攪拌溶液に0~5℃で添加した。次いで、(3-アミノプロピル) カルバミン酸tert-ブチル (243 g、1.39 mol) を4分割して、反応混合物に0~5℃で20分かけて添加した。次いで、反応物を25℃まで加温し、TLC分析が出発物質の消費を示すまで、その温度で攪拌を続けた (12時間)。反応混合物を濃縮し、得られた残渣を水 (2 L) で希釈した。次いで、混合物を酢酸エチル (2 L×1、700 mL×2) で抽出し、合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (100%酢酸エチル、続いて、10%メタノール/ジクロロメタン) によって精製して、白色固体を得、これを石油エーテル/酢酸エチル (1:2、1 L) 中、15℃で粉碎した。16時間後、スラリーを濾過し、濾過ケーキを酢酸エチル (200 mL) で洗浄し、その後、真空中で乾燥させた。得られた固体をもう1度石油エーテル/酢酸エチル (1:3、600 mL) 中、15℃で24時間粉碎した。スラリーを濾過し、濾過ケーキを酢酸エチル (200 mL) で洗浄した。ケーキを真空中で乾燥させ、表題化合物を白色固体として得た (190 g、40%)。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ ppm 7.81 (t, 2H), 7.63 (d, 1H), 6.76 (t, 2H), 4.01-3.85 (m, 1H), 3.64-3.48 (m, 7H), 3.41-3.22 (m, 4H), 3.02 (q, 4H), 2.90 (q, 4H), 2.28 (t, 6H), 2.05 (t, 2H), 1.57-1.43 (m, 8H), 1.37 (s, 18H), 1.22 (br. s., 12H)。

【1516】

ステップ5: 15-(13,13-ジメチル-5,11-ジオキソ-2,12-ジオキサ-6,10-ジアザテトラデカ-1-イル)-2,2-ジメチル-4,10,17-トリオキソ-3,13-ジオキサ-5,9,16-トリアザオクタコサン-28-酸。水酸化リチウム-水和物 (35.7 g、853 mmol) の水 (400 mL) 溶液を、15-(13,13-ジメチル-5,11-ジオキソ-2,12-ジオキサ-6,10-ジアザテトラデカ-1-イル)-2,2-ジメチル-4,10,17-トリオキソ-3,13-ジオキサ-5,9,16-トリアザオクタコサン-28-酸メチル (220 g、284 mmol) のテトラヒドロフラン (1.2 L) 攪拌溶液に20℃で添加した。次いで、TLC分析が出発物質の消費を示すまで、反応混合物を28℃まで加熱した (18時間)。反応混合物を濃縮し、得られた残渣を水 (2 L) で希釈した。次いで、混合物をジクロロメタン (1 L×2) で洗浄し、塩酸 (1 N、900 mL) でpH<4に酸性化した。混合物をジクロロメタン (1 L×2) で抽出し、合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮して、表題化合物を薄黄色のゴム状物質として得た (190 g、88%)。¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ ppm 11.97 (br. s., 1H), 7.81 (t, 2H), 7.62 (d, 1H), 6.75 (t, 2H), 3.98-3.87 (m, 1H), 3.56 (t, 4H), 3.38-3.24 (m, 4H), 3.02 (q, 4H), 2.90 (q, 4H), 2.28 (t, 4H), 2.18 (t, 2H), 2.05 (t, 2H), 1.57-1.41 (m, 8H), 1.37 (s, 18H), 1.23 (br. s., 12H)。

【1517】

ステップ6: 15-(13,13-ジメチル-5,11-ジオキソ-2,12-ジオキサ-6,10-ジアザテトラデカ-1-イル)-2,2-ジメチル-4,10,17-トリオキソ-3,13-ジオキサ-5,9,16-トリアザオクタコサン-28-酸ベンジル。炭酸カリウム (107 g、773 mmol) 及び臭化ベンジル (52.9 g、309 mmol) を、15-(13,13-ジメチル-5,11-ジオキソ-2,12-ジオキサ-6,10-ジアザテトラデカ-1-イル)-2,2-ジメチル-4,10,17-トリオキソ-3,13-ジオキサ-5,9,16-トリアザオクタコサン-28-酸 (19

6 g、258 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (800 mL) 攪拌溶液に 20 °C で添加した。次いで、TLC 分析が出発物質の消費を示すまで、反応混合物を 35 °C まで加熱した (12 時間)。混合物を水 (1.5 L) で希釈し、メチル tert-ブチルエーテル (1 L × 1, 500 mL × 2) で抽出した。合わせた有機層を 5 % 塩化リチウム水溶液 (800 mL × 2) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。得られた残渣を、最初にシリカゲルクロマトグラフィー (10 % メタノール/ジクロロメタン) によって精製し、その後、分取 HPLC (prep L-LD、Phenomenex Luna C18 250 × 80 mm × 10 μm、30 ~ 100 % アセトニトリル/水 (10 mM 重炭酸アンモニウムにより調整)、250 mL/分) によって精製して、表題化合物を白色固体として得た (100 g、46 %)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.41–7.28 (m, 5H), 6.86 (t, 2H), 6.61 (d, 1H), 5.21 (t, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.26–4.14 (m, 1H), 3.81–3.72 (m, 2H), 3.72–3.63 (m, 2H), 3.58 (dd, 2H), 3.41 (dd, 2H), 3.36–3.24 (m, 4H), 3.16 (q, 4H), 2.52–2.38 (m, 4H), 2.35 (t, 2H), 2.19 (t, 2H), 1.68–1.55 (m, 8H), 1.43 (s, 18H), 1.34–1.20 (m, 12H)。

【1518】

ステップ 7: 12-[(1,3-ビス{3-[(3-アミノプロピル)アミノ]-3-オキソプロポキシ}プロパン-2-イル)アミノ]-12-オキソドデカン酸ベンジル。15-(13,13-ジメチル-5,11-ジオキソ-2,12-ジオキサ-6,10-ジアザテトラデカ-1-イル)-2,2-ジメチル-4,10,17-トリオキソ-3,13-ジオキサ-5,9,16-トリアザオクタコサン-28-酸ベンジル (5.0 g、5.9 mmol) のジクロロメタン (35 mL) 中の攪拌溶液を氷浴中で冷却した。トリフルオロ酢酸 (8.8 mL、0.12 mol) を 15 分間かけて滴下して添加した。さらに 15 分後、氷浴を取り外し、反応物を周囲温度で 2 時間攪拌した。反応物を濃縮し、アセトニトリル (20 mL) を添加した。溶液を濃縮し、高真空ポンプで一晩乾燥させた。得られた油をジクロロメタン (125 mL) 中に溶解し、MP-Carbonate 樹脂 (Biotage) (18 g、3.1 mmol/g) を添加して、物質を遊離塩基にした。混合物を、窒素下、周囲温度で 2.5 時間攪拌した。次いで、樹脂を濾去し、ジクロロメタン (25 mL)、続いて、メタノール (25 mL) で洗浄した。合わせた濾液を濃縮し、真空中で一晩乾燥させて、表題化合物を白色固体として得た (4.1 g、定量的)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.40–7.28 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 4.17–4.06 (m, 1H), 3.70 (t, 4H), 3.46 (d, 4H), 3.30–3.28 (m, 4H, メタノールシフトと重複), 2.95 (t, 4H), 2.46 (t, 4H), 2.36 (t, 2H), 2.20 (t, 2H), 1.85 (m, 4H), 1.61 (d, 4H), 1.30 (br. s., 12H)。

【1519】

ステップ 8: 5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(アセチルアミノ)-2,3-ビス(アセチルオキシ)-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクター-1-イル]メトキシ}ペンタン酸ペンタフルオロフェニル。氷浴中に置いた 5-{[(1S,2R,3R,4R,5S)-4-(アセチルアミノ)-2,3-ビス(アセチルオキシ)-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクター-1-イル]メトキシ}ペンタン酸 tert-ブチル (0.990 g、2.04 mmol) のジクロロメタン (8 mL) 溶液に、トリフルオロ酢酸 (1.90 g、17.0 mmol) を添加し、反応物を、窒素下、周囲温度で一晩攪拌した。LCMS によって確認されたとおり、エステル脱保護は完了した [(m/z) C₁₈H₂₈NO₁₀⁺ (M+H)⁺ 418.0]。反応混合物を 0 °C まで冷却し、2,6-ルチジン (2.18 g、20.5 mmol)、続いて、トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル (0.86 g、3.06 mmol/mL) を滴下漏斗により順

10

20

30

40

50

次添加し、反応混合物を周囲温度で攪拌した。3時間後、反応物を塩酸（1 N、150 mL）の添加によってクエンチし、ジクロロメタン（200 mL）で抽出した。有機相を塩酸（1 N、3 × 150 mL）及び飽和炭酸水素ナトリウム（150 mL）で洗浄し、次いで、その後、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（25～75%酢酸エチル／ヘプタン）によって精製して、表題化合物を白色固体として得た（1.03 g、87%）。¹H NMR（600 MHz, CD₃CN）δ ppm 6.49（d, 1H）, 5.36（d, 1H）, 5.30（s, 1H）, 5.01（dd, 1H）, 4.10（t, 1H）, 3.94（d, 1H）, 3.69（dd, 2H）, 3.55–3.46（m, 2H）, 3.46–3.36（m, 1H）, 2.72（t, 2H）, 2.12（s, 3H）, 1.91（s, 3H）, 1.85（s, 3H）, 1.80–1.68（m, 2H）, 1.66–1.53（m, 2H）。LCMS（m/z）C₂₄H₂₇F₅NO₁₀⁺（M+H）⁺ 584.8；保持時間 = 0.94分（UPLC 1.5分間の方法）。

【1520】

ステップ9：1-[(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクター-1-イル]-18-{17-[(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクター-1-イル]-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデカ-1-イル}-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸ベンジル。アセトニトリル（18 mL）及びジメチルホルムアミド（8 mL）の混合物中の12-[(1, 3-ビス{3-[(3-アミノプロピル)アミノ]-3-オキソプロポキシ}プロパン-2-イル)アミノ]-12-オキソドデカン酸ベンジル（1.05 g、1.31 mmol）の懸濁液に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン（1.83 mL、10.5 mmol）を添加した。次いで、得られた混合物を5-{[(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクター-1-イル]メトキシ}ペンタン酸ペンタフルオロフェニル（1.75 g、3.00 mmol）のアセトニトリル（5 mL）溶液に添加し、反応物を、窒素下、周囲温度で2時間攪拌した。次いで、反応物を1 N塩酸（50 mL）で希釈し、ジクロロメタン（2 × 125 mL）で抽出した。合わせたジクロロメタン抽出物を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー（20～100%酢酸エチル／ヘプタン、次いで、0～30%メタノール／ジクロロメタン）によって精製して、表題化合物を白色固体として得た（1.71 g、89%）。¹H NMR（600 MHz, CD₃OD）δ ppm 7.37–7.28（m, 5H）, 5.46（d, 2H）, 5.34（s, 2H）, 5.17–5.07（m, 4H）, 4.20（d, 2H）, 4.15–4.09（m, 1H）, 4.02（d, 2H）, 3.67–3.79（m, 8H）, 3.57–3.18（m, 18H, メタノールピークと重複）, 2.45（t, 4H）, 2.38（t, 2H）, 2.25–2.12（m, 12H）, 1.96（s, 12H）, 1.76–1.48（m, 14H）, 1.43–1.25（m, 14H）。

【1521】

ステップ10：実施例32.1-[(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクター-1-イル]-18-{17-[(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2, 3-ビス(アセチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクター-1-イル]-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデカ-1-イル}-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸ベンジル（1.71 g、1.18 mmol）のメタノール（24 mL）溶液を、H-cubeの小型10%Pd/C Cartに、完全なH₂（20 bar）下、25℃及び1 mL／分の流速で通した。Cat

c a r tを追加のメタノール（10 mL）ですすぎ、フロースルーを濃縮して油にした。残渣をジクロロメタン中に溶解し、濃縮し（2×25 mL）で、粘着性の白色の泡を得た。この物質を真空ポンプで一晩乾燥させ、その後、アセトニトリル／水（3.8 mL、1：1）中に溶解し、凍結乾燥して、白色固体にした（1.52 g、95%）。¹H NMR（400 MHz，CD₃OD）δ ppm 5.44（d，2H），5.32（s，2H），5.12–5.09（m，2H），4.18（d，2H），4.13–4.10（m，1H）4.01（d，2H）3.79–3.67（m，8H），3.56–3.35（m，10H），3.26–3.14（m，8H），2.43（t，4H），2.28（t，2H），2.23–2.14（m，12H）1.97–1.92（m，12H），1.74–1.50（m，14H），1.41–1.28（m，14H）。LCMS（m/z）C₆₃H₁₀₄N₇O₂₅⁺（M+H）⁺ 1359.1；保持時間 = 0.80分（UPLC 1.5分間実施）。

【1522】

1-[(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2,3-ジヒドロキシ-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクター-1-イル]-18-{17-[(1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-(アセチルアミノ)-2,3-ジヒドロキシ-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクター-1-イル]-5,11-ジオキソ-2,16-ジオキサ-6,10-ジアザヘプタデカ-1-イル}-7,13,20-トリオキソ-2,16-ジオキサ-8,12,19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸

10

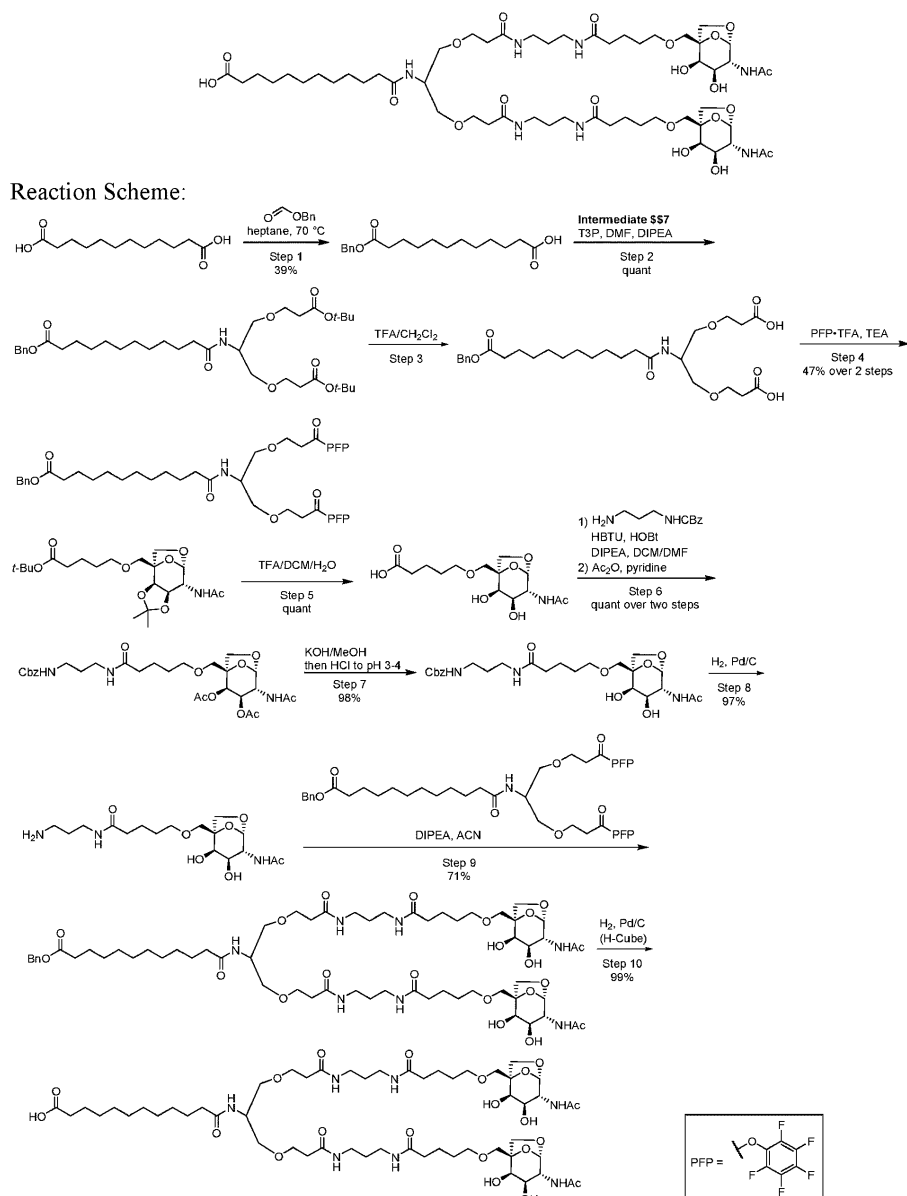
20

30

40

50

【化 2 7 8】



10

20

30

【1 5 2 3】

ステップ1：12-（ベンジルオキシ）-12-オキソドデカン酸。ドデカン二酸（15.0 g、65.0 mmol）及びDowex-H型（65 g）を、ヘプタン（0.52 L）及びギ酸ベンジル（142 g、1.04 mol、130 mL）の混合物に添加し、反応物を24時間加熱還流した。次いで、反応物を冷却し、樹脂を濾去した。濾液を真空中で濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（0～20%酢酸エチル／ヘプタン）によって精製して、どろっとした残渣を得た。単離物を一晩スラリー化した（5%酢酸エチル／ヘプタン、20 mL）。混合物を真空濾過によって濾過し、得られた固体をヘプタンで洗浄して、表題化合物を白色固体として得た（6.66 g、39%）。¹H NMR（400 MHz, CDCl₃）δ ppm 7.36（s, 5H）, 5.12（s, 2H）, 2.42–2.30（m, 4H）, 1.75–1.54（m, 4H）, 1.45–1.16（m, 12H）。

【1 5 2 4】

40

50

ステップ2: 12-オキソ-12-[(2, 2, 16, 16-テトラメチル-4, 14-ジオキソ-3, 7, 11, 15-テトラオキサヘプタデカン-9-イル)アミノ]ドデカン酸ベンジル。n-プロピルホスホン酸無水物(環状三量体)(2.3 g、3.6 mmol、2.0 mL、酢酸エチル中50%)を、ジメチルホルムアミド(8 mL)中の12-(ベンジルオキシ)-12-オキソドデカン酸(0.95 g、2.98 mmol)、3, 3'-[(2-アミノプロパン-1, 3-ジイル)ビス(オキシ)]ジプロパン酸ジ-tert-ブチル(1.03 g、2.98 mmol)及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン(1.2 g、8.9 mmol、1.6 mL)の懸濁液に添加し、反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチル(100 mL)で希釈し、塩酸(1 N、30 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム(30 mL)、及びブライン(30 mL)で洗浄した。有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮して、残渣を得、次いで、これをヘプタン(3×40 mL)と共沸して、表題化合物を固体として得た(2.0 g、100%)。¹H NMR (600 MHz, CD₃CN) δ ppm 7.41-7.31 (m, 5H), 6.34 (d, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.01 (td, 1H), 3.67-3.58 (m, 4H), 3.44 (dd, 2H), 3.36 (dd, 2H), 2.40 (t, 4H), 2.33 (t, 2H), 2.09 (t, 2H), 1.61-1.49 (m, 4H), 1.43 (s, 18H), 1.30-1.25 (m, 12H)。LCMS (m/z) C₃₆H₆₀NO₉⁺ (M+H)⁺ 650.5; 保持時間 = 1.23分 (UPLC 1.5分間の方法)

【1525】

ステップ3: 3, 3'-[(2-{[12-(ベンジルオキシ)-12-オキソドデカノイル]アミノ}プロパン-1, 3-ジイル)ビス(オキシ)]ジプロパン酸。12-オキソ-12-[(2, 2, 16, 16-テトラメチル-4, 14-ジオキソ-3, 7, 11, 15-テトラオキサヘプタデカン-9-イル)アミノ]ドデカノエート(1.60 g、2.47 mmol)のトリフルオロ酢酸(15 g、130 mmol、10.0 mL)溶液を周囲温度で一晩攪拌した。反応混合物を濃縮し、得られた残渣をジエチルエーテル(4×70 mL)と20°Cで共沸し、その後、真空中で一晩乾燥させて、表題化合物をゴム状物質として得た(4.03 g、99%、2.11当量のTFA)。¹H NMR (600 MHz, CD₃CN) δ ppm 7.52-7.24 (m, 5H), 6.89 (d, 1H), 5.14-5.04 (m, 2H), 4.15-4.01 (m, 1H), 3.65 (t, 4H), 3.49-3.46 (m, 2H), 3.44-3.41 (m, 2H), 2.50 (t, 4H), 2.33 (t, 2H), 2.21 (t, 2H), 1.57 (td, 4H), 1.23-1.32 (m, 12H)。LCMS (m/z) C₂₈H₄₄NO₉⁺ (M+H)⁺ 538.6; 保持時間 = 0.92分 (UPLC 1.5分間の方法)。

【1526】

ステップ4: 12-({1, 3-ビス[3-オキソ-3-(ペンタフルオロフェノキシ)プロポキシ]プロパン-2-イル}アミノ)-12-オキソドデカン酸ベンジル。3, 3'-[(2-{[12-(ベンジルオキシ)-12-オキソドデカノイル]アミノ}プロパン-1, 3-ジイル)ビス(オキシ)]ジプロパン酸(1.57 g、2.41 mmol、1当量のTFA)ジ-イソプロピルエチルアミン(3.11 g、24.1 mmol、4.20 mL)のジメチルホルムアミド(10 mL)懸濁液に、氷浴中で、トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル(5.40 g、19.3 mmol、3.31 mL)を滴下して添加した。得られた溶液を周囲温度で攪拌した。反応混合物を濃縮し、ヘプタン(2×20 mL)と共沸した。得られた残渣を酢酸エチル(80 mL)で希釈し、10%クエン酸(30 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム(30 mL)、及びブライン(30 mL)で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥させ、濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー(0~60%酢酸エチル/ヘプタン)によって精製して、表題化合物を固体として得た(983 mg、47%)。¹H NMR (600 MHz, CD₃CN-d₃) δ ppm 7.44-7.24 (m, 5H), 6.23 (d, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.

