

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-513719

(P2022-513719A)

(43)公表日 令和4年2月9日(2022.2.9)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z 4 B 0 6 5
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	Z N A 4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全284頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-531966(P2021-531966)	(71)出願人	516212924
(86)(22)出願日	令和1年12月6日(2019.12.6)		ウェイブ ライフ サイエンス リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和3年7月29日(2021.7.29)		WAVE LIFE SCIENCES LTD.
(86)国際出願番号	PCT/US2019/065058		シンガポール 018936 シンガポール, #12-00 マリナ ワン イーストタワー, 7 ストライツ ビュー
(87)国際公開番号	WO2020/118246	(74)代理人	100079108
(87)国際公開日	令和2年6月11日(2020.6.11)		弁理士 稲葉 良幸
(31)優先権主張番号	62/776,432	(74)代理人	100109346
(32)優先日	平成30年12月6日(2018.12.6)		弁理士 大貫 敏史
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100117189
(31)優先権主張番号	PCT/US2019/027109		弁理士 江口 昭彦
(32)優先日	平成31年4月11日(2019.4.11)	(74)代理人	100134120
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	PCT/US2019/031672		

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方法

(57)【要約】

【課題】とりわけ、本開示は、設計されたDMDオリゴヌクレオチド、その組成物及び使用方法を提供する。

【解決手段】一部の実施形態において、本開示は、内部的にトランケートされているが、少なくとも部分的に機能性のジストロフィンタンパク質変異体に転写物が翻訳され得るように、エクソン51をスキップすることにより、突然変異体DMD転写物を修復するのに有用な技術を提供する。一部の実施形態において、本開示は、DMD転写物スプライシングを調節するのに有用な技術を提供する。一部の実施形態において、提供される技術は、ジストロフィン（DMD）DMD転写物のスプライシングを変化させることができる。一部の実施形態において、本開示は、限定はされないが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー筋ジストロフィー等を含む筋ジストロフィーなどの疾患を治療する方法を提供する。

【選択図】 図1

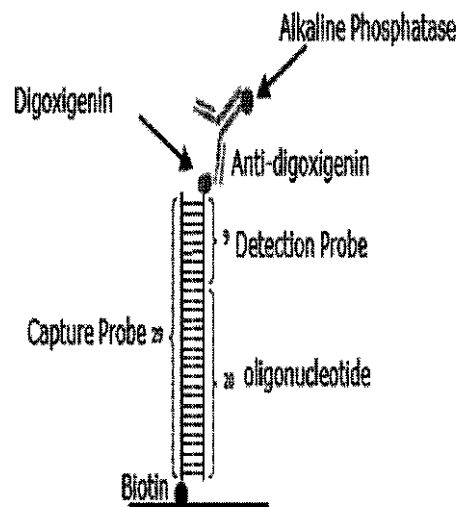


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド組成物であって、前記複数のオリゴヌクレオチドは、

1) 共通の塩基配列、及び

2) 独立に1つ又は複数（例えば、約1～50、1～40、1～30、1～25、1～20、1～15、1～10、5～50、5～40、5～30、5～25、5～20、5～15、5～10、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又はそれを超える）のキラルインターヌクレオチド結合（「キラル制御されたインターヌクレオチド結合」）における同じ結合リン立体化学

10

を共有し、

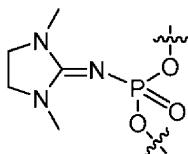
前記組成物は、前記複数のオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比較して、前記複数のオリゴヌクレオチドについて濃縮されているか、又は前記共通の塩基配列を共有する前記組成物中の前記オリゴヌクレオチドの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%は、前記複数のオリゴヌクレオチドである、オリゴヌクレオチド組成物。

【請求項 2】

前記複数のオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

【化 1】

20



の構造及び1つ又は複数の天然リン酸結合を有する1つ又は複数のホスホロチオエートインターヌクレオチド結合を含み、且つ独立に各キラルインターヌクレオチド結合における同じ結合リン立体化学を共有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

30

前記共通の塩基配列は、AGUUUCCUUA GUAA C C A C A Gである、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記塩基配列は、GGUAAGUUCUGUCCAAGCCCCであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記塩基配列は、GUACCUC C A A C A U C A A G G A Aであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記塩基配列は、CAACAUCAAGGAAGAU G G C Aであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

40

【請求項 7】

前記塩基配列は、GAUGGCAUUUCUAGUUUGGAであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記塩基配列は、AUGGCAUUUCUAGUUUGGAGであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記塩基配列は、UGGCAUUUCUAGUUUGGAG Aであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

50

【請求項 10】

前記塩基配列は、G G C A U U U C U A G U U U G G A G A Uであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記塩基配列は、G C A U U U C U A G U U U G G A G A U Gであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記塩基配列は、G C A G U U U C C U U A G U A A C C A Cであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記塩基配列は、C A G U U U C C U U A G U A A C C A C Aであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記塩基配列は、U U C C U U A G U A A C C A C A G G U Uであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記塩基配列は、U U G U G U C A C C A G A G U A A C A Gであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記塩基配列は、U G G C A G U U U C C U U A G U A A C Cであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記塩基配列は、U C A A G G A A G A U G G C A U U U C Uであるか又はそれを含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 18】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f A * S f G * S f U n 0 0 1 R f U * S f U * S f C n 0 0 1 R m C f U * S f U * S m A * S f G * S m U m A * S f A * S f C * S f C * S f A n 0 0 1 R f C * S f A * S f G

(式中、

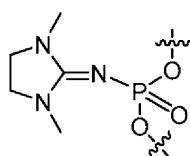
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 2】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである)

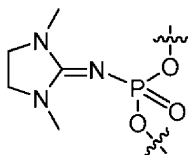
の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 19】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f C * S f C * S f U n 0 0 1 R f C * S f C * S m A f A * S m C * S f A * S m U f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f G * S f A * S f A

(式中、
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
***S** は、**S_p** ホスホロチオエートを表し；
m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
n001R は、
 【化3】



10

であり、ここで、リンは、**R_p** 配置のものである)
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

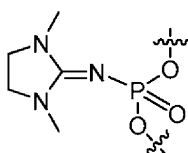
【請求項20】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

fU * S f G * S f G n001R f C * S f A * S f U n001R f U * S f U * S m C
f U * S m A * S f G * S m U f U * S f U * S f G * S f G n001R f A * S f G * S f A

20

(式中、
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
***S** は、**S_p** ホスホロチオエートを表し；
m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
n001R は、
 【化4】



30

であり、ここで、リンは、**R_p** 配置のものである)
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項21】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

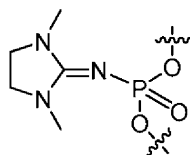
f G * S f G * S f C n001R f A * S f U * S f U n001R m U f C * S f U * S
m A * S f G * S m U m U * S f U * S f G * S f G * S f A n001R f G * S f A * S f U

40

(式中、
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
***S** は、**S_p** ホスホロチオエートを表し；
m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
n001R は、

50

【化 5】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 2 2】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m U
 f C * S m C * S f U * S m U f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C *
 S f C

（式中、

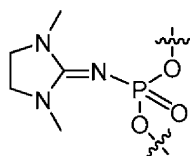
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S_pホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 6】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 2 3】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R m U f U * S f U * S
 m C * S f C * S m U m U * S f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C *
 S f C

（式中、

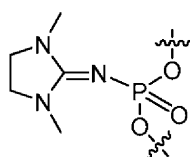
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S_pホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 7】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 2 4】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

$f G * S f G * S f U n 0 0 1 R f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m C f U * S m G * S f U * S m C f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f C * S f C * S f C$

(式中、

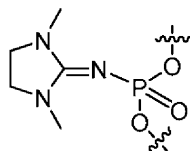
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

$* S$ は、 $S p$ ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

$n 0 0 1 R$ は、

【化 8】



であり、ここで、リンは、 $R p$ 配置のものである)

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 2 5】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

$f G * S f G * S f U n 0 0 1 R f A * S f A * S f G n 0 0 1 R m U f U * S f C * S m U * S f G * S m U m C * S f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f C * S f C * S f C$

(式中、

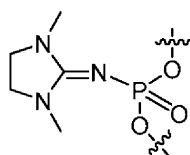
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

$* S$ は、 $S p$ ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

$n 0 0 1 R$ は、

【化 9】



であり、ここで、リンは、 $R p$ 配置のものである)

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 2 6】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

$f C * S f A * S f A n 0 0 1 R f C * S f A * S f U n 0 0 1 R f C * S f A * S m A f G * S m G * S f A * S m A f G * S f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A$

(式中、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

$* S$ は、 $S p$ ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

$n 0 0 1 R$ は、

10

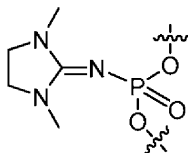
20

30

40

50

【化 1 0】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 2 7】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A n 0 0 1 R f U * S f U * S m U
f C * S m U * S f A * S m G f U * S f U * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f A *
S f G

（式中、

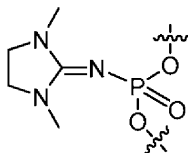
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S_pホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 1】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 2 8】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A n 0 0 1 R m U f U * S f U * S
m C * S f U * S m A m G * S f U * S f U * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f A *
S f G

（式中、

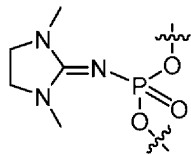
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S_pホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 2】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 2 9】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

$f G * S f C * S f A n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f U * S m A$
 $f G * S m U * S f U * S m U f G * S f G * S f A * S f G n 0 0 1 R f A * S f U * S f G$

(式中、

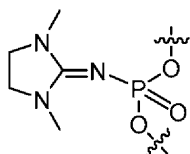
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

$* S$ は、 $S p$ ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

$n 0 0 1 R$ は、

【化 1 3】



であり、ここで、リンは、 $R p$ 配置のものである)

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 3 0】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

$f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f C * S m U$
 $f U * S m A * S f G * S m U f A * S f A * S f C * S f C n 0 0 1 R f A * S f C * S f A$

(式中、

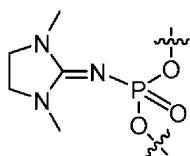
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

$* S$ は、 $S p$ ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

$n 0 0 1 R$ は、

【化 1 4】



であり、ここで、リンは、 $R p$ 配置のものである)

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 3 1】

組成物であって、前記組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

$f U * S f U * S f C n 0 0 1 R f C * S f U * S f U n 0 0 1 R m A f G * S f U * S$
 $m A * S f A * S m C m C * S f A * S f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f G * S f U * S f U$

(式中、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

$* S$ は、 $S p$ ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

$n 0 0 1 R$ は、

10

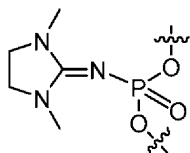
20

30

40

50

【化 1 5】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである)

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である、組成物。

【請求項 3 2】

液体組成物であり、前記オリゴヌクレオチドは、前記組成物に溶解された 1 つ又は複数の塩である、請求項 1 8 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記オリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、薬学的に許容可能な塩である、請求項 1 8 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記レベルは、約 5 0 % 以上である、請求項 1 8 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 5】

f A * S f G * S f U n 0 0 1 R f U * S f U * S f C n 0 0 1 R m C f U * S f U * S m A * S f G * S m U m A * S f A * S f C * S f C * S f A n 0 0 1 R f C * S f A * S f G

(式中、

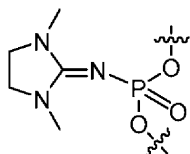
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S_pホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 6】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである)

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 3 6】

f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f C * S f C * S f U n 0 0 1 R f C * S f C * S m A f A * S m C * S f A * S m U f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f G * S f A * S f A

(式中、

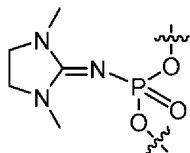
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S_pホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 7】



10

20

30

40

50

であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 37】

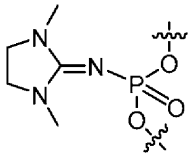
f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f U n 0 0 1 R f U * S f U * S m C
 f U * S m A * S f G * S m U f U * S f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f A * S f G *
 S f A

（式中、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S_pホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、

10

【化 18】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

20

【請求項 38】

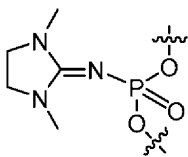
f G * S f G * S f C n 0 0 1 R f A * S f U * S f U n 0 0 1 R m U f C * S f U * S
 m A * S f G * S m U m U * S f U * S f G * S f G * S f A n 0 0 1 R f G * S f A *
 S f U

（式中、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S_pホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、

30

【化 19】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 39】

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m U
 f C * S m C * S f U * S m U f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C *
 S f C

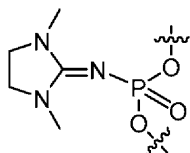
40

（式中、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S_pホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、

50

【化 2 0】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 0】

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R m U f U * S f U * S m C * S f C * S m U m U * S f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C * S f C

（式中、

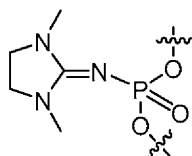
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S_pホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 2 1】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 1】

f G * S f G * S f U n 0 0 1 R f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m C f U * S m G * S f U * S m C f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f C * S f C * S f C

（式中、

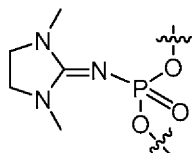
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S_pホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 2 2】



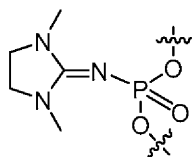
であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 2】

f G * S f G * S f U n 0 0 1 R f A * S f A * S f G n 0 0 1 R m U f U * S f C * S m U * S f G * S m U m C * S f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f C * S f C * S f C

（式中、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 2 3】

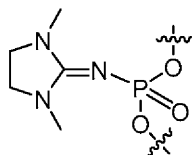


10

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである）
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 3】
 f C * S f A * S f A n 0 0 1 R f C * S f A * S f U n 0 0 1 R f C * S f A * S m A
 f G * S m G * S f A * S m A f G * S f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C *
 S f A

（式中、
 f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 2 4】

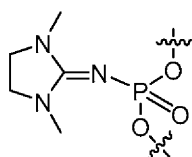


20

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである）
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 4】
 f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A n 0 0 1 R f U * S f U * S m U
 f C * S m U * S f A * S m G f U * S f U * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f A *
 S f G

（式中、
 f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 2 5】



30

40

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである）
 の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 5】

50

f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A n 0 0 1 R m U f U * S f U * S
m C * S f U * S m A m G * S f U * S f U * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f A *
S f G

(式中、

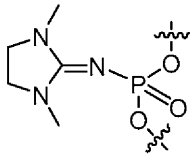
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 2 6】



10

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである)

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 6】

f G * S f C * S f A n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f U * S m A
f G * S m U * S f U * S m U f G * S f G * S f A * S f G n 0 0 1 R f A * S f U *
S f G

20

(式中、

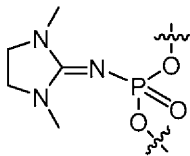
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 2 7】



30

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである)

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 7】

f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f C * S m U
f U * S m A * S f G * S m U f A * S f A * S f C * S f C n 0 0 1 R f A * S f C *
S f A

40

(式中、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

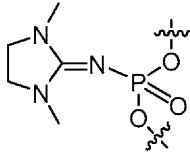
* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

50

【化 2 8】



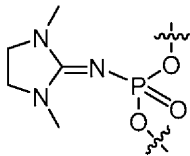
であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 8】

f U * S f U * S f C n 0 0 1 R f C * S f U * S f U n 0 0 1 R m A f G * S f U * S
m A * S f A * S m C m C * S f A * S f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f G * S f U *
S f U

（式中、
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
* S は、S_pホスホロチオエートを表し；
m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
n 0 0 1 R は、

【化 2 9】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである）
の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4 9】

薬学的に許容可能な塩である、請求項 3 5 ~ 4 8 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5 0】

約 5 0 % 以上のジアステロオマー純度を有する、請求項 3 5 ~ 4 9 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5 1】

有効量の、請求項 3 5 ~ 5 0 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド及び薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項 5 2】

標的転写物のスプライシングを変化させるための方法であって、請求項 1 ~ 5 1 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド組成物を投与することを含む方法。

【請求項 5 3】

ジストロフィンのエクソン 5 1 は、前記組成物の非存在と比較して増加したレベルでスキップされる、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）を治療するための方法であって、それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、請求項 1 ~ 3 4 又は 5 1 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、前記対象は、エクソン 5 1 のスキッピングに適した DMD 遺伝子の突然変異を有する、方法。

【請求項 5 5】

10

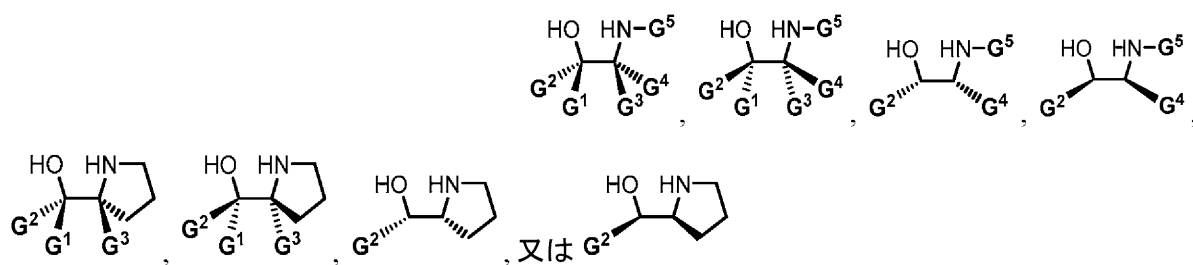
20

30

40

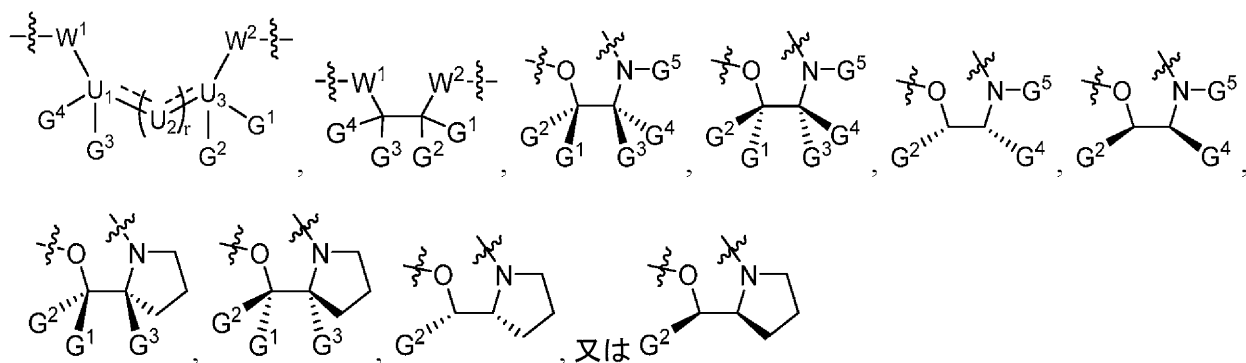
50

オリゴヌクレオチド又はそのオリゴヌクレオチド組成物を調製するための方法であって、
【化 3 0】



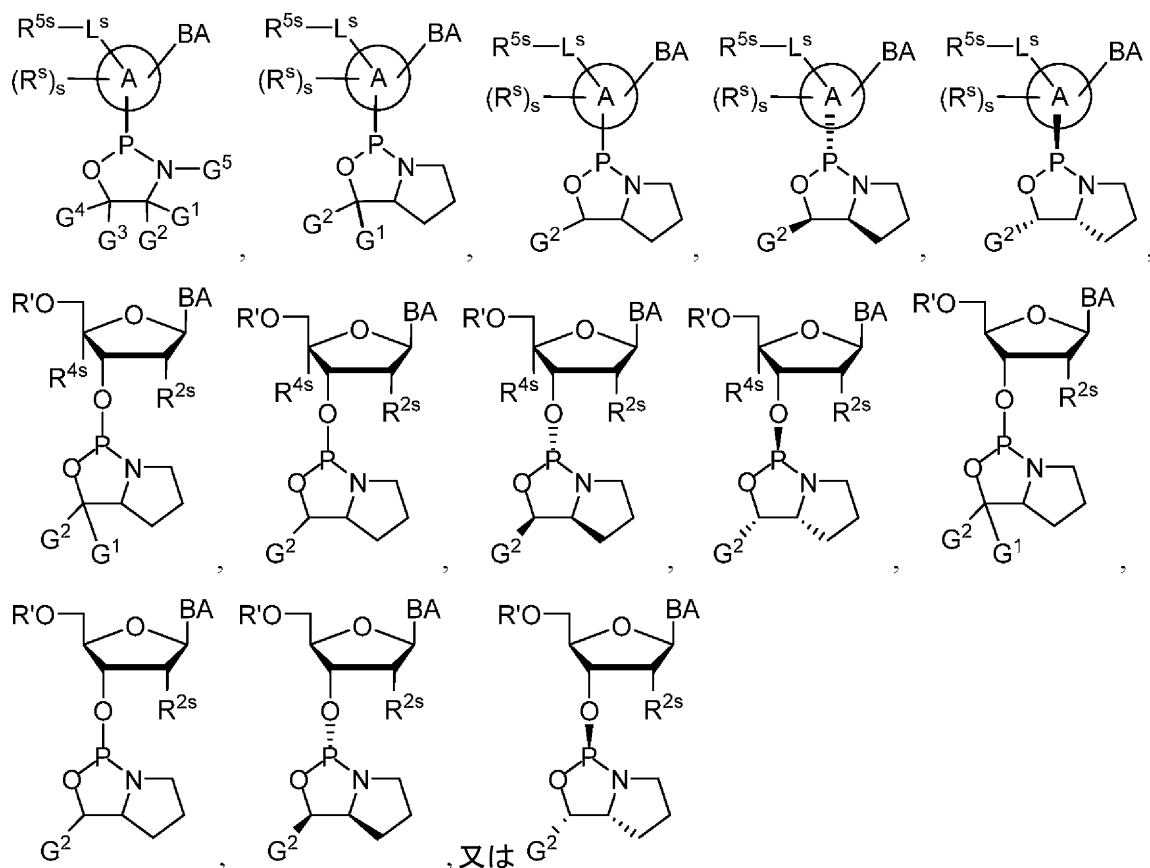
10

の構造を有する化合物又はその塩；又は
【化 3 1】



20

の構造を有するキラル補助部分を含むホスホルアミダイト化合物；又は
【化 3 2】



30

40

の構造を有するホスホルアミダイト化合物又はその塩を提供すること

50

を含む方法。

【請求項 56】

少なくとも1つの化合物において、 G^2 は、 $-L'-S(O)_2R'$ であり、ここで、 R' は、任意選択で置換されている $C_1\sim 6$ 脂肪族又はフェニルであり、及び L' は、 $-CH_2-$ である、請求項55に記載の方法。

【請求項 57】

少なくとも1つの化合物において、 G^2 は、 $-CH_2SiCH_3Ph_2$ である、請求項55又は56に記載の方法。

【請求項 58】

1つ又は複数のサイクルを含み、前記サイクルのそれぞれは、独立に、

- 1) 脱ブロック化；
- 2) カップリング；
- 3) 第1のキャッピング；
- 4) 修飾；及び
- 5) 第2のキャッピング

を含むか又はそれらからなる、請求項55～57のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

【00521】の実施形態1～17又は【00522】の1～512の化合物、組成物又は方法。

【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、2018年12月6日に提出された米国仮出願第62/776,432号、2019年10月16日に提出された同第62/916,192号及び2019年10月16日に提出された同第62/916,194号並びに2019年4月11日に提出され、2019年10月17日に国際公開第2019/200185号として公開されたPCT出願PCT/米国特許出願公開第2019/027109号及び2019年5月10日に提出され、2019年11月14日に国際公開第2019/217784号として公開されたPCT出願PCT/米国特許出願公開第2019/031672号に対する優先権を主張するものであり、これらの各々の全体は、参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

背景

オリゴヌクレオチドは、治療、診断、研究及びナノマテリアル適用において有用である。天然に存在する核酸（例えば、非修飾DNA又はRNA）を治療薬に使用するには、例えば、細胞外及び細胞内ヌクレアーゼに対するその不安定性及び／又はその細胞透過及び分布の不足に起因して限界があり得る。新規の改良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、例えば様々な疾患の治療に適した新規オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物などが必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

概要

とりわけ、本開示は、塩基配列、化学修飾（例えば、糖、塩基及び／又はインターヌクレオチド結合の修飾及びそのパターン）、及び／又は立体化学（例えば、骨格キラル中心（キラルインターヌクレオチド結合）の立体化学、及び／又はそのパターン）などのオリゴヌクレオチドの構造要素が、オリゴヌクレオチド特性、例えばエクソン（例えば、DMDのエクソン51）のスキッピング、毒性、安定性、タンパク質結合特性等に大きい影響を与え得るという認識を包含する。

【0004】

一部の実施形態において、本開示は、DMD遺伝子のエクソン、例えばエクソン51のスキップを媒介することができ、筋ジストロフィーを治療するのに有用なオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド組成物は、筋ジストロフィーの治療に有用である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書（例えば、表A1）において開示されるDMDオリゴヌクレオチド又はDMDオリゴヌクレオチド組成物であるDMDオリゴヌクレオチド又はDMDオリゴヌクレオチド組成物である。

【0005】

一部の実施形態において、本明細書で実証されたとおり、提供される技術（例えば、オリゴヌクレオチド、組成物、方法など）は、突然変異体mRNA（例えば、有害な突然変異を含むDMD転写物）及び／又はそれ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並びに修復されたmRNA（例えば、エクソン51がスキップされることにより有害な突然変異が欠失するか、修正されるか、又は補償されているDMD転写物）及び／又はそれによってコードされるタンパク質のレベルを増加させることに特に有用である。

【0006】

一部の実施形態において、提供される技術は、DMD転写物のスプライシングを調節すること、例えばそれにより望ましいスプライシング産物のレベルを増加させ、及び／又は望ましくないスプライシング産物のレベルを低減することに特に有用である。一部の実施形態において、提供される技術は、DMD転写物、例えばプレmRNA、RNA等のレベルを低減すること及び多くの場合にmRNA、タンパク質等、かかるDMD転写物から生じるか又はそれによってコードされる産物のレベルを低減することに特に有用である。一部の実施形態において、プレmRNA、又はmRNA、又はRNAは、ある細胞内コンパートメント（例えば、核、細胞質等）から別のコンパートメントに輸送され、及び／又は1つ以上の酵素によって修飾されている。

【0007】

例えば、一部の実施形態において、ジストロフィン遺伝子は、筋ジストロフィー（限定はされないが、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）及びベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）を含む）に関連する1つ以上の突然変異を含むエクソンを含み得る。一部の実施形態において、疾患関連エクソンは、エクソンに突然変異（例えば、ミスセンス突然変異、フレームシフト突然変異、ナンセンス突然変異、未成熟終止コドン等）を含む。一部の実施形態において、本開示は、より短い（例えば、内部でランケートされている）ながらも、部分的に機能性のジストロフィン（例えば、変異体）が産生され得るようにリーディングフレームを維持するか又は回復させつつ、1つ若しくは複数の疾患関連ジストロフィンエクソンを有効にスキッピングするための組成物及び方法を提供する。

【0008】

とりわけ、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物によるDMD転写物スプライシングの調節に化学修飾及び／又は立体化学を用い得ることを実証する。一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドの特性、例えばそれがDMD転写物のスプライシングを変化させる能力を改良する化学修飾及び立体化学の組み合わせを提供する。一部の実施形態において、本開示は、参照条件（例えば、その組成物が存在しないこと、参照組成物（例えば、同じ化学構成を有するDMDオリゴヌクレオチドのステレオランダムな組成物（当業者が理解するとおり、特に指示されない限り、化学構成とは、概して、分子実体中の原子のアイデンティティ及び結合の方法（及び対応する結合多重度）の記述であって、但し、その空間配置から生じる任意の差異を省いた記述を指す）、異なるキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物等）が存在すること、これらの組み合わせ等）と比較したとき、修飾された（例えば、修復された）mRNAを生じさせるDMDエクソン51のスキッピングの増加をもたらす、そうしたmRNAが翻訳されて、内部的にランケートされているが、少なくとも部分的に機能性のジストロフィンタンパク質変異体

10

20

30

40

50

を生じさせることのできるキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0009】

一部の実施形態において、参照条件と比較して、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は、意外にも有効である。一部の実施形態では、DMDエクソン51のスプライシングを5、10、15、20、25、30、40、50又は100倍超亢進させることができる。

【0010】

とりわけ、本開示は、低毒性のオリゴヌクレオチド組成物及びその使用方法を提供することが課題であることを認識する。一部の実施形態において、本開示は、毒性が減少したDMDオリゴヌクレオチド組成物及び方法を提供する。一部の実施形態において、本開示は、免疫応答の誘導が減少したDMDオリゴヌクレオチド組成物及び方法を提供する。

【0011】

一部の実施形態において、本開示は、hTLR9活性の拮抗作用が亢進したオリゴヌクレオチド組成物（例えば、DMDオリゴヌクレオチド及び組成物）を提供する。一部の実施形態において、筋ジストロフィーは、例えば、筋組織の炎症を伴う。一部の実施形態において、提供される技術（例えば、DMDオリゴヌクレオチド、組成物、方法等）は、亢進した活性（例えば、エクソンスキッピング活性）及び炎症を伴う1つ以上の病態及び／又は疾患に有益となり得るhTLR9アンタゴニスト活性の両方を提供する。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及び／又はその組成物は、エクソンスキッピング能と、毒性及び／又は炎症レベルの低下との両方を提供する。

【0012】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、各々が様々なタイプから独立に選択される多重インターヌクレオチド結合を含む。インターヌクレオチド結合の様々なタイプは、特性が異なる。いかなる理論による拘束も望むものではないが、天然リン酸結合（リン酸ジエステルインターヌクレオチド結合）は、アニオン性であり、他の化学修飾なしに単独で使用したときにインビボで不安定なこともあり；ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合は、アニオン性であり、概してインビボでの安定性が天然リン酸結合より高く、一部の例では疎水性がより高いことができ；環状グアニジン部分を含む、本開示で例示されるものなどの中性インターヌクレオチド結合は、生理的pHで中性であり、インビボでの安定性が天然リン酸結合より高く、且つ疎水性がより高いものであり得ることを本開示は指摘しておく。

【0013】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、あるpH〔例えば、ヒト生理的pH（約7.4）、送達部位（例えば、細胞小器官、細胞、組織、器官、生物等）のpH等〕における点で非負電荷（中性又はカチオン性）インターヌクレオチド結合である修飾インターヌクレオチド結合を含む。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、少なくとも一部の例では、オリゴヌクレオチド中の中性インターヌクレオチド結合は、中性インターヌクレオチド結合を含まない同等の核酸と比較して改良された特性及び／又はエクソン51のスキッピング、例えば改良された送達、改良されたエキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼ耐性、改良された細胞取込み、改良されたエンドソームエスケープ及び／又は改良された核取込み等をもたらし得る。

【0014】

一部の実施形態において、非負電荷インターヌクレオチド結合は、環状グアニジン部分を含む。一部の実施形態において、非負電荷インターヌクレオチド結合は、

10

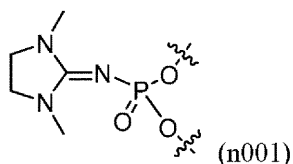
20

30

40

50

【化 1】



又はその立体異性体（例えば、n 0 0 1 R又はn 0 0 1 S）の構造を有する。一部の実施形態において、環状グアニジン部分を含む中性インターヌクレオチド結合は、キラル制御されている。一部の実施形態において、本開示は、少なくとも1つの中性インターヌクレオチド結合と、少なくとも1つのホスホロチオエートインターヌクレオチド結合とを含むオリゴヌクレオチドを含む組成物に関する。一部の実施形態において、本開示は、少なくとも1つの中性インターヌクレオチド結合、少なくとも1つの天然リン酸結合及び少なくとも1つのホスホロチオエートのインターヌクレオチド結合を含むオリゴヌクレオチドを含む組成物に関する。

10

【0 0 1 5】

とりわけ、本開示は、ステレオランダムなDMDオリゴヌクレオチド製剤が、例えば、DMD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の点で互いに異なる複数の個別的な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ない場合、ステレオランダムなDMDオリゴヌクレオチド製剤は、不確定なレベルのDMDオリゴヌクレオチド立体異性体を含む制御されない（又はステレオランダムな）組成物を提供する。これらの立体異性体と同じ塩基配列及び／又は化学修飾を有し得るとしても、その骨格立体化学が異なることに少なくとも起因して、それらは、異なる化学的実体であり、それらは、本明細書において実証されたとおり、異なる特性、例えばエクソン51のスキッピング、毒性、分布等を有し得る。とりわけ、本開示は、目的のDMDオリゴヌクレオチドの特定の立体異性体であるか又はそれを含むキラル制御された組成物を提供し；キラル制御されていない組成物と対照的に、キラル制御された組成物は、DMDオリゴヌクレオチドの特定の立体異性体の制御されたレベルを含む。一部の実施形態において、特定の立体異性体は、例えば、その塩基配列、その骨格結合のパターン、その骨格キラル中心のパターン及び骨格リン修飾のパターン等によって定義され得る。当技術分野において理解されたとおり、一部の実施形態において、塩基配列とは、単にひと続きの塩基を指し、及び／又はDMDオリゴヌクレオチド中のヌクレオシド残基の（例えば、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に存在するヌクレオチドと比べた糖及び／又は塩基成分の）アイデンティティ及び／又は修飾状態を指し、及び／又はかかる残基のハイブリダイゼーション特性（即ち特定の相補的残基とハイブリダイズする能力）を指し得る。一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド内における特定のキラル構造の包含及び／又は位置によって実現する特性の改良（例えば、エクソン51の改良されたスキッピング、低下した毒性等）が、化学修飾、例えば特定の骨格結合、残基修飾等を用いることによって（例えば、ある種の修飾リン酸〔例えば、ホスホロチオエート、置換ホスホロチオエート等〕、糖修飾〔例えば、2'-修飾等〕及び／又は塩基修飾〔例えば、メチル化等〕を用いることによって）実現するものと同等であるか又はそれよりむしろ良好であり得ることを実証する。一部の実施形態において、本開示は、ある種の化学修飾（例えば、2'-F、2'-OMe、ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合等）を含むDMDオリゴヌクレオチドのキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物が予想外に高いエクソンスキッピング効率を実証することを実証する。

20

30

40

【0 0 1 6】

一部の実施形態において、本開示は、

- 1) DMD転写物中の標的配列に相補的な共通の塩基配列を有し；及び
- 2) 1つ以上の修飾糖部分及び修飾インターヌクレオチド結合を含む、

50

複数の D M D オリゴヌクレオチドを含む D M D オリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、D M D オリゴヌクレオチドは、本明細書（例えば、表 A 1）において記載される D M D オリゴヌクレオチドである。

【0017】

一部の実施形態において、提供される D M D オリゴヌクレオチド組成物は、それが D M D 転写物スプライシングシステム内の D M D 転写物と接触されるとき、その組成物が存在しないこと、参照組成物が存在すること及びこ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に対して D M D 転写物のスプライシングが変化される（例えば、エクソン 51 のスキッピングが増加される）ことを特徴とする。

【0018】

一部の実施形態において、参照条件は、その組成物が存在しないことである。一部の実施形態において、参照条件は、参照組成物が存在することである。参照の複数の D M D オリゴヌクレオチドを含む例示的参照組成物については、本開示に詳細に記載される。一部の実施形態において、参照の複数の D M D オリゴヌクレオチドは、提供される組成物における複数の D M D オリゴヌクレオチドと比較して異なる構造要素（化学修飾、立体化学等）を有する。一部の実施形態において、参照組成物は、同じ化学修飾を有する D M D オリゴヌクレオチドのステレオランダムな製剤である。一部の実施形態において、参照組成物は、立体異性体の混合物である一方、提供される組成物は、1つの立体異性体のキラル制御された D M D オリゴヌクレオチド組成物である。一部の実施形態において、参照の複数の D M D オリゴヌクレオチドは、提供される組成物における複数の D M D オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列、同じ糖修飾、同じ塩基修飾、同じインターヌクレオチド結合修飾及び／又は同じ立体化学を有するが、異なる化学修飾、例えば塩基修飾、糖修飾、インターヌクレオチド結合修飾等を有する。

【0019】

例示的スプライシングシステムは、当技術分野において広く公知である。一部の実施形態において、スプライシングシステムは、関連性のある標的 D M D 転写物のスプライシングを実現するのに十分な成分を含むインビボ又はインビトロシステムである。一部の実施形態において、スプライシングシステムは、スプライソソーム（例えば、タンパク質及び／又はその R N A 成分）であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、スプライシングシステムは、細胞小器官膜（例えば、核膜）及び／又は細胞小器官（例えば、核）であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、スプライシングシステムは、細胞又はその集団であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、スプライシングシステムは、組織であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、スプライシングシステムは、生物、例えば動物、例えばマウス、ラット、サル、イヌ、ヒト等の哺乳類であるか又はそれを含む。

【0020】

一部の実施形態において、本開示は、

- 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 D M D オリゴヌクレオチドタイプの複数の D M D オリゴヌクレオチドを含む D M D オリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、D M D オリゴヌクレオチドは、本明細書（例えば、表 A 1）において記載される D M D オリゴヌクレオチドである。

【0021】

一部の実施形態において、本開示は、

- 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DMDオリゴヌクレオチドタイプの複数のDMDオリゴヌクレオチドを含むDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、

この組成物は、キラル制御されており、及びそれは、同じ塩基配列を有するDMDオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比べて特定のDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドが強化されており、

このDMDオリゴヌクレオチド組成物は、それがDMD転写物スプライシングシステム内のDMD転写物と接触されるとき、その組成物が存在しないこと、参照組成物が存在すること及びこ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に対してDMD転写物のスプライシングが変化される（例えば、エクソン51のスキッピングが増加される）ことを特徴とし、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、本明細書（例えば、表A1）において記載されるDMDオリゴヌクレオチドである。

【0022】

一部の実施形態において、本開示は、表A1にあ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し、ここで、オリゴヌクレオチドは、1つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個又はそれを超える）のキラル制御されたインターヌクレオチド結合（例えば、S、R、nS又はnRのもの）を含み、ここで、オリゴヌクレオチドは、任意選択で、薬学的に許容可能な塩形態である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ナトリウム塩として提供される。

【0023】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおり、複数のオリゴヌクレオチドは、同じ化学構成を共有する。一部の実施形態において、組成物中の複数のオリゴヌクレオチドのキラル制御されたインターヌクレオチド結合について、複数のオリゴヌクレオチドの同じ化学構成を共有する組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%、好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合に同じ結合リン配置を共有する。

【0024】

一部の実施形態において、DMD転写物は、ジストロフィン遺伝子又はその変異体のものである。

【0025】

一部の実施形態において、本開示は、本明細書に開示される任意のDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物を提供する。一部の実施形態において、本開示は、本明細書に開示される任意のキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物を提供する。一部の実施形態において、本開示は、本明細書に開示される任意のキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有する。

【0026】

一部の実施形態において、本開示は、本明細書（例えば、表A1）において記載される任意の個々のDMDオリゴヌクレオチドに関する。

【0027】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及び／又は組成物は、エクソン51のスキッピングを媒介する能力を有する。一部の実施形態において、かかるDMDオリゴヌクレオチド及び組成物の非限定的な例として、WV-20011、WV-20052、WV-20059、WV-20072、WV-20073、WV-20074、WV-20075、WV-20076、WV-20096、WV-20097、WV-20101及びWV-20119のもの並びにこれらのDMDオリゴヌクレオチドのいずれかの少なくとも15隣接塩基を含む塩基配列を有する他のDMDオリゴヌクレオチドが

挙げられる。

【0028】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20011を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

【0029】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20052を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

【0030】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20059を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

10

【0031】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20072を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

【0032】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20073を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

【0033】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20074を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

【0034】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20075を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

20

【0035】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20076を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

【0036】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20096を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

【0037】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20097を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

30

【0038】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20101を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

【0039】

一部の実施形態において、本開示は、WV-20119を含むDMDオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド組成物又はその使用方法に関する。

【0040】

一部の実施形態において、本開示は、本明細書（例えば、表A1）において開示される任意のDMDオリゴヌクレオチドの製造方法に関する。

40

【0041】

一部の実施形態において、本開示は、本明細書（例えば、表A1）において開示される任意のDMDオリゴヌクレオチドを含む医薬に関する。

【0042】

いくつかの実施形態において、本明細書のオリゴヌクレオチド配列（限定はされないが、表A1を含む）では、糖が指定されていない場合、その糖は、天然DNA糖であり；及びインターヌクレオチド結合が指定されていない場合、そのインターヌクレオチド結合は、天然リン酸結合である。

【0043】

一部の実施形態において、本開示は、本表のいずれかから選択されるDMDオリゴヌクレ

50

オチドのキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0044】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、天然リン酸結合又はホスホロチオエートインターヌクレオチド結合であるインターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合は、キラル制御されていない。一部の実施形態において、ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である（例えば、Sp又はRp）。

【0045】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、非負電荷インターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、中性インターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、中性インターヌクレオチド結合は、環状グアニジン部分であるか又はそれを含む。

【0046】

一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、グアニジン部分を含む。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、環状グアニジン部分を含む。一部の実施形態において、環状グアニジン部分を含むインターヌクレオチド結合は、n001の構造を有する。一部の実施形態において、中性インターヌクレオチド結合又は環状グアニジン部分を含むインターヌクレオチド結合は、立体化学的に制御されている。

【0047】

一般に、本明細書に記載されるとおりのDMD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を用いて評価することができる。典型的には、異なる組成物（例えば、立体制御された組成物対立体制御されていない組成物及び／又は別の立体制御された組成物）の相対毒性及び／又はタンパク質結合特性は、同じアッセイにおいて、一部の実施形態では実質的に同時に及び一部の実施形態では過去の結果を参照して望ましくは決定される。

【0048】

当業者は、特定のDMDオリゴヌクレオチド組成物に適切なアッセイを分かっており、及び／又はそれを容易に開発することができるであろう。本開示は、例えば、DMDオリゴヌクレオチド組成物挙動の1つ以上の特徴、例えば補体活性化、注射部位炎症、タンパク質結合等を評価することにおいて有用であり得るある種の特定のアッセイについての説明を提供する。

【0049】

例えば、DMDオリゴヌクレオチド組成物の毒性及び／又はタンパク質結合特性を評価することにおいて有用であり得るある種のアッセイには、本明細書に説明及び／又は例示される任意のアッセイが含まれ得る。

【0050】

一部の実施形態において、本開示は、同じ塩基配列を共有する複数のDMDオリゴヌクレオチドを含むDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のキラル制御されたインターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、本開示は、同じ化学構成を共有する複数のDMDオリゴヌクレオチドを含むDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のキラル制御されたインターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド組成物がDMD転写物スプライシングシステム内のDMD転写物と接触されると、その組成物が存在しないこと、参照組成物が存在すること及びこ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に対してDMD転写物のスプライシングが変化される（例えば、エクソン51のスキッピングが増加される）。一部の実施形態では、1つのエクソン（例えば、一部の実施形態ではエクソン51）がスキップされているスプライシング産物及

10

20

30

40

50

び／又はそれによってコードされるタンパク質は、参照条件と比較して増加したレベル（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500倍又はそれを超える）で提供される。

【0051】

一部の実施形態において、本開示は、

- 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DMDオリゴヌクレオチドタイプの複数のDMDオリゴヌクレオチドを含むDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、

複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のキラル制御されたインターヌクレオチド結合を含み；及び

このDMDオリゴヌクレオチド組成物は、それがDMD転写物スプライシングシステム内のDMD転写物と接触されるとき、その組成物が存在しないこと、参照組成物が存在すること及びこ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に対してDMD転写物のスプライシングが変化される（例えば、エクソン51のスキッピングが増加される）ことを特徴とする。

【0052】

一部の実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるDMD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、筋ジストロフィーを治療又は予防する方法を提供する。

【0053】

一部の実施形態において、本開示は、

- 1) DMD転写物中の標的配列に相補的な共通の塩基配列を有し；及び
- 2) 1つ以上の修飾糖部分及び修飾インターヌクレオチド結合を含む、

複数のDMDオリゴヌクレオチドを含むDMD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、筋ジストロフィーを治療又は予防する方法を提供し、

このDMDオリゴヌクレオチド組成物は、それがDMD転写物スプライシングシステム内のDMD転写物と接触されるとき、その組成物が存在しないこと、参照組成物が存在すること及びこ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に対してDMD転写物のスプライシングが変化される（例えば、エクソン51のスキッピングが増加される）ことを特徴とし、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、本明細書（例えば、表A1）において記載されるDMDオリゴヌクレオチドである。

【0054】

一部の実施形態において、本開示は、

- 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DMDオリゴヌクレオチドタイプの複数のDMDオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたDMD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、筋ジストロフィーを治療又は予防する方法を提供し、

この組成物は、キラル制御されており、及びそれは、同じ塩基配列を有するDMDオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比べて、特定のDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドが強化されており、

このDMDオリゴヌクレオチド組成物は、それがDMD転写物スプライシングシステム内のDMD転写物と接触されるとき、その組成物が存在しないこと、参照組成物が存在する

10

20

30

40

50

こと及びこ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に対してDMD転写物のスプライシングが変化される（例えば、エクソン51のスキッピングが増加される）ことを特徴とし、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、本明細書（例えば、表A1）において記載されるDMDオリゴヌクレオチドである。

【0055】

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、少なくとも1つ、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個の非負電荷インターヌクレオチド結合を含み、これらは、任意選択で且つ独立に、キラル制御されている。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、キラル制御された非負電荷インターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、非負電荷インターヌクレオチド結合は、n001である。

10

【0056】

一部の実施形態において、本開示は、

- 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DMDオリゴヌクレオチドタイプの複数のDMDオリゴヌクレオチドを含むDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、

複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のキラル制御されたインターヌクレオチド結合を含み；及び

20

複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の非負電荷インターヌクレオチド結合を含む。

【0057】

一部の実施形態において、筋ジストロフィーでは、DMDエクソン51のスキッピング後、内部的にトランケートされているが、少なくとも部分的に機能性のジストロフィンタンパク質変異体によってジストロフィンの機能が回復するか又は少なくとも部分的に回復し得る。

30

【0058】

一部の実施形態において、筋ジストロフィーには、限定はされないが、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）及びベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）が含まれる。

【0059】

一部の実施形態において、本開示は、本開示のDMDオリゴヌクレオチド又はDMDオリゴヌクレオチド組成物と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0060】

一部の実施形態において、本開示は、筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）を治療する方法であって、それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、本開示に記載される組成物を投与することを含む方法を提供する。

40

【0061】

一部の実施形態において、本開示は、筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）を治療する方法であって、それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、本明細書に開示される任意のDMD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する。一部の実施形態において、組成物は、有効量のオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物であり、キラル制御されている。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、塩形態、例えばナトリウム塩として提供される。

50

【0062】

一部の実施形態において、本開示は、筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）を治療する方法であって、（a）それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、本明細書に開示される任意のDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物を投与すること、及び（b）筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）の少なくとも1つの症状を予防するか、治療するか、改善するか、又はその進行を減速させる能力を有する追加の治療を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0063】

定義

本明細書で使用される場合、別に記載のない限り、以下の定義が適用されるものとする。本開示の目的のために、化学元素は、元素周期表、CASバージョン、Handbook of Chemistry and Physics, 75th Edに従って同定される。加えて、有機化学の一般原理は、“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999並びに“March's Advanced Organic Chemistry”, 5th Ed., Ed.: Smith, M. b. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001に記載されている。

【0064】

脂肪族：本明細書で使用される場合、「脂肪族」又は「脂肪族基」という用語は、完全に飽和しているか、又は1つ若しくは複数の不飽和単位を含む直鎖（即ち非分岐）若しくは分岐、置換若しくは非置換炭化水素鎖或いは完全に飽和しているか、又は1つ若しくは複数の単位の不飽和を含むが、芳香族（本明細書では「炭素環」、「脂環式」若しくは「シクロアルキル」とも呼ばれる）でもこれらの組み合わせでもない単環式炭化水素若しくは二環式若しくは多環式炭化水素を意味する。一部の実施形態において、脂肪族基は、1～100個の脂肪族炭素原子を含む。一部の実施形態において、脂肪族基は、1～20個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態において、脂肪族基は、1～10個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態において、脂肪族基は、1～9個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態において、脂肪族基は、1～8個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態において、脂肪族基は、1～7個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態において、脂肪族基は、1～6個の脂肪族炭素原子を含む。さらに他の実施形態において、脂肪族基は、1～5個の脂肪族炭素原子を含み、さらなる他の実施形態において、脂肪族基は、1、2、3又は4個の脂肪族炭素原子を含む。一部の実施形態において、「脂環式」（又は「炭素環」、「又は「シクロアルキル」）は、完全に飽和しているか、又は1つ若しくは複数の不飽和単位を含むが、芳香族ではない単環式若しくは二環式若しくは多環式炭化水素を指す。一部の実施形態において、「脂環式」（又は「炭素環」、「又は「シクロアルキル」）は、完全に飽和しているか、又は1つ若しくは複数の不飽和単位を含むが、芳香族ではない単環式C₃～C₆炭化水素を指す。適切な脂肪族基には、限定はされないが、線状又は分枝状、置換又は非置換アルキル、アルケニル、アルキニル基及びそれらのハイブリッド、例えば（シクロアルキル）アルキル、（シクロアルケニル）アルキル又は（シクロアルキル）アルケニルが含まれる。

【0065】

アルケニル：本明細書で使用される場合、「アルケニル」という用語は、本明細書で定義するとおり、1つ又は複数の二重結合を有する脂肪族基を指す。

【0066】

アルキル：本明細書で使用される場合、「アルキル」という用語は、当技術分野でのその通常の意味が付与され、直鎖アルキル基、分岐鎖アルキル基、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アルキル基で置換されたシクロアルキルを含む飽和脂肪族基を含み得る。一部の実施形態において、アルキルは、1～100個の炭素原子を有する。特定の実施形態において、直鎖又は分岐鎖アルキルは、その骨格に約1～20

10

20

30

40

50

個の炭素原子を有し（例えば、直鎖の場合にはC₁～C₂₀、分枝鎖の場合にはC₂～C₂₀）、代わりに約1～10個の炭素原子を有する。一部の実施形態において、シクロアルキル環は、それらの環構造に約3～10個の炭素原子を有し、そのような環は、単環式、二環式若しくは多環式であるか又は環構造に約5、6若しくは7個の炭素を有する。一部の実施形態において、アルキル基は、低級アルキル基であり得、ここで、低級アルキル基は、1～4個の炭素原子を含む（例えば、直鎖低級アルキルの場合にはC₁～C₄）。

【0067】

アルキニル：本明細書で使用される場合、「アルキニル」という用語は、本明細書で定義するとおり、1つ又は複数の三重結合を有する脂肪族基を指す。

【0068】

アリール：本明細書で使用される場合、単独で又は「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」のようにより大きい部分の一部として使用される「アリール」という用語は、合計で例えば5～30個の環員を有する単環式環系、二環式環系又は多環式環系を指し、ここで、この系における少なくとも1つの環は、芳香族である。一部の実施形態において、アリール基は、合計5～14個の環員を有する単環式環系、二環式又は多環式環系であり、ここで、この系の少なくとも1つの環は、芳香族であり、この系の各環は、3～7個の環員を含む。一部の実施形態において、アリール基は、ビアリール基である。「アリール」という用語は、「アリール環」という用語と同義に使用することができる。本開示の特定の実施形態において、「アリール」は、限定はされないが、1つ又は複数の置換基を有し得るフェニル、ピフェニル、ナフチル、ビナフチル及びアントラシルなどを含む芳香族環系を指す。また、本明細書で使用される場合、「アリール」という用語の範囲内には、インダニル、フタリミジル、ナフチミジル、フェナントリジニル又はテトラヒドロナフチルなどの1つ又は複数の非芳香族環に縮合した芳香族環も含まれる。

【0069】

同等の：「同等の」という用語は、本明細書において、得られる結果又は観察される現象の比較を可能にする上で互いに十分に類似する2つ（以上）のセットの条件又は状況を表すために使用される。一部の実施形態では、同等セットの条件又は状況は、複数の実質的に同一の特性と、1つ又は少数のまちまちの特性を特徴とする。当業者は、様々なセットの条件又は状況下で得られる結果又は観察される現象の差が、まちまちの特徴の相違に起因するか、又はそれを示すという合理的結論の根拠となるのに十分な数及び種類の実質的に同一の特性を特徴とすると、複数のセットの条件が互いに同等であることを理解されよう。

【0070】

脂環式：「脂環式」、「炭素環」、「カルボシクリル」、「炭素環式ラジカル」及び「炭素環式環」という用語は、同義に使用され、本明細書で使用される場合、飽和又は部分不飽和であるが、特に指定されない限り3～30個の環員を有する、本明細書に記載される非芳香族系、環状脂肪族単環式環系、二環式環系又は多環式環系であることを指す。脂環式基には、限定はされないが、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が含まれる。一部の実施形態において、脂環式基は、3～6個の炭素を有する。一部の実施形態において、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、デカヒドロナフチル又は1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフト-1-イルなどの1つ又は複数の芳香族環又は非芳香族環に融合された脂肪族環も含み得る。一部の実施形態において、脂環式基は、二環式である。一部の実施形態において、脂環式基は、三環式である。一部の実施形態において、脂環式基は、多環式である。一部の実施形態において、「脂環式」は、完全に飽和しているか、又は1つ若しくは複数の不飽和単位を含むが、芳香族ではないC₃～C₆単環式炭化水素又はC₈～C₁₀二環式若しくは多環式炭化水素或いは完全に飽和しているか、又は1つ又は複数の不飽和単位を含むが、芳香族で

はない C₉～C₁₆ 多環式炭化水素を指す。

【0071】

投与レジメン：本明細書で使用されるとき、「投与レジメン」又は「治療レジメン」は、対象に個別に典型的には時間を空けて投与される単位用量（典型的には2用量以上）の組を指す。一部の実施形態において、所与の治療用薬剤には推奨投与レジメンがあり、これは、1用量以上を含み得る。一部の実施形態において、投与レジメンは、複数の用量を含み、その各々は、互いの間が同じ長さの時間だけ空けられている。一部の実施形態において、投与レジメンは、複数の用量と、個々の用量間に空いた少なくとも2つの異なる時間とを含む。一部の実施形態において、投与レジメン内にあるすべての用量は、同じ単位用量値である。一部の実施形態において、投与レジメン内の異なる用量は、異なる値である。一部の実施形態において、投与レジメンは、第1の用量値の第1の用量を含み、続いて第1の用量値と異なる第2の用量値の1つ以上の更なる用量を含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、第1の用量値の第1の用量を含み、続いて第1の用量値と同じ第2の用量値の1つ以上の更なる用量を含む。

10

【0072】

ヘテロ脂肪族：「ヘテロ脂肪族」という用語は、C、CH、CH₂及びCH₃から選択される1つ又は複数の単位が、独立に、1つ又は複数のヘテロ原子によって置き換えられている脂肪族基を指す。一部の実施形態において、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルキルである。一部の実施形態において、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルケニルである。

【0073】

ヘテロアリール：本明細書で使用される場合、単独で又はより大きい部分、例えば「ヘテロアルキル」又は「ヘテロアルコキシ」の一部として使用される「ヘテロアリール」及び「ヘテロアー（heteroar-）」という用語は、合計で例えば5～30個の環員を有する単環式環系、二環式環系又は多環式環系を指し、ここで、この系における少なくとも1つの環は、芳香族であり、少なくとも1つの芳香族環原子は、ヘテロ原子である。一部の実施形態において、ヘテロアリール基は、5～10個の環原子（即ち単環式、二環式又は多環式）、一部の実施形態において5、6、9又は10個の環原子を有する基である。一部の実施形態において、ヘテロアリール基は、環状アレイで共有される6、10又は14個のπ電子を有し；炭素原子に加えて、1～5個のヘテロ原子を有する。ヘテロアリール基には、限定はされないが、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。一部の実施形態において、ヘテロアリールは、ビピリジルなどのヘテロビアリール基である。本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール」及び「ヘテロアー」という用語には、ヘテロ芳香族環が、ラジカル又は結合点がヘテロ芳香族環上にある1つ又は複数のアリール環、脂環式環又はヘテロシクリル環に融合している脂肪族基も含まれる。非限定的な例には、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、インドゾリル、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-オキサジン-3(4H)-オンが含まれる。ヘテロアリール基は、単環式、二環式又は多環式であり得る。「ヘテロアリール」という用語は、「ヘテロアリール環」、「ヘテロアリール基」又は「ヘテロ芳香族」という用語と同義に使用することができ、これらの用語のいずれも、任意選択で置換されている環を含む。「ヘテロアルキル」という用語は、ヘテロアリール基によって置換されたアルキル基を指し、ここで、アルキル部分及びヘテロアリール部分は、独立に、任意選択で置換されている。

20

30

40

【0074】

ヘテロ原子：「ヘテロ原子」という用語は、炭素又は水素ではない原子を意味する。一部

50

の実施形態では、ヘテロ原子は、酸素、硫黄、窒素、リン、ホウ素又はケイ素（窒素、硫黄、リン又はケイ素の任意の酸化型；複素環の任意の塩基性窒素又は置換可能な窒素の4級化型（例えば、3,4-ジヒドロ-2H-ピロリルの場合などのN）、NH（ピロリジニルの場合など）又はNR⁺（N-置換ピロリジニルの場合など）などを含む）である。一部の実施形態において、ヘテロ原子は、ホウ素、窒素、酸素、ケイ素、硫黄又はリンである。一部の実施形態において、ヘテロ原子は、窒素、酸素、ケイ素、硫黄又はリンである。一部の実施形態において、ヘテロ原子は、窒素、酸素、硫黄又はリンである。一部の実施形態において、ヘテロ原子は、窒素、酸素又は硫黄である。

【0075】

ヘテロ環：本明細書で使用される場合、「ヘテロ環」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロ環ラジカル」及び「ヘテロ環」という用語は、本明細書で使用される場合、同義に使用され、飽和しているか、又は部分不飽和である、1つ又は複数のヘテロ原子環原子を有する単環式、二環式又は多環式環部分（例えば、3～30員）を指す。一部の実施形態において、ヘテロシクリル基は、安定な5～7員単環式又は7～10員二環式ヘテロ環式部分であり、この5～7員単環式又は7～10員二環式ヘテロ環式部分は、飽和又は部分不飽和のいずれかであり、炭素原子に加えて、上記に定義したとおり、1つ又は複数、好ましくは1～4個のヘテロ原子を有する。ヘテロ環の環原子に関して使用される場合、「窒素」という用語は、置換窒素を含む。例として、酸素、硫黄及び窒素から選択された0～3個のヘテロ原子を有する飽和又は部分不飽和の環では、窒素は、N（3,4-ジヒドロ-2H-ピロリルのように）、NH（ピロリジニルのように）又は⁺NR（N-置換ピロリジニルのように）であり得る。ヘテロ環は、安定した構造をもたらす任意のヘテロ原子又は炭素原子でそのペンダント基に結合することができ、任意の環原子を任意選択で置換することができる。そのような飽和又は部分不飽和のヘテロ環式ラジカルの例には、限定はされないが、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、ジアゼピニル、オキサゼピニル、チアゼピニル、モルホリニル及びキヌクリジニルが含まれる。「ヘテロ環（heterocycle）」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロ環（heterocyclyl ring）」、「ヘテロ環基」、「ヘテロ環部分」及び「ヘテロ環式ラジカル」という用語は、本明細書で同義に使用され、インドリニル、3H-インドリル、クロマニル、フェナントリジニル又はテトラヒドロキノリニルなど、1つ又は複数のアリール、ヘテロアリール又は脂環式環に融合したヘテロシクリル環も含む。ヘテロシクリル基は、単環式、二環式又は多環式であり得る。「ヘテロシクリルアルキル」という用語は、ヘテロシクリルによって置換されたアルキル基を指し、ここで、アルキル部分及びヘテロシクリル部分は、独立に、任意選択で置換されている。

【0076】

インビトロ：本明細書で使用される場合、「インビトロ」という用語は、生物（例えば、動物、植物及び／又は微生物）内ではなく、人工の環境、例えば試験管又は反応容器、細胞培養物中で起こる事象を指す。

【0077】

インビボ：本明細書で使用される場合、「インビボ」という用語は、生物（例えば、動物、植物及び／又は微生物）内で起こる事象を指す。

【0078】

任意選択で置換されている：本明細書に記載されているとおりの本開示の化合物、例えばオリゴヌクレオチド、脂質、炭水化物などは、「任意選択で置換された」部分を含み得る。一般に、「置換された」という用語は、「任意選択で」という用語が先行するかどうかに関わらず、指定された部分の1つ又は複数の水素が適切な置換基で置換されていることを意味する。特に指定されない限り、「任意選択で置換されている」基は、基の各置換可能位置における適切な置換基を有し得、任意の所与の構造における複数の位置が、特定の基から選択される複数の置換基で置換され得る場合、置換基は、各位置で同じであるか又

10

20

30

40

50

は異なるかのいずれかであり得る。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、安定した化合物又は化学的に実現可能な化合物の形成をもたらすものである。本明細書で使用される場合、「安定した」という用語は、それらの生成、検出並びに特定の実施形態においてそれらの回収、精製及び本明細書に開示される1つ又は複数の目的のための使用を可能にする条件にさらされたときに実質的に変化しない化合物を指す。

【0079】

適切な一価の置換基は、ハロゲン； $-(CH_2)_0 \sim 4 R^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 OR^\circ$ ； $-O(CH_2)_0 \sim 4 R^\circ$ 、 $-O-(CH_2)_0 \sim 4 C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 CH(OR^\circ)_2$ ； R° で置換され得る $-(CH_2)_0 \sim 4 Ph$ ； R° で置換され得る $-(CH_2)_0 \sim 4 O(CH_2)_0 \sim 1 Ph$ ； R° で置換され得る $-CH=CHPh$ ； R° で置換され得る $-(CH_2)_0 \sim 4 O(CH_2)_0 \sim 1$ -ピリジル； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-N_3$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 N(R^\circ)_2$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ； $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 N(R^\circ)C(O)N(R^\circ)_2$ ； $-N(R^\circ)C(S)N(R^\circ)_2$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)N(R^\circ)_2$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 C(O)R^\circ$ ； $-C(S)R^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 C(O)SR^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 C(O)OSi(R^\circ)_3$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 OC(O)R^\circ$ ； $-OC(O)(CH_2)_0 \sim 4 SR^\circ$ 、 $-SC(S)SR^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 SC(O)R^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 C(O)N(R^\circ)_2$ ； $-C(S)N(R^\circ)_2$ ； $-C(S)SR^\circ$ ； $-SC(S)SR^\circ$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 4 OC(O)N(R^\circ)_2$ ； $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$ ； $-C(O)C(O)R^\circ$ ； $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$ ； $-C(NOR^\circ)R^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 SSR^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 S(O)_2R^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 S(O)_2OR^\circ$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 OS(O)_2R^\circ$ ； $-S(O)_2N(R^\circ)_2$ ； $-(CH_2)_0 \sim 4 S(O)R^\circ$ ； $-N(R^\circ)S(O)_2N(R^\circ)_2$ ； $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$ ； $-N(OR^\circ)R^\circ$ ； $-C(NH)N(R^\circ)_2$ ； $-Si(R^\circ)_3$ ； $-OSi(R^\circ)_3$ ； $-P(R^\circ)_2$ ； $-P(OR^\circ)_2$ ； $-P(R^\circ)(OR^\circ)$ ； $-OP(R^\circ)_2$ ； $-OP(OR^\circ)_2$ ； $-OP(R^\circ)(OR^\circ)$ ； $-P[N(R^\circ)_2]_2$ ； $-P(R^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-P(OR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-OP[N(R^\circ)_2]_2$ ； $-OP(R^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-OP(OR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-N(R^\circ)P(R^\circ)_2$ ； $-N(R^\circ)P(OR^\circ)_2$ ； $-N(R^\circ)P(R^\circ)(OR^\circ)$ ； $-N(R^\circ)P[N(R^\circ)_2]_2$ ； $-N(R^\circ)P(R^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-N(R^\circ)P(OR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-B(R^\circ)_2$ ； $-B(R^\circ)(OR^\circ)$ ； $-B(OR^\circ)_2$ ； $-OB(R^\circ)_2$ ； $-OB(R^\circ)(OR^\circ)$ ； $-OB(OR^\circ)_2$ ； $-P(O)(R^\circ)_2$ ； $-P(O)(R^\circ)(OR^\circ)$ ； $-P(O)(R^\circ)(SR^\circ)$ ； $-P(O)(R^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-P(O)(OR^\circ)_2$ ； $-P(O)(SR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-P(O)(OR^\circ)(SR^\circ)$ ； $-P(O)[N(R^\circ)_2]_2$ ； $-OP(O)(R^\circ)_2$ ； $-OP(O)(R^\circ)(OR^\circ)$ ； $-OP(O)(R^\circ)(SR^\circ)$ ； $-OP(O)(R^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-OP(O)(OR^\circ)_2$ ； $-OP(O)(SR^\circ)_2$ ； $-OP(O)(OR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-OP(O)(SR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-OP(O)(OR^\circ)(SR^\circ)$ ； $-OP(O)[N(R^\circ)_2]_2$ ； $-SP(O)(R^\circ)_2$ ； $-SP(O)(R^\circ)(OR^\circ)$ ； $-SP(O)(R^\circ)(SR^\circ)$ ； $-SP(O)(R^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-SP(O)(OR^\circ)_2$ ； $-SP(O)(SR^\circ)_2$ ； $-SP(O)(OR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-SP(O)(SR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-SP(O)(OR^\circ)(SR^\circ)$ ； $-SP(O)[N(R^\circ)_2]_2$ ； $-N(R^\circ)P(O)(R^\circ)_2$ ； $-N(R^\circ)P(O)(R^\circ)(OR^\circ)$ ； $-N(R^\circ)P(O)(R^\circ)(SR^\circ)$ ； $-N(R^\circ)P(O)(R^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-N(R^\circ)P(O)(OR^\circ)_2$ ； $-N(R^\circ)P(O)(SR^\circ)_2$ ； $-N(R^\circ)P(O)(OR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ； $-N(R^\circ)P(O)(SR^\circ)[N(R^\circ)_2]$ ；

$\text{)}_2]$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{O})(\text{OR}^\circ)(\text{SR}^\circ)$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{R}^\circ)_2]$; $-\text{P}(\text{R}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{P}(\text{OR}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{P}(\text{NR}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{P}(\text{R}^\circ)(\text{OR}^\circ)[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{P}(\text{R}^\circ)[\text{N}(\text{R}^\circ)_2][\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{P}(\text{OR}^\circ)[\text{N}(\text{R}^\circ)_2][\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{OP}(\text{R}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{OP}(\text{OR}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{OP}(\text{NR}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{OP}(\text{R}^\circ)(\text{OR}^\circ)[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{OP}(\text{R}^\circ)[\text{N}(\text{R}^\circ)_2][\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{OP}(\text{OR}^\circ)[\text{N}(\text{R}^\circ)_2][\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{R}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{OR}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{NR}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{R}^\circ)(\text{OR}^\circ)[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{R}^\circ)[\text{N}(\text{R}^\circ)_2][\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{OR}^\circ)[\text{N}(\text{R}^\circ)_2][\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{P}(\text{OR}^\circ)[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-(\text{C}_1\sim 4\text{直鎖又は分岐鎖アルキレン})\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; 又は $-(\text{C}_1\sim 4\text{直鎖又は分岐鎖アルキレン})\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$ 、ここで、各 R° は、以下に定義するように置換することができ、独立に、水素、 $\text{C}_1\sim 20$ 脂肪族、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立に選択される 1～5 個のヘテロ原子を有する $\text{C}_1\sim 20$ ヘテロ脂肪族であり; $-\text{CH}_2-(\text{C}_6\sim 20\text{アリール})$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_0\sim 1(\text{C}_6\sim 20\text{アリール})$ 、 $-\text{CH}_2-(\text{窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立に選択される 1～5 個のヘテロ原子を有する 5～20 員ヘテロアリール環})$ 、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立に選択される 0～5 個のヘテロ原子を有する 5～20 員単環式、二環式又は多環式の飽和、部分不飽和の環又はアリール環であるか、又は上記の定義に関わらず、2つの R° の独立した出現がそれらの介在原子と一緒にあって、以下に定義するように置換することができる、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立に選択される 0～5 個のヘテロ原子を有する 3～20 員単環式、二環式又は多環式の飽和、部分不飽和の環又はアリール環を形成する。

【0080】

R° 上の適切な一価置換基 (又は 2つの R° の独立した出現がそれらの介在原子と一緒にあって形成される環) は、独立に、ハロゲン、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{R}^\bullet$ 、 $-(\text{ハロR}^\bullet)$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{OH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{OR}^\bullet$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{CH}(\text{OR}^\bullet)_2$; $-\text{O}(\text{ハロR}^\bullet)$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{C}(\text{O})\text{R}^\bullet$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{SR}^\bullet$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{SH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{NHR}^\bullet$ 、 $-(\text{CH}_2)_0\sim 2\text{NR}^\bullet_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SiR}^\bullet_3$ 、 $-\text{OSiR}^\bullet_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{SR}^\bullet$ 、 $-(\text{C}_1\sim 4\text{直鎖又は分岐鎖アルキレン})\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$ 又は $-\text{SSR}^\bullet$ であり、ここで、各 $\text{R}^\bullet$ は、置換されていないか、又は「ハロ」が前に付いている場合、1つ又は複数のハロゲンでのみ置換され、独立に、窒素、酸素及び硫黄から独立に選択される 0～4 個のヘテロ原子を有する $\text{C}_1\sim 4$ 脂肪族、 $-\text{CH}_2\text{Ph}$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_0\sim 1\text{Ph}$ 及び 5～6 員飽和、部分不飽和の環又はアリール環から独立に選択される。 R° の飽和炭素原子上の適切な二価置換基には、 $=\text{O}$ 及び $=\text{S}$ が含まれる。

【0081】

例えば、適切な炭素原子、窒素原子上の適切な二価置換基は、独立に、 $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 、 $=\text{CR}^*_2$ 、 $=\text{NNR}^*_2$ 、 $=\text{NNHC}(\text{O})\text{R}^*$ 、 $=\text{NNHC}(\text{O})\text{OR}^*$ 、 $=\text{NNHS}(\text{O})_2\text{R}^*$ 、 $=\text{NR}^*$ 、 $=\text{NOR}^*$ 、 $-\text{O}(\text{C}(\text{R}^*_2))_2\sim 3\text{O}-$ 又は $-\text{S}(\text{C}(\text{R}^*_2))_2\sim 3\text{S}-$ であり、ここで、各 R^* は、以下に定義するように置換することができ、独立に、水素、 $\text{C}_1\sim 20$ 脂肪族、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立に選択される 1～5 個のヘテロ原子を有する $\text{C}_1\sim 20$ ヘテロ脂肪族、 $-\text{CH}_2-(\text{C}_6\sim 20\text{アリール})$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_0\sim 1(\text{C}_6\sim 20\text{アリール})$ 、 $-\text{CH}_2-(\text{窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立に選択される 1～5 個のヘテロ原子を有する 5～20 員ヘテロアリール環})$ 、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立に選択される 0～5 個のヘテロ原子を有する 5～20 員単環式、二環式又は多環式の飽和、部分不飽和環又はアリール環であるか、又は上記の定義に関わらず、2つの R^* の独立した出現がそれらの介

在原子と一緒にあって、以下に定義するように置換することができる、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから独立に選択される0～5個のヘテロ原子を有する3～20員単環式、二環式又は多環式の飽和、部分不飽和の環又はアリール環を形成する。「任意選択で置換されている」基の隣接する置換可能な原子に結合する適切な二価置換基には、 $-O(CR^*2)_2 \sim 3O-$ が含まれる。

【0082】

R^* 上の適切な一価の置換基（又は2つの R^* の独立した出現がそれらの介在原子と一緒にあって形成される環）は、独立に、ハロゲン、 $-(CH_2)_0 \sim 2R^\bullet$ 、 $-(ハロR^\bullet)$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2OH$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2OR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2CH(OR^\bullet)_2$ ； $-O(ハロR^\bullet)$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2C(O)R^\bullet$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2C(O)OR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2SR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2SH$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2NH_2$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2NHR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2NR^\bullet_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SiR^\bullet_3$ 、 $-OSiR^\bullet_3$ 、 $-C(O)SR^\bullet$ 、 $-(C_{1 \sim 4}直鎖又は分岐鎖アルキレン)C(O)OR^\bullet$ 又は $-SSR^\bullet$ であり、ここで、各 $R^\bullet$ は、置換されていないか、又は「ハロ」が前に付いている場合、1つ又は複数のハロゲンのみで置換され、独立に、 $C_{1 \sim 4}$ 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_0 \sim 1Ph$ 及び窒素、酸素及び硫黄から独立に選択される0～4個のヘテロ原子を有する5～6員飽和、部分不飽和環又はアリール環から選択される。 R^* の飽和炭素原子上の適切な二価置換基には、 $=O$ 及び $=S$ が含まれる。

10

【0083】

一部の実施形態において、「任意選択で置換されている」基の置換可能な窒素上の適切な置換基には、 $-R^+$ 、 $-NR^+_2$ 、 $-C(O)R^+$ 、 $-C(O)OR^+$ 、 $-C(O)C(O)R^+$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^+$ 、 $-S(O)_2R^+$ 、 $-S(O)_2NR^+_2$ 、 $-C(S)NR^+_2$ 、 $-C(NH)NR^+_2$ 又は $-N(R^+)S(O)_2R^+$ が含まれ；ここで、各 R^+ は、独立に、水素、以下に定義するように置換することができる $C_{1 \sim 6}$ 脂肪族、非置換 $-OPh$ 又は窒素、酸素若しくは硫黄から独立に選択される0～4個のヘテロ原子を有する非置換5～6員飽和、部分不飽和環又はアリール環であるか、又は上記の定義に関わらず、2つの独立した R^+ の出現がそれらの介在原子と一緒にあって、窒素、酸素又は硫黄から独立に選択される0～4個のヘテロ原子を有する非置換の3～12員飽和、部分不飽和又はアリール単環式環若しくは二環式環を形成する。

20

30

【0084】

一部の実施形態において、 R^+ の脂肪族基上の適切な置換基は、独立に、ハロゲン、 $-R^\bullet$ 、 $-(ハロR^\bullet)$ 、 $-OH$ 、 $-OR^\bullet$ 、 $-O(ハロR^\bullet)$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^\bullet$ 、 $-NH_2$ 、 $NHR^\bullet$ 、 $-NR^\bullet_2$ 又は $-NO_2$ であり、ここで、各 $R^\bullet$ は、置換されていないか、又は「ハロ」が前に付いている場合、1つ又は複数のハロゲンのみで置換され、独立に、 $C_{1 \sim 4}$ 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_0 \sim 1Ph$ 又は窒素、酸素又は硫黄から独立に選択される0～4個のヘテロ原子を有する5～6員飽和、部分不飽和環又はアリール環である。

【0085】

部分不飽和：本明細書で使用される場合、「部分不飽和」という用語は、少なくとも1つの二重又は三重結合を含む環部分を指す。「部分不飽和」という用語は、複数の不飽和部位を有する環を包含することが意図されるが、本明細書に定義するとおり、アリール又はヘテロアリール部分を含むことは意図されない。

40

【0086】

医薬組成物：本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、1つ又は複数の薬学的に許容される担体と一緒に製剤化される活性剤を指す。一部の実施形態では、活性剤は、関連集団に投与されると、制御された治療効果を達成する統計的に有意な確率を示す治療レジメンでの投与に適切な単位用量で存在する。一部の実施形態では、医薬組成物は、固体又は液体剤形での投与のために専用に製剤化され得、それは、下記の投与の目的で設計されるものを含む：経口投与、例えば飲薬（水性又は非水性溶液又は懸濁液）、錠

50

剤、例えば口腔、舌下及び全身吸収を目標とするもの、ボラス、粉末、顆粒、舌への適用のためのペースト；非経口投与、例えば滅菌溶液又は懸濁液又は徐放性製剤としての例えば皮下、筋肉内、静脈内又は硬膜外注射；局所適用、例えばクリーム、軟膏又は皮膚、肺若しくは口腔に適用される制御放出パッチ若しくはスプレー；腔内又は直腸内、例えばベッサリー、クリーム又はフォームとして；舌下；眼；経皮；又は鼻内、肺並びに他の粘膜表面への投与。

【0087】

薬学的に許容される：本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という語句は、信頼できる医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応又は他の障害若しくは合併症なしに、ヒト及び動物の組織と接触させる使用に好適であり、適正な利益／リスク比と相応する化合物、材料、組成物及び／又は剤形を指す。

10

【0088】

薬学的に許容される担体：本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、1つの器官、又は身体的一部分から対象化合物を別の器官、又は身体の部分に運搬又は輸送することに関与する、液体若しくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤又は溶媒封入材などの薬学的に許容される材料、組成物又はビヒクルを意味する。各担体は、製剤の他の材料と適合性であり、且つ患者に対して有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。薬学的に許容される担体としては、以下のものが挙げられる：ラクトース、グルコース及びスクロースなどの糖；トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプンなどのデンプン；セルロース並びにその誘導体、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース及び酢酸セルロース；粉末状トラガカンス；麦芽；タルク；ココアバター及び座剤蠟などの賦形剤；ピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及びダイズ油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギニン酸；発熱性物質除去蒸留水；等張食塩水；リンガー液；エチルアルコール；pH緩衝溶液；ポリエステル；ポリカーボネート及び／又はポリ無水物；並びに医薬製剤に使用される他の非毒性適合性物質。

20

【0089】

薬学的に許容される塩：「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書で使用される場合、製剤に関連する使用に適した化合物の塩、即ち信頼できる医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応などを起こさずに、ヒト及び下等動物の組織と接触させる使用に好適であり、適正な利益／リスク比と相応する塩を指す。薬学的に許容される塩は、当技術分野で公知である。例えば、S. M. Berge, et al.は、J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977)において、薬学的に許容される塩を詳細に記載している。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩として、限定はされないが、非毒性酸付加塩があり、これらは、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸及び過塩素酸などの無機酸と一緒に又は酢酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸若しくはマロン酸などの有機酸と一緒に又はイオン交換など、当技術分野で使用される他の方法によって形成されるアミノ基の塩である。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩として、限定はされないが、以下のものが挙げられる：アジピン酸塩、アルギニン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、カンファー硫酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタン硫酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキササン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシーエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石

30

40

50

酸塩、チオシアン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩など。代表的なアルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどが挙げられる。一部の実施形態において、薬学的に許容可能な塩としては、適切な場合、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、1～6個の炭素原子を有するアルキル、スルホン酸塩及びアリアルスルホン酸塩などの対イオンを使用して形成される非毒性アンモニウム、第4級アンモニウム及びアミンカチオンが挙げられる。一部の実施形態では、提供される化合物、例えばオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の酸性基（例えば、天然のリン酸結合基、ホスホロチオエート結合基等）を含み、薬学的に許容される塩は、アルカリ、アルカリ土類金属又はアンモニウム（例えば、 $N(R)_3$ のアンモニウム塩、ここで、各Rは、独立に、本開示に定義され、記載されるとおりである）塩である。代表的なアルカリ又はアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムの塩などが挙げられる。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩である。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩は、カリウム塩である。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩は、カルシウム塩である。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩は、適切であれば、非毒性アンモニウム、4級アンモニウム並びにハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、1～6個の炭素原子を有するアルキル、スルホン酸塩及びアリアルスルホン酸塩などの対イオンを用いて形成されるアミンカチオンを含む。一部の実施形態では、提供される化合物は、1を超える酸性基を含み、例えば、オリゴヌクレオチドは、2つ以上の酸性基を含み得る（例えば、天然のリン酸結合及び／又は修飾されたインターヌクレオチド結合に）。一部の実施形態において、かかる化合物の薬学的に許容可能な塩又は一般的に塩は、同じであるか又は異なり得る2つ以上のカチオンを含む。一部の実施形態において、薬学的に許容可能な塩（又は一般的に、塩）では、十分な酸性度を有する各酸性基は、独立に、その塩形態として存在する（例えば、天然リン酸結合とホスホロチオエートインターヌクレオチド結合とを含むオリゴヌクレオチドでは、天然リン酸結合及びホスホロチオエートインターヌクレオチド結合の各々は、独立に、その塩形態として存在する）。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば提供されるオリゴヌクレオチドの薬学的に許容可能な塩は、提供されるオリゴヌクレオチドのナトリウム塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えばオリゴヌクレオチドの薬学的に許容可能な塩は、そのようなオリゴヌクレオチドのナトリウム塩であり、ここで、各酸性結合、例えば各天然リン酸結合及びホスホロチオエートインターヌクレオチド結合がナトリウム塩形態として存在する（すべてナトリウム塩）。

10

20

30

40

50

【0090】

保護基：「保護基」という用語は、本明細書で使用される場合、当技術分野で公知であり、Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene及びP. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999（これらの全体が参照により本明細書に援用される）に詳細に記載されるものを含む。更に、ヌクレオシド及びヌクレオチドケミストリーのために専用に設計された保護基、例えばSerge L. Beaucage et al. 06/2012により編集されたCurrent Protocols in Nucleic Acid Chemistry（第2章の全体が参照により本明細書に援用される）に記載のものも含まれる。好適なアミノ保護基としては、以下のものが挙げられる：カルバミン酸メチル、カルバミン酸エチル、9-フルオレニルメチルカルバメート（Fmoc）、9-（2-スルホ）フルオレニルメチルカルバメート、9-（2,7-ジブプロモ）フルオロエニルメチルカルバメート、2,7-ジブプロモエチル-〔9-（10,10-ジオキソ-10,10,10,10-テトラヒドロチオキサンチル）〕メチルカルバメート（DBD-Tmoc）、4-メトキシフェナシルカルバメート（Phenoc）、2,2,2-トリクロロエチルカルバメート（Troc）、2-トリメチルシリルエチルカルバメート（Teoc）、2-フェニルエチルカルバメート（hZ）、1-（1-アダマンチル）-1-メチルエチルカルバメート（Adpoc）、1,1-ジメチル-2-ハロエチルカルバメート、1,1-ジメチル-2,2-ジブプロモエチルカルバメート（DB-t-BOC）、1,1-ジメチル-2,2,2-トリ

クロロエチルカルバメート (TCBOC)、1-メチル-1-(4-ビフェニル)エチルカルバメート (Bpoc)、1-(3,5-ジ-*t*-ビフェニルカルバメート)-1-メチルエチルカルバメート (*t*-Bumeoc)、2-(2'-及び4'-ピリジル)エチルカルバメート (Pyoc)、2-(N,N-ジシクロヘキシルカルボキサミド)エチルカルバメート、*t*-ブチルカルバメート (BOC)、1-アダマンチルカルバメート (Adoc)、ビニルカルバメート (Voc)、アリルカルバメート (Alloc)、1-イソプロピルアリルカルバメート (Ipaoc)、シンナミルカルバメート (Coc)、4-ニトロシンナミルカルバメート (Noc)、8-キノリルカルバメート、N-ヒドロキシピペリジニルカルバメート、アルキルジチオカルバメート、ベンジルカルバメート (Cbz)、*p*-メトキシベンジルカルバメート (Moz)、*p*-ニトロベンジルカルバメート、*p*-ブromoベンジルカルバメート、*p*-クロロベンジルカルバメート、2,4-ジクロロベンジルカルバメート、4-メチルスルフィニルベンジルカルバメート (MsZ)、9-アントリルメチルカルバメート、ジフェニルメチルカルバメート、2-メチルチオエチルカルバメート、2-メチルスルホニルエチルカルバメート、2-(*p*-トルエンスルホニル)エチルカルバメート、[2-(1,3-ジチアニル)]メチルカルバメート (Dmoc)、4-メチルチオフエニルカルバメート (Mtpc)、2,4-ジメチル-チオフエニルカルバメート (Bmpc)、2-ホスフィノエチルカルバメート (Peoc)、2-トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバメート (Ppoc)、1,1-ジメチル-2-シアノエチルカルバメート、*m*-クロロ-*p*-アシルオキシベンジルカルバメート、*p*-(ジヒドロキシボリル)ベンジルカルバメート、5-ベンズイソキサゾリルメチルカルバメート、2-(トリフルオロメチル)-6-クロモニルメチルカルバメート (Tcroc)、*m*-ニトロフェニルカルバメート、3,5-ジメトキシベンジルカルバメート、*o*-ニトロベンジルカルバメート、3,4-ジメトキシ-6-ニトロベンジルカルバメート、フェニル(*o*-ニトロフェニル)メチルカルバメート、フェノチアジニル-(10)-カルボニル誘導体、N'-*p*-トルエンスルホニルアミノカルボニル誘導体、N'-フェニルアミノチオカルボニル誘導体、*t*-アミルカルバメート、S-ベンジルチオカルバメート、*p*-シアノベンジルカルバメート、シクロブチルカルバメート、シクロヘキシルカルバメート、シクロペンチルカルバメート、シクロプロピルメチルカルバメート、*p*-デシロキシベンジルカルバメート、2,2-ジメトキシカルボニルビニルカルバメート、*o*-(N,N-ジメチル-カルボキサミド)ベンジルカルバメート、1,1-ジメチル-3-(N,N-ジメチル-カルボキサミド)プロピルカルバメート、1,1-ジメチル-プロピニルカルバメート、ジ(2-ピリジル)メチルカルバメート、2-フラニルメチルカルバメート、2-ヨードエチルカルバメート、イソボルニルカルバメート、イソブチルカルバメート、イソニコチルカルバメート、*p*-(*p*'-メトキシフェニルアゾ)ベンジルカルバメート、1-メチルシクロブチルカルバメート、1-メチルシクロヘキシルカルバメート、1-メチル-1-シクロプロピルメチルカルバメート、1-メチル-1-(3,5-ジメトキシフェニル)エチルカルバメート、1-メチル-1-(*p*-フェニルアゾフェニル)エチルカルバメート、1-メチル-1-フェニルエチルカルバメート、1-メチル-1-(4-ピリジル)エチルカルバメート、フェニルカルバメート、*p*-(フェニルアゾ)ベンジルカルバメート、2,4,6-トリ-*t*-ブチルフェニルカルバメート、4-(トリメチルアンモニウム)ベンジルカルバメート、2,4,6-トリメチルベンジルカルバメート、ホルムアミド、アセトアミド、クロロアセトアミド、トリクロロアセトアミド、トリフルオロアセトアミド、フェニルアセトアミド、3-フェニルプロパンアミド、ピコリンアミド、3-ピリジルカルボキサミド、N-ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、ベンズアミド、*p*-フェニルベンズアミド、*o*-ニトロフェニルアセトアミド、*o*-ニトロフェノキシアセトアミド、アセトアセトアミド、(N'-ジチオベンジルオキシカルボニルアミノ)アセトアミド、3-(*p*-ヒドロキシフェニル)プロパンアミド、3-(*o*-ニトロフェニル)プロパンアミド、2-メチル-2-(*o*-ニトロフェノキシ)プロパンアミド、2-メチル-2-(*o*-フェニルアゾフェノキシ)プロパンアミド、4-クロロブタンアミド、3-メチル-3-ニトロブタンアミド、*o*-ニトロシンナミド、

10

20

30

40

50

N-アセチルメチオニン誘導体、o-ニトロベンズアミド、o-(ベンゾイルオキシメチル)ベンズアミド、4,5-ジフェニル-3-オキサゾリン-2-オン、N-フタルイミド、N-ジチアスクシンイミド(Dts)、N-2,3-ジフェニルマレイミド、N-2,5-ジメチルピロール、N-1,1,4,4-テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物(STABASE)、5-置換1,3-ジメチル-1,3,5-トリアザシクロヘキサン-2-オン、5-置換1,3-ジベンジル-1,3,5-トリアザシクロヘキサン-2-オン、1-置換3,5-ジニトロ-4-ピリドン、N-メチルアミン、N-アリルアミン、N-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチルアミン(SEM)、N-3-アセトキシプロピルアミン、N-(1-イソプロピル-4-ニトロ-2-オキソ-3-ピロオリ-3-イル)アミン、4級アンモニウム塩、N-ベンジルアミン、N-ジ(4-メトキシフェニル)メチルアミン、N-5-ジベンゾスベリルアミン、N-トリフェニルメチルアミン(Tr)、N-[(4-メトキシフェニル)ジフェニルメチル]アミン(MMTr)、N-9-フェニルフルオレニルアミン(PhF)、N-2,7-ジクロロ-9-フルオレニルメチレンアミン、N-フェロセニルメチルアミノ(Fcm)、N-2-ピコリルアミノN'-オキシド、N-1,1-ジメチルチオメチレンアミン、N-ベンジリデンアミン、N-p-メトキシベンジリデンアミン、N-ジフェニルメチレンアミン、N-[(2-ピリジル)メシチル]メチレンアミン、N-(N',N'-ジメチルアミノメチレン)アミン、N,N'-イソプロピリレンジアミン、N-p-ニトロベンジリデンアミン、N-サリチリデンアミン、N-5-クロロサリチリデンアミン、N-(5-クロロ-2-ヒドロキシフェニル)フェニルメチレンアミン、N-シクロヘキシリデンアミン、N-(5,5-ジメチル-3-オキソ-1-シクロヘキセニル)アミン、N-ボラン誘導体、N-ジフェニルボリン酸誘導体、N-[フェニル(ペンタカルボニルクロミウム-又はタングステン)カルボニル]アミン、N-銅キレート、N-亜鉛キレート、N-ニトロアミン、N-ニトロソアミン、アミンN-オキシド、ジフェニルホスフィンアミド(Dpp)、ジメチルチオホスフィンアミド(Mpt)、ジフェニルチオホスフィンアミド(Ppt)、ジアルキルホスホロアミデード、ジベンジルホスホロアミデード、ジフェニルホスホロアミデード、ベンゼンスルフェンアミド、o-ニトロベンゼンスルフェンアミド(Nps)、2,4-ジニトロベンゼンスルフェンアミド、ペンタクロロベンゼンスルフェンアミド、2-ニトロ-4-メトキシベンゼンスルフェンアミド、トリフェニルメチルスルフェンアミド、3-ニトロピリジンスルフェンアミド(Npys)、p-トルエンスルホンアミド(Ts)、ベンゼンスルホンアミド、2,3,6-トリメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mtr)、2,4,6-トリメトキシベンゼンスルホンアミド(Mtb)、2,6-ジメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Pme)、2,3,5,6-テトラメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mte)、4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mbs)、2,4,6-トリメチルベンゼンスルホンアミド(Mts)、2,6-ジメトキシ-4-メチルベンゼンスルホンアミド(imds)、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホンアミド(Pmc)、メタンスルホンアミド(Ms)、β-トリメチルシリルエタンスルホンアミド(SEs)、9-アントラセンスルホンアミド、4-(4',8'-ジメトキシナフチルメチル)ベンゼンスルホンアミド(DNMBs)、ベンジルスルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミド及びフェナシルスルホンアミド。

10

20

30

40

【0091】

好適に保護されたカルボン酸としては、シリル-、アルキル-、アルケニル-、アリール-及びアリールアルキル保護されたカルボン酸が更に挙げられるが、これらに限定されない。適切なシリル基の例としては、トリメチルシリル、トリエチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリイソプロピルシリルなどが挙げられる。好適なアルキル基の例としては、メチル、ベンジル、p-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、トリチル、t-ブチル、テトラヒドロピラン-2-イルが挙げられる。好適なアルケニル基の例としては、アリルが挙げられる。適切なアリール基の例としては、任意選択で置換されているフェニル、ビフェニル又はナフチルが挙げられる。好適

50

なアリールアルキル基の例としては、任意選択で置換されているベンジル（例えば、p-メトキシベンジル（MPM）、3,4-ジメトキシベンジル、O-ニトロベンジル、p-ニトロベンジル、p-ハロベンジル、2,6-ジクロロベンジル、p-シアノベンジル）並びに2-及び4-ピコリルが挙げられる。

【0092】

好適なヒドロキシル保護基としては、メチル、メトキシメチル（MOM）、メチルチオメチル（MTM）、t-ブチルチオメチル、（フェニルジメチルシリル）メトキシメチル（SMOM）、ベンジロキシメチル（BOM）、p-メトキシベンジロキシメチル（PMBM）、（4-メトキシフェノキシ）メチル（p-AOM）、グアヤコールメチル（GUM）、t-ブトキシメチル、4-ペンテニロキシメチル（POM）、シロキシメチル、2-メトキシエトキシメチル（MEM）、2,2,2-トリクロロエトキシメチル、ビス（2-クロロエトキシ）メチル、2-（トリメチルシリル）エトキシメチル（SEMOR）、テトラヒドロピラニル（THP）、3-ブロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、1-メトキシシクロヘキシル、4-メトキシテトラヒドロピラニル（MTHP）、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルS、S-ジオキシド、1-〔（2-クロロ-4-メチル）フェニル〕-4-メトキシピペリジン-4-イル（CTMP）、1,4-ジオキサ-2-イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、2,3,3a,4,5,6,7,7a-オクタヒドロ-7,8,8-トリメチル-4,7-メタノベンゾフラン-2-イル、1-エトキシエチル、1-（2-クロロエトキシ）エチル、1-メチル-1-メトキシエチル、1-メチル-1-ベンジロキシエチル、1-メチル-1-ベンジロキシ-2-フルオロエチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、2-（フェニルセレニル）エチル、t-ブチル、アリル、p-クロロフェニル、p-メトキシフェニル、2,4-ジニトロフェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、o-ニトロベンジル、p-ニトロベンジル、p-ハロベンジル、2,6-ジクロロベンジル、p-シアノベンジル、p-フェニルベンジル、2-ピコリル、4-ピコリル、3-メチル-2-ピコリルN-オキシド、ジフェニルメチル、p,p'-ジニトロベンゾヒドリル、5-ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、α-ナフチルジフェニルメチル、p-メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ（p-メトキシフェニル）フェニルメチル、トリ（p-メトキシフェニル）メチル、4-（4'-ブロモフェナシルオキシフェニル）ジフェニルメチル、4,4',4''-トリス（4,5-ジクロロフタルイミドフェニル）メチル、4,4',4''-トリス（レブリノイルオキシフェニル）メチル、4,4',4''-トリス（ベンゾイルオキシフェニル）メチル、3-（イミダゾール-1-イル）ビス（4',4''-ジメトキシフェニル）メチル、1,1-ビス（4-メトキシフェニル）-1'-ピレニルメチル、9-アントリル、9-（9-フェニル）キサントニル、9-（9-フェニル-10-オキソ）アントリル、1,3-ベンゾジチオラン-2-イル、ベンゾイソチアゾリルS、S-ジオキシド、トリメチルシリル（TMS）、トリエチルシリル（TES）、トリスプロピルシリル（TIPS）、ジメチルイソプロピルシリル（IPDMS）、ジエチルイソプロピルシリル（DEIPS）、ジメチルテキシルシリル、t-ブチルジメチルシリル（TBDMS）、t-ブチルジフェニルシリル（TBDPS）、トリベンジルシリル、トリ-p-キシルイルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル（DPMS）、t-ブチルメトキシフェニルシリル（TBMPs）、ギ酸塩、ギ酸ベンゾイル、酢酸塩、クロロ酢酸塩、ジクロロ酢酸塩、トリクロロ酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、メトキシ酢酸塩、トリフェニルメトキシ酢酸塩、フェノキシ酢酸塩、p-クロロフェノキシ酢酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、4-オキソ吉草酸塩（レブリナート）、4,4-（エチレンジチオ）ペンタン酸塩（レブリノイルジチオアセタール）、ピバロエート、アダマントエート、クロトナート、4-メトキシクロトナート、安息香酸塩、p-フェニル安息香酸塩、2,4,6-トリメチル安息香酸塩（メシトエート）、炭酸アルキルメチル、9-フルオレニルメチル炭酸塩（Fmoc）、炭酸アルキルエチル、アルキル2,2,2-トリクロロエチル炭酸塩（Trocc）、2-（トリメチルシリル）エチル炭酸塩