0.8 (td, 1H), 3.81–3.76 (m, 4H), 3.53–3.42 (m, 4H), 2.92 (t, 4H), 2.32 (t, 2H), 2.07 (t, 2H), 1.62–1.46 (m, 4H), 1.32–1.19 (m, 12H)。LCMS (m/z) $C_{40}H_{42}NO_9^+$ ($M+H$)⁺ 870.6; 保持時間 = 1.23分 (UPLC 1.5分間の方法)。

【1527】

ステップ5: 5- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ} ペンタン酸。ジクロロメタン (15mL) 及び水 (2mL) 中の5- { [(1S, 2R, 6R, 7R, 8S) - 7- (アセチルアミノ) - 4, 4-ジメチル-3, 5, 9, 11-テトラオキサトリシクロ [6.2.1.0~2, 6~] ウンデカー-1-イル] メトキシ} ペンタン酸 tert-ブチル (2.09g, 4.87mmol) の溶液に、トリフルオロ酢酸 (22g, 200mmol, 15mL) を添加し、反応混合物を周囲温度で一晩攪拌した。粗物質を濃縮し、トルエン (3×50mL)、次いで、ヘプタン (3×50mL) と共沸し、真空中で乾燥させて、表題化合物をゴム状物質として得た (2.08g、定量的、0.83当量のTFA)。LCMS (m/z) $C_{14}H_{24}NO_8^+$ ($M+H$)⁺ 334.2; 保持時間 = 0.45分 (UPLC 1.5分間の方法)

【1528】

ステップ6: (1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 1- (3, 9-ジオキソ-1-フェニル-2, 14-ジオキサ-4, 8-ジアザペンタデカン-15-イル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-2, 3-ジイルジアセテート。ジクロロメタン (12mL) 及びジメチルホルムアミド (5mL) 中の約1当量のTFA (1.0g, 2.05mmol) を含有する5- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ} ペンタン酸の溶液に、ジ-イソプロピルエチルアミン (1.59g, 12.3mmol)、o- (ベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (0.93g, 2.46mmol) 及び1H-ベンゾトリアゾール-1-オール (277mg, 2.05mmol) を添加した。濁った混合物を室温で20分間攪拌した。次いで、n- (3-アミノプロピル) カルバミン酸ベンジル塩酸塩 (502mg, 2mmol) を添加した。得られた混合物を周囲温度で一晩攪拌した。アミド生成物の形成をLCMSによって確認した [$C_{25}H_{38}N_3O_9^+$, ($M+H$)⁺ 524.5]。反応混合物を5mLに濃縮し、ピリジン (6mL) で希釈した。この溶液に無水酢酸 (6.0g, 60mmol) を添加し、反応混合物を50℃で一晩攪拌した。反応混合物を室温まで冷却し、酢酸エチル (70mL) で希釈し、塩酸 (1N, 30mL)、飽和炭酸水素ナトリウム (30mL)、及びブライン (30mL) で洗浄した。分離した有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー (0~15%メタノール/ジクロロメタン) によって精製して、表題化合物をガラス状物質として得た (1.28g, 100%)。LCMS (m/z) $C_{29}H_{42}N_3O_{11}^+$, ($M+H$)⁺ 608.5; 保持時間 = 0.70分 (UPLC 1.5分間の方法)

【1529】

ステップ7: {3- [(5- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ} ペンタノイル) アミノ] プロピル} カルバミン酸ベンジル。 (1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 1- (3, 9-ジオキソ-1-フェニル-2, 14-ジオキサ-4, 8-ジアザペンタデカン-15-イル) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-2, 3-ジイルジアセテート (1.5g, 2.47mmol) のメタノール (8mL) 懸濁液に水酸化カリウム (メタノール中1M, 5.3mL, 5.3mmol) を添加した。反応混合物を室温で1時間攪拌した。次いで、反応混合物を塩酸 (ジオキサン中4.0M, 1.5mL) の滴下で処理した。得られたス

ラリーを濃縮し、エタノール（15 mL）中で10分間粉碎した。得られた塩化カリウム沈殿物を濾過によって除去し、エタノール（5 mL）ですすいだ。濾液を濃縮し、真空により乾燥させて、表題化合物をゴム状物質として得た（1.28 g、98%）。¹H NMR（600 MHz，MATHANOL-d₄）δ ppm 7.41–7.25（m，5H），5.21（s，1H），5.07（s，2H），3.93（dd，2H），3.86（d，1H），3.77（d，1H），3.71（dd，1H），3.65（d，1H），3.58（d，1H），3.53–3.46（m，2H），3.20（t，2H），3.15（t，2H），2.20（t，2H），1.99（s，3H），1.70–1.62（m，4H），1.61–1.53（m，2H）。LCMS（m/z）C₂₅H₃₈N₃O₉⁺，（M+H）⁺ 524.5；保持時間 = 0.64分（UPLC 1.5分間の方法）

10

【1530】

ステップ8：5- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ } -N- (3-アミノプロピル) ペンタンアミド。メタノール（20 mL）中の { 3- [(5- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ } ペンタノイル) アミノ] プロピル } カルバミン酸ベンジル（1.60 g、2.4 mmol）及び10%パラジウム炭素（200 mg）の混合物を、Parr反応器で、水素圧力（50 psi）下、周囲温度で一晩攪拌した。反応混合物をセライトに通して濾過した。セライトをメタノール（50 mL）で洗浄し、合わせた濾液を濃縮し、真空中で乾燥させて、表題化合物を固体として得た（925 mg、97%）。¹H NMR（600 MHz，MATHANOL-d₄）δ ppm 5.21（s，1H），3.94（d，1H），3.90（d，1H），3.86（d，1H），3.77（d，1H），3.71（dd，1H），3.65（d，1H），3.61（d，1H），3.58–3.46（m，2H），3.26（t，2H），2.82（t，2H），2.22（t，2H），1.99（s，3H），1.76（quin，2H），1.68（quin，2H），1.63–1.56（m，2H）。LCMS（m/z）C₁₇H₃₂N₃O₇⁺，（M+H）⁺ 390.5；保持時間 = 0.47分（UPLC 1.5分間の方法）

20

30

【1531】

ステップ9：1- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] -18- { 17- [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] -5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデカ-1-イル } -7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸ベンジル。ジクロロメタン（8 mL）及びジメチルホルムアミド（3 mL）の混合物中の5- { [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) - 4- (アセチルアミノ) - 2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ } -N- (3-アミノプロピル) ペンタンアミド（607 mg、1.40 mmol）及び12- ({ 1, 3-ビス [3-オキソ-3- (ペンタフルオロフェノキシ) プロポキシ] プロパン-2-イル } アミノ) -12-オキソドデカン酸ベンジル（500 mg、0.58 mmol）、及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン（200 mg、2.0 mmol）の混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を濃縮し、ヘプタン（3×10 mL）と共沸し、濃縮した。粗残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（0～40%メタノール／ジクロロメタン）によって精製して、表題化合物をガラス状物質として得た（520 mg、71%）。¹H NMR（600 MHz，メタノール-d₄）δ ppm 7.37–7.29（m，5H），5.21（s，2H），5.11（s，2H），4.11（t，1H），3.94（dd，4H），3.87（d，2H），3.77（d，

40

50

2 H), 3.75–3.67 (m, 6 H), 3.64 (d, 2 H), 3.57 (d, 2 H), 3.55–3.42 (m, 8 H), 3.23–3.19 (m, 8 H), 2.43 (t, 4 H), 2.36 (t, 2 H), 2.20 (q, 6 H), 1.98 (s, 6 H), 1.72–1.54 (m, 16 H), 1.35–1.28 (m, 12 H)。LCMS $C_{62}H_{102}N_7O_{21}^+$, $(M+H)^+ 1280.3$; 保持時間 = 1.45 分 (UPLC 3 分間の方法)

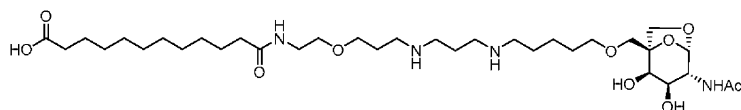
【1532】

ステップ10: 実施例33.1 – [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) – 4 – (アセチルアミノ) – 2, 3 – ジヒドロキシ – 6, 8 – ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター – 1 – イル] – 18, 18 – ビス {17 – [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) – 4 – (アセチルアミノ) – 2, 3 – ジヒドロキシ – 6, 8 – ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター – 1 – イル] – 5, 11 – ジオキソ – 2, 16 – ジオキサ – 6, 10 – ジアザヘプタデカー – 1 – イル} – 7, 13, 20 – トリオキソ – 2, 16 – ジオキサ – 8, 12, 19 – トリアザヘントリアコンタン – 31 – 酸。1 – [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) – 4 – (アセチルアミノ) – 2, 3 – ジヒドロキシ – 6, 8 – ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター – 1 – イル] – 18 – {17 – [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) – 4 – (アセチルアミノ) – 2, 3 – ジヒドロキシ – 6, 8 – ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター – 1 – イル] – 5, 11 – ジオキソ – 2, 16 – ジオキサ – 6, 10 – ジアザヘプタデカー – 1 – イル} – 7, 13, 20 – トリオキソ – 2, 16 – ジオキサ – 8, 12, 19 – トリアザヘントリアコンタン – 31 – 酸ベンジル (520 mg、0.41 mmol) のメタノール (16 mL) 溶液を、ThalesNano H-Cube Pro (商標) の 10% Pd/C 30×4 Cat Cart (登録商標) に、完全な H_2 下、25°C、1 mL / 分の流速で通した。系をメタノール (20 mL) ですすいだ。濾液を濃縮し、塩化メチレン (20 mL)、次いで、ヘプタン (20 mL) と共沸した。得られた残渣をアセトニトリル / 水 (1:1, 20 mL) 中に溶解し、凍結乾燥して、表題化合物を白色固体として得た (477 mg、99%)。 ^1H NMR (600 MHz, メタノール- d_4) δ ppm 5.21 (s, 2 H), 4.11 (t, 1 H), 3.98–3.87 (m, 4 H), 3.87 (d, 2 H), 3.78 (d, 2 H), 3.74–3.67 (m, 6 H), 3.65 (d, 2 H), 3.58 (d, 2 H), 3.55–3.45 (m, 8 H), 3.21 (q, 8 H), 2.43 (t, 4 H), 2.27 (t, 2 H), 2.23–2.16 (m, 6 H), 1.99 (s, 6 H), 1.72–1.62 (m, 8 H), 1.63–1.54 (m, 8 H), 1.35–1.28 (m, 12 H)。LCMS (m/z) $C_{55}H_{96}N_7O_{21}^+$, $(M+H)^+ 1190.7$; 保持時間 = 1.07 分 (UPLC 3 分間の方法)。

【1533】

1 – [(1S, 2R, 3R, 4R, 5S) – 4 – (アセチルアミノ) – 2, 3 – ジヒドロキシ – 6, 8 – ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター – 1 – イル] – 7, 13, 20 – トリオキソ – 2, 16 – ジオキサ – 8, 12, 19 – トリアザヘントリアコンタン – 31 – 酸

【化279】



反応スキーム：

10

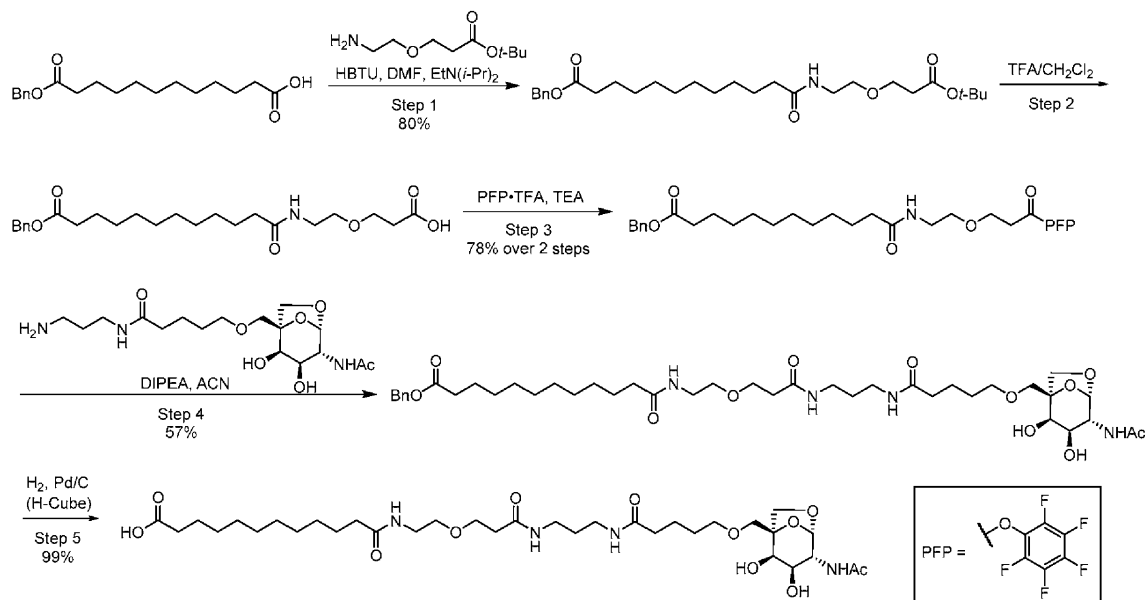
20

30

40

50

【化 2 8 0】



10

【1 5 3 4】

ステップ1：12- { [2- (3-tert-ブトキシ-3-オキソプロポキシ) エチル] アミノ} -12-オキソドデカン酸ベンジル。12-ベンジルオキシ-12-オキソデセカン酸 (2.33 g、7.26 mmol)、3- (2-アミノエトキシ) プロパン酸 tert-ブチル (1.25 g、6.60 mmol) 及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン (2.3 ml、13 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (35 mL) 中に溶解した。この溶液に、N,N,N',N'-テトラメチル-O- (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) ウロニウムヘキサフルオロホスフェート、O- (ベンゾトリアゾール-1-イル) -N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (2.75 g、7.26 mmol) を添加し、反応物を周囲温度で16時間攪拌した。反応物を濃縮し、残渣を酢酸エチル (100 mL) 中に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム、水、及びブライン (それぞれ25 mL) で順次洗浄した。次いで、有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮し、無色の油にした。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (0~100% 酢酸エチル/ヘプタン) によって精製して、所望の生成物を白色固体として得た (2.58 g、80%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.41-7.30 (m, 5H), 6.18 (br. s., 1H), 5.12 (s, 2H), 3.69 (t, 2H), 3.57-3.51 (m, 2H), 3.49-3.42 (m, 2H), 2.49 (t, 2H), 2.36 (t, 2H), 2.23-2.14 (m, 2H), 1.63 (d, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.36-1.22 (m, 12H)。

20

30

【1 5 3 5】

ステップ2：3- (2- { [12- (ベンジルオキシ) -12-オキソデカノイル] アミノ} エトキシ) プロパン酸。12- { [2- (3-tert-ブトキシ-3-オキソプロポキシ) エチル] アミノ} -12-オキソドデカン酸ベンジル (2.58 g、5.25 mmol) をジクロロメタン (12 mL) 中に溶解した。これにトリフルオロ酢酸 (20 mL、0.27 mol) を添加した。周囲温度で2時間攪拌した後、反応物を濃縮した。得られた残渣をトルエン中に溶解し、濃縮し (2×20 mL)、その後、真空ポンプで乾燥させて、固体を得た (2.21 g)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.41-7.30 (m, 5H) 6.08 (br. s., 1H) 5.12 (s, 2H) 3.74 (t, 2H) 3.61-3.51 (m, 2H) 3.50-3.40 (m, 2H) 2.64 (t, 2H) 2.36 (t, 2H) 2.25-2.11

40

50

(m, 2H) 1.72–1.54 (m, 4H) 1.27 (m, 12H)。

【1536】

ステップ3：12-オキソ-12-（{2- [3-オキソ-3-（ペンタフルオロフェノキシ）プロポキシ] エチル} アミノ）ドデカン酸ベンジル。N，N-ジイソプロピルエチルアミン（3.52 mL、20.2 mmol）を3-（2- { [12-（ベンジルオキシ）-12-オキソドデカノイル] アミノ} エトキシ）プロパン酸（2.20 g、5.05 mmol）のジメチルホルムアミド（24 mL）溶液に添加した。次いで、これに、ペンタフルオロフェノール-2，2，2-トリフルオロアセテート（1.74 mL、10.1 mmol）をゆっくりとした流れで添加した。反応物は色が紫色に変化し、これを周囲温度で18時間攪拌した。反応混合物をロータリーエバポレーター（50℃、高真空ポンプ）で1/3の体積に濃縮し、得られた濃縮物を酢酸エチル（300 mL）で希釈し、10%クエン酸（100 mL）、飽和炭酸水素ナトリウム（100 mL）及びブライン（100 mL）で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（0～100%酢酸エチル／ヘプタン）によって精製して、所望の生成物を黄色固体として得た（2.46 g、2ステップで78%）。¹H NMR（400 MHz，CDCl₃）δ ppm 7.41–7.30（m，5H），5.85（br. s.，1H）5.12（s，2H），3.85（t，2H），3.64–3.54（m，2H），3.52–3.43（m，2H），2.94（t，2H），2.36（t，2H），2.16（t，2H），1.70–1.60（m，4H），1.26（m，12H）。

【1537】

ステップ4：1- [（1S，2R，3R，4R，5S）-4-（アセチルアミノ）-2，3-ジヒドロキシ-6，8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] -20-オキソ-2，16-ジオキサ-8，12，19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸ベンジル。ジクロロメタン（3.3 mL）及びジメチルホルムアミド（0.7 mL）の混合液中の5- { [（1S，2R，3R，4R，5S）-4-（アセチルアミノ）-2，3-ジヒドロキシ-6，8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] メトキシ} -N-（3-アミノプロピル）ペンタンアミド（172 mg、0.440 mmol）及び12-オキソ-12-（{2- [3-オキソ-3-（ペンタフルオロフェノキシ）プロポキシ] エチル} アミノ）ドデカン酸ベンジル（220 mg、0.402 mmol）、N，N-ジイソプロピルエチルアミン（95 mg、0.73 mmol）の混合物を、室温で一晩攪拌した。反応混合物を濃縮し、ヘプタン（3×10 mL）と共沸し、濃縮した。粗物質をシリカゲルクロマトグラフィー（0～25%メタノール／ジクロロメタン）によって精製して、表題化合物を油として得た（185 mg、57%）。¹H NMR（600 MHz，メタノール-d₄）δ ppm 7.39–7.28（m，5H），5.21（s，1H），5.11（s，2H），3.99–3.89（m，2H），3.87（d，1H），3.77（d，1H），3.75–3.67（m，3H），3.64（d，1H），3.57（d，1H），3.55–3.44（m，4H），3.38–3.32（m，2H），3.26–3.16（m，4H），2.44（t，2H），2.36（t，2H），2.19（td，4H），1.99（s，3H），1.70–1.55（m，10H），1.33–1.25（m，12H）。LC MS（m/z）C₄₁H₆₇N₄O₁₂⁺，（M+H）⁺ 807.8；保持時間 = 1.60分（UPLC 3分間の方法）。

【1538】

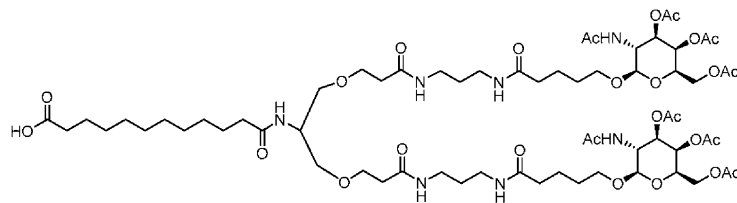
ステップ5：実施例34.1- [（1S，2R，3R，4R，5S）-4-（アセチルアミノ）-2，3-ジヒドロキシ-6，8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクター-1-イル] -20-オキソ-2，16-ジオキサ-8，12，19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸ベンジル（0.22 g、0.25 mmol）のメタノール（22 mL）溶液を、ThalesNano H-Cube Pro（商標）の10% Pd/C 30×4 Cat Cart（登録商標）に、完全なH₂下、25℃、1 mL／分の流速で通した

。系をメタノール（４０ｍＬ）ですすいだ。濾液を濃縮し、塩化メチレン（２０ｍＬ）、次いで、ヘプタン（２０ｍＬ）と共沸した。得られた残渣をアセトニトリル／水（１：１、２０ｍＬ）中に溶解し、凍結乾燥して、表題化合物を白色固体として得た（１７７ｍｇ、９９％）。¹H NMR（６００ MHz，メタノール-*d*₄） δ ppm ５．２０（s，１H），４．０１－３．８９（m，２H），３．８７（d，１H），３．７７（d，１H），３．７５－３．６８（m，３H），３．６５（d，１H），３．５７（d，１H），３．５５－３．４５（m，４H），３．３４（t，２H），３．２７－３．１４（m，４H），２．４４（t，２H），２．２８（t，２H），２．２０（td，４H），１．９８（s，３H），１．６７（t，４H），１．６３－１．５４（m，６H），１．３５－１．２８（m，１２H）。C₃₄H₆₁N₄O₁₂⁺，（M+H）⁺ 717.7；保持時間＝１．１２分（UPCL ３分間の方法）。

【１５３９】

５，１１，１８－トリオキソ－１６－{ [３－オキソ－３－（{３－[（５－{ [３，４，６－トリ－Ｏ－アセチル－２－（アセチルアミノ）－２－デオキシ－ β －D－ガラクトピラノシル] オキシ} ペンタノイル）アミノ] プロピル} アミノ）プロポキシ] メチル}－１－{ [３，４，６－トリ－Ｏ－アセチル－２－（アセチルアミノ）－２－デオキシ－ β －D－ガラクトピラノシル] オキシ}－１４－オキサ－６，１０，１７－トリアザノナコサン－２９－酸

【化２８１】



反応スキーム：

10

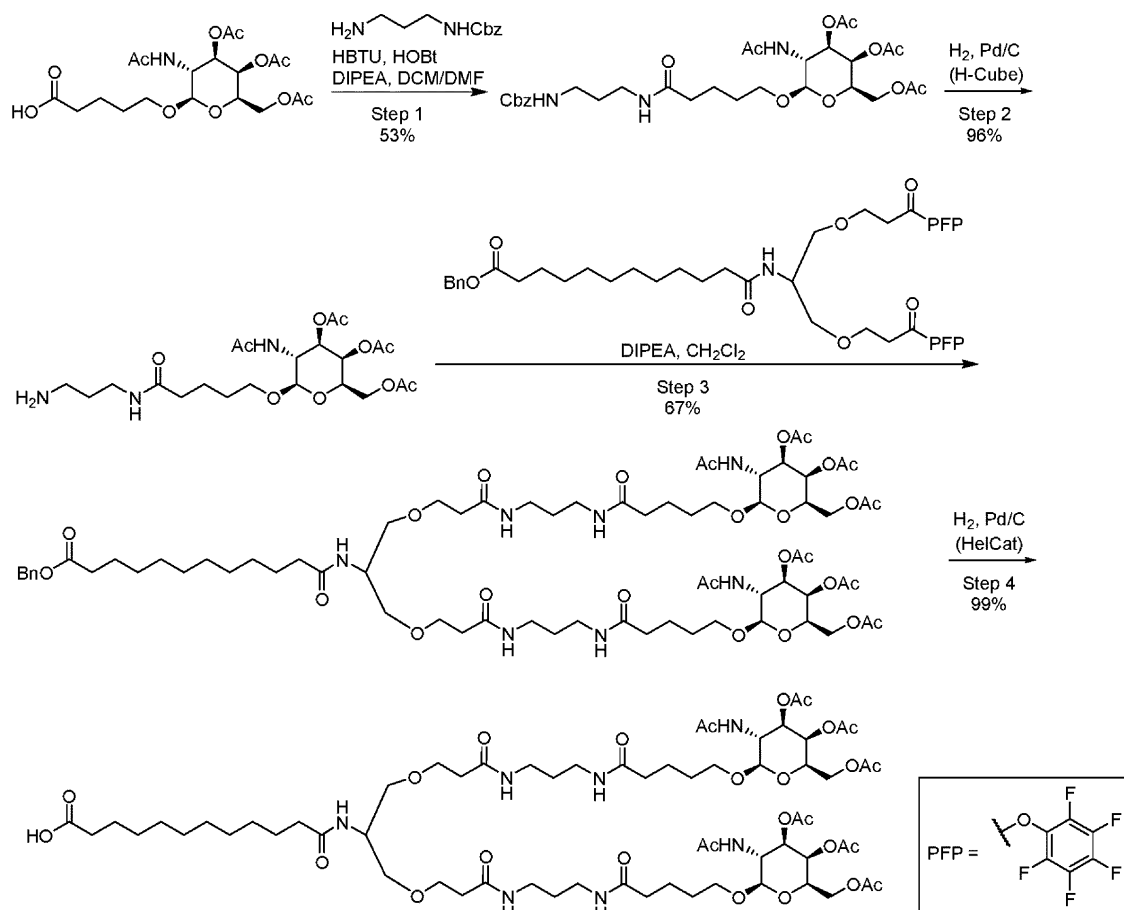
20

30

40

50

【化 2 8 2】



【1 5 4 0】

ステップ1：{3-[(5-{[3, 4, 6-トリ-*O*-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}ペンタノイル)アミノ]プロピル}カルバミン酸ベンジル。N, N-ジイソプロピルエチルアミン(1.38 mL、7.95 mmol)を、(3-アミノプロピル)カルバミン酸ベンジル塩酸塩(0.713 g、2.01 mmol)のN, N-ジメチルホルムアミド(3.5 mL)溶液に添加した。次いで、得られた混合物を5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタン酸(1.19 g、2.65 mmol)のジメチルホルムアミド(10 mL)溶液に添加した。次いで、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3-トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスフェート(1.11 g、2.91 mmol)を添加し、反応混合物を、窒素雰囲気下、周囲温度で攪拌した(2.5時間)。反応物を飽和塩化アンモニウム(50 mL)でクエンチし、ジクロロメタン(4×75 mL)で抽出した。合わせた有機層をブライン(50 mL)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。得られた油をシリカゲルクロマトグラフィー(2~6%メタノール/ジクロロメタン)によって精製して、所望の生成物を白色の泡として得た(0.904 g、53%)。¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7.41-7.25 (m, 5H), 5.33 (d, 1H), 5.12-5.02 (m, 3H), 4.54 (d, 1H), 4.19-4.03 (m, 3H), 4.03-3.97 (m, 1H), 3.91-3.82 (m, 1H), 3.60-3.46 (m, 2H), 3.11-3.25 (m, 4H), 2.16-2.23 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.02 (s, 3H),

1.95 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.73–1.53 (m, 6H), 1.40–1.34 (m, 2H)。