(T M S E C)、2-(フェニルスルホニル)エチル炭酸塩(P s e c)、2-(トリフェニルホスホニオ)エチル炭酸塩(P e o c)、アルキルイソブチル炭酸塩、アルキルビニル炭酸塩、アルキルアリル炭酸塩、アルキルp-ニトロフェニル炭酸塩、アルキルベンジル炭酸塩、アルキルp-メトキシベンジル炭酸塩、アルキル3,4-ジメトキシベンジル炭酸塩、アルキルo-ニトロベンジル炭酸塩、アルキルp-ニトロベンジル炭酸塩、アルキルS-ベンジルチオ炭酸塩、4-エトキシ-1-ナフトチル炭酸塩、メチルジチオ炭酸塩、2-ヨード安息香酸塩、4-アジド酪酸塩、4-ニトロ-4-メチル吉草酸塩、o-(ジブロモメチル)安息香酸塩、2-ホルミルベンゼンスルホン酸塩、2-(メチルチオメトキシ)エチル、4-(メチルチオメトキシ)酪酸塩、2-(メチルチオメトキシメチル)安息香酸塩、2,6-ジクロロ-4-メチルフェノキシ酢酸、2,6-ジクロロ-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノキシ酢酸、2,4-ビス(1,1-ジメチルプロピル)フェノキシ酢酸、クロロジフェニル酢酸、イソ酪酸塩、モノスクシノエート、(E)-2-メチル-2-ブテン酸塩、o-(メトキシカルボニル)安息香酸塩、 α -ナフトエ酸、硝酸塩、アルキルN,N,N',N'-テトラメチルホスホロジアミデート、アルキルN-フェニルカルバミン酸塩、ホウ酸塩、ジメチルホスフィノチオイル、アルキル2,4-ジニトロフェニルスルフェン酸塩、硫酸塩、メタンスルホン酸塩(メシル酸塩)、ベンジルスルホン酸塩及びトシル酸塩(T s)が挙げられる。1,2-又は1,3-ジオールを保護する場合、保護基としては、メチレンアセタール、エチリデンアセタール、1-*t*-ブチルエチリデンケタール、1-フェニルエチリデンケタール、(4-メトキシフェニル)エチリデンアセタール、2,2,2-トリクロロエチリデンアセタール、アセトニド、シクロペンチリデンケタール、シクロヘキシリデンケタール、シクロヘプチリデンケタール、ベンジリデンアセタール、p-メトキシベンジリデンアセタール、2,4-ジメトキシベンジリデンケタール、3,4-ジメトキシベンジリデンアセタール、2-ニトロベンジリデンアセタール、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、ジメトキシメチレンオルトエステル、1-メトキシエチリデンオルトエステル、1-エトキシエチリデンオルトエステル、1,2-ジメトキシエチリデンオルトエステル、 α -メトキシベンジリデンオルトエステル、1-(N,N-ジメチルアミノ)エチリデン誘導体、 α -(N,N'-ジメチルアミノ)ベンジリデン誘導体、2-オキサシクロペンチリデンオルトエステル、ジ-*t*-ブチルシリレン基(D T B S)、1,3-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサンリデン)誘導体(T I P D S)、テトラ-*t*-ブトキシジシロキサン-1,3-ジイリデン誘導体(T B D S)、環状炭酸塩、環状ボロン酸塩、ボロン酸エチル及びボロン酸フェニルが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0093】

一部の実施形態では、ヒドロキシル保護基は、アセチル、*t*-ブチル、*t*-ブトキシメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、2-トリメチルシリルエチル、p-クロロフェニル、2,4-ジニトロフェニル、ベンジル、ベンゾイル、p-フェニルベンゾイル、2,6-ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、p-ニトロベンジル、トリフェニルメチル(トリチル)、4,4'-ジメトキシトリチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、*t*-ブチルジメチルシリル、*t*-ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、トリイソプロピルシリル、ギ酸ベンゾイル、クロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、ピバロイル、9-フルオレニルメチル炭酸塩、メシル酸塩、トシル酸塩、トリフレート、トリチル、モノメトキシトリチル(M M T r)、4,4'-ジメトキシトリチル、(D M T r)及び4,4',4''-トリメトキシトリチル(T M T r)、2-シアノエチル(C E又はC n e)、2-(トリメチルシリル)エチル(T S E)、2-(2-ニトロフェニル)エチル、2-(4-シアノフェニル)エチル2-(4-ニトロフェニル)エチル(N P E)、2-(4-ニトロフェニルスルホニル)エチル、3,5-ジクロロフェニル、2,4-ジメチルフェニル、2-ニトロフェニル、4-ニトロフェニル、2,4,6-トリメチルフェニル、2-(2-ニトロフェニル)エチル、ブチルチオカルボニル、4,4',4''-トリリス(ベンゾイルオキシ)トリチル、ジフェニルカルバモイル、レブリニル、2-(ジブ

ロモメチル)ベンゾイル(D b m b)、2-(イソプロピルチオメトキシメチル)ベンゾイル(P t m t)、9-フェニルキサンテン-9-イル(ピキシル)又は9-(p-メトキシフェニル)キサンテン-9-イル(M O X)である。一部の実施形態では、ヒドロキシル保護基の各々は、独立して、アセチル、ベンジル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル及び4,4'-ジメトキシトリチルから選択される。一部の実施形態では、ヒドロキシル保護基は、トリチル、モノメトキシトリチル及び4,4'-ジメトキシトリチル基からなる群から選択される。

【0094】

一部の実施形態では、リン保護基は、オリゴヌクレオチド合成全体を通して、インターヌクレオチドリ結合に付加される基である。一部の実施形態では、リン保護基は、インターヌクレオチドホスホロチオエート結合の硫黄原子に付加される。一部の実施形態では、リン保護基は、インターヌクレオチドホスホロチオエート結合の酸素原子に付加される。一部の実施形態では、リン保護基は、インターヌクレオチドリ結合の酸素原子に付加される。一部の実施形態では、リン保護基は、2-シアノエチル(C E又はC n e)、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(N P E又はN p e)、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-メチルチオール-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。

【0095】

タンパク質：本明細書で使用されるとき、用語「タンパク質」は、ポリペプチド(即ちペプチド結合によって互いに結合したひと続きの少なくとも2個のアミノ酸)を指す。一部の実施形態において、タンパク質は、天然に存在するアミノ酸のみを含む。一部の実施形態において、タンパク質は、1つ以上の天然に存在しないアミノ酸(例えば、隣接アミノ酸と1つ以上のペプチド結合を形成する部分)を含む。一部の実施形態において、タンパク質鎖中の1つ以上の残基は、非アミノ酸部分(例えば、グリカン等)を含有する。一部の実施形態において、タンパク質は、例えば、1つ以上のジスルフィド結合によって結合するか、又は他の手段によって結び付いた2つ以上のポリペプチド鎖を含む。一部の実施形態において、タンパク質は、L-アミノ酸、D-アミノ酸又は両方を含有し；一部の実施形態において、タンパク質は、当技術分野において公知の1つ以上のアミノ酸修飾又は類似体を含む。有用な修飾としては、例えば、末端アセチル化、アミド化、メチル化等が挙げられる。用語「ペプチド」は、概して、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満又は10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指して用いられる。

【0096】

対象：本明細書で使用される場合、「対象」又は「被験対象」という用語は、例えば、実験、診断、予防及び／又は治療目的のために、提供される化合物又は組成物が本開示に従って投与される任意の生物を指す。典型的な対象としては、動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類及びヒトなどの哺乳類；昆虫；蠕虫；その他など)並びに植物が挙げられる。一部の実施形態では、対象は、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーに罹患し得、及び／又はそれに罹り易いことができる。

【0097】

実質的に：本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、対象となる特徴又は特性のすべて又はほとんどすべての範囲又は程度を示す定性条件を指す。当業者であれば、生物学的現象及び化学的現象が、あったとしても、めったに完結に到達しないこと及び／又は完了まで進行しないこと又は絶対的帰結を達成若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、多くの生物学的現象及び／又は化学的現象に

10

20

30

40

50

本来備わる完全性の潜在的欠如を捉えるために、本明細書で使用される。

【0098】

に罹患している：疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーに「罹患している」個体は、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーの1つ以上の症状を有すると診断され及び／又は示している。

【0099】

罹り易い：疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーに「罹り易い」個体は、一般の人々よりも、その疾患、障害及び／又は病態を発生するリスクが高い個体である。一部の実施形態において、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーに罹り易い個体は、その疾患、障害及び／又は病態と診断されていないこともある。一部の実施形態において、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーに罹り易い個体は、その疾患、障害及び／又は病態の症状を呈することもある。一部の実施形態において、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーに罹り易い個体は、その疾患、障害及び／又は病態の症状を呈しないこともある。一部の実施形態において、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーに罹り易い個体は、その疾患、障害及び／又は病態を発症することになる。一部の実施形態において、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーに罹り易い個体は、その疾患、障害及び／又は病態を発症することにはならない。

10

【0100】

全身：語句「全身投与」、「全身投与される」、「末梢投与」及び「末梢投与される」は、本明細書で使用されるとき、それが被投与者の全身に入り込むような化合物又は組成物の投与を指して、その当技術分野で理解される意味を有する。

20

【0101】

互変異性型：語句「互変異性型」は、本明細書で使用され、及び当技術分野において概して理解されたとおり、容易な相互変換能を有する有機化合物の異なる異性体形態を表して用いられる。互変異性体は、単結合及び隣接する二重結合の転換を伴う水素原子又はプロトンのホルマール移動によって特徴付けられ得る。一部の実施形態において、互変異性体は、プロトトロピック互変異性（即ちプロトンの再配置）によって生じ得る。一部の実施形態において、互変異性体は、原子価互変異性（即ち結合電子の急速な再編成）によって生じ得る。かかる互変異性型は、すべて本開示の範囲内に含まれることが意図される。一部の実施形態において、化合物の互変異性型は、互いに可動平衡状態で存在し、そのため、別個の物質を調製しようと試みると、混合物が形成されることになる。一部の実施形態において、化合物の互変異性型は、分離可能及び単離可能な化合物である。本開示の一部の実施形態において、単一の互変異性型の化合物の純粋な製剤であるか又はそれを含む化学組成物が提供され得る。本開示の一部の実施形態において、化学組成物は、化合物の2つ以上の互変異性型の混合物として提供され得る。特定の実施形態において、かかる混合物は、異なる互変異性型を等量で含有し；特定の実施形態において、かかる混合物は、化合物の少なくとも2つの異なる互変異性型を異なる量で含有する。本開示の一部の実施形態において、化学組成物は、化合物のすべての互変異性型を含有し得る。本開示の一部の実施形態において、化学組成物は、化合物のすべてには満たない互変異性型を含有し得る。本開示の一部の実施形態において、化学組成物は、化合物の1つ以上の互変異性型を、相互変換の結果として時間と共に変化する量で含有し得る。本開示の一部の実施形態において、互変異性は、ケト-エノール互変異性である。化学技術分野の当業者であれば、化学技術分野において公知の任意の好適な試薬を使用してケト-エノール互変異性体を「捕捉する」（即ちそれが「エノール」型のまま留まるように化学的に修飾する）ことによりエノール誘導体を提供することができ、続いてそれが、当技術分野において公知の1つ以上の好適な技法を用いて分離され得ることを認識するであろう。特に指示されない限り、本開示は、純粋な形態であるか又は互いの混合であるかに関わらず、関連性のある化合物のすべての互変異性型を包含する。

30

40

【0102】

50

治療薬：本明細書で使用される場合、「治療薬」という語句は、対象に投与されると、治療効果を有し、及び／又は所望の生物学的作用及び／又は薬理学的作用を誘発する任意の薬剤を指す。一部の実施形態では、治療薬は、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーの1つ以上の症状又は特徴を緩和、改善、軽減、阻害、予防する、その発症を遅延させる、その重症度を低下させ、及び／又はその発生率を低下させるために用いることができる任意の物質である。

【0103】

治療有効量：本明細書で使用される場合、「治療有効量」という語は、治療レジメンの環境として投与されると、所望の生物学的応答を誘発する物質（例えば、治療薬、組成物及び／又は製剤）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／又は病態、例えば筋ジストロフィーに罹患するか又はそれに罹り易い対象に投与されるとき、その疾患、障害及び／又は病態を治療、診断、予防し、及び／又はその発症を遅延させる上で十分な量である。当業者によって理解されるように、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、標的細胞又は組織などといった要因に応じて変動し得る。例えば、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーを治療するための製剤中の化合物の有効量は、その疾患、障害及び／又は病態の1つ又は複数の症状又は特徴を、緩和、改善、軽減、阻害、予防する、その発症を遅延させる、その重症度を低下させ、及び／又はその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、単回用量で投与され；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利用である。

【0104】

治療する：本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」又は「治療すること」という用語は、疾患、障害及び／又は病態、例えば筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状又は特徴を、部分的に又は完全に、緩和、改善、軽減、阻害、予防する、その発症を遅延させる、その重症度を低下させ、及び／又はその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／又は病態、例えば筋ジストロフィーの兆候を示さない対象に対して行い得る。一部の実施形態では、例えば、疾患、障害及び／又は病態に関連した病態を発生するリスクを低減する目的で、その疾患、障害及び／又は病態の初期兆候のみを示す対象に治療を行い得る。

【0105】

単位用量：「単位用量」という表現は、本明細書で使用される場合、医薬組成物の単回投与として投与され、及び／又は物理的に別個の単位で投与される量を指す。多くの実施形態では、単位用量は、所定量の活性剤を含む。一部の実施形態では、単位用量は、薬剤の単回投与全体を含む。一部の実施形態では、2以上の単位用量が、全単回投与を達成するために投与される。一部の実施形態では、意図される効果を達成するために、複数の単位用量の投与が必要であるか又は必要であると予想される。単位用量は、例えば、所定量の1つ又は複数の治療薬、所定量の固形の1つ又は複数の治療薬を含有する液体（例えば、許容可能な担体）の体積であり得、所定量の1つ又は複数の治療薬を含有する徐放製剤又は薬剤送達デバイスであり得る。単位用量が、治療薬に加えて各種成分の何れかを含む製剤中に存在し得ることは理解されよう。例えば、許容可能な担体（例えば、薬学的に許容される担体）、希釈剤、安定剤、緩衝剤、防腐剤などが、後述するように含有され得る。当業者であれば、多くの実施形態において、特定の治療薬の適切な1日総投与量が、一部の単位用量又は複数の単位用量を含み得ること、これが、信頼できる医学的判断の範囲内で担当医により決定され得ることは理解されよう。一部の実施形態では、何れか特定の対象又は生物に対する具体的な有効用量レベルは、治療対象である障害及び障害の重症度、使用される具体的活性化合物の活性；使用される具体的組成物；対象の年齢、体重、健康状態、性別及び食事；使用される具体的な活性化合物の投与時間及びその排泄率；治療期間；使用される具体的な化合物と組み合わせ若しくは同時に用いられる薬物及び／又は追加療法並びに医学分野で公知の類似要因を含め、様々な要因に応じて変動し得る。

【0106】

不飽和：用語「不飽和」は、本明細書で使用されるとき、ある部分が1つ以上の不飽和単位を有することを意味する。

【0107】

野生型：本明細書で使用されるとき、用語「野生型」は、天然で「正常な」（突然変異体、罹患しているもの、改変されているもの等と対照的に）状態又はコンテキストにおいて見られるとおりの構造及び／又は活性を有する実体を指す、その当技術分野で理解される意味を有する。当業者は、野生型遺伝子及びポリペプチドが多くの場合に複数の異なる形態で存在する（例えば、アレル）ことを理解するであろう。

【0108】

核酸：用語「核酸」には、任意のヌクレオチド、その類似体及びそのポリマーが含まれる。用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書で使用されるとき、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチド、リボヌクレオチド（RNA）若しくはデオキシリボヌクレオチド（DNA）のいずれか又はその類似体を指す。これらの用語は、分子の一次構造を指し、二本鎖及び一本鎖DNA並びに二本鎖及び一本鎖RNAを含む。これらの用語には、均等物として、ヌクレオチド類似体で作られているRNA又はDNAのいずれかの類似体、及び限定はされないが、メチル化、保護及び／又はキャッピングされたヌクレオチド又はポリヌクレオチドなど、修飾ポリヌクレオチドが含まれる。これらの用語は、ポリリボヌクレオチド又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又はオリゴデオキシリボヌクレオチド（DNA）；核酸塩基及び／又は修飾核酸塩基のN-グリコシド又はC-グリコシドから誘導されるRNA又はDNA；糖及び／又は修飾糖から誘導される核酸；及びリン酸架橋及び／又は修飾リン原子架橋（本明細書では「インターヌクレオチド結合」とも称される）から誘導される核酸を包含する。この用語は、核酸塩基、修飾核酸塩基、糖、修飾糖、天然の天然リン酸インターヌクレオチド結合又は非天然インターヌクレオチド結合の任意の組み合わせを含む核酸を包含する。例としては、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、リボース部分及びデオキシリボース部分の両方を含む核酸、リボース部分及び修飾リボース部分を含む核酸が挙げられるが、限定はされない。特に指定されない限り、接頭語ポリは、2～約10,000ヌクレオチド単量体単位を含む核酸を指し、ここで、接頭語オリゴは、2～約200ヌクレオチド単量体単位を含む核酸を指す。

【0109】

ヌクレオチド：用語「ヌクレオチド」は、本明細書で使用されるとき、ヘテロ環式塩基、糖及び1つ以上のリン酸基又はリン含有インターヌクレオチド結合からなるポリヌクレオチドの単量体単位を指す。天然に存在する塩基（グアニン、（G）、アデニン、（A）、シトシン、（C）、チミン、（T）及びウラシル（U））は、プリン又はピリミジンの誘導体であるが、天然に存在する及び天然に存在しない塩基類似体も包含されることが理解されなければならない。天然に存在する糖としては、ペントース（五炭糖）デオキシリボース（これは、天然DNAに見られる）又はリボース（これは、天然RNAに見られる）が挙げられるが、天然に存在する及び天然に存在しない糖類似体、例えば2'-修飾を有する糖、ロックド核酸（LNA）及びホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）中の糖なども包含されることが理解されなければならない。ヌクレオチドは、インターヌクレオチド結合によって結合されて核酸又はポリヌクレオチドを形成する。多数のインターヌクレオチド結合が当技術分野において公知である（限定はされないが、天然リン酸結合、ホスホロチオエート結合、ボラノホスフェート結合など）。人工核酸には、PNA（ペプチド核酸）、リン酸トリエステル、ホスホロチオネート、H-ホスホン酸、ホスホロアミデート、ボラノホスフェート、メチルホスホネート、ホスホノアセテート、チオホスホノアセテート及び天然核酸のリン酸骨格の他のバリエーション等が含まれる。一部の実施形態において、ヌクレオチドは、天然に存在する核酸塩基、天然に存在する糖及び天然リン酸結合を含む天然ヌクレオチドである。一部の実施形態において、ヌクレオチドは、天然ヌクレオチドの代わりに使用することのできる構造的類似体である修飾ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体である。

10

20

30

40

50

【0110】

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、天然ヌクレオチドの少なくとも1つの機能を実施することができる任意の化学部分を含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、糖、塩基及び／又はインターヌクレオチド結合における修飾を含む。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／又は修飾インターヌクレオチド結合を含む。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、例えばポリマー中において、少なくとも相補的な塩基配列を含む核酸と塩基対合することができるサブユニットを形成することができる。

【0111】

類似体：「類似体」という用語は、参照化学部分又は参照クラスの化学部分とは構造的に異なるが、そうした参照化学部分又は参照クラスの化学部分の少なくとも1つの機能を実施することができる任意の化学部分を含む。非限定的な例として、ヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドと構造的に異なるが、ヌクレオチドの少なくとも1つの機能を果たす；核酸塩基類似体は、核酸塩基と構造的に異なるが、核酸塩基の少なくとも1つの機能を果たす；糖類似体は、核酸塩基と構造的に異なるが、糖の少なくとも1つの機能を果たす等である。

【0112】

ヌクレオシド：用語「ヌクレオシド」は、核酸塩基又は修飾核酸塩基が糖又は修飾糖に共有結合的に結合している部分を指す。

【0113】

修飾ヌクレオシド：用語「修飾ヌクレオシド」は、天然ヌクレオシドと化学的に異なるが、ヌクレオシドの少なくとも1つの機能を果たす能力を有する化学的部分を指す。一部の実施形態において、修飾ヌクレオシドは、天然ヌクレオシドから誘導されるか又はそれと化学的に類似しているが、しかし、これは、それを天然ヌクレオシドと区別する化学修飾を含む。修飾ヌクレオシドの非限定的な例として、塩基及び／又は糖の修飾を含むものがある。修飾ヌクレオシドの非限定的な例として、糖に2'修飾を有するものがある。更に、修飾ヌクレオシドの非限定的な例として、脱塩基ヌクレオシド（核酸塩基が欠失している）がある。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つの機能が可能であり、例えばポリマー中において、少なくとも相補的な塩基配列を含む核酸と塩基対合することができる部分を形成することができる。

【0114】

ヌクレオシド類似体：「ヌクレオシド類似体」という用語は、天然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つの機能を実施することができる化学部分を指す。一部の実施形態では、ヌクレオシド類似体は、糖の類似体及び／又は核酸塩基の類似体を含む。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、例えばポリマー中において、相補的な塩基配列を含む核酸と塩基対合することができる部分を形成することができる。

【0115】

糖：「糖」という用語は、閉状態及び／又は開状態の単糖又は多糖を指す。一部の実施形態では、糖は、単糖である。一部の実施形態では、糖は、多糖である。糖としては、限定はされないが、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が挙げられる。本明細書で使用される場合、「糖」という用語は、例えば、グリコールのように、従来の糖分子に代わり使用される構造類似体も包含し、そのポリマーは、核酸類似体のグリコール核酸（GNA）などの骨格を形成する。本明細書で使用される場合、「糖」という用語は、天然又は天然に存在するヌクレオチドの代わりに用いられる構成類似体、例えば修飾糖及びヌクレオチド糖も含む。一部の実施形態において、糖は、D-2-デオキシリボースである。一部の実施形態において、糖は、β-D-デオキシリボフラノースである。一部の実施形態において、糖部分は、β-D-デオキシリボフラノース部分である。一部の実施形態において、糖は、D-リボースである。一

10

20

30

40

50

部の実施形態において、糖は、 β -D-リボフラノースである。一部の実施形態において、糖部分は、 β -D-リボフラノース部分である。一部の実施形態において、糖は、任意選択で置換されている β -D-デオキシリボフラノース又は β -D-リボフラノースである。一部の実施形態において、糖部分は、任意選択で置換されている β -D-デオキシリボフラノース又は β -D-リボフラノース部分である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えばDMDオリゴヌクレオチド、核酸等における糖部分／単位は、インターヌクレオチド結合にそれぞれ独立に連結した1個以上の炭素原子を含む糖、例えばその5'-C及び／又は3'-Cがそれぞれ独立にインターヌクレオチド結合（例えば、天然リン酸結合、修飾インターヌクレオチド結合、キラル制御されたインターヌクレオチド結合等）に連結している、任意選択で置換されている β -D-デオキシリボフラノース又は β -D-リボフラノースである。

10

【0116】

修飾糖：用語「修飾糖」は、糖を置き換えることのできる部分を指す。修飾糖は、糖の空間配置、電子特性又は他の何らかの物理化学的特性を模倣する。一部の実施形態において、修飾糖は、置換 β -D-デオキシリボフラノース又は β -D-リボフラノースである。一部の実施形態において、修飾糖は、2'-修飾を含む。一部の実施形態において、修飾糖は、例えば、LNAに見られるとおり、2つの糖炭素原子（例えば、C2及びC4）を連結するリンカー（例えば、任意選択で置換されている二価のヘテロ脂肪族）を含む。一部の実施形態において、リンカーは、 $-O-CH(R)-$ であり、式中、Rは、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、リンカーは、 $-O-CH(R)-$ であり、式中、Oは、糖のC2に連結し、 $-CH(R)-$ は、C4に連結し、及びRは、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、Rは、メチルである。一部の実施形態において、Rは、 $-H$ である。一部の実施形態において、 $-CH(R)-$ は、S配置である。一部の実施形態において、 $-CH(R)-$ は、R配置である。

20

【0117】

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指す。最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。一部の実施形態において、修飾核酸塩基は、その核酸塩基がA、T、C、G、U及びその互変異性体から選択される置換核酸塩基である。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、シトシン又はチミンである。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、シトシン又はチミンである。一部の実施形態では、核酸塩基は、「修飾核酸塩基」、例えばアデニン（A）、グアニン（G）、ウラシル（U）、シトシン（C）及びチミン（T）以外の核酸塩基である。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、シトシン又はチミンである。一部の実施形態では、修飾核酸塩基は、空間配置、電子的性質又は核酸塩基の何れか他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又はオリゴヌクレオチド二重らせん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、シトシン又はグアニン）と対合することができる。本明細書で使用される場合、「核酸塩基」という用語は、天然又は天然に存在するヌクレオチドの代わりに用いられる構成類似体、例えば修飾核酸塩基及び核酸塩基類似体も含む。一部の実施形態において、核酸塩基は、任意選択で置換されているA、T、C、G若しくはU又はその核酸塩基がA、T、C、G、U及びその互変異性体から選択される置換核酸塩基である。

30

40

【0118】

修飾核酸塩基：「修飾核酸塩基」、「修飾塩基」などといった用語は、核酸塩基と化学的に異なるが、核酸塩基の少なくとも1つの機能を実施することができる化学部分を指す。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つの機能が可能であり、例えばポリマー中に

50

において、少なくとも相補的な塩基配列を含む核酸と塩基対合することができる部分を形成することができる。一部の実施形態において、修飾核酸塩基は、その核酸塩基が A、T、C、G、U 及びその互変異性体から選択される置換核酸塩基である。

【0119】

キラルリガンド：用語「キラルリガンド」又は「キラル補助基」は、キラルである部分であって、反応が一定の立体選択性で行われ得るように反応に取り込むことのできる部分を指す。一部の実施形態において、この用語は、かかる部分を含む化合物も指し得る。

【0120】

ブロッキング基：「ブロッキング基」という用語は、官能基の反応性をマスキングする基を指す。後に、ブロッキング基の除去により官能基をアンマスキングし得る。一部の実施形態では、ブロッキング基は、保護基である。

10

【0121】

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、分子中に埋め込まれるか又は分子に付加された、一般に認識されている化学的実体である。一部の実施形態において、化合物の部分は、化合物から 1 つ以上の -H 及び / 又はその均等物を除去することによってその化合物から形成される一価、二価又は多価の基である。一部の実施形態において、その文脈に応じて、「部分」は、その部分の誘導元の化合物又は実体も指し得る。

【0122】

リーディングフレーム：用語「リーディングフレーム」は、二本鎖 DNA 分子の、各方向に 3 つずつ、6 つの可能なリーディングフレームの 1 つを指す。使用されるリーディングフレームにより、DNA 分子のコード配列内でアミノ酸のコードにいずれのコドンが使用されるかが決まる。

20

【0123】

オリゴヌクレオチド：用語「オリゴヌクレオチド」は、核酸塩基、修飾核酸塩基、糖、修飾糖、天然リン酸結合又は非天然インターヌクレオチド結合の任意の組み合わせを含むヌクレオチド単量体のポリマー又はオリゴマーを指す。

【0124】

本開示のオリゴヌクレオシドは、様々な長さであり得る。詳細な実施形態において、オリゴヌクレオシドは、約 20 ～ 約 200 ヌクレオシド長の範囲であり得る。様々な関連する実施形態において、一本鎖、二本鎖及び三本鎖のオリゴヌクレオシドは、長さが約 4 ～ 約 10 ヌクレオシド、約 10 ～ 約 50 ヌクレオシド、約 20 ～ 約 50 ヌクレオシド、約 15 ～ 約 30 ヌクレオシド、約 20 ～ 約 30 ヌクレオシド長の範囲であり得る。一部の実施形態において、オリゴヌクレオシドは、約 9 ～ 約 39 ヌクレオシド長である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオシドは、少なくとも 15 ヌクレオシド長である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオシドは、少なくとも 20 ヌクレオシド長である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオシドは、少なくとも 25 ヌクレオシド長である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオシドは、少なくとも 30 ヌクレオシド長である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオシドは、少なくとも 18 ヌクレオシド長の相補鎖の二重鎖である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオシドは、少なくとも 21 ヌクレオシド長の相補鎖の二重鎖である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド長の目的上、考慮される各ヌクレオシドは、独立に、A、T、C、G、U 及びその互変異性体から選択される、任意選択で置換されている核酸塩基を含む。

30

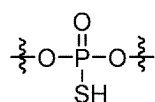
40

【0125】

インターヌクレオチド結合：本明細書で使用されるとき、語句「インターヌクレオチド結合」は、概して、核酸又はオリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位間の結合、典型的にはリン含有結合を指し、上記及び本明細書において使用されたとおり、「糖間結合」、「インターヌクレオチド結合」及び「リン原子架橋」と同義である。当業者が理解するとおり、天然 DNA 及び RNA は、天然リン酸結合を含有する。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、天然に存在する DNA 及び RNA 分子に見られるとおりの天然

50

リン酸結合（ $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})\text{O}-$ 、典型的には例えば約 7.4 の pH でそのアニオン型 $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}^-)\text{O}-$ として存在する）である。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、天然リン酸結合と構造的に異なるが、天然リン酸結合の代わりに利用し得る修飾インターヌクレオチド結合（又は非天然インターヌクレオチド結合）、例えばホスホロチオエートインターヌクレオチド結合、PMO 結合等である。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、天然リン酸ジエステル結合の 1 つ以上の酸素原子が 1 つ以上の有機又は無機部分によって独立に置き換えられている修飾インターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、かかる有機又は無機部分は、限定はされないが、 $=\text{S}$ 、 $=\text{Se}$ 、 $=\text{NR}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SeR}'$ 、 $-\text{N}(\text{R}_2')\text{B}(\text{R}')_3$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{Se}-$ 及び $-\text{N}(\text{R}')-$ （式中、各 R' は、独立に、以下に定義及び記載され 10
るとおりである）から選択される。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合はリン酸トリエステル結合である。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、ホスホロチオエートジエステル結合（ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合、
【化 2】



、典型的には例えば約 7.4 の pH でそのアニオン型 $-\text{OP}(\text{O})(\text{S}^-)\text{O}-$ として存在する）である。当業者によれば、インターヌクレオチド結合は、その結合中の酸又は塩基部分の存在に起因して所与の pH でアニオン又はカチオンとして存在し得ることが理解される。

【0126】

特に指定されない限り、オリゴヌクレオチド配列の前に付される Rp/Sp の表記は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合中の結合リンの立体配置をオリゴヌクレオチド配列の 5' から 3' の順に記述する。

【0127】

オリゴヌクレオチドタイプ：本明細書で使用されるとき、語句「オリゴヌクレオチドタイプ」は、特定の塩基配列、骨格結合のパターン（即ちインターヌクレオチド結合タイプ、例えば天然リン酸結合、ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合、負電荷インターヌクレオチド結合、中性インターヌクレオチド結合等のパターン）、骨格キラル中心のパターン（即ち結合リン立体化学（ Rp/Sp ）のパターン）及び骨格リン修飾のパターンを有するオリゴヌクレオチドを定義して使用される。一部の実施形態において、共通の表記の「タイプ」のオリゴヌクレオチドは、互いに構造的に同一である。

【0128】

当技術分野の当業者であれば、本開示の合成方法が、オリゴヌクレオチド（例えば、DMDO 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、それによってその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／又は結合リンで特定の修飾、及び／又は特定の塩基、及び／又は特定の糖を有するように、事前に設計可能であり及び／又は選択可能であることを理解されるであろう。一部の実施形態では、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、事前に設計及び／又は選択される。一部の実施形態では、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、設計及び／又は決定される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖は、特定の組み合わせの塩基を有するように、設計及び／又は選択される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖は、上述の構造特性の 1 つ又は複数の特定の組み合わせを有するように設計及び／又は選択される。本開示は、複数のオリゴヌクレオチド分子を含むか又はそれからなる組成物（例えば、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物）を提供する。一部の実施形態において、かかる分子は、 40
50

すべて同じタイプである。一部の実施形態において、かかる分子は、すべて構造的に互いに同一である。一部の実施形態において、提供される組成物は、異なるタイプの複数のオリゴヌクレオチドを典型的には所定の（ランダムではない）相対量で含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるとおりの DMD オリゴヌクレオチドである。

【0129】

キラル制御：本明細書で使用される場合、「キラル制御」とは、オリゴヌクレオチド（例えば、DMD オリゴヌクレオチド）内のキラルインターヌクレオチド結合中の、キラル結合リンの立体化学的指定の制御を指す。一部の実施形態では、制御は、オリゴヌクレオチドの糖部分及び塩基部分から非存在のキラル要素を介して達成され、例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工程中に 1 つ以上のキラル補助基を介して達成され、このキラル補助剤は、多くの場合、オリゴヌクレオチド調製工程で用いられるキラルホスホロアミダイトの一部である。キラル制御とは対照的に、当業者は、キラル補助剤を使用しない従来のオリゴヌクレオチド合成は、こうした従来のオリゴヌクレオチド合成を用いてキラルインターヌクレオチド結合を形成する場合、キラルインターヌクレオチド結合での立体化学を制御することができないことを理解されよう。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド内のキラルインターヌクレオチド結合中の各キラル結合リンの立体化学指定が制御される。

10

【0130】

キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物：用語「キラル制御された（立体制御された又は立体定義された）オリゴヌクレオチド組成物」、「キラル制御された（立体制御された又は立体定義された）核酸組成物」などは、本明細書で使用されるとき、1）共通の塩基配列、2）共通の骨格結合のパターン、3）共通の骨格キラル中心のパターン、及び 4）共通の骨格リン修飾のパターンを共有する複数のオリゴヌクレオチド（又は核酸、キラル制御されたオリゴヌクレオチド若しくはキラル制御された核酸）（特定のタイプのオリゴヌクレオチド）を含む組成物を指し、ここで、複数のオリゴヌクレオチド（又は核酸）は、1 つ以上のキラルインターヌクレオチド結合に同じ立体化学を共有する（キラル制御されたインターヌクレオチド結合、そのキラル結合リンが R_p 又は S_p であり、キラル制御されていないインターヌクレオチド結合のようにランダムな R_p 及び S_p 混合物ではない）。キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中の複数のオリゴヌクレオチド（又は核酸）のレベルは、非ランダムである（予め決められている、制御されている）。キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、典型的には、例えばキラル制御されたオリゴヌクレオチド調製による 1 つ以上のキラルインターヌクレオチド結合の立体選択的な形成を通じて調製される（例えば、立体選択性を意図的に制御するためのキラル補助基又はキラル触媒を使用しない従来のホスホロアミダイトベースのオリゴヌクレオチド合成など、キラル制御されない（ステレオランダムな、非立体選択的な、ラセミの）オリゴヌクレオチド合成と比較して、本開示に例示されるとおりのキラル補助基を使用する）。キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、共通の塩基配列、共通の骨格結合のパターン及び共通の骨格リン修飾のパターンを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比べて複数のオリゴヌクレオチドが強化されている。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1）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タイプの複数のオリゴヌクレオチドを含み、ここで、同じ塩基配列、骨格結合のパターン及び骨格リン修飾のパターンを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比べて、これは、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドが強化されている。当業者が容易に理解するとおり、かかる強化は、実質的にラセミ体の製剤と比較して、各キラル制御されたインターヌクレオチド結合において、より高いレベルの結合リンが望ましい立体配置を有することの特徴とし得る。一部の実施形態において、各キラル制御されたインターヌクレオチド結合は、独立に、そのキラル結合リンに関して少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %

20

30

40

50

、 97%、98%又は99%のジアステレオ純度を有する。一部の実施形態において、それぞれが独立に少なくとも90%のジアステレオ純度を有する。一部の実施形態において、それぞれが独立に少なくとも95%のジアステレオ純度を有する。一部の実施形態において、それぞれが独立に少なくとも97%のジアステレオ純度を有する。一部の実施形態において、それぞれが独立に少なくとも98%のジアステレオ純度を有する。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、同じ化学構成を有する。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、同じ化学構成及び立体化学を有し、構造的に同一である。

【0131】

一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中の複数のオリゴヌクレオチドは、同じ塩基配列、存在する場合には同じ核酸塩基、糖及びインターヌクレオチド結合修飾並びに1つ以上のキラル制御されたインターヌクレオチド結合の結合リンキラル中心における独立に同じ立体化学（R_p又はS_p）を共有し、但し特定の結合リンキラル中心の立体化学は、異なることもある。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの約0.1%～100%（例えば、約1%～100%、5%～100%、10%～100%、20%～100%、30%～100%、40%～100%、50%～100%、60%～100%、70%～100%、80%～100%、90%～100%、95%～100%、50%～90%、又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%、又は少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%）が複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、共通の塩基配列を共有するキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの約0.1%～100%（例えば、約1%～100%、5%～100%、10%～100%、20%～100%、30%～100%、40%～100%、50%～100%、60%～100%、70%～100%、80%～100%、90%～100%、95%～100%、50%～90%、又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%、又は少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%）が複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、共通の塩基配列、共通の骨格結合のパターン及び共通の骨格リン修飾のパターンを共有するキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの約0.1%～100%（例えば、約1%～100%、5%～100%、10%～100%、20%～100%、30%～100%、40%～100%、50%～100%、60%～100%、70%～100%、80%～100%、90%～100%、95%～100%、50%～90%、又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%、又は少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%）が複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中のすべてのオリゴヌクレオチド又は共通の塩基配列（例えば、複数のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドタイプのもの）を共有する組成物中のすべてのオリゴヌクレオチド又は共通の塩基配列、共通の骨格結合のパターン及び共通の骨格リン修飾のパターン（例えば、複数のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドタイプのもの）を共有する組成物中のすべてのオリゴヌクレオチド又は共通の塩基配列、共通の塩基修飾パターン、共通の糖修飾パターン、共通のインターヌクレオチド結合タイプパターン及び／又は共通のインターヌクレオチド結合修飾パターン（例えば、複数のオリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

又はオリゴヌクレオチドタイプのもの)を共有する組成物中のすべてのオリゴヌクレオチド又は同じ化学構成を共有する組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの約0.1%~100%(例えば、約1%~100%、5%~100%、10%~100%、20%~100%、30%~100%、40%~100%、50%~100%、60%~100%、70%~100%、80%~100%、90%~100%、95%~100%、50%~90%、又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%、又は少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%)が複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも(DP)NCI(式中、DPは、85%~100%から選択されるパーセンテージであり、及びNCIは、キラル制御されたインターヌクレオチド結合の数である)である。一部の実施形態において、DPは、少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。一部の実施形態において、DPは、少なくとも85%である。一部の実施形態において、DPは、少なくとも90%である。一部の実施形態において、DPは、少なくとも95%である。一部の実施形態において、DPは、少なくとも96%である。一部の実施形態において、DPは、少なくとも97%である。一部の実施形態において、DPは、少なくとも98%である。一部の実施形態において、DPは、少なくとも99%である。一部の実施形態において、DPは、キラル制御されたインターヌクレオチド結合の結合リンキラル中心のジアステレオ純度を反映する。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合の結合リンキラル中心のジアステレオ純度は、典型的には、かかるインターヌクレオチド結合と、そのインターヌクレオチド結合によって連結された2つのヌクレオシド単位とを含む適切な二量体を使用して評価され得る。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、約1~50(例えば、約1~10、1~20、5~10、5~20、10~15、10~20、10~25、10~30又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20)のキラルインターヌクレオチド結合で、同じ立体化学を有する。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、キラルインターヌクレオチド結合の約0.1%~100%(例えば、約1%~100%、約5%~100%、10%~100%、20%~100%、30%~100%、40%~100%、50%~100%、60%~100%、70%~100%、80%~100%、90%~100%、95%~100%、50%~90%又は約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは100%又は少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%)で、同じ立体化学を有する。一部の実施形態では、各キラルインターヌクレオチド結合は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合であり、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、キラルインターヌクレオチド結合のすべてがキラル制御されたインターヌクレオチド結合であるのではなく、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。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、所定レベルの個々のオリゴヌクレオチド又は核酸タイプを含む。例えば、一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1つのオリゴヌクレオチドタイプを所定レベル(例えば、上記に記載されるとおり)で含む。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、2つ以上のオリゴヌクレオチドタイプを、それぞれ独立に所定レベルで含む。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、多数のオリゴヌクレオチドタイプをそれぞれ独立に所定レベルで含む。一部の実施形態において、キラル制御された

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド組成物は、あるオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの組成物であり、この組成物は、所定レベルのそのオリゴヌクレオチドタイプの複数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、複数のDMDオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物である。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、あるDMDオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドの組成物である。

【0132】

キラル的に純粋：本明細書で使用されるとき、語句「キラル的に純粋」は、オリゴヌクレオチド分子のすべて又はほぼすべて（残りは、不純物である）が結合リン原子に関して単一のジアステレオマー形態で存在するオリゴヌクレオチド又はその組成物を記載して使用される。多くの実施形態において、当業者が理解するとおり、キラル的に純粋なオリゴヌクレオチド組成物は、組成物中のオリゴヌクレオチドの実質的にすべてが構造的に同一である（同じ立体異性体である）点で実質的に純粋である。

10

【0133】

結合リン：本明細書において定義されるとき、語句「結合リン」は、言及されている特定のリン原子がインターヌクレオチド結合に存在するリン原子であることを指して使用され、このリン原子は、天然に存在するDNA及びRNAに存在するとおりの天然リン酸結合のリン原子に対応する。一部の実施形態において、結合リン原子は、修飾インターヌクレオチド結合中のものである。一部の実施形態において、結合リン原子は、キラルである。

20

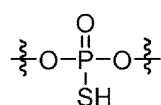
【0134】

インターヌクレオチド結合：本明細書で使用される場合、「インターヌクレオチド結合」という語句は、一般に、核酸又はオリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位間の結合、典型的にはリン含有結合を指し、上記及び本明細書において使用されるとおり、「糖間結合」、「インターヌクレオチド結合」及び「リン原子架橋」と同義である。当業者が理解するとおり、天然DNA及びRNAは、天然リン酸結合を含有する。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、天然に存在するDNA及びRNA分子に見られるとおりの天然リン酸結合（ $-OP(O)(OH)O-$ 、典型的には例えば約7.4のpHでそのアニオン型 $-OP(O)(O-)O-$ として存在する）である。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、天然リン酸結合と構造的に異なるが、天然リン酸結合の代わりに利用し得る修飾インターヌクレオチド結合（又は非天然インターヌクレオチド結合）、例えばホスホロチオエートインターヌクレオチド結合、PMO結合等である。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、天然リン酸ジエステル結合の1つ又は複数の酸素原子が1つ又は複数の有機又は無機部分によって独立に置き換えられている修飾インターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、かかる有機又は無機部分は、限定はされないが、 $=S$ 、 $=Se$ 、 $=NR'$ 、 $-SR'$ 、 $-SeR'$ 、 $-N(R_2')$ 、 $B(R')_3$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 及び $-N(R')-$ （式中、各 R' は、独立に、以下に定義及び記載されるとおりである）から選択される。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、リン酸トリエステル結合である。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、ホスホロチオエートジエステル結合（ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合、

30

40

【化3】



、典型的には例えば約7.4のpHでそのアニオン型 $-OP(O)(S-)O-$ として存在する）である。当業者によれば、インターヌクレオチド結合は、その結合中の酸又は塩基部分の存在に起因して所与のpHでアニオン又はカチオンとして存在し得ることが理解される。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、所与のpHで負に帯電

50

していないインターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、所与の pH において中性インターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、所与の pH は、pH 約 7.4 である。一部の実施形態において、所与の pH は、pH 約 0、1、2、3、4、5、6 又は 7～pH 約 7、8、9、10、11、12、13 又は 14 の範囲である。一部の実施形態において、所与の pH は、pH 5～9 の範囲である。一部の実施形態において、所与の pH は、pH 6～8 の範囲である。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、例えば、PNA（ペプチド核酸）結合又は PMO（ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー）結合の 1 つである。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、キラル結合リンを含む。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、インターヌクレオチド結合は、s（ホスホロチオエート）、s1、s2、s3、s4、s5、s6、s7、s8、s9、s10、s11、s12、s13、s14、s15、s16、s17 又は s18 から選択され、ここで、s1、s2、s3、s4、s5、s6、s7、s8、s9、s10、s11、s12、s13、s14、s15、s16、s17 及び s18 のそれぞれは、独立に、国際公開第 2017/062862 号に記載されるとおりである。

10

【0135】

特に指定されない限り、化合物（例えば、DMD オリゴヌクレオチド、薬剤等）の塩、例えば薬学的に許容可能な酸付加塩又は塩基付加塩、立体異性型及び互変異性型が包含される。特に指定されない限り、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その」は、文脈上特に明確に指示されない限り複数形への言及を含む（及び逆も同様である）。従って、例えば、「化合物」への言及は、複数のかかる化合物を含み得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0136】

図面の簡単な説明

【図1】HELISA アッセイの例である。

【発明を実施するための形態】

【0137】

特定の実施形態の詳細な説明

合成オリゴヌクレオチドは、幅広い種類の適用において有用な分子ツールを提供する。例えば、オリゴヌクレオチドは、治療、診断、研究及び新規ナノマテリアル適用において有用である。天然に存在する核酸（例えば、非修飾 DNA 又は RNA）の使用は、例えば、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼに対するその脆弱性によって制限される。そのため、こうした欠点を回避しようと様々な合成の対応物が開発されている。これには、とりわけそうした分子を、分解を受けにくいものにし、且つオリゴヌクレオチド、例えば DMD オリゴヌクレオチドの他の特性を改良する化学修飾、例えば塩基修飾、糖修飾、骨格修飾等を含む合成オリゴヌクレオチドが含まれる。化学修飾は、毒性の増加等、ある種の望ましくない効果にもつながり得る。構造上の観点から、天然リン酸結合に対する修飾はキラリティーを導入することができ、オリゴヌクレオチドのある種の特性は、オリゴヌクレオチドの骨格を形成するリン原子の立体配置の影響を受け得る。

30

40

【0138】

一部の実施形態において、本開示は、DMD 標的核酸に少なくとも部分的に相補的な配列を有し、且つ一部の実施形態では DMD エクソンのスキッピングを媒介する能力を有する DMD オリゴヌクレオチド又は DMD オリゴヌクレオチド組成物に関する。一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチド又は DMD オリゴヌクレオチド組成物は、DMD エクソン 51 のスキッピングを媒介する能力を有する。

【0139】

一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチド又は DMD オリゴヌクレオチド組成物は、インターヌクレオチド結合（例えば、骨格）、糖及び／又は核酸塩基に対する様々な修飾の任意のものを含む。

50

【0140】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド又はDMDオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書（例えば、表A1）において開示される任意のDMDオリゴヌクレオチド又はDMDオリゴヌクレオチド組成物である。

【0141】

一部の実施形態において、骨格のキラリティー（例えば、リン原子の立体配置）又は骨格における天然リン酸結合若しくは非天然インターヌクレオチド結合の包含及び／又は糖及び／又は核酸塩基の修飾及び／又は化学的部分の付加が、DMDオリゴヌクレオチドの特性及び活性、例えばDMDオリゴヌクレオチド（例えば、ジストロフィン（DMD）DMD転写物配列にとってアンチセンスのDMDオリゴヌクレオチド）がDMDエクソン51をスキップする能力及び／又は限定はされないが、安定性の増加、薬物動態の改良及び／又は免疫原性の低下等を含めたDMDオリゴヌクレオチドの他の特性に影響を及ぼし得る。提供される化合物、例えばDMDオリゴヌクレオチド及びその組成物の特性及び／又は活性の評価に好適なアッセイは当技術分野において広く公知であり、本開示において利用することができる。

【0142】

一部の実施形態において、DMD転写物は、プレmRNAである。一部の実施形態において、スプライシング産物は、成熟RNAである。一部の実施形態において、スプライシング産物は、mRNAである。一部の実施形態において、スプライシングの調節又は変化は、DMDエクソン51のスキッピングを含む。

【0143】

一部の実施形態において、提供される組成物中の提供されるDMDオリゴヌクレオチド、例えば複数のDMDオリゴヌクレオチドは、塩基修飾、糖修飾及び／又はインターヌクレオチド結合修飾を含む。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、塩基修飾及び糖修飾を含む。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、塩基修飾及びインターヌクレオチド結合修飾を含む。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、糖修飾及びインターヌクレオチド修飾を含む。一部の実施形態において、提供される組成物は、塩基修飾、糖修飾及びインターヌクレオチド結合修飾を含む。塩基修飾、糖修飾、インターヌクレオチド結合修飾等の例示的化学修飾は、限定はされないが本開示に記載されるものを含め、当技術分野において広く公知である。一部の実施形態において、修飾塩基は、置換されたA、T、C、G又はUである。一部の実施形態において、糖修飾は2'-修飾である。一部の実施形態において、2'-修飾は2'-F修飾である。一部の実施形態において、2'-修飾は2'-Rであり、式中、R1は水素でない。一部の実施形態において、2'-修飾は2'-ORであり、式中、R1は、任意選択で置換されているアルキルである。一部の実施形態において、2'-修飾は2'-OMeである。一部の実施形態において、2'-修飾は2'-MOEである。一部の実施形態において、修飾糖部分は架橋二環式又は多環式環である。一部の実施形態において、修飾糖部分は、5～20個の環原子を有する架橋二環式又は多環式環であり、ここで、1つ以上の環原子は、任意選択で且つ独立に、ヘテロ原子である。例示的環状構造は、BNA、LNA等に見られるものなど、当技術分野において広く公知である。

【0144】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾インターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、1つ以上のキラル修飾インターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、1つ以上のキラル制御されたキラル修飾インターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、1つ以上の天然リン酸結合を含む。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾インターヌクレオチド結合と1つ以上の天然リン酸結合とを含む。一部の実施形態において、修飾インターヌクレオチド結合は、ホスホロチオエート結合である。一部の実施形態において、各修飾インターヌクレオチド結

10

20

30

40

50

合は、ホスホロチオエート結合である。

【0145】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾インターヌクレオチド結合と1つ以上の天然リン酸結合との両方を含む。一部の実施形態において、修飾インターヌクレオチド結合と天然リン酸結合との両方を含むDMDオリゴヌクレオチド及びその組成物は、特性、例えばエクソン51のスキッピング及び毒性等の改良をもたらす。一部の実施形態において、修飾インターヌクレオチド結合は、キラルインターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、修飾インターヌクレオチド結合は、ホスホロチオエート結合である。一部の実施形態において、修飾インターヌクレオチド結合は、置換ホスホロチオエート結合である。

10

【0146】

とりわけ、本開示は、ステレオランダムなDMDオリゴヌクレオチド製剤が、例えばDMDオリゴヌクレオチド鎖内の個々の骨格結合リンキラル中心の立体化学構造の点で互いに異なる複数の個別的な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ない場合、ステレオランダムなDMDオリゴヌクレオチド製剤は、制御されないキラル中心、例えばキラル結合リンに関して不確定なレベルのDMDオリゴヌクレオチド立体異性体を含む制御されない組成物を提供する。これらの立体異性体と同じ塩基配列を有し得るとしても、その骨格立体化学が異なることに少なくとも起因して、それらは異なる化学的実体であり、及びそれらは、本明細書において実証されたとおり、異なる特性、例えばエクソン51のスキッピング、毒性等を有し得る。とりわけ、本開示は、1つ以上の結合リンキラル中心の立体化学が独立に（例えば、キラル制御されたインターヌクレオチド結合の点で）制御されている新規DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態において、本開示は、目的のDMDオリゴヌクレオチドの特定の立体異性体であるか、又はそれを含有するキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

20

【0147】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド中、骨格キラル中心のパターンは、限定はされないが、DMDエクソン51のスキッピングの改良、安定性の増加、活性の増加、低毒性、低免疫応答、タンパク質結合プロファイルの改良、特定のタンパク質への結合の増加及び／又は送達の亢進を含め、1つ若しくは複数の活性又は1つ若しくは複数の特性の改良をもたらすことができる。

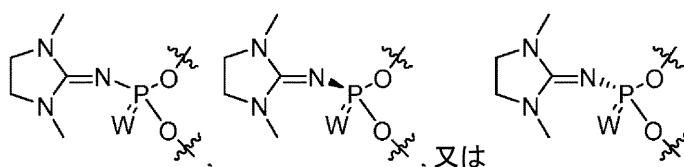
30

【0148】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、1つ以上の非負電荷インターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、非負電荷インターヌクレオチド結合は、正電荷インターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、非負電荷インターヌクレオチド結合は、中性インターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、修飾インターヌクレオチド結合（例えば、非負電荷インターヌクレオチド結合）は、任意選択で置換されているグアニジン部分を含む。一部の実施形態において、修飾インターヌクレオチド結合は、任意選択で置換されている環状グアニジン部分を含む。一部の実施形態において、修飾インターヌクレオチド結合は、任意選択で置換されている環状グアニジン部分を含み、

40

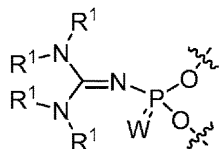
【化4】



の構造を有し、式中、Wは、Oである。一部の実施形態において、負に帯電していないインターヌクレオチド結合（例えば、中性インターヌクレオチド結合）は、

50

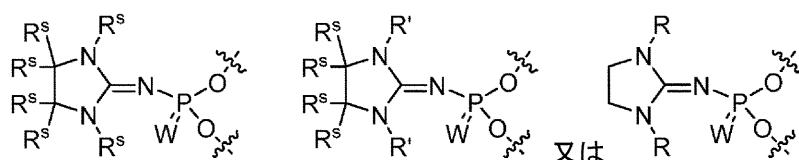
【化 5】



の構造を有し、ここで、各変数は、独立に、本明細書に記載されるとおりである。一部の
実施形態において、2つの R ¹（同じ又は異なる窒素原子上のいずれかにある）は、R で
あり、それらの介在原子と一緒に、本明細書に記載されるように任意選択で置換され
ている環を形成する。一部の実施形態において、負に帯電していないインターヌクレオ
チド結合（例えば、中性インターヌクレオチド結合）は、

10

【化 6】



の構造を有し、ここで、各変数は、独立に、本明細書に記載されるとおりである。一部の
実施形態において、Wは、Oである。一部の実施形態において、そのようなインターヌク
レオチド結合は、キラル制御されている。様々な変数、例えば R ¹、R ¹、R ˢなどの有
用な実施形態は、米国特許出願第 6 2 / 7 7 6 , 4 3 2 号、国際公開第 2 0 1 9 / 2 0 0
1 8 5 号及び同第 2 0 1 9 / 2 1 7 7 8 4 号に記載されているものを含み、各変数の実施
形態を含む説明は、独立に、参照により本明細書に援用される。

20

【0 1 4 9】

一部の実施形態において、非負電荷インターヌクレオチド結合は、立体化学的に制御され
ている。

【0 1 5 0】

一部の実施形態において、提供される DMD オリゴヌクレオチドは、DMD 転写物に結合
し、エクソン 5 1 のスキッピングを誘導（例えば、媒介）することにより DMD 転写物の
スプライシングパターンを変えることができる。一部の実施形態において、提供される D
MD オリゴヌクレオチドは、例えば、本明細書に記載されるとおりの 1 つ以上の好適な条
件下において同等の DMD オリゴヌクレオチドと比べて高い効率でエクソンのエクソンス
スキッピングを提供する。一部の実施形態において、提供されるスキッピング効率は、例え
ば、本明細書に記載されるとおりの 1 つ以上の好適な条件下において同等の DMD オリゴ
ヌクレオチドより少なくとも 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %
、8 0 %、9 0 %、1 0 0 %、1 1 0 %、1 2 0 %、1 3 0 %、1 4 0 %、1 5 0 %、1
6 0 %、1 7 0 %、1 8 0 %、1 9 0 % 高いか、又はその 2、3、4、5、6、7、8
、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、3 0、4
0、5 0 倍若しくはそれを超える。

30

40

【0 1 5 1】

一部の実施形態において、参照条件と比較して、提供されるキラル制御された DMD オリ
ゴヌクレオチド組成物は、意外にも有効である。一部の実施形態において、変化は、参照
条件と比較した望ましい mRNA レベルの増加によって測る。一部の実施形態において、
変化は、参照条件と比較した望ましくない mRNA レベルの低下によって測る。一部の実
施形態において、参照条件は、DMD オリゴヌクレオチド処理が存在しないことである。
一部の実施形態において、参照条件は、同じ塩基配列及び化学修飾を有する DMD オリゴ
ヌクレオチドのステレオランダムな組成物である。

【0 1 5 2】

50

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド組成物は、それがDMD転写物スプライシングシステム内のDMD転写物と接触されるとき、その組成物が存在しないこと、参照組成物が存在すること及びこ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に対してDMD転写物のスプライシングが変化される（例えば、エクソン51がスキップされる）ことを特徴とする。一部の実施形態において、望ましいスプライシング産物（例えば、エクソン51を欠失しているもの）が、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%若しくは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、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000倍又はそれを超えて増加する。一部の実施形態において、望ましいスプライシング参照は、参照条件下に存在しない（例えば、定量的PCRによって確実に検出することができない）。一部の実施形態において、本開示に例示されたとおり、提供される組成物におけるその複数のDMDオリゴヌクレオチド、例えばある複数のDMDオリゴヌクレオチドのレベルは予め決められている。

10

【0153】

一部の実施形態において、共通の塩基配列を有するDMDオリゴヌクレオチドは、同じパターンのヌクレオシド修飾、例えば糖修飾、塩基修飾等を有し得る。一部の実施形態において、ヌクレオシド修飾のパターンは、位置及び修飾の組み合わせによって表され得る。一部の実施形態において、非キラル結合（例えば、PO）は、すべて省略され得る。一部の実施形態において、同じ塩基配列を有するDMDオリゴヌクレオチドは、同じ化学構成を有する。

20

【0154】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド組成物は、キラル制御されている。

【0155】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド組成物は、ステレオランダムではなく、且つジアステレオマーのラセミ製剤ではない。

【0156】

当業者が理解するとおり、DMDオリゴヌクレオチドのステレオランダムな又はラセミ体の製剤は、典型的にはいかなるキラル補助基、キラル修飾試薬及び／又はキラル触媒も使用することなく、ヌクレオチド単量体の非立体選択的及び／又は低立体選択的カップリングにより調製される。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の（又はキラル制御されていない）製剤では、すべて又はほとんどのカップリングステップは、そのカップリングステップが亢進した立体選択性をもたらすように特別に行われない点でキラル制御されていない。DMDオリゴヌクレオチドの例示的な実質的にラセミ体の製剤は、当技術分野で周知の方法である、一般的に使用されるホスホロアミダイトDMDオリゴヌクレオチド合成からのテトラエチルチウラムジスルフィド又は（TETD）又は3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキシド（BDTD）のいずれかによる亜リン酸トリエステルの硫化を通じたホスホロチオエートDMDオリゴヌクレオチドの製剤である。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤は、実質的にラセミ体のDMDオリゴヌクレオチド組成物（又はキラル制御されていないDMDオリゴヌクレオチド組成物）を提供する。一部の実施形態において、ヌクレオチド単量体の少なくとも1つのカップリングは、約60:40、70:30、80:20、85:15、90:10、91:9、92:8、97:3、98:2又は99:1より低いジアステレオ選択性を有する。一部の実施形態において、各インターヌクレオチド結合は、独立に、約60:40、70:30、80:20、85:15、90:10、91:9、92:8、97:3、98:2又は99:1より低いジアステレオ選択性を有する。一部の実施形態において、ジアステレオ選択性は約60:40より低い。一部の実施形態において、ジアステレオ選択性は約70:30より低い。一部の実施形態において、ジアステレオ選択性は約80:20より低い。一部の実施形態において、ジア

30

40

50

ステレオ選択性は約 90 : 10 より低い。一部の実施形態において、ジアステレオ選択性は約 91 : 9 より低い。一部の実施形態において、少なくとも 1 個のインターヌクレオチド結合が約 90 : 10 より低いジアステレオ選択性を有する。一部の実施形態において、各インターヌクレオチド結合は、独立に、約 90 : 10 より低いジアステレオ選択性を有する。一部の実施形態において、キラル制御されていないインターヌクレオチド結合は、90 %、85 %、80 %、75 %、70 %、65 %、60 % 又は 55 % 以下のジアステレオマー純度を有する。一部の実施形態において、純度は 90 % 以下である。一部の実施形態において、純度は 85 % 以下である。一部の実施形態において、純度は 80 % 以下である。

【0157】

対照的に、キラル制御された DMD オリゴヌクレオチド組成物では、キラル制御された DMD オリゴヌクレオチド組成物の DMD オリゴヌクレオチドのものなど、少なくとも 1 つ及び典型的には各キラル制御されたインターヌクレオチド結合は、独立に、キラル結合リンに関して 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 又はそれを超えるジアステレオマー純度を有する。一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は 95 % 以上である。一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は 96 % 以上である。一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は 97 % 以上である。一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は 98 % 以上である。一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は 99 % 以上である。とりわけ、本開示の技術は、高いジアステレオマー純度のキラル制御されたインターヌクレオチド結合をルーチンで提供する。

【0158】

当業者が理解するとおり、カップリングのジアステレオ選択性又はインターヌクレオチド結合のジアステレオマー純度（ジアステレオ純度）は、同じ又は同等の条件下における二量体形成のジアステレオ選択性／形成された二量体のインターヌクレオチド結合のジアステレオマー純度によって評価することができ、ここで、二量体は同じ 5' - 及び 3' - ニュクレオシド及びインターヌクレオチド結合を有する。

【0159】

一部の実施形態において、本開示は、複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、複数のオリゴヌクレオチドは、

1) 共通の塩基配列、及び
2) 独立に 1 つ又は複数（例えば、約 1 ~ 50、1 ~ 40、1 ~ 30、1 ~ 25、1 ~ 20、1 ~ 15、1 ~ 10、5 ~ 50、5 ~ 40、5 ~ 30、5 ~ 25、5 ~ 20、5 ~ 15、5 ~ 10、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 又はそれを超える）のキラルインターヌクレオチド結合（「キラル制御されたインターヌクレオチド結合」）における同じ結合リン立体化学を共有する。

【0160】

一部の実施形態において、本開示は、複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、複数のオリゴヌクレオチドは、

1) 共通の塩基配列、及び
2) 独立に 1 つ又は複数（例えば、約 1 ~ 50、1 ~ 40、1 ~ 30、1 ~ 25、1 ~ 20、1 ~ 15、1 ~ 10、5 ~ 50、5 ~ 40、5 ~ 30、5 ~ 25、5 ~ 20、5 ~ 15、5 ~ 10、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 又はそれを超える）のキラルインターヌクレオチド結合（「キラル制御されたインターヌクレオチド結合」）における同じ結合リン立体化学を共有し；

組成物は、共通の塩基配列を共有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比

10

20

30

40

50

較して、複数のオリゴヌクレオチドについて濃縮されている。

【0161】

一部の実施形態において、すべてのインターヌクレオチド結合の少なくとも5%~100%（例えば、約10%~100%、20~100%、30%~100%、40%~100%、50%~80%、50%~85%、50%~90%、50%~95%、60%~80%、60%~85%、60%~90%、60%~95%、60%~100%、65%~80%、65%~85%、65%~90%、65%~95%、65%~100%、70%~80%、70%~85%、70%~90%、70%~95%、70%~100%、75%~80%、75%~85%、75%~90%、75%~95%、75%~100%、80%~85%、80%~90%、80%~95%、80%~100%、85%~90%、85%~95%、85%~100%、90%~95%、90%~100%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%など）は、キラル制御されている。一部の実施形態において、すべてのキラルインターヌクレオチド結合の少なくとも5%~100%（例えば、約10%~100%、20~100%、30%~100%、40%~100%、50%~80%、50%~85%、50%~90%、50%~95%、60%~80%、60%~85%、60%~90%、60%~95%、60%~100%、65%~80%、65%~85%、65%~90%、65%~95%、65%~100%、70%~80%、70%~85%、70%~90%、70%~95%、70%~100%、75%~80%、75%~85%、75%~90%、75%~95%、75%~100%、80%~85%、80%~90%、80%~95%、80%~100%、85%~90%、85%~95%、85%~100%、90%~95%、90%~100%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%など）は、キラル制御されている。一部の実施形態において、すべてのホスホロチオエートインターヌクレオチド結合の少なくとも5%~100%（例えば、約10%~100%、20~100%、30%~100%、40%~100%、50%~80%、50%~85%、50%~90%、50%~95%、60%~80%、60%~85%、60%~90%、60%~95%、60%~100%、65%~80%、65%~85%、65%~90%、65%~95%、65%~100%、70%~80%、70%~85%、70%~90%、70%~95%、70%~100%、75%~80%、75%~85%、75%~90%、75%~95%、75%~100%、80%~85%、80%~90%、80%~95%、80%~100%、85%~90%、85%~95%、85%~100%、90%~95%、90%~100%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%など）は、キラル制御されている。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも50%である。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも60%である。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも70%である。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも80%である。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも90%である。一部の実施形態において、各キラルインターヌクレオチド結合は、キラル制御されている。一部の実施形態において、各ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合は、キラル制御されている。

10

20

30

40

【0162】

一部の実施形態において、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、この組成物は、オリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比較して、オリゴヌクレオチド及び／又はその薬学的に許容可能な塩形態について濃縮されている。

【0163】

一部の実施形態において、組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約5%~100%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、

50

85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%は、複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、同じ塩基配列（例えば、共通の塩基配列）である組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約5%～100%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%は、複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、実質的にラセミ体の製剤と比較した濃縮は、組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約5%～100%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%が複数のオリゴヌクレオチドであることである。一部の実施形態において、実質的にラセミ体の製剤と比較した濃縮は、同じ塩基配列（例えば、共通塩基配列）である組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約5%～100%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%が複数のオリゴヌクレオチドであることである。一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチドの組成物を提供し、ここで、組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約5%～100%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%は、それぞれ独立に、その1つ又は複数の様々な形態（例えば、酸、塩基、様々な塩形態など）のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチドの組成物を提供し、ここで、組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約5%～100%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%は、それぞれ独立に、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチドの組成物を提供し、ここで、オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列である組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約5%～100%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%は、それぞれ独立に、その1つ又は複数の様々な形態（例えば、酸、塩基、様々な塩形態など）のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチドの組成物を提供し、ここで、オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列であり、且つオリゴヌクレオチドと同じ核酸塩基、糖及び／又はインターヌクレオチド結合修飾（存在する場合）のパターンである組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約5%～100%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%は、それぞれ独立に、その1つ又は複数の様々な形態（例えば、酸、塩基、様々な塩形態など）のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチドの組成物を提供し、ここで、オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列であり、且つオリゴヌクレオチドと同じ核酸塩基、糖及び／又はインターヌクレオチド結合修飾（存在する場合）のパターンである組成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約5%～100%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%は、それぞれ独立に、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドと1つ又は複数の特徴（例えば、上記）を共有する組

成物中のすべてのオリゴヌクレオチドの少なくとも約 5 % ~ 100 %、5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % は、オリゴヌクレオチドの 1 つ又は複数の薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、組成物は、オリゴヌクレオチドの 1 つのみの薬学的に許容可能な塩を含む。一部の実施形態において、組成物は、オリゴヌクレオチドの 2 つ以上の薬学的に許容可能な塩を含む。一部の実施形態において、組成物は、液体組成物であり、オリゴヌクレオチド及び／又はその 1 つ又は複数の塩形態は、溶解される。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも 50 % である。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも 60 % である。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも 70 % である。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも 80 % である。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも 90 % である。一部の実施形態において、パーセンテージは、少なくとも 95 % である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、表 A 1 の配列であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1 つ又は複数の天然リン酸結合、1 つ又は複数のホスホロチオエートインターヌクレオチド結合及び 1 つ又は複数の中性インターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、表 A 1 に記載されるオリゴヌクレオチドであり、ここで、各キラルオリゴヌクレオチドは、独立に、R p 又は S p である。

10

【0164】

一部の実施形態において、本開示は、

20

- 1) 共通の塩基配列；
- 2) 共通の骨格結合のパターン；及び
- 3) 共通の骨格キラル中心のパターン

を有することによって定義される複数の DMD オリゴヌクレオチドを含むキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）DMD オリゴヌクレオチド組成物を提供し、この組成物は、組成物中の DMD オリゴヌクレオチドの少なくとも約 10 % が共通の塩基配列及び長さ、共通の骨格結合のパターン並びに共通の骨格キラル中心のパターンを有する点で単一の DMD オリゴヌクレオチドの実質的に純粋な製剤であり、ここで、オリゴヌクレオチドは、本明細書（例えば、表 A 1）において提供される。

【0165】

30

一部の実施形態において、本開示は、複数の DMD オリゴヌクレオチドのキラル制御された DMD オリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、この組成物は、同じ DMD オリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比べて、単一の DMD オリゴヌクレオチドタイプの DMD オリゴヌクレオチドが強化されている。一部の実施形態において、本開示は、複数の DMD オリゴヌクレオチドのキラル制御された DMD オリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、この組成物は、同じ DMD オリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比べて、

40

- 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単一の DMD オリゴヌクレオチドタイプの DMD オリゴヌクレオチドが強化されており、ここで、オリゴヌクレオチドは、本明細書（例えば、表 A 1）において提供される。

【0166】

一部の実施形態において、本開示は、

- 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

50

によって定義される特定のDMDオリゴヌクレオチドタイプの複数のDMDオリゴヌクレオチドを含むキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、この組成物は、同じ塩基配列及び長さを有するDMDオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比べて特定のDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドが強化されており、ここで、オリゴヌクレオチドは、本明細書（例えば、表A1）において提供される。

【0167】

一部の実施形態において、あるDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドは、共通の骨格リン修飾のパターン及び共通の糖修飾パターンを有する。一部の実施形態において、あるDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドは、共通の骨格リン修飾のパターン及び共通の塩基修飾パターンを有する。一部の実施形態において、あるDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドは、共通の骨格リン修飾のパターン及び共通のヌクレオシド修飾パターンを有する。一部の実施形態において、特定のタイプのDMDオリゴヌクレオチドは同じ化学構成を有する。一部の実施形態において、あるDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドは同一である。

10

【0168】

一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物は、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプではない組成物中のDMDオリゴヌクレオチドが、前記DMDオリゴヌクレオチドタイプの調製過程からの、ある場合には特定の精製手順後の不純物である点で、DMDオリゴヌクレオチドタイプの実質的に純粋な製剤である。

20

【0169】

一部の実施形態において、組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%が、共通の塩基配列、共通の骨格結合のパターン及び共通の骨格キラル中心のパターンを有する。

【0170】

一部の実施形態において、共通の塩基配列、共通の骨格結合のパターン及び共通の骨格キラル中心のパターンを有するDMDオリゴヌクレオチドは、共通の骨格リン修飾のパターンを有する。一部の実施形態において、共通の塩基配列、共通の骨格結合のパターン及び共通の骨格キラル中心のパターンを有するDMDオリゴヌクレオチドは、共通の骨格リン修飾のパターン及び共通のヌクレオシド修飾パターンを有する。一部の実施形態において、共通の塩基配列、共通の骨格結合のパターン及び共通の骨格キラル中心のパターンを有するDMDオリゴヌクレオチドは、共通の骨格リン修飾のパターン及び共通の糖修飾パターンを有する。一部の実施形態において、共通の塩基配列、共通の骨格結合のパターン及び共通の骨格キラル中心のパターンを有するDMDオリゴヌクレオチドは、共通の骨格リン修飾のパターン及び共通の塩基修飾パターンを有する。一部の実施形態において、共通の塩基配列、共通の骨格結合のパターン及び共通の骨格キラル中心のパターンを有するDMDオリゴヌクレオチドは同一である。

30

【0171】

一部の実施形態において、あるDMDオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物の純度は、組成物中にあるそのDMDオリゴヌクレオチドタイプであるDMDオリゴヌクレオチドのパーセンテージとして表される。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約10%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約20%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約30%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約40%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである

40

50

。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約50%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約60%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約70%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約80%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約90%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約92%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約94%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約95%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約96%が同じDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約97%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約98%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物中のDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも約99%が、そのDMDオリゴヌクレオチドタイプである。

10

20

30

40

50

【0172】

一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物の純度は、その調製過程における各カップリングステップの立体選択性によって制御することができる。一部の実施形態において、カップリングステップは60%の立体選択性（例えば、ジアステレオ選択性）を有する（そのカップリングステップから形成される新規インターヌクレオチド結合の60%が、意図した立体化学を有する）。かかるカップリングステップの後、形成される新規インターヌクレオチド結合は、60%純度を有すると言うことができる。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも60%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも70%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも80%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも85%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも90%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも91%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも92%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも93%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも94%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも95%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも96%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも97%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも98%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも99%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは少なくとも99.5%の立体選択性を有する。一部の実施形態において、各カップリングステップは事実上100%の立体選択性を有する。

【0173】

一部の実施形態では、提供される組成物において、特定のDMDオリゴヌクレオチドタイプ（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）の塩基配列を有するDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、97%又は99%が、その特定のDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、特定のDMDオリゴヌクレオチドタイプの塩基配列、骨格結合のパターン及び骨格リン修飾のパターンを有するDMDオリゴヌクレオチドの少なくとも0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、97%又は99%が、その特定のDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドである。

10

【0174】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは1つ以上のキラルな修飾リン酸結合を含む。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、1つ以上の修飾骨格結合、塩基及び／又は糖を含むDMDオリゴヌクレオチドのものである。

20

【0175】

一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約80%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約85%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約90%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約91%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約92%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約93%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約94%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約95%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約96%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約97%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約98%より高い立体化学純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された（及び／又は立体化学的に純粋な）製剤は、約99%より高い立体化学純度である。

30

40

【0176】

一部の実施形態において、1つ以上とは、1である。一部の実施形態において、1つ以上とは、2である。一部の実施形態において、1つ以上とは、3である。一部の実施形態において、1つ以上とは、4である。一部の実施形態において、1つ以上とは、5である。一部の実施形態において、1つ以上とは、6である。一部の実施形態において、1つ以上とは、7である。一部の実施形態において、1つ以上とは、8である。一部の実施形態において、1つ以上とは、9である。一部の実施形態において、1つ以上とは、10である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少なくとも1である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少なくとも2である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少な

50

くとも3である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少なくとも4である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少なくとも5である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少なくとも6である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少なくとも7である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少なくとも8である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少なくとも9である。一部の実施形態において、1つ以上とは、少なくとも10である。

【0177】

一部の実施形態において、塩基配列、例えば複数のDMDオリゴヌクレオチドの共通の塩基配列、特定のDMDオリゴヌクレオチドタイプの塩基配列等は、遺伝子又はDMD転写物（例えば、ジストロフィン又はDMDの）に相補的な配列を含むか又はそれである。一部の実施形態において、共通の塩基配列は、遺伝子に100%相補的な配列を含むか又はそれである。

10

【0178】

一部の実施形態において、キラルインターヌクレオチド結合の結合リンは、キラル制御されている。一部の実施形態において、キラルインターヌクレオチド結合はホスホロチオエートインターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、提供される組成物のDMDオリゴヌクレオチド中の各キラルインターヌクレオチド結合はホスホロチオエートインターヌクレオチド結合である。

【0179】

当業者が理解するとおり、インターヌクレオチド結合、天然リン酸結合、ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合等は、その環境のpHに応じてその塩形態で存在し得る。特に指示されない限り、かかるインターヌクレオチド結合が言及されるとき、かかる塩形態が本願に包含される。

20

【0180】

一部の実施形態において、本開示のDMDオリゴヌクレオチドは1つ以上の修飾糖部分を含む。一部の実施形態において、本開示のDMDオリゴヌクレオチドは1つ以上の修飾塩基部分を含む。当業者に公知であり、且つ本開示に記載されるとおり、糖及び塩基部分に様々な修飾を導入することができる。例えば、一部の実施形態において、修飾は、米国特許第9006198号、国際公開第2014/012081号、国際公開第2015/107425号及び国際公開第2017/062862号（これらの各々の糖及び塩基修飾は、参照により本明細書に援用される）に記載される修飾である。

30

【0181】

本開示において本明細書で使用される場合、文脈から他の解釈が明らかでない限り、(i)「1つの(a)」又は「1つの(an)」という語は、「少なくとも1つ」を意味すると理解され得；(ii)「又は」という語は、「及び／又は」を意味すると理解され得；(iii)「含んでいる」、「含む」、「包含している」（「限定されない」で使用されるかどうかに関わらず）及び「包含する」（「限定されない」で使用されるかどうかに関わらず）という語は、単独で又は1つ若しくは複数の追加の構成要素若しくはステップと一緒に提示されるかに関わらず、項目別の構成要素又はステップを包含すると理解され得；(iv)「別の」という語は、少なくとも追加の／第2の1つ又は複数の意味すると理解され得；(v)「約」及び「ほぼ」という語は、当業者によって理解されるであろう標準的なばらつきを許容すると理解され得；及び(vi)範囲が指定されている場合、エンドポイントが含まれる。

40

【0182】

特に記載がない限り、オリゴヌクレオチド及びその要素（例えば、塩基配列、糖修飾、インターヌクレオチド結合、結合リン立体化学、それらのパターンなど）の説明は、5'から3'である。当業者が理解するように、一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、塩形態、特に薬学的に許容可能な塩形態、例えばナトリウム塩として提供及び／又は利用することができる。また、当業者が理解するように、一部の実施形態において、組成物内の個々のオリゴヌクレオチドは、たとえそのような組成物（例えば、液体組成物）内

50

において、特定のそのようなオリゴヌクレオチドが特定の瞬間に異なる塩形態である可能性がある（且つ例えば液体組成物中で溶解され得、オリゴヌクレオチド鎖がアニオン形態で存在し得る）としても、同じ構成及び／又は構造であると思なすことができる。例えば、当業者は、所与の pH において、オリゴヌクレオチド鎖に沿った個々のインターヌクレオチド結合が酸（H）形態又は複数の可能な塩形態（例えば、いずれのイオンが製剤又は組成物に存在する可能性があるかに応じてナトリウム塩又は異なるカチオンの塩）の 1 つであり得ることを理解し、且つそれらの酸形態（例えば、存在する場合、すべてのカチオンを H⁺ で置き換える）が同じ構成及び／又は構造である限り、そのような個々のオリゴヌクレオチドが同じ構成及び／又は構造であると適切に見なされ得ることを理解するであろう。

10

【0183】

一部の実施形態において、提供される技術で利用することができる核酸塩基、糖及びインターヌクレオチド結合などは、米国特許第 9 6 9 5 2 1 1 号、同第 9 6 0 5 0 1 9 号、同第 9 5 9 8 4 5 8 号、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 8 6 1 2 号、同第 2 0 1 5 0 2 1 1 0 0 6 号、同第 2 0 1 7 0 0 3 7 3 9 9 号、国際公開第 2 0 1 7 / 0 1 5 5 5 5 号、同第 2 0 1 7 / 0 6 2 8 6 2 号、同第 2 0 1 7 / 1 6 0 7 4 1 号、同第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 6 4 号、同第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 7 9 号、同第 2 0 1 7 / 2 1 0 6 4 7 号、同第 2 0 1 8 / 2 2 3 0 5 6 号、同第 2 0 1 8 / 2 3 7 1 9 4 号、同第 2 0 1 9 / 0 5 5 9 5 1 号、同第 2 0 1 9 / 2 0 0 1 8 5 号及び／又は同第 2 0 1 9 / 2 1 7 7 8 4 号に記載されており、これらのそれぞれの核酸塩基、糖及びインターヌクレオチド結合は、独立に、参照により本明細書に援用される。一部の実施形態において、様々な有用な技術（例えば、核酸塩基、糖、インターヌクレオチド結合、立体化学及びそれらのパターン、塩基配列、オリゴヌクレオチド、組成物、方法など）は、米国特許出願第 6 2 / 7 7 6 , 4 3 2 号、国際公開第 2 0 1 9 / 2 0 0 1 8 5 号及び同第 2 0 1 9 / 2 1 7 7 8 4 号に記載されており、これらのそれぞれは、独立に、参照により本明細書に援用される。

20

【0184】

ジストロフィン

一部の実施形態において、本開示は、ジストロフィン（DMD）遺伝子又はそれによってコードされる産物（DMD 転写物、タンパク質（例えば、ジストロフィンタンパク質の様々な変異体）等）に関する技術、例えば DMD オリゴヌクレオチド、組成物、方法等を提供する。

30

【0185】

一部の実施形態において、本開示は、限定はされないが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD とも略される）及びベッカー型筋ジストロフィー（BMD）を含めた筋ジストロフィーの治療のための、DMD オリゴヌクレオチド並びにその組成物及び使用方法を含む技術を提供する。一部の実施形態において、DMD は 1 つ以上の突然変異を含む。一部の実施形態において、かかる突然変異は、筋ジストロフィーに罹患している又はそれに罹り易い対象におけるジストロフィンタンパク質の生物学的機能の低下に関連する。

【0186】

一部の実施形態において、ジストロフィン（DMD）遺伝子又はその産物又はその変異体若しくは一部分は、DMD、BMD、CMD3B、DXS142、DXS164、DXS206、DXS230、DXS239、DXS268、DXS269、DXS270、DXS272、MRX85 又はジストロフィン；外部 ID：OMIM：300377MGI：94909；HomoloGene：20856；GeneCards：DMD；ヒトにおいて：Entrez：1756；Ensembl：ENSG00000198947；UniProt：P11532；RefSeq（mRNA）：NM_000109；NM_004006；NM_004007；NM_004009；NM_004010；RefSeq（タンパク質）：NP_000100；NP_003997；NP_004000；NP_004001；NP_004002；位置（UCSC）：Chr X：31.1-33.34Mb；マウスにおいて：Entrez：13405；Ensembl：ENSMUSG00000045103；UniProt

40

50

： P 1 1 5 3 1 ; RefSeq (m R N A) : N M _ 0 0 7 8 6 8 ; N M _ 0 0 1 3 1 4 0 3 4 ; N M _ 0 0 1 3 1 4 0 3 5 ; N M _ 0 0 1 3 1 4 0 3 6 ; N M _ 0 0 1 3 1 4 0 3 7 ; RefSeq (タンパク質) : N P _ 0 0 1 3 0 0 9 6 3 ; N P _ 0 0 1 3 0 0 9 6 4 ; N P _ 0 0 1 3 0 0 9 6 5 ; N P _ 0 0 1 3 0 0 9 6 6 ; N P _ 0 0 1 3 0 0 9 6 7 ; 位置 (UCSC) : C h r X : 8 2 . 9 5 - 8 5 . 2 1 M b と称されることもある。

【 0 1 8 7 】

DMD 遺伝子は、報告によれば、X 染色体上の遺伝子スペースの 2 3 0 万 b p にわたって分布する 7 9 エクソンを含有する。しかしながら、タンパク質への翻訳に使用されるのは (コード配列)、約 1 4 , 0 0 0 b p のみ (1 % 未満) であることが報告されている。2 3 0 万 b p の当初のヘテロ核 RNA DMD 転写物から、その遺伝子配列の約 9 9 . 5 % であるイントロン配列がスプライシングにより除去されて、ジストロフィンタンパク質産生の鍵となるあらゆる情報を含む成熟 1 4 , 0 0 0 b p m R N A が提供されることが報告されている。一部の実施形態において、DMD 患者はこの DMD 遺伝子に、野生型 DMD m R N A の適切な構築及び／又は野生型ジストロフィンタンパク質の産生を妨げる 1 つ又は複数の突然変異を有し、DMD 患者は、その筋肉に顕著なジストロフィン欠損を示すことが多い。

【 0 1 8 8 】

一部の実施形態において、ジストロフィン DMD 転写物、例えば m R N A 又はタンパク質は、選択的スプライシングに関係する又はそれから産生されるものを包含する。例えば、骨格筋、脳及び心臓組織における DMD 遺伝子のスプライシングパターンの分析後、ジストロフィン遺伝子の 1 6 の選択的 DMD 転写物が報告された。Sironi et al. 2002 FEBS Letters 517: 163-166。

【 0 1 8 9 】

ジストロフィンには幾つかのアイソフォームがあることが報告される。一部の実施形態において、ジストロフィンとは、特定のアイソフォームを参照する。各々組織特異的プロモーターによって制御される、少なくとも 3 つの完全長ジストロフィンアイソフォームが報告されている。Klamut et al. 1990 Mol. Cell. Biol. 10: 193-205 ; Nudel et al. 1989 Nature 337: 76-78 ; Gorecki et al. 1992 Hum. Mol. Genet. 1: 505-510。筋肉アイソフォームは、報告によれば主に骨格筋に発現するが、平滑筋及び心筋にも発現し [Bies, R.D., Phelps, S.F., Cortez, M.D., Roberts, R., Caskey, C.T. and Chamberlain, J.S. 1992 Nucleic Acids Res. 20: 1725-1731]、脳ジストロフィンは、報告によれば皮質ニューロンに特異的であるが、心臓及び小脳ニューロンにも検出することができ、一方、プルキンエ細胞型は、報告によれば、ほぼすべての小脳ジストロフィンを占める [Gorecki et al. 1992 Hum. Mol. Genet. 1: 505-510]。選択的スプライシングは、報告によれば、ジストロフィン多様化手段を提供する：報告によれば、この遺伝子の 3 ' 領域が選択的スプライシングを受けると、脳ニューロン、心臓プルキンエ線維及び平滑筋細胞に組織特異的 DMD 転写物が生じ [Bies et al. 1992 Nucleic Acids Res. 20: 1725-1731 ; 及び Feener et al. 1989 Nature 338: 509-511]、一方で骨格筋ではこの遺伝子の 5 ' 領域に 1 2 パターンの選択的スプライシングが報告されている [Surono et al. 1997 Biochem. Biophys. Res. Commun. 239: 895-899]。

【 0 1 9 0 】

一部の実施形態において、ジストロフィン m R N A、遺伝子又はタンパク質は、復帰突然変異体バージョンである。とりわけ、復帰突然変異体ジストロフィンについては、例えば： Hoffman et al. 1990 J. Neurol. Sci. 99:9-25 ; Klein et al. 1992 Am. J. Hum. Genet. 50: 950-959 ; 及び Chelly et al. 1990 Cell 63: 1239-1348 ; Arahata et al. 1998 Nature 333: 861-863 ; Bonilla et al. 1988 Cell 54: 447-452 ; Fanin et al. 1992 Neur. Disord. 2: 41-45 ; Nicholson et al. 1989 J. Neurol. Sci. 94: 137-146 ; Shimizu et al. 1988 Proc. Jpn. Acad. Sci. 64: 205-208 ; Sicinzi et al. 1989 Science 244: 1578-1580 ; 及び Sherratt

10

20

30

40

50

et al. Am. J. Hum. Genet. 53: 1007-1015に報告された。

【0191】

本明細書で引用されるすべての文献は、存在する場合、補足データを含む。

【0192】

DMD遺伝子における様々な突然変異は、エクソン51における一部のものを含む筋ジストロフィーを引き起こし得るものであり、及び／又は引き起こすことが報告された。

【0193】

筋ジストロフィー

本明細書に記載される1つ以上のDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物は、筋ジストロフィー又はその少なくとも1つの症状を治療するか、又はその発症を遅延させるために使用することができる。一部の実施形態において、筋ジストロフィー（MD）は、時間と共に骨格筋の（進行性）脱力及び破壊を生じる一群の筋病態、疾患又は障害の任意のものである。こうした病態、疾患又は障害は、主にいずれの筋肉が冒されるか、症状が現れたときの脱力の程度及び症状が悪化する速さの点で異なる。多くのMD患者は、最終的には歩行困難になる。多くの場合、筋ジストロフィーは致死性である。型によっては、中枢神経系を含めた他の器官の障害も伴う。一部の実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）である。

【0194】

一部の実施形態において、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの症状は、報告によると、筋消耗を伴う筋脱力であり、随意筋、特に、股関節、骨盤領域、大腿、肩及びふくらはぎの随意筋が最初に冒される。筋脱力は、報告によると、後に腕、頸部及び他の領域にも起こり得る。報告によると、ふくらはぎが肥大することが多い。症状は、報告によると、通常、6歳までに現れ、乳児期早期に現れ得る。他の身体症状は、報告によると、ぎこちない歩き方、足の踏み出し方又は走り方（ある場合には、患者は、腓筋の筋緊張が増加するため、その前足部で歩行する傾向がある）、頻繁な転倒、疲労、運動技能（例えば、走る、跳ぶ、飛び越える）の障害、股関節屈筋の短縮につながる可能性のある腰椎脊柱前弯過度、全体的姿勢及び／又は歩き方、足の踏み出し方又は走り方の異常、アキレス腱及び膝腱の筋拘縮が機能を損なう、進行性の歩行困難、筋線維の変形、舌及び腓筋の仮性肥大（腫大）、脳内ジストロフィンの消失又は機能不全の結果であると考えられている神経行動障害（例えば、ADHD）、学習障害（例えば、失読症）及び特定の認知技能（例えば、短期言語記憶）の非進行性の低下のリスク上昇、最終的な歩行能力の喪失（通常は12歳までに喪失）、骨格変形（ある場合には脊柱側弯症を含む）及び臥位又は座位からの起立困難である。

【0195】

一部の実施形態において、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）は、報告によると、短くなった、しかしインフレームであるDMD転写物を生じる結果、トランケートされているが部分的には機能性の1つ又は複数のタンパク質の産生をもたらす突然変異によって引き起こされる。かかる部分的に機能性の1つ又は複数のタンパク質は、決定的に重要なアミノ末端、システインリッチ及びC末端ドメインを保持しているが、通常、機能的意義が低いと報告される中心桿状ドメインのエLEMENTを欠いていることが報告された。England et al. 1990 Nature, 343, 180-182。

【0196】

一部の実施形態において、BMD表現型の範囲は、突然変異の詳細及びジストロフィンの産生レベルに応じて軽度DMDから事実上無症候にまで及ぶ。Yin et al. 2008 Hum. Mol. Genet. 17: 3909-3918。

【0197】

一部の実施形態において、アウトオブフレーム突然変異を有するジストロフィー患者は、概して、重症度の高いデュシェンヌ型筋ジストロフィーと診断され、インフレーム突然変異を有するジストロフィー患者は、概して、重症度の低いベッカー型筋ジストロフィーと

10

20

30

40

50

診断される。しかしながら、インフレーション欠失を有する患者の少数は、エクソン47～51、48～51及び49～53の欠失など、ヒンジ領域の一部をコードするエクソン50又は51を始端又は終端とする欠失突然変異を有する患者を含め、デュシェンヌ型筋ジストロフィーと診断される。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、同じエクソン欠失が存在するにも関わらず疾患重症度に患者間変動がある点が、報告によれば、mRNAスプライシング効率及び／又はパターン；ゲノム再配列後の翻訳又はDMD転写効率；及びトランケート型タンパク質構造の安定性又は機能に及ぼす具体的な欠失区切り点の効果に関係し得ることを指摘しておく。Yokota et al. 2009 Arch. Neurol. 66: 32.

【0198】

筋ジストロフィーの治療としてのエクソンスキッピング

一部の実施形態において、筋ジストロフィーの治療は、ジストロフィン（DMD）エクソン51のスキッピングを媒介する能力を有するDMDオリゴヌクレオチドの使用を含む。一部の実施形態において、本開示は、筋ジストロフィーを治療する方法を提供し、この方法は、それに罹患している又はそれに罹り易い対象に、DMDオリゴヌクレオチド又はDMD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。特に、とりわけ、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド／キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物が、予想外にも、他の点で同一の、しかしキラル制御されていないDMDオリゴヌクレオチド／オリゴヌクレオチド組成物と比較してエクソンスキッピングの調節に有効であることを実証する。一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドへの1つ以上の非負電荷インターヌクレオチド結合の取込みが送達及び／又は全体的なエクソンスキッピング効率を大きく改良し得ることを実証する。

【0199】

一部の実施形態において、筋ジストロフィーの治療は、DMDオリゴヌクレオチドの使用を利用し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する（例えば、指図する）能力を有する。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、突然変異（例えば、フレームシフト、挿入、欠失、ミスセンス若しくはナンセンス突然変異又は他の突然変異）を含むエクソンのスキッピングを媒介する能力を有し、ここで、エクソンがスキップされたmRNAの翻訳により、トランケートされているが機能性の（又はほぼ機能性の）DMDタンパク質が生じる。

【0200】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドを含む組成物は、中枢神経系のジストロフィン関連障害の治療に有用である。一部の実施形態において、本開示は、中枢神経系のジストロフィン関連障害を治療する方法に関し、ここで、この方法は、中枢神経系のジストロフィン関連障害に罹患している患者に治療有効量のDMDオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、中枢神経系のジストロフィン関連障害に罹患している患者に対して中枢神経系外（非限定的な例として、静脈内又は筋肉内）に投与され、このDMDオリゴヌクレオチドは、血液脳関門を通過して中枢神経系に入り込む能力を有する。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは中枢神経系に直接（非限定的な例として、髄腔内、脳室内、頭蓋内等の送達により）投与される。

【0201】

一部の実施形態において、中枢神経系のジストロフィン関連障害又はその症状は、知能低下、長期記憶低下、短期記憶低下、言語機能障害、てんかん、自閉症スペクトラム障害、注意欠陥多動障害（ADHD）、強迫性障害、学習障害、行動障害、脳容積の低下、灰白質容積の低下、低い白質異方性度、高い白質半径方向拡散率、頭蓋形状の異常又は海馬、淡蒼球、尾状核被殻、視床下部、前交連、中脳水道周囲灰白質、内包、扁桃、脳梁、中隔核、側坐核、海馬采、脳室若しくは中脳視床の容積若しくは構造の有害な変化のいずれか1つ以上であり得る。一部の実施形態では、筋ジストロフィーの筋肉関連症状を呈する患者が、中枢神経系のジストロフィン関連障害の症状も呈する。

10

20

30

40

50

【0202】

一部の実施形態において、中枢神経系のジストロフィン関連障害は、完全長ジストロフィン又は限定はされないが、Dp260、Dp140、Dp116、Dp71又はDp40を含めたジストロフィンの小型アイソフォームなど、ジストロフィン遺伝子の遺伝子産物のレベル、活性、発現及び／又は分布の異常に関係し、それを伴い、及び／又はそれによって引き起こされる。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、中枢神経系のジストロフィン関連障害の1つ以上のシステムの改善のために、筋ジストロフィー患者の中枢神経系に投与される。一部の実施形態において、中枢神経系のジストロフィン関連障害は、完全長ジストロフィン又は限定はされないが、Dp260、Dp140、Dp116、Dp71又はDp40を含めたジストロフィンの小型アイソフォームなど、ジストロフィン遺伝子の遺伝子産物のレベル、活性、発現及び／又は分布の異常に関係し、それを伴い、及び／又はそれによって引き起こされる。一部の実施形態において、中枢神経系のジストロフィン関連障害に罹患している患者にDMDオリゴヌクレオチドを投与することにより、ジストロフィン遺伝子の遺伝子産物のレベル、活性及び／又は発現が増加し、及び／又は分布が改良される。

10

【0203】

一部の実施形態において、本開示は、ジストロフィンプレmRNAスプライシングを調節する技術であって、それによってエクソン51が切り出されて突然変異が除去される技術を提供する。

【0204】

一部の実施形態において、DMD患者では、DMD遺伝子は、突然変異を含むエクソンを含み、この障害は、少なくとも部分的にDMDエクソン51のスキッピングにより治療される。

20

【0205】

一部の実施形態において、DMD患者では、DMD遺伝子又はDMD転写物が1つ又は複数のエクソンに突然変異を有し、この突然変異は、ミスセンス又はナンセンス突然変異及び／又は欠失、挿入、逆位、転座若しくは重複である。

【0206】

一部の実施形態において、筋ジストロフィーの治療では、DMDのエクソン（例えば、エクソン51）がスキップされ、ここで、このエクソンは、DMDタンパク質機能に必須でない一連のアミノ酸をコードするか、又はそのスキッピングは、完全に又は少なくとも部分的に機能性のDMDタンパク質をもたらし得る。

30

【0207】

一部の実施形態において、筋ジストロフィーの治療では、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、それにより作り出されるmRNAは、人工的な内部ランケット型DMDタンパク質変異体に翻訳され得るものであり、それは、少なくとも部分的に改良された又は完全に回復した生物学的活性をもたらす。

【0208】

一部の実施形態において、エクソン51がスキップされたジストロフィンDMD転写物から産生される内部ランケット型DMDタンパク質変異体は、アウトオブフレーム欠失を有するジストロフィンDMD転写物から産生される末端ランケット型DMDタンパク質と比べて機能性が高い。

40

【0209】

一部の実施形態において、エクソン51がスキップされたジストロフィンDMD転写物から産生される内部ランケット型DMDタンパク質変異体は、例えば、アウトオブフレーム欠失を有するジストロフィンDMD転写物から産生される末端ランケット型DMDタンパク質を分解し得るナンセンス変異依存分解機構に対する耐性が高い。

【0210】

一部の実施形態において、筋ジストロフィーの治療は、DMDオリゴヌクレオチドの利用し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを

50

媒介する能力を有する。

【0211】

一部の実施形態において、本開示は、エクソンスキッピング戦略の設計にDMD突然変異の性質及び位置を利用し得るという認識を包含する。一部の実施形態において、DMD患者がエクソンに突然変異を有する場合、その突然変異エクソンのスキッピングにより、内部的にトランケートされた（内部的に短くなった）が、少なくとも部分的に機能性のDMDタンパク質変異体が産生され得る。

【0212】

一部の実施形態において、DMD患者は、例えば、スプライシングに必要な部位を不活性化することによるか、又は潜在部位を活性化し、そのためそれがスプライシングに際して活性になることによるか、又は代替的な（例えば、非天然の）スプライス部位を作り出すことによってDMD転写物のスプライシングを変化させる突然変異を有する。一部の実施形態において、かかる突然変異は、低活性又は不活性のタンパク質の産生を引き起こす。一部の実施形態において、スプライシング調節、例えばエクソンスキッピング、かかる突然変異の抑制等を用いると、例えば適切なスプライシングの回復による活性が回復したタンパク質の産生又は活性が改良された若しくは回復した内部トランケート型ジストロフィンタンパク質変異体の産生等により、かかる突然変異の効果を除去又は低減することができる。

【0213】

一部の実施形態において、リーディングフレームを回復させると、アウトオブフレーム突然変異をインフレーム突然変異に変換することができる；一部の実施形態において、ヒトでは、かかる変化により、重度のデュシェンヌ型筋ジストロフィーをより軽度のベッカー型筋ジストロフィーに変えることができる。

【0214】

一部の実施形態において、DMD患者又はDMDを有する疑いがある患者は、DMDオリゴヌクレオチドを含む組成物の投与前にDMD遺伝子型に関して分析される。

【0215】

一部の実施形態において、DMD患者又はDMDを有する疑いがある患者は、DMDオリゴヌクレオチドを含む組成物の投与前にDMD表現型に関して分析される。

【0216】

一部の実施形態において、DMD患者は、DMDオリゴヌクレオチドを含む組成物の投与前にDMD遺伝子型及びDMD表現型の関係を決定するため遺伝子型及び表現型に関して分析される。

【0217】

一部の実施形態において、患者は、DMDオリゴヌクレオチドを含む組成物の投与前にジストロフィーを有することが遺伝的に確認される。

【0218】

一部の実施形態において、DMD遺伝子型の分析又はDMD若しくは患者の遺伝的確認は、患者がDMDに1つ以上の有害な突然変異を有するかどうかを決定することを含む。

【0219】

一部の実施形態において、DMD遺伝子型の分析又はDMD若しくは患者の遺伝的確認は、患者がDMDに1つ以上の有害な突然変異を有するかどうかを決定すること、及び／又はDMDスプライシングを分析すること、及び／又はDMDのスプライス変異体を検出することを含み、ここで、スプライス変異体は、異常なDMDスプライシングによって産生される。

【0220】

一部の実施形態において、DMD遺伝子型の分析又はDMDの遺伝的確認は、治療に有用なDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物の選択に関する情報を与える。

【0221】

一部の実施形態では、異常な又は突然変異体のDMD遺伝子又はその一部分が患者又は患

10

20

30

40

50

者の1つ又は複数の細胞又は1つ又は複数の組織から除去又はコピーされ、異常な若しくは突然変異体のDMD遺伝子又は異常若しくは突然変異を含むその一部分若しくはそのコピーが細胞に挿入される。一部の実施形態では、この細胞を使用して、DMDオリゴヌクレオチドを含む様々な組成物を試験することにより、かかる組成物が患者にとって治療として有用となり得るかどうかを予測することができる。一部の実施形態において、細胞は筋芽細胞又は筋細管である。

【0222】

一部の実施形態において、個体又は患者は、DMDオリゴヌクレオチドによる治療前、DMDの1つ以上のスプライス変異体を産生し得、多くの場合に各変異体が極めて低レベルで産生される。一部の実施形態では、任意の適切な方法を用いることにより、DMDオリゴヌクレオチドの投与前、投与中又は投与後に患者において低レベルのスプライス変異体が産生されていることを検出し得る。

10

【0223】

一部の実施形態において、患者及び／又はその組織は、DMDオリゴヌクレオチドを含む組成物の投与前に、DMD遺伝子の様々なスプライシング変異体の産生に関して分析される。

【0224】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド（例えば、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有するDMDオリゴヌクレオチド）の設計方法を提供する。一部の実施形態において、本開示は本明細書に記載される合理的設計及び任意選択でシーケンスウォークを利用して、例えば1つ以上のアッセイ及び／又は条件におけるエクソンスキッピングの試験のためのDMDオリゴヌクレオチドを設計する。一部の実施形態では、所与の生体システムの様々な情報を用いることを含め、合理的設計後に効果的なDMDオリゴヌクレオチドが開発される。

20

【0225】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドの開発方法では、DMDオリゴヌクレオチドは、1つ以上の潜在的なスプライシング関連モチーフにアニールするように設計され、次にエクソンスキッピングを媒介するその能力が試験される。

【0226】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物を評価する例示的技術

30

本開示において、DMDオリゴヌクレオチドの特性及び／又は活性の評価には、例えば、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/015575号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号等、様々な技術を利用することができる。

【0227】

例えば、DMDオリゴヌクレオチドは、エクソンスキッピングを媒介するその能力に関して、本開示に係るインビトロ及びインビボアッセイを含めた様々なアッセイで判定することができる。インビトロアッセイは、限定はされないが、Δ48-50患者由来筋芽細胞を含め、本明細書に記載される又は当技術分野において公知の様々な試験細胞で実施することができる。インビボ試験は、限定はされないが、マウス、ラット、ネコ、ブタ、イヌ、サル又は非ヒト霊長類を含め、本明細書に記載される又は当技術分野において公知の試験動物で実施することができる。

40

【0228】

非限定的な例として、DMDオリゴヌクレオチドの特性／活性を評価するための幾つものアッセイを以下に記載する。様々な他の好適なアッセイが利用可能であり、エクソンスキッピング用に設計されるのでないDMDオリゴヌクレオチドのものを含め、DMDオリゴヌクレオチド特性／活性の評価に利用し得る（例えば、標的DMD転写物レベルの低下にRNアーゼHが関わり得るDMDオリゴヌクレオチドについては、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/

50

015575号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号等に記載されるアッセイ)。

【0229】

DMDオリゴヌクレオチドは、エクソン51のスキッピングを媒介するその能力に関してジストロフィンRNAで判定することができ、これは、非限定的な例として、ネステッドPCR、qRT-PCR及び／又はシーケンシングを用いて試験することができる。

【0230】

DMDオリゴヌクレオチドは、タンパク質の回復（例えば、スキップされたエクソンにコードされるコドンに対応するアミノ酸を欠く内部ランケート型ジストロフィンタンパク質変異体の産生、これは、エクソンスキッピング前に産生されるタンパク質（存在する場合）と比較して改良された機能を有する）を媒介するその能力に関して判定することができ、これは、ウエスタンブロット、免疫染色等、幾つものタンパク質検出及び／又は定量化方法によって判定することができる。ジストロフィンに対する抗体は、市販されているか、又は必要に応じて所望の目的に合わせて開発することができる。

10

【0231】

DMDオリゴヌクレオチドは、回復した安定タンパク質の産生を媒介するその能力に関して判定することができる。回復したタンパク質の安定性は、非限定的な例では、血清及び組織安定性に関するアッセイで試験することができる。

【0232】

DMDオリゴヌクレオチドは、アルブミンなどのタンパク質と結合するその能力に関して判定することができる。例示的な関連技術としては、例えば、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/015575号等に記載されるものが挙げられる。

20

【0233】

DMDオリゴヌクレオチドは、免疫活性に関して、例えばサイトカイン活性化、補体活性化、TLR9活性等に関するアッセイを通じて判定することができる。例示的な関連技術としては、例えば、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/015575号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号等に記載されるものが挙げられる。

【0234】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドの有効性は、例えば、インシリコ解析及び予測、無細胞抽出物、人工的コンストラクトをトランスフェクトした細胞、ヒトジストロフィントランス遺伝子又はその一部分を有するマウスなどの動物、正常な及びジストロフィー性のヒト筋原細胞株及び／又は臨床試験で試験することができる。正常な及びジストロフィー性のヒト筋原細胞株は時に、一定の条件下で異なる有効性結果を生じ得るため、2つ以上のアッセイを利用することが望ましい場合もある (Mitrpant et al. 2009 Mol. Ther. 17: 1418)。

30

【0235】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、インビトロで細胞において試験することができる。一部の実施形態において、細胞におけるインビトロでの試験は、1つ又は複数のDMDオリゴヌクレオチドのジムノシスによる送達又はデリバリー剤又はトランスフェクタントを使用した送達を伴い、これらの多くは当技術分野において公知であり、本開示において利用し得る。

40

【0236】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、インビトロで正常ヒト骨格筋細胞 (hSkMC) において試験することができる。例えば、Arechavala et al. 2007 Hum. Gene Ther. 18: 798-810を参照されたい。

【0237】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、DMD患者からの筋外植片で試験することができる。DMD患者からの筋外植片については、例えば、Fletcher et al. 2006 J. Gene Med. 8: 207-216; McClorey et al. 2006 Neur. Dis. 16: 583

50

-590 ; 及び Arechavala et al. 2007 Hum. Gene Ther. 18: 798-810 に報告されている。

【0238】

一部の実施形態において、細胞は、DMD 患者からの培養筋細胞であるか又はそれを含む。例えば、Aartsma-Rus et al. 2003 Hum. Mol. Genet. 8: 907-914 を参照されたい。

【0239】

一部の実施形態において、個別の DMD オリゴヌクレオチドは、ある状況下では、エクソン 51 をスキップするその能力について実験間変動を示し得る。一部の実施形態において、個別の DMD オリゴヌクレオチドは、いずれの細胞が使用されるか、成長条件及び他の実験要因に応じて、1 つ又は複数のエクソン 51 をスキップするその能力について変動を示し得る。変動を制御するため、典型的には試験しようとする DMD オリゴヌクレオチド及び対照 DMD オリゴヌクレオチドが同じ又は実質的に同じ条件下で評価される。

【0240】

インビトロ実験には、患者由来筋芽細胞で行われるものも含まれる。かかる実験の特定の結果は本明細書に記載した。特定のかかる実験では、細胞を骨格成長培地において培養して、細胞を分裂／未熟筋芽細胞状態に保った。次に培地を「分化」培地（インスリン及び 2 % ウマ血清を含有する）に交換し、同時に投与のため培地中の DMD オリゴヌクレオチドをスパイクした。細胞は、それが好適な期間、例えば RNA 実験について合計 4 日及びタンパク質実験について 6 日にわたって投与を受けるにつれ筋管に分化した（かかる条件は「0 日間前分化」（RNA について 0 日 + 4 日、タンパク質について 0 日 + 6 日）として参照される）。

【0241】

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、DMD オリゴヌクレオチドが成熟筋管に入り込み、その細胞並びに「未熟」細胞においてスキッピングを誘導可能かどうか分かっていることが望ましい場合もあることを指摘しておく。一部の実施形態において、本開示は、筋管における DMD オリゴヌクレオチドの効果を試験するアッセイを提供した。一部の実施形態では、「0 日間前分化」と異なる投薬スケジュールを使用しており、ここで、筋芽細胞を分化培地で数日間（4 日又は 7 日又は 10 日）にわたって筋管に予め分化させ、次に DMD オリゴヌクレオチドを投与した。特定の関連するプロトコルについては実施例 19 に記載する。

【0242】

一部の実施形態において、本開示は、前分化実験において、投与前に細胞を分化培地で培養した日数に関わらず、DMD オリゴヌクレオチド（PMO であるものを除く）が通常、ほぼ同じレベルの RNA スキッピング及びジストロフィンタンパク質回復をもたらすことを実証した。一部の実施形態において、本開示は、筋芽細胞及び筋管に入り込み、そこで活性となることが可能であり得る DMD オリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチドは、インビトロで $\Delta 45-52$ DMD 患者細胞（ $\Delta 45-52$ 又は $\Delta 45-52$ と称される）又は $\Delta 52$ DMD 患者細胞（ $\Delta 52$ 又は $\Delta 52$ と称される）において 0、4 又は 7 日の前分化を伴い試験される。

【0243】

一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチドは、非哺乳類及び哺乳類モデルを含め；非限定的な例として、線虫属（Caenorhabditis）、ショウジョウバエ属（Drosophila）、ゼブラフィッシュ、マウス、ラット、ネコ、イヌ及びブタを含め、様々な動物モデルのいずれか 1 つ以上で試験することができる。例えば、McGreevey et al. 2015 Dis. Mod. Mech. 8: 195-213 にあるレビューを参照されたい。

【0244】

mdx マウスの例示的な使用が、例えば、Lu et al. 2003 Nat. Med. 9: 1009 ; Jarawiriyapaisarn et al. 2008 Mol. Ther., 16, 1624-1629 ; Yin et al. 2008 Hum. Mol. Genet., 17, 3909-3918 ; Wu et al. 2009 Mol. Ther., 17, 8

64-871; Wu et al. 2008 Proc. Natl Acad. Sci. USA, 105, 14814-14819; Mann et al. 2001 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98: 42-47; 及び Gebiski et al. 2003 Hum. Mol. Gen. 12: 1801-1811に報告されている。

【0245】

DMDオリゴヌクレオチドの有効性は、ゴールデン・レトリバー筋ジストロフィー（GRMD）動物モデルなど、イヌで試験することができる。Lu et al. 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:198-203; Alter et al. 2006 Nat. Med. 12:175-7; McClorey et al. 2006 Gene Ther. 13:1373-81; 及び Yokota et al. 2012 Nucl. Acid Ther. 22: 306。

【0246】

DMDオリゴヌクレオチドは、様々な組織（例えば、骨格筋、心筋及び／又は横隔膜筋）への効率的な送達に関して試験動物においてインビボで判定することができる；これは、非限定的な例において、ハイブリダイゼーションELISA及び動物組織における分布に関する試験によって試験することができる。

【0247】

DMDオリゴヌクレオチドは、血漿PKに関して試験動物においてインビボで判定することができる；これは、非限定的な例として、AUC（曲線下面積）及び半減期をアッセイすることにより試験され得る。

【0248】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、インビボで試験動物の筋肉への筋肉内投与によって試験することができる。

【0249】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、インビボで試験動物の腓腹筋への筋肉内投与によって試験することができる。

【0250】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、インビボでマウスの腓腹筋への筋肉内投与によって試験することができる。

【0251】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、インビボで、ヒトジストロフィン遺伝子座全体がトランスジェニックのマウスモデルの腓腹筋への筋肉内投与によって試験することができる。例えば、Bremmer-Bout et al. 2004 Mol. Ther. 10, 232-240を参照されたい。

【0252】

DMDオリゴヌクレオチドの有効性を判定するために実施することのできる追加の試験としては、中心核線維数及びジストロフィン陽性線維数及び機能性握力分析が挙げられる。非限定的な例として、Yin et al. 2009 Hum. Mol. Genet. 18: 4405-4414に報告される実験プロトコルを参照されたい。

【0253】

DMDオリゴヌクレオチドの追加の試験方法としては、非限定的な例として、Kinali et al. 2009 Lancet 8: 918; Bertoni et al. 2003 Hum. Mol. Gen. 12: 1087-1099に報告される方法が挙げられる。

【0254】

オリゴヌクレオチド及び組成物の特定の実施例

一部の実施形態において、本開示は、様々な目的、例えばスキッピングの調節、DMD転写物のレベルの低減、有益なタンパク質のレベルの改良、病態、疾患及び障害の治療等に有用なDMDオリゴヌクレオチド及び／又はDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態において、本開示は、改良された特性、例えばエクソン51の増加したスキッピング、低下した毒性等を備えるDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供する。とりわけ、本開示のDMDオリゴヌクレオチドは、DMDオリゴヌクレオチドの様々な特性及び活性を改良することのできる化学修飾、立体化学及び／又はこれらの組み合わせを含

10

20

30

40

50

む。非限定的な例を表 A 1 に挙げる。一部の実施形態において、D M D オリゴヌクレオチドタイプは、表 A 1 の D M D オリゴヌクレオチドの塩基配列、骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン及び骨格リン修飾のパターンによって定義されたとおりのタイプであり、ここで、D M D オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つのキラル制御されたインターヌクレオチド結合（「立体化学／結合」中の少なくとも 1 つの R 又は S）を含む。

【 0 2 5 5 】

一部の実施形態において、本開示は、本明細書、例えば表 A 1 に記載される D M D オリゴヌクレオチドに関する。

【 0 2 5 6 】

以下の表において、「I D」は、識別情報又はオリゴヌクレオチド番号を示し；及び「説明」は、修飾配列を示す。

【 0 2 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表A1. 例示的オリゴヌクレオチド

ID	説明	ネイキッド配列	結合/立体化学
WV- 3152	fU * SfC * SfA * SfA * SfG * SfG * SmAfA * SmGfA * SmUfG * SmGfC * SfA * SfU * SfU * SfC * SfU	UCAAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SSSSS SOSOS OSOSSSS S
WV- 7336	fU * fC * fA * fA * fGfG * mAfA * mGmA * fU * mGmGfC * fA * fU * fU * fU * fC * fU	UCAAAGGAAGAUGGCAU UUCU	XXXXO XOXX XOXX XXX X
WV- 9517	fC * SfU * SfC * SfC * SfC * SfG * SfG * SfU * SfU * SmCfU * SmG * SfA * SmAmGfG * SfU * SfG * SfU * SfU * SfC	CUCCGGUUCUGAAGGU GUUC	SSSSS SSSOSS SOOSSSSS
WV- 13405	GTTGCCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC	GTTGCCCTCCGGTTCTGA AGGT GTTC	OOOOO OOOOO OOOOO OOOOO OOO
WV- 13406	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC	CTCCGGTTCTGAAGGTG TTC	OOOOO OOOOO OOOOO OOOO
WV- 13407	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA	TGCCTCCGGTTCTGAAG GTGTT CTTGTA	OOOOO OOOOO OOOOO OOOOO OOOOO O
WV- 13835	fU * SfC * SfC * SfG * SfG * SfU * SfU * SfU * SmCfU * SmG * SfA * SmAmGfG * SfU * SfG * SfU * SfU * SfC * SfU	UCCGGUUCUGAAGGUG UUCU	SSSSS SSOSS SOOSSSS S
WV- 13864	fC * SfU * SfCn001RfC * SfG * SfGn001RfU * SfU * SmCfU * SmG * SfA * SmAfG * SfG * SfU * SfGn001RfU * SfU * SfC	CUCCGGUUCUGAAGGU GUUC	SS nR SS nR SSOSS SOSSS nR SS
WV- 14344	fC * SfU * SfCn001RfC * SfG * SfGn001RfU * SfU * SmCfU * SmG * SfA * SmAfGfG * SfU * SfGn001RfU * SfU * SfC	CUCCGGUUCUGAAGGU GUUC	SS nR SS nR SSOSS SOSSS nR SS
WV- 14522	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfGn001mAfA * SmGmA * SfU * SmGmGfC * SfA * SfU * SfU * SfU * SfC * SfU	UCAAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SS nX SS nX OSOSS OOSSS nX SS
WV- 14523	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfGn001mAfA * SmGmA * SfU * SmGmGfCn001fA * SfU * SfU * SfU * SfC * SfU	UCAAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SS nX SS nX OSOSS OO nX SS nX SS
WV- 14791	fU * SfC * SfCn001RfG * SfG * SfU * SfU * SfU * SmCfU * SmG * SfA * SmAmGfG * SfU * SfGn001RfU * SfU * SfC * SfU	UCCGGUUCUGAAGGUG UUCU	SS nR SS nR SSOSS OOSS nR SSS
WV- 15860	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SmAfA * SmGmA * SfU * SmGmGfCn001fA * SfU * SfU * SfU * SfC * SfU	UCAAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SS nX SSSOSOS SOO nX SS nX SS
WV- 15861	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfGn001mAfA * SmGmA * SfU * SmGmGfC * SfA * SfU * SfU * SfU * SfC * SfU	UCAAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SS nX SS nX OSOSSOSSSSS S
WV- 15862	fU * SfC * SfA * SfA * SfG * SfG * SmAfA * SmGmA * SfU * SmGmGfCn001fA * SfU * SfU * SfU * SfC * SfU	UCAAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SSSSS SOSOS SOO nX SS nX SS

【 0 2 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 2】

WV-17859	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SmA * SfA * SmGmA * SfU *	UCAAGGAAGAUGGCAU	SS nX SSSSS OSS
WV-17860	SmGmGfCn001fA * SfU * SfUn001fU * SfC * SfU	UUCU	OO nX SS nX SS
WV-17861	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SmA * SfA * SmGmA * SfU *	UCAAGGAAGAUGGCAU	SS nX SSSSOS
WV-17862	SmGmG * SfCn001fA * SfU * SfUn001fU * SfC * SfU	UUCU	SOS nX SS nX SS
WV-17863	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SmA * SfA * SmGmA * SfU *	UCAAGGAAGAUGGCAU	SS nX SSSSS
WV-17864	SmGmG * SfCn001fA * SfU * SfUn001fU * SfC * SfU	UUCU	OSSOS nX SS nX SS
WV-17865	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SfA * SfA * SmGmA * SfU *	UCAAGGAAGAUGGCAU	SS nX SSSSS
WV-17866	SmGfG * SfCn001fA * SfU * SfUn001fU * SfC * SfU	UUCU	OSSOS nX SS nX SS
WV-20034	fU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG * SfGn001mA * SfA * SmGmA * SfU *	UCAAGGAAGAUGGCAU	SS nX SS nX SSOSS
WV-20037	SmGmGfC * SfA * SfU * SfUn001fU * SfC * SfU	UUCU	OSSSS nX SS
WV-20040	fU * SfG * SfAn001fA * SfA * SfU * SfUn001fC * SfU * SmG * SfC * SmC	UGAAAUCUGCCAGAGC	SS nX SS nX SSSSS
WV-20043	* SfA * SmG * SfA * SfG * SfC * SfAn001fG * SfG * SfU	AGGU	SSSSS nX SS
WV-20046	fU * SfG * SfAn001fA * SfA * SfU * SfUn001fC * SfU * SmG * SfC * SmC	UGAAAUCUGCCAGAGC	SS nX SS nX SSSSS
WV-20049	* SfA * SmG * SfA * SfG * SfC * SfA * SfA * SmG * SfC * SfC	AGGU	SSSSS nX SS
WV-20050	fA * SfA * SfU * SfUn001fC * SfU * SfGn001fC * SfC * SmA * SfG * SmA	AAUCUGCCAGAGCAGG	SS nX SS nX SSSSS
WV-20051	* SfU * SmC * SfA * SfG * SfG * SfU * SfUn001fA * SfC * SfC	UACC	SSSSS nX SS
WV-20052	fC * SfU * SfGn001fC * SfC * SfA * SfAn001fG * SfA * SmG * SfC * SmA	CUGCCAGAGCAGGUAC	SS nX SS nX SSSSS
WV-20053	* SfG * SmG * SfU * SfA * SfC * SfCn001fU * SfC * SfC	CUCC	SSSSS nX SS
WV-20054	fC * SfC * SfAn001fG * SfA * SfGn001fC * SfA * SmG * SfG * SmU	CCAGAGCAGGUACCUC	SS nX SS nX SSSSS
WV-20055	* SfA * SmC * SfC * SfU * SfC * SfCn001fA * SfA * SfC	CAAC	SSSSS nX SS
WV-20056	fG * SfA * SfGn001fC * SfA * SfGn001fG * SfU * SmA * SfC * SmC	GAGCAGGUACCUCCAA	SS nX SS nX SSSSS
WV-20057	* SfU * SmC * SfC * SfA * SfA * SfCn001fA * SfU * SfC	CAUC	SSSSS nX SS
WV-20058	fC * SfA * SfGn001fG * SfU * SfAn001fC * SfC * SmU * SfC * SmC	CAGGUACCUCCAACAU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20059	* SfA * SmA * SfC * SfA * SfU * SfCn001fA * SfA * SfG	CAAG	SSSSS nX SS
WV-20060	fA * SfG * SfGn001fU * SfA * SfCn001fC * SfU * SmC * SfC * SmA	AGGUACCUCCAACAUCU	SS nX SS nX SSSSS
WV-20061	* SfA * SmC * SfA * SfU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG	AGG	SSSSS nX SS
WV-20062	fG * SfG * SfU * SfUn001fA * SfC * SfCn001fU * SfC * SmC * SfA * SmA	GGUACCUCCAACAUCAA	SS nX SS nX SSSSS
WV-20063	* SfC * SmA * SfU * SfC * SfA * SfAn001fG * SfC * SfA	GGA	SSSSS nX SS
WV-20064	fG * SfU * SfAn001fC * SfC * SfU * SfUn001fC * SfC * SmA * SfA * SmC	GUACCUCCAACAUCAA	SS nX SS nX SSSSS
WV-20065	* SfA * SmU * SfC * SfA * SfA * SfGn001fG * SfA * SfA	GAA	SSSSS nX SS

【 0 2 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 3】

WV- 20053	fU * Sfa * SfCn001fC * SfU * SfCn001fC * Sfa * SmA * SfC * SmA * SfU * SmC * Sfa * Sfa * SfG * SfGn001fa * Sfa * SfG	UACCUCCAACAUCAAAGG AAG	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20054	fA * Sfc * SfCn001fU * Sfc * SfCn001fa * Sfa * SmC * Sfa * SmU * Sfc * SmA * Sfa * SfG * SfG * SfAn001fa * SfG * Sfa	ACCUCCAACAUCAAAGGA AGA	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20055	fC * Sfc * SfUn001fC * Sfc * SfAn001fa * Sfc * SmA * SfU * SmC * Sfa * SmA * SfG * SfG * Sfa * SfAn001fG * Sfa * SfU	CCUCCAACAUCAAAGGA GAU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20056	fC * SfU * SfCn001fC * Sfa * SfAn001fC * Sfa * SmU * SfC * SmA * Sfa * SmG * SfG * Sfa * Sfa * SfGn001fa * SfU * SfG	CUCCAACAUCAAAGGAAG AUG	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20057	fU * Sfc * SfCn001fa * Sfa * SfCn001fa * SfU * SmC * Sfa * SmA * SfG * SmG * Sfa * Sfa * SfG * SfAn001fU * SfG * SfG	UGCAACAUCAAAGGAAGA UGG	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20058	fC * Sfc * SfAn001fa * Sfc * SfAn001fU * Sfc * SmA * Sfa * SmG * SfG * SmA * Sfa * SfG * Sfa * SfUn001fG * SfG * Sfc	CCAACAUCAAAGGAAGAU GGC	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20059	fC * Sfa * SfAn001fC * Sfa * SfUn001fC * Sfa * SmA * SfG * SmG * Sfa * SmA * SfG * Sfa * SfU * SfGn001fG * Sfc * Sfa	CAACAUCAAAGGAAGAU GCA	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20060	fA * Sfa * SfCn001fa * SfU * SfCn001fa * Sfa * SmG * SfG * SmA * Sfa * SmG * Sfa * SfU * SfG * SfGn001fC * Sfa * SfU	AACAUCAAAGGAAGAU GCAU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20061	fA * Sfc * SfAn001fU * Sfc * SfAn001fa * SfG * SmG * Sfa * SmA * SfG * SmA * SfU * SfG * SfG * SfCn001fa * SfU * SfU	ACAUCAAAGGAAGAU CAU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20062	fC * Sfa * SfUn001fC * Sfa * SfAn001fG * SfG * SmA * Sfa * SmG * Sfa * SmU * SfG * SfG * Sfa * SfAn001fU * SfU * SfU	CAUCAAGGAAGAU AUU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20063	fA * SfU * SfCn001fa * Sfa * SfGn001fG * Sfa * SmA * SfG * SmA * SfU * SmG * SfG * Sfc * Sfa * SfUn001fU * SfU * Sfc	AUCAAGGAAGAU GUU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20064	fU * Sfc * SfAn001fa * SfG * SfGn001fa * Sfa * SmG * Sfa * SmU * SfG * SmG * Sfc * Sfa * SfU * SfUn001fU * Sfc * SfU	UCAAGGAAGAU GUU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20064	fU * Sfc * SfAn001fa * SfG * SfGn001fa * Sfa * SmG * Sfa * SmU * SfG * SmG * Sfc * Sfa * SfU * SfUn001fU * Sfc * SfU	UCAAGGAAGAU GUU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20065	fC * Sfa * SfAn001fG * SfG * SfAn001fa * SfG * SmA * SfU * SmG * SfG * SmC * Sfa * SfU * SfU * SfUn001fC * SfU * Sfa	CAAGGAAGAU GUU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20066	fA * Sfa * SfGn001fG * Sfa * SfAn001fG * Sfa * SmU * SfG * SmG * Sfc * SmA * SfU * SfU * SfU * SfCn001fU * Sfa * SfG	AAGGAAGAU GUU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20067	fA * SfG * SfGn001fa * Sfa * SfGn001fa * SfU * SmG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfU * SfU * Sfc * SfUn001fa * SfG * SfU	AGGAAGAU GUU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20068	fG * SfG * SfAn001fa * SfG * SfAn001fU * SfG * SmG * SfC * SmA * SfU * SmU * SfU * Sfc * SfU * SfAn001fG * SfU * SfU	GGAAGAU GUU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS
WV- 20069	fG * Sfa * SfAn001fG * Sfa * SfUn001fG * SfG * SmC * Sfa * SmU * SfU * SmU * Sfc * SfU * Sfa * SfGn001fU * SfU * SfU	GAAGAU GUU	SS nX SS nX SSSSS SSSS nX SS

【 0 2 6 0 】

10

20

30

40

50

【表 4】

WV- 20070	fA * SfA * SfGn001fA * SfU * SfGn001fG * SfC * SmA * SfU * SmU * SfU * SmC * SfU * SfA * SfG * SfUn001fU * SfU * SfG	AAGAUGGCAUUUCUAG UUUG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20070	fA * SfA * SfGn001fA * SfU * SfGn001fG * SfC * SmA * SfU * SmU * SfU * SmC * SfU * SfA * SfG * SfUn001fU * SfU * SfG	AAGAUGGCAUUUCUAG UUUG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20071	fA * SfG * SfAn001fU * SfG * SfGn001fC * SfA * SmU * SfU * SmU * SfC * SmU * SfA * SfG * SfU * SfUn001fU * SfG * SfG	AGAUGGCAUUUCUAGU UUGG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20072	fG * SfA * SfUn001fG * SfG * SfCn001fA * SfU * SmU * SfU * SmC * SfU * SmA * SfG * SfU * SfU * SfUn001fG * SfG * SfA	GAUGGCAUUUCUAGUU UGGA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20073	fA * SfU * SfGn001fG * SfC * SfAn001fU * SfU * SmU * SfC * SmU * SfA * SmG * SfU * SfU * SfU * SfGn001fG * SfA * SfG	AUGGCAUUUCUAGUUU GGAG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20073	fA * SfU * SfGn001fG * SfC * SfAn001fU * SfU * SmU * SfC * SmU * SfA * SmG * SfU * SfU * SfU * SfGn001fG * SfA * SfG	AUGGCAUUUCUAGUUU GGAG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20074	fU * SfG * SfGn001fC * SfA * SfUn001fU * SfU * SmC * SfU * SmA * SfG * SmU * SfU * SfU * SfG * SfGn001fA * SfG * SfA	UGGCAUUUCUAGUUUG GAGA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20075	fG * SfG * SfCn001fA * SfU * SfUn001fU * SfC * SmU * SfA * SmG * SfU * SmU * SfU * SfG * SfG * SfAn001fG * SfA * SfU	GGCAUUUCUAGUUUGG AGAU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20076	fG * SfC * SfAn001fU * SfU * SfUn001fC * SfU * SmA * SfG * SmU * SfU * SmU * SfG * SfG * SfA * SfGn001fA * SfU * SfG	GCAUUUCUAGUUUGGA GAUG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20076	fG * SfC * SfAn001fU * SfU * SfUn001fC * SfU * SmA * SfG * SmU * SfU * SmU * SfG * SfG * SfA * SfGn001fA * SfU * SfG	GCAUUUCUAGUUUGGA GAUG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20077	fC * SfA * SfUn001fU * SfU * SfCn001fU * SfA * SmG * SfU * SmU * SfU * SmG * SfG * SfA * SfG * SfAn001fU * SfG * SfG	CAUUUCUAGUUUGGAG AUGG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20078	fA * SfU * SfUn001fU * SfC * SfUn001fA * SfG * SmU * SfU * SmU * SfG * SmG * SfA * SfG * SfA * SfUn001fG * SfG * SfC	AUUUCUAGUUUGGAGA UGGC	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20079	fU * SfU * SfUn001fC * SfU * SfAn001fG * SfU * SmU * SfU * SmG * SfG * SmA * SfG * SfA * SfU * SfGn001fG * SfC * SfA	UUUCUAGUUUGGAGAU GGCA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20080	fU * SfU * SfCn001fU * SfA * SfGn001fU * SfU * SmU * SfG * SmG * SfA * SmG * SfA * SfU * SfG * SfGn001fC * SfA * SfG	UUCUAGUUUGGAGAU GCAG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20081	fU * SfC * SfUn001fA * SfG * SfUn001fU * SfU * SmG * SfG * SmA * SfG * SmA * SfU * SfG * SfG * SfCn001fA * SfG * SfU	UCUAGUUUGGAGAU CAGU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20082	fC * SfU * SfAn001fG * SfU * SfUn001fU * SfG * SmG * SfA * SmG * SfA * SmU * SfG * SfG * SfC * SfAn001fG * SfU * SfU	CUAGUUUGGAGAU AGUU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20083	fU * SfA * SfGn001fU * SfU * SfUn001fG * SfG * SmA * SfG * SmA * SfU * SmG * SfG * SfC * SfA * SfGn001fU * SfU * SfU	UAGUUUGGAGAU GUUU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20084	fA * SfG * SfUn001fU * SfU * SfGn001fG * SfA * SmG * SfA * SmU * SfG * SmG * SfC * SfA * SfG * SfUn001fU * SfU * SfG	AGUUUGGAGAU UUUC	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS

10

20

30

40

【 0 2 6 1 】

50

【表 6】

WV-20103	fC * SfC * SfUn001fU * SfA * SfGn001fU * SfA * SmA * SfC * SmC * SfA * SmC * SfA * SfG * SfU * SfUn001fU * SfG * SfU	CUUAGUAACACAGG UUGU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20104	fC * SfU * SfUn001fA * SfG * SfUn001fA * SfA * SmC * SfC * SmA * SfC * SmA * SfG * SfU * SfUn001fG * SfU * SfG	CUUAGUAACACAGGU UGUG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20105	fU * SfU * SfAn001fG * SfU * SfAn001fA * SfC * SmC * SfA * SmC * SfA * SmG * SfG * SfU * SfU * SfGn001fU * SfG * SfU	UUAGUAACACAGGUU GUGU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20106	fU * SfA * SfGn001fU * SfA * SfAn001fC * SfC * SmA * SfC * SmA * SfG * SmG * SfU * SfU * SfG * SfUn001fG * SfU * SfC	UAGUAACACAGGUUG UGUC	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20107	fA * SfG * SfUn001fA * SfA * SfCn001fC * SfA * SmC * SfA * SmG * SfG * SmU * SfU * SfG * SfU * SfGn001fU * SfC * SfA	AGUAACACAGGUUGU GUCA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20108	fG * SfU * SfAn001fA * SfC * SfCn001fA * SfC * SmA * SfG * SmG * SfU * SmU * SfG * SfU * SfG * SfUn001fC * SfA * SfC	GUAACACAGGUUGUG UCAC	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20109	fU * SfA * SfAn001fC * SfC * SfAn001fC * SfA * SmG * SfG * SmU * SfU * SmG * SfU * SfG * SfU * SfCn001fA * SfC * SfC	UAACACAGGUUGUGU CACC	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20110	fA * SfA * SfCn001fC * SfA * SfCn001fA * SfG * SmG * SfU * SmU * SfG * SmU * SfG * SfU * SfC * SfAn001fC * SfC * SfA	AACCACAGGUUGUGUC ACCA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20111	fA * SfC * SfCn001fA * SfC * SfAn001fG * SfG * SmU * SfU * SmG * SfU * SmG * SfU * SfC * SfA * SfCn001fC * SfA * SfG	ACCACAGGUUGUGUCA CCAG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20112	fC * SfC * SfAn001fC * SfA * SfGn001fG * SfU * SmU * SfG * SmU * SfG * SmU * SfC * SfA * SfC * SfCn001fA * SfG * SfA	CCACAGGUUGUGUCAC CAGA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20113	fC * SfA * SfCn001fA * SfG * SfGn001fU * SfU * SmG * SfU * SmG * SfU * SmC * SfA * SfC * SfC * SfAn001fG * SfA * SfG	CACAGGUUGUGUCACC AGAG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20114	fA * SfC * SfAn001fG * SfG * SfUn001fU * SfG * SmU * SfG * SmU * SfC * SmA * SfC * SfC * SfA * SfGn001fA * SfG * SfU	ACAGGUUGUGUCACCA GAGU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20115	fC * SfA * SfGn001fG * SfU * SfUn001fG * SfU * SmG * SfU * SmC * SfA * SmC * SfC * SfA * SfG * SfAn001fG * SfU * SfA	CAGGUUGUGUCACCAG AGUA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20116	fA * SfG * SfGn001fU * SfU * SfGn001fU * SfG * SmU * SfC * SmA * SfC * SmC * SfA * SfG * SfA * SfGn001fU * SfA * SfA	AGGUUGUGUCACCAGA GUAA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20117	fG * SfG * SfUn001fU * SfG * SfUn001fG * SfU * SmC * SfA * SmC * SfC * SmA * SfG * SfA * SfG * SfUn001fA * SfA * SfC	GGUUGUGUCACCAGAG UAAC	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20118	fG * SfU * SfUn001fG * SfU * SfGn001fU * SfC * SmA * SfC * SmC * SfA * SmG * SfA * SfG * SfU * SfAn001fA * SfC * SfA	GUUGUGUCACCAGAGU AACA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20119	fU * SfU * SfGn001fU * SfG * SfUn001fC * SfA * SmC * SfC * SmA * SfG * SmA * SfG * SfU * SfA * SfAn001fC * SfA * SfG	UUGUGUCACCAGAGUA ACAG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20120	fU * SfG * SfUn001fG * SfU * SfCn001fA * SfC * SmC * SfA * SmG * SfA * SmG * SfU * SfA * SfA * SfCn001fA * SfG * SfU	UGUGUCACCAGAGUAA CAGU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS

【 0 2 6 3 】

10

20

30

40

50

【表 7】

WV- 20121	fG * SfU * SfGn001fU * SfC * SfAn001fC * SfC * SmA * SfG * SmA * SfG * SmU * SFA * SFA * SfC * SfAn001fG * SfU * SfC	GUGUACACAGAGUAAC AGUC	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20122	fU * SfG * SfUn001fC * SFA * SfCn001fC * SFA * SmG * SFA * SmG * SfU * SmA * SFA * SfC * SFA * SfGn001fU * SfC * SfU	UGUACACAGAGUAACA GUCU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20123	fG * SfU * SfCn001fA * SfC * SfCn001fA * SfG * SmA * SfG * SmU * SFA * SmA * SfC * SFA * SfG * SfUn001fC * SfU * SfG	GUCACACAGAGUAACAG UCUG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20124	fU * SfC * SfAn001fC * SfC * SfAn001fG * SFA * SmG * SfU * SmA * SFA * SmC * SFA * SfG * SfU * SfCn001fU * SfG * SFA	UCACACAGAGUAACAGU CUGA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20125	fC * SFA * SfCn001fC * SFA * SfGn001fA * SfG * SmU * SFA * SmA * SfC * SmA * SfG * SfU * SfC * SfUn001fG * SFA * SfG	CACACAGAGUAACAGUC UGAG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20126	fA * SfC * SfCn001fA * SfG * SfAn001fG * SfU * SmA * SFA * SmC * SFA * SmG * SfU * SfC * SfU * SfGn001fA * SfG * SfU	ACCAGAGUAACAGUCU GAGU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20127	fC * SfC * SfAn001fG * SFA * SfGn001fU * SFA * SmA * SfC * SmA * SfG * SmU * SfC * SfU * SfG * SfAn001fG * SfU * SFA	CCAGAGUAACAGUCUG AGUA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20128	fC * SFA * SfGn001fA * SfG * SfUn001fA * SFA * SmC * SFA * SmG * SfU * SmC * SfU * SfG * SFA * SfGn001fU * SFA * SfG	CAGAGUAACAGUCUGA GUAG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20129	fA * SfG * SfAn001fG * SfU * SfAn001fA * SfC * SmA * SfG * SmU * SfC * SmU * SfG * SFA * SfG * SfUn001fA * SfG * SfG	AGAGUAACAGUCUGAG UAGG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20130	fG * SFA * SfGn001fU * SFA * SfAn001fC * SFA * SmG * SfU * SmC * SfU * SmG * SFA * SfG * SfU * SfAn001fG * SfG * SFA	GAGUAACAGUCUGAGU AGGA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20131	fA * SfG * SfUn001fA * SFA * SfCn001fA * SfG * SmU * SfC * SmU * SfG * SmA * SfG * SfU * SFA * SfGn001fG * SFA * SfG	AGUAACAGUCUGAGUA GGAG	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20132	fG * SfU * SfAn001fA * SfC * SfAn001fG * SfU * SmC * SfU * SmG * SFA * SmG * SfU * SFA * SfG * SfGn001fA * SfG * SfC	GUAAACAGUCUGAGUAG GAGC	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20133	fU * SFA * SfAn001fC * SFA * SfGn001fU * SfC * SmU * SfG * SmA * SfG * SmU * SFA * SfG * SfG * SfAn001fG * SfC * SfU	UAAACAGUCUGAGUAGG AGCU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20134	fA * SFA * SfCn001fA * SfG * SfUn001fC * SfU * SmG * SFA * SmG * SfU * SmA * SfG * SfG * SFA * SfGn001fC * SfU * SFA	AACAGUCUGAGUAGGA GCUA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20135	fA * SfC * SfAn001fG * SfU * SfCn001fU * SfG * SmA * SfG * SmU * SFA * SmG * SfG * SFA * SfG * SfCn001fU * SFA * SFA	ACAGUCUGAGUAGGAG CUAA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20136	fC * SFA * SfGn001fU * SfC * SfUn001fG * SFA * SmG * SfU * SmA * SfG * SmG * SFA * SfG * SfC * SfUn001fA * SFA * SFA	CAGUCUGAGUAGGAGC UAAA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20137	fA * SfG * SfUn001fC * SfU * SfGn001fA * SfG * SmU * SFA * SmG * SfG * SmA * SfG * SfC * SfU * SfAn001fA * SFA * SFA	AGUCUGAGUAGGAGCU AAAA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20138	fG * SfU * SfCn001fU * SfG * SfAn001fG * SfU * SmA * SfG * SmG * SFA * SmG * SfC * SfU * SFA * SfAn001fA * SFA * SfU	GUCUGAGUAGGAGCUA AAAU	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS

【 0 2 6 4 】

10

20

30

40

50

【表 8】

WV- 20139	fU * SfC * SfUn001fG * SfA * SfGn001fU * SfA * SmG * SfG * SmA * SfG * SmC * SfU * SfA * SfA * SfAn001fA * SfU * SfA	UCUGAGUAGGAGCUAA AAUA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20140	fC * SfU * SfGn001fA * SfG * SfUn001fA * SfG * SmG * SfA * SmG * SfC * SmU * SfA * SfA * SfA * SfAn001fU * SfA * SfU	CUGAGUAGGAGCUAAA AUUA	SS nX SS nX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20011	fG * SfG * SfUn001fA * SfA * SfGn001fU * SfU * SmC * SfU * SmG * SfU * SmC * SfC * SfA * SfA * SfGn001fC * SfC * SfC	GGUAAGUUCUGUCCAA GCCC	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20052	fG * SfU * SfAn001fC * SfC * SfUn001fC * SfC * SmA * SfA * SmC * SfA * SmU * SfC * SfA * SfA * SfGn001fG * SfA * SfA	GUACCUCCAACAUCAAAG GAA	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20059	fC * SfA * SfAn001fC * SfA * SfUn001fC * SfA * SmA * SfG * SmG * SfA * SmA * SfG * SfA * SfU * SfGn001fC * SfC * SfA	CAACAUCAAAGGAAGAUG GCA	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20072	fG * SfA * SfUn001fG * SfG * SfCn001fA * SfU * SmU * SfU * SmC * SfU * SmA * SfG * SfU * SfU * SfUn001fG * SfG * SfA	GAUGGCAUUUCUAGUU UGGA	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20073	fA * SfU * SfGn001fG * SfC * SfAn001fU * SfU * SmU * SfC * SmU * SfA * SmG * SfU * SfU * SfU * SfGn001fG * SfA * SfG	AUGGCAUUUCUAGUUU GGAG	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20074	fU * SfG * SfGn001fC * SfA * SfUn001fU * SfU * SmC * SfU * SmA * SfG * SmU * SfU * SfU * SfG * SfGn001fA * SfG * SfA	UGGCAUUUCUAGUUUG GAGA	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20075	fG * SfG * SfCn001fA * SfU * SfUn001fU * SfC * SmU * SfA * SmG * SfU * SmU * SfU * SfG * SfG * SfAn001fG * SfA * SfU	GGCAUUUCUAGUUUGG AGAU	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20076	fG * SfC * SfAn001fU * SfU * SfUn001fC * SfU * SmA * SfG * SmU * SfU * SmU * SfG * SfG * SfA * SfGn001fA * SfU * SfG	GCAUUUCUAGUUUGGA GAUG	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20096	fG * SfC * SfAn001fG * SfU * SfUn001fU * SfC * SmC * SfU * SmU * SfA * SmG * SfU * SfA * SfA * SfCn001fC * SfA * SfC	GCAGUUUCCUUAAGUAA CCAC	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20097	fC * SfA * SfGn001fU * SfU * SfUn001fC * SfC * SmU * SfU * SmA * SfG * SmU * SfA * SfA * SfC * SfCn001fA * SfC * SfA	CAGUUUCCUUAAGUAA CACA	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20101	fU * SfU * SfCn001fC * SfU * SfUn001fA * SfG * SmU * SfA * SmA * SfC * SmC * SfA * SfC * SfA * SfGn001fG * SfU * SfU	UUCUUUAAGUAAACCA GGUU	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 20119	fU * SfU * SfGn001fU * SfG * SfUn001fC * SfA * SmC * SfC * SmA * SfG * SmA * SfG * SfU * SfA * SfAn001fC * SfA * SfG	UUGUGUACCCAGAGUA ACAG	SSnXSSnXSSSS SSSSSSnXSS
WV- 30233	fC * SfAn001fG * SfU * SfUn001fU * SfC * SmC * SfU * SmU * SfA * SmG * SfU * SfA * SfA * SfCn001fC * SfA * SfC	CAGUUUCCUUAAGUAA CAC	SnXSSnXSSSSSSSSS SSnXSS
WV- 30234	fG * SfU * SfUn001fU * SfC * SfCn001fU * SfU * SmA * SfG * SmU * SfA * SmA * SfC * SfC * SfA * SfCn001fA * SfG	GUUCCUUAAGUAAACCA CAG	SSnXSSnXSSSSSSS SSSnXS
WV- 30235	fG * SfU * SfAn001fA * SfG * SmU * SfU * SmC * SfU * SmG * SfU * SfC * SfC * SfAn001fA * SfG * SfC	GUAAGUUCUGUCCAAG C	SSnXSSSSSSSSSSSn XSS
WV- 30236	fGn001fU * SfAn001fA * SfG * SmU * SfU * SmC * SfU * SmG * SfU * SfC * SfC * SfAn001fA * SfG * SfC	GUAAGUUCUGUCCAAG C	nXSnXSSSSSSSSSSS nXSS

【 0 2 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

WV- 31568	fU * SfG * SfGn001RfC * Sfa * SfU * SfAn001RfA * SfU * SmUfC * SmC * SfU * SmUfA * SfG * SfU * SfAn001RfA * SfC * SfC	UGGAGUUUCCUUAAGU AACC	SsnRSSnRSSOSSS OSSSnRSS
WV- 31569	fC * Sfa * SfGn001RfU * SfU * SfUn001RfC * SfC * SmUfU * Sma * SfG * SmUfA * Sfa * SfC * SfCn001RfA * SfC * Sfa	CAGUUUCCUUAAGUAAC CACA	SsnRSSnRSSOSSS OSSSnRSS
WV- 31570	fa * SfG * SfUn001RfU * SfU * SfCn001RfC * SfU * SmUfA * SmG * SfU * Smafa * Sfa * SfC * SfAn001RfC * Sfa * SfG	AGUUUCCUUAAGUAACC ACAG	SsnRSSnRSSOSSS OSSSnRSS
WV- 31571	fU * SfU * SfCn001RfC * SfU * SfUn001RfA * SfG * SmUfA * Sma * SfC * SmCfa * SfC * Sfa * SfGn001RfG * SfU * SfU	UUCUUAGUAACCACA GGUU	SsnRSSnRSSOSSS OSSSnRSS
WV- 31572	fU * SfU * SfGn001RfU * SfG * SfUn001RfC * Sfa * SmCfC * Sma * SfG * SmafG * SfU * Sfa * SfAn001RfC * Sfa * SfG	UUGUGUACCCAGAGUA ACAG	SsnRSSnRSSOSSS OSSSnRSS
WV- 31573	fg * SfG * SfUn001RfA * Sfa * SfGn001RmUfU * SfC * SmU * SfG * SmUmC * SfC * Sfa * Sfa * SfGn001RfC * SfC * SfC	GGUAAGUUCUGUCCAA GCCC	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31574	fg * SfU * SfAn001RfC * SfC * SfUn001RmCfC * Sfa * Sma * SfC * SmAmU * SfC * Sfa * Sfa * SfGn001RfG * Sfa * Sfa	GUACCUCCAACAUCUAAAG GAA	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31575	fC * Sfa * SfAn001RfC * Sfa * SfUn001RmCfa * Sfa * SmG * SfG * SmAmA * SfG * Sfa * SfU * SfGn001RfG * SfC * Sfa	CAACAUCAAAGGAAGAUG GCA	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31576	fa * SfU * SfGn001RfG * SfC * SfAn001RmUfU * SfU * SmC * SfU * SmAmG * SfU * SfU * SfU * SfGn001RfG * Sfa * SfG	AUGGCAUUUCUAGUUU GGAG	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31577	fU * SfG * SfGn001RfC * Sfa * SfUn001RmUfU * SfC * SmU * Sfa * SmGmU * SfU * SfU * SfG * SfGn001RfA * SfG * Sfa	UGGCAUUUCUAGUUUG GAGA	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31578	fg * SfG * SfCn001RfA * SfU * SfUn001RmUfC * SfU * Sma * SfG * SmUmU * SfU * SfG * SfG * SfAn001RfG * Sfa * SfU	GGCAUUUCUAGUUUGG AGAU	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31579	fg * SfC * SfAn001RfU * SfU * SfUn001RmCfU * Sfa * SmG * SfU * SmUmU * SfG * SfG * Sfa * SfGn001RfA * SfU * SfG	GCAUUUCUAGUUUGGA GAUG	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31580	fU * SfG * SfGn001RfC * Sfa * SfGn001RmUfU * SfU * SmC * SfC * SmUmU * Sfa * SfG * SfU * SfAn001RfA * SfC * SfC	UGGAGUUUCCUUAAGU AACC	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31581	fC * Sfa * SfGn001RfU * SfU * SfUn001RmCfC * SfU * SmU * Sfa * SmGmU * Sfa * Sfa * SfC * SfCn001RfA * SfC * Sfa	CAGUUUCCUUAAGUAAC CACA	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31582	fa * SfG * SfUn001RfU * SfU * SfCn001RmCfU * SfU * Sma * SfG * SmUmA * Sfa * SfC * SfC * SfAn001RfC * Sfa * SfG	AGUUUCCUUAAGUAACC ACAG	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31583	fU * SfU * SfCn001RfC * SfU * SfUn001RmAfG * SfU * Sma * Sfa * SmCmC * Sfa * SfC * Sfa * SfGn001RfG * SfU * SfU	UUCUUAGUAACCACA GGUU	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31584	fU * SfU * SfGn001RfU * SfG * SfUn001RmCfA * SfC * SmC * Sfa * SmGmA * SfG * SfU * Sfa * SfAn001RfC * Sfa * SfG	UUGUGUACCCAGAGUA ACAG	SsnRSSnROSSSSO SSSnRSS
WV- 31585	fU * SfC * SfAn001RfA * SfG * SfGn001RmAfA * SmGfa * SmUfG * SmGfC * Sfa * SfU * SfUn001RfU * SfC * SfU	UCAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SsnRSSnROSOSOS OSSSnRSS

【 0 2 6 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

WV- 31586	fU * SfC * SfAn001RfA * SfG * SfGn001RmAfA * SmGmA * SfU * SmGmGfC * SfA * SfU * SfUn001RfU * SfC * SfU	UCAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SSnRSSnROSSOSSO OSSSnRSS
WV- 31587	fU * SfC * SfAn001RfA * SfG * SfGn001RfA * SfA * SmGfA * SmU * SfG * SmGfC * SfA * SfU * SfUn001RfU * SfC * SfU	UCAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SSnRSSnRSSOSSSS OSSSnRSS
WV- 31588	fU * SfC * SfAn001RfA * SfG * SfGn001RmAfA * SfG * SmA * SfU * SmGmG * SfC * SfA * SfU * SfUn001RfU * SfC * SfU	UCAAGGAAGAUGGCAU UUCU	SSnRSSnROSSSSSO SSSSnRSS
WV- 19886	fC * SfU * SfUn001fC * SfU * SfGn001fC * SfC * SmA * SfA * SmC * SfU * SmU * SfU * SfU * SfA * SfUn001fC * SfA * SfU	CUUCUGCCAAACUUUAU UCAU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19887	fU * SfU * SfCn001fU * SfG * SfCn001fC * SfA * SmA * SfC * SmU * SfU * SmU * SfU * SfA * SfU * SfCn001fA * SfU * SfU	UUCUGCCAACUUUUUAU CAUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19888	fU * SfC * SfUn001fG * SfC * SfCn001fA * SfA * SmC * SfU * SmU * SfU * SmU * SfA * SfU * SfC * SfAn001fU * SfU * SfU	UCUGCCAACUUUUUAUC AUUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19889	fC * SfU * SfGn001fC * SfC * SfAn001fA * SfC * SmU * SfU * SmU * SfU * SmA * SfU * SfC * SfA * SfUn001fU * SfU * SfU	CUGCCAACUUUUUAUCA UUUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19890	fU * SfG * SfCn001fC * SfA * SfAn001fC * SfU * SmU * SfU * SmU * SfA * SmU * SfC * SfA * SfU * SfUn001fU * SfU * SfU	UGCCAACUUUUUAUCAU UUUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19891	fG * SfC * SfCn001fA * SfA * SfCn001fU * SfU * SmU * SfU * SmA * SfU * SmC * SfA * SfU * SfU * SfUn001fU * SfU * SfU	GCCAACUUUUUAUCAU UUUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19892	fC * SfC * SfAn001fA * SfC * SfUn001fU * SfU * SmU * SfA * SmU * SfC * SmA * SfU * SfU * SfU * SfUn001fU * SfU * SfC	CCAACUUUUUAUCAUUUU UUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19893	fC * SfA * SfAn001fC * SfU * SfUn001fU * SfU * SmA * SfU * SmC * SfA * SmU * SfU * SfU * SfU * SfUn001fU * SfC * SfU	CAACUUUUUAUCAUUUUU UCU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19894	fA * SfA * SfCn001fU * SfU * SfUn001fU * SfA * SmU * SfC * SmA * SfU * SmU * SfU * SfU * SfU * SfUn001fC * SfU * SfC	AACUUUUUAUCAUUUUUU CUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19895	fA * SfC * SfUn001fU * SfU * SfUn001fA * SfU * SmC * SfA * SmU * SfU * SmU * SfU * SfU * SfU * SfCn001fU * SfC * SfA	ACUUUUUAUCAUUUUUU CUCA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19896	fC * SfU * SfUn001fU * SfU * SfAn001fU * SfC * SmA * SfU * SmU * SfU * SmU * SfU * SfU * SfC * SfUn001fC * SfA * SfU	CUUUUAUCAUUUUUUUC UCAU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19897	fU * SfU * SfUn001fU * SfA * SfUn001fC * SfA * SmU * SfU * SmU * SfU * SmU * SfU * SfC * SfU * SfCn001fA * SfU * SfA	UUUUAUCAUUUUUUUCU CAUA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19898	fU * SfU * SfUn001fA * SfU * SfCn001fA * SfU * SmU * SfU * SmU * SfU * SmU * SfC * SfU * SfC * SfAn001fU * SfA * SfC	UUUAUCAUUUUUUUCUC AUAC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19899	fU * SfU * SfAn001fU * SfC * SfAn001fU * SfU * SmU * SfU * SmU * SfU * SmC * SfU * SfC * SfA * SfUn001fA * SfC * SfC	UUAUCAUUUUUUUCUCA UACC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19900	fU * SfA * SfUn001fC * SfA * SfUn001fU * SfU * SmU * SfU * SmU * SfC * SmU * SfC * SfA * SfU * SfAn001fC * SfC * SfU	UAUCAUUUUUUUCUCAU CCU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS

【 0 2 6 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

WV-19901	fA * SfU * SfCn001fA * SfU * SfUn001fU * SfU * SmU * SfU * SmC * SfU * SfU * SfA * SfC * SfCn001fC * SfU * SfU	AUCAUUUUUCUCAUACCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19902	fU * SfC * SfAn001fU * SfU * SfUn001fU * SfU * SmU * SfC * SmU * SfC * SmA * SfU * SfA * SfC * SfCn001fU * SfU * SfC	UCAUUUUUCUCAUACCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19903	fC * SfA * SfUn001fU * SfU * SfUn001fU * SfU * SmC * SfU * SmC * SfA * SmU * SfA * SfC * SfCn001fU * SfU * SfC	CAUUUUUCUCAUACCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19904	fA * SfU * SfUn001fU * SfU * SfUn001fU * SfC * SmU * SfC * SmA * SfU * SmA * SfC * SfCn001fC * SfU * SfU	AUUUUUCUCAUACCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19905	fU * SfU * SfUn001fU * SfU * SfUn001fC * SfU * SmC * SfA * SmU * SfA * SmC * SfC * SfCn001fU * SfU * SfC	UUUUUCUCAUACCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19906	fU * SfU * SfUn001fU * SfU * SfCn001fU * SfC * SmA * SfU * SmA * SfC * SmC * SfU * SfU * SfC * SfCn001fC * SfU * SfU	UUUUUCUCAUACCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19907	fU * SfU * SfUn001fU * SfC * SfUn001fC * SfA * SmU * SfA * SmC * SfC * SmU * SfU * SfU * SfC * SfCn001fC * SfU * SfU	UUUUUCUCAUACCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19908	fU * SfU * SfUn001fC * SfU * SfCn001fA * SfU * SmA * SfC * SmC * SfU * SmU * SfU * SfC * SfCn001fU * SfU * SfG	UUUCUCAUACCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19909	fU * SfU * SfCn001fU * SfC * SfAn001fU * SfA * SmC * SfC * SmU * SfU * SmC * SfU * SfG * SfC * SfUn001fU * SfG * SfA	UUUCUCAUACCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19910	fU * SfC * SfUn001fC * SfA * SfUn001fA * SfC * SmC * SfU * SmU * SfC * SmU * SfG * SfC * SfU * SfU * SfCn001fC * SfA * SfU	UCUCAUACCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19911	fC * SfU * SfCn001fA * SfU * SfAn001fC * SfC * SmU * SfU * SmC * SfU * SmC * SfU * SmG * SfC * SfU * SfU * SfCn001fA * SfU * SfG	CUCAUACCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19912	fU * SfC * SfAn001fU * SfA * SfCn001fC * SfU * SmU * SfC * SmU * SfG * SmC * SfU * SfU * SfG * SfAn001fU * SfG * SfA	UCAUACCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19913	fC * SfA * SfUn001fA * SfC * SfCn001fU * SfU * SmC * SfU * SmG * SfC * SmU * SfU * SfG * SfA * SfUn001fC * SfA * SfU	CAUACCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19914	fA * SfU * SfAn001fC * SfC * SfUn001fU * SfC * SmU * SfG * SmC * SfU * SmC * SfU * SmU * SfG * SfA * SfCn001fA * SfU * SfC	AUACCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19915	fU * SfA * SfCn001fC * SfU * SfUn001fC * SfU * SmG * SfC * SmU * SfU * SmG * SfA * SfU * SfG * SfAn001fU * SfC * SfA	UACCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19916	fA * SfC * SfCn001fU * SfU * SfC * SfA * SfUn001fC * SfA * SmU * SfC * SmA * SfU * SfG * SfC * SfCn001fC * SfA * SfU	ACCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19917	fC * SfC * SfUn001fU * SfC * SfUn001fC * SfC * SmU * SfU * SmG * SfA * SmU * SfG * SfA * SfU * SfCn001fA * SfU * SfC	CCUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19918	fC * SfU * SfUn001fC * SfU * SfCn001fC * SfU * SmU * SfG * SmA * SfU * SmG * SfA * SfU * SfC * SfAn001fU * SfC * SfU	CUUCUGCUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS

【 0 2 7 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

WV- 19919	fU * SfU * SfCn001fU * SfG * SfCn001fU * SfU * SmG * SfA * SmU * SfG * SmA * SfU * SfC * SfA * SfUn001fC * SfU * SfC	UUCUGCUUGAUGAUC UCUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19920	fU * SfC * SfUn001fG * SfC * SfUn001fU * SfG * SmA * SfU * SmG * SfA * SmU * SfC * SfA * SfU * SfCn001fU * SfC * SfG	UCUGCUUGAUGAUC CUCG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19921	fC * SfU * SfGn001fC * SfU * SfUn001fG * SfA * SmU * SfG * SmA * SfU * SmC * SfA * SfU * SfC * SfUn001fC * SfG * SfU	CUGCUUGAUGAUC UCGU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19922	fU * SfG * SfCn001fU * SfU * SfGn001fA * SfU * SmG * SfA * SmU * SfC * SmA * SfU * SfC * SfU * SfCn001fG * SfU * SfU	UGCUUGAUGAUC CGUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19923	fG * SfC * SfUn001fU * SfG * SfAn001fU * SfG * SmA * SfU * SmC * SfA * SmU * SfC * SfU * SfC * SfGn001fU * SfU * SfG	GCUGAUGAUC GUUG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19924	fC * SfU * SfUn001fG * SfA * SfUn001fG * SfA * SmU * SfC * SmA * SfU * SmC * SfU * SfC * SfG * SfUn001fU * SfG * SfA	CUUGAUGAUC UUGA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19925	fU * SfU * SfGn001fA * SfU * SfGn001fA * SfU * SmC * SfA * SmU * SfC * SmU * SfC * SfG * SfU * SfUn001fG * SfA * SfU	UGAUGAUC UGAU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19926	fU * SfG * SfAn001fU * SfG * SfAn001fU * SfC * SmA * SfU * SmC * SfU * SmC * SfG * SfU * SfU * SfGn001fA * SfU * SfA	UGAUGAUC GAUA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19927	fG * SfA * SfUn001fG * SfA * SfUn001fC * SfA * SmU * SfC * SmU * SfC * SmG * SfU * SfU * SfG * SfAn001fU * SfA * SfU	GAUGAUC AUUA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19928	fA * SfU * SfGn001fA * SfU * SfCn001fA * SfU * SmC * SfU * SmC * SfG * SmU * SfU * SfG * SfA * SfUn001fA * SfU * SfC	AUGAUC UAUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19929	fU * SfG * SfAn001fU * SfC * SfAn001fU * SfC * SmU * SfC * SmG * SfU * SmU * SfG * SfA * SfU * SfAn001fU * SfC * SfC	UGAUC AUCC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19930	fG * SfA * SfUn001fC * SfA * SfUn001fC * SfU * SmC * SfG * SmU * SfU * SmG * SfA * SfU * SfA * SfUn001fC * SfC * SfU	GAUCUC UCCU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19931	fA * SfU * SfCn001fA * SfU * SfCn001fU * SfC * SmG * SfU * SmU * SfG * SmA * SfU * SfA * SfU * SfCn001fC * SfU * SfC	AUCAUC CCUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19932	fU * SfC * SfAn001fU * SfC * SfUn001fC * SfG * SmU * SfU * SmG * SfA * SmU * SfA * SfU * SfC * SfCn001fU * SfC * SfA	UCAUC CUCA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19933	fC * SfA * SfUn001fC * SfU * SfCn001fG * SfU * SmU * SfG * SmA * SfU * SmA * SfU * SfC * SfC * SfUn001fC * SfA * SfA	CAUCUC UCAA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19934	fA * SfU * SfCn001fU * SfC * SfGn001fU * SfU * SmG * SfA * SmU * SfA * SmU * SfC * SfC * SfU * SfCn001fA * SfA * SfG	AUCUGU CAAG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19935	fU * SfC * SfUn001fC * SfG * SfUn001fU * SfG * SmA * SfU * SmA * SfU * SmC * SfC * SfU * SfC * SfAn001fA * SfG * SfG	UCUGU AAGG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19936	fC * SfU * SfCn001fG * SfU * SfUn001fG * SfA * SmU * SfA * SmU * SfC * SmC * SfU * SfC * SfA * SfAn001fG * SfG * SfU	CUCGU AGGU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS

【 0 2 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 5】

WV- 19937	fU * Sfc * SfGn001fU * SfU * SfGn001fA * SfU * Sma * SfU * Sma * SfU * SmaC * Sfc * SmU * Sfc * Sfa * Sfa * SfGn001fG * SfU * Sfc	UCGUAGUAUCCUCA GGUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19938	fC * Sfg * SfUn001fU * Sfg * SfAn001fU * Sfa * SmU * Sfc * SmaC * SfU * SmC * Sfa * Sfa * Sfg * SfGn001fU * Sfc * Sfa	CGUAGUAUCCUCAAG GUCA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19939	fG * SfU * SfUn001fG * Sfa * SfUn001fA * SfU * SmaC * Sfc * SmaU * Sfc * Sma * Sfa * Sfg * Sfg * SfUn001fC * Sfa * Sfc	GUAGUAUCCUCAAGG UCAC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19940	fU * SfU * SfGn001fA * SfU * SfAn001fU * Sfc * SmaC * SfU * SmaC * Sfa * Sma * Sfg * Sfg * SfU * SfCn001fA * Sfc * Sfc	UUGAUUCCUCAAGGU CACC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19941	fU * Sfg * SfAn001fU * Sfa * SfUn001fC * Sfc * SmU * Sfc * Sma * Sfa * SmG * Sfg * SfU * Sfc * SfAn001fC * Sfc * Sfc	UGAUUCCUCAAGGUC ACCC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19942	fG * Sfa * SfUn001fA * SfU * SfCn001fC * SfU * SmaC * Sfa * Sma * Sfg * SmG * SfU * Sfc * Sfa * SfCn001fC * Sfc * Sfa	GAUAUCCUCAAGGUCA CCCA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19943	fa * SfU * SfAn001fU * Sfc * SfCn001fU * Sfc * Sma * Sfa * SmG * Sfg * SmU * Sfc * Sfa * Sfc * SfCn001fC * Sfa * Sfc	AUAUCCUCAAGGUCAC CCAC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19944	fU * Sfa * SfUn001fC * Sfc * SfUn001fC * Sfa * Sma * Sfg * SmG * SfU * SmC * Sfa * Sfc * Sfc * SfCn001fA * Sfc * Sfc	UAUCCUCAAGGUCACC CACC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19945	fa * SfU * SfCn001fC * SfU * SfCn001fA * Sfa * SmG * Sfg * SmU * Sfc * Sma * Sfc * Sfc * Sfc * SfAn001fC * Sfc * Sfa	AUCCUCAAGGUCACCC ACCA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19946	fU * Sfc * SfCn001fU * Sfc * SfAn001fA * Sfg * SmG * SfU * SmaC * Sfa * SmC * Sfc * Sfa * Sfa * SfCn001fC * Sfa * SfU	UCCUCAAGGUCACCCA CCAU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19947	fC * Sfc * SfUn001fC * Sfa * SfAn001fG * Sfg * SmU * Sfc * Sma * Sfc * SmC * Sfc * Sfa * Sfc * Sfc * SfCn001fA * SfU * Sfc	CCUCAAGGUCACCCAC CAUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19948	fC * SfU * SfCn001fA * Sfa * SfGn001fG * SfU * SmaC * Sfa * SmaC * Sfc * SmC * Sfa * Sfc * Sfc * SfAn001fU * Sfc * Sfa	CUCAAGGUCACCCACC AUCA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19949	fU * Sfc * SfAn001fA * Sfg * SfGn001fU * Sfc * Sma * Sfa * Sfc * SmaC * Sfc * Sma * Sfc * Sfc * Sfa * SfUn001fC * Sfa * Sfc	UCAAGGUCACCCACCA UCAC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19950	fC * Sfa * SfAn001fG * Sfg * SfUn001fC * Sfa * SmaC * Sfc * SmaC * Sfa * SmC * Sfc * Sfa * SfU * SfCn001fA * Sfc * Sfc	CAAGGUCACCCACCAU CACC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19951	fa * Sfa * SfGn001fG * SfU * SfCn001fA * Sfc * SmaC * Sfc * Sma * Sfc * SmC * Sfa * SfU * Sfc * SfAn001fC * Sfc * Sfc	AAGGUCACCCACCAUCA CCC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19952	fa * Sfg * SfGn001fU * Sfc * SfAn001fC * Sfc * SmaC * Sfa * SmaC * Sfc * Sma * SfU * Sfc * Sfa * SfCn001fC * Sfc * SfU	AGGUCACCCACCAUCA CCCU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19953	fG * Sfg * SfUn001fC * Sfa * SfCn001fC * Sfc * Sma * Sfc * SmaC * Sfa * SmU * Sfc * Sfa * Sfc * SfCn001fC * SfU * Sfc	GGUCACCCACCAUCAC CCUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 19957	fa * Sfc * SfCn001fC * Sfa * SfCn001fC * Sfa * SmU * Sfc * Sma * Sfc * SmC * Sfc * SfU * Sfc * SfUn001fG * SfU * Sfg	ACCCACCAUACCCUCU GUG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS

【 0 2 7 2 】

10

20

30

40

50

【表 16】

WV-19958	fc * Sfc * SfcCn001fA * Sfc * SfcCn001fA * Sfu * SmC * Sfa * SmC * Sfc * Sfa	CCACCAUCACCCUCU	SSnX SSnX SSSSS
WV-19959	fc * Sfc * SfaAn001fC * Sfc * SfaAn001fU * Sfc * Sma * Sfc * Sma * Sfu	CCACCAUCACCCUCUG	SSnX SSnX SSSSS
WV-19960	fc * Sfa * SfcCn001fC * Sfa * SfuAn001fC * Sfa * Sma * Sfc * Sma * Sfu	CACCAUCACCCUCUGU	SSnX SSnX SSSSS
WV-19961	fa * Sfc * SfcCn001fA * Sfu * SfcCn001fA * Sfc * SmC * Sfc * Sma * Sfu	ACCAUCACCCUCUGUG	SSnX SSnX SSSSS
WV-19962	fc * Sfc * SfaAn001fU * Sfc * SfaAn001fC * Sfc * SmC * Sfu * Sma * Sfu	CAUCACCCUCUGUGA	SSnX SSnX SSSSS
WV-19963	fc * Sfa * SfuAn001fC * Sfa * SfcCn001fC * Sfc * SmU * Sfc * Sma * Sfu	CAUCACCCUCUGUGAU	SSnX SSnX SSSSS
WV-19964	fa * Sfu * SfcCn001fA * Sfc * SfcCn001fC * Sfu * SmC * Sfu * Sma * Sfu	AUCACCCUCUGUGAUU	SSnX SSnX SSSSS
WV-19965	fu * Sfc * SfaAn001fC * Sfc * SfcCn001fU * Sfc * SmU * Sfg * Sma * Sfu	UCACCCUCUGUGAUUU	SSnX SSnX SSSSS
WV-19966	fc * Sfa * SfcCn001fC * Sfa * SfuAn001fC * Sfu * SmG * Sfu * Sma * Sfu	CACCCUCUGUGAUUUU	SSnX SSnX SSSSS
WV-19967	fa * Sfc * SfcCn001fC * Sfu * Sfu * Sfa * Sfa * SfuAn001fU * Sfa * Sfa	ACCCUCUGUGAUUUUA	SSnX SSnX SSSSS
WV-19968	fc * Sfc * SfcCn001fU * Sfc * SfuAn001fG * Sfu * SmG * Sfa * Sma * Sfu	CCCUCUGUGAUUUUAU	SSnX SSnX SSSSS
WV-19969	fc * Sfc * SfuAn001fC * Sfu * SfcGn001fU * Sfg * Sma * Sfu * Sma * Sfu	CCUCUGUGAUUUUAUA	SSnX SSnX SSSSS
WV-19970	fc * Sfu * SfcCn001fU * Sfg * SfuAn001fG * Sfa * SmU * Sfu * Sma * Sfu	CUCUGUGAUUUUAUAA	SSnX SSnX SSSSS
WV-19971	fu * Sfc * SfuAn001fG * Sfu * SfcGn001fA * Sfu * SmU * Sfu * Sma * Sfu	UCUGUGAUUUUAUAAC	SSnX SSnX SSSSS
WV-19972	fc * Sfu * SfcGn001fU * Sfg * Sfa * Sfa * SfuAn001fU * Sfg * Sfa	UUGA	SSnX SSnX SSSSS
WV-19973	fu * Sfg * Sma * Sfa * Sfc * Sfu * SfuAn001fU * Sfu * SmU * Sfa * Sma * Sfu	UGUGAUUUUAUAACUU	SSnX SSnX SSSSS
WV-19974	fg * Sfu * SfcGn001fA * Sfu * SfuAn001fU * Sfu * Sma * Sfu * Sma * Sfu	GUGAUUUUAUAACUUG	SSnX SSnX SSSSS
WV-19975	fu * Sfg * SfaAn001fU * Sfu * SfuAn001fU * Sfa * SmU * Sfa * Sma * Sfu	UGAUUUUAUAACUUGA	SSnX SSnX SSSSS

【 0 2 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 17】

WV-19976	fG * Sfa * SfUn001fU * SfU * SfUn001fa * SfU * Sma * Sfa * SmC * SfU * SmU * Sfg * Sfa * Sfa * SfG	GAUUUAUAACUUGAU CAAG	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19977	fA * SfU * SfUn001fU * SfU * SfAn001fU * Sfa * Sma * Sfc * SmU * SfU * SmG * Sfa * Sfa * SfAn001fa * Sfg * Sfc	AUUUAUAACUUGAUCA AGC	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19978	fU * SfU * SfUn001fU * Sfa * SfUn001fa * Sfa * SmC * SfU * SmU * Sfg * Sma * Sfa * SfAn001fg * Sfc * Sfa	UUUAUAACUUGAUCAA GCA	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19979	fU * SfU * SfUn001fa * SfU * SfAn001fa * Sfc * SmU * SfU * SmG * Sfa * SmU * Sfc * Sfa * SfGn001fc * Sfa * Sfg	UUUAUAACUUGAUCAAG CAG	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19980	fU * SfU * SfAn001fU * Sfa * SfAn001fc * SfU * SmU * Sfg * Sma * SfU * SmC * Sfa * Sfa * SfGn001fa * Sfg * Sfa	UUUAUAACUUGAUCAAGC AGA	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19981	fU * Sfa * SfUn001fa * Sfa * SfCn001fU * SfU * SmG * Sfa * SmU * Sfc * Sma * Sfa * Sfg * SfAn001fg * Sfa * Sfg	UAUAACUUGAUCAAGCA GAG	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19982	fA * SfU * SfAn001fa * Sfc * SfUn001fU * Sfg * Sma * SfU * SmC * Sfa * Sma * Sfg * Sfa * SfGn001fa * Sfg * Sfa	AUAACUUGAUCAAGCAG AGA	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19983	fU * Sfa * SfAn001fc * SfU * SfUn001fg * Sfa * SmU * Sfc * Sma * Sfa * SmG * Sfc * Sfa * SfAn001fg * Sfa * Sfa	UAACUUGAUCAAGCAGA GAA	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19984	fA * Sfa * SfCn001fU * SfU * SfGn001fa * SfU * SmC * Sfa * Sma * Sfg * SmC * Sfa * Sfg * SfAn001fa * Sfa * Sfa	AACUUGAUCAAGCAGA GAAA	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19985	fA * Sfc * SfUn001fU * Sfg * SfAn001fU * Sfc * Sma * Sfa * SmG * Sfc * Sma * Sfg * Sfa * SfAn001fa * Sfa * Sfg	ACUUGAUCAAGCAGAG AAG	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19986	fc * SfU * SfUn001fg * Sfa * SfUn001fc * Sfa * Sma * Sfg * SmC * Sfa * SmG * Sfa * Sfg * SfAn001fa * Sfg * Sfc	CUUGAUCAAGCAGAGA AAGC	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19987	fU * SfU * SfGn001fa * SfU * SfCn001fa * Sfa * SmG * Sfc * Sma * Sfg * Sma * Sfg * Sfa * SfAn001fg * Sfc * Sfc	UUGAUCAAGCAGAGAAA GCC	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19988	fU * Sfg * SfAn001fU * Sfc * SfAn001fa * Sfg * SmC * Sfa * SmG * Sfa * SmG * Sfa * Sfa * SfGn001fc * Sfc * Sfa	UGAUCAAGCAGAGAAA GCCA	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19989	fG * Sfa * SfUn001fc * Sfa * SfAn001fg * Sfc * Sma * Sfg * Sma * Sfg * Sma * Sfa * Sfa * SfGn001fc * Sfa * Sfg	GAUCAAGCAGAGAAAAG CCAG	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19989	fG * Sfa * SfUn001fc * Sfa * SfAn001fg * Sfc * Sma * Sfg * Sma * Sfg * Sma * Sfa * Sfa * SfGn001fc * Sfa * Sfg	GAUCAAGCAGAGAAAAG CCAG	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19990	fA * SfU * SfCn001fa * Sfa * SfGn001fc * Sfa * SmG * Sfa * SmG * Sfa * SmG * Sfa * Sfa * SfGn001fa * Sfg * SfU	AUCAAGCAGAGAAAAGCC AGU	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19991	fU * Sfc * SfAn001fa * Sfg * SfCn001fa * Sfg * Sma * Sfg * Sma * Sfg * Sma * Sfa * Sfa * SfGn001fg * Sfa * Sfc	UCAAGCAGAGAAAAGCCA GUC	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS
WV-19992	fc * Sfa * SfAn001fg * Sfc * SfAn001fg * Sfa * SmG * Sfa * Sma * Sfa * Sma * Sfg * Sfa * SfGn001fU * Sfc * Sfg	CAAGCAGAGAAAAGCCA GUCG	SSnX SSnX SSSSS SSSS nX SS

10

20

30

40

【0274】

50

【表 18】

WV-19993	fA * SfA * SfGn001fC * SfA * SfGn001fA * SfG * SmA * SfA * SmA * SfG * SmC * SfC * SfA * SfU * SfUn001fC * SfG * SfG	AAGCAGAGAAAGCCAG UCGG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19994	fA * SfG * SfCn001fA * SfG * SfAn001fG * SfA * SmA * SfA * SmG * SfC * SmC * SfA * SfU * SfCn001fG * SfG * SfU	AGCAGAGAAAGCCAGU CGGU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19995	fG * SfC * SfAn001fG * SfA * SfGn001fA * SfA * SmA * SfG * SmC * SfC * SmA * SfG * SfU * SfCn001fG * SfU * SfA	GCAGAGAAAGCCAGUC GGUA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19996	fC * SfA * SfGn001fA * SfG * SfAn001fA * SfA * SmG * SfC * SmC * SfA * SmG * SfU * SfC * SfGn001fU * SfA * SfA	CAGAGAAAGCCAGUCG GUAA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19997	fA * SfG * SfAn001fG * SfA * SfAn001fA * SfG * SmC * SfC * SmA * SfG * SmU * SfC * SfG * SfAn001fA * SfA * SfG	AGAAAGCCAGUCGG UAAG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19998	fG * SfA * SfGn001fA * SfA * SfAn001fG * SfC * SmC * SfA * SmG * SfU * SmC * SfG * SfA * SfAn001fA * SfG * SfU	GAGAAAGCCAGUCGGU AAGU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-19999	fA * SfG * SfAn001fA * SfA * SfGn001fC * SfC * SmA * SfG * SmU * SfC * SmG * SfU * SfA * SfAn001fG * SfU * SfU	AGAAAGCCAGUCGGUA AGUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20000	fG * SfA * SfAn001fA * SfG * SfCn001fC * SfA * SmG * SfU * SmC * SfG * SmG * SfU * SfA * SfAn001fU * SfU * SfC	GAAAGCCAGUCGGUAA GUUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20001	fA * SfA * SfAn001fG * SfC * SfCn001fA * SfG * SmU * SfC * SmG * SfG * SmU * SfA * SfAn001fU * SfC * SfU	AAAGCCAGUCGGUAA UUCU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20002	fA * SfA * SfGn001fC * SfC * SfAn001fG * SfU * SmC * SfG * SmG * SfU * SmA * SfA * SfU * SfU * SfUn001fC * SfU * SfG	AAGCCAGUCGGUAA UCUG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20003	fA * SfG * SfCn001fC * SfA * SfGn001fU * SfC * SmG * SfG * SmU * SfA * SmA * SfG * SfU * SfCn001fU * SfG * SfU	AGCCAGUCGGUAA CUGU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20004	fG * SfC * SfCn001fA * SfG * SfUn001fC * SfG * SmG * SfU * SmA * SfA * SmG * SfU * SfU * SfC * SfAn001fG * SfU * SfC	GCCAGUCGGUAA UGUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20005	fC * SfC * SfAn001fG * SfU * SfCn001fG * SfG * SmU * SfA * SmA * SfG * SmU * SfU * SfC * SfU * SfCn001fU * SfC * SfC	CCAGUCGGUAA GUCC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20006	fC * SfA * SfGn001fU * SfC * SfGn001fG * SfU * SmA * SfA * SmG * SfU * SmU * SfC * SfU * SfCn001fC * SfC * SfA	CAGUCGGUAA UCCA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20007	fA * SfG * SfUn001fC * SfG * SfGn001fU * SfA * SmA * SfG * SmU * SfU * SmC * SfU * SfG * SfU * SfCn001fC * SfA * SfA	AGUCGGUAA CCAA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20008	fG * SfU * SfCn001fG * SfG * SfU * SfC * SfCn001fA * SfA * SmG * SfU * SmU * SfC * SmU * SfG * SfU * SfA * SfA	GUCGGUAA CAAG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20009	fU * SfC * SfGn001fG * SfU * SfAn001fA * SfG * SmU * SfU * SmC * SfU * SmG * SfU * SfC * SfA * SfAn001fA * SfG * SfC	UCGGUAA AAGC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV-20010	fC * SfG * SfGn001fU * SfA * SfAn001fG * SfU * SmU * SfC * SmU * SfG * SmU * SfC * SfA * SfAn001fG * SfC * SfC	CGGUAA AGCC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS

【0275】

10

20

30

40

50

【表 1 9】

WV- 20010	fC * SfG * SfGn001fU * SfA * SfAn001fG * SfU * SmU * SfC * SmU * SfG * SmU * SfC * SfC * SfA * SfAn001fG * SfC * SfC	CGUAAGUUCUGUCCA AGCC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20012	fG * SfU * SfAn001fA * SfG * SfUn001fU * SfC * SmU * SfG * SmU * SfC * SmC * SfA * SfA * SfG * SfCn001fC * SfC * SfG	GUAAGUUCUGUCCAAG CCCG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20013	fU * SfA * SfAn001fG * SfU * SfUn001fC * SfU * SmG * SfU * SmC * SfC * SmA * SfA * SfG * SfC * SfCn001fC * SfG * SfG	UAAGUUCUGUCCAAGC CCGG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20014	fA * SfA * SfGn001fU * SfU * SfCn001fU * SfG * SmU * SfC * SmC * SfA * SmA * SfG * SfC * SfC * SfCn001fG * SfG * SfU	AAGUUCUGUCCAAGCC CGGU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20015	fA * SfG * SfUn001fU * SfC * SfU * SfUn001fG * SfU * SmC * SfA * SfA * SmG * SfC * SfC * SfC * SfCn001fG * SfU * SfU	AGUUCUGUCCAAGCCC GGUU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20016	fG * SfU * SfUn001fC * SfU * SfGn001fU * SfC * SmC * SfA * SmA * SfG * SmC * SfC * SfC * SfG * SfGn001fU * SfU * SfG	GUUCUGUCCAAGCCCG GUUG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20017	fU * SfU * SfCn001fU * SfG * SfUn001fC * SfC * SmA * SfA * SmG * SfC * SmC * SfC * SfG * SfG * SfUn001fU * SfG * SfA	UUCUGUCCAAGCCCGG UUGA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20018	fU * SfC * SfUn001fG * SfU * SfCn001fC * SfA * SmA * SfG * SmC * SfC * SmC * SfG * SfG * SfU * SfUn001fG * SfA * SfA	UCUGUCCAAGCCCGGU UGAA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20019	fC * SfU * SfGn001fU * SfC * SfCn001fA * SfA * SmG * SfC * SmC * SfC * SmG * SfG * SfU * SfU * SfGn001fA * SfA * SfA	CUGUCCAAGCCCGGUU GAAA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20020	fU * SfG * SfUn001fC * SfC * SfAn001fA * SfG * SmC * SfC * SmC * SfG * SmG * SfU * SfU * SfG * SfA * SfAn001fA * SfA * SfU	UGUCCAAGCCCGGUUG AAAU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20021	fG * SfU * SfCn001fC * SfA * SfAn001fG * SfC * SmC * SfC * SmG * SfG * SmU * SfU * SfG * SfA * SfA * SfAn001fA * SfU * SfC	GUCCAAGCCCGGUUGA AAUC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20022	fU * SfC * SfCn001fA * SfA * SfGn001fC * SfC * SmC * SfG * SmG * SfU * SmU * SfG * SfA * SfA * SfAn001fU * SfC * SfU	UCCAAGCCCGGUUGAA AUCU	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20023	fC * SfC * SfAn001fA * SfG * SfCn001fC * SfC * SmG * SfG * SmU * SfU * SmG * SfA * SfA * SfU * SfUn001fC * SfU * SfG	CCAAGCCCGGUUGAAA UCUG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20024	fC * SfA * SfAn001fG * SfC * SfCn001fC * SfG * SmG * SfU * SmU * SfG * SmA * SfA * SfA * SfU * SfCn001fU * SfG * SfC	CAAGCCCGGUUGAAAA CUGC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20025	fA * SfA * SfGn001fC * SfC * SfCn001fG * SfG * SmU * SfU * SmG * SfA * SmA * SfA * SfU * SfC * SfU * SfUn001fG * SfC * SfC	AAGCCCGGUUGAAAAUC UGCC	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20026	fA * SfG * SfCn001fC * SfC * SfGn001fG * SfU * SmU * SfG * SmA * SfA * SmA * SfU * SfC * SfU * SfGn001fC * SfC * SfA	AGCCCGGUUGAAAAUCU GCCA	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS
WV- 20027	fG * SfC * SfCn001fC * SfG * SfGn001fU * SfU * SmG * SfA * SmA * SfA * SmU * SfC * SfU * SfG * SfCn001fC * SfA * SfG	GCCCGGUUGAAAAUCUG CCAG	SSnX SSnX SSSSS SSSSS nX SS

【 0 2 7 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

WV- 31181	fG * SfU * SfC * SfA * SfC * SfC * SfC * SfC * SfA * SmC * SfC * Sma *	GUCACCCACCAUCACC CUCU	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31182	fU * SfC * SfA * SfC * SfC * SfC * SfA * SfC * SmC * SfA * SmU *	UCACCCACCAUCACCCU CUG	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31183	fC * SfA * SfC * SfC * SfC * SfA * SfC * SfC * SfA * SfU * SmC *	CACCCACCAUCACCCUC UGU	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31184	fG * SfA * SfU * SfC * SfA * SfA * SfG * SfC * SfA * SfC * SfG * Sma *	GAUCAAGCAGAGAAAG CCAG	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31185	fC * SfA * SfA * SfG * SfC * SfC * SfA * SfG * SfA * SmG * SfA * Sma *	CAAGCAGAGAAAGCCA GUCG	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31186	fA * SfA * SfG * SfC * SfC * SfA * SfA * SfG * SfU * SmC * SfG * SmG *	AAGCCAGUCGGUAGU UCUG	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31187	fA * SfG * SfU * SfC * SfG * SfG * SfU * SfA * Sma * SfG * SmU *	AGUCGGUAGUUCUGU CCAA	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31188	fG * SfU * SfC * SfG * SfG * SfU * SfA * SfA * SmG * SfU * SmU *	GUCGGUAGUUCUGUC CAAG	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31189	fU * SfC * SfG * SfG * SfU * SfA * SfA * SfG * SmU * SfU * SmC *	UCGGUAGUUCUGUCC AAGC	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31190	fC * SfG * SfG * SfU * SfA * SfA * SfG * SfU * SmU * SfC * SmU *	CGGUAAGUUCUGUCCA AGCC	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31191	fG * SfG * SfU * SfA * SfA * SfG * SfU * SfU * SmC * SfU * SmG *	GGUAGUUCUGUCCAA GCCC	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31192	fG * SfU * SfA * SfA * SfG * SfU * SfU * SfC * SfC * SmU * SfG * SmU *	GUAAGUUCUGUCCAAG CCCG	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31193	fU * SfA * SfA * SfG * SfU * SfU * SfC * SfC * SfU * SmG * SfU * SmC *	UAAGUUCUGUCCAAGC CCGG	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31194	fA * SfA * SfG * SfU * SfU * SfC * SfC * SfU * SfG * SmU * SfC * SmC *	AAGUUCUGUCCAAGCC CGGU	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31195	fA * SfG * SfU * SfU * SfC * SfC * SfU * SfG * SfU * SmC * SfC * Sma *	AGUUCUGUCCAAGCCC GGUU	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31196	fG * SfU * SfU * SfC * SfU * SfG * SfU * SfC * SmC * SfA * Sma *	GUUCUGUCCAAGCCCG GUUG	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31197	fU * SfU * SfC * SfU * SfG * SfU * SfC * SfC * Sma * SfA * SmG *	UUCUGUCCAAGCCCGG UUGA	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS
WV- 31198	fU * SfC * SfU * SfG * SfU * SfC * SfC * SfA * Sma * SfG * SmC *	UCUGUCCAAGCCCGGU UGAA	SSSSS SSSSS SSSSS SSSS

【 0 2 7 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

WV-31199	fG * SfU * SfC * SfC * SfA * SfA * SfG * SfC * SmC * SfC * SmG * SfG * SmU * SfU * SfG * SfA * SfA * SfA * SfU * SfC	GUCCAAGCCCGUUGA AAUC	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31213	fG * SfC * SfA * SfU * SfU * SfU * SfC * SfC * SfU * SmA * SfG * SmU * SfU * SmU * SfG * SfA * SfG	GCAUUUCUAGUUUGGA GAUG	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31215	fG * SfG * SfC * SfA * SfG * SfU * SfU * SfU * SmC * SfC * SmU * SfU * SmA * SfG * SfA * SfC * SfC * SfA	GGCAGUUCCUUGUA ACCA	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31216	fG * SfC * SfA * SfG * SfU * SfU * SfU * SfC * SmC * SfU * SmU * SfA * SmG * SfU * SfA * SfC * SfC * SfA * SfC	GCAGUUCCUUGUAA CCAC	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31217	fC * SfA * SfG * SfU * SfU * SfU * SfC * SfC * SfC * SmU * SfU * Sma * SfG * SmU * SfA * SfC * SfC * SfA * SfC * SfA	CAGUUCCUUGUAAC CACA	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31218	fA * SfG * SfU * SfU * SfU * SfC * SfC * SfC * SfU * SmU * SfA * SmG * SfU * SmA * SfA * SfC * SfA * SfC * SfG	AGUUCCUUGUAACC ACAG	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31219	fG * SfU * SfU * SfU * SfC * SfC * SfC * SfU * SfU * SmA * SfG * SmU * SfA * SmA * SfC * SfA * SfC * SfG	GUUCCUUGUAACCA CAGG	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31220	fU * SfU * SfU * SfC * SfC * SfU * SfU * SfA * SmG * SfU * Sma * SfA * SmC * SfC * SfA * SfC * SfA * SfG * SfG * SfU	UUUCCUUGUAACCACA GGU	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31221	fU * SfU * SfC * SfC * SfU * SfU * SfA * SfG * SmU * SfA * Sma * SfC * SmC * SfA * SfC * SfG * SfG * SfU * SfU	UUCUUGUAACCACA GGUU	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31222	fU * SfC * SfC * SfU * SfU * SfA * SfG * SfU * SmA * SfA * SmC * SfC * SmA * SfC * SfA * SfG * SfU * SfU * SfG	UCCUAGUAACCACAG GUUG	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31223	fC * SfC * SfU * SfU * SfA * SfG * SfU * SfA * SmA * SfC * SmC * SfA * SmC * SfA * SfG * SfU * SfU * SfG * SfU	CCUAGUAACCACAGG UUGU	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31224	fG * SfU * SfU * SfG * SfU * SfG * SfU * SfC * SmA * SfC * SmC * SfA * SmG * SfA * SfG * SfU * SfA * SfA * SfC * SfA	GUUGUGUACCCAGAGU AACA	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31225	fU * SfU * SfG * SfU * SfG * SfU * SfC * SfC * SfA * SmC * SfC * Sma * SfG * SmA * SfG * SfU * SfA * SfA * SfC * SfA	UUGUGUACCCAGAGUA ACAG	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-31226	fU * SfG * SfU * SfG * SfU * SfC * SfA * SfC * SmC * SfA * SmG * SfA * SmG * SfU * SfA * SfC * SfA * SfC * SfU	UGUGUACCCAGAGUAA CAGU	SSSS SSSSS SSSS SSSS
WV-32693	fG * SfUn001RfU * SfU * SfCn001RfC * SfU * SmUfA * SmG * SfU * SmaAfA * SfC * SfC * SfAn001RfC * SfA * SfG	GUUCCUUGUAACCA CAG	SnRSSnRSS OSSSS OSSSnRSS
WV-32694	fG * SfUn001RfU * SfU * SfCn001RmCfU * SfU * Sma * SfG * SmJmA * SfA * SfC * SfC * SfAn001RfC * SfA * SfG	GUUCCUUGUAACCA CAG	SnRSSnR OSSSS OSSSnRSS