【1541】

ステップ2：N-(3-アミノプロピル)-5-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}ペンタンアミド酢酸塩。{3-[(5-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}ペンタノイル)アミノ]プロピル}カルバミン酸ベンジル

5-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}ペンタン酸 (1.01g、1.59mmol) をメタノール (30mL) 及び氷酢酸 (91μL、1.6mmol) の混合物中に溶解した。これに、10% Pd/C (0.2g、湿潤) を窒素下で添加し、反応混合物を、50psiの水素下で、密閉攪拌 Parr 反応器中に置いた。16時間後、ヘッドスペースを窒素 (×4) でパージし、0.45μm ナイロンシリンジフィルターを通して濾過した。フィルターをメタノールで洗浄し、合わせた濾液を濃縮して、表題化合物を白色の泡として得た (0.86gmg、96%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 5.34 (d, 1H), 5.06–5.02 (m, 1H), 4.52 (d, 1H), 4.19–4.05 (m, 3H), 4.04–3.98 (m, 1H), 3.92–3.84 (m, 1H), 3.56–3.47 (m, 1H), 2.98–2.89 (m, 2H), 2.23 (t, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.06 (d, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.94 (d, 5H), 1.91 (s, 3H), 1.83 (m, 2H), 1.74–1.54 (m, 4H), 1.39–1.31 (m, 1H)。

【1542】

ステップ3：5, 11, 18-トリオキソ-16-{[3-オキソ-3-({3-[(5-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}ペンタノイル)アミノ]プロピル}アミノ)プロポキシ]メチル}-1-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}-14-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-酸ベンジル。

12-({1, 3-ビス [3-オキソ-3-(ペンタフルオロフェノキシ)プロポキシ]プロパン-2-イル}アミノ)-12-オキソドデカン酸ベンジル (150mg、0.172mmol)、N-(3-アミノプロピル)-5-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}ペンタンアミド酢酸塩 (233mg、0.414mmol) 及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.15mL、0.862mmol) をジクロロメタン (3.5mL) 中に溶解し、周囲温度で64時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、ヘプタンを添加し、残渣をもう1度濃縮した (×3)。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (4~14% メタノール/ジクロロメタン) によって精製して、所望の生成物を無色のガラス状物質として得た (175mg、67%)。次いで、化合物をアセトニトリル及び水 (1:1、30mL) の混合物中に溶解し、凍結乾燥して、白色固体を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.42–7.37 (m, 5H), 7.15 (br. s., 2H), 6.94–6.84 (m, 3H), 6.51–6.45 (m, 2H), 5.38 (d, 2H), 5.20 (d, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.65–4.57 (m, 2H), 4.27–4.06 (m, 8H), 4.02–3.90 (m, 4H), 3.73 (br. s., 6H), 3.63–3.42 (m, 8H), 3.37–3.26 (m, 8H), 2.47 (br. s., 5H), 2.38 (t, 3H), 2.34–2.15 (m, 15H), 2.12 (s, 6H), 2.03 (s, 6H), 1.98 (s, 6H), 1.78 (br. s., 4H), 1.28 (d, 14H)。

【1543】

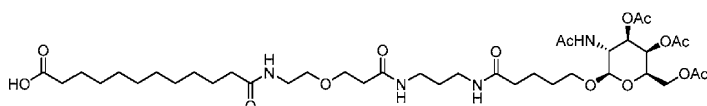
ステップ4：実施例35．10% Pd/C (30mg、湿潤)を、ベンジル-5, 11, 18-トリオキソ-16- { [3-オキソ-3- ({3- [(5- { [3, 4, 6-トリ-
 リ- O -アセチル-2- (アセチルアミノ)-2-デオキシ- β -D-ガラクトピラノシル]
 オキシ} ペンタノイル) アミノ] プロピル} アミノ] プロボキシ] メチル} -1- {
 [3, 4, 6-トリ- O -アセチル-2- (アセチルアミノ)-2-デオキシ- β -D-
 ガラクトピラノシル] オキシ} -14-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-
 29-酸 (282mg、0.187mmol) のメタノール (5mL) 溶液に添加した。
 混合物を、50psiの水素下、HelCat中に置き、周囲温度で16時間攪拌した。
 次いで、ヘッドスペースを窒素 ($\times 3$) でパージし、溶液を0.2 μm ナイロンシリンジ
 フィルターに通して濾過した。フィルターをメタノールで洗浄し、合わせた濾液を濃縮し
 て、表題化合物を白色の泡として得、次いで、これをアセトニトリル及び水 (1:1、2
 0mL) の混合物中に溶解し、凍結乾燥して、白色固体を得た (262mg、99%)。
 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 5.33 (d, 2H), 5.08-5.04 (m, 2H), 4.55 (d, 2H) 4.21-3.98 (m, 10
 H), 3.91-3.83 (m, 2H), 3.69 (t, 4H) 3.60-3.44 (m, 8H), 3.24-3.19 (m, 8H), 2.43 (t, 4H), 2.3
 1-2.16 (m, 8H), 2.14 (s, 6H), 2.06-2.00 (m, 6H), 1.94 (d, 10H), 1.73-1.55 (m, 15H), 1.40-
 1.28 (m, 12H)。LCMS (m/z) $\text{C}_{65}\text{H}_{108}\text{N}_7\text{O}_{27}^+$ ($M+H$)
 $+ 1419.7$; 保持時間 = 1.34分 (UPLC 3.0分間実施)

10

20

【1544】

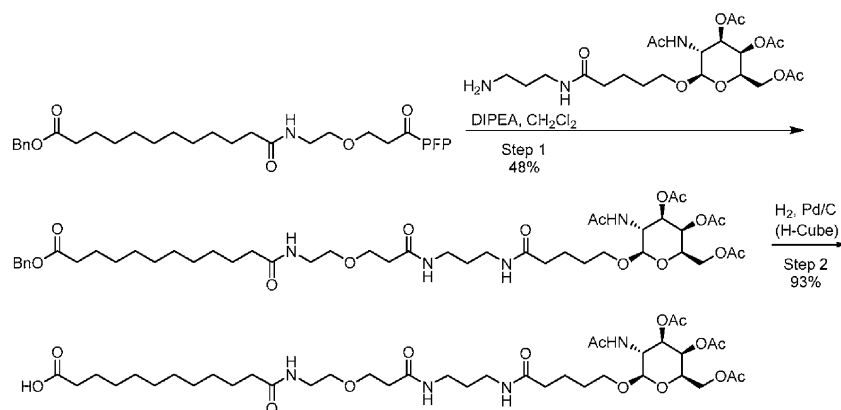
5, 11, 18-トリオキソ-1- { [3, 4, 6-トリ- O -アセチル-2- (アセ
 チルアミノ)-2-デオキシ- β -D-ガラクトピラノシル] オキシ} -14-オキサ-
 6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-酸
 【化283】



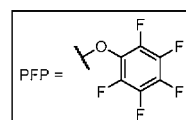
30

反応スキーム：

【化284】



40



【1545】

ステップ1：5, 11, 18-トリオキソ-1- { [3, 4, 6-トリ- O -アセチル
 -2- (アセチルアミノ)-2-デオキシ- β -D-ガラクトピラノシル] オキシ} -1

50

4-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-酸ベンジル。N-(3-アミノプロピル)-5-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}ペンタンアミド酢酸塩(159 mg、0.264 mmol)を、12-オキソ-12-(2-[3-オキソ-3-(ペンタフルオロフェノキシ)プロポキシ]エチル)アミノ)ドデカン酸ベンジル(164 mg、0.291 mmol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(200 µL、1.32 mmol)のジクロロメタン(5 mL)溶液に添加し、反応物を周囲温度で16時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、得られた残渣をヘプタンに取り込み、濃縮した(3×10 mL)。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(0~10%メタノール/ジクロロメタン)によって精製して、表題化合物を無色のガラス状物質として得た(116 mg、48%)。LCMS (m/z) C₄₈H₇₂N₄O₁₅⁺ (M+H)⁺ 921.8; 保持時間 = 0.91分 (UPLC 1.3分間実施)。

【1546】

ステップ2: 実施例36. 10% Pd/C (25 mg、湿潤)を、5, 11, 18-トリオキソ-1-{[3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ}-14-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-酸ベンジル(196 mg、0.213 mmol)のメタノール(5 mL)中溶液に窒素下で添加した。反応物を、50 psiの水素下、Hel Cat中に置き、周囲温度で16時間攪拌した。ヘッドスペースを窒素(×3)でパージし、溶液を0.2 µmナイロンシリンジフィルターに通して濾過した。フィルターをメタノールで洗浄し、合わせた濾液を濃縮して、表題化合物を無色のガラス状物質として得、次いで、これを、アセトニトリル及び水(1:1、20 mL)の混合物中に溶解し、凍結乾燥して、白色固体を得た(165 mg、93%)。1H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 8.01-7.91 (m, 1H), 5.33 (d, 1H), 5.06 (m, 1H), 4.55 (d, 1H), 4.19-3.98 (m, 4H), 3.91-3.84 (m, 1H), 3.76-3.67 (m, 2H), 3.57-3.47 (m, 4H), 3.25-3.18 (m, 4H), 2.44 (t, 2H), 2.30-2.16 (m, 6H), 2.14 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.73-1.54 (m, 10H), 1.39-1.28 (m, 12H)。LCMS (m/z) C₃₉H₆₇N₄O₁₅⁺ (M+H)⁺ 831.8; 保持時間 = 1.30分 (UPLC 3.0分間実施)。

【1547】

実施例37. オリゴヌクレオチドの合成

様々なオリゴヌクレオチドの合成を本明細書に記載する。WVオリゴヌクレオチドの名称後の、10進数に続く2桁の数字は、バッチ番号を示す。例えば、WV-7107.03は、WV-7107のバッチ03を示す。

【1548】

実施例37A. WV-7107及びWV-6558の合成。

配列5'-Mod001L001Aeo*SGeom5CeoTeoTeo*RC*ST*ST*SG*RT*SC*SC*RA*SG*SC*RTeoTeoTeoAeo*STeo-3'を有するWV-6558は、配列5'-L001Aeo*SGeom5CeoTeoTeo*RC*ST*ST*SG*RT*SC*SC*RA*SG*SC*RTeoTeoTeoAeo*STeo-3'を有するWV-7107のGalNAc複合体である。GalNAc複合化ステップをWV-7107上で実施し、WV-6558を作製する。

【1549】

WV-7107の固相合成:

WV-7107の合成を、3300 µmol規模で6.0 cm径ステンレス鋼カラムリアクターを使用し、CPG支持体(負荷72 µmol/g)を使用してAKTA OP100合成装置(GE healthcare)上で実施した。プロセスは5つのステップ

、すなわち、脱トリチル、カップリング、キャッピング1、酸化／チオール化及びキャッピング2からなる。

【1550】

脱トリチルを、3% DCAのトルエン溶液を使用して、436 nmに設定したUVウォッチコマンドを用いて実施した。脱トリチル後、少なくとも4カラム体積(CV)のACNを使用して脱トリチル試薬を洗浄した。

全てのホスホラミダイトならびに活性化剤溶液(CMIT及びETT)を調製し、3 Åモレキュラーシーブ上で合成前に少なくとも4時間乾燥させた。

【1551】

立体規定的アミダイトカップリングを、0.2 Mアミダイト溶液及び0.6 M CMITを使用して実施した。イソブチロニトリル(IBN)中に溶解させたdC-L及びdC-Dアミダイトを除いて、全てのアミダイトをACN中に溶解させた。立体規定MOEアミダイトを、20% IBN/ACN v/v中に溶解させた。CMITをACN中に溶解させた。4当量を使用して、カップリングを、40% (体積)の各々のアミダイト溶液と67%のCMIT活性化剤とをカラムに添加する前にインラインで混合することによって実施した。次いで、カップリング混合物を最低でも10分間再循環し、カップリング効率を最大化した。

【1552】

標準的な立体不規則的アミダイトカップリングを、0.2 Mアミダイト溶液及び0.6 M ETTのACN溶液を使用して実施した。MOE-Tアミダイトを、20% IBN/ACN v/vで溶解させた。4当量を使用して、カップリングを、40% (体積)の各々のアミダイト溶液と60%のETT活性化剤とをカラムに添加する前にインラインで混合することによって実施した。次いで、カップリング混合物を最低でも6分間再循環し、カップリング効率を最大化した。

【1553】

両方の場合のカップリング後、カラムを2 CVのACNで洗浄した。

立体規定カップリングのために、次いでカラムを1 CVのキャッピング1溶液(無水酢酸、ルチジン、ACN)混合物で処理し、キラル補助アミンを4分でアセチル化した。このステップ後、カラムを少なくとも2 CVのACNで洗浄した。次いでチオール化を、2 CVの0.2 Mキサンタンヒドリドのピリジン溶液を用いて6分の接触時間で実施した。ACNを使用した2 CVのチオール化洗浄ステップ後、キャッピング2を、0.5 CVのキャッピングA及びキャッピングB試薬のインライン混合物(1:1)を使用して実施し、続いて2 CVのACNで洗浄した。

【1554】

立体不規則的カップリングサイクルについては、キャッピング1ステップはない。酸化を、50 mMヨウ素の／ピリジン／H₂O (9:1)溶液を使用し、2.5分間及び3.5当量で実施した。2 CVのACN洗浄後、キャッピング2を、0.5 CVのキャッピングA及びキャッピングB試薬のインライン混合物(1:1)を使用して実施し、続いて2 CVのACNで洗浄した。

【1555】

WV-7107の切断及び脱保護:

上で合成した物質の67% (または2200 µmol)をこのステップで使用した。WV-7107上のDPSE補助基を、DMSO、水、TEA及びTEA・3HFを39:8:1:2.5のv/v比で混合することにより、オリゴ1 mmol当たり100 mL溶液となるように作製した1 MのTEA・HF溶液でオリゴ結合固体支持体を処理することによって除去した。次いで、混合物を25℃で6時間、インキュベーターシェーカー中で振盪した。混合物を冷却(氷浴)し、次いでオリゴ1 mmol当たり200 mLのアンモニア水を添加した。次いで、混合物を45℃で16時間振盪した。次いで、混合物を濾過し(0.2~1.2 µmフィルター)、ケーキを水ですすいだ。濾液を得て、UPLCによって分析し、30.8% FLPの純度を得た。定量を、Nano Drop one分光

10

20

30

40

50

光度計 (Thermo Scientific) を使用して実施し、約 101,200 OD/mmole の収量を得た。

【1556】

WV-7107 の精製及び脱塩：

粗 WV-7107 を、Source 15Q (GE healthcare) を充填した Agilent Load&Lock カラム (5cm×32cm) 上に負荷した。精製を、20mM NaOH 及び 2.5M NaCl を溶出液として使用し、AKTA 150 Pure (GE Healthcare) 上で実施した。画分を分析してプールし、純度 70% 以上の物質を得た。次いで、精製した物質を 2K 再生セルロース膜上で脱塩し、続いて凍結乾燥して WV-7107 を白色粉末として得た。次いで、本物質を複合化実験に使用した。

10

【1557】

実施例 37B. WV-6558 の合成

GalNAc 複合化のプロトコール

前駆体物質：WV-7107.03

最終複合化生成物：WV-6558.03

複合化の試薬

【表 92】

20

オリゴヌクレオチド ／試薬	分子量	オリゴヌクレオチド に対する当量	mg	μ L	μ モル
WV-7107.03	7191.7	1	400	—	55.62
トリアンテナ型 GalNAc ロット：GL-N12-26	2005	1.6	178.4	—	88.99
HATU P/N Sigma 445460 ロット：MKBV8272V	382	1.4	29.75	—	77.87
DIEA P/N Sigma 387649 ロット：SHBG2052V	129	10.0	—	98.83	556.2
アセトニトリル	—	—	—	4000	—

30

表 2：オリゴヌクレオチド水溶液

【表 93】

40

オリゴヌクレオチド ／溶媒	濃度 (mg/mL)	総体積 (mL)	総 mg
WV-7107.01 の水溶液	50	8	400

1-((2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-16

50

、16-ビス（（3-（（3-（5-（（（2R，3R，4R，5R，6R）-3-アセトアミド-4，5-ジアセトキシ-6-（アセトキシメチル）テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル）オキシ）ペンタンアミド）プロピル）アミノ）-3-オキソプロポキシ）メチル）-5，11，18-トリオキソ-14-オキサ-6，10，17-トリアザノナコサン-29-酸（1.6当量）、及びHATU（1.4当量）を計量し、50mLのプラスチック管に移した。無水アセトニトリル中に物質を溶解させて、次いでDIEA（ $d = 0.742$ ）（10当量）を管中に添加する。透明な混合物を、20分間37℃で攪拌した。凍結乾燥したWV-7107試料を8mLの水で再構成し、50mg/mLの濃度にした。次いで、GalNac混合物を試料WV-7107に添加し、60分間37℃で攪拌した。反応の進行をUPLCによってモニターした。反応は、1時間のインキュベーション後に完了する。溶液を真空下で（speed vacによって）濃縮してアセトニトリルを除去し、得られたGalNac複合化オリゴを、濃縮水酸化アンモニウム（5mL）を用いて脱保護のために1時間37℃でインキュベートすることによって処理した。最終生成物WV-6558の形成を、UPLC及び質量分析法によって確認した。複合化試料を陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。実測質量：8802.4（デコンボリューションした）、目標質量：8801.6。

10

【1558】

実施例37C．WV-9542の合成

PFE複合化のプロトコール

前駆体物質：WV-7107.02

最終複合化生成物：WV-9542.01

複合化の試薬

【表94】

20

オリゴヌクレオチド／試薬	分子量	オリゴヌクレオチドに対する当量	mg	μ L	μ モル
WV-7107.02	7191.7	1	1700	—	236.38
トリアンテナ型 PFE ASGPR リガンド ロット： GL-N12-58	2065.8	1.6	781.3	—	378.21
HATU P/N Sigma 445460 ロット： MKBV8272V	382	1.2	108.36	—	283.66
DIEA P/N Sigma 387649 ロット： SHBG2052V	129	10.0	304.93	420.02	2363.84
DMF	—	—	—	13000	—

30

40

表2：オリゴヌクレオチド水溶液

50

【表 9 5】

オリゴヌクレオチド ／溶媒	濃度 (mg/mL)	総体積 (mL)	総 mg
WV-7107.01 の水溶液	60	13	1800

10

トリアンテナ型 P F E A S G P R リガンド (1 8 , 1 8 - ビス (1 7 - ((1 S , 2 R , 3 R , 4 R , 5 S) - 4 - アセトアミド - 2 , 3 - ジヒドロキシ - 6 , 8 - ジオキサビシクロ [3 . 2 . 1] オクタン - 1 - イル) - 5 , 1 1 - ジオキソ - 2 , 1 6 - ジオキサー - 6 , 1 0 - ジアザヘプタデシル) - 1 - ((1 S , 2 R , 3 R , 4 R , 5 S) - 4 - アセトアミド - 2 , 3 - ジヒドロキシ - 6 , 8 - ジオキサビシクロ [3 . 2 . 1] オクタン - 1 - イル) - 7 , 1 3 , 2 0 - トリオキソ - 2 , 1 6 - ジオキサー - 8 , 1 2 , 1 9 - トリアザヘントリアコンタン - 3 1 - 酸) (1 . 6 当量) 、及び H A T U (1 . 2 当量) を計量し、50 mL の管に移した。無水ジメチルホルムアミド中に物質を溶解させて、次いで D I E A (d = 0 . 7 4 2) (1 0 当量) を管中に添加する。溶液が透明になるまで超音波処理し、それを 2 0 分間 3 7 ° C で攪拌した。W V - 7 1 0 7 試料を 1 3 mL の水で再構成した。次いで、トリアンテナ型 P F E リガンド混合物を試料 W V - 7 1 0 7 に添加し、1 時間 3 7 ° C で攪拌した。反応の進行を U P L C によってモニターした。反応は、1 時間のインキュベーション後に完了しなかった。トリアンテナ型 P F E リガンド (1 . 2 当量) 及び H A T U (1 当量) の 2 回目の添加分を量り分けて、D I E A (1 5 当量) を含む 5 mL の D M F 中に溶解させた。リガンドを、活性化のために 2 0 分間 3 7 ° C でインキュベートした。次いで、活性化したリガンドを反応混合物に添加し、1 時間 3 7 ° C でインキュベートした。反応が完了し、最終生成物 W V - 9 5 4 2 の形成を、U P L C 及び質量分析法によって確認した。複合化試料を陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。実測質量： 8 8 3 7 . 6 (デコンボリューションした) , 目標質量： 8 8 3 7 . 6 。

20

30

【 1 5 5 9 】

実施例 3 7 D . W V - 9 5 4 3 の合成

P F E 複合化のプロトコール

前駆体物質：W V - 7 1 0 7 . 0 2

最終複合化生成物：W V - 9 5 4 3 . 0 1

複合化の試薬

40

50

【表 9 6】

オリゴヌクレオチド／試薬	分子量	オリゴヌクレオチドに対する当量	mg	μ L	μ モル
WV-7107.02	7191.7	1	90	–	12.51
ビスアンテナ型 GalNAc ロット： PF-07075575	1418.59	2	35.5	–	25.03
HATU P/N Sigma 445460 ロット： MKBV8272V	382	1.8	8.6	–	22.53
DIEA P/N Sigma 387649 ロット： SHBG2052V	129	10.0	16.14	22.24	125.14
ジメチルホルムアミド	–	–	–	1500	–

表 2：オリゴヌクレオチド水溶液

【表 9 7】

オリゴヌクレオチド／溶媒	濃度 (mg/mL)	総体積 (mL)	総 mg
WV-7107.01 の水溶液	60	1.5	90

ビスアンテナ型 GalNAc (1-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-16-((3-((3-(5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 11, 18-トリオキソ-14-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-酸) (2.0 当量)、及び HATU (1.8 当量)を計量し、50 mL の管に移した。無水ジメチルホルムアミド (1.5 mL) 中に物質を溶解させて、次いで DIEA ($d = 0.742$) (10 当量) を管中に添加する。溶液が透明になるまで超音波処理し、それを 20 分間 37℃ で攪拌した。WV-7107 試料を 1.5 mL の水で再構成した。次いで、ビスアンテナ型 GalNAc 混合物を試料 WV-7107 に添加し、1 時間 37℃ で攪拌した。反応の進行を UPLC によってモニターした。反応は、1 時間のインキュベーション後に完了した。混合物を、濃縮水酸化アンモニウム (2 mL) を用いて、脱保護のために 1 時間 37℃ でインキュベートすることによって処理した。最終生成物 WV-9543 の形成を、UPLC 及び質量分析法によって確認した。複合化試料を陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。実測質量： 834

2. 6 (デコンボリューションした), 目標質量: 8340.1.