10

20

30

40

【 0 2 7 9 】

表 A 1 では、スペースを利用して体裁を整え、読み易さを図っており、例えば O X X X X
X X X X X X X X X X X X X X は、O X X X X X X X X X X X X X X X X X X X
と同じ立体化学を示し； * S 及び * S は、両方とも結合リンが S p 配置を有するホスホロ
チオエートインターヌクレオチド結合を示す等である。

【 0 2 8 0 】

表 A 1 に挙げられる DMD オリゴヌクレオチドは、すべて一本鎖である。本願に記載されるとおり、これらは、一本鎖として使用され得るか、又は 1 つ以上の他の鎖と複合体を形成する鎖として使用され得る。

【 0 2 8 1 】

一部の配列は、その長さに起因して複数行に分割している。

【 0 2 8 2 】

当業者が理解するとおり、ヌクレオシド単位は、未修飾であり、（例えば、*r*、*m*、*m*5、*e* *o*などで）特に示されない限り、未修飾の核酸塩基及び2'-デオキシ糖（2つの2'-H）を含み；結合は、特に示されない限り、天然リン酸結合であり；及び酸性／塩基性基は、独立に、それらの塩形態で存在し得る。

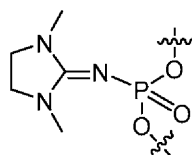
【 0 2 8 3 】

ID：オリゴヌクレオチドの識別番号

WV-13405、WV-13406及びWV-13407は、完全PMO（モルホリノオリゴヌクレオチド）である。 10

n001：非負電荷結合

【化7】



（これは、（例えば、n001R又はn001Sのように）特に指示されない限りステレオランダムである）； 20

n001R：キラル制御されていて、且つRp配置を有するn001；

n001S：キラル制御されていて、且つSp配置を有するn001；

nX：「結合／立体化学」中、nO又はnXは、ステレオランダムなn001を示す；

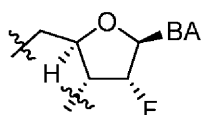
nR：「結合／立体化学」中、nRは、キラル制御されていて、且つRp配置を有するn001を示す；

nS：「結合／立体化学」中、nSは、キラル制御されていて、且つSp配置を有するn001を示す；

F、f：後ろに続くヌクレオシド上の2'-F修飾（例えば、fA（

【化8】

30

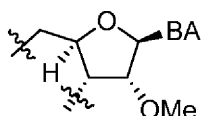


式中、BAは核酸塩基Aである））；

m：後ろに続くヌクレオシド上の2'-OMe修飾（例えば、mA（

【化9】

40



式中、BAは核酸塩基Aである））；

*、PS：ホスホロチオエート；

*R、R、Rp：Rp配座のホスホロチオエート；

*S、S、Sp：Sp配座のホスホロチオエート；

X：ステレオランダムなホスホロチオエート； 50

O、PO：リン酸ジエステル（リン酸）。2つのヌクレオシド単位間にインターヌクレオチド結合が指定されない場合、そのインターヌクレオチド結合は、リン酸ジエステル結合（天然リン酸結合）である。

【0284】

一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドの各ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合は、独立に、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド組成物は、表A1に挙げられるDMDオリゴヌクレオチドタイプのキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物であり、ここで、DMDオリゴヌクレオチドの各ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合は、独立に、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である。

10

【0285】

一部の実施形態において、本開示は、複数の提供されるDMDオリゴヌクレオチドを含むか又はそれからなる組成物（例えば、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物）を提供する。一部の実施形態において、複数のすべてのDMDオリゴヌクレオチドが同じタイプであり、即ちすべてが同じ塩基配列、骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン及び骨格リン修飾のパターンを有する。一部の実施形態において、同じタイプのDMDオリゴヌクレオチドは、すべて構造的に同一である。一部の実施形態において、提供される組成物は、複数のDMDオリゴヌクレオチドタイプのDMDオリゴヌクレオチドを、典型的には制御された量で含む。一部の実施形態において、提供されるキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物は、2つ以上の提供されるDMDオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせを含む。

20

【0286】

一部の実施形態において、本開示のDMDオリゴヌクレオチド組成物は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物であり、ここで、その複数のDMDオリゴヌクレオチドの配列は、表A1に挙げられる塩基配列を含むか又はそれからなる。

【0287】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、表A1に記載される配列であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、AGUUUCCUUAAGUAACCAACAGであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、UGGCAUUUCUAGUUUGGAGAであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、GGUAAGUUCUGUCCAAAGCCCであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、GGUAAGUUCUGUCCAAAGCCCであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、AUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、GCAUUUCUAGUUUGGAGAUGであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、CAGUUUCCUUAAGUAACCAACCAであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、UCCCUUAGUAACCAACAGGUUであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、GUACCUCCAAACAUCAAAGGAであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUAであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、UGGCAGUUUCCUUAAGUAACCであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、GGUAAGUUCUGUCCAAAGCCCであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、CAACAUCAAAGGAAGAUGGCAであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、塩基配列は、AUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAであるか又はそれを含む。

30

40

【0288】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20011である。

【0289】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで

50

、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20052である。

【0290】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20059である。

【0291】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20072である。

【0292】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20073である。

【0293】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20074である。

【0294】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20075である。

【0295】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20076である。

【0296】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20096である。

【0297】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20097である。

【0298】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20101である。

【0299】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、WV-20119である。

【0300】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20011のキラ制御された組成物を提供する。

【0301】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20052のキラ制御された組成物を提供する。

【0302】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20059のキラ制御された組成物を提供する。

【0303】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20072のキラ制御された組成物を提供する。

【0304】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20073のキラ制御された組成物を提供する。

【0305】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20074のキラ制御された組成物を提供する。

【0306】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20075のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0307】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20076のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0308】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20096のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0309】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20097のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0310】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20101のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0311】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20119のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0312】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20011のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0313】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20052のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0314】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20059のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0315】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20072のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0316】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20073のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0317】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20074のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0318】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20075のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0319】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20076のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0320】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20096のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0321】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20097のキラ
ル制御された組成物を提供する。

【0322】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20101のキラ
ル制御された組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0323】

一部の実施形態において、本開示は、DMDオリゴヌクレオチドWV-20119のキラル制御された組成物を提供する。

【0324】

本明細書に記載されているとおり、一部の実施形態において、本開示は、エクソンスキッピング、例えばエクソン51スキッピングに適している病態、障害又は疾患（例えば、BMD、DMDなど）を予防及び／又は治療するのに有用なオリゴヌクレオチド及び組成物（例えば、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物、薬学的に許容可能な組成物など）を提供する。一部の実施形態において、本開示は、エクソンスキッピング、例えばエクソン51スキッピングに適した病態、障害又は疾患（例えば、BMD、DMDなど）を予防及び／又は治療するための方法を提供し、この方法は、それに罹患しやすい又はそれに罹患した対象に、治療有効量のオリゴヌクレオチド若しくはその薬学的に許容可能な塩又は組成物を投与することを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、様々な形態のオリゴヌクレオチドを含む組成物、例えば緩衝系中にオリゴヌクレオチドの1つ又は複数の溶解した酸形態及び／又は1つ又は複数の塩形態を含む液体組成物で投与することができる。一部の実施形態において、塩は、ナトリウム塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31582又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31565又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31568又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31561又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31576又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31567又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31569又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31583又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31562又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31578又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31580又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31573又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31563又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、WV-31564又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、塩は、ナトリウム塩である。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、高いジアステレオ純度、例えば1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%であるか又はそれを超える。一部の実施形態において、ジアステレオ純度は、少なくとも10%である。一部の実施形態において、ジアステレオ純度は、少なくとも20%である。一部の実施形態において、ジアステレオ純度は、少なくとも30%である。一部の実施形態において、ジアステレオ純度は、少なくとも40%である。一部の実施形態において、ジアステレオ純度は、少なくとも50%である。一部の実施形態において、ジアステレオ純度は、少なくとも60%である。一部の実施形態において、ジアステレオ純度は、少なくとも70%である。一部の実施形態において、ジアステレオ純度は、少なくとも80%である。一部の実施形態において、ジアステレオ純度は、少なくとも90%である。

【0325】

本明細書に記載されているとおり、一部の実施形態において、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提供し、ここで、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチド（例えば、少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、8

0 %、85 %、90 %、95 %又はそれを超える)は、それぞれ独立に、単一のオリゴヌクレオチド又はその塩の構造を有する。一部の実施形態において、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提供し、ここで、あるレベルの、組成物中の共通の塩基配列を共有するすべてのオリゴヌクレオチド(例えば、少なくとも約1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %又はそれを超える)は、それぞれ独立に、単一のオリゴヌクレオチド又はその塩の構造を有する。一部の実施形態において、レベルは、少なくとも10 %である。一部の実施形態において、レベルは、少なくとも20 %である。一部の実施形態において、レベルは、少なくとも30 %である。一部の実施形態において、レベルは、少なくとも40 %である。一部の実施形態において、レベルは、少なくとも50 %である。一部の実施形態において、レベルは、少なくとも60 %である。一部の実施形態において、レベルは、少なくとも70 %である。一部の実施形態において、レベルは、少なくとも80 %である。一部の実施形態において、レベルは、少なくとも90 %である。一部の実施形態において、各塩は、独立に、薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、塩は、ナトリウム塩である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31582である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31565である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31568である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31561である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31576である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31567である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31569である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31583である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31562である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31578である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31580である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31573である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31563である。一部の実施形態において、単一のオリゴヌクレオチドは、WV-31564である。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、様々な形態(例えば、酸形態及び／又は1つ若しくは複数の薬学的に許容可能な塩形態)で存在し得る治療有効量の単一のオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物である。一部の実施形態において、医薬組成物は、本明細書に記載されているとおりの薬学的に許容可能な担体及び他の成分をさらに含み得る。一部の実施形態において、医薬組成物は、液体組成物、例えば1つ又は複数の溶解したオリゴヌクレオチドを含む、適切なpH(例えば、約7、約7~8、約7.4など)を有する緩衝液である。

10

20

30

40

50

【0326】

一部の実施形態において、かかる提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、キラル制御され得、複数のそのオリゴヌクレオチドを含み、ここで、1つ以上(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個又はそれを超える)のインターヌクレオチド結合がキラル制御されている。一部の実施形態において、各キラルインターヌクレオチド結合が独立にキラル制御されている。一部の実施形態において、キラル制御されたインターヌクレオチド結合は、表A1の「結合／立体化学」に示されるとおりのS、R、nR又はnSのものである。

【0327】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソンのスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドである。

【0328】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを

媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20011である。

【0329】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20052である。

【0330】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20059である。

【0331】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20072である。

【0332】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20073である。

【0333】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20074である。

【0334】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20075である。

【0335】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20076である。

【0336】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20096である。

【0337】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20097である。

【0338】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20101である。

【0339】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、DMDエクソン51のスキッピングを媒介する能力を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、WV-20119である。

【0340】

一部の試験では、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、意外にも、例えばドリサベルセン及び／又はエテプリルセンと比較したときにエクソン51の高いスキッピングを提供することができる。例えば、様々なキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物は、各々が、ドリサベルセン及び／又はエテプリルセンと比較して、ジストロフィンにお

10

20

30

40

50

るエクソン51のスキッピングを媒介する優れた能力を示し、一部の実施形態では何倍も高かった。特定のデータを本開示に例として提供する。

【0341】

一部の実施形態において、マウスにおいて例示的DMDオリゴヌクレオチドをアッセイするとき、DMDオリゴヌクレオチドは雄C57BL/10ScSn dmdmd x マウス（4～5週齢）の尾静脈に、被験量、例えば10mg/kg、30mg/kg等で静脈内注射される。一部の実施形態において、注射後の被験時点、例えば2、7及び／又は14日目等の例えば日数で組織が回収され、一部の実施形態では、液体窒素中に新鮮凍結されて、分析時まで-80℃で保存される。

【0342】

本開示では、様々なアッセイを用いてDMDオリゴヌクレオチドレベルを評価することができる。一部の実施形態では、ハイブリッドELISAを用いて、被験物質段階希釈を標準曲線として使用して組織中のDMDオリゴヌクレオチドレベルが定量化される：例えば、例示的手順では、無水マレイン酸で活性化した96ウェルプレート（Pierce 15110）を50μlの捕捉プローブによって2.5%NaHCO₃（Gibco、25080-094）中500nMで37℃において2時間コートした。このプレートを次にPBST（PBST+0.1%Tween-20）で3回洗浄し、5%無脂肪乳-PBSTで37℃において1時間ブロックした。被験物質DMDオリゴヌクレオチドをマトリックス中に段階希釈した。この標準を元の試料と共に溶解緩衝液（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、すべての試料中のDMDオリゴヌクレオチド量が100ng/mL未満となるようにした。20μlの希釈試料と、PBST中に希釈した180μlの333nM検出プローブとを混合し、次にPCR機で変性させた（65℃、10分、95℃、15分、4C∞）。50μlの変性試料を、ブロックしたELISAプレートにトリプリケートで分配し、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ストレプトアビジン-APをウェル当たり50μlで加え、室温で1時間インキュベートした。大量のPBSTで洗浄した後、100μlのAttoPhos（Promega S1000）を加え、暗所下室温で10分間インキュベートし、プレートリーダー（Molecular Device、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標準曲線に基づき4パラメータ回帰式によって計算した。

【0343】

一部の実施形態において、提供されるDMD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で安定している。

【0344】

エクソン51のエクソンスキッピングのための例示的ジストロフィンオリゴヌクレオチド及び組成物

一部の実施形態において、本開示は、DMD（例えば、マウス、ヒト等の）におけるエクソン51のスキッピングを媒介するためのDMDオリゴヌクレオチド、DMDオリゴヌクレオチド組成物及びその使用方法を提供する。

【0345】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及び／又は組成物は、エクソン51のスキッピングを媒介する能力を有する。

【0346】

一部の実施形態では、かかるDMDオリゴヌクレオチド及び組成物の非限定的な例としては、WV-20011、WV-20052、WV-20059、WV-20072、WV-20073、WV-20074、WV-20075、WV-20076、WV-20096、WV-20097、WV-20101及びWV-20119のもの並びにこれらのDMDオリゴヌクレオチドのいずれかの少なくとも15隣接塩基を含む塩基配列を有する他のDMDオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0347】

一部の実施形態において、エクソン 5 1 スキッピングの目的の領域の配列はマウスとヒトとの間で異なる。

【0348】

本開示では、エクソンスキッピングに関する DMD オリゴヌクレオチドの評価に様々なアッセイを利用することができる。一部の実施形態において、ヒトにおけるエクソン 5 1 スキッピングが意図される DMD オリゴヌクレオチドの特定の組み合わせの化学及び立体化学の有効性を試験するため、マウス配列を有する対応する DMD オリゴヌクレオチドを調製し、次にマウスで試験することができる。本開示は、エクソン 5 1 のヒト及びマウスホモログに数個の違いが存在することを認識する（以下の下線箇所）。

【化 10】

M GTGGTTACTAAGGAAACTGTCATCTCCAACTAGAAATGCCATCTTCTTTGCTGTTGGAG
H GTGGTTACTAAGGAAACTGCCATCTCCAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAG

10

ここで、Mはマウスの nt 7571～7630であり；及びHはヒトの nt 7665～7724である。

【0349】

これらの違いにより、マウス及びヒトでの試験用には、エクソン 5 1 のスキッピングに関して僅かに異なる DMD オリゴヌクレオチドが調製され得る。非限定的な例として、ヒト及びマウスでの試験に以下の DMD オリゴヌクレオチド配列を使用することができる。

20

【化 11】

ヒトDMDオリゴヌクレオチド配列 : UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU

【化 12】

マウスDMDオリゴヌクレオチド配列 : GCAAAGAAGAUGGCAUUUCU

ヒトとマウスの間のミスマッチは下線で示す。

30

【0350】

ヒト対象の治療を意図する DMD オリゴヌクレオチドは、塩基配列（例えば、

【化 13】

UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU

）と、特定のパターンの化学、インターヌクレオチド結合、立体化学及び追加の化学的部分（存在する場合）との特定の組み合わせで構築することができる。かかる DMD オリゴヌクレオチドはインビトロでヒト細胞において又はインビボでヒト対象において試験することができ、しかし、例えば 2 つの塩基配列にミスマッチがあるため、マウスでの試験については、適合性が限られていることもある。

40

【0351】

対応する DMD オリゴヌクレオチドは、対応するマウス塩基配列

【化 14】

(GCAAAGAAGAUGGCAUUUCU)

並びに同じパターンの化学、インターヌクレオチド結合、立体化学及び追加の化学的部分（存在する場合）で構築することができる。かかる DMD オリゴヌクレオチドは、マウスにおいてインビボで試験することができる。マウス塩基配列を含む幾つかの DMD オリゴヌクレオチドを構築し、試験した。

50

【 0 3 5 2 】

一部の実施形態において、ヒト DMD エクソンスキッピング DMD オリゴヌクレオチドは、ヒト配列を含む DMD 遺伝子を含むように修飾されたマウスにおいて試験することができる。

【 0 3 5 3 】

様々な修飾パターンを含む様々な DMD オリゴヌクレオチドが本明細書に記載される。以下の表は、特定の DMD オリゴヌクレオチドの試験結果を示す。概して、数字はスキッピング量を示し、ここで、特に指示されない限り、100 であれば 100 % のスキッピングを示し、0 であればスキッピングがないことを示す。DMD のエクソンスキッピングをアッセイするため、Δ 5 2 ヒト患者由来筋芽細胞及び／又は Δ 4 5 - 5 2 ヒト患者由来筋芽細胞（エクソン 5 2 又はエクソン 4 5 ~ 5 2 が既に欠失したヒト細胞）において DMD オリゴヌクレオチドをインビトロで試験した。特に注記しない限り、様々な実験において、DMD オリゴヌクレオチドはジムノシスにより送達した。

【 0 3 5 4 】

【表 2 3 】

表 1. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

様々な DMD エクソン 51 DMD オリゴヌクレオチドの活性をインビトロで試験した。

数字は、DMD エクソン 51 のスキッピング量を示す(DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを表す)。

試験した量は、10、3.3 及び 1.1 uM であった。

濃度	10	3.3	1.1	濃度	10		3.3	1.1
WV-3152	20.8	9	4.1	WV-14522	36.9		10.4	4.7
	22	10	4.9		27.4		10.4	4.2
	17.3	9.3	3.2		21		12.6	5.6
	21.3	7.2	4.4		26.5		10.4	5.7
WV-15860	27.4	13.2	12.7	WV-14523	27.2		8.1	6.2
	30.4	15.4	9		28.3		8.5	4.9
	33	14.2	6		18.4		9.1	3.6
	33.4	16.9	5.9		18.7		9.6	4.4
WV-15861	26.6	9.2	5.6	モック	0.21			
	28.5	6.1	5.4		0.35			
	34.1	8.2	5.2		0.48			
	29.9	11.1	4		0.24			
WV-15862	30.7		7.8					
	33.3		7.2					
	21.9	15.1	6.8					
	26.4	13.2	7.2					

【 0 3 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 2. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

DMD エクソン 51 のスキッピングのためのオリゴヌクレオチドをインビトロで試験した。

数字は、DMD エクソン 51 のスキッピング量を示す (DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100% がスキップされたことを表す)。

使用した DMD オリゴヌクレオチドの濃度: 10、3.3 及び 1.1 uM。

	10uM	3.3uM	1.1uM		10uM	3.3uM	1.1uM
モック	0.2	0.3	0.2	WV- 17861	37.6	22.6	9
	0.3	0.2	0.3		38.8	22.5	8.9
	0.2	0	0.2		40.7	24.4	13.2
	0.2	0.6	0.2		41.7	25.4	11.6
WV- 7336	3.1	1.6	0.7	WV- 17862	38.4	18.9	8.1
	8.9	1.8	0.1		34.1	19.6	9
	5.4	1.4	0.9		34.8	26	10
	4.9	1.5	0.7		36.1	21.4	9.5
WV- 3152	32.4	26.5	7.5	WV- 17863	32.7	18.2	9.2
	27.2	22.2	8.4		35.1	18.9	9.3
	28	14.5	7.6		34.8	18.2	8.6
	26.8	14.8	7.3		30.7	17	9
WV- 15860	43.3	25.7	10.2	WV- 17864	37.3	23.6	11.7
	37.9	23.8	9.6		41.4	23.3	10.6
	38.4	24.5	11.2		39.9	20.6	17.5
	42.4	21.9	11		38.8	21.7	10.2
WV- 17859	42.3	26.7	16.3	WV- 17865	35.9	16.5	9.3
	41.3	26	16.8		34	16.7	7.5
	39.9	22.9	15.5		34.4	17.5	11.9
	48.6	23.6	14.9		34.1	17.8	9.8
WV- 17860	38.1	19.3	11.7	WV- 17866	48.7	28.4	17.7
	35.3	19.2	12		43.3	28.6	13.1
	41	28.2	16.4		44.5	24.8	15.4
	40.4	21.9	11.1		45.1	30.5	16.3

【 0 3 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 3. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

DMD エクソン 51 のスキッピングのためのオリゴヌクレオチドをインビトロで試験した。

数字は、DMD エクソン 51 のスキッピング量を示す(DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100% がスキップされたことを表す)。

使用した DMD オリゴヌクレオチドの濃度: 10 及び 3.3 uM。

	10uM	3.3uM		10uM	3.3uM
モック	0	0	WV- 20058	14.6	4.8
	0	0			
	0	0		12	3.7
	0	0		12.6	3.5
WV- 20034	15.9	7	WV- 20061	35.8	26.5
	17.1	8.4			
	16.1	7.3		39.3	24.2
	15.3	7.2		39.9	22.8
WV- 20037	29.7	18.3	WV- 20064	26.5	17.6
	27.2	17.5			
	26.6	19.4		24.5	16.4
	29.2	18.4		27.5	17.1
WV- 20040	9.6	4.9	WV- 20067	15.7	8.3
	9.1	5.2		16.8	9.3
	11.4	3.5		17.3	8.6
	10.9	2.9		16.3	8.7
WV- 20043	20.2	9.6	WV- 20070	41.3	26.4
	20.4	9.8		31.7	22.3
	18.9	9.8		39.7	27.2
	21	10.4		38.4	26.9
WV- 20046	28.5	14.7	WV- 20073	30.9	21.1
	29.8	14.2		26.9	17.9
	29.2	15.8		31.1	20.2
	26.6	14.5		30.7	22.2
WV- 20049	20.9	11.6	WV- 20076	23.2	16.8
				18.9	11.4
	18.6	12.2		21.8	16.9
	18.4	11.7		22.8	15.8
WV- 20052	28.8	18.8	WV- 3152	35.7	24.8
	30.1	18.6		33.5	24.9
	29.6	20.1		32.1	25.3
WV- 20055	26.8	17	WV- 15860	41.9	27.5
	25.3	16.6		43.6	30.7
	24.1	17		42.4	30

10

20

30

40

【 0 3 5 7 】

50

【表 2 6】

表 4A. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

DMD エクソン 51 のスキッピングのためのオリゴヌクレオチドをインビトロで試験した。

オリゴヌクレオチドは 10 μ M で 4 日間投与した。

数字は DMD エクソン 51 のスキッピング量を示す(DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを表す)。

WV-3152	19	20	12	14	WV-20093	35	34	35	38
WV-15860	29	31	26	23	WV-20092	25	26	25	25
WV-20140	1	1	1	1	WV-20091	28	27	30	32
WV-20139	3	3	2	2	WV-20090	21	19	22	22
WV-20138			2	3	WV-20089	8	7	8	9
WV-20137	4	5			WV-20088	22	21	26	25
WV-20136					WV-20087	28	28	33	32
WV-20135	5	5	5	5	WV-20086	25	25	27	26
WV-20134	5	6	5	4	WV-20085	33	31	30	31
WV-20133	17	17	13	13	WV-20084	21	22	21	21
WV-20132	8	8	6	6	WV-20083	21	21	19	17
WV-20131	14	16	12	12	WV-20082	42	37	32	30

10

20

【 0 3 5 8】

30

40

50

【表 2 7】

WV-20130	10	9	8	8	WV-20081	41	41	30	30
WV-20129	12	14	11	11	WV-20080	49	44	26	25
WV-20128	9	9	8	8	WV-20079	42	38	53	51
WV-20127			8	8	WV-20078	27	28	36	35
WV-20126	7	8	8	7	WV-20077	10	10	10	10
WV-20125	8	8	8	8	WV-20076	45	45	45	41
WV-20124	22	21	21	21	WV-20075	40	31	37	42
WV-20123	13	13	14	12	WV-20074	55	57	53	56
WV-20122	11	12	12	11	WV-20073	51	55	51	50
WV-20121	21	22	22	21	WV-20072	41	36	37	36
WV-20120	28	30	32	33	WV-20071	42	40	44	46
WV-20119	52	50			WV-20070	18	18	25	25
WV-20118	39	37	27	26	WV-20069	11	11	10	9
WV-20117	18	17	15	18	WV-20068	20	17	20	18
WV-20116	20	20	17	17	WV-20067	12	9	11	11
WV-20115	8	8	8	6	WV-20066	12	11	13	12
WV-20114	19	20	15	14	WV-20065	16	15	16	14
WV-20113	20	18	17	15	WV-20064	37	35	37	36
WV-20112	16	15	12	12	WV-20063	19		24	22
WV-20111	31	30	33	31	WV-20062	6	6	7	7
WV-20110	14	14	14	12	WV-20061	24	23	26	24
WV-20109	20	21	25	24	WV-20060	16	17	16	17
WV-20108	27	25	22	22	WV-20059	55	42	62	67
WV-20107	20	19	16	14	WV-20058	28	30	33	33
WV-20106	44	42	34	37	WV-20057	37	38	37	34
WV-20105	23	22	18	18	WV-20056	35	34	33	35
WV-20104	41	40	33	28	WV-20055			40	40
WV-20103	48	52	53	53	WV-20054	25	25	35	36
WV-20102	54	52	55	59	WV-20053	43	45	46	46
WV-20101	38	39	38	43	WV-20052	47	47	53	46
WV-20100	52	51	48	50	WV-20051	30	33	30	30
WV-20099	53	51	47	48	WV-20050	29	28	28	26
WV-20098	46	44	45	46	WV-20049	41	41	38	38
WV-20097	47	46	51	48	WV-20049	24	23	22	21
WV-20096	45	41	42	43					
WV-20095	43	41	50	47					
WV-20094	55	50	57	55					

【0359】

DMD 転写物においてエクソン 51 のスキッピングを誘導することが示されている様々なオリゴヌクレオチドを、対応する内部的にランケートされた DMD タンパク質の産生を促進するそれらの能力についてさらに試験した。実験では、抗ジストロフィン抗体 (Abcam, Cambridge, MA) によって認識され、且つエクソン 51 がスキップされた DMD 転写物の転写によって理論的に生成されるサイズに対応するサイズのタンパク質の生成を測定した。実験は、5 μ M のオリゴヌクレオチドによって裸で処理し、7 日間処理した δ 48-50 細胞でインビトロにおいて行った。オリゴヌクレオチド WV-3152 (5 μ M) は、野生型 (健康な) ヒト不死化筋芽細胞で観察された野生型ジストロフィンレベル

に正規化すると、18%の内部的にトランケートされたDMDタンパク質を産生し；WV-15860（5 μM）では31%であった。

【0360】

【表28】

表 4B. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

分化培地中で患者Δ48-50 細胞にオリゴヌクレオチドを4日間投与した。RNA を Trizol 抽出によって回収した。TaqMan シグナルを SFSR9 内部対照に対して正規化した。

数字は DMD エクソン51 のスキッピング量を示す(DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを表す)。

	10uM	3.3uM		10uM	3.3uM
モック	0	0	WV-20058	14.6	4.8
	0	0			
	0	0		12	3.7
	0	0		12.6	3.5
WV-20034	15.9	7	WV-20061	35.8	26.5
	17.1	8.4			
	16.1	7.3		39.3	24.2
	15.3	7.2		39.9	22.8
WV-20037	29.7	18.3	WV-20064	26.5	17.6
	27.2	17.5			
	26.6	19.4		24.5	16.4
	29.2	18.4		27.5	17.1
WV-20040	9.6	4.9	WV-20067	15.7	8.3
	9.1	5.2		16.8	9.3
	11.4	3.5		17.3	8.6
	10.9	2.9		16.3	8.7
WV-20043	20.2	9.6	WV-20070	41.3	26.4
	20.4	9.8		31.7	22.3
	18.9	9.8		39.7	27.2
	21	10.4		38.4	26.9
WV-20046	28.5	14.7	WV-20073	30.9	21.1
	29.8	14.2		26.9	17.9
	29.2	15.8		31.1	20.2
	26.6	14.5		30.7	22.2
WV-20049	20.9	11.6	WV-20076	23.2	16.8
				18.9	11.4
	18.6	12.2		21.8	16.9
	18.4	11.7		22.8	15.8
WV-20052	28.8	18.8	WV-3152	35.7	24.8
	30.1	18.6		33.5	24.9
	29.6	20.1		32.1	25.3
WV-20055	26.8	17	WV-15860	41.9	27.5
	25.3	16.6		43.6	30.7
	24.1	17		42.4	30

10

20

30

40

【0361】

50

【表 2 9】

表 4C. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

分化培地中フリーアップテイク条件下で患者由来Δ48-50 細胞にオリゴヌクレオチドを 4 日間投与した。RNA を Trizol 抽出によって回収した。DMD「スキップされた」転写物及び DMD「全」転写物についての TaqMan シグナルは、SFSR9 内部対照に対して正規化した。

数字はDMDエクソン 51 のスキッピング量を示す(DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを表す)。

	10uM	3.3uM	1.1uM
モック	0.2	0.3	0.2
	0.3	0.2	0.3
	0.2	0	0.2
	0.2	0.6	0.2
WV-7336	3.1	1.6	0.7
	8.9	1.8	0.1
	5.4	1.4	0.9
	4.9	1.5	0.7
WV-3152	32.4	26.5	7.5
	27.2	22.2	8.4
	28	14.5	7.6
	26.8	14.8	7.3
WV-15860	43.3	25.7	10.2
	37.9	23.8	9.6
	38.4	24.5	11.2
	42.4	21.9	11
WV-17859	42.3	26.7	16.3
	41.3	26	16.8
	39.9	22.9	15.5
	48.6	23.6	14.9

10

20

30

【 0 3 6 2 】

40

50

【表 3 0】

WV-17860	38.1	19.3	11.7
	35.3	19.2	12
	41	28.2	16.4
	40.4	21.9	11.1
WV-17861	37.6	22.6	9
	38.8	22.5	8.9
	40.7	24.4	13.2
	41.7	25.4	11.6
WV-17862	38.4	18.9	8.1
	34.1	19.6	9
	34.8	26	10
	36.1	21.4	9.5
WV-17863	32.7	18.2	9.2
	35.1	18.9	9.3
	34.8	18.2	8.6
	30.7	17	9
WV-17864	37.3	23.6	11.7
	41.4	23.3	10.6
	39.9	20.6	17.5
	38.8	21.7	10.2
WV-17865	35.9	16.5	9.3
	34	16.7	7.5
	34.4	17.5	11.9
	34.1	17.8	9.8
WV-17866	48.7	28.4	17.7
	43.3	28.6	13.1
	44.5	24.8	15.4
	45.1	30.5	16.3

10

20

30

40

50

【 0 3 6 3 】

【表 3 1】

表 4D. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

分化培地中フリーアップテイク条件下で患者由来Δ48-50 細胞にオリゴヌクレオチドを 4 日間投与した。24WP からビーズベースの抽出によって RNA を回収した。DMD「スキップされた」転写物及び DMD「全」転写物についての TaqMan シグナルは、SFSR9 内部対照に対して正規化した。数字は DMD エクソン 51 のスキッピング量を示す(DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを表す)。

	10uM	3.3uM		10uM	3.3uM
モック	0	0	WV-20058	14.6	4.8
	0	0			
	0	0		12	3.7
	0	0		12.6	3.5
WV-20034	15.9	7	WV-20061	35.8	26.5
	17.1	8.4			
	16.1	7.3		39.3	24.2
	15.3	7.2		39.9	22.8
WV-20037	29.7	18.3	WV-20064	26.5	17.6
	27.2	17.5			
	26.6	19.4		24.5	16.4
	29.2	18.4		27.5	17.1
WV-20040	9.6	4.9	WV-20067	15.7	8.3
	9.1	5.2		16.8	9.3
	11.4	3.5		17.3	8.6
	10.9	2.9		16.3	8.7
WV-20043	20.2	9.6	WV-20070	41.3	26.4
	20.4	9.8		31.7	22.3
	18.9	9.8		39.7	27.2
	21	10.4		38.4	26.9
WV-20046	28.5	14.7	WV-20073	30.9	21.1
	29.8	14.2		26.9	17.9
	29.2	15.8		31.1	20.2
	26.6	14.5		30.7	22.2
WV-20049	20.9	11.6	WV-20076	23.2	16.8
				18.9	11.4
	18.6	12.2		21.8	16.9
	18.4	11.7		22.8	15.8
WV-20052	28.8	18.8	WV-3152	35.7	24.8
	30.1	18.6		33.5	24.9
	29.6	20.1		32.1	25.3
WV-20055	26.8	17	WV-15860	41.9	27.5
	25.3	16.6		43.6	30.7
	24.1	17		42.4	30

【 0 3 6 4】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表 4E. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

条件及びパラメータ: バイオロジカルデュプリケートでの 96WP における 4 日間の 10uM の Δ 48-50 細胞 (デルタ 48-50) (前分化なし)

試料はビーズ溶解緩衝液中に溶解させてベークし 0-80 で凍結した

ビーズベースの抽出と手作業(Bravo と比べて)での洗浄

数字はDMDエクソン 51 のスキッピング量を示す(DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを表す)。

WV-3152	19	20	12	14	WV-20094	55	50	57	55
WV-15860	29	31	26	23	WV-20093	35	34	35	38
WV-20140	1	1	1	1	WV-20092	25	26	25	25
WV-20139	3	3	2	2	WV-20091	28	27	30	32
WV-20138			2	3	WV-20090	21	19	22	22
WV-20137	4	5			WV-20089	8	7	8	9
WV-20136					WV-20088	22	21	26	25
WV-20135	5	5	5	5	WV-20087	28	28	33	32
WV-20134	5	6	5	4	WV-20086	25	25	27	26
WV-20133	17	17	13	13	WV-20085	33	31	30	31
WV-20132	8	8	6	6	WV-20084	21	22	21	21
WV-20131	14	16	12	12	WV-20083	21	21	19	17
WV-20130	10	9	8	8	WV-20082	42	37	32	30
WV-20129	12	14	11	11	WV-20081	41	41	30	30
WV-20128	9	9	8	8	WV-20080	49	44	26	25
WV-20127			8	8	WV-20079	42	38	53	51
WV-20126	7	8	8	7	WV-20078	27	28	36	35
WV-20125	8	8	8	8	WV-20077	10	10	10	10
WV-20124	22	21	21	21	WV-20076	45	45	45	41
WV-20123	13	13	14	12	WV-20075	40	31	37	42
WV-20122	11	12	12	11	WV-20074	55	57	53	56

【 0 3 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 3 3】

WV-20121	21	22	22	21	WV-20073	51	55	51	50
WV-20120	28	30	32	33	WV-20072	41	36	37	36
WV-20119	52	50			WV-20071	42	40	44	46
WV-20118	39	37	27	26	WV-20070	18	18	25	25
WV-20117	18	17	15	18	WV-20069	11	11	10	9
WV-20116	20	20	17	17	WV-20068	20	17	20	18
WV-20115	8	8	8	6	WV-20067	12	9	11	11
WV-20114	19	20	15	14	WV-20066	12	11	13	12
WV-20113	20	18	17	15	WV-20065	16	15	16	14
WV-20112	16	15	12	12	WV-20064	37	35	37	36
WV-20111	31	30	33	31	WV-20063	19		24	22
WV-20110	14	14	14	12	WV-20062	6	6	7	7
WV-20109	20	21	25	24	WV-20061	24	23	26	24
WV-20108	27	25	22	22	WV-20060	16	17	16	17
WV-20107	20	19	16	14	WV-20059	55	42	62	67
WV-20106	44	42	34	37	WV-20058	28	30	33	33
WV-20105	23	22	18	18	WV-20057	37	38	37	34
WV-20104	41	40	33	28	WV-20056	35	34	33	35
WV-20103	48	52	53	53	WV-20055			40	40
WV-20102	54	52	55	59	WV-20054	25	25	35	36
WV-20101	38	39	38	43	WV-20053	43	45	46	46
WV-20100	52	51	48	50	WV-20052	47	47	53	46
WV-20099	53	51	47	48	WV-20051	30	33	30	30
WV-20098	46	44	45	46	WV-20050	29	28	28	26
WV-20097	47	46	51	48	WV-20049	41	41	38	38
WV-20096	45	41	42	43	WV-20049	24	23	22	21
WV-20095	43	41	50	47					

10

20

30

【 0 3 6 6 】

40

50

【表 3 4】

表 4F. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

デルタ 48-50 細胞を分化培地中フリーアップテイク条件下で 10uM のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。RNA を Agilent ビーズベースプロトコルで抽出し、ランダムヘキサマーで逆転写した。TaqMan アッセイを全 DMD 転写物又はスキップされた転写物に対応するエクソン接合部に標的化した(各ランは hSFSR9 内部対照とマルチプレックス化)。

数字は DMD エクソン 51 のスキッピング量を示す(DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを表す)。

WV-3152	19	20	12	14	WV-20094	55	50	57	55
WV-15860	29	31	26	23	WV-20093	35	34	35	38
WV-20140	1	1	1	1	WV-20092	25	26	25	25
WV-20139	3	3	2	2	WV-20091	28	27	30	32
WV-20138			2	3	WV-20090	21	19	22	22
WV-20137	4	5			WV-20089	8	7	8	9
WV-20136					WV-20088	22	21	26	25
WV-20135	5	5	5	5	WV-20087	28	28	33	32
WV-20134	5	6	5	4	WV-20086	25	25	27	26
WV-20133	17	17	13	13	WV-20085	33	31	30	31
WV-20132	8	8	6	6	WV-20084	21	22	21	21
WV-20131	14	16	12	12	WV-20083	21	21	19	17
WV-20130	10	9	8	8	WV-20082	42	37	32	30
WV-20129	12	14	11	11	WV-20081	41	41	30	30
WV-20128	9	9	8	8	WV-20080	49	44	26	25
WV-20127			8	8	WV-20079	42	38	53	51
WV-20126	7	8	8	7	WV-20078	27	28	36	35
WV-20125	8	8	8	8	WV-20077	10	10	10	10
WV-20124	22	21	21	21	WV-20076	45	45	45	41
WV-20123	13	13	14	12	WV-20075	40	31	37	42
WV-20122	11	12	12	11	WV-20074	55	57	53	56
WV-20121	21	22	22	21	WV-20073	51	55	51	50

【0 3 6 7】

10

20

30

40

50

【表 3 5】

WV-20120	28	30	32	33	WV-20072	41	36	37	36
WV-20119	52	50			WV-20071	42	40	44	46
WV-20118	39	37	27	26	WV-20070	18	18	25	25
WV-20117	18	17	15	18	WV-20069	11	11	10	9
WV-20116	20	20	17	17	WV-20068	20	17	20	18
WV-20115	8	8	8	6	WV-20067	12	9	11	11
WV-20114	19	20	15	14	WV-20066	12	11	13	12
WV-20113	20	18	17	15	WV-20065	16	15	16	14
WV-20112	16	15	12	12	WV-20064	37	35	37	36
WV-20111	31	30	33	31	WV-20063	19		24	22
WV-20110	14	14	14	12	WV-20062	6	6	7	7
WV-20109	20	21	25	24	WV-20061	24	23	26	24
WV-20108	27	25	22	22	WV-20060	16	17	16	17
WV-20107	20	19	16	14	WV-20059	55	42	62	67
WV-20106	44	42	34	37	WV-20058	28	30	33	33
WV-20105	23	22	18	18	WV-20057	37	38	37	34
WV-20104	41	40	33	28	WV-20056	35	34	33	35
WV-20103	48	52	53	53	WV-20055			40	40
WV-20102	54	52	55	59	WV-20054	25	25	35	36
WV-20101	38	39	38	43	WV-20053	43	45	46	46
WV-20100	52	51	48	50	WV-20052	47	47	53	46
WV-20099	53	51	47	48	WV-20051	30	33	30	30
WV-20098	46	44	45	46	WV-20050	29	28	28	26
WV-20097	47	46	51	48	WV-20049	41	41	38	38
WV-20096	45	41	42	43	WV-20049	24	23	22	21
WV-20095	43	41	50	47					

【0 3 6 8】

10

20

30

40

50

【表 3 6】

表 4G. 特定の DMD オリゴヌクレオチドの活性

デルタ 48-50 細胞を分化培地中フリーアップテイク条件下で 10uM のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。RNA を Agilent ビーズベースプロトコルで抽出し、ランダムヘキサマーで逆転写した。TaqMan アッセイを全 DMD 転写物又はスキップされた転写物に対応するエクソン接合部に標的化した(各ランは hSFSR9 内部対照とマルチプレックス化)。

数字は DMD エクソン 51 のスキッピング量を示す(DMD mRNA に対するパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを表す)。

WV-3152	19	20	12	14	WV-20094	55	50	57	55
WV-15860	29	31	26	23	WV-20093	35	34	35	38
WV-20140	1	1	1	1	WV-20092	25	26	25	25
WV-20139	3	3	2	2	WV-20091	28	27	30	32
WV-20138			2	3	WV-20090	21	19	22	22
WV-20137	4	5			WV-20089	8	7	8	9
WV-20136					WV-20088	22	21	26	25
WV-20135	5	5	5	5	WV-20087	28	28	33	32
WV-20134	5	6	5	4	WV-20086	25	25	27	26
WV-20133	17	17	13	13	WV-20085	33	31	30	31
WV-20132	8	8	6	6	WV-20084	21	22	21	21
WV-20131	14	16	12	12	WV-20083	21	21	19	17
WV-20130	10	9	8	8	WV-20082	42	37	32	30
WV-20129	12	14	11	11	WV-20081	41	41	30	30
WV-20128	9	9	8	8	WV-20080	49	44	26	25
WV-20127			8	8	WV-20079	42	38	53	51
WV-20126	7	8	8	7	WV-20078	27	28	36	35
WV-20125	8	8	8	8	WV-20077	10	10	10	10
WV-20124	22	21	21	21	WV-20076	45	45	45	41
WV-20123	13	13	14	12	WV-20075	40	31	37	42

【0 3 6 9】

10

20

30

40

50

【表 3 7】

WV-20122	11	12	12	11	WV-20074	55	57	53	56
WV-20121	21	22	22	21	WV-20073	51	55	51	50
WV-20120	28	30	32	33	WV-20072	41	36	37	36
WV-20119	52	50			WV-20071	42	40	44	46
WV-20118	39	37	27	26	WV-20070	18	18	25	25
WV-20117	18	17	15	18	WV-20069	11	11	10	9
WV-20116	20	20	17	17	WV-20068	20	17	20	18
WV-20115	8	8	8	6	WV-20067	12	9	11	11
WV-20114	19	20	15	14	WV-20066	12	11	13	12
WV-20113	20	18	17	15	WV-20065	16	15	16	14
WV-20112	16	15	12	12	WV-20064	37	35	37	36
WV-20111	31	30	33	31	WV-20063	19		24	22
WV-20110	14	14	14	12	WV-20062	6	6	7	7
WV-20109	20	21	25	24	WV-20061	24	23	26	24
WV-20108	27	25	22	22	WV-20060	16	17	16	17
WV-20107	20	19	16	14	WV-20059	55	42	62	67
WV-20106	44	42	34	37	WV-20058	28	30	33	33
WV-20105	23	22	18	18	WV-20057	37	38	37	34
WV-20104	41	40	33	28	WV-20056	35	34	33	35
WV-20103	48	52	53	53	WV-20055			40	40
WV-20102	54	52	55	59	WV-20054	25	25	35	36
WV-20101	38	39	38	43	WV-20053	43	45	46	46
WV-20100	52	51	48	50	WV-20052	47	47	53	46
WV-20099	53	51	47	48	WV-20051	30	33	30	30
WV-20098	46	44	45	46	WV-20050	29	28	28	26
WV-20097	47	46	51	48	WV-20049	41	41	38	38
WV-20096	45	41	42	43	WV-20049	24	23	22	21
WV-20095	43	41	50	47					

【 0 3 7 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 8】

表 4H. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性

分化培地中フリーアップテイク条件下でδ48-50 細胞を 10uM のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。

数字は DMD エキソン 51 のスキッピング量を示す(全 DMD mRNA のパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。他の実験と同様に、オリゴヌクレオチドの複数の数字はデュプリケートを表す。

モック	0.2	0.2	WV-20004	42.7	45.8
WV-20119	47.7	45.9	WV-20003	35.9	28.3
WV-3152	25.2	15	WV-20002	44.6	38.8
WV-20064	44.5	30.4	WV-20001	33	17.5
WV-20048	38.3	36.8	WV-20000	31.9	19.4
WV-20047	37.2	35.1	WV-19999	29.9	25.1
WV-20045	45.4	38.7	WV-19998	30.3	24.1
WV-20044	30.4	29.6	WV-19997	35	25.4
WV-20043	38.3	32.1	WV-19996	14.3	11.2
WV-20042	42.3	34.6	WV-19995	16.3	11.5
WV-20041	37.9	25.2	WV-19994	20.5	15
WV-20040	31.4	24.9	WV-19993	30.6	20.6
WV-20039	39.3	30	WV-19992	41.5	35.9
WV-20038	27.8	15.4	WV-19991	38.7	35.2
WV-20037	34.6	24.2	WV-19990	27.6	21.4
WV-20036	22.9	21.5	WV-19989	45	33
WV-20035	27.8	16.2	WV-19988	37.4	34.4
WV-20034	25.1	13.3	WV-19987	46	39.5
WV-20033	36.8	26.3	WV-19986	41.2	35.2
WV-20032	34.1	22.6	WV-19985	50.6	42.7
WV-20031	37.4	29.3	WV-19984	39	34.3
WV-20030	32.4	31.9	WV-19983	34.4	27.1

【 0 3 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 3 9】

WV-20029	45.1	32.6	WV-19982	38	33.3
WV-20028	39.3	41	WV-19981	32.8	23.8
WV-20027	45.5	38.8	WV-19980	46.4	37
WV-20026	41.1	28.3	WV-19979	45.4	41.6
WV-20025	43.6	32.6	WV-19978	33.1	22.1
WV-20024	32.1	20.4	WV-19977	39.3	30.9
WV-20023	29.5	19.1	WV-19976	31	21.6
WV-20022	43	39.3	WV-19975	23.4	19.4
WV-20021	49.2	33.1	WV-19974	28	15.3
WV-20020	43.3	42.3	WV-19973	31.9	22
WV-20019	26.5	16.4	WV-19972	30.8	28.9
WV-20018	43.2	37.4	WV-19971	26.5	14.4
WV-20017	49.6	33.2	WV-19970	23.8	15.5
WV-20016	48.9	45.1	WV-19969	11.7	7.9
WV-20015	45	40.7	WV-19968	2.3	1.5
WV-20014	44.1	39.3	WV-19967	2.4	1.1
WV-20013	64.3	40.8	WV-19966	1.9	1
WV-20012	48.5	46.3	WV-19965	1.7	0.7
WV-20011	54.5	49.9	WV-19964	0.8	0.7
WV-20010	46.4	34.6	WV-19963	1.7	0.7
WV-20009	51.2	44.7	WV-19962	0.3	0.4
WV-20008	45.6	43.2	WV-19961	4.1	2.1
WV-20007	43.5	39.3	WV-19960	2.8	1.9
WV-20006	43.9	38.8	WV-19959	14	10.6
WV-20005	41	28.8	WV-19958	8.3	5.7
			WV-19957	5.5	4.5

【 0 3 7 2 】

10

20

30

40

50

【表 40】

表 4I. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性

分化培地中フリーアップテイク条件下で δ 48-50 細胞を 1 μ M のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。

数字はDMD エキソン 51 のスキッピング量を示す(全 DMD mRNA のパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。

モック	0.6	0.2	WV-20003	4.9	12.6
WV-3152	6	6.1	WV-20002	26.8	27.4
WV-20064	22.3	22	WV-20001	13.3	15.4
WV-20119	36.3	29.9	WV-20000	10.1	17.5
WV-20048	10.2	12.2	WV-19999	3.9	4.8
WV-20047	8.8	10	WV-19998	5.1	5.6
WV-20045	9.6	12.6	WV-19997	11.8	13.4
WV-20044	3.6	2.9	WV-19996	3	2.7
WV-20043	3.4	2.1	WV-19995	0.9	1.3
WV-20042	8.7	15.2	WV-19994	4.1	4.3
WV-20041	8.9	8.1	WV-19993	9	10.7
WV-20040	3.6	3.7	WV-19992	25.2	22.4
WV-20039	1.3	2.4	WV-19991	7.8	14
WV-20038	4	3	WV-19990	5	4.5
WV-20037	6.3	7.3	WV-19989	16	22
WV-20036	5.3	3.6	WV-19988	9.3	5.9
WV-20035	3.1	4.3	WV-19987	4.5	10.3
WV-20034	4.5	3.9	WV-19986	6.2	5.2
WV-20033	8.7	10.6	WV-19985	13.9	14.8
WV-20032	8.8	12.4	WV-19984	7	6.8
WV-20031	4	4.2	WV-19983	1.2	3.5
WV-20030	4.7	3.6	WV-19982	2.2	4.1
WV-20029	3	4.6	WV-19981	2.1	4.4
WV-20028	10	4.5	WV-19980	4	2.7
WV-20027	2.3	4.3	WV-19979	4.4	9
WV-20026	9.6	7.7	WV-19978	4.1	4.5
WV-20025	11.1	12.1	WV-19977	5.4	8.1
WV-20024	9.6	8.6	WV-19976	4.5	3.1
WV-20023	3.3	5.7	WV-19975	2.4	2.7

【0373】

10

20

30

40

50

【表 4 1】

WV-20022	13.5	16.7	WV-19974	5.5	6
WV-20021	18.5	25.2	WV-19973	10.5	9.5
WV-20020	10.1	5.2	WV-19972	10.1	8.6
WV-20019	2.6	3.5	WV-19971	3.6	4
WV-20018	20.4	20.1	WV-19970	7.3	11.2
WV-20017	20.7	27.2	WV-19969	3.4	5.5
WV-20016	39.4	39.6	WV-19968	1.4	1.2
WV-20015	9.4	19.7	WV-19967	0.8	1
WV-20014	16.8	38.7	WV-19966	0.6	1.1
WV-20013	25.1	31.5	WV-19965	0.4	0.7
WV-20012	16.8	7.4	WV-19964	0.4	0.3
WV-20011	25.1	42.8	WV-19963	0.5	0.6
WV-20010	20.6	26.5	WV-19962	0.6	1
WV-20009	39.2	38.9	WV-19961	1	1.4
WV-20008	30.6	40.1	WV-19960	0.8	1.1
WV-20007	15.3	16.7	WV-19959	2.1	4
WV-20006	14	16.7	WV-19958	2.8	4.5
WV-20005	13.7	13.8	WV-19957	1.4	1.9
WV-20004	9	7.5			

10

20

30

40

50

【 0 3 7 4 】

【表 4 2】

表 4J. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性

分化培地中フリーアップテイク条件下で δ 48-50 細胞を 10 μ M のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。

数字は DMD エキソン 51 のスキッピング量を示す(全 DMD mRNA のパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。

モック	0	0	WV-19921	4	3
WV-3152	56	51	WV-19920	5	5
WV-20064	73	64	WV-19919	2	2
WV-20102	78	81	WV-19918	3	3
WV-20119	79	80	WV-19917	2	1
WV-19953	18	17	WV-19916	1	1
WV-19952	22	21	WV-19915	2	3
WV-19951	32	27	WV-19914	1	2
WV-19950	52	46	WV-19913	1	1
WV-19949	31	35	WV-19912	1	1
WV-19948	18	22	WV-19911	3	2
WV-19947	14	11	WV-19910	2	2
WV-19946	18	15	WV-19909	2	3
WV-19945	10	10	WV-19908	1	1
WV-19944	37	34	WV-19907	2	2
WV-19943	15	14	WV-19906	1	1
WV-19942	43	45	WV-19905	1	2
WV-19941	38	37	WV-19904	3	3
WV-19940	37	40	WV-19903	5	6
WV-19939	36	36	WV-19902	9	13
WV-19938	20	20	WV-19901	20	18
WV-19937	4	4	WV-19900	26	24
WV-19936	10	10	WV-19899	20	23
WV-19935	11	10	WV-19898	17	18
WV-19934	14	12	WV-19897	3	4
WV-19933	9	10	WV-19896	2	2
WV-19932	15	18	WV-19895	0	0
WV-19931	12	13	WV-19894	0	0
WV-19930	13	13	WV-19893	0	0
WV-19929	26	24	WV-19892	0	0
WV-19928	17	17	WV-19891	0	0
WV-19927	7	6	WV-19890	0	0
WV-19926	8	9	WV-19889	0	0
WV-19925	3	3	WV-19888	0	0
WV-19924	3	3	WV-19887	0	0
WV-19923	3	3	WV-19886	0	0
WV-19922	3	3			

【 0 3 7 5 】

10

20

30

40

50

【表 4 3】

表 4K. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性

分化培地中フリーアップテイク条件下でδ48-50 細胞を 3、1 又は 0.3uM のオリゴヌクレオチドによって 3 日間処理した。

数字はDMDエキソン51のスキッピング量を示す(全DMD mRNAのパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。

	3uM		1uM		0.3uM	
水	0.1	0.1	0.3	0.1	0.2	0.4
WV-3152	12.4	12	4.3	3.8	1.6	1.5
WV-20064	23.6	22.3	6.9	4.7	1.7	0.4
WV-20120	17.9	21.6	3.3	4.4	0.9	0.9
WV-20119	30.3	38.3	7.4	7	1.6	1.5
WV-20118	26.4	29.4	6.5	5	1.5	1
WV-20103	26.2	27.6	8.9	9.6	1.7	1.9
WV-20102	25.7	29	11.6	12.8	1.8	2.7
WV-20101	27.1	30.2	8.8	10.3	1.8	1.7
WV-20100	33.9	35.7	9.9	11.6	2.1	2.2
WV-20099	37.4	38.3	12.1	12.4	2.7	2.1
WV-20098	35.5	34.1	11.1	12.9	2.2	2.5
WV-20097	24.1	28.6	10.6	8.3	2.4	2.2
WV-20096	29.8	29.9	8.9	8.9	1.2	2.2
WV-20095	42.2	37.7	8.7	9.1	1.8	2

10

20

【0 3 7 6】

30

40

50

【表 4 4】

WV-20094	36.7	43.9	10.9	14.9	2.2	2.1
WV-20076	28.4	32	8.8	10.1	1.9	2
WV-20075	37.5	36.7	9.1	11.1	1.7	2
WV-20074	35.8	43.5	10.5	11.4	2	2
WV-20073	29.7	35.4	9.1	8.1	1.3	1.5
WV-20072	30.2	34.4	4.9	5.5	0.7	0.7
WV-20071	33.7	37.5	10.8	8.8	1.8	1.6
WV-20059	34.8	42.8	16.4	15.7	2.6	2.5
WV-20058	22.9	26	5.3	6	1.1	0.8
WV-20057	20.4	30.7	5.8	7.9	1.7	1.2
WV-20054	17.1	27	5.1	5.1	1.1	1.5
WV-20053	48.8	36.2	6.6	11.8	2.1	1.9
WV-20052	46.5	52.9	13.9	16.5	1.5	3.6
WV-20021	27.5	26.8	5.6	5.7	0	0
WV-20018	32.2	24.2	5.1	4.9	1.2	1.5
WV-20017	34.5	36.6	4.1	5	1.2	1
WV-20016	28.8	32.4	5.7	6.9	1.6	2.1
WV-20015	29	54	10	12	2	2
WV-20014	21	39	8	5	1	2
WV-20013	13	14	9	6	1	1
WV-20012	42	44	12	12	2	2
WV-20011	39	64	20	17	3	5
WV-20010	28	33	7	11	2	2
WV-20009	35	36	12	11	2	2
WV-20008	34	34	13	10	1	2
WV-20007	52	31	6	6	0	1
WV-20002	27	49	8	7	1	1
WV-19992	28	35	7	5	1	1
WV-19989	20	22	6	5	2	1
WV-19950	22	37	8	6	3	2

10

20

30

【 0 3 7 7 】

40

50

【表 4 5】

表 5A. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性。

分化培地中フリーアップテイク条件下でδ48-50 細胞を 5 または 1μM のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。

数字は DMD エキソン 51 のスキッピング量を示す(全 DMD mRNA のパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。

	5μM		1μM	
WV-20052	4.7	3.1	0.9	1.4
WV-31538	1.4	0.7	0.3	0.1
WV-31550	1.2	1.1	0.3	0.2
WV-31562	3.5	2.4	0.6	0.5
WV-31574	3.4	1.4	0.7	1.1
WV-31200	2.5	2	0.1	0.2
WV-20074	6.3	6.8	1.3	1.2
WV-31541	2.4	1.6	0.5	0.5
WV-31553	1.9	2.6	0.1	0.4
WV-31565	6	4.6	0.6	0.8
WV-31577	1.7	0.5	0.5	0.4
WV-31211	2.1			0.2
WV-20075	2.9	3	0.6	1.8
WV-31542	1.6	2.1	0.8	0.4
WV-31554	2	3	1.1	1
WV-31566	2.7	3.5	1.5	1.5
WV-31578	3.1	4	2	2.3
WV-31212	1	1.7	0	0
WV-20094	7.6	5.5	1.9	1.7
WV-31544	1.6	1.4	0.4	0.2
WV-31556	1.2	1.6	0.9	0.9
WV-31568	2.9	3.6	0.5	0.4
WV-31580	1.5	4.5	0.4	0.3
WV-31214	2.1		0.1	0.1

10

20

30

40

50

【 0 3 7 8】

【表 4 6】

表 5B. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性。

分化培地中フリーアップテイク条件下でδ48-50 細胞を 5uM のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。

数字は DMD エキソン 51 のスキッピング量を示す(全 DMD mRNA のパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。

	5uM			5uM	
H ₂ O	0	0	WV-31567	5.5	4.6
WV-3152	2.8	2.9	WV-31579	3.7	4
WV-20011	9.7	11.5	WV-31588	3.8	3.8
WV-31537	6.3	5.7	WV-20097	10.6	10.8
WV-31549	3.6	3.4	WV-31545	2.8	2.8
WV-31561	6.9	7.5	WV-31557	1.9	2.1
WV-31573	7.9	8.1	WV-31569	7.9	8.1
WV-31585	2.8	2.7	WV-31581	4.6	4.4
WV-20059	9.2	9			
WV-31539	3	3.1	WV-20098	7.4	7.9
WV-31551	2.3	2.2	WV-31546	4.7	4.5
WV-31563	5.6	5.5	WV-31558	5.2	5.6
WV-31575	3.6	3.7	WV-31570	6.4	7.1
WV-31586	2.5	2.4	WV-31582	8.5	8.4
WV-20073	10.1	10.6			
WV-31540	3.6	3.8	WV-20101	6.2	6.5
WV-31552	4.2	4.1	WV-31547	3	3.5
WV-31564	7.7	7.6	WV-31559	2	2.2
WV-31576	8	7.5	WV-31571	4.5	5.1
WV-31587	2.9	3	WV-31583	5.5	5.6
WV-20076	8.6	8.4			
WV-31543	2.7	2.6	WV-20119	7.3	7.1
WV-31555	1.8	1.7	WV-31548	1.4	1.4
WV-31572	3.9	3.9	WV-31560	1.4	1.6
WV-31584	4.9	5			

【 0 3 7 9 】

10

20

30

40

50

【表 4 7】

表 5C. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性。

分化培地中フリーアップテイク条件下でδ48-50 細胞を 5 または 1uM のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。

数字はDMD エキソン 51 のスキッピング量を示す(全DMD mRNA のパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。

	5uM		1uM	
水	0	0	0	0
WV-3152	13.2	9.3	3.3	3.4
WV-31562	26.2	17	5.5	4.1
WV-31574		16.3	5.2	5.2
WV-31565	47.5	23.7	11.1	10.6
WV-31566	26	16.7	4.9	4.6
WV-31578	34	23.7	7.2	8.2
WV-31568	40.2	34.7	9.1	8.6
WV-31580	40.6	27.6	8.8	9.3
WV-31561	36.3	22.4	8.8	7.5
WV-31573	36.5	28.2	9.6	7.9
WV-31563	26.2	24.7	5.7	4.5
WV-31564	38.2	33.6	9.5	6.8
WV-31576	45	38.8	11.5	8.2
WV-31567	26.4	19.8	6	4.1
WV-31579	20.6	23.4	4.2	4.1
WV-31569	38.8	26.5	6.5	5.1
WV-31581	19.6	16.6	4	2.6
WV-31570	26.6	26.2	6.8	6.4
WV-31582	43.1	27.3	13	10.8
WV-31571	18.6	13.9	3.1	3.7
WV-31583	24.8	18.1	4.6	4.9
WV-31572	18	14	2.8	3.4
WV-31584	20.5	17.9	4.3	3.9

【 0 3 8 0 】

10

20

30

40

50

【表 4 8】

表 5D. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性。

分化培地中フリーアップテイク条件下でδ48-50 細胞を 5 または 1μM のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。

数字はDMDエキソン51のスキッピング量を示す(全DMD mRNAのパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。

	5μM		1μM	
モック	0	0	0	0
WV-3152	1.9	1	0.7	0
WV-20011	5.8	6	3.3	3
WV-20059	7.4	5.1	2.7	1.1
WV-20052	5.3	3	2.2	0.9
WV-30285	5.9	5.4	1.9	0.6
WV-20053	6.7	5.1	1.7	1.5
WV-20071	5.3	3.5	1.5	0.7
WV-20072	3.6	4.3	0.6	0.2
WV-20073	6.6	2.4	0.6	0.9
WV-20074	6.2	1.1	1.7	1.9
WV-20075	3.2	2.4	1.2	1.2
WV-20076	4.1	4.5	1.9	2
WV-20096	4.4	8.1	2.6	2
WV-30233	7.7	4.6	3	1.7
WV-20097	6	7	3	2.6
WV-20098	5.1	4.3	1.3	1.4
WV-30234	5.6	7.8	0.7	1.9
WV-20099	8.2	6.8	2.5	1.8
WV-20009	9.2	8.5	2.3	0.9
WV-30235	1.7	0.5	0.8	0.1
WV-30236	4.2	0.6	0.2	0.1

【 0 3 8 1 】

10

20

30

40

50

【表 4 9】

表 5E. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性。

分化培地中フリーアップテイク条件下でδ48-50 細胞を 5uM のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。

数字は DMD エキソン 51 のスキッピング量を示す(全 DMD mRNA のパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。

	5uM			5uM	
水	0.1	0.0	WV-31197	0.0	2.0
WV-3152	2.0	2.1	WV-31198	1.4	1.6
WV-31565	5.0	5.5	WV-31199	1.1	1.1
WV-31578	4.2	4.8	WV-31200	1.6	1.6
WV-31567	3.0	4.1	WV-31201	1.3	1.4
WV-31569	7.4	6.7	WV-31202	1.3	1.1
WV-31582	8.5	8.2	WV-31203	1.1	1.0
WV-32693	8.5	7.3	WV-31204	0.8	0.9
WV-32694	11.2	11.6	WV-31205	1.1	1.3
WV-31570	6.6	6.0	WV-31206	0.8	0.8
WV-31561	4.0	3.9	WV-31207	2.2	1.9
WV-31573	5.5	5.6	WV-31208	1.3	1.3
WV-31179	1.6	1.8	WV-31209	1.6	1.7
WV-31180	1.0	1.1	WV-31210	3.4	3.6
WV-31181	0.9	0.8	WV-31211	3.4	3.4
WV-31182	1.3	1.6	WV-31212	1.7	1.9
WV-31183	1.0	0.9	WV-31213	1.7	1.7
WV-31184	1.0	0.6	WV-31214	3.1	2.9
WV-31185	1.3	1.3	WV-31215	1.5	2.0
WV-31186	1.4	1.5	WV-31216	1.9	2.2
WV-31187	1.0	1.1	WV-31217	2.6	3.7
WV-31188	1.8	2.0	WV-31218	1.4	1.8
WV-31189	3.2	3.1	WV-31219	2.5	2.6
WV-31190	2.7	2.4	WV-31220	2.3	1.9
WV-31191	3.2	3.0	WV-31221	1.8	1.3
WV-31192	3.5	4.0	WV-31222	1.9	1.5
WV-31193	0.0	2.1	WV-31223	1.3	1.1
WV-31194	0.0	1.9	WV-31224	1.1	1.0
WV-31195	0.0	2.6	WV-31225	2.1	1.7
WV-31196	0.0	2.1	WV-31226	0.9	0.9

【 0 3 8 2 】

10

20

30

40

50

【表 50】

表 5F. 特定の DMD のオリゴヌクレオチドの活性。

分化培地中フリーアップテイク条件下で δ 48-50 細胞を 5uM のオリゴヌクレオチドによって 4 日間処理した。

数字は DMD エキソン 51 のスキッピング量を示す(全 DMD mRNA のパーセンテージとしての量、100 であれば 100%がスキップされたことを示す)。

	5uM			5uM	
水	0.0	0.0	WV-31197	0.0	1.6
WV-3152	2.7	1.3	WV-31198	2.2	2.4
WV-31565	8.4	11.0	WV-31199	1.5	1.6
WV-31578	7.2	8.7	WV-31200	1.9	2.4
WV-31567	2.7	7.3	WV-31201	1.8	2.4
WV-31569	14.3	14.7	WV-31202	1.7	1.7
WV-31582	14.7	16.9	WV-31203	0.8	1.4
WV-32693	15.6	15.0	WV-31204	1.7	1.2
WV-32694	24.1	23.5	WV-31205	1.0	2.1
WV-31570	6.9	10.6	WV-31206	1.5	1.2
WV-31561	6.8	4.9	WV-31207	0.0	1.7
WV-31573	8.8	8.6	WV-31208	0.0	1.4
WV-31179	2.3	2.8	WV-31209	0.0	2.5
WV-31180	1.7	1.0	WV-31210	6.4	5.8
WV-31181	1.2	1.1	WV-31211	6.2	4.5
WV-31182	2.0	2.2	WV-31212	2.8	3.0
WV-31183	1.6	1.5	WV-31213	2.8	2.7
WV-31184	1.2	1.3	WV-31214	4.7	4.4
WV-31185	1.8	1.9	WV-31215	2.3	2.2
WV-31186	1.9	2.3	WV-31216	2.5	2.4
WV-31187	1.6	1.8	WV-31217	4.9	1.7
WV-31188	2.6	2.9	WV-31218	2.7	2.6
WV-31189	4.9	4.9	WV-31219	4.7	4.0
WV-31190	3.8	3.8	WV-31220	3.5	1.8
WV-31191	5.2	4.5	WV-31221	2.8	2.3
WV-31192	5.9	6.6	WV-31222	2.8	2.3
WV-31193	0.0	4.1	WV-31223	1.8	1.7
WV-31194	0.0	2.7	WV-31224	1.5	1.6
WV-31195	0.0	1.3	WV-31225	3.5	1.6
WV-31196	4.0	6.2	WV-31226	1.8	1.5

【0383】

DMD オリゴヌクレオチド、その活性、その合成及び使用並びに他の態様に関連する追加情報は、国際公開第 2019 / 200185 号及び同第 2019 / 217784 号で得ることができ、その DMD オリゴヌクレオチドは、参照により本明細書に援用される。

【0384】

オリゴヌクレオチド及び組成物の例示的調製方法

とりわけ、本開示は、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ヌクレオチドを含め、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技術（方法、試薬、条件、精製方法等）を提供する。本開示に係る提供さ

れるオリゴヌクレオチド及びその組成物の調製には、限定はされないが、米国特許第 9 6 9 5 2 1 1 号、米国特許第 9 6 0 5 0 1 9 号、米国特許第 9 5 9 8 4 5 8 号、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 8 6 1 2 号、米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 2 1 1 0 0 6 号、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 3 7 3 9 9 号、国際公開第 2 0 1 7 / 0 1 5 5 5 5 号、国際公開第 2 0 1 7 / 0 6 2 8 6 2 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 6 0 7 4 1 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 6 4 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 7 9 号、国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 0 6 4 7 号、国際公開第 2 0 1 8 / 2 2 3 0 5 6 号、国際公開第 2 0 1 8 / 2 3 7 1 9 4 号、国際公開第 2 0 1 9 / 0 5 5 9 5 1 号、国際公開第 2 0 1 9 / 2 0 0 1 8 5 号及び／又は国際公開第 2 0 1 9 / 2 1 7 7 8 4 号（これらの各々の調製技術は、参照により本明細書に援用される）に記載されるものを含め、本明細書に記載されるとおりの様々な技術（方法、試薬、条件、精製方法等）を利用することができる。

10

【0385】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド、例えばキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは 50 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 55 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 60 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 65 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 70 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 75 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 80 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 85 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 90 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 91 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 92 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 93 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 94 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 95 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 96 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 97 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 98 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 99 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 99.5 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 99.6 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 99.7 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 99.8 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは約 99.9 % を上回る純度である。一部の実施形態において、提供されるキラル制御された DMD オリゴヌクレオチドは少なくとも約 99 % を上回る純度である。

20

30

40

【0386】

一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物、例えばキラル制御された DMD オリゴヌクレオチド組成物は、単一のオリゴヌクレオチドタイプを含むように設計された組成物である。特定の実施形態において、かかる組成物は約 50 % のジア

50

ステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 50 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 50 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 55 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 60 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 65 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 70 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 75 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 80 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 85 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 90 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 91 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 92 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 93 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 94 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 95 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 96 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 97 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 98 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 99 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 99.5 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 99.6 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 99.7 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 99.8 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は約 99.9 % のジアステレオ純度である。一部の実施形態において、かかる組成物は少なくとも約 99 % のジアステレオ純度である。

10

20

30

40

50

【0387】

とりわけ、本開示は、オリゴヌクレオチド、例えば DMD オリゴヌクレオチドの立体選択的な（ステレオランダム又はラセミ体でない）調製についての課題を認識する。とりわけ、本開示は、多重の（例えば、5、6、7、8、9又は10個以上の）インターヌクレオチド結合を含むオリゴヌクレオチドの、及び特に多重の（例えば、5、6、7、8、9又は10個以上の）キラルインターヌクレオチド結合を含む DMD オリゴヌクレオチドについての立体選択的調製のための方法及び試薬を提供する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば DMD オリゴヌクレオチドのステレオランダムな又はラセミ体の製剤では、少なくとも1つのキラルインターヌクレオチド結合が、90：10、95：5、96：4、97：3又は98：2未満のジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドの立体選択的な又はキラル制御された製剤について、各キラルインターヌクレオチド結合が90：10、95：5、96：4、97：3又は98：2より高いジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチドの立体選択的な又はキラル制御された製剤について、各キラルインターヌクレオチド結合が95：5より高いジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチドの立体選択的な又はキラル制御された製剤について、各キラルインターヌクレオチド結合が96：4より高いジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチドの立体選択的な又はキラル制御された製剤について、各キラルインターヌクレオチド結合が97：3より高いジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチドの立体選択的な又はキラル制御された製剤について、各キラルインターヌクレオチド結合が98：2より高いジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態において、DMD オリゴヌクレオチドの立体選択的な又はキラル制御された製剤について、各キラルインターヌクレオチド結合が99：1より高いジアステレオ選択性で形成される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば DMD オリゴヌクレオチド中のキラルインターヌクレオチド結合のジアステレオ選択性は、モデル反応、例えば本

質的に同じ又は同等の条件下での二量体の形成を通じて測定され得、ここで、二量体は、キラルインターヌクレオチド結合と同じインターヌクレオチド結合を有し、二量体の5'-ヌクレオシドはキラルインターヌクレオチド結合の5'末端に対するヌクレオシドと同じであり、及び二量体の3'-ヌクレオシドはキラルインターヌクレオチド結合の3'末端に対するヌクレオシドと同じである。

【0388】

一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物は、多数のDMDオリゴヌクレオチドタイプを含むように設計された組成物である。一部の実施形態では、本開示の方法により、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドのライブラリの作成が可能であり、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DMDオリゴヌクレオチドタイプを任意の1つ以上の他のキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドタイプと混合してキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を作り出すことができるようになる。一部の実施形態において、予め選択された量のDMDオリゴヌクレオチドタイプは、上述のジASTEレオマー純度のいずれか1つを有する組成物である。

10

【0389】

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド（例えば、DMDオリゴヌクレオチド）の作製方法を提供し、この方法は、

- (1) カップリングステップ；
- (2) キャッピングステップ；
- (3) 任意選択で修飾ステップ；
- (4) 脱ブロック化ステップ；及び
- (5) 望ましい長さが実現するまでステップ(1)～(4)を繰り返すステップ

20

を含む。

【0390】

一部の実施形態において、本開示は、例えばDMDオリゴヌクレオチドを調製する方法を提供し、この方法は、1つ以上のサイクルを含み、その各々は、独立に、

- (1) カップリングステップ；
- (2) 任意選択で修飾前キャッピングステップ；
- (3) 修飾ステップ；
- (4) 任意選択で修飾後キャッピングステップ；及び
- (5) 任意選択で脱ブロック化ステップ

30

を含む。

【0391】

一部の実施形態において、サイクルは、1つ以上の修飾前キャッピングステップを含む。一部の実施形態において、サイクルは、1つ以上の修飾後キャッピングステップを含む。一部の実施形態において、サイクルは、1つ以上の修飾前及び修飾後キャッピングステップを含む。一部の実施形態において、サイクルは、1つ以上の脱保護ステップを含む。一部の実施形態において、サイクルは、カップリングステップ、修飾前キャッピングステップ、修飾ステップ、修飾後キャッピングステップ及び脱保護ステップを含む。一部の実施形態において、サイクルは、カップリングステップ、修飾前キャッピングステップ、修飾ステップ及び脱保護ステップを含む。一部の実施形態において、サイクルは、カップリングステップ、修飾前キャッピングステップ、修飾ステップ、修飾後キャッピングステップ及び脱保護ステップを含む。一部の実施形態において、サイクルは、カップリングステップ、修飾前キャッピングステップ、修飾ステップ、修飾後キャッピングステップ及び脱保護ステップを含む。一部の実施形態において、1つ以上のサイクルは、カップリングステップ、修飾前キャッピングステップ、修飾ステップ及び脱保護ステップを含む。一部の実施形態において、1つ以上のサイクルは、カップリングステップ、修飾ステップ、修飾後キャッピングステップ及び脱保護ステップを含む。

40

【0392】

提供される方法を記載するとき、語句「サイクル」は、当業者が理解するとおりのその通

50

常の意味を有する。一部の実施形態において、1ラウンドのステップ(1)～(4)がサイクルと称される。一部の実施形態において、一部のサイクルは、修飾することを含む。一部の実施形態において、一部のサイクルは、修飾することを含まない。一部の実施形態において、一部のサイクルは修飾することを含み、一部のサイクルは修飾することを含まない。一部の実施形態において、各サイクルは、独立に、修飾ステップを含む。一部の実施形態において、各サイクルはサイクリングステップを含まない。

【0393】

一部の実施形態において、キラル制御されたインターヌクレオチド結合を形成するため、キラル補助基を含むキラル的に純粋なホスホロアミダイトを利用してキラル制御されたインターヌクレオチド結合を立体選択的に形成する。本開示では、様々なホスホロアミダイト及びキラル補助基、例えば米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/217784号（これらの各々のホスホロアミダイト及びキラル補助基は、参照により本明細書に援用される）に記載されるものを利用し得る。

10

20

【0394】

一部の実施形態において、かかるインターヌクレオチド結合は中性インターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、かかるインターヌクレオチド結合は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である。一部の実施形態において、かかるインターヌクレオチド結合は、キラル補助基部分を含む。一部の実施形態において、かかるインターヌクレオチド結合は、キラル補助基部分を含まない。一部の実施形態において、キラル補助基部分は修飾中に外れ落ちる。

【0395】

提供される技術は様々な利点を提供する。とりわけ、本明細書において実証されたとおり、提供される技術は、特に、治療目的に決定的に重要な幾つもの特性及び活性をもたらす修飾された及び／又はキラル的に純粋なオリゴヌクレオチド、例えばDMDオリゴヌクレオチドについて、オリゴヌクレオチド合成粗純度及び収率を大幅に改良することができる。治療的に重要なDMDオリゴヌクレオチドについて予想外にも高い粗純度及び収率をもたらす能力により、提供される技術は製造コストを（例えば、精製の簡略化、全収率の大幅な改良等を通じて）大きく削減することができる。一部の実施形態において、提供される技術は容易にスケールアップすることができ、DMDオリゴヌクレオチドを臨床目的に十分な量及び品質で生産し得る。一部の実施形態において、G2に電子求引基を含むキラル補助基（例えば、PSMキラル補助基）を含む提供される技術は、P-N結合を含むキラル制御されたインターヌクレオチド結合（例えば、n001の非負電荷インターヌクレオチド結合）の調製に特に有用であり、製造作業を大きく簡略化し、コストを削減し、及び／又は下流形成を促進することができる。

30

40

【0396】

一部の実施形態において、提供される技術は、試薬適合性の改良をもたらす。例えば、本開示において実証されたとおり、提供される技術は、特にキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド合成について、酸化、硫化及び／又はアジド反応に異なる試薬系を使用する柔軟性をもたらす。

【0397】

とりわけ、本開示は、高い粗純度のDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態において、本開示は、高い粗純度のキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態において、本開示は、高い粗純度のキラル制御された

50

DMDオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、本開示は、高い粗純度及び／又は高い立体純度のDMDオリゴヌクレオチドを提供する。

【0398】

支持体及びリンカー

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは溶液中で調製され得る。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは支持体を使用して調製され得る。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは固体支持体を使用して調製される。本開示において利用することができる好適な支持体としては、例えば、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/217784号（これらの各々の固体支持体は、参照により本明細書に援用される）に記載される固体支持体が挙げられる。

10

【0399】

一部の実施形態において、合成中にオリゴヌクレオチド鎖を支持体に連結するため、リンカー部分が利用される。好適なリンカーは当技術分野で広く利用されており、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/217784号（これらの各々のリンカーは、参照により本明細書に援用される）に記載されるものが挙げられる。

20

【0400】

一部の実施形態において、結合部分はスクシンアミド酸リンカー、又はコハク酸リンカー（ $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ）、又はオキサリルリンカー（ $-\text{CO}-\text{CO}-$ ）である。一部の実施形態において、結合部分とヌクレオシドとはエステル結合で一体に結合される。一部の実施形態において、結合部分とヌクレオシドとはアミド結合で一体に結合される。一部の実施形態において、結合部分はヌクレオシドを別のヌクレオチド又は核酸に連結する。好適なリンカーは、例えば、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に開示される。一部の実施形態では、ユニバーサルリンカー（UnyLinker）を使用してオリゴヌクレオチドが固体支持体に取り付けられる（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）。一部の実施形態において、様々な直交性リンカー（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）。

30

40

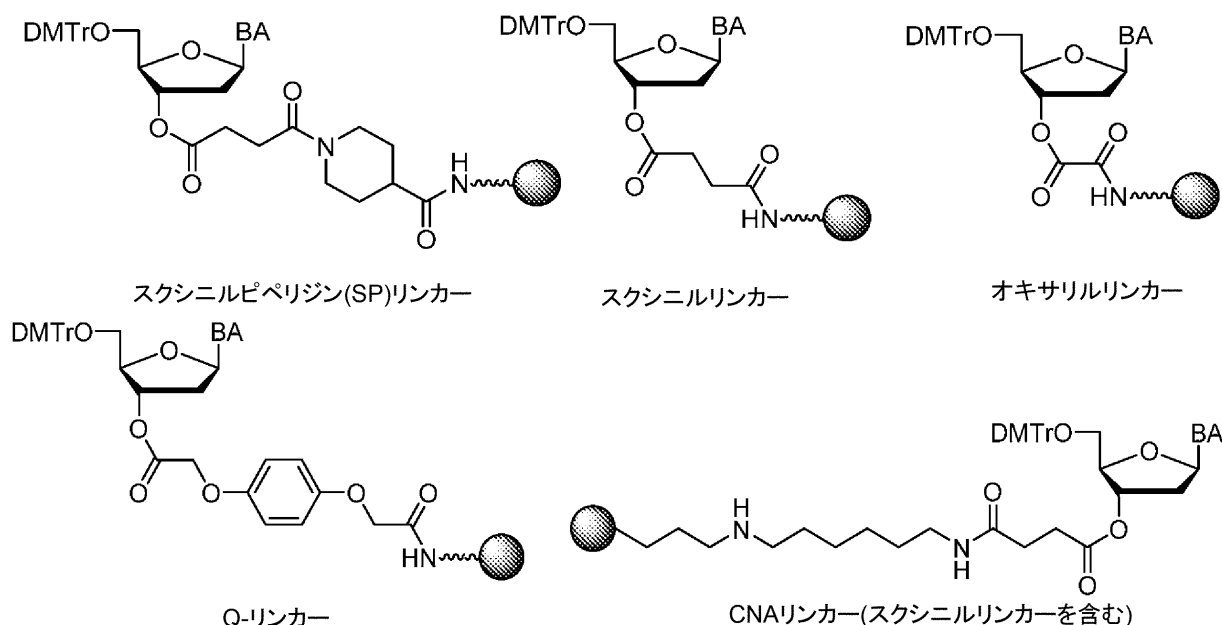
【0401】

とりわけ、本開示は、オリゴヌクレオチド合成に用いられる反応条件の組に適合するようにリンカーを選択又は設計し得ることを認識する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの分解を回避し、及び脱硫を回避するため、脱保護前に補助基が選択的に除去される。一部の実施形態において、DPSE基はF⁻イオンによって選択的に除去すること

50

ができる。一部の実施形態において、本開示は、例えば MeCN 中 0.1 M TBAF、THF 又は MeCN 中 0.5 M HF-Et₃N 等、DPSE 脱保護条件下で安定しているリンカーを提供する。一部の実施形態において、提供されるリンカーは、以下に例証するおりのリンカーである。

【化 15】



10

20

【0402】

溶媒

オリゴヌクレオチドの合成は、概して非プロトン性有機溶媒中で実施される。一部の実施形態において、溶媒は、ニトリル溶媒、例えばアセトニトリルなどである。一部の実施形態において、溶媒は、塩基性アミン溶媒、例えばピリジンなどである。一部の実施形態において、溶媒は、エーテル溶媒、例えばテトラヒドロフランなどである。一部の実施形態において、溶媒は、ハロゲン化炭化水素、例えばジクロロメタンなどである。一部の実施形態において、溶媒の混合物が使用される。特定の実施形態において、溶媒は、上述の溶媒クラスの任意の1つ以上の混合物である。

30

【0403】

一部の実施形態において、非プロトン性有機溶媒が塩基性ではないとき、反応ステップに塩基が存在する。塩基が存在する一部の実施形態では、塩基はアミン塩基、例えばピリジン、キノリン又はN,N-ジメチルアニリンなどである。例示的な他のアミン塩基としては、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)又はN,N-ジメチルアニリンが挙げられる。

【0404】

一部の実施形態において、塩基はアミン塩基以外である。

40

【0405】

一部の実施形態において、非プロトン性有機溶媒は無水である。一部の実施形態において、無水非プロトン性有機溶媒は新鮮に蒸留される。一部の実施形態において、新鮮に蒸留された無水非プロトン性有機溶媒は、塩基性アミン溶媒、例えばピリジンなどである。一部の実施形態において、新鮮に蒸留された無水非プロトン性有機溶媒は、エーテル溶媒、例えばテトラヒドロフランである。一部の実施形態において、新鮮に蒸留された無水非プロトン性有機溶媒は、ニトリル溶媒、例えばアセトニトリルである。

【0406】

キラル試薬／キラル補助基

50

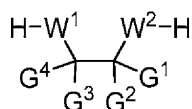
一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチドの作製において立体選択性を付与するため、キラル試薬（キラル補助基と称されることもある）が使用される。本開示の方法では、当業者により及び本明細書でキラル補助基とも称される多くのキラル試薬を使用し得る。かかるキラル試薬の例は、本明細書並びに米国特許第 9 6 9 5 2 1 1 号、米国特許第 9 6 0 5 0 1 9 号、米国特許第 9 5 9 8 4 5 8 号、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 8 6 1 2 号、米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 2 1 1 0 0 6 号、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 3 7 3 9 9 号、国際公開第 2 0 1 7 / 0 1 5 5 5 5 号、国際公開第 2 0 1 7 / 0 6 2 8 6 2 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 6 0 7 4 1 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 6 4 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 7 9 号、国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 0 6 4 7 号、国際公開第 2 0 1 8 / 0 9 8 2 6 4 号、国際公開第 2 0 1 8 / 2 2 3 0 5 6 号、国際公開第 2 0 1 8 / 2 3 7 1 9 4 号、国際公開第 2 0 1 9 / 0 5 5 9 5 1 号、国際公開第 2 0 1 9 / 2 0 0 1 8 5 号及び／又は国際公開第 2 0 1 9 / 2 1 7 7 8 4 号（これらの各々のキラル補助基は、参照により援用される）に記載される。

10

【0407】

一部の実施形態において、キラル試薬は、式 3 - A A :

【化 1 6】



式3-AA

20

（式中、各可変要素は、独立に、本明細書に記載されるとおりである）の化合物である。

【0408】

式 3 - A A の一部の実施形態において、W 1 及び W 2 は、独立に、- N G 5 -、- O - 又は - S - であり；G 1、G 2、G 3、G 4 及び G 5 は、独立に、水素であるか、又は脂肪族、アルキル、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロ脂肪族、ヘテロシクリル、ヘテロアリール若しくはアリールから選択される任意選択で置換されている基であるか；又は G 1、G 2、G 3、G 4 及び G 5 の 2 つが G 6 であり（一緒になって、単環式又は多環式の、縮合している又は縮合していない最大約 2 0 個の環原子の任意選択で置換されている飽和、部分不飽和又は不飽和炭素環式環又はヘテロ原子含有環を形成する）、G 1、G 2、G 3、G 4 及び G 5 の 4 つ以下が G 6 である。式 3 - I の化合物と同様に、G 1、G 2、G 3、G 4 又は G 5 のいずれかは、オキソ、チオキソ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアリール又はアリール部分によって任意選択で置換されている。一部の実施形態では、かかる置換は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドの作製において立体選択性を生じさせる。一部の実施形態において、ヘテロ原子含有部分、例えばヘテロ脂肪族、ヘテロシクリル、ヘテロアリール等は、1 ～ 5 個のヘテロ原子を有する。一部の実施形態において、ヘテロ原子は、窒素、酸素、硫黄及びケイ素から選択される。一部の実施形態において、少なくとも 1 つのヘテロ原子が窒素である。一部の実施形態において、脂肪族、アルキル、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロ脂肪族、ヘテロシクリル、ヘテロアリール又はアリール基は、1 ～ 2 0、1 ～ 1 5、1 ～ 1 0、1 ～ 9、1 ～ 8、1 ～ 7 又は 1 ～ 6 個の炭素原子を有する。

30

40

【0409】

一部の実施形態において、W 1 は - N G 5 - O - である。一部の実施形態において、W 1 は - N G 5 - O - であり、式中、- O - は - H に結合する。一部の実施形態において、W 1 は - N G 5 - である。一部の実施形態において、G 5 と、G 3 及び G 4 の一方とが一緒になって、0 ～ 3 個のヘテロ原子を W 1 の窒素原子に加えて有する、任意選択で置換されている 3 ～ 1 0 員環を形成する。一部の実施形態では、G 5 と G 3 とが一緒になって、0 ～ 3 個のヘテロ原子を W 1 の窒素原子に加えて有する、任意選択で置換されている 3 ～ 1

50

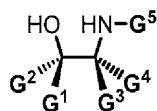
0員環を形成する。一部の実施形態では、G⁵とG⁴とが一緒になって、0～3個のヘテロ原子をW¹の窒素原子に加えて有する、任意選択で置換されている3～10員環を形成する。一部の実施形態において、形成される環は、任意選択で置換されている4、5、6、7又は8員環である。一部の実施形態において、形成される環は、任意選択で置換されている4員環である。一部の実施形態において、形成される環は、任意選択で置換されている5員環である。一部の実施形態において、形成される環は、任意選択で置換されている6員環である。一部の実施形態において、形成される環は、任意選択で置換されている7員環である。

【0410】

一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

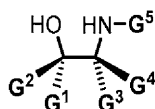
10

【化17】



の構造を有する。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

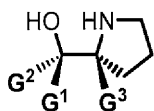
【化18】



20

の構造を有する。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

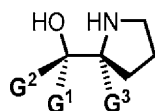
【化19】



30

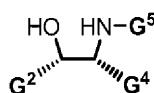
の構造を有する。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

【化20】



の構造を有する。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

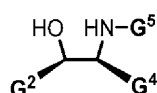
【化21】



40

の構造を有する。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

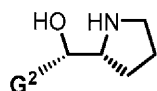
【化22】



50

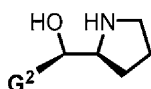
の構造を有する。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

【化 2 3】



の構造を有する。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

【化 2 4】



10

の構造を有する。

【0 4 1 1】

一部の実施形態において、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、独立に、水素であるか、又は C 1 ~ 1 0 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選択で置換されている基であり、G 2 は、- C (R)₂ S i (R)₃ であり、及び G 4 と G 5 とは、一緒になって、単環式又は多環式の、縮合している又は縮合していない最大約 2 0 個の環原子の任意選択で置換されている飽和、部分不飽和又は不飽和ヘテロ原子含有環を形成する。一部の実施形態において、各 R は、独立に、水素であるか、又は C 1 ~ C 6 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選択で置換されている基である。一部の実施形態において、G 2 は、- C (R)₂ S i (R)₃ であり、式中、- C (R)₂ - は、任意選択で置換されている - C H 2 - であり、及び - S i (R)₃ の各 R は、独立に、C 1 ~ 1 0 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選択で置換されている基である。一部の実施形態において、- S i (R)₃ の少なくとも 1 つの R は、独立に、任意選択で置換されている C 1 ~ 1 0 アルキルである。一部の実施形態において、- S i (R)₃ の少なくとも 1 つの R は、独立に、任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、- S i (R)₃ の 1 つの R は、独立に、任意選択で置換されているフェニルであり、他の 2 つの R の各々は、独立に、任意選択で置換されている C 1 ~ 1 0 アルキルである。一部の実施形態において、- S i (R)₃ の 1 つの R は、独立に、任意選択で置換されている C 1 ~ 1 0 アルキルであり、他の 2 つの R の各々は、独立に、任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、G 2 は、任意選択で置換されている - C H 2 S i (P h) (M e)₂ である。一部の実施形態において、G 2 は、任意選択で置換されている - C H 2 S i (M e) (P h)₂ である。一部の実施形態において、G 2 は、- C H 2 S i (M e) (P h)₂ である。一部の実施形態において、G 4 と G 5 とは、一緒になって、1 個の窒素原子（それに G 5 が結合する）を含有する任意選択で置換されている飽和 5 ~ 6 員環を形成する。一部の実施形態において、G 4 と G 5 とは、一緒になって、1 個の窒素原子を含有する任意選択で置換されている飽和 5 員環を形成する。一部の実施形態において、G 1 は、水素である。一部の実施形態において、G 3 は、水素である。一部の実施形態において、G 1 及び G 3 は、両方とも水素である。

20

30

40

【0 4 1 2】

一部の実施形態において、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、独立に、R 1 であり、G 2 は、- R 1 であり、及び G 4 と G 5 とは、一緒になって、単環式又は多環式の、縮合している又は縮合していない最大約 2 0 個の環原子の任意選択で置換されている飽和、部分不飽和又は不飽和ヘテロ原子含有環を形成し、式中、R 1 は、C 1 ~ 2 0 脂肪族、1 ~ 5 個のヘテロ原子を有する C 1 ~ 2 0 脂肪族、C 6 ~ 2 0 アリール、1 ~ 5 個のヘテロ原子を有する C 5 ~ 2 0 ヘテロアリール及びこれらの組み合

50

わせ（例えば、脂肪族－アリール／ヘテロアリール、ヘテロ脂肪族－アリール／ヘテロア
 リール）から選択される任意選択で置換されている基である。一部の実施形態において、
 G 1 及び G 3 の各々は、独立に、R である。一部の実施形態において、G 1 及び G 3 の各
 々は、独立に、－H である。一部の実施形態において、G 2 は、炭素原子によって分子の
 残りの部分に連結され、この炭素原子は 1 つ以上の電子求引基で置換される。一部の実施
 形態において、G 2 は、1 つ以上の電子求引基で置換されたメチルである。一部の実施形
 態において、G 2 は、1 つの且つ 1 つのみの電子求引基で置換されたメチルである。一部
 の実施形態において、G 2 は、2 つ以上の電子求引基で置換されたメチルである。とりわ
 け、電子求引基を含む G 2 を有するキラル補助基は塩基によって容易に除去することがで
 き（例えば実質的に水の無い無水条件下で塩基に不安定であり；多くの場合、好ましくは
 かかるキラル補助基を含むインターヌクレオチド結合を含むオリゴヌクレオチドが、特に
 塩基の存在下で相当量の水を含む条件／試薬系（例えば、NH₄OH を使用する切断条件
 ／試薬系）に曝露される前）、本明細書に記載されるとおりの様々な利点、例えば高い粗
 純度、高収率、高い立体選択性、より簡略化された作業、より少ないステップ、更なる製
 造コストの削減及び／又はより簡略化された下流製剤化（例えば、切断後の低量の 1 つ又
 は複数の塩）等をもたらす。一部の実施形態において、実施例に記載されるとおり、かか
 る補助基は、他の官能基及び／又は保護基との代替的又は追加的な化学適合性をもたらし
 得る。一部の実施形態において、実施例で実証されるとおり、塩基に不安定なキラル補助
 基は、キラル制御された非負電荷インターヌクレオチド結合（例えば、n 0 0 1 などの中
 性インターヌクレオチド結合）の構築に特に有用であり；一部の例では、実施例で実証さ
 れるとおり、それが例えば無水条件下での塩基を用いた除去と共に利用されるとき、高い
 立体選択性を伴う大きく改良された収率及び／又は粗純度をもたらすことができる。一部
 の実施形態において、かかるキラル補助基は酸素原子（例えばこれは、対応するキラル補
 助基化合物における－OH 基に対応する）を介して結合リンに結合し、その酸素が結合す
 るキラル補助基中の炭素原子（α 炭素）は、－H にも結合し（他の基に加えて；一部の実
 施形態では、第二級炭素）、及びキラル補助基中の次の炭素原子（β 炭素）が 1 つ又は 2
 つの電子求引基に結合する。一部の実施形態において、－W 2－H は－OH である。一部
 の実施形態において、G 1 は－H である。一部の実施形態において、G 2 は 1 つ又は 2 つ
 の電子求引基を含むか、又は他の形で塩基によるキラル補助基の除去を促進することがで
 きる。一部の実施形態において、G 1 は－H であり、G 2 は 1 つ又は 2 つの電子求引基を
 含み、－W 2－H は－OH である。一部の実施形態において、G 1 は－H であり、G 2 は
 1 つ又は 2 つの電子求引基を含み、－W 2－H は－OH であり、－W 1－H は－NG 5－
 H であり、G 3 及び G 4 の一方は G 5 と一緒になって、それらの介在原子と共に本明細書
 に記載されるとおりの環（例えば、G 5 がその上にある窒素原子に加えて 0 ～ 5 個のヘテ
 ロ原子を有する、任意選択で置換されている 3 ～ 20 員環単環式、二環式又は多環式環（
 例えば、G 5 がその上にある窒素原子に加えて他のヘテロ原子を有しない、任意選択で置
 換されている 3、4、5 又は 6 員環単環式飽和環））を形成する。

10

20

30

40

50

【0413】

当業者が理解するとおり、様々な電子求引基が当技術分野において公知であり、本開示に
 おいて利用することができる。一部の実施形態において、電子求引基は炭素原子を含み、
 及び／又は例えば－S(O)－、－S(O)₂－、－P(O)(R¹)－、－P(S)R¹－又は－C(O)－を介して炭素原子に連結される。一部の実施形態において、電子求
 引基は、－CN、－NO₂、ハロゲン、－C(O)R¹、－C(O)OR'、－C(O)
 N(R')₂、－S(O)R¹、－S(O)₂R¹、－P(W)(R¹)₂、－P(O)
 (R¹)₂、－P(O)(OR')₂ 又は－P(S)(R¹)₂ である。一部の実施形態
 において、電子求引基は、－CN、－NO₂、ハロゲン、－C(O)R¹、－C(O)O
 R'、－C(O)N(R')₂、－S(O)R¹、－S(O)₂R¹、－P(W)(R¹)₂、－P(O)(R¹)₂、－P(O)(OR')₂ 又は－P(S)(R¹)₂ の 1 つ以
 上で置換されているアリール又はヘテロアリール、例えばフェニルである。

【0414】

一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-L''-R'$ であり、式中、 L' は $-C(R)$ 又は任意選択で置換されている $-CH_2-$ であり、及び L'' は、 $-P(O)(R')$ 、 $-P(O)(R')O-$ 、 $-P(O)(OR')$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-P(O)[N(R')]$ 、 $-P(O)[N(R')]O-$ 、 $-P(O)[N(R')][N(R')]$ 、 $-P(S)(R')$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 又は $-S-$ であり、ここで、各 R' は、独立に、本明細書において記載されたとおりの R^1 である。一部の実施形態において、 L' は $-C(R)_2-$ である。一部の実施形態において、 L' は、任意選択で置換されている $-CH_2-$ である。

【0415】

一部の実施形態において、 L' は $-C(R)_2-$ である。一部の実施形態において、各 R は、独立に、水素であるか、又は $C_1 \sim C_6$ 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、任意選択で置換されている基である。一部の実施形態において、 L' は $-CH_2-$ である。一部の実施形態において、 L'' は、 $-P(O)(R')$ 、 $-P(S)(R')$ 、 $-S(O)_2-$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-C(O)N(R')$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-P(O)(R')_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-P(S)(R')_2$ である。一部の実施形態において、各 R' は、独立に、本開示に記載されたとおり（例えば、 R について記載される実施形態）の任意選択で置換されている脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール又はヘテロアリールである。一部の実施形態において、各 R' は、独立に、任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、各 R' は、独立に、任意選択で置換されているフェニルであり、ここで、1つ以上の置換基は、 $-CN$ 、 $-OMe$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 及び $-F$ から独立に選択される。一部の実施形態において、各 R' は、独立に置換フェニルであり、ここで、1つ以上の置換基は、 $-CN$ 、 $-OMe$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 及び $-F$ から独立に選択される。一部の実施形態において、各 R' は、独立に置換フェニルであり、ここで、置換基は、 $-CN$ 、 $-OMe$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 及び $-F$ から独立に選択される。一部の実施形態において、各 R' は、独立に一置換フェニルであり、ここで、置換基は、 $-CN$ 、 $-OMe$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 及び $-F$ から独立に選択される。一部の実施形態において、2つの R' は同じである。一部の実施形態において、2つの R' は異なる。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-S(O)R'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-C(O)N(R')$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-S(O)_2R'$ である。一部の実施形態において、 R' は、本開示に記載されたとおり（例えば、 R について記載される実施形態）の任意選択で置換されている脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール又はヘテロアリールである。一部の実施形態において、 R' は、任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、 R' は、任意選択で置換されているフェニルであり、ここで、1つ以上の置換基は、 $-CN$ 、 $-OMe$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 及び $-F$ から独立に選択される。一部の実施形態において、 R' は置換フェニルであり、ここで、1つ以上の置換基は、 $-CN$ 、 $-OMe$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 及び $-F$ から独立に選択される。一部の実施形態において、 R' は置換フェニルであり、ここで、各置換基は、 $-CN$ 、 $-OMe$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 及び $-F$ から独立に選択される。一部の実施形態において、 R' は一置換フェニルである。一部の実施形態において、 R' は一置換フェニルであり、ここで、置換基は、 $-CN$ 、 $-OMe$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 及び $-F$ から独立に選択される。一部の実施形態において、置換基は電子求引基である。一部の実施形態において、電子求引基は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、ハロゲン、 $-C(O)R^1$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-S(O)R^1$ 、 $-S(O)_2R^1$ 、 $-P(W)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(OR')_2$ 又は $-P(S)(R^1)_2$ である。

【0416】

一部の実施形態において、 G^2 は、任意選択で置換されている $-CH_2-L''-R$ であり、式中、 L'' 及び R の各々は、独立に、本開示に記載されたとおりである。一部の実施形態において、 G^2 は、任意選択で置換されている $-CH(-L''-R)_2$ であり、式中、

10

20

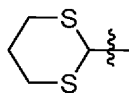
30

40

50

L”及びRの各々は、独立に、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、G²は、任意選択で置換されている-CH(-S-R)₂である。一部の実施形態において、G²は、任意選択で置換されている-CH₂-S-Rである。一部の実施形態において、2つのR基がそれらの介在原子と一緒になって環を形成する。一部の実施形態において、形成される環は、介在ヘテロ原子に加えて0～2個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換されている5、6、7員環である。一部の実施形態において、G²は、任意選択で置換されている

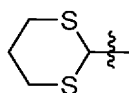
【化25】



10

である。一部の実施形態において、G²は、

【化26】



である。一部の実施形態において、例えば塩基による除去を促進するため、例えば酸化によって-S-が-S(O)-又は-S(O)₂-に変換され得る。

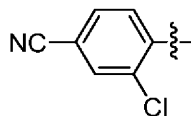
20

【0417】

一部の実施形態において、G²は-L'-R'であり、式中、各可変要素は本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、G²は-CH₂-R'である。一部の実施形態において、G²は-CH(R')₂である。一部の実施形態において、G²は-C(R')₃である。一部の実施形態において、R'は、任意選択で置換されているアリール又はヘテロアリールである。一部の実施形態において、R'は置換アリール又はヘテロアリールであり、ここで、1つ以上の置換基は、独立に、電子求引基である。一部の実施形態において、-L'-は、任意選択で置換されている-CH₂-であり、及びR'はRであり、式中、Rは、任意選択で置換されているアリール又はヘテロアリールである。一部の実施形態において、Rは置換アリール又はヘテロアリールであり、ここで、1つ以上の置換基は、独立に、電子求引基である。一部の実施形態において、Rは置換アリール又はヘテロアリールであり、ここで、各置換基は、独立に、電子求引基である。一部の実施形態において、Rは、2つ以上の置換基で置換されたアリール又はヘテロアリールであり、ここで、各置換基は、独立に、電子求引基である。一部の実施形態において、電子求引基は、-CN、-NO₂、ハロゲン、-C(O)R¹、-C(O)OR'、-C(O)N(R')₂、-S(O)R¹、-S(O)₂R¹、-P(W)(R¹)₂、-P(O)(R¹)₂、-P(O)(OR')₂又は-P(S)(R¹)₂である。一部の実施形態において、R'は、

30

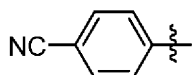
【化27】



40

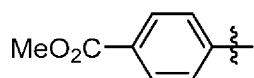
である。一部の実施形態において、R'はp-N₂Ph-である。一部の実施形態において、R'は、

【化28】

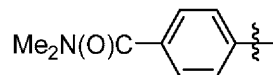


50

である。一部の実施形態において、 R' は、
【化 29】

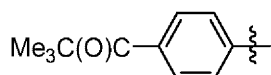


である。一部の実施形態において、 R' は、
【化 30】

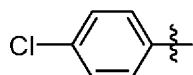


10

である。一部の実施形態において、 R' は、
【化 31】

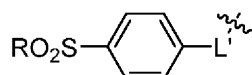


である。一部の実施形態において、 R' は、
【化 32】



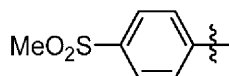
20

である。一部の実施形態において、 G^2 は、
【化 33】

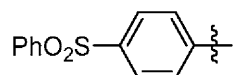


である。一部の実施形態において、 R' は、
【化 34】

30

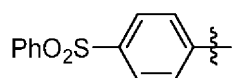


である。一部の実施形態において、 R' は、
【化 35】



である。一部の実施形態において、 R' は 2, 4, 6-トリクロロフェニルである。一部の
実施形態において、 R' は 2, 4, 6-トリフルオロフェニルである。一部の実施形態
において、 G^2 は $-CH(4\text{-クロロフェニル})_2$ である。一部の実施形態において、 G^2
は $-CH(R')_2$ であり、式中、各 R' は、
【化 36】

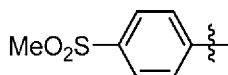
40



である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH(R')_2$ であり、式中、各 R' は、

50

【化 3 7】

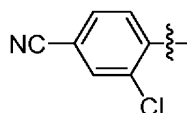


である。一部の実施形態において、 R' は $-C(O)R$ である。一部の実施形態において、 R' は $CH_3C(O)-$ である。

【0 4 1 8】

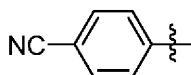
一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-S(O)_2R'$ であり、式中、各可変要素は本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2R'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-S(O)R'$ であり、式中、各可変要素は本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)R'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-C(O)_2R'$ であり、式中、各可変要素は本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-C(O)_2R'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-C(O)R'$ であり、式中、各可変要素は本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-C(O)R'$ である。一部の実施形態において、 $-L'-$ は、任意選択で置換されている $-CH_2-$ であり、及び R' は R である。一部の実施形態において、 R は、任意選択で置換されているアリール又はヘテロアリールである。一部の実施形態において、 R は、任意選択で置換されている脂肪族である。一部の実施形態において、 R は、任意選択で置換されているヘテロ脂肪族である。一部の実施形態において、 R は、任意選択で置換されているアリールである。一部の実施形態において、 R は、任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、 R はフェニルではないか、又は一置換、二置換若しくは三置換フェニルであり、ここで、各置換基は、 $-NO_2$ 、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-C_1 \sim 3$ アルキル及び $C_1 \sim 3$ アルキルオキシから選択される。一部の実施形態において、 R は置換アリール又はヘテロアリールであり、ここで、1つ以上の置換基は、独立に、電子求引基である。一部の実施形態において、 R は置換アリール又はヘテロアリールであり、ここで、各置換基は、独立に、電子求引基である。一部の実施形態において、 R は、2つ以上の置換基で置換されたアリール又はヘテロアリールであり、ここで、各置換基は、独立に、電子求引基である。一部の実施形態において、電子求引基は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、ハロゲン、 $-C(O)R^1$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-S(O)R^1$ 、 $-S(O)_2R^1$ 、 $-P(W)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(OR')_2$ 又は $-P(S)(R^1)_2$ である。一部の実施形態において、 R' はフェニルである。一部の実施形態において、 R' は置換フェニルである。一部の実施形態において、 R' は、

【化 3 8】



である。一部の実施形態において、 R' は、

【化 3 9】



である。一部の実施形態において、 R' は、

10

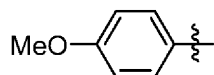
20

30

40

50

【化 4 0】



である。一部の実施形態において、 R' は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ 脂肪族である。一部の実施形態において、 R' は t -ブチルである。一部の実施形態において、 R' はイソプロピルである。一部の実施形態において、 R' はメチルである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2C(O)OMe$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2C(O)Ph$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2C(O)-tBu$ である。

10

【0 4 1 9】

一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-NO_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2NO_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-S(O)_2N(R')$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(R')$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-S(O)_2NHR'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2NHR'$ である。一部の実施形態において、 R' はメチルである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2NH(CH_3)$ である。一部の実施形態において、 R' は $-CH_2Ph$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2NH(CH_2Ph)$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(CH_2Ph)_2$ である。一部の実施形態において、 R' はフェニルである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2NHPh$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(CH_3)Ph$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(CH_3)_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2NH(CH_2Ph)$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2NHPh$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2NH(CH_2Ph)$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(CH_3)_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(CH_3)Ph$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-S(O)_2N(R')(OR')$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(R')(OR')$ である。一部の実施形態において、各 R' はメチルである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(CH_3)(OCH_3)$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(Ph)(OCH_3)$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(CH_2Ph)(OCH_3)$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2N(CH_2Ph)(OCH_3)$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-S(O)_2OR'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2OR'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2OPh$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2OCH_3$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-S(O)_2OCH_2Ph$ である。

20

30

40

【0 4 2 0】

一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-P(O)(R')_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(R')_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-P(O)[N(R')_2]_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)[N(R')_2]_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-P(O)[O(R')_2]_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)[O(R')_2]_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-P(O)(R')[N(R')_2]$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(R')[N(R')_2]$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-P(O)(R')[O(R')]$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(R')[O(R')]$ である。

50

部の実施形態において、 G^2 は $-L'-P(O)(OR')[N(R')_2]$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(OR')[N(R')_2]$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-C(O)N(R')_2$ であり、式中、各可変要素は本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-C(O)N(R')_2$ である。一部の実施形態において、各 R' は、独立に、 R である。一部の実施形態において、1つの R' は、任意選択で置換されている脂肪族であり、1つの R は、任意選択で置換されているアリールである。一部の実施形態において、1つの R' は、任意選択で置換されている $C_{1\sim6}$ 脂肪族であり、1つの R は、任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、各 R' は、独立に、任意選択で置換されている $C_{1\sim6}$ 脂肪族である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(CH_3)Ph$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(CH_3)_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(Ph)_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(OCH_3)_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(CH_2Ph)_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)[N(CH_3)Ph]_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)[N(CH_3)_2]_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)[N(CH_2Ph)_2]_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(OCH_3)_2$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-P(O)(OPh)_2$ である。

10

20

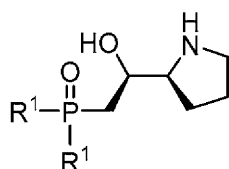
【0421】

一部の実施形態において、 G^2 は $-L'-SR'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2-SR'$ である。一部の実施形態において、 R' は、任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、 R' はフェニルである。

【0422】

一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

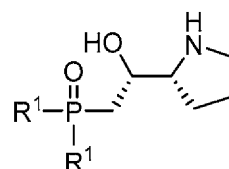
【化41】



30

の構造を有し、式中、各 R^1 は、独立に、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

【化42】

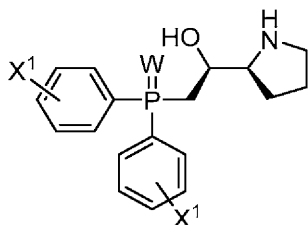


40

の構造を有し、式中、各 R^1 は、独立に、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、各 R^1 は、独立に、本開示に記載されるとおりの R である。一部の実施形態において、各 R^1 は、独立に、 R であり、式中、 R は、本開示に記載されるとおりの任意選択で置換されている脂肪族、アリール、ヘテロ脂肪族又はヘテロアリールである。一部の実施形態において、各 R^1 はフェニルである。一部の実施形態において、 R^1 は $-L-R'$ である。一部の実施形態において、 R^1 は $-L-R'$ であり、式中、 L は、 $-O-$ 、 $-S-$ 又は $-N(R')$ である。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

50

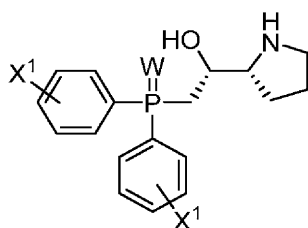
【化 4 3】



の構造を有し、式中、各 X^1 は、独立に、 $-H$ 、電子求引基、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-OR$ 、 $-Cl$ 、 $-BR$ 又は $-F$ であり、及び W は O 又は S である。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

10

【化 4 4】



20

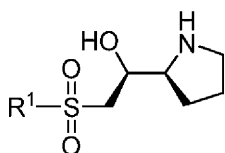
の構造を有し、式中、各 X^1 は、独立に、 $-H$ 、電子求引基、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-OR$ 、 $-Cl$ 、 $-BR$ 又は $-F$ であり、及び W は O 又は S である。一部の実施形態において、各 X^1 は、独立に、 $-CN$ 、 $-OR$ 、 $-Cl$ 、 $-BR$ 又は $-F$ であり、式中、 R は $-H$ でない。一部の実施形態において、 R は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ 脂肪族である。一部の実施形態において、 R は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ アルキルである。一部の実施形態において、 R は $-CH_3$ である。一部の実施形態において、1つ以上の X^1 は、独立に、電子求引基（例えば、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、ハロゲン、 $-C(O)R^1$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-S(O)R^1$ 、 $-S(O)_2R^1$ 、 $-P(W)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(OR')_2$ 、 $-P(S)(R^1)_2$ 等）である。

30

【化 4 2 3】

一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

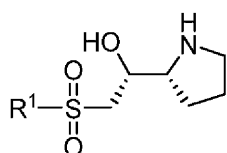
【化 4 5】



40

の構造を有し、式中、 R^1 は本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

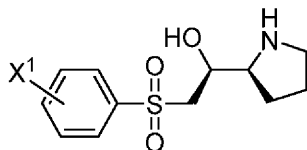
【化 4 6】



の構造を有し、式中、 R^1 は本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において

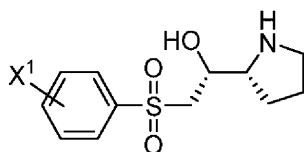
50

、 R^1 は、本開示に記載されるとおりの R である。一部の実施形態において、 R^1 は R であり、式中、 R は、本開示に記載されるとおりの任意選択で置換されている脂肪族、アリール、ヘテロ脂肪族又はヘテロアリールである。一部の実施形態において、 R^1 は $-L-R'$ である。一部の実施形態において、 R^1 は $-L-R'$ であり、式中、 L は、 $-O-$ 、 $-S-$ 又は $-N(R')$ である。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、
【化 47】



10

の構造を有し、式中、 X^1 は、 $-H$ 、電子求引基、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-OR$ 、 $-Cl$ 、 $-BR$ 又は $-F$ であり、及び W は O 又は S である。一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、
【化 48】



20

の構造を有し、式中、 X^1 は、 $-H$ 、電子求引基、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-OR$ 、 $-Cl$ 、 $-BR$ 又は $-F$ であり、及び W は O 又は S である。一部の実施形態において、 X^1 は、 $-CN$ 、 $-OR$ 、 $-Cl$ 、 $-BR$ 又は $-F$ であり、式中、 R は $-H$ でない。一部の実施形態において、 R は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ 脂肪族である。一部の実施形態において、 R は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ アルキルである。一部の実施形態において、 R は $-CH_3$ である。一部の実施形態において、 X^1 は電子求引基（例えば、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、ハロゲン、 $-C(O)R^1$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-S(O)R^1$ 、 $-S(O)_2R^1$ 、 $-P(W)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(OR')_2$ 、 $-P(S)(R^1)_2$ 等）である。一部の実施形態において、 X^1 は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 又はハロゲンでない電子求引基である。一部の実施形態において、 X^1 は、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、ハロゲン又は $C_1 \sim 3$ アルキルオキシでない。
【0424】

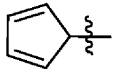
30

一部の実施形態において、 G^2 は $-CH(R^{21})-CH(R^{22})=C(R^{23})(R^{24})$ であり、式中、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 及び R^{24} の各々は、独立に、 R である。一部の実施形態において、 R^{22} 及び R^{23} は両方とも R であり、これらの 2 つの R 基がそれらの介在原子と一緒にあって、本明細書に記載されるとおりの任意選択で置換されているアリール環又はヘテロアリール環を形成する。一部の実施形態において、1 つ以上の置換基は、独立に、電子求引基である。一部の実施形態において、 R^{21} 及び R^{24} は両方とも R であり、これらの 2 つの R 基がそれらの介在原子と一緒にあって、本明細書に記載されるとおりの任意選択で置換されている環を形成する。一部の実施形態において、 R^{21} 及び R^{24} は両方とも R であり、これらの 2 つの R 基がそれらの介在原子と一緒にあって、本明細書に記載されるとおりの任意選択で置換されている飽和又は部分飽和環を形成する。一部の実施形態において、 R^{22} 及び R^{23} は両方とも R であり、これらの 2 つの R 基がそれらの介在原子と一緒にあって、本明細書に記載されるとおりの任意選択で置換されているアリール環又はヘテロアリール環を形成し、且つ R^{21} 及び R^{24} は両方とも R であり、これらの 2 つの R 基がそれらの介在原子と一緒にあって、本明細書に記載されるとおりの任意選択で置換されている部分飽和環を形成する。一部の実施形態において、 R^{21} は $-H$ である。一部の実施形態において、 R^{24} は $-H$ である。一部の実施形態

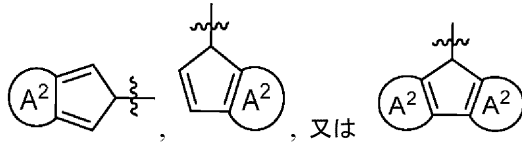
40

50

において、 G^2 は、任意選択で置換されている
【化 4 9】

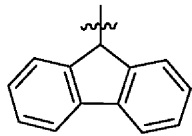


である。一部の実施形態において、 G^2 は、任意選択で置換されている
【化 5 0】

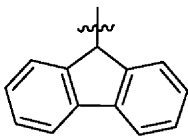


であり、式中、各環 A^2 は、独立に、本明細書に記載されるとおりの 3 ～ 15 員環単環式、二環式又は多環式環である。一部の実施形態において、環 A^2 は、本明細書に記載されるとおりの 1 ～ 5 個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換されている 5 ～ 10 員環単環式アリール環又はヘテロアリール環である。一部の実施形態において、環 A^2 は、本明細書に記載されるとおりの任意選択で置換されているフェニル環である。一部の実施形態において、一部の実施形態において、 G^2 は、任意選択で置換されている

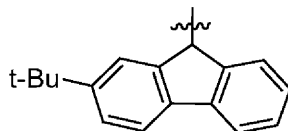
【化 5 1】



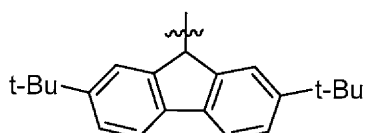
である。一部の実施形態において、 G^2 は、
【化 5 2】



である。一部の実施形態において、 G^2 は、
【化 5 3】



である。一部の実施形態において、 G^2 は、
【化 5 4】



である。

【0425】

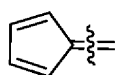
一部の実施形態において、キラル補助基は、DPSE補助基である。一部の実施形態において、キラル補助基は、PSM補助基である。

【0426】

一部の実施形態において、その対応する化合物が式3-I又は式3-AAの化合物である、例えばインターヌクレオチド結合のキラル補助基部分は、塩基と接触すると、対応する化合物からの水分子の脱離（G2の $-W2-H=-OH$ 及び $\alpha-H$ の脱離）によって形成される生成物と同じ構造を有するアルケンとして放出され得る。一部の実施形態において、かかるアルケンは、（電子求引基） $2=C(R1)-L-N(R5)(R6)$ 、（電子求引基） $H=C(R1)-L-N(R5)(R6)$ 、 $CH(-L''-R')=C(R1)-L-N(R5)(R6)$ （式中、CH基は、任意選択で置換されている）又は $C^X=C(R1)-L-N(R5)(R6)$ （式中、 C^X は、任意選択で置換されている）

10

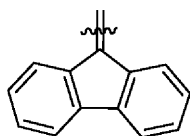
【化55】



であり、及び任意選択で1つ以上の任意選択で置換されている環と縮合し得、及び他の各可変要素は、独立に、本明細書に記載されるとおりである）の構造を有する。一部の実施形態において、 C^X は、任意選択で置換されている

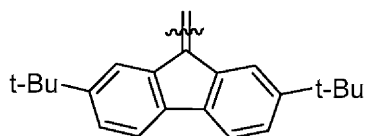
20

【化56】



である。一部の実施形態において、 C^X は、

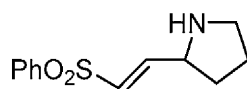
【化57】



30

である。一部の実施形態において、かかるアルケンは、

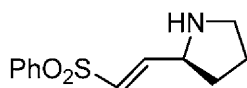
【化58】



40

である。一部の実施形態において、かかるアルケンは、

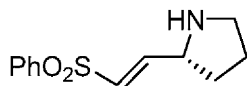
【化59】



である。一部の実施形態において、かかるアルケンは、

50

【化 6 0】



である。

【 0 4 2 7】

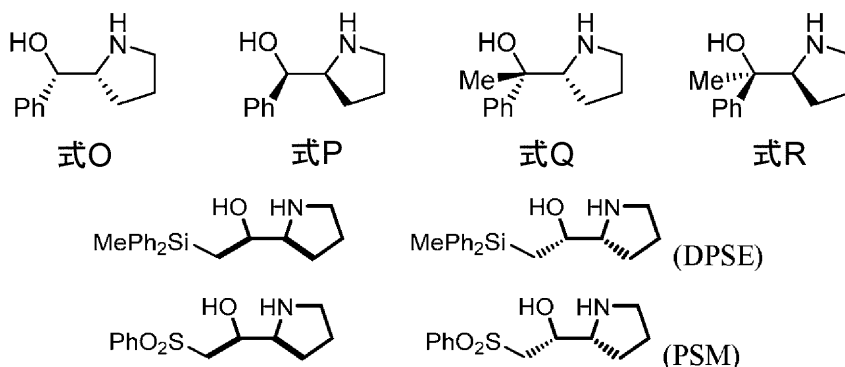
一部の実施形態において、キラル試薬はアミノアルコールである。一部の実施形態において、キラル試薬はアミノチオールである。一部の実施形態において、キラル試薬はアミノフェノールである。一部の実施形態において、キラル試薬は、(S)-及び(R)-2-メチルアミノ-1-フェニルエタノール、(1R, 2S)-エフェドリン又は(1R, 2S)-2-メチルアミノ-1, 2-ジフェニルエタノールである。

10

【 0 4 2 8】

本開示の一部の実施形態において、キラル試薬は、以下の式の1つの化合物である。

【化 6 1】



20

【 0 4 2 9】

当業者が理解するとおり、キラル試薬は典型的には立体的に純粋であるか又は実質的に立体的に純粋であり、典型的には実質的に他の立体異性体のない単一の立体異性体として利用される。一部の実施形態において、本開示の化合物は立体的に純粋であるか又は実質的に立体的に純粋である。

30

【 0 4 3 0】

本明細書において実証されるとおり、キラルインターヌクレオチド結合の調製に使用されるとき、立体選択性を得るために、概して立体化学的に純粋なキラル試薬が利用される。とりわけ、本開示は、記載される構造を有するものを含め、立体化学的に純粋なキラル試薬を提供する。

【 0 4 3 1】

キラル試薬、例えば式Q又はその立体異性体である式Rによって表される異性体の選択により、結合リンにおけるキラリティーの具体的な制御が可能となる。従って、各合成サイクルにおいてR_p配置又はS_p配置のいずれかを選択することにより、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドの全体的な三次元構造の制御を可能にすることができる。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドは、すべてがR_pの立体中心を有する。本開示の一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドは、すべてがS_pの立体中心を有する。本開示の一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド中の各結合リンは、独立に、R_p又はS_pである。本開示の一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド中の各結合リンは、独立に、R_p又はS_pであり、少なくとも1つがR_pであり、少なくとも1つがS_pである。一部の実施形態において、R_p及びS_p中心の選択は、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドに特定の三次元超構造を付与するように行われる。かかる選

40

50

択の例は本明細書に更に詳細に記載される。

【0432】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、例えばインターヌクレオチド結合にキラル補助基部分を含む。一部の実施形態において、キラル補助基は結合リンに連結される。一部の実施形態において、キラル補助基はW²によって結合リンに連結される。一部の実施形態において、キラル補助基はW²によって結合リンに連結され、式中、W²はOである。任意選択で、W¹は、例えばW¹が－NG⁵－であるとき、DMDオリゴヌクレオチド合成中にキャッピングされる。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド中のキラル補助基におけるW¹は、DMDオリゴヌクレオチド合成中に例えばキャッピング試薬によってキャッピングされる。一部の実施形態において、W¹は、DMDオリゴヌクレオチド特性を調節するため目的を持ってキャッピングされ得る。一部の実施形態において、W¹は－R¹でキャッピングされる。一部の実施形態において、R¹は－C(O)R'である。一部の実施形態において、R'は、任意選択で置換されているC₁～6脂肪族である。一部の実施形態において、R'はメチルである。

10

【0433】

一部の実施形態において、本開示に係る使用のためのキラル試薬は、上述のサイクル中の特定のステップで除去されるその能力に関して選択される。例えば、一部の実施形態では、結合リンを修飾するステップの間にキラル試薬を除去することが望ましい。一部の実施形態では、結合リンを修飾するステップの前にキラル試薬を除去することが望ましい。一部の実施形態では、結合リンを修飾するステップの後にキラル試薬を除去することが望ましい。一部の実施形態では、1回目のカップリングステップが行われた後であるが、2回目のカップリングステップが行われる前にキラル試薬を除去して、そのため第2のカップリングの間に（及び同様に更なる後続のカップリングステップについても）成長中のDMDオリゴヌクレオチド上にキラル試薬が存在しないようにすることが望ましい。一部の実施形態において、キラル試薬は、結合リンの修飾後であるが、後続のサイクルが始まる前に行われる「脱ブロック化」反応の間に除去される。除去の例示的方法及び試薬は本明細書に記載される。

20

【0434】

一部の実施形態において、キラル補助基の除去は、スキームIに示されるとおり、修飾及び／又は脱ブロック化ステップの実施時に実現される。キラル補助基の除去を修飾及び脱ブロック化などの他の転換と共に組み合わせることが有益であり得る。当業者であれば、ステップ／転換の省力化が、特により長いDMDオリゴヌクレオチドについて、例えば収率及び生成物純度の点で全体的な合成効率を改良し得ることを理解するであろう。修飾及び／又は脱ブロック化の間にキラル補助基が除去される1つの例がスキームIに示される。

30

【0435】

一部の実施形態において、本開示の方法に係る使用のためのキラル試薬は、それが一定の条件下で除去可能であることを特徴とする。例えば、一部の実施形態において、キラル試薬は、酸性条件下で除去されるその能力に関して選択される。特定の実施形態において、キラル試薬は、弱酸性条件下で除去されるその能力に関して選択される。特定の実施形態において、キラル試薬は、E₁脱離反応によって除去されるその能力に関して選択される（例えば、酸性条件下におけるキラル試薬上でのカチオン中間体の形成に起因して、DMDオリゴヌクレオチドからのキラル試薬の切断が引き起こされることで除去が起こる）。一部の実施形態において、キラル試薬は、それがE₁脱離反応を受け入れる又はそれを促進することが可能なものとして認識される構造を有することの特徴とする。関連性のある技術分野の当業者は、いずれの構造であれば、かかる脱離反応を受け易いものと想定され得るかについて理解するであろう。

40

【0436】

一部の実施形態において、キラル試薬は、求核剤で除去されるその能力に関して選択される。一部の実施形態において、キラル試薬は、アミン求核剤で除去されるその能力に関し

50

て選択される。一部の実施形態において、キラル試薬は、アミン以外の求核剤で除去されるその能力に関して選択される。

【0437】

一部の実施形態において、キラル試薬は、塩基で除去されるその能力に関して選択される。一部の実施形態において、キラル試薬は、アミンで除去されるその能力に関して選択される。一部の実施形態において、キラル試薬は、アミン以外の塩基で除去されるその能力に関して選択される。

【0438】

一部の実施形態において、キラル補助基を含むキラル的に純粋なホスホロアミダイトは、使用前に分離され得る。一部の実施形態において、キラル補助基を含むキラル的に純粋なホスホロアミダイトは、分離なしに使用され得る。一部の実施形態において、これは形成後に直接使用され得る。

【0439】

活性化

当業者が理解するとおり、DMDオリゴヌクレオチド調製は、例えば、ホスホロアミダイト調製の間、サイクル中の1つ以上のステップの間、サイクル後切断／脱保護の間等に、様々な条件、試薬等を用いて反応成分を活性化し得る。本開示において利用することができる様々な活性化技術としては、限定はされないが、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/217784号（これらの各々の活性化技術は、参照により援用される）に記載されるものが挙げられる。特定の活性化技術、例えば試薬、条件、方法等は、実施例に示す。

【0440】

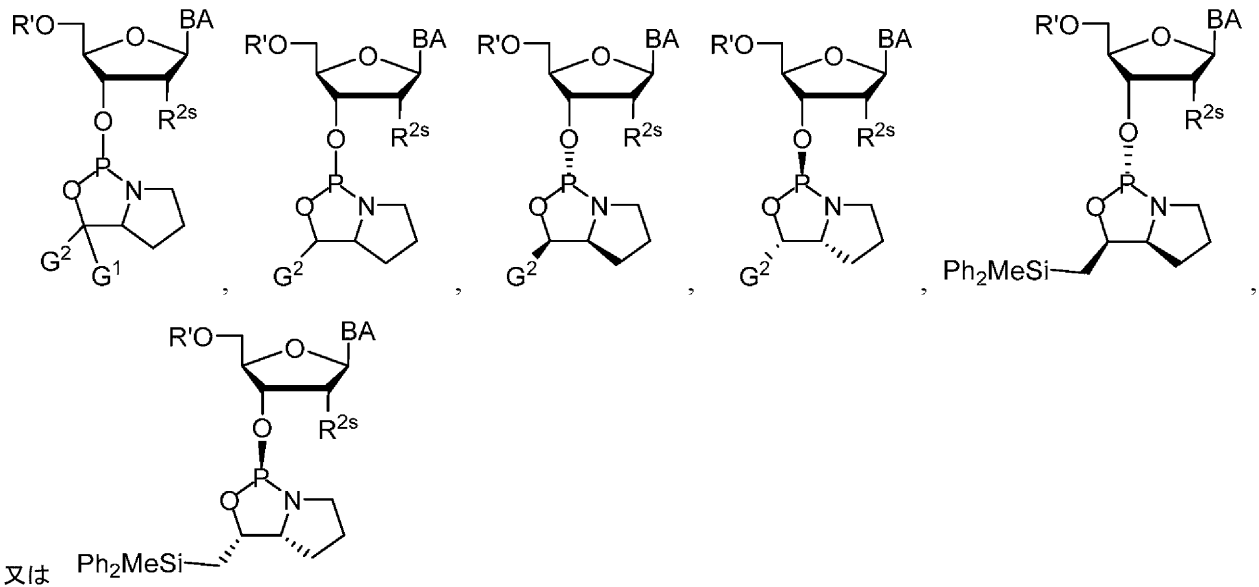
カップリング

一部の実施形態において、本開示のサイクルは、キラル制御されたインターヌクレオチド結合を形成するための立体選択的縮合／カップリングステップを含む。縮合には、多くの場合、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)、ベンズイミダゾリウムトリフレート(BIT)、ベンズトリアゾール、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などの活性化試薬が使用される。好適な条件及び試薬としては、キラルホスホロアミダイトを含め、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/217784号（これらの各々の縮合試薬、条件及び方法は、参照により援用される）に記載されるものが挙げられる。特定のカップリング技術、例えば試薬、条件、方法等は、実施例に示される。

【0441】

一部の実施形態において、カップリングのためのキラルホスホロアミダイトは、

【化62】

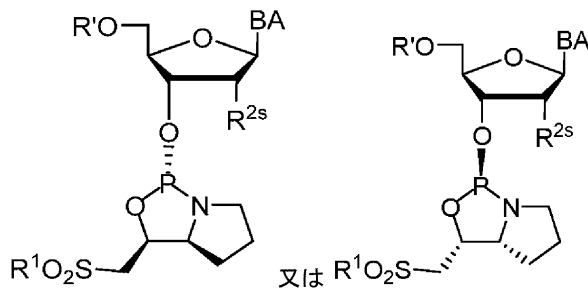


10

20

の構造を有し、式中、 R^{2s} は、 $-\text{H}$ 、 $-\text{F}$ 又は $-\text{OR}$ であり、それぞれの他の可変要素は、独立に、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、 G^1 又は G^2 は、本開示に記載されるとおりの電子求引基を含む。一部の実施形態において、カップリングのためのキラルホスホロアミダイトは、

【化63】



30

の構造を有し、式中、各可変要素は、独立に、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、 R^1 は、本開示に記載されるとおりの R' である。一部の実施形態において、 R^1 は、本開示に記載されるとおりの R である。一部の実施形態において、 R は、本開示に記載されるとおりの任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、 R は、フェニルである。一部の実施形態において、 R は、本開示に記載されるとおりの任意選択で置換されている $\text{C}_{1\sim6}$ 脂肪族である。一部の実施形態において、 R は、本開示に記載されるとおりの任意選択で置換されている $\text{C}_{1\sim6}$ アルキルである。例えば、一部の実施形態において、 R は、メチルであり；一部の実施形態において、 R は、イソプロピルであり；一部の実施形態において、 R は、 t -ブチルである等である。一部の実施形態において、 R' は、オリゴヌクレオチド合成における5'ブロック化基、例えばDMTrである。一部の実施形態において、 BA は、本明細書に記載されるとおりの任意選択で保護されている核酸塩基である。一部の実施形態において、 BA は、任意選択で置換されているA、T、G、C、U又はその互変異性体である。一部の実施形態において、 BA は、保護されている核酸塩基である。一部の実施形態において、 BA は、任意選択で置換されている保護されたA、T、G、C、U又はその互変異性体である。一部の実施形態において、 R' は、保護基である。一部の実施形態において、 R' は、DMTrである

40

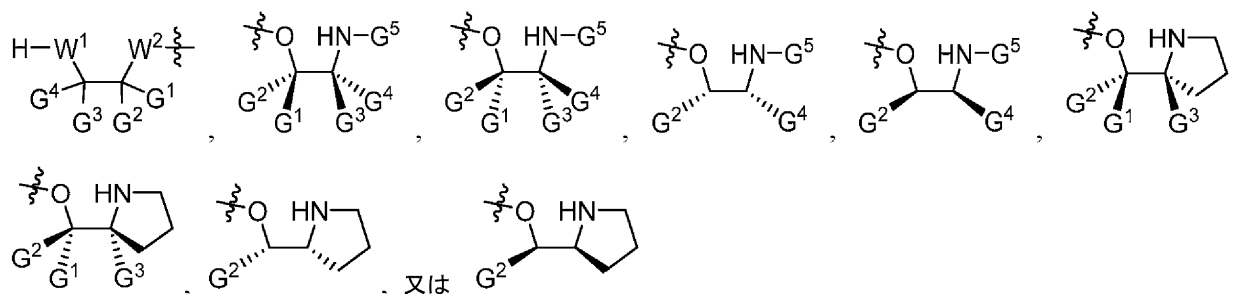
50

。一部の実施形態において、 R^2 は、 $-H$ 、 $-F$ 又は $-OMe$ である。一部の実施形態において、 R^2 は、 $-H$ である。一部の実施形態において、 R^2 は、 $-F$ である。一部の実施形態において、 R^2 は、 $-OMe$ である。

【0442】

一部の実施形態において、結合リンに結合した、

【化64】



10

(式中、各可変要素は、独立に、本開示に係るものである)

を含むカップリングステップで形成されるインターヌクレオチド結合である。

【0443】

一部の実施形態において、カップリングは、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超える立体選択性でインターヌクレオチド結合を形成する。一部の実施形態において、立体選択性は85%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は85%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は90%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は91%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は92%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は93%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は94%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は95%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は96%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は97%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は98%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は99%以上である。

20

【0444】

キャッピング

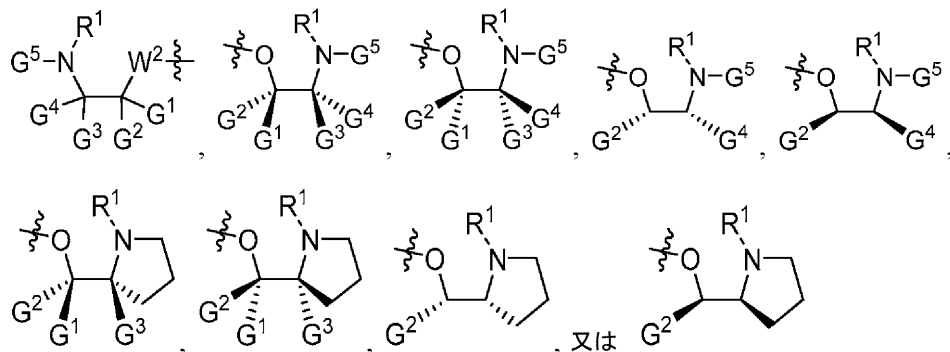
最終的な核酸が二量体より大きい場合、未反応の $-OH$ 部分が概してブロック化基／キャッピング基でキャッピングされる。オリゴヌクレオチド中のキラル補助基もブロック化基でキャッピングして、キャッピングされた縮合中間体を形成し得る。好適なキャッピング技術(例えば、試薬、条件等)としては、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/217784号(これらの各々のキャッピング技術は、参照により援用される)に記載されるものが挙げられる。一部の実施形態において、キャッピング試薬はカルボン酸又はその誘導体である。一部の実施形態において、キャッピング試薬は $R'COOH$ である。一部の実施形態において、キャッピングステップにより、キラル補助基中の未反応 $5'OH$ 基及び／又はアミノ基に $R'COO-$ が導入される。一部の実施形態において、サイクルは2つ以上のキャッピングステップを含み得る。一部の実施形態において、サイクルは、カップリング生成物の修飾前に第1のキャッピング(例えば、 $P(III)$ から $P($

40

50

V) への変換) を含み、カップリング生成物の修飾後に別のキャッピングを含む。一部の実施形態において、第1のキャッピングはアミド化条件下で実施され、これは例えば、アシル化試薬 (例えば、 $(RC(O))_2O$ の構造を有する無水物 (例えば、 Ac_2O)) 及び塩基 (例えば、2, 6-ルチジン) を含む。一部の実施形態において、第1のキャッピングにより、アミノ基、例えばインターヌクレオチド結合中のキラル補助基のアミノ基がキャッピングされる。一部の実施形態において、キャッピングステップで形成されるインターヌクレオチドは、

【化65】



10

を含み、式中、各可変要素は、独立に、本開示に係るものである。一部の実施形態において、 R^1 は $R-C(O)-$ である。一部の実施形態において、 R は CH_3- である。一部の実施形態において、各キラル制御されたカップリング (例えば、キラル補助基を使用する) の後に第1のキャッピングが続く。典型的には、従来のホスホロアミダイトを用いて天然リン酸結合を構築するキラル制御されていないカップリングについてのサイクルは、第1のキャッピングを含まない。一部の実施形態において、第2のキャッピングは、例えば、遊離 $5'-OH$ がキャッピングされるエステル化条件下 (例えば、従来のホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成のキャッピング条件下) で実施される。

20

【0445】

特定のキャッピング技術、例えば試薬、条件、方法等は実施例に示す。

【0446】

修飾

一部の実施形態において、その結合リンが $P(III)$ として存在するインターヌクレオチド結合は、別の修飾インターヌクレオチド結合を形成するように修飾される。多くの実施形態において、 $P(III)$ は、求電子剤との反応によって修飾される。本開示では、 $P(III)$ に好適な各種の反応を利用し得る。好適な修飾技術 (例えば、試薬 (例えば、硫化試薬、酸化試薬等)、条件等) としては、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び/又は国際公開第2019/217784号 (これらの各々の修飾技術は、参照により援用される) に記載されるものが挙げられる。

40

【0447】

一部の実施形態において、実施例に示されるとおり、本開示は、中性インターヌクレオチド結合を含めた非負電荷インターヌクレオチド結合を導入するための修飾試薬を提供する。

【0448】

50

一部の実施形態において、修飾はサイクル内である。一部の実施形態において、修飾はサイクル外であり得る。例えば、一部の実施形態では、1つ以上の修飾ステップが、1つ以上のインターヌクレオチド結合及び／又は他の位置に同時に修飾を導入するためのDMDオリゴヌクレオチド鎖に到達した後に実施され得る。

【0449】

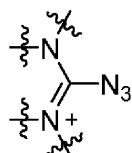
一部の実施形態において、修飾はクリックケミストリーの使用を含み、例えば、ここで、DMDオリゴヌクレオチド、例えばインターヌクレオチド結合のアルキン基がアジドと反応する。本開示では、クリックケミストリーの様々な試薬及び条件を利用することができる。一部の実施形態において、アジドは R^1-N_3 の構造を有し、式中、 R^1 は本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、 R^1 は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ アルキルである。一部の実施形態において、 R^1 はイソプロピルである。

10

【0450】

一部の実施形態において、実施例で実証されるとおり、P(III)結合をアジド又はアジドイミダゾリニウム塩（例えば、

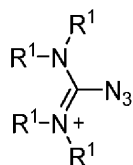
【化66】



20

を含む化合物；一部の実施形態では、アジド反応と称される）と好適な条件下で反応させることにより、P(III)結合を非負電荷インターヌクレオチド結合に変換することができる。一部の実施形態において、アジドイミダゾリニウム塩は PF_6^- の塩である。一部の実施形態において、アジドイミダゾリニウム塩は、

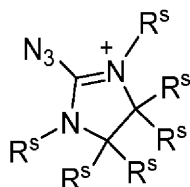
【化67】



30

の塩である。一部の実施形態において、有用な試薬塩は、

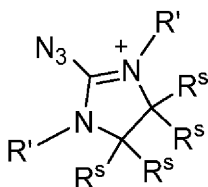
【化68】



40

の塩であり、式中、各 R^S は、独立に、 R^1 である。一部の実施形態において、有用な試薬は、

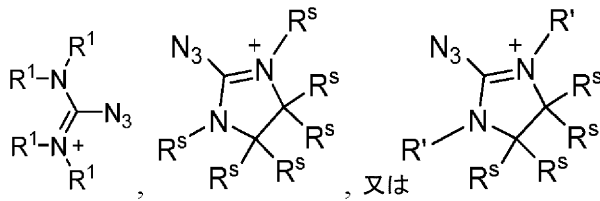
【化69】



50

の塩である。窒素カチオンを含むかかる試薬は、対アニオン（例えば、本開示に記載されるとおりの Q^- ）も含有し、これは、当技術分野において広く公知であり、様々な化学的試薬中に含まれる。一部の実施形態において、有用な試薬は $Q^+ Q^-$ であり、式中、 Q^+ は、

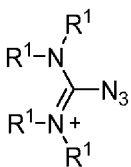
【化 7 0】



10

であり、及び Q^- は対アニオンである。一部の実施形態において、 Q^+ は、

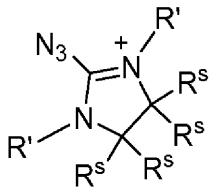
【化 7 1】



20

である。一部の実施形態において、 Q^+ は、

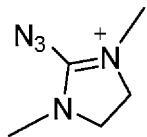
【化 7 2】



30

である。一部の実施形態において、 Q^+ は、

【化 7 3】



である。当業者が理解するとおり、 $Q^+ Q^-$ の構造を有する化合物において、典型的には、 Q^+ 中の正電荷の数が Q^- 中の負電荷の数に等しい。一部の実施形態において、 Q^+ は一価カチオンであり、 Q^- は一価アニオンである。一部の実施形態において、 Q^- は、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 TfO^- 、 Tf_2N^- 、 AsF_6^- 、 ClO_4^- 又は SbF_6^- である。一部の実施形態において、 Q^- は PF_6^- である。当業者は、他にも多くのタイプの対アニオンが利用可能であり、本開示に利用し得ることを容易に理解する。一部の実施形態において、アジドイミダゾリニウム塩は2-アジド-1,3-ジメチルイミダゾリニウムヘキサフルオロホスフェートである。

40

【0451】

一部の実施形態において、 $P(III)$ 結合は、 $R-GZ$ （式中、 R は本開示に記載されるとおりであり、及び GZ は脱離基、例えば $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-OTf$ 、 $-OMs$ 、 $-OTs$ 等である）の構造を有する求電子剤と反応する。一部の実施形態において、 R は $-CH_3$ である。一部の実施形態において、 R は $-CH_2CH_3$ である。一部の実施

50

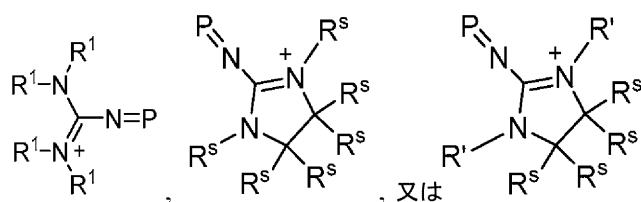
形態において、Rは $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ である。一部の実施形態において、Rは $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ である。一部の実施形態において、Rは $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ である。一部の実施形態において、Rは $\text{PhCH}_2\text{OCH}_2-$ である。一部の実施形態において、Rは $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ である。一部の実施形態において、Rは $\text{H}_3\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}_2-$ である。一部の実施形態において、Rは $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-$ である。一部の実施形態において、Rは CH_3SCH_2- である。一部の実施形態において、Rは $-\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ である。一部の実施形態において、Rは $-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ である。一部の実施形態において、Rは $-\text{CH}_2\text{CONHCH}_3$ である。

【0452】

一部の実施形態において、修飾ステップの後、P(III)結合リンがP(V)インターヌクレオチド結合に変換される。一部の実施形態において、P(III)結合リンはP(V)インターヌクレオチド結合に変換され、その結合リンに結合したすべての基は変化しないままである。一部の実施形態において、結合リンはPからP(=O)に変換される。一部の実施形態において、結合リンはPからP(=S)に変換される。一部の実施形態において、結合リンはPから

10

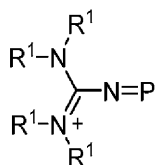
【化74】



20

(式中、各可変要素は、独立に、本開示に記載されるとおりである) に変換される。一部の実施形態において、Pは、

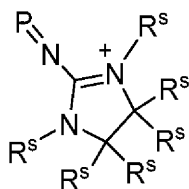
【化75】



30

に変換される。一部の実施形態において、Pは、

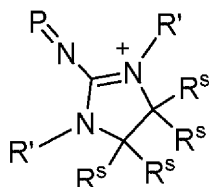
【化76】



40

に変換される。一部の実施形態において、Pは、

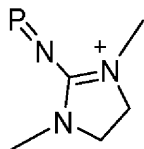
【化77】



に変換される。一部の実施形態において、Pは、

50

【化 7 8】



に変換される。当業者が理解するとおり、各カチオンに典型的には対アニオンが存在し、従ってシステム内（例えば、化合物、組成物等）の正電荷の総数は負電荷の総数に等しくなる。一部の実施形態において、対アニオンは、本開示に記載されるとおりの Q^- （例えば、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 TfO^- 、 Tf_2N^- 、 AsF_6^- 、 ClO_4^- 、 SbF_6^- 等）である。

10

【0453】

一部の実施形態において、かかるインターヌクレオチド結合は、キラル制御されている。一部の実施形態において、すべてのかかるインターヌクレオチド結合がキラル制御されている。一部の実施形態において、かかるインターヌクレオチド結合の少なくとも1つの結合リンは R_p である。一部の実施形態において、かかるインターヌクレオチド結合の少なくとも1つの結合リンは S_p である。一部の実施形態において、かかるインターヌクレオチド結合の少なくとも1つの結合リンは R_p であり、及びかかるインターヌクレオチド結合の少なくとも1つの結合リンは S_p である。一部の実施形態において、本開示の DMD オリゴヌクレオチドは、1つ以上の（例えば、1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、1～40、1～50、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 個等の）かかるインターヌクレオチド結合を含む。一部の実施形態において、かかる DMD オリゴヌクレオチドは、1つ以上の他のタイプのインターヌクレオチド結合、例えば1つ以上の天然リン酸結合及び／又は1つ以上のホスホロチオエートインターヌクレオチド結合（例えば、一部の実施形態では、独立にキラル制御されているものの1つ以上；一部の実施形態では、その各々が独立にキラル制御されている；一部の実施形態では、少なくとも1つが R_p である；一部の実施形態では、少なくとも1つが S_p である；一部の実施形態では、少なくとも1つが R_p であり、且つ少なくとも1つが S_p である等）を更に含む。一部の実施形態において、かかる DMD オリゴヌクレオチドは立体的に純粋である（実質的に他の立体異性体がない）。一部の実施形態において、本開示は、かかる DMD オリゴヌクレオチドのキラル制御された DMD オリゴヌクレオチド組成物を提供する。一部の実施形態において、本開示は、かかる DMD オリゴヌクレオチドのキラル的に純粋な DMD オリゴヌクレオチド組成物を提供する。

20

30

【0454】

一部の実施形態において、修飾は、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超える立体選択性で進む。一部の実施形態において、立体選択性は85%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は85%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は90%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は91%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は92%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は93%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は94%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は95%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は96%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は97%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は98%以上である。一部の実施形態において、立体選択性は99%以上である。一部の実施形態において、修飾は立体特異的である。

40

【0455】

脱ブロック化

一部の実施形態において、サイクルはサイクルステップを含む。一部の実施形態において

50

、成長するDMDオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基はブロック化され（即ち保護され）、続いてヌクレオシドカップリングパートナーと反応させるため脱ブロック化されなければならない。

【0456】

一部の実施形態では、酸性化を用いてブロック化基が除去される。好適な脱ブロック化技術（例えば、試薬、条件等）としては、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/217784号（これらの各々の脱ブロック化技術は、参照により援用される）に記載されるものが挙げられる。特定の脱ブロック化技術、例えば試薬、条件、方法等は実施例に示す。

10

【0457】

切断及び脱保護

特定の段階では、例えば望ましいDMDオリゴヌクレオチド長さが実現した後、切断及び／又は脱保護が実施されることにより、ブロック化した核酸塩基等が脱保護され、及び支持体からDMDオリゴヌクレオチド生成物が切断される。一部の実施形態において、切断及び脱保護は別々に実施される。一部の実施形態において、切断及び脱保護は、1つのステップにおいて又は2つ以上のステップにおいて、但しその間に生成物の分離を挟まずに実施される。一部の実施形態において、切断及び／又は脱保護には塩基条件及び高温が利用される。一部の実施形態において、特定のキラル補助基には、フッ化物条件が必要である（例えば、TB AF、HF-ET₃N等、任意選択で追加の塩基と共に）。好適な切断及び脱保護技術（例えば、試薬、条件等）としては、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/0217784号（これらの各々の切断及び脱保護技術は、参照により援用される）に記載されるものが挙げられる。特定の切断及び脱保護技術、例えば試薬、条件、方法等は実施例に示す。

20

30

【0458】

一部の実施形態において、特定のキラル補助基は塩基性条件下で除去される。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドを塩基、例えばN(R)₃の構造を有するアミンと接触させることにより、特定のキラル補助基（例えば、本開示に記載されるとおりのG²中の電子求引基を含むもの）が除去される。一部の実施形態において、塩基はNHR₂である。一部の実施形態において、各Rは、独立に、任意選択で置換されているC₁～6脂肪族である。一部の実施形態において、各Rは、独立に、任意選択で置換されているC₁～6アルキルである。一部の実施形態において、アミンはDEAである。一部の実施形態において、アミンはTEAである。一部の実施形態において、アミンは、溶液、例えばアセトニトリル溶液として提供される。一部の実施形態において、かかる接触は無水条件下で実施される。一部の実施形態において、かかる接触は、望ましいDMDオリゴヌクレオチド長さが実現した直後に実施される（例えば、合成サイクル後最初のステップ）。一部の実施形態において、かかる接触は、キラル補助基及び／又は保護基の除去及び／又

40

50

は固体支持体からのDMDオリゴヌクレオチドの切断の前に実施される。一部の実施形態において、塩基との接触により、標準的なDMDオリゴヌクレオチド合成において利用されるシアノエチル基が除去され、塩形態で存在し得る天然リン酸結合がもたらされる（ここで、カチオンは、例えばアンモニウム塩である）。

【0459】

サイクル

本開示のDMDオリゴヌクレオチドの調製に好適なサイクルとしては、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号（例えば、スキームI、I-b、I-c、I-d、I-e、I-f等）、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/217784号（これらの各々のサイクルは、参照により援用される）に記載されるものが挙げられる。例えば、一部の実施形態において、例示的サイクルはスキームI-fである。特定のサイクルは実施例に示す（例えば、天然リン酸結合の調製については、他のキラル補助基を利用する等）。

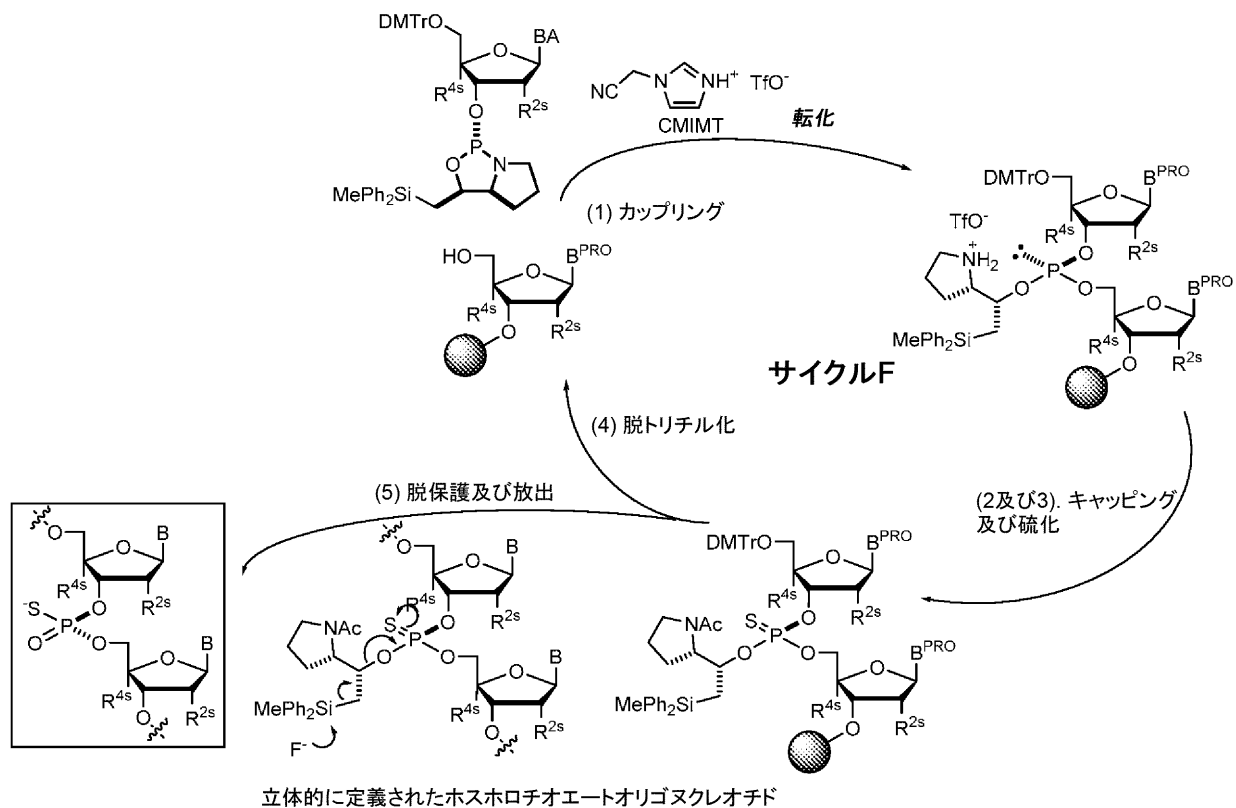
10

20

【0460】

スキームI-e. DPSEキラル補助基を用いた例示的サイクル

【化79】



30

40

【0461】

一部の実施形態において、R^{2s}はH又は-OR¹であり、式中、R¹は水素でない。一部の実施形態において、R^{2s}はH又は-OR¹であり、式中、R¹は、任意選択で置換されているC₁~6アルキルである。一部の実施形態において、R^{2s}はHである。一部の実施形態において、R^{2s}は-OMeである。一部の実施形態において、R^{2s}は-O

50

CH₂CH₂OCH₃である。一部の実施形態において、R²Sは-Fである。一部の実施形態において、R⁴Sは-Hである。一部の実施形態において、R⁴S及びR²Sは一緒になって、本開示に記載されるとおりの架橋-L-O-を形成する。一部の実施形態において、-O-は2'位の炭素に連結される。一部の実施形態において、Lは-CH₂-である。一部の実施形態において、Lは-CH(Me)-である。一部の実施形態において、Lは-(R)-CH(Me)-である。一部の実施形態において、Lは-(S)-CH(Me)-である。

【0462】

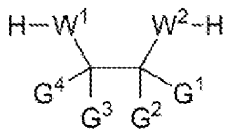
精製及び特徴付け

本開示におけるDMDオリゴヌクレオチド及びDMDオリゴヌクレオチド組成物の精製及び／又は特徴付けには、様々な精製及び／又は特徴付け技術（方法、計器、プロトコル等）を利用することができる。一部の実施形態において、精製は、各種のHPLC／UPLC技術を用いて実施される。一部の実施形態において、特徴付けは、MS、NMR、UV等を含む。一部の実施形態において、精製及び特徴付けは、例えばHPLC-MS、UPLC-MS等、共に実施され得る。例示的な精製及び特徴付け技術としては、米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/200185号及び／又は国際公開第2019/217784号（これらの各々の精製及び特徴付け技術は、参照により援用される）に記載されるものが挙げられる。

【0463】

一部の実施形態において、本開示は、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及びDMDオリゴヌクレオチド組成物を調製する方法を提供する。一部の実施形態において、提供される方法は、本明細書に記載されるとおりの式3-AAの構造を有する提供されるキラル試薬を提供することを含む。一部の実施形態において、提供される方法は、

【化80】



（式中、W¹は-NG⁵であり、W²はOであり、G¹及びG³の各々は、独立に、水素であるか、又はC₁～C₁₀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、任意選択で置換されている基であり、G²は-C(R)₂Si(R)₃又は-C(R)₂SO₂R¹であり、及びG⁴とG⁵とは一緒になって、単環式又は多環式の、縮合している又は縮合していない最大約20個の環原子の任意選択で置換されている飽和、部分不飽和又は不飽和ヘテロ原子含有環を形成し、式中、各Rは、独立に、水素であるか、又はC₁～C₆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、任意選択で置換されている基である）の構造を有する提供されるキラル試薬を提供することを含む。

【0464】

一部の実施形態において、提供されるキラル試薬は、

10

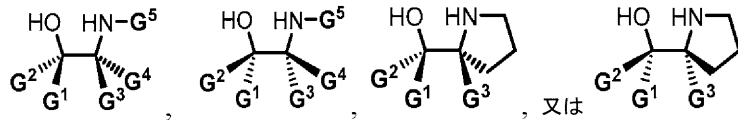
20

30

40

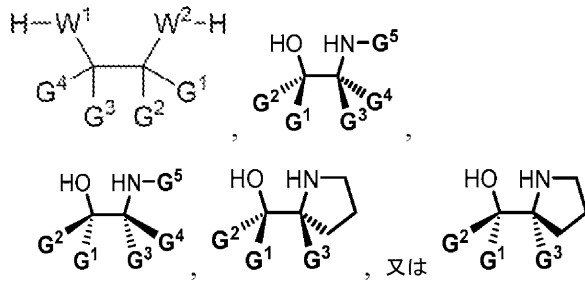
50

【化 8 1】



の構造を有し、式中、各可変要素は、独立に、本開示に記載されるとおりである。一部の
実施形態において、提供される方法は、

【化 8 2】

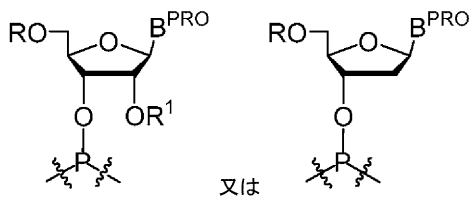


10

の構造を有するキラル試薬からの部分を含むホスホロアミダイトを提供することを含み、
ここで、 $-W^1H$ 及び $-W^2H$ 又はヒドロキシル基及びアミノ基は、ホスホロアミダイト
のリン原子と結合を形成する。一部の実施形態において、 $-W^1H$ 及び $-W^2H$ 又はヒド
ロキシル基及びアミノ基は、例えば、

20

【化 8 3】



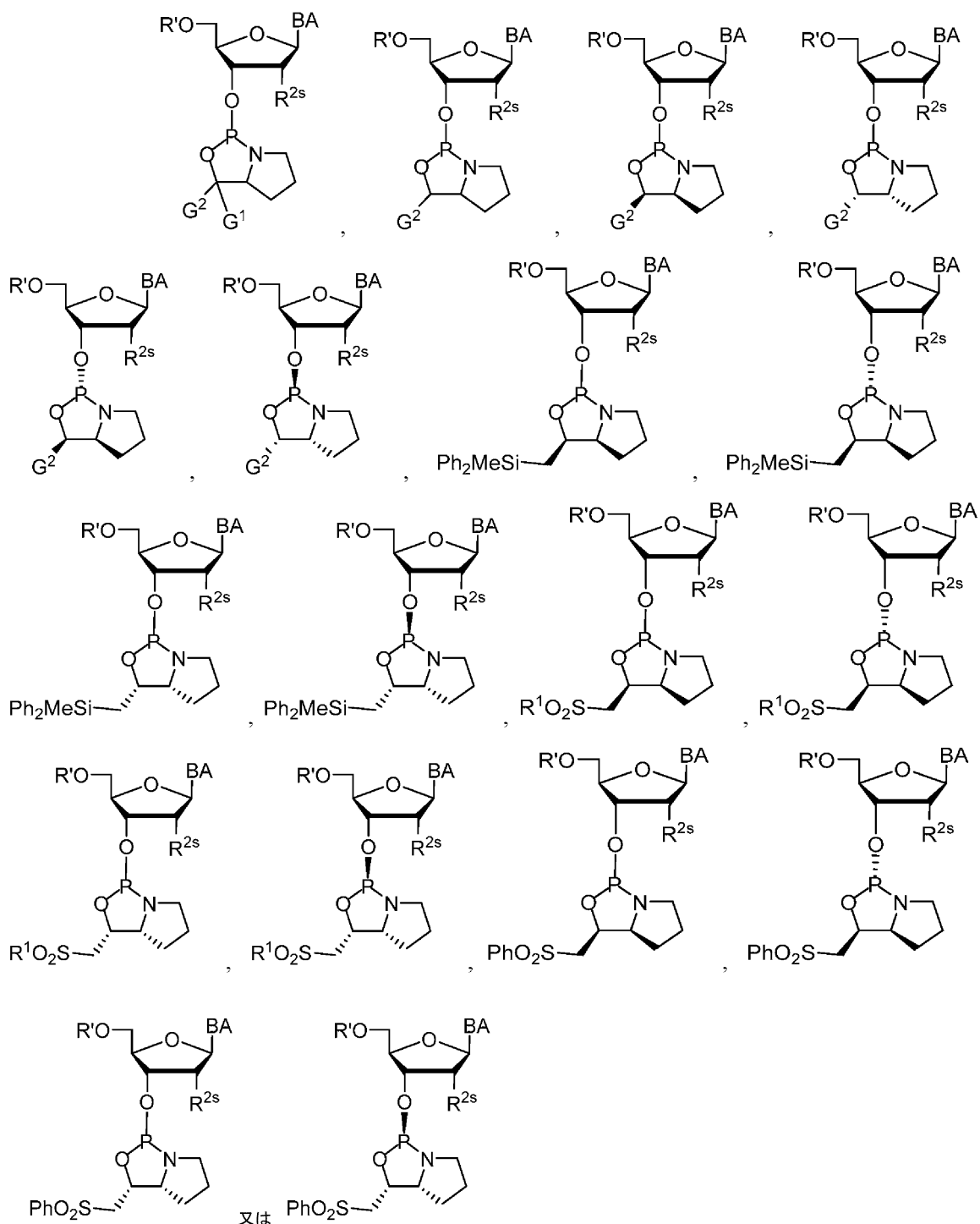
30

におけるホスホロアミダイトのリン原子と結合を形成する。一部の実施形態において、ホ
スホロアミダイトは、

40

50

【化 8 4】



の構造を有し、式中、他の各可変要素は、独立に、本開示に記載されるとおりである。一部の実施形態において、R²Sは、-Hである。一部の実施形態において、R²Sは、-Fである。一部の実施形態において、R²Sは、-OMeである。一部の実施形態において、R'は、DMTrである。一部の実施形態において、BAは、任意選択で置換されているA、T、C、G、U又はA、T、C、G若しくはUの任意選択で置換されている互変異性体である。

【 0 4 6 5 】

一部の実施形態において、 G^2 は $-C(R)_2Si(R)_3$ であり、式中、 $-C(R)_2-$ は、任意選択で置換されている $-CH_2-$ であり、及び $-Si(R)_3$ の各Rは、独立

10

20

30

40

50

に、 $C_1 \sim C_{10}$ 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、任意選択で置換されている基である。一部の実施形態において、 $-Si(R)_3$ の少なくとも1つのRは、独立に、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_{10}$ アルキルである。一部の実施形態において、 $-Si(R)_3$ の少なくとも1つのRは、独立に、任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、 $-Si(R)_3$ の1つのRは、独立に、任意選択で置換されているフェニルであり、他の2つのRの各々は、独立に、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_{10}$ アルキルである。一部の実施形態において、 $-Si(R)_3$ の1つのRは、独立に、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_{10}$ アルキルであり、他の2つのRの各々は、独立に、任意選択で置換されているフェニルである。一部の実施形態において、 G_2 は、任意選択で置換されている $-CH_2Si(Ph)(Me)_2$ である。一部の実施形態において、 G_2 は、任意選択で置換されている $-CH_2Si(Me)(Ph)_2$ である。一部の実施形態において、 G_2 は $-CH_2Si(Me)(Ph)_2$ である。一部の実施形態において、 G_4 と G_5 とは一緒になって、1個の窒素原子（それに G_5 が結合する）を含有する、任意選択で置換されている飽和5～6員環を形成する。一部の実施形態において、 G_4 と G_5 とは一緒になって、1個の窒素原子を含有する、任意選択で置換されている飽和5員環を形成する。一部の実施形態において、 G_1 は水素である。一部の実施形態において、 G_3 は水素である。一部の実施形態において、 G_1 及び G_3 は両方とも水素である。一部の実施形態において、 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、任意選択で置換されている $-CH_2-$ であり、及び $-Si(R)_3$ の各Rは、独立に、 $C_1 \sim C_{10}$ 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、任意選択で置換されている基であり、及び G_4 と G_5 とは一緒になって、1個の窒素原子を含有する、任意選択で置換されている飽和5員環を形成する。一部の実施形態において、提供される方法は、フルオロ含有試薬を提供することを更に含む。一部の実施形態において、提供されるフルオロ含有試薬は、キラル試薬又はキラル試薬から形成される生成物を合成後にオリゴヌクレオチドから除去する。本開示では、 $-SiR_3$ 基の除去のためのF-源を含め、様々な公知のフルオロ含有試薬、例えばTBAF、 HF_3-Et_3N 等を利用することができる。一部の実施形態において、フルオロ含有試薬は、濃アンモニアなどの従来方法と比較して、より良好な結果、例えばより短い処理時間、より低い温度、より少ない脱硫化等を提供する。一部の実施形態において、特定のフルオロ含有試薬については、本開示は、結果の改良のため、例えばキラル試薬（又はDMDオリゴヌクレオチド合成時にそれから形成される生成物）の除去時における支持体からのDMDオリゴヌクレオチドの切断を減らすため、リンカーを提供する。一部の実施形態において、提供されるリンカーはSPリンカーである。一部の実施形態において、本開示は、 $HF-NR_3$ などのHF-塩基錯体を利用すると、キラル試薬（又はDMDオリゴヌクレオチド合成時にそれから形成される生成物）の除去時に切断を制御し得ることを実証した。一部の実施形態において、 $HF-NR_3$ は $HF-NEt_3$ である。一部の実施形態において、 $HF-NR_3$ 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。

【0466】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおり、 G_2 は、例えばその α 位に電子求引基を含む。一部の実施形態において、 G_2 は、1つ以上の電子求引基で置換されたメチルである。一部の実施形態において、電子求引基は炭素原子を含み、及び／又は例えば、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-P(O)(R^1)-$ 、 $-P(S)R^1-$ 又は $-C(O)-$ を介して炭素原子に連結される。一部の実施形態において、電子求引基は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、ハロゲン、 $-C(O)R^1$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-S(O)R^1$ 、 $-S(O)_2R^1$ 、 $-P(W)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(OR')_2$ 又は $-P(S)(R^1)_2$ である。一部の実施形態において、電子求引基は、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、ハロゲン、 $-C(O)R^1$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-S(O)R^1$ 、 $-S(O)_2R^1$ 、 $-P(W)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(R^1)_2$ 、 $-P(O)(OR')_2$ 又は $-P(S)(R^1)_2$ の1つ以上で置換されて

いるアリアル又はヘテロアリアル、例えばフェニルである。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2S(O)R'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2S(O)_2R'$ である。一部の実施形態において、 G^2 は $-CH_2P(O)(R')_2$ である。更なる例示の実施形態が、例えばキラル試薬／補助基に関して記載される。

【0467】

立体制御されたオリゴヌクレオチド（例えば、本明細書又は当技術分野において記載される方法により調製されるもの）が意図した立体制御された（キラル制御された）インターヌクレオチド結合を含むことの確認は、種々の好適な技術を用いて実施することができる。立体制御された（キラル制御された）オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの立体制御されたインターヌクレオチド結合を含み、これは、例えば、リンを含む立体制御されたインターヌクレオチド結合、 R_p 配置の立体制御されたホスホロチオエートインターヌクレオチド結合（ PS ）、 S_p 配置の PS 等であり得る。有用な技術としては、非限定的な例として：NMR（例えば、 $1D$ （一次元）及び／又は $2D$ （二次元） $1H-31P$ HETCOR（異核相関分光法））、HPLC、 $RP-HPLC$ 、質量分析法、 $LC-MS$ 及び／又は立体特異的ヌクレアーゼが挙げられる。一部の実施形態において、立体特異的ヌクレアーゼとしては、 R_p 配置のインターヌクレオチド結合（例えば、 R_p 配置の PS ）に特異的な、ベンゾナーゼ、マイクロコッカスヌクレアーゼ及び $svPDE$ （ヘビ毒ホスホジエステラーゼ）；及び S_p 配置のインターヌクレオチド結合（例えば、 S_p 配置の PS ）に特異的な、ヌクレアーゼ $P1$ 、マングビーンヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ $S1$ が挙げられる。

10

20

【0468】

一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチド、例えばDMDオリゴヌクレオチドの骨格の立体化学パターン及び／又は特定のインターヌクレオチド結合の立体化学を確認又は同定する方法に関する。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、リンを含む立体制御されたインターヌクレオチド結合、 R_p 配置の立体制御されたホスホロチオエート（ PS ）又は S_p 配置の PS を含む。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの立体制御されたインターヌクレオチド結合と、立体制御されていない少なくとも1つのインターヌクレオチド結合とを含む。一部の実施形態において、方法は、立体特異的ヌクレアーゼによるDMDオリゴヌクレオチドの消化を含む。一部の実施形態において、立体特異的ヌクレアーゼは、 R_p 配置のインターヌクレオチド結合（例えば、 R_p 配置の PS ）に特異的な、ベンゾナーゼ、マイクロコッカスヌクレアーゼ及び $svPDE$ （ヘビ毒ホスホジエステラーゼ）；及び S_p 配置のインターヌクレオチド結合（例えば、 S_p 配置の PS ）に特異的な、ヌクレアーゼ $P1$ 、マングビーンヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ $S1$ から選択される。一部の実施形態において、立体特異的ヌクレアーゼによる消化によって生成されたDMDオリゴヌクレオチド又はその断片が分析される。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド又はその断片（例えば、立体特異的ヌクレアーゼによる消化によって生成される）は、NMR、 $1D$ （一次元）及び／又は $2D$ （二次元） $1H-31P$ HETCOR（異核相関分光法）、HPLC、 $RP-HPLC$ 、質量分析法、 $LC-MS$ 、 $UPLC$ 等によって分析される。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド又はその断片は、既知の立体化学パターンを有するDMDオリゴヌクレオチドの化学的に合成した断片と比較される。

30

40

【0469】

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、少なくとも一部の例において、糖の修飾（例えば、 $2'$ -修飾）、塩基配列又は立体化学的コンテキストにより、特定のヌクレアーゼの立体特異性が変化し得ることを指摘しておく。例えば、一部の実施形態において、 R_p インターヌクレオチド結合に特異的なベンゾナーゼ及びマイクロコッカスヌクレアーゼの両方は、 $PS-S_p$ インターヌクレオチド結合が隣接する単離された $PS-R_p$ インターヌクレオチド結合を切断することができなかった。

【0470】

様々な技法及び材料を利用することができる。一部の実施形態において、本開示は、技術

50

の有用な組み合わせを提供する。例えば、一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドの1つ以上の特定のインターヌクレオチド結合の立体化学は、立体特異的ヌクレアーゼによるDMDオリゴヌクレオチドの消化及び種々の技法のいずれか（例えば、質量電荷比に基づく分離、NMR、HPLC、質量分析法等）による、得られた断片（例えば、ヌクレアーゼ消化生成物）の分析によって確認することができる。一部の実施形態において、立体特異的ヌクレアーゼによるDMDオリゴヌクレオチドの消化の立体化学は、例えば立体化学を制御する技術によって生成された化学合成断片（例えば、二量体、三量体、四量体等）との比較（例えば、NMR、HPLC、質量分析法等）によって確認することができる。

【0471】

更に別の例では、異なるDMDオリゴヌクレオチドを試験して、インターヌクレオチド結合が意図した立体配置であることを確認した。DMDオリゴヌクレオチドは、DMDのエクソン51のスキッピング能力を有する；DMDオリゴヌクレオチド中の大多数のヌクレオチドが2'-Fであり、残りは2'-OMeであった；DMDオリゴヌクレオチド中の大多数のインターヌクレオチド結合がSp配置のPSであり、残りはPOであった。このDMDオリゴヌクレオチドを立体特異的ヌクレアーゼによる消化によって試験し、得られた消化断片を分析した（例えば、LC-MSにより、及び既知の立体化学の化学合成断片との比較により）。この結果から、このDMDオリゴヌクレオチドが、立体制御されたインターヌクレオチド結合の意図したパターンを有することが確認された。

【0472】

一部の実施形態において、立体化学の特徴付け及び／又は確認にはNMRが有用である。例示的な実験の組において、立体制御されたCpGモチーフを含むDMDオリゴヌクレオチドの組を試験して、CpGモチーフの意図した立体化学を確認した。この組内のオリゴヌクレオチドは、pCpGpの構造を有するモチーフを含み、ここで、Cは、シトシンであり、Gはグアニンであり、及びpは、ステレオランダムな又は立体制御された（例えば、Rp又はSp配置の）ホスホロチオエートである。例えば、あるDMDオリゴヌクレオチドはpCpGp構造を含み、ここで、ホスホロチオエートの立体化学パターン（例えば、ppp）はRRRであった；別のDMDオリゴヌクレオチドでは、pppの立体化学パターンはRSSであった；別のDMDオリゴヌクレオチドでは、pppの立体化学パターンはRSRであった等である。この組において、pppの可能なすべての立体化学パターンが表された。DMDオリゴヌクレオチドのうち、pCpGp構造の外部にある一部分において、すべてのインターヌクレオチド結合がPOであった；このDMDオリゴヌクレオチド中のすべてのヌクレオチドが2'-デオキシであった。これらの様々なDMDオリゴヌクレオチドを立体特異的ヌクレアーゼによる消化なしにNMRで試験し、特徴的なピークパターンが観察されたことから、Rp又はSpである各PSがユニークなピークを生じたことが示され、及びDMDオリゴヌクレオチドが意図した立体化学の立体制御されたPSインターヌクレオチド結合を含んだことが確認された。

【0473】

様々な他の立体制御されたDMDオリゴヌクレオチドのインターヌクレオチド結合の立体化学パターンを確認した。ここで、DMDオリゴヌクレオチドは、種々の化学修飾及び立体化学パターンを含む。

【0474】

オリゴヌクレオチドを評価、検出及び／又は定量化するための技術

一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチドを評価、検出及び／又は定量化するための技術を提供する。一部の実施形態において、本開示は、例えば、試料中のオリゴヌクレオチドのレベルを評価する方法に関する。一部の実施形態において、方法は、ハイブリダイゼーション酵素結合免疫吸着アッセイ（HELISA）であるか、それを利用するか又はそれを含む。

【0475】

一部の実施形態において、HELISAを使用して、オリゴヌクレオチド（様々な試料の

10

20

30

40

50

分析物と呼ばれ得る)を定量化することができる。一部の実施形態において、試験試料は、限定はされないが、血漿、脳脊髄液、尿及び組織ホモジネート(例えば、脳、脊髄、肝臓、腎臓、脾臓及び他の組織)を含む。一部の実施形態において、提供される技術、例えばHELISAは、例えば、開発中、臨床試験中、承認後など、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド組成物の薬物動態学的評価及び毒物動態学的評価に有用である。

【0476】

一部の実施形態において、本開示は、

その塩基配列が、第1のオリゴヌクレオチド又はその一部の塩基配列に相補的である配列であるか又はそれを含む、捕捉プローブオリゴヌクレオチドを得ること；

捕捉プローブオリゴヌクレオチドを第1のオリゴヌクレオチドと接触させて、この捕捉プローブオリゴヌクレオチドを第1のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせること；

その塩基配列が、第1のオリゴヌクレオチドの塩基配列と相補的ではない捕捉プローブオリゴヌクレオチドの一部の塩基配列に相補的な配列であるか又はそれを含む、検出プローブオリゴヌクレオチドを得ること；

検出プローブオリゴヌクレオチドを捕捉プローブオリゴヌクレオチドと接触させて、検出プローブオリゴヌクレオチドを、第1のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする捕捉プローブオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせること；

第1のオリゴヌクレオチドと検出プローブオリゴヌクレオチドとを共有結合させること；及び

第1のオリゴヌクレオチドに共有結合していない検出プローブオリゴヌクレオチドを除去すること

を含む方法を提供する。

【0477】

一部の実施形態において、提供される方法は、試料中の第1のオリゴヌクレオチドを検出及び／又は定量化するのに有用である。

【0478】

一部の実施形態において、捕捉プローブオリゴヌクレオチドはタグを含む。一部の実施形態において、タグを利用して、捕捉プローブオリゴヌクレオチドを固定することができる。一部の実施形態において、タグは、オリゴヌクレオチドの3'末端にある。一部の実施形態において、タグはビオチンである。

【0479】

一部の実施形態において、検出プローブオリゴヌクレオチドは、検出、定量化などのための標識を含む。有用な標識は、広く利用可能であり、本開示に従って利用することができる。例えば、一部の実施形態において、標識は、抗体によって検出することができ、その後、別のアッセイ(例えば、ELISA又はそれに類似する技術など)によって評価することができる抗原である。一部の実施形態において、標識は蛍光標識である。一部の実施形態において、標識は放射性標識である。

【0480】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、例えば、ライゲーションを介して共有結合している。当業者が理解するとおり、様々なライゲーション技術が利用可能であり、本開示に従って利用することができる。

【0481】

一部の実施形態において、第1のオリゴヌクレオチドに共有結合していない検出プローブオリゴヌクレオチドの除去は、遊離検出プローブオリゴヌクレオチド並びに補足プローブオリゴヌクレオチド及び第1のオリゴヌクレオチドと検出プローブオリゴヌクレオチドとによって形成されたライゲーション産物によって形成されたものではない複合体の除去を含み、ここで、捕捉プローブオリゴヌクレオチドは、ライゲーション産物に相補的である。一部の実施形態において、捕捉プローブオリゴヌクレオチド及びライゲーション産物は、同じ長さであり、互いに完全に相補的である。一部の実施形態において、除去後、実質的にすべての標識は、ライゲーション産物及び捕捉プローブオリゴヌクレオチドによって

10

20

30

40

50

形成された複合体に存在する。一部の実施形態において、除去は、系を S 1 ヌクレアーゼと接触させることによって行われ、ここで、一本鎖オリゴヌクレオチド及び／又はミスマッチのあるオリゴヌクレオチド鎖は消化される。

【0482】

一部の実施形態において、提供される方法は、検出プローブオリゴヌクレオチドを検出及び／又は定量化することを含む。当業者が理解するとおり、様々な技術、例えば ELISA 及び／又は同様の技術におけるものを検出及び／又は定量化に利用することができる。一部の実施形態において、検出プローブオリゴヌクレオチドの検出／定量化により、第 1 のオリゴヌクレオチドが検出及び／又は定量化される。

【0483】

一部の実施形態において、検出プローブオリゴヌクレオチドは、9 ヌクレオシド長である。一部の実施形態において、第 1 のオリゴヌクレオチドは、20 ヌクレオシド長である。一部の実施形態において、捕捉プローブオリゴヌクレオチドは、検出プローブオリゴヌクレオチド及び第 1 のオリゴヌクレオチドの合計である長さを有する（例えば、第 1 のオリゴヌクレオチドが 20 量体である場合、検出プローブオリゴヌクレオチドは 9 量体であり、捕捉プローブオリゴヌクレオチドは 29 量体である）。

【0484】

一部の実施形態において、本開示は、提供されるオリゴヌクレオチド及び捕捉プローブオリゴヌクレオチドを含む複合体を提供する。一部の実施形態において、本開示は、提供されるオリゴヌクレオチドと検出プローブオリゴヌクレオチドとのライゲーション産物であるオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、本開示は、捕捉プローブオリゴヌクレオチド及びライゲーション産物オリゴヌクレオチドを含む複合体を提供する。一部の実施形態において、捕捉プローブオリゴヌクレオチドは、例えば、表面、固体支持体などに固定される。

【0485】

図 1 は、有用な例を示す。図 1 において、アッセイは、オリゴヌクレオチドと塩基対を形成し、捕捉プローブの 5' 末端にオーバーハングが残る捕捉プローブオリゴヌクレオチドを使用する。捕捉プローブは、3' 末端にビオチンが共有結合でタグ付けされ、これにより、捕捉プローブ：オリゴヌクレオチド複合体を、アビジン、ニュートラアビジン、ストレプトアビジン、抗ビオチン抗体及び他のビオチン結合分子などの分子でプレコートされたプレートにプルダウンすることが可能になる。次に、検出プローブオリゴヌクレオチド、この場合にはジゴキシゲニンなどの共有結合 3' - 検出タグを有する短い 9 量体オリゴヌクレオチドが、T 4 DNA リガーゼとともに追加される。検出プローブオリゴヌクレオチド塩基は、捕捉プローブの 5' オーバーハングと対を形成する。検出プローブと捕捉プローブとの塩基対形成は、オリゴヌクレオチドの 3' 末端を検出プローブの 5' 末端にライゲーションするための T 4 DNA リガーゼのテンプレートを提供する。とりわけ、ライゲーションは、必要に応じて、検出プローブオリゴヌクレオチドが捕捉プローブにハイブリダイズしたままであるように行われる。ライゲーション後、S 1 ヌクレアーゼを使用して、対になっていないすべての捕捉プローブをビオチン又は非二本鎖複合体からクリップする。図 1 に示すとおり、検出プローブの完全長親オリゴヌクレオチドへのライゲーションが効率的に進行すると、S 1 ヌクレアーゼによる切断及び分解に耐性がある完全 29 量体二本鎖複合体が形成される。検出タグがジゴキシゲニンである状態では、アルカリホスファターゼ（AP）コンジュゲート抗ジゴキシゲニン抗体を添加すると、AP 基質の添加で AP による脱リン酸化により蛍光シグナルが発生し、複合体の検出及び／又は定量化が可能になる。

【0486】

一部の実施形態において、感度及び／又は特異性は、第 1 のオリゴヌクレオチドの検出プローブへの共有結合によるライゲーションによる影響を受け得ることが観察された。一部の実施形態において、検出プローブオリゴヌクレオチドは、共有結合（例えば、ライゲーション）なしでは、検出／定量化まで捕捉プローブへの結合を維持できない。従って、T

10

20

30

40

50

4 DNAリガーゼ媒介ライゲーションが効率的でない場合、シグナルの重大な障害が起きる。一部の実施形態において、第1のオリゴヌクレオチドの共有結合、例えばライゲーションは、第1のオリゴヌクレオチド（分析物）を、そのより短い代謝産物（例えば、3' N単量体（例えば、Nが20、19量体の場合））と区別することができる。一部の実施形態において、より短い代謝産物オリゴヌクレオチドは、ライゲーション、例えばT4 DNA媒介ライゲーションをテンプレート化するのに十分な長さではない。一部の実施形態において、ライゲーションされていない検出プローブオリゴヌクレオチドを含む複合体が除去される。一部の実施形態において、そのような複合体は、例えば、S1ヌクレアーゼによって媒介される分解に対して不安定である。本開示に従って様々な技術を利用して、結合効率、例えばライゲーション効率、従って全体の検出／定量化効率を改善することができる。一部の実施形態において、ポリエチレングリコール（PEG）を利用して、提供される技術、例えばHELISAアッセイを改善してきた。

10

【0487】

一部の実施形態において、提供される技術は、洗剤、例えばPEG、DMSO及び／又はベタインの利用を含む。一部の実施形態において、提供される技術は、洗剤、例えばPEGの利用を含む。一部の実施形態において、提供される技術は、ジメチルスルホキシド（DMSO）の利用を含む。一部の実施形態において、提供される技術は、ベタインの利用を含む。

【0488】

一部の実施形態において、PEG（2000～6000の平均分子量の範囲）、5%ジメチルスルホキシド（DMSO）及び／又は0.5M～1.5Mベタインの10～20%溶液の添加が、バックグラウンドシグナルへの影響を最小限に抑えてシグナル全体を増強することが観察された。一部の実施形態において、シグナルは、約10倍改善され、それにより、方法の感度が著しく改善された。一部の実施形態において、PEGでは、ポリマーのパーセンテージを5から20%に増加させると、シグナルの用量依存的な増加が観察され、異なる平均分子量のPEG種（2000、4000及び6000）にわたって同等であった（表6）。

20

【0489】

30

40

50

【表 5 1】

表 6. 様々な PEG 分子量種の濃度依存効果。

この表のデータは、示された条件のデュプリケート測定の前平均バックグラウンド減算応答である。20 量体オリゴヌクレオチドを、適切な捕捉及び検出プローブオリゴヌクレオチドを使用する評価のためのアッセイで利用し、20 量体オリゴヌクレオチドは、様々な核酸塩基、糖及びインターヌクレオチド結合修飾を含み、そのキラルインターヌクレオチド結合のそれぞれは、独立に、キラル制御されている。

オリゴヌクレオチド	PEG のパーセンテージ	PEG の分子量		
		2000	4000	6000
0.5 ng/mL	0%	23.25		
	5%	1.16	-1.82	7.77
	10%	247.06	228.36	287.64
	20%	473.16	491.90	479.65
5 ng/mL	0%	348.29		
	5%	1318.61	1359.53	1454.66
	10%	5095.92	4977.37	5647.40
	20%	6538.09	6766.78	7238.19
50 ng/mL	0%	3983.78		
	5%	14661.62	15994.26	16711.34
	10%	32132.79	32123.30	32665.46
	20%	35261.80	35880.18	36638.60

【0 4 9 0】

一部の実施形態において、ベタインでは、例えばベタインの濃度を 0.1 M、0.5 M から 1.5 M に増加させると、シグナルの用量依存的な増加が観察された（表 7）。一部の実施形態において、DMSO では、10% PEG-6000 又は 1.5 M ベタインに匹敵するシグナルの増加をもたらすには 5% で十分である。一部の実施形態において、10% PEG-6000 とベタイン又は DMSO との組み合わせもシグナルの増加をもたらした。

【0 4 9 1】

【表 5 2】

表 7. 化学添加物は、PEG の有無にかかわらず、シグナル応答を改善する。

この表のデータは、示された条件のデュプリケート測定の前平均バックグラウンド減算応答である。同じオリゴヌクレオチドを表 6 のように評価に使用した。

オリゴヌクレオチド										
	PEG-6000 なし					10% PEG-6000				
	なし	5% DMSO	0.1M ベタイン	0.5M ベタイン	1.5M ベタイン	なし	5% DMSO	0.1M ベタイン	0.5M ベタイン	1.5M ベタイン
0.8 ng/mL	4.56	68.62	0.12	23.33	63.61	78.11	140.73	81.18	83.26	75.98
4 ng/mL	180.98	1290.61	109.44	476.83	1317.92	1589.65	2461.54	1445.09	1535.48	1383.11
20 ng/mL	1955.16	11290.71	1040.88	4475.63	10729.77	14453.51	16738.76	12272.30	14716.33	11991.78

【0 4 9 2】

様々な配列及び／又は化学修飾を含む様々な他のオリゴヌクレオチドでの PEG-6000

0 の評価は、同様の感度の向上をもたらした。

【0493】

【表53】

表 8. PEG はシグナルを改善することができる。

様々な濃度の 20 量体オリゴヌクレオチドを利用した(校正曲線として利用することができ;この表のオリゴヌクレオチド(表 6 及び表 7 のオリゴヌクレオチドとは異なる)は、様々な核酸塩基、糖及びインターヌクレオチド結合修飾を含み、そのキラルインターヌクレオチド結合のそれぞれは、独立に、キラル制御されている)。この表のデータは、デュプリケート測定 of 平均バックグラウンド減算応答である。