【1560】

実施例37E. WV-9544の合成

PFE複合化のプロトコール

前駆体物質: WV-7107.02

最終複合化生成物: WV-9544.01

複合化の試薬

【表98】

オリゴヌクレオチド／試薬	分子量	オリゴヌクレオチドに対する当量	mg	μ L	μ モル
WV-7107.02	7191.7	1	90	–	12.51
ビスアンテナ型 PFE ASGPR リガンド ロット: PF-07075667	1190.39	2	29.8	–	25.03
HATU P/N Sigma 445460 ロット: MKBV8272V	382	1.8	8.6	–	22.53
DIEA P/N Sigma 387649 ロット: SHBG2052V	129	10.0	16.14	22.24	125.14
ジメチルホルムアミド	–	–	–	1500	–

表2: オリゴヌクレオチド水溶液

【表99】

オリゴヌクレオチド／溶媒	濃度 (mg/mL)	総体積 (mL)	総 mg
WV-7107.01 の水溶液	60	1.5	90

ビスアンテナ型 PFE ASGPR リガンド (18- (17- ((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イル) -5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサ-6, 10-ジアザヘプタデシル) -1- ((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-1-イ

ル) - 7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサ-8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸) (2.0当量)、及びHATU (1.8当量)を計量し、50mLの管に移した。無水ジメチルホルムアミド (1.5mL) 中に物質を溶解させて、次いでDIEA (d=0.742) (10当量)を管中に添加する。溶液が透明になるまで超音波処理し、それを20分間37℃で攪拌した。WV-7107試料を1.5mLの水で再構成した。次いで、ビスアンテナ型PF E A S G P Rリガンド混合物を試料WV-7107に添加し、1時間37℃で攪拌した。反応の進行をUPLCによってモニターした。反応は、1時間のインキュベーション後に完了した。最終生成物WV-9544の形成を、UPLC及び質量分析法によって確認した。複合化試料を陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。実測質量：8367.2 (デコンボリューションした)、目標質量：8364.1。

【1561】

実施例37F. WV-9545の合成

PF E 複合化のプロトコール

前駆体物質：WV-7107.02

最終複合化生成物：WV-9545.01

複合化の試薬

【表100】

オリゴヌクレオチド／試薬	分子量	オリゴヌクレオチドに対する当量	mg	μ L	μ モル
WV-7107.02	7191.7	1	90	-	12.51
モノ GalNAc ロット： PF-07075574	830.97	2	20.8	-	25.03
HATU P/N Sigma 445460 ロット： MKBV8272V	382	1.8	8.6	-	22.53
DIEA P/N Sigma 387649 ロット： SHBG2052V	129	10.0	16.14	22.24	125.14
ジメチルホルムアミド	-	-	-	1500	-

表2：オリゴヌクレオチド水溶液

10

20

30

40

50

【表 1 0 1】

オリゴヌクレオチド ／溶媒	濃度 (mg/mL)	総体積 (mL)	総 mg
WV-7107.01 の水溶液	60	1.5	90

10

モノGalNAc (1-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-5, 11, 18-トリオキソ-14-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-酸) (2.0当量)、及びHATU (1.8当量)を計量し、50 mLの管に移した。無水ジメチルホルムアミド (1.5 mL) 中に物質を溶解させて、次いでDIEA (d=0.742) (10当量)を管中に添加する。溶液が透明になるまで超音波処理し、それを20分間37℃で攪拌した。WV-7107試料を1.5 mLの水で再構成した。次いで、モノGalNAcリガンド混合物を試料WV-7107に添加し、1時間37℃で攪拌した。反応の進行をUPLCによってモニターした。反応は、1時間のインキュベーション後に完了した。混合物を、濃縮水酸化アンモニウム (2 mL) を用いて、脱保護のために1時間37℃でインキュベートすることによって処理した。最終生成物WV-9545の形成を、UPLC及び質量分析法によって確認した。複合化試料を陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。実測質量：7881.3 (デコンボリューションした)、目標質量：7878.6。

20

【1562】

実施例37G. WV-9546の合成

PFE複合化のプロトコール

前駆体物質：WV-7107.02

最終複合化生成物：WV-9546.01

複合化の試薬

30

40

50

【表 1 0 2】

オリゴヌクレオチド／試薬	分子量	オリゴヌクレオチドに対する当量	mg	μ L	μ モル
WV-7107.02	7191.7	1	90	－	12.51
モノ PFE ASGPR リガンド ロット： PF-07075666	716.87	2	17.9	－	25.03
HATU P/N Sigma 445460 ロット： MKBV8272V	382	1.8	8.6	－	22.53
DIEA P/N Sigma 387649 ロット： SHBG2052V	129	10.0	16.14	22.24	125.14
ジメチルホルム アミド	－	－	－	1500	－

表 2：オリゴヌクレオチド水溶液
【表 1 0 3】

オリゴヌクレオチド ／溶媒	濃度 (mg/mL)	総体積 (mL)	総 mg
WV-7107.01 の水溶液	60	1.5	90

モノ P F E A S G P R リガンド (1 - ((1 S , 2 R , 3 R , 4 R , 5 S) - 4 - アセトアミド - 2 , 3 - ジヒドロキシー - 6 , 8 - ジオキサビシクロ [3 . 2 . 1] オクタン - 1 - イル) - 7 , 1 3 , 2 0 - トリオキソ - 2 , 1 6 - ジオキサー - 8 , 1 2 , 1 9 - トリアザヘントリアコンタン - 3 1 - 酸) (2 . 0 当量) 、 及び H A T U (1 . 8 当量) を計量し、 5 0 m L の管に移した。無水ジメチルホルムアミド (1 . 5 m L) 中に物質を溶解させて、次いで D I E A (d = 0 . 7 4 2) (1 0 当量) を管中に添加する。溶液が透明になるまで超音波処理し、それを 2 0 分間 3 7 ° C で攪拌した。W V - 7 1 0 7 試料を 1 . 5 m L の水で再構成した。次いで、モノ G a l N A c リガンド混合物を試料 W V - 7 1 0 7 に添加し、 1 時間 3 7 ° C で攪拌した。反応の進行を U P L C によってモニターした。反応は、 1 時間のインキュベーション後に完了した。最終生成物 W V - 9 5 4 6 の形成を、 U P L C 及び質量分析法によって確認した。複合化試料を陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。実測質量： 7 8 9 3 . 1 (デコンボリューションした) , 目標質量： 7 8 9 0 . 6 。

【1563】

実施例37H. IEX精製条件

試料WV-9542について

【表104】

緩衝液A	20 mM水酸化ナトリウム	
緩衝液B	2.5 N塩化ナトリウムの20 mM水酸化ナトリウム溶液	
カラム	2.5 cm×33 cm Source 15 Q	
勾配	%B	カラム体積 (160 mL)
	0	2
	0-15	2
	15	1
	15-90	15
	100	1

10

20

試料WV-6558、WV-9542~WV-9546について

【表105】

緩衝液A	20 mM水酸化ナトリウム	
緩衝液B	2.5 N塩化ナトリウムの20 mM水酸化ナトリウム溶液	
カラム	2.0 cm×10 cm Source 15 Q	
勾配	%B	カラム体積 (160 mL)
	0	2
	0-20	5
	20	1
	20-90	15
	100	1

30

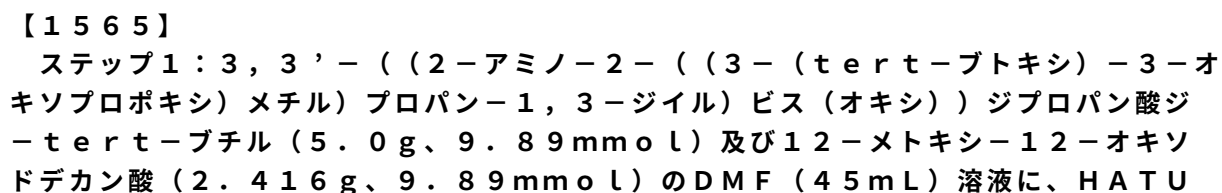
40

【1564】

50

1-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-acetamid-4, 5-diacetoxysin-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxi-16, 16-bis((3-((3-(5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-acetamid-4, 5-diacetoxysin-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxi)pentanamid)propyl)amino)-3-oxopropoxy)methyl)-5, 11, 18-trioxo-14-oxa-6, 10, 17-triazanocosan-29-acidの合成

【化285】



ステップ1: 3, 3' - ((2-アミノ-2- ((3- (tert-ブトキシ) -3-オキソプロポキシ) メチル) プロパン-1, 3-ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸ジ-tert-ブチル (5.0 g、9.89 mmol) 及び12-メトキシ-12-オキソドデカン酸 (2.416 g、9.89 mmol) のDMF (45 mL) 溶液に、HATU

(3.76 g、9.89 mmol) 及び DIPEA (2.58 mL、14.83 mmol) を添加した。反応混合物を室温で5時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮し、ブラインで希釈して EtOAc で抽出し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させて、濃縮して残渣を得て、これを 10% EtOAc のヘキサン溶液～40% EtOAc のヘキサン溶液で溶出する ISCO (120 g 金シリカゲルカートリッジ) によって精製し、3, 3' - ((2 - ((3 - (tert-ブトキシ) - 3 - オキソプロポキシ) メチル) - 2 - (12 - メトキシ - 12 - オキソドデカンアミド) プロパン - 1, 3 - ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸ジ-tert-ブチル (5.13 g、7.01 mmol、収率 70.9%) を無色の油として得た。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ 6.03 (s, 1H), 3.74 - 3.61 (m, 15H), 2.45 (t, J = 6.3 Hz, 6H), 2.31 (td, J = 7.5, 3.9 Hz, 2H), 2.19 - 2.10 (m, 2H), 1.64 - 1.59 (m, 4H), 1.46 (s, 27H), 1.32 - 1.24 (m, 12H); MS (ESI), 732.6 (M+H)⁺.

【1566】

ステップ2: 3, 3' - ((2 - ((3 - (tert-ブトキシ) - 3 - オキソプロポキシ) メチル) - 2 - (12 - メトキシ - 12 - オキソドデカンアミド) プロパン - 1, 3 - ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸ジ-tert-ブチル (5.0 g、6.83 mmol) のギ酸 (50 mL) 溶液を、室温で48時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、トルエン (3×) と共蒸発させて白色固体を得て、これを高真空下で2日間乾燥させた。LC-MS 及び H NMR は、反応が完了していないことを示した。粗生成物をギ酸 (50 mL) 中に再溶解させた。反応混合物を室温で24時間攪拌した。LC-MS は、反応が完了したことを示した。溶媒を減圧下で蒸発させ、トルエン (3×) と共蒸発させて高真空中で乾燥し、3, 3' - ((2 - ((2 - カルボキシエトキシ) メチル) - 2 - (12 - メトキシ - 12 - オキソドデカンアミド) プロパン - 1, 3 - ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸 (4.00 g) を白色固体として得た。MS (ESI): 562.4 (M-H)⁻.

【1567】

ステップ3: 0℃の3, 3' - ((2 - ((2 - カルボキシエトキシ) メチル) - 2 - (12 - メトキシ - 12 - オキソドデカンアミド) プロパン - 1, 3 - ジイル) ビス (オキシ)) ジプロパン酸 (3.85 g、6.83 mmol) 及び HOBt (3.88 g、28.7 mmol) の DCM (60 mL) 及び DMF (15 mL) 溶液に、(3 - アミノプロピル) カルバミン酸 tert-ブチル (4.76 g、27.3 mmol)、EDAC HCl 塩 (5.24 g、27.3 mmol) 及び DIPEA (8.33 mL、47.8 mmol) を添加した。反応混合物を0℃で15分間攪拌し、室温で20時間攪拌した。LC-MS は、反応が完了しなかったことを示した。(3 - アミノプロピル) カルバミン酸 tert-ブチル (1.59 g、9.12 mmol) 及び EDC HCl 塩 (1.75 g、9.13 mmol) を、反応混合物中に添加した。反応混合物を室温で4時間、絶えず攪拌した。溶媒を蒸発させて残渣を得て、これを EtOAc (300 mL) 中に溶解し、水 (1×)、飽和重炭酸ナトリウム (2×)、10% クエン酸 (2×) 及び水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮して残渣を得て、これを DCM～30% MeOH の DCM 溶液で溶出する ISCO (80 g 金カートリッジ) によって精製し、15, 15 - ビス (13, 13 - ジメチル - 5, 11 - ジオキソ - 2, 12 - ジオキサ - 6, 10 - ジアザテトラデシル) - 2, 2 - ジメチル - 4, 10, 17 - トリオキソ - 3, 13 - ジオキサ - 5, 9, 16 - トリアザオクタコサン - 28 - 酸メチル (6.61 g、6.40 mmol、2つのステップから収率 94%) を白色固体として得た。MS (ESI): 1033.5 (M+H)⁺.

【1568】

ステップ4: 15, 15 - ビス (13, 13 - ジメチル - 5, 11 - ジオキソ - 2, 12 - ジオキサ - 6, 10 - ジアザテトラデシル) - 2, 2 - ジメチル - 4, 10, 17 - トリオキソ - 3, 13 - ジオキサ - 5, 9, 16 - トリアザオクタコサン - 28 - 酸メチ

10

20

30

40

50

ル (6.56 g、6.35 mmol) の THF (75 mL) 溶液に、LiOH (0.457 g、19.06 mmol) の水 (25 mL) 溶液を添加した。混合物を室温で一晩攪拌した。LC-MS は、反応が完了したことを示した。溶媒を蒸発させ、1N の HCl (45 mL) を使用して酸性化し、DCM (3×) で抽出して無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮して 15, 15-ビス (13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸 (6.31 g、6.20 mmol、収率 98%) を白色固体として得た。MS (ESI): 1019.6 (M+H)⁺。

【1569】

ステップ 5: 15, 15-ビス (13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸 (6.31 g、6.20 mmol) 及び (ブロモメチル) ベンゼン (1.272 g、7.44 mmol) の DMF (40 mL) 溶液に、K₂CO₃ (2.57 g、18.59 mmol) を添加した。混合物を 40℃ で 4 時間攪拌し、室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させた。反応混合物を EtOAc で希釈し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮して残渣を得て、これを DCM ~ 30% MeOH の DCM 溶液で溶出する ISCO (80 g カートリッジ) によって精製し、15, 15-ビス (13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸ベンジル (6.41 g、5.78 mmol、収率 93%) を無色の油として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.80 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 7.39 – 7.30 (m, 5H), 6.95 (s, 1H), 6.74 (t, J = 5.8 Hz, 3H), 5.07 (s, 2H), 3.53 (J, J = 7.3 Hz, 6H), 3.51 (s, 6H), 3.02 (q, J = 6.7 Hz, 6H), 2.94 – 2.85 (m, 6H), 2.29 (dt, J = 26.1, 6.9 Hz, 8H), 2.02 (q, J = 9.7, 8.6 Hz, 2H), 1.56 – 1.39 (m, 10H), 1.35 (s, 27H), 1.20 (brs, 14H); MS (ESI): 1019.6 (M+H)⁺。

【1570】

ステップ 6: 15, 15-ビス (13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル)-2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザオクタコサン-28-酸ベンジル (2.42 g、2.183 mmol) の DCM (40 mL) 溶液に、2, 2, 2-トリフルオロ酢酸 (8 mL、105 mmol) を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、トルエン (2×) と共蒸発させてエーテルで粉碎し、高真空下で一晩乾燥させた。次のステップに TFA 塩を直接使用する。

【1571】

ステップ 7: 5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタン酸 (3.91 g、8.73 mmol)、HBTU (3.48 g、9.17 mmol) 及び HOBt (1.239 g、9.17 mmol) の DCM (25 mL) 溶液に、DIPEA (6.08 mL、34.9 mmol)、続いて 12-((1, 19-ジアミノ-10-((3-((3-アミノプロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 15-ジオキソ-8, 12-ジオキサ-4, 16-ジアザノナデカン-10-イル)アミノ)-12-オキソドデカン酸ベンジル (1.764 g、2.183 mmol) の DMF (4.0 mL) 溶液を添加した。混合物を室温で 5 時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これを 5 カラム量の 5% MeOH の DCM 溶液で溶出して HOBt を除去し、続いて 5% ~ 30% MeOH の DCM 溶液で溶出する ISCO (40 g

10

20

30

40

50

金カラム)によって精製し、1-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-16, 16-ビス((3-((3-(5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 11, 18-トリオキソ-14-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-ベンジルエステル(3.98 g、収率87%)を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.82-7.74 (m, 6H), 7.69 (t, J = 5.6 Hz, 3H), 7.33-7.27 (m, 5H), 6.94 (s, 1H), 5.16 (d, J = 3.4 Hz, 3H), 5.03 (s, 2H), 4.92 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 3H), 4.43 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.02-3.95 (m, 9H), 3.82 (dt, J = 11.2, 8.8 Hz, 3H), 3.65 (dt, J = 10.5, 5.6 Hz, 3H), 3.51-3.44 (m, 12H), 3.36 (dt, J = 9.6, 6.0 Hz, 3H), 3.01-2.95 (m, 12H), 2.29 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 6.3 Hz, 6H), 2.05 (s, 9H), 1.99 (t, J = 7.0 Hz, 8H), 1.94 (s, 9H), 1.84 (s, 9H), 1.72 (s, 9H), 1.50-1.14 (m, 34H); MS (ESI): 1049.0 (M/2+H)+.

【1572】

ステップ8: Arでフラッシュした丸底フラスコに、10% Pd/C (165 mg、0.835 mmol) 及び EtOAc (15 mL) を添加した。ベンジル保護トリス GalNAc (1.75 g、0.835 mmol) のメタノール (15 mL) 溶液を添加し、続いてトリエチルシラン (2.67 mL、16.70 mmol) を滴下して添加した。混合物を室温で3時間攪拌した。LC-MSは反応が完了したことを示し、これをEtOAcで希釈してセライトに通して濾過し、20% MeOHのEtOAc溶液で洗浄して、減圧下で濃縮し、1-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-16, 16-ビス((3-((3-(5-((2R, 3R, 4R, 5R, 6R)-3-アセトアミド-4, 5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ペンタンアミド)プロピル)アミノ)-3-オキソプロポキシ)メチル)-5, 11, 18-トリオキソ-14-オキサ-6, 10, 17-トリアザノナコサン-29-酸 (1.67 g、0.832 mmol、収率100%) を白色固体として得た。

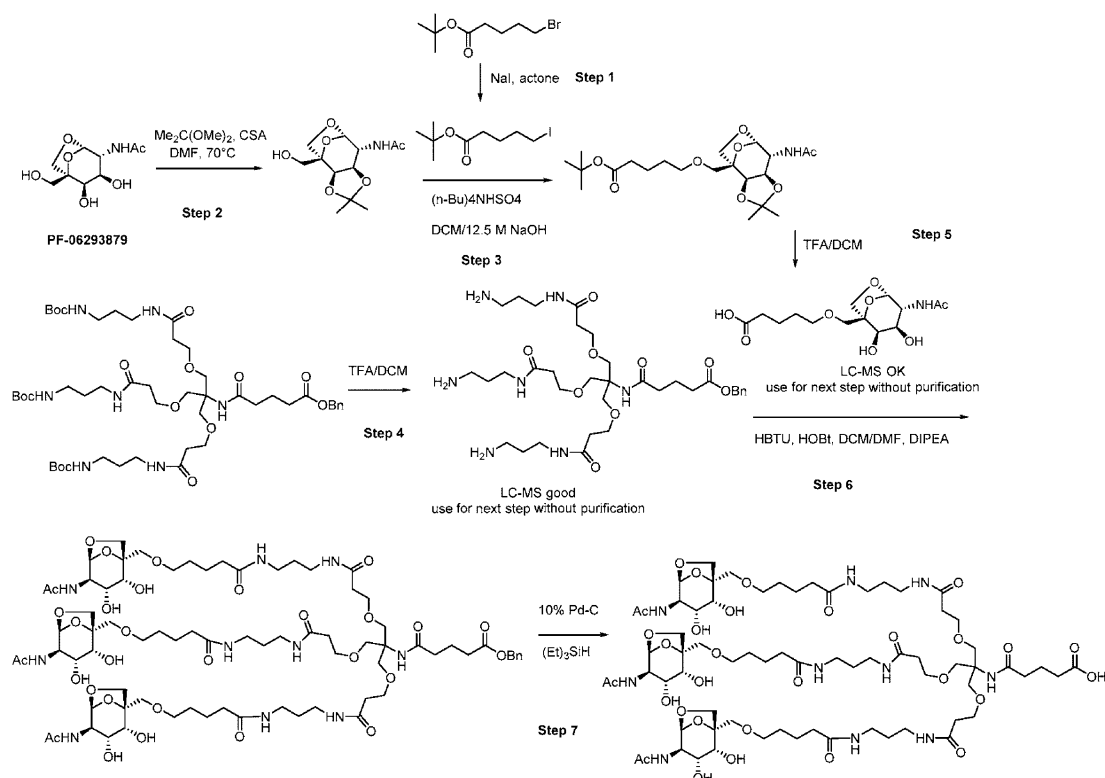
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.95 (s, 1H), 7.83-7.74 (m, 6H), 7.69 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 6.93 (s, 1H), 5.16 (d, J = 3.4 Hz, 3H), 4.92 (dd, J = 11.2, 3.4 Hz, 3H), 4.43 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 4.01-3.94 (m, 9H), 3.82 (dt, J = 11.3, 8.8 Hz, 3H), 3.66 (dt, J = 10.7, 5.6 Hz, 3H), 3.54-3.43 (m, 12H), 3.41-3.33 (m, 3H), 3.03-2.94 (m, 12H), 2.24 (t, J = 7.4 Hz, 10H), 2.14 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.06 (s, 9H), 2.00 (t, J = 7.2 Hz, 8H), 1.95 (s, 9H), 1.84 (s, 9H), 1.73 (s, 9H), 1.51-1.14 (m, 34H)。MS (ESI): 1003.8 (M/2+H)+.

【1573】

実施例39. リガンドの合成。

18, 18-ビス(17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S)-4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)

－ 5， 11－ジオキソ－ 2， 16－ジオキサ－ 6， 10－ジアザヘプタデシル）－ 1－（
（ 1 S， 2 R， 3 R， 4 R， 5 S）－ 4－アセトアミド－ 2， 3－ジヒドロキシ－ 6， 8
－ジオキサビシクロ [3． 2． 1] オクタン－ 1－イル）－ 7， 13， 20－トリオキソ
－ 2， 16－ジオキサ－ 8， 12， 19－トリアザテトラコサン－ 24－酸の合成
【化 2 8 6】



【 1 5 7 4 】

ステップ 1： 5－ブロモペンタン酸 *tert*－ブチル（ 4． 0 g、 16． 87 mmol ）のアセトン（ 80 mL ）溶液に、 NaI（ 7． 59 g、 50． 6 mmol ）を添加した。反応混合物を 57℃ で 2 時間攪拌し、濾過して EtOAc で洗浄した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これを EtOAc 中に溶解し、水、ブラインで洗浄して Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濃縮して残渣を得て、これを 20% EtOAc のヘキサン溶液～ 50% EtOAc のヘキサン溶液で溶出する ISCO（ 40 g カラム ）によって精製し、 5－ヨードペンタン酸 *tert*－ブチル（ 4． 54 g、 15． 98 mmol、 収率 95% ）を黄色油として得た。¹H NMR（ 500 MHz， クロロホルム－ d ） δ 3． 19（ t， J = 6． 9 Hz， 2 H）， 2． 24（ t， J = 7． 3 Hz， 2 H）， 1． 86（ p， J = 7． 1 Hz， 2 H）， 1． 70（ p， J = 7． 4 Hz， 2 H）， 1． 45（ s， 9 H）。

【 1 5 7 5 】

ステップ 2： N－（（ 1 S， 2 R， 3 R， 4 R， 5 S）－ 2， 3－ジヒドロキシ－ 1－（ヒドロキシメチル）－ 6， 8－ジオキサビシクロ [3． 2． 1] オクタン－ 4－イル）アセトアミド（ 600 mg、 2． 57 mmol ）の DMF（ 15 mL ）溶液に、 2， 2－ジメトキシプロパン（ 2087 μL、 17． 03 mmol ）、続いて（ + / - ）－カンファラー－ 10－スルホン酸（ 264 mg、 1． 135 mmol ）を添加した。反応混合物を 70℃ で 24 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却し、次いでメタノール（ 2． 5 mL ）を添加した。反応混合物を室温で 30 分間攪拌し、TEA（ 0． 10 mL ）で中和した。溶媒を蒸発させ、残渣をトルエンと共蒸発させた。残渣を EtOAc～ 10% MeOH の EtOAc 溶液で溶出する ISCO（ 24 g 金 ）によって精製し、N－（（ 3 a R， 4 S， 7 S， 8 R， 8 a R）－ 4－（ヒドロキシメチル）－ 2， 2－ジメチルヘキサヒド

ロー4, 7-エポキシ [1, 3] ジオキソロ [4, 5-d] オキセピン-8-イル) アセトアミド7 (666 mg、2.437 mmol、収率95%)を得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.09 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.15 – 5.05 (m, 2H), 4.26 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 4.09 (dd, J = 7.3, 5.8 Hz, 1H), 3.80 – 3.60 (m, 5H), 1.83 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.26 (s, 3H); MS, 274.3 (M+H)⁺.