オリゴヌクレオチド	PEG-6000 なし	10% PEG-6000
5.00	3481.04	26267.22
2.50	2375.74	18706.35
1.25	1883.35	12769.13
0.625	2162.84	8071.38
0.313	946.97	5173.12
0.156	566.97	2426.78
0.0781	334.41	1469.73
0.0391	185.66	853.73
0.0195	139.88	372.95
0.00977	53.42	150.14

10

20

【0494】

生物学的適用、例示的使用及び投与レジメン

本明細書に記載されるとおり、提供される組成物及び方法は、様々な目的、例えば米国特許第 9 6 9 5 2 1 1 号、米国特許第 9 6 0 5 0 1 9 号、米国特許第 9 5 9 8 4 5 8 号、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 8 6 1 2 号、米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 2 1 1 0 0 6 号、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 3 7 3 9 9 号、国際公開第 2 0 1 7 / 0 1 5 5 5 5 号、国際公開第 2 0 1 7 / 0 6 2 8 6 2 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 6 0 7 4 1 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 6 4 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 7 9 号及び／又は国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 0 6 4 7 号に記載されるものに有用である。

30

【0495】

一部の実施形態において、提供される技術は、標的 DMD 転写物中のエクソン 51 をスキップする。様々な塩基配列を有し及び／又は様々な核酸（例えば、様々な遺伝子の DMD 転写物）を標的化する、様々なタイプの修飾インターヌクレオチド結合を含む幾つもの DMD オリゴヌクレオチドが、非負電荷インターヌクレオチド結合（例えば、n001）を含む多くのものを含めて調製され、様々な有用な特性、活性及び／又は利点を実証された。

40

【0496】

一部の実施形態において、本開示は、システム内の DMD 転写物又はそれによってコードされる産物のレベルを調節するための方法を提供し、この方法は、提供される DMD オリゴヌクレオチド又はその組成物の有効量を投与することを含む。一部の実施形態において、本開示は、システム内の DMD 転写物又はそれによってコードされる産物のレベルを調節するための方法を提供し、この方法は、DMD 転写物を提供される DMD オリゴヌクレオチド又はその組成物と接触させることを含む。一部の実施形態において、システムはインビトロシステムである。一部の実施形態において、システムは細胞である。一部の実施形態において、システムは組織である。一部の実施形態において、システムは器官である。一部の実施形態において、システムは生物である。一部の実施形態において、システム

50

は対象である。一部の実施形態において、システムはヒトである。一部の実施形態において、DMD転写物のレベルの調節により、DMD転写物のレベルが低下する。一部の実施形態において、DMD転写物のレベルの調節により、DMD転写物のレベルが増加する。

【0497】

一部の実施形態において、本開示は、核酸配列又はそれによってコードされる産物に関連する病態、疾患又は障害を予防又は治療する方法を提供し、この方法は、それに罹患している又はそれに罹り易い対象に、提供されるDMDオリゴヌクレオチド又はその組成物の有効量を投与することを含み、ここで、DMDオリゴヌクレオチド又はその組成物は核酸配列のDMD転写物のレベルを調節する。一部の実施形態において、核酸配列は遺伝子である。一部の実施形態において、DMD転写物のレベルの調節により、DMD転写物のレベルが低下する。一部の実施形態において、DMD転写物のレベルの調節により、DMD転写物のレベルが増加する。

10

【0498】

一部の実施形態において、例えばノックダウン、エクソンスキッピング等を通じて調節されたDMD転写物のレベルの変化は、少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、100、200、500又は1000倍である。

【0499】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及びDMDオリゴヌクレオチド組成物はスプライシングを調節する。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及びDMDオリゴヌクレオチド組成物はエクソンスキッピングを促進し、それによりエクソンスキッピング前のDMD転写物と比べて有益な機能が増加したDMD転写物のレベルを生じさせる。一部の実施形態において、有益な機能は、生物学的機能が増加したタンパク質をコードすることである。一部の実施形態において、本開示は、スプライシングの調節方法を提供し、この方法は、提供されるDMDオリゴヌクレオチド又はDMDオリゴヌクレオチド組成物をスプライシングシステムに投与することを含み、ここで、少なくとも1つのDMD転写物のスプライシングが変化される（例えば、エクソン51のスキッピングが増加される）。一部の実施形態において、少なくとも1つのスプライシング産物のレベルが少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、100、200、500又は1000倍に増加する。一部の実施形態において、本開示は、DMDスプライシングの調節方法を提供し、この方法は、提供されるDMDオリゴヌクレオチド又はその組成物をスプライシングシステムに投与することを含む。

20

30

【0500】

一部の実施形態において、本開示は、DMDを予防又は治療する方法を提供し、この方法は、それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、提供されるDMDオリゴヌクレオチド又はDMDオリゴヌクレオチド組成物の有効量を含む医薬組成物を投与することを含む。

【0501】

一部の実施形態において、提供される組成物及び方法は、その組成物が存在しないこと、参照組成物が存在すること及びこ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て改良されたDMD転写物スプライシングパターンを提供する。改良は、任意の望ましい生物学的機能の改良であり得る。一部の実施形態において、例えばDMDでは、改良は、生物学的活性が改良されたジストロフィンタンパク質を産生するmRNAの産生である。

40

【0502】

一部の実施形態では、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド及びキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物であって、任意選択で1つ以上の非負電荷インターヌクレオチド結合を含むDMDオリゴヌクレオチド（又はキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物における複数のDMDオリゴヌクレオチド）が特に有用及び有効である。

50

とりわけ、かかるDMDオリゴヌクレオチド及びDMDオリゴヌクレオチド組成物は、大幅に改良された効果、より良好な送達、より低い毒性等をもたらすことができる。

【0503】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド組成物は、標的DMD転写物のスプライシングを変化させることにおいて同等の効果を有する、他の点で同等の参照DMDオリゴヌクレオチド組成物と比べて低い用量及び／又は頻度で投与される。一部の実施形態において、立体制御された（キラル制御された）DMDオリゴヌクレオチド組成物は、標的DMD転写物のスプライシングを変化させることにおいて同等の効果を有する、他の点で同等のステレオランダムな参照DMDオリゴヌクレオチド組成物と比べて低い用量及び／又は頻度で投与される。必要であれば、提供される組成物は、その低い毒性のため、より高い用量／頻度で投与することもできる。

10

【0504】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド、組成物及び方法は、例えば参照組成物と比較したとき低毒性である。当技術分野において広く公知のとおり、DMDオリゴヌクレオチドは、例えば細胞、組織、生物等への投与時に毒性を誘導し得る。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは望ましくない免疫応答を誘導し得る。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは補体活性化を誘導し得る。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは補体の代替経路の活性化を誘導し得る。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは炎症を誘導し得る。とりわけ、補体系は細胞に損傷を与え得る強力な細胞溶解活性を有し、従って調節して傷害の可能性を低減すべきである。一部の実施形態では、DMDオリゴヌクレオチド誘導性血管外傷が、例えば医薬用途のDMDオリゴヌクレオチドの開発において頻発する難題である。一部の実施形態において、高用量のDMDオリゴヌクレオチドを投与したときの主な炎症源は、代替補体カスケードの活性化を伴う。一部の実施形態において、補体活性化は、ホスホロチオエート含有DMDオリゴヌクレオチドに関連する共通の難題であり、ホスホロチオエートの一部の配列が自然免疫細胞活性化を誘導する可能性もある。一部の実施形態では、サイトカイン放出がDMDオリゴヌクレオチドの投与に関連する。例えば、一部の実施形態では、インターロイキン-6（IL-6）単球走化性タンパク質（MCP-1）及び／又はインターロイキン-12（IL-12）の増加が観察される。例えば、Frazier, Antisense Oligonucleotide Therapies: The Promise and the Challenges from a Toxicologic Pathologist's Perspective, Toxicol Pathol., 43: 78-89, 2015; 及び Engelhardt, et al., Scientific and Regulatory Policy Committee Points-to-consider Paper: Drug-induced Vascular Injury Associated with Nonsmall Molecule Therapeutics in Preclinical Development: Part 2. Antisense Oligonucleotides, Toxicol Pathol. 43: 935-944, 2015を参照されたい。

20

30

【0505】

本明細書に提供されたとおりのオリゴヌクレオチド組成物は、限定はされないが、DMD転写、翻訳、免疫応答、エピジェネティクス等を含めた幾つもの細胞過程及び機構を調節するための薬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たとおりのDMDオリゴヌクレオチド組成物は、研究及び／又は診断目的の試薬として使用することができる。当業者は、本明細書における本開示、開示が、特定の使用に限定されるものではなく、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適用可能であることを容易に認識するであろう。とりわけ、提供される組成物は、種々の治療、診断、農業及び／又は研究適用において有用である。

40

【0506】

提供されるキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド組成物の投与には、様々な投与レジメン、例えば米国特許第9695211号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2013/0178612号、米国特許出願公開第20150211006号、米国特許出願公開第20170037399号、国際公開

50

第2017/015555号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/192679号及び／又は国際公開第2017/210647号（これらの各々の投与レジメンは、参照により本明細書に援用される）に記載されるものを利用することができる。

【0507】

一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及び組成物は、その低い毒性に伴い、より高い投薬量及び／又はより高い頻度で投与することができる。一部の実施形態において、提供される組成物は、その改良された送達（及び他の特性）に伴い、生物学的効果、例えば臨床的有効性の実現に、より低い投薬量及び／又はより低い頻度で投与することができる。

10

【0508】

単回用量は、様々な量のDMDオリゴヌクレオチドを含有することができる。一部の実施形態において、単回用量は、適用に応じて好適な所望のとおり、あるタイプのキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドを様々な量で含有することができる。一部の実施形態において、単回用量は、あるタイプのキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドを約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、300mg又はそれを超えて（例えば、約350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000mg又はそれを超えて）含有する。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないDMDオリゴヌクレオチドと比べてより低量での単回用量及び／又は総用量で投与される。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドは、有効性の改良により、キラル制御されていないDMDオリゴヌクレオチドと比べてより低量での単回用量及び／又は総用量で投与される。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドは、キラル制御されていないDMDオリゴヌクレオチドと比べてより高量での単回用量及び／又は総用量で投与される。一部の実施形態において、キラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドは、安全性の改良により、キラル制御されていないDMDオリゴヌクレオチドと比べてより高量での単回用量及び／又は総用量で投与される。

20

30

【0509】

医薬組成物

療法薬として使用されるとき、本明細書に記載される提供されるDMDオリゴヌクレオチド又はDMD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。一部の実施形態において、医薬組成物は、提供されるDMDオリゴヌクレオチド又はその薬学的に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少なくとも1つ薬学的に許容可能な不活性成分とを含む。一部の実施形態において、提供される組成物中では、提供されるDMDオリゴヌクレオチドは、塩、好ましくは薬学的に許容可能な塩、例えばナトリウム塩、アンモニウム塩等として存在し得る。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチドの塩は、2つ以上のカチオンを例えば一部の実施形態では最大でDMDオリゴヌクレオチド中の負電荷酸性基（例えば、リン酸、ホスホロチオエート等）の数に至るまで含む。当業者が理解するとおり、本明細書に記載されるDMDオリゴヌクレオチドは塩形態、特に薬学的に許容可能な塩形態で提供され、及び／又は利用され得る。

40

【0510】

一部の実施形態において、本開示は、提供されるDMDオリゴヌクレオチド、例えばキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドの塩及びその医薬組成物を提供する。一部の実施形態において、塩は、薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態では、塩基に（例えば、水溶液、医薬組成物等の条件下で）供与され得る各水素イオンが非H⁺カチオンに置き換えられる。例えば、一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドの薬学的に

50

許容可能な塩は全金属イオン塩であり、ここで、各インターヌクレオチド結合（例えば、天然リン酸結合、ホスホロチオエートジエステル結合等）の各水素イオン（例えば、水中で十分に酸性の、 $-OH$ 、 $-SH$ 等のもの）が金属イオンに置き換えられる。一部の実施形態において、提供される塩は全ナトリウム塩である。一部の実施形態において、提供される薬学的に許容可能な塩は全ナトリウム塩である。一部の実施形態において、提供される塩は全ナトリウム塩であり、ここで、存在する場合に天然リン酸結合（酸性形態 $-O-P(O)(OH)-O-$ ）である各インターヌクレオチド結合が、そのナトリウム塩形態（ $-O-P(O)(ONa)-O-$ ）として存在し、及び存在する場合にホスホロチオエートジエステル結合（ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合；酸性形態 $-O-P(O)(SH)-O-$ ）である各インターヌクレオチド結合が、そのナトリウム塩形態（ $-O-P(O)(SNa)-O-$ ）として存在する。

10

【0511】

一部の実施形態において、医薬組成物は、静脈内注射、経口投与、頬側投与、吸入、経鼻投与、局所投与、眼内投与又は耳内投与用に製剤化される。一部の実施形態において、医薬組成物は、錠剤、丸薬、カプセル、液体、吸入薬、鼻腔内噴霧溶液、坐薬、懸濁液、ゲル、コロイド、分散液、懸濁液、溶液、エマルション、軟膏、ローション、点眼薬又は点耳薬である。

【0512】

一部の実施形態において、本開示は、薬学的に許容可能な賦形剤との混合でのキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチド又はその組成物を含む医薬組成物を提供する。当業者は、本医薬組成物が、上記に記載されるキラル制御されたDMDオリゴヌクレオチドの薬学的に許容可能な塩又はその組成物を包含することを認識するであろう。

20

【0513】

種々の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。例示的ナノ担体としては、限定はされないが、リボソーム、カチオン性ポリマー複合体及び様々な高分子物質が挙げられる。核酸と様々なポリカチオンとの複合体形成は、もう1つの細胞内送達手法であり；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共重合体及びデンドリマーの使用が含まれる。幾つかのカチオン性ナノ担体は、PEI及びポリアミドアミンデンドリマーを含め、エンドソームからの内容物の放出を助ける。他の手法としては、ポリマーナノ粒子、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挙げられる。一部の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは別の分子にコンジュゲートされる。

30

【0514】

本明細書に記載される例示的な送達戦略に加えて、更なる核酸送達戦略が公知である。

【0515】

治療及び／又は診断適用では、本開示の化合物は、全身及び局所又は限局投与を含め、種々の投与様式用に製剤化することができる。技法及び製剤については、概して、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed. 2000)を参照し得る。

【0516】

提供されるDMDオリゴヌクレオチド及びその組成物は、幅広い投薬量範囲にわたって有効である。例えば、成人ヒトの治療では、1日約0.01～約1000mg、約0.5～約100mg、約1～約50mg及び1日約5～約100mgの投薬量が、用いられ得る投薬量の例である。正確な投薬量は、投与経路、化合物の投与形態、治療下の対象、治療下の対象の体重並びに主治医の意向及び経験に依存することになる。

40

【0517】

薬学的に許容可能な塩は、概して当業者に周知であり、例として、限定されないが、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、酒石酸水素塩、臭化物、エデト酸カルシウム、カンシル酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストル酸塩、エシル酸塩、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、グリコアルサニル酸塩、ヘキシルレゾルシン酸塩、ヒドラバミン、臭化水素酸塩、

50

塩酸塩、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、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、ポリガラクトロン酸塩、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、酒石酸塩又はテオクル酸塩を挙げることができる。他の薬学的に許容可能な塩については、例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)を参照し得る。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、塩酸塩、マレイン酸塩、メシル酸塩、ナプシル酸塩、パモ酸塩（エンボン酸塩）、リン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩又は酒石酸塩が挙げられる。

10

【0518】

当業者は理解するとおり、DMDオリゴヌクレオチドは、例えば医薬用途のため、幾つもの塩として製剤化され得る。一部の実施形態において、塩は金属カチオン塩及び／又はアンモニウム塩である。一部の実施形態において、塩はDMDオリゴヌクレオチドの金属カチオン塩である。一部の実施形態において、塩はDMDオリゴヌクレオチドのアンモニウム塩である。代表的なアルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどが挙げられる。一部の実施形態において、塩はDMDオリゴヌクレオチドのナトリウム塩である。一部の実施形態において、薬学的に許容可能な塩としては、適切な場合、非毒性アンモニウム、第4級アンモニウム及びDMDオリゴヌクレオチドと共に形成されるアミンカチオンが挙げられる。当業者は理解するとおり、DMDオリゴヌクレオチド内に2つ以上のアニオンがあり得るため、DMDオリゴヌクレオチドの塩は2つ以上のカチオン、例えばナトリウムイオンを含有し得る。

20

【0519】

治療下の具体的な病態に応じて、かかる薬剤は液体又は固形剤形に製剤化され、全身又は局所投与され得る。薬剤は、例えば、当業者に公知のとおりの時限型又は持続型低量放出形態で送達され得る。製剤化及び投与技法については、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)を参照し得る。好適な経路としては、経口、頬側、吸入スプレーによるもの、舌下、直腸、経皮、腔内、経粘膜、鼻腔又は腸内投与；筋肉内、皮下、髄内注射を含む非経口送達並びに髄腔内、脳室内に直接、静脈内、関節内、胸骨内、滑液嚢内、肝内、病巣内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内又は眼内注射又は他の送達様式を挙げることができる。

30

【0520】

注射用には、本開示の薬剤は、ハanks液、リンゲル液又は生理食塩緩衝液などの生理的に適合性のある緩衝液中など、水溶液中に製剤化及び希釈され得る。かかる経粘膜投与には、通過しようとする関門に適切な透過剤が製剤中に使用される。かかる透過剤は、概して、当技術分野において公知である。

【0521】

薬学的に許容可能な不活性担体を使用して、本開示の実施のため本明細書に開示される化合物を全身投与に好適な投薬量に製剤化することは、本開示の範囲内である。担体の適切な選択及び好適な製造実践により、本開示の組成物、詳細には、溶液として製剤化されるものは、静脈内注射によるなど、非経口的に投与し得る。

40

【0522】

化合物、例えばDMDオリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の薬学的に許容可能な担体を使用して経口投与に好適な投薬量に容易に製剤化することができる。かかる担体により、本開示の化合物を治療下の対象（例えば患者）による経口摂取用に錠剤、丸薬、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして製剤化することが可能になる。

【0523】

鼻腔又は吸入送達には、本開示の薬剤は、当業者に公知の方法によっても製剤化され得、

50

例えば、限定はされないが、生理食塩水、ベンジルアルコールなどの保存剤、吸収促進剤及びフルオロカーボンなど、可溶化、希釈又は分散物質の例を挙げることができる。

【0524】

特定の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド及び組成物はCNSに送達される。特定の実施形態において、DMD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。特定の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド及び組成物は脳実質に投与される。特定の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチド及び組成物は、髄腔内投与又は脳室内投与によって動物／対象に送達される。実質内投与、髄腔内投与又は脳室内投与では、中枢神経系内での本明細書に記載されるDMDオリゴヌクレオチド及び組成物の広範な分布が実現し得る。

10

【0525】

特定の実施形態において、非経口投与は、例えばシリンジ、ポンプ等による注射によるものである。特定の実施形態において、注射はボーラス注射である。特定の実施形態において、注射は、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。

【0526】

特定の実施形態において、ボーラス注射によるなど、医薬剤を特異的に局在化させる方法は、半有効濃度（EC50）を20、25、30、35、40、45又は50分の1に低下させる。特定の実施形態において、標的組織は脳組織である。特定の実施形態において、標的組織は線条体組織である。特定の実施形態において、EC50の低下は、それを必要としている患者において薬理学的結果を達成するために必要な用量が減少するため望ましい。

20

【0527】

特定の実施形態において、DMDオリゴヌクレオチドは、注射又は注入によって1ヵ月毎、2ヵ月毎、90日毎、3ヵ月毎、6ヵ月毎に1回、年2回又は年1回送達される。

【0528】

本開示での使用に好適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実現するための有効量で含まれる組成物が挙げられる。有効量の決定は、特に本明細書に提供される詳細な本開示を踏まえれば、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0529】

これらの医薬組成物は、活性成分に加えて、活性化合物を医薬品として使用し得る製剤にする処理を促進する賦形剤及び助剤を含む好適な薬学的に許容可能な担体を含み得る。経口投与用に製剤化される製剤は、錠剤、糖衣錠、カプセル又は溶液の形態であり得る。

30

【0530】

経口使用向けの医薬製剤は、活性化合物を固体賦形剤と合わせ、任意選択で得られた混合物を粉砕し、及びこの顆粒混合物を、必要に応じて好適な助剤を添加した後に処理して錠剤又は糖衣錠コアを入手することにより入手し得る。好適な賦形剤は、詳細には、充填剤、例えばラクトース、スクロース、マンニトール又はソルビトールを含めた糖類；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、コメデンプン、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／又はポリビニルピロリドン（PVP：ポビドン）である。必要であれば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天又はアルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩など、崩壊剤が添加され得る。

40

【0531】

糖衣錠コアには、好適なコーティングが付与される。この目的上、濃縮糖液が使用され得、これは、任意選択で、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポルゲル、ポリエチレングリコール（PEG）及び／又は二酸化チタン、ラッカー溶液及び好適な有機溶媒若しくは溶媒混合物を含み得る。錠剤又は糖衣錠コーティングには、異なる組み合わせの活性化合物用量の識別又は特徴付けのため、色素又はピグメントが添加され得る。

【0532】

50

経口的に使用することのできる医薬製剤には、ゼラチンで作られたプッシュフィットカプセル並びにゼラチン及びグリセロール又はソルビトールなどの可塑剤で作られたソフトシールカプセルが含まれる。プッシュフィットカプセルは、活性成分を、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤及び／又はタルク又はステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤並びに任意選択で安定剤との混合で含有し得る。ソフトカプセルでは、活性化合物が脂肪油、流動パラフィン又は液体ポリエチレングリコール（PEG）などの好適な液体中に溶解又は懸濁され得る。加えて、安定剤が添加され得る。

【0533】

一部の実施形態において、本明細書に記載される任意のDMDオリゴヌクレオチド若しくはこれらの組み合わせ又は本明細書に記載されるDMDオリゴヌクレオチドを含む任意の組成物は、本明細書に記載される又は当技術分野において公知の任意の医薬製剤と組み合わせることができる。

10

【0534】

併用療法

一部の実施形態において、対象には、提供されるDMDオリゴヌクレオチド又はDMDオリゴヌクレオチド組成物、例えばDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物に加えて、追加の治療（限定はされないが、療法剤又は方法を含む）が投与される。一部の実施形態において、1つ又は複数のDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物（又は2つ以上の組成物、各々がDMDオリゴヌクレオチドを含む）が追加の治療と共に患者に投与される。

【0535】

一部の実施形態において、本開示は、筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）を治療する方法に関し、この方法は、（a）それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、提供されるDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物を投与すること、及び（b）筋ジストロフィーを予防するか、治療するか、改善するか、又はその進行を減速させる能力を有する追加の治療を対象に投与することを含む。一部の実施形態において、追加の治療は、第2のDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物である。

20

【0536】

一部の実施形態において、追加の治療は、それ自体が筋ジストロフィーを予防するか、治療するか、改善するか、又はその進行を減速させる能力を有する。一部の実施形態において、追加の治療は、提供されるDMDオリゴヌクレオチドと共に投与したとき、筋ジストロフィーを予防するか、治療するか、改善するか、又はその進行を減速させる能力を有する。

30

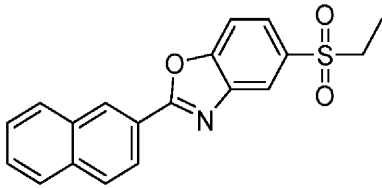
【0537】

一部の実施形態において、追加の治療は、提供されるDMDオリゴヌクレオチド、例えば提供されるDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物の前、その後又はそれと同時に対象に投与される。一部の実施形態において、組成物は、1つ又は複数のDMDオリゴヌクレオチドと追加の治療との両方を含む。一部の実施形態において、1つ又は複数のDMDオリゴヌクレオチドと1つ又は複数の追加の治療とは別個の組成物中にある。一部の実施形態において、本開示は、例えば他の療法剤及び／又は医療手技との併用療法のための技術（例えば、組成物、方法等）を提供する。一部の実施形態において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及び／又は組成物は、1つ以上の他の療法剤と一緒に使用され得る。一部の実施形態において、提供される組成物は、提供されるDMDオリゴヌクレオチドと、1つ以上の他の療法剤とを含む。一部の実施形態において、1つ以上の他の療法剤は、組成物中の提供されるDMDオリゴヌクレオチドと比較して、1つ以上の異なる標的及び／又は標的に対する1つ以上の異なる機構を有し得る。一部の実施形態において、療法剤はDMDオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、療法剤は小分子薬物である。一部の実施形態において、療法剤はタンパク質である。一部の実施形態において、療法剤は抗体である。本開示では、幾つもの療法剤を利用し得る。例えば、DMDに対するDMDオリゴヌクレオチドが、ユートロフィン産生を調節する1つ以上の療法剤（ユートロフ

40

50

イン調節物質)と一緒に使用され得る。一部の実施形態において、ユートロフィン調節物質はユートロフィン産生を促進する。一部の実施形態において、ユートロフィン調節物質はエズトロミドである。一部の実施形態において、ユートロフィン調節物質は、
【化 8 5】



10

又はその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態において、提供される D M D オリゴヌクレオチド又はその組成物は、1つ以上の他の療法剤及び／又は医療手技の前、それと同時に又はその後に投与される。一部の実施形態において、提供される D M D オリゴヌクレオチド又はその組成物は、1つ以上の他の療法剤及び／又は医療手技と同時に投与される。一部の実施形態において、提供される D M D オリゴヌクレオチド又はその組成物は、1つ以上の他の療法剤及び／又は医療手技の前に投与される。一部の実施形態において、提供される D M D オリゴヌクレオチド又はその組成物は、1つ以上の他の療法剤及び／又は医療手技の後に投与される。一部の実施形態において、提供される組成物は、1つ以上の他の療法剤を含む。

20

【0538】

一部の実施形態において、D M D オリゴヌクレオチドを含む組成物は、目的の D M D エクソソンのスキッピングを改良するため、追加の薬剤と共投与される。一部の実施形態において、追加の薬剤は、抗体、D M D オリゴヌクレオチド、タンパク質又は小分子である。一部の実施形態において、追加の薬剤は、スプライシングに関与するタンパク質に干渉する。一部の実施形態において、追加の薬剤は、スプライシングに関与するタンパク質に干渉し、ここで、タンパク質は S R タンパク質である。

【0539】

一部の実施形態において、追加の薬剤は、スプライシングに関与するタンパク質に干渉し、ここで、タンパク質は S R タンパク質であり、これは、セリン (S) 及びアルギニン (R) アミノ酸残基の1つ以上のロングリピートを含むタンパク質ドメインを含有する。S R タンパク質は、報告によれば、細胞内で重度にリン酸化され、構成的及び選択的スプライシングに関与する。Long et al. 2009 Biochem. J. 417: 15-27; Shepard et al. 2009 Genome Biol. 10: 242。一部の実施形態において、追加の薬剤は、S R プロテインキナーゼを阻害する又は低下させる化学的化合物である。一部の実施形態において、S R プロテインキナーゼを阻害し又は低下させる化学的化合物は、S R P I N 3 4 0 である。S R P I N 3 4 0 については、例えば、Fukuhura et al. 2006 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 11329-11333に報告されている。一部の実施形態において、化学的化合物は、S R タンパク質をリン酸化することも可能な C d c 様キナーゼ (C l k) に特異的なキナーゼ阻害薬である。一部の実施形態において、S R タンパク質をリン酸化することも可能な C d c 様キナーゼ (C l k) に特異的なキナーゼ阻害薬は、T G 0 0 3 である。T G 0 0 3 は、報告によれば、インビトロ及びインビボの両方でスプライシングに影響を及ぼした。Nowak et al. 2010 J. Biol. Chem. 285: 5532-5540; Muraki et al. 2004 J. Biol. Chem. 279: 24246-24254; Yomoda et al. 2008 Genes Cells 13: 233-244; 及び Nishida et al. 2011 Nat Commun. 2:308。

30

40

【0540】

一部の実施形態において、筋ジストロフィーに罹患している患者では、筋組織が脂肪及び結合組織に置き換わり、冒されている筋肉が脂肪含量の増加に起因して大きく見えることがあり、これは仮性肥大として知られる病態である。一部の実施形態において、1つ又は複数の D M D オリゴヌクレオチドを含む組成物が、脂肪、若しくは線維、若しくは結合組

50

織の発達又は脂肪、若しくは線維、若しくは結合組織による筋組織の置換を低減又は予防する治療と共に投与される。

【0541】

一部の実施形態において、1つ又は複数のDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物は、脂肪、若しくは又は線維、若しくは結合組織の発達又は脂肪、若しくは線維、若しくは結合組織による筋組織の置換を低減又は予防する治療と共に投与され、ここで、この治療は、線維化の中心メディエーターである結合組織成長因子（CTGF）に対する抗体（例えば、FG-3019）である。一部の実施形態において、1つ又は複数のDMDオリゴヌクレオチドを含む組成物は、人体の脂肪含量を低減する薬剤と共に投与される。

【0542】

追加の治療としては、免疫調節薬により疾患の進行を減速させること（例えば、ステロイド及び形質転換成長因子β阻害薬）、筋線維のジストロフィン欠乏を補償し得るタンパク質を誘導又は導入すること（例えば、ユートロフィン、バイグリカン及びラミニン）又は筋肉の再生応答を支えること（例えば、ミオスタチン及びアクチビン2B）が挙げられる。

【0543】

一部の実施形態において、追加の治療は、筋細胞内の正常なカルシウムバランスを回復させる能力を有する小分子である。

【0544】

一部の実施形態において、追加の治療は、リアノジン受容体カルシウムチャネル複合体（RyR）と呼ばれるある種のチャネルの活性を修正することにより、筋細胞内の正常なカルシウムバランスを回復させる能力を有する小分子である。一部の実施形態において、かかる小分子は、Rycal ARM210（ARMGO Pharma, Tarry Town, NY）である。

【0545】

一部の実施形態において、追加の治療はフラボノイドである。

【0546】

一部の実施形態において、追加の治療は、エピカテキンなどのフラボノイドである。エピカテキンは、カカオの木から採取されるダークチョコレートに見られるフラボノイドであり、動物及びヒトにおいて心臓及び筋肉における新規ミトコンドリアの産生（例えば、ミトコンドリアバイオジェネシス）を増加させると同時に、筋組織の再生を刺激することが報告されている。

【0547】

一部の実施形態において、追加の治療はフォリスタチン遺伝子療法である。

【0548】

一部の実施形態において、追加の治療は、フォリスタチン344のアデノ随伴ウイルス送達により筋力を増加させ、筋消耗及び線維化を防ぐことである。

【0549】

一部の実施形態において、追加の治療はグルココルチコイドである。

【0550】

一部の実施形態において、追加の治療はプレドニゾンである。

【0551】

一部の実施形態において、追加の治療はデフラザコートである。

【0552】

一部の実施形態において、追加の治療はバモロロン（VBP15）である。

【0553】

一部の実施形態において、追加の治療は、マイクロジストロフィン遺伝子など、外因性ジストロフィン遺伝子又はその合成バージョン若しくは一部分の送達である。

【0554】

一部の実施形態において、追加の治療は、外因性ジストロフィン遺伝子又はその一部分、例えばSGT-001などのマイクロジストロフィン遺伝子、合成ジストロフィン遺伝子

10

20

30

40

50

又はマイクロジストロフィンの送達のためのアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター媒介性遺伝子導入システム（Solid BioSciences、Cambridge, Mass.）の送達である。

【0555】

一部の実施形態において、追加の治療は幹細胞治療である。

【0556】

一部の実施形態において、追加の治療はステロイドである。

【0557】

一部の実施形態において、追加の治療はコルチコステロイドである。

【0558】

一部の実施形態において、追加の治療はプレドニゾンである。

【0559】

一部の実施形態において、追加の治療は β -2アゴニストである。

【0560】

一部の実施形態において、追加の治療はイオンチャネル阻害薬である。

【0561】

一部の実施形態において、追加の治療はカルシウムチャネル阻害薬である。

【0562】

一部の実施形態において、追加の治療は、キサンチンであるカルシウムチャネル阻害薬である。一部の実施形態において、追加の治療は、メチルキサンチンであるカルシウムチャネル阻害薬である。一部の実施形態において、追加の治療は、ペントキシフィリンであるカルシウムチャネル阻害薬である。一部の実施形態において、追加の治療は、ペントキシフィリン、フラフィリン、リソフィリン、プロペントキシフィリン、ペンチフィリン、テオフィリン、トルバフィリン、アルビフィリン、エンプロフィリン及びその誘導体から選択されるメチルキサンチン誘導体であるカルシウムチャネル阻害薬である。

【0563】

一部の実施形態において、追加の治療は心疾患又は心血管疾患の治療である。

【0564】

一部の実施形態において、追加の治療は血圧治療薬である。

【0565】

一部の実施形態において、追加の治療は外科手術である。

【0566】

一部の実施形態において、追加の治療は、短縮した筋肉を直すか、脊柱を真っすぐにするか、又は心臓若しくは肺の障害を治療する外科手術である。

【0567】

一部の実施形態において、追加の治療は、装具、歩行器、立位歩行器又は他の機械的歩行補助具である。

【0568】

一部の実施形態において、追加の治療は運動及び／又は理学療法である。

【0569】

一部の実施形態において、追加の治療は補助換気である。

【0570】

一部の実施形態において、追加の治療は、抗痙攣薬、免疫抑制薬又は便秘の治療である。

【0571】

一部の実施形態において、追加の治療はNF- κ B阻害薬である。

【0572】

一部の実施形態において、追加の治療はサリチル酸及び／又はドコサヘキサエン酸（DHA）を含む。

【0573】

一部の実施形態において、追加の治療は、サリチル酸及びドコサヘキサエン酸（DHA）のコンジュゲートであるエダサロネクセント（CAT-1004、Catabasis）である。

10

20

30

40

50

【0574】

一部の実施形態において、追加の治療は細胞ベースの療法薬である。

【0575】

一部の実施形態において、追加の治療は、同種異系カーディオスフェア由来細胞である、それを含む。

【0576】

一部の実施形態において、追加の治療はCAP-1002 (Capricor) である。

【0577】

一部の実施形態において、例えば立体化学パターン中の y 、 t 、 n 及び m は、それぞれ独立に、本開示に記載されるとおり 1 ~ 20 である。一部の実施形態において、 y は 1 である。一部の実施形態において、 y は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 である。一部の実施形態において、 y は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 である。一部の実施形態において、 y は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 である。一部の実施形態において、 y は 1 である。一部の実施形態において、 y は 2 である。一部の実施形態において、 y は 3 である。一部の実施形態において、 y は 4 である。一部の実施形態において、 y は 5 である。一部の実施形態において、 y は 6 である。一部の実施形態において、 y は 7 である。一部の実施形態において、 y は 8 である。一部の実施形態において、 y は 9 である。一部の実施形態において、 y は 10 である。

【0578】

一部の実施形態において、 n は 1 である。一部の実施形態において、 n は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 である。一部の実施形態において、 n は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 である。一部の実施形態において、 n は 1 ~ 10 である。一部の実施形態において、 n は、1、2、3、4、5、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 n は 1 である。一部の実施形態において、 n は、2、3、4、5、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 n は、3、4、5、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 n は、4、5、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 n は、5、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 n は、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 n は、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 n は 1 である。一部の実施形態において、 n は 2 である。一部の実施形態において、 n は 3 である。一部の実施形態において、 n は 4 である。一部の実施形態において、 n は 5 である。一部の実施形態において、 n は 6 である。一部の実施形態において、 n は 7 である。一部の実施形態において、 n は 8 である。一部の実施形態において、 n は 9 である。一部の実施形態において、 n は 10 である。

【0579】

一部の実施形態において、 m は 0 ~ 50 である。一部の実施形態において、 m は 1 ~ 50 である。一部の実施形態において、 m は 1 である。一部の実施形態において、 m は 2 ~ 50 である。一部の実施形態において、 m は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 である。一部の実施形態において、 m は、2、3、4、5、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 m は、3、4、5、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 m は、4、5、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 m は、5、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 m は、6、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 m は、7 又は 8 である。一部の実施形態において、 m は 0 である。一部の実施形態において、 m は 1 である。一部の実施形態において、 m は 2 である。一部の実施形態において、 m は 3 である。一部の実施形態において、 m は 4 である。一部の実施形態において、 m は 5 である。一部の実施形態において、 m は 6 である。一部の実施形態において、 m は 7 である。一部の実施形態において、 m は 8 である。一部の実施形態において、 m は 9 である。一部の実施形態において、 m は 10 である。一部の実施形態において、 m は 11 である。一部の実施形態において、 m は 12 である。

。一部の実施形態において、 m は13である。一部の実施形態において、 m は14である。
。一部の実施形態において、 m は15である。一部の実施形態において、 m は16である。
。一部の実施形態において、 m は17である。一部の実施形態において、 m は18である。
。一部の実施形態において、 m は19である。一部の実施形態において、 m は20である。
。一部の実施形態において、 m は21である。一部の実施形態において、 m は22である。
。一部の実施形態において、 m は23である。一部の実施形態において、 m は24である。
。一部の実施形態において、 m は25である。一部の実施形態において、 m は少なくとも
2である。一部の実施形態において、 m は少なくとも3である。一部の実施形態において
、 m は少なくとも4である。一部の実施形態において、 m は少なくとも5である。一部の
実施形態において、 m は少なくとも6である。一部の実施形態において、 m は少なくとも
7である。一部の実施形態において、 m は少なくとも8である。一部の実施形態において
、 m は少なくとも9である。一部の実施形態において、 m は少なくとも10である。一部
の実施形態において、 m は少なくとも11である。一部の実施形態において、 m は少なく
とも12である。一部の実施形態において、 m は少なくとも13である。一部の実施形態
において、 m は少なくとも14である。一部の実施形態において、 m は少なくとも15で
ある。一部の実施形態において、 m は少なくとも16である。一部の実施形態において、
 m は少なくとも17である。一部の実施形態において、 m は少なくとも18である。一部
の実施形態において、 m は少なくとも19である。一部の実施形態において、 m は少なく
とも20である。一部の実施形態において、 m は少なくとも21である。一部の実施形態
において、 m は少なくとも22である。一部の実施形態において、 m は少なくとも23で
ある。一部の実施形態において、 m は少なくとも24である。一部の実施形態において、
 m は少なくとも25である。一部の実施形態において、 m は少なくとも25より大きい。

10

20

30

40

50

【0580】

一部の実施形態において、 t は1～20である。一部の実施形態において、 t は1である。
。一部の実施形態において、 t は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、
11、12、13、14又は15である。一部の実施形態において、 t は、2、3、4、
5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15である。一部の実施形態に
おいて、 t は1～5である。一部の実施形態において、 t は2である。一部の実施形態に
おいて、 t は3である。一部の実施形態において、 t は4である。一部の実施形態におい
て、 t は5である。一部の実施形態において、 t は6である。一部の実施形態において、
 t は7である。一部の実施形態において、 t は8である。一部の実施形態において、 t は
9である。一部の実施形態において、 t は10である。一部の実施形態において、 t は1
1である。一部の実施形態において、 t は12である。一部の実施形態において、 t は1
3である。一部の実施形態において、 t は14である。一部の実施形態において、 t は1
5である。一部の実施形態において、 t は16である。一部の実施形態において、 t は1
7である。一部の実施形態において、 t は18である。一部の実施形態において、 t は1
9である。一部の実施形態において、 t は20である。

【0581】

一部の実施形態において、 t 及び m の各々は、独立に、少なくとも2、3、4、5、6、
7、8、9、10、11、12、13、14又は15である。一部の実施形態において、
 t 及び m の各々は、独立に、少なくとも3である。一部の実施形態において、 t 及び m の
各々は、独立に、少なくとも4である。一部の実施形態において、 t 及び m の各々は、独
立に、少なくとも5である。一部の実施形態において、 t 及び m の各々は、独立に、少な
くとも6である。一部の実施形態において、 t 及び m の各々は、独立に、少なくとも7で
ある。一部の実施形態において、 t 及び m の各々は、独立に、少なくとも8である。一部
の実施形態において、 t 及び m の各々は、独立に、少なくとも9である。一部の実施形態
において、 t 及び m の各々は、独立に、少なくとも10である。

【0582】

本開示において使用されるとき、一部の実施形態において、「1つ以上」は、1～200
、1～150、1～100、1～90、1～80、1～70、1～60、1～50、1～

40、1～30又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24若しくは25である。一部の実施形態において、「1つ以上」は1である。一部の実施形態において、「1つ以上」は2である。一部の実施形態において、「1つ以上」は3である。一部の実施形態において、「1つ以上」は4である。一部の実施形態において、「1つ以上」は5である。一部の実施形態において、「1つ以上」は6である。一部の実施形態において、「1つ以上」は7である。一部の実施形態において、「1つ以上」は8である。一部の実施形態において、「1つ以上」は9である。一部の実施形態において、「1つ以上」は10である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも1である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも2である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも3である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも4である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも5である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも6である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも7である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも8である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも9である。一部の実施形態において、「1つ以上」は少なくとも10である。本開示において使用されるとき、一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は、1～200、1～150、1～100、1～90、1～80、1～70、1～60、1～50、1～40、1～30又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24若しくは25である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は1である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は2である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は3である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は4である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は5である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は6である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は7である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は8である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は9である。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は10である。

10

20

30

40

50

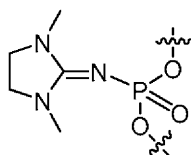
【0583】

とりわけ、本開示は、以下の例示的な実施形態を提供する。

1. fG*SfU*SfAn001RfC*SfC*SfUn001RfC*SfC*SfA*SfA; fU*SfG*SfGn001RfC*SfA*SfUn001RfU*SfU*SfCfU*SfA*SfG*SfGn001RfA*SfG*SfA; fG*SfG*SfCn001RfA*SfU*SfUn001RmUfC*SfU*SfA*SfG*SfGn001RfA*SfU*SfG*SfGn001RfG*SfA*SfU; fU*SfG*SfGn001RfC*SfA*SfGn001RfU*SfU*SfCfC*SfC*SfU*SfUfA*SfG*SfU*SfAn001RfA*SfC*SfC; fU*SfG*SfGn001RfC*SfA*SfGn001RmUfU*SfU*SfC*SfC*SfC*SfU*SfA*SfG*SfU*SfAn001RfA*SfC*SfC; fG*SfG*SfUn001RfA*SfA*SfGn001RfU*SfU*SfCfU*SfG*SfU*SfCfC*SfA*SfA*SfGn001RfC*SfC*SfC; fG*SfG*SfUn001RfA*SfA*SfGn001RmUfU*SfC*SfU*SfG*SfUfC*SfC*SfA*SfA*SfGn001RfC*SfC*SfC;

20

30



40

50

2. 塩形態である、実施形態1のオリゴヌクレオチド。
3. 塩形態は、ナトリウム塩である、実施形態2のオリゴヌクレオチド。
4. ナトリウム塩中のナトリウムイオンの数は、オリゴヌクレオチド中のホスホロチオエート及びリン酸結合の総数に等しい、実施形態3のオリゴヌクレオチド。
5. 実施形態1～4のいずれか1つの複数のオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物であって、そのオリゴヌクレオチドの同じ塩基配列のオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤に対して、そのオリゴヌクレオチドについて強化されている、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物。
6. 治療有効量の、実施形態1～4のいずれか1つのオリゴヌクレオチドと、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とを含む医薬組成物。
7. 溶液である、実施形態10の医薬組成物。
8. 疾患の治療における使用のためのオリゴヌクレオチド組成物であって、前記使用は、標的転写物のスプライシングを変化させることを含み、オリゴヌクレオチド組成物は、それが転写物スプライシングシステム内の標的転写物と接触されるとき、その組成物が存在

しないこと、参照組成物が存在すること及びこ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に対して転写物のスプライシングが変化されることを特徴とする、オリゴヌクレオチド組成物。

9. (a) 標的転写物のスプライシングは、その組成物が存在しない場合に対して変化され、好ましくは、標的転写物は、ジストロフィンのプレmRNAであり、変化は、その組成物が存在しない場合に対して増加したレベルで1つ以上のエクソンがスキップされることであり、より好ましくは、ジストロフィンのエクソン51は、その組成物が存在しない場合に対して増加したレベルでスキップされるか；又は

(b) オリゴヌクレオチド組成物は、実施形態6～7のいずれか1つの組成物である、実施形態8の使用のためのオリゴヌクレオチド組成物。

10. 前記使用は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、実施形態1～9のいずれか1つのオリゴヌクレオチド又は実施形態9～13のいずれか1つの組成物を投与することを含む、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療における使用のための、実施形態1～4のいずれか1つのオリゴヌクレオチド又は実施形態6～7のいずれか1つの組成物。

11. DMDを予防又は治療する方法であって、DMDに罹り易いか又はそれに罹患している対象に有効量のDMDオリゴヌクレオチドを投与することを含む方法。

12. 対象は、エクソン51スキッピングに適しているDMD遺伝子の突然変異を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、エクソン51スキッピングを提供することができる、実施形態15の方法。

13. 対象は、エクソン51スキッピングに適しているDMD遺伝子のフレームシフト突然変異を有し、及びDMDオリゴヌクレオチドは、エクソン51スキッピングを提供することができる、実施形態11の方法。

14. オリゴヌクレオチドは、実施形態1～4のいずれか1つのオリゴヌクレオチドである、実施形態11の方法。

15. オリゴヌクレオチドは、実施形態5～7のいずれか1つの組成物において投与される、実施形態15の方法。

16. オリゴヌクレオチドを調製する方法であって、本明細書に記載されるキラル補助基、ホスホロアミダイト若しくはアジド試薬又は条件を使用することを含む方法。

17. 本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド、キラル補助基、ホスホロアミダイト、組成物又は方法。

【0584】

とりわけ、本開示は、以下の例示的な実施形態を提供する。

1. 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タイプの複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド組成物であって、

複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のキラル制御されたインターヌクレオチド結合を含み；及び

転写物スプライシングシステム内の転写物と接触されると、転写物のスプライシングが、組成物の非存在、参照組成物の存在及びこ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に対して変化されることを特徴とするオリゴヌクレオチド組成物。

2. 転写物はジストロフィン転写物である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

3. 転写物のスプライシングは、エクソン45、51若しくは53又は複数のエクソンのスキッピングのレベルが増加するように変化されている、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

4. 複数のオリゴヌクレオチドの各キラルインターヌクレオチド結合は、独立に、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

5. 各キラル修飾インターヌクレオチド結合は、独立に、そのキラル結合リンにおいて少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の立体純度を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

6. 塩基配列は、表A1の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列の15個の連続する塩基であるか又はそれを含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

7. 骨格結合のパターンは、少なくとも1つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

8. 骨格結合のパターンは、中性インターヌクレオチド結合である少なくとも1つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

9. 骨格結合のパターンは、トリアゾール、中性トリアゾール、アルキン若しくは環状グアニジンであるか又はそれを含む少なくとも1つの中性インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

10. オリゴヌクレオチドタイプは、コレステロール；L-カルニチン（アミド及びカルバメート結合）；葉酸；ガンボギン酸；切断可能な脂質（1，2-ジラウリン及びエステル結合）；インスリン受容体リガンド；CPP；グルコース（3分岐型及び16分岐型糖鎖）；又はマンノース（3分岐型及び16分岐型糖鎖、 α 及び β ）のいずれかを含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

11. オリゴヌクレオチドタイプが表A1に記載されている任意のオリゴヌクレオチドである、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

12. 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タイプの複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド組成物であって、

キラル制御されており、且つ特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドでは、同じ塩基配列、骨格結合のパターン及び骨格リン修飾のパターンを有するオリゴヌクレオチドの実質的にラセミ体の製剤と比較して濃縮されており、

オリゴヌクレオチド組成物は、転写物スプライシングシステム内の転写物と接触されると、組成物の非存在、参照組成物の存在及びこ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レベルと比較してスキッピングのエクソンのレベルが増加するように、転写物のスプライシングが変化されることを特徴とする組成物。

13. 転写物は、ジストロフィン転写物である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

14. エクソンは、DMDエクソン45、51若しくは53又は複数のDMDエクソンであり、ここで、エクソン45、51若しくは53又は複数のエクソンのスキッピングのレベルが増加するように、転写物のスプライシングが変化される、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

15. 骨格キラル中心のパターンは、少なくとも1つのSpを含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

16. 骨格キラル中心のパターンは、少なくとも1つのRpを含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

17. キラル的に純粋な組成物である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

18. 各キラル修飾インターヌクレオチド結合は、独立に、そのキラル結合リンにおいて少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の立体純度を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

10

20

30

40

50

19. 塩基配列は、表 A 1 の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列の 15 個の連続する塩基であるか又はそれを含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

20. 骨格結合のパターンは、少なくとも 1 つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

21. 骨格結合のパターンは、中性インターヌクレオチド結合である少なくとも 1 つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

22. 骨格結合のパターンは、トリアゾール、中性トリアゾール、アルキン又は環状グアニジンであるか又はそれを含む少なくとも 1 つの中性インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

23. オリゴヌクレオチドタイプは、コレステロール；L-カルニチン（アミド及びカルバメート結合）；葉酸；ガンボギン酸；切断可能な脂質（1, 2-ジラウリン及びエステル結合）；インスリン受容体リガンド；CPP；グルコース（3 分岐型及び 16 分岐型糖鎖）；又はマンノース（3 分岐型及び 16 分岐型糖鎖、 α 及び β ）のいずれかを含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

24. オリゴヌクレオチドタイプは、表 A 1 に記載されている任意のオリゴヌクレオチドである、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

25. 1) 塩基配列；

2) 骨格結合のパターン；及び

3) 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タイプの複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物であって、

複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含み；

オリゴヌクレオチド組成物は、転写物スプライシングシステム内の転写物と接触されると、組成物の非存在、参照組成物の存在及びこ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レベルと比較してスキッピングのエクソンのレベルが増加するように、転写物のスプライシングが変化されることを特徴とする組成物。

26. 転写物は、ジストロフィン転写物である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

27. エクソンは、DMD エクソン 45、51 若しくは 53 又は複数の DMD エクソンであり、ここで、エクソン 45、51 若しくは 53 又は複数のエクソンのスキッピングのレベルが増加するように、転写物のスプライシングが変化される、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

28. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、その少なくとも 50% が pH 7.4 で負に帯電していない形態で存在するインターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

29. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、中性インターヌクレオチド結合であり、このインターヌクレオチド結合の少なくとも 50% は、pH 7.4 において中性形態で存在する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

30. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合の中性形態は、独立に、8、9、10、11、12、13 又は 14 以上の pKa を有する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

31. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合の中性形態は、結合する単位が $-CH_3$ で置き換えられた場合、独立に、8、9、10、11、12、13 又は 14 以上の pKa を有する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

32. 参照条件は、組成物の非存在である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

33. 参照条件は、参照組成物の存在である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

。

10

20

30

40

50

34. 参照組成物は、他の点では同一の組成物であり、ここで、複数のオリゴヌクレオチドは、キラル制御されたインターヌクレオチド結合を含まない、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

35. 参照組成物は、他の点では同一の組成物であり、ここで、複数のオリゴヌクレオチドは、負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含まない、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

36. 骨格結合のパターンは、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合及びホスホジチオエート結合から選択される1つ又は複数の骨格結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

37. 複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、1つ又は複数の糖修飾を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。 10

38. 糖修飾は、2'-O-メチル、2'-MOE、2'-F、モルホリノ及び二環式糖部分から選択される1つ又は複数の修飾を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

39. 1つ又は複数の糖修飾は2'-F修飾である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

40. 複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、2'-F修飾糖部分を含む1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオシド単位を含む5'末端領域を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

41. 複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、2'-F修飾糖部分を含む1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオシド単位を含む3'末端領域を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。 20

42. 複数のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、5'末端領域とホスホジエステル結合を含む1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオチド単位を含む3'領域との間の中間領域を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

43. 塩基配列は、表A1の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列の15個の連続する塩基であるか又はそれを含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

44. 骨格結合のパターンは、少なくとも1つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

45. 骨格結合のパターンは、中性インターヌクレオチド結合である少なくとも1つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。 30

46. 骨格結合のパターンは、トリアゾール、中性トリアゾール、アルキン又は環状グアニジンであるか又はそれを含む少なくとも1つの中性インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

47. オリゴヌクレオチドタイプは、コレステロール；L-カルニチン（アミド及びカルバメート結合）；葉酸；ガンボギン酸；切断可能な脂質（1,2-ジラウリン及びエステル結合）；インスリン受容体リガンド；CPP；グルコース（3分岐型及び16分岐型糖鎖）；又はマンノース（3分岐型及び16分岐型糖鎖、 α 及び β ）のいずれかを含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。 40

48. オリゴヌクレオチドタイプは、表A1に記載されている任意のオリゴヌクレオチドである、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

49. 1) 塩基配列；

2) 骨格結合のパターン；及び

3) 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タイプの複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物であって、

複数のオリゴヌクレオチドは、

1) 2'-F修飾糖部分を含む1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオシド単位を含む5'末端領域； 50

2) 2'-F修飾糖部分を含む1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオシド単位を含む3'末端領域；及び

3) 5'末端領域とホスホジエステル結合を含む1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオチド単位を含む3'領域との間の中間領域を含む組成物。

50. オリゴヌクレオチド組成物は、転写物スプライシングシステム内の転写物と接触されると、組成物の非存在、参照組成物の存在及びこ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レベルと比較してスキッピングのエクソンのレベルが増加するように、転写物のスプライシングが変化されることを特徴とする、実施形態43又は49の組成物。

51. 転写物は、ジストロフィン転写物である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

52. エクソンは、DMDエクソン45、51若しくは53又は複数のDMDエクソンであり、エクソン45、51若しくは53又は複数のエクソンのスキッピングのレベルが増加するように、転写物のスプライシングが変化される、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

53. 5'末端領域は、2'-F修飾糖部分を含まない1つ又は複数のヌクレオシド単位を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

54. 3'末端領域は、2'-F修飾糖部分を含まない1つ又は複数のヌクレオシド単位を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

55. 中間領域は、ホスホジエステル結合を含まない1つ又は複数のヌクレオチド単位を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

56. 2'-F修飾糖部分及び5'末端の修飾インターヌクレオチド結合を含む1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオシド単位の最初のもは、5'末端からのオリゴヌクレオチドの1番目、2番目、3番目、4番目又は5番目のヌクレオシド単位であり、2'-F修飾糖部分及び3'末端の修飾インターヌクレオチド結合を含む1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のヌクレオシド単位の最後のもは、オリゴヌクレオチドの最後、最後から2番目、最後から3番目、最後から4番目又は最後から5番目のヌクレオシド単位である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

57. 5'末端領域は、2'-F修飾糖部分を含む2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の連続するヌクレオシド単位を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

58. 5'末端領域は、2'-F修飾糖部分を含む5、6、7、8、9又は10個以上の連続するヌクレオシド単位を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

59. 3'末端領域は、2'-F修飾糖部分を含む2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の連続するヌクレオシド単位を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

60. 3'末端領域は、2'-F修飾糖部分を含む5、6、7、8、9又は10個以上の連続するヌクレオシド単位を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

61. 5'末端領域に2'-F修飾糖部分を含む2つのヌクレオシド単位間の各インターヌクレオチド結合は、独立に、修飾インターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

62. 3'末端領域に2'-F修飾糖部分を含む2つのヌクレオシド単位間の各インターヌクレオチド結合は、独立に、修飾インターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

63. 各修飾インターヌクレオチド結合は、独立に、キラルインターヌクレオチド結合である、実施形態61又は62の組成物。

64. 各修飾インターヌクレオチド結合は、独立に、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である、実施形態61又は62の組成物。

65. 各修飾インターヌクレオチド結合は、ホスホロチオエートインターヌクレオチド結

10

20

30

40

50

合である、実施形態 61 又は 62 の組成物。

66. 各修飾インターヌクレオチド結合は、キラル制御されたホスホロチオエートインターヌクレオチド結合である、実施形態 61 又は 62 の組成物。

67. 各修飾インターヌクレオチド結合は、キラル制御された S p ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合である、実施形態 61 又は 62 の組成物。

68. 中間領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個以上の天然リン酸結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

69. 中間領域は、2' - O R¹ 修飾糖部分を含むヌクレオシド単位と 2' - F 修飾糖部分を含むヌクレオシド単位との間又はそれぞれ独立に 2 - O R¹ 修飾糖部分を含む 2 つのヌクレオシド単位間に、それぞれ独立に、1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個以上の天然リン酸結合を含み、ここで、R¹ は、C₁ ~ 6 アルキルで任意選択で置換されている、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

10

70. 中間領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個以上の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

71. 中間領域は、2' - O R¹ 修飾糖部分を含むヌクレオシド単位と 2' - F 修飾糖部分を含むヌクレオシド単位との間又はそれぞれ独立に 2 - O R¹ 修飾糖部分を含む 2 つのヌクレオシド単位間に、それぞれ独立に、1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個以上の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含み、ここで、R¹ は、C₁ ~ 6 アルキルで任意選択で置換されている、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

72. 2' - O R¹ は、2' - O C H₃ である、実施形態 69 又は 71 の組成物。

20

73. 2' - O R¹ は、2' - O C H₂ C H₂ O C H₃ である、実施形態 69 又は 71 の組成物。

74. 5' 末端領域は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個のキラル修飾インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

75. 5' 末端領域は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個の連続するキラル修飾インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

76. 5' 末端領域の各インターヌクレオチド結合は、キラル修飾インターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

77. 3' 末端領域は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個のキラル修飾インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

30

78. 3' 末端領域は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個の連続するキラル修飾インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

79. 3' 末端領域の各インターヌクレオチド結合は、キラル修飾インターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

80. 中間領域は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個のキラル修飾インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

81. 中間領域は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個の連続するキラル修飾インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

40

82. 各キラル修飾インターヌクレオチド結合は、独立に、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である、実施形態 74 ~ 81 のいずれか 1 つの組成物。

83. 各キラル修飾インターヌクレオチド結合は、独立に、キラル制御されたインターヌクレオチド結合であり、ここで、そのキラル制御された結合リンは S p 配置を有する、実施形態 74 ~ 81 のいずれか 1 つの組成物。

84. 各キラル修飾インターヌクレオチド結合は、独立に、キラル制御されたホスホロチオエートインターヌクレオチド結合である、実施形態 74 ~ 83 のいずれか 1 つの組成物。

85. 中間領域は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

50

86. 中間領域は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の中性インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

87. 中性インターヌクレオチド結合は、キラルインターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

88. 中性インターヌクレオチド結合は、その結合リンにおけるR_p又はS_pとは独立にキラル制御されたインターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

89. 塩基配列は、ジストロフィン遺伝子の20塩基長の部分又はその相補体に対して5個以下のミスマッチを有する配列を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

90. 複数のオリゴヌクレオチドの塩基配列の長さは50塩基以下である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

91. 骨格キラル中心のパターンは、R_p又はS_pとは独立に、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25のキラル制御された中心を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

92. 骨格キラル中心のパターンは、R_p又はS_pとは独立に、少なくとも5個のキラル制御された中心を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

93. 骨格キラル中心のパターンは、R_p又はS_pとは独立に、少なくとも6個のキラル制御された中心を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

94. 骨格キラル中心のパターンは、R_p又はS_pとは独立に、少なくとも10個のキラル制御された中心を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

95. 特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン遺伝子の1つ又は複数のエクソンのスキッピングを媒介することができる、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

96. 複数のオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン遺伝子のエクソン45、51又は53のスキッピングを媒介することができる、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

97. 複数のオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン遺伝子のエクソン45のスキッピングを媒介することができる、実施形態96の組成物。

98. 複数のオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを媒介することができる、実施形態96の組成物。

99. 複数のオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン遺伝子のエクソン53のスキッピングを媒介することができる、実施形態96の組成物。

100. 塩基配列は、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に対して5個以下のミスマッチを有する配列を含む、実施形態97の組成物。

101. 塩基配列は、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を含むか又はその配列である、実施形態97の組成物。

102. 塩基配列は、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である、実施形態97の組成物。

103. 塩基配列は、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に対して5個以下のミスマッチを有する配列を含む、実施形態97の組成物。

104. 塩基配列は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドを含むか又はそれである、実施形態97の組成物。

105. 塩基配列は、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドである、実施形態97の組成物。

106. 複数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である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

107. 特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドは、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドである、実施形態18の組成物。

108. 塩基配列は、表A1の任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列の15個の連続する塩基であるか又はそれを含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

10

20

30

40

50

109. 骨格結合のパターンは、少なくとも1つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

110. オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

111. オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のキラル制御された負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

112. オリゴヌクレオチドは、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の連続する負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

113. オリゴヌクレオチドは、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の連続するキラル制御された負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

114. オリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング、コアーウィング又はウィングーコア構造を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

115. ウィングは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

116. オリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング、コアーウィング又はウィングーコア構造を含み、ウィングは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のキラル制御された負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

117. オリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング、コアーウィング又はウィングーコア構造を含み、ウィングは、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の連続する負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

118. オリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング、コアーウィング又はウィングーコア構造を含み、ウィングは、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の連続するキラル制御された負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

119. オリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング構造を含むか又はそれからなり、1つのウィングのみが、1つ又は複数の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

120. オリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング、コアーウィング又はウィングーコア構造を含み、コアは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

121. オリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング、コアーウィング又はウィングーコア構造を含み、コアは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上のキラル制御された負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

122. オリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング、コアーウィング又はウィングーコア構造を含み、コアは、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の連続する負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

123. オリゴヌクレオチドは、ウィングーコアーウィング、コアーウィング又はウィングーコア構造を含み、コアは、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の連続するキラル制御された負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

124. ウィングのインターヌクレオチド結合の40%、45%、50%、55%、60

10

20

30

40

50

%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%は、独立に、負に帯電していないインターヌクレオチド結合、天然リン酸インターヌクレオチド結合又はRpキラルインターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

125. ウィングのインターヌクレオチド結合の40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%は、独立に、負に帯電していないインターヌクレオチド結合又は天然リン酸インターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

126. ウィングのインターヌクレオチド結合の40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%は、独立に、負に帯電していないインターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

127. パーセンテージは50%以上である、実施形態124～126のいずれか1つの組成物。

128. パーセンテージは60%以上である、実施形態124～126のいずれか1つの組成物。

129. パーセンテージは75%以上である、実施形態124～126のいずれか1つの組成物。

130. パーセンテージは80%以上である、実施形態124～126のいずれか1つの組成物。

131. パーセンテージは90%以上である、実施形態124～126のいずれか1つの組成物。

132. オリゴヌクレオチドはそれぞれ、負に帯電していないインターヌクレオチド結合及び天然リン酸インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

133. オリゴヌクレオチドはそれぞれ、負に帯電していないインターヌクレオチド結合、天然リン酸インターヌクレオチド結合及びRpキラルインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

134. ウィングは、負に帯電していないインターヌクレオチド結合及び天然リン酸インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

135. ウィングは、負に帯電していないインターヌクレオチド結合、天然リン酸インターヌクレオチド結合及びRpキラルインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

136. コアは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個以上の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

137. 同じオリゴヌクレオチドのすべての負に帯電していないインターヌクレオチド結合は同じ構成を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

138. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合のそれぞれは、独立に、式I-n-1、I-n-2、I-n-3、I-n-4、II、II-a-1、II-a-2、II-b-1、II-b-2、II-c-1、II-c-2、II-d-1、II-d-2の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

139. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合のそれぞれは、独立に、式I-n-1、I-n-2、I-n-3、I-n-4、II、II-a-1、II-a-2、II-b-1、II-b-2、II-c-1、II-c-2、II-d-1、II-d-2の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

140. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合のそれぞれは、独立に、式II、II-a-1、II-a-2、II-b-1、II-b-2、II-c-1、II-c-2、II-d-1、II-d-2の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

141. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合のそれぞれは、独立に、式II、

10

20

30

40

50

I I - a - 1、I I - a - 2、I I - b - 1、I I - b - 2、I I - c - 1、I I - c - 2、I I - d - 1、I I - d - 2の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

142. 骨格結合のパターンは、中性インターヌクレオチド結合である少なくとも1つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

143. 骨格結合のパターンは、トリアゾール、中性トリアゾール、アルキン又は環状グアニジンであるか又はそれを含む少なくとも1つの中性インターヌクレオチド結合を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

144. オリゴヌクレオチドタイプは、コレステロール；L-カルニチン（アミド及びカルバメート結合）；葉酸；ガンボギン酸；切断可能な脂質（1，2-ジラウリン及びエステル結合）；インスリン受容体リガンド；CPP；グルコース（3分岐型及び16分岐型糖鎖）；又はマンノース（3分岐型及び16分岐型糖鎖、 α 及び β ）のいずれかを含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

145. オリゴヌクレオチドタイプは、表A1に記載されている任意のオリゴヌクレオチドである、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

146. オリゴヌクレオチドのそれぞれは、任意選択でリンカー部分を介してオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド鎖にコンジュゲートされた化学部分を含み、ここで、化学部分は、炭水化物部分、ペプチド部分、受容体リガンド部分又は $-N(R^1)_2$ 、 $-N(R^1)_3$ 若しくは $-N=C(N(R^1)_2)_2$ の構造を有する部分を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

147. オリゴヌクレオチドのそれぞれは、任意選択でリンカー部分を介してオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド鎖にコンジュゲートされた化学部分を含み、ここで、化学部分はグアニジン部分を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

148. オリゴヌクレオチドのそれぞれは、任意選択でリンカー部分を介してオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド鎖にコンジュゲートされた化学部分を含み、ここで、化学部分は、 $-N=C(N(CH_3)_2)_2$ を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

149. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの塩基配列を有する組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%は、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドである、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

150. 特定のオリゴヌクレオチドタイプの塩基配列、骨格結合のパターン及び骨格リン修飾のパターンを有する組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%は、特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドである、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

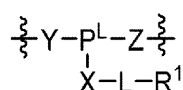
151. 特定のタイプのオリゴヌクレオチドは構造的に同一である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

152. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合はホスホルアミデート結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

153. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合はグアニジン部分を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

154. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式I：

【化87】



I

10

20

30

40

50

(式中、

P^L は、 $P (=W)$ 、 P 又は $P \rightarrow B(R')_3$ であり；

W は、 O 、 $N(-L-R^5)$ 、 S 又は Se であり；

R^1 及び R^5 のそれぞれは、独立に、 $-H$ 、 $-L-R'$ 、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-L-Si(R')_3$ 、 $-OR'$ 、 $-SR'$ 又は $-N(R^2)$ であり；

X 、 Y 及び Z のそれぞれは、独立に、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(-L-R^5)-$ 又は L であり；

各 L は、独立に、共有結合又は $C_1 \sim 30$ 脂肪族基及び $1 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $C_1 \sim 30$ ヘテロ脂肪族基から選択される二価の任意選択で置換されている直鎖基又は分岐鎖基であり、ここで、1つ又は複数のメチレン単位は、任意選択で独立に、 $C_1 \sim 6$ アルキレン、 $C_1 \sim 6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $1 \sim 5$ 個のヘテロ原子を有する二価 $C_1 \sim C_6$ ヘテロ脂肪族基、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-P(O)(OR')-$ 、 $-P(O)(SR')-$ 、 $-P(O)(R')-$ 、 $-P(O)(NR')-$ 、 $-P(S)(OR')-$ 、 $-P(S)(SR')-$ 、 $-P(S)(R')-$ 、 $-P(S)(NR')-$ 、 $-P(R')-$ 、 $-P(OR')-$ 、 $-P(SR')-$ 、 $-P(NR')-$ 、 $-P(OR')[B(R')_3]-$ 、 $-OP(O)(OR')O-$ 、 $-OP(O)(SR')O-$ 、 $-OP(O)(R')O-$ 、 $-OP(O)(NR')O-$ 、 $-OP(OR')O-$ 、 $-OP(SR')O-$ 、 $-OP(NR')O-$ 、 $-OP(R')O-$ 又は $-OP(OR')[B(R')_3]O-$ であり、且つ1つ又は複数の CH 又は炭素原子は、任意選択で独立に Cy^L で置換されており；

各 $-Cy-$ は、独立に、 $C_3 \sim 20$ 脂環式環、 $C_6 \sim 20$ アリール環、 $1 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $5 \sim 20$ 員ヘテロアリール環及び $1 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $3 \sim 20$ 員ヘテロシクリル環から選択される、任意選択で置換されている二価基であり；

各 Cy^L は、独立に、 $C_3 \sim 20$ 脂環式環、 $C_6 \sim 20$ アリール環、 $1 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $5 \sim 20$ 員ヘテロアリール環及び $1 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $3 \sim 20$ 員ヘテロシクリル環から選択される、任意選択で置換されている三価又は四価の基であり；

各 R' は、独立に、 $-R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 又は $-S(O)_2R$ であり；

各 R は、独立に、 $-H$ 又は $C_1 \sim 30$ 脂肪族、 $1 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $C_1 \sim 30$ ヘテロ脂肪族、 $C_6 \sim 30$ アリール、 $C_6 \sim 30$ アリール脂肪族、 $1 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $C_6 \sim 30$ アリールヘテロ脂肪族、 $1 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $5 \sim 30$ 員ヘテロアリール及び $1 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $3 \sim 30$ 員ヘテロシクリルから選択される任意選択で置換される基であるか、又は

2つの R 基は、任意選択で独立に、共有結合を形成するか、又は

同じ原子上の2つ以上の R 基は、任意選択で独立に、原子と一緒にあって、原子に加えて $0 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換されている $3 \sim 30$ 員単環式、二環式又は多環式環を形成するか、又は

2つ以上の原子上の2つ以上の R 基は、任意選択で独立に、それらの介在原子と一緒にあって、介在原子に加えて $0 \sim 10$ 個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換されている $3 \sim 30$ 員単環式、二環式又は多環式環を形成する)

の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

155. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、式 I の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

156. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 I - n - 1：

10

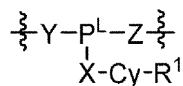
20

30

40

50

【化 8 8】



I-n-1

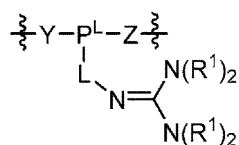
の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

157. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、式 I - n - 1 の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

10

158. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 I - n - 2 :

【化 8 9】



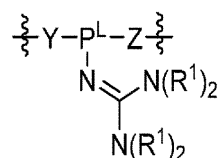
I-n-2

の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

20

159. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 I - n - 3 :

【化 9 0】



I-n-3

30

の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

160. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、式 I - n - 3 の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

161. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 I - n - 3 の構造又はその塩形態を有し、1つの -N(R')₂ の1つの R' と他の -N(R')₂ の1つの R' が、それらの介在原子と一緒にあって、介在原子に加えて0~10個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換されている3~30員単環式、二環式又は多環式環を形成する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

162. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、式 I - n - 3 の構造又はその塩形態を有し、1つの -N(R')₂ の1つの R' と他の -N(R')₂ の1つの R' が、それらの介在原子と一緒にあって、介在原子に加えて0~10個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換されている3~30員単環式、二環式又は多環式環を形成する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

40

163. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 I - n - 3 の構造又はその塩形態を有し、1つの -N(R')₂ の1つの R' と他の -N(R')₂ の1つの R' が、それらの介在原子と一緒にあって、2つ以下の窒素原子を有する、任意選択で置換されている5員単環式環を形成する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

164. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、式 I - n - 3 の構造又はその塩形態を有し、1つの -N(R')₂ の1つの R' と他の -N(R')₂ の1つの R' が、それらの介在原子と一緒にあって、2つ以下の窒素原子を有する、任意

50

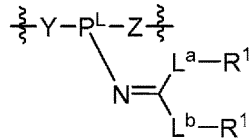
選択で置換されている 5 員単環式環を形成する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

165. 形成された環は飽和環である、実施形態 159～162 のいずれか 1 つの組成物。

166. 形成された環は部分不飽和環である、実施形態 159～162 のいずれか 1 つの組成物。

167. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 I-n-4 :

【化 9 1】



I-n-4

10

の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

168. L^{a} は、共有結合である、実施形態 167 の組成物。

169. L^{a} は、 $-\text{N}(\text{R}^1)-$ である、実施形態 167 の組成物。

170. L^{a} は、 $-\text{N}(\text{R}')-$ である、実施形態 167 の組成物。

171. L^{a} は、 $-\text{N}(\text{R})-$ である、実施形態 167 の組成物。

172. L^{a} は、 $-\text{S}(\text{O})-$ である、実施形態 167 の組成物。

173. L^{a} は、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ である、実施形態 167 の組成物。

174. L^{a} は、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$ である、実施形態 167 の組成物。

175. L^{b} は、共有結合である、実施形態 167～174 のいずれか 1 つの組成物。

176. L^{b} は、 $-\text{N}(\text{R}^1)-$ である、実施形態 167～174 のいずれか 1 つの組成物。

177. L^{b} は、 $-\text{N}(\text{R}')-$ である、実施形態 167～174 のいずれか 1 つの組成物。

178. L^{b} は、 $-\text{N}(\text{R})-$ である、実施形態 167～174 のいずれか 1 つの組成物。

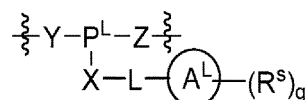
179. L^{b} は、 $-\text{S}(\text{O})-$ である、実施形態 167～174 のいずれか 1 つの組成物。

180. L^{b} は、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ である、実施形態 167～174 のいずれか 1 つの組成物。

181. L^{b} は、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$ である、実施形態 167～174 のいずれか 1 つの組成物。

182. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 II :

【化 9 2】



II

40

(式中、

P^{L} は、 $\text{P} (= \text{W})$ 、 P 又は $\text{P} \rightarrow \text{B}(\text{R}')_3$ であり；

W は、 O 、 $\text{N}(-\text{L}-\text{R}^5)$ 、 S 又は Se であり；

X 、 Y 及び Z のそれぞれは、独立に、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(-\text{L}-\text{R}^5)-$ 又は L であり；

R^5 は、 $-\text{H}$ 、 $-\text{L}-\text{R}'$ 、ハロゲン、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{L}-\text{Si}(\text{R}')_3$ 、 $-\text{OR}$

50

、 $-SR'$ 又は $-N(R_2)$ であり；

環 A^L は、0～10個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている3～20員単環式、二環式又は多環式環であり；

各 RS は、独立に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-L-R'$ 、 $-L-Si(R)_3$ 、 $-L-OR'$ 、 $-L-SR'$ 、 $-L-N(R_2)$ 、 $-O-L-R'$ 、 $-O-L-Si(R)_3$ 、 $-O-L-OR'$ 、 $-O-L-SR'$ 又は $-O-L-N(R_2)$ であり；

g は0～20であり；

各 L は、独立に、共有結合又は $C_1\sim 30$ 脂肪族基及び1～10個のヘテロ原子を有する $C_1\sim 30$ ヘテロ脂肪族基から選択される二価の任意選択で置換されている直鎖基又は分岐鎖基であり、ここで、1つ又は複数のメチレン単位は、任意選択で独立に、 $C_1\sim 6$ アルキレン、 $C_1\sim 6$ アルケニレン、 $-C\equiv C-$ 、1～5個のヘテロ原子を有する二価 $C_1\sim C_6$ ヘテロ脂肪族基、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-P(O)(OR')-$ 、 $-P(O)(SR')-$ 、 $-P(O)(R')-$ 、 $-P(O)(NR')-$ 、 $-P(S)(OR')-$ 、 $-P(S)(SR')-$ 、 $-P(S)(R')-$ 、 $-P(S)(NR')-$ 、 $-P(R')-$ 、 $-P(OR')-$ 、 $-P(SR')-$ 、 $-P(NR')-$ 、 $-P(OR')[B(R')_3]-$ 、 $-OP(O)(OR')O-$ 、 $-OP(O)(SR')O-$ 、 $-OP(O)(R')O-$ 、 $-OP(O)(NR')O-$ 、 $-OP(OR')O-$ 、 $-OP(SR')O-$ 、 $-OP(NR')O-$ 、 $-OP(R')O-$ 又は $-OP(OR')[B(R')_3]O-$ であり、且つ1つ又は複数の CH 又は炭素原子は、任意選択で独立に Cy^L で置換されており；

各 $-Cy-$ は、独立に、 $C_3\sim 20$ 脂環式環、 $C_6\sim 20$ アリール環、1～10個のヘテロ原子を有する5～20員ヘテロアリール環及び1～10個のヘテロ原子を有する3～20員ヘテロシクリル環から選択される、任意選択で置換されている二価基であり；

各 Cy^L は、独立に、 $C_3\sim 20$ 脂環式環、 $C_6\sim 20$ アリール環、1～10個のヘテロ原子を有する5～20員ヘテロアリール環及び1～10個のヘテロ原子を有する3～20員ヘテロシクリル環から選択される、任意選択で置換されている三価又は四価の基であり；

各 R' は、独立に、 $-R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 又は $-S(O)_2R$ であり；

各 R は、独立に、 $-H$ 又は $C_1\sim 30$ 脂肪族、1～10個のヘテロ原子を有する $C_1\sim 30$ ヘテロ脂肪族、 $C_6\sim 30$ アリール、 $C_6\sim 30$ アリール脂肪族、1～10個のヘテロ原子を有する $C_6\sim 30$ アリールヘテロ脂肪族、1～10個のヘテロ原子を有する5～30員ヘテロアリール及び1～10個のヘテロ原子を有する3～30員ヘテロシクリルから選択される任意選択で置換される基であるか、又は

2つの R 基は、任意選択で独立に、共有結合を形成するか、又は

同じ原子上の2つ以上の R 基は、任意選択で独立に、原子と一緒にあって、原子に加えて0～10個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換されている3～30員単環式、二環式又は多環式環を形成するか、又は

2つ以上の原子上の2つ以上の R 基は、任意選択で独立に、それらの介在原子と一緒にあって、介在原子に加えて0～10個のヘテロ原子を有する、任意選択で置換されている3～30員単環式、二環式又は多環式環を形成する)

の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

183. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、式 II の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

184. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 $II-a-1$ ：

10

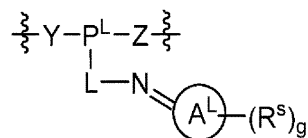
20

30

40

50

【化 9 3】

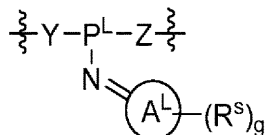


II-a-1

の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

185. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式II-a-2:

【化 9 4】



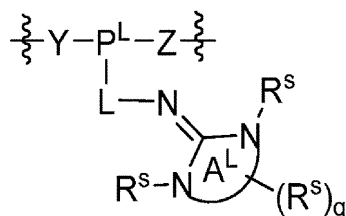
II-a-2

の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

186. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、式II-a-1又はII-a-2の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

187. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式II-b-1:

【化 9 5】

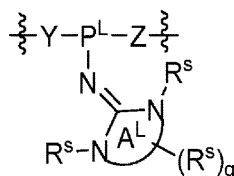


II-b-1

の構造又はその塩形態を有し、式中、 g は 0 ～ 18 である、実施形態 182 ～ 186 のいずれか 1 つの組成物。

188. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式II-b-2:

【化 9 6】

**II-b-2**

の構造又はその塩形態を有し、式中、 g は 0 ～ 18 である、実施形態 182 ～ 187 のいずれか 1 つの組成物。

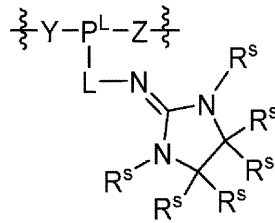
189. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、式II-b-1又はII-b-2の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

190. 環 A^L は、0～10 個のヘテロ原子（式 II-b-1 又は II-b-2 のための 2 つの窒素原子に加えて）を有する任意選択で置換されている 3～20 員単環式環である、実施形態 182～188 のいずれか 1 つの組成物。

191. 環 A^L は、任意選択で置換されている 5 員単環式飽和環である、実施形態 182～188 のいずれか 1 つの組成物。

192. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 II-c-1 :

【化 9 7】

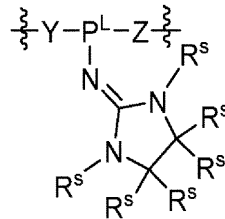


II-c-1

の構造又はその塩形態を有し、式中、g は 0～4 である、実施形態 182～191 のいずれか 1 つの組成物。

193. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、式 II-c-2 :

【化 9 8】



II-c-2

の構造又はその塩形態を有し、式中、g は 0～4 である、実施形態 182～193 のいずれか 1 つの組成物。

194. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、独立に、式 II-c-1 又は II-c-2 の構造又はその塩形態を有する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

195. それぞれの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は同じ構造を有する、実施形態 182～193 のいずれか 1 つの組成物。

196. 該当する場合、負に帯電していないインターヌクレオチド結合ではない複数のオリゴヌクレオチドの各インターヌクレオチド結合は、独立に、式 I の構造を有する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

197. 複数のオリゴヌクレオチドの各インターヌクレオチド結合は、独立に、式 I の構造を有する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

198. 1 つ又は複数の P^L は P (=W) である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

199. 各 P^L は、独立に、P (=W) である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

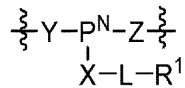
200. 1 つ又は複数の W は O である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

201. 各 W は O である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

202. 1 つ又は複数の W は S である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

203. 1 つ又は複数の W は、独立に、N (-L-R^S) である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

204. 1つ又は複数のインターヌクレオチド結合は、独立に、式 III :



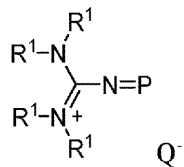
III

の構造又はその塩形態を有し、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

205. P^{N} は、 $\text{P} (= \text{N} - \text{L} - \text{R}^5)$ である、実施形態204の組成物。

206. P^{N} は、

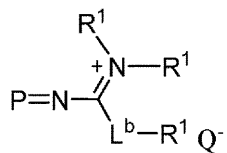
【化100】



Q^- である、実施形態204の組成物。

207. P^{N} は、

【化101】



Q^- である、実施形態204の組成物。

208. L^a は、共有結合である、実施形態207の組成物。

209. L^a は、 $-\text{N}(\text{R}^1)-$ である、実施形態207の組成物。

210. L^a は、 $-\text{N}(\text{R}')-$ である、実施形態207の組成物。

211. L^a は、 $-\text{N}(\text{R})-$ である、実施形態207の組成物。

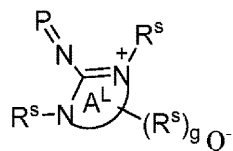
212. L^a は、 $-\text{S}(\text{O})-$ である、実施形態207の組成物。

213. L^a は、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ である、実施形態207の組成物。

214. L^a は、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$ である、実施形態207の組成物。

215. P^{N} は、

【化102】



Q^- である、実施形態204の組成物。

216. P^{N} は、

10

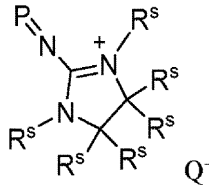
20

30

40

50

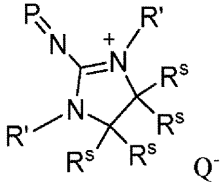
【化 1 0 3】



Q⁻である、実施形態 2 0 4 の組成物。

2 1 7 . P N は、

【化 1 0 4】



Q⁻である、実施形態 2 0 4 の組成物。

2 1 8 . 1 つ又は複数の Y は O である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

2 1 9 . 各 Y は O である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

2 2 0 . 1 つ又は複数の Z は O である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

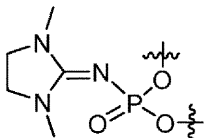
2 2 1 . 各 Z は O である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

2 2 2 . 1 つ又は複数の X は O である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

2 2 3 . 1 つ又は複数の X は S である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

2 2 4 . 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、

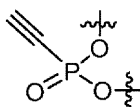
【化 1 0 5】



の構造を有する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

2 2 5 . 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、

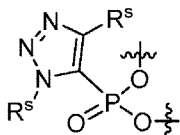
【化 1 0 6】



の構造を有する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

2 2 6 . 負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、

【化 1 0 7】



の構造を有する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

227. 負に帯電していないインターヌクレオチド結合ではない式 I 又その塩形態の各インターヌクレオチド結合では、X は、独立に、O 又は S であり、且つ $L-R^1$ は $-H$ (それぞれ天然リン酸結合又はホスホロチオエート結合) である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

228. 複数のオリゴヌクレオチドにホスホロチオエート結合が存在する場合、各ホスホロチオエート結合は、独立に、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

229. 少なくとも 1 つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

230. 少なくとも 1 つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

231. 複数のオリゴヌクレオチドは、リンカーを介してオリゴヌクレオチド骨格に独立に結合されている標的部分を含む、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

232. 標的部分は炭水化物部分である、実施形態 231 の組成物。

233. 標的部分は、 $G a l N a c$ 部分を含むか又は $G a l N a c$ 部分である、実施形態 231 又は 232 の組成物。

234. 複数のオリゴヌクレオチドは脂質部分を含み、ここで、脂質部分は、独立に、リンカーを介してオリゴヌクレオチド骨格に結合されている、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

235. 複数のオリゴヌクレオチドは塩として存在し、ここで、組成物の状態での 1 つ又は複数の非中性インターヌクレオチド結合は、独立に、塩形態として存在する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

236. 複数のオリゴヌクレオチドは塩として存在し、ここで、組成物の状態での 1 つ又は複数の負に帯電したインターヌクレオチド結合は、独立に、塩形態として存在する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

237. 複数のオリゴヌクレオチドは塩として存在し、ここで、組成物の状態での 1 つ又は複数の負に帯電したインターヌクレオチド結合は、独立に、金属塩として存在する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

238. 複数のオリゴヌクレオチドは塩として存在し、ここで、組成物の状態でのそれぞれの負に帯電したインターヌクレオチド結合は、独立に、金属塩として存在する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

239. 複数のオリゴヌクレオチドは塩として存在し、ここで、組成物の状態でのそれぞれの負に帯電したインターヌクレオチド結合は、独立に、ナトリウム塩として存在する、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

240. 複数のオリゴヌクレオチドは塩として存在し、ここで、それぞれの負に帯電したインターヌクレオチド結合は、独立に、天然リン酸結合 (その中性型は $-O-P(O)(OH)-O$ である) 又はホスホロチオエートインターヌクレオチド結合 (その中性型は $-O-P(O)(SH)-O$ である) である、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

241. 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タイプの複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド組成物であって、

複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個のキラル制御されたインターヌクレオチド結合を含み; 及び

複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の負に帯電していないインターヌクレオチド結合を含む組成物。

10

20

30

40

50

242. 少なくとも1つの負に帯電していないインターヌクレオチド結合は、中性インターヌクレオチド結合である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

243. 中性インターヌクレオチド結合は、トリアゾール、中性トリアゾール、アルキン又は環状グアニジンであるか又はそれを含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

244. オリゴヌクレオチド組成物は、転写物スプライシングシステム内の転写物と接触されると、転写物のスプライシングが、組成物の非存在、参照組成物の存在及びこ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に対して変化されることを特徴とする、先行する実施形態のいずれか1つのオリゴヌクレオチド組成物。

245. 転写物は、ジストロフィン転写物である、先行する実施形態のいずれか1つのオリゴヌクレオチド組成物。

246. 転写物のスプライシングは、エクソン45、51若しくは53又は複数のエクソンのスキッピングのレベルが増加するように変化される、先行する実施形態のいずれか1つのオリゴヌクレオチド組成物。

247. 標的遺伝子のノックダウンを媒介することができる、先行する実施形態のいずれか1つのオリゴヌクレオチド組成物。

248. 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タイプの複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド組成物であって、

複数のオリゴヌクレオチドは、コレステロール；L-カルニチン（アミド及びカルバメート結合）；葉酸；切断可能な脂質（1，2-ジラウリン及びエステル結合）；インスリン受容体リガンド；ガンボギン酸；CPP；グルコース（3分岐型及び16分岐型糖鎖）；又はマンノース（3分岐型及び16分岐型糖鎖、 α 及び β ）を含むオリゴヌクレオチド組成物。

249. 複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個のキラル制御されたインターヌクレオチド結合を含む、実施形態248の組成物。

250. オリゴヌクレオチド組成物は、転写物スプライシングシステム内の転写物と接触されると、転写物のスプライシングが、組成物の非存在、参照組成物の存在及びこ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に対して変化されることを特徴とする、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

251. 転写物は、ジストロフィン転写物である、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

252. 転写物のスプライシングは、エクソン45、51若しくは53又は複数のエクソンのスキッピングのレベルが増加するように変化される、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

253. オリゴヌクレオチド組成物は、標的遺伝子のノックダウンを媒介することができる、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

254. 複数のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド組成物であって、複数のオリゴヌクレオチドは、

1) 共通の塩基配列、及び

2) 独立に1つ又は複数（例えば、約1～50、1～40、1～30、1～25、1～20、1～15、1～10、5～50、5～40、5～30、5～25、5～20、5～15、5～10、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個以上）のキラルインターヌクレオチド結合（「キラル制御されたインターヌクレオチド結合」）における同じ結合リン立体化学

10

20

30

40

50

を共有する、オリゴヌクレオチド組成物。

255. 複数のオリゴヌクレオチドは、独立に5つ以上のインターヌクレオチド結合における同じ結合リン立体化学を共有する、実施形態254の組成物。

256. 複数のオリゴヌクレオチドは、独立に5つ以上のホスホロチオエートインターヌクレオチド結合における同じ結合リン立体化学を共有する、実施形態254の組成物。

257. 複数のオリゴヌクレオチドは、独立に各ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合における同じ結合リン立体化学を共有する、実施形態254～256のいずれか1つの組成物。

258. 複数のオリゴヌクレオチドは、独立に各キラルインターヌクレオチド結合における同じ結合リン立体化学を共有する、実施形態254～256のいずれか1つの組成物。

259. 複数のオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個）の中性インターヌクレオチド結合を含む、実施形態254～258のいずれか1つの組成物。

260. 複数のオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個）のn001を含む、実施形態254～258のいずれか1つの組成物。

261. 複数のオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個）の天然リン酸結合を含む、実施形態254～260のいずれか1つの組成物。

262. 塩基配列は、UCAAGGAAGAUUGGCAUUUCUであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

263. 塩基配列は、GGUAAGUUCUGUCCAAGCCCCであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

264. 塩基配列は、GUACCUCCAACAUCAAGGAAであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

265. 塩基配列は、CAACAUCAAGGAAGAUUGGCAであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

266. 塩基配列は、GAUGGCAUUUCUAGUUUGGAであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

267. 塩基配列は、AUGGCAUUUCUAGUUUGGAGであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

268. 塩基配列は、UGGCAUUUCUAGUUUGGAGGAであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

269. 塩基配列は、GGCAUUUCUAGUUUGGAGGAUであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

270. 塩基配列は、GCAUUUCUAGUUUGGAGGAUGであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

271. 塩基配列は、GCAGUUUCCUUAAGUAACCAACであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

272. 塩基配列は、CAGUUUCCUUAAGUAACCAACAであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

273. 塩基配列は、UUCCUUAAGUAACCAACAGGUUであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

274. 塩基配列は、UUGUGUCACCAAGAGUAACAGであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

275. 塩基配列は、UGGCAAGUUUCCUUAAGUAACCAACであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

276. 塩基配列は、AGUUUCCUUAAGUAACCAACAGであるか又はそれを含む、実施形態254～261のいずれか1つの組成物。

277. 複数のオリゴヌクレオチドの塩基配列を有する組成物中のオリゴヌクレオチドの

10

20

30

40

50

少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 % 又は 90 % は、複数のオリゴヌクレオチドである、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

278. 複数のオリゴヌクレオチドの塩基配列、骨格結合のパターン及び骨格リン修飾のパターンを有する組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 % 又は 90 % は、複数のオリゴヌクレオチドである、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

279. 複数のオリゴヌクレオチドは同じ構成を有し、同じ構成を有する組成物中のオリゴヌクレオチドの少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 % 又は 90 % は、複数のオリゴヌクレオチドである、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

280. 各ヘテロ原子は、独立に、ホウ素、窒素、酸素、ケイ素、硫黄又はリンである、先行する実施形態のいずれか 1 つの組成物。

281. 先行する実施形態のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド組成物及び薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

282. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f C * S f C * S f U n 0 0 1 R f C * S f C * S m A
f A * S m C * S f A * S m U f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f G * S f A *
S f A

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

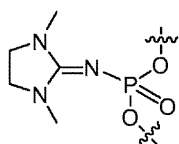
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 108】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

283. 組成物であって、GUACCUCACAACAUGGAの塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f C * S f C * S f U n 0 0 1 R f C * S f C * S m A
f A * S m C * S f A * S m U f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f G * S f A *
S f A

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

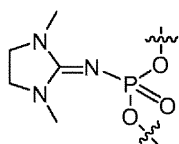
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 109】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

284. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f U n 0 0 1 R f U * S f U * S m C
f U * S m A * S f G * S m U f U * S f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f A * S f G *
S f A

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

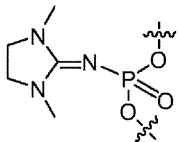
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化110】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

285. 組成物であって、UGGCAUUUCUAGUUUGGAGGAの塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f U n 0 0 1 R f U * S f U * S m C
f U * S m A * S f G * S m U f U * S f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f A * S f G *
S f A

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

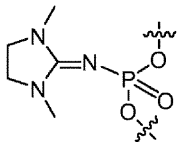
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化111】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

286. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f G * S f G * S f C n 0 0 1 R f A * S f U * S f U n 0 0 1 R m U f C * S f U * S
m A * S f G * S m U m U * S f U * S f G * S f G * S f A n 0 0 1 R f G * S f A *
S f U

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

10

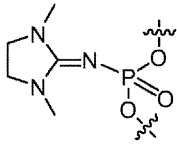
20

30

40

50

【化 1 1 2】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

287. 組成物であって、GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUの塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f G * S f G * S f C n 0 0 1 R f A * S f U * S f U n 0 0 1 R m U f C * S f U * S m A * S f G * S m U m U * S f U * S f G * S f G * S f A n 0 0 1 R f G * S f A * S f U

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

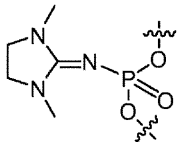
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 1 3】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

288. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m U f C * S m C * S f U * S m U f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C * S f C

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

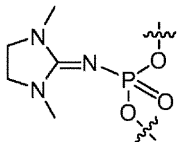
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 1 4】



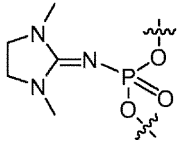
であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

289. 組成物であって、UGGCAGUUUCCUUAAGUAAACCの塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m U f C * S m C * S f U * S m U f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C * S f C

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 1 5】



10

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

290. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R m U f U * S f U * S m C * S f C * S m U m U * S f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C * S f C

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

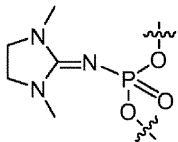
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 1 6】



20

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

291. 組成物であって、U G G C A G U U U C C U U A G U A A C C の塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R m U f U * S f U * S m C * S f C * S m U m U * S f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C * S f C

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

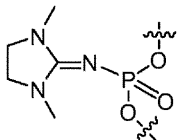
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 1 7】



30

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

292. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

50

f G * S f G * S f U n 0 0 1 R f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m C
f U * S m G * S f U * S m C f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f C * S f C *
S f C

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

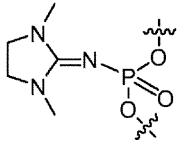
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - O M e 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 1 8】



10

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

2 9 3 . 組成物であって、G G U A A G U U C U G U C C A A G C C C の塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f G * S f G * S f U n 0 0 1 R f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m C
f U * S m G * S f U * S m C f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f C * S f C *
S f C

20

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

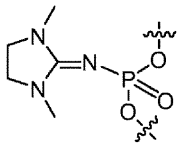
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - O M e 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 1 9】



30

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

2 9 4 . 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f G * S f G * S f U n 0 0 1 R f A * S f A * S f G n 0 0 1 R m U f U * S f C * S
m U * S f G * S m U m C * S f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f C * S f C *
S f C

40

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

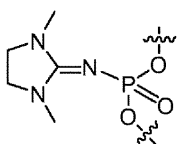
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - O M e 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 2 0】



50

であり、ここで、リンは、R_p配置のものである、組成物。

295. 組成物であって、GGUAAGUUCUGUCCAAAGCCCCの塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

fG*SfG*SfUn001RfA*SfA*SfGn001RmUfU*SfC*S
mU*SfG*SmUmC*SfC*SfA*SfA*SfGn001RfC*SfC*
SfC

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

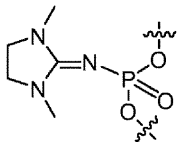
fは、2'-F修飾ヌクレオシドを表し；

*Sは、S_pホスホロチオエートを表し；

mは、2'-OMe修飾ヌクレオシドを表し；及び

n001Rは、

【化121】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである、組成物。

296. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

fC*SfA*SfAn001RfC*SfA*SfUn001RfC*SfA*SmA
fG*SmG*SfA*SmAfG*SfA*SfU*SfGn001RfG*SfC*
SfA

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

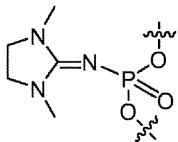
fは、2'-F修飾ヌクレオシドを表し；

*Sは、S_pホスホロチオエートを表し；

mは、2'-OMe修飾ヌクレオシドを表し；及び

n001Rは、

【化122】



であり、ここで、リンは、R_p配置のものである、組成物。

297. 組成物であって、CAACAUCAAGGAAGAUGGCAの塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

fC*SfA*SfAn001RfC*SfA*SfUn001RfC*SfA*SmA
fG*SmG*SfA*SmAfG*SfA*SfU*SfGn001RfG*SfC*
SfA

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

fは、2'-F修飾ヌクレオシドを表し；

*Sは、S_pホスホロチオエートを表し；

mは、2'-OMe修飾ヌクレオシドを表し；及び

n001Rは、

10

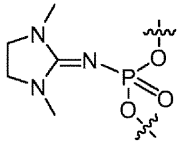
20

30

40

50

【化 1 2 3】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

298. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A n 0 0 1 R f U * S f U * S m U
f C * S m U * S f A * S m G f U * S f U * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f A *
S f G

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

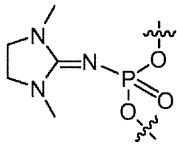
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 2 4】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

299. 組成物であって、A U G G C A U U U C U A G U U U G G A G の塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A n 0 0 1 R f U * S f U * S m U
f C * S m U * S f A * S m G f U * S f U * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f A *
S f G

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

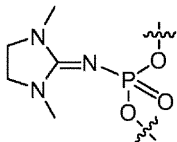
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 2 5】



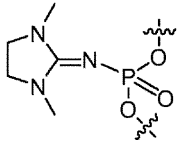
であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

300. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A n 0 0 1 R m U f U * S f U * S
m C * S f U * S m A m G * S f U * S f U * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f A *
S f G

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 2 6】



10

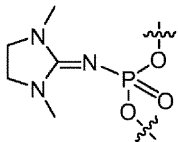
であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

3 0 1 . 組成物であって、A U G G C A U U U C U A G U U U G G A G の塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、
 f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A n 0 0 1 R m U f U * S f U * S m C * S f U * S m A m G * S f U * S f U * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f A * S f G

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 2 7】

20



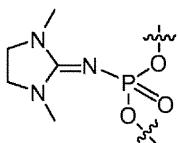
であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

3 0 2 . 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、
 f G * S f C * S f A n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f U * S m A f G * S m U * S f U * S m U f G * S f G * S f A * S f G n 0 0 1 R f A * S f U * S f G

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 2 8】

40



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

3 0 3 . 組成物であって、G C A U U U C U A G U U U G G A G A U G の塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

50

f G * S f C * S f A n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f U * S m A
f G * S m U * S f U * S m U f G * S f G * S f A * S f G n 0 0 1 R f A * S f U *
S f G

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

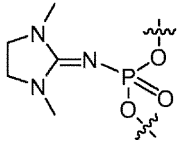
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 2 9】



10

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

3 0 4 . 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f C * S m U
f U * S m A * S f G * S m U f A * S f A * S f C * S f C n 0 0 1 R f A * S f C *
S f A

20

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

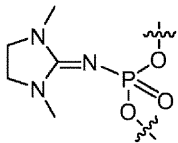
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 3 0】



30

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

3 0 5 . 組成物であって、C A G U U U C C U U A G U A A C C A C A の塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f C * S m U
f U * S m A * S f G * S m U f A * S f A * S f C * S f C n 0 0 1 R f A * S f C *
S f A

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

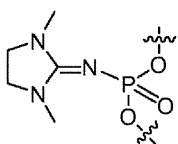
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 3 1】



40

50

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

306. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f A * S f G * S f U n 0 0 1 R f U * S f U * S f C n 0 0 1 R m C f U * S f U * S m A * S f G * S m U m A * S f A * S f C * S f C * S f A n 0 0 1 R f C * S f A * S f G

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

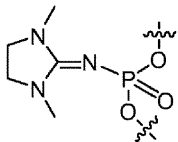
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - O M e 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化132】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

307. 組成物であって、A G U U U C C U U A G U A A C C A C A G の塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f A * S f G * S f U n 0 0 1 R f U * S f U * S f C n 0 0 1 R m C f U * S f U * S m A * S f G * S m U m A * S f A * S f C * S f C * S f A n 0 0 1 R f C * S f A * S f G

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

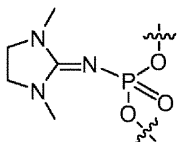
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - O M e 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化133】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

308. 組成物であって、組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f U * S f C n 0 0 1 R f C * S f U * S f U n 0 0 1 R m A f G * S f U * S m A * S f A * S m C m C * S f A * S f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f G * S f U * S f U

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - O M e 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

10

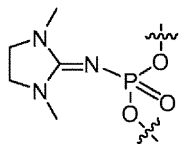
20

30

40

50

【化 1 3 4】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

309. 組成物であって、U U C C U U A G U A A C C A C A G G U U の塩基配列を有する組成物中のあるレベルのすべてのオリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、

f U * S f U * S f C n 0 0 1 R f C * S f U * S f U n 0 0 1 R m A f G * S f U * S m A * S f A * S m C m C * S f A * S f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f G * S f U * S f U

の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であり、ここで、

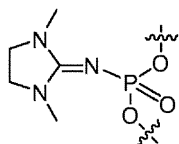
f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - O Me 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、

【化 1 3 5】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、組成物。

310. 液体組成物であり、オリゴヌクレオチドは、組成物に溶解された1つ又は複数の塩である、実施形態282～309のいずれか1つの組成物。

311. オリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、薬学的に許容可能な塩である、実施形態282～310のいずれか1つの組成物。

312. オリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、ナトリウム塩、カリウム塩及びアンモニウム（例えば、[N (R) 4] + の構造（例えば、各 R は、独立に、- H 又は任意選択で置換されている C 1 ～ 6 アルキルを有する））塩から独立に選択される薬学的に許容可能な塩である、実施形態282～311のいずれか1つの組成物。

313. オリゴヌクレオチドは、それぞれ独立に、ナトリウム塩である、実施形態282～312のいずれか1つの組成物。

314. レベルは、約1%～100%（例えば、約5%～100%、10%～100%、20%～100%、30%～100%、40%～100%、50%～100%、60%～100%、70%～100%、80%～100%、90%～100%、95%～100%、50%～90%、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは100%又は少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは99%）である、実施形態282～313のいずれか1つの組成物。

315. レベルは、約50%以上である、実施形態282～313のいずれか1つの組成物。

316. レベルは、約60%以上である、実施形態282～313のいずれか1つの組成物。

317. レベルは、約70%以上である、実施形態282～313のいずれか1つの組成

物。

318. レベルは、約80%以上である、実施形態282～313のいずれか1つの組成物。

319. レベルは、約85%以上である、実施形態282～313のいずれか1つの組成物。

320. レベルは、約90%以上である、実施形態282～313のいずれか1つの組成物。

321. レベルは、約95%以上である、実施形態282～313のいずれか1つの組成物。

322. $fG * SfU * SfAn001RfC * SfC * SfUn001RfC * SfC * SmAfA * SmC * SfA * SmUfC * SfA * SfA * SfGn001RfG * SfA * SfA$ の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

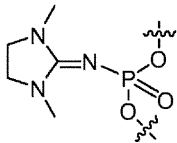
f は、2'-F修飾ヌクレオシドを表し；

$*S$ は、 Sp ホスホロチオエートを表し；

m は、2'-OMe修飾ヌクレオシドを表し；及び

$n001R$ は、

【化136】



であり、ここで、リンは、 Rp 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

323. $fU * SfG * SfGn001RfC * SfA * SfUn001RfU * SfU * SmCfU * SmA * SfG * SmUfU * SfU * SfG * SfGn001RfA * SfG * SfA$ の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

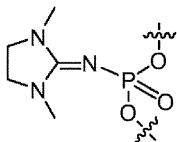
f は、2'-F修飾ヌクレオシドを表し；

$*S$ は、 Sp ホスホロチオエートを表し；

m は、2'-OMe修飾ヌクレオシドを表し；及び

$n001R$ は、

【化137】



であり、ここで、リンは、 Rp 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

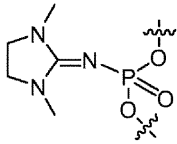
324. $fG * SfG * SfCn001RfA * SfU * SfUn001RmUfC * SfU * SmA * SfG * SmUmU * SfU * SfG * SfG * SfAn001RfG * SfA * SfU$ の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

f は、2'-F修飾ヌクレオシドを表し；

$*S$ は、 Sp ホスホロチオエートを表し；

m は、2'-OMe修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、
【化 1 3 8】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

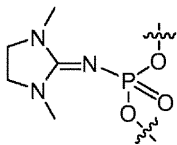
3 2 5 . f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m U f C * S m C * S f U * S m U f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C * S f C の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - O Me 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、
【化 1 3 9】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

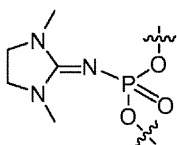
3 2 6 . f U * S f G * S f G n 0 0 1 R f C * S f A * S f G n 0 0 1 R m U f U * S f U * S m C * S f C * S m U m U * S f A * S f G * S f U * S f A n 0 0 1 R f A * S f C * S f C の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

m は、2' - O Me 修飾ヌクレオシドを表し；及び

n 0 0 1 R は、
【化 1 4 0】



であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

3 2 7 . f G * S f G * S f U n 0 0 1 R f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S m C f U * S m G * S f U * S m C f C * S f A * S f A * S f G n 0 0 1 R f C * S f C * S f C の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；

10

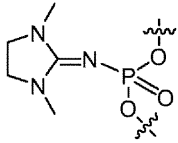
20

30

40

50

mは、2'-OMe修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n001Rは、
 【化141】

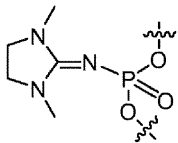


であり、ここで、リンは、Rp配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。 10

328. fG*SfG*SfUn001RfA*SfA*SfGn001RmUfU*SfC*SmU*SfG*SmUmC*SfC*SfA*SfA*SfGn001RfC*SfC*SfCの構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

fは、2'-F修飾ヌクレオシドを表し；
 *Sは、Spホスホロチオエートを表し；
 mは、2'-OMe修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n001Rは、
 【化142】

20

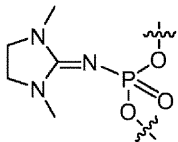


であり、ここで、リンは、Rp配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

329. fC*SfA*SfAn001RfC*SfA*SfUn001RfC*SfA*SmAfG*SmG*SfA*SmAfG*SfA*SfU*SfGn001RfG*SfC*SfAの構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

30

fは、2'-F修飾ヌクレオシドを表し；
 *Sは、Spホスホロチオエートを表し；
 mは、2'-OMe修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n001Rは、
 【化143】



40

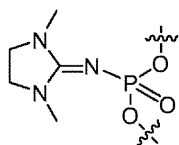
であり、ここで、リンは、Rp配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

330. fA*SfU*SfGn001RfG*SfC*SfAn001RfU*SfU*SmUfC*SmU*SfA*SmGfU*SfU*SfU*SfGn001RfG*SfA*SfGの構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

fは、2'-F修飾ヌクレオシドを表し；

50

* S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - O M e 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 4 4】



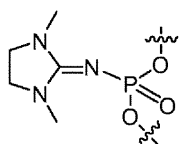
10

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

3 3 1 . f A * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f C * S f A n 0 0 1 R m U f U * S f U * S m C * S f U * S m A m G * S f U * S f U * S f U * S f G n 0 0 1 R f G * S f A * S f G の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - O M e 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 4 5】

20

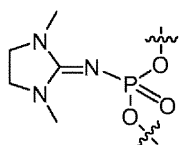


であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

3 3 2 . f G * S f C * S f A n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f U * S m A f G * S m U * S f U * S m U f G * S f G * S f A * S f G n 0 0 1 R f A * S f U * S f G の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

30

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - O M e 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 4 6】



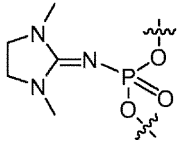
40

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

3 3 3 . f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f U * S f U * S f U n 0 0 1 R f C * S f C * S m U f U * S m A * S f G * S m U f A * S f A * S f C * S f C n 0 0 1 R f A * S f C * S f A の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

50

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 4 7】



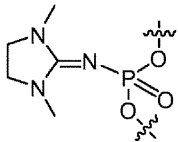
10

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

3 3 4 . f A * S f G * S f U n 0 0 1 R f U * S f U * S f C n 0 0 1 R m C f U * S f U * S m A * S f G * S m U m A * S f A * S f C * S f C * S f A n 0 0 1 R f C * S f A * S f G の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 4 8】

20

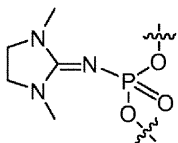


であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

3 3 5 . f U * S f U * S f C n 0 0 1 R f C * S f U * S f U n 0 0 1 R m A f G * S f U * S m A * S f A * S m C m C * S f A * S f C * S f A * S f G n 0 0 1 R f G * S f U * S f U の構造を有するオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩であって、

f は、2' - F 修飾ヌクレオシドを表し；
 * S は、S p ホスホロチオエートを表し；
 m は、2' - OMe 修飾ヌクレオシドを表し；及び
 n 0 0 1 R は、
 【化 1 4 9】

30



40

であり、ここで、リンは、R p 配置のものである、オリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容可能な塩。

3 3 6 . オリゴヌクレオチドは、薬学的に許容可能な塩である、実施形態 3 2 2 ~ 3 3 5 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

3 3 7 . オリゴヌクレオチドは、ナトリウム塩、カリウム塩及びアンモニウム（例えば、

50

[N(R)4] + の構造（例えば、各 R は、独立に、-H 又は任意選択で置換されている C₁ ~ 6 アルキルを有する）塩から選択される薬学的に許容可能な塩である、実施形態 322 ~ 336 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

338. オリゴヌクレオチドは、ナトリウム塩である、実施形態 322 ~ 337 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

339. オリゴヌクレオチドは、約 1% ~ 100%（例えば、約 5% ~ 100%、10% ~ 100%、20% ~ 100%、30% ~ 100%、40% ~ 100%、50% ~ 100%、60% ~ 100%、70% ~ 100%、80% ~ 100%、90% ~ 100%、95% ~ 100%、50% ~ 90%、約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 若しくは 100% 又は少なくとも 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 若しくは 99%）のジアステレオマー純度を有する、実施形態 322 ~ 338 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

340. ジアステレオマー純度は約 50% 以上である、実施形態 322 ~ 339 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

341. ジアステレオマー純度は約 60% 以上である、実施形態 322 ~ 339 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

342. ジアステレオマー純度は約 70% 以上である、実施形態 322 ~ 339 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

343. ジアステレオマー純度は約 80% 以上である、実施形態 322 ~ 339 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

344. ジアステレオマー純度は約 85% 以上である、実施形態 322 ~ 339 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

345. ジアステレオマー純度は約 90% 以上である、実施形態 322 ~ 339 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

346. ジアステレオマー純度は約 95% 以上である、実施形態 322 ~ 339 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド。

347. 有効量の実施形態 322 ~ 346 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド及び薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

348. 先行する実施形態のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド組成物を投与することを含む、標的転写物のスプライシングを変化させるための方法。

349. 標的転写物のスプライシングは、組成物の非存在と比較して変化される、実施形態 348 の方法。

350. 変化は、組成物の非存在と比較して増加したレベルで 1 つ又は複数のエクソンがスキップされることである、先行する実施形態のいずれか 1 つの方法。

351. 標的転写物は、ジストロフィンのプレ mRNA である、先行する実施形態のいずれか 1 つの方法。

352. ジストロフィンのエクソン 45 は、組成物の非存在と比較して増加したレベルでスキップされる、先行する実施形態のいずれか 1 つの方法。

353. ジストロフィンのエクソン 51 は、組成物の非存在と比較して増加したレベルでスキップされる、先行する実施形態のいずれか 1 つの方法。

354. ジストロフィンのエクソン 53 は、組成物の非存在と比較して増加したレベルでスキップされる、実施形態 348 ~ 351 のいずれか 1 つの方法。

355. エクソンがスキップされた mRNA によってコードされるタンパク質は、エクソンがスキップされていない対応する mRNA によってコードされるタンパク質よりも優れた 1 つ又は複数の機能を提供する、先行する実施形態のいずれか 1 つの方法。

356. 筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）を治療するための方法であって、それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、先行する実施形態のいずれか 1 つ

10

20

30

40

50

の組成物を投与することを含む方法。

357. 筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）を治療するための方法であって、それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、本明細書に開示される任意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。

358. 筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）を治療するための方法であって、（a）それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に、本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドを含む組成物を投与すること、及び（b）筋ジストロフィー、デュシェンヌ型（デュシェンヌ）筋ジストロフィー（DMD）又はベッカー型（ベッカー）筋ジストロフィー（BMD）の進行を予防、治療、改善又は遅延させることができる追加の治療を対象に施すことを含む方法。

359. 追加の治療は、第2のオリゴヌクレオチドである、実施形態358の方法。

360. 転写物スプライシングシステムは筋芽細胞又は筋管を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

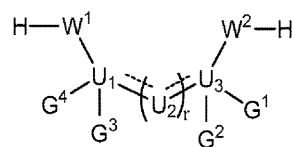
361. 転写物スプライシングシステムは筋芽細胞を含む、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

362. 転写物スプライシングシステムは筋芽細胞を含み、この筋芽細胞は、前分化の0日後、4日後又は7日後に組成物と接触される、先行する実施形態のいずれか1つの組成物。

363. （a）先行する実施形態のいずれかの第1の組成物；（b）先行する実施形態のいずれかの第2の組成物；及び任意選択の（c）先行する実施形態のいずれかの第3の組成物を含む組み合わせを含み、第1、第2及び第3の組成物が異なる組成物。

364. オリゴヌクレオチド又はそのオリゴヌクレオチド組成物を調製するための方法であって、

【化150】

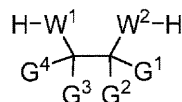


式3-I

の構造を有する化合物又はその塩を提供することを含む方法。

365. オリゴヌクレオチド又はそのオリゴヌクレオチド組成物を調製するための方法であって、

【化151】



の構造を有する化合物又はその塩を提供することを含む方法。

366. オリゴヌクレオチド又はそのオリゴヌクレオチド組成物を調製するための方法であって、

10

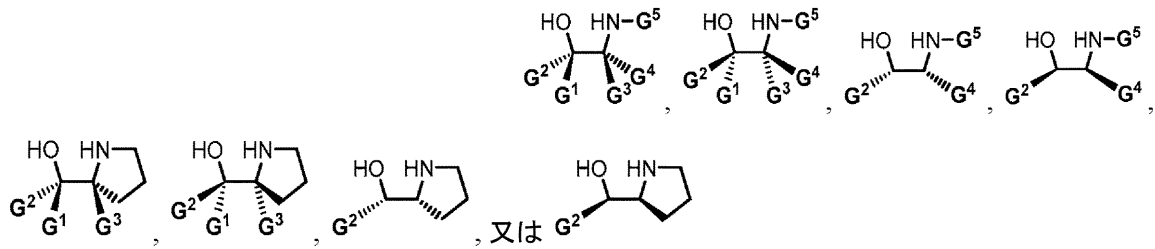
20

30

40

50

【化 1 5 2】



10

の構造を有する化合物又はその塩を提供することを含む方法。

367. 化合物は、立体化学的に純粋である、実施形態364～366のいずれか1つの方法。

368. 化合物は、表CA-1、CA-2、CA-3、CA-4、CA-5、CA-6、CA-7、CA-8、CA-9、CA-10、CA-11又はCA-12の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーある、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

369. 化合物は、表CA-2の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

370. 化合物は、表CA-3の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

371. 化合物は、表CA-4の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

372. 化合物は、表CA-5の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

373. 化合物は、表CA-6の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

374. 化合物は、表CA-7の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

375. 化合物は、表CA-8の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

376. 化合物は、表CA-9の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

377. 化合物は、表CA-10の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

378. 化合物は、表CA-11の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

379. 化合物は、表CA-12の化合物又は関連するそのジアステレオマー又はエナンチオマーである、実施形態364～367のいずれか1つの方法。

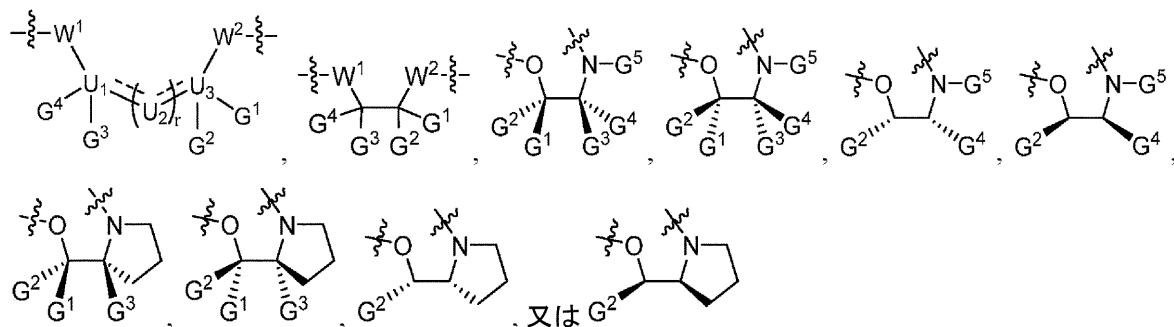
380. オリゴヌクレオチド又はそのオリゴヌクレオチド組成物を調製するための方法であって、

20

30

40

【化 1 5 3】

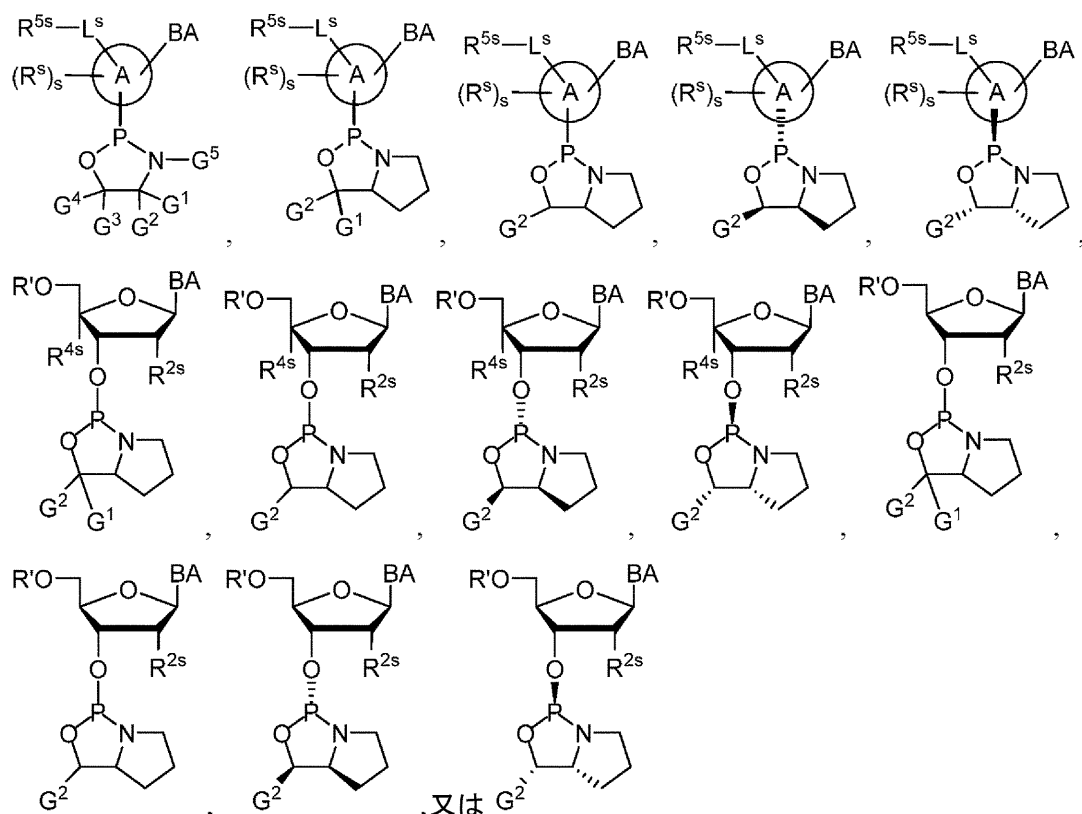


10

の構造を有するキラル補助部分を含むホスホルアミダイト化合物を提供することを含む方法。

381. オリゴヌクレオチド又はそのオリゴヌクレオチド組成物を調製するための方法であって、

【化 1 5 4】



20

30

の構造を有するホスホルアミダイト化合物又はその塩を提供することを含む方法。

40

382. W1は-NG5-である、実施形態364～381のいずれか1つの方法。

383. G5とG3及びG4の1つとが一緒になって、-NG5-の窒素に加えて0～3個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている3～8員飽和環を形成する、実施形態364～382のいずれか1つの方法。

384. G5とG3及びG4の1つとが一緒になって、-NG5-の窒素の他にヘテロ原子を有していない任意選択で置換されている5員飽和環を形成する、実施形態364～382のいずれか1つの方法。

385. W2は、-O-である、実施形態364～384のいずれか1つの方法。

386. G2は、電子求引基を含む、実施形態364～385のいずれか1つの方法。

387. G2は、1つ又は複数の電子求引基で置換されているメチルである、実施形態3

50

64～385のいずれか1つの方法。

388. 電子求引基は、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、ハロゲン、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^1$ 、 $-\text{P}(\text{W})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')_2$ 若しくは $-\text{P}(\text{S})(\text{R}^1)_2$ 又は $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、ハロゲン、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^1$ 、 $-\text{P}(\text{W})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')_2$ 若しくは $-\text{P}(\text{S})(\text{R}^1)_2$ の1つ若しくは複数で置換されているアリール若しくはヘテロアリールである、実施形態386～387のいずれか1つの方法。

389. 電子求引基は、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、ハロゲン、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^1$ 、 $-\text{P}(\text{W})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')_2$ 若しくは $-\text{P}(\text{S})(\text{R}^1)_2$ 又は $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、ハロゲン、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^1$ 、 $-\text{P}(\text{W})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')_2$ 若しくは $-\text{P}(\text{S})(\text{R}^1)_2$ の1つ若しくは複数で置換されているフェニルである、実施形態386～387のいずれか1つの方法。

390. 電子求引基は、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、ハロゲン、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^1$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^1$ 、 $-\text{P}(\text{W})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^1)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')_2$ 又は $-\text{P}(\text{S})(\text{R}^1)_2$ である、実施形態386～387のいずれか1つの方法。

391. G^2 は、 $-\text{L}'-\text{L}''-\text{R}'$ であり、ここで、 L' は、 $-\text{C}_2(\text{R})$ 又は任意選択で置換されている $-\text{CH}_2-$ であり、 L'' は、共有結合、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}')-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}')\text{O}-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')\text{O}-$ 、 $-\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{R}')] -$ 、 $-\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{R}')]\text{O}-$ 、 $-\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{R}')][\text{N}(\text{R}')]-$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{R}')-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{O}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 又は $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$ である、実施形態364～386のいずれか1つの方法。

392. G^2 は、 $-\text{L}'-\text{L}''-\text{R}'$ であり、ここで、 L' は、 $-\text{C}_2(\text{R})$ 又は任意選択で置換されている $-\text{CH}_2-$ であり、 L'' は、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}')-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}')\text{O}-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')-$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')\text{O}-$ 、 $-\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{R}')]-$ 、 $-\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{R}')]\text{O}-$ 、 $-\text{P}(\text{O})[\text{N}(\text{R}')][\text{N}(\text{R}')]-$ 、 $-\text{P}(\text{S})(\text{R}')-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{O}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 又は $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$ である、実施形態364～386のいずれか1つの方法。

393. G^2 は、 $-\text{L}'-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ である、実施形態364～392のいずれか1つの方法。

394. R' は、任意選択で置換されている $\text{C}_1\sim 6$ 脂肪族である、実施形態393の方法。

395. R' は、任意選択で置換されている $\text{C}_1\sim 6$ アルキルである、実施形態393の方法。

396. R' は、メチル、イソプロピル又はtert-ブチルである、実施形態393の方法。

397. R' は、任意選択で置換されているフェニルである、実施形態393の方法。

398. R' はフェニルである、実施形態393の方法。

399. R' は、置換フェニルである、実施形態393の方法。

400. G^2 は、 $-\text{L}'-\text{P}(\text{O})(\text{R}')_2$ である、実施形態364～392のいずれか1つの方法。

401. 1つの R' は、任意選択で置換されている $\text{C}_1\sim 6$ 脂肪族である、実施形態400の方法。

402. 1つの R' は、任意選択で置換されている $\text{C}_1\sim 6$ アルキルである、実施形態400の方法。

10

20

30

40

50

403. 1つのR'は、任意選択で置換されているフェニルである、実施形態400の方法。
404. 1つのR'はフェニルである、実施形態400の方法。
405. 1つのR'は置換フェニルである、実施形態400の方法。
406. 他のR'は、任意選択で置換されているC₁~6脂肪族である、実施形態401~405のいずれか1つの方法。
407. 他のR'は、任意選択で置換されているC₁~6アルキルである、実施形態401~405のいずれか1つの方法。
408. 他のR'は、任意選択で置換されているフェニルである、実施形態401~405のいずれか1つの方法。 10
409. 他のR'はフェニルである、実施形態401~405のいずれか1つの方法。
410. 他のR'は置換フェニルである、実施形態401~405のいずれか1つの方法。
411. L'は、-C(R')₂-である、実施形態391~410のいずれか1つの方法。
412. L'は、任意選択で置換されている-CH₂-である、実施形態391~410のいずれか1つの方法。
413. L'は、-CH₂-である、実施形態391~410のいずれか1つの方法。
414. 1つ又は複数の追加の化合物を提供することを含み、ここで、各化合物は、独立に、実施形態364~413のいずれか1つの化合物である、実施形態364~413のいずれか1つの方法。 20
415. 追加の化合物は、化合物とは異なる構造を有する、実施形態414の方法。
416. 追加の化合物において、G²は、-L'-Si(R)₃であり、ここで、各Rは、独立に、-Hではない、実施形態414の方法。
417. 追加の化合物において、G²は、-CH₂SiCH₃Ph₂である、実施形態414の方法。
418. 1つ又は複数のサイクルを含み、サイクルのそれぞれは、独立に、
- 1) 脱ブロック化；
 - 2) カップリング；
 - 3) 任意選択で第1のキャッピング；
 - 4) 修飾；及び
 - 5) 任意選択で第2のキャッピング
- を含むか又はそれらからなる、実施形態364~417のいずれか1つの方法。
419. オリゴヌクレオチド又はその組成物を調製するための方法であって、1つ又は複数のサイクルを含み、それぞれのサイクルは、独立に、
- 1) 脱ブロック化；
 - 2) カップリング；
 - 3) 任意選択で第1のキャッピング；
 - 4) 修飾；及び
 - 5) 任意選択で第2のキャッピング
- を含むか又はそれらからなる、方法。 40
420. 少なくとも1つのサイクルは、1)~5)を含むか又はそれらからなる、実施形態418~419のいずれか1つの方法。
421. ステップは、1)~5)まで順次行われる、実施形態418~420のいずれか1つの方法。
422. サイクルは、オリゴヌクレオチドの所望の長さが達成されるまで行われる、実施形態418~421のいずれか1つの方法。
423. 脱ブロック化により、5'-OH上の保護基が除去され、遊離5'-OHが提供される、実施形態418~422のいずれか1つの方法。
424. 保護基は、R'-C(O)-である、実施形態423の方法。
425. 保護基は、DMTrである、実施形態423の方法。 50

426. 脱ブロックされるオリゴヌクレオチドを酸と接触させることを含む、実施形態423～425のいずれか1つの方法。

427. 1) ホスホルアミダイトを提供すること；及び2) ホスホルアミダイトをオリゴヌクレオチドと反応させることを含むカップリングを含み、ここで、P-O結合は、ホスホルアミダイトのリンとオリゴヌクレオチドの5'-OHとの間に形成される、実施形態364～426のいずれか1つの方法。

428. 1) ホスホルアミダイトを提供すること；及び2) ホスホルアミダイトをオリゴヌクレオチドと反応させることを含むカップリングを含み、ここで、P-O結合は、ホスホルアミダイトのリンとオリゴヌクレオチドの5'-OHとの間に形成され、ここで、ホスホルアミダイトは、実施形態380～413のいずれか1つの化合物である、実施形態364～427のいずれか1つの方法。

429. 1) ホスホルアミダイトを提供すること；及び2) ホスホルアミダイトをオリゴヌクレオチドと反応させることを含むカップリングを含み、ここで、P-O結合は、ホスホルアミダイトのリンとオリゴヌクレオチドの5'-OHとの間に形成され、ここで、ホスホルアミダイトは、実施形態380～385のいずれか1つの化合物であり、G²は、-L'-Si(R)₃であり、ここで、各Rは、独立に、-Hではない、実施形態364～428のいずれか1つの方法。

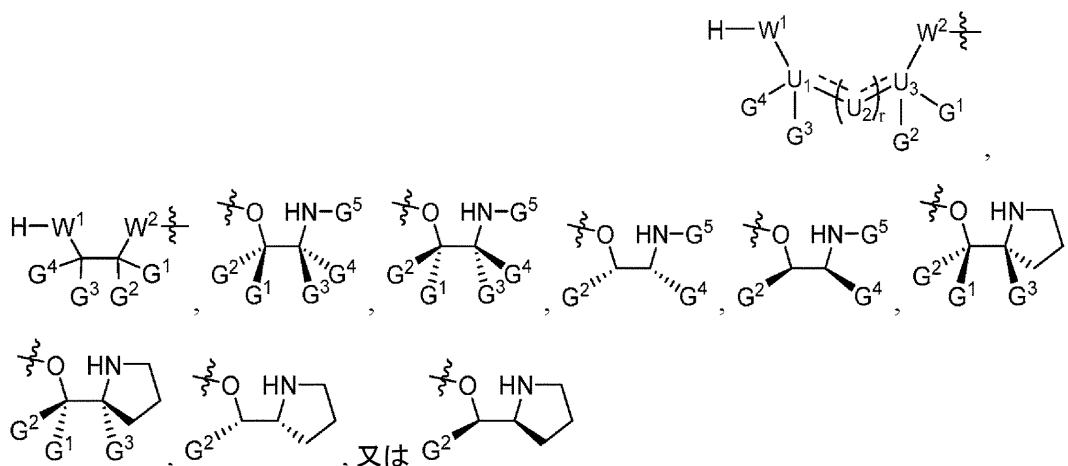
430. G²は、-CH₂SiCH₃Ph₂である、実施形態429の方法。

431. カップリングは、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれを超える立体選択性でインターヌクレオチド結合を形成する、実施形態428～430のいずれか1つの方法。

432. 形成されるインターヌクレオチド結合は、式I又はその塩形態のインターヌクレオチド結合である、実施形態431の方法。

433. -X-L-R¹は、

【化155】



である、実施形態432の方法。

434. P^LはPである、実施形態432又は433の方法。

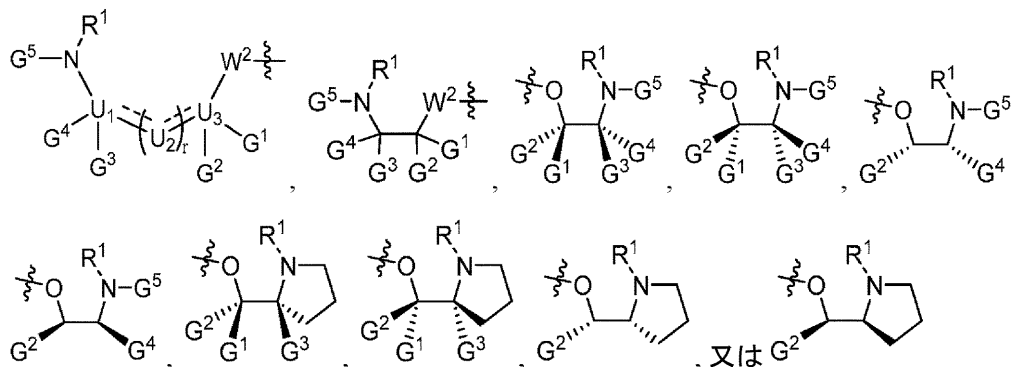
435. 1) ホスホルアミダイトを提供すること；及び2) ホスホルアミダイトをオリゴヌクレオチドと反応させることを含むカップリングを含み、ここで、P-O結合が、ホスホルアミダイトのリンとオリゴヌクレオチドの5'-OHとの間に形成され、ここで、ホスホルアミダイトは、リン原子が保護されたヌクレオシド、-N(i-Pr)₂及び2-シアノエチルに結合されるオリゴヌクレオチド合成のための標準的なホスホルアミダイトである、実施形態364～434のいずれか1つの方法。

436. 1) アシル化試薬を提供すること；及び2) オリゴヌクレオチドをアシル化試薬と接触させることを含む第1のキャッピング含み、ここで、第1のキャッピングは、インターヌクレオチド結合のアミノ基をキャッピングする、実施形態364～435のいずれ

か 1 つの方法。

437. 式 I 又はその塩形態のインターヌクレオチド結合を形成する第 1 のキャッピングを含み、 $-X-L-R^1$ は、

【化 156】



10

である、実施形態 364 ~ 436 のいずれか 1 つの方法。

438. P^L は P であり、 R^1 は $-C(O)R$ である、実施形態 437 の方法。

439. 第 1 のキャッピングは、実施形態 431 の各カップリングの後に行われる、実施形態 364 ~ 438 のいずれか 1 つの方法。

440. 硫化であるか又は硫化を含む修飾ステップを含む、実施形態 364 ~ 439 のいずれか 1 つの方法。

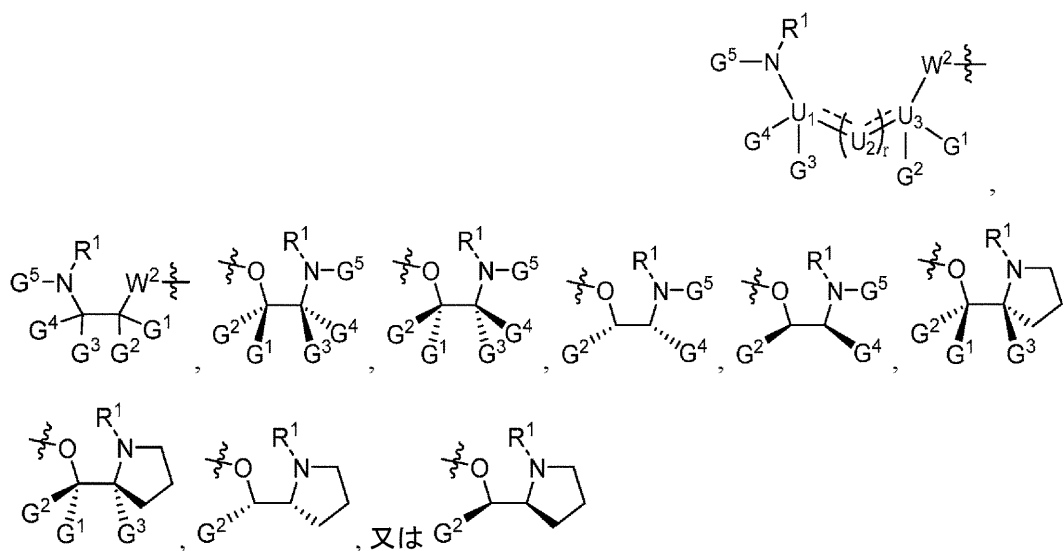
20

441. 硫化は、結合リンに $=S$ を導入する、実施形態 440 の方法。

442. 硫化は、式 I 又はその塩形態のインターヌクレオチド結合を形成し、 P^L は P ($=S$) である、実施形態 440 又は 441 の方法。

443. $-X-L-R^1$ は、

【化 157】



30

である、実施形態 442 の方法。

444. R^1 は、 $-C(O)R$ である、実施形態 443 の方法。

445. 酸化であるか又は酸化を含む修飾ステップを含む、実施形態 364 ~ 444 のいずれか 1 つの方法。

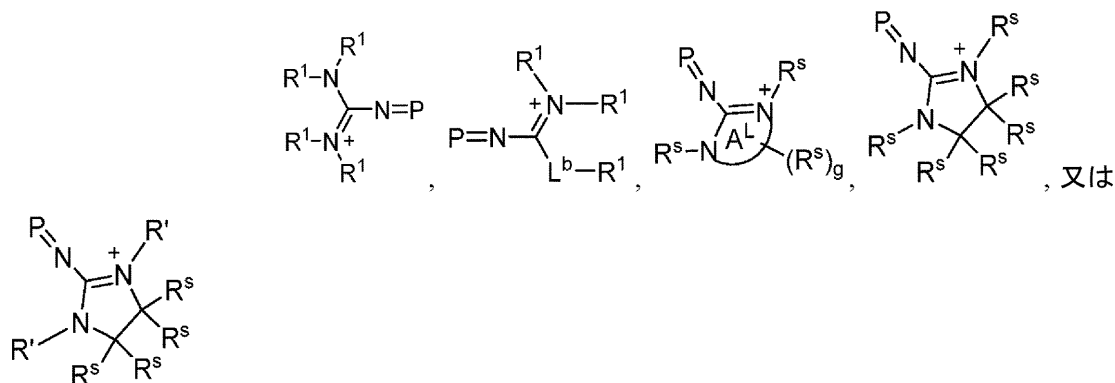
446. 硫化は、結合リンに $=O$ を導入する、実施形態 440 の方法。

447. 結合リンに $=N-L-R^5$ を導入する修飾ステップを含む、実施形態 364 ~ 446 のいずれか 1 つの方法。

448. 結合リンを、

50

【化 1 5 8】



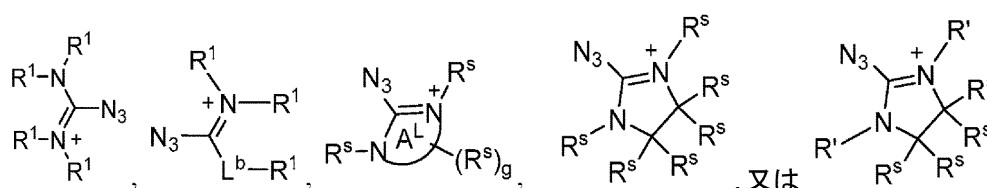
10

に変換する修飾ステップを含む、実施形態 364～446 のいずれか 1 つの方法。

449. オリゴヌクレオチドをアジドイミダゾリニウム塩と接触させることを含む修飾ステップを含む、実施形態 364～448 のいずれか 1 つの方法。

450. オリゴヌクレオチドを、

【化 1 5 9】

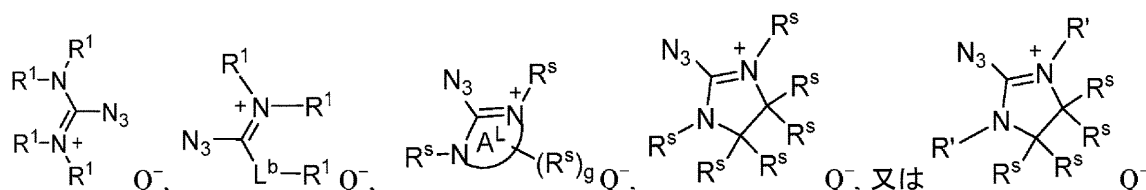


20

を含む化合物と接触させることを含む修飾ステップを含む、実施形態 364～448 のいずれか 1 つの方法。

451. オリゴヌクレオチドを、

【化 1 6 0】



30

の構造を有する化合物と接触させることを含む修飾ステップを含み、ここで、Q⁻はアニオンである、実施形態 364～448 のいずれか 1 つの方法。

452. Q⁻は、F⁻、Cl⁻、Br⁻、BF₄⁻、PF₆⁻、TfO⁻、Tf₂N⁻、AsF₆⁻、ClO₄⁻又はSbF₆⁻である、実施形態 451 の方法。

453. Q⁻は、PF₆⁻である、実施形態 452 の方法。

454. 修飾ステップは、式 I 又はその塩形態のインターヌクレオチド結合を形成し、ここで、P^Lは、P (=N-L-R⁵) である、実施形態 364～454 のいずれか 1 つの方法。

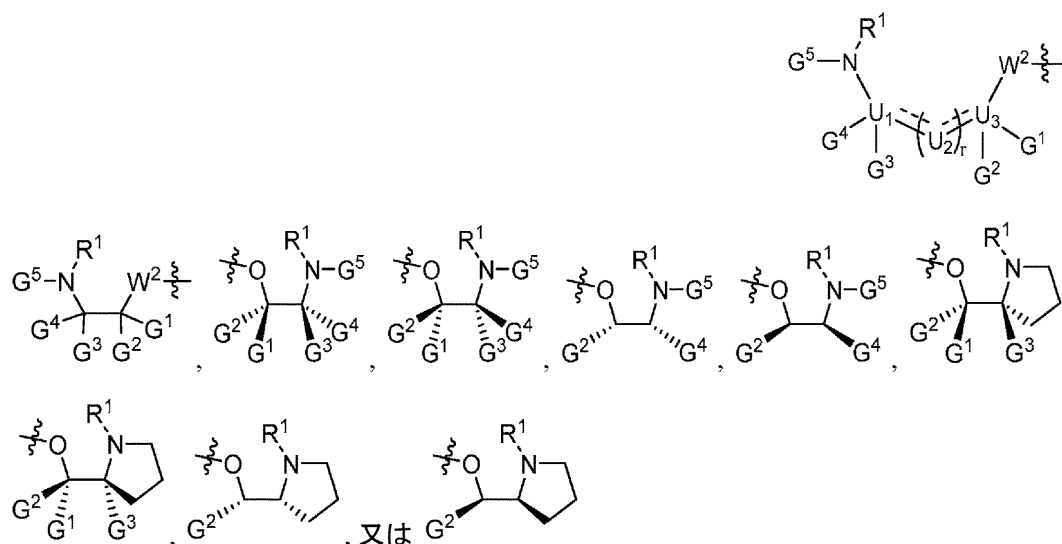
40

455. 修飾ステップは、式 III 又はその塩形態のインターヌクレオチド結合を形成する、実施形態 364～454 のいずれか 1 つの方法。

456. -X-L-R¹は、

50

【化 1 6 1】



10

である、実施形態 4 5 4 又は 4 5 5 の方法。

4 5 7. R^1 は、 $-C(O)R$ である、実施形態 4 5 6 の方法。

4 5 8. 遊離 5'-OH をキャッピングする第 2 のキャッピングを含む、実施形態 3 6 4 ~ 4 5 7 のいずれか 1 つの方法。

20

4 5 9. 遊離 5'-OH をキャッピングする第 2 のキャッピングを含み、第 2 のキャッピングは各サイクルで行われる、実施形態 3 6 4 ~ 4 5 8 のいずれか 1 つの方法。

4 6 0. 遊離 5'-OH をキャッピングする第 2 のキャッピングを含み、第 2 のキャッピングは、各サイクルで行われ、その後別のサイクルが続く、実施形態 3 6 4 ~ 4 5 8 のいずれか 1 つの方法。

4 6 1. 5'-OH は、 $-OAc$ としてキャッピングされている、実施形態 4 5 8 ~ 4 6 0 のいずれか 1 つの方法。

4 6 2. オリゴヌクレオチドは、固体支持体に付着されている、実施形態 3 6 4 ~ 4 6 1 のいずれか 1 つの方法。

30

4 6 3. 固体支持体が CPG である、実施形態 4 6 2 の方法。

4 6 4. オリゴヌクレオチドが塩基と接触される接触を含む、実施形態 4 6 2 ~ 4 6 3 のいずれか 1 つの方法。

4 6 5. 接触は、実質的に水なしで行われる、実施形態 4 6 4 の方法。

4 6 6. 接触は、オリゴヌクレオチドの長さが達成された後、且つオリゴヌクレオチドの脱保護及び切断の前に行われる、実施形態 4 6 4 又は 4 6 5 の方法。

4 6 7. 塩基は、 NR_3 の構造を有するアミン塩基である、実施形態 4 6 4 ~ 4 6 6 のいずれか 1 つの方法。

4 6 8. 塩基は、トリエチルアミンである、実施形態 4 6 7 の方法。

4 6 9. 塩基は、 N,N -ジエチルアミンである、実施形態 4 6 7 の方法。

40

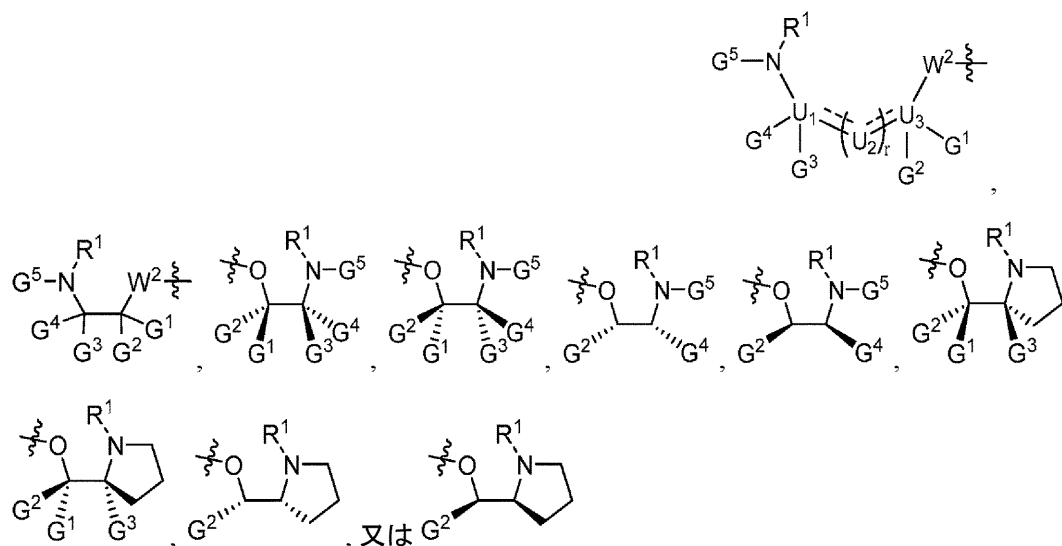
4 7 0. 接触は、キラル補助剤を除去する、実施形態 4 6 4 ~ 4 6 9 のいずれか 1 つの方法。

4 7 1. 接触は、 $-X-L-R^1$ 基を除去する、実施形態 4 6 4 ~ 4 7 0 のいずれか 1 つの方法。

4 7 2. $-X-L-R^1$ は、

50

【化 1 6 2】



10

である、実施形態 4 7 1 の方法。

4 7 3. 接触は、式 I - n - 1、I - n - 2、I - n - 3、I - n - 4、II、II - a - 1、II - a - 2、II - b - 1、II - b - 2、II - c - 1、II - c - 2、II - d - 1 又は II - d - 2 のインターヌクレオチド結合を形成し、P^Lは P (O) である、実施形態 4 6 4 ~ 4 7 2 のいずれか 1 つの方法。

20

4 7 4. G² は、電子求引基を含む、実施形態 4 5 6 ~ 4 7 3 のいずれか 1 つの方法。

4 7 5. G² は、1 つ又は複数の電子求引基で置換されているメチルである、実施形態 4 5 6 ~ 4 7 4 のいずれか 1 つの方法。

4 7 6. 電子求引基は、-CN、-NO₂、ハロゲン、-C (O) R¹、-C (O) OR[']、-C (O) N (R['])₂、-S (O) R¹、-S (O)₂ R¹、-P (W) (R¹)₂、-P (O) (R¹)₂、-P (O) (OR['])₂ 若しくは -P (S) (R¹)₂ 又は -CN、-NO₂、ハロゲン、-C (O) R¹、-C (O) OR[']、-C (O) N (R['])₂、-S (O) R¹、-S (O)₂ R¹、-P (W) (R¹)₂、-P (O) (R¹)₂、-P (O) (OR['])₂ 若しくは -P (S) (R¹)₂ の 1 つ若しくは複数で置換されているアリール若しくはヘテロアリールである、実施形態 4 7 4 ~ 4 7 5 のいずれか 1 つの方法。

30

4 7 7. 電子求引基は、-CN、-NO₂、ハロゲン、-C (O) R¹、-C (O) OR[']、-C (O) N (R['])₂、-S (O) R¹、-S (O)₂ R¹、-P (W) (R¹)₂、-P (O) (R¹)₂、-P (O) (OR['])₂ 若しくは -P (S) (R¹)₂ 又は -CN、-NO₂、ハロゲン、-C (O) R¹、-C (O) OR[']、-C (O) N (R['])₂、-S (O) R¹、-S (O)₂ R¹、-P (W) (R¹)₂、-P (O) (R¹)₂、-P (O) (OR['])₂ 若しくは -P (S) (R¹)₂ の 1 つ若しくは複数で置換されているフェニルである、実施形態 4 7 4 ~ 4 7 5 のいずれか 1 つの方法。

40

4 7 8. 電子求引基は、-CN、-NO₂、ハロゲン、-C (O) R¹、-C (O) OR[']、-C (O) N (R['])₂、-S (O) R¹、-S (O)₂ R¹、-P (W) (R¹)₂、-P (O) (R¹)₂、-P (O) (OR['])₂ 又は -P (S) (R¹)₂ である、実施形態 4 7 4 ~ 4 7 5 のいずれか 1 つの方法。

4 7 9. G² は、-L' - L'' - R' であり、ここで、L' は、-C₂(R 又は任意選択で置換されている -CH₂-) であり、L'' は、共有結合、-P (O) (R') -、-P (O) (R') O -、-P (O) (OR') -、-P (O) (OR') O -、-P (O) [N (R')] -、-P (O) [N (R')] O -、-P (O) [N (R')] [N (R')] -、-P (S) (R') -、-S (O)₂ -、-S (O)₂ O -、-S (O) -、-C (O) - 又は -C (O) N (R') - である、実施形態 4 5 6 ~ 4 7 8 のい

50

いずれか1つの方法。

480. G^2 は、 $-L'-L''-R'$ であり、ここで、 L' は、 $-C_2(R)$ 又は任意選択で置換されている $-CH_2-$ であり、 L'' は、 $-P(O)(R')-$ 、 $-P(O)(R')O-$ 、 $-P(O)(OR')-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-P(O)[N(R')]-$ 、 $-P(O)[N(R')]O-$ 、 $-P(O)[N(R')][N(R')]-$ 、 $-P(O)[N(R')][N(R')]O-$ 、 $-P(O)[N(R')][N(R')][N(R')]-$ 、 $-P(O)[N(R')][N(R')][N(R')]O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-S(O)_2O-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-C(O)-$ 又は $-C(O)N(R')-$ である、実施形態456～478のいずれか1つの方法。

481. G^2 は、 $-L'-S(O)_2R'$ である、実施形態456～480のいずれか1つの方法。

482. R' は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ 脂肪族である、実施形態481の方法。

483. R' は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ アルキルである、実施形態481の方法。

484. R' は、メチル、イソプロピル又はtertブチルである、実施形態481の方法。

485. R' は、任意選択で置換されているフェニルである、実施形態481の方法。

486. R' は、フェニルである、実施形態481の方法。

487. R' は、置換フェニルである、実施形態481の方法。

488. G^2 は、 $-L'-P(O)(R')_2$ である、実施形態456～480のいずれか1つの方法。

489. 1つの R' は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ 脂肪族である、実施形態488の方法。

490. 1つの R' は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ アルキルである、実施形態488の方法。

491. 1つの R' は、任意選択で置換されているフェニルである、実施形態488の方法。

492. 1つの R' は、フェニルである、実施形態488の方法。

493. 1つの R' は、置換フェニルである、実施形態488の方法。

494. 他の R' は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ 脂肪族である、実施形態489～493のいずれか1つの方法。

495. 他の R' は、任意選択で置換されている $C_1 \sim 6$ アルキルである、実施形態489～493のいずれか1つの方法。

496. 他の R' は、任意選択で置換されているフェニルである、実施形態401～405のいずれか1つの方法。

497. 他の R' は、フェニルである、実施形態401～405のいずれか1つの方法。

498. 他の R' は、置換フェニルである、実施形態401～405のいずれか1つの方法。

499. L' は、 $-C(R')_2-$ である、実施形態479～498のいずれか1つの方法。

500. L' は、任意選択で置換されている $-CH_2-$ である、実施形態479～498のいずれか1つの方法。

501. L' は、 $-CH_2-$ である、実施形態479～498のいずれか1つの方法。

502. 接触は、2'-シアノエチルを除去する、実施形態464～501のいずれか1つの方法。

503. 接触は、天然リン酸結合又はその塩形態を形成する、実施形態464～502のいずれか1つの方法。

504. 実施形態470～502のいずれか1つの構造とは異なる構造を有する別のキラル補助剤又は基を除去することを含む、実施形態364～502のいずれか1つの方法。

505.

10

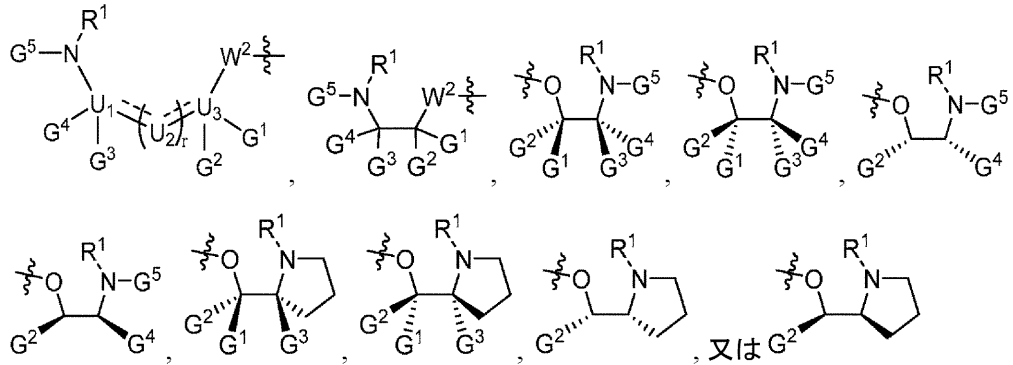
20

30

40

50

【化 1 6 3】



10

を除去することを含み、ここで、 G^2 は $-L'-Si(R)_3$ であり、各 R は、独立に、 $-H$ ではない、実施形態364～502のいずれか1つの方法。

506. G^2 は、 $-CH_2SiCH_3Ph_2$ である、実施形態505の方法。

507. オリゴヌクレオチドをフッ化物と接触させることを含む、実施形態504～506のいずれか1つの方法。

508. オリゴヌクレオチドをTEA-HF及び塩基を含む溶液と接触させることを含む、実施形態504～506のいずれか1つの方法。

509. 固体支持体からオリゴヌクレオチドを切断することを含む、実施形態364～508のいずれか1つの方法。

20

510. オリゴヌクレオチド又はその組成物は、実施形態1～347のいずれか1つのオリゴヌクレオチド又は組成物である、実施形態364～509のいずれか1つの方法。

511. 実施形態364～413のいずれか1つの化合物又は関連するジアステレオマー又はエナンチオマー。

512. 各ヘテロ原子は、独立に、ホウ素、窒素、酸素、ケイ素、硫黄又はリンである、先行する実施形態のいずれか1つの方法。

【実施例】

【0585】

実施例

上記は、本開示の特定の非限定的な実施形態の説明であった。従って、本明細書に説明される本開示の実施形態は、単に本開示の原理の適用の例示に過ぎないことが理解されるべきである。本明細書における例示される実施形態の詳細への言及は、特許請求の範囲を限定することを意図するものではない。

30

【0586】

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し、及びその特性及び／又は活性を評価する特定の方法は、限定はされないが、米国特許第9394333号、米国特許第9744183号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2015/0211006号、米国特許出願公開第2017/0037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/015575号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号（これらの各々の方法及び試薬は、参照により本明細書に援用される）に記載されるものを含め、当技術分野において広く公知である。本出願人は、本明細書において、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及びDMDオリゴヌクレオチド組成物を調製する例示的な方法について説明する。

40

【0587】

本開示の特定の実施形態の機能及び利点は、以下に記載する例からより深く理解され得る。以下の例は、かかる実施形態の特定の利益を例示することを意図している。

【0588】

50

実施例 1. DMDオリゴヌクレオチド組成物の例示的合成

DMDオリゴヌクレオチド及びその組成物の特定の調製技術は当技術分野において広く公知である。一部の実施形態において、本開示のDMDオリゴヌクレオチド及びDMDオリゴヌクレオチド組成物は、米国特許第9394333号、米国特許第9744183号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2015/0211006号、米国特許出願公開第2017/0037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/015575号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192679号、国際公開第2017/210647号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/237194号及び国際公開第2019/055951号の1つ以上に記載される技術、例えば試薬（例えば、固体支持体、カップリング試薬、切断試薬、ホスホロアミダイト等）、キラル補助基、溶媒（例えば、反応、洗浄用等）、サイクル、反応条件（例えば、時間、温度等）等を用いて調製した。

10

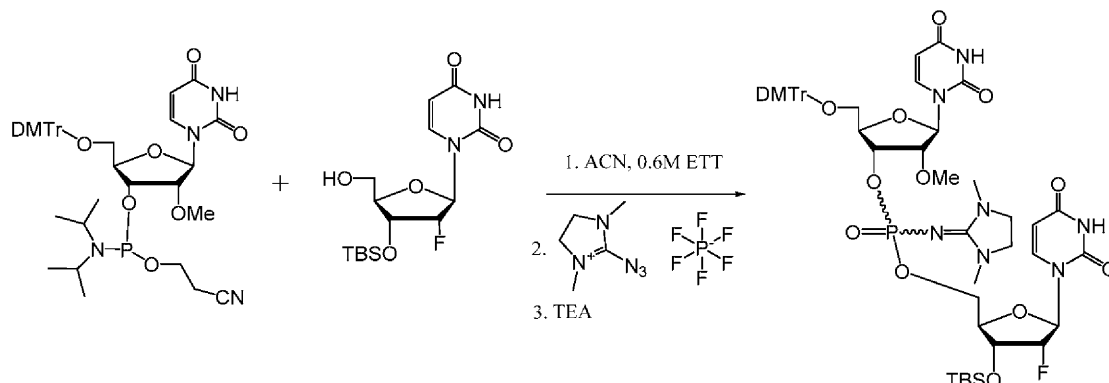
【0589】

実施例 2. 環状グアニジン部分を含むホスホロアミデートインターヌクレオチド結合の例示的合成

本明細書に例示されるとおり、ホスホロアミデートインターヌクレオチド結合は、本開示において、立体的に純粋な垂リン酸インターヌクレオチド結合を含めた垂リン酸インターヌクレオチド結合から容易に調製することができる。

20

【化164】



30

【0590】

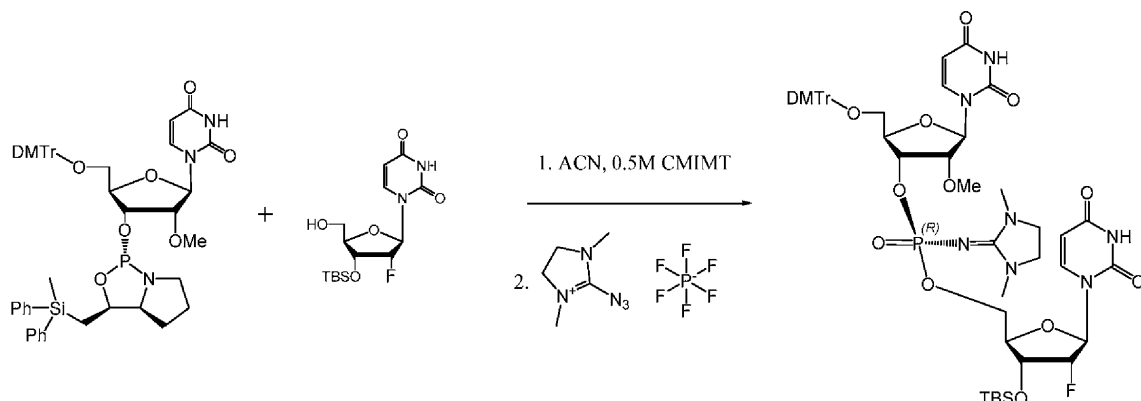
乾燥アセトニトリル（5.2 mL）中のアミダイト（474 mg、0.624 mmol、1.5当量、乾燥アセトニトリルとの真空下における最低でも12時間にわたる共蒸発により予め乾燥させた）及びTBS保護アルコール（150 mg、0.41 mmol、乾燥アセトニトリルとの真空下における最低でも12時間にわたる共蒸発により予め乾燥させた）の攪拌溶液に、アルゴン雰囲気下、室温で5-（エチルチオ）-1H-テトラゾール（ETT、2.08 mL、0.6 M、3当量）を加えた。この反応混合物を5分間攪拌し、次にLCMSによってモニタし、次にアセトニトリル（1 mL）中の2-アジド-1,3-ジメチルイミダゾリニウムヘキサフルオロホスフェート（356 mg、1.24 mmol、3当量）の溶液を加えた。反応が完了したところで（約5分後、LCMSによりモニタした）、次にトリエチルアミン（0.17 mL、1.24 mmol、3当量）を加え、反応をLCMSによりモニタした。反応混合物を減圧下で濃縮し、次にジクロロメタン（50 mL）に再溶解し、水（25 mL）、飽和重炭酸ナトリウム水溶液（25 mL）及びブライン（25 mL）で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去した。DCM（5%トリエチルアミン）及びMeOHを溶離液として使用してシリカゲルカラム（80 g）によって粗生成物を精製した。生成物含有画分を回収し、溶媒を蒸発させた。得られた生成物はTEA・HCl塩を含有し得る。この塩を除去するため、生成物

40

50

をDCM (50 mL) に再溶解させて、飽和重炭酸ナトリウム水溶液 (20 mL) 及びブライン (20 mL) で洗浄し、次に硫酸マグネシウムで乾燥させて、溶媒を蒸発させた。淡黄色の固体が得られた。収率：440 mg (89%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ -1.34, -1.98. $\text{C}_{51}\text{H}_{65}\text{FN}_7\text{O}_{14}\text{PSi}$ [M] $^{+}$ についてのMS計算値1078.17, 実測値：1078.57 [M+H] $^{+}$.

【化165】



10

【0591】

立体的に純粋な (Rp) 二量体の合成

乾燥アセトニトリル (18 mL) 中の L-DPSE キラルアミダイト (1.87 g、2.08 mmol、1.5 当量、乾燥アセトニトリルとの真空下における最低でも12時間にわたる共蒸発により予め乾燥させた) 及び TBS 保護アルコール (500 mg、1.38 mmol、乾燥アセトニトリルとの真空下における最低でも12時間にわたる共蒸発により予め乾燥させた) の攪拌溶液に、アルゴン雰囲気下、室温で 2-(1H-イミダゾール-1-イル) アセトニトリルトリフルオロメタンスルホネート (CMIMT、5.54 mL、0.5 M、2 当量) を加えた。得られた反応混合物を5分間攪拌し、次に LCMS によってモニタし、次にアセトニトリル (2 mL) 中の 2-アジド-1,3-ジメチルイミダゾリニウムヘキサフルオロホスフェート (1.18 g、4.16 mmol、3 当量) の溶液を加えた。反応が完了したところで (約5分後、LCMS によりモニタした)、反応混合物を減圧下で濃縮し、次にジクロロメタン (70 mL) に再溶解し、水 (40 mL)、飽和重炭酸ナトリウム水溶液 (40 mL) 及びブライン (40 mL) で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去した。DCM (5% トリエチルアミン) 及び MeOH を溶離液として使用してシリカゲルカラム (120 g) によって粗生成物を精製した。生成物含有画分を回収し、溶媒を蒸発させた。得られた生成物は TEA・HCl 塩を含有した。この塩を除去するため、生成物を DCM (50 mL) に再溶解させて、飽和重炭酸ナトリウム水溶液 (20 mL) 及びブライン (20 mL) で洗浄し、次に硫酸マグネシウムで乾燥させて、溶媒を蒸発させた。淡黄色の泡沫状固体が得られた。収率：710 mg (47%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ -1.38. $\text{C}_{51}\text{H}_{65}\text{FN}_7\text{O}_{14}\text{PSi}$ [M] $^{+}$ についてのMS計算値1078.17, 実測値：1078.19.

20

30

40

50

グー>ジメチルイミダゾリウム処理→Post-capを含んだ。特定の酸化サイクルと比較すると、P（III）を例えばI₂-ピリジン-水で酸化する酸化ステップがジメチルイミダゾリウム処理に置き換えられた。

【0597】

例示的調製の特定の条件及び／又は結果

合成スケール：127 μmol

【0598】

【表54】

合成条件(立体的に純粋なインターヌクレオチド結合)

合成ステップ	条件
脱トリチル化	トルエン中 3% DCA; 300 cm/hr, 436 UV watch
カップリング	2.5 当量の 0.2M キラルアミダイト、67%の 0.6M CMIMT 再循環時間: 10 分
Pre-Cap B	試薬: 20:30:50::無水酢酸: ルチジン: アセトニトリル 1.5 CV, 3 分 CT
チオール化	試薬: 0.2 M キサンタンヒドリド 0.6 CV, 6 分 CT
キャッピング(1:1 Cap A+Cap B)	0.4 CV, 0.8 分 CT

Cap A = 20%:80% = NMI:ACN (v/v)

Cap B = 20%:30%:50% = Ac₂O:2,6-ルチジン:ACN (v/v/v)

【0599】

【表55】

合成条件(ステレオランダムな n001)

合成ステップ	条件
脱トリチル化	トルエン中 3% DCA; 300 cm/hr, 436 UV watch
カップリング	2.5 当量の 0.2M 標準アミダイト、67%の 0.6M ETT 再循環時間: 8 分
ジメチルイミダゾリウム処理:	2.30 CV, 5 分 CT, 3.5 当量
キャッピング(1:1 Cap A+Cap B)	0.4 CV, 0.8 分 CT

【0600】

合成プロセスパラメータ:

合成機: AKTA Oligopilot 100

固体支持体: CPG 2'フルオロ-U (85 μmol / g)

合成スケール: 127 μmol; 1.5 gm

カラム直径: 20 mm

カラム容積: 6.3 mL

【0601】

立体的に純粋なカップリング試薬:

単量体: MeCN中 0.2 M (2'フルオロ-dA-L-DPSE、2'フルオロ-dG-L-DPSE、2'-OMe-A-L-DPSE); 20%イソブチロニトリル / MeCN中 0.2 M (2'フルオロ-dC-L-DPSE、2'フルオロ-U-L-DPSE)

脱ブロック化: トルエン中 3% DCA

活性化剤：MeCN中0.6M CMIMT

硫化：ピリジン中0.2Mキサンタンヒドリド

Cap A：MeCN中20%NMI

Cap B：無水酢酸、ルチジン、MeCN (20:30:50)

Pre-Cap：Neat Cap B

【0602】

ステレオランダムなカップリング試薬：

単量体：MeCN中0.2M (2'OMeA及び2'OMeG)

脱ブロック化：トルエン中3%DCA

活性化剤：MeCN中0.6M ETT

2-アジド-1,3-ジメチルイミダゾリニウム-ヘキサフルオロホスフェート：MeCN中0.1M

Cap A：MeCN中20%NMI

Cap B：無水酢酸、ルチジン、MeCN

【0603】

脱保護条件：

初めに支持体をDMSO、H₂O、トリエチルアミン (pH 6.8) 中5M TEA.HFで処理することによるワンポット脱保護。インキュベーション：3時間、室温、80 μL / μmol。続いてアンモニア水 (200 μL / μmol) の添加。インキュベーション：24時間、35℃。脱保護した材料を0.45 μmフィルタを用いて滅菌ろ過した。

収率：720. D. / μmol

【0604】

【表56】

DMSO/水、5/1、v/v 中 5×TEA.HF の溶液の配合

試薬	溶媒/試薬	容積(mL)	総容積(mL)
DMSO/水, 5/1, v/v 中の (5×) TEA.HF	DMSO	55.0	100
	水	11.0	
	トリエチルアミン(TEA)	9.0	
	トリエチルアミン 三フッ化水素酸塩 (TEA.3HF)	25.0	

【0605】

例示的な粗UPLCクロマトグラムには、いずれも7113.2の同じ望ましい分子量を有する4つの個別的なピークがあった。

【0606】

【表57】

	RT	面積	%面積	高さ
9	7.843	402732	16.75	212901
10	7.884	941388	39.14	327190
11	7.968	595232	24.75	275741
12	8.025	353090	14.68	150141

【0607】

例示的な最終QC UPLCクロマトグラムは4つの個別的なピークを示し、いずれも7113.2の望ましい分子量を有した(%純度95.32)。粗LC-MSは7113.2の望ましい分子量の単一のピークを示した(データは示さず)。例示的な最終QC LC-MSは、7113.1の望ましい分子量の主ピークを示した。

【0608】

同様のサイクル条件又は各DMDオリゴヌクレオチドの具体的なケミストリーに応じてその変形例を用いて他のDMDオリゴヌクレオチドが調製され得る。

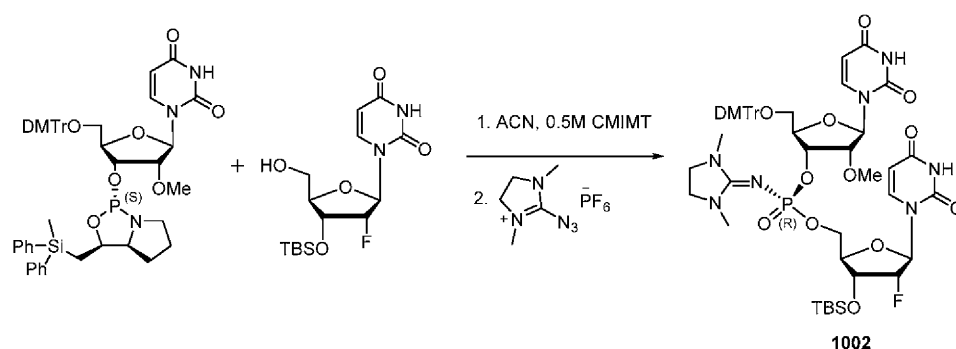
【0609】

実施例4. キラル制御された非負電荷インターヌクレオチド結合

二量体合成

この手順は、立体的に純粋な二量体リン酸骨格を作製し、続いてそれをオリゴヌクレオチド(例えば、DMDオリゴヌクレオチド、一本鎖RNA i 剤又はssRNA等)の選択的な部位に取り込むものである。第2の手法は、自動DMDオリゴヌクレオチド合成機を使用して分子を合成することにより、完全DMDオリゴヌクレオチドの特異的部位に非負電荷インターヌクレオチド結合、例えば中性インターヌクレオチド結合を導入するものである。

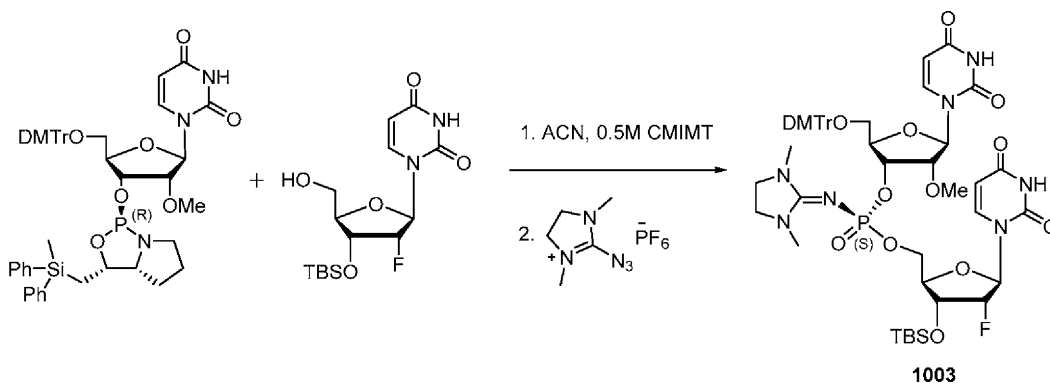
【化168】



【0610】

立体的に純粋な(Rp)二量体についての一般的実験手順(B): 乾燥アセトニトリル(18mL)中のL(又は)D-DPSEキラルアミダイト(1.87g、2.08mmol、1.5当量、乾燥アセトニトリルとの共蒸発によって予め乾燥させて、それを真空下に最低でも12時間置いた)及びTBS保護アルコール(500mg、1.38mmol、乾燥アセトニトリルとの共蒸発によって予め乾燥させて、それを真空下に最低でも12時間置いた)の攪拌溶液に、アルゴン雰囲気下、室温で2-(1H-イミダゾール-1-イル)アセトニトリルトリフルオロメタンスルホネート(CMIMT、5.54mL、0.5M、2当量)を加えた。得られた反応混合物を5分間攪拌し、次にLCMSによってモニタし、次にアセトニトリル(2mL)中の2-アジド-1,3-ジメチルイミダゾリニウムヘキサフルオロホスフェート(1.18g、4.16mmol、3当量)の溶液を加えた。反応が完了したところで(約5分後、LCMSによりモニタした)、次にこの反応混合物を減圧下で濃縮し、次にジクロロメタン(70mL)に再溶解し、水(40mL)、飽和重炭酸ナトリウム水溶液(40mL)及びブライン(40mL)で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去した。DCM(2%トリエチルアミン)及びMeOHを溶離液として使用してシリカゲルカラム(120g)によって粗生成物を精製した。生成物含有画分を蒸発させた。淡黄色の泡沫状固体1002が得られた。収率: 710mg(47%)。31P NMR(162MHz, CDCl3) δ -1.38. C51H65FN7O14PSi[M]+についてのMS(ES)m/z計算値1077.40, 実測値: 1078.19[M+H]+.

【化 1 6 9】



10

【0 6 1 1】

立体的に純粋な (S_p) 二量体 1003：上記に示すとおりの手順 B に従った。D-D P S E キラルアミダイトを使用した。淡黄色の泡沫状固体が得られた。収率：890 mg (59%)。³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ -1.93。C₅₁H₆₅FN₇O₁₄PSi [M]⁺ についての MS (ES) m/z 計算値 1077.40, 実測値：1078.00 [M+H]⁺。

【0 6 1 2】

TBS 基の脱保護についての一般的実験手順 (C)：THF (70 mL) 中の TBS 保護化合物 (9.04 mmol) の攪拌溶液に、室温で TBAF (1.0 M、13.6 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 2~4 時間攪拌した。LCMS により、出発材料が残っていないことが示され、次に濃縮し、続いて ISCO-コンビフラッシュシステム (3 CV の DCM 中 2% TEA で予め平衡化した 330 g gold rediSep 高性能シリカカラム) 及びグラジエント溶離液として DCM/メタノール/2% TEA を使用して精製した。生成物含有カラム画分を合わせてプールし、蒸発させた後、続いて高真空下で乾燥させると、純粋な生成物がもたらされた。

20

【0 6 1 3】

キラルアミダイトについての一般的実験手順 (D)：TBS 保護化合物 (2.5 mmol) を 35℃ で 80 mL の無水トルエン (30 mL × 2) と共蒸発することにより乾燥させて、高真空下で一晩乾燥させた。次に乾燥したそれを乾燥 THF (30 mL) に溶解し、続いてトリエチルアミン (17.3 mmol) を加え、次にこの反応混合物を -65℃ に冷却した [グアニンフレーバーについて：TMS-Cl、2.5 mmol を -65℃ で加えた、非グアニンフレーバーについて TMS-Cl を加えなかった]。[(1R, 3S, 3aS) -1-クロロ-3-((メチルジフェニルシリル)メチル)テトラヒドロ-1H, 3H-ピロロ [1, 2-c] [1, 3, 2] オキサザホスホール (又は) (1S, 3R, 3aR) -1-クロロ-3-((メチルジフェニルシリル)メチル)テトラヒドロ-1H, 3H-ピロロ [1, 2-c] [1, 3, 2] オキサザホスホール (1.8 当量) の THF 溶液を上記の反応混合物にシリンジで 2 分かけて加え、次に徐々に室温に温めた。室温で 20~30 分後、TLC 並びに LCMS により、出発材料が生成物に変換された (反応時間：1 時間) ことが示された。次にこの反応混合物を、エアフリーろ過チューブを使用してアルゴン下でろ過し、THF で洗浄し、26℃ において回転蒸発下で乾燥させると、粗固体材料がもたらされ、これを DCM/CH₃CN/5% TEA を溶媒として使用して ISCO-コンビフラッシュシステム (40 g gold rediSep 高性能シリカカラム (3 CV の CH₃CN/5% TEA、次に 3 CV の DCM/5% TEA で予め平衡化した) により精製した (化合物は 10~40 DCM/CH₃CN/5% TEA で溶出した)。合わせてプールしたカラム画分の蒸発後、高真空下で乾燥させると、白色の固体がもたらされ、分離収率が求まった。

30

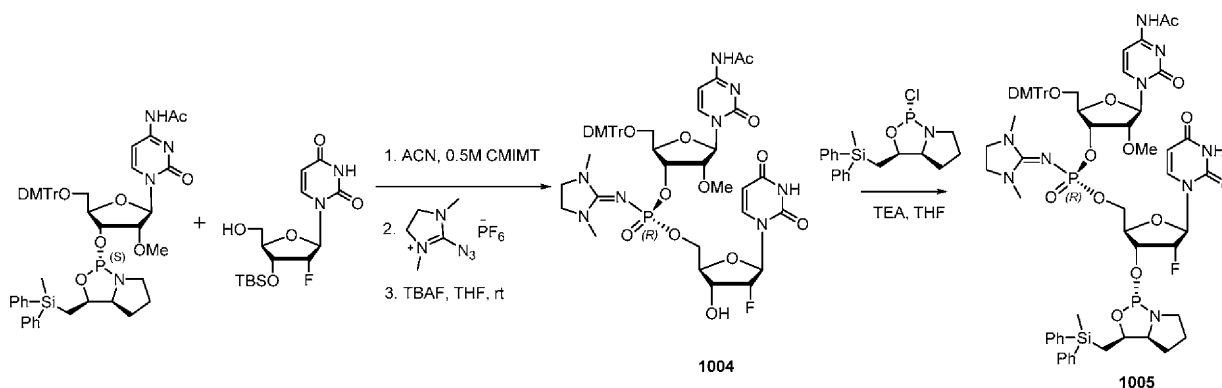
40

【0 6 1 4】

50

³¹P NMR (δ 0.0におけるリン酸の内部標準) : 1001 : -1.34及び-1.98。1002 : -1.93。1003 : -1.38。1001、1002及び1003の¹H NMRは、ジアステレオマーの複数の水素について異なる化学シフトを実証した。LCMSも同様に、2つのジアステレオマーについて異なる保持時間を示した。一条件下では、以下の保持時間が観察された : 1001について1.90及び2.15、一方のジアステレオマーについて1.92及び他方について2.17。

【化170】



10

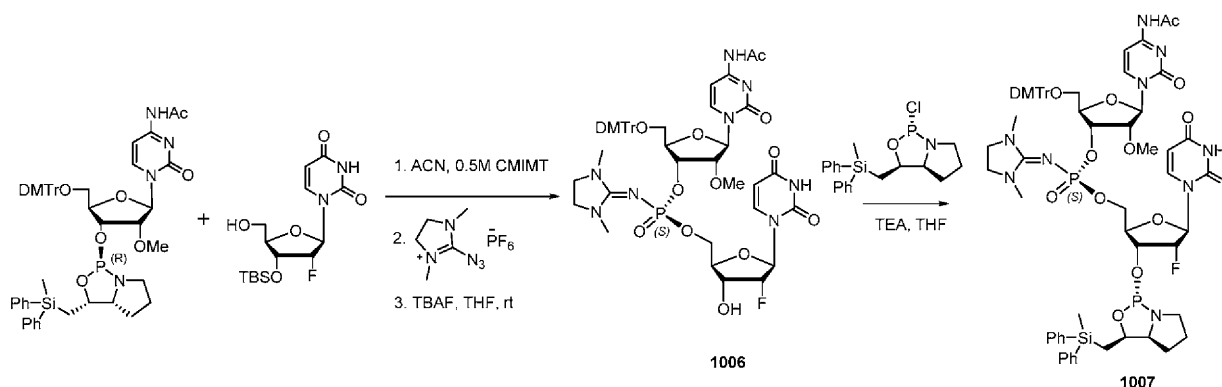
【0615】

化合物1004 : 手順B及びCに従った。オフホワイトの泡沫状固体、収率 : (36%)。 **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ -1.23。C₄₇H₅₄FN₈O₁₄P [M]⁺についてのMS (ES) m/z 計算値1004.34, 実測値 : 1043.21 [M+K]⁺。

【0616】

化合物1005 : 手順Dを用いた。オフホワイトの泡沫状固体、収率 : (81%)。 **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 154.43, -2.52。C₆₆H₇₆FN₉O₁₅P₂Si [M]⁺についてのMS (ES) m/z 計算値1343.46, 実測値 : 1344.85 [M+H]⁺。

【化171】



20

30

40

【0617】

化合物1006 : 手順B及びCに従った。オフホワイトの泡沫状固体、収率 : (47%)。 **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ -2.54。C₄₇H₅₄FN₈O₁₄P [M]⁺についてのMS (ES) m/z 計算値1004.34, 実測値 : 1043.12 [M+K]⁺。

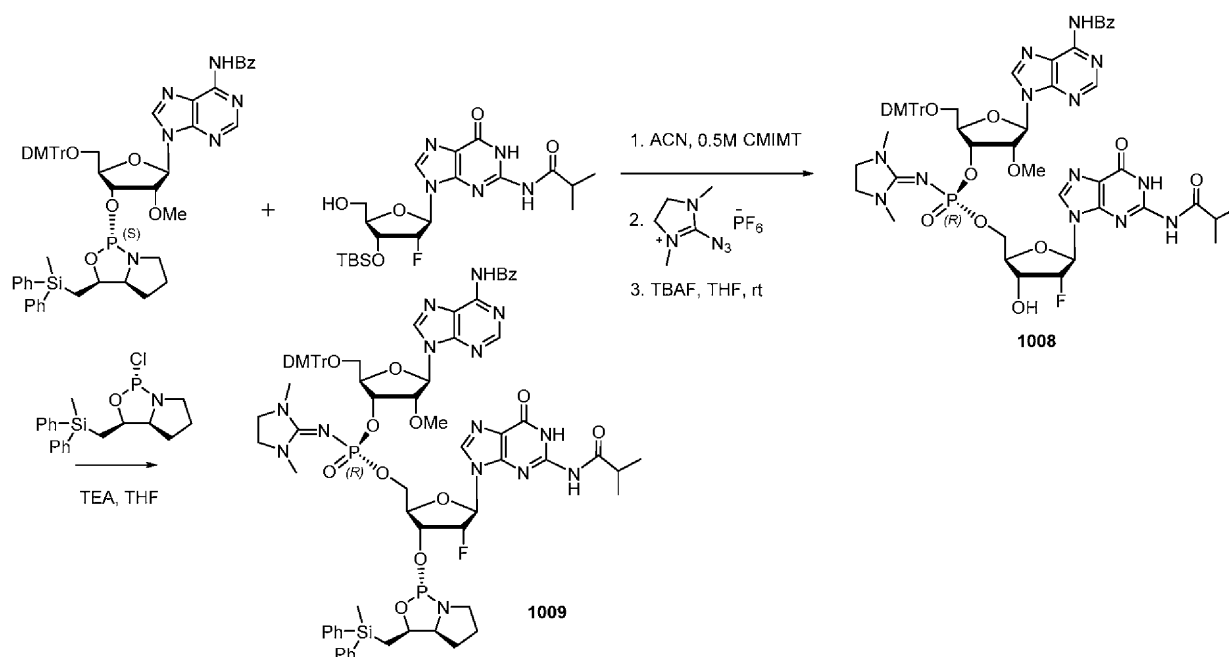
【0618】

化合物1007 : 手順Dを用いた。オフホワイトの泡沫状固体、収率 : (81%)。 **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 153.55, -2.20。C₆₆H₇₆

50

F N 9 O 1 5 P 2 S i [M]⁺ についての MS (ES) m/z 計算値 1343.46, 実測値: 1344.75 [M+H]⁺.

【化 172】



【0619】

化合物 1008: 手順 B 及び C に従った。オフホワイトの泡沫状固体、収率: (36%)。³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ -1.38. C₅₈H₆₃FN₁₃O₁₃P [M]⁺ についての MS (ES) m/z 計算値 1199.43, 実測値: 1200.76 [M+H]⁺.

【0620】

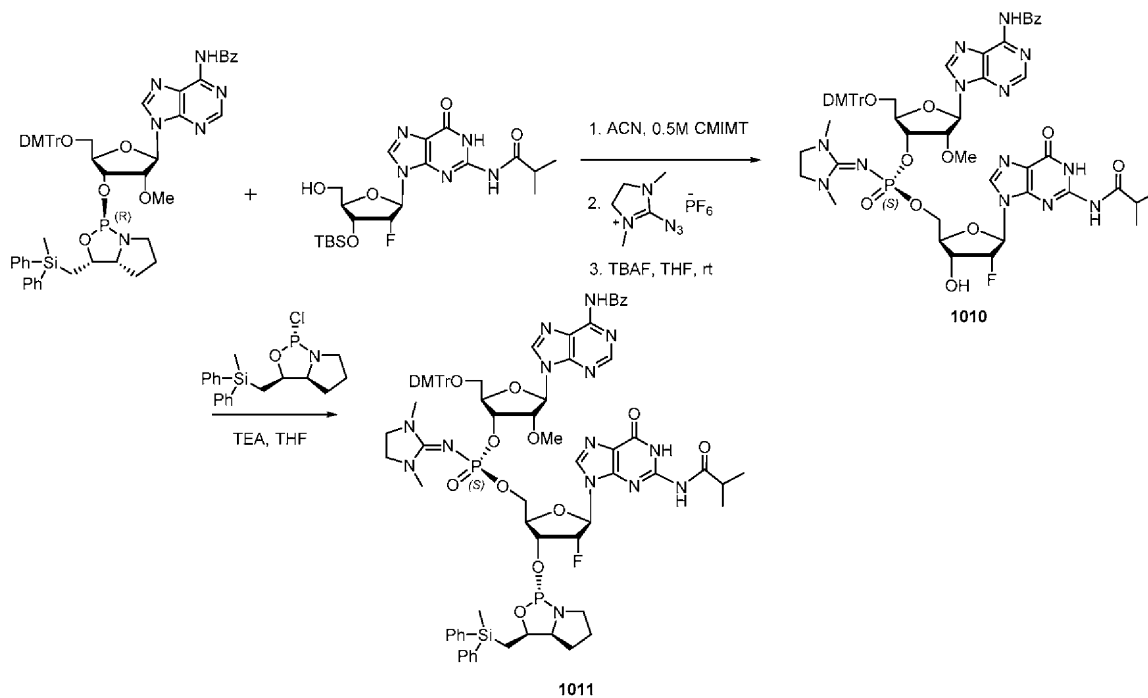
化合物 1009: 手順 D を用いた。オフホワイトの泡沫状固体、収率: (60%)。³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 157.26, -2.86. C₇₇H₈₅FN₁₄O₁₄P₂Si [M]⁺ についての MS (ES) m/z 計算値 1538.55, 実測値: 1539.93 [M+H]⁺.

30

40

50

【化 1 7 3】



10

20

【0 6 2 1】

化合物 1010：手順 B 及び C に従った。オフホワイトの泡沫状固体、収率：(36%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ -2.82. $\text{C}_{58}\text{H}_{63}\text{FN}_{13}\text{O}_{13}\text{P}$ [M] $^+$ についての MS (ES) m/z 計算値 1199.43, 実測値：1200.19 [M+H] $^+$.

【0 6 2 2】

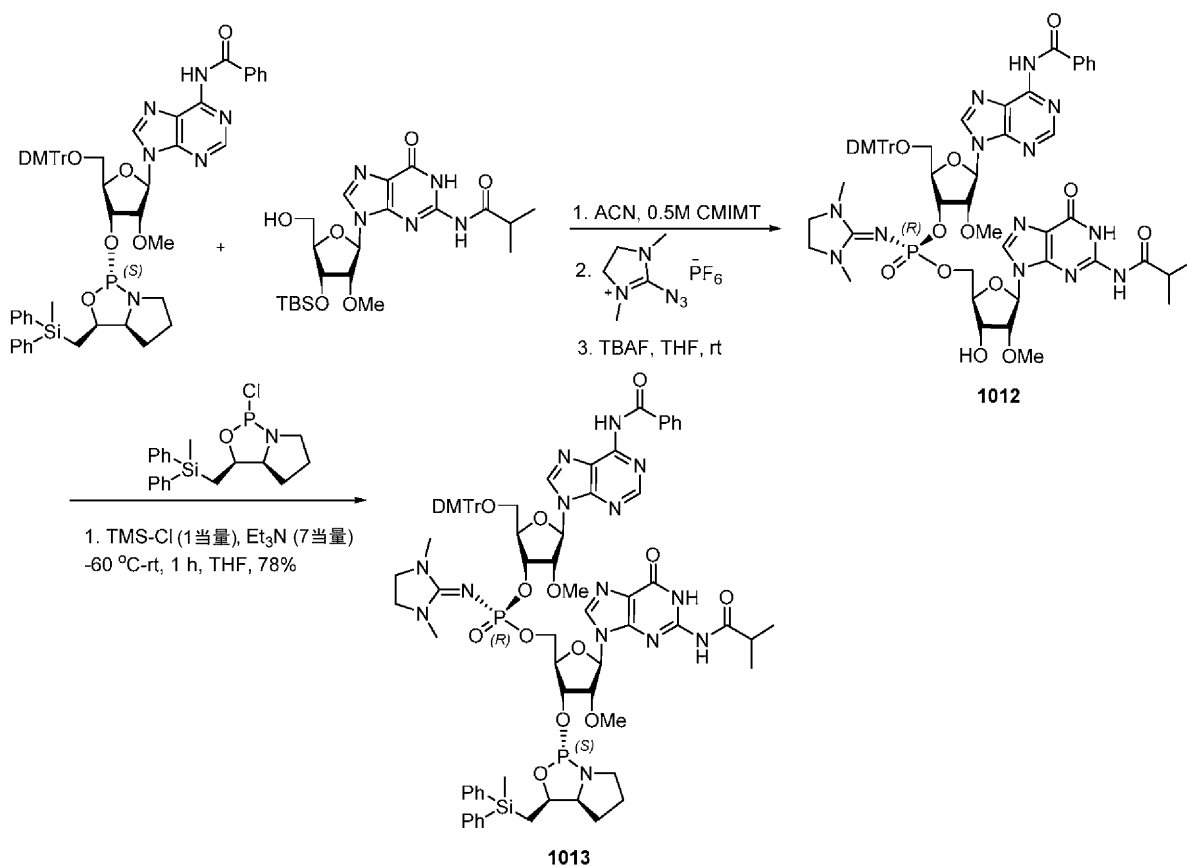
化合物 1011：手順 D を用いた。オフホワイトの泡沫状固体、収率：(63%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 159.56, -2.99. $\text{C}_{77}\text{H}_{85}\text{FN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}_2\text{Si}$ [M] $^+$ についての MS (ES) m/z 計算値 1538.55, 実測値：1539.83 [M+H] $^+$.