【1576】

ステップ3: 5-ヨードペンタン酸tert-ブチル (1310 mg、4.61 mmol) 及びN-((3aR, 4S, 7S, 8R, 8aR)-4-(ヒドロキシメチル)-2, 2-ジメチルヘキサヒドロ-4, 7-エポキシ [1, 3] ジオキソロ [4, 5-d] オキセピン-8-イル) アセトアミド7 (420 mg、1.537 mmol) のDCM (10.5 mL) 溶液に、硫酸水素テトラブチルアンモニウム (783 mg、2.305 mmol)、続いて12.5 Mの水酸化ナトリウム溶液 (7 mL) を添加した。反応混合物を室温で24時間攪拌した。反応混合物をDCM及び水で希釈し、DCM (2×) で抽出した。有機層を1 NのHCl溶液で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。溶媒を減圧下で濃縮して、残渣を得た。得られた粗物質を酢酸エチル (30 mL) に添加し、5分間超音波処理した。得られた沈殿物を濾過し、酢酸エチル (10 mL×2) で洗浄した。LC-MSは、フィルターが所望の生成物を含有しないことを示し、これはテトラブチルアンモニウム塩であった。濾液を減圧下で濃縮して残渣を得て、これを50% EtOAcのヘキサン溶液~EtOAcで溶出するISCO (40 gシリカゲル金カートリッジ) によって精製し、5-((3aR, 4S, 7S, 8R, 8aR)-8-アセトアミド-2, 2-ジメチルヘキサヒドロ-4, 7-エポキシ [1, 3] ジオキソロ [4, 5-d] オキセピン-4-イル) メトキシ) ペンタン酸tert-ブチル (0.470 g、1.094 mmol、収率71.2%) を帯黄色油として得た。

¹H NMR (500 MHz, クロロホルム-d) δ 5.56 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.21 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.12 (dtd, J = 7.7, 3.8, 1.7 Hz, 1H), 3.99 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 3.90 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.77 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 3.67 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.52 (ddt, J = 30.5, 9.2, 5.8 Hz, 2H), 2.23 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.03 (d, J = 14.5 Hz, 3H), 1.65 – 1.55 (m, 7H), 1.44 (s, 9H), 1.35 (s, 3H); MS, 452.4 (M+Na)⁺.

【1577】

ステップ4: 15, 15-ビス (13, 13-ジメチル-5, 11-ジオキソ-2, 12-ジオキサ-6, 10-ジアザテトラデシル) -2, 2-ジメチル-4, 10, 17-トリオキソ-3, 13-ジオキサ-5, 9, 16-トリアザヘニコサン-21-酸ベンジル (0.168 g、0.166 mmol) のDCM (3 mL) 溶液に、TFA (3 mL) を添加した。反応混合物を室温で3時間攪拌した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を減圧下で蒸発させて、5-((1, 19-ジアミノ-10-((3-((3-アミノプロピル) アミノ)-3-オキソプロポキシ) メチル)-5, 15-ジオキソ-8, 12-ジオキサ-4, 16-ジアザノナデカン-10-イル) アミノ)-5-オキソペンタン酸ベンジルを無色の油として得た。MS, 710.5 (M+H)⁺。精製することなく次のステップに直接使用する。

【1578】

ステップ5: 5-((3aR, 4S, 7S, 8R, 8aR)-8-アセトアミド-2, 2-ジメチルヘキサヒドロ-4, 7-エポキシ [1, 3] ジオキソロ [4, 5-d] オキセピン-4-イル) メトキシ) ペンタン酸tert-ブチル (285 mg、0.664 mmol) のDCM (5 mL) 溶液に、TFA (5 mL) を添加して室温で4時間攪拌した。LC-MSは、反応が完了したことを示した。溶媒を蒸発させて、5-((1S,

2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - アセトアミド - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 1 - イル) メトキシ) ペンタン酸を得た。MS (ESI) : 334. 3 (M+H) +。精製することなく次のステップに直接使用する。

【1579】

ステップ6 : 5 - (((1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - アセトアミド - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 1 - イル) メトキシ) ペンタン酸 (221 mg、0. 664 mmol) の DCM (10 mL) 溶液に、DIPEA (2313 μ l、13. 28 mmol)、HBTU (208 mg、0. 548 mmol)、HOBT (67. 3 mg、0. 498 mmol)、5 - ((1, 19 - ジアミノ - 10 - ((3 - ((3 - アミノプロピル) アミノ) - 3 - オキソプロポキシ) メチル) - 5, 15 - ジオキソ - 8, 12 - ジオキサー - 4, 16 - ジアザノナデカン - 10 - イル) アミノ) - 5 - オキソペンタン酸ベンジル (118 mg、0. 166 mmol) (GL08-02) の DMF (3. 0 mL) 及び DCM (5. 0 mL) 溶液を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。LC-MS は所望の生成物を示した。溶媒を減圧下で蒸発させて残渣を得て、これを DCM ~ 80% MeOH の DCM 溶液で溶出するISCO (24 g 金カートリッジ) によって精製し、18, 18 - ビス (17 - ((1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - アセトアミド - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 1 - イル) - 5, 11 - ジオキソ - 2, 16 - ジオキサー - 6, 10 - ジアザヘプタデシル) - 1 - ((1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - アセトアミド - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 1 - イル) - 7, 13, 20 - トリオキソ - 2, 16 - ジオキサー - 8, 12, 19 - トリアザテトラコサン - 24 - 酸ベンジル (272 mg、0. 164 mmol、収率 99%) を得た (管 30 ~ 42 の生成物 (40% MeOH の DCM 溶液 ~ 60% MeOH の DCM 溶液))。

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7. 89 (d, J = 7. 8 Hz, 3H), 7. 81 (t, J = 5. 7 Hz, 3H), 7. 75 (s, 3H), 7. 34 (q, J = 7. 5, 6. 9 Hz, 5H), 7. 05 (s, 1H), 5. 07 (s, 5H), 4. 83 (d, J = 5. 3 Hz, 3H), 4. 56 (d, J = 7. 1 Hz, 3H), 3. 73 (dd, J = 23. 3, 9. 2 Hz, 6H), 3. 64 (d, J = 7. 0 Hz, 6H), 3. 58 - 3. 35 (m, 27H), 3. 02 (p, J = 6. 2 Hz, 12H), 2. 33 (t, J = 7. 6 Hz, 2H), 2. 26 (t, J = 6. 4 Hz, 6H), 2. 10 (t, J = 7. 6 Hz, 2H), 2. 04 (t, J = 7. 4 Hz, 6H), 1. 82 (s, 9H), 1. 72 (q, J = 7. 6 Hz, 2H), 1. 52 - 1. 39 (m, 18H); MS (ESI), 1656. 3 (M+H) +。

【1580】

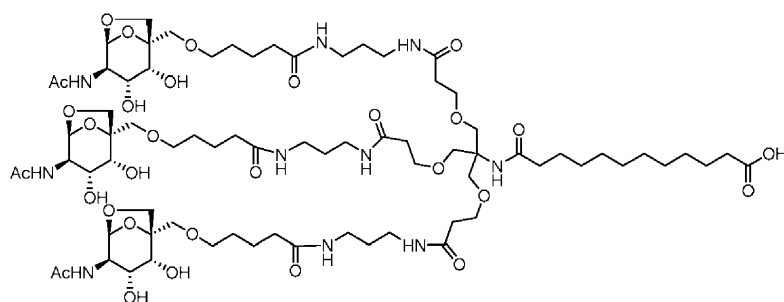
ステップ7 : 18, 18 - ビス (17 - ((1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - アセトアミド - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 1 - イル) - 5, 11 - ジオキソ - 2, 16 - ジオキサー - 6, 10 - ジアザヘプタデシル) - 1 - ((1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - アセトアミド - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 1 - イル) - 7, 13, 20 - トリオキソ - 2, 16 - ジオキサー - 8, 12, 19 - トリアザテトラコサン - 24 - 酸ベンジル (270 mg、0. 163 mmol) の EtOAc (10 mL) 溶液に、10% Pd-C (50 mg)、及び MeOH (5. 0 mL)、及びトリエチルシラン (1042 μ l、6. 52 mmol) を添加した。反応混合物を室温で1時間攪拌し、濾過して濃縮し、18, 18 - ビス (17 - ((1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - アセトアミド - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 1 - イル) - 5, 11 - ジオキソ - 2, 16 - ジオキサー - 6, 10 - ジアザヘプタデシル) - 1 - ((1 S, 2 R, 3 R, 4 R, 5 S) - 4 - アセトアミド - 2, 3 - ジヒドロキシ - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン - 1 - イル) - 7, 13, 20 - トリオキ

ソー2, 16-ジオキサー8, 12, 19-トリアザテトラコサン-24-酸 (246 mg, 0.157 mmol, 収率96%) を白色固体として得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.99 (brs, 1H), 7.89 (d, J = 7.9 Hz, 3H), 7.82 (t, J = 5.4 Hz, 3H), 7.75 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 7.03 (s, 1H), 5.07 (d, J = 1.6 Hz, 3H), 4.83 (brs, 3H), 4.56 (brs, 3H), 3.79 – 3.68 (m, 6H), 3.64 (d, J = 7.2 Hz, 6H), 3.58 – 3.34 (m, 27H), 3.02 (p, J = 6.3 Hz, 12H), 2.27 (t, J = 6.4 Hz, 6H), 2.17 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.08 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.04 (t, J = 7.3 Hz, 6H), 1.82 (s, 9H), 1.65 (p, J = 7.5 Hz, 2H), 1.54 – 1.40 (m, 18H); MS (ESI), 1566.3 (M+H)⁺.

【1581】

実施例40. リガンドの合成。

18, 18-ビス(17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサー6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサー8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸の合成【化287】



18, 18-ビス(17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサー6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサー8, 12, 19-トリアザヘントリアコンタン-31-酸を、18, 18-ビス(17-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-5, 11-ジオキソ-2, 16-ジオキサー6, 10-ジアザヘプタデシル)-1-((1S, 2R, 3R, 4R, 5S) -4-アセトアミド-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-1-イル)-7, 13, 20-トリオキソ-2, 16-ジオキサー8, 12, 19-トリアザテトラコサン-24-酸と同じ手順を使用して合成した。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.90 (d, J = 7.8 Hz, 3H), 7.83 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 7.76 (t, J = 5.7 Hz, 3H), 6.98 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 5.09 (s, 3H), 3.81 – 3.69 (m, 6H), 3.69 – 3.62 (m, 6H), 3.62 – 3.40 (m, 24H), 3.04 (p, J = 6.1 Hz, 9H), 2.28 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 2.18 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.06 (t, J = 7.7 Hz, 6H), 1.84 (s, 6H)

、 1.48 (tq, J = 14.9, 7.4 Hz, 16H), 1.23 (s, 8H)。MS (ESI), 1664.0 (M+H)⁺。

【1582】

均等論

本開示のいくつかの例示的实施形態が記載されているが、上述は、単なる例示であって限定ではなく、例としてのみ提示されたものであることは、当業者には明白のはずである。多くの修正及び他の例示的实施形態は、当分野の通常の技能のうちの1つの範囲内であり、本開示の範囲内であることが予期される。特に、本明細書中に提示される実施例の多くは、方法行為またはシステム要素の特定の組み合わせを含むが、これらの行為及びこれらの要素が、同じ目的を達成するための他の方法において、併用され得ることを理解すべきである。1つの実施形態に関してのみ検討される行為、要素、及び特徴は、他の実施形態における類似の役割から除外されることを意図されない。さらに、もしあれば、例えば、請求される発明中に列挙される1つ以上のミーンズプラスファンクションの限定 (means-plus-function limitations) に関し、当該手段は、列挙される機能を実施するために、本明細書に開示される手段を限定することを意図せず、当該列挙機能の実施のための現在公知または将来的に開発されるいずれの手段も範囲に含むことが意図される。

【1583】

本請求範囲の要素を修飾するための、請求の範囲中の例えば「第1」、「第2」、「第3」などの順序を示す語の使用は、それ自体が、1つの請求の範囲の要素の任意の優先度、先行、または順序が、別の請求の範囲の要素を越えることを暗示するものではなく、または方法のその行為が行われる時間的順序を暗示するものでもないが、特定の名称を有する1つの請求の範囲の要素を、同じ名称を有する（しかし順序を示す語の使用に関し）別の請求の範囲の要素と識別し、当該請求の範囲の要素を識別するための単なる標識として使用される。同様に、a)、b) など、または i)、ii) などの使用は、それ自体は、当該請求の範囲内の任意のステップの優先度、先行、または順序を暗示するものではない。同様に、本明細書におけるこれらの用語の使用は、それ自体は、任意の必要とされる優先度、先行、または順序も暗示するものではない。いかなるそのような用語の使用も、記載される（請求されるものを含む）発明における要素の数を示すものでもない。

【1584】

上記明細書は、当業者が本開示に記載されるいかなる発明の実施も可能にするのに十分である。本開示は、提供される実施例によって範囲が限定されるものではなく、これらは、記載される発明の1つ以上の態様を例証するものとして意図され、他の機能的に均等な実施形態も、記載される発明の範囲内にある。本明細書に示される、かつ記載されるものに加えて、記載される発明の様々な修正が前述の記載から当業者には明らかとなり、それらは記載される発明の範囲内であろう。記載される発明の利益及び目的は、記載される発明の各実施形態に必ずしも包含されるものではない。

【1585】

上記明細書は、当業者が、本発明の実施を可能にするのに十分であるとみなされる。本開示は、提供される実施例によって範囲が限定されるものではなく、実施例は本発明の一態様の一つの解説と意図されるものであり、他の機能的均等な実施形態も、本発明の範囲内にある。本明細書中で示され、記載されたものに加えて、本発明の様々な修正は、先の明細書から当業者に明白となり、添付の実施形態の範囲内であろう。本発明の利益及び目的は、本発明の各実施形態に必ずしも包含されない。

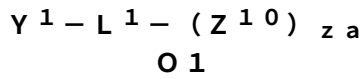
【1586】

本出願全体をとおして、様々な公開物が参照される。これらの公開物の開示は、その全体が、あらゆる目的のために、参照により本明細書に援用される。

【1587】

実施形態

1. 式O1を有する化合物：



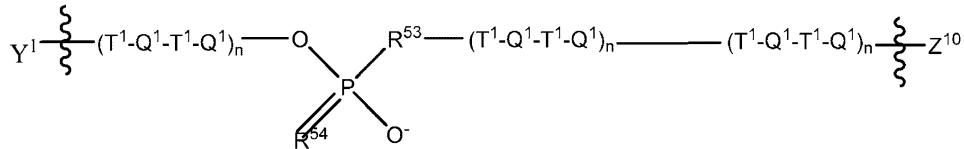
または前記化合物の薬学的に許容される塩であって、式中、 Y^1 は、PNPLA3を標的とするオリゴヌクレオチドであり、

za は、1、2、または3であり、

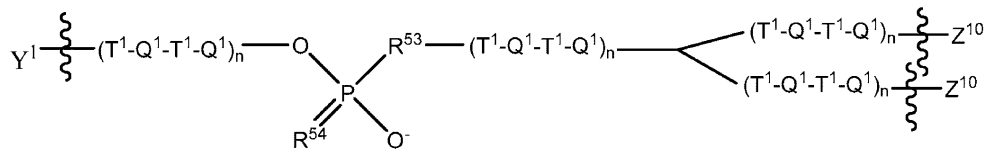
L^1 は、式L11、L12、L13、L43、L44、L45、L46、L47、L48、L49、L50、L51、L52、L53またはL54の化合物であり、 Y^1 及び Z^{10} との結合位置が示されており、

【化288】

10

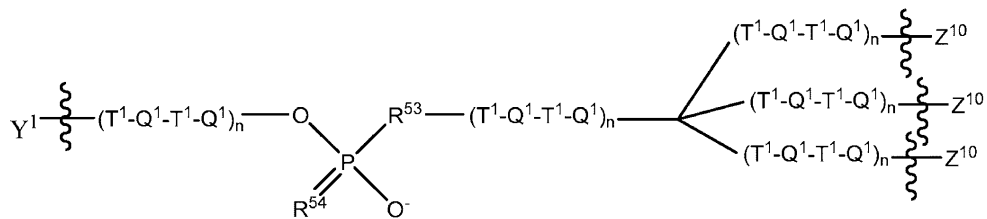


L11



20

L12

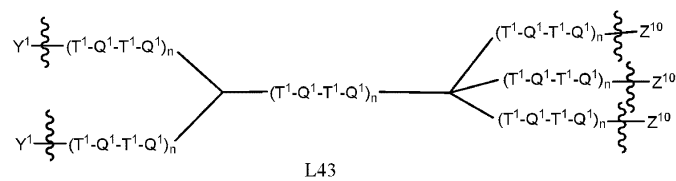


30

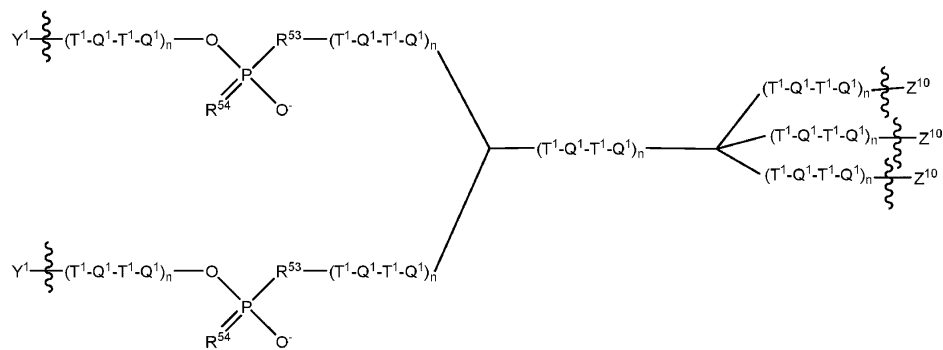
L13

40

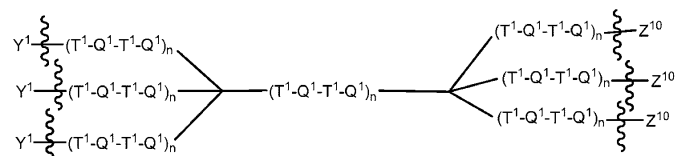
50



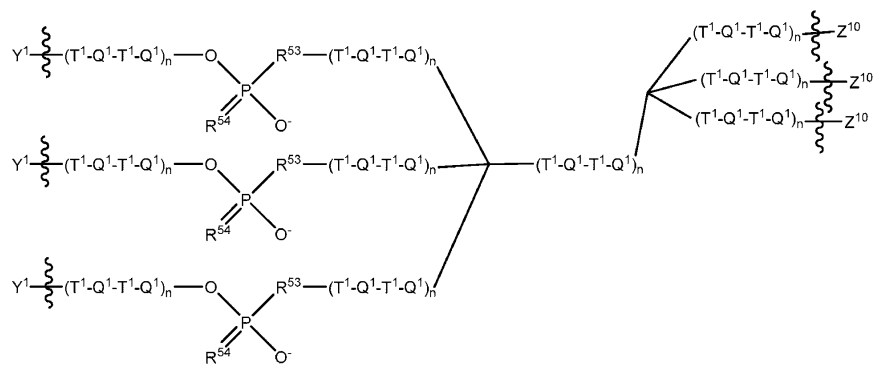
L43



L44



L45



L46

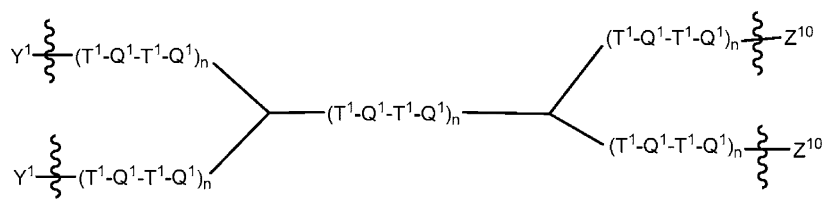
10

20

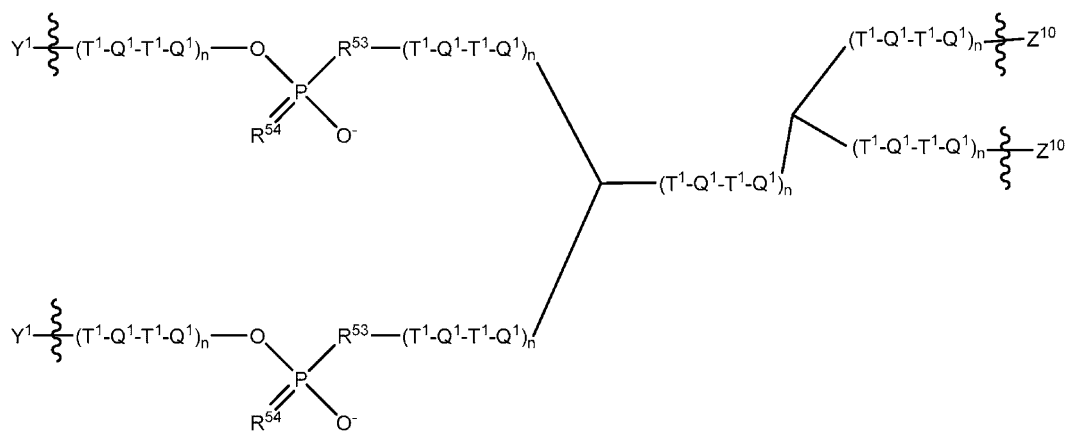
30

40

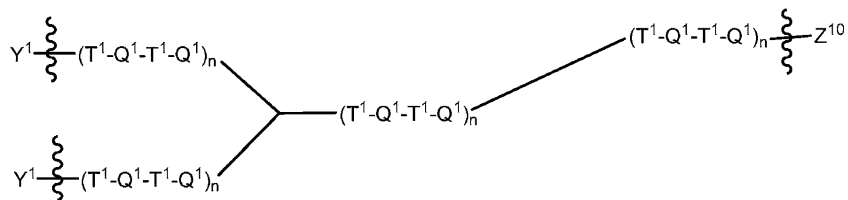
50



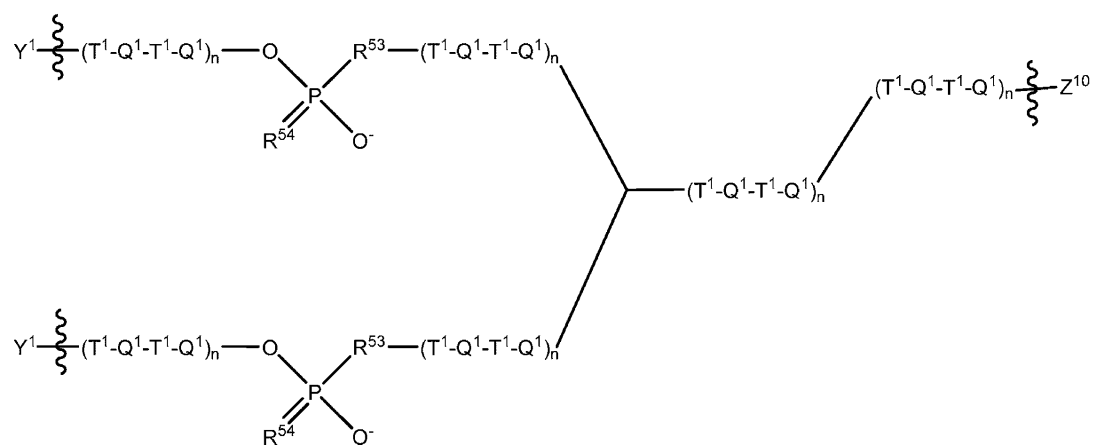
L47



L48



L49



L50

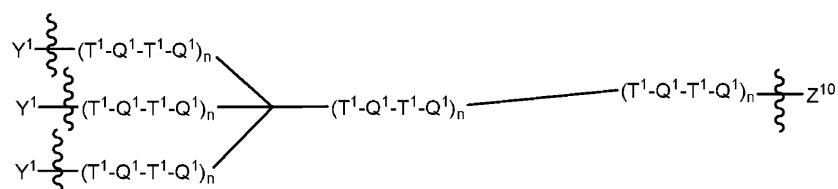
10

20

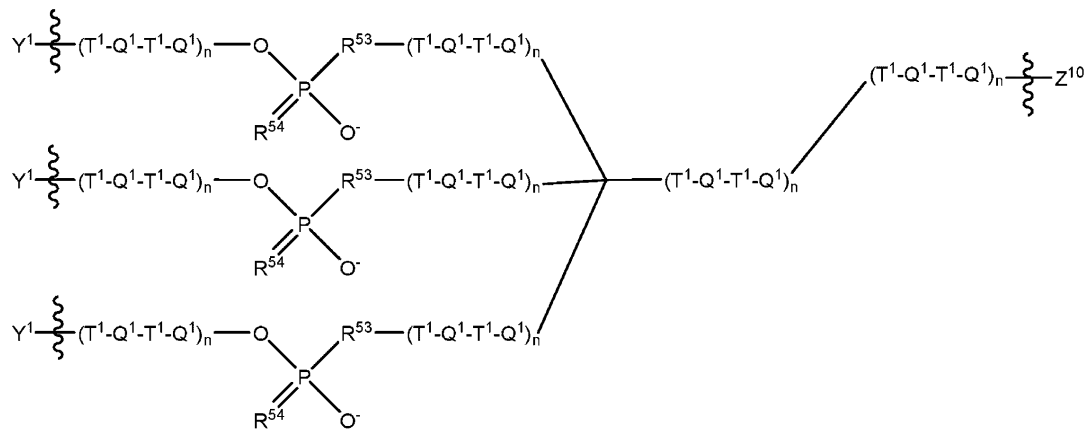
30

40

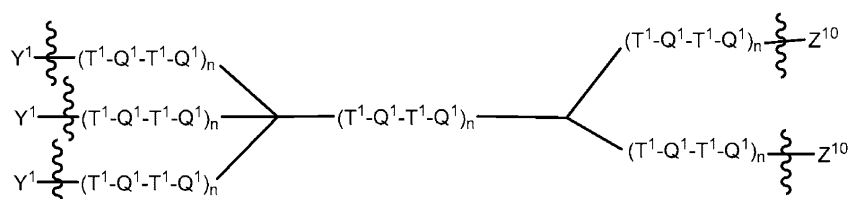
50



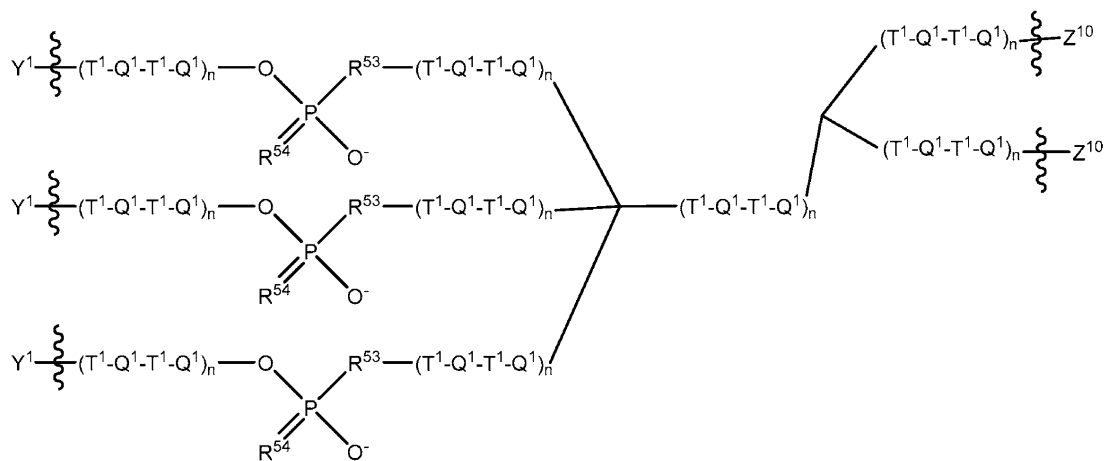
L51



L52



L53



L54

式中、各 T^1 は、独立して、存在しないか、アルキレン、アルケニレン、またはアルキ

10

20

30

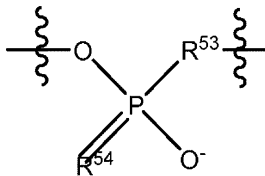
40

50

ニレンであり、ここで、前記アルキレン、アルケニレン、またはアルキニレンの1つ以上の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、及び $-\text{N}(\text{R}^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 Q^1 は、独立して、存在しないか、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}^{49}-$ 、 $-\text{NR}^{49}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NR}^{49}-$ 、 $-\text{NR}^{49}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NR}^{49}-\text{C}(\text{O})-\text{NR}^{49}-$ 、二価のヘテロアリール基、または $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、及び $-\text{NR}^{49}-$ から選択されるヘテロ原子基（ここで、少なくとも2つの炭素原子が前記ヘテロ原子基 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 及び $-\text{NR}^{49}-$ を任意の他のヘテロ原子基から分離している）、または次式の構造であり、

【化289】



ここで、 R^{53} は $-\text{O}$ または $-\text{NH}-$ であり、 R^{54} は $-\text{O}$ または $-\text{S}$ であり、

各 R^{49} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された前記アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{N}(\text{R}^{49a})-$ で置き換えられてもよく、前記アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{49a})_2$ 、 $-\text{OR}^{49a}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{49a})$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各 R^{49a} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、

R^{53} は、 $-\text{O}$ または $-\text{NH}$ であり、

R^{54} は、 $-\text{O}$ または $-\text{S}$ であり、

各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40であり、 n が0より大きい場合、各 $(\text{T}^1-\text{Q}^1-\text{T}^1-\text{Q}^1)$ の各 T^1 及び各 Q^1 は独立して選択され、

各 Z^{10} は、独立して、式Z12、Z13、Z14、Z15、Z16、Z17、Z18、Z19、Z20、もしくはZ21の化合物、またはその幾何異性体もしくは位置異性体であり、 L^1 との結合位置が示されており、

10

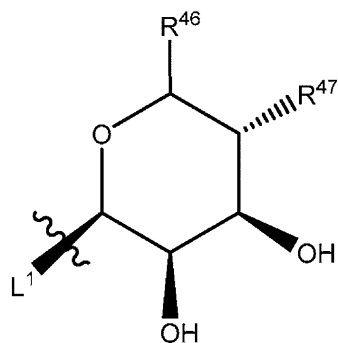
20

30

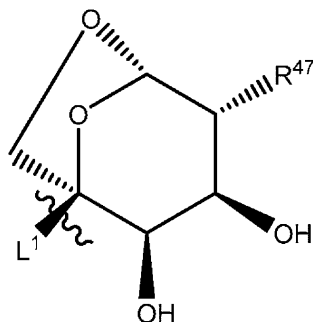
40

50

【化 2 9 0】

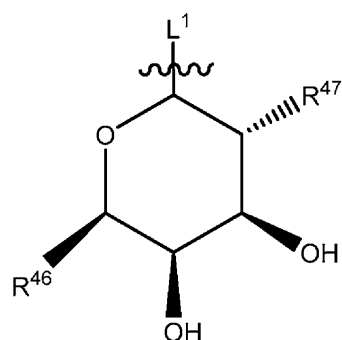


Z12



Z13

;



Z16

ここで、各 R^{46} は、独立して、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CN}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SH}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、またはアリールもしくはヘテロアリールであり、ここで、前記アリールまたはヘテロアリールは、 R^{51} で任意に置換され、

各 R^{47} は、独立して、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{OR}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{48}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、前記テトラゾール及びトリアゾールは、 R^{48} で任意に置換され、

各 R^{48} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキル、ハロ置換 (C_1-C_5) アルキル、ハロ置換 (C_3-C_6) シクロアルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルケニル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキニル、ハロ置換 (C_1-C_5) アルケニル、ハロ置換 (C_1-C_5) アルキニル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、前記アルキルまたはシクロアルキルの $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、及び $-\text{N}(\text{R}^{52})-$ から選択される

ヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、前記アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{52})_2$ 、 $-OR^{52}$ 、及び $-S(R^{52})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 R^{51} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_3-C_{20})$ シクロアルキル、 $-(C_1-C_{60})$ アルケニル、 $-(C_1-C_{60})$ アルキニル、または $-(C_1-C_{60})$ アルキルであり、ここで、前記シクロアルキルの1~6個の $-CH_2-$ 基または前記アルキルの1~20個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、前記アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49})_2$ 、 $-OR^{49}$ 、及び $-S(R^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

10

各 R^{52} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、 $-(C_1-C_{20})$ アルケニル、 $-(C_1-C_{20})$ アルキニル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された前記アルキルまたはシクロアルキルの1~6個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、前記アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49})_2$ 、 $-OR^{49}$ 、及び $-S(R^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよい、

20

前記化合物または前記薬学的に許容される塩。

【1588】

2. Y^1 が、少なくとも15塩基を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1589】

3. Y^1 の塩基配列が、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列を含むか、もしくはその塩基配列であり、または Y^1 の塩基配列が、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの配列の15個の連続塩基を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

30

【1590】

4. Y^1 が、少なくとも1つのホスホジエステルヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1591】

5. Y^1 が、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1592】

6. Y^1 が、キラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

40

【1593】

7. Y^1 が、Sp立体配置にキラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1594】

8. Y^1 が、Rp立体配置にキラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1595】

9. Y^1 が、前記キラル制御された修飾ヌクレオチド間結合またはキラル制御されたホ

50

スホロチオエートの場合、組成物内で少なくとも70%のジアステレオ純度を有するリンキラル中心を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1596】

10. Y¹が、前記キラル制御された修飾ヌクレオチド間結合またはキラル制御されたホスホロチオエートの場合、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または99.5%のジアステレオ純度を有するリンキラル中心を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1597】

11. Y¹が、少なくとも1つの糖修飾を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

10

【1598】

12. Y¹が、少なくとも1つの塩基修飾を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1599】

13. Y¹が、骨格結合のパターンをさらに含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1600】

14. Y¹が、骨格キラル中心のパターンをさらに含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

20

【1601】

15. Y¹が、化学修飾のパターンをさらに含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1602】

16. Y¹が、骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び化学修飾のパターンをさらに含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1603】

17. 前記オリゴヌクレオチドの前記骨格結合のパターン、前記骨格キラル中心のパターン、及び前記化学修飾のパターンが、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンである、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

30

【1604】

18. 前記オリゴヌクレオチドの前記骨格結合のパターン、前記骨格キラル中心のパターン、及び前記化学修飾のパターンが、表1Aに列挙されるオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンであり、Y¹の塩基配列が、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列を含むか、もしくはその塩基配列であり、またはY¹の塩基配列が、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの配列の15個の連続塩基を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1605】

40

19. 前記オリゴヌクレオチドが、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性の減少を媒介する能力を有する、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1606】

20. 前記オリゴヌクレオチドが、RNase H、立体障害及び／またはRNA干渉によって媒介される機序を介して、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性の減少を媒介する能力を有する、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1607】

21. 各T¹が、独立して、存在しないか、アルキレンであり、ここで、前記アルキレ

50

ンの1つ以上の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、及び $-\text{N}(\text{R}^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 Q^1 が、独立して、存在しないか、 $-\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}^{49}$ 、 $-\text{NR}^{49}-\text{C}(\text{O})$ 、または $-\text{O}-$ 、及び $-\text{NR}^{49}$ から選択されるヘテロ原子基であり、ここで、少なくとも2つの炭素原子が、前記ヘテロ原子基 $-\text{O}-$ 及び $-\text{NR}^{49}$ を任意の他のヘテロ原子基から分離しており、

各 R^{49} が、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、前記アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

各 n が、独立して、0、1、2、3または4であり、 n が0より大きい場合、各 $(\text{T}^1-\text{Q}^1-\text{T}^1-\text{Q}^1)$ の各 T^1 及び各 Q^1 は独立して選択され、

各 R^{46} が、 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ であり、

各 R^{47} が、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{48}$ であり、

各 R^{48} が、独立して、 $-\text{H}$ 、または $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキルである、
先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1608】

22. 式O2を有する化合物：

$\text{Y}^1-\text{L}^2-(\text{Z}^{11})_{za}$

O2

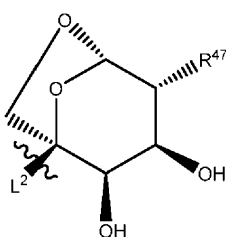
またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中、 Y^1 は、PNPLA3を標的とするオリゴヌクレオチドであり、

za は、1、2、または3であり、

L^2 は、結合基であり、

Z^{11} は、式(B)の化合物であり、 L^2 との結合位置が示されており、

【化291】



(B)

各 R^{47} は、独立して、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{OR}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{48}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、前記テトラゾール及びトリアゾールは、 R^{48} で任意に置換され、

各 R^{48} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキル、ハロ置換 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキル、ハロ置換 $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルケニル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキニル、ハロ置換 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルケニル、ハロ置換 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキニル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、前記アルキルまたはシクロアルキルの $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、及び $-\text{N}(\text{R}^{52})-$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、前記アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{52})_2$ 、 $-\text{OR}^{52}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{52})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 R^{49} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シ

クロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された前記アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{N}(\text{R}^{49a})$ で置き換えられてもよく、前記アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{49a})_2$ 、 $-\text{OR}^{49a}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{49a})$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各 R^{49a} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、

各 R^{52} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルケニル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルキニル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された前記アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{N}(\text{R}^{49})$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、前記アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{49})_2$ 、 $-\text{OR}^{49}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよい、

前記化合物または前記薬学的に許容される塩。

【1609】

23. L^2 が、式 $\text{L}1$ 、 $\text{L}2$ 、 $\text{L}3$ 、 $\text{L}4$ 、 $\text{L}5$ 、 $\text{L}6$ 、 $\text{L}7$ 、 $\text{L}8$ 、 $\text{L}9$ 、 $\text{L}10$ 、 $\text{L}11$ 、 $\text{L}12$ 、 $\text{L}13$ または $\text{L}14$ の化合物であり、 Y^1 及び Z^{11} との結合位置が示されており、

10

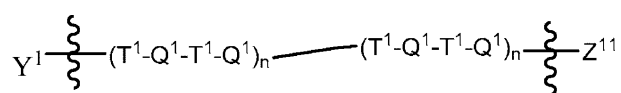
20

30

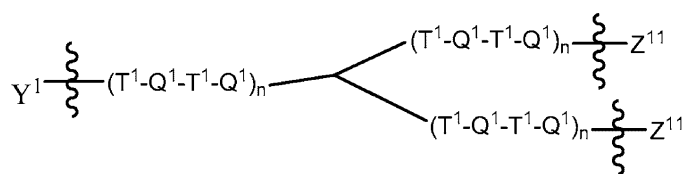
40

50

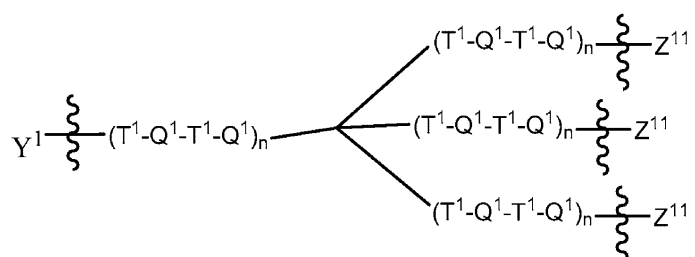
【化 2 9 2】



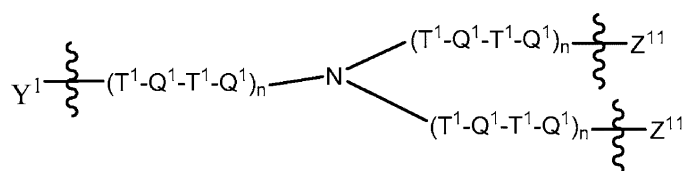
L1



L2



L3



L4

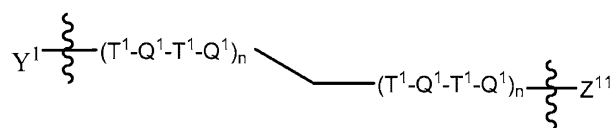
10

20

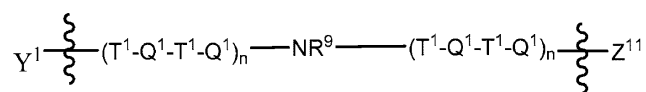
30

40

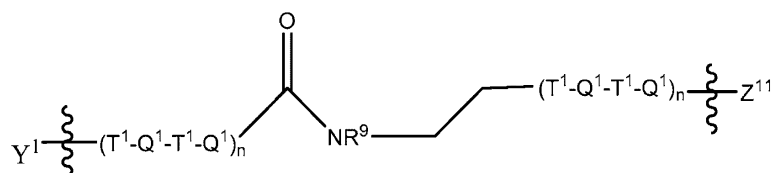
50



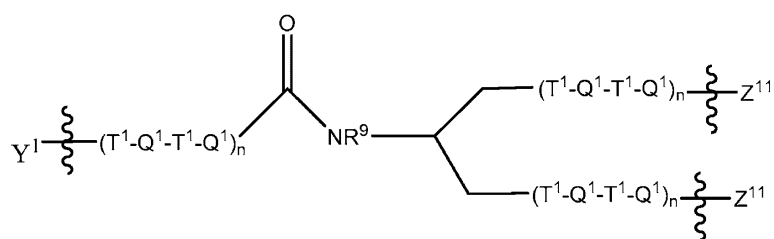
L5



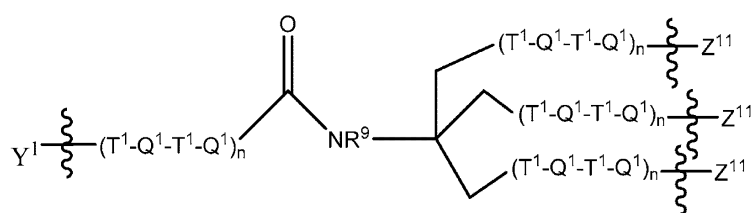
L6



L7



L8



L9

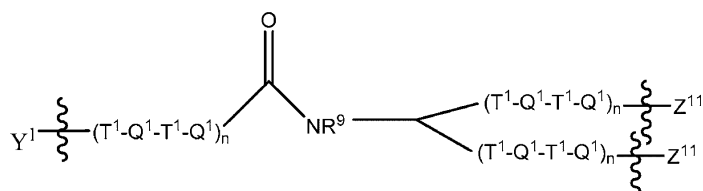
10

20

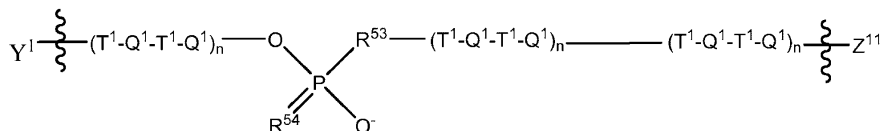
30

40

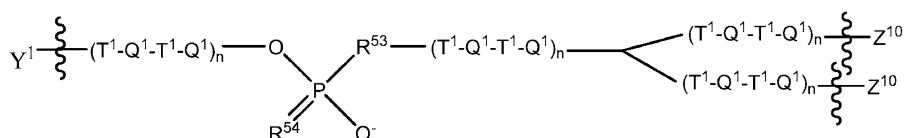
50



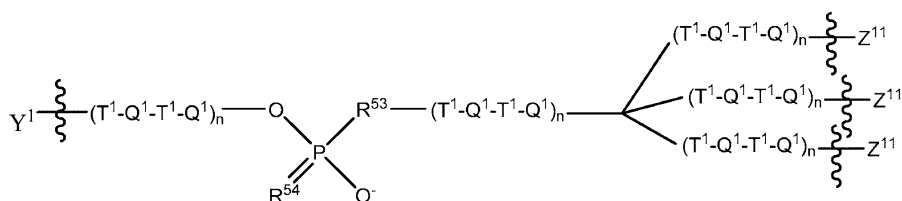
L10



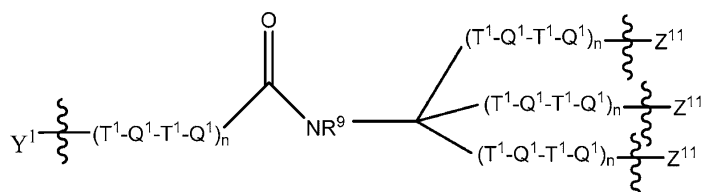
L11



L12



L13



L14

式中、各 T^1 は、独立して、存在しないか、アルキレン、アルケニレン、またはアルキニレンであり、ここで、前記アルキレン、アルケニレン、またはアルキニレンの1つ以上の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 Q^1 は、独立して、存在しないか、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-NR^{49}-$ 、 $-NR^{49}-C(O)-$ 、 $-O-C(O)-NR^{49}-$ 、 $-NR^{49}-C(O)-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NR^{49}-C(O)-NR^{49}-$ 、二価のヘテロアリール基、または $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S$

10

20

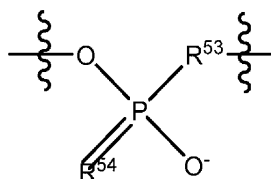
30

40

50

—S—、—S(O)—、—S(O)₂—、及び—NR⁴⁹—から選択されるヘテロ原子基（ここで、少なくとも2つの炭素原子が前記ヘテロ原子基—O—、—S—、—S—S—、—S(O)—、—S(O)₂—及び—NR⁴⁹—を任意の他のヘテロ原子基から分離している）、または次式の構造であり、

【化293】



10

ここで、R⁵³は—Oまたは—NHであり、R⁵⁴は—Oまたは—Sであり、

各R⁴⁹は、独立して、—H、—(C₁—C₂₀)アルキル、または—(C₃—C₆)シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された前記アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の—CH₂—基は、—O—、—S—、または—N(R^{49a})—で置き換えられてもよく、前記アルキルの—CH₃は、—N(R^{49a})₂、—OR^{49a}、及び—S(R^{49a})から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各R^{49a}は、独立して、—H、—(C₁—C₆)アルキル、または—(C₃—C₆)シクロアルキルであり、

20

R⁵³は、—Oまたは—NHであり、

R⁵⁴は、—Oまたは—Sであり、

各nは、独立して、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40であり、nが0より大きい場合、各(T¹—Q¹—T¹—Q¹)の各T¹及び各Q¹は独立して選択される、

先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1610】

30

24. Y¹が、少なくとも15塩基を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1611】

25. Y¹の塩基配列が、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列を含むか、もしくはその塩基配列であり、またはY¹の塩基配列が、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの配列の15個の連続塩基を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1612】

26. Y¹が、少なくとも1つのホスホジエステルヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

40

【1613】

27. Y¹が、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1614】

28. Y¹が、キラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1615】

29. Y¹が、Sp立体配置にキラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

50

【1616】

30. Y^1 が、R p 立体配置にキラル制御されたホスホロチオエートである、少なくとも1つのキラル制御された修飾ヌクレオチド間結合を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1617】

31. Y^1 が、前記キラル制御された修飾ヌクレオチド間結合またはキラル制御されたホスホロチオエートの場合、組成物内で少なくとも70%のジアステレオ純度を有するリンキラル中心を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1618】

32. Y^1 が、前記キラル制御された修飾ヌクレオチド間結合またはキラル制御されたホスホロチオエートの場合、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または99.5%のジアステレオ純度を有するリンキラル中心を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

10

【1619】

33. Y^1 が、少なくとも1つの糖修飾を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1620】

34. Y^1 が、少なくとも1つの塩基修飾を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

20

【1621】

35. 前記オリゴヌクレオチドの前記骨格結合のパターンが、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターンである、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1622】

36. 前記オリゴヌクレオチドの前記骨格キラル中心のパターンが、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターンである、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1623】

37. 前記オリゴヌクレオチドの前記化学修飾のパターンが、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドの化学修飾のパターンである、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

30

【1624】

38. 前記オリゴヌクレオチドの前記骨格結合のパターン、前記骨格キラル中心のパターン、及び／または前記化学修飾のパターンが、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンである、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1625】

39. 前記オリゴヌクレオチドの前記骨格結合のパターン、前記骨格キラル中心のパターン、及び前記化学修飾のパターンが、表1Aに列挙される任意のオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドの骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンである、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

40

【1626】

40. 前記オリゴヌクレオチドの前記骨格結合のパターン、前記骨格キラル中心のパターン、及び前記化学修飾のパターンが、表1Aに列挙されるオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドのものである Y^1 の骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、及び／または化学修飾のパターンであり、 Y^1 の塩基配列が、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの塩基配列を含むか、もしくはその塩基配列であり、または Y^1 の塩基配列が、表1Aに列挙される任意のPNPLA3オリゴヌクレオチドの配列の15個の連続塩基を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

50

【1627】

41. 前記オリゴヌクレオチドが、PNPLA3 標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性の減少を媒介する能力を有する、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1628】

42. 前記オリゴヌクレオチドが、RNase H、立体障害及び／またはRNA干渉によって媒介される機序を介して、PNPLA3 標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性の減少を媒介する能力を有する、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1629】

43. 各 R^{47} が、 $-N(R^{48})-C(O)-R^{48}$ であり、各 R^{48} が、独立して、 $-H$ 、または $-(C_1-C_5)$ アルキルである、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1630】

44. 各 T^1 が、独立して、存在しないか、アルキレンであり、ここで、前記アルキレンの1つ以上の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、及び $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 Q^1 が、独立して、存在しないか、 $C(O)$ 、 $C(O)-NR^{49}$ 、 $NR^{49}-C(O)$ 、または O 、及び NR^{49} から選択されるヘテロ原子基であり、ここで、少なくとも2つの炭素原子が、前記ヘテロ原子基 O 及び NR^{49} を任意の他のヘテロ原子基から分離しており、

各 R^{49} が、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_6)$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、前記アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

各 n が、独立して、0、1、2、3または4であり、 n が0より大きい場合、各 $(T^1-Q^1-T^1-Q^1)$ の各 T^1 及び各 Q^1 は独立して選択される、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1631】

45. (a) PNPLA3を標的とする能力を有するオリゴヌクレオチドと、(b) 結合基と、(c) Z^{10} 及び Z^{11} から独立して選択される1、2、または3つの部分とを含む化合物を含む、組成物であって、ここで、前記結合基は、前記オリゴヌクレオチドと前記1、2または3つの部分を結合し、式中、

各 Z^{10} は、独立して、式 Z^{12} 、 Z^{13} 、 Z^{14} 、 Z^{15} 、 Z^{16} 、 Z^{17} 、 Z^{18} 、 Z^{19} 、 Z^{20} 、もしくは Z^{21} の化合物、またはその幾何異性体もしくは位置異性体であり、 L^1 との結合位置が示されており、

10

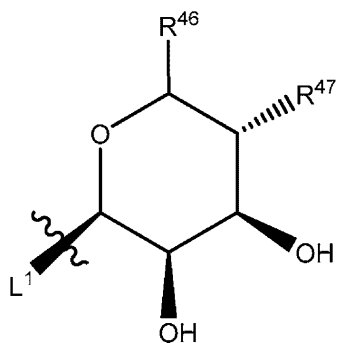
20

30

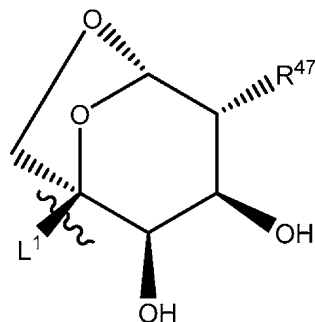
40

50

【化 2 9 4】

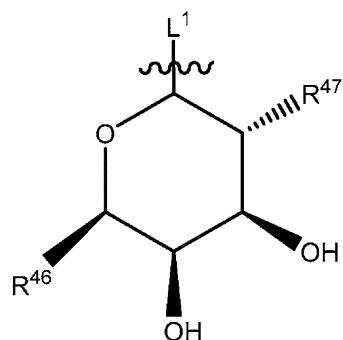


Z12



Z13

;



Z16

ここで、各 R^{46} は、独立して、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CN}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SH}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{R}^{51}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{52})-\text{R}^{51}$ 、またはアリールもしくはヘテロアリールであり、ここで、前記アリールまたはヘテロアリールは、 R^{51} で任意に置換され、

各 R^{47} は、独立して、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{OR}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{48}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、前記テトラゾール及びトリアゾールは、 R^{48} で任意に置換され、

各 R^{48} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキル、ハロ置換 (C_1-C_5) アルキル、ハロ置換 (C_3-C_6) シクロアルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルケニル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキニル、ハロ置換 (C_1-C_5) アルケニル、ハロ置換 (C_1-C_5) アルキニル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、前記アルキルまたはシクロアルキルの $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、及び $-\text{N}(\text{R}^{52})-$ から選択される

ヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、前記アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{52})_2$ 、 $-\text{OR}^{52}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{52})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

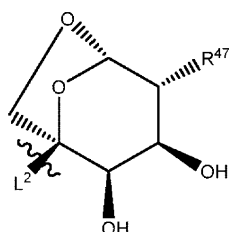
各 R^{51} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_3-\text{C}_{20})$ シクロアルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{60})$ アルケニル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{60})$ アルキニル、または $-(\text{C}_1-\text{C}_{60})$ アルキルであり、ここで、前記シクロアルキルの1～6個の $-\text{CH}_2-$ 基または前記アルキルの1～20個の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、及び $-\text{N}(\text{R}^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、前記アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{49})_2$ 、 $-\text{OR}^{49}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

各 R^{52} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルキル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルケニル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルキニル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された前記アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{N}(\text{R}^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、前記アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{49})_2$ 、 $-\text{OR}^{49}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、

各 R^{49} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_{20})$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された前記アルキルまたはシクロアルキルの1～6個の $-\text{CH}_2-$ 基は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{N}(\text{R}^{49a})-$ で置き換えられてもよく、前記アルキルの $-\text{CH}_3$ は、 $-\text{N}(\text{R}^{49a})_2$ 、 $-\text{OR}^{49a}$ 、及び $-\text{S}(\text{R}^{49a})$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各 R^{49a} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、

各 R^{49a} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ アルキル、または $-(\text{C}_3-\text{C}_6)$ シクロアルキルであり、

Z^{11} は、式(B)の化合物であり、 L^2 との結合位置が示されており、
【化295】



(B)

各 R^{47} は、独立して、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^{48})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{C}(\text{O})-\text{OR}^{48}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{48})-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^{48}$ 、テトラゾール、またはトリアゾールであり、ここで、前記テトラゾール及びトリアゾールは、 R^{48} で任意に置換され、

各 R^{48} は、独立して、 $-\text{H}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ アルキル、ハロ置換 $-(\text{C}_1-\text{C}_5)$ ア

ルキル、ハロ置換 $-(C_3-C_6)$ シクロアルキル、 $-(C_1-C_5)$ アルケニル、 $-(C_1-C_5)$ アルキニル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルケニル、ハロ置換 $-(C_1-C_5)$ アルキニル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、前記アルキルまたはシクロアルキルの $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、及び $-N(R^{52})-$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、前記アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{52})_2$ 、 $-OR^{52}$ 、及び $-S(R^{52})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、

各 R^{49} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された前記アルキルまたはシクロアルキルの1~6個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49a})-$ で置き換えられてもよく、前記アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49a})_2$ 、 $-OR^{49a}$ 、及び $-S(R^{49a})$ から選択されるヘテロ原子基で置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよく、各 R^{49a} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_6)$ アルキル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、

各 R^{52} は、独立して、 $-H$ 、 $-(C_1-C_{20})$ アルキル、 $-(C_1-C_{20})$ アルケニル、 $-(C_1-C_{20})$ アルキニル、または $-(C_3-C_6)$ シクロアルキルであり、ここで、少なくとも2つの炭素原子で分離された前記アルキルまたはシクロアルキルの1~6個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-N(R^{49})-$ から独立して選択されるヘテロ原子で各々独立して置き換えられてもよく、前記アルキルの $-CH_3$ は、 $-N(R^{49})_2$ 、 $-OR^{49}$ 、及び $-S(R^{49})$ から選択されるヘテロ原子基で各々独立して置き換えられてもよく、ここで、前記ヘテロ原子基は、少なくとも2つの炭素原子で分離されており、ここで、前記アルキル、アルケニル、アルキニル、及びシクロアルキルは、ハロ原子で置換されてもよい、

前記組成物。

【1632】

47. 特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたPNPLA3オリゴヌクレオチド組成物であって、前記特定のオリゴヌクレオチド型は、

a) 共通塩基配列及び長さであって、前記塩基配列は、PNPLA3標的遺伝子に相補的である、前記共通塩基配列及び長さ、

b) 骨格結合の共通パターン、

c) 骨格キラル中心の共通パターンであって、前記骨格キラル中心の共通パターンは、キラル制御されたキラル中心を含む少なくとも1つのヌクレオチド間結合を含む、前記骨格キラル中心の共通パターンによって特徴付けられ、

前記組成物は、前記特定のオリゴヌクレオチド型のオリゴヌクレオチドに関して、同じ共通塩基配列と長さを有するオリゴヌクレオチドの実質的なラセミ調製物と比較して、富化されているという点でキラル制御され、

前記オリゴヌクレオチド組成物は、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性を減少させる能力を有する、

前記組成物。

【1633】

48. 前記オリゴヌクレオチドが、RNase H、立体障害及び／またはRNA干渉によって媒介される機序を介して、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性を減少させる能力を有する、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物。

【1634】

49. 先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物を含む、組成物。

【1635】

50. 一本鎖RNAi剤であるPNPLA3オリゴヌクレオチドを含む組成物であって

10

20

30

40

50

、前記一本鎖RNA i 剤は、PNPLA3 標的RNA 配列に相補的または実質的に相補的であり、

約15～約49ヌクレオチドの長さを有し、

標的特異的なRNA 干渉を誘導する能力を有し、

前記一本鎖RNA i 剤は、少なくとも1つの非天然の塩基、糖、及び／またはヌクレオチド間結合を含み、

前記組成物は、PNPLA3 標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、レベル及び／または活性を減少させる能力を有する、前記組成物。

【1636】

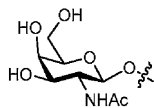
51. 1つまたは複数の前記オリゴヌクレオチドが、架橋二環式ケタールをさらに含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物。

10

【1637】

52. R^{CD} が、

【化296】



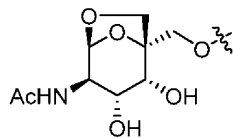
である、先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物。

【1638】

20

53. R^{CD} が、

【化297】



である、先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物。

【1639】

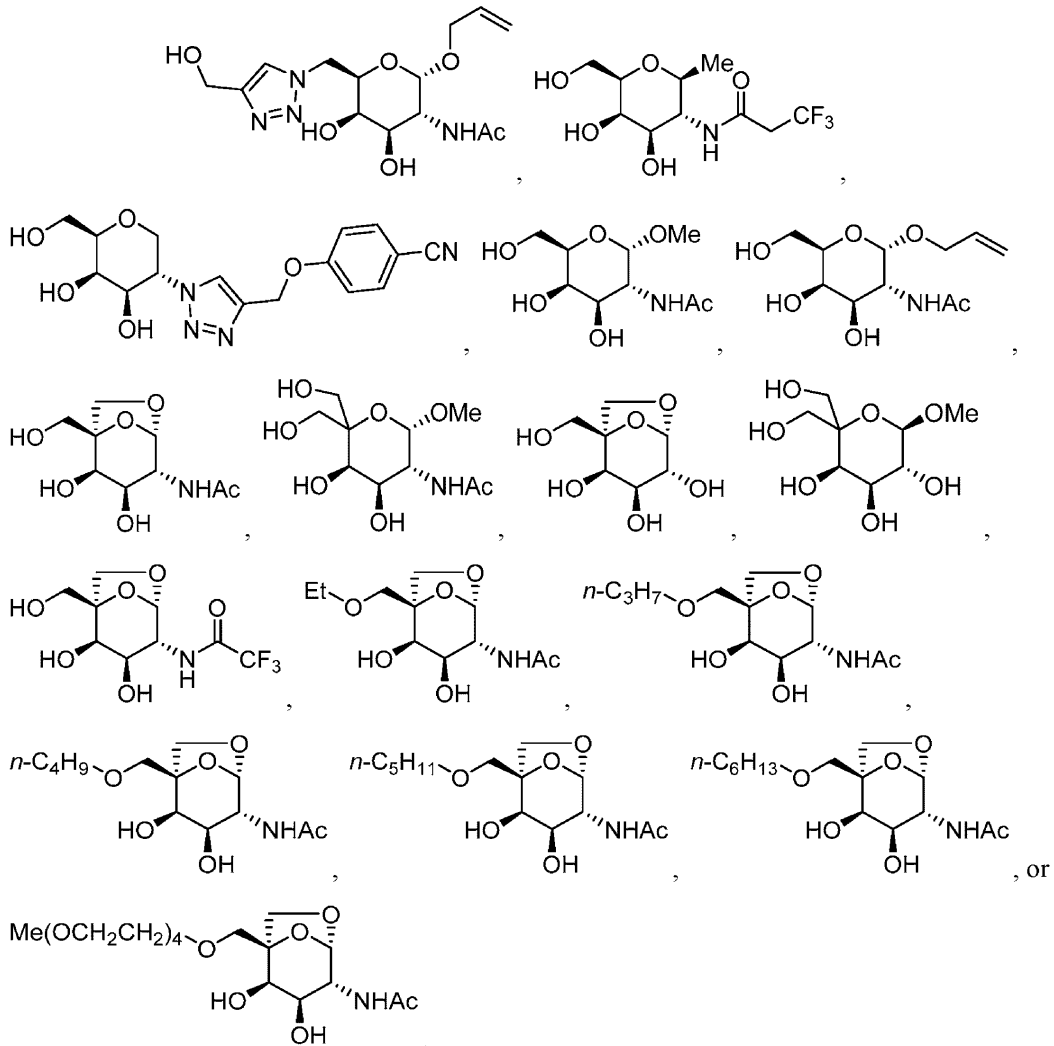
54. R^{CD} が、 $R^{CD}-H$ が、

30

40

50

【化 2 9 8】



10

20

であるような構造のものである、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の組成物。

30

【1 6 4 0】

5 5. R^{CD} が、リンカーを介して、1 つまたは複数の前記オリゴヌクレオチドに繋がれる、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の組成物。

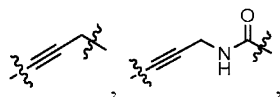
【1 6 4 1】

5 6. 前記リンカーが、 L^M である、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の組成物。

【1 6 4 2】

5 7. 前記リンカーが、

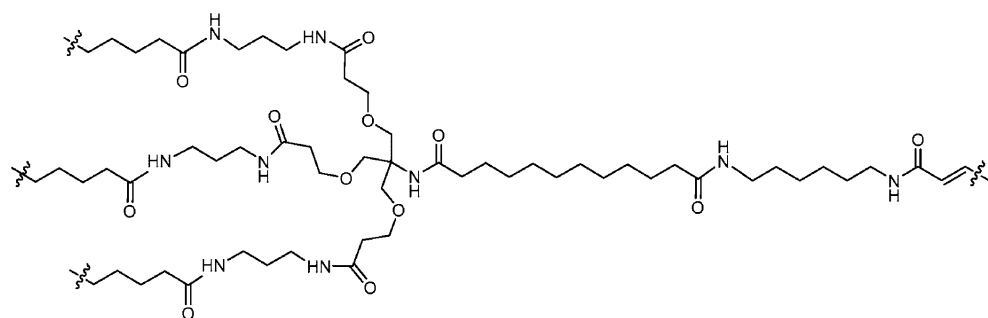
【化 2 9 9】



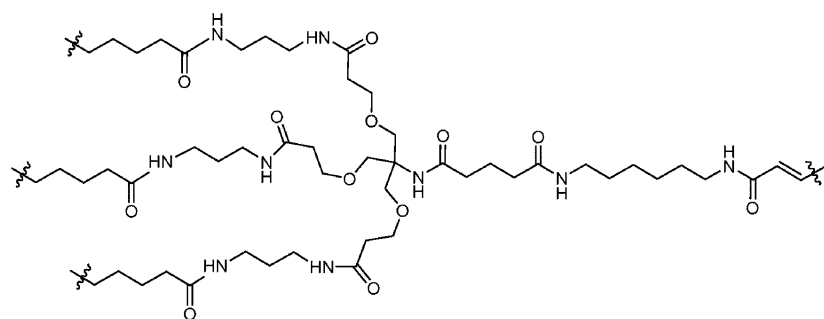
40

50

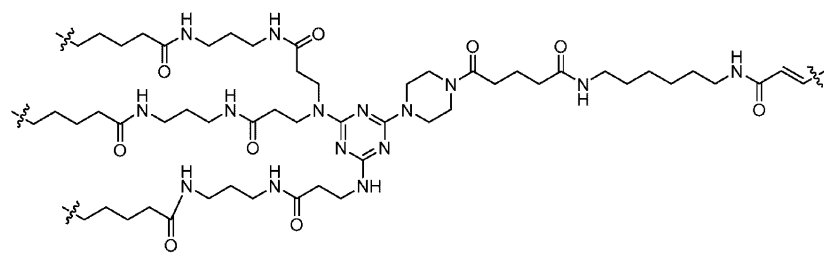
【化 3 0 0】



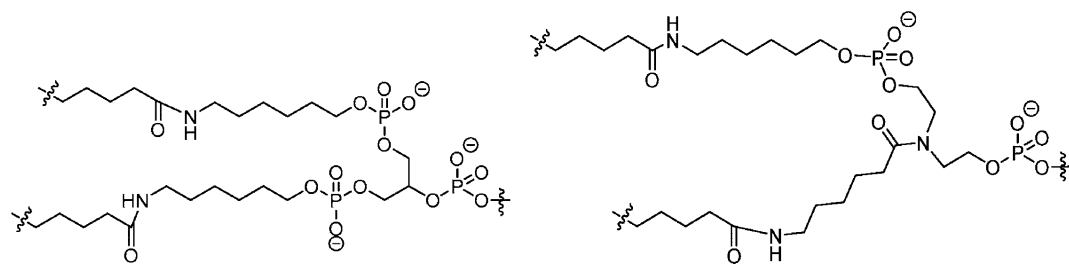
10



20



30



の構造を有する、先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物。

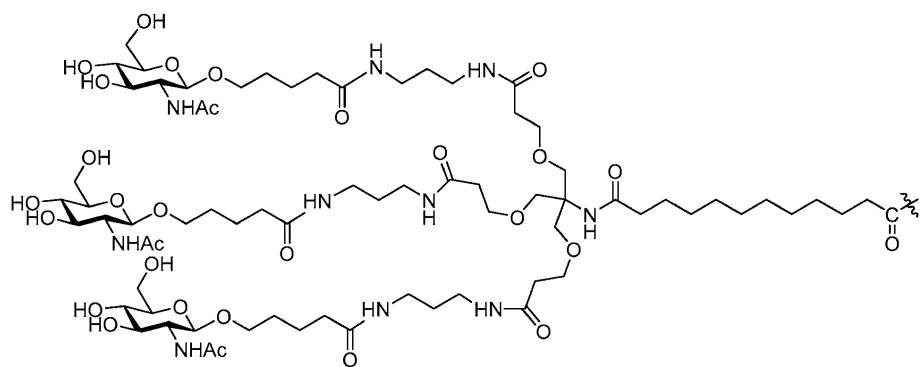
【1 6 4 3】

58. R^{CD} が、

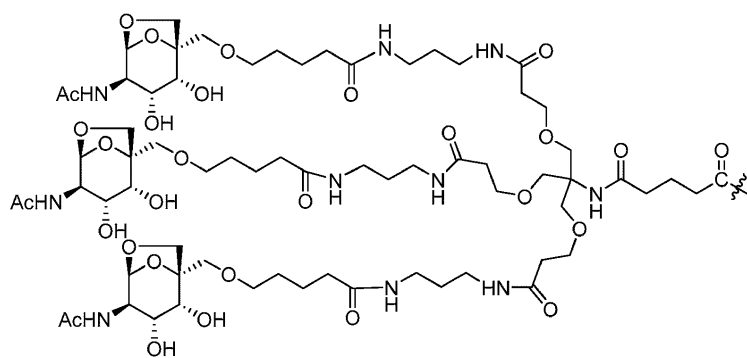
40

50

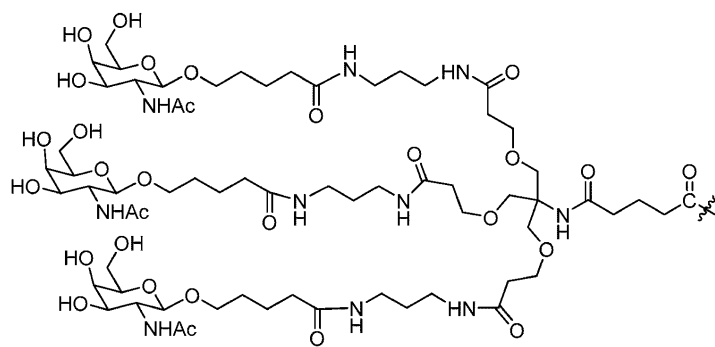
【化 3 0 1】



10



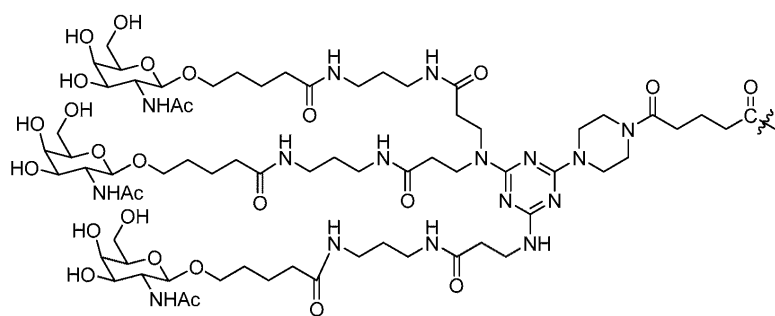
20



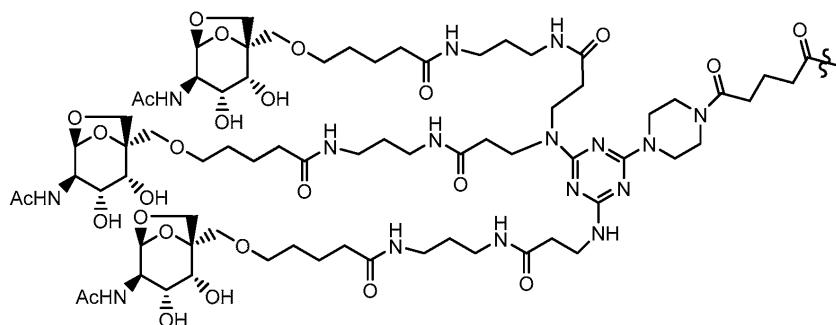
30

40

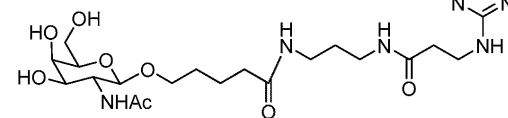
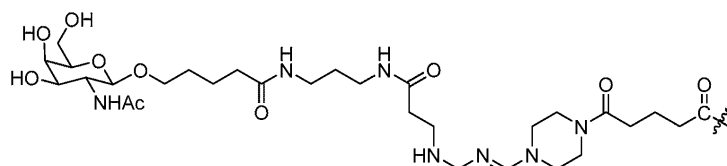
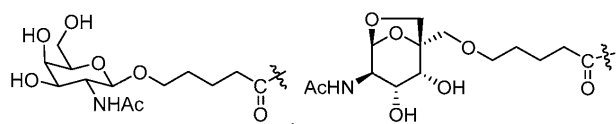
50



10



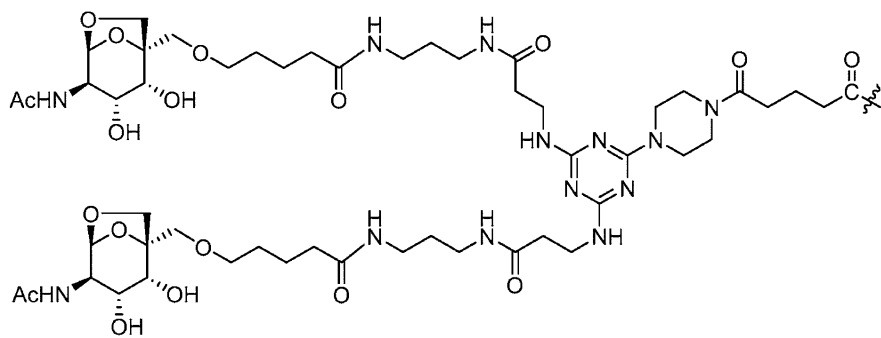
20



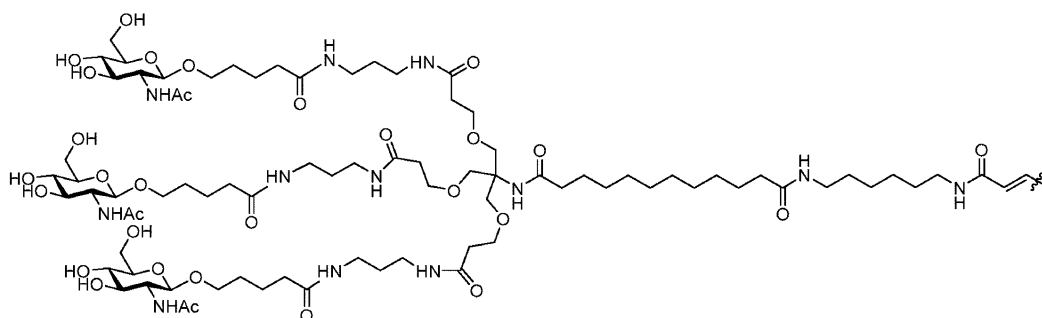
30

40

50



, or



から選択される、先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物。

【1644】

60. 少なくとも1つの薬学的に許容可能な賦形剤と混合された、先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物を治療有効量で含む、医薬組成物。

【1645】

61. 抗炎症性剤、抗糖尿病剤、及びコレステロール／脂質調整剤からなる群から選択される少なくとも1つの追加の医薬品をさらに含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物。

【1646】

62. 前記追加の医薬品が、アセチル-CoAカルボキシラーゼ (ACC) 阻害剤、ジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ1 (DGAT-1) 阻害剤、ジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ2 (DGAT-2) 阻害剤、モノアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ阻害剤、ホスホジエステラーゼ (PDE) -10 阻害剤、AMPK活性化剤、スルホニル尿素、メグリチニド、 α -アミラーゼ阻害剤、 α -グルコシドヒドロラーゼ阻害剤、 α -グルコシダーゼ阻害剤、PPAR γ アゴニスト、PPAR α ／ γ アゴニスト、ビグアニド、グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) 調節剤、リラグルチド、アルビグルチド、エキセナチド、アルビグルチド、リキシセナチド、デュラグルチド、セマグルチド、タンパク質チロシンホスファターゼ-1B (PTP-1B) 阻害剤、SIRT-1活性化剤、ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV) 阻害剤、インスリン分泌促進剤、脂肪酸酸化阻害剤、A2アンタゴニスト、c-junアミノ末端キナーゼ (JNK) 阻害剤、グルコキナーゼ活性化剤 (GKa)、インスリン、インスリン模倣剤、グリコーゲンホスホリラーゼ阻害剤、VPAC2受容体アゴニスト、SGLT2阻害剤、グルカゴン受容体調節剤、GPR119調節剤、FGF21誘導体もしくはアナログ、TGR5受容体調節剤、GPBAR1受容体調節剤、GPR40アゴニスト、GPR120調節剤、高親和性ニコチン酸受容体 (HM74A) 活性化剤、SGLT1阻害剤、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ酵素の阻害剤もしくは調節剤、フルクトース1, 6-ジホスファターゼの阻害剤、アルドースレダクターゼの阻害剤、ミネラルコルチコイド受容体阻害剤、TORC2の阻害剤、CCR2及び／またはCCR5の阻

40

50

害剤、PKCアイソフォーム（例えば、PKC α 、PKC β 、PKC γ ）の阻害剤、脂肪酸シンターゼの阻害剤、セリンパルミトイルトランスフェラーゼの阻害剤、GPR81、GPR39、GPR43、GPR41、GPR105、Kv1.3、レチノール結合タンパク質4、グルココルチコイド受容体、ソマトスタイン受容体の調節剤、PDHK2もしくはPDHK4の阻害剤もしくは調節剤、MAP4K4の阻害剤、IL1ベータを含むIL1ファミリーの調節剤、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、スクアレンシンターゼ阻害剤、フィブラート、胆汁酸隔離剤、ACAT阻害剤、MTP阻害剤、リポオキシゲナーゼ阻害剤、コレステロール吸収阻害剤、PCSK9調節剤、コレステリルエステル転移タンパク質阻害剤ならびにRXRアルファの調節剤からなる群から選択される、先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物。

10

【1647】

63. システアミンもしくはその薬学的許容可能な塩、シスタミンもしくはその薬学的許容可能な塩、抗酸化化合物、レシチン、ビタミンB複合体、胆汁塩製剤、カンナビノイド-1（CB1）受容体のアンタゴニスト、カンナビノイド-1（CB1）受容体のインバースアゴニスト、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体）活性制御剤、ベンゾチアゼピンもしくはベンゾチエピン化合物、タンパク質チロシンホスファターゼPTPRUを阻害するRNAアンチセンス構築物、ヘテロ原子結合置換ピペリジン及びその誘導体、ステアロイル補酵素アルファデルター9デサチュラーゼを阻害する能力を有するアザシクロペンタン誘導体、アディポネクチンの分泌促進活性もしくは誘導活性を有するアシルアミド化合物、第四級アンモニウム化合物、グラチラマー酢酸塩、ペントラキシンタンパク質、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、n-アセチルシステイン、イソフラボン化合物、マクロライド抗生物質、ガレクチン阻害剤、抗体、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つの追加の医薬品をさらに含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物。

20

【1648】

64. ヒトにおける、非アルコール性脂肪性肝疾患もしくは非アルコール性脂肪性肝炎の評価スコアリングシステムの重症度の少なくとも1点の減点、非アルコール性脂肪性肝炎活性の血清マーカーレベルの低下、非アルコール性脂肪性肝炎疾患活性の低下、または非アルコール性脂肪性肝炎の医学的結果の低減のための方法であって、そのような減点、低下または低減を必要とするヒトに、それを必要とする患者に対して治療有効量の先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物を投与するステップを含む、前記方法。

30

【1649】

65. ヒトにおける、脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、肝硬変を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、または肝硬変及び肝細胞癌を伴う非アルコール性脂肪性肝炎を治療するための方法であって、そのような治療を必要とするヒトに、それを必要とする患者に対して治療有効量の先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物を投与するステップを含む、前記方法。

【1650】

66. ヒトにおける、高脂血症、I型糖尿病、II型真性糖尿病、特発性I型糖尿病（Ib型）、成人潜在性自己免疫性糖尿病（LADA）、早期発症性2型糖尿病（EOD）、若年発症性非定型糖尿病（YOAD）、若年発症成人型糖尿病（MODY）、栄養不良に関連する糖尿病、妊娠糖尿病、冠状動脈性心疾患、虚血性脳卒中、血管形成術後の再狭窄、末梢血管疾患、間欠性跛行、心筋梗塞、脂質異常症、食後脂肪血症、耐糖能異常（IGT）の状態、空腹時血漿グルコース障害の状態、代謝性アシドーシス、ケトン症、関節炎、肥満症、骨粗鬆症、高血圧、うっ血性心不全、左心室肥大、末梢性動脈疾患、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、白内障、糖尿病性腎症、糸球体硬化症、慢性腎不全、糖尿病性ニューロパシー、メタボリックシンドローム、X症候群、月経前症候群、狭心症、血栓症、アテローム性動脈硬化症、一過性脳虚血発作、脳卒中、血管再狭窄、高血糖症、高インスリン血症、高トリグリセリド血症、インスリン抵抗性、グルコース代謝障害、勃起不全、皮膚及び結合組織障害、足部潰瘍及び潰瘍性大腸炎、内皮機能不全及び血管コンプライア

40

50

ンス低下、高アポBリポタンバク血症、アルツハイマー、統合失調症、認知障害、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、及び過敏性腸症候群、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）、または非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）を治療するための方法であって、そのような治療を必要とするヒトに、それを必要とする患者に対して治療有効量の先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物を投与するステップを含む、前記方法。

【1651】

67. ヒトにおける、脂肪肝、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、肝線維症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、肝硬変を伴う非アルコール性脂肪性肝炎、または肝硬変及び肝細胞癌を伴う非アルコール性脂肪性肝炎を治療するための方法であって、そのような治療を必要とするヒトに、

a. 先行実施形態のいずれか1つに記載の第1の組成物と、

c. 抗炎症性剤、抗糖尿病剤、及びコレステロール／脂質調整剤からなる群から選択される少なくとも1つの追加の医薬品、ならびに少なくとも1つの薬学的に許容可能な賦形剤を含む第2の組成物とを含む、治療有効量の2つの別個の医薬組成物を投与するステップを含む、前記方法。

【1652】

68. 前記第1の組成物及び前記第2の組成物が、同時に投与される、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【1653】

69. 前記第1の組成物及び前記第2の組成物が、逐次的に任意の順で投与される、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【1654】

70. ヒトにおける、門脈圧亢進症、肝タンパク質合成能力、高ビリルビン血症、または脳障害を低減するための方法であって、そのような治療を必要とするヒトに、それを必要とする患者に対して治療有効量の先行実施形態のいずれか1つに記載の組成物を投与するステップを含む、前記方法。

【1655】

71. 細胞における、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、活性及び／またはレベルを減少させる方法であって、前記細胞を、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物または組成物と接触させるステップを含む、前記方法。

【1656】

72. 患者における、PNPLA3標的遺伝子またはその遺伝子産物の発現、活性及び／またはレベルを減少させる方法であって、細胞を、先行実施形態のいずれか1つに記載の化合物または組成物と接触させるステップを含む、前記方法。

10

20

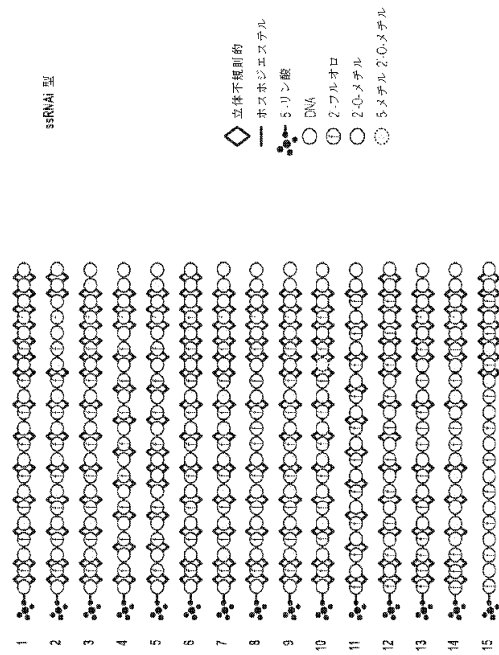
30

40

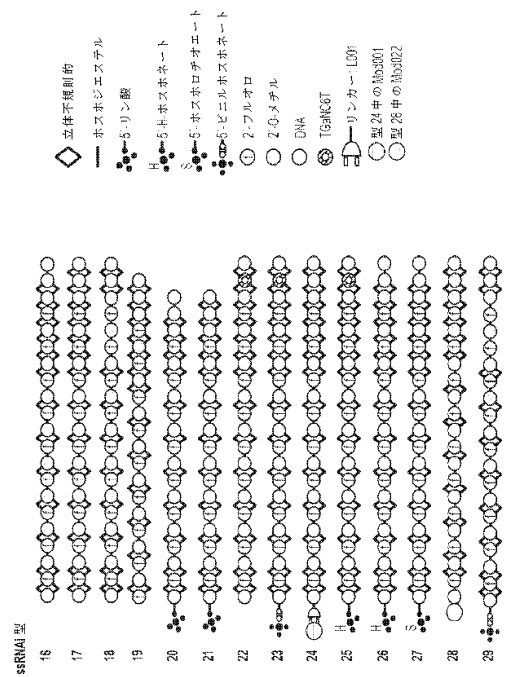
50

【図面】

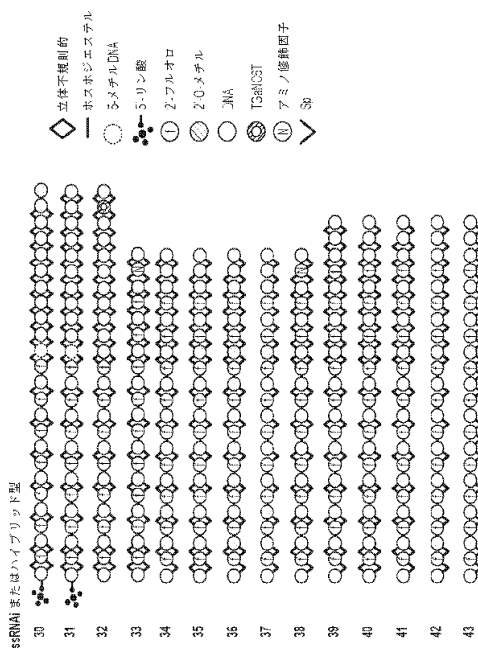
【図 1 A】



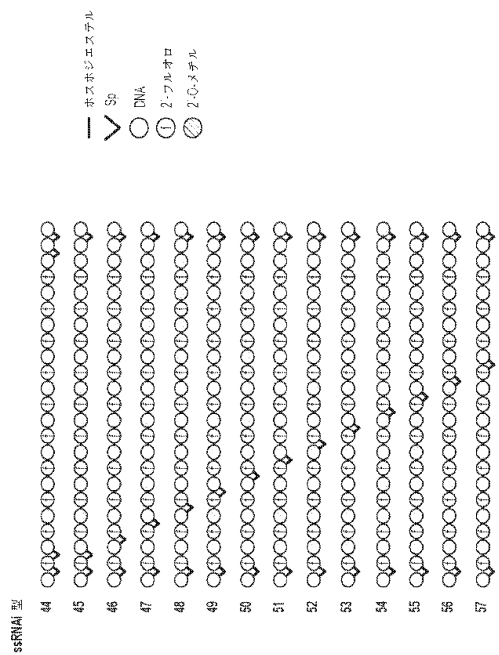
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】



10

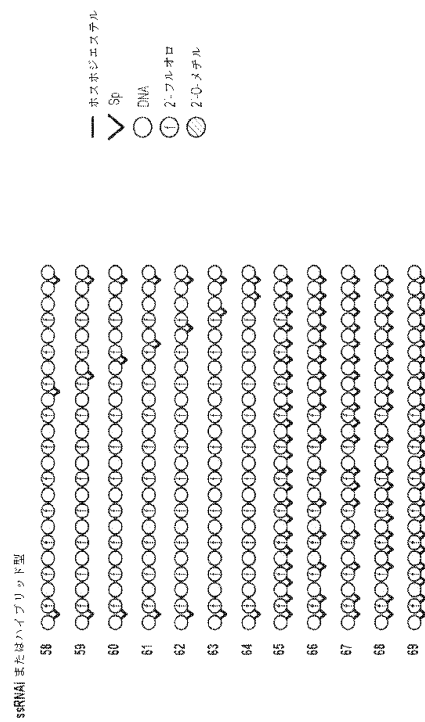
20

30

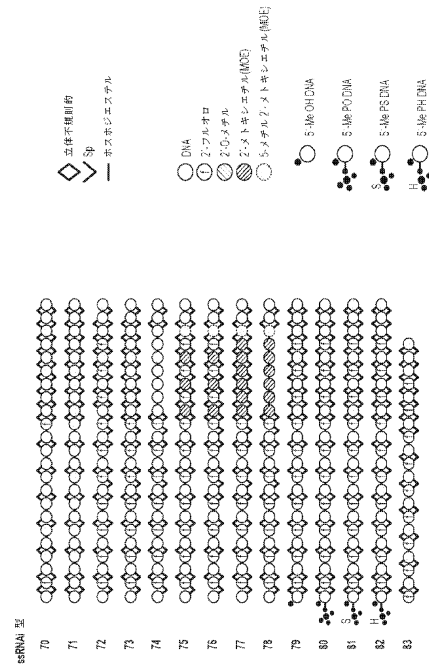
40

50

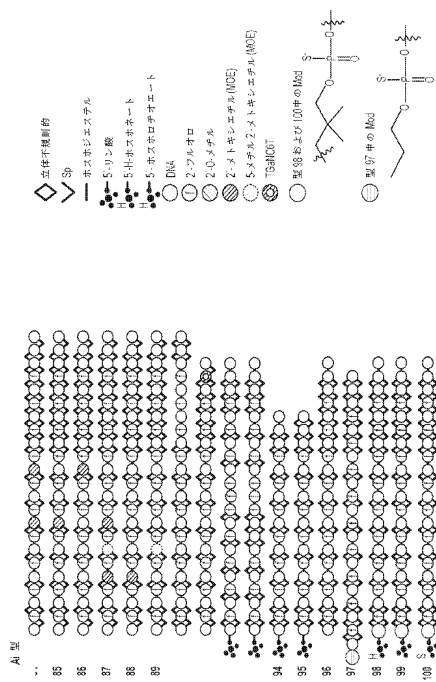
【図 1 E】



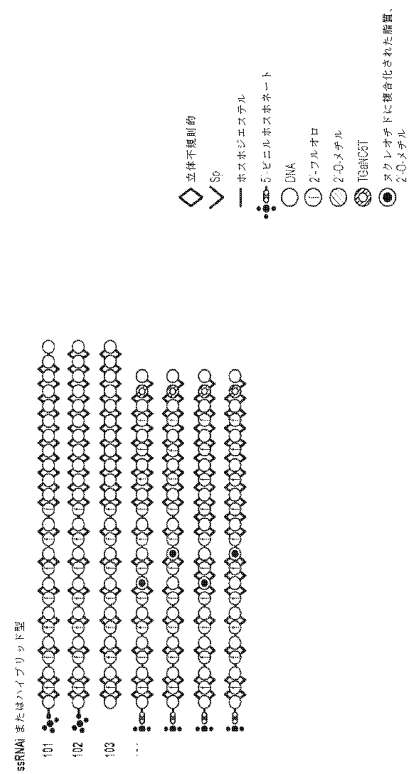
【図 1 F】



【図 1 G】



【図 1 H】



10

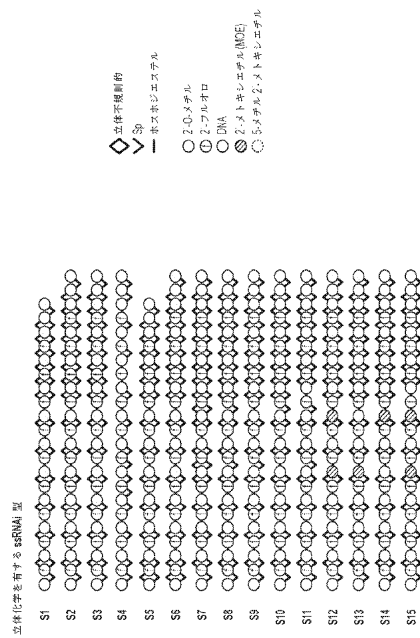
20

30

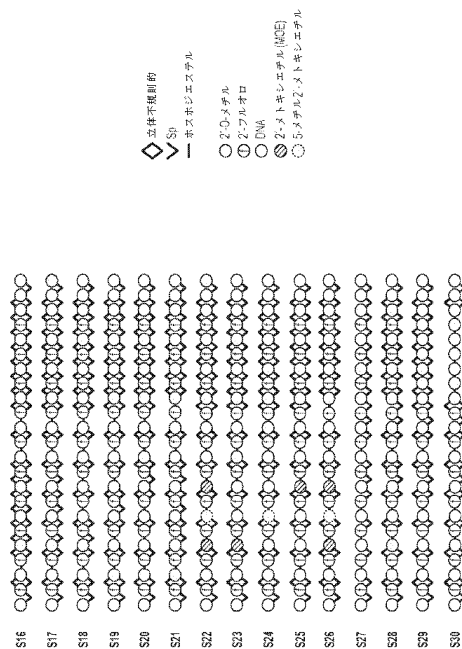
40

50

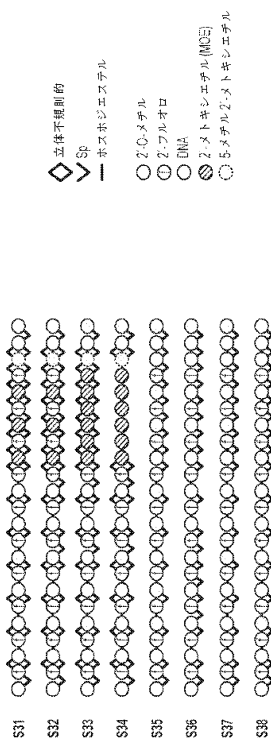
【図 1 I】



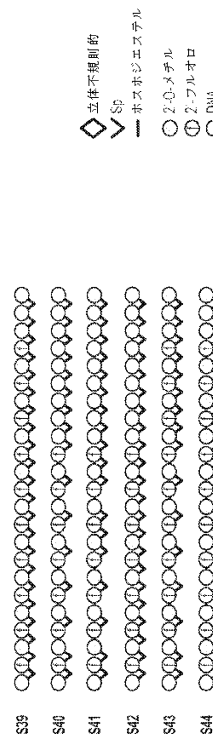
【図 1 J】



【図 1 K】



【図 1 L】



10

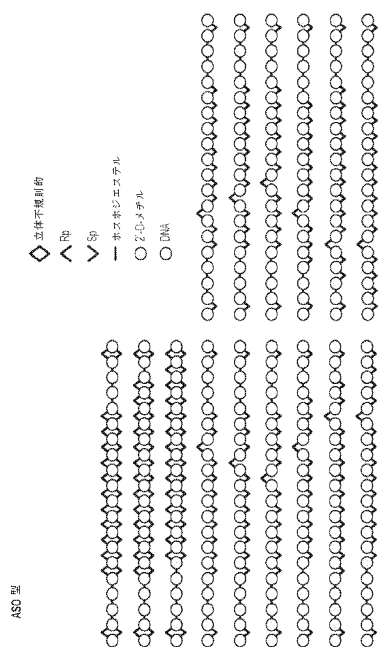
20

30

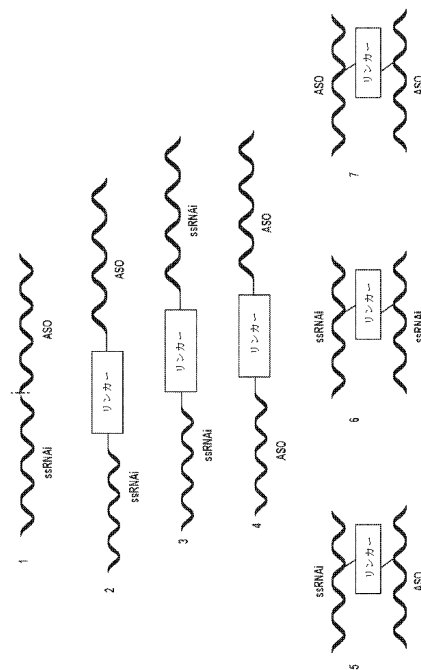
40

50

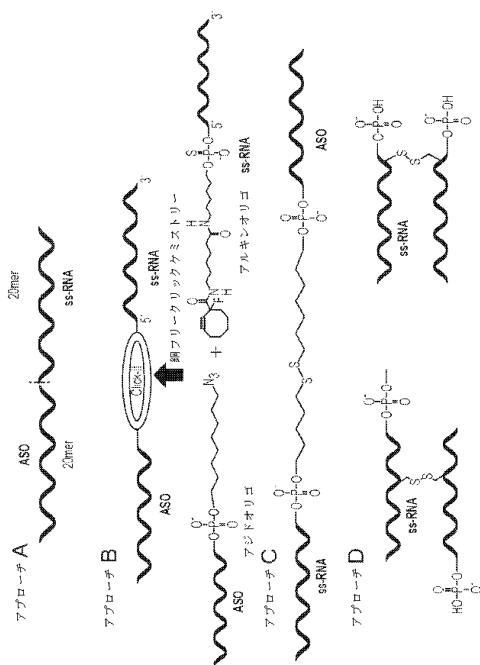
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 29/00

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

弁理士 三好 玲奈

(74)代理人

100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者

ヴァージェシー, チャンドラ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, 7 3 3 コンコルド アベニュー, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者

岩本 直樹

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, 7 3 3 コンコルド アベニュー, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者

バトラー, デイビット チャールズ ドネル

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, 7 3 3 コンコルド アベニュー, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者

マラッパン, スブラマニアン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, 7 3 3 コンコルド アベニュー, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者

ル, ゲンリャン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, 7 3 3 コンコルド アベニュー, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者

チャン, ジェイソン ジンシン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, 7 3 3 コンコルド アベニュー, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者

ヴァンパディーカル, ヴィノッド

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, 7 3 3 コンコルド アベニュー, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者

アッポニ, ルチアーノ エンリケ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, 7 3 3 コンコルド アベニュー, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者

ウィスニウスカ, ハンナ マリア

アメリカ合衆国, ロード アイランド州 0 2 9 0 3, プロヴィデンス, 2 0 ウェストミンスター ストリート アpartment 6エー

(72)発明者

チェン, シアユン

アメリカ合衆国, コネチカット州 0 6 4 7 5, オールド セイブロック, 2 1 2 オールド ポストン ポスト ロード

(72)発明者

チョ, ヤング ジン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, 7 3 3 コンコルド アベニュー, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

審査官

小倉 梢

(56)参考文献

国際公開第2017/062862 (WO, A2)

特表2018-524013 (JP, A)

国際公開第2016/130806 (WO, A2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST

N)