30

40

50

【化 1 7 4】



10

20

【0 6 2 3】

化合物 1 0 1 2 : 手順 B 及び C に従った。オフホワイトの泡沫状固体、収率 : (3 6 %)

。

【化 1 7 5】

$[\alpha]_D^{23} = -25.74$ (c 1.06, CHCl_3)

30

^1H NMR (162 MHz, クロロホルム- d) δ -1.83. ^{13}C NMR (400 MHz, クロロホルム- d) δ 12.14 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.25-7.94 (m, 2H), 7.90 (s, 1H), 7.72-7.48 (m, 2H), 7.44 (dd, $J=8.2$, 6.7 Hz, 2H), 7.35-7.26 (m, 2H), 7.24-7.02 (m, 8H), 6.81-6.56 (m, 4H), 6.04 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 5.67 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 4.83 (dt, $J=8.6$, 4.4 Hz, 1H), 4.71-4.54 (m, 2H), 4.49 (dt, $J=14.2$, 4.8 Hz, 2H), 4.35 (ddt, $J=11.0$, 5.1, 3.2 Hz, 1H), 4.28-4.09 (m, 2H), 3.68 (s, 6H), 3.37 (d, $J=3.3$ Hz, 7H), 3.33-3.17 (m, 5H), 2.82 (s, 5H), 2.74-2.60 (m, 1H), 1.92 (s, 2H), 1.72-1.50 (m, 1H), 1.08 (d, $J=6.9$ Hz, 3H), 0.94 (d, $J=6.9$ Hz, 3H). $\text{C}_{59}\text{H}_{66}\text{N}_{13}\text{O}_{14}\text{P}$ についての MS (ES) m/z 計算値 1211.45 $[\text{M}]^+$, 実測値: 1212.42 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

40

【0 6 2 4】

化合物 1 0 1 3 : 手順 D を用いた。オフホワイトの泡沫状固体、収率 : (7 8 %) 。

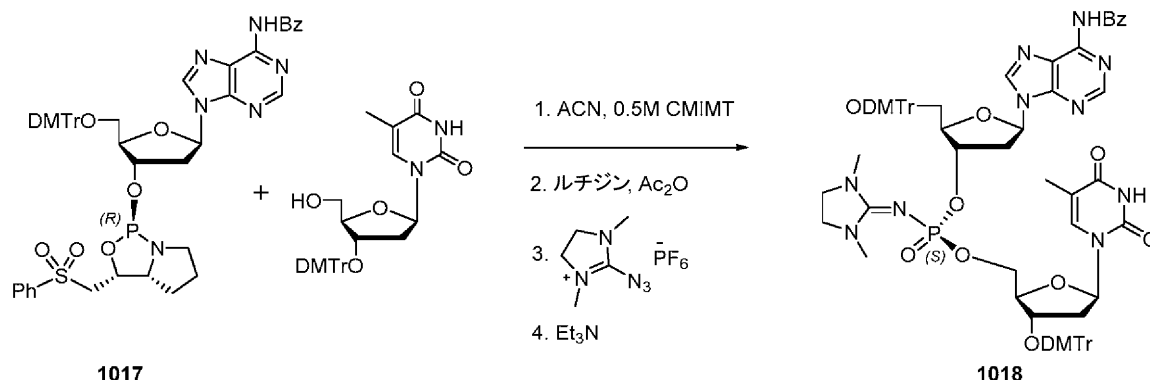
50

C₇₈H₈₈N₁₄O₁₅P₂Si についてのMS (ES) m/z 計算値 1550.57 [M]⁺, 実測値: 1551.77 [M+H]⁺.

【0627】

化合物1016: 手順Dを用いた。オフホワイトの泡沫状固体、収率: (64%)。31P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 156.64, -2.67. C₇₈H₈₈N₁₄O₁₅P₂Si についてのMS (ES) m/z 計算値 1550.57 [M]⁺, 実測値: 1551.77 [M+H]⁺.

【化180】



10

20

【0628】

スルホニルアミダイトを使用した立体的に純粋な二量体についての一般的実験手順 (E): 乾燥アセトニトリル (2 mL) 中の立体的に純粋なスルホニルアミダイト1017 (259 mg, 0.275 mmol, 1.5 当量) 及びTBS保護アルコール (100 mg, 0.18 mmol) の攪拌溶液に、アルゴン雰囲気下、室温で2-(1H-イミダゾール-1-イル)アセトニトリルトリフルオロメタンスルホネート (CMIMT, 0.73 mL, 0.36 mmol, 0.5 M, 2 当量) を加えた。得られた反応混合物を5分間攪拌し、LCMSによりモニタし、次に無水酢酸 (ACN中2 M, 0.18 mL, 0.36 mmol, 2 当量) とルチジン (ACN中2 M, 0.18 mL, 0.36 mmol, 2 当量) との混合物を加え、次に約5分間攪拌し、次にアセトニトリル (1 mL) 中の2-アジド-1,3-ジメチルイミダゾリニウムヘキサフルオロホスフェート (104.7 mg, 0.367 mmol, 2 当量) の溶液を加えた。反応が完了したところで (約5分後、LCMSによりモニタした)、次にトリエチルアミン (0.13 mL, 0.91 mmol, 5 当量) を加え、LCMSによりモニタした。反応が完了したところで、これを減圧下で濃縮し、次にジクロロメタン (50 mL) に再溶解し、水 (25 mL)、飽和重炭酸ナトリウム水溶液 (25 mL) 及びブライン (25 mL) で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去した。DCM (2% トリエチルアミン) 及びMeOHを溶離液として使用してシリカゲルカラム (80 g) により粗生成物を精製した。生成物含有画分を回収し、蒸発させた。オフホワイトの固体1018が得られた。収率: 204 mg (82%)。31P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ -1.87. C₇₄H₇₅FN₁₀O₁₄P [M]⁺ についてのMS (ES) m/z 計算値 1359.44, 実測値: 1360.39 [M+H]⁺.

30

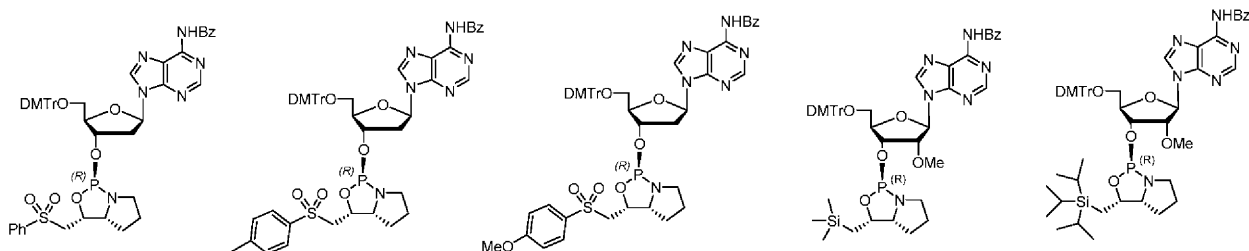
40

【0629】

合成に利用し得る追加のホスホロアミダイトとしては、以下が挙げられる。

50

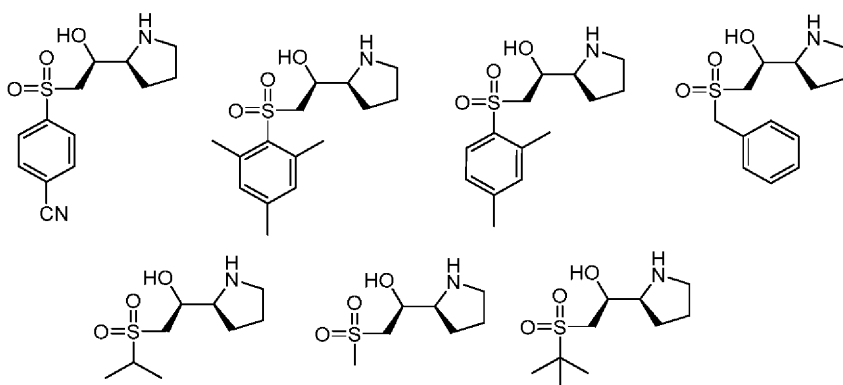
【化 1 8 1】



追加の有用なキラル補助基としては、以下が挙げられる。

10

【化 1 8 2】



20

他のホスホロアミダイト及びキラル補助基、例えば米国特許第 9 6 9 5 2 1 1 号、米国特許第 9 6 0 5 0 1 9 号、米国特許第 9 5 9 8 4 5 8 号、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 8 6 1 2 号、米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 2 1 1 0 0 6 号、米国特許出願公開第 2 0 1 7 0 0 3 7 3 9 9 号、国際公開第 2 0 1 7 / 0 1 5 5 5 5 号、国際公開第 2 0 1 7 / 0 6 2 8 6 2 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 6 0 7 4 1 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 6 4 号、国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 2 6 7 9 号、国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 0 6 4 7 号、国際公開第 2 0 1 8 / 0 9 8 2 6 4 号、国際公開第 2 0 1 8 / 2 2 3 0 5 6 号及び／又は国際公開第 2 0 1 8 / 2 3 7 1 9 4 号（これらの各々のキラル補助基及びホスホロアミダイトは、参照により援用される）などに記載されるもの。

30

【0 6 3 0】

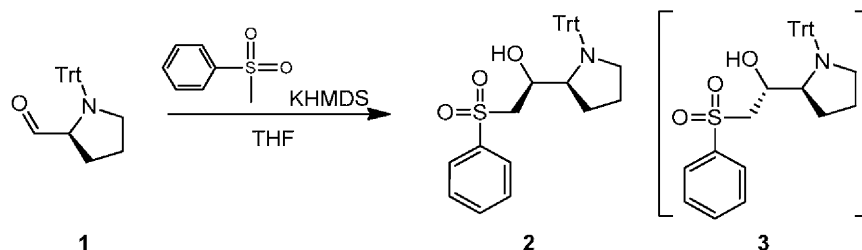
実施例 5．キラル制御されたオリゴヌクレオチド調製についての例示的技術－例示的な有用なキラル補助基

とりわけ、本開示は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合の調製に有用な技術（例えば、キラル補助基、ホスホロアミダイト、サイクル、条件、試薬等）を提供する。一部の実施形態において、提供される技術は、 $P-N=$ （式中、 P は結合である）を含む特定のインターヌクレオチド結合、例えば非負電荷インターヌクレオチド結合、中性インターヌクレオチド結合等の調製に特に有用である。一部の実施形態において、結合リンは三価である。特定の例示的技術（キラル補助基及びその調製、ホスホロアミダイト及びその調製、サイクル、条件、試薬等）は、本明細書の実施例に記載される。とりわけ、かかるキラル補助基は、参照キラル補助基（例えば、式 O、P、Q、R のもの又は DPSE）と比較したとき、より穏やかな反応条件、より高い官能基適合性、代替的脱保護及び／又は切断条件、より高い粗収率及び／又は精製後収率、より高い粗純度、より高い生成物純度及び／又はより高い（又は実質的に同じ若しくは同等の）立体選択性をもたらす。

40

50

【化 1 8 3】



【0 6 3 1】

2つの並列バッチ：THF（600 mL）中のメチルスルホニルベンゼン（102.93 g、658.96 mmol、1.5当量）の溶液に -70°C でKHMDS（1 M、658.96 mL、1.5当量）を滴下して加え、30分かけて -30°C にゆっくりと温めた。次にこの混合物を -70°C に冷却した。THF（400 mL）中の化合物1（150 g、439.31 mmol、1当量）の溶液を -70°C で滴下して加えた。この混合物を -70°C で3時間攪拌した。TLC（石油エーテル：酢酸エチル＝3：1、 $R_f=0.1$ ）により、化合物1が完全に消費され、極性がより大きい1つの新規主スポットが検出されたことが指示された。2つのバッチを合わせた。この反応混合物を飽和 NH_4Cl （水溶液1000 mL）に加えることによりクエンチし、次にEtOAc（1000 mL×3）で抽出した。合わせた有機層を Na_2SO_4 で乾燥させて、ろ過し、減圧下で濃縮して、1000 mL溶液を生じさせた。次にMeOH（600 mL）を加え、減圧下で濃縮して、1000 mL溶液を生じさせ、次に残渣をろ過し、MeOH（150 mL）で洗浄した；残渣をTHF（1000 mL）及びMeOH（600 mL）で溶解し、次に減圧下で濃縮して、1000 mL溶液を生じさせた。次にろ過して残渣を生じさせ、MeOH（150 mL）で洗浄した。及びもう1回繰り返した。化合物2（248 g、粗製）が白色の固体として得られた。及び合わせた母液を減圧下で濃縮すると、化合物3（200 g、粗製）が黄色の油として生じた。

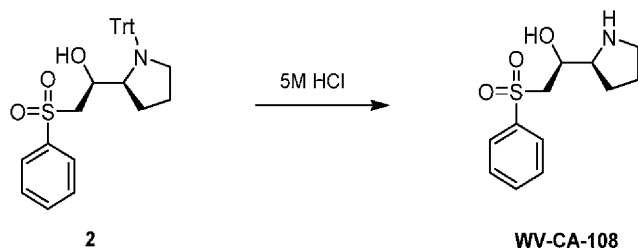
【0 6 3 2】

化合物2： ^1H NMR（400 MHz，クロロホルム- d ） $\delta=7.80$ （d， $J=7.5$ Hz，2 H），7.74–7.66（m，1 H），7.61–7.53（m，2 H），7.47（d， $J=7.5$ Hz，6 H），7.24–7.12（m，9 H），4.50–4.33（m，1 H），3.33（s，1 H），3.26（ddd， $J=2.9$ ，5.2，8.2 Hz，1 H），3.23–3.10（m，2 H），3.05–2.91（m，2 H），1.59–1.48（m，1 H），1.38–1.23（m，1 H），1.19–1.01（m，1 H），0.31–0.12（m，1 H）。

【0 6 3 3】

化合物WV-CA-108の調製

【化 1 8 4】



THF（1 L）中の化合物2（248 g、498.35 mmol、1当量）の溶液にHCl（5 M、996.69 mL、10当量）を加えた。この混合物を 15°C で1時間攪拌した。TLC（石油エーテル：酢酸エチル＝3：1、 $R_f=0.03$ ）により、化合物2が完全に消費され、極性がより大きい1つの新規主スポットが検出されたことが指示された

。得られた混合物をMTBE (500 mL × 3) で洗浄した。合わせた有機層を水 (100 mL) で逆抽出した。合わせた水層を5M NaOH水溶液でpH12に調整し、DCM (500 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させて、ろ過して濃縮すると、白色の固体がもたらされた。WV-CA-108 (122.6 g、粗製) が白色の固体として得られた。

【0634】

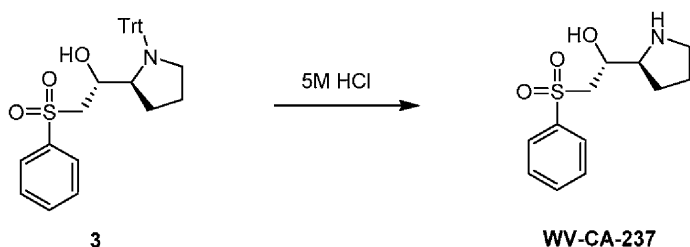
¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ = 7.95 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.66 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.57 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 4.03 (ddd, J = 2.6, 5.3, 8.3 Hz, 1H), 3.37-3.23 (m, 2H), 3.20-3.14 (m, 1H), 2.91-2.75 (m, 3H), 2.69 (br s, 1H), 1.79-1.54 (m, 5H); ¹³C NMR (101 MHz, クロロホルム-d) δ = 139.58, 133.83, 129.28, 127.98, 67.90, 61.71, 59.99, 46.88, 25.98, 25.84; LCMS [M+H]⁺: 256.1. LCMS純度: 100%. SFC 100%純度。

10

【0635】

化合物WV-CA-237の調製

【化185】



20

THF (1.5 L) 中の化合物3 (400.00 g、803.78 mmol) の溶液にHCl (5M、1.61 L) を加えた。この混合物を15℃で2時間攪拌した。TLCにより、化合物3が完全に消費され、極性がより大きい1つの新規主スポットが検出されたことが指示された。得られた混合物をMTBE (500 mL × 3) で洗浄した。合わせた水層を5M NaOH水溶液でpH12に調整し、DCM (500 mL × 1) 及びEtOAc (1000 mL × 2) で抽出した。合わせた有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させて、ろ過し、濃縮すると、褐色の固体としてもたらされた。WV-CA-237 (100 g、粗製) が褐色の固体として得られた。

30

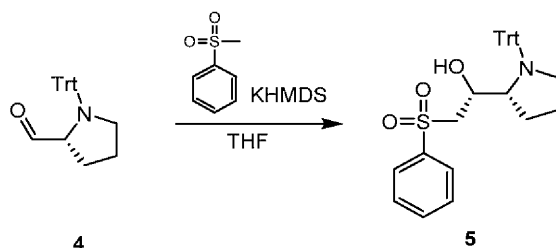
【0636】

残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル = 3/1 ~ 酢酸エチル:メタノール = 1:2) によって精製すると、24 gの粗製物が生じた。次に4 gの残渣を分取HPLC (カラム: Phenomenex luna C18 250 × 50 mm × 10 μm; 移動相: [水 (0.05% HCl) - ACN]; B%: 2% → 20%、15分) によって精製すると、望ましい化合物が (2.68 g、収率65%,) 白色の固体として生じた。WV-CA-237 (2.68 g) が白色の固体として得られた。WV-CA-237: ¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ = 7.98-7.88 (m, 2H), 7.68-7.61 (m, 1H), 7.60-7.51 (m, 2H), 4.04 (dt, J = 2.4, 5.6 Hz, 1H), 3.85 (ddd, J = 3.1, 5.6, 8.4 Hz, 1H), 3.37-3.09 (m, 3H), 2.95-2.77 (m, 3H), 1.89-1.53 (m, 4H), 1.53-1.39 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, クロロホルム-d) δ = 139.89, 133.81, 133.70, 129.26, 129.16, 128.05, 127.96, 68.20, 61.77, 61.61, 61.01, 60.05, 46.67, 28.02, 26.24, 25.93; LCMS [M+H]⁺: 256.1. LCMS純度: 80.0%. SFC dr = 77.3:22.7.

40

50

【化 1 8 6】



10

【0 6 3 7】

THF (1400 mL) 中の化合物 4 (140 g、410.02 mmol) の溶液にメチルスルホニルベンゼン (96.07 g、615.03 mmol) を加え、次に 0.5 時間で KHMDS (1 M、615.03 mL) を加えた。この混合物を $-70 \sim -40^{\circ}\text{C}$ で 3 時間攪拌した。TLC により、化合物 4 が消費され、1 つの新規スポットが形成されたことが指示された。 0°C で飽和 NH_4Cl 水溶液 3000 mL を加えることにより反応混合物をクエンチし、次に EtOAc (3000 mL) で希釈し、EtOAc (2000 mL $\times$ 3) で抽出した。 Na_2SO_4 で乾燥させて、ろ過し、減圧下で濃縮して、残渣を生じさせた。この粗製物に THF (1000 mL) 及び MeOH (1500 mL) を加え、約 1000 mL 残渣が残るまで 45°C で減圧濃縮し、固体をろ過した。3 回繰り返した。化合物 5 (590 g、72.29% 収率) が黄色の固体として得られた。

20

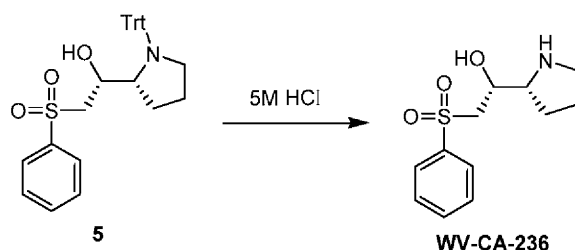
^1H NMR (400 MHz, クロロホルム- d) δ = 7.81 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.75–7.65 (m, 1H), 7.62–7.53 (m, 2H), 7.48 (br d, J = 7.2 Hz, 6H), 7.25–7.11 (m, 9H), 4.50–4.37 (m, 1H), 3.31–3.11 (m, 3H), 3.04–2.87 (m, 2H), 1.60–1.48 (m, 1H), 1.39–1.24 (m, 1H), 1.11 (dtd, J = 4.5, 8.8, 12.8 Hz, 1H), 0.32–0.12 (m, 1H)。

【0 6 3 8】

化合物 WV-CA-236 の調製

【化 1 8 7】

30



THF (1100 mL) 中の化合物 5 (283 g、568.68 mmol) の溶液に HCl (5 M、1.14 L) を加えた。この混合物を 25°C で 2 時間攪拌した。TLC により、化合物 5 が消費され、2 つの新規スポットが形成されたことが指示された。この反応混合物を MTBE (1000 mL $\times$ 3) で洗浄し、次に 0°C で $\text{pH} = 12$ になるまで NaOH (5 M) を加えることにより水相を塩基性化し、次に DCM (1000 mL $\times$ 3) で抽出して残渣を生じさせ、 Na_2SO_4 で乾燥させて、ろ過し、減圧下で濃縮して、残渣を生じさせた。化合物 WV-CA-236 (280 g、1.10 mol、96.42% 収率) が黄色の固体として得られた。

40

【0 6 3 9】

この粗生成物を 0°C で HCl / EtOAc (1400 mL、4 M) と加え合わせ、2 時間後、白色の固体をろ過し、この固体を MeOH (1000 mL $\times$ 3) で洗浄した。LCMS により、この固体が別のピーク ($\text{MS} = 297$) を含むことが示された。次に白色の固

50

体をH₂O (600 mL) と加え合わせ、DCM (300 mL × 3) で洗浄した。pH = 1.2 となるまで水相をNaOH (5 M) と加え合わせた。次にDCM (800 mL) で希釈し、DCM (800 mL × 4) で抽出した。合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥させて、ろ過し、減圧下で濃縮して、生成物を生じさせた。化合物WV-CA-236 (280 g) が黄色の固体として得られた。¹H NMR (400 MHz, クロロホルム-d) δ = 8.01–7.89 (m, 2H), 7.69–7.62 (m, 1H), 7.61–7.51 (m, 2H), 4.05 (ddd, J = 2.8, 5.2, 8.4 Hz, 1H), 3.38–3.22 (m, 2H), 3.21–3.08 (m, 1H), 2.95–2.72 (m, 4H), 1.85–1.51 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, クロロホルム-d) δ = 139.75, 133.76, 129.25, 127.94, 67.57, 61.90, 60.16, 46.86, 25.86. LCMS [M+H]⁺: 256. LCMS 純度: 95.94. SFC 純度: 99.86%.

10

【0640】

実施例6. キラル制御されたオリゴヌクレオチド調製の例示的技術—例示的な有用なホスホロアミダイト

とりわけ、本開示は、オリゴヌクレオチド合成に有用なホスホロアミダイトを提供する。一部の実施形態において、提供されるホスホロアミダイトは、キラル制御されたインターヌクレオチド結合の調製に特に有用である。一部の実施形態において、提供されるホスホロアミダイトは、P–N=を含むキラル制御されたインターヌクレオチド結合、例えば非負電荷インターヌクレオチド結合又は中性インターヌクレオチド結合等の調製に特に有用である。一部の実施形態において、結合リンは三価である。一部の実施形態において、結合リンは五価である。

20

【0641】

クロロ誘導体の一般的手順I: 一部の実施形態において、例示的手順では、キラル補助基 (174.54 mmol) をロータリーエバポレーターにおいて35℃で無水トルエン (80 mL × 3) との共沸蒸発により乾燥させて、高真空下で一晩乾燥させた。無水THF (200 mL) に溶解したこの乾燥キラル補助 (174.54 mmol) 及び4-メチルモルホリン (366.54 mmol) の溶液を、アルゴン下でカニューレを用いて三つ口丸底フラスコに入れられた無水THF (150 mL) 中のトリクロロホスフィン (37.07 g, 16.0 mL, 183.27 mmol) の氷冷 (イソプロピルアルコールドライアイス浴) 溶液に加え (開始温度: -10.0℃、最大: 温度0℃、28分添加)、この反応混合物を15℃で1時間加温した。その後、エアフリーろ過チューブ (Chemglass: ろ過チューブ、24/40内側ジョイント、80mm外径中粒フリット、Airfree、シュレンク型) を使用して沈降した白色の固体をアルゴン下で真空ろ過した。溶媒をアルゴン下、低温 (25℃) でロータリーエバポレーターによって除去し、得られた粗製半固体を真空下で一晩 (約15時間) 乾燥させて、これを次のステップに直接使用した。

30

【0642】

クロロ誘導体の一般的手順I: 一部の実施形態において、例示的手順では、キラル補助剤 (174.54 mmol) をロータリーエバポレーターにおいて35℃で無水トルエン (80 mL × 3) との共沸蒸発により乾燥させて、高真空下で一晩乾燥させた。無水THF (200 mL) に溶解したこの乾燥したキラル補助基 (174.54 mmol) 及び4-メチルモルホリン (366.54 mmol) の溶液をアルゴン下でカニューレを用いて三つ口丸底フラスコに入った無水THF (150 mL) 中のトリクロロホスフィン (37.07 g, 16.0 mL, 183.27 mmol) の氷冷 (イソプロピルアルコールドライアイス浴) 溶液に加え (開始温度: -10.0℃、最高温度: 0℃、28分添加)、この反応混合物を15℃で1時間温めた。その後、エアフリーろ過チューブ (Chemglass: ろ過チューブ、24/40内側ジョイント、80mm外径中粒フリット、Airfree、シュレンク型) を使用して沈降した白色の固体をアルゴン下で真空ろ過した。溶媒をアルゴン下低温 (25℃) でロータリーエバポレーターによって除去し、得られた粗製半固体を真空下で一晩 (約15時間) 乾燥させて、これを次のステップに直接使用した。

40

50

【0643】

カップリングの一般的手順ⅠⅠⅠ：一部の実施形態において、例示的手順では、ヌクレオシド（9.11mmol）を35℃で60mLの無水トルエン（60mL×2）との共蒸発により乾燥させて、高真空下で一晩乾燥させた。乾燥したヌクレオシドを乾燥THF（78mL）に溶解し、続いてトリエチルアミン（63.80mmol）を加え、次にアルゴン下で−5℃に冷却した（2'-F-dG/2'-OMe-dGの場合、0.95当量のTMS-Clを使用）。粗製物（一般的手順Ⅰ（又は）ⅠⅠにより作製されたもの、14.57mmol）のTHF溶液をカニューレで3分かけて加え、次に徐温して室温にした。室温で1時間後、TLCにより、SMから生成物への変換が指示され（総反応時間1時間）、次にこの反応混合物を0℃でH₂O（4.55mmol）によりクエンチし、無水MgSO₄（9.11mmol）を加え、10分間攪拌した。次に反応混合物を、エアフリーろ過チューブを使用してアルゴン下でろ過し、THFで洗浄し、26℃において回転蒸発下で乾燥させると、白色の粗固体生成物が得られ、これを高真空下で一晩乾燥させた。溶媒として酢酸エチル／ヘキサン1%TEA含有（100%EtOAc／ヘキサン／1%Et₃Nで溶出した化合物）（2'-F-dGの場合、アセトニトリル／酢酸エチル1%TEA含有を使用）を使用したISCO-コンビフラッシュシステム（アセトニトリルで予め平衡化したredSep高性能シリカカラム）により、粗生成物を精製した。合わせてプールしたカラム画分の蒸発後、残渣を高真空下で乾燥させると、生成物が白色の固体としてもたらされた。

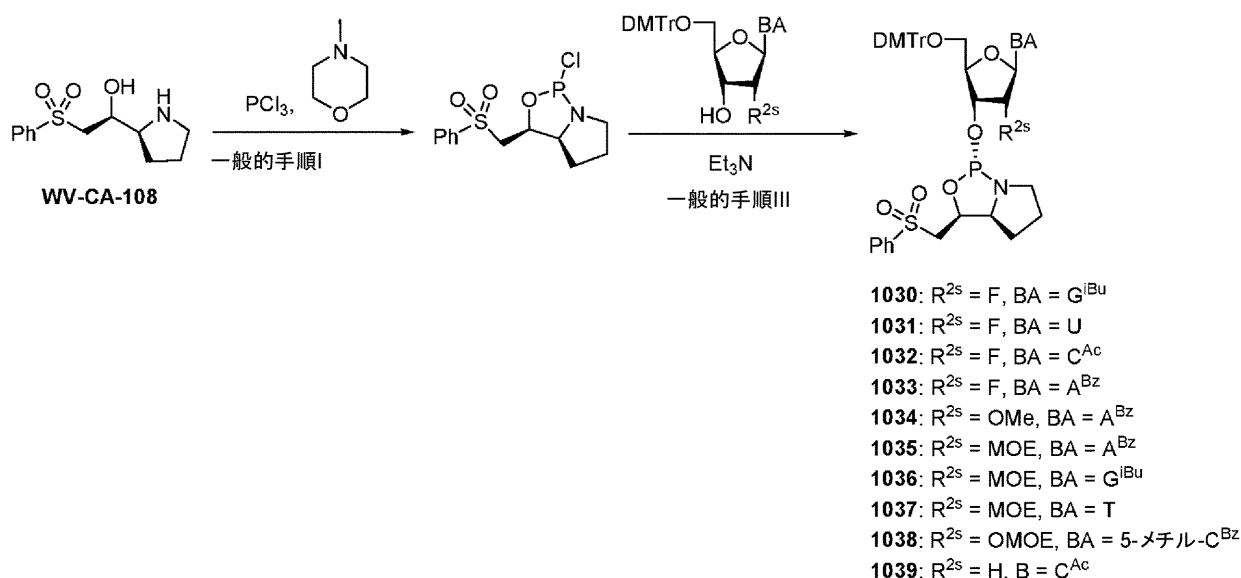
10

【0644】

20

アミダイト（1030～1039）の調製

【化188】



30

1030の調製：一般的手順Ⅰの後、続いて一般的手順ⅠⅠⅠを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：（73%）。³¹P NMR（162MHz，CDCl₃）δ 153.32。C₄₇H₅₀FN₆O₁₀PSについての（ES）m/z計算値：940.98[M]⁺，実測値：941.78[M+H]⁺。

40

【0645】

1031の調製：一般的手順Ⅰの後、続いて一般的手順ⅠⅠⅠを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：（78%）。³¹P NMR（162MHz，CDCl₃）δ 153.62。C₄₂H₄₃FN₃O₁₀PSについての（ES）m/z計算値：831.85[M]⁺，実測値：870.58[M+K]⁺。

【0646】

1032の調製：一般的手順Ⅰの後、続いて一般的手順ⅠⅠⅠを用いた。オフホワイトの

50

泡沫状固体。収率：(68%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 153.95. $\text{C}_{44}\text{H}_{46}\text{FN}_4\text{O}_{10}\text{PS}$ についての (ES) m/z 計算値：872.26 [M]⁺, 実測値：873.62 [M+H]⁺.

【0647】

1033の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。白色の泡沫状固体。収率：(87%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 151.70. $\text{C}_{50}\text{H}_{48}\text{FN}_6\text{O}_9\text{PS}$ についての (ES) m/z 計算値：958.29 [M]⁺, 実測値：959.79, 960.83 [M+H]⁺.

【0648】

1034の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(65%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 154.80. $\text{C}_{51}\text{H}_{51}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{PS}$ についての (ES) m/z 計算値：971.31 [M]⁺, 実測値：971.81 [M+H]⁺.

10

【0649】

1035の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(76%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 156.50. $\text{C}_{53}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{PS}$ についての (ES) m/z 計算値：1014.33 [M]⁺, 実測値：1015.81 [M+H]⁺.

【0650】

1036の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(78%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 156.40. $\text{C}_{50}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{PS}$ についての (ES) m/z 計算値：996.34 [M]⁺, 実測値：997.90 [M+H]⁺.

20

【0651】

1037の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(73%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 154.87. $\text{C}_{46}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{PS}$ についての (ES) m/z 計算値：901.30 [M]⁺, 実測値：940.83 [M+K]⁺.

【0652】

1038の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(75%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 154.94. $\text{C}_{53}\text{H}_{57}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{PS}$ についての (ES) m/z 計算値：1004.34 [M]⁺, 実測値：1005.86 [M+H]⁺.

30

【0653】

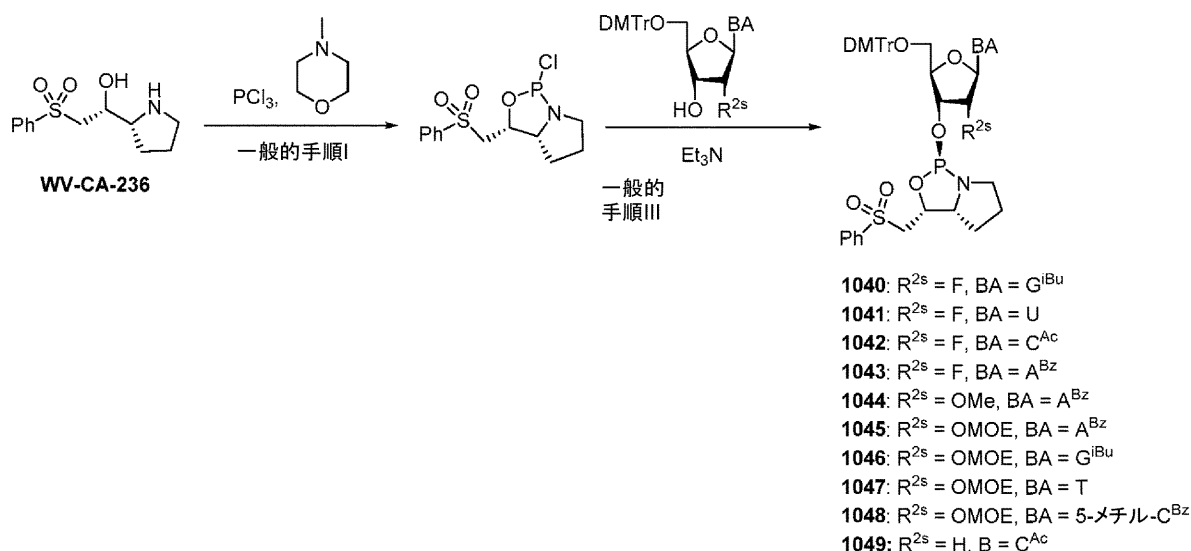
1039の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(80%)。 ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 153.52. $\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{PS}$ についての (ES) m/z 計算値：854.28 [M]⁺, 実測値：855.41 [M+H]⁺.

【0654】

アミダイト (1040~1049) の調製

40

【化 1 8 9】



10

1040の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(78%)。 ^1P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 157.80. $C_{47}H_{50}FN_6O_{10}PS$ についての(ES) m/z 計算値：940.98 [M]⁺, 実測値：941.68 [M+H]⁺.

20

【0655】

1041の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(78%)。 ^1P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 157.79. $C_{42}H_{43}FN_3O_{10}PS$ についての(ES) m/z 計算値：831.85 [M]⁺, 実測値：870.68 [M+K]⁺.

【0656】

1042の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(78%)。 ^1P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 158.07. $C_{44}H_{46}FN_4O_{10}PS$ についての(ES) m/z 計算値：872.26 [M]⁺, 実測値：873.62 [M+H]⁺.

30

【0657】

1043の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。白色の泡沫状固体。収率：(86%)。 ^1P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 156.48. $C_{50}H_{48}FN_6O_9PS$ についての(ES) m/z 計算値：958.29 [M]⁺, 実測値：959.79, 960.83 [M+H]⁺.

【0658】

1044の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(65%)。 ^1P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 154.80. $C_{51}H_{51}N_6O_{10}PS$ についての(ES) m/z 計算値：971.31 [M]⁺, 実測値：971.81 [M+H]⁺.

40

【0659】

1045の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(77%)。 ^1P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 154.74. $C_{53}H_{55}N_6O_{11}PS$ についての(ES) m/z 計算値：1014.33 [M]⁺, 実測値：1015.81 [M+H]⁺.

【0660】

1046の調製：一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率：(76%)。 ^1P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 15

50

5.05. C₅₀H₅₇N₆O₁₂PS についての (ES) m/z 計算値: 996.34 [M]⁺, 実測値: 997.90 [M+H]⁺.

【0661】

1047の調製: 一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率: (75%)。³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 15

5.44. C₄₆H₅₂N₃O₁₂PS についての (ES) m/z 計算値: 901.30 [M]⁺, 実測値: 940.83 [M+K]⁺.

【0662】

1048の調製: 一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率: (73%)。³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 15

5.96. C₅₃H₅₇N₄O₁₂PS についての (ES) m/z 計算値: 1004.34 [M]⁺, 実測値: 1005.86 [M+H]⁺.

【0663】

1049の調製: 一般的手順Iの後、続いて一般的手順IIIを用いた。オフホワイトの泡沫状固体。収率: (80%)。³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 15

6.37. C₄₄H₄₇N₄O₁₀PS についての (ES) m/z 計算値: 854.28 [M]⁺, 実測値: 855.31 [M+H]⁺.

【0664】

実施例7. キラル制御されたオリゴヌクレオチド調製の例示的技術—オリゴヌクレオチド合成のための例示的サイクル、条件及び試薬

一部の実施形態において、本開示は、キラル制御されたインターヌクレオチド結合の調製に特に有用である技術（例えば、試薬、溶媒、条件、サイクルパラメータ、切断方法、脱保護方法、精製方法等）を提供する。一部の実施形態において、かかるインターヌクレオチド結合、例えば非負電荷インターヌクレオチド結合又は中性インターヌクレオチド結合等は、P-N=（式中、Pは結合リンである）を含む。一部の実施形態において、結合リンは三価である。一部の実施形態において、結合リンは五価である。本明細書において実証されるとおり、本開示の技術は、穏和な反応条件、高い官能基適合性、代替的脱保護及び／又は切断条件、高い粗収率及び／又は精製後収率、高い粗純度、高い生成物純度及び／又は高い立体選択性をもたらすことができる。

【0665】

一部の実施形態において、天然リン酸結合の調製サイクルは、脱保護（例えば、脱トリチル化）、カップリング、酸化（例えば、I₂/Py/H₂O又は当技術分野で利用可能な他の好適な方法を使用）及びキャッピング（例えば、本明細書に記載されるcap₂又は当技術分野で利用可能な他の好適な方法）を含むか又はそれからなる。例示的なサイクルを以下に記載し、ここで、B₁及びB₂は、独立に、核酸塩基である。当業者が理解するとおり、様々な修飾、例えば糖修飾、塩基修飾等が適合し、それが含まれ得る。

10

20

30

40

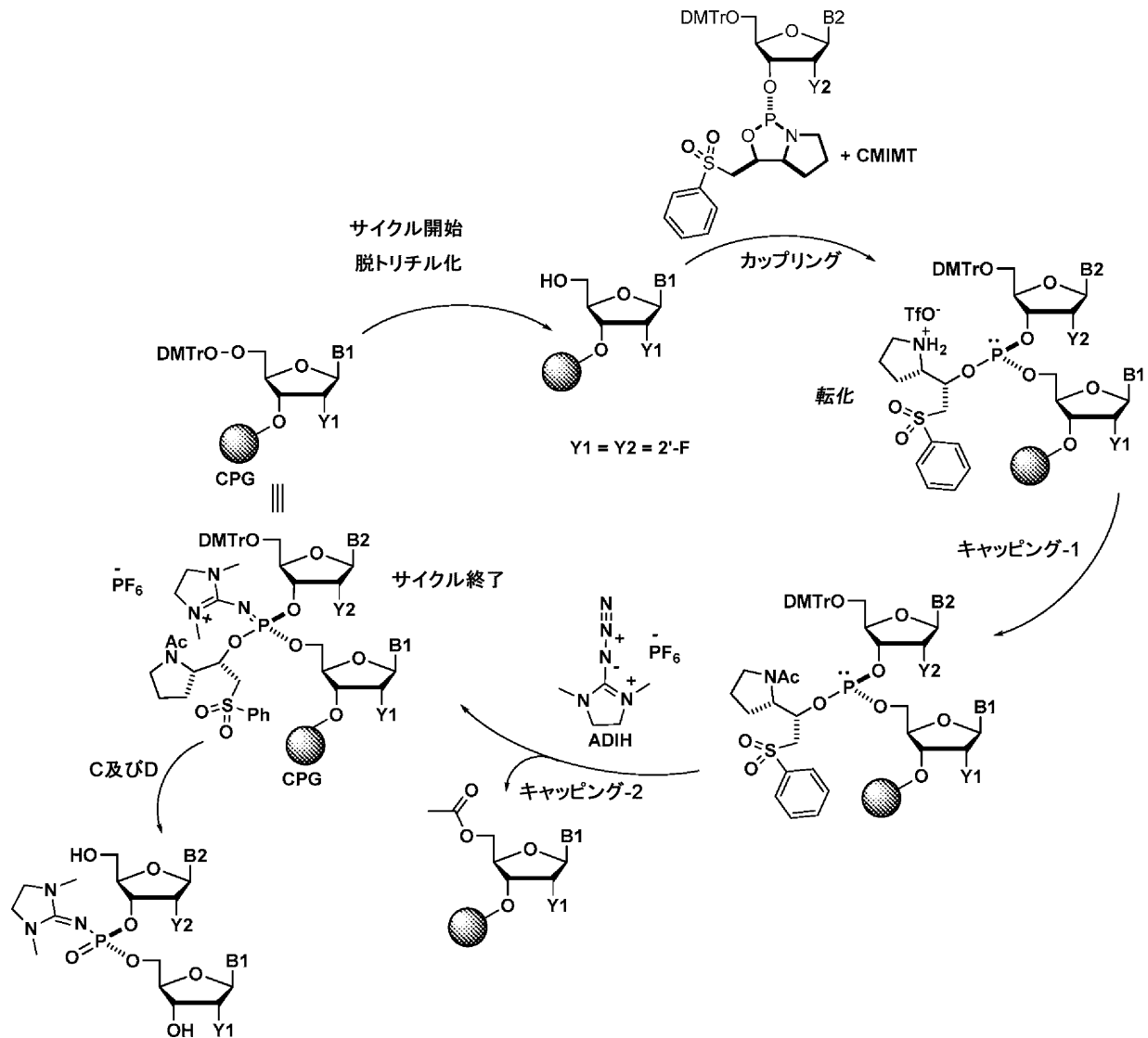
50

30



一部の実施形態において、非天然リン酸結合（例えば、特定の非負電荷インターヌクレオチド結合、中性インターヌクレオチド結合等）又はその塩形態の構造を有するものの調製サイクルは、脱保護（例えば、脱トリチル化）、カップリング、第1のキャッピング（例えば、本明細書に記載されるとおりのキャッピングー1）、修飾（例えば、ADIH又は当技術分野で利用可能な他の好適な方法を使用）及び第2のキャッピング（例えば、本明細書に記載されるとおりのキャッピングー2又は当技術分野で利用可能な他の好適な方法）を含むか又はそれからなる。例示的なサイクルを以下に記載し、ここで、B1及びB2は、独立に、核酸塩基である。当業者が理解するとおり、様々な修飾、例えば糖修飾、塩基修飾等が適合し、それが含まれ得る。一部の実施形態において、PSMキラル補助基を使用したサイクルは、PSMサイクル又はPSMアミダイトサイクルと称される。

【化 1 9 2】



10

20

30

【0668】

本開示では、様々な切断及び脱保護方法を利用し得る。一部の実施形態において、当業者が理解するとおり、切断及び脱保護のパラメータ（例えば、塩基、溶媒、温度、当量、時間等）は、例えば、調製しようとするDMDオリゴヌクレオチドの構造（例えば、核酸塩基、糖、インターヌクレオチド結合及びその修飾／保護）、固体支持体、反応規模等を考慮して調整することができる。一部の実施形態において、切断及び脱保護は、1つ又は2つ以上の個別のステップを含む。例えば、一部の実施形態において、2ステップ切断及び脱保護が利用される。一部の実施形態において、切断及び脱保護ステップは、好適な溶媒（例えば、DMSO／H₂O）中の好適な量（例えば、約100mL／mmol以上（例えば、100±5mL／mmol））のフッ化物含有試薬（例えば、TEA-HF、任意選択でTEAなどの追加的な塩基によって緩衝される）を含み、好適な温度（例えば、約0～100、0～80、0～50、0～40、0～30、0、10、20、30、40、50、60、70、80、90又は100℃（例えば、一例において、27±2℃））で好適な期間（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50時間又はそれを超えて（例えば、一例において、6±0.5時間））実施される。一部の実施形態において、切断及び脱保護ステップは、好適な溶媒（例えば、水）（例えば、濃NH₄OH）中の好適な量（例えば、

40

50

約 200 mL / mmol 以上（例えば、 200 ± 5 mL / mmol）の好適な塩基（例えば、 NR_3 ）を含み、好適な温度（例えば、約 0 ~ 100、0 ~ 80、0 ~ 50、0 ~ 40、0 ~ 30、0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 又は 100 °C（例えば、一例において、 37 ± 2 °C））で好適な期間（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50 時間又はそれを超えて（例えば、一例において、 24 ± 1 時間））実施される。一部の実施形態において、切断及び脱保護は 2 つのステップを含むか又はそれからなり、ここで、一方のステップ（例えば、ステップ 1）は $\text{DMSO} / \text{H}_2\text{O}$ 中 $1 \times \text{TEA} - \text{HF}$ 、 100 ± 5 mL / mmol、 27 ± 2 °C 及び 6 ± 0.5 時間であり、及び他方のステップ（例えば、ステップ 2）は、濃 NH_4OH 、 200 ± 5 mL / mmol、 37 ± 2 °C 及び 24 ± 1 時間である。切断及び脱保護方法の特定の例は、本明細書に記載される。

10

【0669】

当業者が理解するとおり、DMD オリゴヌクレオチド合成は固体支持体上で実施されることが多い。多くの種類の固体支持体が市販されており、及び／又は他の方法で調製／入手することができ、及び本開示において利用することができる。一部の実施形態において、固体支持体は CPG である。一部の実施形態において、固体支持体は NittoPhase HL である。固体支持体の種類及びサイズは、望ましい適用に基づき選択することができ、ある場合には具体的な使用に対してある種の固体支持体が他よりも良好に性能を発揮し得る。一部の実施形態において、特定の調製には、NittoPhase HL などの特定のポリマー固体支持体と比較して CPG がより高い粗収率及び／又は純度をもたらし得ることが観察された。

20

【0670】

アミダイトは、典型的には好適な濃度で溶媒に溶解させる。一部の実施形態において、アミダイトは ACN に溶解させる。一部の実施形態において、アミダイトは 2 つ以上の溶媒の混合物に溶解させる。一部の実施形態において、アミダイトは ACN と IBN との混合物（例えば、20 % ACN / 80 % IBN）に溶解させる。アミダイトの様々な濃度が利用され得、具体的な条件（例えば、固体支持体、調製しようとする DMD オリゴヌクレオチド、反応時間、規模等）を考慮して調整され得る。一部の実施形態において、約 0.01 ~ 0.5、0.05 ~ 0.5、0.1 ~ 0.5、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45 又は 0.5 M の濃度が利用される。一部の実施形態において、約 0.2 M の濃度が利用される。多くの実施形態において、アミダイト溶液は乾燥させる。一部の実施形態において、3 Å 分子篩を利用してアミダイト溶液を乾燥させる（又はアミダイト溶液を乾燥した状態に保つ）。一部の実施形態において、分子篩は約 15 ~ 20 % v / v で利用される。

30

【0671】

様々な当量のアミダイトが DMD オリゴヌクレオチド合成に有用である。当業者は理解し得るとおり、アミダイトの当量は、具体的な条件（例えば、固体支持体、調製しようとする DMD オリゴヌクレオチド、反応時間、規模等）を考慮して調整することができ、合成時に同じ又は異なる当量が利用され得る。一部の実施形態において、アミダイトの当量は、約 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 又はそれを超える。一部の実施形態において、好適な当量は約 2 である。一部の実施形態において、好適な当量は約 2.5 である。一部の実施形態において、好適な当量は約 3 である。一部の実施形態において、好適な当量は約 3.5 である。一部の実施形態において、好適な当量は約 4 である。

40

【0672】

幾つもの活性化剤が当技術分野で利用可能であり、本開示において利用し得る。一部の実施形態において、活性化剤は ETT である。一部の実施形態において、活性化剤は CMIMT である。一部の実施形態において、CMIMT は、キラル制御された合成に利用される。当業者が理解するとおり、異なるアミダイトに同じ又は異なる活性化剤が利用され得、異なる量で利用され得る。一部の実施形態において、活性化剤は、約 40 ~ 100 %、

50

例えば40%、50%、60%、70%、80%又は90%の送達で利用される。一部の実施形態において、送達は約60%である（例えば、ETTについて）。一部の実施形態において、送達は約70%である（例えば、CMIMTについて）。一部の実施形態において、活性化剤／アミダイトのモル比は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれを超える。一部の実施形態において、モル比は約3～6である。一部の実施形態において、モル比は約1である。一部の実施形態において、モル比は約2である。一部の実施形態において、モル比は約3である。一部の実施形態において、モル比は約4である。一部の実施形態において、モル比は約5である。一部の実施形態において、モル比は約6である。一部の実施形態において、モル比は約7である。一部の実施形態において、モル比は約8である。一部の実施形態において、モル比は約9である。一部の実施形態において、モル比は約10である。一部の実施形態において、モル比は約2～5、2～4又は3～4である（例えば、ETTについて）。一部の実施形態において、モル比は約3.7である（例えば、ETTについて）。一部の実施形態において、モル比は約3～8、4～8、4～7、4～6、5～7、5～8又は5～6である（例えば、CMIMTについて）。一部の実施形態において、モル比は約5.8である（例えば、CMIMTについて）。

10

20

30

40

50

【0673】

当業者が理解するとおり、DMDオリゴヌクレオチド合成には様々な好適な流量及び反応時間が利用され得、調製しようとするDMDオリゴヌクレオチド、規模、合成セットアップ等に応じて調整され得る。一部の実施形態において、合成に利用される再循環流量は約200cm/hである。一部の実施形態において、再循環時間は約1～10分である。一部の実施形態において、再循環時間は約8分である。一部の実施形態において、再循環時間は約10分である。

【0674】

例えばカップリング後のP(III)結合の修飾には、多くの技術が利用可能である。例えば、P(III)結合からP(V)P(=O)タイプの結合に例えば酸化によって変換するため、様々な方法が利用可能である。一部の実施形態では、I₂/Pyrr/H₂Oが利用される。同様に、P(III)結合をP(V)P(=S)タイプの結合に例えば硫化によって変換するため、多くの方法が利用可能である。一部の実施形態において、本明細書に例示されるとおり、チオール化試薬としてXHが利用される。P(III)結合をP(V)P(=N-)タイプの結合に変換する技術も本開示において広く利用可能であり、利用することができる。一部の実施形態において、本明細書に例示されるとおりADIHが利用される。好適な反応パラメータが本明細書に記載される。一部の実施形態において、ADIHは、約0.01～0.5、0.05～0.5、0.1～0.5、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45又は0.5Mの濃度で使用される。一部の実施形態において、ADIHの濃度は約0.25Mである。一部の実施形態において、ADIHの濃度は約0.3Mである。一部の実施形態において、ADIHは、約1～50、1～40、1～30、1～25、1～20、1～10又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45又は50当量又はそれを超えて利用される。一部の実施形態において、ADIHの当量は約7.5である。一部の実施形態において、ADIHの当量は約10である。一部の実施形態において、ADIHの当量は約15である。一部の実施形態において、ADIHの当量は約20である。一部の実施形態において、ADIHの当量は約23である。一部の実施形態において、ADIHの当量は約25である。一部の実施形態において、ADIHの当量は約30である。一部の実施形態において、ADIHの当量は約35である。一部の実施形態において、1つの実験、ADIHは、15.2当量で、及び15分の接触時間を利用した。一部の実施形態において、アミダイトに応じて、試薬、例えばADIHの濃度、当量、接触時間等が調整され得る。

【0675】

本開示の技術は、様々な規模での調製に好適である。一部の実施形態において、合成は数百 μmol 以上で実施される。一部の実施形態において、規模は約 $200 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $300 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $400 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $500 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $550 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $600 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $650 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $700 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $750 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $800 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $850 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $900 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は約 $950 \mu\text{mol}$ である。一部の実施形態において、規模は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25 mmol 又はそれを超える。一部の実施形態において、規模は約 1 mmol 以上である。一部の実施形態において、規模は約 2 mmol 以上である。一部の実施形態において、規模は約 5 mmol 以上である。一部の実施形態において、規模は約 10 mmol 以上である。一部の実施形態において、規模は約 15 mmol 以上である。一部の実施形態において、規模は約 20 mmol 以上である。一部の実施形態において、規模は約 25 mmol 以上である。

10

【0676】

一部の実施形態において、実測収率は $85 \sim 90 \text{ OD} / \mu\text{mol}$ (例えば、 10.2 mmol OD 合成について $85,000 \text{ OD} / \text{mmol}$ 、 58.4% の粗純度 (% FLP)) であった。

20

【0677】

本開示の技術は、とりわけ、キラル制御されたインターヌクレオチド結合、例えば $P-N$ = (式中、 P は結合リンである) を含むものを含む DMD オリゴヌクレオチドの調製に利用するとき、様々な利点をもたらす得る。例えば、本明細書において実証されたとおり、本開示の技術は、最小限の量のより短い DMD オリゴヌクレオチドで (例えば、不完全なカップリング、分解等からの) 高い粗純度及び収率をもたらすことができる (例えば、多くの実施形態において、 20mer DMD オリゴヌクレオチドについて約 $55 \sim 60\%$ の完全長生成物)。かかる高い粗収率及び／又は純度は、とりわけ、下流精製を大きく削減することができ、且つ生産コスト及び商品原価を大きく削減することができ、一部の実施形態では、商業生産、臨床試験及び／又は市販を大幅に促進し又はその規模拡大を可能にすることができる。

30

【0678】

キラル制御された DMD オリゴヌクレオチド組成物 $WV-13864$ の例示的調製手順以下には、コントロールドポアグラス (CPG) 低バルク密度固体支持体 (例えば、 CN A リンカー $CPG(600 \text{ \AA} \text{ LBD})$) による $2' - fC$ (アセチル) を使用した $WV-13864$ の例示的調製手順を記載する。有用なホスホロアミダイトとしては、 $5' - ODMTr - 2' - F - dA(N6 - Bz) - (L) - DPSE$ ホスホロアミダイト、 $5' - ODMTr - 2' - F - dC(N4 - Ac) - (L) - DPSE$ ホスホロアミダイト、 $5' - ODMTr - 2' - F - dG(N2 - iBu) - (L) - DPSE$ ホスホロアミダイト、 $5' - ODMTr - 2' - F - dU - (L) - DPSE$ ホスホロアミダイト、 $5' - ODMTr - 2' - OMe - G(N^2 - iBu) - (L) - DPSE$ ホスホロアミダイト、 $5' - ODMTr - 2' - F - dC(N4 - Ac) - (L) - PSM$ ホスホロアミダイト、 $5' - ODMTr - 2' - F - dG(N2 - iBu) - (L) - PSM$ ホスホロアミダイト、 $5' - DMT - 2' - OMe - A(Bz) - \beta$ - シアノエチルホスホロアミダイト及び $5' - DMT - 2' - OMe - C(Ac) - \beta$ - シアノエチルホスホロアミダイトが挙げられる。

40

【0679】

チオール化には、 0.1 M キサントンヒドリド溶液 (XH) を使用した。アセトニトリル

50

中の 0.3 M の 2-アジド-1,3-ジメチル-イミダゾリニウムヘキサフルオロホスフェート (ADIH) を利用して中性 PN 結合を形成した。酸化溶液は、ピリジン/水、90/10、v/v 中 0.04~0.06 M ヨウ素であった。Cap A は、アセトニトリル、20/80、v/v 中 N-メチルイミダゾールであった。Cap B は、無水酢酸/2,6-ルチジン/アセトニトリル、20/30/50、v/v/v であった。脱ブロック化は、トルエン中 3% ジクロロ酢酸を用いて実施した。使用した NH₄OH は 28~30% 濃水酸化アンモニウムであった。

【0680】

脱トリチル化

合成を開始するため、5'-ODMTr-2'-F-dC(N4-Ac)-CPG 固体支持 10
体をトルエン中 3% (DCA) での処理による 5'-ヒドロキシルからの DMT r 保護基の酸触媒除去に供した。DMT r 除去ステップは通常、濃い赤色又はオレンジ色で可視化されたと共に、UV watch コマンドによって 436 nm の波長でモニタすることができる。

【0681】

DMT r 除去は、合成サイクルの開始時に繰り返すことができる。いずれの場合においても、脱トリチル化後、合成の次のステップのための調製において、支持体に結合した材料をアセトニトリルで洗浄した。

【0682】

カップリング

アミダイトをアセトニトリル (ACN) 又は 20% イソブチロニトリル (IBN) / 80% ACN のいずれかに密度補正なしに 0.2 M の濃度で溶解させた。この溶液は、使用の 4 時間以上前に分子篩 (3 Å) で乾燥させた (15~20%、v/v)。

【0683】

【表 58】

アミド	溶媒	濃度	MS3Å
5'-ODMTr-2'-OMe-A(N6-Bz)-CE	ACN	0.2M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-OMe-C(N4-Ac)-CE	ACN	0.2M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dA(N6-Bz)-(L)-DPSE	ACN	0.2M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dC(N4-Ac)-(L)-DPSE	ACN	0.2M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dU-(L)-DPSE	20% IBN/ 80% ACN	0.2M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dG(N2-iBu)-(L)-DPSE	ACN	0.2M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-OMe-G(N2-iBu)-(L)-DPSE	20% IBN/ 80% ACN	0.2M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dC(N4-Ac)-(L)-PSM	ACN	0.2M	15-20%, v/v
5'-ODMTr-2'-F-dG(N2-iBu)-(L)-PSM	ACN	0.2M	15-20%, v/v

【0684】

二重活性化剤 (CMIMT 及び ETT) カップリング手法を利用した。両方の活性化剤を ACN に 0.5 M の濃度で溶解させた。CMIMT は、5.833/1 の CMIMT 対アミダイトモル比でのキラル制御されたカップリングに使用されている。ETT は、標準アミダイト (天然リン酸結合について) のカップリングに 3.752/1 の ETT 対アミダイトモル比で使用した。DPSE 及び PSM アミダイトの再循環時間は、すべて 10 分であり、但し mG-L-DPSE を除き、これは 8 分であった。標準アミダイトは、すべて 8 分間カップリングさせた。

【0685】

Cap-1 (キャッピング-1、第 1 のキャッピング)

C a p B (A c 2 O / 2 , 6 - ルチジン / M e C N (2 : 3 : 5 、 v / v / v)) を使用した。一部の実施形態において、C a p - 1 は、例えばキラル補助基上の、第二級アミン基をカップリングした。一部の実施形態において、第二級アミンの不完全な保護は、カップリングの失敗又は1つ以上の副生成物の形成を招く副反応につながり得る。一部の実施形態において、C a p - 1 はエステル化に効率的な条件ではないこともある（例えば、未反応5'-OHのカッピングに関してC a p - 2（第2のカッピング）と比べて効率が低い条件）。

【0686】

D P S E サイクルのチオール化

C a p - 1 後、亜リン酸中間体 P (I I I) を硫化試薬で修飾した。例示的調製では、1 . 2 C V (6 ~ 7 当量) の硫化試薬 (0 . 1 M X H / ピリジン - A C N 、 1 : 1 、 v / v) をフロースルーモードの合成カラムを通じて6分の接触時間で送達して P (V) を形成した。

10

【0687】

P S M サイクルのアジド反応

C a p - 1 後、A C N 中の好適な試薬（例えば、A D I H などの - N 3 を含む）を使用して中性インターヌクレオチド結合（P N 結合）を形成した。例示的調製では、それぞれのサイクルにおいて、f G - L - P S M について10 . 3 当量の0 . 2 5 M A D I H で10分の接触時間及びf C - L - P S M について25 . 8 当量の0 . 3 M A D I H で15分の接触時間を利用した。

20

【0688】

標準ヌクレオチドサイクルの酸化

標準アミダイトサイクルにC a p - 1 ステップは不要であった。固体支持体への標準アミダイトのカップリング後、亜リン酸中間体 P (I I I) を0 . 0 5 M のヨウ素 / 水 / ピリジン溶液で酸化して P (V) を形成した。例示的調製では、効率的な酸化のため、3 . 5 当量の酸化溶液をフロースルーモードによって2分の接触時間でカラムに送り込んだ。

【0689】

C a p - 2 (カッピング - 2 、 第 2 の カッピング)

各サイクルの固相 D M D オリゴヌクレオチド合成でのカップリング効率は約97~100%であり、例えばD M T r カチオンの放出によってモニタした。典型的には脱トリチル化モニタリングによれば1~3%の、固体支持体上の未結合の残留5'-ヒドロキシル基を、C a p A (アセトニトリル (N M I / A C N = 2 0 / 8 0 、 v / v) 中 2 0 % N - メチルイミダゾール) 及び C a p B (2 0 % : 3 0 % : 5 0 % = A c 2 O : 2 , 6 - ルチジン : A C N (v / v / v)) 試薬（例えば、1 : 1 ）でブロック化した。両方の試薬（例えば、0 . 4 C V ）をフロースルーモードによって0 . 8 分の接触時間でカラムに送り込み、配列形成の失敗を防止した。カッピングされていないアミン基もこのステップで保護され得る。

30

【0690】

本明細書に例示されるとおり、一部の実施形態において、D P S E アミダイト又はD P S E サイクルは、脱トリチル化→カップリング→C a p - 1 (カッピング - 1 、 第 1 の カッピング) →チオール化→C a p - 2 (カッピング - 1 、 後カッピング、第2のカッピング) であり；一部の実施形態において、P S M アミダイト又はP S M サイクルは、脱トリチル化→カップリング→C a p - 1 (カッピング - 1 、 第 1 の カッピング) →アジド反応→C a p - 2 (カッピング - 1 、 後カッピング、第2のカッピング) であり；一部の実施形態において、標準アミダイト又は標準サイクル（従来の、キラル制御されていないもの）は、脱トリチル化→カップリング→酸化→C a p - 2 (カッピング - 1 、 後カッピング、第2のカッピング) である。

40

【0691】

合成サイクルを選択し、望ましい長さが実現するまで繰り返した。

【0692】

50

アミン洗浄

一部の実施形態において、提供される技術は、 $P-N=$ （式中、 P は結合リンである）を含むインターヌクレオチド結合を含むDMDオリゴヌクレオチドの調製に特に有効である。一部の実施形態において、提供される技術は、DMDオリゴヌクレオチド中間体を塩基と接触させることを含む。一部の実施形態において、接触は、望ましいDMDオリゴヌクレオチド長さが実現した後に実施される。一部の実施形態において、かかる接触により、 $P-N=$ （式中、 P は結合リンである）を含むインターヌクレオチド結合を含むDMDオリゴヌクレオチドがもたらされる。一部の実施形態において、接触により、キラル補助基（例えば、分子の残りの部分に炭素原子を介して連結した G^2 を含み、且つその炭素原子が少なくとも1つの電子求引基に連結されるもの（例えば、 $WV-CA-231$ 、 $WV-CA-236$ 、 $WV-CA-240$ 等））が除去される。一部の実施形態において、接触は、塩基又は実質的に OH^- 不含若しくは水不含（無水）の塩基溶液を利用して実施される。一部の実施形態において、塩基はアミン（例えば、 $N(R)_3$ ）である。一部の実施形態において、塩基は N ， N -ジエチルアミン（DEA）である。一部の実施形態において、塩基溶液は20% DEA/ACNである。一部の実施形態において、塩基とのかかる接触により、 $P-N=$ を含むインターヌクレオチド結合の1つ以上の位置に代わりに天然リン酸結合を有する副生成物のレベルが低下する。

【0693】

例示的調製では、DMDオリゴヌクレオチドヌクレオチド合成サイクルの完了後、5カラム容量のアセトニトリル中20% DEAにより15分の接触時間でオンカラムアミン洗浄を実施した。

【0694】

一部の実施形態において、塩基との接触によりまた、標準天然リン酸結合の構築に使用される2-シアノエチル基が除去され得る。一部の実施形態において、塩基との接触により、天然リン酸結合（例えば、カチオンがアミン塩基の対応するアンモニウム塩である塩形態のもの）がもたらされる。

【0695】

切断及び脱保護

塩基との接触後、DMDオリゴヌクレオチドは更なる切断及び脱保護に曝される。例示的調製では、補助基の除去（例えば、DPSE）、切断及び脱保護は2ステップのプロセスであった。ステップ1では、DMDオリゴヌクレオチドを有するCPG固体支持体を1×TEA-HF溶液（DMSO：水：TEA・3HF：TEA=43：8.6：2.8：1=v/v/v/v、 $100 \pm 5 \mu L / \mu mol$ ）により $27 \pm 2^\circ C$ で 6 ± 0.5 時間処理した。次にバルクスラリーを濃水酸化アンモニウム（28~30%、 $200 \pm 10 mL / mmol$ ）により $37 \pm 2^\circ C$ で 24 ± 1 時間処理して（ステップ2）、固体支持体からDMDオリゴヌクレオチドを放出させた。粗生成物をろ過によって回収した。ろ液を固体支持体の洗浄液（例えば、水）と合わせた。一部の実施形態において、実測収率は約80~900D/ μmol であった。

【0696】

とりわけ、提供される技術は、高い粗純度及び／又は粗収率をもたらした。多くの調製において（様々な規模、試薬濃度、反応時間等）、約55~60%の粗純度（%FLP）が達成され、短いDMDオリゴヌクレオチド（例えば、不完全なカップリング、分解、副反応等からのもの）の量は最小限であった。多くの実施形態において、最も顕著な短いDMDオリゴヌクレオチドの量は約2~10%以下に過ぎず、多くの場合に2~4%以下に過ぎない（例えば、一部の実施形態において、約2%もの低さ（最も顕著な短いDMDオリゴヌクレオチドは $N-3$ である））。

【0697】

DMDオリゴヌクレオチド精製には、様々な技術を利用可能であり、本開示において利用することができる。一部の実施形態では、例えば、AEX精製及び／又はUF/DFを用いて粗生成物を更に精製した（例えば、90%を超える純度）。

【0698】

本明細書に記載される技術を用いて、多様な塩基配列、修飾（例えば、核酸塩基、糖及びインターヌクレオチド結合修飾）及び／又はそのパターン、結合リン立体化学及び／又はそのパターン等を含む様々なDMDオリゴヌクレオチドをumolからmmolに至るまでの様々な規模で調製した。かかるDMDオリゴヌクレオチドは様々な標的を有し、様々な機構を通じて機能し得る。特定のかかるDMDオリゴヌクレオチドを本開示の表に提供する。

【0699】

当業者が理解するとおり、本明細書に記載される例は、例示のために過ぎない。当業者は、例えば、計装、規模、試薬、反応物、望ましい結果等に応じて様々な条件、パラメータ等を調整し得ることを理解するであろう。本開示において、特定の結果は様々な技術を用いて更に改良し得る。とりわけ、提供されるDMDオリゴヌクレオチド及びその組成物は、例えば様々なアッセイ及びインビボモデルにおいて、大きく改良された特性及び／又はエクソン51のスキッピングを提供することができ、様々な病態、障害又は疾患の予防及び／又は治療に特に有用であり得る。特定のデータは本明細書の実施例に提供する。

【0700】

実施例8．患者筋芽細胞の「前分化」のためのジムノシス投与に関するタイムライン
本開示では、本開示の技術の特性及び／又は活性の評価に、様々な技術、例えば米国特許第9394333号、米国特許第9744183号、米国特許第9605019号、米国特許第9598458号、米国特許出願公開第2015/0211006号、米国特許出願公開第2017/0037399号、国際公開第2017/015555号、国際公開第2017/192664号、国際公開第2017/015575号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2017/160741号、国際公開第2017/192679号及び国際公開第2017/210647号等に記載されるものを利用することができる。一部の実施形態において、本開示の技術、例えばDMDオリゴヌクレオチド並びにその組成物及び使用法は、予想外にも、好適な参照技術（例えば、同じ塩基配列を有するが、生理的pHで中性及び／又はカチオン性インターヌクレオチド結合を有しないDMDオリゴヌクレオチドのステレオランダムな組成物に基づく技術）と比較して優れた結果を実証する。以下には、本開示に記載されるDMDオリゴヌクレオチドの特性及び／又は活性の評価に有用であり得る例示的技術を記載する。当業者は、以下に例示される条件は異なり得る／変更し得ること並びにそれに加えて及び／又はそれに代えて、他の好適な試薬、温度、条件、時間、量等を本開示において利用し得ることを理解する。

【0701】

特に注記しない限り、様々な実験において、実験に使用した細胞及び動物は、そうした細胞又は動物に典型的な条件で使用した。特に注記しない限り、インビトロ実験では、様々な細胞は、標準的な条件下（例えば、特定の細胞型、細胞株又は同様の細胞型若しくは細胞株に用いられる最も一般的な条件下）において、例えば通常の成長培地、普通の温度（37℃）並びにCambridge, MAの典型的な重力及び大気圧で成長させた。動物は、給餌、ケージサイズ等の条件を普通として、標準的な実験室条件下においてほぼ室温又は数度低い温度で飼育した。特に記載がない限り、細胞も動物も、極端な温度（例えば、寒冷ショック又は熱ショック）、圧力、重力、環境音、飼料又は栄養不足等に曝さなかった。

【0702】

患者由来筋芽細胞株の維持：

DMDΔ52及びDMDΔ45-52筋芽細胞は、5%FBS、1×ペニシリンーストレプトマイシン及び1×L-グルタミンを補足した完全骨格筋成長培地（Promocell、Heidelberg、独国）に維持した。フラスコ又はプレートにMatrigel：DMEM溶液（1：100）で好適な時間、例えば30分間にわたってコートし、その後Matrigel：DMEM溶液を吸引によって除去してから、細胞を完全骨格筋成長培地に播種した。

【0703】

標準的な投与手順（0日間前分化）

10

20

30

40

50

1日目：好適な細胞成長容器、例えば6ウェルプレート又は24ウェルプレートをMatrigel：DMEM溶液でコートする。ある条件、例えば37℃、5%CO₂で好適な時間、例えば30分間にわたってインキュベートする。吸引し、細胞成長容器に好適な数の細胞、例えば6ウェルプレートでは合計1500μlの完全成長培地中に150K細胞／ウェル、24ウェルプレートでは500μlの成長培地中に30K細胞／ウェルを播種する。好適な条件で好適な期間にわたり、例えば37℃、5%CO₂で一晩インキュベートする。

【0704】

2日目：好適な分化培地、例えばDMEM+5%ウマ血清+10μg/mlインスリンを調製する。分化培地中に好適なDMDオリゴヌクレオチド希釈液、例えば30μM、10μM、3.33μM、1.11μM、0.37μMの段階希釈液を調製する。接着細胞から成長培地を吸い取り、細胞にDMDオリゴヌクレオチド：分化培地溶液を加える。細胞の回収時までオリゴヌクレオチドは細胞に接し続ける（培地交換なし）。

10

【0705】

6日目：RNAを入手する。典型的な手順では、好適な数の細胞、例えば24ウェルプレートのウェルからの細胞を例えば冷PBSで洗浄し、続いて好適な量のRNA抽出及び試料／RNA抽出の保存用試薬、例えば24ウェルプレートでは500μl／ウェルのTRIzolを加え、プレートを-80℃で凍結するか、又はRNA抽出を継続してRNAを得た。

【0706】

8日目：タンパク質を入手する。典型的な手順では、好適な数の細胞、例えば6ウェルプレートのウェル内の細胞を例えば冷PBSで洗浄した。次に好適な量の好適な溶解緩衝液—例えば、典型的な手順では、6ウェルプレートについてプロテアーゼ阻害薬を補足した200μl／ウェルのRIPAを加えた。溶解後、試料を保存し、例えば-80℃で凍結し得るか、又はタンパク質抽出を継続し得る。

20

【0707】

他の好適な手順、例えば以下に記載されるものを用い得る。当業者が理解するとおり、試薬、温度、条件、時点、量等の多くのパラメータは、変更され得る。

【0708】

4日間前分化投与手順

30

1日目：6ウェルプレート又は24ウェルプレートをMatrigel：DMEM溶液でコートする。37℃、5%CO₂で30分間インキュベートする。吸引し、6ウェルプレートでは合計1500μlの完全成長培地中に150K細胞／ウェル、24ウェルプレートでは500μlの成長培地中に30K細胞／ウェルを播種する。37℃、5%CO₂で一晩インキュベートする。

【0709】

2日目：分化培地を以下のとおり調製する：DMEM+5%ウマ血清+10μg/mlインスリン。成長培地を吸引し、分化培地を補充する。

【0710】

6日目：細胞を4日間分化させる。分化培地中にDMDオリゴヌクレオチド希釈液、例えば30μM、10μM、3.33μM、1.11μM、0.37μMの段階希釈液を調製する。接着細胞から分化培地を吸い取り、細胞にDMDオリゴヌクレオチド：分化培地溶液を加える。オリゴヌクレオチドは細胞の回収時まで細胞に接し続ける（培地交換なし）。

40

【0711】

10日目：24ウェルプレート内の細胞を冷PBSで洗浄し、24ウェルプレートに500μl／ウェルのTRIzolを加え、プレートを-80℃で凍結するか、又はRNA抽出を継続する。

【0712】

12日目：6ウェルプレート内の細胞を冷PBSで洗浄する。プロテアーゼ阻害薬を補足

50

した200 μ l / ウェルのRIPAを加える。プレートを-80℃で凍結するか、又はタンパク質抽出を継続する。

【0713】

7日間前分化投与手順

1日目：6ウェルプレート又は24ウェルプレートをMatrigel：DMEM溶液でコートする。37℃、5%CO₂で30分間インキュベートする。吸引し、6ウェルプレートでは合計1500 μ lの完全成長培地中に150K細胞／ウェル、24ウェルプレートでは500 μ lの成長培地中に30K細胞／ウェルを播種した。37℃、5%CO₂で一晩インキュベートする。

【0714】

2日目：分化培地を以下のとおり調製する：DMEM+5%ウマ血清+10 μ g / ml インスリン。成長培地を吸収し、分化培地を補充する。

【0715】

9日目：細胞を7日間分化させる。分化培地中にDMDオリゴヌクレオチド希釈液、例えば30 μ M、10 μ M、3.33 μ M、1.11 μ M、0.37 μ Mの段階希釈液を調製する。接着細胞から分化培地を吸い取り、細胞にDMDオリゴヌクレオチド：分化培地溶液を加える。オリゴヌクレオチドは細胞の回収時まで細胞に接し続ける（培地交換なし）。

【0716】

13日目：24ウェルプレート内の細胞を冷PBSで洗浄し、24ウェルプレートに500 μ l / ウェルのTRIZOLを加え、プレートを-80℃で凍結するか、又はRNA抽出を継続する。

【0717】

15日目：6ウェルプレート内の細胞を冷PBSで洗浄する。プロテアーゼ阻害薬を補足した200 μ l / ウェルのRIPAを加える。プレートを-80℃で凍結するか、又はタンパク質抽出を継続する。

【0718】

10日間前分化投与手順

1日目：6ウェルプレート又は24ウェルプレートをMatrigel：DMEM溶液でコートする。37℃、5%CO₂で30分間インキュベートする。吸引し、6ウェルプレートでは合計1500 μ lの完全成長培地中に150K細胞／ウェル、24ウェルプレートでは500 μ lの成長培地中に30K細胞／ウェルを播種した。37℃、5%CO₂で一晩インキュベートする。

【0719】

2日目：分化培地を以下のとおり調製する：DMEM+5%ウマ血清+10 μ g / ml インスリン。成長培地を吸収し、分化培地を補充する。

【0720】

12日目：細胞を10日間分化させる。分化培地中にDMDオリゴヌクレオチド希釈液、例えば30 μ M、10 μ M、3.33 μ M、1.11 μ M、0.37 μ Mの段階希釈液を調製する。接着細胞から分化培地を吸い取り、細胞にDMDオリゴヌクレオチド：分化培地溶液を加える。オリゴヌクレオチドは細胞の回収時まで細胞に接し続ける（培地交換なし）。

【0721】

16日目：24ウェルプレート内の細胞を冷PBSで洗浄し、24ウェルプレートに500 μ l / ウェルのTRIZOLを加え、プレートを-80℃で凍結するか、又はRNA抽出を継続する。

【0722】

18日目：6ウェルプレート内の細胞を冷PBSで洗浄する。プロテアーゼ阻害薬を補足した200 μ l / ウェルのRIPAを加える。プレートを-80℃で凍結するか、又はタンパク質抽出を継続する。

10

20

30

40

50

【0723】

実施例9．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は、機能的なDMDタンパク質を提供することができる。

DMDδ48-50筋芽細胞を、オリゴヌクレオチドを含む分化培地中フリーアップティック条件下で6日間又は7日間培養した。分化した筋管をPBSで洗浄し、プロテアーゼ阻害剤を添加した75μlのRIPA溶解緩衝液で溶解した。総タンパク質濃度を、ウシ血清アルブミンの標準曲線と比較することにより、Pierce Protein 660nmアッセイ試薬で希釈して決定した。

【0724】

使用される一次抗体に応じて、66kDa～440kDa分離モジュール、抗ウサギ検出モジュール及び抗マウス検出モジュールを使用して、製造業者の指示に従ってWES（商標）機器でジストロフィンを定量した。試料を、0.1×試料緩衝液（分離モジュールからの10×試料緩衝液）で0.5μg/μlに希釈し、（分離モジュールからの）蛍光マスターミックスと混合し、95℃で5分間変性させた。モック処理されたDMD筋管の溶解物に希釈された健康な不死化ヒト筋管（「野生型」）からの溶解物を使用して検量線を作成した。試料、ブロッキング試薬（抗体希釈剤）、一次抗体（タンパク質単純抗体希釈剤中、1：50抗ジストロフィン [Abcam]、1：1000抗ピンキュリン [Thermo]）、西洋ワサビペルオキシド（HRP）コンジュゲート二次抗体（すぐに使用できる抗ウサギで1：10に希釈したすぐに使用できる抗マウス）と化学発光基質をピペットでプレート（分離モジュールの一部）に入れた。機器のデフォルト設定を使用した：475Vで30分間のスタッキングと分離；ブロッキング試薬を5分間、一次抗体及び二次抗体の両方を30分間；ルミノール／過酸化物の化学発光検出を約15分間（1、2、4、8、16、32、64、128、512秒の露光）。Compassソフトウェアによって検出されたピークの曲線下面積（AUC）によって生成された化学発光を自動的に定量し、電気泳動図又は仮想プロット様画像として表示した。（ジストロフィンのAUC）／（ピンキュリンのAUC）の比率に対する%標準をプロットすることによって標準曲線を作成した。計算した試料の濃度をこの標準曲線から補間した（表9）。

【0725】

【表59】

表9. 特定のタンパク質の産生データ。

	水	WV-3152	WV-31562	WV-31565	WV-31578	WV-31568	WV-31580	WV-31561	WV-31573	WV-31563	WV-31564	WV-31576	WV-31567	WV-31569	WV-31582	WV-31583
Bio rep 1	0.1	1	1.3	2.8	2.6	3.3	3	2.5	2.4	1.5	2.7	2.3	1.5	1.8	3.3	1.9
Bio rep 2	0.1	1	1.2	2.2	2.6	2.6	2.5		2.4	1.7	2.9	5.9	2.7	0.2	7.2	2.1

【0726】

実施例10．インシリコ配列設計

インシリコ分析を行って、目的のオリゴヌクレオチド（例えば、長さ20ヌクレオチド）と3つの主要な種：ホモサピエンス（Homo sapiens）（ヒト）、ハツカネズミ（Mus musculus）（マウス）及びカニクイザル（Macaca fascicularis）（サル）のDNA又はRNA内の配列との間の配列相補性を決定した。複数のソフトウェア／プログラムを、本開示に従って配列アラインメントに利用することができる。一部の実施形態において、配列検索は、bowtie及びblastnソフトウェアプログラムを用いて行った。例えば、20ヌクレオチド長にミスマッチが2つ以下の場合に相補性「ヒット」と見なして記録した。

【 0 7 2 7 】

一部の実施形態において、インシリコ設計を使用して、オリゴヌクレオチドとマウス及びサルのジストロフィン転写物との間の相補性を決定した。オリゴヌクレオチドと、ヒト及び動物（例えば、サル）の両方のジストロフィン転写物との間の完全一致は、一部の実施形態において、様々な種において同じオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物を使用する研究、例えば毒物学研究を可能にする。理論に拘束されることを望むものではないが、一部の実施形態において、不完全な一致（例えば、20 核酸塩基長のオリゴヌクレオチドで18又は19の核酸塩基の一致）は、効率の低い標的結合をもたらし得る。表10は、ヒト、マウス及びサルのジストロフィン転写物間で相補性を有するオリゴヌクレオチドの特定の例を示した。

10

【 0 7 2 8 】

【表 6 0】

表 10.3 種(ヒト、マウス、サル)の中で相補性を有するオリゴヌクレオチド及び配列。

オリゴヌクレオチド	塩基配列
WV-20011	GGUAAGUUCUGUCCAAGCCC
WV-20052	GUACCUCCAACAUCAAGGAA
WV-20059	CAACAUCAAGGAAGAUGGCA
WV-20073	AUGGCAUUUCUAGUUUGGAG
WV-20074	UGGCAUUUCUAGUUUGGAGA
WV-20075	GGCAUUUCUAGUUUGGAGAU
WV-20076	GCAUUUCUAGUUUGGAGAUG
WV-20094	UGGCAGUUUCCUUAGUAACC
WV-20097	CAGUUUCCUUAGUAACCACA
WV-20098	AGUUUCCUUAGUAACCACAG
WV-20101	UUCCUUAGUAACCACAGGUU
WV-20119	UUGUGUCACCAGAGUAACAG

20

30

【 0 7 2 9 】

一部の実施形態において、本開示は、その塩基配列が表10の塩基配列であるか又はそれを含むオリゴヌクレオチドを提供する。

40

【 0 7 3 0 】

一部の実施形態において、インシリコ設計を使用して、オリゴヌクレオチドとマウス及びネズミ科動物ジストロフィン転写物との間の相補性を決定した。マウスは遺伝子操作を受けやすいため、筋ジストロフィーのマウスモデルは、マウスジストロフィン遺伝子からエクソンを欠失させることによって開発できる可能性がある。一部の実施形態において、マウスジストロフィンとの完全な一致は、ジストロフィン内部欠失マウスモデルでの研究を可能にし得る。とりわけ、マウスモデルからのデータ、例えばマウスモデルにおけるインビボでのリーディングフレームの修復及び／又はジストロフィンタンパク質の産生／回復のためのエクソンスキッピングのデータは、ヒトの治療薬の開発に有用であり得る。

【 0 7 3 1 】

50

均等物

本開示の一部の例示的实施形態を説明したが、前述の説明が単に例示であり、限定するものではなく、単に例として提供されているに過ぎないことが当業者に明らかなはずである。多くの変形形態例及び他の例示的な実施形態が当業者の範囲内にあり、本開示の範囲内に含まれるものと企図される。詳細には、本明細書に提供される例の多くは、方法動作又はシステム要素の具体的な組み合わせを含むが、それらの動作及びそれらの要素が、同じ目的を達成するため他の方法で組み合わせられ得ることが理解されなければならない。一実施形態のみに関連して考察される動作、要素及び特徴が、他の実施形態における同様の役割から除外されることは意図されない。更に、以下の特許請求の範囲に記載される1つ以上のミーンズプラスファンクション限定について、存在する場合、記載される機能の実施について本明細書に開示される手段に手段が限定されることは意図されず、記載される機能の実施について現在公知の又は後に開発される任意の手段が範囲内に包含されることが意図される。

10

20

【0732】

特許請求の範囲においてクレーム要素を修飾する「第1」、「第2」、「第3」等の序数用語の使用自体は、1つのクレーム要素の別のクレーム要素と比した何らかの優先、先行若しくは順序又は方法の動作が実施される時間的順序を含意するものでなく、単に特定の名称の1つのクレーム要素を同じ名称（その序数用語の使用を別にすれば）の別の要素と区別するための符丁として使用される。同様に、a）、b）等、又はi）、ii）等の使用自体は、特許請求の範囲におけるステップの何らかの優先、先行又は順序を含意するものでない。同様に、本明細書中でのこれらの用語の使用自体は、何らかの必須の優先、先行又は順序を含意するものでない。

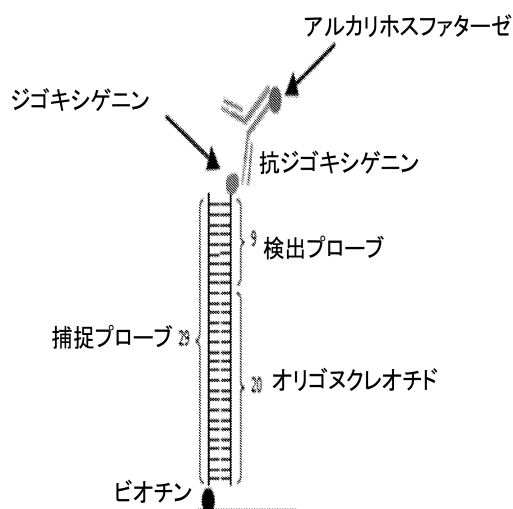
【0733】

前述の記載されている本明細書は、当業者が本発明を実施可能となるのに十分であると見なされる。提供される例によって本開示の範囲が限定されることはない。例は、本発明の1つ以上の態様の例示として意図され、他の機能的均等物の実施形態が本発明の範囲内にある。本明細書に示され、記載されるものに加えて、前述の記載から様々な変形形態が当業者に明らかになるであろうと共に、それらは、添付の特許請求の範囲内に含まれる。本発明の利点及び目的は、必ずしも本発明の各実施形態に包含されるとは限らない。

30

【図面】

【図1】



40

50

【配列表】

2022513719000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/65058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 15/113, 15/11, 15/09 (2020.01)

CPC - C12N 15/113, 15/11, 15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/0037399 A1 (WAVE LIFE SCIENCES LTD.) 09 February 2017; paragraphs [0005], [0166]-[0170], [0186], [0630]	1
A		2-3, 18, 32/18, 35, 49/35
A	KUPRYUSHKIN et al. 'Dodecyl-modified oligodeoxyribonucleotides as platform for oligonucleotide delivery into eukaryotic cells' 13th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society; 2017; abstract 057	2-3, 18, 32/18, 35, 49/35
A	WO 2003/025139 A2 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 27 March 2003; page 64, lines 11-14	2-3
A	US 2007/0292875 A1 (CROOKE et al.) 20 December 2007; paragraph [0019]	18, 32/18, 35, 49/35
A	WO 2011/109427 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 09 September 2011; page 38, second paragraph	18, 32/18, 35, 49/35

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

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April 2020 (27.04.2020)

Date of mailing of the international search report

04 MAY 2020

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/66058

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☒ Claims Nos.: 33, 34, 50-54, 58, 59 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: -***Please See Supplemental Page-*** 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 18, 32/18, 35, 49/35; AGUUUCCUUAGUAACCAAG [SEQ ID NO: 83] Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/65058

***Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking: ***

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-32, 35-49, and AGUUUCCUUAGUAACCACAG [SEQ ID NO: 83] (oligonucleotide sequence) are directed toward oligonucleotides, and compositions comprising said oligonucleotides.

The compositions and oligonucleotides will be searched to the extent they encompass AGUUUCCUUAGUAACCACAG [SEQ ID NO: 83] (first exemplary oligonucleotide sequence). Applicant is invited to elect additional oligonucleotide(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable bases, modifications, chirality or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional oligonucleotide sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1, 2, 3 (in-part), 18, 32 (in-part), 35, and 49 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 83 (oligonucleotide sequence). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected oligonucleotide sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 126 (oligonucleotide sequence).

Groups II+, Claims 55-57 and the first shown compound in Claim 55, wherein each of G1-G5 are each H (compound structure) are directed toward methods for preparing an oligonucleotide.

The methods can be searched to the extent they encompass the first shown compound in Claim 55, wherein each of G1-G5 are H (first exemplary compound structure). Applicant is invited to elect additional compound(s) with fully specified structure(s) thereof (i.e. no optional or variable atoms, bonds, or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional compound(s) can be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claim 55 (in-part) encompasses this first named invention of Groups II+ and thus this claim can be searched with payment of a fee for the search of Groups II+, to the extent that it encompasses the first shown compound in Claim 55, wherein each of G1-G5 are each H (compound structure). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected structure(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention of Groups II+, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) can result in only the first claimed invention of groups II+ to be searched/examined. An exemplary election would be the first shown compound in Claim 55, wherein G1 is aliphatic, and each of G2-G5 are H (compound structure).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include SEQ ID NO: 83, not present in any of Groups II+; the special technical features of Groups II+ include a method for preparing an oligonucleotide, not present in any of Groups I+.

Groups I+ and II+ share the technical features including: oligonucleotides.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2017/0037399 A1 to Wave Life Sciences Ltd. (hereinafter "Wave").

Wave discloses oligonucleotides (oligonucleotides; abstract).

No technical features are shared between the oligonucleotide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: an oligonucleotide composition comprising a plurality of oligonucleotides, wherein oligonucleotides of the plurality share: 1) a common base sequence, and 2) the same linkage phosphorus stereochemistry independently at one or more chiral internucleotidic linkages, and wherein the composition is enriched, relative to a substantially racemic preparation of oligonucleotides of the plurality, for oligonucleotides of the plurality, or wherein at least 5% of the oligonucleotides in the composition that share the common base sequence are oligonucleotides of the plurality; a composition, wherein all oligonucleotides in the composition are oligonucleotides each independently having a uniform structure of modifications and chiral pattern, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, including a 2'-F modified nucleoside; a Sp phosphorothioate, a 2'-OMe modified nucleoside; and a [(1,3-dimethylimidazolidin-2-ylidene)amino] group, wherein the phosphorus is of the Rp configuration.

However, these shared technical features are previously disclosed by Wave in view of the abstract 'Dodecyl-modified oligodeoxynucleotides as platform for oligonucleotide delivery into eukaryotic cells' by Kupryushkin et al. (hereinafter 'Kupryushkin').

Wave discloses an oligonucleotide composition comprising a plurality of oligonucleotides (an oligonucleotide composition comprising a plurality of oligonucleotides; paragraphs [0005], [0166]), wherein oligonucleotides of the plurality share: 1) a common base sequence (wherein oligonucleotides of the plurality share: a common base sequence; paragraphs [0166], [0167]), and 2) the same linkage phosphorus stereochemistry independently at one or more chiral internucleotidic linkages (the same linkage phosphorus stereochemistry independently at one or more chiral internucleotidic linkages; paragraphs [0168], [0169]), and wherein the composition is enriched, relative to a substantially racemic preparation of oligonucleotides of the plurality, for oligonucleotides of the plurality (and wherein the composition is enriched, relative to a substantially racemic preparation of oligonucleotides of the plurality, for oligonucleotides of the plurality; paragraph [0170]); a composition, wherein all oligonucleotides in the composition are oligonucleotides each independently having a uniform structure of modifications and chiral pattern (a composition, wherein the oligonucleotides are of a single type (all oligonucleotides in the composition are oligonucleotides each independently having a uniform structure of modifications and chiral pattern); paragraphs [0107], [0108]), including a 2'-F modified nucleoside (including a 2'-F modified nucleoside; paragraphs [0189], [1067]); a Sp phosphorothioate (a Sp Phosphorothioate; paragraphs [0058], [0104], [0127]), and a 2'-OMe modified nucleoside (a 2'-OMe modified nucleoside; paragraphs [0189], [1067]).

Continued Within the Next Supplemental Box.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/65058

-***-Continued from Previous Supplemental Box-***-

Wave does not disclose a [(1,3-dimethylimidazolidin-2-ylidene)amino]phosphonic acid, wherein the phosphorus is of the Rp configuration.

Kupryushkin discloses the use of oligonucleotide derivatives comprising uncharged phosphoryl guanidine analog 1,3-dimethylimidazolidine-2-imino groups for the delivery of oligonucleotides to cells (use of oligonucleotide derivatives comprising uncharged phosphoryl guanidine analog 1,3-dimethylimidazolidine-2-imino groups for the delivery of oligonucleotides to cells; abstract)

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Wave to have included the use of 1,3-dimethylimidazolidine-2-imino group containing chirally specific internucleotidic linkages, as disclosed by Kupryushkin, in order to provide an oligonucleotide with both chiral specificity, as disclosed by Wave, and an uncharged backbone, as disclosed by Kupryushkin, for enhanced delivery of the oligonucleotide to cells.

No technical features are shared between the compounds of Groups II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups II+ share the technical features including: a method for preparing an oligonucleotide or an oligonucleotide composition thereof, comprising providing: a phosphoramidite compound comprising a chiral auxiliary moiety having the first structure for a phosphoramidite compound shown in Claim 55 (a method for preparing an oligonucleotide or an oligonucleotide composition thereof, comprising providing: a phosphoramidite compound comprising a chiral auxiliary moiety having the structure of Formula 3-I (the first structure for a phosphoramidite compound shown in Claim 55); paragraphs [0665], [0666]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ and II+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Wave and Kupryushkin references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類 **F I** テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071(2010.01) **C 1 2 N** 5/071

(32)優先日 令和1年5月10日(2019.5.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/916,192
(32)優先日 令和1年10月16日(2019.10.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/916,194
(32)優先日 令和1年10月16日(2019.10.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 内藤 和彦

- (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, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 ヴァルギーズ, 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, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンシズ 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, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 シヴァリラ, チック シャクティ
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, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 コターリ, ナヤンタラ
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, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 ダービン, アン フィーゲン
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, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 ラマサミー, セルヴィ
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, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 カンダサミー, パチャムトゥ
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, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内

- (72)発明者 クマラサミー, ジャヤカント
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 ボミネニ, ゴパル レディ
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ 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 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 ディヴァカラメノン, セトゥマドハヴァン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 バトラー, デイヴィット チャールズ ドネール
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 ルー, ゲンリャン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 ヤン, ハイリン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 清水 護
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 モニアン, パラシャント
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- (72)発明者 ルー, コア ノック ダン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02138, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7
33, ウェイブ ライフ サイエンシズ リミテッド内
- F ターム (参考) 4B065 AA93X AB01 AC20 BA01 CA60
4C084 AA13 NA14 ZA941 ZA942
4C086 AA01 AA02 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA94