

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-550915

(P2022-550915A)

(43)公表日 令和4年12月5日(2022.12.5)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04		
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全238頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-520976(P2022-520976)	(71)出願人	516212924		
(86)(22)出願日	令和2年10月5日(2020.10.5)		ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド		
(85)翻訳文提出日	令和4年4月19日(2022.4.19)		WAVE LIFE SCIENCES LTD.		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/054307		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	WO2021/071788	(74)代理人	100079108		
(87)国際公開日	令和3年4月15日(2021.4.15)		弁理士 稲葉 良幸		
(31)優先権主張番号	62/911,340	(74)代理人	100109346		
(32)優先日	令和1年10月6日(2019.10.6)		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	62/983,736		弁理士 江口 昭彦		
(32)優先日	令和2年3月1日(2020.3.1)	(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/US2020/032244				
		最終頁に続く	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 オリゴヌクレオチド組成物及びその使用方法

(57)【要約】

とりわけ、本開示は、C9orf72オリゴヌクレオチド、組成物及びその方法を提供する。一部の実施形態において、本開示は、筋萎縮性側索硬化症及び前頭側頭型認知症などのC9orf72関連病態、障害又は疾患を治療する方法を提供する。

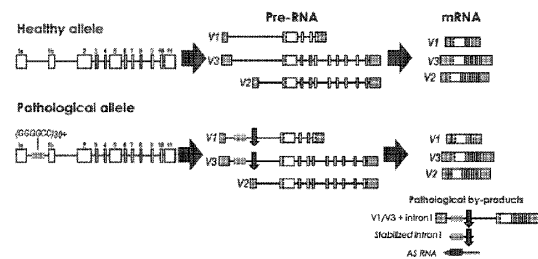


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖、塩基又はヌクレオチド間結合の少なくとも 1 つの修飾を含むオリゴヌクレオチドにおいて、前記オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C 9 o r f 7 2 遺伝子又はその転写物の塩基配列と少なくとも 8 0 % 同一であるか又は相補的である塩基配列の少なくとも 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 又は 2 5 隣接塩基であるか又はそれを含み、且つ前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G 及び C から選択される置き換え核酸塩基によって任意選択で置き換えられていることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、糖、塩基又はヌクレオチド間結合の少なくとも 1 つの修飾を含み、前記オリゴヌクレオチドの前記塩基配列は、C 9 o r f 7 2 遺伝子又はその転写物の塩基配列と同一であるか又は相補的である塩基配列の少なくとも 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 又は 2 5 隣接塩基を含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、前記オリゴヌクレオチドの前記塩基配列は、A C T C A C C C A C T C G C C A C C G C であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、前記 C 9 o r f 7 2 転写物を含む系に投与されたとき、リピート伸長含有 C 9 o r f 7 2 転写物のレベルを低減し、前記リピート伸長含有 C 9 o r f 7 2 転写物は、少なくとも 3 0、5 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0 又は 1 0 0 0 個の G G G G C リピートを含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、パーセンテージによって測定されるときの前記リピート伸長含有 C 9 o r f 7 2 転写物のレベルの低減は、パーセンテージによって測定されるときの前記リピート伸長含有 C 9 o r f 7 2 転写物のレベルの低減の少なくとも 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2. 5、3、4、5、6、7、8、9 又は 1 0 倍であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 3 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィングーコアーウィングー3'構造を含むか又はそれからなり、各ウィング糖は、独立に 2'-OR 修飾を含み、式中、R は、任意選択で置換された C₁~6 脂肪族であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、前記 5'-ウィングは、1 つ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合と 1 つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合とを含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、前記 3'-ウィングは、1 つ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合と 1 つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合とを含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィング及び前記 3'-ウィングの各々は、独立に 3、4、5、6、7、8、9 又は 1 0 個の核酸塩基を含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 0】

請求項 9 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、各コア糖は、独立に 2 つの 2' - H を含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、前記オリゴヌクレオチド又は前記コアは、

$(Np)_t [(Op/Rp)_n (Sp)_m] y$

(式中、

t は、1 ~ 50 であり、

n は、1 ~ 10 であり、

m は、1 ~ 50 であり、

y は、1 ~ 10 であり、

Np は、Rp 又は Sp の何れかであり；

Sp は、キラル修飾ヌクレオチド間結合のキラルな結合リンの S 配置を示し、

Op は、天然リン酸結合のアキラルな結合リンを示し、及び

Rp は、キラル修飾ヌクレオチド間結合のキラルな結合リンの S 配置を示し、及び

y は、1 ~ 10 である)

の骨格キラル中心 (結合リン) のパターンを含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、各 Np は、Sp であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、前記パターンは、 $(Np)_t [(Rp)_n (Sp)_m] y$ であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、各 n は、1 であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

請求項 14 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、y は、1 であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

請求項 14 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、y は、2 であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

請求項 14 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、t は、2 以上であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

請求項 14 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、t は、3 以上であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

請求項 14 に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、各 m は、独立に 2 ~ 20 であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 20】

$m A^* S m_5 C e o \quad n 0 0 1 R \quad T e o \quad m_5 C e o \quad n 0 0 1 R \quad m A^* S \quad C^* S \quad C^* S \quad C^* R \quad A^* S \quad C^* S \quad T^* S \quad m_5 C^* S \quad G^* R \quad m_5 C^* S \quad C^* S \quad m A^* S \quad m C \quad n 0 0 1 R \quad m_5 C e o^* S \quad m G^* S \quad m C$

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される塩において、式中、

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し、

* S は、Sp ホスホロチオエート結合を表し、

m₅ C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し、

n 0 0 1 R は、Rp n 0 0 1 結合を表し、n 0 0 1 結合は、

10

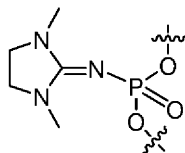
20

30

40

50

【化 1】



の構造を有し、

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し、

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し、及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表すことを特徴とするオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩。

10

【請求項 2 1】

m A * S m 5 C e o n 0 0 1 R T e o m 5 C e o n 0 0 1 R m A * S C *
S C * S C * R A * S C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S
m A * S m C * S m 5 C e o n 0 0 1 R m G * S m 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される塩において、式中、

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し、

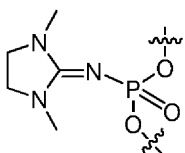
* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し、

m 5 C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し、

n 0 0 1 R は、R p n 0 0 1 結合を表し、n 0 0 1 結合は、

20

【化 2】



の構造を有し、

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し、

* R は、R p ホスホロチオエート結合を有し、及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表すことを特徴とするオリゴヌクレオチド又は薬学的に許容されるその塩。

30

【請求項 2 2】

m A * S m 5 C e o n 0 0 1 R T e o m 5 C e o n 0 0 1 R m A * S C *
S C * S C * R A * S C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S
m A * S m C * S m 5 C e o * S m G n 0 0 1 R m 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される塩において、式中、

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し、

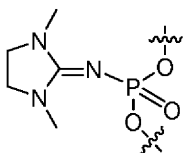
* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し、

m 5 C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し、

n 0 0 1 R は、R p n 0 0 1 結合を表し、n 0 0 1 結合は、

40

【化 3】



の構造を有し、

50

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し、

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し、及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表すことを特徴とするオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 2 3】

m C * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S T * S C * R A * S
C * S C * R C * S A * S C * S T * S m 5 m C * S m G * S m C * S
m 5 m C * S m 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される塩において、式中、

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し、

* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し、

m 5 C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し、

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し、

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し、及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表すことを特徴とするオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 2 4】

m A * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S C * S C * R A * S
C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C * S m 5 m C
* S m G * S m 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される塩において、式中、

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し、

* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し、

m 5 C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し、

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し、

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し、及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表すことを特徴とするオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 2 5】

m C * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S T * S C * R A * S
C * S C * R C * S A * S C * S T * S m 5 C e o * S m G * S m C * S
m 5 C e o * S m 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される塩において、式中、

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し、

* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し、

m 5 C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し、

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し、

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し、及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表すことを特徴とするオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 2 6】

m A * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S C * S C * R A * S
C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C * S m 5 C e
o * S m G * S m 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される塩において、式中、

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し、

* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し、

m 5 C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し、

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し、

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し、及び

10

20

30

40

50

m 5 は、C の 5 位のメチルを表すことを特徴とするオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 27】

請求項 1～26 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、薬学的に許容される塩形態であることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 28】

請求項 1～27 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G 及び C から選択される異なる核酸塩基によって任意選択で置き換えられていることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 29】

請求項 1～28 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、前記オリゴヌクレオチド中の各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立に少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% のジアステレオマー純度を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 30】

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

を有する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において、前記組成物中の前記複数のオリゴヌクレオチドのレベルはランダムでなく、及び前記複数の各オリゴヌクレオチドは、独立に請求項 1～28 の何れかに記載のオリゴヌクレオチド又はその塩形態であることを特徴とする組成物又は

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において、

前記複数のオリゴヌクレオチドは、同じ構成のものであり、

前記複数のオリゴヌクレオチドは、1 つ以上（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 又はそれを超える）のキラル制御されたヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有し、

同じ共通の塩基配列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、前記組成物が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について集積されており、及び

前記複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に請求項 1～28 の何れかに記載のオリゴヌクレオチド又はその塩形態であることを特徴とする組成物又は

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において、

前記複数のオリゴヌクレオチドは、同じ構成のものであり、

前記複数のオリゴヌクレオチドは、1 つ以上（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 又はそれを超える）のキラル制御されたヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有し、

各キラル制御されたヌクレオチド間結合で、同じ構成を共有する組成物中の全てのヌクレオチドの少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% は、同じ結合リン立体化学を共有し、及び

前記複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に請求項 1～28 の何れかに記載のオリゴヌクレオチド又はその塩形態であることを特徴とする組成物。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の組成物において、前記特定のタイプのオリゴヌクレオチド又は前記複数のオリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を共有する組成物中の全てのオリゴヌクレオチドの 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% 又は約 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 若しく

10

20

30

40

50

は 1 0 0 % 又は少なくとも 5 %、1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 若しくは 9 9 %) が、前記特定のタイプのオリゴヌクレオチド又は前記複数のオリゴヌクレオチドであるように集積されていることを特徴とする組成物。

【請求項 3 2】

請求項 3 0 又は 3 1 に記載の組成物において、前記複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも 5 つのヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有することを特徴とする組成物。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の組成物において、前記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ヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有することを特徴とする組成物。

10

【請求項 3 4】

請求項 3 3 に記載の組成物において、前記複数のオリゴヌクレオチドは、独立に各キラルヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有することを特徴とする組成物。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 に記載の組成物において、前記複数又はタイプのオリゴヌクレオチドは、同じ構造を共有することを特徴とする組成物。

【請求項 3 6】

請求項 3 1 に記載の組成物において、前記複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に請求項 2 0 に記載のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする組成物。

20

【請求項 3 7】

請求項 3 1 に記載の組成物において、前記複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に請求項 2 1 に記載のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする組成物。

【請求項 3 8】

請求項 3 1 に記載の組成物において、前記複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に請求項 2 2 に記載のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする組成物。

【請求項 3 9】

請求項 3 1 に記載の組成物において、前記複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に請求項 2 3 に記載のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする組成物。

30

【請求項 4 0】

請求項 3 1 に記載の組成物において、前記複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に請求項 2 4 に記載のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする組成物。

【請求項 4 1】

請求項 3 1 に記載の組成物において、前記複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に請求項 2 5 に記載のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする組成物。

【請求項 4 2】

請求項 3 1 に記載の組成物において、前記複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に請求項 2 6 に記載のオリゴヌクレオチドであることを特徴とする組成物。

【請求項 4 3】

請求項 3 5 ～ 4 2 の何れか 1 項に記載の組成物において、各オリゴヌクレオチドは、独立に塩形態であることを特徴とする組成物。

40

【請求項 4 4】

医薬組成物において、請求項 1 ～ 4 3 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド又は組成物を含むか又は送達し、且つ薬学的に許容される担体を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 4 5】

方法において、C 9 o r f 7 2 伸長リピートに関連する病態、障害及び／又は疾患に罹患しているか又はそれに罹り易い対象に、有効量の請求項 1 ～ 4 4 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド又は組成物を投与することを含むことを特徴とする方法。

50

【請求項 46】

請求項 45 に記載の方法において、前記病態、障害及び／又は疾患は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）であることを特徴とする方法。

【請求項 47】

請求項 45 に記載の方法において、前記病態、障害及び／又は疾患は、前頭側頭型認知症（FTD）であることを特徴とする方法。

【請求項 48】

細胞における C9orf72 標的遺伝子又はその遺伝子産物の活性、発現及び／又はレベルを低下させる方法において、請求項 1～44 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド又は組成物を前記細胞に導入することを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 49】

細胞の集団におけるフォーカスを低減する方法において、請求項 1～44 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド又は組成物を前記細胞に接触させることを含むことを特徴とする方法。

【請求項 50】

請求項 49 に記載の方法において、フォーカスを有する細胞のパーセンテージを低減することを特徴とする方法。

【請求項 51】

請求項 49 又は 50 に記載の方法において、細胞当たりのフォーカスの数を低減することを特徴とする方法。

20

【請求項 52】

細胞の集団におけるジペプチドリピート（DPR）タンパク質のレベルを低減する方法において、前記細胞を、請求項 1～44 の何れか一項に記載のオリゴヌクレオチド又は組成物に接触させることを含むことを特徴とする方法。

【請求項 53】

前記 DPR タンパク質は、ポリ-GP、ポリ-GA 又はポリ-GR を含むことを特徴とする、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

請求項 49～53 の何れか一項に記載の方法において、前記細胞は、ヒト対象中にあることを特徴とする方法。

30

【請求項 55】

細胞において非リピート伸長含有 C9orf72 RNA 転写物に対してリピート伸長含有 C9orf72 RNA 転写物を優先的にノックダウンする方法において、前記リピート伸長含有 C9orf72 RNA 転写物及び前記非リピート伸長含有 C9orf72 RNA 転写物を含む細胞を、請求項 1～44 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド又は組成物に接触させることを含み、

前記オリゴヌクレオチドは、前記リピート伸長含有 C9orf72 RNA 転写物中に存在するか又はその中の配列に相補的な配列を含み、

前記オリゴヌクレオチドは、細胞において、非リピート伸長含有 C9orf72 RNA 転写物に対してリピート伸長含有 C9orf72 RNA 転写物の優先的なノックダウンを導くことを特徴とする方法。

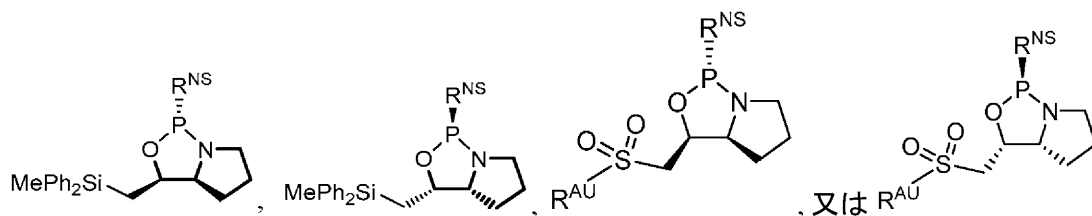
40

【請求項 56】

請求項 1～44 の何れか一項に記載のオリゴヌクレオチド又は組成物を調製する方法において、

50

【化 4】



又はその塩の構造を有するホスホラミダイトを、ヌクレオシド又はオリゴヌクレオチドの-OHに接触させることを含み、式中、 R^{AU} は、 $C_{1\sim 20}$ 脂肪族、1~10個のヘテロ原子を有する $C_{1\sim 20}$ ヘテロ脂肪族、 $C_{6\sim 20}$ アリール、 $C_{6\sim 20}$ アリール脂肪族、1~10個のヘテロ原子を有する $C_{6\sim 20}$ アリールヘテロ脂肪族、1~10個のヘテロ原子を有する5~20員ヘテロアリール及び1~10個のヘテロ原子を有する3~20員ヘテロシクリルから選択される、任意選択で置換された基であり、及び R^{NS} は、任意選択で置換又は保護されたヌクレオシドであることを特徴とする方法。

10

【請求項 57】

化合物、オリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、実施形態1~218の何れか1つのものであることを特徴とする化合物、オリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、各々の全体が参照によって本明細書に援用される2019年10月6日に出願された同第62/911,340号、2020年3月1日に提出された同第62/983,736号、及び2020年8月24日に提出された同第63/069,704号、及び2020年5月8日に提出されたPCT/US2020/032244号の優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

オリゴヌクレオチドは、様々な適用、例えば、限定はされないが、様々な状態、障害又は疾患の治療を含め、治療、診断及び／又は研究適用において有用である。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本開示は、C9orf72転写物（又はその産物）のレベルを低減することのできるオリゴヌクレオチド及びその組成物を提供する。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及び組成物は、疾患関連C9orf72転写物（又はその産物）のレベルを非疾患関連又は低疾患関連C9orf72転写物に対して優先的に低減することができる（例えば、図1を参照されたい）。例示的なC9orf72転写物には、C9orf72遺伝子の何れか一方の鎖及び様々な起点からの転写物が含まれる。一部の実施形態において、少なくとも一部のC9orf72転写物は、タンパク質に翻訳される。一部の実施形態において、少なくとも一部のC9orf72転写物は、タンパク質に翻訳されない。一部の実施形態において、特定のC9orf72転写物は、主にイントロン配列を含む。

40

【0004】

C9orf72におけるヘキサヌクレオチドリピート伸長（9番染色体、オープンリーディングフレーム72）は、報告によれば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）及び前頭側頭型認知症（FTD）の遺伝的原因として最も多く見られる。このリピート伸長を含むC9orf72遺伝子変異体及び／又はそれをコードする産物は、大脳皮質基底核変性症候群（CBD）、非定型パーキンソン症候群、オリブ橋小脳変性症（OPCD）、原発性側索硬化症（PLS）、進行性筋萎縮症（PMA）、ハンチントン病（HD）表現型模写、

50

アルツハイマー病（A D）、双極性障害、統合失調症及び他の非運動障害など、他のC 9 o r f 7 2 関連障害にも関連する。一部の実施形態において、本開示は、C 9 o r f 7 2 標的を標的とし（例えば、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド）、且つC 9 o r f 7 2 標的遺伝子及び／又はその遺伝子産物（転写物、特にリピート伸長含有転写物、タンパク質等）をノックダウンする能力又はその発現、レベル及び／又は活性を低下させる能力を有するオリゴヌクレオチドに関する組成物及び方法を提供する。

【0005】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、リピート伸長を含む病的な又は疾患関連のC 9 o r f 7 2 突然変異又は変異体を標的とする。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 遺伝子産物は、C 9 o r f 7 2 遺伝子から転写されたRNA（例えば、mRNA、成熟RNA又はプレmRNA）、C 9 o r f 7 2 RNA転写物から翻訳されたタンパク質（例えば、ヘキサヌクレオチドリピートから翻訳されたジペプチドリピートタンパク質）又はフォーカス（focus）（複数形：フォーカス（foci））（これは、報告によれば、RNA結合タンパク質が結合したリピート伸長を含むRNAを含む）である。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、非リピート伸長含有C 9 o r f 7 2 RNA（リピート伸長を含有しないC 9 o r f 7 2 RNA）に対してリピート伸長含有C 9 o r f 7 2 RNAの優先的なノックダウンを媒介する能力を有する。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、野生型又は非有害C 9 o r f 7 2 遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルを低下させることなく（又は非常に低い程度まで低下している間）、有害C 9 o r f 7 2 遺伝子産物（例えば、リピート伸長を含むRNA、ジペプチドリピートタンパク質又はフォーカス）の発現、活性及び／又はレベルを低下させる。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、有害C 9 o r f 7 2 遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルを低下させるが、C 9 o r f 7 2 タンパク質の1つ又は複数の有益な及び／又は必須の生物学的活性を消失させるか又は大幅に抑制するほど野生型又は非有害C 9 o r f 7 2 タンパク質の発現、活性及び／又はレベルを低下させない。C 9 o r f 7 2 タンパク質の有益な及び／又は必須の活性は、広く知られており、限定はされないが、炎症の制限、自己免疫の予防及び若年死の予防が挙げられる。

【0006】

とりわけ、本開示は、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドの構造要素を制御することが、C 9 o r f 7 2 標的遺伝子のノックダウンを含め、オリゴヌクレオチドの特性及び／又は活性に対する大きい影響を有し得るという認識を包含する。一部の実施形態において、標的遺伝子のノックダウンは、RNAアーゼH又は翻訳に影響を及ぼす立体障害により媒介される。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドの制御された構造要素としては、限定はされないが、塩基配列、化学修飾（例えば、糖、塩基及び／若しくはヌクレオチド間結合の修飾）若しくはそのパターン、立体化学（例えば、骨格キラルヌクレオチド間結合の立体化学）の改変若しくはそのパターン、ウィング構造、コア構造、ウィングーコア構造、ウィングーコアーウィング構造若しくはコアーウィング構造及び／又は追加の化学的部分（例えば、炭水化物部分、ターゲティング部分等）とのコンジュゲーションが挙げられる。一部の実施形態において、本開示は、安定性が改善されたオリゴヌクレオチドの組成物を含め、オリゴヌクレオチド活性を維持し又は増加させつつ、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド安定性を改善するための技術（例えば、化合物、方法等）を提供する。一部の実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、C 9 o r f 7 2 又はその産物を標的とする。一部の実施形態において、標的遺伝子は、C 9 o r f 7 2 である。

【0007】

一部の実施形態において、本開示は、炭水化物部分、ターゲティング部分など、様々な任意選択の追加の化学的部分が、c 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドに取り込まれると、1つ以上の特性を改善し得るという認識を包含する。一部の実施形態において、追加の化学的部分は、グルコース、G l u N A c（N-アセチルアミングルコサミン）及びアニス

アミド部分から選択される。これら及び他の部分については、本明細書、例えば実施例 1 及び 2 に更に詳細に記載される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、2 つ以上の追加の化学的部分を含むことができ、ここで、追加の化学的部分は、同一であるか若しくは同一でないか、又は同じカテゴリー（例えば、炭水化物部分、糖部分、ターゲティング部分等）であるか若しくは同じカテゴリーでない。一部の実施形態において、特定の追加の化学的部分は、限定はされないが、中枢神経系の特定の細胞、部位又は一部分（例えば、大脳皮質、海馬、脊髄等）を含め、所望の細胞、組織及び／又は器官へのオリゴヌクレオチドの送達を促進する。一部の実施形態において、特定の追加の化学的部分は、オリゴヌクレオチドのインターナリゼーションを促進する。一部の実施形態において、特定の追加の化学的部分は、オリゴヌクレオチド安定性を増加させる。一部の実施形態において、本開示は、様々な追加の化学的部分をオリゴヌクレオチドに取り込む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、ヌクレオチド間結合、糖及び／又は核酸塩基を用いて（例えば、任意選択でリンカーを介した糖、核酸塩基又はヌクレオチド間結合上の部位との共有結合により）追加の化学的部分を導入するための例えば試薬及び方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0008】

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通りの 1 つ以上の特徴〔限定はされないが、本明細書に開示される塩基配列（ここで、各 U は、任意選択で、独立に T に置換することができ、逆も同様である）、及び／若しくは化学修飾、及び／若しくは立体化学、及び／若しくはそのパターン並びに／又はこれらの組み合わせ〕がその構造に含まれるオリゴヌクレオチド、例えば C9orf72 オリゴヌクレオチドにより、驚くほど高い標的特異性を実現し得ることを実証する。

【0009】

一部の実施形態において、本開示は、特定の提供される構造要素、技術及び／又は特徴が、C9orf72 をノックダウンするオリゴヌクレオチドに特に有用であることを実証する。しかしながら、それにも関わらず、本開示の教示は、いかなる特定の生化学的機構に関与するか又はそれによって機能するオリゴヌクレオチドにも限定されない。一部の実施形態において、本開示は、二本鎖 RNA 干渉、一本鎖 RNA 干渉などの機構又は RNアーゼ H 媒介機構若しくは翻訳の立体障害によって C9orf72 遺伝子若しくはその遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルを低下させるアンチセンスオリゴヌクレオチドとしての役割を果たす機構を介して機能する能力を有するオリゴヌクレオチドを提供する。

【0010】

更に、本開示は、任意の機構を通じて機能する任意の C9orf72 オリゴヌクレオチドであって、本明細書に記載される任意の配列、構造又はフォーマット（又はその一部分）を含む任意の C9orf72 オリゴヌクレオチドに関し、ここで、オリゴヌクレオチドは、塩基、糖又はヌクレオチド間結合の少なくとも 1 つの天然に存在しない修飾を含む。一部の実施形態において、本開示は、少なくとも 1 つの立体制御されたヌクレオチド間結合（限定はされないが、Sp 又は Rp 配置のホスホロチオエート結合を含む）を含む任意の C9orf72 オリゴヌクレオチドに関する。一部の実施形態において、本開示は、任意の機構を通じて機能し、且つ少なくとも 1 つの立体制御されたヌクレオチド間結合（限定はされないが、Sp 又は Rp 配置のホスホロチオエート結合を含む）を含む任意の C9orf72 オリゴヌクレオチドに関する。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任意の配列、構造又はフォーマット（又はその一部分）、任意選択の追加の化学的部分（限定はされないが、炭水化物部分及び標的部分を含む）、立体化学又は立体化学のパターン、ヌクレオチド間結合又はヌクレオチド間結合のパターン；糖の修飾又は糖の修飾のパターン；塩基の修飾又は塩基の修飾のパターンを含む C9orf72 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、糖、核酸塩基又はヌクレオチド間結合の修飾は、天然に存在しない修飾である。

【0011】

一部の実施形態において、C9orf72 障害関連標的アレルは、限定はされないが、

G 4 C 2 又は (G G G G C C) n g (式中、n g は、30 以上である)を含めた、ヘキサヌクレオチドリピート伸長をイントロン1に含む。一部の実施形態において、n g は、50 以上である。一部の実施形態において、n g は、100 以上である。一部の実施形態において、n g は、150 以上である。一部の実施形態において、n g は、200 以上である。一部の実施形態において、n g は、300 以上である。一部の実施形態において、n g は、500 以上である。

【0012】

イントロン1のC9orf72 G4C2リピート伸長は、報告によれば、ヨーロッパ系集団の中で10例中1例のALS症例を占める。G4C2リピートは、報告によれば、転写物の約10%に過ぎず(例えば、図1に示される病的アレルの転写物V3及びV1)、例えばリピート伸長含有転写物、及び／又はスプライスアウトされたリピート伸長含有イントロン、及び／又はリピート伸長含有領域のアンチセンス転写及び様々な核酸結合タンパク質による、少なくとも部分的にジペプチドリピータンパク質及びフォーカス形成によって媒介される機能獲得毒性を伴う。一部の実施形態において、V1は、報告によれば、極めて低いレベルで転写され(C9orf72転写物レベル全体の約1%)、ヘキサヌクレオチドリピート伸長を含む転写物のレベルに大きく寄与しない。報告によれば、リピート伸長を含有するイントロン核酸は、pre-mRNA、部分的にスプライシングされたRNA及び／又はスプライスアウトされたイントロンとして滞留することができ、これらの核酸を含むRNAフォーカスは、RNA結合タンパク質の隔離に関連する。C9orf72 RNAフォーカスについては、例えば、Liu et al., 2017, Cell Chemical Biology 24, 1-8; Niblock et al. Acta Neuropathologica Communications (2016) 4:18に記載されている。ジペプチドリピータンパク質(DPRタンパク質)を含む異常タンパク質産物は、報告によれば、リピート伸長から産生され、ニューロンに対する毒性を伴う。一部の実施形態において、本開示は、G4C2リピートの近くのイントロン配列を標的とし、且つリピート伸長含有転写物、それによってコードされるタンパク質及び／又は関連するフォーカスのレベルを低減することのできるオリゴヌクレオチド並びにその組成物及び使用方法を提供する。一部の実施形態において、本開示は、G4C2リピートの近くのイントロン配列を標的とすることにより、正常なC9orf72転写物への影響を最小限に抑えつつ、RNアーゼHを介してリピート伸長含有転写物を特異的にノックダウンするC9orf72オリゴヌクレオチド及びその組成物を提供する。一部の実施形態において、既存のデータと比較して、本開示は、イントロン配列(例えば、リピートとエクソン1bとの間)を標的とする提供される技術がリピート伸長含有産物レベルを有効に且つ／又は優先的に低減できることを実証する。

【0013】

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、リピート伸長の有害な疾患関連の効果について幾つかの可能な機構が文献に提案されていることを指摘しておく。例えば、Edbauer et al. 2016 Curr. Opin. Neurobiol. 36:99-106; Conlon et al. Elife. 2016 Sep 13; 5: pii: e17820; Xi et al. 2015 Acta Neuropathol. 129:715-727; Cohen-Hada et al. 2015 Stem Cell Rep. 7:927-940; 及びBurguete et al. Elife 2015; 4: e08881を参照されたい。とりわけ、本開示は、1つ以上又は全ての有害な疾患関連のC9orf72産物及び／又は疾患関連効果を低減又は除去することのできる技術を提供する。

【0014】

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、リピート伸長含有C9orf72転写物の有害効果の可能な機構がフォーカスの生成であることを指摘しておく。報告によれば、リピート伸長は、イントロン1含有C9orf72 mRNAの滞留をもたらす。イントロン1を保持するC9orf72 mRNAの大多数

は、核に蓄積し、そこで、G4C2 RNAリピートをプロセッシングできない特異的分解経路の標的となる。RNAは、続いて、凝集してフォーカスとなり、フォーカスは、RNA結合タンパク質も含み、RNA結合タンパク質をその正常機能から隔離する。Niblock *Acta Neuropathol Commun.* 2016; 4:18。報告によれば、アンチセンスC9orf72産物を含むアンチセンスフォーカスは、小脳プルキンエニューロン及び運動ニューロンに著しく高頻度で存在する一方、センスフォーカスは、小脳顆粒ニューロンに著しく高頻度で存在する。Cooper-Knock *et al. Acta Neuropathol* (2015) 130:63-75。一部の実施形態において、本開示は、フォーカスレベルを低減する技術を提供する。一部の実施形態において、提供される技術は、1種以上のニューロンにおけるアンチセンスフォーカス及び／又はセンスフォーカスのレベルを低減するか又はそれを除去する。

10

【0015】

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、リピート伸長含有C9orf72転写物の別の可能な有害効果の機構がジペプチドリピート(DPR)タンパク質の生成であることを指摘しておく。イントロン1を保持するC9orf72 mRNAのごく一部が細胞質に輸送され、6つ全てのリーディングフレームにおいてDPRへのRAN(リピート関連非AUG翻訳)翻訳を受ける。Niblock *Acta Neuropathol Commun.* 2016; 4:18。Cooper-Knock *et al.* は、センス又はアンチセンス由来ジペプチドリピートタンパク質を含有する封入体がそれぞれ小脳顆粒ニューロン又は運動ニューロンに著しく高頻度で存在し；及びALSにおける一次病理標的である運動ニューロンでは、アンチセンスフォーカスの存在が、ALS神経変性の顕著な特徴であるTDP-43の誤った局在化と相関するが、センスフォーカスについて相関がなかったことも報告した。一部の実施形態において、提供される技術は、C9orf72 DPRタンパク質産物の1つ以上又は全てのレベルを低減する。

20

【0016】

一部の実施形態では、機能獲得型及び／又は機能喪失型の機構がC9orf72関連障害における神経変性につながる。例えば、Mizielinska *et al.* 2014 *Science* 345:1192-94; Chew *et al.* 2015 *Science* 348:1151-1154; Jiang *et al.* 2016 *Neuron* 90:535-550; 及びLiu *et al.* 2016 *Neuron* 90:521-534; Gendron *et al.* *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017 Jan 27. pii:a024224; Haessler *et al.* *Nat Rev Neurosci.* 2016 Jun; 17(6):383-95; Koppers *et al.* *Ann. Neurol.* 2015; 78:426-438; Todd *et al.* *J. Neurochem.* 2016 138 (Suppl. 1) 145-162を参照されたい。一部の実施形態において、提供される技術は、望ましくない獲得機能を低減し、且つ／又は所望の機能を回復若しくは亢進させる。

30

【0017】

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並びにその組成物及び使用方法は、限定はされないが、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を含め、幾つかのC9orf72関連障害の何れかの治療に有用である。一部の実施形態において、ALSは、MIM: 612069である。筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、報告によれば、臨床的に進行性麻痺により特徴付けられる致死性神経変性疾患であり、典型的には症状発症から2~3年以内に多くの場合に呼吸不全によって死亡に至る(Rowland and Shneider, *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344, 1688-1700)。ALSは、報告によれば、西欧諸国で3番目によく見られる神経変性疾患であり(Hirtz *et al.*, *Neurology*, 2007, 68, 326-337)、現在のところ有効な治療法はない。約10%の症例が本質的に家族性である一方、この疾患と診断され

40

50

る患者の大部分は、それが集団全体を通じて無作為に発生するように見えるため、散在性に分類される (Chio et al., *Neurology*, 2008, 70, 533-537)。報告によれば、臨床的、遺伝的及び疫学的データは、ALS及び前頭側頭型認知症 (FTD) が、中枢神経系全体にわたるTDP-43陽性封入体の存在によって病理学的に特徴付けられる一連の重複した疾患に相当するという仮説を裏付けている (Lillo and Hodges, *J. Clin. Neurosci.*, 2009, 16, 1131-1135; Neumann et al., *Science*, 2006, 314, 130-133)。幾つもの遺伝子、例えばSOD1、TARDBP、FUS、OPTN及びVCPが、古典的家族性ALSの原因である可能性があるものとして発見されている (Johnson et al., *Neuron*, 2010, 68, 857-864; Kwiatkowski et al., *Science*, 2009, 323, 1205-1208; Maruyama et al., *Nature*, 2010, 465, 223-226; Rosen et al., *Nature*, 1993, 362, 59-62; Sreedharan et al., *Science*, 2008, 319, 1668-1672; Vance et al., *Brain*, 2009, 129, 868-876)。報告によれば、ALS、FTD及びALS-FTDの複数の症例を含む血縁の連鎖解析では、C9orf72と同定された、この疾患についての重要な遺伝子座が9番染色体の短腕にあることが示唆されていた (Boxer et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2011, 82, 196-203; Morita et al., *Neurology*, 2006, 66, 839-844; Pearson et al., *J. Neurol.*, 2011, 258, 647-655; Vance et al., *Brain*, 2006, 129, 868-876)。この突然変異は、ALS及びFTDの最もよく見られる遺伝的原因であることが分かっていた。一部の実施形態において、ALS-FTDの原因となる突然変異は、9番染色体上のC9orf72遺伝子の第1イントロンにある大型ヘキサヌクレオチド (例えば、GGGGCC又はG₄C₂) リピート伸長である (Renton et al., *Neuron*, 2011, 72, 257-268; DeJesus-Hernandez et al., *Neuron*, 2011, 72, 245-256)。この領域に関連付けられる大多数の症例には、C9orf72遺伝子を網羅するファウンダーハプロタイプが存在する (Renton et al., *Neuron*, 2011, 72, 257-268)。9番染色体p21上のこの遺伝子座は、405人のフィンランド人患者コホートにおいて家族性ALSのほぼ半分以上を占め、全ALS症例のほぼ4分の1を占める (Laaksovirta et al., *Lancet Neurol.*, 2010, 9, 978-985)。ALS発生率は、報告によれば、1:50,000である。家族性ALSは、報告によれば、全ALS症例の5~10%に相当する; 報告によれば、C9orf72突然変異がALSの最もよく見られる原因であり得る (40~50%)。ALSは、報告によれば、脳の運動皮質、脳幹及び脊髄における上位及び下位運動ニューロンの両方の変性に関連する。報告によれば、ALSの症状には、筋脱力及び／又は筋萎縮、嚥下又は呼吸困難、筋痙攣、筋硬直が含まれる。報告によれば、呼吸不全が主な死因である。一部の実施形態において、提供される技術は、ALS又は他のC9orf72関連病態、障害及び／又は疾患に関連する重症度を低減し、且つ／又はその症状の1つ以上を除去する。

【0018】

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並びにその組成物及び使用方法は、限定はされないが、前頭側頭型認知症 (FTD) を含め、幾つかのC9orf72関連障害の何れかの治療に有用である。一部の実施形態において、FTDは、前頭側頭葉変性症又はFTLD、MIM: 600274と称される。前頭側頭型認知症は、報告によれば、2番目によく見られる形態の初老期認知症であり、報告によれば、前頭葉又は側頭葉の限局性萎縮に関連する。Boxer et al., 2005 *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 19 (Suppl 1): S3-S6。FTDは、筋萎縮性側索硬化症と広範な臨床的、病理学的及び分子的重複を共有する。Gijssels

inck, Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2017 Jan 27. pii: a026757 によって報告される通り、報告によれば、両方の疾患が起こる家族及び個人の患者 (ALS-FTD) があり (Lomen-Hoerth et al. 2002 Neurology 59:1077-1079)、ALS 及び FTL D 患者における TDP-43 封入体 (Arai et al. 2006 Biochem. Biophys. Res. Comm. 351:602-611; Neumann et al. 2006 Science 314:130-133) は、ALS 及び FTL D 患者について病理学的分布が異なるにも関わらず、区別不能であり得る (Tsujiet al. 2012 Brain 135:3380-3391)。報告によれば、ALS 及び FTL D には、それらの臨床的及び病理学的に顕著な特徴が重複するため、共通の疾患経路が関与し得るというエビデンスがある。従って、これらの疾患の純粋な形態は、1つの疾患連続体の両極であると思なされる (Lillo and Hodges 2009 J. Clin. Neurosci. 16:1131-1135)。報告によれば、遺伝学的研究では、FTL D 及び ALS において同じ遺伝子 - 例えば、TBK1、TARDBP、FUS、VCP に突然変異が同定された (Neumann et al. 2006; Kovacs et al. 2009 Mov. Disord. 24:1843-1847; Johnson et al. 2010 Neuron 68:857-864; Van Langenhove et al. 2010 Neurology 74:366-371; Cirulli et al. 2015 Science 347:1436-1441; Freischmidt et al. 2015 Nat. Neurosci. 18:631-636; Pottier et al. 2015 Acta Neuropathol. 130:77-92)。報告によれば、ALS、FTL D 及び ALS-FTD 患者の C9orf72 におけるリピート伸長突然変異の同定により、共通の疾患病理学的機構についての遺伝学的エビデンスが提供された (Gijssels et al. 2010 Arch. Neurol. 67:606-616; De Jesus-Hernandez et al. 2011 Neuron 72:245-256; Renton et al. 2011 Neuron 72:257-268)。

10

20

30

40

50

【0019】

一部の実施形態において、C9orf72 標的は、特異的アレル (例えば、リピート伸長を含むもの) であり、1つ以上の産物 (例えば、RNA 及び／又はジペプチドリピータンパク質若しくは DPR などのタンパク質産物) のレベル、発現及び／又は活性を変化させることが意図される。多くの実施形態において、C9orf72 標的アレルは、その存在及び／又は発現が、限定はされないが、ALS 及び FTD 又は他の C9orf72 関連障害又はその症状を含め、1つ以上の疾患及び／又は病態の存在、発生率及び／又は重症度に関連する (例えば、相関する) ものである。代わりに又は加えて、一部の実施形態において、C9orf72 標的アレルは、それについての1つ以上の遺伝子産物の発現、レベル及び／又は活性の変化が、限定はされないが、ALS 及び FTD 又は他の C9orf72 関連障害を含めた疾患及び／又は病態の1つ以上の側面の改善 (例えば、発症の遅延、重症度の低減、他の治療法に対する応答性等) に相関するものである。

【0020】

一部の実施形態において、神経学的疾患は、神経細胞の過剰興奮性によって特徴付けられる。一部の実施形態において、報告によれば、(GGGGCC)_n 伸長に起因して及び／又はその存在下で C9orf72 活性が 50% 減少すると、グルタミン酸受容体 NMDA、AMPA 及びカイナイトを通じた神経伝達が増加する。加えて、報告によれば、グルタミン酸受容体は、ニューロンに蓄積する。報告によれば、神経伝達の増加及びグルタミン酸受容体の蓄積は、神経細胞の過剰興奮性に起因するグルタミン酸誘導性の興奮毒性につながる。報告によれば、グルタミン酸受容体を阻害すれば、神経細胞の過剰興奮性が治療され得る。報告によれば、伸長から生成されるジペプチドリピータンパク質のクリアランスが障害され、その神経毒性が亢進する。C9orf72 は、報告によれば、RAB

5の活性化を通じて初期エンドソーム輸送を促進し、この活性化にはホスファチジルイノシトール3-リン酸 (phosphatidylinositol 3-phosphate) (PI3P) が必要である。PIKFYVEは、PI3Pをホスファチジルイノシトール(3,5)-ニリン酸(PI(3,5)P₂)に変換する。報告によれば、PIKFYVEを阻害すれば、PI3Pレベルの増加によってRAB5レベルの変化が補償され、初期エンドソーム成熟が可能となり、それが最終的にジペプチドリピータンパク質のクリアランスにつながり得る。報告によれば、ニューロンもエンドソーム輸送を用いてナトリウム及びカリウムイオンチャネル局在化を調節する。報告によれば、PIKFYVEの阻害によりまた、神経細胞の過剰興奮性も治療され得る。一部の実施形態において、提供される技術は、神経細胞の過剰興奮性を低減する。一部の実施形態において、提供される技術は、PIKFYVE阻害薬と同じ治療レジームの一環として投与され得る。

10

【0021】

一部の実施形態において、本開示は、

- 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

を共有する第1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を提供し、この組成物は、組成物中のランダムでないか又は制御されたレベルのオリゴヌクレオチド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ことにおいて単一のオリゴヌクレオチドの実質的に純粋な製剤である。

20

【0022】

一部の実施形態において、本開示は、C9orf72ノックダウンを導く能力を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含むC9orf72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) 共通の塩基配列及び長さ、
- 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

によって特徴付けられる特定のオリゴヌクレオチドタイプであり、

この組成物は、同じ塩基配列及び長さ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、この組成物が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について集積されていることにおいてキラル制御されている。

30

【0023】

一部の実施形態において、本開示は、同じ構成又は構造を共有する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を提供し、ここで、オリゴヌクレオチドは、1つ以上(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれを超える)のキラル制御されたヌクレオチド間結合を含む組成物を提供する。一部の実施形態において、複数の各オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C9orf72遺伝子又はその転写物の塩基配列又はその一部分と同一であるか又は相補的である15、16、17、18、19、20又はそれを超える連続核酸塩基を含む。

40

【0024】

一部の実施形態において、その標的配列と最大相補性についてアラインメントされるとき、提供されるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、1つ以上のミスマッチ(例えば、ATでもAUでもCGでもない)を含む。一部の実施形態において、ミスマッチは、3'末端に存在する。一部の実施形態において、1、2又は3つ以下のミスマッチが存在する。本明細書に実証される通り、塩基配列が1つ以上のミスマッチを含むオリゴヌクレオチドはその標的配列とアラインメントされたとき、予想外に、塩基配列がその標的配列に完全に相補的であるオリゴヌクレオチドと比較して高い活性(例えば、標的転写物及びRNアーゼHに接触させて標的転写物のレベルを低減するとき)、低い毒性などを提供し得る。

【0025】

50

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（これは、C 9 o r f 7 2を標的とするか又はC 9 o r f 7 2以外の標的を標的とすることができる）は、1つ以上のブロックを含む。一部の実施形態において、ブロックは、1つ以上の連続ヌクレオシド、及び／又はヌクレオチド、及び／又は糖又は塩基、及び／又はヌクレオチド間結合を含む。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、3つ以上のブロックを含み、ここで、両端のブロックは、同一でなく、従って、オリゴヌクレオチドは、非対称である。一部の実施形態において、ブロックは、ウィング又はコアである。

【0026】

一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのウィングと少なくとも1つのコアとを含み、ここで、ウィングがコアと異なる構造〔例えば、立体化学、追加の化学的部分又は糖、塩基若しくはヌクレオチド間結合における化学修飾（又はそのパターン）〕を含むことにおいて又は逆も同様に、ウィングは、コアと構造的に異なる。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、ウィングーコアーウィング構造を含む。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、ウィングーコア、コアーウィング又はウィングーコアーウィング構造を含み、ここで、1つのウィングは、構造〔例えば、立体化学、追加の化学的部分又は糖、塩基若しくはヌクレオチド間結合における化学修飾（又はそのパターン）〕において他のウィング及びコアと異なる（例えば、非対称オリゴヌクレオチド）。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ウィングーコア、コアーウィング又はウィングーコアーウィング構造を有するか又はそれを含み、ブロックは、ウィング又はコアである。一部の実施形態において、コアは、ギャップとも称される。

【0027】

一般に、本明細書に記載される通りのオリゴヌクレオチド組成物の特性は、任意の適切なアッセイを用いて評価することができる。

【0028】

当業者は、特定のオリゴヌクレオチド組成物に適切なアッセイを承知しており、且つ／又はそれを容易に開発することができるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1は、例示的C 9 o r f 7 2転写物を記載する。健常及び病的C 9 o r f 7 2アレルから産生されるV 3、V 2及びV 1転写物が示され、ここで、病的アレルは、ヘキサヌクレオチドリピート伸長〔水平のバー、(G G G G C C)₃₀₊で示される〕を含有する。下向きの矢印は、幾つかの例示的C 9 o r f 7 2オリゴヌクレオチドターゲットイングイントロンの位置を示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

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(Periodic Table of the Elements)、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、有機化学の一般的原理は、“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, 並びに“March’s Advanced Organic Chemistry”, 5th Ed., Ed.: Smith, M. b. 及びMarch, J., John Wiley & Sons, New York: 2001に記載されている。

【0031】

本開示において本明細書で使用されるとき、文脈から特に明確でない限り、(i)用語「a」又は「an」は、「少なくとも1つ」を意味すると理解することができ；(ii)用語「又は」は、「及び／又は」を意味すると理解することができ；(iii)用語「を含

10

20

30

40

50

む (comprising)」、「を含む (comprise)」、「を含め (including)」、「(「限定はされないが」と共に使用されるか否かを問わない) 及び「としては、～が挙げられる (include)」、「(「限定はされないが」と共に使用されるか否かを問わない) は、それら自体によって又は1つ以上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かかわらず、項目化された構成要素又はステップを包含すると理解することができ；(i v) 用語「別の」は、少なくとも追加の／第2の1つ以上を意味すると理解することができ；(v) 用語「約」又は「おおよそ」は、当業者によって理解される標準偏差を許容すると理解することができ、及び(v i) 範囲が提供される場合、終点を含める。

【0032】

別に記載のない限り、オリゴヌクレオチド及びその要素の記載（例えば、塩基配列、糖修飾、ヌクレオチド間結合、結合リン立体化学など）は、5' から3' の方向である。当業者が理解する通り、一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、塩形態として、特に薬学的に許容される塩形態、例えば、ナトリウム塩として提供し、及び／又は利用することができる。同様に当業者が理解する通り、一部の実施形態において、組成物内の個別のオリゴヌクレオチドは、そうした組成物（例えば、液体組成物）内で特定のそうしたオリゴヌクレオチドが特定の時点で（1つ以上の）異なる塩形態であり得る（且つ溶解させることができ、例えば、液体組成物中の場合、オリゴヌクレオチド鎖がアニオン形態として存在し得る）場合であっても、同じ構成及び／又は構造であるとみなすことができる。例えば、当業者は、所与のpHで、オリゴヌクレオチド鎖に沿う個別のヌクレオチド間結合が酸（H）形態であり得るか又は複数の考えられる塩形態（例えば、どのイオンが製剤又は組成物中に存在し得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、且つその酸形態（例えば、全てのカチオンを、存在する場合、H⁺で置き換える）が同じ構成及び／又は構造である限り、そうした個別のオリゴヌクレオチドは同じ構成及び／又は構造であると適切にみなすことができることを理解する。

【0033】

脂肪族：本明細書で使用される場合、「脂肪族」は、完全に飽和であるか、又は1つ若しくは複数の不飽和の単位を含む直鎖（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、或いは完全に飽和であるか又は1つ若しくは複数の不飽和の単位を含む、置換若しくは非置換単環、二環若しくは多環式炭化水素環（しかし、芳香族ではない）又はそれらの組み合わせを意味する。一部の実施形態では、脂肪族基は、1～50個の脂肪族炭素原子を含む。一部の実施形態では、脂肪族基は、1～20個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態では、脂肪族基は、1～10個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態では、脂肪族基は、1～9個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態では、脂肪族基は、1～8個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態では、脂肪族基は、1～7個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態では、脂肪族基は、1～6個の脂肪族炭素原子を含む。更に別の実施形態では、脂肪族基は、1～5個の脂肪族炭素原子を含み、また別の実施形態では、脂肪族基は、1、2、3又は4個の脂肪族炭素原子を含む。好適な脂肪族基として、限定はされないが、直鎖若しくは分岐状、置換若しくは非置換アルキル、アルケニル、アルキニル基並びに（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）アルケニルなどのハイブリッドが挙げられる。

【0034】

アルキル：本明細書で使用される場合、「アルキル」という用語には、当技術分野での通常の意味が付与され、直鎖アルキル基、分岐アルキル基、シクロアルキル（脂環式）基、アルキル置換シクロアルキル基及びシクロアルキル置換アルキル基をはじめとする飽和脂肪族基が挙げられる。一部の実施形態では、アルキルは、1～100炭素原子を有する。いくつかの実施形態では、直鎖又は分岐鎖アルキルは、その骨格に約1～20個の炭素原子（例えば、直鎖の場合にはC₁～C₂₀、分岐鎖の場合にはC₂～C₂₀）或いは約1～10個を有する。一部の実施形態では、シクロアルキル環は、その環構造に約3～10個の炭素原子を有し（その場合、こうした環は、単環、二環若しくは多環式である）或いはその環構造に約5、6又は7個の炭素を有する。一部の実施形態では、アルキル基は

、低級アルキル基であり得、ここで、低級アルキル基は、1～4個の炭素原子（例えば、直鎖低級アルキルの場合、 $C_1 \sim C_4$ ）を含む。

【0035】

動物：本明細書で使用されるとき、用語「動物」は、動物界の任意のメンバーを指す。一部の実施形態において、「動物」は、任意の発育段階にあるヒトを指す。一部の実施形態において、「動物」は、任意の発育段階にある非ヒト動物を指す。特定の実施形態において、非ヒト動物は、哺乳類（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類及び／又はブタ）である。一部の実施形態において、動物には、限定はされないが、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類及び／又は虫が含まれる。一部の実施形態において、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物及び／又はクローンであり得る。

10

【0036】

おおよそ：本明細書で使用される場合、数値に関する「おおよそ」又は「約」という用語は、一般に、別に記載がないか又は文脈から他の解釈が明らかでない限り、その数値の両方向で5%、10%、15%若しくは20%の範囲内にある（多いか又は少ない）数値を含むと解釈される（但し、そうした数値が、考えられる値の0%に満たなくなるか又は100%を超える場合を除く）。一部の実施形態では、投与量に関して「約」という用語を用いる場合、 $\pm 5 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ を意味する。

【0037】

アリール：本明細書で使用され、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」などのより大きい部分の一部として用いられる「アリール」という用語は、計5～30環員を有する単環、二環若しくは多環系を指し、ここで、その系の少なくとも1つの環は、芳香環である。一部の実施形態では、アリール基は、計5～14環員を有する単環、二環若しくは多環系を指し、ここで、その系の少なくとも1つの環は芳香族であり、且つその系の環は各々、3～7の環員を含む。一部の実施形態では、アリール基は、ビアリール基である。「アリール」という用語は、用語「アリール環」と置き換え可能に用いられ得る。本発明のいくつかの実施形態では、「アリール」は、限定されないが、フェニル、ピフェニル、ナフチル、ピナフチル、アントラシルなどを含む芳香環系を指し、これは、1つ又は複数の置換基を含み得る。また、用語「アリール」の範囲には、本明細書で使用される通り、芳香環が、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つ若しくは複数の非芳香環に融合されている基も含まれる。

20

30

【0038】

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）のセットの条件若しくは状況を表すために使用される。一部の実施形態では、同等セットの条件若しくは状況は、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若しく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。

40

【0039】

脂環式：「脂環式」、「炭素環」、「カルボシクリル」、「炭素環式基」及び「炭素環」という用語は、置き換え可能に用いられ、本明細書で使用される場合、別に記載のない限り、3～30の環員を有する、本明細書に記載されるような、飽和若しくは部分不飽和であるが、非芳香族の環状脂肪族単環、二環若しくは多環系を指す。脂環式基として、限定はしないが、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挙げられる。一部の実施形態では、脂環式基は、3～6個の炭素を有する。一部の実施形態では、

50

脂環式基は、飽和であり、且つ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テトラヒドロナフチルなどの1つ若しくは複数の芳香環又は非芳香環に融合された脂環も含み得る。一部の実施形態では、脂環式基は二環式である。一部の実施形態では、脂環式基は三環式である。一部の実施形態では、脂環式基は多環式である。一部の実施形態では、「脂環式」は、完全に飽和であるか又は1つ若しくは複数の不飽和単位を含むが、芳香族ではなく、残りの分子に対して単一の結合点を有する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、或いは完全に飽和であるか又は1つ若しくは複数の不飽和単位を含むが、芳香族ではなく、残りの分子に対して単一の結合点を有するC₉～C₁₆多環式炭化水素を指す。

【0040】

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一組の単位用量（典型的には2用量以上）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全ての用量は、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。

【0041】

ヘテロ脂肪族：「ヘテロ脂肪族」という用語は、本明細書で使用される場合、当技術分野におけるその通常の意味が付与され、1つ又は複数の炭素原子が、独立に、1つ又は複数のヘテロ原子（例えば、酸素、窒素、硫黄、ケイ素、リンなど）で置換されている、本明細書に記載の通りの脂肪族基を指す。一部の実施形態では、C、CH、CH₂及びCH₃から選択される1つ又は複数の単位が、独立に、1つ又は複数のヘテロ原子（それらの酸化及び／若しくは置換形態を含む）により置換される。一部の実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルキルである。一部の実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルケニルである。

【0042】

ヘテロアルキル：「ヘテロアルキル」という用語は、本明細書で使用される場合、当技術分野におけるその通常の意味が付与され、1つ又は複数の炭素原子が、独立に、1つ又は複数のヘテロ原子（例えば、酸素、窒素、硫黄、ケイ素、リンなど）で置換されている本明細書に記載のアルキル基を指す。ヘテロアルキル基の例として、限定はされないが、アルコキシ、ポリ（エチレングリコール）-、アルキル置換アミノ、テトラヒドロフラニル、ピペリジニル、モルホリニルなどが挙げられる。

【0043】

ヘテロアリール：「ヘテロアリール」及び「ヘテロアル-」という用語は、本明細書で使用される場合、単独又はより大きい部分（例えば、「ヘテロアルキル」若しくは「ヘテロアルコキシ」の一部として用いられ、計5～30環員を有する単環、二環若しくは多環系を指し、ここで、その系の少なくとも1つの環は、芳香族であり、少なくとも1つの芳香環原子は、ヘテロ原子である。一部の実施形態では、ヘテロアリール基は、5～10個の環原子（即ち単環、二環又は多環式）を有し、一部の実施形態では、5、6、9若しくは10個の環原子を有する。一部の実施形態では、ヘテロアリール基は、環状アレイ内に共有される6、10又は14π電子を有し；炭素原子の他に、1～5個のヘテロ原子を有する。ヘテロアリール基としては、限定しないが、チエニル、フラニル、ピロニル、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

10

20

30

40

50

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挙げられる。一部の実施形態では、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。「ヘテロアリール」及び「ヘテロアルー」という用語は、本明細書で使用される場合、ヘテロ芳香環が、1つ若しくは複数のアリール、脂環式又はヘテロシクリル環と融合しており、結合基若しくは結合点がヘテロ芳香環上にある基も含む。非限定的な例として、インドリル、イソインドリル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、ジベンゾフラニル、インダゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンズチアゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、4H-キノリジニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル及びピリド〔2, 3-b〕-1, 4-オキサジン-3(4H)-オンが挙げられる。ヘテロアリール基は、単環、二環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」という用語と置き換え可能に用い得、これらの用語は何れも、任意選択で置換される環を含む。「ヘテロアラキル」という用語は、ヘテロアリール基により置換されたアルキル基を指し、ここで、アルキル及びヘテロアリール部分は独立に、任意選択で置換される。

10

【0044】

ヘテロ原子：「ヘテロ原子」という用語は、本明細書で使用される場合、炭素又は水素ではない原子を意味する。一部の実施形態では、ヘテロ原子は、ホウ素、酸素、硫黄、窒素、リン又はケイ素（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若しく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。

20

【0045】

複素環：本明細書で使用される場合、「複素環」、「ヘテロシクリル」、「複素環式基」及び「複素環」という用語は、本明細書で用いられる通り、置き換え可能に使用され、飽和若しくは部分不飽和で、1つ又は複数のヘテロ原子環原子を有する単環、二環若しくは多環式環部分（例えば、3～30員の）を指す。一部の実施形態では、ヘテロシクリル基は、飽和若しくは部分不飽和の何れかであり、且つ炭素原子以外に、1つ又は複数、好ましくは、1～4個のヘテロ原子（上に定義した通り）を有する、安定な5～7員単環又は7～10員二環式複素環部分である。複素環の環原子に関して用いられるとき、「窒素」という用語は、置換窒素を含む。一例として、酸素、硫黄及び窒素から選択される0～3個のヘテロ原子を有する飽和若しくは部分不飽和環の場合、窒素は、N（3, 4-ジヒドロ-2H-ピロリルの場合など）、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）であり得る。複素環は、任意のヘテロ原子又は炭素原子においてそのペンダント基に結合することができ、これにより、安定な構造が得られ、また、環原子の何れかを任意選択で置換することもできる。こうした飽和若しくは部分不飽和複素環式ラジカル例としては、限定しないが、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挙げられる。「複素環」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロシクリル環」、「複素環式基」、「複素環式部分」及び「複素環式ラジカル」という用語は、本明細書では置き換え可能に用いられ、更に、ヘテロシクリル環が、1つ又は複数のアリール、ヘテロアリール若しくは脂環、例えばインドリニル、3H-インドリル、クロマニル、フェナントリジニル又はテトラヒドロキノリニルに融合した基も含む。ヘテロシクリル基は、単環、二環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り置換されたアルキル基を指し、ここで、アルキル及びヘテロシクリル部分は、独立に、任意選択で置換される。

30

40

【0046】

50

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。

【0047】

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。

【0048】

任意選択で置換される：本明細書に記載される場合、本開示の化合物、例えばオリゴヌクレオチドは、任意選択で置換される部分及び／又は置換された部分を含み得る。一般に、用語「置換される」は、用語「任意選択で」が前に置かれるか否かに関わらず、指定部分の1つ又は複数の水素が好適な置換基で置換されることを意味する。別に指示されない限り、「任意選択で置換される」基は、基の置換可能な位置の各々に好適な置換基を有することができ、何れか所与の構造内の2つ以上の位置が、指定された群から選択される2つ以上の置換基で置換され得る場合、置換基は、全ての位置で同じであるか又は異なり得る。一部の実施形態では、任意選択で置換される基は、置換されていない。本開示により考慮される置換基の組み合わせは、好ましくは、安定な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。「安定な」という用語は、本明細書で使用される場合、その生産、検出並びに特定の実施形態ではその回収、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付されたとき、実質的に変化しない化合物を指す。

【0049】

置換可能な原子、例えば好適な炭素原子に対する好適な一価置換基は、独立に、以下：ハロゲン； $-(CH_2)_{0\sim4}R^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}OR^O$ ； $-O(CH_2)_{0\sim4}R^O$ ； $-O-(CH_2)_{0\sim4}C(O)OR^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}CH(OR^O)_2$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}Ph(R^Oで置換され得る)$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}O(CH_2)_{0\sim1}Ph(R^Oで置換され得る)$ ； $-CH=CHPh(R^Oで置換され得る)$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}O(CH_2)_{0\sim1}$ -ピリジル $(R^Oで置換され得る)$ ； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-N_3$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}N(R^O)_2$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}N(R^O)C(O)R^O$ ； $N(R^O)C(S)R^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}N(R^O)C(O)NR^O_2$ ； $-N(R^O)C(S)NR^O_2$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}N(R^O)C(O)OR^O$ ； $-N(R^O)N(R^O)C(O)R^O$ ； $-N(R^O)N(R^O)C(O)NR_2$ ； $-N(R^O)N(R^O)C(O)OR^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}C(O)R^O$ ； $-C(S)R^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}C(O)OR^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}C(O)SR^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}C(O)SiR^O_3$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}CO(O)R^O$ ； $-OC(O)(CH_2)_{0\sim4}SR$ 、 $-SC(S)SR^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}SC(O)R^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}C(O)NR^O_2$ ； $-C(S)NR^O_2$ ； $-C(S)SR^O$ ； $-SC(S)SR^O$ 、 $-(CH_2)_{0\sim4}OC(O)NR^O_2$ ； $-C(O)N(OR^O)R^O$ ； $-C(O)C(O)R^O$ ； $-C(O)CH_2C(O)R^O$ ； $-C(NOR^O)R^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}SSR^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}S(O)_2R^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}S(O)_2OR^O$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}OS(O)_2R^O$ ； $-S(O)_2NR^O_2$ ； $-(CH_2)_{0\sim4}S(O)R^O$ ； $-N(R^O)S(O)_2NR^O_2$ ； $-N(R^O)S(O)_2R^O$ ； $-N(OR^O)R^O$ ； $-C(NH)NR^O_2$ ； $-Si(R^O)_3$ ； $-OSi(R^O)_3$ ； $-B(R^O)_2$ ； $-OB(R^O)_2$ ； $-OB(OR^O)_2$ ； $-P(R^O)_2$ ； $-P(OR^O)_2$ ； $-OP(R^O)_2$ ； $-OP(OR^O)_2$ ； $-P(O)(R^O)_2$ ； $-P(O)(OR^O)_2$ ； $-OP(O)(R^O)_2$ ； $-OP(O)(OR^O)_2$ ； $-OP(O)(OR^O)(SR^O)$ ； $-SP(O)(R^O)_2$ ； $-SP(O)(OR^O)_2$ ； $-N(R^O)P(O)(R^O)_2$ ； $-N(R^O)P(O)(OR^O)_2$ ； $-P(R^O)_2[B(R^O)_3]$ ； $-P(OR^O)_2[B(R^O)_3]$ ； $-OP(R^O)_2[B(R^O)_3]$ ； $-OP(OR^O)_2[B(R^O)_3]$ ； $-(C_{1\sim4}直鎖若しくは分岐アルキレン)O-N(R^O)_2$ ；又は $-(C_{1\sim4}直鎖若しくは分岐アルキレン)C(O)O-N(R^O)_2$ 、ここで、各 R^O は、以下に定義する通り置換され得、独立に、水素、 $C_{1\sim4}$

脂肪族、独立に、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから選択される1～5個のヘテロ原子を有する $C_1 \sim C_{20}$ 脂肪族、 $-CH_2-$ ($C_6 \sim 14$ アリール)、 $-O$ (CH_2) $_0 \sim 1$ ($C_6 \sim 14$ アリール)、 $-CH_2-$ (5～14員ヘテロアリール環)、独立に、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから選択される0～5個のヘテロ原子を有する5～20員の単環、二環若しくは多環式、飽和、部分不飽和又はアリール環であるか、或いは上の定義にもかかわらず、 R^O の2回の独立した出現は、それらの介在原子と一緒に、独立に、窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから選択される0～5個のヘテロ原子を有する5～20員の単環、二環若しくは多環式、飽和、部分不飽和又はアリール環を形成し、これらは、以下に定義する通り置換され得る。

【0050】

R^O (又は R^O の2回の独立した出現により、それらの介在原子と一緒に形成される環) に対する好適な一価置換基は、独立に、ハロゲン、 $-(CH_2)_0 \sim 2 R^*$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 OH$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 OR^*$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 CH(OR^*)_2$ ； $-O$ (ハロ R^*)、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 C(O)R^*$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 C(O)OR^*$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 SR^*$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 SH$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 NH_2$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 NHR^*$ 、 $-(CH_2)_0 \sim 2 NR^{*2}$ 、 $-NO_2$ 、 $-SiR^{*3}$ 、 $-OSiR^{*3}$ 、 $-C(O)SR^*$ 、 $-(C_1 \sim 4$ 直鎖若しくは分岐アルキレン) $C(O)OR^*$ 又は $-SSR^*$ (ここで、各 R^* は、非置換であるか、又は「ハロ」が前に置かれる場合、1つ又は複数のハロゲンのみで置換されている)、並びに独立に $C_1 \sim C_4$ 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_0 \sim 1 Ph$ 、並びに独立に窒素、酸素、硫黄、ケイ素及びリンから選択される0～4個のヘテロ原子を有する5～6員飽和、部分不飽和又はアリール環である。 R^O の飽和炭素原子に対する好適な二価置換基は、 $=O$ 及び $=S$ を含む。

【0051】

例えば、好適な炭素原子に対する好適な二価置換基は、独立に、以下： $=O$ 、 $=S$ 、 $=NNR^{*2}$ 、 $=NNHC(O)R^*$ 、 $=NNHC(O)OR^*$ 、 $=NNHS(O)_2R^*$ 、 $=NR^*$ 、 $=NOR^*$ 、 $-O(C(R^{*2}))_2 \sim 3 O-$ 又は $-S(C(R^{*2}))_2 \sim 3 S-$ であり、ここで、 R^* の各々独立した出現は、水素、以下に定義する通りに置換され得る $C_1 \sim 6$ 脂肪族並びに独立に窒素、酸素及び硫黄から選択される0～4個のヘテロ原子を有する非置換5～6員飽和、部分不飽和又はアリール環から選択される。「任意選択で置換された」基の隣接置換可能炭素に結合される好適な二価置換基としては、 $-O(CR^{*2})_2 \sim 3 O-$ が挙げられ、ここで、 R^* の各々独立した出現は、水素、以下に定義する通り置換され得る $C_1 \sim 6$ 脂肪族並びに独立に窒素、酸素及び硫黄から選択される0～4個のヘテロ原子を有する非置換5～6員飽和、部分不飽和又はアリール環から選択される。

【0052】

R^* の脂肪族基に対する好適な置換基は、独立に、ハロゲン、 R^* 、 $-(CH_2)_0 \sim 1 OH$ 、 $-OR^*$ 、 $-O(CH_2)_0 \sim 1 Ph$ 又は独立に、窒素、酸素及び硫黄から選択される0～4個のヘテロ原子を有する5～6員飽和、部分不飽和又はアリール環である。

【0053】

経口：「経口投与」及び「経口投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、それらが当技術分野で理解されている意味を有し、化合物又は組成物の口からの投与を指す。

【0054】

非経口：「非経口投与」及び「非経口投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、それらが当技術分野で理解されている意味を有し、腸及び局所投与以外の投与方

10

20

30

40

50

法、通常は、注射による投与を指し、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼内、心臓内、皮内、腹腔内、気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内及び胸骨内注射及び注入が挙げられる。

【0055】

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通り、アリアル又はヘテロアリアル部分を含むことは意図されない。

【0056】

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、所定の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（水性若しくは非水性溶液若しくは懸濁液）、錠剤、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、例えば滅菌溶液若しくは懸濁液又は徐放性製剤としての例えば皮下、筋肉内、静脈内若しくは硬膜外注射；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；腔内若しくは直腸内、例えばペッサリー、クリーム若しくはフォームとして；舌下；眼；経皮；又は鼻内、肺並びに他の粘膜表面への投与。

【0057】

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。

【0058】

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、又は身体の一部から対象化合物を別の器官、又は身体の部分へと運搬若しく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、組成物若しく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。

【0059】

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. B e r g e , e t a l. は、J.

10

20

30

40

50

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、ラクチン酸塩、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。一部の実施形態では、提供される化合物は、1つ又は複数の酸性基、例えばオリゴヌクレオチドを含み、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）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ー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、提供される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／又は修飾されたヌクレオチド間結合に）。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩又は一般にそうした化合物の塩は、2つ以上のカチオンを含み、これらは、同じであるか又は異なり得る。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩（又は一般に、塩）において、酸性基中の全てのイオン化水素は、カチオンで置換される。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩は、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、薬学的に許容される塩は、提供されるオリゴヌクレオチドのナトリウム塩であり、ここで、各酸性結合基（例えば、各天然リン酸結合、各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合など）は、独立にナトリウム塩形態（全ナトリウム塩）として存在する。

【0060】

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、Serge L. Beaucage et al., 06/2012により編集されたCurrent Protocols in Nucleic Acid Chemistry（Chapter 2の全体が参照により本明細書に援用される）に記載の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（Fmo

c)、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romo)フルオロエニルメチルカルバメート、2,7-ジ-*t*-ブチル-[9-(10,10-ジ
 オキソ-10,10,10,10-テトラヒドロチオキサントール)]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romo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*-Bum
 eoc)、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(Ipa
 oc)、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-シクロブ
 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

10

20

30

40

50

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、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'-イソプロピリデンジアミン、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-若しくはタングステン)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ド、ジベンジルホスホロアミド、ジフェニルホスホロアミド、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

50

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るフェニル、ビフェニル又はナフチルが挙げられる。好適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。

10

【0062】

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）、ベンジルオキシメチル（BOM）、*p*-メトキシベンジルオキシメチル（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-ペンテニルオキシメチル（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romo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-ベンジルオキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-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-（フェニルセレンニル）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romo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-オキシ）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）、トリイソプロピルシリル（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

20

30

40

50

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（TMSEC）、2-（フェニルスルホニル）エチル炭酸塩（Psec）、2-（トリフェニルホスホニオ）エチル炭酸塩（Peoc）、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（monosuccinoate）、（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、ハウ酸塩、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（Ts）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-tert-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-tert-ブチルシリレン基（DTBS）、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（TIPDS）、テトラ-tert-ブトキシジシロキサン-1,3-ジイリデン誘導体（TBDS）、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

【0063】

一部の実施形態では、ヒドロキシル保護基は、アセチル、tert-ブチル、tert-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、tert-ブチルジメチルシリル、tert-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

50

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 (MMTr)、4, 4'-ジメトキシトリチル、(DMTr) 及び 4, 4', 4''-トリメトキシトリチル (TMTr)、2-シアノエチル (CE 又は Cne)、2-(トリメチルシリル) エチル (TSE)、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 (NPE)、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-(ジプロモメチル) ベンゾイル (Dbmb)、2-(イソプロピルチオメトキシメチル) ベンゾイル (Ptmt)、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 (MOX) 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。一部の実施形態では、リン結合保護基は、オリゴヌクレオチド合成全体を通して、リン結合 (例えば、ヌクレオチド間結合) に付加される基である。一部の実施形態では、保護基は、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、保護基は、ヌクレオチド間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、保護基は、ヌクレオチド間リン酸結合の酸素原子に付加される。一部の実施形態では、保護基は、2-シアノエチル (CE 又は Cne)、2-トリメチルシリルエチル、2-ニトロエチル、2-スルホニルエチル、メチル、ベンジル、o-ニトロベンジル、2-(p-ニトロフェニル) エチル (NPE 又は Npe)、2-フェニルエチル、3-(N-tert-ブチルカルボキサミド)-1-プロピル、4-オキソペンチル、4-メチルチオール-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) アミノエチル又は 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。

【0064】

サンプル：サンプルは、本明細書で使用される場合、特定の生物又はそれから得られる材料である。一部の実施形態では、サンプルは、本明細書に記載される通り、目的の供給源から得られるか又はそれに由来する生体サンプルである。一部の実施形態では、目的の供給源は、動物又はヒトなどの生物を含む。一部の実施形態では、生体サンプルは、生物組織又は体液を含む。一部の実施形態では、生体サンプルは、骨髄；血液；血球；腹水；組織若しくは細針生検；細胞含有体液；フリーフローティング核酸；喀痰；唾液；尿；脳髄液、腹膜液；胸膜液；糞便；リンパ液；婦人科系体液；皮膚スワブ；膣スワブ；口腔スワブ；鼻腔スワブ；乳管洗浄液若しくは気管支肺胞洗浄液などの洗浄物又は洗浄液；吸引物；剥離物；骨髄検体；組織生検試料；手術検体；糞便、他の体液、分泌物及び／若しくは排泄物；並びに／又はそれら由来の細胞などであるか又はそれを含む。一部の実施形態では、生体サンプルは、個体から得られる細胞であるか又はそれを含む。一部の実施形態では、サンプルは、任意の適切な手段により目的の供給源から直接得られる「一次サンプル」である。例えば、一部の実施形態では、一次生体サンプルは、生検 (例えば、穿刺吸引若しくは組織生検)、手術、体液の採取 (例えば、血液、リンパ液、糞便など) などからなる群から選択される方法によって得られる。一部の実施形態では、文脈から明らかになるように、「サンプル」という用語は、一次サンプルを処理する (例えば、それから1つ又は複数の構成要素を取り出す及び／又はそれに1つ又は複数の物質を添加する) ことによって得られる製剤を指す。例えば、半透膜を用いた濾過である。こうした「処理サンプル」は、例えば、サンプルから抽出したか、又は mRNA の増幅若しくは逆転写、特定の構成要素の単離及び／若しくは精製などの技術に一次サンプルを付すことによって得ら

れた核酸若しくはタンパク質を含み得る。一部の実施形態では、サンプルは、生物である。一部の実施形態では、サンプルは、植物である。一部の実施形態では、サンプルは、動物である。一部の実施形態では、サンプルは、ヒトである。一部の実施形態では、サンプルは、ヒト以外の生物である。

【0065】

被験者：本明細書で使用される場合、「被験者」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。典型的な被験者としては、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、被験者は、疾患、障害及び／若しくは状態に罹患し得、且つ／又はそれに対して感受性であり得る。

10

【0066】

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全て若しくはほとんど全ての範囲又は程度を示す定性条件を指す。生物学分野の当業者であれば、生物学的現象及び化学的現象が、あったとしても、めったに完結に到達しないこと及び／若しく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。

【0067】

に罹患している：疾患、障害及び／又は状態に「罹患している」個体は、疾患、障害及び／又は状態の1つ以上の症状を有すると診断され、且つ／又は示している。

20

【0068】

感受性である：疾患、障害及び／又は状態に対して「感受性である」個体は、一般の人々よりも、その疾患、障害及び／又は状態を発生するリスクが高い個体である。一部の実施形態では、疾患、障害及び／又は状態に対して感受性の個体は、疾患、障害及び／又は状態に罹患しやすい傾向がある。一部の実施形態では、疾患、障害及び／又は状態に対して感受性の個体は、その疾患、障害及び／又は状態を有すると診断されていない場合もある。一部の実施形態では、疾患、障害及び／又は状態に対して感受性の個体は、その疾患、障害及び／又は状態の症状を示す場合もある。一部の実施形態では、疾患、障害及び／又は状態に対して感受性の個体は、その疾患、障害及び／又は状態の症状を示さない場合もある。一部の実施形態では、疾患、障害及び／又は状態に対して感受性の個体は、その疾患、障害及び／又は状態を発生する。一部の実施形態では、疾患、障害及び／又は状態に対して感受性の個体は、その疾患、障害及び／又は状態を発生しない場合もある。

30

【0069】

全身：「全身投与」、「全身投与される」、「末梢投与」及び「末梢投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、レシピエントの全身に入るように化合物又は組成物を投与することを指す、当技術分野で理解されている意味を有する。

【0070】

治療薬：本明細書で使用される場合、「治療薬」という語句は、被験者に投与されると、治療効果を有し、且つ／又は所望の生物学的作用及び／若しく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／又は状態の1つ以上の症状若しくは特徴を緩和、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る、且つ／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。

40

【0071】

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、治療レジメンの一環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／若しくは状態に罹患するか又はそれに対して感受性である被験者に投与されると

50

き、その疾患、障害及び／若しくは状態を治療、診断、予防する、且つ／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／又は状態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／又は状態の1つ若しく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る、且つ／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必要である。

【0072】

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／又は状態の1つ若しくは複数の症状又は特徴を、部分的に若しくは完全に、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る、且つ／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／又は状態の兆候を示さない被験者に対して行い得る。一部の実施形態では、例えば、疾患、障害及び／又は状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／又は状態の初期兆候のみを示す被験者に治療を行い得る。

【0073】

不飽和：本明細書で使用される場合、「不飽和」という用語は、一部分が、1つ又は複数の不飽和単位を有することを意味する。

【0074】

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、且つ／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若しく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有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、何れか特定の被験者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；被験者の年齢、体重、健康状態、性別及び食事；使用される具体的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。

【0075】

野生型：本明細書で使用される場合、「野生型」という用語は、（突然変異型、疾患性、改変型などとは対照的に）「正常な」状態又は状況において、自然界に存在する構造及び／又は活性を有する実体を表す、当技術分野で理解される意味を有する。当業者であれば、野生型遺伝子及びポリペプチドが、往々にして、複数の異なる形態（例えば、対立遺伝子）で存在することは、理解されよう。

【0076】

核酸：本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、任意のヌクレオチド及びそ

10

20

30

40

50

のポリマーを含む。本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド（RNA）又はデオキシリボヌクレオチド（DNA）を含む、任意の長さのヌクレオチドの多量体型を指す。これらの用語は、その分子の一次構造を指しており、従って、二本鎖及び一本鎖DNA並びに二本鎖及び一本鎖RNAを含む。これらの用語は、同等物として、限定されないが、メチル化、保護及び／若しくはキャップヌクレオチド又はポリヌクレオチドなどの修飾ヌクレオチド及び／又は修飾ポリヌクレオチドから作製されるRNA又はDNA何れかの類似体を含む。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）並びに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／若しくは修飾核酸塩基のN-グリコシド又はC-グリコシドから誘導されたRNA又はDNA；糖及び／又は修飾糖から誘導された核酸；並びにリン酸架橋及び／又は修飾リンヌクレオチド間結合から誘導された核酸を包含する。この用語は、核酸塩基、修飾核酸塩基、糖、修飾糖、リン酸架橋又は修飾ヌクレオチド間結合の何れかの組み合わせを含む核酸を包含する。例として、限定はされないが、リボース部分を含む核酸、デオキシリボース部分を含む核酸、リボース部分とデオキシリボース部分の両方を含む核酸、リボース部分と修飾リボース部分を含む核酸が挙げられる。別に記載のない限り、接頭語のポリ-は、2～約10,000のヌクレオチドモノマー単位を含む核酸を指し、接頭語のオリゴ-は、2～約200のヌクレオチドモノマー単位を含む核酸を指す。

10

【0077】

ヌクレオチド：「ヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用される場合、核酸塩基、糖及び1つ又は複数のヌクレオチド間結合から構成されるポリヌクレオチドのモノマー単位を指す。天然の塩基（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、天然及び非天然の塩基類似体も含まれると理解すべきである。天然糖は、ペントース（五炭糖）のデオキシリボース（DNAを形成する）又はリボース（RNAを形成する）であるが、天然及び非天然の糖類似体も含まれると理解すべきである。ヌクレオチドは、ヌクレオチド間結合を介して連結されて、核酸又はポリヌクレオチドを形成する。多くのヌクレオチド間結合が当技術分野において公知である（限定はされないが、例えば、リン酸塩、ホスホロチオエート、ボラノリン酸塩など）。人工核酸としては、PNA（ペプチド核酸）、ホスホトリエステル、ホスホロチオナート、H-ホスホン酸塩、ホスホロアミデート、ボラノリン酸塩、メチルホスホン酸塩、ホスホノ酢酸塩、チオホスホノ酢酸塩及び本明細書に記載されるものなど、ネイティブ核酸のリン酸骨格の他の変異体が挙げられる。一部の実施形態では、天然のヌクレオチドは、天然に存在する塩基、糖及びヌクレオチド間結合を含む。本明細書に記載される通り、一部の実施形態では、「ヌクレオチド」という用語は、修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体のように、天然の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造類似体も包含する。

20

30

【0078】

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／又はヌクレオチド間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／又は修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドの少なくとも1つの機能、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。

40

【0079】

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つの機能を実施し；

50

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つの機能を実施する、などである。

【0080】

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

【0081】

修飾ヌクレオシド：「修飾ヌクレオシド」という用語は、天然ヌクレオシドに由来するか又は天然ヌクレオチドと化学的に類似するが、天然ヌクレオシドからそれを識別させる化学修飾を含む、部分を指す。修飾ヌクレオシドの非限定的な例として、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。

10

【0082】

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。

20

【0083】

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。

30

【0084】

修飾糖：「修飾糖」という用語は、糖を置換することができる部分を指す。修飾糖は、空間配置、電子的性質又は糖の何れか他の物理化学的特性を模倣する。

【0085】

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を指す。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種の全ての天然塩基（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

40

50

類似体も含む。

【0086】

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。

【0087】

ブロック基：「ブロック基」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、ブロック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、ブロック基は、保護基である。

【0088】

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。

【0089】

固体支持体：「固体支持体」という用語は、核酸の合成を可能にする任意の支持体を指す。一部の実施形態では、この用語は、ガラス又はポリマーを指し、それは、核酸を合成するために実施される反応ステップで使用される培地中で不溶性であり、誘導体化されて反応基を含有する。一部の実施形態では、固体支持体は、高度架橋ポリスチレン（HCP）又は制御ポアガラス（CPG）である。一部の実施形態では、固体支持体は、制御ポアガラス（CPG）である。一部の実施形態では、固体支持体は、制御ポアガラス（CPG）と高度架橋ポリスチレン（HCP）のハイブリッド支持体である。

【0090】

相同性：「相同性」又は「同一性」又は「類似性」は、2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性及び同一性は各々、比較の目的でアラインメントすることができる各配列中の位置の比較により決定され得る。比較される配列の同等位置が、同じ塩基により占有されるとき、その分子はその位置で同一であり；同等部位が、同一又は類似（例えば、立体的及び／又は電子的性質において類似）の核酸残基により占有されるとき、その分子はその位置で相同（類似）と呼称され得る。相同性／類似性又は同一性のパーセンテージとしての表現は、比較配列により共有される位置での、同一又は類似の核酸の数の関数を指す。「非関連」又は「非相同性」配列は、本明細書に記載される配列と、40%未満の同一性、35%未満の同一性、30%未満の同一性又は25%未満の同一性を共有する。2つの配列を比較する際、残基（アミノ酸又は核酸）の非存在又は余剰な残基の存在も、同一性及び相同性／類似性を低減する。

【0091】

一部の実施形態では、「相同性」という用語は、数学に基づいた配列類似性の比較を表すものであり、類似の機能又はモチーフを有する遺伝子を特定するために使用される。本明細書に記載される核酸配列を「クエリ配列」として使用して、公開データベースに対する検索を実行することにより、例えば他のファミリーのメンバー、関連配列又は相同体を特定することができる。一部の実施形態では、こうした検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLAST及びXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して実施することができる。一部の実施形態では、BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12で実行して、本開示の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を取得することができる。一部の実施形態では、比較目的でギャップ化アラインメントを取得するために、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402に記載されるように、ギャップ化BLASTを使用し得る。BLAST及びギャップ化BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプ

10

20

30

40

50

ログラム（例えば、XBLAST及びBLAST）のデフォルトパラメータを用いることができる（www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい）。

【0092】

同一性：本明細書で使用されるとき、「同一性」は、2つ以上の配列を最大限の配列マッチとなるように、即ちギャップ及び挿入を考慮に入れてアラインメントしたとき、それらの配列の対応する位置において同一であるヌクレオチド残基のパーセンテージを意味する。同一性は、限定はされないが、国際公開第2017/192679号に引用されるものを含め、限定はされないが、当技術分野において公知のものを含め、公知の方法によって容易に計算することができる。

【0093】

オリゴヌクレオチド：「オリゴヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドのポリマー又はオリゴマーを指し、これは、天然及び非天然の核酸塩基、糖及びヌクレオチド間結合の任意の組み合わせを含み得る。

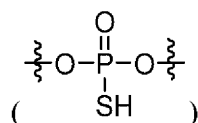
【0094】

オリゴヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖であり得る。一本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖領域（一本鎖オリゴヌクレオチドの2つの部分により形成される）を有し得、2つのオリゴヌクレオチド鎖を含む二本鎖オリゴヌクレオチドは、例えば、2つのオリゴヌクレオチド鎖が互いに相補的ではない領域に、一本鎖領域を有し得る。オリゴヌクレオチドの例として、限定はされないが、構造遺伝子、制御領域及び終結領域を含む遺伝子、例えばウィルスDNA又はプラスミドDNAなどの自己複製系、一本鎖及び二本鎖RNAi剤並びに他のRNA干渉試薬（RNAi剤又はiRNA剤）、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNA、マイクロRNA模倣体、スーパーミア（supermir）、アプタマー、アンチミア（antimirs）、アンタゴミア（antagomir）、U1アダプター、三重鎖形成性オリゴヌクレオチド、G-四重鎖オリゴヌクレオチド、RNAアクチベータ、免疫賦活性オリゴヌクレオチド及びデコイオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0095】

ヌクレオチド間結合：本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド間結合」という語句は、概して、オリゴヌクレオチド又は核酸のヌクレオチド単位を連結する結合を指す。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、天然DNA分子及び天然RNA分子中に存在するようなホスホジエステル結合（天然リン酸結合）である。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、「修飾ヌクレオチド間結合」であり、この場合、ホスホジエステル結合の各酸素原子は、任意選択で、且つ独立に、有機又は無機部分により置換されている。一部の実施形態では、こうした有機又は無機部分は、限定されないが、 $=S$ 、 $=Se$ 、 $=NR'$ 、 $-SR'$ 、 $-SeR'$ 、 $-N(R'_2)B(R')_3$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 及び $N(R')$ から選択され、式中、各 R' は、独立して、本開示に定義され、記載される通りである。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、ホスホトリエステル結合、ホスホロチオエートジエステル結合

【化1】



、又は修飾ホスホロチオエートトリエステル結合である。一部の実施形態では、ヌクレオチド間結合は、例えば、PNA（ペプチド核酸）又はPMO（ホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー）結合の1つである。当業者であれば、ヌクレオチド間結合が、結合中の酸性又は塩基性部分の存在によって、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を理解されよう。

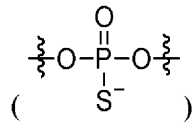
【0096】

修飾ヌクレオチド間結合の非限定的な例は、国際公開第2017/210647に記載される通り、s、s1、s2、s3、s4、s5、s6、s7、s8、s9、s10、s11、s12、s13、s14、s15、s16、s17及びs18と称される修飾ヌクレオチド間結合である。

【0097】

例えば、(Rp, Sp) - ATsCs1GAは、1) TとCの間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合

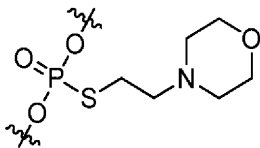
【化2】



10

; 及び2) CとGの間の

【化3】



20

の構造を有するホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を有する。別に指定されない限り、オリゴヌクレオチド配列の前に置かれるRp/Spという記号表示は、そのヌクレオチド間結合中のキラル結合リン原子の配座を、オリゴヌクレオチド配列の5'から3'の方向で順に記載するものである。例えば、(Rp, Sp) - ATsCs1GAの場合、TとCの間の「s」結合のリンは、Rpの配座を有し、CとGの間の「s1」結合のリンは、Spの配座を有する。一部の実施形態では、「全(ALL) - (Rp)」又は「全(ALL) - (Sp)」は、オリゴヌクレオチドの全てのキラル結合リン原子が、それぞれ、同じRp又はSpの配座を有することを示すために使用される。

30

【0098】

オリゴヌクレオチドタイプ：本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチドタイプ」という語句は、特定の塩基配列、骨格結合のパターン（即ちヌクレオチド間結合タイプのパターン、例えばリン酸、ホスホロチオエートなど）、骨格キラル中心のパターン（即ち結合リン立体化学のパターン(Rp/Sp)）及び骨格リン修飾のパターンを有するオリゴヌクレオチドを定義するために使用される。一部の実施形態では、共通して「タイプ」と称されるオリゴヌクレオチドは、互いに構造的に同一である。

【0099】

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／若しくは結合リンで特定の修飾、並びに／又は特定の塩基、並びに／又は特定の糖を有するように、事前に設計可能、且つ／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、上述の構造特性のうちの1つ若しく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。一部の実施形態では、本開示は、複数のオリゴヌクレオチド分子を含有するか又はそれらから構成される組成物（例え

40

50

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。一部の実施形態では、こうした分子の全てが同じタイプの分子である(即ち互いに構造的に同一である)。多くの実施形態では、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、典型的には予め決定された相対量で含有する。

【0100】

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内のキラルヌクレオチド間結合中の、キラル結合リンの立体化学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ヌクレオチド間結合を形成する場合、キラルヌクレオチド間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ヌクレオチド間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

【0101】

キラル制御(された)オリゴヌクレオチド組成物：「キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物」、「キラル制御された核酸組成物」などの用語は、本明細書で使用される場合、1)共通の塩基配列、2)骨格結合の共通パターン、及び3)骨格リン修飾の共通パターンを有する複数のオリゴヌクレオチド(又は核酸)を含む組成物を指し、この場合、上記複数のオリゴヌクレオチド(又は核酸)は、1つ若しくは複数のキラルヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を有する(キラル制御された又は立体定義されたヌクレオチド間結合、そのキラル結合リンは、組成物(「立体定義された」)中R_p又はS_pであり、非キラル制御ヌクレオチド間結合のようにランダムR_p及びS_pではない)。キラル制御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、予め決定/制御されている(例えば、キラル制御オリゴヌクレオチド製剤を介して、1つ又は複数のキラルヌクレオチド間結合を立体選択的に形成する)。一部の実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物中の全オリゴヌクレオチドの約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%又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%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、上記複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物中の共通の塩基配列、骨格結合の共通パターン及び骨格リン修飾の共通パターンを有する全オリゴヌクレオチドの約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%又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%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、上記複数のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、レベルは、組成物中の全オリゴヌクレオチド又は組成物中、共有塩基配列(例えば、複数のオリゴヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチドタイプの)を有する全オリゴヌクレオチドの、又は組成物中、共通の塩基配列、骨格結合の共通パターン及び骨格リン修飾の共通パターンを有す

20

30

40

50

る全オリゴヌクレオチドの、又は組成物中、共通の塩基配列、塩基修飾の共通パターン、糖修飾の共通パターン、ヌクレオチド間結合タイプの共通パターン及び／若しくはヌクレオチド間結合修飾の共通パターンを有する全オリゴヌクレオチドの約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%又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%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%）である。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、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）のキラルヌクレオチド間結合で、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、キラルヌクレオチド間結合の約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%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。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチド（又は核酸）は、同じ構成のものである。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチド（又は核酸）のレベルは、複数のオリゴヌクレオチド（又は核酸）と同じ構成を共有する組成物中の全てのオリゴヌクレオチド（又は核酸）の約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%又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%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%）である。一部の実施形態において、各キラルヌクレオチド間結合はキラル制御されたヌクレオチド間結合であり、且つ組成物は、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。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチド（又は核酸）は、構造的に同一である。一部の実施形態において、キラル制御されたヌクレオチド間結合は、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%、典型的には少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%のジアステレオ純度を有する。一部の実施形態において、キラル制御されたヌクレオチド間結合は、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、キラル制御されたヌクレオチド間結合は、少なくとも96%のジアステレオ純度を有する。一部の実施形態において、キラル制御されたヌクレオチド間結合は、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、キラル制御されたヌクレオチド間結合は、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、キラル制御されたヌクレオチド間結合は、少なくとも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、レベルのパーセンテージは、 $(DS)^{nc}$ であるか又は少なくとも (DS)

10

20

30

40

50

n_c であり、ここで、 DS は、本開示に記載される通りのジステレオ純度であり（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%又はそれを超える）、及び n_c は、本開示に記載される通りのキラル制御されたヌクレオチド間結合の数（例えば、1~50、1~40、1~30、1~25、1~20、5~50、5~40、5~30、5~25、5~20、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）である。一部の実施形態において、レベルのパーセンテージは、 $(DS)^{n_c}$ であるか又は少なくとも $(DS)^{n_c}$ であり、式中、 DS は、95%~100%である。例えば、 DS が99%であり、及び n_c が10であるとき、パーセンテージは、90%であるか又は少なくとも90%（ $(99\%)^{10} = 90.90 = 90\%$ ）である。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レベルは、オリゴヌクレオチド中の各キラル制御されたヌクレオチド間結合のジステレオ純度の積として表される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド（又は核酸）中で2つのヌクレオチドを連結するヌクレオチド間結合のジステレオ純度は、同じ2つのヌクレオチドを連結するダイマーのヌクレオチド間結合のジステレオ純度によって表され、ここで、ダイマーは、同等の条件、一部の例において、同一の合成サイクル条件を使用して調製される（例えば、オリゴヌクレオチド中の N_x と N_y との間の結合 $\dots N_x N_y \dots$ について、ダイマーは $N_x N_y$ である）。一部の実施形態において、全てのキラルヌクレオチド間結合がキラル制御されたヌクレオチド間結合であるわけではなく、且つ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、キラル制御されていないヌクレオチド間結合は、典型的にはステレオランダムオリゴヌクレオチド組成物中で観察される通り約80%、75%、70%、65%、60%、55%未満又は約50%のジステレオ純度を有する（例えば、慣習的オリゴヌクレオチド合成、例えば、ホスホロアミダイト法から当業者によって理解される通り）。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチド（又は核酸）は、同じタイプである。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、非ランダム若しくは制御レベルの個別のオリゴヌクレオチドタイプ又は核酸タイプを含む。例えば、一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1つ及び1つ以下のオリゴヌクレオチドタイプを含む。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、2種以上のオリゴヌクレオチドタイプを含む。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチドタイプを含む。一部の実施形態では、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、オリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドからなる組成物であり、この組成物は、そのオリゴヌクレオチドタイプの非ランダム若しくは制御レベルの複数のオリゴヌクレオチドを含む。

【0102】

キラル的に純粋：本明細書で使用される場合、「キラル的に純粋」という語句は、その中の全て又はほぼ全て（残りは不純物）のオリゴヌクレオチド分子が、結合リン原子に関して単一のジステレオマータイプで存在する、オリゴヌクレオチド又はその組成物を表すために使用される。

【0103】

所定（の）：所定の（又は予め決定された）とは、例えば、ランダムに発生するか、ランダムであるか、又は制御なしに達成されるのとは反対に、意図的に選択されるか、又は非ランダムであるか、又は制御されることが意味される。当業者であれば、本明細書を読むことで、本開示が、オリゴヌクレオチド組成物に組み込まれる特定の化学及び／又は立体化学の特徴の選択を可能にし、更に、そのような化学及び／又は立体化学の特徴を有するオリゴヌクレオチド組成物の調製制御も可能にする技術を提供することを理解されよう。提供されるこうした組成物は、本明細書に記載される通り「所定」である。何らかのオリゴヌクレオチドを含有し得る組成物は、特定の化学及び／又は立体化学特徴を意図的に生成するように制御されていないプロセスによって偶然生成された組成物であることから

、これは「所定の」組成物ではない。一部の実施形態では、所定の組成物は、（例えば、制御されたプロセスの反復により）意図的に再現することができる組成物である。一部の実施形態では、組成物中の複数のオリゴヌクレオチドの所定レベルとは、組成物中の複数のオリゴヌクレオチドの絶対量及び／又は相対量（比、パーセンテージなど）が制御されていることを意味する。一部の実施形態では、組成物中の上記複数のオリゴヌクレオチドの所定レベルは、キラル制御オリゴヌクレオチドの調製によって達成される。

【0104】

結合リン：本明細書において定義されるように、「結合リン」という語句は、関連する特定のリン原子が、ヌクレオチド間結合中に存在するリン原子であり、そのリン原子は、天然のDNA及びRNA中に存在するホスホジエステルヌクレオチド間結合のリン酸原子に相当することを示すために使用される。一部の実施形態では、結合リン原子は、修飾ヌクレオチド間結合中にあり、この場合、ホスホジエステル結合の各酸素原子は、任意選択で、且つ独立に、有機部分又は無機部分により置換される。一部の実施形態では、結合リン原子は、キラルである。一部の実施形態では、結合リン原子は、アキラルである。

10

【0105】

P-修飾：本明細書で使用される場合、「P-修飾」という用語は、立体化学的修飾以外の結合リンでの任意の修飾を指す。一部の実施形態では、P-修飾は、結合リンに共有結合したペンダント部分の付加、置換又は除去を含む。一部の実施形態では、「P-修飾」は、 $-X-L-R^1$ であり、式中、X、L及び R^1 の各々は、独立に、本開示に定義され、記載される通りである。

20

【0106】

ブロックマー：「ブロックマー」という用語は、本明細書で使用される場合、その各々個別のヌクレオチド単位を特徴付ける構造特徴のパターンが、そのヌクレオチド間リン結合で共通の構造特徴を有する少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位の存在を特徴とするオリゴヌクレオチド鎖を指す。共通の構造特徴とは、結合リンでの共通立体化学又は結合リンでの共通修飾を意味する。一部の実施形態では、ヌクレオチド間リン結合で共通の構造特徴を有する少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位は、「ブロック」と呼ばれる。一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、ブロックマーである。

【0107】

一部の実施形態では、ブロックマーは、「ステレオブロックマー」であり、例えば、少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位は、結合リンで同じ立体化学を有する。このような少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位は、「ステレオブロック」を形成する。

30

【0108】

一部の実施形態では、ブロックマーは、「P-修飾ブロックマー」であり、例えば、少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位は、結合リンで同じ修飾を有する。このような少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位は、「P-修飾ブロック」を形成する。例えば、 $(R_p, S_p) - A T s C s G A$ は、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位、即ちTsとCsが、同じP-修飾を有している（即ち両方ともホスホロチオエートジエステルである）ことから、P-修飾ブロックマーである。同じオリゴヌクレオチドの $(R_p, S_p) - A T s C s G A$ において、TsCsはブロックを形成し、これは、P-修飾ブロックである。

40

【0109】

一部の実施形態では、ブロックマーは、「結合ブロックマー」であり、例えば、少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位は、結合リンで同一の立体化学及び同一の修飾を有する。少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位は、「結合ブロック」を形成する。例えば、 $(R_p, R_p) - A T s C s G A$ は、少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位、即ちTsとCsが、同じ立体化学（両方とも R_p ）とP-修飾（両方ともホスホロチオエート）を有していることから、結合ブロックマーである。同じオリゴヌクレオチドの $(R_p, R_p) - A T s C s G A$ において、TsCsはブロックを形成し、これは、結合ブロックである。

50

【0110】

一部の実施形態では、ブロックマーは、ステレオブロック、P-修飾ブロック及び結合ブロックから独立に選択される1つ又は複数のブロックを含む。一部の実施形態では、ブロックマーは、1つのブロックに関してステレオブロックマーであり、且つ／又は別のブロックに関してP-修飾ブロックマーであり、且つ／又は更に別のブロックに関して結合ブロックマーである。

【0111】

本開示の化合物及び組成物に関して本明細書に記載される方法及び構造は、別に記載のない限り薬学的に許容される酸付加塩又は塩基付加塩型にも適用される。

【0112】

特定の実施形態の説明

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（例えば、C9orf72を標的とするオリゴヌクレオチド）は、種々の病態、障害及び疾患の治療を含め、治療、診断及び研究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、エンド及びエキソヌクレアーゼに対するその感受性によって制限される。そのため、このような欠点を回避する様々な合成対応物が開発されている。そうした対応物には、とりわけ、そうした分子を分解に対する感受性が低いものにし且つオリゴヌクレオチドの他の特性及び／又は活性を改善する化学修飾、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。構造的観点から見れば、ヌクレオチド間結合を修飾するとキラリティーを導入することができ、特定のオリゴヌクレオチド特性は、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。多くの実施形態において、本開示は、キラリ制御されたキラリヌクレオチド間結合を含む技術（例えば、オリゴヌクレオチド、組成物、方法など）を提供する。とりわけ、提供される技術は、高い活性（例えば、標的核酸（例えば、様々な転写物）及び／又はそれによってコードされる産物（例えば、様々なタンパク質）のレベル及び／又は活性の低減）、選択性（例えば、特定の標的核酸（例えば、様々な転写物）及び／又はそれによってコードされる産物（例えば、様々なタンパク質）のレベル及び／又は活性の、1つ以上の他のものに対する選択的低減）及び／又は低い毒性（例えば、不所望な免疫活性の低いレベルなどの不所望な副作用の低いレベル）を提供し得る。

【0113】

オリゴヌクレオチド

とりわけ、本開示は、本開示に記載される通りの様々な核酸塩基及びそのパターン、糖及びそのパターン、ヌクレオチド間結合及びそのパターン及び／又は追加の化学的部分及びそのパターンを含み得る様々な設計の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C9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72遺伝子及び／又はその産物（例えば、転写物、mRNA、タンパク質など）の1つ以上の発現、レベル及び／又は活性の低下を指令し得る。一部の実施形態において、提供されるC9orf72オリゴヌクレオチドは、様々な病態、障害又は疾患に関連するC9orf72核酸（例えば、C9orf72遺伝子の何れかの鎖であり得るか又はそれから転写され得る遺伝子、転写物、mRNAなど）及び／又はそれによってコードされる産物（例えば、様々なタンパク質及び／又はペプチドなど）の発現、レベル及び／又は活性を低減し得る。一部の実施形態において、提供されるC9orf72オリゴヌクレオチドは、対象又は患者の細胞におけるC9orf72遺伝子及び／又はその産物の1つ以上の発現、レベル及び／又は活性の低下を指令し得る。一部の実施形態において、細胞は、C9orf72を正常に発現するか又はC9orf72タンパク質を正常に産生する。一部の実施形態において、提供されるC9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72標的遺伝子又は遺伝子産物の発現、レベル及び／又は活性の低下を指令し得、且つ本明細書に開示されるC9orf72オリゴヌクレオチドの塩基配列からなるか、それを含むか又はその一部分（例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個又はそ

10

20

30

40

50

れを超える隣接塩基のスパン)を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立にUで置換され得、その逆も同様であり、且つオリゴヌクレオチドは、塩基、糖及び／又はヌクレオチド間結合の少なくとも1つの天然に存在しない修飾を含む。一部の実施形態において、様々な病態、障害及び／又は疾患に関連するC9orf72核酸(例えば、C9orf72遺伝子の何れかの鎖であり得、又はそれから転写され得る遺伝子、転写物、mRNAなど)及び／又はそれによってコードされる産物(例えば、様々なタンパク質及び／又はペプチドなど)の発現、レベル及び／又は活性は、病態、障害又は疾患にあまり関連しないか又は関連しないC9orf72核酸及び／又はそれによってコードされる産物の発現、レベル及び／又は活性に対して選択的に低減される。一部の実施形態において、伸長リピートを含むv1及び／又はv3転写物(例えば、図1に示されるもの、アンチセンス及びセンス)及び／又はその産物は、様々な病態、障害及び／又は疾患に関連する。一部の実施形態において、v2転写物は、伸長リピートを含むv1及びv3転写物と比較して病態、障害及び／又は疾患に関連しないか又はあまり関連しない。当業者によって理解される通り、2つの事象又は実体は、一方の存在、レベル及び／又は形態が他方のものと相関する場合、その用語が本明細書で使用されるとき、互いに「関連」する。例えば、実体(例えば、ポリペプチド、遺伝子シグネチャー、代謝物、微生物、転写物など)は、その存在、レベル及び／又は形態が疾患、障害又は病態の発生率及び／又はその感受性と相関する場合(例えば、関連母集団にわたり)、特定の疾患、障害又は病態に関連すると見なされる。

10

【0114】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子、例えば、C9orf72標的遺伝子又はその産物の発現、レベル及び／又は活性の低下を指令し得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、RNアーゼH媒介ノックダウンを介してC9orf72標的遺伝子又はその産物の発現、レベル及び／又は活性の低下を指令し得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72標的遺伝子mRNAとの結合後に翻訳を立体的にブロックすることによって、及び／又はmRNAスプライシングを改変若しくは妨害することによってC9orf72標的遺伝子又はその産物の発現、レベル及び／又は活性の低下を指令し得る。しかしながら、これにもかかわらず、本開示はいかなる特定の機構にも限定されない。一部の実施形態において、本開示は、二本鎖RNA干渉、一本鎖RNA干渉、RNアーゼH媒介ノックダウン、翻訳の立体障害又は2つ以上のそうした機構の組み合わせを介して機能し得るオリゴヌクレオチド、組成物、方法などを提供する。

20

30

【0115】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72の発現、レベル及び／又は活性の低下を媒介し得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、mRNA分解及び／又はC9orf72mRNAの翻訳の立体障害を伴う機構を介してC9orf72の低下、レベル及び／又は活性の低下を媒介し得る。

【0116】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、2つ以上のC9orf72アレルの発現、レベル及び／又は活性の低下を媒介し得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、病態、障害又は疾患に関連するC9orf72アレルの発現、レベル及び／又は活性の低下を、病態、障害又は疾患にあまり関連しないか又は関連しないC9orf72アレルの発現、レベル及び／又は活性に対して選択的に媒介し得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、病態、障害又は疾患に関連するC9orf72転写物及び／又はそれによってコードされる産物の発現、レベル及び／又は活性の低下を、病態、障害又は疾患にあまり関連しないか又は関連しないC9orf72転写物及び／又はそれによってコードされる産物の発現、レベル及び／又は活性に対して選択的に媒介し得る。

40

【0117】

50

一部の実施形態において、本開示は、C9orf72関連疾患、障害又は病態の治療方法に関し、この方法は、C9orf72の発現、レベル及び／又は活性の低下を媒介し得る治療有効量のC9orf72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、C9orf72の複数の形態、例えば、アレルが存在し得、提供される技術は、形態及びその産物の2つ以上又は全ての発現、レベル及び／又は活性を低減し得る。一部の実施形態において、提供される技術は、病態、障害又は疾患に関連するC9orf72転写物及び／又はそれによってコードされる産物の発現、レベル及び／又は活性を、病態、障害又は疾患にあまり関連しないか又は関連しないものに対して選択的に低減する。

【0118】

一部の実施形態において、本開示は、C9orf72関連疾患、障害又は病態の治療方法に関し、この方法は、それに罹患している対象に治療有効量の提供されるオリゴヌクレオチド又はその組成物を投与することを含む。

【0119】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される、例えば、表の構造要素又はその一部分を含む。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、各Tが独立にUに置換され得、その逆も同様である本明細書に記載される塩基配列（又はその一部分）、本明細書に記載される化学修飾若しくは化学修飾（又はその一部分）のパターン及び／又はフォーマット若しくはその一部分を含む。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、本明細書に開示される、例えば、表に開示されるか又はそれ以外に本明細書に開示される、各Tが独立にUに置換され得る塩基配列（又はその一部分）、化学修飾のパターン（又はその一部分）及び／又はオリゴヌクレオチドのフォーマットを含む塩基配列を有する。一部の実施形態において、こうしたオリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチドは、遺伝子、例えば、C9orf72遺伝子又はその遺伝子産物の発現、レベル及び／又は活性を低減する。

【0120】

とりわけ、C9orf72オリゴヌクレオチドは、その標的核酸（例えば、プレmRNA、成熟mRNAなど）にハイブリダイズし得る。例えば、一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、DNA鎖（C9orf72遺伝子の何れかの鎖）に由来するC9orf72核酸にハイブリダイズし得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72転写物にハイブリダイズし得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、限定はされないがプレmRNA又は成熟RNAを含めた、RNAプロセシングの任意の段階にあるC9orf72核酸にハイブリダイズし得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、限定はされないが、プロモーター領域、エンハンサー領域、転写終止領域、翻訳開始シグナル、翻訳終止シグナル、コード領域、非コード領域、エクソン、イントロン、イントロン／エクソン若しくはエクソン／イントロンジャンクション、5'UTR又は3'UTRを含め、C9orf72核酸の任意の要素又はその相補体にハイブリダイズし得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、2つ以下のミスマッチを有するその標的にハイブリダイズし得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、1つ以下のミスマッチを有するその標的にハイブリダイズし得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、ミスマッチを有さない（例えば、全てC-G及び／又はA-T/U塩基対合のとき）その標的にハイブリダイズし得る。

【0121】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、転写物の2つ以上の変異体にハイブリダイズし得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72転写物の2つ以上又は全ての変異体にハイブリダイズし得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、センス鎖に由来するC9orf72転

10

20

30

40

50

写物の2つ以上又は全ての変異体にハイブリダイズし得る。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、病態、障害又は疾患に関連する転写物（例えば、伸長リピートを含むもの）に選択的にハイブリダイズする。

【0122】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドのC9orf72標的は、mRNAでないC9orf72RNAである。

【0123】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチドは、増加したレベルの1つ以上の同位体を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチドは、例えば、1つ以上の元素、例えば、水素、炭素、窒素などの1つ以上の同位体によって標識される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば、提供される組成物中のC9orf72オリゴヌクレオチド、例えば、組成物の複数のオリゴヌクレオチドは、塩基修飾、糖修飾及び／又はヌクレオチド間結合修飾を含み、ここで、オリゴヌクレオチドは、濃縮レベルのデューテリウムを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチドは、1つ以上の位置でデューテリウムで標識される（ ^1H を ^2H で置換する）。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド鎖又はオリゴヌクレオチド鎖と共役した任意の部分（例えば、ターゲティング部分など）の1つ以上の ^1H を ^2H で置換する。こうしたオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される組成物及び方法に使用することができる。

【0124】

一部の実施形態において、本開示は、以下：

1) 転写物中に標的配列（例えば、C9orf72標的配列）に相補的である共通の塩基配列を有し；且つ

2) 1つ以上の修飾糖部分及び／又は修飾ヌクレオチド間結合を含む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する。

【0125】

一部の実施形態において、共通の塩基配列を有するC9orf72オリゴヌクレオチドは、ヌクレオシド修飾、例えば、糖修飾、塩基修飾などの同じパターンを有し得る。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すことができる。一部の実施形態において、骨格結合のパターンは、各ヌクレオチド間結合の位置及びタイプ（例えば、リン酸、ホスホロチオエート、置換ホスホロチオエートなど）を含む。

【0126】

一部の実施形態において、提供される組成物は、複数のオリゴヌクレオチドを含む。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、複数のオリゴヌクレオチドは、共通の塩基配列を共有する。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、共通の糖修飾のパターンを共有する。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、共通の塩基修飾のパターンを共有する。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、共通のヌクレオシド修飾のパターンを共有する。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、同じ構成である。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、同一である。

【0127】

一部の実施形態において、本明細書に例示される通り、C9orf72オリゴヌクレオチドは、キラル制御されており、1つ以上のキラル制御されたヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、立体化学的に純粋である。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、他の立体異性体から実質的に分離されている。

【0128】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾核酸塩基、1つ以上の修飾糖及び／又は1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む。

【0129】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾糖を含む。一部の実施形態において、本開示のオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾核酸塩基を含む。様々な修飾を、本開示に従って糖及び／又は核酸塩基に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号に記載される修飾である。一部の実施形態において、修飾は、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、米国特許第9982257号、米国特許第10160969号、米国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020/0056173号、米国特許出願公開第2018/0216107号、米国特許出願公開第2019/0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公開第2019/0249173号、米国特許出願公開第2019/0375774号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第2018/223081号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/032607号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/075357号、国際公開第2019/200185号、国際公開第2019/217784号、国際公開第2019/032612号及び／又は国際公開第2020/191252号に記載される修飾であり、それらの各々の糖、塩基及びヌクレオチド間結合修飾は、参照によって本明細書に独立に組み込まれる。

10

20

【0130】

本開示で使用されるとき、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つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、2つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、3つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、4つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、5つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、6つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、7つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、8つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、9つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、10個である。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも1つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも2つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも3つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも4つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも5つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも6つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも7つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも8つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも9つである。一部の実施形態において、「1つ以上」は、少なくとも10個である。

30

40

【0131】

本開示で使用されるとき、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つである。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は、2つである。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は、3つである。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は、4つである。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は、5つである。一部の実施形態において、「

50

少なくとも1つ」は、6つである。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は、7つである。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は、8つである。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は、9つである。一部の実施形態において、「少なくとも1つ」は、10個である。

【0132】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、表に記載されるC9orf72オリゴヌクレオチドであるか又はそれを含む。

【0133】

本開示で実証される通り、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（例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド）は、それをノックダウン系中で転写物と接触させたとき、その標的（例えば、C9orf72オリゴヌクレオチドについてC9orf72転写物をノックダウンすること）を特徴とする。

【0134】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、塩形態として提供される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、その塩形態として存在する負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、天然リン酸結合など）を含む塩として提供される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、薬学的に許容される塩として提供される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、金属塩として提供される。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。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、金属塩、例えば、ナトリウム塩として提供され、ここで、各負電荷ヌクレオチド間結合は、独立に塩形態である（例えば、ナトリウム塩の場合、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合について $-O-P(O)(SNa)-O-$ 、天然リン酸結合について $-O-P(O)(ONa)-O-$ など）。

【0135】

一部の実施形態において、本開示は、1又は2つのウィングとコアとを含み、且つ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か又はその構造のものであるオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、各ウィング及びコアは、独立に1つ以上の核酸塩基を含む。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、ウィングーコアーウィング構造を含むか又はその構造のものである。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、コアーウィング構造を含むか又はその構造のものである。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、ウィングーコア構造を含むか又はその構造のものである。一部の実施形態において、コアは、本開示に記載される通りの連続ヌクレオチド単位領域である。一部の実施形態において、各ウィングは、独立に、本開示に記載の通りの1つ以上の核酸塩基を含む。

【0136】

一部の実施形態において、ウィングーコアーウィングモチーフは、「X-Y-Z」と表され、ここで、「X」は、5'ウィングの長さ（別に記載のない限り、核酸塩基の数）を示し、「Y」は、コアの長さを示し、また「Z」は、3'ウィングの長さを示す。一部の実施形態において、Xは、1～10、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10であり、及びZは、1～10、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10である。一部の実施形態において、Yは、1～50、例えば、5～50、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20である。一部の実施形態において、X及びZは、同じ若しくは異なる長さであり、及び／又は同じ若しくは異なる修飾若しくは修飾パターンを有する。好ましい実施形態では、Yは、8～15ヌクレオチドである。X、Y又はZは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30若しくはそれを超えるヌクレオチドの何れでもあり得る。一部の実施形態において、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、例えば、5-10-5、5-10-4、4-10-4、4-10-3、3-10-3、2-10-2、5-9-5、5-9-4、

4-9-5、5-8-5、5-8-4、4-8-5、5-7-5、4-7-5、5-7-4又は4-7-4のウィング-コア-ウィング構造を有するか又は含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、例えば、5-10、8-4、4-12、12-4、3-14、16-2、18-1、10-3、2-10、1-10、8-2、2-13、5-13、5-8又は6-8のウィング-コア又はコア-ウィング構造を有するか又は含む。

【0137】

一部の実施形態において、ウィングは、1つ以上の糖修飾を含む。一部の実施形態において、ウィング-コア-ウィング構造の2つのウィングは、同じ糖修飾を含む。一部の実施形態において、ウィング-コア-ウィング構造の2つのウィングは、異なる糖修飾を含む。一部の実施形態において、ウィング-コア-ウィング構造の2つのウィングは、異なる糖修飾のパターンを含む。一部の実施形態において、ウィング-コア-ウィング構造の2つのウィングは、同じ糖修飾の異なる糖修飾のパターンを含む。一部の実施形態において、ウィング-コア-ウィング構造の2つのウィングは、同じ糖修飾のパターンを含む。一部の実施形態において、ウィングは、2つ以上の異なる糖修飾を含む。

10

【0138】

一部の実施形態において、糖修飾は2'-修飾、例えば、2'-ORを含み、式中、Rは、本明細書に記載される通りであるがHでなく、2'-炭素を含む二環式糖修飾（例えば、LNA糖中）などである。一部の実施形態において、ウィング中の各糖修飾は、独立に2'-修飾である。一部の実施形態において、ウィング-コア-ウィングの両方のウィング中の各糖修飾は、独立に2'-修飾である。一部の実施形態において、ウィング又は各ウィングは、独立に2つ以上の異なる糖修飾を含み、ここで、各糖修飾は、独立に2'-修飾である。一部の実施形態において、各2'-修飾は、独立に2'-OR修飾であり、式中、Rは、本明細書に記載される通りであるがHでない。一部の実施形態において、各2'-修飾は、独立に2'-OR修飾であり、式中、Rは、任意選択で置換されたC₆アルキルである。一部の実施形態において、各糖修飾は、独立に2'-OMe又は2'-MOEである。

20

【0139】

一部の実施形態において、糖修飾は、糖修飾の不存在と比較して改善された安定性及び／又はハイブリダイゼーションを提供する。一部の実施形態において、特定の糖修飾、例えば、2'-MOEは、他の点で同一の条件下で2'-OMeよりも高い安定性を提供する。

30

【0140】

一部の実施形態において、ウィングは、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、ウィングは、1つ以上の連続天然リン酸結合を含む。一部の実施形態において、ウィングは、1つ以上の天然リン酸結合と、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、ウィングは、天然リン酸結合を含まず、且つウィングの各ヌクレオチド間結合は、独立に修飾ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、Spホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、ウィングは、1つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、ウィングは、1つ以上の中性ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、各ウィングは、独立に1つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、各ウィングは、独立に1つ以上の中性ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合又は中性ヌクレオチド間結合は、独立にキラル制御されている。一部の実施形態において、各非負電荷ヌクレオチド間結合又は中性ヌクレオチド間結合は、独立にキラル制御されている。一部の実施形態において、ウィングは、1~5つ、例えば、1、2、3、4又は5つの非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、ウィングは、1つの非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、ウィングは、2つの非負電荷ヌ

40

50

クレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、ウィングは、3つの非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、ウィングは、4つの非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、ウィングは、5つの非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、各非負電荷ヌクレオチド間結合は、独立に中性ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合又は中性ヌクレオチド間結合は、 $n001$ である。一部の実施形態において、各々は 001 であり、且つ任意選択で独立にキラル制御されている。一部の実施形態において、各非負電荷ヌクレオチド間結合、例えば、 $n001$ は、独立にキラル制御されている。一部の実施形態において、 $n001$ は、キラル制御されており、且つ Rp である。一部の実施形態において、 $n001$ は、キラル制御されており、且つ Sp である。一部の実施形態において、ウィングは、1つ以上のキラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合と、1つ以上のキラル制御された中性ヌクレオチド間結合とを含む。一部の実施形態において、ウィングは、1つ以上のキラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合と、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、ウィングは、1つ以上のキラル制御された中性ヌクレオチド間結合と、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、ウィングは、1つ以上のキラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合と、1つ以上のキラル制御された中性ヌクレオチド間結合と、1つ以上の天然リン酸結合とを含む（例えば、表中の特定のオリゴヌクレオチド中の特定の5'-ウィング）。一部の実施形態において、ウィング中の各ヌクレオチド間結合は、天然リン酸結合及びホスホロチオエートヌクレオチド間結合から独立に選択される。一部の実施形態において、ウィング中の各ヌクレオチド間結合は、天然リン酸結合、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合及び非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、 $n001$ などの中性ヌクレオチド間結合）から独立に選択される。一部の実施形態において、ウィング中の各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合及び非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、 $n001$ などの中性ヌクレオチド間結合）から独立に選択される。一部の実施形態において、1つ以上の又は各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立にキラル制御されている。一部の実施形態において、1つ以上の又は各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立にキラル制御されており、且つ Sp である。一部の実施形態において、1つ以上の又は各非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、 $n001$ などの中性ヌクレオチド間結合）は、独立にキラル制御されている。一部の実施形態において、1つ以上の又は各非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、 $n001$ などの中性ヌクレオチド間結合）は、独立にキラル制御されており、且つ Rp である。一部の実施形態において、ウィング（例えば、5'-ウィング）のパターン（例えば、ヌクレオチド間結合のタイプ及び結合リン立体化学を含める）は、 $SOOO$ であるか又はそれを含み、ここで、 S は、キラル制御されており、且つ Sp であるホスホロチオエートヌクレオチド間結合を表し、且つ O は、天然リン酸結合を表す。一部の実施形態において、ウィング（例えば、3'-ウィング）のパターンは、 $SSSS$ であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、ウィング（例えば、5'-ウィング）のパターンは、 $SnRonR$ であるか又はそれを含み、ここで、 nR は、キラル制御されており、且つ Rp である非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、 $n001$ などの中性ヌクレオチド間結合）を表す。一部の実施形態において、ウィング（例えば、3'-ウィング）のパターンは、 $SnRSS$ であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、ウィング（例えば、3'-ウィング）のパターンは、 $SSnRS$ であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、ウィング（例えば、3'-ウィング）のパターンは、 $SSSnR$ であるか又はそれを含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合又は中性ヌクレオチド間結合は、2つの修飾糖間に存在する。一部の実施形態において、コアは、1つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合又は中性ヌクレオチド間結合も有し得、それらの各々は任意選択で独立にキラル制御されており；一部の実施形態において、各々は独立にキラル制御されている。一部の実施形態において、コア糖（一部の実施形態において、これは2'-O-を含有しない）は、中性ヌクレオチド間結合に結合していない。

10

20

30

40

50

【0141】

一部の実施形態では、ウィングーコアーウィング構造を含むか、又はウィングーコアーウィング構造であるオリゴヌクレオチドの場合、2つのウィングは、それらが異なるレベル及び／若しくはタイプの化学修飾、骨格キラル中心立体化学並びに／又はそれらのパターンを含むという点で異なっている。一部の実施形態では、2つのウィングは、それらが異なるレベル及び／若しくはタイプの糖修飾、並びに／又はヌクレオチド間結合、並びに／又はヌクレオチド間結合立体化学、並びに／又はそれらのパターンを含むという点で異なっている。例えば、一部の実施形態では、一方のウィングは、2'OR修飾（Rは、任意選択で置換されたC₁～6アルキル（例えば、2-MOE）である）を含むのに対し、他方のウィングは、こうした修飾を含まないか又はより低レベルの（例えば、数及び／又はパーセンテージで）そうした修飾を含み；加えて且つ代わりに、一方のウィングは、天然リン酸結合を含むが、他方のウィングは、天然リン酸結合を含まないか又はより低レベルの（例えば、数及び／又はパーセンテージで）天然リン酸結合を含み；加えて且つ代わりに、一方のウィングは、特定のタイプの修飾ヌクレオチド間結合（例えば、ホスホロチオエートジエステルヌクレオチド間結合）を含み得るが、他方のウィングは、天然リン酸結合を含まないか又はより低レベルの（例えば、数及び／又はパーセンテージで）そのタイプの修飾ヌクレオチド間結合を含み；加えて且つ代わりに、一方のウィングは、特定の配座（例えば、Rp若しくはSp）の結合リン原子を含むキラル修飾ヌクレオチド間結合を含み得るが、他方のウィングは、特定の配座の結合リン原子を含むキラル修飾ヌクレオチド間結合を含まないか、より低レベルで含み；加えて且つ代わりに、各ウィングは、異なるパターンの糖修飾、ヌクレオチド間結合及び／又は骨格キラル中心を含み得る。一部の実施形態では、一方のウィングは、1つ又は複数の天然リン酸結合と、1つ又は複数の2'-OR修飾（Rは、-H若しくは-Meではない）を含み、他方のウィングは、天然リン酸結合を含まず、2'-OR修飾（Rは、-H若しくは-Meではない）を含まない。一部の実施形態では、一方のウィングは、1つ又は複数の天然リン酸結合と、1つ又は複数の2'-MOE修飾を含み、他方のウィングの各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、他方のウィングの各糖単位は、2'-OMe修飾を含む。一部の実施形態では、一方のウィングは、1つ又は複数の天然リン酸結合と、1つ又は複数の2'-MOE修飾を含み、他方のウィングの各ヌクレオチド間結合は、Spホスホロチオエート結合であり、他方のウィングの各糖単位は、2'-OMe修飾を含む。

10

20

30

【0142】

一部の実施形態において、コアは、2'-修飾を含む糖を含まない。一部の実施形態において、コアは、2'-ORを含む糖を含まず、式中、Rは、本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、各コア糖は、2つの2'-Hを含む（例えば、典型的には天然DNA糖で見られる通り）。

【0143】

一部の実施形態において、コア中のヌクレオチド間結合の70%、80%、90%以上又は100%が、修飾ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、コア中のヌクレオチド間結合の70%、80%又は90%以上は、独立に、Sp配置の修飾ヌクレオチド間結合であり、且つコアは、Rp配置の修飾ヌクレオチド間結合及び天然リン酸結合から選択される1、2、3、4又は5つのヌクレオチド間結合も含有する。一部の実施形態において、コア中のホスホロチオエートヌクレオチド間結合の70%、80%又は90%以上は、独立に、Sp配置の修飾ヌクレオチド間結合であり、且つコアは、Rp配置の1、2、3、4又は5つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合も含有する。一部の実施形態では、コアは、Rp配座の修飾ヌクレオチド間結合及び天然リン酸結合から選択される1又は2つのヌクレオチド間結合を更に含む。一部の実施形態では、コアは、Rp配座の修飾ヌクレオチド間結合及び天然リン酸結合から選択される1つ以下のヌクレオチド間結合を更に含み、残りのヌクレオチド間結合は、独立に、Sp配座の修飾ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態では、コアは、Rp配座の修飾ヌクレオチド間結合及び天然リン酸結合から各々独立に選択される2つ以下のヌクレオチド間結合を更に含み、残り

40

50

のヌクレオチド間結合は、独立に、S p 配座の修飾ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態では、コアは、1つ以下の天然リン酸結合を更に含み、残りのヌクレオチド間結合は、独立に、S p 配座の修飾ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態では、コアは、2つ以下の天然リン酸結合を更に含み、残りのヌクレオチド間結合は、独立に、S p 配座の修飾ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態では、コアは、1つ以下のR p 配座の修飾ヌクレオチド間結合を更に含み、残りのヌクレオチド間結合は、独立に、S p 配座の修飾ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態では、コアは、2つ以下のR p 配座の修飾ヌクレオチド間結合を更に含み、残りのヌクレオチド間結合は、独立に、S p 配座の修飾ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態では、2つの天然リン酸結合又は2つのR p 配座の修飾ヌクレオチド間結合は、2つ以上のS p 配座の修飾ヌクレオチド間結合によって隔てられる。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、式Iのものである。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。当業者によって理解される通り、ウィング糖及びコア糖に結合しているヌクレオチド間結合は、コアヌクレオチド間結合とみなすことができる。

10

【0144】

コア及びウィングは様々な長さであり得る。一部の実施形態において、コアは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20核酸塩基以上を含む。一部の実施形態において、ウィングは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10核酸塩基以上を含む。一部の実施形態において、ウィングは、2、3、4、5、6、7、8、9又は10核酸塩基以下を含む。一部の実施形態において、ウィングーコアーウィング構造について、両方のウィングが同じ長さ、例えば5核酸塩基である。一部の実施形態において、2つのウィングは異なる長さである。一部の実施形態において、コアは、コア内のヌクレオチド単位のパーセンテージによって測定したとき、オリゴヌクレオチド全長の40%、45%、50%、60%、70%、80%又は90%以上である。一部の実施形態において、コアはオリゴヌクレオチド全長の50%以上である。

20

【0145】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、様々な塩形態、特に薬学的に許容される塩形態を含めた様々な形態で提供することができる。一部の実施形態では、本開示は、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。一部の実施形態では、塩は、薬学的に許容される塩である。一部の実施形態では、塩基に供与され得る（例えば、水溶液、医薬組成物などの条件下で）各水素イオンは、非H⁺カチオンにより置換される。例えば、一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの薬学的に許容される塩は、全金属（all-metal）イオン塩であり、ここで、各ヌクレオチド間結合（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など）の各水素イオン（例えば、-OH、-SHなどの）は、金属イオンにより置換される。一部の実施形態では、提供される塩は、全ナトリウム塩である。一部の実施形態では、提供される薬学的に許容される塩は、全ナトリウム塩である。一部の実施形態では、提供される塩は、全ナトリウム塩であり、ここで、天然リン酸結合（酸形態-O-P(O)(OH)-O-）である各ヌクレオチド間結合は、存在する場合、そのナトリウム塩形態（-O-P(O)(ONa)-O-）として存在し、ホスホロチオエートジエステル結合（酸形態-O-P(O)(SH)-O-）である各ヌクレオチド間結合は、存在する場合、そのナトリウム塩形態（-O-P(O)(SNa)-O-）として存在する。

30

40

【0146】

一部の実施形態において、提供される化合物、例えば、オリゴヌクレオチドは、C9orf72標的の活性及び／又は機能を調節し得る。一部の実施形態において、C9orf72標的遺伝子は、1つ以上のC9orf72遺伝子産物（例えば、RNA及び／又はタンパク質産物）の発現及び／又は活性を変化させることが意図される遺伝子である。一部の実施形態において、C9orf72は、病態、障害又は疾患に関連する。多くの実施形態において、C9orf72標的遺伝子は、阻害されることが意図される。従って、多くの実施形態において、本明細書に記載される通りのC9orf72オリゴヌクレオチドが

50

特定の C9orf72 標的遺伝子に作用するとき、その C9orf72 遺伝子の 1 つ以上の遺伝子産物、特に病態、障害又は疾患に関連するものの存在及び／又は活性が、オリゴヌクレオチドがその不存在のときと比較して存在するとき、低減される。

【0147】

一部の実施形態において、C9orf72 標的は、それに関する 1 つ以上の産物（例えば、RNA 及び／又はタンパク質産物）の発現及び／又は活性を変化させることが意図される特異的アレル（例えば、病態、障害又は疾患に関連する病的アレル）である。多くの実施形態において、C9orf72 標的アレルは、その存在及び／又は発現が、1 つ以上の疾患及び／又は病態、例えば C9orf72 関連障害の存在、発生率及び／又は重症度に関連する（例えば、相関する）ものである。代わりに又は加えて、一部の実施形態において、C9orf72 標的アレルは、それについての 1 つ以上の遺伝子産物のレベル及び／又は活性の変化が疾患及び／又は病態の 1 つ以上の側面の改善（例えば、発生の遅延、重症度の低減、他の治療法に対する応答性等）に相関するものである。一部のかかる実施形態において、本明細書に記載される通りの C9orf72 オリゴヌクレオチド及びその使用法は、非病的アレル、例えば 1 つ以上の関連性が低い／関連性のないアレルと比べて病的アレルを優先的又は特異的に標的とし得る。一部の実施形態において、C9orf72 の病的アレルは、リピート伸長、例えばヘキサヌクレオチドリピート伸長（HRE）、例えば約 30 超 500 又は 1000 以下又はそれを超えるヘキサヌクレオチドリピート伸長を含む。一部の実施形態において、アレルからの転写物は、2 つ以上の変異体（例えば、異なるスプライシングパターンから）を有し得る。一部の実施形態において、提供される技術は、病態、障害又は疾患に関連する転写物（例えば、RNA）及び／又はそれによってコードされる産物（例えば、タンパク質）の発現、活性及び／又はレベルを、病態、障害又は疾患とあまり関連しないか又は関連しないものと比較して選択的に低減する。

【0148】

一部の実施形態において、C9orf72 標的配列は、本明細書に記載される通りのオリゴヌクレオチドが結合する配列である。多くの実施形態において、C9orf72 標的配列は、提供されるオリゴヌクレオチドの配列又はその中の連続残基の配列と同一であるか、又はその正確な相補体である（例えば、提供されるオリゴヌクレオチドは、C9orf72 標的配列と同一であるか又はその正確な相補体である標的結合配列を含む）。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド（の関連性のある一部分）とその標的配列との間に少数の差異／ミスマッチ（例えば、1、2 又は 3 以下）が許容される。多くの実施形態において、C9orf72 標的配列は C9orf72 標的遺伝子内に存在する。多くの実施形態において、C9orf72 標的配列は、C9orf72 標的遺伝子から産生される転写物（例えば、mRNA 及び／又は pre-mRNA）の範囲内に存在する。一部の実施形態において、C9orf72 標的配列は、1 つ以上のアレル部位（即ち C9orf72 標的遺伝子内においてアレル変異が出現する位置）を含む。一部のかかる実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1 つ以上の他のアレルと比べて優先的に又は特異的に、ある 1 つのアレルに結合する。

【0149】

一部の実施形態において、C9orf72（9 番染色体オープンリーディングフレーム 72）は、C9ORF72、C9、ALSFTD、FTDAL S、FTDAL S1、DENNL72；外部 ID：MGI：1920455 Homologene：10137 GeneCards：C9orf72 と称される遺伝子又はその遺伝子産物である。一部の実施形態において、C9orf72 は、非公式には C9 と称され得る。C9orf72 オルソログ：種：ヒト Entrez：203228；Ensembl：ENSG00000147894；UniProt：Q96LT7；RefSeq（mRNA）：NM_145005 NM_001256054 NM_018325；RefSeq（タンパク質）：NP_001242983 NP_060795 NP_659442；位置（UCSC）：Chr9：27.55～27.57Mb；種：マウス Entrez：73205；Ensembl：ENSMUSG00000028300；UniProt

：Q6DFW0；RefSeq (mRNA)：NM_001081343；RefSeq (タンパク質)：NP_00107481；位置 (UCSC)：Chr4：35.19～35.23Mb。C9orf72をコードするヌクレオチドとしては、限定なしに、GENBANK受託番号NM_001256054.1；GENBANK受託番号NT_008413.18；GENBANK受託番号BQ068108.1；GENBANK受託番号NM_018325.3；GENBANK受託番号DN993522.1；GENBANK受託番号NM_145005.5；GENBANK受託番号DB079375.1；GENBANK受託番号BU194591.1；配列識別番号4141_014_A5；配列識別番号4008_73_A；及びGENBANK受託番号NT_008413.18が挙げられる。C9orf72は、報告によれば、分子質量が54328Daの481アミノ酸タンパク質であり、これはユビキチン化及びリン酸化の翻訳後修飾を受け得る。C9orf72の発現レベルは、報告によれば中枢神経系で最も高いことができ、タンパク質はニューロンの細胞質並びにシナプス前終末に局在化する。C9orf72は、報告によれば、エンドソーム及びリソソーム輸送調節において役割を果たし、オートファジー及びエンドサイトーシス輸送に関与するRABタンパク質と相互作用することが示されている。C9orf72は、報告によれば、初期エンドソーム輸送を媒介するGTPアーゼであるRAB5を活性化する。C9orf72における突然変異は、報告によれば、ALS及びFTDと関連付けられている。De Jesus-Hernandez et al. 2011 Neuron 72：245-256；Renton et al. 2011 Neuron 72：257-268；及びItzovich et al. 2016 Neurobiol. Aging. Volume 40, Pages 192.e13-192.e15。報告によれば、C9orf72関連障害などの神経学的疾患に罹患している対象では、C9orf72にヘキサヌクレオチドリピート伸長（例えば、(GGGGCC)n）が存在し得る。

10

20

30

40

50

【0150】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、何れかのDNA鎖に由来するC9orf72核酸にハイブリダイズすることができる。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72アンチセンス又はセンス転写物にハイブリダイズすることができる。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、限定はされないがプレmRNA又は成熟mRNAを含めた、RNAプロセシングの任意の段階にあるC9orf72核酸にハイブリダイズすることができる。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、限定はされないが、C9orf72核酸のプロモーター領域、エンハンサー領域、転写終止領域、翻訳開始シグナル、翻訳終止コドン、コード領域、非コード領域、エクソン、イントロン、5'UTR、3'UTR、リピート領域、ヘキサヌクレオチドリピート伸長、スプライスジャンクション、イントロン／エクソン又はエクソン／イントロンジャンクション、エクソン：エクソンスプライスジャンクション、エクソンスプライシングサイレンサー (ESS)、エクソンスプライシングエンハンサー (ESE)、エクソン1a、エクソン1b、エクソン1c、エクソン1d、エクソン1e、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、イントロン1、イントロン2、イントロン3、イントロン4、イントロン5、イントロン6、イントロン7、イントロン8、イントロン9又はイントロン10を含め、C9orf72核酸の任意の要素又はその相補体にハイブリダイズすることができる。イントロンとエクソンとは交互に並ぶ；イントロン1はエクソン1（又は1a又は1b又は1c等）とエクソン2との間にあり；イントロン2はエクソン2と3との間にあり、以下同様である。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、イントロン1中の標的配列と同一であるか又は相補的である。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、エクソン1bからの一部分とイントロン1からの一部分とを含む標的配列と同一であるか又は相補的である。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、エクソン1bとイントロン1との間のジャンクションにまたがる。

【0151】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、GENBANK受託番号NT_008413.18、ヌクレオシド27535000~27565000又はその相補体によって表されるC9orf72プレmRNAの一部分にハイブリダイズすることができる。

【0152】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドはイントロンにハイブリダイズすることができる。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、ヘキサヌクレオチドリピートを含むイントロンにハイブリダイズすることができる。

【0153】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、センス鎖に由来する全てのC9orf72変異体にハイブリダイズする。一部の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定はされないがヘキサヌクレオチドリピート伸長を含むものを含め、センス鎖に由来するC9orf72変異体に選択的にハイブリダイズする。一部の実施形態において、ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、任意のヘキサヌクレオチドの少なくとも24リピートを含む。一部の実施形態において、ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、任意のヘキサヌクレオチドの少なくとも30リピートを含む。一部の実施形態において、ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、ヘキサヌクレオチドの何れかの少なくとも50リピートを含む。一部の実施形態において、ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、ヘキサヌクレオチドの何れかの少なくとも100リピートを含む。一部の実施形態において、ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、任意のヘキサヌクレオチドの少なくとも200リピートを含む。一部の実施形態において、ヘキサヌクレオチドリピート伸長は、任意のヘキサヌクレオチドの少なくとも500リピートを含む。一部の実施形態において、ヘキサヌクレオチドは、GGGGCC、GGGGGG、GGGGGC、GGGGCG、CCCCGG、CCCCCC、GGGGCC及び／又はCGCCCCである。一部の実施形態において、ヘキサヌクレオチドGGGGCCはGGGGCCexp又は(GGGGCC)_nと表記され、即ちヘキサヌクレオチドGGGGCCのリピートである。

【0154】

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又はその一領域（例えば、コア）の骨格キラル中心のパターンは、本明細書に記載される通り(Sp)m(Rp)n、(Rp)n(Sp)m、(Np)t[(Op)n(Sp)m]y、(Sp)t[(Op)n(Sp)m]y、(Np)t[(Rp)n(Sp)m]y又は(Sp)t[(Rp)n(Sp)m]yを含むか又はそれであり、式中、m、n、t、yの各々は独立に1~50である。一部の実施形態において、少なくとも1つのnは1である。一部の実施形態において、各nは、独立に1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、骨格キラル中心のパターンは、(Rp)n(Sp)m、(Np)t(Rp)n(Sp)m又は(Sp)t(Rp)n(Sp)mを含むか又はそれであり、式中、m>2である。一部の実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、(Rp)n(Sp)m、(Np)t(Rp)n(Sp)m又は(Sp)t(Rp)n(Sp)m、を含むか又はそれであり、式中、nは1であり、t>1及びm>2である。一部の実施形態において、少なくとも1つのnは1であり、少なくとも1つのtは1以上であり、及び少なくとも1つのmは2以上である。一部の実施形態において、少なくとも1つのnは1であり、少なくとも1つのtは2以上であり、及び少なくとも1つのmは3以上である。一部の実施形態において、各nは1である。一部の実施形態において、少なくとも1つのt>1である。一部の実施形態において、少なくとも1つのt>2である。一部の実施形態において、少なくとも1つのt>3である。一部の実施形態において、少なくとも1つのt>4である。一部の実施形態において、少なくとも1つのm>1である。一部の実施形態において、少なくとも1つのm>2である。一部の実施形態において、少なくとも1つのm>3である。一部の実施形態において、少なくとも

10

20

30

40

50

1つの $m > 4$ である。一部の実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、1つ以上のアキラルな天然リン酸結合を含む。一部の実施形態において、 m 、 t 及び n （又はパターンの t がない場合、 m 及び n ）の和は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20以上である。一部の実施形態において、和は5である。一部の実施形態において、和は6である。一部の実施形態において、和は7である。一部の実施形態において、和は8である。一部の実施形態において、和は9である。一部の実施形態において、和は10である。一部の実施形態において、和は11である。一部の実施形態において、和は12である。一部の実施形態において、和は13である。一部の実施形態において、和は14である。一部の実施形態において、和は15である。一部の実施形態において、 S_p は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合の配置である。一部の実施形態において、各 S_p は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合の配置である。一部の実施形態において、 R_p は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合の配置である。一部の実施形態において、各 R_p は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合の配置である。一部の実施形態において、各 S_p は、コアについての骨格キラル中心のパターンについてのホスホロチオエートヌクレオチド間結合の配置である。一部の実施形態において、各 R_p は、コアについての骨格キラル中心のパターンについてのホスホロチオエートヌクレオチド間結合の配置である。

10

【0155】

塩基配列

一部の実施形態において、提供されるC9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72遺伝子又はその遺伝子産物の発現、レベル及び／又は活性の低下を指令し得る。一部の実施形態において、C9orf72標的遺伝子は、リピート伸長を含む。一部の実施形態において、提供されるC9orf72オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列又はその一部分を含み得、ここで、一部分は、少なくとも15隣接塩基のスパン又は1～5つのミスマッチを含む少なくとも15隣接塩基のスパンである。一部の実施形態において、そのC9orf72標的の塩基配列（例えば、C9orf72遺伝子又は転写物の同じ長さの配列）とアラインメントされるとき、提供されるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、標的配列に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%又は完全に相補的であるか又はそれと同一である。一部の実施形態において、1、2又は3つ以下のミスマッチが存在する。一部の実施形態において、2つ以下のミスマッチが存在する。一部の実施形態において、1つ以下のミスマッチが存在する。一部の実施形態において、ミスマッチは存在しない。一部の実施形態において、ミスマッチは、ウィング中に存在する。一部の実施形態において、ミスマッチは、5'-ウィング中に存在する。一部の実施形態において、ミスマッチは、3'-ウィング中に存在する。一部の実施形態において、ミスマッチは、コア中に存在する。一部の実施形態において、全ての「マッチ」は、ワトソン・クリック塩基対である。一部の実施形態において、1つ以上、例えば、1、2、3つのゆらぎ塩基対が存在する。一部の実施形態において、1、2又は3つ以下のゆらぎ塩基対が存在する。一部の実施形態において、2つ以下のゆらぎ塩基対が存在する。一部の実施形態において、1つ以下のゆらぎ塩基対が存在する。一部の実施形態において、ゆらぎ塩基対は存在しない。一部の実施形態において、ゆらぎ塩基対は、ウィング中に存在する。一部の実施形態において、ゆらぎ塩基対は、5'-ウィング中に存在する。一部の実施形態において、ゆらぎ塩基対は、3'-ウィング中に存在する。一部の実施形態において、ゆらぎ塩基対は、コア中に存在する。

20

30

40

【0156】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドの塩基配列は、標的特異的ノックダウンを媒介する上で、C9orf72転写物標的に対して十分な長さ及び同一性を有する。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、転写物標的配列の部分と相補的である。

【0157】

50

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C9orf72標的転写物のそれと相補的である。本明細書で使用される通り、「標的転写物配列」、「標的配列」、「標的遺伝子」などは、一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAを含め、C9orf72遺伝子の転写中に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の連続部分を指す。

【0158】

本明細書の用語「相補的」、「完全に相補的」及び「実質的に相補的」は、それらの使用の状況から理解されるように、C9orf72オリゴヌクレオチドとC9orf72標的配列同士の塩基マッチングに関して使用することができる。一部の実施形態では、C9orf72オリゴヌクレオチドの塩基配列は、最大にアライメントされたとき、オリゴヌクレオチドの各塩基が標的鎖上の連続塩基と塩基対合することができる場合、C9orf72標的配列の塩基配列と相補的である。非限定的な例として、標的配列が、例えば、5'-GCAUAGCGAGCGAGGGAAAC-3'の塩基配列を有する場合、5'-GUUUUCCCU CGCUCGCUAUGC-3'の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドは、そのような標的配列と相補的であるか又は完全に相補的である。当然ながら、TによるUの又はその逆の置換は、相補性の量を変化させないことに留意されたい。

【0159】

本明細書に記載される通り、C9orf72標的配列と「実質的に相補的な」ポリヌクレオチドは、主に又は大部分が相補的であるが、100%相補的ではない。一部の実施形態では、実質的に相補的な配列（例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド）は、標的配列に対して100%相補的な配列から1、2、3、4又は5つのミスマッチを有する。

【0160】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドの塩基配列は、免疫刺激物質として作用し得るCpGモチーフを含み得る（例えば、非メチル化のとき）。一部の実施形態において、CpGモチーフのC又はGは、C及び／又はGを別の塩基で置き換えるように修飾される。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドの塩基配列は、本明細書に記載される任意のC9orf72オリゴヌクレオチドの配列であるか又はそれを含み（又はその少なくとも15隣接塩基のスパンを含み）、但し、CpGモチーフ内のC又はGは、存在する場合、別の核酸塩基に変化される。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドの塩基配列は、本明細書に記載される任意のC9orf72オリゴヌクレオチドの配列であるか又はそれを含み（又はその少なくとも15隣接塩基のスパンを含み）、但し、CpGモチーフ内のCは、存在する場合、別の核酸塩基に変化される。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドの塩基配列は、本明細書に記載される任意のC9orf72オリゴヌクレオチドの配列であるか又はそれを含み（又はその少なくとも15隣接塩基のスパンを含み）、但し、CpGモチーフ内のGは、存在する場合、別の核酸塩基に置き換えられる。本明細書で使用される通り、オリゴヌクレオチド中の塩基を置き換え塩基に置き換えることに関する語句又は他の本文は、ワトソン・クリック塩基対合（例えば、Aとの各U又はT塩基対及びCとの各G塩基対）を介して標的配列（例えば、mRNA）の塩基配列に100%相補的である塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが置き換え塩基によって置き換えられ、但し、オリゴヌクレオチド中の1つの塩基（通常、標的核酸中の対応する塩基とワトソン・クリック塩基対を形成する）が、標的核酸の対応する塩基とワトソン・クリック塩基対を形成し得ない置き換え塩基（例えば、核酸塩基又は核酸塩基誘導体）によって置き換えられることを除くが、置き換え核酸塩基は、任意選択で標的核酸配列中の対応する塩基と非ワトソン・クリック塩基対〔限定はされないが、グアニン-ウラシル（G-U）、ヒポキサンチン-ウラシル（I-U）、ヒポキサンチン-アデニン（I-A）及びヒポキサンチン-シトシン（I-C）などのゆらぎ塩基対を含める〕を形成し得る（が必ずしも形成しない）状況を参照する。一部の実施形態において、置き換え塩基でのオリゴヌクレオチド中の塩基の置き換えは、ミスマッチをその位置で標的配列に導入する。一部の実施形態において、Cは、Tで置き換えられる（例えば、コア中で又はヌクレオシドCは、2'-ORも2'位の置

10

20

30

40

50

換基も含まない)。一部の実施形態において、Cは、Uで置き換えられる(例えば、ウィング中で又はヌクレオシドは2'-炭素の置換基を含む)。一部の実施形態において、1つ以上のCは、独立に置き換えられる。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド又はその一部分(例えば、5'-ウィング、コア、3'-ウィング)中の各Cは、独立に置き換えられる。

【0161】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドにおいて、Gは、イノシン(I)によって置き換えられる。一部の実施形態において、イノシン又はIという用語は、本明細書で使用されるとき、核酸塩基ヒポキサンチンと同一視される。一部の実施形態において、イノシンという用語は、本明細書で使用されるとき、ヒポキサンチンと糖又は修飾糖とを含むヌクレオシドと同一視される。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、CpIモチーフ(例えば、核酸塩基GがIによって置き換えられたCpGモチーフ)を含む。そうしたC9orf72オリゴヌクレオチドの非限定的な例としては、限定はされないが、WV-21442及びWV-21445が挙げられる。

【0162】

一部の実施形態において、CpGモチーフを有するC9orf72オリゴヌクレオチドにおいて、Cは、例えば、CpGモチーフの免疫原性を低減するように修飾されている(例えば、5mCにメチル化)。一部の実施形態において、修飾Cヌクレオシド、例えば、5mCヌクレオシド、は、2'-MOE修飾を含む。一部の実施形態において、ウィング中のCpGモチーフにおいて、Cは、修飾されている(例えば、5mCにメチル化)。一部の実施形態において、5'-ウィング中のCpGモチーフにおいて、Cは、修飾されている(例えば、5mCにメチル化)。一部の実施形態において、3'-ウィング中のCpGモチーフにおいて、Cは、修飾されている(例えば、5mCにメチル化)。一部の実施形態において、コア中のCpGモチーフにおいて、Cは、修飾されている(例えば、5mCにメチル化)。一部の実施形態において、CpGモチーフの各Cは、修飾されている(例えば、5mCにメチル化)。一部の実施形態において、CpGモチーフ中ではない1つ以上のCは、独立に修飾されている(例えば、5mCにメチル化)。こうしたオリゴヌクレオチドの非限定的な例としては、WV-21445、WV-21446、WV-23740、WV-23503及びWV-23491が挙げられる。

【0163】

一部の実施形態において、末端塩基(例えば、最端部の5'又は3'末端の一方)は、CpGモチーフ中の成分(例えば、オリゴヌクレオチドの5'末端のCpG中のC又は3'末端のCpG中のG)である。一部の実施形態において、末端塩基は、末端塩基でない塩基(例えば、非末端塩基)よりも標的核酸へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに寄与し得ない。一部の実施形態において、本開示は、CpGオリゴヌクレオチドに関し、ここで、末端塩基は、CpGモチーフ中の成分であり、且つ末端塩基は、別の塩基によって置き換えられ；一部の実施形態において、CpGオリゴヌクレオチドの末端塩基は、Gであり、且つIによって置き換えられる。

【0164】

C9orf72オリゴヌクレオチドの設計及び構築を考慮する塩基配列の一部の実施形態において、末端塩基は、CpGモチーフ中の成分であり、且つ従って末端塩基は、オリゴヌクレオチドの塩基配列中に含まれない(例えば、オリゴヌクレオチドは、1塩基だけトランケートされる)。こうしたオリゴヌクレオチドの非限定的な例としては、WV-21557、WV-23486、WV-23435及びWV-23487が挙げられる。

【0165】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドにおいて、末端塩基は、核酸塩基Aであり、且つ塩基は、I又はGによって置き換えられる。こうしたオリゴヌクレオチドの非限定的な例としては、WV-21445、WV-21446、WV-23740、WV-23503及びWV-23491が挙げられる。

【0166】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、C9orf72を標的とし、且つ、以下の塩基配列

CCCACACCTGCTCTTTGCTAG、AACAGCCACCCGCCCAGGAT
 G、AACCGGGCAGCAGGGACGGC、ACAGGCTGCGGGTTGTTT
 CCC、ACCCACACCTGCTCTTTGCTA、ACCCACTCGCCACCG
 CCTGC、ACCCCAAACAGCCACCCGCGC、ACCCCCCATCTCAT
 CCCGCAT、ACCCGAGCTGTCTCTCTTCCC、ACCCGCCAGGA
 TGCCGCTC、ACCCGCGCGCTCTTCCCGGCA、ACCCCTCCGG
 CCTTCCCCCAG、ACCGGGCAGCAGGGACGGCT、ACCTCTC
 TTTCTAGCGGGA、ACGCACCTCTCTTTCTAGC、ACTCA
 CCCACTCGCCACCGC、AGCAAACCGGGCAGCAGGGAC、AGC
 CGTCCCTGCTGCCCGGT、AGCGCGCGACTCCTGAGTTC、A
 GCTTGCTACAGGCTGCGGT、AGGATGCCGCGCTCCTCACTC
 、AGGCTGCGGGTTGTTTCCCTC、AGGCTGTGAGCTCGGATC
 TC、AGGGCCACCCCTCCTGGGAA、ATCCCTCACAAGGCTC
 TTGT、ATGCCGCGCTCCTCACTCACCC、ATTGCCCTGCATCCG
 GGCCCC、CACCCACTCGCCACCGCGCTG、CACCCCCATCTC
 ATCCCGCA、CACCCGCCAGGATGCCGCGCT、CACCTCTCTT
 TCCTAGCGGG、CACTCACCCACTCGCCACCG、CAGGATGC
 CGCCTCCTCACT、CAGGCTGCGGGTTGTTTCCCT、CAGGGT
 GGCATCTGCTTACAC、CCAAACAGCCACCCGCGCAGG、CCAC
 CCGCCAGGATGCCGCGC、CCACCCCTCCGGCGCTTCCCCC、CC
 ACTCGCCACCGCGCTGCGC、CCAGGATGCCGCGCTCCTCAC、
 CCCAAACAGCCACCCGCGCAG、CCCACTCGCCACCGCGCTGC
 G、CCCCAAACAGCCACCCGCGCA、CCCGCCAGGATGCCGCGC
 TCC、CCTCACTCACCCACTCGCGC、CCCGCGCGCTCTTCCC
 GGCAG、CCCGGCAGCCGAACCCCAAAC、CCGACTTGCAATTG
 CTGCCCT、CCGCAGCCTGTAGCAAGCTC、CCGCCAGGATG
 CCGCGCTCCT、CCGCCTCCTCACTCACCCAC、CCGCGCGCTC
 TTCCCGGCAGC、CCGCTTCTACCCGCGCGCTCT、CCGGGCA
 GCAGGGACGGCTG、CCTAGCGGGACACCGTAGGT、CCTCA
 CTCACCCACTCGCCA、CCTCCGGCGCTTCCCCCAGGC、CCT
 CCTCACTCACCCACTCG、CCTCTCTTTCTAGCGGGAC、C
 CTCTGCCAAGGCGCTGCCAC、CCTCTTCCCGGCAGCCGAAC
 、CCTGAGTTCCAGAGCTTGCT、CCTGCTCTTGCTAGACCC
 CG、CCTGCTGCCCGGGTTGCTTCT、CCTGGTTGCTTACAG
 CTCC、CCTTCCCTGAAGGTTCTCTCC、CGCACCTCTCTTTCT
 CTAGCG、CGCATAGAATCCAGTACCAT、CGCCAGGATGCC
 GCCTCCTC、CGCCTCCTCACTCACCCACT、CGCCTCTTCC
 CGGCAGCCGA、CGCGCGACTCCTGAGTTCCA、CGCTTCTA
 CCCGCGCGCTCTT、CGGGCAGCAGGGACGGCTGA、CGGTTG
 TTTCCCTCCTTGTT、CTACCCGCGCGCTCTTCCCGG、CTCA
 CCCACTCGCCACCGCC、CTCACTCACCCACTCGCCAC、CT
 CAGTACCCGAGGCTCCCT、CTCCTCACTCACCCACTCGC、
 CTCTTCCCGGCAGCCGAACC、CTCTTGCTAGACCCCGGCC
 C、CTCTTTCTAGCGGGACACC、CTGCGGTTGTTTCCCTC
 CTT、CTGCTCTTGCTAGACCCCGC、CTTCCCGGCAGCCGA
 ACCCC、CTTCCCTTGCTTTTCCCGCGCT、CTTCTACCCGCGC
 CTCTTCC、CTTGCTAGACCCCGCCCCCA、CTTGGTGTGTC
 AGCCGTTCCC、CTTGTTTACCCCTCAGCGAGT、CTTTCTTAG

10

20

30

40

50

CGGGACACCGT、GACATCCCCTCACAGGCTCT、GAGAGCC
CCCGCTTCTACCC、GAGCTGCCCCAGGACCACTTC、GAGCT
TGCTACAGGCTGCGG、GAGGCCAGATCCCCATCCCT、GAT
CCCCATTCCAGTTTCCA、GATGCCGCTCTCTCACTCAC、G
CAACCGGGCAGCAGGGACG、GCACCTCTCTTTCTAGCGG
、GCAGGCGGTGGCGAGTGGGT、GCAGGCGTCTCCACACCC
CC、GCAGGGACGGCTGACACACC、GCATCCGGGGCCCCGGG
CTTC、GCATCCTGGCGGGGTGGCTGT、GCCACCCGCCAGGA
TGCCGC、GCCAGATCCCCATCCCTTGT、GCCAGGATGCCG
CCTCCTCA、GCCCTCAGTACCCGAGCTGT、GCCGCTCTCT
CACTCACCCA、GCCGGGAAGAGGCGCGGGTAG、GCCGTCC
CTGCTGCCCGGTT、GCCTCCTCACTCACCCACTC、GCCTC
TCAGTACCCGAGGCT、GCCTCTTCCCAGGCGAGCCGAA、GCG
CAGGCGGTGGCGAGTGGGTGAGTGAGGAGGCGGCATC、GC
GCAGGCGGTGGCGAGTGGGTGAGTGAGG、GCGCGACTCCT
GAGTTCCAG、GCGCGCGACTCCTGAGTTCC、GCGGCATCC
TGGCGGGGTGGC、GCGGTTGCGGTGCCTGCGCC、GCGGTTG
TTTCCCTCCTTGT、GCTACAGGCTGCGGGTTGTTT、GCTAG
ACCCCGCCCCCAAAA、GCTCTGAGGAGAGCCCCCGC、GCT
CTTGCTAGACCCCGCCC、GCTGCGATCCCCATTCCAGT、G
CTGCGGTTGTTTCCCTCCT、GCTGGAGATGGCGGGTGGGCA
、GCTGGGTGTCGGGCTTTTCGC、GCTGTTTGAACGACCTCT
CT、GCTTCTACCCGCGCCTCTTC、GCTTGCTACAGGCTGC
GGTT、GCTTGGTGTGTCAAGCCGTCC、GCTTTCCCGCCCTC
AGTACC、GGACCCGCTGGGAGCGCTGC、GGATGCCGCTC
CTCACTCA、GGCAGCAGGGACGGCTGACA、GGCCTCTCAG
TACCCGAGGC、GGCGGAGGCGCAGGCGGGTGG、GGCGTCTC
CACACCCCCATC、GGCTCCCTTTTCTCGAGCCC、GGCTGC
GGTTGTTTCCCTCC、GGGAAGGCCCGGAGGGGTGGGC、GGGC
AGCAGGGACGGCTGAC、GGGCTCTCCTCAGAGCTCGA、GG
GTGTCGGGCTTTTCGCCCTC、GGTCCCTGCCCGGCGAGGAGA、
GTACCCGAGGCTCCCTTTTC、GTCAGCCGTCCCTGCTGCC
C、GTCCCTGCTGCCCGGTTGCT、GTCCGTGTGCTCATTTGG
GTC、GTCGCTGTTTGAACGACCTC、GTCGGGTGTGCTCCCC
ATTCT、GTGCAGGCGTCTCCACACCC、GTGCTGCGATCCC
CATTCCA、GTGGCAGGCCCTTGGCAGAGG、GTTCAACCTCA
GCGAGTACT、GTTGCGGTGCCTGCGCCCCGC、GTTGTTTCC
CTCCTTGTTTT、TACAGGCTGCGGGTTGTTTCC、TACCCGC
GCCTCTTCCCGGC、TCACCCACTCGCCACCCGCCT、TCACC
CTCAGCGAGTACTGT、TCACTCACCCACTCGCCACC、TCC
CCTCACAGGCTCTTGTG、TCCCGGCGAGCCGAACCCCAA、T
CCTCACTCACCCACTCGCC、TCCTTGCTTTTCCCGCCCTCA
、TCTCAGTACCCGAGGCTCCC、TCTTCCCGGCGAGCCGAAC
CC、TCTTGCTAGACCCCGCCCCC、TGCCGCTCTCTCACTC
ACCC、TGCCGTGCATCCGGGGCCCCGG、TGCGGTTGTTTCCC
TCCTTG、TGCTACAGGCTGCGGGTTGTT、TGCTAGACCCCG
CCCCCAA、TGCTCTTGCTAGACCCCGCC、TGGGAATGGGG
ATCGCAGCAC、TGGGAATGGGGGATCGCAGCACA、TGGCGAG
TGGGTGAGTGAGGAGGCGGCATC、TGTGCTGCGATCCCCA
TTCC、TTCCAGAGCTTGCTACAGGC、TTCCCCGGCGAGCCGA

10

20

30

40

50

A C C C C A、T T C T A C C C G C G C C T C T T C C C、T T G C T A C A G G C T
G C G G T T G T、T T G C T A G A C C C C G C C C C C A A、T T T C C C C A C A
C C A C T G A G C T、A C C C A C T C G C C A、A C C C A C T C G C C A、A C T
C A C C C A C T C G C C A C C G C、A C T C A C C C A C T C G C C A C C G C、A
C T C A C C C A C T C G C C A C C G C、A C T C A C C C A C T C G C C A C C G C
、A C T C A C C C A C T C G C C A C C G C、A C T C G C C A、A U A C U U A C C
U G G、C A C T C G C C A、C C C A C T C G C C A、C C C A C T C G C C A、C C
T C A C T C A C C C A C T C G C C、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C、C C
T C A C T C A C C C A C T C G C C A、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A、
C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C
A、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A、C C T C A C T C A C C C A C T C G
C C A、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A、C C T C A C T C A C C C A C T
C G C C A、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C C、C C T C A C T C A C C C A
C T C G C C C、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C G、C C T C A C T C A C C
C A C T C G C C G、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C G、C C T C A C T C A
C C C A C T C G C C G、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C G、C C T C A C T
C A C C C A C T C G C C G、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C I、C C T C A
C T C A C C C A C T C G C C I、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C U、C C T
C A C T C A C C C A C T C G C C U、C C T C A C T C A C C C A C U C G C C、C C
T C A C T C A C C C A C U C G C C、C C T C A C T C A C C C A C U C G C C、C C
T C A C T C A C C C A C U C G C C A、C C T G C T G C C C G G T T G C T T C T、
C C T G C T G C C C G G T T G C U U C U、C C U G C T G C C C G G T T G C T T C
T、C G C C U C C T C A C T C A C C C A C U、C T C A C T C A C C C A C T C G C
C A C、C U C U G G A A C U C A G G A G U C G C G C G C、G C G C G A C T C C T
G A G T T C C A G、G C U A C C U A U A U G、G T C C C T G C T G C C C G G T T
G C T、G U C C C T G C T G C C C G G T T G C T、T C C T T G C T T T C C C G C
C C T C A、T G C C G C C T C C T C A C T C A C C C、U C C T C A C T C A C C C
A C U C G C C、又はU C C U T G C T T T C C C G C C C T C Aであるか、それを含む
か又はその少なくとも15塩基部分を含む塩基配列を有し、ここで、各核酸塩基Tは、独
立に、且つ任意選択で核酸塩基Uで置換され得、且つ各Uは、独立に、且つ任意選択でT
で置換され得、且つ1つ以上のC p Gモチーフ中の核酸塩基C及び／又は核酸塩基Gは、
存在する場合、別の塩基によって置き換えられ；一部の実施形態において、C p Gモチ
ーフ中のG核酸塩基は、Iによって置き換えられる。

【0167】

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、A C T C A C C C A C T
C G C C A C C G Cであるか、又はそれを含むか又はその少なくとも15塩基部分を含み
、ここで、各核酸塩基Tは、独立に、且つ任意選択で核酸塩基Uで置換され得、且つ各U
は、独立に、且つ任意選択でTで置換され得、且つC p Gモチーフ中の核酸塩基C及び／
又は核酸塩基Gは、存在する場合、別の塩基によって置き換えられ；一部の実施形態にお
いて、C p Gモチーフ中のG核酸塩基は、Iによって置き換えられる。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、A C T C A C C C A C T C G C C A C C G C
であるか、それを含むか又はその少なくとも15塩基部分を含み、ここで、各核酸塩基T
は、独立に、且つ任意選択で核酸塩基Uで置換され得、且つ各Uは、独立に、且つ任意選
択でTで置換され得、且つC p Gモチーフ中の1つ以上のGは、独立にIによって置換さ
れる。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、A C T C A C C C A
C T C G C C A C C G Cであるか、それを含むか又はその少なくとも15塩基部分を含み
、ここで、各核酸塩基Tは、独立に、且つ任意選択で核酸塩基Uで置換され得、且つ各U
は、独立に、且つ任意選択でTで置換され得る。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、A C T C A C C C A C T C G C C A C C G Cであるか、それを含む
か又はその少なくとも15塩基部分を含む。記載される通り、本開示のオリゴヌクレオチ

ドは、様々な塩基、糖及び／又はヌクレオチド間結合修飾を含み得、例えば、一部の実施形態において、5 m C は、修飾 C として利用される。

【0168】

本開示は、表 A 1 及び他所に様々なオリゴヌクレオチドを示し、それらの各々は規定の塩基配列を有する。一部の実施形態において、本開示は、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドの何れかの塩基配列であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有する任意のオリゴヌクレオチドを包含する。一部の実施形態において、本開示は、任意の化学修飾、立体化学、フォーマット、構造特徴（例えば、修飾の任意の構造若しくはパターン又はその部分）及び／又は本明細書に記載される何れか他の修飾（例えば、ターゲティング部分、炭水化物部分などの別の部分との共役；及び／若しくは多量体化）を有する、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドの何れかの塩基配列であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有する任意のオリゴヌクレオチドを包含する。一部の実施形態において、（例えば、塩基配列又は修飾のパターンの）「部分」は、少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 長である。一部の実施形態では、塩基配列の「部分」は、少なくとも 5 n t 長である。一部の実施形態では、塩基配列の「部分」は、少なくとも 10 n t 長である。一部の実施形態では、塩基配列の「部分」は、少なくとも 15 n t 長である。一部の実施形態では、塩基配列の「部分」は、少なくとも 20 n t 長である。

10

【0169】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは C 9 o r f 7 2 を標的とし、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各 T は、独立に、且つ任意選択で U で置換され得る。

20

【0170】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは C 9 o r f 7 2 を標的とし、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C A であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各 T は、独立に、且つ任意選択で U で置換され得る。

【0171】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは C 9 o r f 7 2 を標的とし、A T A C T T A C C T G G であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各 T は、独立に、且つ任意選択で U で置換され得る。

30

【0172】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは C 9 o r f 7 2 を標的とし、C A C T C G C C A であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各 T は、独立に、且つ任意選択で U で置換され得る。

【0173】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは C 9 o r f 7 2 を標的とし、A C T C G C C A であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各 T は、独立に、且つ任意選択で U で置換され得る。

【0174】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは C 9 o r f 7 2 を標的とし、A C C C A C T C G C C A であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各 T は、独立に、且つ任意選択で U で置換され得る。

40

【0175】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは C 9 o r f 7 2 を標的とし、C C C A C T C G C C A であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各 T は、独立に、且つ任意選択で U で置換され得る。

【0176】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは C 9 o r f 7 2 を標的とし、T G C C G C C T C C T C A C T C A C C C であるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各 T は、独立に、且つ任意選択で U で置換され得る。

50

【0177】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、TGCCGCCCTCCTCACTCACCCであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0178】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、GCGCGACTCCTGAGTTCCAGであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0179】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、TCCTTGCTTTTCCCGCCCTCAであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

10

【0180】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、TCCTTGCTTTTCCCGCCCTCAであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0181】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、TCCTTGCTTTTCCCGCCCTCAであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

20

【0182】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、GTCCCTGCTGCCCGGTTGCTであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0183】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、GTCCCTGCTGCCCGGTTGCTであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0184】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、GTCCCTGCTGCCCGGTTGCTであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

30

【0185】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、CCTGCTGCCCGGTTGCTTCTであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0186】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、CCTGCTGCCCGGTTGCTTCTであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

40

【0187】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、CCTGCTGCCCGGTTGCTTCTであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0188】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、GCTAACCTAATAGであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0189】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、CTCT

50

G G A A C T C A G G A G T C G C G C G Cであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0190】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C Iであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0191】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C Gであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

10

【0192】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、T C C T C A C T C A C C C A C T C G C Cであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0193】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、C T C A C T C A C C C A C T C G C C A Cであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0194】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、A C T C A C C C A C T C G C C A C C G Cであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

20

【0195】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、C G C C T C C T C A C T C A C C C A C Tであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0196】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、C C T C A C T C A C C C A C T C G C Cであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

30

【0197】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C Aであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0198】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、C C T C A C T C A C C C A C T C G C Cであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0199】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C Cであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

40

【0200】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的とし、C C T C A C T C A C C C A C T C G C C Tであるか、それを含むか又はその一部分を含む塩基配列を有し、ここで、各Tは、独立に、且つ任意選択でUで置換され得る。

【0201】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドはC9orf72を標的化し、A C T C A C C C A C T C G C C A C C G Cであるか、それを含むか又はその一部を含む塩基配列を有し、各Tは独立に任意選択でUに置換され得、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間

50

結合は5'から3'で、 $S_n R O n R S S S R S S S S R S S S n R S S$ であり、各Sは独立にSp配置のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を表し、各nRは独立にRp配置のn001を表し、Oは天然リン酸結合を表し、及び各Rは独立にRp配置のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を表す。

【0202】

実施形態の何れかのC9orf72を標的化するオリゴヌクレオチドと薬学的に許容される希釈剤又は担体とを含む医薬組成物。

【0203】

実施形態の何れかのC9orf72を標的化するオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物において、薬学的に許容される希釈剤はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)又は人工CF S(aCF S)である、医薬組成物。

10

【0204】

一部の実施形態において、医薬組成物は、C9orf72を標的化し、且つACTCA C C C A C T C G C C A C C G Cである塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。

【0205】

一部の実施形態において、医薬組成物は、C9orf72を標的化し、且つACTCA C C C A C T C G C C A C C G Cである塩基配列を有するオリゴヌクレオチド又はその塩と薬学的に許容される希釈剤の担体とを含む。

【0206】

一部の実施形態において、組成物は、C9orf72を標的化し、且つACTCA C C C A C T C G C C A C C G Cである塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含み、その塩はナトリウム塩である。

20

【0207】

一部の実施形態において、塩基配列の一部分は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19個又はそれを超える隣接(連続)塩基のスパンである。一部の実施形態において、塩基配列の一部分は、15、16、17、18、19個又はそれを超える隣接(連続)塩基のスパンである。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、上記塩基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の塩基配列は、上記塩基配列である。

【0208】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの5'末端における核酸塩基は、任意選択で置き換え核酸塩基(当業者によって理解されるもの、それは元の5'末端核酸塩基と異なる)によって置き換えられる。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの5'末端における核酸塩基は、置き換え核酸塩基によって置き換えられる。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの3'末端における核酸塩基は、任意選択で置き換え核酸塩基(当業者によって認識されるもの、それは元の3'末端核酸塩基と異なる)によって置き換えられる。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの3'末端における核酸塩基は、置き換え核酸塩基によって置き換えられる。一部の実施形態において、置き換え核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される。一部の実施形態において、置き換え核酸塩基は、Iである。一部の実施形態において、置き換え核酸塩基は、Aである。一部の実施形態において、置き換え核酸塩基は、Tである。一部の実施形態において、置き換え核酸塩基は、Uである。一部の実施形態において、置き換え核酸塩基は、Gである。一部の実施形態において、置き換え核酸塩基は、Cである。一部の実施形態において、標的配列とアラインメントされたとき、置き換え核酸塩基は非ワトソン・クリック塩基対を作出する。一部の実施形態において、置き換え核酸塩基は、ゆらぎ塩基対を作出する。

30

40

【0209】

本明細書で実証される通り、多くの実施形態において、置き換えは、改善された特性、活性、選択性などを提供し得る。

【0210】

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配列のC9orf72オリ

50

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、本明細書に記載される配列の C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドを提供し、ここで、オリゴヌクレオチドは、C 9 o r f 7 2 遺伝子又はその遺伝子産物の発現、レベル及び／又は活性の低下を導き得る。一部の実施形態において、記載される配列の C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の構造を含む。様々な配列において、U は T に置き換えることができるか又は逆も同様であり、又は配列は U 及び T の混合物を含み得る。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは長さが約 4 9、4 5、4 0、3 0、3 5、2 5、2 3 個以下の総ヌクレオチドである。一部の実施形態において、一部分は、0 ～ 3 つのミスマッチを含む少なくとも 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 又は 2 5 個の総ヌクレオチドのスパンである。一部の実施形態において、一部分は、0 ～ 3 つのミスマッチを有する少なくとも 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 又は 2 5 個の総ヌクレオチドのスパンであり、ここで、0 ミスマッチのスパンは、相補的であり、1 つ以上のミスマッチを有するスパンは実質的な相補性の非限定的な例である。上記に記載される配列の 5' 末端が U で始まる一部の実施形態において、U は欠失させ、及び／又は別の塩基に置き換えることができる。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フォーマット又はフォーマットの一部分を有する本明細書に開示される任意のオリゴヌクレオチドの塩基配列であるか、又はそれを含むか、又はその一部分を含む塩基配列を有する任意のオリゴヌクレオチドを包含する。

10

【0211】

一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列を含むことができる。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列又はその一部分を含むことができる。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列又はその一部分を含むことができ、ここで、一部分は、1 5 隣接塩基のスパン又は 1 ～ 5 つのミスマッチを含む 1 5 隣接塩基のスパンである。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載される任意の塩基配列又はその一部分を、本明細書に記載される任意の他の構造要素又は修飾と組み合わせて含むことができる。塩基配列及び有用な構造要素の特定の例を、修飾及びそのパターンを含め、表 A 1 に記載する。

20

【0212】

様々な塩基配列及び修飾を有する C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドの非限定的な例を以下の表 1 A に開示する。

30

【0213】

40

50

【表 1】

表A1. C9orf72オリゴヌクレオチド及び組成物を含めた特定のオリゴヌクレオチド及び組成物。

ID	説明	塩基配列	立体化学/ ヌクレオチド間結合
WV-8012	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA*SC*ST*Sm C*SmG*SmC*SmA	CTCACTCACCCA CTCGCCA	SOOOSSSRSSRSSSSSS S
WV-17819	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*SmC*RmG*RmC*RmC*RmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS RSSSS RRRR
WV-17820	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*Sm5Ceo*SGeo*Sm5Ceo*Sm5Ceo*SAeo	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS R SSSS SSS
WV-17821	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*Sm5Ceo*RGeo*Rm5Ceo*Rm5Ceo*RAeo	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS RSSSS RRRR
WV-17822	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*C*T*C*A*C*C*A*C*C*A*C*T* m5Ceo*Geo*m5Ceo*m5Ceo*Aeo	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	XOXX XXXXX XXXX XXXX
WV-17885	mC*SmC*SmU*SmC*SmA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*SC* RA*SC*ST*Sm5CeoGeom5Ceo5Ceo*RAeo	CCUCACTCACCA CTCGCCA	SSSS SSRSS SRSS OOR
WV-18851	rArUrArCrUrArCrUrGrG	AUACUACUGG	O000 O000 O
WV-18852	mC*m5CeoTeom5CeoA*C*T*C*A*C*C*A*C*C*A*C*T*mC *mG*mC*mC*mAL004	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	XOXX XXXXX XXXX XXXX
WV-20761	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*SmCmG*SmC*SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS RSSSS OSS
WV-20762	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*Sm5CeoG*SmC*SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS RSSSS OSS
WV-20763	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*Sm5Ceo*SmG*SmC*SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS R SSSS SSS
WV-20764	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*Rm5CeoG*SmC*SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS RSSROSS
WV-20765	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*Rm5Ceo*SmG*SmC*SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS RS SSRS SS
WV-20766	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*Sm5mC*SmG*SmC*SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS R SSSS SSS
WV-20767	C*SA*SC*ST*SmC*SmG*SmC*SmC*SmA	CACTCGCCA	SSSS SSS
WV-20768	A*SC*ST*SmC*SmG*SmC*SmA	ACTCGCCA	SSSS SS
WV-20769	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*Sm5CeoGeomC*SmC*SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS RSSSS OOS
WV-20770	mC*Sm5CeoTeom5CeoA*SC*ST*SC*RA*SC*SC*RC*SA* SC*ST*Rm5CeoGeomC*SmC*SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS RSSROSS

【 0 2 1 4 】

10

20

30

40

50

【表 2】

WV-20771	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS RSSSS
WV-20772	SC * ST * Sm5mCmG * SmC * SmA	CCACTCGCCA	OSSS
WV-20773	A * SC * SC * RC * SA * SC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	ACCCACTCGCCA	SSR SSSSS SSS
WV-20774	C * SC * RC * SA * SC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCCACTCGCCA	SR SSSSS SSS
WV-20775	A * SC * SC * SC * SA * SC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	ACCCACTCGCCA	SSSS SSSSS S
WV-21145	C * SC * SC * SA * SC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCCACTCGCCA	SSSS SSSSS
WV-21146	Teo * RGeom5Ceo5CeoGeo * RC * SC * ST * SC * RC * ST * SC * RA	TGCCGCCTCC	ROOORS SSRSS
WV-21147	* SC * ST * Rm5CeoAcom5Ceo5Ceo * Rm5Ceo	TCACTCAC CC	RSSRO OOR
WV-21148	Teo * RGeo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * RC * SC * ST * SC * RC * ST	TGCCGCCTCC	RRRRRS SSRSS RSSRR
WV-21149	* SC * RA * SC * ST * Rm5CeoAcom5Ceo5Ceo * Rm5Ceo	TCACTCAC CC	RRR
WV-21150	Teo * RGeom5Ccom5CeoGeo * RC * SC * ST * SC * RC * ST * SC * RA	TGCCGCCTCC	ROOORS SSRSS
WV-21151	* SC * ST * Rm5Ceo * RAeo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * Rm5Ceo	TCACTCAC CC	RSSRR RRR
WV-21152	Teo * RGeo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RGeo * RC * SC * ST * SC * RC * ST	TGCCGCCTCC	RRRRRS SSRSS RSSRO
WV-21153	* SC * RA * SC * ST * Rm5CeoAcom5Ceo5Ceo * Rm5Ceo	TCACTCAC CC	OOR
WV-21154	Teo * RGeom5Ccom5CeoGeo * RC * SC * ST * SC * RC * ST * SC * RA	TGCCGCCTCC	ROOORS SSRSS R
WV-21155	* SC * ST * Rm5Ceo * SmA * SmC * SmC * SmC	TCACTCAC CC	SSRSS SS
WV-21156	mU * SmG * SmC * SmC * SGeo * RC * SC * ST * SC * RC * ST * SC *	UGCCGCCTCC	SS SSRSS SR SSRSS
WV-21157	RA * SC * ST * Rm5CeoAcom5Ceo5Ceo * Rm5Ceo	TCACTCAC CC	ROOOR
WV-21158	Geo * Rm5CeoGeo5CeoGeo * RA * SC * ST * SC * RC * ST * SG * RA	GCGCGACTCC	ROOORS SSRSS
WV-21159	* SG * ST * RTeom5Ceo5CeoAeo * RGeo	TGAGTTCAG	RSSRO OOR
WV-21160	Geo * Rm5Ceo * RGeo * Rm5Ceo * RGeo * RA * SC * ST * SC * RC * ST	GCGCGACTCC	RRRRRS SSRSS RSSRO
WV-21161	* SG * RA * SG * ST * RTeom5Ceo5CeoAeo * RGeo	TGAGTTCAG	OOR
WV-21162	Geo * Rm5CeoGeo5CeoGeo * RA * SC * ST * SC * RC * ST * SG * RA	GCGCGACTCC	ROOORS SSRSS R
WV-21163	* SG * ST * RTeo * SmC * SmC * SmA * SmG	TGAGTTCAG	SSRSS SS
WV-21164	mG * SmC * SmG * SmC * SGeo * RA * SC * ST * SC * RC * ST * SG *	GCGCGACTCC	SS SSRSS SR SSRSS
WV-21165	RA * SG * ST * RTeom5Ceo5CeoAeo * RGeo	TGAGTTCAG	ROOOR
WV-21166	Teo * Rm5Ceo5CeoTeo * RG * SC * ST * ST * RT * SC * SC *	TCCTTGCTTT	ROOORS SSRSS
WV-21167	Rm5C * SG * SC * Rm5Ceo5CeoTeom5Ceo * RAeo	CCCGCCCTCA	RSSRO OOR
WV-21168	Teo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RTeo * RTeo * RG * SC * ST * ST * RT * SC	TCCTTGCTTT	RRRRRS SSRSS RSSRR
WV-21169	* SC * Rm5C * SG * SC * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RTeo * Rm5Ceo * RAeo	CCCGCCCTCA	RRR
WV-21170	Teo * Rm5Ceo5CeoTeo * RG * SC * ST * ST * RT * SC * SC *	TCCTTGCTTT	ROOORS SSRSS
WV-21171	Rm5C * SG * SC * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RTeo * Rm5Ceo * RAeo	CCCGCCCTCA	RSSRR RRR

【 0 2 1 5 】

10

20

30

40

50

【表 3】

WV-21160	Teo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RTeo * RGeo * RG * SC * ST * ST * RT * SC * SC * Rm5C * SG * SC * Rm5Cgeom5CeoTeom5Ceo * RAeo	TCCTTGCTTT CCCGCCTCA	RRRRRS SSRSS RSSRO OOR
WV-21161	Teo * Rm5Cgeom5CeoTeoTeo * RG * SC * ST * ST * RT * SC * SC * Rm5C * SG * SC * Rm5Ceo * SmC * SmU * SmC * SmA	TCCTTGCTTT CCCGCCCUCA	ROOORS SSRSS R SSRS SS
WV-21162	mU * SmC * SmC * SmU * STeo * RG * SC * ST * ST * RT * SC * SC * Rm5C * SG * SC * Rm5Cgeom5CeoTeom5Ceo * RAeo	UCCUTGCTTT CCCGCCTCA	SS SSRSS SR SSRSS ROOOR
WV-21163	Geo * RTeom5Cgeom5Cgeom5Ceo * RT * SG * SC * ST * SG * RC * SC * Sm5C * RG * SG * STeoTeoGeom5Ceo * RTeo	GTCCCTGCTG CCCGGTGCT	ROOORSS SSRSS RSSOOR
WV-21164	Geo * RTeo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RT * SG * SC * ST * SG * RC * SC * Sm5C * RG * SG * STeo * RTeo * RGeo * Rm5Ceo * RTeo	GTCCCTGCTG CCCGGTGCT	RRRRSS SSRSS RSSRR RR
WV-21165	Geo * RTeom5Cgeom5Cgeom5Ceo * RT * SG * SC * ST * SG * RC * SC * Sm5C * RG * SG * STeo * RTeo * RGeo * Rm5Ceo * RTeo	GTCCCTGCTG CCCGGTGCT	ROOORSS SSRSS RSSRR RR
WV-21166	Geo * RTeo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * Rm5Ceo * RT * SG * SC * ST * SG * RC * SC * Sm5C * RG * SG * STeoTeoGeom5Ceo * RTeo	GTCCCTGCTG CCCGGTGCT	RRRRSS SSRSS RSSOOR
WV-21167	Geo * RTeom5Cgeom5Cgeom5Ceo * RT * SG * SC * ST * SG * RC * SC * Sm5C * RG * SG * SmU * SmU * SmG * SmC * SmU	GTCCCTGCTG CCCGUUGCU	ROOORSS SSRSS R SSSS S
WV-21168	mG * SmU * SmC * SmC * Sm5Ceo * RT * SG * SC * ST * SG * RC * SC * Sm5C * RG * SG * STeoTeoGeom5Ceo * RTeo	GUCCCTGCTG CCCGGTGCT	SS SSRSS SSRSS RSSOOR
WV-21169	m5Ceo * Rm5CeoTeoGeom5Ceo * RT * SG * SC * SC * Rm5C * SG * SG * RT * ST * SG * Rm5CeoTeoTeom5Ceo * RTeo	CCTGCTGCC GGTGCTTCT	ROOORS SSRSS RSSRO OOR
WV-21170	m5Ceo * Rm5Ceo * RTeo * RGeo * Rm5Ceo * RT * SG * SC * SC * Rm5Ceo * SG * SG * RT * ST * SG * Rm5CeoTeoTeom5Ceo * RTeo	CCTGCTGCC GGTGCTTCT	RRRRRS SSRSS RSSRR RRR
WV-21171	m5Ceo * Rm5CeoTeoGeom5Ceo * RT * SG * SC * SC * Rm5C * SG * SG * RT * ST * SG * Rm5Ceo * RTeo * Rm5Ceo * RTeo	CCTGCTGCC GGTGCTTCT	ROOORS SSRSS RSSRR RRR
WV-21172	m5Ceo * Rm5Ceo * RTeo * RGeo * Rm5Ceo * RT * SG * SC * SC * Rm5C * SG * SG * RT * ST * SG * Rm5CeoTeoTeom5Ceo * RTeo	CCTGCTGCC GGTGCTTCT	RRRRRS SSRSS RSSRO OOR
WV-21173	m5Ceo * Rm5CeoTeoGeom5Ceo * RT * SG * SC * SC * Rm5C * SG * SG * RT * ST * SG * Rm5Ceo * SmU * SmU * SmC * SmU	CCTGCTGCC GGTGCUUCU	ROOORS SSRSS R SSRS SS
WV-21174	mC * SmC * SmU * SmG * Sm5Ceo * RT * SG * SC * SC * Rm5C * SG * SG * RT * ST * SG * Rm5CeoTeoTeom5Ceo * RTeo	CCUGCTGCC GGTGCTTCT	SS SSRSS SR SSRSS ROOOR
WV-21206	mC * Sm5CeoTeom5CgeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * SmCn00lmG * SmC * SmC * SmA	CCTACTCAC CCACTGCCA	SOOOS SSRSS RSSSS nX SSS
WV-21207	mC * Sm5CeoTeom5CgeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RA * SC * ST * SmCn00lmG * SmC * SmC * SmA	CCTACTCAC CCACTGCCA	SOOOS SSRSS SRSSS nX SSS
WV-21208	m5Ceo * Rm5CeoTeom5CeoAeo * RC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * m5Ceo * Rm5CeoTeom5CeoAeo * RC * ST * SC * RA * SC * SC * RC *	CCTACTCAC	ROOOR SSRSS RSSSS

【 0 2 1 6 】

10

20

30

40

【表 4】

	SA * SC * ST * SmCn001mG * SmC * SmC * SmA	CCACTCGCCA	nX SSS
WV-21209	m5Ceo * Rm5CeoTeom5CeoAeo * RC * ST * SC * RA * SC * SC * SC *	CCTCACTCAC	ROOOR SSRSS SRSSS
	RA * SC * ST * SmCn001mG * SmC * SmC * SmA	CCACTCGCCA	nX SSS
WV-21259	rGrCrUrArCrCrUrArUrG	GCUACCUAUUG	00000 00000 O
WV-21344	rCrUrCrUrGrGrArCrUrArGrGrArGrUrCrGrCrGrCrG	CUCUGGAACU CAGGAGUCGC GCGC	00000 00000 00000 00000 OOO
WV-21345	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS R
	SC * ST * SmC * SmG * SmC * Sm5mC * SmA	CCACTCGCCA	SSSSS SSS
WV-21346	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS R
	SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmA	CCACTCGCCA	SSSSS SSS
WV-21347	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS R
	SC * ST * Sm5mCmG * SmC * Sm5mC * SmA	CCACTCGCCA	SSSSS SSS
WV-21442	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS R
	SC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmC * SmI	CCACTCGCCI	SSSSS SSS
WV-21443	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS R
	SC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmC * SmG	CCACTCGCCG	SSSSS SSS
WV-21445	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS R
	SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmI	CCACTCGCCI	SSSSS SSS
WV-21446	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS R
	SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCACTCGCCG	SSSSS SSS
WV-21506	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * RA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS R
	SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmA	CCACTCGCCA	SSSSS SS
WV-21507	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS R
	SC * ST * SmCn001RmG * SmC * SmCn001RmA	CCACTCGCCA	nR SS nR
WV-21508	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * RA *	CCTCACTCAC	SOOOS SSRSS SRSSS
	SC * ST * SmCn001RmG * SmC * SmCn001RmA	CCACTCGCCA	nR SS nR
WV-21509	mU * Sm5CeoTeom5CeoTeomC * SA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC *	UCCTCACTCAC	SOOOS S SSRSS R
	SA * SC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC	CCACUCGCC	SSSSS SS
WV-21510	mU * Sm5CeoTeom5CeoTeomC * SA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC *	UCCTCACTCAC	SOOOS S SSRSS SR
	RA * SC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC	CCACUCGCC	SSSSS S
WV-21511	mU * Sm5CeoTeom5CeoTeomC * SA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC *	UCCTCACTCAC	SOOOS S SSRSS R
	SA * SC * SmU * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCACUCGCC	SSSSS SS
WV-21512	mU * Sm5CeoTeom5CeoTeomC * SA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC *	UCCTCACTCAC	SOOOS S SSRSS SR
	RA * SC * SmU * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCACUCGCC	SSSSS S
WV-21513	mU * Sm5CeoTeom5CeoTeomC * SA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC *	UCCTCACTCAC	SOOOS S SSRSS

【 0 2 1 7 】

10

20

30

40

50

【表 5】

	SA * SC * SmU * SmCn001RmG * SmC * SmC	CCACUCGCC	RSSSS nR SS
WV-21514	mU * Sm5Ceom5CeoTeomC * SA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC *	UCCTACTCAC	SOOOS S SSRSS
	RA * SC * SmU * SmCn001RmG * SmC * SmC	CCACUCGCC	SRSSS nR SS
WV-21515	mC * STeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST	CTCACTACCCAC	SOOOS SRSSR SSSSS
	* SC * SmG * SmC * SmC * SmA * SmC	TCGCCAC	SSSS
WV-21516	mC * STeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST	CTCACTACCCAC	SOOOS SRSSS R
	* SC * SmG * SmC * SmC * SmA * SmC	TCGCCAC	SSSSS SSS
WV-21517	mC * STeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST	CTCACTACCCAC	SOOOS SRSSR SSSSS
	* Sm5C * SmG * SmC * Sm5mC * SmA * SmC	TCGCCAC	SSSS
WV-21518	mC * STeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST	CTCACTACCCAC	SOOOS SRSSS R
	* Sm5C * SmG * SmC * Sm5mC * SmA * SmC	TCGCCAC	SSSSS SSS
WV-21519	mC * STeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST	CTCACTACCCAC	SOOOS SR SSRSS SS
	* SCn001RmG * SmC * SmCn001RmA * SmC	TCGCCAC	nR SS nR S
WV-21520	mC * STeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST	CTCACTACCCAC	SOOOS SRS SSRSS S
	* SCn001RmG * SmC * SmCn001RmA * SmC	TCGCCAC	nR SS nR S
WV-21521	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C *	ACTACCCAC	SOOOS SSRSS SR
	RG * SC * SC * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	TCGCCACCGC	SSSSS SS
WV-21522	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C *	ACTACCCAC	SOOOS SSRSS SR
	RG * SC * Sm5C * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	TCGCCACCGC	SSSSS SS
WV-21523	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C *	ACTACCCAC	SOOOS SSRSS SRSS
	RG * SC * SCn001RmA * SmC * SmCn001RmG * SmC	TCGCCACCGC	nR SS nR S
WV-21524	m5mC * SGeom5Ceom5CeomU * SC * SC * ST * SC * RA * SC * ST * SC	CGCCUCCTCA	SOOOS S SSRSS SR
	* RA * SC * SmC * SmC * SmA * SmC * SmU	CTCAC CCACU	SSSSS S
WV-21525	m5mC * SGeom5Ceom5CeomU * SC * SC * ST * SC * RA * SC * ST * SC	CGCCUCCTCA	SOOOS S SSRSS SR
	* RA * SC * SmC * Sm5mC * SmA * SmC * SmU	CTCAC CCACU	SSSSS S
WV-21526	mCn001RGeom5Ceom5CeomU * SC * SC * ST * SC * RA * SC * ST * SC	CGCCUCCTCA	nR OOOSS SSRSS
	* RA * SC * SmC * SmCn001RmA * SmC * SmU	CTCAC CCACU	SRSSS nR SS
WV-21552	m5Ceo * Sm5CeoTeom5CeoAeo * RC * ST * SC * RA * SC * SC * RC *	CCTCACTAC	SOOOR SSRSS R SSSSS
	SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmA	CCACTCGCCA	SSS
WV-21553	m5Ceo * Sm5CeoTeom5CeoAeo * RC * ST * SC * RA * SC * SC * SC *	CCTCACTAC	SOOOR SSRSS SR
	RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmA	CCACTCGCCA	SSSSS SS
WV-21554	m5Ceo * Sm5CeoTeom5CeoAeo * RC * ST * SC * RA * SC * SC * RC *	CCTCACTAC	SOOOR SSRSS R SSSSS
	SA * SC * SmU * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCACUCGCC	SS
WV-21555	m5Ceo * Sm5CeoTeom5CeoAeo * RC * ST * SC * RA * SC * SC * SC *	CCTCACTAC	SOOOR SSRSS SR
	RA * SC * SmU * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCACUCGCC	SSSSS S
WV-21556	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA *	CCTCACTAC	SOOOS SSRSS R

【 0 2 1 8 】

10

20

30

40

50

【表 6】

	SC * SmU * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCACUCGCC	SSSSS S
WV-21557	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * SmU * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS SR SSSSS S
WV-21558	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21559	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21560	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SmA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21561	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RmC * SmA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21562	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SmC * RmC * SmA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21563	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SmC * SmC * RmC * SmA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21564	mC * Sm5CeoTeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21565	mC * Sm5CeoTeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21566	mC * Sm5CeoTeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21567	mC * Sm5CeoTeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SmA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21568	mC * Sm5CeoTeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SC * RmC * SmA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21569	mC * Sm5CeoTeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SC * SmC * RmC * SmA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-21570	mC * Sm5CeoTeom5CeoAeomC * ST * SC * RA * SmC * RmC * SmA * SmC * SmU * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-23435	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * SmU * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS SR SSSSS S
WV-23436	mC * Sm5Ceo001RTeom5Ceom001RmC * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * SmUn001Rm5mC * SmGn001RmC * SmC	CCTCACTCAC CCACUCGCC	S nR O nR S SSRSS SRSS nR S nR S
WV-23437	mC * Sm5Ceo001RTeom5Ceom001RmC * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * SmUn001Rm5mCmGn001RmC *	CCTCACTCAC CCACUCGCC	S nR O nR S SSRSS SRSS nR O nR S

【 0 2 1 9 】

10

20

30

40

50

【表 7】

WV-23438	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * SmU * SmCn001RmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACUCGCC	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR S S
WV-23439	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * SmU * Sm5Ceo * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACUCGCC	SOOOS SSRSS SR SSSSS S
WV-23440	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS SR SSSSS S
WV-23441	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * SmCn001RmG * SmCn001RmC * SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR S nR S
WV-23442	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * SmCn001RmGmCn001RmC * SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR O nR S
WV-23443	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * Sm5Ceo * SmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	SOOOS SSRSS SR SSSSS S
WV-23444	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * SmCn001RmG * SmC * SmCn001RmA	CCTCACTCAC CCACTCGCCA	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR S nR S
WV-23453	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * RG * Sm5C * Sm5C * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTCACCCAC TCGCCACCGC	SOOOS SSRSS SR SSSSS S
WV-23454	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * RG * Sm5C * Sm5C * SmA * SmC * Sm5C * RA * SmCn001RmG * SmC	ACTCACCCAC TCGCCACCGC	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR S nR S
WV-23455	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * RG * Sm5C * Sm5C * SmA * SmC * SmCn001RmG * SmC	ACTCACCCAC TCGCCACCGC	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR O nR S
WV-23456	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * RG * Sm5C * Sm5C * SmA * SmC * SmCn001RmG * SmC	ACTCACCCAC TCGCCACCGC	S nR O nR S SSRSS SR SSSSS nR S
WV-23457	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SG * Rm5C * Sm5C * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTCACCCAC TCGCCACCGC	SOOOS SSRSS SSR SSSSS S
WV-23458	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SG * Rm5C * Sm5C * SmA * SmC * Sm5C * RA * Sm5C * ST * SmCn001RmG * SmC	ACTCACCCAC TCGCCACCGC	SOOOS SSRSS SSRSS nR S nR S
WV-23459	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SG * Rm5C * Sm5C * SmA * SmC * Sm5C * RA * Sm5C * ST * SmCn001RmG * SmC	ACTCACCCAC TCGCCACCGC	SOOOS SSRSS SSRSS nR O nR S

【 0 2 2 0 】

10

20

30

40

50

【表 8】

WV-23460	mA * Sm5Ce0Teom5CeomA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SG * Rm5C * Sm5C * SmA * SmC * SmCn001RmG * SmC	ACTCACCAC TCGCCACGC	SOOOS SSRSS SSRSS SS nR S
WV-23461	mA * Sm5Ce0Teom5CeomA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * RG * Sm5C * Sm5C * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCAC TCGCCACGC	SOOOS SSRSS SR SSSSS SS
WV-23462	mA * Sm5Ce0Teom5CeomA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SG * Rm5C * Sm5C * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCAC TCGCCACGC	SOOOS SSRSS SSR SSSSS S
WV-23486	mC * Sm5Ce0Teom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCC	SOOOS SSRSS SR SSSSS S
WV-23487	mC * Sm5Ce0Teom5CeomA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCC	SOOOS SSRSS SR SSSSS S
WV-23488	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5mC * SmGn001RmC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCC	S nR O nR S SSRSS S RSSSS nR S
WV-23489	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5mCmGn001RmC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCC	S nR O nR S SSRSS SRSSS O nR S
WV-23490	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * SmCn001RmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCC	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR SS
WV-23491	mC * Sm5Ce0Teom5CeomA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG	SOOOS SSRSS SR SSSSS SS
WV-23492	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * SmCn001RmG * SmCn001RmC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR S nR S
WV-23493	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * SmCn001RmGmCn001RmC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR O nR S
WV-23494	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * SmCn001RmG * SmC * SmCn001RmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG	S nR O nR S SSRSS SRSSS nR SS nR
WV-23495	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SG * Rm5C * Sm5C * SmAn001RmC * SmCn001RmG * SmC	ACTCACCAC TCGCCACGC	S nR O nR S SSRSS SSRSS nR S nR S
WV-23496	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SG * Rm5C * Sm5C * SmAn001RmCmCn001RmG * SmC	ACTCACCAC TCGCCACGC	S nR O nR S SSRSS SSRSS nR O nR S
WV-23497	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SG * Rm5C * Sm5C * SmA * SmC * SmCn001RmG	ACTCACCAC TCGCCACGC	S nR O nR S SSRSS SSRSS SS nR S

【 0 2 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 9】

	* SmC			
WV-23498	mA * Sm5Ceo001RTeom5Ceo001RmA * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SG * Rm5C * Sm5C * SmA * SmCmCn001RmG * SmC	ACTCACCAC TCGCCACCGC		SnRO nR S SSRSS SSRSS SO nR S
WV-23503	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Rm5C * SA * Sm5C * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG		SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-23648	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * Sm5C * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5C * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCC		SOOOS SSRSS SR SSSSS S
WV-23649	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Sm5C * RA * Sm5C * ST * Sm5Ceo * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG		SOOOS SSRSS SR SSSSS SS
WV-23650	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * Sm5C * ST * Sm5C * RA * Sm5C * Sm5C * Rm5C * SA * Sm5C * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * Sm5Ceo * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG		SOOOS SSRSS R SSSSS SSS
WV-23740	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG		SOOOS SSRSS SR SSSSS SS
WV-23741	mA * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * RC * SC * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTCACCAC TCGCCACCGC		SOOOS SSRSS SSR SSSSS S
WV-23742	mA * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * RC * Sm5C * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTCACCAC TCGCCACCGC		SOOOS SSRSS SSR SSSSS S
WV-26633	mA * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTCACCAC TCGCCACCGC		SOOOS SSRSS SSR SSSSS S
WV-27092	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCCC		SOOOS SSRSS SR SSSSS SS
WV-27093	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCCC		SOOOS SSRSS SR SSSSS SS
WV-27094	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmU	CCTCACTCAC CCACTCGCCU		SOOOS SSRSS SR SSSSS SS
WV-27095	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCCU		SOOOS SSRSS SR SSSSS SS
WV-27104	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * Sm5mC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG		SOOOS SSRSS SR SSSSS SS
WV-27105	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mCmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG		SOOOS SSRSS SRSSS OSSS
WV-27106	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mCmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG		SOOOS SSRSS SR SSSSS SO
WV-27107	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mCmG * SmC * Sm5mCmG	CCTCACTCAC CCACTCGCCG		SOOOS SSRSS SRSSS OSSO

10

20

30

40

【 0 2 2 2 】

50

【表 10】

WV-27108	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5CeomG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS SRSSS OSSS
WV-27109	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5CeomG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS SR SSSS SO
WV-27110	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5CeomG * SmC * Sm5CeomG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS SRSSS OSSO
WV-27134	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * Sm5mC * Sm5mC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS R SSSS SSS
WV-27135	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mCmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS RSSSS OSSS
WV-27136	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mCmG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS R SSSS SSO
WV-27137	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mCmG * SmC * Sm5mCmG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS RSSSS OSSO
WV-27138	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5CeomG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS RSSSS OSSS
WV-27139	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5CeomG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS R SSSS SSO
WV-27140	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5CeomG * SmC * Sm5CeomG	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS RSSSS OSSO
WV-27141	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS R SSSS SSS
WV-27142	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCG	SOOOS SSRSS R SSSS SSS
WV-27143	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmU	CCTCACTCAC CCACTCGCU	SOOOS SSRSS R SSSS SSS
WV-27144	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCAC CCACTCGCU	SOOOS SSRSS R SSSS SSS
WV-28077	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * SmU * SmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTCACCCAC TUGCGG	SOOOS SSRSS RSSSS SSSS
WV-28078	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * SmU * SmG	CCTCACTCACCCAC TCGCG	SOOOS SSRSS RSSSS SSSS
WV-28079	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * SmU * SmG * SmC * SmU * SmG	CCTCACTCACCCAC TUGCG	SOOOS SSRSS RSSSS SSSS
WV-28080	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCACCCAC	SOOOS SSRSS RSSSS SSSS

【0223】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

	SC * ST * SmU * SmG * SmC * SmC	TUGCC	SSS
WV-28081	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * RG * SC * SC * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACC GC	SOOOS SSRSS SRSSS SSS
WV-28082	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * RG * SC * SC * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCCACTCG CCACUGC	SOOOS SSRSS SRSSS SSS
WV-28083	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * RG * SC * SC * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACUGC	SOOOS SSRSS SRSSS SSS
WV-28084	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * RG * SC * Sm5C * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACC GC	SOOOS SSRSS SRSSS SSS
WV-28085	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * RG * SC * Sm5C * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCCACTCG CCACUGC	SOOOS SSRSS SRSSS SSS
WV-28086	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * RG * SC * Sm5C * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACUGC	SOOOS SSRSS SRSSS SSS
WV-28087	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * SG * RC * SC * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACC GC	SOOOS SSRSS SSRSS SSS
WV-28088	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * RC * SC * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCCACTCG CCACUGC	SOOOS SSRSS SSRSS SSS
WV-28089	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * SG * RC * SC * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACUGC	SOOOS SSRSS SSRSS SSS
WV-28090	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACC GC	SOOOS SSRSS SSRSS SSS
WV-28091	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCCACTCG CCACUGC	SOOOS SSRSS SSRSS SSS
WV-28092	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACUGC	SOOOS SSRSS SSRSS SSS
WV-28303	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * RG * SC * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACC GC	SOOOS SSRSS SRSSS SSS
WV-28304	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * RG * SC * SC * SmA * SmC * Sm5CeoG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACC GC	SOOOS SSRSS SRSSS SSOS
WV-28305	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * RG * SC * Sm5C * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACC GC	SOOOS SSRSS SRSSS SSS
WV-28306	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * RG * SC * Sm5C * SmA * SmC * Sm5CeoG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACC GC	SOOOS SSRSS SRSSS SSOS
WV-28307	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * SG * RC * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC CACC GC	SOOOS SSRSS SSRSS SSS
WV-28308	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * ST * SG * SC * SC * SmA * SmC * Sm5mC * SmG * SmC	ACTACCCCACTTGC	SOOOS SSRSS SSRSS

【 0 2 2 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

	RC * SC * SmA * SmC * Sm5CeomG * SmC	CACCGC	SSOS
WV-28464	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * SmU * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTACCCAC TUGCCA	SOOOS SSRSS RSRSS SSSS
WV-28465	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * SmU * SmG * SmC * SmC * Sm5mC * SmA	CCTCACTACCCAC TUGCCA	SOOOS SSRSS RSRSS SSSS
WV-28466	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * SmU * SmA	CCTCACTACCCAC TCGCUA	SOOOS SSRSS RSRSS SSSS
WV-28467	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * SmU * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTACCCAC TUGCUA	SOOOS SSRSS RSRSS SSSS
WV-28478	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * Sm5Ceo * SmG	CCTCACTACCCAC TCGCCG	SOOOS SSRSS RSRSS SSSS
WV-28479	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * RA * SC * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * SmC	CCTCACTACCCAC TCGCC	SOOOS SSRSS RSRSS SSS
WV-28480	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5CeomG * SmC * SmC	CCTCACTACCCAC TCGCC	SOOOS SSRSS RSRSS OSS
WV-28481	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * SmU * SmG * SmC * SmC * SmU * SmG	CCTCACTACCCAC TUGCUG	SOOOS SSRSS RSRSS SSSS
WV-28872	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * RC * SA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTACCCAC TCGCCA	SOOOS SRSSS RSRSS SSSS
WV-28873	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * RC * SA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTACCCAC TCGCCG	SOOOS SRSSS RSRSS SSSS
WV-28874	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * RC * SA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTACCCAC TCGCCA	SOOOS SRSSS RSRSS SSSS
WV-28875	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * RC * SA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTACCCAC TCGCCG	SOOOS SRSSS RSRSS SSSS
WV-28876	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * RC * SA * SC * SC * RC * SA * RC * ST * SmC * SmG * SmC * SmC * SmA	CCTCACTACCCAC TCGCCA	SOOOS SRSSR SSRSS SSSS
WV-28877	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * RC * SA * SC * SC * RC * SA * RC * ST * Sm5mC * SmG * SmC * Sm5mC * SmG	CCTCACTACCCAC TCGCCG	SOOOS SRSSR SSRSS SSSS
WV-30206	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SOOOS SSRSS SSRSS SSSS
WV-30207	mA * Sm5Ceon001RTeon001Rm5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SnRnRnRS SSRSS SSRS SSSS
WV-30208	mA * Sm5Ceon001RTeon5Ceon001RmA * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SnOnRS SSRSS SSRSS SSSS
WV-30209	mA * Sm5Ceon001RTeon5Ceon001RmA * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG	SnOnRS SSRSS SSRSS

【 0 2 2 5】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

	Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmAn001RmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	CCACCGC	nRSS	SSRSS
WV-30210	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmCn001Rm5Ceo * SmG * SmC	ACTACCCACTCG CCACCGC	SnOnRS SSRSS SnRSS	SSRSS
WV-30211	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceon001RmG * SmC	ACTACCCACTCG CCACCGC	SnOnRS SSRSS SSnRS	SSRSS
WV-30212	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmGn001RmC	ACTACCCACTCG CCACCGC	SnOnRS SSRSS SSnR	SSRSS
WV-30213	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCACTCG CCACUGC	SnOnRS SSRSS SSS	SSRSS
WV-30214	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmAn001RmC * SmU * SmG * SmC	ACTACCCACTCG CCACUGC	SnOnRS SSRSS nRSS	SSRSS
WV-30215	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmCn001RmU * SmG * SmC	ACTACCCACTCG CCACUGC	SnOnRS SSRSS SnRSS	SSRSS
WV-30216	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * SmUn001RmG * SmC	ACTACCCACTCG CCACUGC	SnOnRS SSRSS SSnRS	SSRSS
WV-30217	mA * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * SmU * SmGn001RmC	ACTACCCACTCG CCACUGC	SnOnRS SSRSS SSnR	SSRSS
WV-30218	mC * Sm5CeoTeom5CeoA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * Sm5Ceo * SmG	CCTCACTCACCAC TCGCCG	SOOOS SSRSS SSS	SSRSS
WV-30219	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * Sm5Ceo * SmG	CCTCACTCACCAC TCGCCG	SnRnRnRS SSRSS SRSS SSSS	SSRSS
WV-30220	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * Sm5Ceo * SmG	CCTCACTCACCAC TCGCCG	SnOnRS SSRSS SSS	SSRSS
WV-30221	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * Sm5Ceo * SmG	CCTCACTCACCAC TCGCCG	SnOnRS SSRSS nRSS	SSRSS
WV-30222	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5Ceo * SmGn001RmC * Sm5Ceo * SmG	CCTCACTCACCAC TCGCCG	SnOnRS SSRSS SnRSS	SSRSS
WV-30223	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5Ceo * SmG * SmCn001Rm5Ceo * SmG	CCTCACTCACCAC TCGCCG	SnOnRS SSRSS SSnRS	SSRSS
WV-30224	mC * Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5Ceo * SmG * SmC * Sm5Ceon001RmG	CCTCACTCACCAC TCGCCG	SnOnRS SSRSS SSnR	SSRSS
WV-30225	m5Ceo * Sm5CeoTeom5CeoAeo * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RA SC * ST * SmU * SmG * SmC * SmU * SmG	CCTCACTCACCAC TUGCUG	SOOOS SSRSS SSS	SSRSS
WV-30226	mC * SmC * SmU * SmC * SmA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RA SC * ST * STeoGeom5CeoTeo * SGeo	CUCACTCACCAC CTTGCTG	SSSS SSRSS OOOS	SSRSS
WV-30227	m5Ceo * Sm5CeoTeom5CeoAeo * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RA	CCTCACTCACCAC	SOOOS SSRSS	SSRSS

【 0 2 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

	* SC * ST * STeoGeom5CeoTao * SGeo	TTGCTG	OOOS
WV-30228	m5Ceo * Sm5Ceon001RTeon001Rm5Ceon001RAco * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * SmU * SmG * SmC * SmU * SmG	CCTCACTCACCCAC TUGCUG	SnRnRnRS SSRSS SRSSS SSSS
WV-30229	mC * SmC * SmU * SmC * SmA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * STeon001RGeo001Rm5Ceon001RTeo * SGeo	CCUCACTCACCCA CTTGCTG	SSSSS SSRSS SRSSS mRnRnRS
WV-30230	m5Ceo * Sm5Ceon001RTeon001Rm5Ceon001RAeo * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * STeoGeom5CeoTao * SGeo	CCTCACTCACCCAC TTGCTG	SnRnRnRS SSRSS SRSSS OOS
WV-30231	m5Ceo * Sm5CeoTeom5CeoAeo * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * STeon001RGeo001Rm5Ceon001RTeo * SGeo	CCTCACTCACCCAC TTGCTG	SOOOS SSRSS SRSSS mRnRnRS
WV-30232	mA * Sm5Ceon001RTeon001Rm5Ceon001RmA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * SmU * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACUGC	SnRnRnRS SSRSS SRSSS SSSS
WV-30237	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * RC * SA * SC * ST * STeo * SmG * SmC * SmA	CCTCACTCACCCAC TTGCCA	SOOOS SSRSS RSSSS SSSS
WV-30238	mC * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * ST * SC * RA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * STeo * SmG * SmC * SmC	CCTCACTCACCCAC TTGCC	SOOOS SSRSS SRSSS SSS
WV-30239	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * RC * SC * SmA * SmC * STeo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACTGC	SOOOS SSRSS SSRSS SSSS
WV-30277	mA * Sm5CeoTeom5CeomA * SC * SC * RC * SA * SC * RT * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SOOOS SRSSR SSRSSS SSSS
WV-30278	mA * Sm5Ceon001RTeon001Rm5Ceon001RmA * SC * SC * RC * SA * SC * RT * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SnRnRnRS SRSSR SSRSS SSSS
WV-30279	mA * Sm5Ceon001RTeon5Ceon001RmA * SC * SC * RC * SA * SC * RT * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SnRnRS SRSSR SSRSS SSSS
WV-30280	mA * Sm5Ceon001RTeon5Ceon001RmA * SC * SC * RC * SA * SC * RT * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmAn001RmC * Sm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SnRnRS SRSSR SSRSS mRSS
WV-30281	mA * Sm5Ceon001RTeon5Ceon001RmA * SC * SC * RC * SA * SC * RT * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmCn001Rm5Ceo * SmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SnRnRS SRSSR SSRSS SnRSS
WV-30282	mA * Sm5Ceon001RTeon5Ceon001RmA * SC * SC * RC * SA * SC * RT * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceon001RmG * SmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SnRnRS SRSSR SSRSS SSnRS
WV-30283	mA * Sm5Ceon001RTeon5Ceon001RmA * SC * SC * RC * SA * SC * RT * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmGn001RmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SnRnRS SRSSR SSRSS SSSnR
WV-34205	mAm5CeoTeom5CeoAACCCACTm5CCGm5CCmAmCm5CeoGmC	ACTCACCCACTCG CCACCGC	SOOOSSSSSSSRRSSSS S
WV-37246	mlm5Ceon001RTeon5Ceon001RmACCCACTm5CCGm5CCmAmCn001Rm5CeoGmC	ICTCICCCACTCGC ACCGC	SnRnRSSSSSSSSSRSSSn RSS

【 0 2 2 7 】

【表 1 5】

WV-38627	mA*m5CeoTeom5Ceo mA*C*C*A*C*T*m5C*G*m5C*C*mA*mC*m5C eo*mG*mC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	X000XXXXXXXXXX XXX
WV-39524	mA*m5Ceo001Teom5Ceo001mA*C*C*A*C*T*m5C*G*m5C*C*mA* mC*m5Ceo*mGn001mC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	XnXOnXXXXXXXXXX XXXnX
WV-39526	mA*m5Ceo001Teom5Ceo001mA*C*C*A*C*T*m5C*G*m5C*C*mA* mC*m5Ceo001mG*mC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	XnXOnXXXXXXXXXX XXnX
WV-39527	mA*m5Ceo001Teom5Ceo001mA*SC*SC*SC*RA*SC*ST*Sm5C*SG*R m5C*SC*SmA*SmC*Sm5Ceo*SmGn001mC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	SnXOnXSSSRSSSRSSSS SnX
WV-39528	mA*Sm5Ceo001Teom5Ceo001mA*SC*SC*SC*RA*SC*ST*Sm5C*SG*R m5C*SC*SmA*SmC*Sm5Ceo001mG*SmC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	SnXOnXSSSRSSSRSSSS nXS
WV-39523	mA*Sm5Ceo001Teom5Ceo001SmA*SC*SC*SC*RA*SC*ST*Sm5C*SG *Rm5C*SC*SmA*SmC*Sm5Ceo*SmGn001SmC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	SnSO nSSSRSSSRSSSS nS
WV-39525	mA*Sm5Ceo001Teom5Ceo001SmA*SC*SC*SC*RA*SC*ST*Sm5C*SG *Rm5C*SC*SmA*SmC*Sm5Ceo001SmG*SmC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	SnSO nSSSRSSSRSSSS SS
WV-34452	mA*Sm5Ceo001Teom5Ceo001RmA*SC*SC*SC*RA*SC*ST*Sm5C*S G*Rm5C*SC*SmA*SmC*Sm5Ceo*SmGn001RmC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	SnSO nRSSSRSSSRSSSS nR
WV-34453	mA*Sm5Ceo001Teom5Ceo001SmA*SC*SC*SC*RA*SC*ST*Sm5C*S G*Rm5C*SC*SmA*SmC*Sm5Ceo*SmGn001RmC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	SnRO nSSSRSSSRSSSS nR
WV-34466	mA*Sm5Ceo001Teom5Ceo001RmA*SC*SC*SC*RA*SC*ST*Sm5C*S G*Rm5C*SC*SmA*SmC*Sm5Ceo*SmGn001SmC	ACTCACCCACTCGC CACCGC	SnRO nRSSSRSSSRSSSS SnS
WV-39814	mC*Sm5Ceo001TeoTeom001mC*SC*SC*ST*RG*SA*SG*SG*RT*ST *SmC*SmC*SmU*SmCn001mC	CCTTCCCTGAAGGT TCCUCC	SnXOnXSSSRSSSRSSSS SnX

10

20

30

40

【0228】

表 A 1 の解説

本開示は、いくつかの配列が、その長さのために、表 1 A の複数の行に分割されることを示す；しかし、これらの配列は、表 1 A の全てのオリゴヌクレオチドと同様に、一本鎖である（別に注記のない限り）。当業者によって理解される通り、ヌクレオチド間結合が 2 つのヌクレオチド単位間で規定されないとき、ヌクレオチド間結合はホスホジエステル結合（天然リン酸結合）であり、別に示されない限り、糖は、2' 位の置換を含まない（2' -炭素における 2 つの -H）天然 DNA 糖である。表に列記される部分及び修飾（又はこれらの部分若しくは修飾を含むオリゴヌクレオチドを構築するために用いられる化合

50

物：

I：イノシン；

m：2'-OMe；

m5：Cの5位のメチル（核酸塩基は、5-メチルシトシン）；

m5Ce o：5-メチル2'-O-メトキシエチルC；

m5mC：5-メチル2'-OMeC；

e o：2'-MOE（2'-OC₂H₄CH₂OCH₃）；

r：2'-OH；

O、PO：ホスホジエステル（リン酸）；これは、結合、例えばリンカーとオリゴヌクレオチド鎖との結合、ヌクレオチド間結合などであり得る。立体化学／ヌクレオチド間結合の列に表示するホスホジエステルは、説明の列には繰り返さない；説明の列にヌクレオチド間結合が表示されていない場合、それは、ホスホジエステルである。

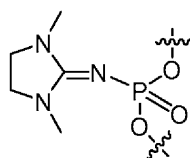
*、PS：ホスホロチオエート；これは、結合、例えばリンカーとオリゴヌクレオチド鎖との結合、ヌクレオチド間結合などであり得る。

R、Rp：Rp配座のホスホロチオエート；*Rは、Rp配座の単一ホスホロチオエートを示すことに留意されたい；

S、Sp：Sp配座のホスホロチオエート；*Sは、Sp配座の単一ホスホロチオエートを示すことに留意されたい；

n001：

【化4】



nX：ステレオランダムn001；

nR又はn001R：Rp配置のn001；

nS又はn001S：Sp配置のn001；

X：ステレオランダムホスホロチオエート；及び

L004：-NH(CH₂)₄CH(CH₂OH)CH₂-の構造を有するリンカー、式中、-NH-はMod(-C(O)-を介して)又は-Hに連結し、及び-CH₂-連結部位はオリゴヌクレオチド鎖の3'末端で結合、例えばホスホジエステル(-O-P(O)(OH)-O-)。塩形態として存在し得る。表中ではO又はPOとして示され得る)又はホスホロチオエート(-O-P(O)(SH)-O-)。塩形態として存在し得る。表中では、ホスホロチオエートがキラル制御されていない場合、*として示され；キラル制御されていて、且つSp配置を有する場合、*S、S又はSpとして示され、及びキラル制御されていて、且つRp配置を有する場合、*R、R又はRpとして示され得る)に連結している。例えば、L004の直前にアスタリスクがなければ、その結合がホスホジエステル結合であることを示す。例えば、末端がmA L004であるWV-18852では、リンカーL004は3'-末端糖（これは2'-OMeであり、核酸塩基Aに連結している）の3'位でホスホジエステル結合に(-CH₂-部位を介して)連結し、及びL004リンカーは-NH-を介して-Hに連結している。

【0229】

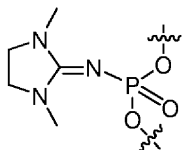
例えば、一部の実施形態において、本開示は、

mA*Sm5Ceon001RTeom5Ceon001RmA*SC*SC*SC*RA*SC*ST*Sm5C*SG*Rm5C*SC*SmA*SmCn001Rm5Ce o*SmG*SmC

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される塩を提供し、式中、

mは、ヌクレオシドへの2'-OMe修飾を表し（例えば、mAは、2'-OMeA）；

* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し；
 m 5 C e o は、5-メチル 2'-O-メトキシエチル C を表し；
 n 0 0 1 R は、R p n 0 0 1 結合を表し、ここで、n 0 0 1 結合は、
 【化 5】



10

の構造を有し；

e o は、ヌクレオシドへの 2'-OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し（例えば、T e o は、2'-OCH₂CH₂OCH₃T）；

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し；及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表す（例えば、5 m C において、核酸塩基は、5-メチルシトシン）。

【0 2 3 0】

一部の実施形態において、本開示は、

m A * S m 5 C e o n 0 0 1 R T e o m 5 C e o n 0 0 1 R m A * S C * S C * S C *
 R A * S C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C * S m 5 C e o n 0
 0 1 R m G * S m 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される塩を提供し、

式中、m、* S、m 5 C e o、n 0 0 1 R、e o、* R、m 5 などは、独立に本明細書に示される通りである。

【0 2 3 1】

一部の実施形態において、本開示は、

m A * S m 5 C e o n 0 0 1 R T e o m 5 C e o n 0 0 1 R m A * S C * S C * S C *
 R A * S C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C * S m 5 C e o * S
 m G n 0 0 1 R m C

30

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される塩を提供し、

式中、m、* S、m 5 C e o、n 0 0 1 R、e o、* R、m 5 などは、独立に本明細書に示される通りである。

【0 2 3 2】

一部の実施形態において、本開示は、

m C * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S T * S C * R A * S C * S C * R C
 * S A * S C * S T * S m 5 m C * S m G * S m C * S m 5 m C * S m 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される塩を提供し、

式中、m、* S、m 5 C e o、e o、* R、m 5 などは、独立に本明細書に示される通りである。

【0 2 3 3】

一部の実施形態において、本開示は、

m A * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S C * S C * R A * S C * S T * S m
 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C * S m 5 m C * S m G * S m 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される塩を提供し、

式中、m、* S、m 5 C e o、e o、* R、m 5 などは、独立に本明細書に示される通りである。

【0 2 3 4】

一部の実施形態において、本開示は、

m C * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S T * S C * R A * S C * S C * R C
 * S A * S C * S T * S m 5 C e o * S m G * S m C * S m 5 C e o * S m G

50

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される塩を提供し、

式中、 m 、 $*S$ 、 $m5Ceo$ 、 eo 、 $*R$ 、 $m5$ などは、独立に本明細書に示される通りである。

【0235】

一部の実施形態において、本開示は、

$mA * Sm5CeoTeom5Ceo mA * SC * SC * SC * RA * SC * ST * Sm5C * SG * Rm5C * SC * SmA * SmC * Sm5Ceo * SmG * SmC$

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される塩を提供し、

式中、 m 、 $*S$ 、 $m5Ceo$ 、 eo 、 $*R$ 、 $m5$ などは、独立に本明細書に示される通りである。

【0236】

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

一部の実施形態において、提供されるC9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72標的遺伝子又はその遺伝子産物の発現、レベル及び／又は活性の低下を導き得る。

一部の実施形態において、C9orf72標的遺伝子は、リピート伸長を含む。一部の実施形態において、C9orf72標的遺伝子は、ヘキサヌクレオチドリピート伸長を含む。

【0237】

とりわけ、本開示は、高い純度及び高いジアステレオマー純度のキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチド及びキラル制御されたC9orf72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、高い純度のキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチド及びキラル制御されたC9orf72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、高いジアステレオマー純度のキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチド及びキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0238】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチド組成物は、組成物中のそのオリゴヌクレオチドタイプでないオリゴヌクレオチドが、前記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ことにおいて、あるC9orf72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。

【0239】

一部の実施形態において、本開示はキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチドを提供し、ここで、オリゴヌクレオチド内にある個別のヌクレオチド間結合の少なくとも2つは、互いと比べて異なる立体化学及び／又は異なるP修飾を有する。特定の実施形態において、本開示はキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチドを提供し、ここで、オリゴヌクレオチド内にある個別のヌクレオチド間結合の少なくとも2つは、互いと比べて異なるP修飾を有する。特定の実施形態において、本開示はキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチドを提供し、ここで、オリゴヌクレオチド内にある個別のヌクレオチド間結合の少なくとも2つは、互いと比べて異なるP修飾を有し、キラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのリン酸ジエステルヌクレオチド間結合を含む。特定の実施形態において、本開示はキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチドを提供し、ここで、オリゴヌクレオチド内にある個別のヌクレオチド間結合の少なくとも2つは、互いと比べて異なるP修飾を有し、キラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのホスホロチオエートジエステルヌクレオチド間結合と少なくとも1つのホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含む。特定の実施形態において、本開示はキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチドを提供

10

20

30

40

50

し、ここで、オリゴヌクレオチド内にある個別のヌクレオチド間結合の少なくとも2つは、互いと比べて異なるP修飾を有し、キラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのリン酸ジエステルヌクレオチド間結合と少なくとも1つのホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含む。

【0240】

一部の実施形態において、提供される化合物、例えば、提供されるオリゴヌクレオチドは、60%~100%の純度を有する。一部の実施形態において、純度は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、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、純度は、少なくとも60%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも70%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも80%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも85%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも90%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも91%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも92%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも93%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも94%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも95%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも96%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも97%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも98%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも99%である。一部の実施形態において、純度は、少なくとも99.5%である。

10

20

【0241】

一部の実施形態において、提供される化合物、例えば、提供されるオリゴヌクレオチドは、60%~100%の立体化学純度を有する。一部の実施形態において、提供される化合物、例えば、提供されるオリゴヌクレオチドは、60%~100%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、ジアステレオマー純度は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、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、提供される化合物、例えば、提供されるオリゴヌクレオチドのキラル要素、例えば、キラル中心（炭素、リンなど）は、60%~100%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、キラル要素、例えば、キラル中心（炭素、リンなど）は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%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、キラル制御されたヌクレオチド間結合の各結合リンは、独立に、85%~100%、例えば、90%~100%の又は少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%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、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のキラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に、85%~100%、例えば、90%~100%の又は少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%若しくは99%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、各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立に、キラル制御されている。一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は少なくとも60%である。一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は少なくとも70%である。一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は少なくとも80%である。一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は少なくとも85%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少なくとも90%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少なくとも91%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少なくとも92%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少なくとも93%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少なくとも94%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少なくとも95%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少なくとも96%である。

30

40

50

一部の実施形態において、ジアステレオマー純度は少なくとも 97% 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少なくとも 98% 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少なくとも 99% 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少なくとも 99.5% である。

【0242】

とりわけ、本開示は、様々な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、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドの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組成物、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド組成物は、本開示に記載される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、オリゴヌクレオチド組成物、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド組成物は、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組成物、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド組成物は、キラル制御されていない（ステレオランダム）。

10

【0243】

天然リン酸結合の結合リンは、アキラルである。多くの修飾ヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合の結合リンは、キラルである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド組成物の調製（例えば、慣習的なホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成で）の間、キラル結合リンの配置は意図的に設計も制御もされず、様々な立体異性体（ジアステレオマー）の複雑なランダム混合物であるキラル制御されていない（ステレオランダム）オリゴヌクレオチド組成物（実質的にラセミ体の製剤）を作出し、 n 個のキラルヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチド（結合リンはキラル）について、典型的には 2^n 個の立体異性体（例えば、 n が 10 であるとき、 $2^{10} = 1,032$ ； n が 20 であるとき、 $2^{20} = 1,048,576$ ）を作出する。これらの立体異性体は同じ構成を有するが、それらの結合リンの立体化学のパターンに関しては異なる。

20

【0244】

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設計及び調製するための技術を含む。一部の実施形態において、本開示は、例えば、S及び／又はRをそれらの立体化学／結合で含有する表A1の多くのオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。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、制御／予め決定された（ステレオランダム組成物のようにランダムでない）レベルの複数のオリゴヌクレオチドを含み、ここで、オリゴヌクレオチドは、1つ以上のキラルヌクレオチド間結合（キラル制御されたヌクレオチド間結合）で同じ結合リン立体化学を共有する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、同じ骨格キラル中心のパターン（結合リンの立体化学）を共有する。一部の実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、本開示に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、同じ構成を共有する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、構造的に同一である。当業者によって理解される通り、様々な形態のオリゴヌクレオチド、例えば、様々なオリゴヌクレオチドの塩形態は、別に記載のない限り同じ構成及び／又は構造を有するとみなすことができる。

30

40

【0245】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチド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り、ここで、オリゴヌクレオチドは、

1) 共通の塩基配列、

2) 共通の骨格結合のパターン及び

3) 1つ以上（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又はそれを超える）のキラルヌクレオチド間結合（キラル制御されたヌ

50

クレオチド間結合)における同じ結合リン立体化学を共有し、

この組成物は、共通の塩基配列及び骨格結合のパターン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べて、複数のオリゴヌクレオチドについて集積されている。

【0246】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチド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り、ここで、オリゴヌクレオチドは、

- 1) 共通の塩基配列、
- 2) 共通の骨格結合のパターン及び
- 3) 少なくとも1つのSpを含む共通の骨格キラル中心のパターン

10

を共有し、

この組成物は、共通の塩基配列及び骨格結合のパターン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べて、複数のオリゴヌクレオチドについて集積されている。

【0247】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチド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り、ここで、オリゴヌクレオチドは、

- 1) 共通の塩基配列、
- 2) 共通の骨格結合のパターン及び
- 3) 少なくとも1つのRpを含む共通の骨格キラル中心のパターン

20

を共有し、

この組成物は、共通の塩基配列及び骨格結合のパターン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べて、複数のオリゴヌクレオチドについて集積されている。

【0248】

一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、同じ構成である。

【0249】

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) 共通の構成及び
- 2) 1つ以上(例えば、1~50、1~40、1~30、1~25、1~20、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)のキラルヌクレオチド間結合(キラル制御されたヌクレオチド間結合)における同じ結合リン立体化学を共有し、

30

この組成物は、共通の構成の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について集積されている。

【0250】

一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、構造的に同一である。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、構造的に同一であり、且つこの組成物は、複数のオリゴヌクレオチドと同じ構成の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について集積されている。

40

【0251】

一部の実施形態において、これらは、独立に、5~50又はそれを超える、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個又はそれを超えるキラルヌクレオチド間結合で同じ立体化学を共有する。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合で同じ立体化学を共有する。

【0252】

50

一部の実施形態において、実質的にキラル体の製剤に対する集積は、組成物中の全てのオリゴヌクレオチドの少なくとも約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、実質的にキラル体の製剤に対する集積は、共通の塩基配列を共有する組成物中の全てのオリゴヌクレオチドの少なくとも約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、パーセンテージは少なくとも約10%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約20%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約30%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約40%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約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約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約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約75%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約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約85%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約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約91%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約92%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約93%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約94%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約95%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約96%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約97%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約98%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約99%である。当業者によって理解される通り、オリゴヌクレオチドの様々な形態は同じ構成及び／又は構造を有すると適切にみなすことができ、同じ構成を共有するオリゴヌクレオチドの様々な形態は同じ構成を有すると適切にみなすことができる。

10

20

30

【0253】

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のレベルは、制御されている。対照的に、キラル制御されていない（又はステレオランダム、ラセミ体）オリゴヌクレオチド組成物（又は製剤）において、オリゴヌクレオチドのレベルはランダムであり、制御されていない。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のレベルは、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物中の全てのオリゴヌクレオチドの、又は複数のオリゴヌクレオチドと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全てのオリゴヌクレオチドの、又は複数のオリゴヌクレオチドと共通の塩基配列及び骨格結合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全てのオリゴヌクレオチドの、又は複数のオリゴヌクレオチドと共通の塩基配列、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全てのオリゴヌクレオチドの、又は複数のオリゴヌクレオチドと同じ構成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全てのオリゴヌクレオチドの約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%又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、

40

50

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%)である。一部の実施形態において、実質的にキラル体の製剤に対する集積は、本明細書に記載されるレベルである。

【0254】

一部の実施形態において、パーセンテージとしてのレベル（例えば、制御レベル、予め決定されたレベル、集積）は、 $(DS)^{nc}$ であるか又は少なくとも $(DS)^{nc}$ であり、ここで、DSは、90%～100%であり、及びncは、本開示に記載される通りのキラル制御されたヌクレオチド間結合の数（例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれを超える）である。一部の実施形態において、各キラルヌクレオチド間結合は、キラル制御されており、及びncは、キラルヌクレオチド間結合の数である。一部の実施形態において、DSは、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%又はそれを超える。一部の実施形態において、DSは90%であるか又は少なくとも90%である。一部の実施形態において、DSは91%であるか又は少なくとも91%である。一部の実施形態において、DSは92%であるか又は少なくとも92%である。一部の実施形態において、DSは93%であるか又は少なくとも93%である。一部の実施形態において、DSは94%であるか又は少なくとも94%である。一部の実施形態において、DSは95%であるか又は少なくとも95%である。一部の実施形態において、DSは96%であるか又は少なくとも96%である。一部の実施形態において、DSは97%であるか又は少なくとも97%である。一部の実施形態において、DSは98%であるか又は少なくとも98%である。一部の実施形態において、DSは99%であるか又は少なくとも99%である。一部の実施形態において、レベル（例えば、制御レベル、予め決定されたレベル、集積）は、同じ構成を共有する組成物中の全てのオリゴヌクレオチドのパーセンテージであり、ここで、パーセンテージは $(DS)^{nc}$ であるか又は少なくとも $(DS)^{nc}$ である。例えば、DSが99%であり、及びncが10であるとき、パーセンテージは90%であるか又は少なくとも90% $((99\%)^{10} = 0.90 = 90\%)$ である。当業者によって理解される通り、ステレオランダム製剤において、パーセンテージは典型的には約 $1/2^{nc}$ であり、ncが10であるとき、パーセンテージは約 $1/2^{10} = 0.001 = 0.1\%$ である。

【0255】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチド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り、ここで、オリゴヌクレオチドは、

1) 共通の塩基配列、

2) 共通の骨格結合のパターン及び

3) 1つ以上（例えば、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又はそれを超える）のキラルヌクレオチド間結合（キラル制御されたヌクレオチド間結合）における同じ結合リン立体化学を共有し、

共通の塩基配列及び骨格結合のパターンを共有する組成物中の全てのオリゴヌクレオチド内の複数のオリゴヌクレオチドのパーセンテージは、少なくとも $(DS)^{nc}$ であり、ここで、DSは、90%～100%であり、及びncは、キラル制御されたヌクレオチド間結合の数である。

【0256】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチド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り、ここで、オリゴヌクレオチドは

- 、
- 1) 共通の塩基配列、
 - 2) 共通の骨格結合のパター及び
 - 3) 少なくとも1つのSpを含む共通の骨格キラル中心のパターン

を共有し、

共通の塩基配列及び骨格結合のパターンを共有する組成物中の全てのオリゴヌクレオチド内の複数のオリゴヌクレオチドのパーセンテージは、少なくとも(DS)^{nc}であり、ここで、DSは、90%~100%であり、及びncは、キラル制御されたヌクレオチド間結合の数である。

【0257】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチド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り、ここで、オリゴヌクレオチドは

10

- 、
- 1) 共通の塩基配列、
 - 2) 共通の骨格結合のパター及び
 - 3) 少なくとも1つのRpを含む共通の骨格キラル中心のパターン

を共有し、

共通の塩基配列及び骨格結合のパターンを共有する組成物中の全てのオリゴヌクレオチド内の複数のオリゴヌクレオチドのパーセンテージは、少なくとも(DS)^{nc}であり、ここで、DSは、90%~100%であり、及びncは、キラル制御されたヌクレオチド間結合の数である。

20

【0258】

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、共通の構成のものであり、且つ1つ以上(例えば、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又はそれを超える)のキラルヌクレオチド間結合(キラル制御されたヌクレオチド間結合)で同じ結合リン立体化学を共有し、組成物中の同じ構成の全てのオリゴヌクレオチド内の複数のオリゴヌクレオチドのパーセンテージは、少なくとも(DS)^{nc}であり、ここで、DSは、90%~100%であり、及びncは、キラル制御されたヌクレオチド間結合の数である。

30

【0259】

一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、異なる塩形態のものである。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、単一オリゴヌクレオチドの1つ以上の形態、例えば、様々な薬学的に許容される塩形態を含む。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、2つ以上のオリゴヌクレオチドの1つ以上の形態、例えば、様々な薬学的に許容される塩形態を含む。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、2^{NC}オリゴヌクレオチドの1つ以上の形態、例えば、様々な薬学的に許容される塩形態を含み、ここで、NCは、キラル制御されていないキラルヌクレオチド間結合の数である。一部の実施形態において、2^{NC}オリゴヌクレオチドは、例えばそれらがキラル制御されたオリゴヌクレオチド合成を使用して特異的に集積されない場合、組成物内で相対的に類似のレベルを有する。

40

【0260】

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、構造的に同一であり、且つ組成物中の複数のオリゴヌクレオチドと同じ構成の全てのオリゴヌクレオチド内の複数のオリゴヌクレオチドのパーセンテージは、少なくとも(DS)^{nc}であり、ここで、DSは、90%~100%であり、及びncは、キラル制御されたヌクレオチド間結合の数である。

50

【0261】

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レベルは、オリゴヌクレオチド中の各キラル制御されたヌクレオチド間結合のジアステレオ純度の積として決定することができる。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド（又は核酸）中の2つのヌクレオチドを連結するヌクレオチド間結合のジアステレオ純度は、同じ2つのヌクレオチドを連結するダイマーのヌクレオチド間結合のジアステレオ純度によって表され、ここで、ダイマーは、同等の条件、一部の例において、同一の合成サイクル条件を使用して調製される（例えば、オリゴヌクレオチド中の N_x と N_y との結合... $N_x N_y$... について、ダイマーは $N_x N_y$ である）。

【0262】

一部の実施形態において、全てのキラルヌクレオチド間結合は、キラル制御されており、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。一部の実施形態において、全てのキラルヌクレオチド間結合がキラル制御されたヌクレオチド間結合ではなく、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、全てのキラルヌクレオチド間結合の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%がキラル制御されている。一部の実施形態において、全てのキラルヌクレオチド間結合の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%が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ヌクレオチド間結合は、キラル制御されている。

【0263】

オリゴヌクレオチドは、様々な骨格キラル中心のパターン（キラル結合リンの立体化学のパターン）を含み得るか又はそれからなり得る。特定の有用な骨格キラル中心のパターンは、本開示に記載される。一部の実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、共通の骨格キラル中心のパターンを共有し、それは本開示に記載されるパターンであるか又はそれを含む（例えば、「結合リン立体化学及びそのパターン」におけるように、表A1のキラル制御されたオリゴヌクレオチドの骨格キラル中心のパターン）。

【0264】

キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、ステレオランダムオリゴヌクレオチド組成物に対して多数の利点を実証し得る。とりわけ、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、対応するステレオランダムオリゴヌクレオチド組成物よりもオリゴヌクレオチド構造に関して均一である。立体化学を制御することによって、個別の立体異性体の組成物を調製及び評価することができ、その結果、所望の特性及び／又は活性を有する立体異性体のキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を開発することができる。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、対応するステレオランダムオリゴヌクレオチド組成物と比較して良好な送達、安定性、クリアランス、活性、選択性及び／又は毒性プロファイルを提供する。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、より良好な効力、より少ない副作用及び／又はより大きい利便性及び有効な投薬レジメンを提供する。とりわけ、本明細書に記載される骨格キラル中心のパターンを利用してオリゴヌクレオチド標的の制御された切断（例えば、プレmRNA、成熟mRNAなどの転写物；切断部位、切断部位における切断の速度及び／又は程度の制御及び／又は切断の全体的速度及び程度などを含む）及び大幅に増加した標的選択性を提供することができる。一部の実施形態において、特定の骨格キラル中心のパターンを含むオリゴヌクレオチドのキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、極めて少数の位置、一部の実施形態において、単一位置で（例えば、SNP部位、点突然変異部位などで）核酸塩基の違いを有する配列を識別し得る。

【0265】

当業者によって理解される通り、ステレオランダム又は（実質的に）ラセミ体の製剤／キラル制御されていないオリゴヌクレオチド組成物は、典型的には、キラル制御なしで、

10

20

30

40

50

例えば、オリゴヌクレオチド合成の間に結合リンで高い立体選択性（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%又はそれを超える；一部の実施形態において、95%、96%、97%、98%、99%又は99.5%又はそれを超える；一部の実施形態において、97%、98%、99%又は99.5%又はそれを超える；一部の実施形態において、98%、99%又は99.5%又はそれを超える）を提供し得るキラル補助剤、キラル修飾試薬及び／又はキラル触媒を使用せずに調製される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの実質的なラセミ（又はキラル制御されていない）製剤において、カップリングステップは、増強された立体選択性を提供するためのカップリングステップを特に実施しないことにおいてキラル制御されていない。オリゴヌクレオチド／キラル制御されていないオリゴヌクレオチド組成物の実質的なラセミ調製の一例は、慣習的ホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド合成及びテトラエチルチウラムジスルフィド又は（TETD）、3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシド（BDTD）などの非キラル硫化試薬を用いる硫化を介するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの調製であり、当技術分野では公知の方法である。ステレオランダムオリゴヌクレオチド組成物／オリゴヌクレオチドの実質的なラセミ体の製剤を作製する様々な方法が広く公知であり、当技術分野で実施されており、本開示のそうした組成物及び製剤の調製に利用することができる。

10

【0266】

キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の特性及び／又は活性、例えば、C9orf72標的遺伝子又はその遺伝子産物のレベル、活性及び／又は発現の低下におけるキラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチド組成物を示す特定のデータを、例えば、実施例に示す。

20

【0267】

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、例えば、キラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、少なくとも1つのキラル制御されたヌクレオチド間結合の結合リンはSpである。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、例えば、キラル制御されたC9orf72オリゴヌクレオチド組成物を提供し、ここで、キラル制御されたヌクレオチド間結合の結合リンの大部分はSp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その一部分（例えば、5'-ウィング、3'-ウィング、コアなど）の全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の（又は全てのキラルヌクレオチド間結合の又は全てのヌクレオチド間結合の）約50%～100%、55%～100%、60%～100%、65%～100%、70%～100%、75%～100%、80%～100%、85%～100%、90%～100%、55%～95%、60%～95%、65%～95%又は約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%又はそれを超えるものがSp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その一部分（例えば、5'-ウィング、3'-ウィング、コアなど）の全てのキラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合の約50%～100%、55%～100%、60%～100%、65%～100%、70%～100%、75%～100%、80%～100%、85%～100%、90%～100%、55%～95%、60%～95%、65%～95%又は約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%又はそれを超えるものがSpである。一部の実施形態において、パーセンテージは60%以上である。一部の実施形態において、パーセンテージは67%以上である。一部の実施形態において、パーセンテージは70%以上である。一部の実施形態において、パーセンテージは75%以上である。一部の実施形態において、パーセンテージは80%以上である。一部の実施形態において、パーセンテージは85%以上である。一部の実施形態において、パーセンテージは90%以上である。一部の実施形態において、パーセンテージは95%以上である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド又はその一部分（例えば、5'-ウィング、3'-ウィング、コアなど）は、1つ以上のRpキラル制御されたヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態に

30

40

50

において、オリゴヌクレオチド又はその一部分（例えば、5'－ウィング、3'－ウィング、コアなど）は、1つ以上のRpキラル制御された非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、n001などの中性ヌクレオチド間結合）を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド又はその一部分（例えば、5'－ウィング、3'－ウィング、コアなど）は、1つ以上のRpキラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、コアは、1つ以上のRpホスホロチオエートヌクレオチド間結合を、例えば、本明細書に記載される通りのRpSpSpを含む骨格キラル中心のパターンで含む。

【0268】

立体化学及び骨格キラル中心のパターン

天然リン酸結合と対照的に、キラル修飾されたヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合の結合リンは、キラルである。とりわけ、本開示は、キラルヌクレオチド間結合中のキラル結合リンの立体化学の制御を含む技術（例えば、オリゴヌクレオチド、組成物、方法など）を提供する。一部の実施形態において、本明細書に実証される通り、立体化学の制御は、所望の安定性、低減した毒性、改善された標的核酸の低減などを含めた改善された特性及び／又は活性を提供し得る。一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチド及び／又はその領域に有用な骨格キラル中心のパターンを提供し、そのパターンは、5'から3'へのキラル結合リンの各キラル結合リン（Rp又はSp）の立体化学、各アキラル結合リン（Op、存在する場合）の指標の組み合わせである。一部の実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、標的核酸の切断パターンを、切断系（例えば、インビトロアッセイ、細胞、組織、器官、生物、対象など）中でそれらが提供されるオリゴヌクレオチド又はその組成物に接触されたときに制御し得る。一部の実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、標的核酸の切断効率及び／又は選択性を、切断系中でそれらが提供されるオリゴヌクレオチド又はその組成物に接触されたときに改善する。

【0269】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド又はその一領域（例えば、コア）の骨格キラル中心のパターンは、(Sp)m(Rp/Op)n、(Rp/Op)n(Sp)m、(Sp)m(Rp)n、(Rp)n(Sp)m、(Np)t[(Rp/Op)n(Sp)m]y、[(Rp/Op)n(Sp)m]y(Np)t、(Np)t[(Rp)n(Sp)m]y、[(Rp)n(Sp)m]y(Np)t、[(Op)n(Sp)m]y(Rp)k、[(Op)n(Sp)m]y、(Sp)t[(Op)n(Sp)m]y(Rp)k、[(Rp)n(Sp)m]y(Rp)k、[(Rp)n(Sp)m]y、(Sp)t[(Rp)n(Sp)m]y又は(Sp)t[(Rp)n(Sp)m]y(Rp)kを含むか又はそれであり、式中、各Npは、独立にSp又はRpであり、並びにm、n、t、y及びkの各々は、独立に1～50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、C9orf72オリゴヌクレオチド又はその一領域（例えば、コア）の骨格キラル中心のパターンは、Rp(Sp)mを含むか又はそれである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド又はその一領域（例えば、コア）の骨格キラル中心のパターンは、(Sp)tRp(Sp)mを含むか又はそれである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド又はその一領域（例えば、コア）の骨格キラル中心のパターンは、[Rp(Sp)m]yを含むか又はそれである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド又はその一領域（例えば、コア）の骨格キラル中心のパターンは、(Np)t[Rp(Sp)m]yを含むか又はそれである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド又はその一領域（例えば、コア）の骨格キラル中心のパターンは、(Sp)t[Rp(Sp)m]yを含むか又はそれである。一部の実施形態において、少なくとも1つのnは、1である。一部の実施形態において、各nは、1である。一部の実施形態において、少なくとも1つのmは、2以上である。一部の実施形態において、各mは、独立に2以上で

10

20

30

40

50

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、 t は、1 である。一部の実施形態において、 t は、2 以上である。一部の実施形態において、 t は、2 以上である。一部の実施形態において、 y は、4 以上である。一部の実施形態において、少なくとも 1 つの R_p / O_p は、 R_p である。一部の実施形態において、 N_p 、 R_p 、 S_p の各々は、独立にホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、 O_p は、天然リン酸結合を表す。

【0270】

一部の実施形態において、 m 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 又は 25 である。一部の実施形態において、骨格キラル中心のパターンにおいて、各 m は、独立に 2 以上である。一部の実施形態において、各 m は、独立に、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、各 m は、独立に、2～3、2～5、2～6 又は 2～10 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 の 2 つ以上の出現がある場合、それらは同じであるか又は異なり得、且つそれらの各々は、独立に、本開示に記載される通りである。

【0271】

一部の実施形態において、 y 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 又は 25 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。

【0272】

一部の実施形態において、 t 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 又は 25 である。一部の実施形態において、各 t は、独立に、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、 t は 2 以上である。一部の実施形態において、 t は 3 以上である。一部の実施形態において、 t は 4 以上である。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 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 の 2 つ以上の出現がある場合、それらは同じであるか又は異なり得、且つそれらの各々は、独立に、本開示に記載される通りである。

【0273】

一部の実施形態において、 n 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 又は 25 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。一部の実施形態において、 n の2つ以上の出現がある場合、それらは同じであるか又は異なり得、且つそれらの各々は、独立に、本開示に記載される通りである。多くの実施形態において、骨格キラル中心のパターンにおいて、 n の少なくとも1つの出現は1であり；一部の場合、各 n は1である。

【0274】

一部の実施形態において、 k 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又は25である。一部の実施形態において、 k は1である。一部の実施形態において、 k は2である。一部の実施形態において、 k は3である。一部の実施形態において、 k は4である。一部の実施形態において、 k は5である。一部の実施形態において、 k は6である。一部の実施形態において、 k は7である。一部の実施形態において、 k は8である。一部の実施形態において、 k は9である。一部の実施形態において、 k は10である。

【0275】

一部の実施形態において、少なくとも1つの n は1であり、及び少なくとも1つの m は2以上である。一部の実施形態において、少なくとも1つの n は1であり、少なくとも1つの t は2以上であり、及び少なくとも1つの m は3以上である。一部の実施形態において、各 n は1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、少なくとも1つの $t > 1$ である。一部の実施形態において、少なくとも1つの $t > 2$ である。一部の実施形態において、少なくとも1つの $t > 3$ である。一部の実施形態において、少なくとも1つの $t > 4$ である。一部の実施形態において、少なくとも1つの $m > 1$ である。一部の実施形態において、少なくとも1つの $m > 2$ である。一部の実施形態において、少なくとも1つの $m > 3$ である。一部の実施形態において、少なくとも1つの $m > 4$ である。一部の実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、1つ以上のアキラルな天然リン酸結合を含む。一部の実施形態において、一部の実施形態において、 m 、 t 及び n （又はパターンの t がない場合、 m 及び n ）の和は5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20以上である。一部の実施形態において、和は5である。一部の実施形態において、和は6である。一部の実施形態において、和は7である。一部の実施形態において、和は8である。一部の実施形態において、和は9である。一部の実施形態において、和は10である。一部の実施形態において、和は11である。一部の実施形態において、和は12である。一部の実施形態において、和は13である。一部の実施形態において、和は14である。一部の実施形態において、和は15である。

【0276】

一部の実施形態において、キラル制御されたヌクレオチド間結合中の幾つもの結合リンは、 S_p である。一部の実施形態において、キラル制御されたヌクレオチド間結合の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%は、 S_p 結合リンを有する。一部の実施形態において、キラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%は、 S_p 結合リンを有する。一部の実施形態において、全てのキラルヌクレオチド間結合の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%は、 S_p 結合リンを有するキラル制御されたヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、全てのキラルヌクレオチド間結合の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%は、 S_p 結合リンを有するキラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、全てのヌクレオチド間結合の少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、

40

50

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中のヌクレオチド間結合の全て、本質的に全て又はほとんどは、S_p配置であり（例えば、全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の又は全てのキラルヌクレオチド間結合の又はオリゴヌクレオチド中の全てのヌク

レオチド間結合の約50%~100%、55%~100%、60%~100%、65%~100%、70%~100%、75%~100%、80%~100%、85%~100%、90%~100%、55%~95%、60%~95%、65%~95%又は約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%若しくはそれを超える）、但し、ヌクレオチド間結合の1つ又は少数（例えば、1、2、3、4若しくは5つ及び／又は全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の又は全てのキラルヌクレオチド間結合の又はオリゴヌクレオチド中の全てのヌクレオチド間結合の50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%若しくは5%未満）はRp配置である。一部の実施形態において、コア中のヌクレオチド間結合の全て、本質的に全て又はほとんどはSp配置であり（例えば、全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の又は全てのキラルヌクレオチド間結合の又はコア中の全てのヌクレオチド間結合の約50%~100%、55%~100%、60%~100%、65%~100%、70%~100%、75%~100%、80%~100%、85%~100%、90%~100%、55%~95%、60%~95%、65%~95%又は約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%若しくはそれを超える）、但し、ヌクレオチド間結合の1つ又は少数（例えば、1、2、3、4若しくは5つ及び／又は全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の又は全てのキラルヌクレオチド間結合の又はコア中の全てのヌクレオチド間結合の50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%若しくは5%未満）はRp配置である。一部の実施形態において、コア中のヌクレオチド間結合の全て、本質的に全て又はほとんどは、Sp配置のホスホロチオエートであり（例えば、全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の又は全てのキラルヌクレオチド間結合の又はコア中の全てのヌクレオチド間結合の約50%~100%、55%~100%、60%~100%、65%~100%、70%~100%、75%~100%、80%~100%、85%~100%、90%~100%、55%~95%、60%~95%、65%~95%又は約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%若しくはそれを超える）、但し、ヌクレオチド間結合の1つ又は少数（例えば、1、2、3、4若しくは5つ及び／又は全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の又は全てのキラルヌクレオチド間結合の又はコア中の全てのヌクレオチド間結合の50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%若しくは5%未満）はRp配置のホスホロチオエートである。一部の実施形態において、コア中の各ヌクレオチド間結合はSp配置のホスホロチオエートであり、但し、1つのホスホロチオエートはRp配置である。一部の実施形態において、コア中の各ヌクレオチド間結合はSp配置のホスホロチオエートであり、但し、1つのホスホロチオエートはRp配置である。

10

20

30

40

50

【0278】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上のRpヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以下のRpヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、2つ以上のRpヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、3つ以上のRpヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、4つ以上のRpヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、5つ以上のRpヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の約5%~50%はRpである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の約5%~40%はRpである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の約10%~40%はRpである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の約15%~40%はRpである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の約20%~40%はRpである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の約25%

～40%はRpである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の約30%～40%はRpである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の全てのキラル制御されたヌクレオチド間結合の約35%～40%はRpである。

【0279】

一部の実施形態において、塩基配列は、標的核酸中の特徴的な配列エレメントと相補的な配列を含むか又はそれであり、その特徴的な配列エレメントは、標的核酸（例えば、特定のアレルからの転写物又は核酸からのあるタイプの転写物（例えば、図1のV3）、それは病態、障害又は疾患に関連することが多い）を、他の核酸（例えば、異なるアレルからの転写物又は核酸からの（1つ以上の）異なるタイプの転写物（例えば、図1のV2）、それは病態、障害又は疾患に関連しないか又はあまり関連しないことが多い）から識別し得る。一部の実施形態において、共通の塩基配列は、特徴的な配列エレメントと相補的な配列を含む。一部の実施形態において、共通の塩基配列は、特徴的な配列エレメントと相補的な配列である。一部の実施形態において、共通の塩基配列は、特徴的な配列エレメントと100%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、特徴的な配列エレメントと100%相補的な配列を含む。一部の実施形態において、共通の塩基配列は、特徴的な配列エレメントと100%相補的な配列である。一部の実施形態において、Rpヌクレオチド間結合（例えば、Rpホスホロチオエートヌクレオチド間結合）は、特徴的な配列エレメントに対して+5、+4、+3、+2、+1、-1、-2、-3、-4又は-5位にある。一部の実施形態において、こうしたRpは、骨格キラル中心のパターンにおけるRpSpSpモチーフ（例えば、本明細書に記載される通りの(Rp)n(Sp)m、(Np)t[(Rp)n(Sp)m]y、(Sp)t[(Rp)n(Sp)m]y、Rp(Sp)m、(Sp)tRp(Sp)m、[Rp(Sp)m]y、(Np)t[Rp(Sp)m]y又は(Sp)t[Rp(Sp)m]yを含むか又はそれからなるもの）のものである。別に記載のない限り、Rpヌクレオチド間結合の位置決めについて、「-」は、特徴的な配列エレメントと相補的な配列の5'末端のヌクレオシドから、オリゴヌクレオチドの5'末端に向けてカウントし、-1位のヌクレオチド間結合は、特徴的な配列エレメントと相補的な配列の5'末端のヌクレオシドの5'-炭素に結合しているヌクレオチド間結合であり、「+」は、特徴的な配列エレメントと相補的な配列の3'末端のヌクレオシドから、オリゴヌクレオチドの3'末端に向けてカウントし、+1位のヌクレオチド間結合は、特徴的な配列エレメントと相補的な配列の3'末端のヌクレオシドの3'-炭素に結合しているヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、特徴的な配列エレメントは、単一の識別位置（例えば、点突然変異）を含む。一部の実施形態において、特徴的な配列エレメントは、点突然変異又はSNPである。当業者によって理解される通り、特徴的な配列エレメントが1つのヌクレオシドのみを含むとき、特徴的な配列エレメントと相補的な配列の5'末端のヌクレオシド及び特徴的な配列エレメントと相補的な配列の3'末端のヌクレオシドは同じである。一部の実施形態において、Rpは-5にある。一部の実施形態において、Rpは-4にある。一部の実施形態において、Rpは-3にある。一部の実施形態において、Rpは-2にある。一部の実施形態において、Rpは-1にある。一部の実施形態において、Rpは+1にある。一部の実施形態において、Rpは+2にある。一部の実施形態において、Rpは+3にある。一部の実施形態において、Rpは+4にある。一部の実施形態において、Rpは+5にある。一部の実施形態において、こうしたRpは、キラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合の配置である。一部の実施形態において、こうしたRpはコア領域中に存在する。

【0280】

一部の実施形態において、Sp配置のヌクレオチド間結合（Sp結合リンを有する）は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、アキラルなヌクレオチド間結合は、天然リン酸結合である。一部の実施形態において、Rp配置のヌクレオチド間結合（Rp結合リンを有する）は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合

である。一部の実施形態において、S p 配置の各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、各アキラルなヌクレオチド間結合は、天然リン酸結合である。一部の実施形態において、R p 配置の各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、S p 配置の各ヌクレオチド間結合はホスホロチオエートヌクレオチド間結合であり、各アキラルなヌクレオチド間結合は天然リン酸結合であり、且つ R p 配置の各ヌクレオチド間結合はホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、R p 配置のヌクレオチド間結合は、非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、n 0 0 1 などの中性ヌクレオチド間結合）である。一部の実施形態において、各キラル制御された非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、n 0 0 1 などの中性ヌクレオチド間結合）は R p である。一部の実施形態において、各 n 0 0 1 は R p である。

10

【0281】

一部の実施形態において、ウィングヌクレオシド及びコアヌクレオシドに結合しているヌクレオチド間結合は、例えば、コアヌクレオチド間結合のタイプ、修飾、数及び／又はパターンを説明するとき、コアヌクレオチド間結合の1つと見なされる。一部の実施形態において、ウィングヌクレオシド及びコアヌクレオシドに結合している各ヌクレオチド間結合は、例えば、コアヌクレオチド間結合のタイプ、修飾、数及び／又はパターンを説明するとき、コアヌクレオチド間結合の1つと見なされる。例えば、一部の実施形態において、コアヌクレオチド間結合は、2つのコアヌクレオシドに結合している。一部の実施形態において、コアヌクレオチド間結合は、コアヌクレオシド及びウィングヌクレオシドに結合している。一部の実施形態において、各コアヌクレオチド間結合は、独立に、2つのコアヌクレオシド又はコアヌクレオシド及びウィングヌクレオシドに結合している。一部の実施形態において、各ウィングヌクレオチド間結合は、独立に、2つのウィングヌクレオシドに結合している。

20

【0282】

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提供されるオリゴヌクレオチド、例えば、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、各々、異なるタイプのヌクレオチド間結合を含む。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つの天然リン酸結合と少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間結合とを含む。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つの天然リン酸結合と少なくとも2つの修飾ヌクレオチド間結合とを含む。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つの天然リン酸結合と少なくとも3つの修飾ヌクレオチド間結合とを含む。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つの天然リン酸結合と少なくとも4つの修飾ヌクレオチド間結合とを含む。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つの天然リン酸結合と少なくとも5つの修飾ヌクレオチド間結合とを含む。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つの天然リン酸結合と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個又はそれを超える修飾ヌクレオチド間結合とを含む。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、各修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、非負電荷ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、中性ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は n 0 0 1 である。一部の実施形態において、各修飾ヌクレオチド間結合は、独立に、ホスホロチオエート又は中性ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、各修飾ヌクレオチド間結合は、独立に、ホスホロチオエート又は n 0 0 1 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、少なくとも1つの天然リン酸結合と少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個の連

30

40

50

続修飾ヌクレオチド間結合とを含む。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つの天然リン酸結合と少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個の連続ホスホロチオエートヌクレオチド間結合とを含む。

【0283】

一部の実施形態において、修飾結合はキラル補助剤を含み、これは、例えば、反応、例えば、オリゴヌクレオチド合成サイクルにおけるカップリング反応の立体選択性の制御に使用される。

【0284】

ヌクレオチド間結合

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、塩基修飾、糖修飾及び／又はヌクレオチド間結合修飾を含む。様々なヌクレオチド間結合を本開示に従って利用して核酸塩基を含む単位、例えば、ヌクレオシドを結合させることができる。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合と1つ以上の天然リン酸結合の両方を含む。当業者によって広く知られる通り、天然リン酸結合は天然DNA及びRNA分子に広く見られ；これらは $-OP(O)(OH)O-$ の構造を有し、DNA及びRNA中のヌクレオシド中の糖を連結し、且つ様々な塩形態であり得、例えば、生理学的pH（約7.4）で天然リン酸結合は主に塩形態で存在し、アニオンは $-OP(O)(O^-)O-$ である。修飾ヌクレオチド間結合又は非天然リン酸結合は、天然リン酸結合でもその塩形態でもないヌクレオチド間結合である。修飾ヌクレオチド間結合は、その構造に応じてその塩形態でもあり得る。例えば、当業者によって理解される通り、 $-OP(O)(SH)O-$ の構造を有するホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、例えば、生理学的pH（約7.4）で様々な塩形態であり得、アニオンは $-OP(O)(S^-)O-$ である。

【0285】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、チオホスフェート、3'-チオホスフェート又は5'-チオホスフェートであるヌクレオチド間結合を含む。

【0286】

一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、キラル結合リンを含むキラルヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、キラルヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合である。一部の実施形態において、キラルヌクレオチド間結合は、非負電荷ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、キラルヌクレオチド間結合は、中性ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、キラルヌクレオチド間結合は、そのキラル結合リンに関してキラル制御されている。一部の実施形態において、キラルヌクレオチド間結合は、そのキラル結合リンに関して立体化学的に純粋である。一部の実施形態において、キラルヌクレオチド間結合は、キラル制御されていない。一部の実施形態において、骨格キラル中心のパターンは、キラル制御されたヌクレオチド間結合（Rp又はSp）の位置及び結合リン配置とアキラルなヌクレオチド間結合（例えば、天然リン酸結合）の位置と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、米国特許第9982257号、米国特許第10160969号、米国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020/0056173号、米国特許出願公開第2018/0216107号、米国特許出願公開第2019/0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公開第2019/0249173号、米国特許出願公開第2019/0375774号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第20

10

20

30

40

50

18 / 223081号、国際公開第2018 / 237194号、国際公開第2019 / 032607号、国際公開第2019 / 055951号、国際公開第2019 / 075357号、国際公開第2019 / 200185号、国際公開第2019 / 217784号、国際公開第2019 / 032612号及び／又は国際公開第2020 / 191252号に記載される通りの修飾ヌクレオチド間結合（例えば、式I、I-a、I-b又はI-c、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などの構造又はその塩形態を有する修飾ヌクレオチド間結合）を含み、それらの各々のヌクレオチド間結合（例えば、式I、I-a、I-b又はI-c、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のものなど）は独立に参照によって本明細書に援用される。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、非負電荷ヌクレオチド間結合である。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、1つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、正電荷ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、中性ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、本開示は、1つ以上の中性ヌクレオチド間結合を含むオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合又は中性ヌクレオチド間結合（例えば、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などの1つ）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、米国特許第9982257号、米国特許第10160969号、米国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020 / 0056173号、米国特許出願公開第2018 / 0216107号、米国特許出願公開第2019 / 0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019 / 0077817号、米国特許出願公開第2019 / 0249173号、米国特許出願公開第2019 / 0375774号、国際公開第2018 / 223056号、国際公開第2018 / 223073号、国際公開第2018 / 223081号、国際公開第2018 / 237194号、国際公開第2019 / 032607号、国際公開第2019 / 055951号、国際公開第2019 / 075357号、国際公開第2019 / 200185号、国際公開第2019 / 217784号、国際公開第2019 / 032612号及び／又は国際公開第2020 / 191252号に記載される通りである。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合又は中性ヌクレオチド間結合は、国際公開第2018 / 223056号、国際公開第2019 / 032607号、国際公開第2019 / 075357号、国際公開第2019 / 032607号、国際公開第2019 / 075357号、国際公開第2019 / 200185号、国際公開第2019 / 217784号、国際公開第2019 / 032612号及び／又は国際公開第2020 / 191252号に記載される通りの式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などの1つであり、それらの各々のそうしたヌクレオチド間結合は独立に参照によって本明細書に援用される。

【0288】

一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、オリゴヌクレオチドの送達及び／又は活性（例えば、標的遺伝子又はその遺伝子産物のレベル、活性及び／又は発現を低下させる能力、選択性など）を改善し得る。

【0289】

一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、 $-OP(=W)(-N=C(R')_2)-O-$ 又は $-OP(=W)(-N(R')_2)-O-$ の構造を有し、式中、Wは、O又はSであり；

各R'は、独立に、R'又は $-N(R_2)$ であり；

10

20

30

40

50

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た基であるか又は：

2つの R 基は、任意選択で、且つ独立に、一緒になって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、且つ独立に、その原子と一緒に、その原子以外に、 $0\sim 10$ 個のヘテロ原子を有する任意選択で置換された $3\sim 30$ 員の単環、二環若しくは多環を形成するか又は：

2個以上の原子上の2つ以上の R 基は、任意選択で、且つ独立に、それらの介在原子と一緒に、介在原子以外に、 $0\sim 10$ 個のヘテロ原子を有する任意選択で置換された $3\sim 30$ 員の単環、二環若しくは多環を形成する。

【0290】

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、 W は S である。

【0291】

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

【0292】

一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、 $-OP(=O)(-N=C(N(R'))_2)_2-O-$ の構造を有する。一部の実施形態において、一方の $N(R')_2$ の R' 基は R であり、他方の $N(R')_2$ の R' 基は R であり、及び2つの R 基はそれらの介在原子と一緒に任意選択で置換された環、例えば、 $n001$ におけるような5員環を形成する。一部の実施形態において、各 R' は、独立に、 R であり、ここで、各 R は、独立に、任意選択で置換された $C_{1\sim 6}$ 脂肪族である。

【0293】

一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、 $-OP(=W)(-N(R'))_2-O-$ の構造を有する。

【0294】

一部の実施形態において、 R' は R 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、 R' は $-C(O)R$ である。一部の実施形態において、 R' は $-C(O)OR$ である。一部の実施形態において、 R' は $-S(O)_2R$ である。

【0295】

一部の実施形態において、 R'' は $-NHR'$ である。一部の実施形態において、 $-N(R')_2$ は $-NHR'$ である。

【0296】

本明細書に記載される通り、一部の実施形態で、 R は H 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た $C_{1\sim 6}$ 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た $C_{1\sim 6}$ アルキルである。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、 R は、置換されたメチルである。一部の実施形態において、 R は、エチルである。一部の実施形態において、 R は、置換されたエチルである。

【0297】

一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、非負電荷ヌクレオチド間結合は、中性ヌクレオチド間結合である。

【0298】

一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は非負電荷ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は中性ヌクレオチド間結合である。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1つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は正電荷ヌ

10

20

30

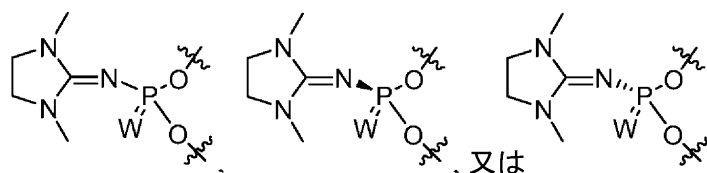
40

50

クレオチド間結合である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は中性ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合（例えば、非負電荷ヌクレオチド間結合）は、任意選択で置換されているトリアゾリルを含む。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合（例えば、非負電荷ヌクレオチド間結合）は、任意選択で置換されているアルキニルを含む。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合はトリアゾール又はアルキン部分を含む。一部の実施形態において、トリアゾール部分、例えばトリアゾリル基は任意選択で置換されている。一部の実施形態において、トリアゾール部分、例えばトリアゾリル基は置換されている。一部の実施形態において、トリアゾール部分は置換されていない。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、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、修飾ヌクレオチド間結合は、任意選択で置換されている環状グアニジン部分を含み、且つ

10

【化 6】



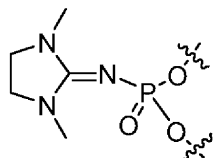
20

の構造を有し、式中、WはO又はS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、WはSである。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は立体化学的に制御されている。

【0299】

一部の実施形態において、ヌクレオチド間結合、例えば、非負電荷ヌクレオチド間結合、中性ヌクレオチド間結合は、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ヌクレオチド間結合は、

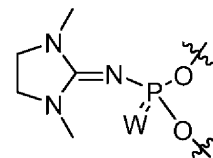
【化 7】



30

の構造を有する。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合又は中性ヌクレオチド間結合は、

【化 8】



40

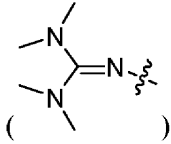
の構造であるか又はそれを含み、式中、Wは、O又はSである。

【0300】

一部の実施形態において、ヌクレオチド間結合は、T m g 基

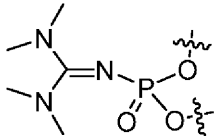
50

【化 9】



を含む。一部の実施形態において、ヌクレオチド間結合は、Tmg基を含み、且つ

【化 10】



の構造を有する（「Tmgヌクレオチド間結合」）。一部の実施形態において、中性ヌクレオチド間結合としては、PNA及びPMOのヌクレオチド間結合並びにTmgヌクレオチド間結合が挙げられる。

【0301】

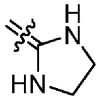
一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～10個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている3～20員環ヘテロシクリル又はヘテロアリール基を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～10個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている3～20員環ヘテロシクリル又はヘテロアリール基を含み、ここで、少なくとも1つのヘテロ原子は、窒素である。一部の実施形態において、かかるヘテロシクリル又はヘテロアリール基は5員環である。一部の実施形態において、かかるヘテロシクリル又はヘテロアリール基は6員環である。

【0302】

一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～10個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5～20員環ヘテロアリール基を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～10個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5～20員環ヘテロアリール基を含み、ここで、少なくとも1つのヘテロ原子は、窒素である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～4つのヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5～6員環ヘテロアリール基を含み、ここで、少なくとも1つのヘテロ原子は、窒素である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～4つのヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5員環ヘテロアリール基を含み、ここで、少なくとも1つのヘテロ原子は、窒素である。一部の実施形態において、ヘテロアリール基は結合リンに直接結合する。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～10個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5～20員環ヘテロシクリル基を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～10個のヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5～20員環ヘテロシクリル基を含み、ここで、少なくとも1つのヘテロ原子は、窒素である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～4つのヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5～6員環ヘテロシクリル基を含み、ここで、少なくとも1つのヘテロ原子は、窒素である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、1～4つのヘテロ原子を有する任意選択で置換されている5員環ヘテロシクリル基を含み、ここで、少なくとも1つのヘテロ原子は、窒素である。一部の実施形態において、ヘテロシクリル基は結合リンに直接結合する。一部の実施形態において、ヘテロシクリル基は結合リンにリンカーを介して、例えばその=N-で結合リンに直接結合したグアニジン部分の一部であるヘテロシクリル基の場合には=N-を介して結合する。一部の実施形態において、非負

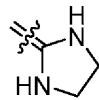
電荷ヌクレオチド間結合は、任意選択で置換されている

【化 1 1】



基を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、置換されている

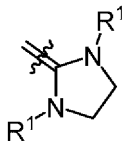
【化 1 2】



10

基を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、

【化 1 3】



20

基を含む。一部の実施形態において、各 R^1 は、独立に、任意選択で置換されている C_{1-6} アルキルである。一部の実施形態において、各 R^1 は、独立に、メチルである。

【0 3 0 3】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは異なる種類のヌクレオチド間リン結合を含む。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は少なくとも1つの天然リン酸結合と少なくとも1つの修飾（非天然）ヌクレオチド間結合とを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの天然リン酸結合と少なくとも1つのホスホロチオエートとを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの天然リン酸結合と少なくとも1つの非負電荷ヌクレオチド間結合とを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合と少なくとも1つの天然リン酸結合と少なくとも1つの非負電荷ヌクレオチド間結合とを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上、例えば1～50、1～40、1～30、1～20、1～15、1～10、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれを超える非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、水溶液中所与のpHにおいて負電荷塩形態で存在するヌクレオチド間結合が50%、40%、40%、30%、20%、10%、5%又は1%未満であることにおいて負電荷でない。一部の実施形態において、pHは約pH7.4である。一部の実施形態において、pHは約4～9である。一部の実施形態において、パーセンテージは10%未満である。一部の実施形態において、パーセンテージは5%未満である。一部の実施形態において、パーセンテージは1%未満である。一部の実施形態において、ヌクレオチド間結合は、中性形態のヌクレオチド間結合が水中で約1、2、3、4、5、6又は7以下のpKaでないことにおいて、非負電荷ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、7以下のpKaでない。一部の実施形態において、6以下のpKaでない。一部の実施形態において、5以下のpKaでない。一部の実施形態において、4以下のpKaでない。一部の実施形態において、3以下のpKaでない。一部の

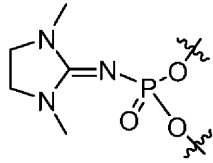
30

40

50

の実施形態において、2以下の pK_a でない。一部の実施形態において、1以下の pK_a でない。一部の実施形態において、中性形態のヌクレオチド間結合の pK_a は、 CH_3 -ヌクレオチド間結合- CH_3 の構造を有する中性形態の化合物の pK_a によって表すことができる。例えば、

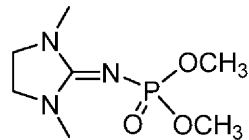
【化14】



10

の pK_a は、 pK_a

【化15】



によって表すことができる。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は中性ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は正電荷ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合はグアニジン部分を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合はヘテロアリアル塩基部分を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合はトリアゾール部分を含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合はアルキニル部分を含む。

20

【0304】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、異なるタイプのヌクレオチド間リン結合を含む。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は、少なくとも1つの天然リン酸結合と少なくとも1つの修飾（非天然）ヌクレオチド間結合とを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの天然リン酸結合と少なくとも1つのホスホロチオエートとを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの天然リン酸結合と少なくとも1つの非負電荷ヌクレオチド間結合とを含む。

30

【0305】

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、中性ヌクレオチド間結合が、天然リン酸結合（ PO ）よりも疎水性が高いホスホロチオエートヌクレオチド間結合（ PS ）よりも疎水性が高いことができることを指摘しておく。典型的には、 PS 又は PO と異なり、中性ヌクレオチド間結合は低い電荷を持つ。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、オリゴヌクレオチドに1つ以上の中性ヌクレオチド間結合を取り込むと、オリゴヌクレオチドが細胞によって取り込まれる能力及び／又はエンドソームから逃れる能力が増加し得ることを指摘しておく。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、1つ以上の中性ヌクレオチド間結合の取り込みを利用して、オリゴヌクレオチドとその標的核酸との間に形成される二本鎖の融解温度を調節し得ることを指摘しておく。

40

【0306】

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、オリゴヌクレオチドに1つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合、例えば中性ヌクレオチド間結合を取り込むと、オリゴヌクレオチドが遺伝子ノックダウンなどの機能を媒介する能力を

50

増加させることが可能であり得ることを指摘しておく。一部の実施形態において、核酸又はそれによってコードされる産物のレベルのノックダウンを媒介する能力を有するオリゴヌクレオチド、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチドは、1つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、標的遺伝子の発現のノックダウンを媒介する能力を有するオリゴヌクレオチドは、1つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合を含む。

【0307】

一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合、例えば、中性ヌクレオチド間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、非負電荷ヌクレオチド間結合はキラル制御されている。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合はキラル制御されており、その結合リンはR_pである。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合はキラル制御されており、その結合リンはS_pである。

【0308】

多くの実施形態において、詳細に実証される通り、本開示のオリゴヌクレオチドは、2つ以上の異なるヌクレオチド間結合を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合と非負電荷ヌクレオチド間結合とを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合と、非負電荷ヌクレオチド間結合と、天然リン酸結合とを含む。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、中性ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、n001である。一部の実施形態において、各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立に、キラル制御されている。一部の実施形態において、各キラル修飾されたヌクレオチド間結合は、独立に、キラル制御されている。

【0309】

一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合、例えば、中性ヌクレオチド間結合は、キラル制御されていない。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合は、キラル制御されている。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合はキラル制御されており、且つその結合リンはR_pである。一部の実施形態において、非負電荷ヌクレオチド間結合はキラル制御されており、且つその結合リンはS_pである。

【0310】

天然DNA及びRNAにおけるような典型的な連結は、ヌクレオチド間結合が2つの糖（これは本明細書に記載される通り非修飾又は修飾の何れかであり得る）との結合を形成することである。多くの実施形態において、本明細書に例示される通り、ヌクレオチド間結合は、その酸素原子又はヘテロ原子を介してその5'炭素の1つの任意選択で修飾されたりボース又はデオキシリボース及びその3'炭素の他の任意選択で修飾されたりボース又はデオキシリボースとの結合を形成する。一部の実施形態において、ヌクレオチド間結合によって連結される各ヌクレオシド単位は独立に核酸塩基を含み、これは、独立に、任意選択で置換されたA、T、C、G若しくはU又はA、T、C、G若しくはUの任意選択で置換された互変異性体である。

【0311】

当業者によって理解される通り、多くの他のタイプのヌクレオチド間結合を本開示に従って利用することができ、例えば、米国特許第3,687,808号；同第4,469,863号；同第4,476,301号；同第5,177,195号；同第5,023,243号；同第5,034,506号；同第5,166,315号；同第5,185,444号；同第5,188,897号；同第5,214,134号；同第5,216,141号；同第5,235,033号；同第5,264,423号；同第5,264,564号；同第5,276,019号；同第5,278,302号；同第5,286,717号；同第5,321,131号；同第5,399,676号；同第5,405,938号；同第5,405,939号；同第5,434,257号；同第5,453,496号；同第5,455,233号；同第5,466,677号；同第5,466,677号；同第5

、470、967号；同第5、476、925号；同第5、489、677号；同第5、519、126号；同第5、536、821号；同第5、541、307号；同第5、541、316号；同第5、550、111号；同第5、561、225号；同第5、563、253号；同第5、571、799号；同第5、587、361号；同第5、596、086号；同第5、602、240号；同第5、608、046号；同第5、610、289号；同第5、618、704号；同第5、623、070号；同第5、625、050号；同第5、633、360号；同第5、64、562号；同第5、663、312号；同第5、677、437号；同第5、677、439号；同第6、160、109号；同第6、239、265号；同第6、028、188号；同第6、124、445号；同第6、169、170号；同第6、172、209号；同第6、277、603号；同第6、326、199号；同第6、346、614号；同第6、444、423号；同第6、531、590号；同第6、534、639号；同第6、608、035号；同第6、683、167号；同第6、858、715号；同第6、867、294号；同第6、878、805号；同第7、015、315号；同第7、041、816号；同第7、273、933号；同第7、321、029号；又は同第RE39464号に記載されるものである。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、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、米国特許第9982257号、米国特許第10160969号、米国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020/0056173号、米国特許出願公開第2018/0216107号、米国特許出願公開第2019/0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公開第2019/0249173号、米国特許出願公開第2019/0375774号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第2018/223081号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/032607号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/075357号、国際公開第2019/200185号、国際公開第2019/217784号、国際公開第2019/032612号及び／又は国際公開第2020/191252号に記載されるものであり、それらの各々の核酸塩基、糖、ヌクレオチド間結合、キラル補助剤／試薬及びオリゴヌクレオチド合成の技術（試薬、条件、サイクルなど）は独立に参照によって本明細書に援用される。

10

20

30

【0312】

様々なタイプのヌクレオチド間結合を他の構造要素、例えば、糖と組み合わせて利用して所望のオリゴヌクレオチド特性及び／又は活性を達成することができる。例えば、本開示は、オリゴヌクレオチドの設計において、修飾ヌクレオチド間結合及び修飾糖を任意選択で天然リン酸結合及び天然糖と共に定型的に利用する。一部の実施形態において、本開示は、1つ以上の修飾糖を含む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、1つ以上の修飾糖と1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合とを含むオリゴヌクレオチドを提供し、その1つ以上は天然リン酸結合である。

【0313】

核酸塩基

様々な核酸塩基を本開示に従って、提供されるオリゴヌクレオチド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、核酸塩基は天然核酸塩基であり、最も一般的に出現するものはA、T、C、G及びUである。一部の実施形態において、核酸塩基は、AでもTでもCでもGでもUでもない修飾核酸塩基である。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たA、T、C、G若しくはU又はA、T、C、G若しくはUの置換された互変異性体である。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たA、T、C、G又はU、例えば、5mC、5-ヒドロキシメチルCなどである。一部の実施形態において、核酸塩基は、アルキル置換されたA、T、C、G又はUである。一部の実施形態において、核酸塩基はAである。一部の実施形態において、核酸塩基はTである。一部の実施形態において、核酸塩基はCである。一部の実施形態において、核酸塩

40

50

基はGである。一部の実施形態において、核酸塩基はUである。一部の実施形態において、核酸塩基は5mCである。一部の実施形態において、核酸塩基は、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、核酸塩基は、A、T、C、G又はUの置換された互変異性体である。一部の実施形態において、置換は、核酸塩基中の特定の官能基を保護してオリゴヌクレオチド合成の間の不所望な反応を最小化する。オリゴヌクレオチド合成における核酸塩基保護の好適な技術は当技術分野で広く公知であり、本開示に従って利用することができる。一部の実施形態において、修飾核酸塩基は、オリゴヌクレオチドの特性及び／又は活性を改善する。例えば、多くの場合、5mCをCの代わりに利用して特定の不所望な生物学的効果、例えば、免疫応答を調節することができる。一部の実施形態において、配列同一性を決定するとき、同じ水素結合パターンを有する置換核酸塩基は非置換核酸塩基と同じとして処理され、例えば、5mCはCと同じと処理することができる〔例えば、Cの代わりに5mCを有するオリゴヌクレオチド（例えば、A T 5mC G）は、（1つ以上の）対応する位置でCを有するオリゴヌクレオチド（例えば、A T C G）と同じ塩基配列を有すると見なされる〕。

10

20

30

40

50

【0314】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上のA、T、C、G又はU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つ以上の任意選択で置換されたA、T、C、G又はU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つ以上の5-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、5-ホルミルシトシン又は5-カルボキシシトシンを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の5-メチルシチジンを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の各核酸塩基は、任意選択で置換されたA、T、C、G及びU並びにA、T、C、G及びUの任意選択で置換された互変異性体からなる群から選択される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の各核酸塩基は、任意選択で保護されたA、T、C、G及びUである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の各核酸塩基は、任意選択で置換されたA、T、C、G又はUである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の各核酸塩基は、A、T、C、G、U及び5mCからなる群から選択される。一部の実施形態において、核酸塩基はヒポキサンチンである。

【0315】

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た2AP又はDAPである。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た2APである。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たDAPである。一部の実施形態において、核酸塩基は2APである。一部の実施形態において、核酸塩基はDAPである。

【0316】

一部の実施形態において、核酸塩基は、天然核酸塩基又は天然核酸塩基に由来する修飾核酸塩基である。例としては、アシル保護基によって保護されたそのそれぞれのアミノ基を任意選択で有するウラシル、チミン、アデニン、シトシン及びグアニン、2-フルオロウラシル、2-フルオロシトシン、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、2,6-ジアミノプリン、アザシトシン、プソイドイソシトシン及びプソイドウラシルなどのピリミジン類似体並びに他の修飾核酸塩基、例えば8-置換プリン、キサンチン又はヒポキサンチン（後者2つは天然分解産物である）が挙げられる。修飾核酸塩基の特定の例は、Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196及びRevankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313に開示されている。一部の実施形態において、修飾核酸塩基は、置換ウラシル、チミン、アデニン、シトシン又はグアニンである。一部の実施形態において、修飾核酸塩基は、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン又はグアニンの、例えば水素結合及び／又は塩基対合において機能の置き換えである。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ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、5-メチルシトシン又はグアニンである。一部の実施形態において、核酸塩基は、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、5-メチルシトシン又はグアニンである。

【0317】

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、1つ以上の5-メチルシトシンを含む。一部の実施形態において、本開示は、塩基配列が本明細書に、例えば、表A1に開示されるオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、各Tは、独立に、Uで置き換えることができ、その逆も可能である。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において、1つ以上のCは、独立に、5mCに修飾される。当業者によって理解される通り、一部の実施形態において、5mCは、オリゴヌクレオチドの塩基配列に関してCとして処理することができ、そうしたオリゴヌクレオチドは、C位で核酸塩基修飾を含む（例えば、表A1の様々なオリゴヌクレオチドを参照のこと）。

【0318】

一部の実施形態において、核酸塩基は、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、米国特許第9982257号、米国特許第10160969号、米国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020/0056173号、米国特許出願公開第2018/0216107号、米国特許出願公開第2019/0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公開第2019/0249173号、米国特許出願公開第2019/0375774号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第2018/223081号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/032607号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/075357号、国際公開第2019/200185号、国際公開第2019/217784号、国際公開第2019/032612号及び／又は国際公開第2020/191252号に記載されるものであり、それらの各々の核酸塩基は参照によって本明細書に援用される。

【0319】

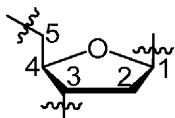
糖

修飾糖を含め、様々な糖を本開示に従って利用することができる。一部の実施形態において、本開示は、糖修飾及びそのパターンを、任意選択で、オリゴヌクレオチド中に取り込まれたときに改善された特性及び／又は活性を提供し得る他の構造要素（例えば、ヌクレオチド間結合修飾及びそのパターン、その骨格キラル中心のパターンなど）と組み合わせて提供する。

【0320】

最も一般的な天然に存在するヌクレオシドは、核酸塩基アデノシン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）及びチミン（T）又はウラシル（U）につながったリボース糖（例えば、RNA中）又はデオキシリボース糖（例えば、DNA中）を含む。一部の実施形態において、糖、例えば、表A1の多くのオリゴヌクレオチド中の様々な糖（特に注記のない限り）は、

【化16】



の構造を有する天然DNA糖（DNA核酸又はオリゴヌクレオチド中であり、ここで、核酸塩基は1'位に結合しており、且つ3'及び5'位はヌクレオチド間結合に連結している（当業者によって理解される通り、オリゴヌクレオチドの5'末端の場合、5'位は5'末端基（例えば、-OH）に連結され得、オリゴヌクレオチドの3'末端の場合、3'位は3'末端基（例えば、-OH）に連結され得る。一部の実施形態において、糖は、

10

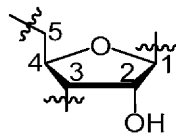
20

30

40

50

【化 1 7】



の構造を有する天然 RNA 糖（RNA 核酸又はオリゴヌクレオチド中であり、ここで、核酸塩基は 1' 位に結合しており、且つ 3' 及び 5' 位はヌクレオチド間結合に連結している（当業者によって理解される通り、オリゴヌクレオチドの 5' 末端の場合、5' 位は 5' 末端基（例えば、 $-OH$ ）に連結され得、オリゴヌクレオチドの 3' 末端の場合、3' 位は 3' 末端基（例えば、 $-OH$ ）に連結され得る。一部の実施形態において、糖は、天然 DNA 糖でも天然 RNA 糖でもない修飾糖である。とりわけ、修飾糖は、改善された安定性を提供し得る。一部の実施形態において、修飾糖を利用して 1 つ以上のハイブリダイゼーション特徴を変更及び／又は最適化することができる。一部の実施形態において、修飾糖を利用して標的認識を変更及び／又は最適化することができる。一部の実施形態において、修飾糖を利用してオリゴヌクレオチド活性を改善することができる。

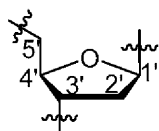
【0 3 2 1】

糖は、ヌクレオチド間結合に様々な位置で結合させることができる。非限定的な例として、ヌクレオチド間結合は糖の 2'、3'、4' 又は 5' 位に結合させることができる。一部の実施形態において、最も一般的には天然核酸中のように、ヌクレオチド間結合は、別に記載のない限り 5' 位のある糖及び 3' 位の別の糖と連結する。

【0 3 2 2】

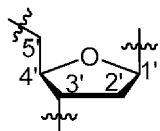
一部の実施形態において、糖は、任意選択で置換された天然 DNA 又は RNA 糖である。一部の実施形態において、糖は、任意選択で置換された

【化 1 8】



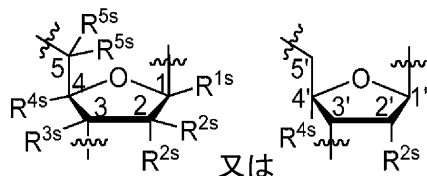
である。一部の実施形態において、2' 位は任意選択で置換されている。一部の実施形態において、糖は、

【化 1 9】



である。一部の実施形態において、糖は、

【化 2 0】



又は

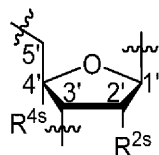
の構造を有し、式中、 R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 及び R^{5s} の各々は、独立に、 $-H$ 、好適な置換基又は好適な糖修飾（例えば、米国特許第 9 3 9 4 3 3 3 号、米国特許第 9 7 4 4 1 8 3 号、米国特許第 9 6 0 5 0 1 9 号、米国特許第 9 9 8 2 2 5 7 号、米国特許

出願公開第20170037399号、米国特許出願公開第20180216108号、米国特許出願公開第20180216107号、米国特許第9598458号、国際公開第2017/062862号、国際公開第2018/067973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2018/098264号、国際公開第2018/022473号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第2018/223081号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/032607号、国際公開第2019/032612号、国際公開第2019/055951号及び／又は国際公開第2019/075357号に記載されるもの、それらの各々の置換基、糖修飾、 R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 及び R^{5s} の説明並びに修飾糖は独立に参照によって本明細書に援用される)である。一部の実施形態において、 R^{1s} 、 R^{2s} 、 R^{3s} 、 R^{4s} 、及び R^{5s} の各々は、独立に、 R^s であり、ここで、各 R^s は、独立に、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-L^s$ 、 $-R'$ 、 $-L^s-OR'$ 、 $-L^s-SR'$ 、 $-L^s-N(R')_2$ 、 $-O-L^s-OR'$ 、 $-O-L^s-SR'$ 又は $-O-L^s-N(R')_2$ であり、各 R' は、独立に、本明細書に記載される通りであり、及び各 L^s は、独立に、共有結合又は任意選択で置換された二価 $C_1 \sim 6$ 脂肪族若しくは1～4個のヘテロ原子を有するヘテロ脂肪族であるか；又は2つの R^s は、一緒になって架橋 $-L^s-$ を形成する。一部の実施形態において、 R' は、任意選択で置換された $C_1 \sim 10$ 脂肪族である。一部の実施形態において、糖は、

【化21】

10

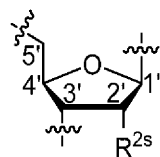
20



の構造を有する。一部の実施形態において、 R^{4s} は、 $-H$ である。一部の実施形態において、糖は、

【化22】

30



の構造を有し、式中、 R^{2s} は、 $-H$ 、ハロゲン又は $-OR$ であり、ここで、 R は、任意選択で置換された $C_1 \sim 6$ 脂肪族である。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、 $-F$ 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、修飾ヌクレオシドは、 mA 、 mT 、 mC 、 $m5mC$ 、 mG 、 mU などであり、ここで、 R^{2s} は、 $-OMe$ である。一部の実施形態において、 R^{2s} は、 $-OCH_2CH_2OMe$ である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオシドは、 Aeo 、 Teo 、 Ceo 、 $m5Ceo$ 、 Geo 、 Ueo などであり、ここで、 R^{2s} は、 $-OCH_2CH_2OMe$ である。

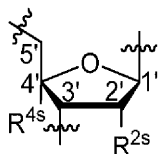
40

【0323】

一部の実施形態において、糖は、

50

【化 2 3】



の構造を有し、式中、 R^{2s} 及び R^{4s} は、一緒になって $-L^s-$ を形成し、ここで、 L^s は、共有結合又は任意選択で置換された二価 $C_1 \sim 6$ 脂肪族若しくは $1 \sim 4$ 個のヘテロ原子を有するヘテロ脂肪族である。一部の実施形態において、各ヘテロ原子は、独立に、窒素、酸素又は硫黄から選択される。一部の実施形態において、 L^s は、任意選択で置換された $C_2-O-CH_2-C_4$ である。一部の実施形態において、 L^s は、 $C_2-O-CH_2-CH_3$ である。一部の実施形態において、 L^s は、 $C_2-O-(R)-CH(CH_2CH_3)-C_4$ である。一部の実施形態において、 L^s は、 $C_2-O-(S)-CH(CH_2CH_3)-C_4$ である。

10

【0324】

一部の実施形態において、糖は、二環式糖、例えば、本開示に記載される通り R^{2s} 及び R^{4s} が一緒になって結合を形成する糖である。一部の実施形態において、糖は、LNA 糖、BNA 糖、cEt 糖などから選択される。一部の実施形態において、架橋は $2'$ 及び $4'$ 炭素原子間にある（本開示に記載される通りその介在原子と一緒に任意選択で置換された環を形成する R^{2s} 及び R^{4s} に対応）。一部の実施形態において、二環式糖の例としては、アルファ-L-メチレンオキシ ($4'-CH_2-O-2'$) LNA、ベータ-D-メチレンオキシ ($4'-CH_2-O-2'$) LNA、エチレンオキシ ($4'-(CH_2)_2-O-2'$) LNA、アミノオキシ ($4'-CH_2-O-N(R)-2'$) LNA 及びオキシアミノ ($4'-CH_2-N(R)-O-2'$) LNA が挙げられる。一部の実施形態において、二環式糖、例えば、LNA 又は BNA 糖は、2つの糖炭素間の少なくとも1つの架橋を有する糖である。一部の実施形態において、ヌクレオシド中の二環式糖は、アルファ-L-リボフラノース又はベータ-D-リボフラノースの立体化学配置を有し得る。一部の実施形態において、糖は、国際公開第 1999014226 号に記載される糖である。一部の実施形態において、 $4'-2'$ 二環式糖又は $4'$ から $2'$ 二環式糖は、糖環の $2'$ 炭素原子及び $4'$ 炭素原子を連結する架橋を含むフラノース環を含む二環式糖である。一部の実施形態において、二環式糖、例えば、LNA 又は BNA 糖は、2つのペントフラノシル糖炭素間の少なくとも1つの架橋を含む。一部の実施形態において、LNA 又は BNA 糖は、 $4'$ 及び $2'$ ペントフラノシル糖炭素間の少なくとも1つの架橋を含む。

20

30

【0325】

一部の実施形態において、二環式糖は、アルファ-L-メチレンオキシ ($4'-CH_2-O-2'$) BNA、ベータ-D-メチレンオキシ ($4'-CH_2-O-2'$) BNA、エチレンオキシ ($4'-(CH_2)_2-O-2'$) BNA、アミノオキシ ($4'-CH_2-O-N(R)-2'$) BNA、オキシアミノ ($4'-CH_2-N(R)-O-2'$) BNA、メチル (メチレンオキシ) ($4'-CH(CH_3)-O-2'$) BNA (拘束エチル又は cEt と称される)、メチレン-チオ ($4'-CH_2-S-2'$) BNA、メチレン-アミノ ($4'-CH_2-N(R)-2'$) BNA、メチル炭素環式 ($4'-CH-CH(CH_3)-2'$) BNA、プロピレン炭素環式 ($4'-(CH_2)_3-2'$) BNA 又はビニル BNA の糖である。

40

【0326】

一部の実施形態において、糖修飾は、 $2'-OMe$ 、 $2'-MOE$ 、 $2'-LNA$ 、 $2'-F$ 、 $5'$ -ビニル又は $S-cEt$ である。一部の実施形態において、修飾糖は、FRNA、FANA 又はモルホリノの糖である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、核酸類似体、例えば、GNA、LNA、PNA、TNA、F-HNA (F-THP 又は $3'$ -フルオロテトラヒドロピラン)、MNA (マンニトール核酸、例えば、Leumann

50

2002 Bioorg. Med. Chem. 10:841-854)、ANA (アニトール核酸) 又はモルホリノ又はその一部分を含む。一部の実施形態において、糖修飾は、天然糖を別の環状又は非環状部分で置き換える。こうした部分の例は当技術分野で広く公知であり、例えば、モルホリノ、グリコール核酸中で使用されるものなどであり、本開示に従って利用することができる。当業者によって理解される通り、修飾糖と利用するとき、一部の実施形態において、ヌクレオチド間結合は、例えば、モルホリノ、PNAなどにおけるように修飾することができる。

【0327】

一部の実施形態において、糖は、6位で(R)又は(S)キラリティーの何れかを有する6'-修飾二環式糖、例えば、米国特許第7399845号に記載されるものである。一部の実施形態において、糖は、5位で(R)又は(S)キラリティーの何れかを有する5'-修飾二環式糖、例えば、米国特許出願公開第20070287831号に記載されるものである。

【0328】

一部の実施形態において、修飾糖は、-F; -CF₃、-CN、-N₃、-NO、-NO₂、-OR'、-SR' 又は -N(R'₂から独立に選択される2'位の1つ以上の置換基(典型的には、1つの置換基で、且つアキシアル位置であることが多い)を含有し、ここで、各R'は、独立に、任意選択で置換されたC₁~C₁₀脂肪族; -O-(C₁~C₁₀アルキル)、-S-(C₁~C₁₀アルキル)、-NH-(C₁~C₁₀アルキル) 又は -N(C₁~C₁₀アルキル)₂; -O-(C₂~C₁₀アルケニル)、-S-(C₂~C₁₀アルケニル)、-NH-(C₂~C₁₀アルケニル) 又は -N(C₂~C₁₀アルケニル)₂; -O-(C₂~C₁₀アルキニル)、-S-(C₂~C₁₀アルキニル)、-NH-(C₂~C₁₀アルキニル) 又は -N(C₂~C₁₀アルキニル)₂; 又は -O-O-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-O-(C₁~C₁₀アルキル)、-O-(C₁~C₁₀アルキレン)-NH-(C₁~C₁₀アルキル) 又は -O-(C₁~C₁₀アルキレン)-NH(C₁~C₁₀アルキル)₂、-NH-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-(C₁~C₁₀アルキル) 又は -N(C₁~C₁₀アルキル)-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-(C₁~C₁₀アルキル) であり、アルキル、アルキレン、アルケニル及びアルキニルの各々は、独立に、且つ任意選択で置換されている。一部の実施形態において、置換基は、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、MOE、DMAOE 又は DMAEOE であり、ここで、nは、1~約10である。一部の実施形態において、修飾糖は、国際公開第2001/088198号; 及びMartin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504に記載されるものである。一部の実施形態において、修飾糖は、置換シリル基、RNA切断基、レポーター基、蛍光標識、インターカレーター、核酸の薬物動態特性を改善するための基、核酸の薬力学特性を改善するための基又は同様の特性を有する他の置換基から選択される1つ以上の基を含む。一部の実施形態において、修飾は、3'-末端ヌクレオシド上の糖の3'位又は5'-末端ヌクレオシドの5'位を含め、糖又は修飾糖の2'、3'、4'、又は5'位の1つ以上に作られる。

【0329】

一部の実施形態において、修飾糖は、2'-OHが-F; -CF₃、-CN、-N₃、-NO、-NO₂、-OR'、-SR' 又は -N(R'₂から選択される基(例えば、R'²_s)で置き換えられるリボースであり、ここで、各R'は、独立に、本開示に記載される通り; -O-(C₁~C₁₀アルキル)、-S-(C₁~C₁₀アルキル)、-NH-(C₁~C₁₀アルキル) 又は -N(C₁~C₁₀アルキル)₂; -O-(C₂~C₁₀アルケニル)、-S-(C₂~C₁₀アルケニル)、-NH-(C₂~C₁₀アルケニル) 又は -N(C₂~C₁₀アルケニル)₂; -O-(C₂~C₁₀アルキニル)、-S-(C₂~C₁₀アルキニル)、-NH-(C₂~C₁₀アルキニル) 又は -N(C₂~C₁₀アルキニル)₂; 又は -O-O-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-O-(C₁~C₁₀アルキル)、-O-(C₁~C₁₀アルキレン)-NH-(C₁~C₁₀アルキル) 又は -O-(C₁~C₁₀アルキレン)-NH(C₁~C₁₀アルキル)₂、-NH-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-(C₁~C₁₀アルキル) 又は -N(C₁~C₁₀アルキレン)-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-(C₁~C₁₀アルキル) であり、アルキル、アルキレン、アルケニル及びアルキニルの各々は、独立に、且つ任意選択で置換されている。一部の実施形態において、置換基は、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、MOE、DMAOE 又は DMAEOE であり、ここで、nは、1~約10である。一部の実施形態において、修飾糖は、国際公開第2001/088198号; 及びMartin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504に記載されるものである。一部の実施形態において、修飾糖は、置換シリル基、RNA切断基、レポーター基、蛍光標識、インターカレーター、核酸の薬物動態特性を改善するための基、核酸の薬力学特性を改善するための基又は同様の特性を有する他の置換基から選択される1つ以上の基を含む。一部の実施形態において、修飾は、3'-末端ヌクレオシド上の糖の3'位又は5'-末端ヌクレオシドの5'位を含め、糖又は修飾糖の2'、3'、4'、又は5'位の1つ以上に作られる。

ルキレン) - O - (C₁ ~ C₁₀ アルキル) 又は - N (C₁ ~ C₁₀ アルキル) - (C₁ ~ C₁₀ アルキレン) - O - (C₁ ~ C₁₀ アルキル) であり、ここで、アルキル、アルキレン、アルケニル及びアルキニルの各々は、独立に、且つ任意選択で置換されている。一部の実施形態において、2' - OH は、- H で置き換えられる (デオキシリボース)。一部の実施形態において、2' - OH は、- F で置き換えられる。一部の実施形態において、2' - OH は、- OR' で置き換えられる。一部の実施形態において、2' - OH は、- OMe で置き換えられる。一部の実施形態において、2' - OH は、- OCH₂CH₂OMe で置き換えられる。

【0330】

一部の実施形態において、糖修飾は、2' - 修飾である。一般的に使用される 2' - 修飾 10 としては、限定はされないが、2' - OR が挙げられ、ここで、R は、任意選択で置換された C₁ ~ 6 脂肪族である。一部の実施形態において、修飾は、2' - OR であり、ここで、R は、任意選択で置換された C₁ ~ 6 アルキルである。一部の実施形態において、修飾は、2' - OMe である。一部の実施形態において、修飾は、2' - MOE である。一部の実施形態において、2' - 修飾は、S - c E t である。一部の実施形態において、修飾糖は、LNA 糖である。一部の実施形態において、2' - 修飾は、- F である。一部の実施形態において、2' - 修飾は、FANA である。一部の実施形態において、2' - 修飾は、FRNA である。一部の実施形態において、糖修飾は、5' - 修飾、例えば、5' - Me である。一部の実施形態において、糖修飾は、糖環のサイズを変化させる。一部の実施形態において、糖修飾は、FHNA の糖部分である。 20

【0331】

一部の実施形態において、糖修飾は、糖部分を別の環状又は非環状部分で置き換える。こうした部分の例は当技術分野で広く公知であり、限定はされないが、モルホリノ (任意選択で、そのホスホロジアミデート結合を有する)、グリコール核酸などにおいて使用されるものが挙げられる。

【0332】

一部の実施形態において、C9orf72 オリゴヌクレオチドの糖の 1 つ以上は、修飾されている。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの各糖は、独立に修飾されている。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、各修飾糖は、独立に、2' - 修飾を含む。一部の実施形態において、2' - 修飾は、2' - 30 - OR であり、式中、R は、任意選択で置換された C₁ ~ 6 脂肪族である。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、2' - 修飾は、LNA 糖修飾である。一部の実施形態において、2' - 修飾は、2' - F である。一部の実施形態において、各糖修飾は、独立に、2' - 修飾である。一部の実施形態において、各糖修飾は、独立に、2' - OR である。一部の実施形態において、各糖修飾は、独立に、2' - OR であり、式中、R は、任意選択で置換された C₁ ~ 6 アルキルである。一部の実施形態において、各糖修飾は、2' - OMe である。一部の実施形態において、各糖修飾は、2' - MOE である。一部の実施形態において、各糖修飾は、独立に、2' - OMe 又は 2' - MOE である。一部の実施形態において、各糖修飾は、独立に、2' - OMe、2' - MOE 又は LNA 糖で 40 である。

【0333】

一部の実施形態において、修飾糖は、任意選択で置換された ENA 糖である。一部の実施形態において、糖は、例えば、Seth et al., J Am Chem Soc. 2010 October 27; 132(42):14942-14950 に記載されるものである。一部の実施形態において、修飾糖は、XNA (ゼノ核酸) 中の糖、例えば、アラビノース、アンヒドロヘキシトール、トレオース、2' フルオロアラビノース又はシクロヘキセンである。

【0334】

修飾糖としては、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル又はシクロペンチル部分が挙げられる。こうした修飾糖の代表例としては、米国特許第 4, 981, 957 号、米 50

国特許第 5, 118, 800 号、米国特許第 5, 319, 080 号又は米国特許第 5, 359, 044 号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、リボース環内の酸素原子は、窒素、硫黄、セレン又は炭素によって置き換えられる。一部の実施形態において、 $-O-$ は、 $-N(R')$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 又は $-C(R')_2$ で置き換えられる。一部の実施形態において、修飾糖は、修飾リボースであり、ここで、リボース環内の酸素原子は、窒素で置き換えられ、この窒素は、任意選択でアルキル基（例えば、メチル、エチル、イソプロピルなど）で置換される。

【0335】

一部の実施形態において、糖は、ヌクレオチド間結合、一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合によって連結される。一部の実施形態において、ヌクレオチド間結合は、結合リンを含有しない。一部の実施形態において、ヌクレオチド間結合は、 $-L-$ である。一部の実施形態において、ヌクレオチド間結合は、 $-OP(O)(-C\equiv CH)O-$ 、 $-OP(O)(R)O-$ （例えば、 R は、 $-CH_3$ である）、 $3'-NHP(O)(OH)O-5'$ 、 $3'-OP(O)(CH)OCH_2-5'$ 、 $3'-C(H)C(O)NHCH_2-5'$ 、 $3'-SC(H)OCH_2-5'$ 、 $3'-OC(H)OCH_2-5'$ 、 $3'-C(H)NR'CH_2-5'$ 、 $3'-C(H)N(Me)OCH_2-5'$ 、 $3'-NHC(O)C(H)CH_2-5'$ 、 $3'-NR'C(O)C(H)CH_2-5'$ 、 $3'-C(H)CH_2NR'-5'$ 、 $3'-C(H)CH_2NH-5'$ 又は $3'-OC(H)CH_2N(R')-5'$ である。一部の実施形態において、 $5'$ 炭素は、任意選択で $=O$ で置換することができる。

【0336】

一部の実施形態において、修飾糖は、任意選択で置換されたペントース又はヘキソースである。一部の実施形態において、修飾糖は、任意選択で置換されたペントースである。一部の実施形態において、修飾糖は、任意選択で置換されたヘキソースである。一部の実施形態において、修飾糖は、任意選択で置換されたリボース又はヘキシトールである。一部の実施形態において、修飾糖は、任意選択で置換されたリボースである。一部の実施形態において、修飾糖は、任意選択で置換されたヘキシトールである。

【0337】

一部の実施形態において、糖修飾は、 $5'$ -ビニル (R 又は S)、 $5'$ -メチル (R 又は S)、 $2'-SH$ 、 $2'-F$ 、 $2'-OCH_2-2'-OCH_2CH_3$ 、 $2'-OCH_2CH_2F$ 又は $2'-O(CH_2)_2OCH_3$ である。一部の実施形態において、 $2'$ 位の置換基、例えば、 $2'$ -修飾は、アリル、アミノ、アジド、チオ、 O -アリル、 $O-C_1\sim C_{10}$ アルキル、 OCF_3 、 OCH_2F 、 $O(CH_2)_2SCH_3$ 、 $O(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ 、 $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ 及び $O-CH_2-C(=O)-N(R_1)-(CH_2)_2-N(R_m)(R_n)$ であり、ここで、各アリル、アミノ及びアルキルは、任意選択で置換されており、並びに R_1 、 R_m 及び R_n の各々は、独立に、本開示に記載される通りの R' である。一部の実施形態において、 R_1 、 R_m 及び R_n の各々は、独立に、 $-H$ 又は任意選択で置換された $C_1\sim C_{10}$ アルキルである。

【0338】

一部の実施形態において、糖は、テトラヒドロピラン又はTHP糖である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオシドは、典型的な天然ヌクレオシド中のペントフラノシル残基を置換する6員テトラヒドロピラン糖を有するヌクレオシドであるテトラヒドロピランヌクレオシド又はTHPヌクレオシドである。THP糖及び／又はヌクレオシドとしては、ヘキシトール核酸(HNA)、アニトール核酸(ANA)、マンニトール核酸(MNA)（例えば、Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854）又はフルオロHNA(F-HNA)中で使用されるものが挙げられる。

【0339】

一部の実施形態において、糖は、6個以上の原子及び／又は2個以上のヘテロ原子を有する環、例えば、モルホリノ糖を含む。

【0340】

当業者が理解する通り、糖、核酸塩基、ヌクレオチド間結合などの修飾は、オリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドと組み合わせて利用されることが多い、例えば、表 A 1 の様々なオリゴヌクレオチドを参照されたい。例えば、糖修飾及び核酸塩基修飾の組み合わせは、2'-F (糖) 5-メチル (核酸塩基) 修飾ヌクレオシドである。一部の実施形態において、組み合わせは、S でのリボシル環酸素原子の置き換え及び 2' 位の置換である。

【0341】

一部の実施形態において、2'-修飾糖は、2' 位で修飾されたフラノシル糖である。一部の実施形態において、2'-修飾は、ハロゲン、-R' (ここで、R' は、-H でない)、-OR' (ここで、R' は、-H でない)、-SR'、-N(R₂') 任意選択で置換された -CH₂-CH=CH₂、任意選択で置換されたアルケニル又は任意選択で置換されたアルキニルである。一部の実施形態において、2'-修飾は、-O[(CH₂)_nO]_m CH₃、-O(CH₂)_nNH₂、-O(CH₂)_nCH₃、-O(CH₂)_nF、-O(CH₂)_nONH₂、-OCH₂C(=O)N(H)CH₃ 及び -O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂ から選択され、式中、各 n 及び m は、独立に、1~約 10 である。一部の実施形態において、2'-修飾は、任意選択で置換された C₁~C₁₂ アルキル、任意選択で置換されたアルケニル、任意選択で置換されたアルキニル、任意選択で置換されたアルカリール、任意選択で置換されたアラルキル、任意選択で置換された -O-アルカリール、任意選択で置換された -O-アラルキル、-SH、-SCH₃、-OCN、-Cl、-Br、-CN、-F、-CF₃、-OCF₃、-SOCH₃、-SO₂CH₃、-ONO₂、-NO₂、-N₃、-NH₂、任意選択で置換されたヘテロシクロアルキル、任意選択で置換されたヘテロシクロアルカリール、任意選択で置換されたアミノアルキルアミノ、任意選択で置換されたポリアルキルアミノ、置換シリル、レポーター基、インターカレーター、薬物動態を改善するための基、薬力学特性を改善するための基及び他の置換基である。一部の実施形態において、2'-修飾は、2'-MOE 修飾である。

【0342】

一部の実施形態において、2'-修飾又は 2'-置換糖又はヌクレオシドは、-H (典型的には置換基と見なされない) 又は -OH 以外の糖の 2' 位の置換基を含む糖又はヌクレオシドである。一部の実施形態において、2'-修飾糖は、一方が 2' 炭素である糖環の 2 個の炭素原子を連結する架橋を含む二環式糖である。一部の実施形態において、2'-修飾は、非架橋、例えば、アリル、アミノ、アジド、チオ、任意選択で置換された -O-アリル、任意選択で置換された -O-C₁~C₁₀ アルキル、-OCF₃、-O(CH₂)₂OCH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、-O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n) 又は -OCH₂C(=O)N(R_m)(R_n) であり、ここで、各 R_m 及び R_n は、独立に、-H 又は任意選択で置換された C₁~C₁₀ アルキルである。

【0343】

一部の実施形態において、糖は、N-メタノカルバ、LNA、cMOE BNA、cEt BNA、α-L-LNA 又は関連類似体、HNA、Me-ANA、MOE-ANA、Ara-FHNA、FHNA、R-6'-Me-FHNA、S-6'-Me-FHNA、ENA 又は c-ANA の糖である。一部の実施形態において、修飾ヌクレオチド間結合は、C3-アミド (例えば、C3' に結合しているアミド修飾を有する糖、Mutisya et al. 2014 Nucleic Acids Res. 2014 Jun 1; 42(10):6542-6551)、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、MMI [例えば、メチレン (メチルイミノ)、Peoc'h et al. 2006 Nucleosides and Nucleotides 16(7-9)]、PMO (ホスホロジアミデート結合モルホリノ) 結合 (これは 2 つの糖を連結する) 又は PNA (ペプチド核酸) 結合である。

【0344】

一部の実施形態において、糖は、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、米国特許第 9982257 号、米国特許第 10160969 号、米国特許第 10479995 号、米国特許出願公開第 2020/0056173 号、米国特許出願公開第 2018/0216107 号、米国特許出願公開第 2019/0127733 号、米国特許第 10450568 号、

米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公開第2019/0249173号、米国特許出願公開第2019/0375774号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第2018/223081号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/032607号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/075357号、国際公開第2019/200185号、国際公開第2019/217784号、国際公開第2019/032612号及び／又は国際公開第2020/191252号に記載されるものであり、それらの各々の糖は参照によって本明細書において援用される。

【0345】

オリゴヌクレオチド又はその類似体の調製に有用な様々な追加の糖は当技術分野で公知であり、本開示に従って利用することができる。

10

【0346】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるか又は当技術分野で公知の任意の糖を含み得る。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるか又は当技術分野で公知の任意の糖を、本明細書に記載される任意の他の構造要素又は修飾、限定はされないが、塩基配列又はその一部分、塩基；ヌクレオチド間結合；立体化学又はそのパターン；限定はされないが、ターゲティング部分などを含めた追加の化学的部分；糖、塩基又はヌクレオチド間結合の修飾のパターン；フォーマット又はその任意の構造要素及び／又は本明細書に記載される任意の他の構造要素又は修飾と組み合わせて含み得；及び一部の実施形態において、本開示は、任意のそうしたオリゴヌクレオチドのマルチマーに関する。

20

【0347】

オリゴヌクレオチド及び組成物の産生

様々な方法をオリゴヌクレオチド及び組成物の産生に利用することができ、本開示に従って利用することができる。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、米国特許第9982257号、米国特許第10160969号、米国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020/0056173号、米国特許出願公開第2018/0216107号、米国特許出願公開第2019/0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公開第2019/0249173号、米国特許出願公開第2019/0375774号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第2018/223081号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/032607号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/075357号、国際公開第2019/200185号、国際公開第2019/217784号、国際公開第2019/032612号及び／又は国際公開第2020/191252号に記載される通り、例えば、慣習的なホスホロアミダイト化学（例えば、ホスホロアミダイトは $-CH_2CH_2CH_2$ 及び $-N(i-Pr)_2$ を含む）を利用してステレオランダムオリゴヌクレオチド及び組成物を調製することができ、特定の試薬及びキラル制御技術を利用してキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を調製することができ、それらの各々の試薬及び方法は参照によって本明細書に援用される。

30

40

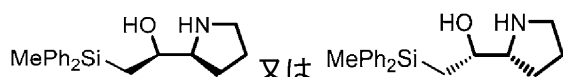
【0348】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド及びその組成物のキラル制御／立体選択調製は、例えば、モノマーホスホロアミダイトの一部としてキラル補助剤の利用を含む。こうしたキラル補助試薬及びホスホロアミダイトの例は、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、米国特許第9982257号、米国特許第10160969号、米国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020/0056173号、米国特許出願公開第2018/0216107号、米国特許出願公開第2019/0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公

50

開第 2019/0249173 号、米国特許出願公開第 2019/0375774 号、国際公開第 2018/223056 号、国際公開第 2018/223073 号、国際公開第 2018/223081 号、国際公開第 2018/237194 号、国際公開第 2019/032607 号、国際公開第 2019/055951 号、国際公開第 2019/075357 号、国際公開第 2019/200185 号、国際公開第 2019/217784 号、国際公開第 2019/032612 号及び／又は国際公開第 2020/191252 号に記載されており、それらの各々のキラル補助試薬及びホスホロアミダイトは独立に参照によって本明細書に援用される。一部の実施形態において、キラル補助剤は、

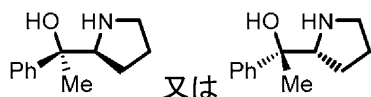
【化 24】



10

(DPSEキラル補助剤)である。一部の実施形態において、キラル補助剤は、

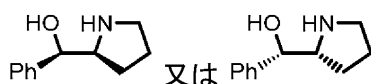
【化 25】



20

である。一部の実施形態において、キラル補助剤は、

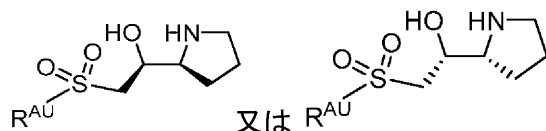
【化 26】



30

である。一部の実施形態において、キラル補助剤は、 $-SO_2R^{AU}$ を含み、式中、 R^{AU} は、 $C_1\sim 20$ 脂肪族、 $1\sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $C_1\sim 20$ ヘテロ脂肪族、 $C_6\sim 20$ アリール、 $C_6\sim 20$ アリール脂肪族、 $1\sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $C_6\sim 20$ アリールヘテロ脂肪族、 $1\sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $5\sim 20$ 員ヘテロアリール及び $1\sim 10$ 個のヘテロ原子を有する $3\sim 20$ 員ヘテロシクリルから選択される任意選択で置換された基である。一部の実施形態において、キラル補助剤は、

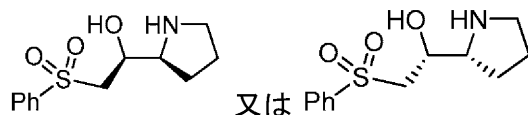
【化 27】



40

である。一部の実施形態において、 R^{AU} は、任意選択で置換されたアリールである。一部の実施形態において、 R^{AU} は、任意選択で置換されたフェニルである。一部の実施形態において、 R^{AU} は、任意選択で置換された $C_1\sim 6$ 脂肪族である。一部の実施形態において、キラル補助剤は、

【化 28】



50

(PSMキラル補助剤)である。一部の実施形態において、こうしたキラル補助剤の利用、例えば、調製、こうしたキラル補助剤を含むホスホロアミダイト、こうした補助剤を含む中間体オリゴヌクレオチド、保護、除去などは、米国特許第 9394333 号、米国特

許第 9 7 4 4 1 8 3 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、米国特許第 9 9 8 2 2 5 7 号、米国特許第 1 0 1 6 0 9 6 9 号、米国特許第 1 0 4 7 9 9 9 5 号、米国特許出願公開第 2 0 2 0 / 0 0 5 6 1 7 3 号、米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 2 1 6 1 0 7 号、米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 1 2 7 7 3 3 号、米国特許第 1 0 4 5 0 5 6 8 号、米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 0 7 7 8 1 7 号、米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 2 4 9 1 7 3 号、米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 3 7 5 7 7 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 2 3 0 7 3 号、国際公開第 2 0 1 8 / 2 2 3 0 8 1 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 3 2 6 0 7 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 / 0 7 5 3 5 7 号、国際公開第 2 0 1 9 / 2 0 0 1 8 5 号、国際公開第 2 0 1 9 / 2 1 7 7 8 4 号、国際公開第 2 0 1 9 / 0 3 2 6 1 2 号及び／又は国際公開第 2 0 2 0 / 1 9 1 2 5 2 号に記載されており、参照によって本明細書に援用される。

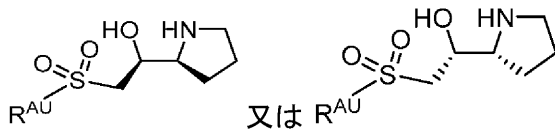
10

【0349】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド及び／又は組成物を調製する方法は、例えば、1つ以上のキラル制御されたヌクレオチド間結合を構築するために本明細書に記載のキラル補助剤を使用することを含む。一部の実施形態において、1つ以上のキラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に DPSE キラル補助剤を使用して構築される。一部の実施形態において、各キラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立に DPSE キラル補助剤を使用して構築される。一部の実施形態において、1つ以上のキラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に

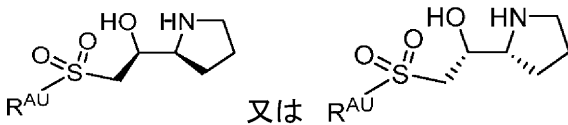
20

【化29】



又はその塩を使用して構築され、式中、 R^{AU} は、本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、各キラル制御された非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、n 0 0 1）は、独立に

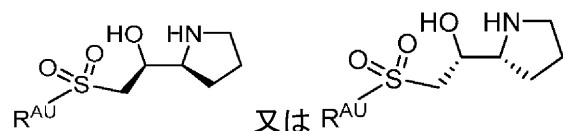
【化30】



30

又はその塩を使用して構築される。一部の実施形態において、各キラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に

【化31】

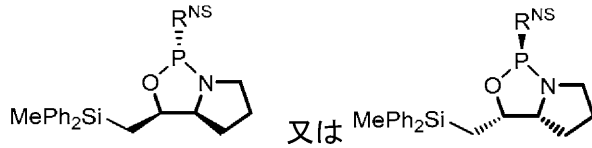


40

又はその塩を使用して構築される。一部の実施形態において、 R^{AU} は、任意選択で置換された C_{1-20} 、 C_{1-10} 、 C_{1-6} 、 C_{1-5} 又は C_{1-4} 脂肪族である。一部の実施形態において、 R^{AU} は、任意選択で置換された C_{1-20} 、 C_{1-10} 、 C_{1-6} 、 C_{1-5} 又は C_{1-4} アルキルである。一部の実施形態において、 R^{AU} は、任意選択で置換されたアリールである。一部の実施形態において、 R^{AU} は、フェニルである。一部の実施形態において、1つ以上のキラル制御されたヌクレオチド間結合は、PSMキラル補助

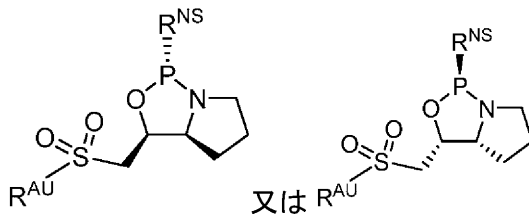
50

剤を使用して構築される。一部の実施形態において、各キラル制御された非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、 $n001$ ）は、独立に P S M キラル補助剤を使用して構築される。一部の実施形態において、各キラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に P S M キラル補助剤を使用して構築される。当業者によって理解される通り、キラル補助剤はオリゴヌクレオチド調製のためにホスホラミダイト（例えば、
【化 3 2】



10

（ D P S E ホスホラミダイト ） 、
【化 3 3】

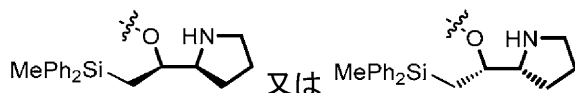


20

（式中、 R^{AU} は、独立に本明細書に記載される通りであり； R^{AU} が $-Ph$ である場合、P S M ホスホラミダイト）、式中、 R^{NS} は、任意選択で置換／保護されたヌクレオシド（例えば、オリゴヌクレオチド合成のために任意選択で保護されている）又はその塩などである）で利用されることが多い。一部の実施形態において、方法は、D P S E 及び／又は P S M ホスホラミダイト又はその塩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、D P S E 及び／又は P S M ホスホラミダイト又はその塩を $-OH$ （例えば、ヌクレオシド又はオリゴヌクレオチド鎖の $5'-OH$ ）に接触させることを含む。当業者が理解する通り、接触は、リン結合が形成されるような様々な好適な条件下で実施することができる。一部の実施形態において、各キラル制御されたヌクレオチド間結合の調製は、独立に D P S E 又は P S M ホスホラミダイト又はその塩を $-OH$ （例えば、ヌクレオシド又はオリゴヌクレオチド鎖の $5'-OH$ ）に接触させることを含む。一部の実施形態において、各キラル制御されたホスホロチオエートヌクレオチド間結合の調製は、独立に D P S E ホスホラミダイト又はその塩を $-OH$ （例えば、ヌクレオシド又はオリゴヌクレオチド鎖の $5'-OH$ ）に接触させることを含む。一部の実施形態において、各キラル制御された非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、 $n001$ ）の調製は、独立に P S M ホスホラミダイト又はその塩を $-OH$ （例えば、ヌクレオシド又はオリゴヌクレオチド鎖の $5'-OH$ ）に接触させることを含む。一部の実施形態において、各キラル制御されたヌクレオチド間結合の調製は、独立に P S M ホスホラミダイト又はその塩を $-OH$ （例えば、ヌクレオシド又はオリゴヌクレオチド鎖の $5'-OH$ ）に接触させることを含む。一部の実施形態において、接触は、2つの糖及びキラル補助剤部分（例えば、
【化 3 4】

30

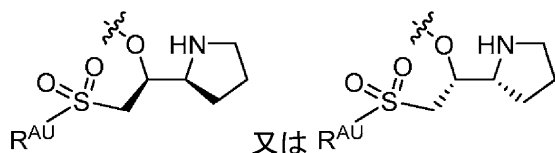
40



又はその塩形態（例えば、D P S E ホスホラミダイト又はその塩からのもの）、

50

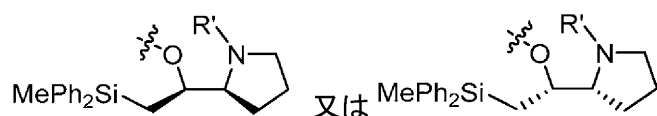
【化 3 5】



又はその塩形態（式中、 R^{AU} は、独立に本明細書に記載される通りであり； R^{AU} が $-Ph$ である場合、例えば、 PSM ホスホラミダイト又はその塩からのもの）などに結合しているリン原子を含む $P(III)$ 結合を形成する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、例えば、 DPE 又は PSM ホスホラミダイトからのキラル補助剤部分を含む $P(III)$ 結合を含む。一部の実施形態において、キラル補助剤部分を含む $P(III)$ 結合は、キラル制御されている。一部の実施形態において、キラル補助剤部分は、例えば、 $P(III)$ 結合を $P(V)$ 結合に変換する前（例えば、硫化、アジドとの反応前など）に保護することができる。一部の実施形態において、保護されたキラル補助剤は

10

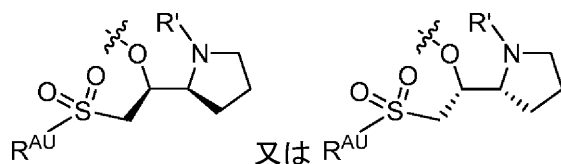
【化 3 6】



20

の構造若しくはその塩形態（例えば、式中、 R' は、独立に本明細書に記載される通りであり；例えば、 DPE ホスホラミダイト又はその塩からのもの）又は

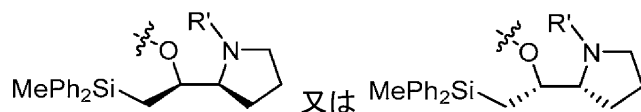
【化 3 7】



30

若しくはその塩形態（式中、各 R' 及び R^{AU} は、独立に本明細書に記載される通りであり； R^{AU} が $-Ph$ である場合、例えば、 PSM ホスホラミダイト又はその塩からのもの）を有し、式中、各 R' は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、 R' は、 $-C(O)R$ であり、式中、 R は、本明細書に記載される通りである。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、オリゴヌクレオチドは、保護されたキラル補助剤を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の各キラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に

【化 3 8】

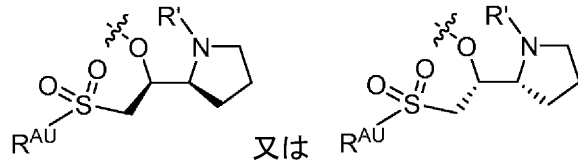


40

若しくはその塩形態又は

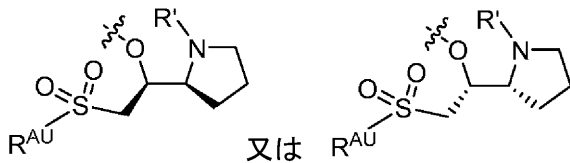
50

【化 3 9】



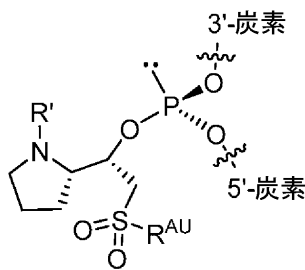
若しくはその塩形態を含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の各キラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に

【化 4 0】



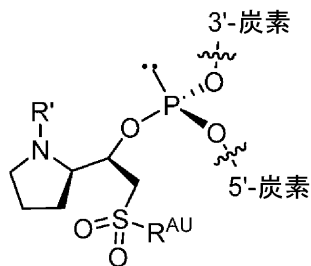
又はその塩形態を含む。一部の実施形態において、 R' は、 $-C(O)R$ である。一部の実施形態において、 R' は、 $-C(O)CH_3$ である。一部の実施形態において、 R^{AU} は、 Ph である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

【化 4 1】



又はその塩形態（ $PIII-1$ ）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

【化 4 2】



又はその塩形態（ $PIII-2$ ）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

10

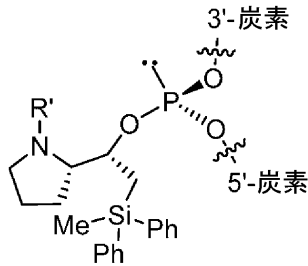
20

30

40

50

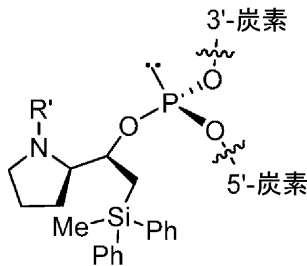
【化 4 3】



10

又はその塩形態（P I I I - 5）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

【化 4 4】

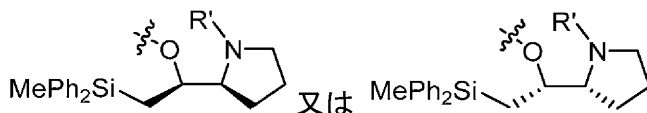


20

又はその塩形態（P I I I - 6）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、5'末端ヌクレオチド間結合は、P I I I - 1、P I I I - 2、P I I I - 5又はP I I I - 6である。一部の実施形態において、5'末端ヌクレオチド間結合は、P I I I - 1又はP I I I - 2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、R'は-C(O)Rである。一部の実施形態において、R'は、-C(O)CH₃である。一部の実施形態において、R^{AU}は、-Phである。一部の実施形態において、P(I I I)結合は、P(V)結合に変換される。一部の実施形態において、P(V)結合は、2つの糖、キラル補助剤部分（例えば、

30

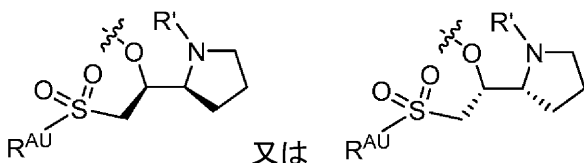
【化 4 5】



又はその塩形態（式中、R'は本明細書に記載される通りであり；例えば、D P S E ホスホラミダイト又はその塩からのもの）、

40

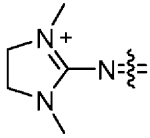
【化 4 6】



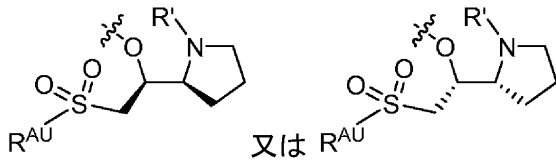
又はその塩形態（式中、R'及びR^{AU}の各々は、独立に本明細書に記載される通りであり；R^{AU}が-Phである場合、例えば、P S M ホスホラミダイト又はその塩からのもの）など）及びS又は

50

【化 4 7】



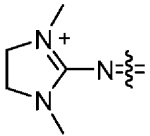
に結合しているリン原子を含む。一部の実施形態において、P（V）結合は、2つの糖、
【化 4 8】



10

又はその塩形態（式中、各 R' 及び R^{AU} は、独立に本明細書に記載される通りであり； R^{AU} が -Ph である場合、例えば、PSMホスホラミダイト又はその塩からのもの）など）及び S 又は

【化 4 9】



20

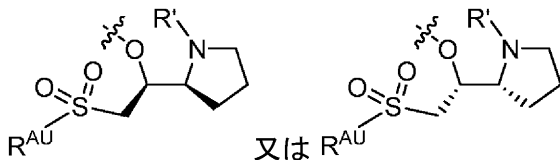
に結合しているリン原子を含む。一部の実施形態において、P（V）結合は、2つの糖、
【化 5 0】



30

又はその塩形態（式中、各 R' 及び R^{AU} は、独立に本明細書に記載される通りであり； R^{AU} が -Ph である場合、例えば、PSMホスホラミダイト又はその塩からのもの）など）及び S に結合しているリン原子を含む。一部の実施形態において、P（V）結合は、2つの糖、

【化 5 1】

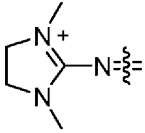


40

又はその塩形態（式中、各 R' 及び R^{AU} は、独立に本明細書に記載される通りであり； R^{AU} が -Ph である場合、例えば、PSMホスホラミダイト又はその塩からのもの）など）及び

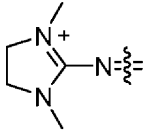
50

【化 5 2】



に結合しているリン原子を含む。当業者は、

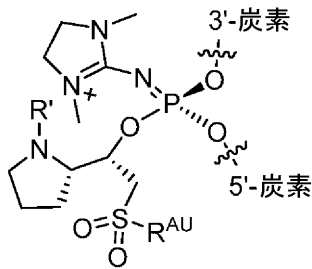
【化 5 3】



10

がカウンターイオン、例えば、一部の実施形態において PF_6^- と共に存在し得ることを理解する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

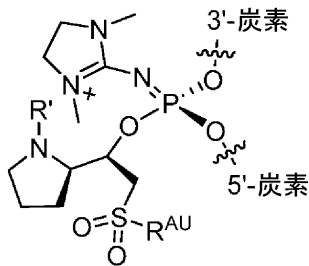
【化 5 4】



20

又はその塩形態（PV-1）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

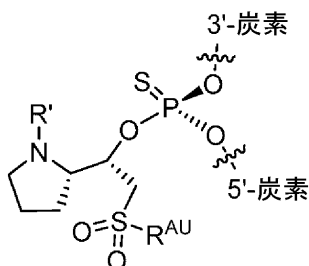
【化 5 5】



30

又はその塩形態（PV-2）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

【化 5 6】

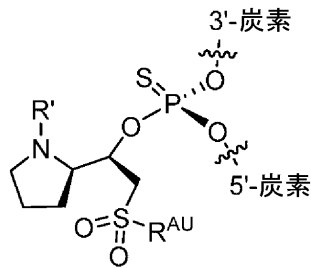


40

50

又はその塩形態（P V - 3）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

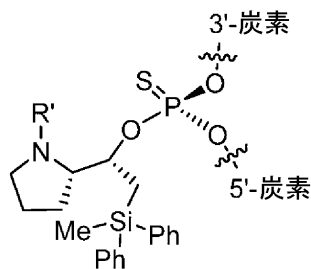
【化 5 7】



10

又はその塩形態（P V - 4）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

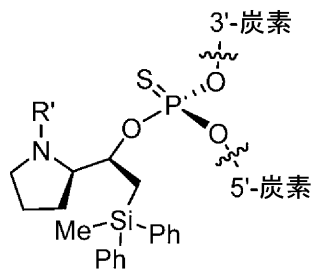
【化 5 8】



20

又はその塩形態（P V - 5）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の

【化 5 9】



30

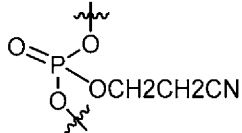
又はその塩形態（P V - 6）を含み、式中、各可変部は、独立に本明細書に記載される通りである。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの各キラルヌクレオチド間結合又は各キラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に P I I I I - 1、P I I I I - 2、P I I I I - 5、P I I I I - 6、P V - 1、P V - 2、P V - 3、P V - 4、P V - 5 及び P V - 6 から選択される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの各キラルヌクレオチド間結合又は各キラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に P I I I I - 1、P I I I I - 2、P V - 1、P V - 2、P V - 3 及び P V - 4 から選択される。一部の実施形態において、P I I I I - 1、P I I I I - 2、P I I I I - 5 又は P I I I I - 6 の結合は、典型的には 5' 末端ヌクレオチド間結合である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの各キラルヌクレオチド間結合又は各キラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に P V - 1、P V - 2、P V - 3、P V - 4、P V - 5 及び P V - 6 から選択される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの各キラルヌクレオチド間結合又は各キラル制御されたヌクレオチド間結合は、独立に P V - 1、P V - 2、P V - 3 又は P V - 4 から選択される。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、本明細書に記

40

50

載される通りの、例えば、表 A 1 のオリゴヌクレオチドであり、各 * S は、独立に P V - 3 又は P V - 5 で置換されており、各 * R は、独立に P V - 4 又は P V - 6 で置換されており、各 n 0 0 1 R は、独立に P V - 1 で置換されており、及び各 n 0 0 1 S は、独立に P V - 2 で置換されている。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、本明細書に記載される通りの、例えば、表 A 1 のオリゴヌクレオチドであり、各 * S は、独立に P V - 3 で置換されており、各 * R は、独立に P V - 4 で置換されており、各 n 0 0 1 R は、独立に P V - 1 で置換されており、及び各 n 0 0 1 S は、独立に P V - 2 で置換されている。一部の実施形態において、各天然リン酸結合は、前駆体、例えば、独立に

【化 6 0】



で置換されている。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、R' は -C(O)R である。一部の実施形態において、R' は -C(O)C₃H₇ である。一部の実施形態において、R^{AU} は -Ph である。一部の実施形態において、方法は、ホスホロチオエート及び／又は非負電荷ヌクレオチド間結合（例えば、n 0 0 1）が形成される（例えば、V - 1、P V - 2、P V - 3、P V - 4、P V - 5、P V - 6 などから）ような 1 つ以上のキラル補助剤部分の除去を含む。一部の実施形態において、キラル補助剤（例えば、P S M）の除去は、オリゴヌクレオチドを塩基（例えば、D E A などの N (R)₃）に無水条件下で接触させることを含む。

【0 3 5 0】

一部の実施形態において、当業者によって理解される通り、キラル制御されたヌクレオチド間結合の調製のため、ホスホラミダイト（例えば、D P S E 又は P S M ホスホラミダイト）は、典型的には、（例えば、本明細書に記載される通りの純度（例えば、約又は少なくとも約 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % 又は約 1 0 0 %）の）キラル集積又は純粋形態で利用される。

【0 3 5 1】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド合成サイクル、試薬及び条件を含めたキラル制御された調製技術は、米国特許第 9 3 9 4 3 3 3 号、米国特許第 9 7 4 4 1 8 3 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、米国特許第 9 9 8 2 2 5 7 号、米国特許第 1 0 1 6 0 9 6 9 号、米国特許第 1 0 4 7 9 9 9 5 号、米国特許出願公開第 2 0 2 0 / 0 0 5 6 1 7 3 号、米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 2 1 6 1 0 7 号、米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 1 2 7 7 3 3 号、米国特許第 1 0 4 5 0 5 6 8 号、米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 0 7 7 8 1 7 号、米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 2 4 9 1 7 3 号、米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 3 7 5 7 7 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 2 3 0 7 3 号、国際公開第 2 0 1 8 / 2 2 3 0 8 1 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 3 2 6 0 7 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 / 0 7 5 3 5 7 号、国際公開第 2 0 1 9 / 2 0 0 1 8 5 号、国際公開第 2 0 1 9 / 2 1 7 7 8 4 号、国際公開第 2 0 1 9 / 0 3 2 6 1 2 号及び／又は国際公開第 2 0 2 0 / 1 9 1 2 5 2 号に記載されており、それらの各々のオリゴヌクレオチド合成方法、サイクル、試薬及び条件は独立に参照によって本明細書に援用される。

【0 3 5 2】

合成されると、オリゴヌクレオチド及び組成物は、典型的には更に精製される。好適な精製技術は広く公知であり、当業者によって実施され、限定はされないが、米国特許第 9 3 9 4 3 3 3 号、米国特許第 9 7 4 4 1 8 3 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、米国特許第 9 9 8 2 2 5 7 号、米国特許第 1 0 1 6 0 9 6 9 号、米

10

20

30

40

50

国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020/0056173号、米国特許出願公開第2018/0216107号、米国特許出願公開第2019/0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公開第2019/0249173号、米国特許出願公開第2019/0375774号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第2018/223081号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/032607号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/075357号、国際公開第2019/200185号、国際公開第2019/217784号、国際公開第2019/032612号及び／又は国際公開第2020/191252号に記載されるものが挙げられ、それらの各々の精製技術は独立に参照によって本明細書に援用される。

10

【0353】

一部の実施形態において、サイクルは、カップリング、キャッピング、修飾及び脱ブロッキングを含むか又はそれからなる。一部の実施形態において、サイクルは、カップリング、キャッピング、修飾、キャッピング及び脱ブロッキングを含むか又はそれからなる。これらのステップは、典型的には、それらが列記される順で実施されるが、一部の実施形態において、当業者によって理解される通り、特定のステップ、例えば、キャッピング及び修飾の順を変更することができる。所望により、当業者が合成において実施することが多いように1つ以上のステップを繰り返して変換率、収量及び／又は純度を改善することができる。例えば、一部の実施形態において、カップリングを繰り返すことができ；一部の実施形態において、修飾（例えば、＝Oを設置するための酸化、＝Sを設置するための硫化など）を繰り返すことができ；一部の実施形態において、且つカップリングは、P（III）結合を特定の状況下でより安定であり得るP（V）結合に変換し得る修飾の後に繰り返され、定型的にはカップリングに修飾が続いて新たに形成されたP（III）結合をP（V）結合に変換する。一部の実施形態において、ステップを繰り返すとき、異なる条件を用いることができる（例えば、濃度、温度、試薬、時間など）。

20

【0354】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、固体担体につなげられる。一部の実施形態において、固体担体は、オリゴヌクレオチド合成用の担体である。一部の実施形態において、固体担体は、ガラスを含む。一部の実施形態において、固体担体は、CPG（制御多孔性ガラス（Controlled Pore Glass））である。一部の実施形態において、固体担体は、ポリマーである。一部の実施形態において、固体担体は、ポリスチレンである。一部の実施形態において、固体担体は、高架橋ポリスチレン（HCP）である。一部の実施形態において、固体担体は、制御多孔性ガラス（CPG）及び高架橋ポリスチレン（HCP）のハイブリッド担体である。一部の実施形態において、固体担体は、金属フォームである。一部の実施形態において、固体担体は、樹脂である。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、固体担体から切断される。

30

【0355】

例えば、様々な経路を介する対象への投与のための、提供されるオリゴヌクレオチドを配合し、及び／又は医薬組成物を調製するための技術は当技術分野で容易に利用可能であり、本開示に従って利用することができ、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、米国特許第9982257号、米国特許第10160969号、米国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020/0056173号、米国特許出願公開第2018/0216107号、米国特許出願公開第2019/0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公開第2019/0249173号、米国特許出願公開第2019/0375774号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第2018/223081号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/032607号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/075357

40

50

号、国際公開第2019/200185号、国際公開第2019/217784号、国際公開第2019/032612号及び／又は国際公開第2020/191252号に記載されるものである。

【0356】

生物学的適用

本明細書に記載される通り、提供される組成物及び方法は、RNA転写物のノックダウンを含め、C9orf72 RNAのノックダウンを改善することができる。一部の実施形態では、提供される組成物及び方法は、組成物の非存在、参照組成物の存在及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件と比較して、C9orf72転写物（限定されないが、リピート伸長を含むものなど）のノックダウンを改善した。

10

【0357】

一部の実施形態では、C9orf72オリゴヌクレオチドは、野生型又は非リピート伸長含有C9orf72遺伝子若しくは遺伝子産物（例えば、ヘキサヌクレオチドリPEAT伸長を欠くもの）のそれと比較して、突然変異型又はリピート伸長含有C9orf72遺伝子若しくは遺伝子産物（例えば、ヘキサヌクレオチドリPEAT伸長を含むもの）の発現、レベル及び／又は活性を優先的に低減（ノックダウン）することができる。

【0358】

様々な実施形態において、全転写物は、V2、V3及びV1、正常（健常、リピート伸長なし）及び突然変異体（病的、リピート伸長含有）の両方を含む。様々な転写物を図1に図示する。V1は、非常に低レベルで転写され（全C9orf72転写物の約1%）、ヘキサヌクレオチドリPEAT伸長を含む転写物のレベル又はV3転写物のアッセイで検出された転写物のレベルに有意に寄与しないことが報告されている。

20

【0359】

V1、V2及びV3は、選択的プレmRNAスプライシングによって産生されるC9orf72転写物の天然で産生されるプレmRNA変異体である。De Jesus-Hernandez et al., 2011. 変異体1及び3では、2つの選択的スプライシングを受けるエクソンの間のイントロンに伸長GGGGCCリピートが位置し、一方変異体2では、リピートはプロモーター領域に位置し、従って転写物には存在しない。V1はC9orf72変異体1転写物であり、これは最も短い転写物に相当し、短い方のC9orf72タンパク質（アイソフォームb）をコードする。NM_145005.5を参照されたい。V2はC9orf72変異体2転写物であり、これは変異体1と比較して5' UTR並びに3' コード領域及びUTRが異なる。得られるC9orf72タンパク質（アイソフォームa）はアイソフォーム1と比較して長い。変異体2及び3は同じC9orf72タンパク質をコードする；NM_018325.3を参照されたい。V3はC9orf72変異体3転写物であり、これは変異体1と比較して5' UTR並びに3' コード領域及びUTRが異なる。得られるC9orf72タンパク質（アイソフォームa）はアイソフォーム1と比較して長い；変異体2及び3は同じタンパク質をコードする。NM_001256054.1を参照されたい。転写変異体1及び3は、C9orf72エクソン2～11によってコードされる481アミノ酸長のタンパク質（NP_060795.1；アイソフォームa）をコードすると予想され、一方、変異体2は、エクソン2～5によってコードされるより短い222アミノ酸のタンパク質（NP_659442.2；アイソフォームb）をコードすると予想される。一部の報告によれば、V1、V2及びV3転写物の存在量は等しくないことが注記される；報告によれば、V2が主要な転写物であって、全転写物の90%を占め、V3は9%を占め、V1は1%を占める。従って、いかなる特定の理論にも拘束されるものではないが、本開示は、一部のC9orf72オリゴヌクレオチドによって媒介される全転写物の減少が、リピート伸長含有転写物のノックダウンという表現を含むことを示唆する。データは、従って多くのC9orf72オリゴヌクレオチドが、非リピート伸長含有C9orf72転写物に対してリピート伸長含有C9orf72転写物の優先的なノックダウンを媒介する能力を有したことを示している。

30

40

【0360】

50

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、全C9orf72転写物と比べて突然変異体（例えば、リピート伸長含有）V3 C9orf72転写物の発現、レベル及び／又は活性を優先的にノックダウンするか又はそれを低下させることができる。

【0361】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、リピート伸長から翻訳されるDPRタンパク質の発現、活性及び／又はレベルの低下を媒介する能力を有する。

【0362】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルの低下を媒介する能力を有する。一部の実施形態において、C9orf72遺伝子産物は、ジペプチドリピート（DPR）タンパク質など、タンパク質である。一部の実施形態において、DPRは、リピート含有C9orf72転写物の6つのリーディングフレームの何れかにおけるRAN翻訳によって産生され得る。一部の実施形態において、ジペプチドリピータンパク質は、ヘキサヌクレオチドリピート領域のセンス鎖又はアンチセンス鎖の何れかのRNA（リピート関連及び非ATG依存性翻訳）を介して産生される。DPRタンパク質については、例えば、Zu et al. 2011 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108:260-265; Zu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2013 Dec 17; 110(51):E4968-77; Lopez-Gonzalez et al., 2016, Neuron 92, 1-9; May et al. Acta Neuropathol (2014) 128:485-503; 及びFreibaum et al. 2017 Front. Mol. Neurosci. 10, Article 35; 及びWestergard et al., 2016, Cell Reports 17, 645-652に記載されている。一部の実施形態において、C9orf72ジペプチドリピートは、ポリ（プロリン-アラニン）（ポリPA又は）又はポリ（アラニン-プロリン）又は（ポリAP）；ポリ（プロリン-アルギニン）（ポリPR）又はポリ（アルギニン-プロリン）（ポリRP）；又はポリ（プロリン-グリシン）（ポリPG）又はポリ（グリシン-プロリン（ポリGP）の何れかであるか又はそれを含む。ポリGAは、報告によればC9orf72脳に大量に発現し、ポリGP及びポリGRが続くが、一方、アンチセンス転写物の翻訳によって生じるポリPA及びポリPRはまれである。報告によれば、ポリGA及び他のDPR種及びDPR取り込みが受け入れる細胞にどのように影響を及ぼすかは、細胞間で伝達される。Zhou et al. は全ての疎水性DPR種の細胞間伝達を検出したとともに、ポリGAがリピートRNAレベル及びDPR発現をブーストすることを示し、DPR伝達が悪循環を引き起こし得ることが示唆される；細胞を抗GA抗体で処理すると、DPRの細胞内凝集が減少した。Zhou et al. 2017. EMBO Mol. Med. 9(5):687-702. Chang et al. は、グリシン-アラニンジペプチドリピータンパク質が、細胞間伝達特性を有する毒性アミロイドを形成することを報告した。Chang et al. 2016. J. Biol. Chem. 291:4903-4911。

【0363】

一部の実施形態において、DPRタンパク質はポリGAを含む。一部の実施形態において、DPRタンパク質はポリGPを含む。一部の実施形態において、DPRタンパク質はポリGRを含む。一部の実施形態において、DPRタンパク質はポリGPである。非限定的な例として、DPRタンパク質のアミノ酸配列はGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAWSGRARGRARGGA AVAVPAPA-AAEAQAVASG、GPGPGPGPGPGPGPGRGRGGPGGGPGAGLRLRLRCLRP RRRRRRRR-WRVGE若しくはGRGRGRGRGRGRGRGRGRGRGVVGAGPGA GPGRGCGCGACARGGGGAGG-GEWVSEEAASWRVAVWGSAA GKRRG（センスフレームから）；又はPRPRPRPRPRPR-PRPRPRPRPR

L A R D S、G P G P G P G P G P G P G P G P G P 若しくは P A P A P A P A P A P A P A P A P A P A P S A R L L S S - R A C Y R L R L F P S L F S S G (アンチセンスフレームから)の何れかであるか、又はそれを含む。一部の実施形態において、D P R タンパク質又はその一部(例えば、D P R 又はその一部)は、G G G G C C リピート(又はそのアンチセンスフレーム)からの翻訳物であるか、又はそれを含む。

【0364】

一部の実施形態において、本開示は、細胞を本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド又は組成物に接触させることによって細胞の集団中のD P R タンパク質及び／又はD P R タンパク質を含むフォーカスのレベルを低減するための技術(例えば、オリゴヌクレオチド、組成物、方法など)を提供する。一部の実施形態において、本開示は、対象に本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド又は組成物を投与することによって対象中のD P R タンパク質及び／又はD P R タンパク質を含むフォーカスのレベルを低減するための技術(例えば、オリゴヌクレオチド、組成物、方法など)を提供する。

10

【0365】

C 9 o r f 7 2 遺伝子産物にはフォーカスも含まれ、これは、C 9 o r f 7 2 R N A 又はその一部分(例えば、切り出されたイントロン)に複数のR N A 結合タンパク質が結合した複合体を含むものであると報告されている。フォーカスについては、例えば、M o r r i e t a l . 2 0 1 3 A c t a N e u r o p a t h . 1 2 5 : 4 1 3 - 4 2 3 に記載される。

【0366】

一部の実施形態において、本開示は、細胞を本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド又は組成物に接触させることによって細胞の集団中のフォーカスのレベルを低減するための技術(例えば、オリゴヌクレオチド、組成物、方法など)を提供する。一部の実施形態において、本開示は、対象に本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド又は組成物を投与することによって対象中のフォーカスのレベルを低減するための技術(例えば、オリゴヌクレオチド、組成物、方法など)を提供する。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド又は組成物は、フォーカスを含む細胞の数及び／又は細胞当たりのフォーカスの数の減少を媒介することができる。一部の実施形態において、フォーカスはG G G G C C リピートを含むR N A を含む。一部の実施形態において、フォーカスは伸長G G G G C C リピートを含むR N A を含む。一部の実施形態において、フォーカスはG G C C C C リピートを含むR N A を含む。一部の実施形態において、フォーカスは伸長G G C C C C リピートを含むR N A を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、伸長リピートは約又は少なくとも約30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500又は1600リピートを含む。

20

30

【0367】

一部の実施形態において、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、細胞又は対象中の1つ以上のR N A 結合タンパク質の活性レベルを増加させ、亢進させ、及び／又は回復させる。一部の実施形態において、提供される技術は、C 9 o r f 7 2 タンパク質のレベルを減少させるか、又はC 9 o r f 7 2 タンパク質の不全及び／又は活性を妨害する。一部の実施形態において、提供される技術は、C 9 o r f 7 2 タンパク質のレベルを減少させるか、又はC 9 o r f 7 2 タンパク質のハプロ不全を妨害する。一部の実施形態において、提供される技術は、小胞輸送を改善するか、又は回復させることができる。一部の実施形態において、提供される技術は、グルタミン酸誘導興奮毒性を低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、核中に送達し、新たに転写されたR N A のレベルを低減し、及び／又はフォーカス中のR N A のレベルを低減することができる。とりわけ、本明細書に実証される通り、提供される技術は、リピート含有C 9 o r f 7 2 転写物(例えば、V 1 及び／又はV 3)及び／又はそれによってコードされる産物を強力に且つ優先的にノックダウンし、及び／又はC 9 o r f 7 2

40

50

タンパク質発現、レベル及び／又は活性を保存することができる。一部の実施形態において、提供される技術は、エクソン1 a 含有変異体（例えば、V1 及び／又はV3（例えば、ミスプライミングされ、G4C2リピートを含有する）、G4C2リピートを含む安定化イントロン1（又はその一部）など）の発現及び／又はレベルを減少させ、スプライシング効率を改善し、リピート含有転写物のレベルを低減し、及び／又はアンチセンス転写物のレベルを低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、伸長関連センス及び／又はアンチセンス転写物からのDPRのレベルを低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、エクソン1 b ジャンクションからのスプライシング機構を置換しないか、又は参照技術よりも低い程度で置換する。一部の実施形態において、提供される技術は、例えば、グルタミン酸の存在下で神経突起伸長（例えば、神経突起長さ及び／又は神経突起分枝）及び／又はニューロン（例えば、運動ニューロン）生存を促進することができる。一部の実施形態において、提供される技術は、伸長G4C2リピートを含有するアレル及び／又は含有しないアレルからの転写物及び／又はそれによってコードされる産物のレベル及び／又は活性を低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、アンチセンス転写物及び／又はそれによってコードされる産物のレベル及び／又は活性を増加させることはないか、又は減少させることができる。

10

【0368】

非限定的な例示的データとして、マウスにおいてC9orf72オリゴヌクレオチドWV-7658及びWV-7659を投与すると、脊髓前角（下位運動ニューロンの位置）における運動ニューロン核100個当たりのフォーカス数の51.8%及び62.2%の低下[PBS（陰性対照）と比較して]；及びフォーカス／細胞が5つより多い細胞の数のそれぞれ58.3%及び70.9%の低下；及び運動ニューロン100個当たりのフォーカス数のそれぞれ49.1%及び55.0%の低下を実証した。

20

【0369】

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、V3C9orf72転写物の有意なノックダウン及び／又はDPRタンパク質の発現、活性及び／又はレベルの低下及び／又はフォーカスを含む細胞の数及び／又は細胞当たりのフォーカスの数の低下が、細胞病理の有意な阻害につながり得るか又はそれに関連し得ることを示唆し、ここでの根底にある生物学理論上の根拠は、伸長ヘキサヌクレオチドリピートアレルがプレスプライミング後のC9orf72転写物及びスプライシング後のイントロンのより長い滞留時間につながり、それらがイントロン性ターゲティングオリゴヌクレオチドに対してより脆弱なものになるというものである。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、V3C9orf72転写物の約50%のノックダウンが細胞病理の約90%の阻害につながり得るか又はそれに関連し得ることを示唆する。

30

【0370】

C9orf72オリゴヌクレオチドによって媒介される改善は、限定はされないが、C9orf72関連障害又はその症状の治療及び／又は予防を含め、任意の所望の生物学的機能の改善であり得る。一部の実施形態において、C9orf72関連障害は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、前頭側頭型認知症（FTD）、大脳皮質基底核変性症候群（CBD）、非定型パーキンソン症候群、オリブ橋小脳変性症（OPCD）、原発性側索硬化症（PLS）、進行性筋萎縮症（PMA）、ハンチントン病（HD）表現型模写、アルツハイマー病（AD）、双極性障害、統合失調症又は他の非運動障害である。一部の実施形態において、C9orf72関連障害の症状は、激越、不安、感情鈍麻、食嗜好の変化、活力及び／又は動機づけの低下、認知症、抑鬱、呼吸困難、嚥下困難、発声困難、呼吸困難、転導性、筋線維束攣縮及び／又は筋痙攣、平衡障害、運動機能障害、不適切な社会的行動、共感欠如、記憶喪失、気分変動、筋攣縮、筋脱力、個人的不衛生、繰り返し行動又は強迫行動、息切れ、不明瞭な発語、不安定歩行、視力異常、四肢の衰弱から選択される。

40

50

【0371】

一部の実施形態において、C9orf72関連障害の症状は、意味性認知症、言語理解の低下又は適切若しくは正確な言語の使用困難である。一部の実施形態において、C9orf72関連障害又はその症状は、大脳皮質基底核変性症候群（CBD）、震え、協調不全、筋固縮及び／又はスパズム、進行性核上性麻痺（PSP）、歩行及び／又は平衡障害、頻繁な転倒、筋硬直、頸部及び／又は上半身の筋硬直、身体機能の喪失及び／又は異常眼球運動である。

【0372】

一部の実施形態において、FTDは行動障害型前頭側頭型認知症（bvFTD）である。一部の実施形態において、報告によれば、bvFTDでは、最も顕著な初期症状は人格及び行動に関連する。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法に従い評価したときの、人間関係及び社会生活上の自製の喪失として現れる脱抑制を対象が起こす程度又は割合を低減する能力を有する。

10

【0373】

一部の実施形態では、本開示は、共通の塩基配列を含む共通の塩基配列を有する第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することにより、疾患を治療する方法を提供し、このヌクレオチド配列は、標的C9orf72転写物中の標的配列と相補的であり、改善は、オリゴヌクレオチド組成物として、立体制御されたオリゴヌクレオチド組成物を用いることを含み、これは、それをオリゴヌクレオチド又はノックダウン系中のC9orf72転写物と接触させると、C9orf72転写物のRNアーゼH媒介性ノックダウンが、組成物の非存在、参照組成物の存在及びそれらの組み合わせからなる群から選択される参照条件下で観察されるものと比較して改善されることを特徴とする。

20

【0374】

一部の実施形態において、本開示の技術は、1つ以上の好適な条件下で（例えば、実施例に記載される1つ以上のアッセイ；1つ以上の濃度、例えば、約1、10、50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000、7000又は10000nMで）、参照技術（例えば、ステレオランダムオリゴヌクレオチド組成物を含む技術、異なる設計のオリゴヌクレオチドのキラリ制御されたオリゴヌクレオチド組成物を含む技術など）によって提供される低減よりも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%若しくは190%超又は少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50倍又はそれを超える標的核酸（例えば、転写物）及び／又はそれによってコードされる産物（例えば、タンパク質）（例えば、病態、障害又は疾患に関連するもの）の低減を提供する。

30

【0375】

一部の実施形態において、C9orf72標的遺伝子又は遺伝子産物の発現又はレベルは、C9orf72オリゴヌクレオチドの投与によって少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%又は80%低下する。一部の実施形態において、C9orf72転写物及び／又はそれによってコードされる産物（例えば、病態、障害又は疾患に関連するもの）の発現又はレベルは、C9orf72オリゴヌクレオチドの投与によって少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%又は80%低下する。一部の実施形態において、評価は、インビトロで、例えば、細胞中で実施される。一部の実施形態において、評価は、インビボで実施される。当業者によって理解される通り、様々な技術が、本開示に従って提供される技術（例えば、オリゴヌクレオチド、組成物など）の特性及び／又は活性の評価に利用可能であり；特定のこうした技術は実施例に記載される。一部の実施形態において、低減は、特定のオリゴヌクレオチド濃度、例えば、約1、10、50、100、150、200、300、400、500、600、700、8

40

50

00、900、1000、2000、5000、7000又は10000 nMで達成される。

【0376】

一部の実施形態において、本開示の技術は、病態、障害又は疾患に関連するC9orf72核酸及び／又はそれによってコードされる産物の発現、活性及び／又はレベルを、病態、障害又は疾患に関連しないか又はあまり関連しないものと比べて選択的に低減し得る。一部の実施形態において、選択性は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500又は1000倍又はそれを超える。一部の実施形態において、選択性は、IC50値の比によって評価され、これは、本開示に従って提供される技術（例えば、実施例に記載されるもの）の活性の評価に好適な様々な技術を介して得ることができる。

10

【0377】

一部の実施形態において、特性、活性、選択性などは、1つ以上のオリゴヌクレオチド濃度、例えば、約1、10、50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000、7000又は10000 nMで評価される。

【0378】

一部の実施形態において、提供される技術のIC50は、約1、10、50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000、7000若しくは10000 nM又は約1、10、50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000、7000若しくは10000 nM以下である。一部の実施形態において、これは、100 nM以下である。一部の実施形態において、これは、200 nM以下である。一部の実施形態において、これは、300 nM以下である。一部の実施形態において、これは、400 nM以下である。一部の実施形態において、これは、500 nM以下である。一部の実施形態において、これは、1 uM以下である。一部の実施形態において、これは、5 uM以下である。一部の実施形態において、これは、10 uM以下である。一部の実施形態において、IC50は、実施例に記載される技術を使用して評価される。一部の実施形態において、IC50は、関連細胞中でインビトロで評価される。一部の実施形態において、IC50は、動物モデルで評価される。

20

30

【0379】

一部の実施形態において、活性及び／又は選択性は、転写物、例えば、病態、障害又は疾患に関連するもののレベルによって評価される。一部の実施形態において、活性及び／又は選択性は、タンパク質及び／又はペプチド、例えば、病態、障害又は疾患に関連するもののレベルによって評価される。一部の実施形態において、活性及び／又は選択性は、細胞の集団及び／又は個別の細胞中の核酸フォーカス（例えば、RNAフォーカス）、例えば、病態、障害又は疾患に関連するもののレベル（例えば、フォーカスを有する細胞のパーセンテージ及び／又は単一細胞中のフォーカスのレベル）によって評価される。

【0380】

一部の実施形態において、病態、障害又は疾患に関連する転写物は、伸長リピート、例えば、G4C2リピートを含む。一部の実施形態において、伸長G4C2リピートはC9orf72のイントロン1中にある。一部の実施形態において、伸長リピートは、約又は少なくとも約30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500又は1600リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約30リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約50リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約100リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約150リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リ

40

50

ートは約又は少なくとも約200リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約300リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約400リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約500リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約600リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約700リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約800リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約900リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約1000リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約1100リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約1200リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約1300リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約1400リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約1500リピートを含む。一部の実施形態において、伸長リピートは約又は少なくとも約1600リピートを含む。健常ヒト個体におけるC9orf72 GGGGCCリピートは2～23単位又は0～15単位の範囲であり；一部の患者において約又は少なくとも約30～71又は700～1600リピートの範囲であるという報告が存在した（例えば、Renton et al., Neuron, 2011, 72, 257-268；DeJesus-Hernandez et al., Neuron, 2011, 72, 245-256を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0381】

一部の実施形態において、病態、障害又は疾患に関連する転写物は、伸長リピート、例えば、G4C2リピートを含む。一部の実施形態において、伸長G4C2リピートは、C9orf72のイントロン1中に存在する。一部の実施形態において、伸長リピートは、約30、50、100、150、200、300若しくは500個又は少なくとも約30、50、100、150、200、300若しくは500個のリピートを含む。一部の実施形態において、病態、障害又は疾患に関連する転写物は、伸長リピートを含むV1及び／又はV3（例えば、図1に示されるもの）である。一部の実施形態において、提供される技術は、伸長リピートを含む転写物及び／又はそれによってコードされる産物（例えば、図1に示される通りの伸長リピートを含むV1及び／又はV3）の発現、活性及び／又はレベルを、伸長リピートを含有しない転写物及び／又はそれによってコードされる産物と比べて選択的に低減する。

【0382】

一部の実施形態において、本開示は、フォーカスのレベルを低減するための技術を提供する。一部の実施形態において、フォーカスは、伸長リピートを含むC9orf72転写物（一方又は両方の鎖から）及び／又はそれによってコードされるペプチドを含む。一部の実施形態において、提供される技術は、フォーカスを有する細胞の数／パーセンテージを低減し、及び／又は個別の細胞中のフォーカスのレベルを低減する。

【0383】

特徴付け及び評価

限定はされないが、当技術分野で知られる多くを含め、様々な技術及びツールを本開示によるC9orf72オリゴヌクレオチドの評価及び検証に用いることができる。

【0384】

一部の実施形態では、C9orf72オリゴヌクレオチドの効力の評価及び検証は、C9orf72オリゴヌクレオチドの送達後に、C9orf72標的核酸又は対応する遺伝子産物のレベル、活性、発現、対立遺伝子特異的発現及び／又は細胞内分布の変化若しくは改善を定量することにより、実施することができる。一部の実施形態では、送達は、トランスフェクション剤を用いて又はトランスフェクション剤を用いずに行うことができる（例えば、ジムノチック）。

【0385】

一部の実施形態では、C9orf72オリゴヌクレオチドの効力の評価及び検証は、C

C9orf72オリゴヌクレオチドの導入後に、C9orf72遺伝子産物（限定はされないが、転写物、DPR若しくはフォーカスを含む）のレベル、活性、発現及び／又は細胞内分布の変化を定量することにより、実施することができる。C9orf72遺伝子産物は、C9orf72遺伝子又は遺伝子座から産生されるRNAを含む。

【0386】

一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチド組成物を同定及び／又は特性決定する方法を提供し、この方法は、以下：

第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む少なくとも1つの組成物を用意するステップと；

送達を参照組成物と比較して評価するステップを含む。

10

【0387】

一部の実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチド組成物を同定及び／又は特性決定する方法を提供し、この方法は、以下：

第1の複数のオリゴヌクレオチドを含む少なくとも1つの組成物を用意するステップと；

細胞内取込みを参照組成物と比較して評価するステップを含む。

【0388】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物の特性を参照ヌクレオチド組成物と比較する。

20

【0389】

一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、ステレオランダムオリゴヌクレオチド組成物である。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、全てのヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエートであるオリゴヌクレオチドのステレオランダム組成物である。一部の実施形態では、参照オリゴヌクレオチド組成物は、全てリン酸結合を有するDNAオリゴヌクレオチド組成物である。

【0390】

一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列と同じ化学修飾を有するオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列と化学修飾の同じパターンを有するオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列及び化学修飾を有するオリゴヌクレオチドの非キラル制御（又はステレオランダム）組成物である。

30

【0391】

一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列を有するが、限定はされないが、本明細書に記載の化学修飾を含め、異なる化学修飾を有するオリゴヌクレオチドの組成物である。一部の実施形態では、参照組成物は、同じ塩基配列を有するが、ヌクレオチド間結合並びに／又はヌクレオチド間結合及び／若しくは化学修飾の立体化学の異なるパターンを有する、オリゴヌクレオチドの組成物である。

【0392】

C9orf72遺伝子産物、C9orf72オリゴヌクレオチドの導入若しくは投与後に変化した可能性のあるそれら遺伝子産物の発現、レベル及び／又は活性を検出するための様々な方法は、当技術分野で公知である。非限定的な例として、C9orf72転写物及びそれらのノックダウンは、qPCRで定量することができ、C9orf72タンパク質レベルは、ウェスタンブロットにより、RNAフォーカスは、FISH（蛍光インサイチュハイブリダイゼーション）により、DPRは、ウェスタンブロット、ELISA又は質量分析法により、決定することができる。市販のC9orf72抗体として、抗C9orf72抗体GT779（1：2000；GeneTex, Irvine, California）が挙げられる。更に、電気生理学及びNMJ形成により野生型及び／又は突然変異体C9orf72を発現する運動ニューロン（MN）に対して機能アッセイを実施す

40

50

ることでもある。

【0393】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドの有効性の判定及び試験は、インビトロで細胞において実施することができる。一部の実施形態において、細胞は、C9orf72を発現する細胞である。一部の実施形態において、細胞は、C9orf72を発現するように操作されたSH-SY5Y（ヒト神経芽細胞腫）細胞である。一部の実施形態において、細胞は、国際公開第2016/167780号に記載される通りの、C9orf72を発現するように操作されたSH-SY5Y細胞である。一部の実施形態において、細胞は、患者由来細胞、患者由来線維芽細胞、iPSC又はiPSNである。一部の実施形態において、細胞は、iPSC由来ニューロン又は運動ニューロンである。C9orf72オリゴヌクレオチドの試験に好適な様々な細胞には、患者由来線維芽細胞、iPSC及びiPSNが含まれ、例えばDonnelly et al. 2013 Neuron 80, 415-428; Sareen et al. 2013 Sci. Trans. Med. 5:208ra149; Swartz et al. STEM CELL TRANSLATIONAL MEDICINE 2016; 5:1-12; 及びAlmeida et al. 2013 Acta Neuropathol. 126:385-399に記載されている。一部の実施形態において、細胞は、限定なしにマウス胚線維芽細胞又は皮質初代ニューロンを含めた、BACトランスジェニックマウス由来細胞である。一部の実施形態において、判定及び試験には細胞集団が関わる。一部の実施形態において、細胞集団は、Cellular Dynamics International、Madison、Wisconsinから市販されている、自然の電氣的及び生化学的活動を呈するiPS細胞由来のヒト大脳皮質ニューロン混合集団であるiCell Neuron (iNeuronとも称される)の集団である。更なる細胞が、脊髄運動ニューロン、中脳ドーパミン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロン、GABA作動性ニューロン、混合皮質ニューロン、中型有棘線条体GABA作動性ニューロン、パルブアルブミン集積皮質GABA作動性ニューロン、第五層皮質グルタミン酸作動性ニューロンを含め、BrainXell、Madison、Wisconsinから市販されている。

10

20

【0394】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドの判定は、動物で実施することができる。一部の実施形態において、動物はマウスである。C9orf72マウスモデル及びそれを使用した実験手順については、Hukema et al. 2014 Acta Neuropath. Comm. 2:166; Ferguson et al. 2016 J. Anat. 226:871-891; Lagier-Tourenne et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013 Nov 19; 110(47):E4530-9; Koppers et al. Ann. Neurol. 2015; 78:426-438; Kramer et al. 2016 Science 353:708; Liu et al., 2016, Neuron 90, 521-534; Peters et al., 2015, Neuron 88, 902-909; Picher-Martel et al. Acta Neuropathologica Communications (2016) 4:70に記載されている。本明細書にはC9-BACマウスモデルが記載される（実施例9を参照されたい）。

30

40

【0395】

一部の実施形態では、標的核酸レベルは、当技術分野で公知の任意の方法により定量することができる。それらの多くは、市販されているキット及び材料を用いて達成することができる。それらは、当技術分野において公知であり、常用されている。こうした方法として、例えばノーザンブロット分析、競合ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）又は定量的リアルタイムPCRが挙げられる。RNA分析は、全細胞RNA又はポリ(A)+mRNAに対して実施することができる。プローブ及びプライマーは、C9orf72核酸とハイブリダイズするように設計される。リアルタイムPCRプローブ及びプライマーを設計する方

50

法は、当技術分野で公知である。

【0396】

一部の実施形態では、C9orf72オリゴヌクレオチドの効力の評価及び検証は、ルシフェラーゼアッセイを用いて実施することができる。こうしたアッセイの非限定的な例は、以下の実施例3に詳述する。一部の実施形態において、ルシフェラーゼアッセイは、nt1～374又はnt158～900（これらは両方ともヘキサヌクレオチドリピート伸長を含む）など、センスC9orf72転写物の一部分につなぎ合わせたルシフェラーゼ遺伝子（又はその効果的な一部分）を含むコンストラクトを用いる。一部の実施形態において、nt1～374は、エクソン1a及びエクソン1aと1bとの間のイントロンを含む。一部の実施形態において、ルシフェラーゼアッセイは、nt900～1（これはヘキサヌクレオチドリピート伸長を含む）など、アンチセンスC9orf72転写物の一部分につなぎ合わせたルシフェラーゼ遺伝子（又はその効果的な一部分）を含むコンストラクトを用いる。一部の実施形態において、ルシフェラーゼアッセイはトランスフェクトCOS-7細胞で実施される。

10

【0397】

一部の実施形態では、C9orf72タンパク質レベルは、当技術分野において公知の任意の方法で評価又は定量することができ、こうした方法として、限定はされないが、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ウェスタンブロット分析（イムノブロッティング）、免疫細胞化学、蛍光活性化細胞選別（FACS）、免疫組織化学、免疫沈降、タンパク質活性検定（例えば、カスパーゼ活性検定）及び定量的タンパク質アッセイが挙げられる。マウス、ラット、サル及びヒトの検出に有用な抗体は、市販されており；C9orf72に対する更に別の抗体を当技術分野で公知の方法により作製することができる。

20

【0398】

オリゴヌクレオチド又は他の核酸のレベルを検出するためのアッセイは本明細書に記載されている（例えば、実施例4において）。このアッセイを用いて、非限定的な例として、C9orf72オリゴヌクレオチド又は目的の何れか他の核酸を検出することができ、そうしたものとして、核酸又はC9orf72及び核酸をターゲティングしない他のオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0399】

C9orf72オリゴヌクレオチドの有効性の判定及び試験は、インビトロ又はインビボで、C9orf72オリゴヌクレオチドを送達した後の細胞内のリピートRNAフォーカス（又はRNAフォーカス）の数の変化を決定することにより実施し得る。リピートRNAフォーカスは、ヘキサヌクレオチドリピートを含むRNAがRNA結合タンパク質を隔離すると形成される構造であり、RNA媒介毒性の尺度及び／又は原因である。一部の実施形態において、RNAフォーカスはセンス又はアンチセンスRNAフォーカスであり得る。C9orf72オリゴヌクレオチドをインビボで動物に投与したとき、動物の脳又はその一部分、限定なしに、小脳、大脳皮質、海馬、視床、髄質又は脳の任意の他の部分などにおけるRNAフォーカスの存在及び／又は数を決定するか又は調べることができる。C9orf72オリゴヌクレオチドの送達後、細胞当たりのフォーカス数（例えば、5つ以下又は5つより多い）又はその平均値及び／又はフォーカスを含む細胞の数を決定することができる。これらの数の一部又は全ての低下が、C9orf72オリゴヌクレオチドの有効性を示す。RNAフォーカスは、限定はされないがFISH（蛍光インサイチュハイブリダイゼーション）を含め、当技術分野において公知の方法により検出することができる；FISHの非限定的な例が実施例4に提示される。

30

40

【0400】

C9orf72オリゴヌクレオチドの有効性の判定及び試験は、インビトロで、C9orf72オリゴヌクレオチドを送達した後の細胞のハプロ不全の変化を決定することにより実施し得る。ハプロ不全は、例えば、ヘキサヌクレオチドリピートRNAがC9orf72転写及び／又はC9orf72遺伝子の発現に対する負のエフェクターとしての役割を果たし、従って全体的なC9orf72転写物量又は遺伝子産物量が低下するときに起

50

こる。ハプロ不全の低下が、C9orf72オリゴヌクレオチドの有効性を示す。

【0401】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドがC9orf72タンパク質の発現、活性及び／又はレベルを有意に低下させることはない。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72リピート伸長又はその遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルを低下させるが、C9orf72タンパク質の発現、活性及び／又はレベルを有意に低下させることはない。

【0402】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、(a) C9orf72リピート伸長又はその遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルを低下させるとともに、(b) 疾患状態を引き起こすのに十分なほどC9orf72の発現、活性及び／又はレベルを低下させることはないものである。C9orf72の産生不足に関係する様々な疾患状態としては、例えば、Farg et al. 2014 Human Mol. Gen. 23:3579-3595; 及びAtanasio et al. Sci Rep. 2016 Mar 16; 6:23204. doi:10.1038/srep23204に記載される通り、不適切なエンドソーム輸送、骨髄増殖によって特徴付けられるロバストな免疫表現型、T細胞活性化、形質細胞の増加、自己抗体上昇、免疫介在性糸球体腎症及び／又は自己免疫応答が挙げられる。

【0403】

C9orf72オリゴヌクレオチドの有効性の判定及び試験は、インビボで実施することができる。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは動物で判定及び／又は試験することができる。一部の実施形態において、ヒト及び／又は他の動物でC9orf72オリゴについて判定及び／又は試験することにより、レベル、活性、発現、アレル特異的発現及び／又は細胞内分布の変化又は改善を媒介し、且つ／又はC9orf72関連障害又はC9orf72関連障害の少なくとも1つの症状を予防するか、治療するか、改善するか、又はその進行を遅延させることができる。一部の実施形態において、かかるインビボでの判定及び／又は試験では、C9orf72オリゴヌクレオチドの導入後の表現型の変化、例えば運動機能及び呼吸の改善を決定することができる。一部の実施形態において、運動機能は、平均台、握力、後肢足跡試験（例えば、動物において）、オープンフィールド動作性、登り棒及びロータロッドを含め、当技術分野において公知の様々な試験の何れかにおける変化の決定により測定することができる。一部の実施形態において、呼吸は、コンプライアンス測定、侵襲抵抗及び全身プレスチモグラフを含め、当技術分野において公知の様々な試験の何れかにおける変化の決定により測定することができる。

【0404】

一部の実施形態では、C9orf72オリゴヌクレオチドの効力の検証は、神経疾患を有する被験者からの運動ニューロン細胞をC9orf72オリゴヌクレオチドと接触させた後、運動ニューロン細胞が分解するか否かを決定することにより達成することができる。運動ニューロン細胞が分解しなければ、C9orf72オリゴヌクレオチドは、運動ニューロン分解を低減又は阻害することができると考えられ得る。運動ニューロン細胞は、多能性幹細胞由来のものであり得る。多能性幹細胞は、被験者由来の細胞から再プログラムしたものであり得る。被験者由来の細胞は、例えば、体細胞であり得る。体細胞は、例えば、線維芽細胞、リンパ球又はケラチノサイトであり得る。運動ニューロン細胞が分解するか否かの評価は、対照との比較に基づいて行い得る。一部の実施形態では、対照レベルは、所定の値又は基準値であり得、これを測定結果及び／又は視覚検査結果を評価するためのベンチマークとして使用する。所定の値又は基準値は、神経疾患に罹患していない被験者からのサンプル（例えば、運動ニューロン細胞）又は神経疾患に罹患しているが、運動ニューロン細胞をC9orf72オリゴヌクレオチドと接触させていない被験者からのサンプル中のレベルであり得る。所定の値又は基準値は、神経疾患に罹患している被験者からのサンプル中のレベルであり得る。これらのスクリーニング方法の何れかにおいて

、神経疾患を有する被験者由来の細胞は、C9orf72における(GGGGCC)*n*ヘキサヌクレオチド伸長を含み得る。

【0405】

C9orf72の効力は、非限定的な例として、Peters et al. 2015 Neuron. 88 (5) : 902-9; O'Rourke et al. 2015 Neuron. 88 (5) : 892-901; 及びLiu et al. 2016 Neuron. 90 (3) : 521-34に記載されるものなど、好適な試験動物で検証することもできる。一部の実施形態では、試験動物は、C9-BACマウスである。また、450のリピート伸長を含むC9-BACトランスジェニックマウスでもC9orf72の効力を検証することができ、これも、Jiang et al. 2016 Neuron. 90, 1-16に記載されている。

10

【0406】

一部の実施形態では、試験動物において、様々なC9orf72転写物のレベルを決定することができ、これらは、C9orf72タンパク質レベル、RNAフォーカス及びDPR (ジペプチドリピータンパク質) のレベルであり得る。試験は、C9orf72オリゴヌクレオチドに対して並びに参照オリゴヌクレオチドと比較して実施することができる。本明細書に開示されるいくつかのC9orf72オリゴヌクレオチドは、RNA iフォーカスを含む細胞のパーセンテージ及び細胞当たりのフォーカスの平均数を低減することができる。本明細書に開示されるいくつかのC9orf72オリゴヌクレオチドは、ポリGPなどのDPRのレベルを低減することができる。

20

【0407】

一部の実施形態では、C9orf72オリゴヌクレオチドは、ALS、FTD又は他のC9orf72関連障害により引き起こされる神経変性の程度又は比率を低減することができる。一部の実施形態では、挙動症状の改善又はあらゆる神経系組織の劣化の程度若しくは割合の少なくとも低減に加えて、被験者又は他の動物におけるC9orf72オリゴヌクレオチドの治療効果を、脳スキャン、例えばCATスキャン、機能性MRI若しくはPETスキャン又は当技術分野で公知の他の方法でモニターすることもできる。

【0408】

C9orf72オリゴヌクレオチドの分析のための各種アッセイが、本明細書において、例えば実施例9、13及び14に記載され、これらは、中でも、以下：例えば、ALSニューロンで実施されるリポーターアッセイ (ルシフェラーゼアッセイ) 並びに測定、例えばV3/イントロン発現、活性及び/又はレベルの分析; 安定性アッセイ; TLR9アッセイ; 補体アッセイ; PD (薬力学) (C9-BAC、i.c.v若しくは脳静脈内注射)、例えばC9orf72-BAC (C9-BAC) マウスモデルで検証されるPD及び/又は効力; 限定はされないが、マウスなどの試験動物の側脳室又は中枢神経系の他の領域 (限定はされないが、皮質及び脊髄など) への注射をはじめとする、インビボ処置; フォーカスの数及び/又はフォーカス: ポリGPを含む細胞の数の分析 (又はpGP若しくはDPRアッセイ) を含む。

30

【0409】

一部の実施形態において、様々なアッセイから得られたデータを判定し、特に望ましいC9orf72オリゴヌクレオチドを選択するため、選択基準が用いられる。一部の実施形態では、少なくとも1つの選択基準が用いられる。一部の実施形態では、2つ以上の選択基準が用いられる。一部の実施形態において、ルシフェラーゼアッセイの選択基準 (例えば、V3/イントロンノックダウン) は、V3イントロンの少なくとも部分的なノックダウン及び/又はイントロン転写物の少なくとも部分的なノックダウンである。一部の実施形態において、ルシフェラーゼアッセイの選択基準 (例えば、V3/イントロンノックダウン) は、V3イントロンの50%のKD (ノックダウン) 及びイントロン転写物の50%のKDである。一部の実施形態において、選択基準にはIC₅₀の決定が含まれる。一部の実施形態において、選択基準には、約10 nM未満、約5 nM未満又は約1 nM未満のIC₅₀が含まれる。一部の実施形態において、安定性アッセイの選択基準は、1日

40

50

目に少なくとも50%の安定性〔少なくとも50%のレベルのオリゴヌクレオチドがなおも残留しており且つ／又は検出可能である〕である。一部の実施形態において、安定性アッセイの選択基準は、2日目に少なくとも50%の安定性である。一部の実施形態において、安定性アッセイの選択基準は、3日目に少なくとも50%の安定性である。一部の実施形態において、安定性アッセイの選択基準は、4日目に少なくとも50%の安定性である。一部の実施形態において、安定性アッセイの選択基準は、5日目に少なくとも50%の安定性である。一部の実施形態において、安定性アッセイの選択基準は、5日目に80%〔少なくとも80%のオリゴヌクレオチドが残留している〕である。一部の実施形態において、選択基準は、フォーカス数及び／又はフォーカスを含む細胞の数の少なくとも部分的なノックダウンである。一部の実施形態において、選択基準は、フォーカス数及び／又はフォーカスを含む細胞の数の少なくとも50%のKD（ノックダウン）である。一部の実施形態において、選択基準としては、TLR9アッセイにおける活性化の欠如が挙げられる。一部の実施形態において、選択基準としては、補体アッセイにおける活性化の欠如が挙げられる。一部の実施形態において、選択基準としては、マウスなど、試験動物の側脳室又は他の中枢神経系領域（限定はされないが皮質及び脊髄を含む）におけるノックダウンが挙げられる。一部の実施形態において、選択基準としては、マウスなど、試験動物の側脳室又は他の中枢神経系領域（限定はされないが皮質及び脊髄を含む）における少なくとも50%のノックダウンが挙げられる。一部の実施形態において、選択基準としては、DPRタンパク質の発現、活性及び／又はレベルのノックダウンが挙げられる。一部の実施形態において、選択基準としては、DPRタンパク質の発現、活性及び／又はレベルのノックダウンが挙げられる。一部の実施形態において、選択基準としては、DPRタンパク質の発現、活性及び／又はレベルの少なくとも50%のノックダウンが挙げられる。一部の実施形態において、選択基準としては、DPRタンパク質ポリGPの発現、活性及び／又はレベルの少なくとも50%のノックダウンが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0410】

C9orf72のノックダウンにおける有効性が判定及び試験されているオリゴヌクレオチドには、C9orf72関連障害又はその症状の治療又は予防における使用のための投与を含め、様々な用途がある。

【0411】

目的の標的核酸の検出アッセイ

一部の実施形態において、本開示は、標的核酸（例えば、標的オリゴヌクレオチド）を検出及び／又は定量化するためのハイブリダイゼーションアッセイに関し、このアッセイは、標的核酸に少なくとも部分的に相補的な捕捉プローブと、検出プローブとを利用する；ここでは、検出プローブ又は捕捉プローブと検出プローブと標的核酸とを含む複合体が、検出される能力を有する。かかるアッセイは、C9orf72オリゴヌクレオチド（例えば、組織又は体液試料中の）の検出に用いることができるか、又は任意の試料中の任意の標的核酸（任意の標的又は配列に対する）の検出に用いることができる。一部の実施形態において、捕捉プローブは第一級アミンを含み、これはアミノ反応性固体支持体と反応する能力を有し、従ってプローブを固体支持体上に固定化する。一部の実施形態において、アミノ反応性固体支持体は無水マレイン酸を含む。プローブの固定化は、プローブ及び固体支持体上のアルキン及びアジド部分を用いたクリックケミストリーで実施することができる。クリックケミストリーのため、アルキン又はアジドは、例えば、プローブの5'又は3'末端にあり得、任意選択でリンカーを介して取り付けられ得る。クリックケミストリーのため、固体支持体は、例えば、アルキン又はアジド部分を含む。一部の実施形態において、クリックケミストリーとしては、非限定的な例として、Kolb et al., 2011 Angew. Chem. Int. Ed. 40: 2004-2021に記載されるものが挙げられる。

【0412】

一部の実施形態において、直接又は間接的に検出される能力を有するプローブ又は複合体は、検出可能シグナルの生成に関与する。一部の実施形態において、プローブ又は複

体は、(a)別の化学的成分が存在しない場合に検出可能シグナルを生成する能力を有する(非限定的な例として、蛍光色素又は放射標識など、検出可能シグナルを生成する能力を有する部分を有する)、又は(b)適切な第2の部分が結合すると検出可能シグナルを生成する能力を有するリガンド、標識又は他の成分を含む。一部の実施形態において、(b)のタイプのプローブ又は複合体は、抗体などの適切な第2の化学物質が結合することのできるビオチン、ジゴキシゲニン、ハプテン、リガンド等の標識を含み、第2の化学物質は、標識に結合すると、例えば放射標識、化学発光、色素、アルカリホスファターゼシグナル、ペルオキシダーゼシグナル等によってシグナルを生成する能力を有する。

【0413】

一部の実施形態において、捕捉プローブは固体支持体上に固定化される。一部の実施形態では、捕捉プローブは標的核酸にハイブリダイズ、結合又はライゲートし、検出プローブも標的核酸にハイブリダイズ、結合又はライゲートし、及びこの複合体が、検出される能力を有する。ハイブリダイゼーションアッセイの多くの変形例が当技術分野において公知である。一部の実施形態では、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、捕捉と検出プローブとは同じプローブであり、一本鎖ヌクレアーゼを使用して、標的核酸に結合しない(又は完全には結合しない)プローブが分解される。

【0414】

一部の実施形態において、本開示は、標的核酸(例えば、標的オリゴヌクレオチド)を検出及び/又は定量化するためのハイブリダイゼーションアッセイに関し、ここで、プローブ(例えば、捕捉プローブ)は、標的核酸に少なくとも部分的に相補的で、第一級アミンを含み、第一級アミンはアミノ反応性固体支持体と反応する能力を有し、従ってプローブを固体支持体に固定化する。第一級アミンは、例えば、プローブの5'又は3'末端にあり得、任意選択でリンカーを介して取り付けられ得る。一部の実施形態において、アミノ反応性固体支持体は無水マレイン酸を含む。

【0415】

標的オリゴヌクレオチドは、例えば、C9orf72オリゴヌクレオチド又は任意の目的の標的に対するオリゴヌクレオチドであり得る。

【0416】

一部の実施形態において、アッセイは、ハイブリダイゼーションアッセイ、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ、競合ハイブリダイゼーションアッセイ、二重ライゲーションハイブリダイゼーションアッセイ、ヌクレアーゼハイブリダイゼーションアッセイ又は電気化学的アッセイ若しくは電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイである。

【0417】

一部の実施形態において、アッセイはサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイであり、ここでは、捕捉プローブが固体支持体に結合し、標的オリゴヌクレオチドの一部分にアニーリングする能力を有し;検出プローブは検出される能力を有し、且つ標的オリゴヌクレオチドの別の一部分にアニーリングする能力を有し;捕捉プローブ及び検出プローブの両方が標的オリゴヌクレオチドハイブリダイズすると、検出される能力を有する複合体が生じる。

【0418】

一部の実施形態において、アッセイはヌクレアーゼハイブリダイゼーションアッセイであり、捕捉プローブは、標的オリゴヌクレオチドに完全に相補的な切断プローブであり、ここでは、完全長標的オリゴヌクレオチドが結合する切断プローブが検出される能力を有し;及び遊離している(標的オリゴヌクレオチドに結合しない)か、又は標的オリゴヌクレオチドのショートマー(shortmer)、代謝物若しくは分解産物に結合する切断プローブは、S1ヌクレアーゼ処理によって分解され、従って検出可能シグナルを生成しない。

【0419】

一部の実施形態において、アッセイはハイブリダイゼーション-ライゲーションアッセイであり、ここでは、捕捉プローブが鑄型プローブであり、これは標的オリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドに完全に相補的で、標的オリゴヌクレオチドと検出プローブとのリガーゼ媒介性ライゲーションの基質としての役割を果たすことが意図されるものである。

【0420】

一部の実施形態において、本開示は、例えば、試料中、例えば組織又は体液中の標的核酸（例えば、標的オリゴヌクレオチド）を検出及び／又は定量化する方法に関し、この方法は、（１）捕捉プローブを提供するステップであって、捕捉プローブは標的核酸と少なくとも部分的に相補的で、且つ第一級アミンを含み、第一級アミンはアミノ反応性固体支持体によって結合される能力を有し、従ってプローブを固体支持体に固定化するステップ；（２）捕捉プローブを固体支持体に固定化するステップ；（３）検出プローブを提供するステップであって、検出プローブは標的核酸と少なくとも部分的に相補的で（例えば、捕捉プローブが結合する領域と異なる標的核酸領域において）、且つシグナルを直接又は間接的に生成する能力を有するステップ；ここで、ステップ（２）及び（３）は、何れの順序でも実施することができる；（４）プローブを標的核酸ハイブリダイズさせるのに好適な条件下で組織又は体液を捕捉プローブ及び検出プローブに接触させるステップ；（５）標的核酸にハイブリダイズしなかった検出プローブを除去するステップ；及び（６）検出プローブによって直接又は間接的に生成されるシグナルを検出するステップを含み、ここでは、シグナルの検出が、標的核酸の検出及び／又は定量化を示す。

10

【0421】

一部の実施形態において、標的オリゴヌクレオチドはC9orf72オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、標的オリゴヌクレオチドはC9orf72オリゴヌクレオチドでない。一部の実施形態において、標的核酸は、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA薬剤、二本鎖siRNA薬剤、一本鎖siRNA薬剤又は疾患に関連する核酸（例えば、癌細胞において存在量が増加する転写物など、疾患状態で発現する又は過剰発現する遺伝子又は遺伝子産物又はこの核酸は、疾患又は障害に関連する突然変異を含む）である。

20

【0422】

一部の実施形態において、アミノ反応性固体支持体は無水マレイン酸を含む。

【0423】

標的オリゴヌクレオチドが検出プローブにリアニールリングされ、次に捕捉プローブと組み合わされ、捕捉プローブは第一級アミン標識を介してアミノ反応性プレートに結合している。捕捉プローブ、検出プローブ及び標的オリゴヌクレオチドの間に二重ハイブリダイゼーション（例えば、サンドイッチハイブリダイゼーション）が起こる；捕捉プローブと検出プローブとの間にはギャップが許容され、捕捉又は検出プローブに結合しない標的オリゴヌクレオチドの一本鎖部分が後に残る。固体支持体（例えば、プレート表面）は無水マレイン酸を含み（例えば、无水マレイン酸活性化プレート）、これは捕捉プローブの末端にある第一級アミン標識と（例えば、pH8～9で）自然に反応し、プローブが固体支持体に固定化される。一部の実施形態において、固体支持体は、プレート、チューブ、フィルタ、ビーズ、ポリマービーズ、金、粒子、ウェル又はマルチウェルプレートである。

30

【0424】

非限定的な例として、以下の条件を用いることができる：

40

コーティング：2.5% Na₂CO₃ pH9.0中500nM 50ul／ウェル、37℃、2時間

試料／検出プローブ：希釈液としての300nM検出プローブ、4℃、一晚

ストレプトアビジン-AP：PBST中1：2000 50ul／ウェル、室温、1～2時間

基質Att oPhos：100ul／ウェル、室温、5分読み取り

【0425】

例えば、標的核酸が検出プローブにプレアニールリングされ、次に捕捉プローブと組み合わされ、捕捉プローブは、プローブ及び固体支持体上のアルキン（アジド）部分を用いたクリックケミストリーによってプレートに結合している。捕捉プローブ、検出プローブ及

50

び標的核酸の間で二重ハイブリダイゼーション（例えば、サンドイッチハイブリダイゼーション）が起こる；捕捉プローブと検出プローブとの間にはギャップが許容され、捕捉又は検出プローブに結合しない標的オリゴヌクレオチドの一本鎖部分が後に残る。固体支持体（例えば、プレート表面）はアルキン（又はアジド）部分を含み、これは捕捉プローブの末端にあるアジド（又はアルキン）部分標識とクリックケミストリーで反応し、プローブが固体支持体に固定化される。一部の実施形態において、固体支持体は、プレート、チューブ、フィルタ、ビーズ、ポリマービーズ、金、粒子、ウェル又はマルチウェルプレートである。

【0426】

アッセイの非限定的な例を以下に提供する：

10

動物生検を含めた組織中の標的オリゴヌクレオチドレベルを測定するハイブリダイゼーションELISAアッセイ：

標的オリゴヌクレオチドの逆相補配列は2つのセグメントに分割することができ、各々が捕捉プローブ又は検出プローブに相当する。5'側配列（標的オリゴヌクレオチドの）は5～15ntであり得；3'側配列は5～15ntであり得る。しかしながら、5'側プローブ配列（標的オリゴヌクレオチドの3'側部分にハイブリダイズする）が3'側プローブ配列と重複することは、それらが両方とも標的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする場合にあってはならない。5'側プローブと3'側プローブとの間にはギャップが許容される。各プローブは、少なくとも25℃、好ましくは>45℃、更により好ましくは>50℃の融解温度（ T_m ）を有しなければならない。高い T_m を実現するため、ロックド核酸（LNA）又はペプチド核酸（PNA）などの修飾ヌクレオチドを使用することができる。プローブ中の他のヌクレオチドはDNA若しくはRNAの何れのヌクレオチドであり得るか、又は2'-OMe、2'-F若しくは2'-MOE修飾を有するものなど、任意の他の形態の修飾ヌクレオチドであり得る。

20

【0427】

5'側プローブは、5'側位置でリンカーを伴う検出部分によって標識することもできる。このプローブが検出プローブである。

【0428】

5'側プローブ（標的オリゴヌクレオチドの3'側部分にハイブリダイズする）は、5'側位置でリンカーを伴う第一級アミンによって標識することができる。このプローブが捕捉プローブである。リンカーは、第一級アミンをプローブヌクレオチドにつなぐために使用することができる。リンカーは、C6-、C12-リンカー、PEG、TEG又はオリゴヌクレオチドに関係のない任意のヌクレオチド配列（オリゴdTなど）であり得る。リンカーを伴う5'側第一級アミンは、合成中又は合成後に付けられ得る。

30

【0429】

3'側プローブも、3'側位置でリンカー配列を伴う第一級アミンによって標識することができる。このプローブが捕捉プローブである。

【0430】

3'側プローブ（標的オリゴヌクレオチドの5'側部分にハイブリダイズする）は、3'側位置でリンカーを伴う検出部分によって標識することができる。このプローブが検出プローブである。検出部分は、ビオチン、ジゴキシゲニン、HaloTag（登録商標）リガンド（Promega、Madison、Wisconsin）又は任意の他のハプテンであり得る。検出部分は、Sulfo-Tag（Meso Scale Diagnostics、Rockville、Maryland）でもあり得る。リンカーは、検出部分をプローブヌクレオチドにつなぐために使用することができる。リンカーは、C6-、C12-リンカー、PEG、TEG又はオリゴヌクレオチドに関係のない任意のヌクレオチド配列（オリゴdTなど）であり得る。リンカーを伴う3'側検出部分は、合成中又は合成後に付けられ得る。

40

【0431】

捕捉プローブ（プローブの5'末端又は3'末端の何れかに第一級アミンを有する）は、

50

無水マレイン酸活性化プレート (Pierce; ThermoFisher, Waltham, Massachusetts から入手可能) 又は N-オキシスクシンイミド (NOS) 活性化 DNA-BIND プレート (Corning Life Sciences, Tewksbury, Massachusetts) など、第一級アミンと反応するように活性化される固体表面に固定化することができる。プレートは、MSD プレート (Meso Scale Diagnostics, Rockville, Maryland) など、アミンコンジュゲーション用に活性化される他の種類のプレートでもあり得る。表面は、Luminex 又は ビーズアレイプラットフォーム (BD (商標) Cytometric Bead Array-CBA, BD Biosciences, San Jose, California) など、フローベースのアッセイプラットフォームを用いることができるように、ビーズ、金粒子、カルボキシル化ポリスチレンマイクロパーティクル (MagPlex Microspheres, Luminex Corporation; ThermoFisher, Waltham, Massachusetts から入手可能) 又は Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) などの固体支持体であり得る。

10

20

30

40

50

【0432】

標的オリゴヌクレオチドを含有する生体試料、例えば組織ライセート又は生体液 (血漿、血液、血清、CSF、尿又は他の組織若しくは体液) などを検出プローブと適切なオリゴヌクレオチド及び検出プローブ濃度で混合し、熱変性させて、次に捕捉プローブでコーティングされた表面 (プレート又はマイクロパーティクル) に置くことにより、適切なハイブリダイゼーション緩衝液中、ある時間 (ハイブリダイゼーション) にわたって室温又は 4℃ の何れかで配列特異的ハイブリダイゼーションを促進する。表面 (プレート又はビーズ) を洗浄することにより過剰な検出プローブを除去する。次に、ビオチンに対するアビジン/ストレプトアビジン、DIG 又は ハプテンに対する抗体又はそのリガンドに対する HaloTag など、検出部分を認識する試薬と共に表面をインキュベートする。

【0433】

検出試薬は、通常、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 若しくはアルカリホスファターゼ (AP) などの酵素又はフルオロフォア又は Sulfo-Tag で標識される。徹底的に洗浄した後、HRP に対する TMB 又は AP に対する AttoPhos など、それぞれの基質を加えることにより、酵素標識された検出試薬を検出し、プレートリーダーによって吸光度モード又は蛍光モード (蛍光基質) でプレートを読み取る。一部の実施形態において、標識は、フルオレセイン、B-フィコエリトリン、ローダミン、シアニン色素、アロフィコシアニン又はその変異体若しくは誘導体を含む。

【0434】

Luminex 又は ビーズアレイプラットフォームなどのフローベースの検出プラットフォームには、フルオロフォア標識された検出試薬を使用することができる。

【0435】

Sulfo-Tag 付加された検出試薬は、MSD リーダー (Meso Scale Discovery) によって直接読み取ることができる。

【0436】

オリゴヌクレオチド量は、同じアッセイで実行した被験物質の段階希釈物の検量線を用いて計算することができる。

【0437】

ハイブリダイゼーションアッセイの別の非限定的な例は、実施例 4 に提供される。

【0438】

オリゴヌクレオチド (限定はされないが C9orf72 オリゴヌクレオチドを含む) の有用性に関する様々なアッセイについては、本明細書に記載され、且つ/又は当技術分野において公知である。

【0439】

オリゴヌクレオチド及び組成物の投与

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、標的遺伝子又はその遺伝子産物の発現及び／又はレベルの低下を導く能力を有する。

【0440】

一部の実施形態において、標的遺伝子は、ヘキサヌクレオチドリピート伸長を含む C 9 o r f 7 2 である。

【0441】

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組成物は、非限定的な例として C 9 o r f 7 2 転写物を含めた標的のノックダウンの改善において同等の効果を有する他の点では同等の参照オリゴヌクレオチド組成物よりも低い用量及び／又は頻度で投与される。一部の実施形態において、立体制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、標的 C 9 o r f 7 2 転写物のノックダウンの改善において同等の効果を有する他の点では同等のステレオランダムな参照オリゴヌクレオチド組成物よりも低い用量及び／又は頻度で投与される。

10

【0442】

一部の実施形態において、提供される技術は、より長い持続性を提供する。一部の実施形態において、提供される技術は一度投与されると、活性、例えば、標的転写物及び／又はそれによってコードされる産物の低減を、特定のレベル（例えば、特定の生物学的及び／又は治療効果を提供するために有用及び／又は十分なレベル）以上で、一定期間、例えば、最後の投与後、約若しくは少なくとも約 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、30、35、40、45、50、60 日間若しくはそれを超えて、約若しくは少なくとも約 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、30、35、40、45、50、60 週間若しくはそれを超えて、又は約若しくは少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 若しくは 10 か月間提供することができる。

20

【0443】

一部の実施形態において、本開示は、オリゴヌクレオチド及びその組成物の特性、例えば改善されたノックダウン活性等を化学修飾及び／又は立体化学によって最適化することができることを認識する。一部の実施形態において、本開示は、化学修飾及び立体化学を用いてオリゴヌクレオチド特性を最適化する方法を提供する。

30

【0444】

一部の実施形態において、本開示は、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドを含み且つ共通のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド組成物を投与する方法を提供し、この改良例は、

同じ共通のヌクレオチド配列の参照オリゴヌクレオチド組成物と比べて改善された送達によって特徴付けられる第 1 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を投与すること

を含む。

【0445】

一部の実施形態において、提供される C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド、組成物及び方法は、送達の改善を提供する。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、組成物及び方法は、細胞質送達の改善を提供する。一部の実施形態において、送達の改善は、細胞集団に対するものである。一部の実施形態において、送達の改善は、組織に対するものである。一部の実施形態において、送達の改善は、器官に対するものである。一部の実施形態において、送達の改善は、中枢神経系又はその一部分、例えば CNS に対するものである。一部の実施形態において、送達の改善は、生物に対するものである。送達の改善をもたらす例示的構造要素（例えば、化学修飾、立体化学、その組み合わせ等）、オリゴヌクレオチド、組成物及び方法については、本開示に詳細に記載される。

40

【0446】

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の投与には、様々な投与レジメ

50

ンを利用することができる。一部の実施形態において、複数の単位用量が時間を空けて投与される。一部の実施形態において、所与の組成物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全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（又は別の以前の用量値）と同じ又は異なる第2の（又は後続の）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、少なくとも1単位用量を少なくとも1日間投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、1用量より多くを少なくとも1日の期間、時に1日より長くにわたって投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、複数の用量を少なくとも1週間の期間にわたって投与することを含む。一部の実施形態において、この期間は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40週間又はそれを超える（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100週間又はそれを超える）。一部の実施形態において、投与レジメンは、1週間より長くにわたって1週間に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40週間又はそれを超えて（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100週間又はそれを超えて）1週間に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、2週間より長い期間にわたって2週間毎に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40週間又はそれを超える（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100週間又はそれを超える）期間にわたって2週間毎に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、1ヵ月にわたって1ヵ月に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、1ヵ月より長くにわたって1ヵ月に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヵ月又はそれを超えて1ヵ月に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、約10週間にわたって1週間に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、約20週間にわたって1週間に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、約30週間にわたって1週間に1用量を投与することを含む。一部の実施形態において、投与レジメンは、26週間にわたって1週間に1用量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、同じ配列のキラル制御されていない（例えば、ステレオランダムな）オリゴヌクレオチド組成物及び／又は同じ配列の異なるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物に利用されるものと異なる投与レジメンに従い投与される。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、それが所与の単位時間においてより低い総曝露レベルを実現し、1つ以上のより低い単位用量が関わり、且つ／又は所与の単位時間においてより少ない数の用量を含むことにおいて、同じ配列のキラル制御されていない（例えば、ステレオランダムな）オリゴヌクレオチド組成物と比較したとき低減されている投与レジメンに従い投与される。一部の実施形態において、オリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドは、同じ配列のキラル制御されていない（例えば、ステレオランダムな）オリゴヌクレオチド組成物よりも長い時間にわたって持続する投与レジメンに従い投与される。理論によって制限されることは望まないが、本出願人は、一部の実施形態において、より短い投与レジメン及び／又はより長い用量間の時間が、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の安定性、バイオアベイラビリティ及び／又は有効性の改善に起因し得ることを指摘しておく。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、対応するキラル制御されていないオリゴヌクレオチド組成物と比較して長い投与レジメンを有する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、対応するキラル制御されていないオリゴヌクレオチド組成物と比較して少なくとも2つの用量間の時間がより短い。理論によって制限されることは望まないが、本出願人は、一部の実施形態において、より長い投与レジメン及び／又はより短い用量間の時間が、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の安全性の改善に起因し得ることを指摘しておく。

10

【0447】

一部の実施形態において、送達（及び他の特性）の改善に伴い、提供される組成物は、生物学的効果、例えば臨床的有效性を実現するために、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。

【0448】

単一用量は、様々な量のオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態において、単一用量は、好適に適用による必要に応じて、様々な量のあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態において、単一用量は、約1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300mg又はそれを超える（例えば、約350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000mg又はそれを超える）あるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約1mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約5mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約10mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約15mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約20mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約50mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約100mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約150mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約200mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約250mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、単一用量は、約300mgのあるタイプのキラル制御されたオリゴヌクレオチドを含有する。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は、単一用量として及び／又は総用量として、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも低量で投与される。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、有効性の改善に起因して、単一用量として及び／又は総用量として、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも低量で投与される。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、単一用量として及び／又は総用量として、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも高量で投与される。一部の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、安全性の改善に起因して、単一用量として及び／又は総用量として、キラル制御されていないオリゴヌクレオチドよりも高量で投与される。

20

30

40

【0449】

50

C 9 o r f 7 2 関連病態、障害又は疾患の治療

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、C 9 o r f 7 2 標的遺伝子又はその遺伝子産物の発現、レベル及び／又は活性の低下を導く能力を有する。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 関連障害は、C 9 o r f 7 2 遺伝子又はその遺伝子産物における有害な突然変異の異常な又は過剰な活性、レベル及び／又は発現又はその異常な組織又は細胞間若しくは細胞内分布に関係する、それによって引き起こされ、且つ／又はそれに関連付けられる障害である。一部の実施形態において、C 9 o r f 7 2 関連障害は、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、前頭側頭型認知症（F T D）、大脳皮質基底核変性症候群（C B D）、非定型パーキンソン症候群、オリブ橋小脳変性症（O P C D）、原発性側索硬化症（P L S）、進行性筋萎縮症（P M A）、ハンチントン病（H D）表現型模写、アルツハイマー病（A D）、双極性障害、統合失調症又は他の非運動障害である。C 9 o r f 7 2 関連障害の症状には、本明細書に記載される及び当技術分野において公知のものが含まれる。

【0450】

一部の実施形態において、本開示は、病態、障害又は疾患を治療する方法を提供し、この方法は、それを罹患する対象に、治療有効量の提供されるオリゴヌクレオチド又は治療有効量の提供されるオリゴヌクレオチドを含むか若しくは送達する組成物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、病態、障害又は疾患を治療する方法を提供し、この方法は、それを罹患する対象に、治療有効量のオリゴヌクレオチド組成物を投与することを含む。一部の実施形態において、組成物は、オリゴヌクレオチド（一部の実施形態において、その薬学的に許容される塩形態）と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物である。一部の実施形態において、病態、障害又は疾患は、前頭側頭型認知症（F T D）である。一部の実施形態において、病態、障害又は疾患は、筋萎縮性側索硬化症（A L S）である。

【0451】

何れか特定の理論又は術語に束縛されることは意図しないが、本明細書は、絶えず発展するC 9 o r f 7 2 関連疾患の理解と共に、報告によれば、様々なC 9 o r f 7 2 関連疾患の正確な標識も発展していることに留意する。一部の実施形態では、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドは、C 9 o r f 7 2 のヘキサヌクレオチドリピート伸長含有突然変異型対立遺伝子のレベル（タンパク質及び／若しくはmRNAレベルで）を低減する、且つ／又はヘキサヌクレオチドリピート伸長含有突然変異C 9 o r f 7 2 mRNAから産生されるジペプチドリピートタンパク質のレベルを低減する上で有用であり、その際、オリゴヌクレオチドは、C 9 o r f 7 2 関連疾患を治療する上で有用である。

【0452】

一部の実施形態において、c 9 o r f 7 2 関連障害はF T Dである。一部の実施形態において、F T Dは、前頭側頭型認知症又は前頭側頭型変性症の略称である。一部の実施形態において、前頭側頭型変性症（F T D）は、脳の前頭葉及び側頭葉に発症する疾患過程である。これは、行動、人格、言語及び／又は運動の変化によって特徴付けられる一群の障害を引き起こす。F T Dの臨床診断には、行動障害型F T D（b v F T D）、原発性進行性失語症（P P A）及び運動障害の進行性核上性麻痺（P S P）及び大脳皮質基底核変性症（C B D）の任意の1つ以上が含まれる。一部の実施形態において、P P A、P S P又はC B Dに罹患している又はそれに罹り易い患者は、認知症を呈さないか、又はそれと同定されない。一部の実施形態において、前頭側頭型認知症はb v F T Dの症状に等しいか、又はそれによって特徴付けられる。

【0453】

本開示は、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドを使用する方法に関し、これは、C 9 o r f 7 2 をターゲティングすることができ、C 9 o r f 7 2 関連障害の治療及び／又は治療薬の製造に有用である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、指定塩基配列からの指定最大数のミスマッチを有する塩基配列を含むか、それから構成され得る。

10

20

30

40

50

【0454】

一部の実施形態では、本開示は、神経変性疾患を治療するための薬剤の製造を目的とするC9orf72オリゴヌクレオチドを含む組成物の使用に関する。

【0455】

一部の実施形態では、本開示は、患者のC9orf72関連障害を治療又は改善する方法に関し、この方法は、C9orf72に対する治療有効量のオリゴヌクレオチドを患者に投与するステップを含む。

【0456】

一部の実施形態では、本開示は、C9orf72オリゴヌクレオチドを含む組成物を動物に投与するステップを含む方法に関する。

【0457】

一部の実施形態では、動物は、被験者、例えばヒトである。

【0458】

一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドの投与など、C9orf72関連障害の治療に好適な対象又は患者は、医療専門家が同定又は診断することができる。C9orf72関連疾患は、幾つかの神経学的疾患の1つである。一部の実施形態において、神経学的疾患を有するとの対象の診断は、1つ以上の症状、例えば運動ニューロン変性症状の評価によって実施することができる。一部の実施形態において、神経学的疾患の診断には、身体診察に続き、徹底した神経学的診察が行われ得る。一部の実施形態において、神経学的診察では、運動及び知覚技能、神経機能、聴力及び発話、視力、協調及び平衡、精神状態及び気分又は行動の変化を評価し得る。神経学的疾患に関連する疾患の非限定的な症状は、腕、脚、足又は足首の脱力；不明瞭な発語；足の前部及び足指の背屈困難；手の脱力又は不器用さ；筋麻痺；硬直した筋肉；不随意の痙攣又はもがくような動き（舞踏病）；不随意の持続的筋拘縮（ジストニー）；動作緩慢；自動運動の喪失；姿勢及び平衡障害；柔軟性の欠如；刺痛のある身体部位；頭部の動きに伴い起こる電気ショックを受けた感覚；腕、肩及び舌の攣縮；嚥下困難；呼吸困難；咀嚼困難；視力の部分的又は完全な喪失；複視；緩徐又は異常眼球運動；振戦；不安定歩行；疲労；記憶喪失；眩暈；思考又は集中困難；読書又は書字困難；空間的関係の誤解釈；失見当識；抑鬱；不安；意思決定及び判断困難；衝動制御の喪失；慣習的課題の計画及び実施の困難；攻撃性；被刺激性；引きこもり；気分変動；認知症；睡眠習慣の変化；徘徊；食欲の変化であり得る。

【0459】

一部の実施形態では、組成物は、C9orf72障害の少なくとも1つの症状を予防、治療、改善又はその進行を遅らせる。

【0460】

一部の実施形態では、動物又はヒトは、C9orf72関連障害の症状に罹患している。

【0461】

一部の実施形態において、本開示は、C9orf72遺伝子発現を低下させるオリゴヌクレオチドを細胞に導入する方法に関し、この方法は、オリゴヌクレオチド又はC9orf72オリゴヌクレオチドを細胞に接触させることを含む。

【0462】

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とする哺乳動物のC9orf72遺伝子発現を低減する方法に関し、この方法は、C9orf72に対するオリゴヌクレオチドを含む核酸-脂質粒子を哺乳動物に投与するステップを含む。

【0463】

一部の実施形態において、本開示は、C9orf72遺伝子発現を標的とするオリゴヌクレオチドのインビボ送達方法に関し、この方法は、C9orf72に対するオリゴヌクレオチドを哺乳類に投与することを含む。

【0464】

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とする哺乳動物の C 9 o r f 7 2 関連障害に関連する 1 つ又は複数の症状を治療及び／又は改善する方法に関し、この方法は、C 9 o r f 7 2 に対するオリゴヌクレオチドを含む核酸-脂質粒子を治療有効量で哺乳動物に投与するステップを含む。

【0465】

一部の実施形態では、本開示は、細胞における C 9 o r f 7 2 発現を阻害する方法に関し、この方法は、以下：(a) 細胞を C 9 o r f 7 2 に対するオリゴヌクレオチドと接触させるステップと；(b) ステップ (a) で生成された細胞を、C 9 o r f 7 2 遺伝子の mRNA 転写物の分解を達成するのに十分な時間維持し、それにより細胞中の C 9 o r f 7 2 遺伝子の発現を阻害するステップを含む。

10

【0466】

一部の実施形態では、C 9 o r f 7 2 発現は、少なくとも 30 % 阻害される。

【0467】

一部の実施形態では、本開示は、C 9 o r f 7 2 発現により媒介される障害を治療する方法に関し、そうした治療を必要とするヒトに治療有効量の C 9 o r f 7 2 に対するオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む。

【0468】

一部の実施形態では、投与により、リピート伸長を含む C 9 o r f 7 2 転写物若しくはその遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルを低減が起こる。

【0469】

20

一部の実施形態において、本開示は、C 9 o r f 7 2 関連障害の治療方法に関する。

【0470】

一部の実施形態では、本開示は、以下：同じ mRNA の 2 つ以上の異なるスプライシング産物を含む系であって、少なくとも 1 つのスプライシング産物が、疾患関連であり、少なくとも 1 つのスプライシング産物が、非疾患関連である、スプライシング産物を含む系を用意するステップ；この系にオリゴヌクレオチドを導入するステップを含む方法に関し、ここで、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの疾患関連スプライシング産物中に存在するが、少なくとも 1 つの非疾患関連スプライシング産物中には存在しない配列と相補的であり、オリゴヌクレオチドは、非疾患関連スプライシング産物の発現、レベル及び／又は活性と比較して、疾患関連スプライシング産物の発現、レベル及び／又は活性を低減することができる。

30

【0471】

本方法の一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、疾患関連スプライシング産物中に存在するが、非疾患関連スプライシング産物中には存在しないイントロン-エクソン結合と相補的である。

【0472】

本方法の一部の実施形態において、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ヌクレオチド間結合を含む。

【0473】

本方法の一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドであり、系は、c 9 o r f y 2 関連障害に罹患している及び／又はそれに罹り易い対象である。

40

【0474】

一部の実施形態において、対象には第 2 の治療用薬剤又は方法が投与される。

【0475】

一部の実施形態において、対象には C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドと 1 つ以上の第 2 の治療用薬剤又は方法とが投与される。

【0476】

一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤又は方法は、神経学的疾患を予防するか、治療するか、改善するか、又はその進行を遅延させる能力を有する。

50

【0477】

一部の実施形態において、第2の治療用薬剤又は方法は、C9orf72関連障害を予防するか、治療するか、改善するか、又はその進行を遅延させる能力を有する。

【0478】

一部の実施形態において、第2の治療用薬剤又は方法は、エンドソーム及び／又はリソソーム輸送調節薬、グルタミン酸受容体阻害薬、PIKFYVEキナーゼ阻害薬及びカリウムチャネル活性化薬から選択される、神経学的疾患を予防するか、治療するか、改善するか、又はその進行を遅延させる能力を有する。

【0479】

一部の実施形態において、第2の治療用薬剤又は方法は、ジペプチドリピータンパク質に対する抗体又はRNAフォーカスの形成を妨害する又はその存在量若しくは数を低下させる薬剤（例えば、抗体又は小分子）を含む。

【0480】

一部の実施形態において、第2の治療用薬剤又は方法は、非限定的な例としてC9orf72の発現、活性及び／又はレベルを増加させる遺伝子又は遺伝子産物をノックダウンすることにより、C9orf72の発現、活性及び／又はレベルを間接的に低下させる。一部の実施形態において、第2の治療用薬剤又は方法は、ヒトSpt4オルソログのSUP4H1をノックダウンし、このノックダウンにより、センス及びアンチセンスC9orf72 RNAフォーカスの産生並びにDPRタンパク質が低下した。Kramer et al. 2016 Science 353:708。一部の実施形態において、第2の治療用薬剤又は方法は、核酸、小分子、遺伝子療法又は非限定的な例としてMisset al. Mol Neurobiol. 2017 Aug; 54(6):4466-4476を含めた、文献に記載される他の薬剤若しくは方法である。

【0481】

一部の実施形態において、第2の治療用薬剤はC9orf72オリゴヌクレオチドに物理的にコンジュゲートされる。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72の発現、活性及び／又はレベルを（直接又は間接的に）低下させる又はC9orf72関連障害の症状の治療に有用である第2のオリゴヌクレオチドに物理的にコンジュゲートされる。一部の実施形態において、第1のC9orf72オリゴヌクレオチドは、第1のC9orf72オリゴヌクレオチドと同一であっても又は同一でなくてもよい、且つ第1のC9orf72オリゴヌクレオチドと異なる又は同じである又は重複する配列を標的とすることができる第2のC9orf72オリゴヌクレオチドに物理的にコンジュゲートされる。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、SUP4H1をノックダウンするオリゴヌクレオチドと同じ治療レジームとなるようにコンジュゲートされるか、又は共投与されるか、又は導入される。一部の実施形態において、C9orf72オリゴヌクレオチドは、SOD1、TARDBP、FUS/TLS、MAPT、TDP-43、SUP4H1又はFUS/TLSなど、ALS又はFTDなどのC9orf72関連障害に関連する別の（非C9orf72）遺伝子又は遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルを改善する第2の治療用薬剤と同じ治療レジームとなるようにコンジュゲートされるか、又は共投与されるか、又は導入される。

【0482】

一部の実施形態において、かかる遺伝子又は遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルの改善には、とりわけ：疾患状態で高過ぎるかかる遺伝子又は遺伝子産物の発現、活性及び／又はレベルを低下させること；疾患状態で低過ぎる発現、活性及び／若しくはレベル又はかかる遺伝子若しくは遺伝子産物を増加させること；及び／又はかかる遺伝子又は遺伝子産物の突然変異体及び／又は疾患関連変異体の発現、活性及び／又はレベルを低下させることが含まれる。一部の実施形態において、第2の治療用薬剤はオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、第2の治療用薬剤は、C9orf72オリゴヌクレオチドに物理的にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態において、第2の治療用薬剤はフマル酸モノメチル（MMF）を含み、報告によれば、これはN

r f 2 及び／又はω-3 脂肪酸を活性化させる。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤はフマル酸モノメチル (MMF) 及び／又はω-3 脂肪酸、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を含み、報告によれば、これは NF-κB を阻害する。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤はフマル酸モノメチル (MMF) とω-3 脂肪酸、ドコサヘキサエン酸 (DHA) とのコンジュゲートを含む。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は CAT-4001 (Catabasis Pharmaceuticals, Cambridge, MA, US) である。

【0483】

一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、国際公開第 2016/210372 号に記載されるエンドソーム及び／又はリソソーム輸送調節薬、グルタミン酸受容体阻害薬、PIKFYVE キナーゼ阻害薬及びカリウムチャネル活性化薬から選択される、神経学的疾患を予防するか、治療するか、改善するか、又はその進行を遅延させる能力を有する。一部の実施形態において、カリウムチャネル活性化薬はレチガビンである。一部の実施形態において、グルタミン酸受容体は運動ニューロン (MN) 又は脊髄運動ニューロン上にある。一部の実施形態において、グルタミン酸受容体は NMDA、AMPA 又はカイナイトである。一部の実施形態において、グルタミン酸受容体阻害薬は、AP5 ((2R)-アミノ-5-ホスホノ吉草酸; (2R)-アミノ-5-ホスホノペンタン酸)、CNQX (6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2, 3-ジオン) 又は NBQX (2, 3-ジヒドロキシ-6-ニトロ-7-スルファモイル-ベンゾ [f] キノキサリン-2, 3-ジオン) である。

【0484】

一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、SOD1、TARDBP、FUS/TLS、MAPT、TDP-43、SUPT4H1 又は FUS/TLS など、C9orf72 関連障害に関連する遺伝子 (又はその遺伝子産物) の発現、レベル及び／又は活性を低下させる能力を有する。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、SOD1、TARDBP、FUS/TLS、MAPT、TDP-43、SUPT4H1 又は FUS/TLS など、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 又は前頭側頭型認知症 (FTD) に関連する遺伝子 (又はその遺伝子産物) の発現、レベル及び／又は活性を低下させる薬剤である。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、過剰な酸化的ストレスを制御する能力を有する。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は Radicava (登録商標) (エダラボン) である。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤はウルソデオキシコール酸 (UDCA) である。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、ニューロンへの Na⁺ 侵入を阻止することを通じてニューロンの活動を低減し、且つ運動ニューロンの活動を引き起こす化学物質の放出を阻止することにより、ニューロンに影響を及ぼす能力を有する。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤はリルゾールである。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、疲労を低減し、筋痙攣を緩和し、痙攣を制御し、且つ／又は過剰な唾液及び痰を低減する能力を有する。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、疼痛を低減する能力を有する。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は非ステロイド薬及び／又は抗炎症薬及び／又はオピオイドである。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、抑鬱、睡眠障害、嚥下障害、痙攣、唾液嚥下困難及び／又は便秘を低減する能力を有する。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤はバクロフェン又はジアゼパムである。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、トリヘキシフェニジル、アミトリプチリン及び／又はグリコピロレートであるか又はそれを含む。一部の実施形態において、第 2 の治療用薬剤は、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の少なくとも 15 隣接 nt を含む配列を有する鎖を含む dsRNA 又は siRNA である。

【0485】

医薬組成物

一部の実施形態では、本開示は、提供される化合物、例えば提供されるオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩及び製剤用担体を含む医薬組成物を提供する。一部の

実施形態では、オリゴヌクレオチドは、C9orf72オリゴヌクレオチドである。

【0486】

治療薬として使用されるとき、提供されるオリゴヌクレオチド又は本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物は、医薬組成物として投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、限定はされないが、中枢神経系をはじめとする、疾患に罹患した身体の領域へのオリゴヌクレオチド組成物の投与に好適である。一部の実施形態では、医薬組成物は、治療有効量の提供されるオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩並びに薬学的に許容される希釈剤、薬学的に許容される賦形剤及び薬学的に許容される担体から選択される少なくとも1つの薬学的に許容される不活性成分を含む。

【0487】

当業者によって認識される通り、本開示のオリゴヌクレオチドは、その酸、塩基又は塩形態で提供することができる。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、酸形態、例えば、天然リン酸結合について、 $-OP(O)(OH)O-$ の形態；ホスホロチオエートヌクレオチド間結合について、 $-OP(O)(SH)O-$ の形態；などであり得る。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、塩形態、例えば、天然リン酸結合について、ナトリウム塩の $-OP(O)(ONa)O-$ の形態；ホスホロチオエートヌクレオチド間結合について、ナトリウム塩の $-OP(O)(SNa)O-$ の形態；などであり得る。一部の実施形態において、各酸性結合、例えば、各天然リン酸結合及び各ホスホロチオエート結合は、存在する場合、独立に、塩形態（全塩形態）で存在する。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、全ナトリウム塩形態である。別に注記のない限り、本開示のオリゴヌクレオチドは、酸、塩基及び／又は塩形態で存在し得る。

【0488】

一部の実施形態において、医薬組成物は、治療有効量の提供されるオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩と、薬学的に許容される不活性成分とを含む。一部の実施形態において、薬学的に許容される不活性成分は、薬学的に許容される希釈剤、薬学的に許容される賦形剤及び薬学的に許容される担体から選択される。一部の実施形態において、薬学的に許容される不活性成分は、薬学的に許容される担体である。

【0489】

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又はその組成物を、薬学的に許容される不活性成分（例えば、薬学的に許容される賦形剤、薬学的に許容される担体など）と混合した状態で含む医薬組成物を提供する。当業者は、医薬組成物が提供されるオリゴヌクレオチドの薬学的に許容される塩又は組成物を含むことを理解する。一部の実施形態において、医薬組成物は、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、医薬組成物は、ステレオ純粋オリゴヌクレオチド組成物である。

【0490】

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、薬学的に許容される塩である。一部の実施形態において、医薬組成物は、任意選択で塩形態のオリゴヌクレオチドとナトリウム塩とを含む。一部の実施形態において、医薬組成物は、任意選択で塩形態のオリゴヌクレオチドと塩化ナトリウムとを含む。一部の実施形態において、塩基に供与され得る（例えば、水溶液、医薬組成物などの条件下で）オリゴヌクレオチドの各水素イオンは、非 H^+ カチオンによって置き換えられる。例えば、一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの薬学的に許容される塩は、全金属イオン塩であり、ここで、各ヌクレオチド間結合（例えば、天然リン酸結合、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合など）の各水素イオン（例えば、 $-OH$ 、 $-SH$ などの）は、金属イオンによって置き換えられる。医薬組成物について様々な好適な金属塩は当技術分野で広く公知であり、本開示に従って利用することができる。一部の実施形態において、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩である。一部の実施形態において、薬学的に許容される塩は、マグネシウム塩である。一部の実施形態において、薬学的に許容される塩は、カルシウム塩である。一部の実施形態において、薬学的

10

20

30

40

50

に許容される塩は、カリウム塩である。一部の実施形態において、薬学的に許容される塩は、アンモニウム塩（カチオン $N(R)_4^+$ ）である。一部の実施形態において、薬学的に許容される塩は、1つ及び2つ以上のタイプのカチオンを含む。一部の実施形態において、薬学的に許容される塩は、2つ以上のタイプのカチオンを含む。一部の実施形態において、カチオンは、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 又は Ca^{2+} である。一部の実施形態において、薬学的に許容される塩は、全ナトリウム塩である。一部の実施形態において、薬学的に許容される塩は、全ナトリウム塩であり、ここで、天然リン酸結合（酸形態 $-O-P(O)(OH)-O-$ ）である各ヌクレオチド間結合は、存在する場合、そのナトリウム塩形態（ $-O-P(O)(ONa)-O-$ ）として存在し、且つホスホロチオエートヌクレオチド間結合結合（酸形態 $-O-P(O)(SH)-O-$ ）である各ヌクレオチド間結合は、存在する場合、そのナトリウム塩形態（ $-O-P(O)(SNa)-O-$ ）として存在する。

10

【0491】

薬学的に許容される塩は、一般に、当業者には周知であり、限定はされないが、例として、酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ベシル酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、重酒石酸塩、臭化物、エデト酸カルシウム、カルンシレート（carnsylate）、炭酸塩、クエン酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、エシル酸塩、フマル酸塩、グルセプテート、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニレート（glycolylarsanilate）、ヘキシルリゾルシネート（hexylresorcinate）、ヒドラバミン、臭化水素酸塩、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、粘液酸塩、ナプシル酸塩、硝酸塩、パモ酸塩（エンボン酸塩）、パントテン酸塩、リン酸塩／ニリン酸塩、ポリガラクトロン酸塩、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が挙げられ得る。他の薬学的に許容される塩は、例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)に見出すことができる。好ましい薬学的に許容される塩としては、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。

20

【0492】

核酸及び／又はオリゴヌクレオチドを送達する様々な技術は、当技術分野で公知であり、本開示に従って利用することができる。例えば、様々な超分子ナノキャリアを使用して核酸を送達することができる。ナノキャリアの例としては、限定はされないが、リポソーム、カチオン性ポリマー複合体及び各種ポリマー化合物が挙げられる。様々なポリカチオンと核酸の複合体化は、細胞内送達の別のアプローチであり、これは、PEG化ポリカチオン、ポリエチレンアミン（PEI）複合体、カチオン性ブロックコポリマー及びデンドリマーの使用を含む。PEI及びポリアミドアミンデンドリマーを含むいくつかのカチオン性ナノキャリアは、エンドソームからの内容物の放出を補助する。他のアプローチとしては、ポリマーナノ粒子、ミクロスフェア、リポソーム、デンドリマー、生分解性ポリマー、コンジュゲート、プロドラッグ、硫黄若しくは鉄などの無機コロイド、抗体、インプラント、生分解性インプラント、生分解性ミクロスフェア、浸透圧調節インプラント、脂質ナノ粒子、エマルジョン、油性溶液、水溶液、生分解性ポリマー、ポリ（ラクチド-コグリコール酸）、ポリ（乳酸）、液体デポ、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。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドを別の分子と共役させる。

30

40

【0493】

治療及び／又は診断用途では、全身及び局所又は局在化投与をはじめとする、様々な投与方法のために、本開示の化合物、例えば、オリゴヌクレオチドを製剤化することができる。技術及び製剤化は、一般に、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed. 2000)に見出すことができる。

50

【0494】

一部の実施形態において、提供されるC9orf72は、グルコース、GluNAc（N-アセチルアミングルコサミン）及びアニスアミドから選択される中枢神経系への送達における使用に好適な追加の化学的部分に共役させる。

【0495】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドと共役した追加の化学的部分は、オリゴヌクレオチドを神経系中の細胞にターゲティングさせることができる。

【0496】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドと共役した追加の化学的部分は、アニスアミド又はその誘導体若しくは類似体を含み、提供されるオリゴヌクレオチドを、シグマ1受容体などの特定の受容体を発現する細胞にターゲティングさせることができる。

10

【0497】

一部の実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、その標的を発現する身体細胞及び／又は組織への投与のために製剤化される。

【0498】

一部の実施形態では、C9orf72オリゴヌクレオチドと共役した追加の化学的部分は、C9orf72オリゴヌクレオチドを神経系中の細胞にターゲティングさせることができる。

【0499】

一部の実施形態では、C9orf72オリゴヌクレオチドと共役した追加の化学的部分は、アニスアミド又はその誘導体若しくは類似体を含み、シグマ1受容体などの特定の受容体を発現する細胞にC9orf72オリゴヌクレオチドをターゲティングさせることができる。

20

【0500】

一部の実施形態では、提供されるC9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72を発現する身体細胞及び／又は組織への投与のために製剤化される。一部の実施形態では、こうした身体細胞及び／又は組織は、ニューロン又は中枢神経系の細胞及び／若しくは組織である。一部の実施形態では、中枢神経系内での本明細書に記載のオリゴヌクレオチド及び組成物の広範な分布は、実質内投与、髄腔内投与又は脳血管内投与により達成することができる。

30

【0501】

一部の実施形態では、医薬組成物は、静脈内注射、経口投与、口腔投与、吸入、鼻内投与、局所投与、点眼又は点耳用に製剤化する。一部の実施形態では、医薬組成物は、錠剤、丸薬、カプセル、液剤、吸入剤、鼻内噴霧溶液、座薬、懸濁液、ゲル、コロイド、分散液、懸濁液、溶液、エマルジョン、軟膏、ローション、点眼薬又は点耳薬である。

【0502】

一部の実施形態では、本開示は、薬学的に許容される賦形剤と混合して、キラル制御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、医薬組成物が、前述したキラル制御オリゴヌクレオチドの薬学的に許容される塩又はその組成物を含むことを認識されよう。

40

【0503】

多様な超分子ナノキャリアを用いて、核酸を送達することができる。ナノキャリアの例として、限定はされないが、リポソーム、カチオン性ポリマー複合体及び各種ポリマー物質が挙げられる。様々なポリカチオンと核酸の複合体化は、細胞内送達の別のアプローチであり、これは、PEG化ポリカチオン、ポリエチレンアミン（PEI）複合体、カチオン性ブロックコポリマー及びデンドリマーの使用を含む。PEI及びポリアミドアミンデンドリマーを含むいくつかのカチオン性ナノキャリアは、エンドソームからの内容物の放出を補助する。他のアプローチとしては、ポリマーナノ粒子、ミクロスフェア、リポソーム、デンドリマー、生分解性ポリマー、コンジュゲート、プロドラッグ、硫黄若しくは鉄などの無機コロイド、抗体、インプラント、生分解性インプラント、生分解性ミクロスフ

50

エア、浸透圧調節インプラント、脂質ナノ粒子、エマルジョン、油性溶液、水溶液、生分解性ポリマー、ポリ（ラクチド-コグリコール酸）、ポリ（乳酸）、液体デポ、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。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドを別の分子と共役させる。

【0504】

本明細書に記載する送達戦略例の他にも、別の核酸送達戦略が知られている。

【0505】

治療及び／又は診断用途では、全身及び局所又は局在化投与をはじめとする、様々な投与方法のために、本開示の化合物を製剤化することができる。技術及び製剤化は、一般に、Remington, The Science and Practice of P
harmacy, (20th ed. 2000)に見出すことができる。

10

【0506】

提供されるオリゴヌクレオチド及びその組成物は、広範な用量範囲で有効である。例えば、成人の治療では、1日当たり約0.01～約1000mg、約0.5～約100mg、約1～約50mg及び1日当たり約5～約100mgの用量が、使用可能な用量の例である。厳密な用量は、投与経路、化合物が投与される剤形、治療対象の被験者、治療対象の被験者の体重並びに担当医の選択及び経験に応じて変動する。

【0507】

一部の実施形態では、提供されるC9orf72オリゴヌクレオチドは、米国特許出願第61/774759号；12/19/13に出願された同第61/918,175号；同第61/918,927号；同第61/918,182号；同第61/918941号；同第62/025224号；同第62/046487号；又は国際出願番号PCT/米国特許出願第04/042911号；PCT/欧州特許第2010/070412号；若しくはPCT/IB2014/059503号に記載される医薬組成物に製剤化される。

20

【0508】

処置される具体的な状態に応じて、こうした薬剤を液体又は固体の剤形に製剤化して、全身又は局所に投与することができる。薬剤は、当業者には周知である通り、例えば時間設定又は持続的徐放形態で、送達することができる。製剤化及び投与のための技術は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)に見出すことができる。適切な経路としては、以下、経口、口腔、吸入スプレーによる、舌下、直腸、経皮、腔内、経粘膜、経鼻若しくは腸内投与；筋肉内、皮下、髄内注射並びに髄腔内、直接脳室内、静脈内、関節内、胸骨内、滑膜内、肝臓内、病巣内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内若しくは眼内注射を含む非経口送達又は他の送達様式を挙げることができる。

30

【0509】

注射の場合、開示の薬剤は、例えば、ハanks溶液、リンゲル溶液又は生理食塩緩衝液などの生理学的に適合性の緩衝液中などの水溶液に配合し、希釈し得る。こうした経粘膜投与の場合、透過しようとする障壁に適した浸透剤を製剤に使用する。こうした浸透剤は、当技術分野で一般に知られている。

【0510】

本開示の実施の目的で本明細書に開示される化合物を全身投与に好適な剤形に製剤化するための薬学的に許容される不活性担体の使用は、本開示の範囲内に含まれる。担体の適切な選択及び好適な製造の実施により、本開示の組成物、特に、溶液として製剤化されたものを、静脈内注射などによって非経口投与することができる。

40

【0511】

化合物、例えば、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される担体を用いて、経口投与に適した剤形に、容易に製剤化することができる。こうした担体は、治療対象の被験者（例えば、患者）による経口摂取のために、本開示の化合物を、錠剤、丸薬、カプセル、液剤、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を可能にする。

50

【0512】

経鼻又は吸入送達の場合、当業者には周知の方法により本開示の薬剤を製剤化することもでき、これは、例えば、限定されないが、食塩水などの可溶化剤、希釈剤又は分散物質、ベンジルアルコールなどの防腐剤、吸収促進剤及びフルオロカーボンを含み得る。

【0513】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド又は組成物は、有効量のオリゴヌクレオチド又は組成物と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物として投与される。一部の実施形態において、組成物は、キラル制御されている。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つ以上の薬学的に許容される塩形態を含む。一部の実施形態において、組成物は、液体組成物である。一部の実施形態において、液体組成物は、ほぼ中性のpH（例えば、約pH7）を有する。一部の実施形態において、液体組成物は、約7.4のpHを有する。一部の実施形態において、液体組成物は、緩衝液を含む。

10

【0514】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド及び組成物は、CNSに送達される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド及び組成物は、脳脊髄液に送達される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド及び組成物は、脳実質に投与される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド及び組成物は、髄腔内投与又は脳室内投与により、動物／被験者に送達される。中枢神経系内での本明細書に記載のオリゴヌクレオチド及び組成物の広範な分布は、実質内投与、髄腔内投与又は脳血管投与で達成することができる。

20

【0515】

いくつかの実施形態では、非経口投与は、注射により、例えば注射器、ポンプなどによって行われる。特定の実施形態では、注射は、ボラス注射である。いくつかの実施形態では、注射は、線条体、小脳尾、皮質、海馬及び小脳などの組織に直接投与される。

【0516】

いくつかの実施形態では、ボラス注射など、医薬剤を特に局在化する方法は、20、25、30、35、40、45又は50の係数で50%効果濃度（EC50）を低減する。いくつかの実施形態では、本明細書に更に記載される通りのアンチセンス化合物中の医薬剤である。いくつかの実施形態では、標的組織は、脳組織である。いくつかの実施形態では、標的組織は、線条体組織である。いくつかの実施形態では、EC50の低減は、それを必要とする患者における薬理学的結果を達成するのに必要な用量を減じることから、望ましい。

30

【0517】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、毎月、2ヶ月毎、90日毎、3ヶ月毎、6ヶ月毎に1回、年2回若しくは年1回の注射又は注入により送達される。

【0518】

本開示での使用に適した医薬組成物は、活性成分がその意図される目的を達成するのに有効な量で含有される組成物を含む。有効量の決定は、特に本明細書に提供される詳細な開示に照らして、十分に当業者の能力の範囲内である。

40

【0519】

活性成分に加えて、これらの医薬組成物は、活性化合物の薬学的に使用可能な製剤への処理を促進する賦形剤及び助剤を含む、薬学的に許容される好適な担体を含む。経口投与のため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。

【0520】

経口使用のための医薬製剤は、活性化合物、例えば、オリゴヌクレオチドを固体賦形剤と合わせ、得られた混合物を任意選択で粉碎し、必要に応じて適切な助剤を添加した後、顆粒の混合物を処理して、錠剤又は糖衣錠コアを取得することにより得ることができる。好適な賦形剤は、特に、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はじ

50

めとする、糖などの充填剤；セルロース製剤、例えばトウモロコシデンプン、コムギデンプン、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、ナトリウムカルボキシメチルセルロース（CMC）及び／又はポリビニルピロリドン（PVP：ポビドン）である。所望であれば、崩壊剤、例え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を添加し得る。

【0521】

一部の実施形態において、糖衣錠コアは、好適なコーティングを施して提供される。この目的のために、濃縮糖溶液を用い得、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、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール（PEG）及び／又は二酸化チタン、ラッカー溶液並びに適切な有機溶媒又は溶媒混合物を含有し得る。識別のため又は活性化化合物用量の様々な組み合わせを特徴付けるために、染料又は顔料を錠剤又は糖衣錠コーティングに添加し得る。

10

【0522】

経口で利用できる医薬製剤は、ゼラチン製の押し込み型（push-fit）カプセル及びゼラチン製のソフト密封カプセル並びにグリセロール又はソルビトールなどの可塑剤を含む。押し込み型カプセルは、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／又はタルク若しくはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、及び任意選択で安定剤と一緒に混合した状態で含有することができる。ソフトカプセル内で、活性化化合物を例えば脂肪油、液体パラフィン又は液体ポリエチレングリコール（PEG）などの適切な液体に、溶解又は懸濁させ得る。更に、安定剤を添加し得る。

20

【0523】

活性化化合物、例えば、オリゴヌクレオチドを脂質と合わせることでより組成物を取得することができる。一部の実施形態では、脂質を活性化化合物と共役させる。一部の実施形態では、脂質を活性化化合物と共役させない。一部の実施形態では、脂質は、 $C_{10} \sim C_{40}$ 直鎖、飽和若しくは部分不飽和脂肪族鎖を含む。一部の実施形態では、脂質は、1つ又は複数の $C_1 \sim 4$ 脂肪族基により任意選択で置換された $C_{10} \sim C_{40}$ 直鎖、飽和若しくは部分不飽和脂肪族鎖を含む。一部の実施形態では、脂質は、以下：ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α リノール酸、 γ リノール酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸（turbinaric acid）及びジリノレイルからなる群から選択される。一部の実施形態では、活性化化合物は、本明細書に記載される任意のオリゴヌクレオチド又は他の核酸である。一部の実施形態では、活性化化合物は、表A1に挙げる何れかの核酸の任意の配列を含むか、それから構成される配列の核酸である。一部の実施形態では、組成物は、脂質及び活性化化合物を含み、更に、別の脂質及びターゲティング化合物又は部分から選択される別の構成要素も含む。一部の実施形態では、脂質は、限定しないが、以下：アミノ脂質；両親媒性脂質；アニオン性脂質；アポリボタンパク質；カチオン性脂質；低分子量カチオン性脂質；CLINDMA及びDLINDMAなどのカチオン性脂質；イオン化カチオン性脂質；クローキング成分；ヘルパー脂質；リポペプチド；中性脂質；中性双性イオン脂質；疎水性小分子；疎水性ビタミン；PEG脂質；1つ又は複数の親水性ポリマーで修飾された非荷電脂質；リン脂質；1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンなどのリン脂質；ステルス脂質；ステロール；コレステロール；及びターゲティング脂質；並びに本明細書に記載されるか又は当技術分野で報告されている何れか他の脂質を含む。一部の実施形態では、組成物は、脂質と、別の脂質の少なくとも1つの機能を媒介することができる別の脂質の一部分を含む。一部の実施形態では、ターゲティング化合物又は部分は、特定の細胞若しくは組織又は細胞若しくは組織のサブセットに化合物（例えば、脂質と活性化化合物を含む組成物）をターゲティングさせることができる。一部の実施形態では、ターゲティング部分は、特定の標的、受容体、タンパク質又は他の細胞分画物の細胞若しくは組織特異的発現を利用するように設計される。一部の実施形態では、ターゲティング部分は、組成物を細胞若しくは組織にターゲティングさせて、且つ／又は標的、受容体、

30

40

50

タンパク質若しくは他の細胞分画物と結合させるリガンド（例えば、小分子、抗体、ペプチド、タンパク質、炭水化物、アプタマーなど）である。

【0524】

活性化合物の送達用の組成物の調製に使用するためのいくつかの脂質の例は、活性化合物の機能を可能にする（例えば、それを阻止又は妨害しない）。脂質の非限定的な例として、以下：ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α リノール酸、 γ リノール酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸及びジリノレイルが挙げられる。

【0525】

本開示に記載される通り、脂肪酸との共役などの脂質共役により、オリゴヌクレオチドの1つ又は複数の特性が改善され得る。

【0526】

一部の実施形態では、活性化合物の送達用の組成物は、活性化合物を、要望される通りに、特定の細胞又は組織にターゲティングさせることができる。一部の実施形態では、活性化合物の送達用の組成物は、活性化合物を筋肉細胞又は組織にターゲティングさせることができる。一部の実施形態では、本開示は、活性化合物の送達に関連する組成物及び方法に関し、ここで、組成物は、活性化合物、脂質を含む。筋肉細胞又は組織に対する様々な実施形態では、脂質は、以下：ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α リノール酸、 γ リノール酸、ドコサヘキサエン酸（シス-DHA）、ツルビナル酸及びジリノレイルから選択される。

【0527】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドを含む組成物は、凍結乾燥されている。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドを含む組成物は凍結乾燥されており、且つ凍結乾燥オリゴヌクレオチドはバイアル中に存在する。

【0528】

治療又は予防しようとする特定の障害に応じて、その状態を治療又は予防するために通常投与される別の治療薬を本開示のC9orf72オリゴヌクレオチドと一緒に投与し得る。

【0529】

一部の実施形態では、第1のC9orf72オリゴヌクレオチドと一緒に投与される第2の治療薬は、第2の異なるC9orf72オリゴヌクレオチドである。

【0530】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるC9orf72オリゴヌクレオチドは、C9orf72関連障害若しくはその症状の予防及び／又は治療方法或いはそうした方法に使用するための薬剤の製造に使用することができる。

【0531】

一部の実施形態において、本開示は、以下の実施例実施形態を提供する：

1. 糖、塩基又はヌクレオチド間結合の少なくとも1つの修飾を含むオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C9orf72遺伝子又はその転写物の塩基配列と少なくとも80%同一であるか又は相補的である塩基配列の少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25隣接塩基であるか又はそれを含み、且つオリゴヌクレオチドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される置き換え核酸塩基によって任意選択で置き換えられているオリゴヌクレオチド。

2. 糖、塩基又はヌクレオチド間結合の少なくとも1つの修飾を含むオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C9orf72遺伝子又はその転写物の塩基配列と同一であるか又は相補的である塩基配列の少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25隣接塩基を含むオリゴヌクレオチド。

3. 実施形態1に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、C9orf72遺伝子又はその転写物の塩基配列と同一であるか又は相補的である塩基配列の少なくとも19隣接塩基を含むオリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

4. 上記実施形態の何れか1つに記載のオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C9orf72遺伝子又はその転写物の塩基配列又はその任意の部分と完全に同一又は相補的でないオリゴヌクレオチド。
5. 実施形態4に記載のオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、最大相補性についてアラインメントされたとき、A及びT、A及びU並びにC及びGから選択される塩基対合でないその3'末端のミスマッチを含むオリゴヌクレオチド。
6. 上記実施形態の何れか1つに記載のオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオシドは、イノシンであるオリゴヌクレオチド。
7. 実施形態1～3のオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C9orf72遺伝子又はその転写物の塩基配列と完全に同一あるか又は相補的であるオリゴヌクレオチド。 10
8. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、A C T C A C C C A C T C G C C A C C G Cであるオリゴヌクレオチド。
9. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、C9orf72転写物を含む系に投与されたとき、リピート伸長含有C9orf72転写物のレベルを低減するオリゴヌクレオチド。
10. 実施形態9のオリゴヌクレオチドにおいて、リピート伸長含有C9orf72転写物は、少なくとも30、50、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900又は1000個のGGGGCCリピートを含むオリゴヌクレオチド。 20
11. 実施形態10のオリゴヌクレオチドにおいて、パーセンテージによって測定されるときのリピート伸長含有C9orf72転写物のレベルの低減は、パーセンテージによって測定されるときに非リピート伸長含有C9orf72転写物のレベルの低減の少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9又は10倍であるオリゴヌクレオチド。
12. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、C9orf72エクソン1a、イントロン1、エクソン1b又はエクソン2における部位にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。
13. 上記実施形態の何れかのオリゴヌクレオチドにおいて、結合リンがSp配置である少なくとも1つのヌクレオチド間結合を含むオリゴヌクレオチド。 30
14. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、コアと少なくとも2つのウィングとを含み、各コア及び各ウィングは、独立に1つ以上のヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチド。
15. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィング-コア-ウィング-3'構造を含むか又はそれからなるオリゴヌクレオチド。
16. 実施形態14～15の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィングの糖修飾のパターンは、3'-ウィングの糖修飾のパターンと異なるオリゴヌクレオチド。
17. 実施形態15～16の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各ウィング糖は、独立に2'-修飾を含むオリゴヌクレオチド。
18. 実施形態15～16の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各ウィング糖は、独立に2'-OR修飾を含み、式中、Rは、任意選択で置換されたC₁～6脂肪族であるオリゴヌクレオチド。 40
19. 実施形態15～16の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、一方のウィングは、2'-OMeを含み、及び他方のウィングは、含まないオリゴヌクレオチド。
20. 実施形態15～16の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、一方のウィングは、2'-MOEを含み、及び他方のウィングは、含まないオリゴヌクレオチド。
21. 実施形態15～16の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、一方のウィングは、2'-OMeを含み、2'-MOEを含まず、及び他方のウィングは、2'-MOEを含み、2'-OMeを含まないオリゴヌクレオチド。
22. 実施形態15～16の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィング 50

は、1つ以上の2'-OMe修飾糖と、1つ以上の2'-MOE修飾糖とを含むオリゴヌクレオチド。

23. 実施形態15~16の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各5'-ウィング糖は、独立に2'-OR修飾糖であり、式中、Rは、任意選択で置換されたC₁~6脂肪族であるオリゴヌクレオチド。

24. 実施形態15~16の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、3'-ウィング糖は、1つ以上の2'-OMe修飾糖と、1つ以上の2'-MOE修飾糖とを含むオリゴヌクレオチド。

25. 実施形態15~16の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィング糖は、その5'末端及び3'末端の2'-OMe修飾糖を含み、及び5'-ウィング中の各他の糖は、独立に2'-MOE修飾糖であるオリゴヌクレオチド。

26. 実施形態15~25の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィング糖は、1つ以上の天然リン酸結合を含むオリゴヌクレオチド。

27. 実施形態15~26の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィング糖は、1つ以上の1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合を含むオリゴヌクレオチド。

28. 実施形態27のオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィングの5'からの2つの5'-ウィングヌクレオチドに結合している第1のヌクレオチド間結合は、修飾ヌクレオチド間結合であるオリゴヌクレオチド。

29. 実施形態26~28の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、2つの5'-ウィングヌクレオチドに結合している各他のヌクレオチド間結合は、天然リン酸結合であるオリゴヌクレオチド。

20

30. 実施形態26~29の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各修飾ヌクレオチド間は、独立にホスホロチオエートヌクレオチド間結合であるオリゴヌクレオチド。

31. 実施形態26~29の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合は、独立にホスホロチオエートヌクレオチド間結合であるオリゴヌクレオチド。

32. 実施形態26~29及び31の何れか1つの何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合は、独立に非負電荷ヌクレオチド間結合であるオリゴヌクレオチド。

33. 実施形態30~32の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Spであるオリゴヌクレオチド。

30

34. 実施形態15~33の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィング糖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の核酸塩基を含むオリゴヌクレオチド。

35. 実施形態15~33の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'-ウィング糖は、5つ以下の核酸塩基を含有するオリゴヌクレオチド。

36. 実施形態15~35の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各3'-ウィング糖は、独立に2'-OR修飾糖を含み、式中、Rは、任意選択で置換されたC₁~6脂肪族であるオリゴヌクレオチド。

37. 実施形態15~35の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、3'-ウィング糖は、1つ以上の2'-OMe修飾糖と、1つ以上の2'-MOE修飾糖とを含むオリゴヌクレオチド。

40

38. 実施形態15~35の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各3'-ウィング糖は、独立に2'-OMe修飾糖であるオリゴヌクレオチド。

39. 実施形態15~38の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、2つの3'-ウィング糖に結合している1つ以上のヌクレオチド間結合は、独立に修飾ヌクレオチド間結合であるオリゴヌクレオチド。

40. 実施形態15~39の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、2つの3'-ウィング糖に結合している1つ以上のヌクレオチド間結合は、天然リン酸結合であるオリゴヌクレオチド。

50

41. 実施形態15～38の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、2つの3'-ウイング糖に結合している各ヌクレオチド間結合は、独立に修飾ヌクレオチド間結合であるオリゴヌクレオチド。

42. 実施形態39～41の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各修飾ヌクレオチド間結合は、独立にホスホロチオエートヌクレオチド間結合であるオリゴヌクレオチド。

43. 実施形態39～41の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合は、独立にホスホロチオエートヌクレオチド間結合であるオリゴヌクレオチド。

44. 実施形態39～41及び43の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合は、独立に非負電荷ヌクレオチド間結合であるオリゴヌクレオチド。

45. 実施形態42～44の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、Spであるオリゴヌクレオチド。

46. 実施形態14～45の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、3'-ウイングは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の核酸塩基を含むオリゴヌクレオチド。

47. 実施形態46のオリゴヌクレオチドにおいて、3'-ウイングは、5つ以下の核酸塩基を含有するオリゴヌクレオチド。

48. 実施形態46のオリゴヌクレオチドにおいて、3'-ウイングは、4つ以下の核酸塩基を含有するオリゴヌクレオチド。

49. 実施形態46のオリゴヌクレオチドにおいて、3'-ウイングは、3つ以下の核酸塩基を含有するオリゴヌクレオチド。

50. 実施形態14～49の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、コアは、2'-ORを含む糖を含まないオリゴヌクレオチド。

51. 実施形態14～50の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各コア糖は、独立に2つの2'-Hを含むオリゴヌクレオチド。

52. 実施形態14～51の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチド又はコアは、

$(Np)_t [(Op/Rp)_n (Sp)_m] y$

(式中、

tは、1～50であり；

nは、1～10であり；

mは、1～50であり；

yは、1～10であり；

Npは、Rp又はSpの何れかであり；

Spは、キラル修飾ヌクレオチド間結合のキラルな結合リンのS配置を示し；

Opは、天然リン酸結合のアキラルな結合リンを示し；及び

Rpは、キラル修飾ヌクレオチド間結合のキラルな結合リンのS配置を示し；及び

yは、1～10である)

の骨格キラル中心(結合リン)のパターンを含むオリゴヌクレオチド。

53. 実施形態52のオリゴヌクレオチドにおいて、コアは、 $(Np)_t [(Op/Rp)_n (Sp)_m] y$ の骨格キラル中心のパターンを含むオリゴヌクレオチド。

54. 実施形態52のオリゴヌクレオチドにおいて、コアの骨格キラル中心のパターンは、 $(Np)_t [(Op/Rp)_n (Sp)_m] y$ であるオリゴヌクレオチド。

55. 実施形態52～54の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各Npは、Spであるオリゴヌクレオチド。

56. 実施形態52～55の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、パターンは、少なくとも1つのRpを含むオリゴヌクレオチド。

57. 実施形態52～55の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、パターンは、(

10

20

30

40

50

N p) t [(R p) n (S p) m] yであるオリゴヌクレオチド。

58. 実施形態52～57の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、少なくとも1つのnは、1であるオリゴヌクレオチド。

59. 実施形態52～57の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各nは、1であるオリゴヌクレオチド。

60. 実施形態52～59の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、yは、1であるオリゴヌクレオチド。

61. 実施形態52～59の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、yは、2であるオリゴヌクレオチド。

62. 実施形態52～61の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、tは、2以上であるオリゴヌクレオチド。 10

63. 実施形態52～61の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、tは、3以上であるオリゴヌクレオチド。

64. 実施形態52～61の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、tは、2～20であるオリゴヌクレオチド。

65. 実施形態52～61の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、tは、3～20であるオリゴヌクレオチド。

66. 実施形態52～65の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、少なくとも1つのmは、2～20であるオリゴヌクレオチド。

67. 実施形態52～66の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、少なくとも1つのmは、2であるオリゴヌクレオチド。 20

68. 実施形態52～65の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、少なくとも1つのmは、3、4、5、6、7、8、9又は10であるオリゴヌクレオチド。

69. 実施形態52～68の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各mは、独立に2～20であるオリゴヌクレオチド。

70. 実施形態52～69の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'からの[(Op/Rp)n(Sp)m]yの第1の出現は、RpSpSpであるオリゴヌクレオチド。

71. 実施形態52～69の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'からの[(Op/Rp)n(Sp)m]yの第1の出現は、RpSpSpSpであるオリゴヌクレオチド。 30

72. 実施形態52～69の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、5'からの[(Op/Rp)n(Sp)m]yの第1の出現は、RpSpSpSpSpであるオリゴヌクレオチド。

73. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、GGGGCCリピートと同一又は相補的でない配列を含むオリゴヌクレオチド。

74. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、何れのリピートとも同一又は相補的でない配列を含むオリゴヌクレオチド。

75. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、GGGGCCリピートと同一又は相補的でないオリゴヌクレオチド。 40

76. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C9orf72イントロ配列をターゲティングする配列を含むオリゴヌクレオチド。

77. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C9orf72遺伝子のイントロン又はその転写物の塩基配列と同一であるか又は相補的である塩基配列の少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25隣接塩基を含むオリゴヌクレオチド。

78. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、C9orf72遺伝子又はその転写物の特徴的な塩基配列と同一であるか又 50

は相補的である塩基配列の少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25隣接塩基を含むオリゴヌクレオチド。

79. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、疾患関連C9orf72産物のレベルを優先的に低減するオリゴヌクレオチド。

80. 実施形態79のオリゴヌクレオチドにおいて、産物は、伸長GGGGCCリピートを含む転写物であるオリゴヌクレオチド。

81. 実施形態79のオリゴヌクレオチドにおいて、産物は、少なくとも30、50、100、200、300、400又は500個のGGGGCCリピートを含む転写物であるオリゴヌクレオチド。

82. 実施形態79のオリゴヌクレオチドにおいて、産物は、伸長GGGGCCリピートを含むアンチセンス転写物であるオリゴヌクレオチド。

83. 実施形態79のオリゴヌクレオチドにおいて、産物は、ジペプチドリピータンパク質であるオリゴヌクレオチド。

84. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各非負電荷ヌクレオチド間結合は、n001であるオリゴヌクレオチド。

85. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、PIII-1、PIII-2、PIII-5、PIII-6、PV-1、PV-2、PV-3、PV-4、PV-5及びPV-6の構造を有する結合を含むオリゴヌクレオチド。

86. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、PV-1、PV-2、PV-3、PV-4、PV-5及びPV-6の構造を有する結合を含むオリゴヌクレオチド。

87. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、PIII-1、PIII-2、PV-1、PV-2、PV-3又はPV-4の構造を有する結合を含むオリゴヌクレオチド。

88. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、PV-1、PV-2、PV-3又はPV-4の構造を有する結合を含むオリゴヌクレオチド。

89. 実施形態1～142の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各キラルヌクレオチド間結合は、独立にPIII-1、PIII-2、PIII-5、PIII-6、PV-1、PV-2、PV-3、PV-4、PV-5及びPV-6の構造を有するオリゴヌクレオチド。

90. 実施形態1～142の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各キラルヌクレオチド間結合は、独立にPV-1、PV-2、PV-3、PV-4、PV-5及びPV-6の構造を有するオリゴヌクレオチド。

91. 実施形態1～142の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各キラルヌクレオチド間結合は、独立にPIII-1、PIII-2、PV-1、PV-2、PV-3又はPV-4の構造を有するオリゴヌクレオチド。

92. 実施形態1～142の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各キラルヌクレオチド間結合は、独立にPV-1、PV-2、PV-3又はPV-4の構造を有するオリゴヌクレオチド。

93. オリゴヌクレオチドにおいて、WV-17819、WV-17820、WV-17821、WV-17822、WV-17885、WV-18851、WV-18852、WV-20761、WV-20762、WV-20763、WV-20764、WV-20765、WV-20766、WV-20767、WV-20768、WV-20769、WV-20770、WV-20771、WV-20772、WV-20773、WV-20774、WV-20775、WV-21145、WV-21146、WV-21147、WV-21148、WV-21149、WV-21150、WV-21151、WV-21152、WV-21153、WV-21154、WV-21155、WV-21156、WV-21157、WV-21158、WV-21159、WV-21160、WV-21161、WV-21162、WV-21163、WV-21164、WV-21165、WV-21166、WV-21167、WV-21168、WV-21169、

10

20

30

40

50

WV-21170、WV-21171、WV-21172、WV-21173、WV-21174、WV-21206、WV-21207、WV-21208、WV-21209、WV-21259、WV-21344、WV-21345、WV-21346、WV-21347、WV-21442、WV-21443、WV-21445、WV-21446、WV-21506、WV-21507、WV-21508、WV-21509、WV-21510、WV-21511、WV-21512、WV-21513、WV-21514、WV-21515、WV-21516、WV-21517、WV-21518、WV-21519、WV-21520、WV-21521、WV-21522、WV-21523、WV-21524、WV-21525、WV-21526、WV-21552、WV-21553、WV-21554、WV-21555、WV-21556、WV-21557、WV-21558、WV-21559、WV-21560、WV-21561、WV-21562、WV-21563、WV-21564、WV-21565、WV-21566、WV-21567、WV-21568、WV-21569、WV-21570、WV-23435、WV-23436、WV-23437、WV-23438、WV-23439、WV-23440、WV-23441、WV-23442、WV-23443、WV-23444、WV-23453、WV-23454、WV-23455、WV-23456、WV-23457、WV-23458、WV-23459、WV-23460、WV-23461、WV-23462、WV-23486、WV-23487、WV-23488、WV-23489、WV-23490、WV-23491、WV-23492、WV-23493、WV-23494、WV-23495、WV-23496、WV-23497、WV-23498、WV-23503、WV-23648、WV-23649、WV-23650、WV-23740、WV-23741、WV-23742、WV-26633、WV-27092、WV-27093、WV-27094、WV-27095、WV-27104、WV-27105、WV-27106、WV-27107、WV-27108、WV-27109、WV-27110、WV-27134、WV-27135、WV-27136、WV-27137、WV-27138、WV-27139、WV-27140、WV-27141、WV-27142、WV-27143、WV-27144、WV-30206、WV-30210、WV-30211又はWV-30212であるオリゴヌクレオチド。

10

20

94. 実施形態67のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23491、WV-21445、WV-23457、WV-23453、WV-23742、WV-23741、WV-21522、WV-21446、WV-23486、WV-23457、WV-21522、WV-23453、WV-23487又はWV-30206、WV-30210、WV-30211又はWV-30212であるオリゴヌクレオチド。

30

95. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23491であるオリゴヌクレオチド。

96. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-21445であるオリゴヌクレオチド。

97. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23457であるオリゴヌクレオチド。

40

98. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23453であるオリゴヌクレオチド。

99. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23742であるオリゴヌクレオチド。

100. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23741であるオリゴヌクレオチド。

101. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-21522であるオリゴヌクレオチド。

102. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-21446であるオリゴヌクレオチド。

50

103. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23486であるオリゴヌクレオチド。
104. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23457であるオリゴヌクレオチド。
105. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-21522であるオリゴヌクレオチド。
106. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23453であるオリゴヌクレオチド。
107. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-23487であるオリゴヌクレオチド。
108. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-30206であるオリゴヌクレオチド。
109. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-30210であるオリゴヌクレオチド。
110. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-30211であるオリゴヌクレオチド。
111. 実施形態93のオリゴヌクレオチドにおいて、WV-30212であるオリゴヌクレオチド。
112. 実施形態93～111の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、塩形態であるオリゴヌクレオチド。
113. 実施形態93～111の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、薬学的に許容される塩形態であるオリゴヌクレオチド。
114. 実施形態93～113又は表A1の何れか1つのオリゴヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドにおいて、各Spホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立にPV-3又はPV-5で置換されているオリゴヌクレオチド。
115. 実施形態114のオリゴヌクレオチドにおいて、実施形態93～113の何れか1つのオリゴヌクレオチドであり、各Spホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立にPV-3で置換されているオリゴヌクレオチド。
116. 実施形態93～115又は表A1の何れか1つのオリゴヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドにおいて、各Rpホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立にPV-4又はPV-6で置換されているオリゴヌクレオチド。
117. 実施形態93～115又は表A1の何れか1つのオリゴヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドにおいて、各Rpホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立にPV-4で置換されているオリゴヌクレオチド。
118. 実施形態114～115の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各Rpホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立にPV-4又はPV-6で置換されているオリゴヌクレオチド。
119. 実施形態114～115の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各Rpホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立にPV-4で置換されているオリゴヌクレオチド。
120. 実施形態93～115又は表A1の何れか1つのオリゴヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドにおいて、各Rp非負電荷ヌクレオチド間結合は、独立にPV-1で置換されているオリゴヌクレオチド。
121. 実施形態114～119の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各Rp非負電荷ヌクレオチド間結合は、独立にPV-1で置換されているオリゴヌクレオチド。
122. 実施形態93～115又は表A1の何れか1つに記載のオリゴヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドにおいて、各Sp非負電荷ヌクレオチド間結合は、独立にPV-2で置換されているオリゴヌクレオチド。
123. 実施形態114～121の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各Sp非負電荷ヌクレオチド間結合は、独立にPV-2で置換されているオリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

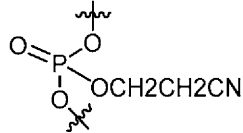
50

124. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各非負電荷ヌクレオチド間結合は、独立にn001であるオリゴヌクレオチド。

125. 実施形態114～124の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各天然リン酸結合は、オリゴヌクレオチド合成において利用された前駆体で独立に置換されているオリゴヌクレオチド。

126. 実施形態114～125の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各天然リン酸結合は、独立に

【化61】



で置換されているオリゴヌクレオチド。

127. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、 $R^A U$ の1つ以上の出現は、独立に任意選択で置換されたフェニルであるオリゴヌクレオチド。

128. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、 $R^A U$ の1つ以上の出現は、独立に任意選択で置換された $C_1 \sim 6$ 脂肪族であるオリゴヌクレオチド。

129. 実施形態1～127の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各 $R^A U$ は—Phであるオリゴヌクレオチド。

130. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、 R' の1つ以上の出現は、独立に—C(O)Rであるオリゴヌクレオチド。

131. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各 R' は、独立に—C(O)Rであるオリゴヌクレオチド。

132. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、各 R' は、独立に—C(O)CH₃であるオリゴヌクレオチド。

133. 実施形態1のオリゴヌクレオチドにおいて、実施形態93～132の何れか1つのオリゴヌクレオチドであるオリゴヌクレオチド。

134. 糖、塩基又はヌクレオチド間結合の少なくとも1つの修飾を含むオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの塩基配列は、標的遺伝子又はその転写物の塩基配列と同一であるか又は相補的である塩基配列の少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25隣接塩基を含み、オリゴヌクレオチドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される異なる核酸塩基により任意選択で置き換えられているオリゴヌクレオチド。

135. 実施形態1～134の何れかのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される置き換え核酸塩基によって置き換えられているオリゴヌクレオチド。

136. 実施形態1～135の何れかのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される置き換え核酸塩基によって置き換えられており、置き換えは、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間にその位置でミスマッチを導入するオリゴヌクレオチド。

137. 実施形態1～135の何れかのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される置き換え核酸塩基によって置き換えられており、置き換えは、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間にその位置でゆらぎ塩基対を導入するオリゴヌクレオチド。

138. 実施形態1～135の何れかのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される置き換え核酸塩基によって置き換えられており、置き換えは、オリゴヌクレオチドの活性を増加させるオリゴヌクレオチド。

139. 実施形態1～138の何れかのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される置き換え核酸塩基によって置き換えられており、置き換えは、オリゴヌクレオチドの活性を少なくとも25%増加させるオリゴヌクレオチド。

140. 実施形態1～138の何れかのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される置き換え核酸塩基によって置き換えられており、置き換えは、オリゴヌクレオチドの活性を少なくとも50%増加させるオリゴヌクレオチド。

141. 実施形態1～138の何れかのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される置き換え核酸塩基によって置き換えられており、置き換えは、オリゴヌクレオチドの活性を少なくとも100%増加させるオリゴヌクレオチド。

142. 実施形態1～138の何れかのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの3'末端上の核酸塩基は、I、A、T、U、G及びCから選択される置き換え核酸塩基によって置き換えられており、置き換えは、オリゴヌクレオチドの活性を少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍又はそれを超えて増加させるオリゴヌクレオチド。

143. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチド中の各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、独立に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%又は99%のジアステレオマー純度を有するオリゴヌクレオチド。

144. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチド中の各キラルヌクレオチド間結合は、独立に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%又は99%のジアステレオマー純度を有するオリゴヌクレオチド。

145. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチドにおいて、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%のジアステレオマー純度を有するオリゴヌクレオチド。

146. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド又はその塩形態を含む組成物。

147. 実施形態1～145の何れか1つのオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容される塩形態を含むか又は送達する医薬組成物。

148. 実施形態147の組成物において、薬学的に許容される担体を更に含む組成物。

149. 実施形態146～148の何れか1つの組成物において、塩形態は、オリゴヌクレオチドのナトリウム塩である組成物。

150. 実施形態146～149の何れか1つの組成物において、キラル制御されている組成物。

151.

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

によって特徴付けられる特定のオリゴヌクレオチドタイプのオリゴヌクレオチドを含む組成物において、

同じ共通の塩基配列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、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について集積されており；及びオリゴヌクレオチドは、C9orf72をターゲティングする組成物。

152.

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

によって特徴付けられる特定のオリゴヌクレオチドタイプ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において、

同じ共通の塩基配列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、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について集積されており；及び

特定のオリゴヌクレオチドタイプの各オリゴヌクレオチドは、独立に実施形態 1 ～ 1 4 5 の何れかのオリゴヌクレオチド又はその塩形態であるオリゴヌクレオチド組成物。

1 5 3 . 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において、

複数のオリゴヌクレオチドは、同じ構成のものであり、

複数のオリゴヌクレオチドは、1 つ以上（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20又はそれを超える）のキラル制御されたヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有し；

同じ共通の塩基配列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、組成物が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について集積されており；及び

複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に実施形態 1 ～ 1 1 7 の何れかのオリゴヌクレオチド又はその塩形態であるオリゴヌクレオチド組成物。

1 5 4 .

a) 共通の塩基配列；

b) 共通の骨格結合のパターン；

c) 共通の骨格キラル中心のパターン

を有する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において、

組成物中の複数のオリゴヌクレオチドのレベルはランダムでなく；及び

複数の各オリゴヌクレオチドは、独立に実施形態 1 ～ 1 4 5 の何れかのオリゴヌクレオチド又はその塩形態であるオリゴヌクレオチド組成物。

1 5 5 . 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において、

複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に実施形態 1 ～ 1 4 5 の何れかのオリゴヌクレオチド又はその塩形態であり；

複数のオリゴヌクレオチドは、1 つ以上（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20又はそれを超える）のキラル制御されたヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有し、及びキラル制御されたヌクレオチド間結合の1 つ以上（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20又はそれを超える）又は各々は、独立に組成物中の約又は少なくとも約少なくとも90%、95%、96%、97%、98%又は99%のジアステレオマー純度を有するオリゴヌクレオチド組成物。

1 5 6 . 実施形態 1 5 5 の組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、5 つ以上のヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有し、その各々は、独立に組成物中の約又は少なくとも約少なくとも90%、95%、96%、97%、98%又は99%のジアステレオマー純度を有する組成物。

1 5 7 . 実施形態 1 5 5 の組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、各ホスホロチオエートヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有し、その各々は、独立に組成物中の約又は少なくとも約少なくとも90%、95%、96%、97%、98%又は99%のジアステレオマー純度を有する組成物。

1 5 8 . 実施形態 1 5 5 の組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、各キラルヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有し、その各々は、独立に組成物中の約又は少なくとも約少なくとも90%、95%、96%、97%、98%又は99%のジアステレオマー純度を有する組成物。

1 5 9 . 実施形態 1 5 1 ～ 1 5 8 の何れか1つの組成物において、特定のタイプのオリゴヌクレオチド又は複数のオリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を共有する組成物中の全てのオリゴヌクレオチドの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%又は約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%又は少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、5

10

20

30

40

50

0 %、60 %、70 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %若しくは99 %) が、特定のタイプのオリゴヌクレオチド又は複数のオリゴヌクレオチドであるように集積されている組成物。

160. 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において、

複数のオリゴヌクレオチドは、同じ構成のものであり；

複数のオリゴヌクレオチドは、1つ以上（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20又はそれを超える）のキラル制御されたヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有し；

各キラル制御されたヌクレオチド間結合で、同じ構成を共有する組成物中の全てのヌクレオチドの少なくとも90 %、95 %、96 %、97 %、98 %又は99 %は、同じ結合リン立体化学を共有し；及び

複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に実施形態1～145の何れかのオリゴヌクレオチド又はその塩形態であるオリゴヌクレオチド組成物。

161. 実施形態153～160の何れか1つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも5つのヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有する組成物。

162. 実施形態153～161の何れか1つの組成物において、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ヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有する組成物。

163. 実施形態153～162の何れか1つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、独立に1つ以上の非負電荷ヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有する組成物。

164. 実施形態153～162の何れか1つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、独立に各非負電荷ヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有する組成物。

165. 実施形態153～162の何れか1つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、独立に各キラルヌクレオチド間結合で同じ結合リン立体化学を共有する組成物。

166. 実施形態153～165の何れか1つの組成物において、複数又はタイプのオリゴヌクレオチドは、同じ構造を共有する組成物。

167. 実施形態151～166の何れか1つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に

$m A * S m 5 C e o n 0 0 1 R T e o m 5 C e o n 0 0 1 R m A * S C * S C * S C * R$
 $A * S C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C n 0 0 1 R m 5 C e o$
 $* S m G * S m C$

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される塩であり；

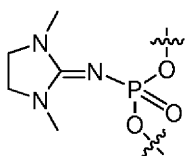
mは、ヌクレオシドへの2'-OMe修飾を表し；

* Sは、Spホスホロチオエート結合を表し；

m5Ce oは、5-メチル2'-O-メトキシエチルCを表し；

n001Rは、Rp n001結合を表し、n001結合は、

【化62】



の構造を有し；

e oは、ヌクレオシドへの2'-OCH₂CH₂OCH₃修飾を表し；

* Rは、Rpホスホロチオエート結合を表し；及び

m5は、Cの5位のメチルを表す組成物。

168. 実施形態151～166の何れか1つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に

$m A * S m 5 C e o n 0 0 1 R T e o m 5 C e o n 0 0 1 R m A * S C * S C * S C * R$
 $A * S C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C * S m 5 C e o n 0 0$
 $1 R m G * S m C$

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される塩であり；

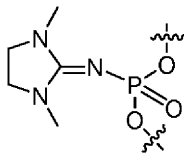
m は、ヌクレオシドへの2'-OMe修飾を表し；

$* S$ は、 $S p$ ホスホロチオエート結合を表し；

$m 5 C e o$ は、5-メチル2'-O-メトキシエチルCを表し；

$n 0 0 1 R$ は、 $R p$ $n 0 0 1$ 結合を表し、 $n 0 0 1$ 結合は、

【化63】



の構造を有し；

$e o$ は、ヌクレオシドへの2'-OCH₂CH₂OCH₃修飾を表し；

$* R$ は、 $R p$ ホスホロチオエート結合を表し；及び

$m 5$ は、Cの5位のメチルを表す組成物。

169. 実施形態151～166の何れか1つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に

$m A * S m 5 C e o n 0 0 1 R T e o m 5 C e o n 0 0 1 R m A * S C * S C * S C * R$
 $A * S C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C * S m 5 C e o * S m$
 $G n 0 0 1 R m C$

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される塩であり；

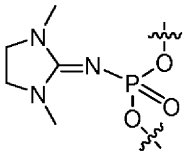
m は、ヌクレオシドへの2'-OMe修飾を表し；

$* S$ は、 $S p$ ホスホロチオエート結合を表し；

$m 5 C e o$ は、5-メチル2'-O-メトキシエチルCを表し；

$n 0 0 1 R$ は、 $R p$ $n 0 0 1$ 結合を表し、 $n 0 0 1$ 結合は、

【化64】



の構造を有し；

$e o$ は、ヌクレオシドへの2'-OCH₂CH₂OCH₃修飾を表し；

$* R$ は、 $R p$ ホスホロチオエート結合を表し；及び

$m 5$ は、Cの5位のメチルを表す組成物。

170. 実施形態151～166の何れか1つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に

$m C * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S T * S C * R A * S C * S C * R C *$
 $S A * S C * S T * S m 5 m C * S m G * S m C * S m 5 m C * S m G$

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される塩であり；

m は、ヌクレオシドへの2'-OMe修飾を表し；

$* S$ は、 $S p$ ホスホロチオエート結合を表し；

$m 5 C e o$ は、5-メチル2'-O-メトキシエチルCを表し；

10

20

30

40

50

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し；

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し；及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表す組成物。

171. 実施形態 151 ~ 166 の何れか 1 つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に

m A * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S C * S C * R A * S C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C * S m 5 m C * S m G * S m 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される塩であり；

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し；

* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し；

m 5 C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し；

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し；

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し；及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表す組成物。

172. 実施形態 151 ~ 166 の何れか 1 つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に

m C * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S T * S C * R A * S C * S C * R C * S A * S C * S T * S m 5 C e o * S m G * S m C * S m 5 C e o * S m 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される塩であり；

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し；

* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し；

m 5 C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し；

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し；

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し；及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表す組成物。

173. 実施形態 151 ~ 166 の何れか 1 つの組成物において、複数のオリゴヌクレオチドは、各々独立に

m A * S m 5 C e o T e o m 5 C e o m A * S C * S C * S C * R A * S C * S T * S m 5 C * S G * R m 5 C * S C * S m A * S m C * S m 5 C e o * S m G * S m 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される塩であり；

m は、ヌクレオシドへの 2' - OMe 修飾を表し；

* S は、S p ホスホロチオエート結合を表し；

m 5 C e o は、5 - メチル 2' - O - メトキシエチル C を表し；

e o は、ヌクレオシドへの 2' - OCH₂CH₂OCH₃ 修飾を表し；

* R は、R p ホスホロチオエート結合を表し；及び

m 5 は、C の 5 位のメチルを表す組成物。

174. 実施形態 151 ~ 173 の何れか 1 つの組成物において、各オリゴヌクレオチドは、独立に塩形態である組成物。

175. 実施形態 151 ~ 173 の何れか 1 つの組成物において、各オリゴヌクレオチドは、独立に薬学的に許容される塩形態である組成物。

176. 実施形態 174 の何れか 1 つの組成物において、塩形態は、ナトリウム形態である組成物。

177. 実施形態 151 ~ 176 の何れか 1 つの組成物を含むか又は送達する医薬組成物。

178. 実施形態 177 の組成物において、薬学的に許容される担体を更に含む組成物。

179. 方法において、C 9 o r f 7 2 伸長リピートに関連する病態、障害及び／又は疾患に罹患しているか又はそれに罹り易い対象に、有効量の上記実施形態の何れか 1 つのオリゴヌクレオチド又は組成物を投与することを含む方法。

180. 実施形態 179 の方法において、病態、障害及び／又は疾患は、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、前頭側頭型認知症（F T D）、大脳皮質基底核変性症候群（C B D）、

10

20

30

40

50

非定型パーキンソン症候群、オリブ橋小脳変性症（OPCD）又はアルツハイマー病である方法。

181．実施形態179の方法において、病態、障害及び／又は疾患は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）である方法。

182．実施形態179の方法において、病態、障害及び／又は疾患は、前頭側頭型認知症（FTD）である方法。

183．対象における筋萎縮性側索硬化症（ALS）を予防又は治療する方法において、それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド又は組成物を投与することを含む方法。

184．対象における前頭側頭型認知症（FTD）を予防又は治療する方法において、それに罹り易いか又はそれに罹患している対象に上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド又は組成物を投与することを含む方法。

185．実施形態183～184の何れか1つの方法において、対象は、C9orf72中の伸長GGGGCCリピートを含む方法。

186．細胞におけるC9orf72標的遺伝子又はその遺伝子産物の活性、発現及び／又はレベルを低下させる方法において、上記実施形態の何れかのオリゴヌクレオチド又は組成物を細胞に導入することを含む方法。

187．細胞の集団におけるフォーカスを低減する方法において、細胞を上記実施形態の何れかのオリゴヌクレオチド又は組成物に接触させることを含む方法。

188．細胞の集団におけるジペプチドリピート（DPR）タンパク質のレベルを低減する方法において、細胞を上記実施形態の何れかのオリゴヌクレオチド又は組成物に接触させることを含む方法。

189．対象におけるC9orf72標的遺伝子又はその遺伝子産物の活性、発現及び／又はレベルを低下させる方法において、対象に上記実施形態の何れかのオリゴヌクレオチド又は組成物を投与することを含む方法。

190．対象におけるフォーカスを低減する方法において、対象に上記実施形態の何れかのオリゴヌクレオチド又は組成物を投与することを含む方法。

191．対象におけるジペプチドリピート（DPR）タンパク質のレベルを低減する方法において、対象に上記実施形態の何れかのオリゴヌクレオチド又は組成物を投与することを含む方法。

192．実施形態179～191の何れか1つの方法において、フォーカスを有する細胞のパーセンテージを低減する方法。

193．実施形態179～192の何れか1つの方法において、細胞当たりのフォーカスの数を低減する方法。

194．実施形態179～193の何れか1つの方法において、フォーカスは、GGGGCCリピートを含むRNAを含む方法。

195．実施形態179～194の何れか1つの方法において、GGGGCCリピート配列によってコードされるDPRタンパク質のレベルを低減する方法。

196．実施形態179～195の何れか1つの方法において、ポリGPを含むDPRタンパク質のレベルを低減する方法。

197．実施形態179～196の何れか1つの方法において、ポリGAを含むDPRタンパク質のレベルを低減する方法。

198．実施形態179～197の何れか1つの方法において、ポリGRを含むDPRタンパク質のレベルを低減する方法。

199．実施形態179～198の何れか1つの方法において、GGGGCCリピートは、伸長GGGGCCリピート（例えば、約又は少なくとも約30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500又は1600リピート）である方法。

200．実施形態179～199の何れか1つの方法において、対象における細胞の集団

10

20

30

40

50

におけるフォーカスを低減する方法。

201. 実施形態179～200の何れか1つの方法において、対象における細胞の集団におけるDPRタンパク質のレベルを低減する方法。

202. 実施形態179～201の何れか1つの方法において、対象は、C9orf72中の伸長GGGGCCリピートを含むヒトである方法。

203. 細胞において非リピート伸長含有C9orf72RNA転写物に対してリピート伸長含有C9orf72RNA転写物を優先的にノックダウンする方法において、リピート伸長含有C9orf72RNA転写物及び非リピート伸長含有C9orf72RNA転写物を含む細胞を、上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド又は組成物に接触させることを含み、

オリゴヌクレオチドは、リピート伸長含有C9orf72RNA転写物中に存在するか又はその中の配列に相補的な配列を含み、

オリゴヌクレオチドは、細胞において、非リピート伸長含有C9orf72RNA転写物に対してリピート伸長含有C9orf72RNA転写物の優先的なノックダウンを導く方法。

204. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、伸長GGGGCCリピートは、約又は少なくとも約30リピートを含むオリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

205. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、伸長GGGGCCリピートは、約又は少なくとも約50リピートを含むオリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

206. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、伸長GGGGCCリピートは、約又は少なくとも約100リピートを含むオリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

207. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、伸長GGGGCCリピートは、約又は少なくとも約150リピートを含むオリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

208. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、伸長GGGGCCリピートは、約又は少なくとも約200リピートを含むオリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

209. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、伸長GGGGCCリピートは、約又は少なくとも約300リピートを含むオリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

210. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、伸長GGGGCCリピートは、約又は少なくとも約500リピートを含むオリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

211. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、伸長GGGGCCリピートは、約又は少なくとも約1000リピートを含むオリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

212. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド、組成物又は方法において、伸長GGGGCCリピートは、約又は少なくとも約1500リピートを含むオリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

213. 上記実施形態の何れか1つのオリゴヌクレオチド又は組成物を調製する方法において、

10

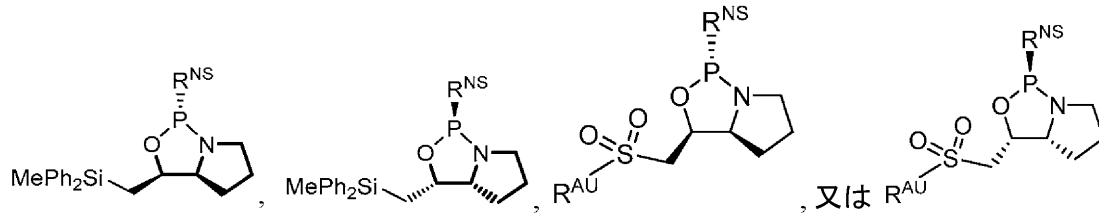
20

30

40

50

【化 6 5】

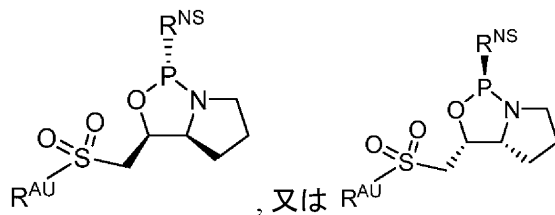


の構造を有するホスホラミダイト又はその塩を、ヌクレオシド又はオリゴヌクレオチドの-OHに接触させることを含み、式中、 R^{AU} は、 $C_{1\sim 20}$ 脂肪族、1~10個のヘテロ原子を有する $C_{1\sim 20}$ ヘテロ脂肪族、 $C_{6\sim 20}$ アリール、 $C_{6\sim 20}$ アリール脂肪族、1~10個のヘテロ原子を有する $C_{6\sim 20}$ アリールヘテロ脂肪族、1~10個のヘテロ原子を有する5~20員ヘテロアリール及び1~10個のヘテロ原子を有する3~20員ヘテロシクリルから選択される任意選択で置換された基であり、及び R^{NS} は、任意選択で置換又は保護されたヌクレオシドである方法。

10

214. 実施形態213の方法において、ホスホラミダイトは、

【化 6 6】



20

の構造又はその塩を有し、それをヌクレオシド又はオリゴヌクレオチドの-OHに接触させることを含む方法。

215. 実施形態213~214の何れか1つの方法において、 R^{AU} は、-Phである方法。

216. 実施形態213~215の何れか1つの方法において、 R^{NS} は、オリゴヌクレオチド合成のために任意選択で保護されたA、T、C又はGである方法。

30

217. 実施形態213~216の何れか1つの方法において、-OHは、5'-OHである方法。

218. 本明細書に記載される化合物、オリゴヌクレオチド、組成物又は方法。

【実施例】

【0532】

実施例

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物（ステレオランダム及びキラル制御の両方）を調製するための様々な技術が公知であり、本開示に従って利用することができ、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、米国特許第9982257号、米国特許第10160969号、米国特許第10479995号、米国特許出願公開第2020/0056173号、米国特許出願公開第2018/0216107号、米国特許出願公開第2019/0127733号、米国特許第10450568号、米国特許出願公開第2019/0077817号、米国特許出願公開第2019/0249173号、米国特許出願公開第2019/0375774号、国際公開第2018/223056号、国際公開第2018/223073号、国際公開第2018/223081号、国際公開第2018/237194号、国際公開第2019/032607号、国際公開第2019/055951号、国際公開第2019/075357号、国際公開第2019/200185号、国際公開第2019/217784号、国際公開第2019/032612号及び／

40

50

又は国際公開第2020/191252号のものであり、それらの各々の方法及び試薬は参照によって本明細書に援用される。

【0533】

一部の実施形態において、好適なキラル補助剤、例えば、DPSE及びPSMキラル補助剤を使用してオリゴヌクレオチドを調製した。様々なオリゴヌクレオチド、例えば、表A1のもの及びその組成物を本開示に従って調製した。

【0534】

実施例1. C9orf72オリゴヌクレオチド組成物は様々なアッセイにおいて活性及び選択的である。

とりわけ、本明細書で実証される通り、本開示は、病態、障害又は疾患に関連し、伸長リピートを含むC9orf72転写物及び／又はそれによってコードされる産物の発現、活性及び／又はレベルを有効に及び／又は選択的に低減し得る技術を提供する。以下の表において、C9orf72オリゴヌクレオチドでの処理後の、HPR1に対する様々なC9orf72転写物（例えば、全V転写物、V3転写物のみなど）の残留レベルを示し、ここで、1.000は100%の相対転写物レベル（ノックダウンなし）を表し、0.000は0%の相対転写物レベル（例えば、100%のノックダウン）を表す。レプリケート実験からの結果を示す。WV-12890は、非ターゲティング対照である。実験は、ALS運動ニューロン中で実施した。追加のアッセイ条件は、本明細書及び／又は国際公開第2019/032607号に記載されている。

【0535】

表1A. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物のみ）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチドのデータを示す。他の「V3転写物のみ」評価におけるように、C9orf72/HPR1におけるV3の相対倍率変化を示す。WV-9491は対照であり、これは、ステレオランダムオリゴヌクレオチド組成物である（説明：mC*m5Ce oTe oTe omC*C*C*T*G*A*A*G*G*T*T*mC*mC*mU*mC*mC、塩基配列：CCTTCCCTGAAGGTTC CUC C、立体化学／ヌクレオチド間結合：X O O O X X X X X X X X X X X X X X X X、表A1の解説を参照されたい）。

【0536】

10

20

30

40

50

【表 1 6】

用量(uM)	WV-8012			WV-30206			WV-30210		
0.0032	1.057	1.087	1.028	1.133	1.043	1.072	1.189	1.094	1.050
0.016	0.933	0.986	1.079	0.908	0.889	0.966	1.000	1.021	0.993
0.08	0.779	0.758	0.712	0.747	0.763	0.853	0.796	0.847	0.841
0.4	0.274	0.283	0.252	0.387	0.406	0.412	0.356	0.321	0.361
2	0.107	0.098	0.093	0.170	0.178	0.173	0.097	0.093	0.089
10	0.036	0.036	0.034	0.075	0.063	0.069	0.019	0.022	0.015
用量(uM)	WV-30211			WV-30212			WV-9491		
0.0032	1.141	1.165	1.094	1.141	1.189	1.165			
0.016	1.014	1.064	1.057	0.940	0.824	1.000	1.395	0.829	0.824
0.08	0.697	0.732	0.824	0.737	0.655	0.655	0.889	1.275	0.953
0.4	0.392	0.304	0.304	0.281	0.255	0.243	1.173	0.847	1.189
2	0.128	0.128	0.099	0.095	0.090	0.067	0.986	1.125	1.064
10	0.033	0.031	0.031		0.027	0.027	1.007	0.993	0.993

10

20

【0 5 3 7】

表 1 B. C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドの活性

この表は、A L S 運動ニューロン中の C 9 o r f 7 2 転写物（全 V 転写物）のノックダウンにおける様々な C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドのデータを示す。C 9 o r f 7 2 / H P R T 1 の相対倍率変化を示す。

【0 5 3 8】

【表 1 7】

用量(uM)	WV-8012			WV-30206			WV-30210		
0.0032	0.954	0.987	1.058	1.008	0.954	1.095	0.980	0.859	0.994
0.016		0.921	0.947	1.058	0.928	1.015	0.890	0.848	0.775
0.08	0.688	0.708	0.733	0.748	0.813	0.665	0.775	0.890	0.819
0.4	0.583	0.670	0.651	0.660	0.743	0.780	0.563	0.608	0.670
2	0.467	0.529	0.490	0.708	0.591	0.625	0.500	0.579	0.567
10	0.321	0.332	0.473	0.379	0.427	0.461		0.377	0.310
用量(uM)	WV-30211			WV-30212			WV-9491		
0.0032	0.921	0.987	0.902	0.994	0.819	1.065			
0.016	0.796	0.947	0.853	0.842	0.865	0.902	0.987	0.954	1.008
0.08	0.791	0.884	0.987	0.819	0.733	0.902	0.908	1.073	0.877
0.4	0.670	0.629	0.642	0.522	0.708	0.733	1.058	0.785	1.349
2	0.461	0.540	0.385	0.567	0.511	0.525	1.001	1.088	0.871
10	0.401	0.349	0.306		0.433	0.407		0.954	1.029

30

40

【0 5 3 9】

実証される通り、様々なオリゴヌクレオチド組成物は、標的化された転写物、例えば、

50

伸長リピートを含有し得、様々な病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V3転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

【0540】

表2A. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物のみ）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチドのデータを示す。他の「V3転写物のみ」評価におけるように、C9orf72中V3／HPRT1の相対倍率変化を示す。

【0541】

【表18】

10

濃度	WV-8012			WV-23486			WV-28080		
0.2uM	0.38	0.59	0.49	0.26	0.34	0.43	0.68	0.73	0.74
1 uM	0.33	0.34	0.27	0.27	0.25	0.29	0.34	0.44	0.47
5uM	0.16	0.11	0.21	0.11	0.15	0.14	0.26	0.27	0.32
濃度	WV-28479			WV-23741					
0.2uM	0.68	0.64	0.79	0.53	0.63	0.65			
1 uM	0.30	0.22	0.29	0.38	0.29	0.38			
5uM	0.13	0.13	0.15	0.14	0.16	0.22			
濃度	WV-28086			WV-28305			WV-28089		
0.2uM	0.96	0.89	1.10	1.02	1.06	0.98	0.89	0.87	0.92
1 uM	0.87	1.00	0.89	0.99	0.82	0.98	0.77	1.00	1.11
5uM	0.75	0.54	0.94	0.74	0.70	0.82	0.75	0.74	0.81
濃度	WV-28307			WV-9491					
0.2uM	0.83	0.90	0.96	1.04	0.90	0.87			
1 uM	0.78	0.68	0.79	1.02	1.11	1.07			
5uM	0.62	0.65	0.81	0.99	0.92	1.07			

20

【0542】

30

表2B. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（全V転写物）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチドのデータを示す。C9orf72／HPRT1の相対倍率変化を示す。

【0543】

40

50

【表 19】

濃度	WV-8012			WV-23486			WV-28080		
0.2uM	0.63	0.82	0.66	0.48	0.64	0.65	0.96	0.98	0.94
1 uM	0.77	0.77	0.96	0.84	0.79	0.84	0.74	0.83	0.96
5uM	0.60	0.42	0.67	0.63	0.72	0.69	0.67	0.76	0.83
濃度	WV-28479			WV-23741					
0.2uM	0.87	0.89	0.91	0.94	0.91	0.88			
1 uM	0.83	0.77	0.76	0.76	0.69	0.78			
5uM	0.68	0.68	0.70	0.70	0.67	0.79			
濃度	WV-28086			WV-28305			WV-28089		
0.2uM	0.82	0.92	0.98	1.10	1.07	1.05	0.78	0.86	0.90
1 uM	0.87	1.11	0.87	1.14	0.96	0.94	0.94	0.95	0.90
5uM	0.86	0.69	1.09	0.90	1.05	1.06	0.89	0.93	0.89
濃度	WV-28307			WV-9491					
0.2uM	0.70	0.92	0.97	1.05	0.96	0.84			
1 uM	0.92	0.91	0.83	0.99	1.05	1.02			
5uM	0.77	0.84	0.84	1.10	0.86	1.07			

10

20

【0544】

実証される通り、複数のオリゴヌクレオチド濃度で、様々なオリゴヌクレオチド組成物は、標的化された転写物、例えば、伸長リピートを含むし得、様々な病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V3転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

【0545】

表3A. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物のみ）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチド（1uM）のデータを示す。他の「V3転写物のみ」評価におけるように、C9orf72中V3／HPRT1の相対倍率変化を示す。

30

【0546】

【表20】

WV-8012	WV-21446	WV-28077	WV-28078	WV-28079	WV-28478	WV-27140	WV-28481	WV-28464	WV-28465	WV-28466	WV-28467	WV-9491
0.33	0.17	0.58	0.29	0.71	0.24	0.46	0.53	0.60	0.63	0.42	0.75	1.02
0.34	0.17	0.65	0.26	0.70	0.22	0.53	0.46	0.59	0.64	0.39	0.66	1.11
0.27	0.18	0.57	0.35	0.74	0.23	0.53	0.53	0.63	0.65	0.43	0.86	1.07

40

【0547】

表3B. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物のみ）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチド（1uM）のデータを示す。他の「V3転写物のみ」評価におけるように、C9orf72中V3／HPRT1の相対倍率変化を示す。

【0548】

50

【表 2 1】

WV-8012	WV-23486	WV-28080	WV-28479	WV-28480	WV-9491
0.33	0.27	0.34	0.30	0.44	1.02
0.34	0.25	0.44	0.22	0.40	1.11
0.27	0.29	0.47	0.29	0.42	1.07

【0549】

表 3 C. C9orf72 オリゴヌクレオチドの活性

10

この表は、ALS 運動ニューロン中の C9orf72 転写物（全 V 転写物）のノックダウンにおける様々な C9orf72 オリゴヌクレオチド（1 uM）のデータを示す。C9orf72 / HPRT1 の相対倍率変化を示す。

【0550】

【表 2 2】

WV-8012	WV-21446	WV-28077	WV-28078	WV-28079	WV-28478	WV-27140	WV-28481	WV-28464	WV-28465	WV-28466	WV-28467	WV-9491
0.77	0.84	0.92	0.84	0.89	0.75	0.83	0.87	0.82	0.98	0.87	0.99	0.99
0.77	0.75	0.94	0.67	0.94	0.79	0.94	0.84	0.95	1.04	0.89	0.78	1.05
0.96	0.83	0.93	0.79	0.91	0.72	0.87	0.89	0.96	0.99	0.86	0.97	1.02

20

【0551】

表 3 D. C9orf72 オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS 運動ニューロン中の C9orf72 転写物（全 V 転写物）のノックダウンにおける様々な C9orf72 オリゴヌクレオチド（1 uM）のデータを示す。C9orf72 / HPRT1 の相対倍率変化を示す。

【0552】

【表 2 3】

30

WV-8012	WV-23486	WV-28080	WV-28479	WV-28480	WV-9491
0.77	0.84	0.74	0.83	0.84	0.99
0.77	0.79	0.83	0.77	0.75	1.05
0.96	0.84	0.96	0.76	0.81	1.02

【0553】

実証される通り、様々なオリゴヌクレオチド組成物は、標的化された転写物、例えば、伸長リピートを含むし得、様々な病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V3 転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

40

【0554】

表 4 A. C9orf72 オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS 運動ニューロン中の C9orf72 転写物（V3 転写物のみ）のノックダウンにおける様々な C9orf72 オリゴヌクレオチド（1 uM）のデータを示す。他の「V3 転写物のみ」評価におけるように、C9orf72 中 V3 / HPRT1 の相対倍率変化を示す。

【0555】

50

【表 2 4】

WV-8012	WV-23741	WV-28081	WV-28082	WV-28083	WV-28084	WV-28085	WV-28086	WV-28087
0.33	0.38	0.88	0.73	0.98	0.98	0.64	0.87	0.72
0.34	0.29	0.86	0.70	1.18	1.00	0.73	1.00	0.74
0.27	0.38	0.85	0.68	1.05	1.11	0.68	0.89	1.00
WV-28088	WV-28089	WV-28303	WV-28304	WV-28305	WV-28306	WV-28307	WV-28308	WV-9491
0.50	0.77	0.45	0.79	0.99	0.92	0.78	0.89	1.02
0.45	1.00	0.87	0.77	0.82	0.98	0.68	0.81	1.11
0.54	1.11	0.91	0.87	0.98	0.83	0.79	0.81	1.07

10

【0 5 5 6】

表 4 B. C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドの活性

この表は、A L S 運動ニューロン中の C 9 o r f 7 2 転写物（全 V 転写物）のノックダウンにおける様々な C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド（1 u M）のデータを示す。C 9 o r f 7 2 / H P R T 1 の相対倍率変化を示す。

【0 5 5 7】

20

【表 2 5】

WV-8012	WV-23741	WV-28081	WV-28082	WV-28083	WV-28084	WV-28085	WV-28086	WV-28087
0.77	0.76	0.98	0.89	1.05	1.05	0.93	0.87	0.91
0.77	0.69	0.87	0.92	1.19	1.15	0.96	1.11	0.96
0.96	0.78	0.92	0.81	1.15	1.09	0.96	0.87	0.98
WV-28088	WV-28089	WV-28303	WV-28304	WV-28305	WV-28306	WV-28307	WV-28308	WV-9491
0.94	0.94	2.40	0.99	1.14	1.03	0.92	0.92	0.99
0.84	0.95	0.93	0.86	0.96	0.91	0.91	0.96	1.05
0.87	0.90	0.95	1.04	0.94	0.86	0.83	0.88	1.02

30

【0 5 5 8】

実証される通り、様々なオリゴヌクレオチド組成物は、標的化された転写物、例えば、伸長リピートを含むし得、病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V 3 転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

【0 5 5 9】

表 5 A. C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドの活性

40

この表は、A L S 運動ニューロン中の C 9 o r f 7 2 転写物（V 3 転写物）のノックダウンにおける様々な C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド（1 u M）のデータを示す。C 9 o r f 7 2 / H P R T 1 の相対倍率変化を示す。

【0 5 6 0】

50

【表 2 6】

濃度(uM)	WV-8012			WV-28478			WV-26633		
0.0032	0.97	0.93	0.96	1.09	1.00		1.08	1.04	1.15
0.016	0.84	0.88	0.90	1.12	0.86	0.61	0.99	0.92	0.94
0.08	0.71	0.69	0.72	0.76	0.62	0.61	0.74	0.79	0.76
0.4	0.29	0.29	0.28	0.22	0.27	0.23	0.37	0.37	0.39
2	0.11	0.10	0.09	0.06	0.08	0.06	0.19	0.17	0.18
10	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.07	0.08	0.07
濃度(uM)	WV-30206			WV-30277					
0.0032	1.08	0.90	0.94	1.08	0.88	1.08			
0.016	0.79	0.82	0.98	1.06	1.06	1.03			
0.08	0.75	0.82	0.76	1.00	0.96	0.92			
0.4	0.35	0.33	0.35	0.71	0.66	0.71			
2	0.12	0.14	0.13	0.44	0.48	0.43			
10	0.06	0.06	0.05	0.33	0.34	0.35			

10

【0561】

20

表 5 B. C9orf72 オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS 運動ニューロン中の C9orf72 転写物（全 V 転写物）のノックダウンにおける様々な C9orf72 オリゴヌクレオチド（1 uM）のデータを示す。C9orf72 / HPRT1 の相対倍率変化を示す。

【0562】

【表 2 7】

濃度(uM)	WV-8012			WV-28478			WV-26633		
0.0032	0.97	0.89	0.98	0.95	1.01		1.01	1.00	0.97
0.016	0.94	0.91	0.92	0.97	1.09	1.22	0.94	0.94	1.10
0.08	0.87	0.85	0.94	0.93	0.89	0.82	0.89	0.88	0.97
0.4	0.79	0.76	0.76	0.71	0.80	0.83	0.82	0.84	0.80
2	0.64	0.52	0.59	0.61	0.55	0.60	0.58	0.62	0.68
10	0.40	0.42	0.46	0.47	0.48	0.49	0.53	0.50	0.54
濃度(uM)	WV-30206			WV-30277					
0.0032	0.98	0.91	0.96	0.99	1.42	0.98			
0.016	0.79	0.95	0.95	1.01	0.95	0.97			
0.08	0.93	0.88	0.92	0.97	0.96	1.01			
0.4	0.82	0.72	0.77	0.79	1.01	0.99			
2	0.52	0.54	0.57	0.75	0.87	0.78			
10	0.49	0.45	0.50	0.73	0.73	0.77			

30

40

【0563】

表 5 C. 特定のオリゴヌクレオチドの活性

様々な C9orf72 オリゴヌクレオチドを、ALS 運動ニューロン中の C9orf72 転写物（V3 転写物）のノックダウンにおけるそれらの効力について検証した。結果のセットからのデータを以下に提示する。

【0564】

50

【表 28】

ID	IC50
WV-8012	184.9 nM
WV-28478	130.3 nM
WV-26633	171.3 nM
WV-30206	232.7 nM
WV-30277	459.0 nM

10

【0565】

実証される通り、複数のオリゴヌクレオチド濃度で、様々なオリゴヌクレオチド組成物は、標的化された転写物、例えば、伸長リピートを含むし得、様々な病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V3転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

【0566】

表6. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチド（1 μM）のデータを示す。C9orf72/HPR1の相対倍率変化を示す。

【0567】

20

【表 29】

WV-8012	0.22	0.21	0.26
WV-26633		0.29	0.42
WV-30206	0.25	0.27	0.32
WV-30207	0.29	0.38	0.32
WV-30208	0.22	0.24	0.26
WV-30209	0.31	0.23	0.23
WV-30210	0.21	0.21	0.23
WV-30211	0.24	0.22	0.22
WV-30212	0.16	0.21	0.17
WV-28091	0.54	0.50	0.56
WV-30232	0.56	0.52	0.61
WV-30213	0.51	0.45	0.39
WV-30214	0.20	0.32	0.37
WV-30215	0.47	0.47	0.38
WV-30216	0.45	0.43	0.51
WV-30217	0.38	0.45	0.45
WV-30277	0.73	0.88	0.71
WV-30278	0.81	0.74	0.75
WV-30279	0.55	0.67	0.51
WV-30280	0.60	0.59	0.61
WV-30281	0.53	0.68	0.71
WV-30282	0.77	0.74	0.81
WV-30283	0.78	0.72	0.70

30

40

【0568】

表7. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

50

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（全V転写物）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチド（1 uM）のデータを示す。C9orf72／HPRT1の相対倍率変化を示す。

【0569】

【表30】

WV-8012	0.62	0.67	0.69
WV-26633		0.66	0.70
WV-30206	0.69	0.67	0.65
WV-30207	0.77	0.69	0.66
WV-30208	0.72	0.74	0.72
WV-30209	0.69	0.64	0.68
WV-30210	0.61	0.59	0.70
WV-30211	0.67	0.72	0.68
WV-30212	0.65	0.58	0.60
WV-28091	0.84	0.76	0.87
WV-30232	0.86	0.86	0.85
WV-30213	0.84	0.84	0.76
WV-30214	0.49	0.79	0.80
WV-30215	0.68	0.73	0.80
WV-30216	0.73	0.76	0.79
WV-30217	0.82	0.83	0.80
WV-30277	0.98	0.86	0.98
WV-30278	1.03	0.90	1.02
WV-30279	0.83	0.87	0.87
WV-30280	1.00	0.75	0.92
WV-30281	0.89	0.92	0.82
WV-30282	0.90	0.95	1.06
WV-30283	1.05	0.97	1.00

10

20

30

【0570】

実証される通り、様々なオリゴヌクレオチド組成物は、標的化された転写物、例えば、伸長リピートを含むし得、様々な病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V3転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

【0571】

表8A．C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチド（1 uM）のデータを示す。C9orf72／HPRT1の相対倍率変化を示す。

40

【0572】

50

【表 3 1】

WV-8012	0.22	0.21	0.26
WV-28478	0.19	0.16	0.19
WV-30219	0.07	0.07	0.07
WV-30220	0.08	0.07	0.07
WV-30221	0.24	0.18	0.23
WV-30222	0.14	0.15	0.16
WV-30223	0.12	0.13	0.16
WV-30224	0.21	0.21	0.19
WV-30225	0.43	0.40	0.50
WV-30226	0.95	0.59	0.74
WV-30227	0.61	0.29	0.61
WV-30228	0.40	0.45	0.46
WV-30229	0.74	0.86	0.83
WV-30230	0.88	0.88	0.85
WV-30231	0.46	0.53	0.49
WV-30237	0.52	0.62	0.55
WV-30238	0.39	0.50	0.50
WV-30239	0.50	0.49	0.49
WV-9491	1.13	1.04	1.04
WV-17820	0.41	0.35	0.33

10

20

30

40

50

【0573】

表 8 B. C9orf72 オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS 運動ニューロン中の C9orf72 転写物（全 V 転写物）のノックダウンにおける様々な C9orf72 オリゴヌクレオチド（1 μ M）のデータを示す。C9orf72 / HPRT1 の相対倍率変化を示す。

【0574】

【表 3 2】

WV-8012	0.62	0.67	0.69
WV-28478	0.70	0.72	0.74
WV-30219	0.58	0.62	0.61
WV-30220	0.65	0.67	0.64
WV-30221	0.69	0.73	0.73
WV-30222	0.73	0.70	0.69
WV-30223	0.68	0.69	0.70
WV-30224	0.70	0.75	0.71
WV-30225	0.79	0.87	0.83
WV-30226	1.07	0.82	1.09
WV-30227	0.92	0.63	0.87
WV-30228	0.81	0.86	0.79
WV-30229	0.91	1.00	1.08
WV-30230	1.11	1.05	1.00
WV-30231	0.81	0.89	0.92
WV-30237	0.70	0.91	0.89
WV-30238	0.84	0.77	0.86
WV-30239	0.82	0.87	0.99
WV-9491	1.15	1.05	1.15
WV-17820	0.73	0.78	0.85

10

20

30

40

50

【0575】

実証される通り、3'末端置き換え核酸塩基及び／又はミスマッチ／ゆらぎを含むオリゴヌクレオチドのものを含めた様々なオリゴヌクレオチド組成物は、標的化された転写物、例えば、伸長リピートを含むし得、様々な病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V3転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

【0576】

表9A. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物のみ）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチドのデータを示す。他の「V3転写物のみ」評価におけるように、C9orf72中V3／HPRT1の相対倍率変化を示す。

【0577】

【表 3 3】

用量(uM)	WV-8012			WV-30206			WV-30208		
0.0032	1.06	1.09	1.03	1.13	1.04	1.07	1.06	1.04	1.04
0.016	0.93	0.99	1.08	0.91	0.89	0.97	0.91	0.82	0.93
0.08	0.78	0.76	0.71	0.75	0.76	0.85	0.67	0.62	0.70
0.4	0.27	0.28	0.25	0.39	0.41	0.41	0.31	0.24	0.26
2	0.11	0.10	0.09	0.17	0.18	0.17	0.08	0.09	0.10
10	0.04	0.04	0.03	0.08	0.06	0.07	0.03	0.03	0.03
用量(uM)	WV-30209			WV-30210			WV-30211		
0.0032	1.20	1.09	0.91	1.19	1.09	1.05	1.14	1.16	1.09
0.016	1.01	1.01	1.09	1.00	1.02	0.99	1.01	1.06	1.06
0.08	0.57	0.27	0.54	0.80	0.85	0.84	0.70	0.73	0.82
0.4	0.34	0.30	0.23	0.36	0.32	0.36	0.39	0.30	0.30
2	0.09	0.10	0.09	0.10	0.09	0.09	0.13	0.13	0.10
10	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03
用量(uM)	WV-30212			WV-30220			WV-9491		
0.0032	1.14	1.19	1.16	1.15	0.98	1.09			
0.016	0.94	0.82	1.00	1.03	0.93	0.97	1.39	0.83	0.82
0.08	0.74	0.66	0.66	0.56	0.62	0.61	0.89	1.27	0.95
0.4	0.28	0.26	0.24		0.15	0.14	1.17	0.85	1.19
2	0.10	0.09	0.07	0.02	0.02	0.02	0.99	1.13	1.06
10		0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	1.01	0.99	0.99

10

20

【0578】

表9B. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（全V転写物）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチドのデータを示す。C9orf72/Hprt1の相対倍率変化を示す。

30

【0579】

40

50

【表 3 4】

用量(uM)	WV-8012			WV-30206			WV-30208		
0.0032	0.95	0.99	1.06	1.01	0.95	1.10	0.82	0.90	0.80
0.016		0.92	0.95	1.06	0.93	1.01	0.65	0.67	0.72
0.08	0.69	0.71	0.73	0.75	0.81	0.66	0.60	0.77	0.96
0.4	0.58	0.67	0.65	0.66	0.74	0.78	0.44	0.64	0.66
2	0.47	0.53	0.49	0.71	0.59	0.62	0.54	0.46	0.41
10	0.32	0.33	0.47	0.38	0.43	0.46	0.34	0.31	0.43
用量(uM)	WV-30209			WV-30210			WV-30211		
0.0032	0.87	0.83	0.80	0.98	0.86	0.99	0.92	0.99	0.90
0.016	0.71	0.79	0.79	0.89	0.85	0.77	0.80	0.95	0.85
0.08	0.55	0.48	0.65	0.77	0.89	0.82	0.79	0.88	0.99
0.4	0.51	0.69	0.50	0.56	0.61	0.67	0.67	0.63	0.64
2	0.39	0.44	0.44	0.50	0.58	0.57	0.46	0.54	0.38
10	0.18	0.27	0.24		0.38	0.31	0.40	0.35	0.31
用量(uM)	WV-30212			WV-30220			WV-9491		
0.0032	0.99	0.82	1.07	1.01	1.04	1.10			
0.016	0.84	0.87	0.90	1.06	0.94	0.95	0.99	0.95	1.01
0.08	0.82	0.73	0.90	0.66	0.99	1.10	0.91	1.07	0.88
0.4	0.52	0.71	0.73		0.68	0.84	1.06	0.79	1.35
2	0.57	0.51	0.53	0.51	0.58	0.64	1.00	1.09	0.87
10		0.43	0.41	0.36	0.41	0.41		0.95	1.03

10

20

【0580】

表 9 C. 特定のオリゴヌクレオチドの活性

様々な C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチドを、A L S 運動ニューロン中の C 9 o r f 7 2 転写物 (V 3 転写物) のノックダウンにおけるそれらの効力について検証した。結果のセットからのデータを以下に提示する。

30

【0581】

【表 3 5】

ID	IC50 (nM)
WV-8012	151.4
WV-30206	207.4
WV-30208	123
WV-30209	65.24
WV-30210	201.7
WV-30211	145.9
WV-30212	90.17
WV-30220	92.28
WV-9491	有意な低減は 観察されず

40

【0582】

実証される通り、複数のオリゴヌクレオチド濃度で、様々なオリゴヌクレオチド組成物

50

は、標的化された転写物、例えば、伸長リピートを含む、様々な病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V3転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

【0583】

表10A. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物のみ）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチドのデータを示す。他の「V3転写物のみ」評価におけるように、C9orf72中V3／HPRT1の相対倍率変化を示す。

【0584】

【表36】

10

濃度	WV-30210			WV-37246		
0.0032	1.19	0.98	1.03	1.17	1.16	0.84
0.016	0.84	0.72	1.08	1.02	1.33	0.85
0.08	0.75	0.99	0.94	0.70	0.78	0.77
0.4	0.45	0.38	0.39	0.79	0.76	0.66
2	0.07	0.07	0.10	0.22	0.19	0.23
10	0.01	0.01	0.02	0.05	0.05	0.05

20

【0585】

表10B. C9orf72オリゴヌクレオチドの活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（全V転写物）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチドのデータを示す。C9orf72／HPRT1の相対倍率変化を示す。

【0586】

【表37】

30

濃度	WV-30210			WV-37246		
0.0032	1.21	1.03	0.98	1.07	1.04	1.02
0.016	0.96	0.94	1.03	0.98	0.97	1.05
0.08	0.84	0.89	0.86	1.14	0.87	1.13
0.4	0.82	0.82	0.75	0.88	0.94	0.84
2	0.80	0.50	0.66	0.74	0.83	0.64
10	0.34	0.33	0.50	0.51	0.39	0.62

【0587】

表10C. 特定のオリゴヌクレオチドの活性

様々なC9orf72オリゴヌクレオチドを、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物）のノックダウンにおけるそれらの効力について検証した。結果のセットからのデータを以下に提示する。

【0588】

【表38】

40

ID	IC50
WV-30210	318.2 nM
WV-37246	736.3 nM

50

【0589】

実証される通り、複数のオリゴヌクレオチド濃度で、様々なオリゴヌクレオチド組成物は、標的化された転写物、例えば、伸長リピートを含むし得、様々な病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V3転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

【0590】

実施例2．特定のインビトロスクリーニングプロトコル

様々な技術を利用して本開示に従って提供される技術の特性及び／又は活性を評価することができる。この実施例は、C9orf72オリゴヌクレオチドのためのインビトロスクリーニングプロトコルを記載する。

【0591】

オリゴヌクレオチドは、24ウェルプレート内で48時間にわたりジムノシスによりALSニューロンに送達した。

【0592】

RNA抽出

RNeasy Plus 96キット（Qiagen、Waltham、Mass.）によるプロトコル：細胞からの減圧／スピン技術を用いた全RNAの精製（gDNA除去が決定的に重要である）に従うRNA抽出

各ウェルについて60ulのRNアーゼフリー水中で全RNAを溶出させた。

【0593】

逆転写

High-Capacity RNA-to-cDNA（商標）キット（Applied Biosystems；ThermoFisher、Waltham、Mass. から入手可能）による逆転写

2×RT緩衝液混合物 9ul

RNA試料 13.5ul

72℃で5分間の熱変性、プレートを氷上で少なくとも2分間冷却する。

熱変性したRNAの各ウェルに以下を加える：

2×RT緩衝液混合物 6

20×RT酵素混合物 1.5ul

cDNAの最終容積は、30ulである。

【0594】

リアルタイムPCR

Taqmanプローブ：

C9orf72全変異体：Hs00376619__m1（FAM）、カタログ番号4351368（ThermoFisher、Waltham、Mass.）

C9orf72 V3：Hs00948764__m1（FAM）、カタログ番号4351368（ThermoFisher、Waltham、Mass.）

C9orf72エクソン1a：

フォワードプライマー AGATGACGCTTGGTG TGTC

リバースプライマー TAAACCCACACCTGCTCTTG

プローブ CTGCTGCCCGGTTGCTTCTCTTT

C9orf72アンチセンスRNA／イントロン：

フォワードプライマー GGTCAGAGAAATGAGAGGGGAAAG

リバースプライマー CGAGTGGGTGAGTGAGGA

プローブ AAATGCGTCGAGCTCTGAGGAGAG

内部対照：ヒトHPRT1（VIC）

Hs02800695__m1、カタログ番号4448486（ThermoFisher、Waltham、Mass.）

【0595】

PCR反応：

10

20

30

40

50

L i g h t c y c l e r 480マスターミックス 10 u l

C9プローブ (FAM) 0.5 u l

H P R T 1 (V I C) 0.5 u l

c D N A * 最大で9 u lまで

ヌクレアーゼフリーH2O 20 u lになるまで

*全変異体プローブについて2 u lのc D N A。他のC9プローブについて9 u lのc D N A。

B i o - r a d C F X 96 T o u c hを使用したリアルタイムP C R

ラン情報:

1 95.0℃で3:00

2 95.0℃で0:10

3 60.0℃で0:30

+プレート読み取り

4 2に進む、更に39回繰り返す

終了

【0596】

実施例3. C9orf72オリゴヌクレオチド組成物は様々なアッセイで活性及び選択的である

提供されるオリゴヌクレオチド及び組成物を様々なアッセイで評価してとりわけ、活性及び／又は選択性を実証した。

【0597】

実施した様々なアッセイの簡単な説明:

レポーター:

ルシフェラーゼアッセイ、本明細書に記載される通り。一部のオリゴヌクレオチドについて2つの数字が提供される (例えば、WV-6408について1.32/2.63); これは、レプリケート実験を示す。

【0598】

A L Sニューロン:

i P S Cの神経細胞分化: C9orf72関連A L S患者 (女性、64歳) からの線維芽細胞に由来するi P S CをRUCDR Infinite Biologicsから入手した。i P S Cは、mTeSR1培地 (STEMCELL Technologies、Vancouver、BC) 中のCorning Matrigelマトリックス (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) にコロニーとして維持した。STEMdiff Neural System (STEMCELL Technologies、Vancouver、BC) を使用して神経前駆細胞を作製した。i P S CをAggreWell 800プレートに懸濁し、STEMdiff神経誘導培地において胚様体として5日間、毎日75%の培地を交換しながら成長させた。胚様体を37 µmセルストレーナーで回収し、MatrigelをコートしたプレートのSTEMdiff神経誘導培地にプレーティングした。培地は、7日間にわたって毎日交換し、プレーティング後2日で85~95%の胚様体が神経ロゼットを呈した。ロゼットを手作業で取り、STEMdiff神経誘導培地 (STEMCELL Technologies、Vancouver、BC) 中ポリ-L-オルニチン及びラミニンをコートしたプレートに移した。培地は、細胞が90%コンフルエンスに達し、且つ神経前駆細胞 (NPC) と見なされるまで7日間にわたって毎日交換した。NPCをTrypLE (Gibco、ThermoFisher、Waltham、Massachusettsから入手可能) で解離し、ポリ-L-オルニチン/ラミニンプレートにおいて成長因子 (20 ng/ml FGF2、20 ng/ml EGF、5 µg/mlヘパリン) を補足した神経維持培地 (NMM、70% DMEM、30% Ham F12、1×B27添加物) 中において1:2又は1:3の比で継代した。ニューロンに成熟させるため、NPCを維持し、5継代未満にわたって拡大し、>90%コンフルエンスになったとき、ポリ-L-オルニチン/ラミニンをコート

10

20

30

40

50

したプレートにおいて成長因子を補足したNMM中において1：4継代した。翌日、分化0日目、培地を新鮮な成長因子不含NMMに交換した。分化ニューロンをNMMに、50%の培地を週2回交換しながら4週間以上維持した。必要に応じて細胞を125,000細胞/cm²の密度でTrypLEと共にリプレーティングした。

【0599】

V3／イントロン：ALSニューロンにおいてV3 RNA転写物及びイントロンRNA転写物のノックダウン(KD)を測定した。ノックダウンされたV3転写物は、野生型及びリピート含有(国際公開第2019/032607号の図1に「健常アレル」V3及び「病的アレル」V3として示される)の両方である。しかしながら、本開示はいかなる特定の理論にも拘束されないが、リピート含有転写物は核内滞留時間がより長いものであり得るため、従って優先的にノックダウンされ得ることに留意されたい。国際公開第2019/032607号の図1においてイントロン転写物は逆向きのAS矢印で示される。2つの数字はV3及びイントロンノックダウンを示す；例えば、WV-6408について、V3は59%ノックダウンされ、イントロンは65%ノックダウンされた。

10

【0600】

安定性：

マウス(Ms)脳ホモジネートを使用して安定性をインビトロでアッセイした。

【0601】

TLR9：

TLR9レポーターアッセイプロトコル：ヒトTLR9又はマウスTLR9レポーターアッセイ(HEK-Blue(商標)TLR9細胞、InvivoGen、San Diego、California)を使用してNF-κBの誘導(NF-κB誘導性SEAP)活性を分析した。50μMの濃度(330μg/mL)及び2倍段階希釈のオリゴヌクレオチドを96ウェルプレートに水中20μLの最終容積でプレーティングした。各ウェルに180μLの容積のHEK-Blue(商標)検出培地中7.2×10⁴細胞の密度でHEK-Blue(商標)TLR9細胞を加えた。ウェル内のオリゴヌクレオチドの最終的なワーキング濃度は、5、2.5、1.25、0.625、0.312、0.156、0.078及び0.0375μMであった。HEK-Blue(商標)TLR9細胞をオリゴヌクレオチドと37℃及び5%CO₂で16時間インキュベートした。インキュベーションの終了時、Spectramaxにより655nmの吸光度を測定した。水が陰性対照であった。陽性対照は、WV-2021及びCpGオリゴヌクレオチドであるODN 2359であった。結果は、媒体対照で処理した細胞に対するNF-κB活性化の倍率変化として表す。参照：ヒトTLR9アゴニストキット(InvivoGen、San Diego、California)。このアッセイでは、オリゴヌクレオチドは、活性が検出されなかったか又は本質的に検出されなかった場合に「クリーン」と見なされる。一部の実験では、WV-8005、WV-8006、WV-8007、WV-8008、WV-8009、WV-8010、WV-8011、WV-8012及びWV-8321は、認め得るほどのhTLR9活性を示さなかったが、一部は、mTRL9で僅かな活性を示した。

20

30

【0602】

補体

一部の実施形態において、カニクイザル血清補体活性化エキソビボアッセイで補体を評価する。オリゴヌクレオチドが補体活性化に及ぼす効果をカニクイザル血清においてエキソビボで測定した。3個体の雄カニクイザルから血清試料をプールし、このプールを試験に使用した。

40

【0603】

330μg/mLの最終濃度のオリゴヌクレオチド又は水対照を新鮮に解凍したカニクイザル血清中(1：30比、v/v)において37℃でインキュベートすることにより、C3a産生の経時的変化を測定した。具体的には、媒体中9.24μLの10mg/mLストックのオリゴヌクレオチド又は媒体単独を270.76μLのプール血清に加え、得

50

られた混合物を 37℃ でインキュベートした。0、5、10 及び 30 分で 20 µL アリコートを集し、2.2 µL の 18 mg/mL EDTA を加えることにより反応を直ちに終了させた。

【0604】

1:3000 希釈で MicroVue C3a Plus 酵素イムノアッセイを用いて C3a 濃度を測定した。結果は、プール血清をオリゴヌクレオチドで処理したときの、媒体対照による処理と比較した補体分解産物濃度の増加として提示した。

【0605】

PD (薬力学) (C9-BAC、icv 又は脳室内注射) :

C9orf72-BAC (C9-BAC) マウスモデルにおいて PD 及び有効性を試験した: インビボ薬理学試験に使用されるトランスジェニックマウスについては、O'Rourke et al. 2015 Neuron. 88 (5): 892-901 に記載されている。簡潔に言えば、選択的スプライシングを受けた非コード第 1 エクソン 1a 及び 1b 間のイントロンにヘキサヌクレオチドリピート伸長 (GGGGCC) を有するヒト 9 番染色体オープンリーディングフレーム 72 遺伝子 (C9orf72) (変異体 3) を保因する、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の線維芽細胞に由来する細菌人工染色体 (BAC) クローンを使用して、トランスジェニックコンストラクトを設計した。BAC は、約 166 kbp 配列 (約 110 kbp の上流配列及び約 20 kbp の下流配列を伴う約 36 kbp のヒト C9orf72 ゲノム配列) を単離した。種々の BAC サブクロンの増幅時、収縮が 100~1000 個の GGGGCC リピートに限られた 1 つのサブクロンを使用した。Tg (C9orf72_3) 系 112 マウス (JAX ストック番号 023099、Jackson Laboratories、Bar Harbor、Maine) は、C9orf72_3 トランス遺伝子の数個のタンデムコピーを有し、各コピーは、100~1000 個のリピートを有する ([GGGGCC] 100-1000)。しかしながら、本明細書で使用するインビボ試験には、500 個以上のリピートを発現するマウスのみを選択した。

【0606】

インビボ手順:

オリゴヌクレオチドを側脳室に注射するため、マウスを麻酔し、げっ歯類定位固定装置に置いた; 次に、マウスのその側脳室の 1 つにステンレス鋼製ガイドカニューレを植え込み (座標: プレグマから -0.3 mm 後方、+1.0 mm 側方及び垂直に -2.2 mm)、それを、歯科用セメントを使用してその場に固定した。化合物の注射前にマウスに 1 週間の回復期間を与えた。典型的な薬理学試験には、1 日目の 2.5 µL 容積での最大 50 µg オリゴヌクレオチドの注射と、それに続く 8 日目の同じ量及び容積のもう 1 回の注射とが関わった。15 日目に安楽死を実施した; マウスにアベルチンで深麻酔をかけ、生理食塩水で経心臓的に灌流した。脳を頭蓋から迅速に取り出し、一方の脳半球は、組織学的分析のために処理し、他方の脳半球は、生化学分析のために解剖してドライアイスで凍結した。同様に、脊髄を解剖してドライアイスで凍結する (腰髄) か、又は組織学的分析のために処理した (頸髄/胸髄)。

【0607】

有効性 (C9-BAC): フォーカス:

組織調製及び組織学的分析

脳半球及び脊髄を 4% パラホルムアルデヒドで 24 時間滴下固定し、次に 30% スクロースに 24~48 時間移し、液体窒素に凍結した。クライオスタットにおいて -18℃ で矢状断の 20 µm 厚連続切片を切り出し、Superfrost スライドに置いた。

【0608】

有効性 (C9-BAC): ポリ GP (DPR アッセイ):

タンパク質及びポリ GP 定量化のための組織調製:

二段階抽出手順を用いて脳及び脊髄試料を処理した; 各段階後、10,000 rpm、4℃ で 10 分間の遠心を行った。第 1 段階は、RIPA (50 mM トリス、150 mM

10

20

30

40

50

NaCl、0.5%DOC、1%NP40、0.1%SDS及びComplete（商標）、pH8.0）中で試料をホモジナイズすることからなった。第2段階は、5Mグアニジン-HCl中へのペレットの再懸濁からなった。

【0609】

Mesoscaleベースのアッセイを用いて各プール中のポリGPを定量化した。簡潔に言えば、ポリクローナル抗体AB1358（Millipore、Millipore Sigma、Billerica、Ma. から入手可能）を捕捉抗体及び検出抗体の両方として使用した。MULTI-ARRAY 96 Sm Spot Plate Pack、SECTORプレートをPBS中1μlの10ug/ml精製抗ポリGP抗体（Millipore、AB1358、Millipore Sigma、Billerica、Ma. から入手可能）によって小スポット上に直接、4℃で一晩コーティングした。PBST（PBS中0.05%Tween-20）で3回洗浄した後、プレートをMSD Blocker Aキット（R93AA-2）又は10%FBS/PBSによって室温で1時間ブロックした。HEK-293細胞から精製したポリGP（プラスミドトランスフェクション後の抗FLAGアフィニティー精製による、Genescriptカスタム製）を10%FBS/PBSで段階希釈し、標準として使用した。25μlの標準ポリGP及び試料（希釈又は非希釈）を各ウェルに加え、室温で1～2時間インキュベートした。PBSTで3回洗浄した後、各ウェル25μlのスルホタグ付抗GP（AB1358）を加え、室温で更に1時間インキュベートした。次に、プレートを3回洗浄し、150μl/ウェルのMSD読み取り緩衝液T（1×）（R92TC-2、MSD）を各ウェルに加え、製造者の初期設定に従ってMSD（MESO QUICKPLEX SQ120）によって読み取った。

10

20

【0610】

C9orf72タンパク質の発現をウエスタンブロッティングにより決定した。簡潔に言えば、RIPA抽出物からのタンパク質を4～12%SDS-PAGE（Criterionゲル、Bio-Rad）によってサイズ分画し、PVDF膜に転写した。C9orf72を検出するため、マウスモノクローナル抗C9orf72抗体GT779（1:2000；GeneTex、Irvine、California）、続いて二次DyLightコンジュゲート抗体を使用して膜を免疫プロットした。Odyssey/Li-Corイメージングシステムを使用して視覚化を行った。

30

一部の追加的な略称：

Cx：皮質

HP：海馬

KD：ノックダウン

SC：脊髄

Str：線条体

【0611】

実施例4．特定の追加のプロトコル

当業者は、様々な技術が本開示に従って提供される技術の評価に利用可能であることを理解する。実験のための特定の追加の有用なプロトコルを以下に提示する。

40

【0612】

標的核酸を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイの非限定的な例が本明細書に記載される。かかるアッセイは、C9orf72オリゴヌクレオチド又はC9orf72でない標的を含め、任意の標的に対する任意の他の核酸又はオリゴヌクレオチドの検出及び／又は定量化に用いることができる。

【0613】

薬物動態試験：

オリゴヌクレオチド定量化及び転写物定量化のための組織調製：

組織を解剖し、予め秤量したエッペンドルフ試験管に新鮮凍結した。試験管を再秤量することにより組織重量を計算した。4容量のTrizol又は溶解緩衝液（4Mグアニジ

50

ン；0.33% N-ラウリルサルコシン；25 mM クエン酸ナトリウム；10 mM DTT) を1単位重量に加えた(組織1 mgにつき4 μ lの緩衝液)。Precellys Evolution組織ホモジナイザー(Bertin Technologies、Montigny-le-Bretonneux、France)により、全ての組織片が溶解するまで4℃で組織溶解を行った。30~50 μ lの組織ライセートをPK測定のために96ウェルプレートに取っておき、残りのライセートを-80℃で保存するか(それが溶解緩衝液中にある場合)又はRNA抽出を続けた(それがTrizol緩衝液中にある場合)。

転写物定量化：

ハイブリダイゼーションプローブ (IDT-DNA)

捕捉プローブ：「C9-イントロン-Cap」/ 5 AmMC12 / TGGCGAGTGG

検出プローブ：「C9-イントロン-Det」：GTGAGTGAGG / 3 BioTEG

5 AmC12は、C₁₂リンカー付きの5'-アミンである。

3 BioTEGは、ビオチン化プローブである。

【0614】

無水マレイン酸活性化96ウェルプレート(Pierce 15110)に2.5% NaHCO₃(Gibco、25080-094)中500 nMの捕捉プローブ50 μ lを37℃で2時間コーティングした。次に、プレートをPBST(PBS+0.1% Tween-20)で3回洗浄し、5%無脂肪乳-PBSTによって37℃で1時間ブロックした。ペイロードオリゴヌクレオチドをマトリックスに段階希釈した。この標準を元の試料と共に、全ての試料中のオリゴヌクレオチド量が50 ng/ml未満になるように溶解緩衝液(4 M グアニジン；0.33% N-ラウリルサルコシン；25 mM クエン酸ナトリウム；10 mM DTT)で希釈した。20 μ lの希釈試料と、PBSTで希釈した180 μ lの333 nM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、4℃ ∞)。ブロックしたELISAプレートに50 μ lの変性試料をトリPLICATEで分配し、4℃で一晩インキュベートした。3回のPBST洗浄後、PBST中の1:2000ストレプトアビジン-AP(Southern Biotech、7100-04)、50 μ l/ウェルを加え、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、100 μ l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：Ex 435 nm、Em 555 nmで読み取った。検量線に従って4パラメータ回帰によって試料中のオリゴヌクレオチドを計算した。

【0615】

GGGGCC及びGGCCCC RNAフォーカスのFISHプロトコル

固定：

スライドを室温で30分間乾燥させ、次に4% PFAで20分間固定した。固定後、スライドをPBSで3回洗浄し、次に予め冷却した70%エタノールに4℃で少なくとも30分間保存した。

【0616】

プレハイブリダイゼーション：

スライドをFISH洗浄緩衝液(40%ホルムアミド、DEPC水中2 $\times$ SSC)で10分間再水和した。スライドにハイブリダイゼーション緩衝液(40%ホルムアミド、2 $\times$ SSC、0.1 mg/ml BSA、0.1 g/ml 硫酸デキストラン、1% 硫酸バナジル錯体、DEPC水中0.25 mg/ml tRNA)を加え、55℃で30分間インキュベートした。

【0617】

プローブの調製：

Cy3-(GGCCCC)3(センスリピート伸長を検出する)及びCy3-(GGGGCC)3(アンチセンスリピート伸長を検出する)プローブを95℃で10分間変性さ

10

20

30

40

50

せた。氷上で冷却した後、プローブを冷ハイブリダイゼーション緩衝液で200 ng/mLに希釈した。

【0618】

ハイブリダイゼーション：

スライドをFISH洗浄緩衝液で軽く洗浄し、希釈したプローブをスライドに加えた。スライドをハイブリダイゼーションオープンにおいて55℃で3時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、スライドをFISH洗浄緩衝液によって55℃で3回、1回の洗浄当たり15分ずつ洗浄した。次に、スライドを1×PBSで1回軽く洗浄した。

【0619】

神経核免疫蛍光染色：

スライドをブロッキング溶液（PBS中2%正常ヤギ血清）で1時間ブロックした。抗NeuN抗体（MAB377、Millipore）をブロッキング溶液に1：500希釈し、スライドに4℃で一晩適用した。次に、スライドをPBSで3回洗浄し、Alexa Fluor 488（Life technology）を含む1：500希釈ヤギ抗マウス二次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。次に、スライドをPBSで3回洗浄した。最後に、イメージングのためサイドをDAPIでマウントした。

【0620】

イメージング及びフォーカス定量化：

RPI回転ディスク共焦点顕微鏡（Zeiss）によって40倍の倍率で画像を撮った。488、CY3及びDAPIチャンネルを収集した。ImageJソフトウェア（NIH）でRNAフォーカスを定量化した。

【0621】

様々な技術（試薬、方法、構築など）が好適であり、それらを様々なオリゴヌクレオチドの製造、特徴付け、検証などに使用した。特定のこうした技術を以下に記載する。

【0622】

実験者は、外部供給者から特定のホスホジエステルベース及びステレオランダムPS修飾オリゴヌクレオチドの合成物を入手し、こうしたオリゴヌクレオチドは、標準的な固相オリゴヌクレオチド合成プロトコルを使用して調製することもできる。実験者は、記載される通りの、及び時に製剤ごとに特定の修飾を有する様々な化学修飾され、キラル制御されたオリゴヌクレオチド及び組成物を調製した。キラル制御されたオリゴヌクレオチド合成に有用であり得る特定の技術としては、Iwamoto, N. et al. Control of phosphorotioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. Nat Biotechnol 35, 845-851, doi:10.1038/nbt.3948 (2017); Butler, D. C. D. et al. Compounds, Composition and Methods for Synthesis. 国際公開第2018237194号（2018）；及びButler, D., Iwamoto, N., Meena, M., Svrzikapa, N., Verdine, G. L., Zlatev, I. Chiral Control. 国際公開第2014012081号（2014）に記載のものが挙げられる。

【0623】

一部の実施形態において、NMRスペクトル（¹H NMR、¹³C NMR及び³¹P NMR）を、適切な参照を用いてVarian MERCURY 300、400若しくは500 NMR分光光度計又はBruker BioSpin GmbH NMR Spectrometerで記録した。ESI高分解能質量スペクトルをAgilent 6230 ESI TOFで記録した。

【0624】

一部の実施形態において、特定のオリゴヌクレオチド及び組成物の分析及び／又は特徴付けに有用な技術は、LC-HRMS及びHPLCである。特定の手順を例として以下に記載し、当業者は、特定の又は全てのパラメータを調整することができることを理解する。

【0625】

逆相HPLC。各オリゴマーの10 µLの5 µM溶液を分析HPLCカラム（Poroshell 120 EC-C18、2.7 µm、2.1×50 mm、Agilent）上に、溶出剤として緩

10

20

30

40

50

衝液 A（水中 200 mM ヘキサフルオロイソプロパノール及び 8 mM トリエチルアミン）及び緩衝液 B（メタノール）を使用してインジェクトし、緩衝液 B を 60 °C で 5 % ~ 30 % の勾配とした。UV 吸光度を 254 nm 及び 280 nm で記録した。

【0626】

DNA コンストラクト。ルシフェラーゼレポーターアッセイのため、一部の実施形態において、実験者は、C9orf72 配列を psiCHECK-2 ベクター（Promega）の NotI 部位中に導入し、それは hRLuc 遺伝子の 3' -UTR の中央に存在する。C9orf72 配列は、エクソン 1a 及び 1b 並びに遺伝子の下流領域を含め、イントロン 1 を包囲する約 1 kb の DNA を包含した。

【0627】

動物。様々な動物実験を、動物の保護及び使用についての適切な動物保護及び使用ガイドラインを遵守して実施した。インビボ試験のため、実験者は、C9BAC トランスジェニックマウス [O'Rourke, J.G. et al. C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron* 88, 892-901, doi:10.1016/j.neuron.2015.10.027 (2015)] Tg(C9orf72_3) No. 023099, Jackson Laboratories) を使用し、これは、C9orf72 トランス遺伝子のいくつかのタンデムコピーを有し、各コピーは 100 ~ 1,000 個のリピートを有する。ここでの試験のため、実験者は、10 ~ 12 週齢である ≥ 500 個のリピートを発現するマウスを選択した。実験者は、雄及び雌マウスの両方を利用した。定位固定手術下での脳室内 (ICV) カニューレ留置のため、実験者はマウスを麻酔し（アベルチン）、それらをげっ歯類定位固定器具に置いた；次にマウスの側脳室の 1 つにステンレス鋼製ガイドカニューレを植え込み（座標：ブレグマから -0.3 mm 後方、+1.0 mm 側方及び垂直に -2.2 mm）、実験者は歯科用セメントを使用してそれをその場に固定した。マウスに 1 週間の回復期間を与えた。

【0628】

用量漸増試験では、実験者は、1 及び 8 日目に 2.5 μ L 中 8 μ g、20 μ g 又は 50 μ g の ASO を投与し、マウスを最初の注射の 2 週間後に剖検した。2 週間の複数回投与試験のため、実験者は、1 及び 8 日目に 2.5 μ L 中 50 μ g のオリゴヌクレオチドを投与し、マウスを上記の通り剖検した。作用試験の持続期間のため、実験者は、マウスを投与後に 3 つの時点（2、4 及び 8 週間、時点当たり群当たり $n = 5 \sim 8$ ）で評価した。単一投与持続期間試験のため、実験者は、1 日目に 2.5 μ L 中 100 μ g のオリゴヌクレオチドを注射し、マウスを投与の 48 時間（1 群当たり $n = 6$ ）、1 週間（ $n = 6$ ）、2 週間（ $n = 6$ ）、8 週間（ $n = 6$ ）及び 12 週間（ $n = 6$ ）後に評価した。剖検時、マウスに経心臓的に生理食塩水をアベルチン麻酔下で灌流させた。実験者は頭蓋骨から脳を迅速に取り出し、実験者は一方の脳半球を組織学的分析のために処理し（10 % ホルマリン中で滴加固定 (drop-fixed)）、他方について、実験者は皮質、海馬、線条体及び小脳に解剖し、生化学分析のためにドライアイス上で凍結した。同様に、実験者は脊髄を解剖し、それをドライアイス上で凍結するか又はそれを組織学的分析のために処理した。

【0629】

細胞モデル。一部の実施形態において、細胞モデルを使用してオリゴヌクレオチド及び／又は組成物を評価した。実験者は、ATCC から Cos-7 細胞を入手した。患者線維芽細胞に由来する iPSC は、ALS の C9orf72 関連女性患者（64 歳、RUCDR Infinite Biologics）に由来した。実験者は、Corning Matrigel マトリックス（Milipore Sigma）上で mTeSR1 培地（STEMCELL Technologies）中でコロニーとして iPSC を維持した。神経前駆細胞を STEMdiff Neural System（STEMCELL Technologies）で産生した。iPSC を AggreWell800 プレート中で懸濁し、STEMdiff 神経誘導培地において胚様体として 5 日間、毎日 75 % の培地を交換しながら成長させた。実験者は、37 μ m セルストレーナーで胚様体を回収し、Matrigel をコートしたプレート上に STEMdiff 神経誘導培地にプレーティングし、培地を 7 日間毎日交換し、プレーティング 2 日で 85 ~ 95 % の胚様体が神経ロゼットを呈した。ロゼットを手作業で取り

10

20

30

40

50

、STEMdiff神経誘導培地 (STEMCELL Technologies) 中ポリ-L-オルニチン及びラミニンをコートしたプレートに移した。実験者は細胞が90%コンフルエンスに達し (7日間)、且つ神経前駆細胞 (NPC) と見なされるまで培地を毎日交換した。実験者は、NPCをTrypLE (ThermoFisher) で解離し、ポリ-L-オルニチン/ラミニンプレートにおいて成長因子 (20 ng/mL FGF2、20 ng/mL EGF、5 µg/mL ヘパリン) を補足した神経維持培地 (NMM; 70% DMEM、30% Ham F12、1かけるB27添加物) 中において1:2又は1:3の比で継代した。ニューロンに成熟させるため、実験者はNPCを維持し、5継代未満にわたって拡大し、>90%コンフルエンスになったとき、実験者はそれらをポリ-L-オルニチン/ラミニンをコートしたプレートにおいて成長因子を補足したNMM培地中で1:4継代した。翌日、分化0日目、実験者は培地を、新鮮な成長因子不含NMMに交換した。分化ニューロンをNMMに、50%の培地を週2回交換しながら4週間以上維持した。必要に応じて細胞を125,000個の細胞/cm²の密度でTrypLEと共にリプレーティングした。同じ患者のiPSC系に由来する運動ニューロンをBrainXellによって分化させ、それらの標準的プロトコルで播種した。C9-ALS初代線維芽細胞を2人の非関連C9キャリアからの皮膚生検物から生成し、各々は1,000個超のリピートを担持した。簡潔に言えば、実験者は生検皮膚を小片に切断し、次いでそれらを15% FBSを補足したDMEMで培養して線維芽細胞拡大を可能とした。実験者は、E15.5 C9-BACトランスジェニック胚から初代皮質ニューロンを生成した。O'Rourke, J.G. et al. C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron* 88, 892-901, doi:10.1016/j.neuron.2015.10.027 (2015)。実験者は、氷冷ハanks平衡塩溶液 (ThermoScientific) 上で各胚から皮質組織を解剖した。プールした組織をミンスし、0.05%トリプシン-EDTA (Life Technology) で37°Cで12分間消化した。消化を10% FBS/DMEMの添加によって停止した。細胞を粉碎し、Glutamax (ThermoScientific)、2%ペニシリン/ストレプトマイシン (streptomycin) 及びB27添加物 (ThermoScientific) を補足されたneurobasal培地中で再懸濁し、ポリ-オルニチンでプレコーティングされた6ウェルプレート (Sigma) 中で0.5 × 10⁶ 個の細胞/ウェルで播種した。iCell Neuron (iNeurons) は、Cellular Dynamics Internationalから市販されている。iPSC由来運動ニューロンは、BrainXellから市販されている。実験者は、ALS運動ニューロンにおける全用量反応アッセイ (10、2.5、0.625、0.16、0.04及び0.001 µM) でIC₅₀を計算した。簡潔に言えば、実験者はオリゴヌクレオチドをジミノシスによって送達し、1週間後に上記の通り転写物レベルを評価した。実験者は、GraphPadソフトウェアを使用して非線形回帰を使用して可変傾斜 (4パラメータ) でデータをフィットさせた。

【0630】

サザンブロット。Gentra Puregene組織キット (Qiagen) を使用してゲノムDNAをALS iPSC、ALS運動ニューロン及びC9BACトランスジェニックマウスから単離した。10 µgのDNAをAluI及びDdeIで37°Cで一晩消化し、次いで電気泳動によって0.6%アガロースゲル上で分離し、正電荷ナイロン膜 (Roche Applied Science) に転写し、UV光への曝露によって架橋させ、ハイブリダイゼーション緩衝液 (EasyHyb、Roche) 中でジゴキシゲニン標識 (G₂C₄)₅ DNAプローブと55°Cで一晩ハイブリダイズさせた。製造者によって推奨される通り抗ジゴキシゲニン抗体 (カタログ番号11093274910、Roche) 及びCDP-Star試薬を使用してプローブを検出した。

【0631】

熱変性 (T_m)。等モル量のサロゲートRNA (5'-GGUGGCGAGUGGGUGAGUGAGGAG)、U1模倣体 (5'-AUACUUACCCUGG) 又はASOを1 × PBS中で溶解させて1 µMの最終濃度の各鎖を得た。次いで、二本鎖試料を90°Cで加熱することによってアニーリングし、次いで4°Cにゆっくり冷却し、4°Cで貯蔵した。温度を5又は15°Cから95°Cに1分当たり+0.5°Cの速度で上昇させるにつれてC

10

20

30

40

50

ary Series UV-Vis分光光度計 (Agilent Technologies) を使用して 254 nm における UV 吸光度を 30 秒間の間隔で記録した。吸光度を温度に対してプロットし、各曲線の一次導関数を取ることによって Tm 値を計算した。

【0632】

RNアーゼHアッセイ。特定のRNアーゼHアッセイのため、実験者は、ヘテロ二本鎖をヒトRNアーゼHC (Iwamoto, N. et al. Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. Nat Biotechnol 35, 845-851, doi:10.1038/nbt.3948 (2017) に記載される通り調製) と 37℃ でインキュベートした。実験者は、ASO 及び / 又は U1 模倣体並びに RNA の等モル (各々 20 μM) 溶液を混合することによって二本鎖を調製した。各反応物は、90 μL の反応容積で RNアーゼH緩衝液 (75 mM KCl、50 mM トリス-HCl、3 mM MgCl₂、10 mM ジチオトレイトール、pH = 8.3) 中の 5.6 μM ASO-RNA、U1 模倣体-RNA 又は ASO-U1 模倣体-RNA ヘテロ複合体を含有した。プレ混合物を 37℃ で 10 分間インキュベートしてから酵素 + U1 模倣体、酵素 + ASO 又は酵素単独を、最終濃度比 2,000 : 1、1,000 : 1 又は 500 : 1 の基質 : RNアーゼHC で加えた。実験者は、反応を 7.0 μL の水中 500 mM EDTA ナトリウム溶液を使用して 5、10、15、30、45 及び 60 分でクエンチした。0 分の時点について、実験者は EDTA を酵素前に反応混合物に加えた。実験者は、緩衝液 A (200 mM HEPES 及び 8 mM トリエチルアミン) 及び緩衝液 B (A + メタノール、50 : 50、v/v) の勾配を使用して Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラム (2.7 μm、2.1 × 50 mm) 上に 70℃ でインジェクトした後の各反応物の 254 nm 及び 280 nm の UV 吸光度を記録した。実験者は、全長 RNA オリゴマーに対応するクロマトグラムからのピーク面積を積分し、それらをアンチセンス鎖と比較して正規化した。実験者は、残留 RNA パーセンテージを、0 分の時点をもとに 100% と定義してプロットして RNA 切断 (n = 3) の相対速度を示した。実験者は、2 元 ANOVA でデータを分析した。エラーバーは標準偏差を示す。

【0633】

RNアーゼHアッセイについての二本鎖分析。一部の実施形態において、実験者は、ASO、RNA 及び / 又は U1 の等モル溶液を混合して二本鎖を 20 μM の最終濃度で調製した。実験者は、3 つの複合体 : ASO + RNA、RNA + U1 及び ASO + RNA + U1 を調製した。混合物を 90℃ で 2 分間加熱し、4 時間超、室温にゆっくり冷却させた。D1000 ラダー 及び 試料緩衝液 (7 mM KCl、20 mM リン酸塩緩衝液、20 mM グアニジン-HCl、80 mM NaCl、20 mM 酢酸塩) を室温で 30 分間平衡化した。分析のための試料は、D1000 試料緩衝液と 1 : 1 で混合することによって調製した。試料 及び ラダーは、IKA ボルテックスを使用して 2,000 rpm で十分に 1 分間混合した。試料を遠心分離して試験管底部に沈降する十分な容積を確保した。実験者は、4200 Agilent TapeStation で High Sensitivity D1000 screentape (サイジング範囲 35 ~ 1,000 bp) を製造者のプロトコルに従って使用して二本鎖を分析した。

【0634】

熱変性 (Tm)。等モル量の RNA 及び各 ASO を 1 × PBS 中で溶解させて 1 μM の最終濃度の各鎖を得た。次いで、二本鎖試料を 90℃ で加熱することによってアニーリングし、次いで 4℃ にゆっくり冷却し、4℃ で貯蔵した。温度を 15℃ から 95℃ に 1 分当たり +0.5℃ の速度で上昇させるにつれて Cary Series UV-Vis 分光光度計 (Agilent Technologies) を使用して 254 nm における UV 吸光度を 30 秒間の間隔で記録した。吸光度を温度に対してプロットし、各曲線の一次導関数を取ることによって Tm 値を計算した。

【0635】

ルシフェラーゼスクリーニングアッセイ。実験者は、psiCHECK2 ベクター中のウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の 3' -UTR 中の ヒト C9orf72 遺伝子 (158 ~ 900 塩基対) からの配列を含有するルシフェラーゼコンストラクトを生成した。この配列

をターゲティングする A S O は、ホタルルシフェラーゼシグナルに影響を与えずにウミシイタケルシフェラーゼシグナルを低下させるはずである。実験者は、ウミシイタケルシフェラーゼシグナルをホタルルシフェラーゼシグナルに正規化して非ターゲティング対照 A S O (WV-993) に対する A S O の相対活性を比較した。実験者は A S O (15又は30 nM) 及びルシフェラーゼレポーターコンストラクト (20 ng) を、Cos-7細胞中へのLipofectamine 2000でのトランスフェクションによって送達した。ホタル及びウミシイタケルシフェラーゼシグナルを、トランスフェクションの48時間後にプレートリーダー (Molecular Devices Spectramax M5) で定量した。実験者は、実験当たり3つの生物学的レプリケートを実施した。

【0636】

細胞モデルへの A S O 送達。ヒト A L S 皮質ニューロンを24ウェルプレート中でNMN中で少なくとも4週間維持し (ウェル当たり250,000個の細胞)、1 μ Mの示される A S O でジミノシスによって (トランスフェクション試薬なしで) 1週間処理した。C9-BACトランスジェニックマウスからの初代ニューロンを培養の5日後に A S O でジミノシスによって示される用量で処理し、処理の15日後に採取した。ヒト A L S 運動ニューロンを凍結ストックから12ウェルプレート中で播種し (ウェル当たり280,000個の細胞)、7日目にジミノシスによって処理し、14日目に回収した。10日目、10 ng BDNF、10 ng の GDNF 及び1 ng の TGF- β 1を含有する50 μ Lの成長因子カクテルを培地交換なしで加えた。C9患者由来線維芽細胞を10 cmディッシュ中でプレティングし、Lipofectamine RNAiMax試薬 (ThermoScientific) を使用して A S O をトランスフェクトした。細胞を処理の72時間後に回収した。

【0637】

C9orf72転写物定量アッセイ。ヒトC9-ALS皮質ニューロン及び運動ニューロンにおいて、Trizol (Invitrogen) を使用して製造者のプロトコルに従ってトータルRNAを抽出した。各試料について、トータルRNAを29.5 μ LのRNアーゼフリー水中で溶出させ、次いで2 μ L (4 U) のDNアーゼI (New England Biolabs, M0303L) 及び3.5 μ Lの10 $\times$ 反応緩衝液を加えた。gDNA除去のために試料を37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。EDTAを5 mMの最終濃度まで加え、DNアーゼIを75 $^{\circ}$ Cで10分間熱不活化した。RNAをHigh-Capacity RNA-to-cDNA (商標) キット (Applied Biosystems) で、製造者の説明書に従って逆転写させた。実験者は、以下のTaqmanプローブを使用した: C9orf72全転写物についてHs00376619_m1 (FAM) (カタログ番号4351368、ThermoFisher) (V1、V2及びV3上で共通); C9orf72 V3転写物についてHs00948764_m1 (FAM) (カタログ番号4351368、ThermoFisher); ヒトHPR1転写物についてHs02800695_m1 (カタログ番号4448486、ThermoFisher)。qPCR反応: 95 $^{\circ}$ Cで3分間、95 $^{\circ}$ Cで10秒間及び60 $^{\circ}$ Cで30秒間の40サイクル。C9患者由来線維芽細胞及びC9-BAC初代細胞系において、Trizol (ThermoScientific) を使用してトータルRNAを単離し、続いてDNアーゼI (Qiagen) で処理した。ランダムヘキサマー及びMultiScribe逆転写酵素 (ThermoScientific) を使用して製造者の説明書に従って1 μ gのトータルRNAをcDNAに逆転写させた。定量的PCRをStepOnePlusリアルタイムPCR (qRT-PCR) システムでSYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) 並びに記載の通りの0.2 μ Mのフォワード及びリバースプライマーを使用して実施した。Tran, H. et al. Differential Toxicity of Nuclear RNA Foci versus Dipeptide Repeat Proteins in a Drosophila Model of C9ORF72 FTD/ALS. Neuron 87, 1207-1214, doi:10.1016/j.neuron.2015.09.015 (2015)。Hpr1検出のため、実験者は以下のプライマーを使用した: フォワード5'-CAAACTTTGCTTTCCCTGGTT、リバース5'-TGGCCCTGTATCCCAACACTTC。各試料及び転写物についてのCt値をHpr1に正規化した。2exp(- Δ Ct)法を使用して各転写物の相対発現を決定した。

【0638】

PCR及びハイブリダイゼーションELISAによるASO定量による転写物分析のための組織処理。実験者は組織を解剖し、予め秤量したEppendorf試験管に新鮮凍結した。実験者は、再秤量することにより組織重量を計算した。溶解のため、実験者は4容量のTrizol又は溶解緩衝液(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)を1単位重量に加え(組織1mgにつき4μLの緩衝液)、全ての組織片が溶解するまで組織を4℃でPrecellysを使用してホモジナイズした。薬物動態(PK)測定のために30~50μLの組織ライセートを96ウェルプレートに取っておいた。残りのライセートは-80℃で保存するか(それが溶解緩衝液中にある場合)又はRNA抽出に使用した(それがTrizol中にある場合)。

【0639】

実験者は、以下のプローブを利用してこの試験で使用されたASOをハイブリダイゼーションELISAによって選択的に定量した: 捕捉プローブ: 「C9-イントロン-Cap」/5AmMC12/TGGCGAGTGG; 検出プローブ: 「C9-イントロン-Det」: GTGAGTGAGG/3BioTEG/。実験者は、無水マレイン酸活性化96ウェルプレート(Pierce 15110)に2.5%NaHCO₃(Gibco, 25080-094)中500nMの捕捉プローブ50μLを37℃で2時間コーティングした。次に、プレートをPBST(PBS+0.1%Tween-20)で3回洗浄し、5%無脂粉乳-PBSTで37℃で1時間ブロックした。ペイロードASOをマトリックスに段階希釈した。この標準を元の試料と共に、全ての試料中のASO量が50ng/mL未満になるように溶解緩衝液(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)で希釈した。20μLの希釈試料と、PBSTで希釈した180μLの333nM検出プローブとを混合し、次に変性させた(65℃、10分、95℃、15分、4℃∞)。ブロックしたELISAプレートに50μLの変性試料をトリプリケートで分配し、4℃で一晩インキュベートした。3回のPBST洗浄後、PBST中の1:2,000ストレプトアビジン-AP(SouthernBiotech, 7100-04)、50μL/ウェルを加え、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。検量線に従って4パラメータ回帰によって試料中のASOを計算した。検出の下限値は、組織1グラム当たり1.25μgのASOであった。

【0640】

マウス脳ホモジネートにおける安定性。実験者は、5μLの各オリゴ溶液(200μM)を45μLのマウス脳ホモジネート(インハウスで調製、20mg/mL)に加えることによって、マウス脳ホモジネートにおけるASOの安定性を決定した。実験者は、各反応物を400rpmで振盪しながら37℃でインキュベートした。実験者は、20merのDNA配列を陽性対照として使用してアッセイの性能を評価した。これはヌクレアーゼ分解から保護するための化学修飾を取り込まないため、DNAは急速に分解する。実験者は反応を終了させ、実験者はトリプリケートで各時点(0~5日)で、50μLの停止緩衝液(2.5%IGEPAL、0.5M NaCl、10mM EDTA、50mMトリリス、pH=8.0)を加え、次いでボルテックスに供することによって実施した。次に、実験者は20μLの内部標準(50μM: 5'-GCGTTTGTCTCTTCTTCUU GCGTTTUU-3')、250μLの2%水酸化アンモニウム及び100μLのフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を各試験管に加えた。ボルテックスに供した後、実験者は各反応物を17,000rpmで室温で30分間スピンドルし、150μLのクロロホルムを使用する水層による上記抽出プロトコルを繰り返した。新たな水層を新たな試験管に移した後、実験者は各試料を乾燥させ、次に水で100μLの容積で再構成した。2μLの混合物をQ Exactive質量分析計(Thermo Fisher Scientific)に、Agilent Poroshellカラム(120、EC-C18 2.7μm、2.1×50mm)及び移動相A(水中400mM HFIP、15mM TEA)及び移動相B

10

20

30

40

50

(メタノール)を使用してインジェクトした。実験者は、データ捕捉のため並びにピーク面積及び分析物と内部標準とのピーク面積比を計算するためにXcalibur (商標) (バージョン4.0.27.10、Thermo Fisher Scientific)を使用した。分析物量の低減を使用してインビトロ安定性の程度を評価した。実験者は、3つの技術的レプリケートから平均及び標準偏差を計算した。

【0641】

RNAフォーカスの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) 検出。実験者は、既に記載される通りFISHを実施した。Tran, H. et al. Differential Toxicity of Nuclear RNA Foci versus Dipeptide Repeat Proteins in a Drosophila Model of C9ORF72 FTD/ALS. *Neuron* 87, 1207-1214, doi:10.1016/j.neuron.2015.09.015 (2015)。実験者は、5'-末端、Cy3コンジュゲート (G₂C₄)₃~4プローブを使用してセンスリピート伸長を検出し、Cy3コンジュゲート (G₄C₂)₃プローブを使用してアンチセンスリピート伸長を検出した (Integrated DNA Technologiesからのプローブ)。プローブを、40%ホルムアミド、2×SSC、0.1% Tween-20及びサケ精子DNAを含有するハイブリダイゼーション緩衝液中で55℃でハイブリダイズさせた。次に、試料を予め加温した緩衝液中及びストリンジェンシー洗浄緩衝液 (0.2×SSC、0.1% Tween20) 中で55℃で2回洗浄した。次に、試料を、DAPIを有するProlong Gold褪色防止試薬 (ThermoFisher) 中でマウントした。共焦点画像をLeica TCS SP5 IIレーザ走査共焦点顕微鏡で撮影し、Leica LAS AFソフトウェアで処理した。実験者は、一次抗体 (抗NeuN抗体、MAB377、Millipore) の1:500希釈物及びAlexa Fluor 488 (Life Technologies) を有する1:500希釈ヤギ抗マウス二次抗体を使用した。実験者は、RPI回転ディスク共焦点顕微鏡 (Zeiss) を40倍の倍率で使用し、画像を488nm、Cy3及びDAPIチャンネルで収集した。Z Project機能を使用して赤色 (Cy3)、緑色 (488) 及び青色 (DAPI) からのスタック画像を併合した。DAPIチャンネルを使用してセット閾値を用いてConvert to Mask機能で核マスクを作った (各実験のための設定、サンプル間で一定)。

【0642】

RNAフォーカスの定量。核をマスクで識別し、各核の面積を測定した。緑色チャンネルをニューロンのマーカーとしてのNeuNで染色した。NeuNが前角領域中でより大きい核を染色するという観察に基づき、ハイスループットフォーカス計数のために78µm²よりも大きい核を有する細胞を運動ニューロンと同定した。Cy3チャンネルを使用してフォーカスを同定し、Find Maximum機能を使用してセットノイズ耐量 (30~90、各実験のための設定、サンプル間で一定) を用いて単一点を同定した。各核内で総輝度を記録し、この核中のフォーカスの数としての255で割った。確率モデルを使用して事後のフォーカス/細胞を計算し; フォーカス数及び細胞数をポアソン分布でR::Statsパッケージ中の関数rpoisを使用してモデリングした。モンテカルロ法を使用して事後サンプルを得た。PBS (即ち対照) 事後を、それ自体を含む各処理の事後から差し引くことによって事後に対して推定を実施した。化合物処理についての95%最高事後密度が0を含まなかった場合、これらの処理を95%信頼レベルでPBSと確実に異なるとみなした。

【0643】

MSDプラットフォームを使用するポリGP定量。脳及び脊髄試料を4容量のRIPA (50mMトリス、150mM NaCl、0.5% DOC、1% NP40、0.1% SDS及び完全プロテアーゼ阻害剤、pH8.0) 中でPrecellys装置中で1.4mm酸化ジルコニウムビーズを用いて振盪することによってホモジナイズした。試料を10,000rpmで4℃で10分間遠心分離し、清澄化したライセートの総タンパク質濃度を600nmタンパク質アッセイ試薬 (Pierce) で決定した。MSD Small-Spotプレートをポリクロナル捕捉抗体 (ウサギ抗ポリGP; AB1358、Millipore) の1µLの10µg/mL溶液でコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。翌日、プレートをP

B S Tで洗浄し、10% F B S / P B S T溶液で室温で1時間ブロックし、次にP B S Tで洗浄し、50～120 μgの脳ライセート（10% F B S / P B S T中に1：4又は1：5希釈）と2～4時間インキュベートした。プレートをP B S Tで洗浄し、スルホタグ共役検出抗体（ウサギ抗ポリGP；AB1358、Millipore）と室温で1時間インキュベートした。プレートをP B S Tで洗浄し、150 μLのMSD読み取り緩衝液T 1Xとインキュベートし、MSD QuickPlex SQ 120プレートリーダーで読み取った。組換え精製ポリGP x 30の検量線を野生型マウス皮質又は脊髄ホモジネートのマトリックス中で調製した。空のウェルから測定したバックグラウンドシグナルを差し引いた後、検量線についての線形ベストフィット回帰直線を使用して組織1マイクログラム当たりのポリGPの濃度を内挿した。

10

【0644】

ウエスタンブロット。実験者は、ウエスタンブロッティングによってC9orf72タンパク質の発現を定量した。簡潔に言えば、R I P A抽出物からのタンパク質をプレキャスト4～12% S D S - P A G E（Criterionゲル、Bio-Rad）でサイズ分画し、P V D F膜に転写した。C9orf72を検出するため、実験者は、マウスモノクローナル抗C9orf72抗体GT779（1：2，000、GeneTex Inc.）及び二次DyLightコンジュゲート抗体を使用した。実験者は、Odysseyイメージングシステム（LI-COR Biosciences）を使用してブロットを視覚化及び定量した。2週間のデータ及び8週間のデータについてのフルサイズ化ブロットを分析した。

20

【0645】

組織調製。二段階抽出手順を使用して脳及び脊髄試料を処理した；各段階後、10,000 rpm、4℃で10分間の遠心を行った。実験者は、最初にR I P A（50 mM トリス、150 mM N a C l、0.5% D O C、1% N P 40、0.1% S D S及びComplete、pH 8.0）緩衝液中で試料をホモジナイズし、次に5 M グアニジン-H C l中でペレットを再懸濁した。実験者は、MSD Blocker Aキット（R93AA-2）（Meso Scale Diagnostics）を使用するMeso Scale Discoveryアッセイでスルホタグコンジュゲート抗ポリGPを用いて各プール中のポリGPを定量した。実験者は、ポリクローナル抗GP抗体AB1358（Millipore Sigma）を捕捉及び検出抗体の両方として使用した。アッセイをMSD（MESO QUICKPLEX SQ 120）によって製造者の説明書（Meso Scale Diagnostics）に従って読み取った。実験者は、野生型マウス脳R I P Aライセート中に希釈したアフィニティー精製F l a g -ポリGP（GenScript）に基づく検量線と比較してポリGPを定量した。

30

【0646】

薬物動態（P K）分析。C9orf72-631の平均組織濃度-時間プロファイルを、1コンパートメントモデルを使用して一次吸収速度及び一次排泄速度を用いてモデリングした。組織濃度は

$$C_t = Dose * K_a / V * (K_a - K_e) * (exp(-K_a * t) - exp(-K_e * t))$$

によって記載され、

式中、 C_t は、組織濃度を表し、 $Dose$ は、投与量を表し、 K_a は、吸収速度を表し、 V は、容積分布を表し、 K_e は、排泄速度を表し、及び t は、投与後の時間を表す。組織中の終末半減期を $\ln 2 / K_e$ として導いた。2コンパートメントモデルも検証したが、オーバーパラメータ化されると思われた。全ての定量値の限界未満を、分析のために0に設定した。Phoenix（登録商標）WinNonlin（登録商標）8.1ソフトウェアプログラム（Certara、Princeton、NJ、USA）を使用してモデルパラメータを推定した。

40

【0647】

ViewRNA ISHアッセイ

実験者は、ViewRNA ISH Tissue 1-Plexアッセイ（ThermoFisher Scientific、カタログ番号QVT0051）をインサイチュでのA S Oの検出に適合させた。簡潔に言えば、マウスの停止後、脳半球及び脊髄生検物を10%中性緩衝化ホルマリン中で2～8℃

50

で一晩固定し、処理し、パラフィン中で包埋した。パラフィン切片（5 μm厚）を調製し、使用まで室温で保存した。スライドを60℃で少なくとも1時間ベーキングした後、キシレン（VWR Chemicals）中の切片のインキュベーションによって10分間脱ろうを実施し、100%エタノール（ThermoFisher Scientific）中でリンスした。スライドを室温で少なくとも30分間空気乾燥させた後、疎水バリアを作出及び乾燥させてからViewRNA ISH標準プロトコルを継続した。再水和したスライドを予熱した標的探索試薬で決定された通りの温度95℃で10分間熱処理し、次にプロテアーゼ消化（Protease QF 1:100、1×PBS中、予め加温）を37℃で15分間行った。処理したスライドを1×PBS中で攪拌しながらリンスし、次にそれらを予め加温したProbe Set Diluent QT（切片当たり300 μL）中12.5 nMに希釈したWVE-3972-01、ペプチジルプロリルイソメラーゼB（PPiB）（陽性対照）及び／又はジヒドロジピコリン酸レダクターゼ（dapB）（陰性対照）についてのQuantiGene ViewRNA miRNAプローブセット（ThermoFisher Scientific）で40℃で2時間処理した。リンスしたスライドを室温で24時間まで保存することができた。シグナル増幅及び検出のため、スライドを予め加温したAmplifier Diluent QF中で1:200で希釈したワーキングPreAmp1 QF溶液中で40℃で30分間インキュベートし；洗浄緩衝液中で攪拌しながらリンスし、次に予め加温したAmplifier Diluent QF中で1:200で希釈したワーキングAmp1 QF溶液中で40℃で20分間インキュベートし、洗浄緩衝液中で攪拌しながらリンスし、次にLabel Probe-APワーキング溶液（Label Probe Diluent QF中で1:1000希釈）中で40℃で20分間インキュベートし、洗浄緩衝液中で攪拌しながらリンスした。AP-Enhancer溶液を加え、室温で5分間インキュベートしてからFast Red基質を加え、40℃で30分間インキュベートして赤色堆積物を生じさせた。その後、核酸DNAをヘマトキシリン及び／又はHoechst33342色素で対比染色した。スライドをProLong Gold褪色防止剤マウンティング培地でマウントし、薄ガラスカバースリップでカバーした。各脳半球／脊髄横断面のため、Zeiss Axio Observer顕微鏡（Zeiss, Thornwood, NY, USA）を明視野又は蛍光視野下で使用して代表的なデジタル画像を生成した。

10

20

30

40

50

【0648】

インビボ可視化を実施し、8週間処理群の組織切片上のWV-30210を検出するように設計されたViewRNAプローブを使用して脳及び脊髄組織中のオリゴヌクレオチドの分布を評価した。WV-30210は組織全体にわたり広く分布され、ニューロン中で集積され得ることが確認された。

【0649】

統計的分析。別に記載のない限り、インビボデータを一元配置分散分析（ANOVA）とそれに続くスチューデント-ニューマン-ケウルの事後分析によってSigmaPlot 13.0を使用して分析した。

【0650】

キャピラリーウエスタンイムノアッセイ（Wes）を使用するC9orf72タンパク質発現の定量。

Wesを使用する評価を一例として以下に記載する。材料：

RIPA溶解及び抽出緩衝液（Thermo Scientific、カタログ番号89901）

Pierceプロテアーゼ阻害剤ミニタブレット（Life technologies、カタログ番号A32953）

Bertin Technologies Precellys Evolution組織ホモジナイザー

PierceBCA試薬A及びB（Fisher Scientific、カタログ番号PI23228及びカタログ番号PI23224）

Pierceウシ血清アルブミン標準（Thermo Scientific、カタログ番号23208）

Wes系（ProteinSimple、カタログ番号004-600）

Jess／Wes分離キット12～230 kDa（ProteinSimple、カタログ番号SM-W004）

抗C9orf72抗体、マウス (GeneTex、カタログ番号GTX632041)

抗HPR T抗体、ウサギ (Novus Biologicals、カタログ番号NBPI-33527)

抗ウサギ検出モジュール (ProteinSimple、カタログ番号DM-001)

抗マウス検出モジュール (ProteinSimple、カタログ番号DM-002)

【0651】

方法：

タブレットを有する10倍重量の容積のRIPA緩衝液及びひとすくいの溶解ビーズを加えることによって、脊髄及び皮質組織からのタンパク質ライセートを調製した。次に、試料をPrecellys Evolution組織ホモジナイザーで2～4サイクル(3×20秒; 6800rpm)ホモジナイズし、14000rpmで4度で10分間スピンドウンした。上清を新たな試験管中に慎重に移した。総タンパク質濃度を測定するため、PierceBCAタンパク質アッセイキットを製造者のプロトコルに従ってBSA標準を用いて使用してライセートの20μlの15倍希釈物を定量した。ライセートを0.1×試料緩衝液中で0.5ug/ulに正規化した。C9orf72定量は、Wes系で製造者の説明書に従って12～230kDa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実施した。ライセートをFluorescent Master Mixと混合し、95℃で5分間変性させた。試料、ブロッキング試薬(抗体希釈物)、一次抗体(抗体希釈物中1:100抗C9orf72、1:250抗HPR T)、HRPコンジュゲート二次抗体(使用準備可能な抗ウサギと1:1の比で組み合わせた使用準備可能な抗マウス)と化学発光基質をプレート中にピペティングした。装置の初期設定を使用した: 475Vで30分間のスタッキング及び分離; ブロッキング試薬で5分間、一次及び二次抗体の両方で30分間; ルミノール/ペルオキシド化学発光検出、約15分間(1-2-4-8-16-32-64-128-512秒の曝露)。産生される化学発光をCompassソフトウェアによって自動的に定量し(検出ピークの曲線下面積又は「AUC」)、電気泳動図として又は仮想プロット様画像として示す。C9orf72ピークのAUCをHPR TピークのAUCで割ることによって、計算した濃度を分析した。次に、動物のPBS処理群を平均化し、全てのデータ点をこの値で割った。

【0652】

実施例5. C9orf72オリゴヌクレオチド組成物はインビボで活性である

動物モデルを含めた様々な技術が、本開示に従って提供される技術の評価に利用可能である。一部の実施形態において、提供される技術は、マウスモデルにおいて評価する。例えば、薬力学試験を実施してC9orf72産物のノックダウンに対して特定のC9orf72オリゴヌクレオチド組成物を評価した。

【0653】

検証したC9orf72オリゴヌクレオチドは、WV-8012、WV-23741、WV-26633、WV-30206及びWV-28478であった。陰性対照はPBS(リン酸緩衝生理食塩水)であった。

【0654】

使用した動物: 雄及び雌C9-BACマウス、2～3か月齢、6群、38匹のマウス。
表11Aは投与設計を説明する。

【0655】

10

20

30

40

50

【表 3 9】

表 11A. インビボ試験の設計

群	被験物質	用量	投与レジメン	投与容積	群当たりのマウスの総数*	剖検時点
1	PBS	NA	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 uL	5	2 週間
2	WV-8012	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 uL	5	2 週間
3	WV-23741	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 uL	7	2 週間
4	WV-26633	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 uL	7	2 週間
5	WV-30206	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 uL	7	2 週間
6	WV-28478	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 uL	7	2 週間

10

【0 6 5 6】

ICV カニニューレ留置を実施した。1 日目に覚醒動物において PBS 又は 50 ug のオリゴヌクレオチドの ICV 注射。7 日目に PBS 又は 50 ug のオリゴヌクレオチドの 2 回目の投与。投与容積、2.5 uL。1 回目の注射の 2 週間後に剖検。

剖検：

時点：2 週間

20

組織：

一方の脳半球をホルマリン中に（組織学、パラフィン）。

皮質（CX）、海馬、小脳及び腰髄（SC）の上半分を秤量試験管中で急速凍結（PK/PD）。

腰髄の下半分を未秤量試験管中で急速凍結（DPR）。

頸髄及び胸髄、ホルマリン（RNA フォーカス定量、OCT 凍結ブロック）

【0 6 5 7】

結果を表 1 1 B ～ 1 1 I に示す。

【0 6 5 8】

脊髄（SC）（全転写物 表 1 1 B、V 3 表 1 1 C）及び大脳皮質（CX）（全転写物 表 1 1 D、V 3 表 1 1 E）からの転写物を分析した。大脳皮質（CX）（表 1 1 F）及び脊髄（SC）（表 1 1 G）からの全ての投与群におけるポリ GP レベルを分析した。脊髄（SC）（表 1 1 H）及び大脳皮質（CX）（表 1 1 I）からの C 9 o r f 7 2 タンパク質を分析した。C 9 o r f 7 2 タンパク質分析のプロトコルは実施例 4 に開示される（キャピラリーウエスタンイムノアッセイ（Wes）を使用する C 9 o r f 7 2 タンパク質発現の定量）。

30

【0 6 5 9】

【表 4 0】

表 11B. 転写物分析、脊髄(SC)、全転写物

PBS	WV-8012	WV-23741	WV-26633	WV-30206	WV-28478
1.1263	1.022	0.743	0.656		0.830
1.3581	0.934	0.689	0.525		0.748
0.9604	0.629	0.748		0.583	0.994
0.7587	0.825	0.442	0.738	0.477	1.396
0.7964	0.536	0.647	0.764	0.515	0.718
		0.436	0.515	0.504	1.015
		0.759	0.522	0.454	0.775

40

50

【 0 6 6 0 】

【表 4 1】

表 11C. 転写物分析、脊髓(SC)、V3

PBS	WV-8012	WV-23741	WV-26633	WV-30206	WV-28478
0.999	0.287	0.297	0.466		0.248
1.172	0.308	0.349	0.334		0.607
0.959	0.233	0.182		0.255	0.212
0.870	0.323	0.138	0.299	0.303	0.230
0.999	0.291	0.262	0.507	0.240	0.525
		0.216	0.361	0.374	0.301
		0.312	0.236	0.182	0.260

10

【 0 6 6 1 】

【表 4 2】

表 11D. 転写物分析、大脳皮質(CX)、全転写物

PBS	WV-8012	WV-23741	WV-26633	WV-30206	WV-28478
0.8727	0.604	0.776	0.922	0.648	0.776
0.9289	0.776	0.671	0.948	0.942	0.680
1.1436	0.639	0.675	0.809	0.484	0.621
1.0523	0.685	0.803	0.588	0.694	0.714
1.0025	0.661	0.699	0.724	0.680	0.699
		0.739	0.714	0.666	0.760
		0.584	0.661	0.481	0.704

20

【 0 6 6 2 】

【表 4 3】

表 11E. 転写物分析、大脳皮質(CX)、V3

PBS	WV-8012	WV-23741	WV-26633	WV-30206	WV-28478
1.063	0.582	0.806	0.876	0.659	0.547
1.034	0.711	0.641	1.034	0.711	1.063
1.155	0.641	0.570	0.706	0.558	0.637
0.789	0.637	0.778	0.752	0.852	0.594
0.958	0.532	0.811	0.664	0.716	0.562
		0.768	0.870	0.602	0.692
		0.687	0.882	0.414	0.650

40

【 0 6 6 3 】

50

【表 4 4】

表 11F. ポリ GP レベル(全ての用量)、大脳皮質(CX)

PBS	WV-8012	WV-23741	WV-26633	WV-30206	WV-28748
2.1830	0.680	1.239	1.119	1.387	0.690
2.3560	0.735	1.179	1.188	0.499	1.250
3.8870	0.894	0.882	1.344	0.703	0.481
0.9520	1.007	0.927	0.180	1.420	0.458
1.1490	0.662	0.789	0.910	0.518	0.622
		0.913	0.896	0.543	0.889
		1.162	1.641	1.134	1.220

10

【0 6 6 4】

【表 4 5】

表 11G. ポリ GP レベル(全ての用量)、脊髄(SC)

PBS	WV-8012	WV-23741	WV-26633	WV-30206	WV-28748
0.968	0.000	0.000	0.284	0.482	0.454
2.868	0.000	0.198	0.502	0.000	0.361
1.445	0.000	0.645	1.117	0.000	0.000
2.165	0.130	0.416	0.088	0.000	0.000
1.345	0.210	0.193	0.382	0.000	0.100
		0.173	0.373	0.287	0.469
		0.000	0.181	0.121	0.262

20

【0 6 6 5】

【表 4 6】

表 11H. C9orf72 タンパク質分析、脊髄(SC)

PBS	WV-8012	WV-23741	WV-26633	WV-30206	WV-28478
1.1419	1.158	0.973	0.793	0.536	0.966
0.6477	1.178	0.945	0.988	0.617	1.058
0.9952	1.013	0.584	0.764	0.932	1.353
1.0976	0.756	0.846	0.865	0.812	1.287
1.1176	0.975	1.007	0.642	0.555	0.699
		0.686	0.712	0.418	0.806
		1.051	0.539	0.867	1.208

30

40

【0 6 6 6】

50

【表 4 7】

表 11I. C9orf72 タンパク質分析、大脳皮質(CX)

PBS	WV-8012	WV-23741	WV-26633	WV-30206	WV-28478
0.983	1.041	0.944	0.957	0.829	1.148
0.959	1.023	1.071	1.082	0.996	1.055
1.088	1.138	1.002	0.946	0.879	1.095
0.894	1.089	1.007	0.984	0.972	1.022
1.077	1.148	1.092	1.096	0.701	1.062
		0.982	1.020	0.989	1.062
		1.008	0.822	1.064	0.964

10

【0 6 6 7】

本明細書に実証される通り、複数のC9orf72オリゴヌクレオチド組成物は、病態、障害又は疾患に関連するC9orf72産物をノックダウンし得る。

【0 6 6 8】

実施例6. C9orf72オリゴヌクレオチド組成物はインビボで活性である

別の実施例において、薬力学試験を実施してC9orf72産物のノックダウンに対して特定のC9orf72オリゴヌクレオチド組成物を評価した。

20

【0 6 6 9】

検証したC9orf72オリゴヌクレオチドは、WV-30206、WV-30210、WV-30211及びWV-30212であった。陰性対照はPBS（リン酸緩衝生理食塩水）であった。

【0 6 7 0】

使用した動物：雄及び雌C9-BACマウス、2～4か月齢、15群、102匹のマウス。表12Aは、投与設計を説明する。

【0 6 7 1】

30

40

50

【表 4 8】

表 12A. インビボ試験の設計

群	被験物質	用量	投与レジメン	投与容積	群当たりのマウスの総数*	剖検
						時点
1	PBS	NA	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	6	8 週間
2	WV-30206	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	8 週間
3	WV-30210	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	8 週間
4	WV-30211	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	8 週間
5	WV-30212	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	8 週間
6	PBS	NA	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	6	4 週間
7	WV-30206	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	4 週間
8	WV-30210	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	4 週間
9	WV-30211	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	4 週間
10	WV-30212	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	4 週間
11	PBS	NA	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	6	2 週間
12	WV-30206	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	2 週間
13	WV-30210	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	2 週間
14	WV-30211	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	2 週間
15	WV-30212	50/50 ug	ICV, 0 日目、7 日目	2.5 ul	7	2 週間

【0 6 7 2】

ICV カニューレ留置を実施した。1 日目に覚醒動物において PBS 又は 50 ug のオリゴヌクレオチドの ICV 注射。7 日目に PBS 又は 50 ug のオリゴヌクレオチドの 2 回目の投与。投与容積、2.5 uL。1 回目の注射の 2 週間、4 週間及び 8 週間後に剖検。

剖検：

時点：2 週間、4 週間及び 8 週間

組織：

一方の脳半球をホルマリン中に（組織学、パラフィン）。

皮質（CX）、海馬、小脳、肝臓、腎臓及び腰髄（SC）の上半分を秤量試験管中で急速凍結（PK/PD）。

腰髄の下半分を未秤量試験管中で急速凍結（DPR）。

頸髄及び胸髄、ホルマリン（RNA フォーカス定量、OCT 凍結ブロック）

【0 6 7 3】

結果を表 1 2 B ~ 1 2 I に示す。

【0 6 7 4】

脊髄（SC）（全転写物 表 1 2 B、V 3 表 1 2 C）及び大脳皮質（CX）（全転写物 表 1 2 D、V 3 表 1 2 E）からの転写物を分析した。大脳皮質（CX）（表 1 2 F）及び脊髄（SC）（表 1 2 G）からの全ての投与群におけるポリ G P レベルを分析した。脊髄（SC）（表 1 2 H）及び大脳皮質（CX）（表 1 2 I）からの C 9 o r f 7 2 タンパク質を分析した。C 9 o r f 7 2 タンパク質分析のプロトコルは実施例 4 に開示される（キャピラリーウエスタンイムノアッセイ（Wes）を使用する C 9 o r f 7 2 タンパク質発現の定量）。

【0 6 7 5】

10

20

30

40

50

【表 4 9】

表 12B. 転写物分析、脊髓(SC)、全転写物

PBS 2 週間	WV- 30206 2 週間	WV- 30210 2 週間	WV- 30211 2 週間	WV- 30212 2 週間	PBS 4 週間	WV- 30206 4 週間	WV- 30210 4 週間	WV- 30211 4 週間	WV- 30212 4 週間
0.90	0.64	0.56	0.58	0.51	0.98	0.63	0.58	0.51	0.56
1.17	0.71	0.49	0.41	0.58	0.93	0.98	0.65	0.59	0.51
1.05	0.70	0.53	0.55	0.53	1.06	0.59	0.42	0.62	0.53
0.94	0.83	0.65	0.46	0.50	0.98		0.57	0.78	0.57
0.90	0.72	0.52	0.50	0.47	1.09	0.79	0.43	0.62	0.72
1.04	0.83	0.49	0.50	0.50	0.96	0.39	0.42	0.54	0.51
	0.74	0.69	0.51	0.62		0.87	0.81	0.49	0.54
PBS 8 週間	WV- 30206 8 週間	WV- 30210 8 週間	WV- 30211 8 週間	WV- 30212 8 週間					
0.97	0.84	0.68	0.56	0.37					
1.11	1.03	0.55	0.49	0.50					
0.91	0.88	0.41	0.42	0.58					
1.01	1.09	0.63	0.57	0.51					
1.06	0.98	0.45	0.65	0.47					
0.93	1.01	0.47	0.72	0.71					
	1.00	0.39	0.51	0.43					

10

20

30

40

50

【 0 6 7 6 】

【表 5 0】

表 12C. 転写物分析、脊髓(SC)、V3

PBS 2 週間	WV- 30206 2 週間	WV- 30210 2 週間	WV- 30211 2 週間	WV- 30212 2 週間	PBS 4 週間	WV- 30206 4 週間	WV- 30210 4 週間	WV- 30211 4 週間	WV- 30212 4 週間
0.86	0.73	0.60	0.63	0.47	0.86	0.59	0.42	0.47	0.53
1.24	0.76	0.47	0.19	0.53	1.11	0.91	0.60	0.55	0.41
0.84	0.71	0.47	0.59	0.47	0.95	0.64	0.34	0.59	0.41
0.99	0.82	0.71	0.39	0.45	1.03		0.45	0.67	0.47
0.90	0.68	0.48	0.52	0.58	0.99	0.88	0.17	0.73	0.75
1.17	0.99	0.44	0.57	0.50	1.06	0.27	0.27	0.37	0.43
	0.90	0.66	0.43	0.74		0.78	0.76	0.52	0.39
PBS 8 週間	WV- 30206 8 週間	WV- 30210 8 週間	WV- 30211 8 週間	WV- 30212 8 週間					
0.94	0.72	0.47	0.47	0.09					
1.07	0.92	0.41	0.33	0.28					
1.01	0.80	0.13	0.16	0.33					
0.91	0.96	0.46	0.42	0.31					
1.22	1.00	0.32	0.34	0.33					
0.86	0.83	0.19	0.59	0.63					
	0.94	0.09	0.26	0.13					

10

20

【0 6 7 7】

30

40

50

【表 5 1】

表 12D. 転写物分析、大脳皮質(CX)、全転写物

PBS 2 週間	WV- 30206 2 週間	WV- 30210 2 週間	WV- 30211 2 週間	WV- 30212 2 週間	PBS 4 週間	WV- 30206 4 週間	WV- 30210 4 週間	WV- 30211 4 週間	WV- 30212 4 週間
0.90	0.64	0.56	0.58	0.51	0.98	0.63	0.58	0.51	0.56
1.17	0.71	0.49	0.41	0.58	0.93	0.98	0.65	0.59	0.51
1.05	0.70	0.53	0.55	0.53	1.06	0.59	0.42	0.62	0.53
0.94	0.83	0.65	0.46	0.50	0.98		0.57	0.78	0.57
0.90	0.72	0.52	0.50	0.47	1.09	0.79	0.43	0.62	0.72
1.04	0.83	0.49	0.50	0.50	0.96	0.39	0.42	0.54	0.51
	0.74	0.69	0.51	0.62		0.87	0.81	0.49	0.54
PBS 8 週間	WV- 30206 8 週間	WV- 30210 8 週間	WV- 30211 8 週間	WV- 30212 8 週間					
0.97	0.84	0.68	0.56	0.37					
1.11	1.03	0.55	0.49	0.50					
0.91	0.88	0.41	0.42	0.58					
1.01	1.09	0.63	0.57	0.51					
1.06	0.98	0.45	0.65	0.47					
0.93	1.01	0.47	0.72	0.71					
	1.00	0.39	0.51	0.43					

【0 6 7 8】

10

20

30

40

50

【表 5 2】

表 12E. 転写物分析、大脳皮質(CX)、V3

PBS 2 週間	WV- 30206 2 週間	WV- 30210 2 週間	WV- 30211 2 週間	WV- 30212 2 週間	PBS 4 週間	WV- 30206 4 週間	WV- 30210 4 週間	WV- 30211 4 週間	WV- 30212 4 週間
0.86	0.73	0.60	0.63	0.47	0.86	0.59	0.42	0.47	0.53
1.24	0.76	0.47	0.19	0.53	1.11	0.91	0.60	0.55	0.41
0.84	0.71	0.47	0.59	0.47	0.95	0.64	0.34	0.59	0.41
0.99	0.82	0.71	0.39	0.45	1.03		0.45	0.67	0.47
0.90	0.68	0.48	0.52	0.58	0.99	0.88	0.17	0.73	0.75
1.17	0.99	0.44	0.57	0.50	1.06	0.27	0.27	0.37	0.43
	0.90	0.66	0.43	0.74		0.78	0.76	0.52	0.39
PBS 8 週間	WV- 30206 8 週間	WV- 30210 8 週間	WV- 30211 8 週間	WV- 30212 8 週間					
0.94	0.72	0.47	0.47	0.09					
1.07	0.92	0.41	0.33	0.28					
1.01	0.80	0.13	0.16	0.33					
0.91	0.96	0.46	0.42	0.31					
1.22	1.00	0.32	0.34	0.33					
0.86	0.83	0.19	0.59	0.63					
	0.94	0.09	0.26	0.13					

10

20

30

40

50

【0 6 7 9】

【表 5 3】

表 12F. ポリ GP レベル(全ての用量)、大脳皮質(CX)

PBS 2 週間	PBS 4 週間	PBS 8 週間	WV- 30206 2 週間	WV- 30206 4 週間	WV- 30206 8 週間	WV- 30210 2 週間	WV- 30210 4 週間	WV- 30210 8 週間
1.10		0.66	0.52		0.44	0.25		0.10
	0.22	0.71	0.27	0.18	0.63	0.09	0.42	0.00
1.08	0.57	0.91	0.60	0.09	0.68	0.00	0.00	0.25
0.89	2.06	1.16	0.73	0.17	0.46	0.18	0.10	0.00
0.97	1.05	0.59	0.93	0.41	0.34	0.09	0.00	0.00
0.96	1.10	1.98	0.69	0.46	0.48	0.10	0.00	0.00
			0.45	0.34	0.69	0.50	0.29	0.00
PBS 2 週間	PBS 4 週間	PBS 8 週間	WV- 30211 2 週間	WV- 30211 4 週間	WV- 30211 8 週間	WV- 30212 2 週間	WV- 30212 4 週間	WV- 30212 8 週間
1.10		0.66	0.57		0.00	0.28		0.00
	0.22	0.71	0.16	0.00	0.09	0.24	0.00	0.05
1.08	0.57	0.91	0.36	0.77	0.00	0.26	0.09	0.05
0.89	2.06	1.16	2.25	0.57	0.10	0.26	0.00	0.06
0.97	1.05	0.59	0.27	0.80	0.19	0.27	0.35	0.00
0.96	1.10	1.98	0.38	0.16	0.47	0.42	0.34	0.08
			0.11	0.24	0.00	0.45	0.13	0.00

【0 6 8 0】

10

20

30

40

50

【表 5 4】

表 12G. ポリ GP レベル(全ての用量)、脊髄(SC)

PBS 2 週間	PBS 4 週間	PBS 8 週間	WV- 30206 2 週間	WV- 30206 4 週間	WV- 30206 8 週間	WV- 30210 2 週間	WV- 30210 4 週間	WV- 30210 8 週間
1.10	0.81		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.57	0.94	0.88	0.00		0.13	0.00	0.23	0.00
1.22	1.79	1.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.12	0.67	0.84	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.08	1.11	1.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00
0.90	0.68	0.89	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00
PBS 2 週間	PBS 4 週間	PBS 8 週間	WV- 30211 2 週間	WV- 30211 4 週間	WV- 30211 8 週間	WV- 30212 2 週間	WV- 30212 4 週間	WV- 30212 8 週間
1.10	0.81		0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.57	0.94	0.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.22	1.79	1.40	0.00	1.06		0.00	0.00	0.00
1.12	0.67	0.84	1.79	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00
1.08	1.11	1.00	0.30	0.23	0.13	0.00	0.00	0.00
0.90	0.68	0.89	0.35		0.00	0.30	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00

10

20

【 0 6 8 1】

【表 5 5】

表 12H. C9orf72 タンパク質分析 脊髄(SC)

PBS	WV- 30206	WV- 30210	WV- 30211	WV- 30212
0.77	1.02	0.90	1.18	1.01
1.07	1.02	0.95	1.05	1.14
1.09	0.77	1.03		0.89
1.02	1.03	0.73	1.04	1.15
1.13	1.07	1.05	0.92	0.99
0.92	1.00	1.06	0.99	1.16
	0.85	0.89	1.08	0.88

30

40

【 0 6 8 2】

50

【表 5 6】

表 12I. C9orf72 タンパク質分析 大脳皮質(CX)

PBS	WV-30206	WV-30210	WV-30211	WV-30212
1.01	0.95	1.11	1.02	0.93
1.13	1.12	0.97	1.14	0.97
0.85	1.04	0.93	0.91	1.10
0.78	1.05	1.00	0.98	0.93
1.08	0.88	0.87	0.96	0.99
1.15	1.08	0.74	1.11	1.06
	1.08	0.90	0.96	0.97

10

【0 6 8 3】

本明細書に実証される通り、複数のC9orf72オリゴヌクレオチド組成物は、病態、障害又は疾患に関連するC9orf72産物をノックダウンし得る。

【0 6 8 4】

実施例7. C9orf72オリゴヌクレオチド組成物はインビボで活性である

別の実施例において、薬力学試験を実施してC9orf72産物のノックダウンに対して特定のC9orf72オリゴヌクレオチド組成物を評価した。

20

【0 6 8 5】

検証したC9orf72オリゴヌクレオチドは、WV-8012及びWV-21446であった。陰性対照は、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）であった。

【0 6 8 6】

使用した動物：雄及び雌C9-BACマウス、2か月齢。表13Aは、投与設計を説明する。

【0 6 8 7】

【表 5 7】

表 13A. インビボ試験の設計

30

群	被験物質	用量	投与レジメン	投与容積	群当たりのマウスの総数*	剖検時点
1	PBS	NA	ICV, 0日目	2.5 ml	5	2週間
2	WV-8012	25 ug	ICV, 0日目	2.5 ml	4	2週間
3	WV-8012	50 ug	ICV, 0日目	2.5 ml	5	2週間
4	WV-8012	100 ug	ICV, 0日目	2.5 ml	5	2週間
5	WV-21446	25 ug	ICV, 0日目	2.5 ml	7	2週間
6	WV-21446	50 ug	ICV, 0日目	2.5 ml	7	2週間
7	WV-21446	100 ug	ICV, 0日目	2.5 ml	7	2週間
8	NA	NA	NA	NA	4	2週間

40

【0 6 8 8】

剖検：

時点：2週間

組織：

一方の脳半球をホルマリン中に（組織学、パラフィン）。

皮質（CX）、海馬、小脳及び腰髄の半分を秤量試験管中で急速凍結（PK/PD）。

腰髄の他の半分を未秤量試験管中で急速凍結（DPR）。

50

頸髄及び理論的脊髄、ホルマリン（RNAフォーカス定量、OCT凍結ブロック）。結果を表13B～13Gに示す。

【0689】

大脳皮質（CX）（全転写物 表13B、V3 表13C）及び脊髄（SC）（全転写物 表13D、V3 表13E）からの転写物を分析した。

【0690】

【表58】

表 13B. 転写物分析、大脳皮質(CX)、全転写物

PBS	WV-8012 (25ug)	WV-8012 (50ug)	WV-8012 (100ug)	WV-21446 (25ug)	WV-21446 (50ug)	WV-21446 (100ug)
1.04	1.02	0.87	0.89	0.79	0.85	0.68
1.07	0.86	0.81	0.77	0.91	0.81	0.76
0.87	0.89	1.00	0.83	0.89	0.96	0.78
1.02	0.89	0.97	0.93	0.86	0.91	
			0.75	1.17	0.77	0.76
				0.92	0.61	0.66
				1.06	0.56	0.69

10

20

【0691】

【表59】

表 13C. 転写物分析、大脳皮質(CX)、V3

PBS	WV-8012 (25ug)	WV-8012 (50ug)	WV-8012 (100ug)	WV-21446 (25ug)	WV-21446 (50ug)	WV-21446 (100ug)
0.97	0.89	0.91	0.74	0.59	0.47	0.39
0.94	0.96	0.85	0.80	1.12	0.85	0.77
0.97	1.10	1.05	0.93	1.05	0.98	0.90
1.11	0.92	1.05	0.87	0.95	0.89	
			0.73	1.18	0.72	0.47
				1.03	0.64	0.44
				0.98	0.46	0.61

30

【0692】

【表60】

表 13D. 転写物分析、脊髄(SC)、全転写物

PBS	WV-8012 (25ug)	WV-8012 (50ug)	WV-8012 (100ug)	WV-21446 (25ug)	WV-21446 (50ug)	WV-21446 (100ug)
1.05	0.66	1.07	0.99	0.83	0.93	1.11
1.07	0.73	1.05	0.76	0.79	1.03	0.90
0.79	0.76	0.86	1.26	1.28	0.75	0.83
1.10	0.83	0.72	0.74	0.68	0.91	
			0.93	0.79	0.79	0.94
				0.58	0.79	0.83
				0.61	0.70	0.86

40

50

【 0 6 9 3 】

【表 6 1】

表 13E. 転写物分析、脊髄(SC)、V3 転写物

PBS	WV-8012 (25ug)	WV-8012 (50ug)	WV-8012 (100ug)	WV-21446 (25ug)	WV-21446 (50ug)	WV-21446 (100ug)
1.08	0.54	1.23	1.04	0.22	0.90	0.16
1.16	0.60	0.45	0.33	0.24	0.20	0.13
0.71	0.52	0.90	1.20	1.33	0.59	0.22
1.05	0.68	0.35	0.45	0.39	0.50	
			0.36	0.96	0.13	0.16
				0.27	0.13	0.15
				0.24	0.14	0.14

10

【 0 6 9 4 】

WV-8012 及び WV-21446 の CNS 組織曝露を評価した。脳及び脊髄組織において用量依存的増加が観察された（2週間の剖検）。平均組織濃度：

WV-8012：脳（0.4～2.1 $\mu\text{g/g}$ ）、脊髄：（1.5～2.7 $\mu\text{g/g}$ ）；及び

20

WV-21446：脳（0.4～2.9 $\mu\text{g/g}$ ）、脊髄：（1.8～6.3 $\mu\text{g/g}$ ）。

【 0 6 9 5 】

【表 6 2】

表 13F. 組織曝露、脳(ug オリゴヌクレオチド/g 組織)

PBS	WT	WV-8012 25 μg	WV-8012 50 μg	WV-8012 100 μg
0.00	0.00	0.40	1.11	2.97
0.40	0.67	0.95	2.16	1.41
0.00	0.40	0.74	0.42	0.61
0.36	0.35	0.64	1.15	0.72
				4.77
PBS	WT	WV-21446 25 μg	WV-21446 50 μg	WV-21446 100 μg
0.00	0.00	0.64	10.76	6.29
0.00	0.40	0.00	0.46	0.78
0.00	0.00	0.00	0.32	0.39
0.00	0.00	0.38	0.44	0.00
		0.00	1.16	3.92
		0.00	1.15	7.33
		0.00	3.04	1.41

30

40

【 0 6 9 6 】

50

【表 6 3】

表 13G. 組織曝露、脊髄(ug オリゴヌクレオチド/g 組織)

PBS	WT	WV-8012 25μg	WV-8012 50μg	WV-8012 100μg
0.00	0.32	2.42	0.39	0.55
0.00	0.00	0.70	5.42	5.32
0.00	0.00	1.21	0.74	0.81
0.00	0.00	1.78	2.99	2.57
				4.26
PBS	WT	WV-21446 25μg	WV-21446 50μg	WV-21446 100μg
0.00	0.00	1.72	0.34	13.34
0.00	0.00	4.48	4.16	6.44
0.00	0.00	0.00	0.68	2.64
0.00	0.00	2.04	0.66	0.12
		0.32	1.92	8.58
		1.54	5.12	6.30
		2.20	2.00	6.40

10

20

【0697】

本明細書に実証される通り、C9orf72オリゴヌクレオチド組成物を送達することができ、それは、病態、障害又は疾患に関連するC9orf72産物をノックダウンし得る。

【0698】

実施例8. C9orf72オリゴヌクレオチド組成物はインビボで活性である

別の実施例において、薬力学試験を実施してC9orf72産物のノックダウンに対して特定のC9orf72オリゴヌクレオチド組成物を評価した。

30

【0699】

検証したC9orf72オリゴヌクレオチドは、WV-30210及びWV-30212であった。陰性対照は、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）であった。

【0700】

使用した動物：雄及び雌C9-BACマウス、2～4か月齢。表14Aは、投与設計を説明する。

【0701】

40

50

【表 6 4】

表 14A. インビボ試験の設計

群	被験物質	用量	投与レジメン	投与容積	群当たりのマウスの総数*	剖検時点
1	PBS	NA	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ml	8	6 週間
2	WV-30210	50/50 ug	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ml	8	6 週間
3	WV-30210	15/15 ug	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ml	8	6 週間
4	WV-30210	5/5 ug	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ml	8	6 週間
5	WV-30210	1.5/1.5 ug	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ml	8	6 週間
6	WV-30212	50/50 ug	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ml	8	6 週間
7	WV-30212	15/15 ug	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ml	8	6 週間
8	WV-30212	5/5 ug	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ml	8	6 週間
9	WV-30212	1.5/1.5 ug	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ml	8	6 週間

10

【0702】

時点：6 週間。

各動物からの組織：

20

皮質：2つの脳半球からの皮質を合わせ、1つの秤量試験管中に急速凍結する。

脊髄：上部及び下部腰髄を分離し、2つの試験管中に急速凍結し、上部腰髄を秤量試験管中で（RNA PD 及び Trizol PK）、下部腰髄を未秤量試験管中で急速凍結する（DPR）。頸髄＋理論的脊髄を秤量試験管中で急速凍結する（プロテイナーゼ K PK）。海馬及び小脳：2つの脳半球から海馬及び小脳を分離し、2つの未秤量試験管中に急速凍結する。

【0703】

結果を表 14B～14G に示す。

【0704】

大脳皮質（CX）（全転写物 表 14B、V3 表 14C、組織曝露 表 14D）及び脊髄（SC）（全転写物 表 14E、V3 表 14F、組織曝露 表 14G）からの転写物を分析した。

30

【0705】

【表 6 5】

表 14B. 転写物分析、大脳皮質(CX)、全転写物

PBS	WV-30210 50,50	WV-30210 15,15	WV-30210 5, 5	WV-30210 1.5, 1.5	WV-30212 50,50	WV-30212 15,15	WV-30212 5, 5	WV-30212 1.5, 1.5
0.68	0.45	0.77	0.86	1.08	0.44	0.55	0.80	0.71
0.90	0.49	0.81	1.14	1.04	0.69	0.83	0.64	0.49
1.22		0.59	1.00	1.20	0.57	0.62	0.67	0.65
1.16	0.52	0.86	1.16	1.27	0.93	0.74	0.73	0.85
0.99	0.53	0.86	0.59	1.31	0.63	0.71	0.56	0.91
0.99	0.73	1.18	0.94	1.24	0.67	1.02	0.69	1.07
1.09	0.45	0.31	1.09	1.09	0.58	0.73	1.08	0.87
0.96	1.32	0.89	1.01	1.36	0.55	1.06	1.04	1.15

40

【0706】

50

【表 6 6】

表 14C. 転写物分析、大脳皮質(CX)、V3 転写物

PBS	WV- 30210 50,50	WV- 30210 15,15	WV- 30210 5, 5	WV- 30210 1.5, 1.5	WV- 30212 50,50	WV- 30212 15,15	WV- 30212 5, 5	WV- 30212 1.5, 1.5
0.89	0.30	0.75	0.76	0.91	0.23	0.61	0.69	0.63
0.90	0.49	0.83	0.98	0.94	0.57	0.81	0.78	0.47
0.98		0.70	0.82	0.91	0.55	0.51	0.73	0.50
0.90	0.26	0.78	0.84	0.94	0.69	0.48	0.66	0.64
1.04	0.37	0.77	0.56	0.98	0.66	0.70	0.66	0.82
1.18	0.60	0.90	0.92	1.14	0.62	0.92	0.71	1.03
1.06	0.42	0.19	0.93	1.10	0.39	0.79	0.92	0.76
1.05	1.19	0.93	1.02	1.09	0.52	0.93	0.89	1.11

10

【0 7 0 7】

【表 6 7】

表 14D. 組織曝露、大脳皮質(CX) (ug オリゴヌクレオチド/g 組織)

PBS	WV- 30210 50/50 ug	WV- 30210 15/15 ug	WV- 30210 5/5 ug	WV- 30210 1.5/1.5 ug	WV- 30212 50/50 ug	WV- 30212 15/15 ug	WV- 30212 5/5 ug	WV- 30212 1.5/1.5 ug
0.00	15.38	1.42	0.20	0.04	21.97	1.48	0.21	0.04
0.00	4.04	0.67	0.09	0.04	2.20	1.03	0.24	0.05
0.00			0.29	0.18	2.15	1.90	0.21	0.07
0.00	7.71	0.46	0.38	0.03	0.92	2.61	0.35	0.06
0.00	4.37	0.62	1.69	0.04	1.52	0.54	0.97	0.06
0.00	1.47	0.46	0.27	0.01	3.54	0.36	0.13	0.07
	4.00	0.91	0.34	0.11	3.38	0.46	0.15	0.05
0.00	1.26	0.36	0.06	0.01	4.39	0.45	0.23	0.08

20

30

【0 7 0 8】

40

50

【表 6 8】

表 14E. 転写物分析、脊髄(SC)、全転写物

PBS	WV- 30210 50/50 ug	WV- 30210 15/15 ug	WV- 30210 5/5 ug	WV- 30210 1.5/1.5 ug	WV- 30212 50/50 ug	WV- 30212 15/15 ug	WV- 30212 5/5 ug	WV- 30212 1.5/1.5 ug
1.44	0.38	0.51	0.72	1.05	0.45	0.25	0.34	0.65
0.82	0.41	0.45	1.25	0.87	0.25	0.64	0.99	0.83
0.79		0.41	0.64	1.32	0.37	0.38	0.92	0.73
0.82	0.36	0.76	0.71	1.15	0.50	0.48	1.01	1.06
1.00	0.30	0.39	0.92	1.03	0.69	0.57	0.65	0.91
1.10	0.52	0.14	0.90	1.12	0.33	0.52	1.10	1.01
1.01	0.31	0.40	0.67	1.03	0.24	0.26	1.09	0.71
1.02	0.74	0.50	0.74	0.94	0.40	0.87	0.98	0.94

10

【0 7 0 9】

【表 6 9】

表 14F. 転写物分析、脊髄(SC)、V3 転写物

PBS	WV- 30210 50,50	WV- 30210 15,15	WV- 30210 5, 5	WV- 30210 1.5, 1.5	WV- 30212 50,50	WV- 30212 15,15	WV- 30212 5, 5	WV- 30212 1.5, 1.5
1.42	0.30	0.57	0.78	1.19	0.48	0.15	0.62	0.88
0.84	0.13	0.37	1.14	0.84	0.13	0.76	0.97	0.93
0.81		0.35	0.71	1.28	0.27	0.24	1.23	0.90
0.88	0.09	0.73	0.67	1.23	0.42	0.30	1.18	1.25
1.11	0.10	0.37	0.94	1.04	0.86	0.66	0.65	0.96
1.04	0.11	0.16	0.95	1.25	0.16	0.49	1.31	1.12
0.88	0.08	0.42	0.70	1.36	0.10	0.39	1.26	0.80
1.02	0.29	0.32	0.71	1.02	0.08	0.77	0.99	1.21

20

30

【0 7 1 0】

【表 7 0】

表 14G. 組織曝露、脊髄(SC) (ug オリゴヌクレオチド/g 組織)

PBS	WV- 30210 50/50 ug	WV- 30210 15/15 ug	WV- 30210 5/5 ug	WV- 30210 1.5/1.5 ug	WV- 30212 50/50 ug	WV- 30212 15/15 ug	WV- 30212 5/5 ug	WV- 30212 1.5/1.5 ug
0.00	2.36	1.41	0.29	0.11	2.82	3.00	0.71	0.05
0.00	3.30	2.04	0.15	0.19	4.24	0.73	0.72	0.14
0.00		2.59	0.55	0.04	3.30	3.68	0.48	0.13
0.00	8.13	0.68	0.72	0.13	2.05	2.94	0.48	0.03
0.00	6.97	2.54	0.63	0.23	1.99	2.16	1.61	0.07
0.00	3.50	2.20	0.35	0.11	4.92	1.93	0.48	0.10
0.00	10.59	1.38	0.71	0.11	7.97	2.15	0.46	0.08
0.00	3.62	3.19	0.66	0.07	6.65	1.69	1.50	0.11

40

50

【 0 7 1 1 】

【表 7 1】

表 14H. ポリ GP タンパク質測定、皮質(CX)

PBS	WV- 30210 50/50 ug	WV- 30210 15/15 ug	WV- 30210 5/5 ug	WV- 30210 1.5/1.5 ug	WV- 30212 50/50 ug	WV- 30212 15/15 ug	WV- 30212 5/5 ug	WV- 30212 1.5/1.5 ug
0.69	0.05	0.56	1.45	1.14	0.12	0.48	0.88	2.01
0.55	0.13	0.68	1.09	1.07	0.16	0.76	0.80	0.96
1.15		0.32	0.64	0.71	0.12	0.60	0.89	1.01
1.17	0.00	0.98	0.31	0.54	0.27	0.18	1.07	0.91
0.89	0.07	1.09	0.21	1.74	0.47	0.26	0.66	1.38
1.08	0.46	0.10	0.80	1.50	0.09	0.80	0.51	0.40
1.41	0.10	0.37	0.83	0.96	0.08	0.27	1.76	0.22
1.08	0.59	0.31	1.33	0.30	0.09	1.40	1.67	0.50

10

【 0 7 1 2 】

【表 7 2】

表 14I. ポリ GP タンパク質測定、脊髄(SC)

PBS	WV- 30210 50/50 ug	WV- 30210 15/15 ug	WV- 30210 5/5 ug	WV- 30210 1.5/1.5 ug	WV- 30212 50/50 ug	WV- 30212 15/15 ug	WV- 30212 5/5 ug	WV- 30212 1.5/1.5 ug
1.13	0.18	0.00	0.88	1.62	0.00	0.00	0.27	0.46
0.61	0.00	0.00	0.59	0.89	0.00	0.29	0.14	0.24
1.40		0.00	0.34	0.57	0.09	0.09	0.35	1.19
0.64	0.00	0.21	0.22	0.48	0.00	0.00	0.45	3.11
0.51	0.08	0.12	0.48	1.29	0.21	0.13	0.35	2.41
	0.00	0.00	0.24	0.78	0.00	0.11	1.07	2.26
1.79	0.00	0.10	0.26	0.85	0.00	0.00	1.04	0.74
0.92	0.00	0.00	0.10	1.01	0.00	0.21	0.31	0.95

20

30

【 0 7 1 3 】

本明細書に実証される通り、C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド組成物を送達することができ、それは、病態、障害又は疾患に関連するC 9 o r f 7 2 産物をノックダウンし得る。

【 0 7 1 4 】

実施例 9 . W V - 3 0 2 1 0 は投与の少なくとも 2 4 週間後にインビボ活性を提供する一部の実施形態において、薬力学試験を実施してC 9 o r f 7 2 産物のノックダウンに対してC 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド組成物、W V - 3 0 2 1 0 を評価した。これは、W V - 3 0 2 1 0 がC 9 o r f 7 2 転写物及びそれによってコードされる産物のレベルを投与の少なくとも 4、1 2、1 8 及び 2 4 週間後（最後の投与の少なくとも 2 3 週間後）に低減し得ることを裏付けた。当業者は、低減が 2 4 週間を超えていっそう長く持続し得ることを理解する。P B S（リン酸緩衝生理食塩水）を陰性対照として利用した。

40

【 0 7 1 5 】

使用した動物：雄及び雌 C 9 - B A C マウス、2 ~ 4 か月齢、8 群、6 4 匹のマウス。
表 1 5 A は投与設計を説明する。

【 0 7 1 6 】

50

【表 7 3】

表 15A. インビボ試験の設計

群	被験物質	用量	投与レジメン	投与容積	群当たり のマウスの 総数	剖検
						時点
1	PBS	NA	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ul	8	4 週間
2	WV-30210	50/50 μ g	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ul	8	4 週間
3	PBS	NA	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ul	8	12 週間
4	WV-30210	50/50 μ g	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ul	8	12 週間
5	PBS	NA	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ul	8	18 週間
6	WV-30210	50/50 μ g	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ul	8	18 週間
7	PBS	NA	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ul	8	24 週間
8	WV-30210	50/50 μ g	ICV、0 日目、7 日目	2.5 ul	8	24 週間

10

【0 7 1 7】

ICV カニューレ留置を実施した。0 日目に覚醒動物において PBS 又は 50 μ g のオリゴヌクレオチドの ICV 注射。7 日目に PBS 又は 50 μ g のオリゴヌクレオチドの 2 回目の投与。投与容積、2.5 μ L。1 回目の注射の 4 週間、12 週間、18 週間及び 24 週間後に剖検。

20

【0 7 1 8】

組織：

皮質 (CX)：2 つの脳半球からの皮質を合わせ、1 つの秤量試験管中に急速凍結する。

【0 7 1 9】

脊髄 (SC)：上部及び下部腰髄を分離し、2 つの試験管中に急速凍結し、上部腰髄を秤量試験管 (RNAPD 及び Trizol PK) 中で、下部腰髄を未秤量試験管中で急速凍結する (DPR)。頸髄 + 理論的脊髄を秤量試験管中で急速凍結する (プロテイナーゼ K PK)。

30

【0 7 2 0】

海馬及び小脳：2 つの脳半球から海馬及び小脳を分離し、2 つの未秤量試験管中に急速凍結する。

【0 7 2 1】

特定の結果を表 15 B ~ 15 I に示す。

【0 7 2 2】

脊髄 (SC) (全転写物 表 15 B、V3 表 15 C) 及び大脳皮質 (CX) (全転写物 表 15 D、V3 表 15 E) からの転写物を分析した。大脳皮質 (CX) (表 15 F) 及び脊髄 (SC) (表 15 G) からの全ての投与群におけるポリ G P レベルを分析した。脊髄 (SC) (表 15 H) 及び大脳皮質 (CX) (表 15 I) からの組織曝露を分析した。大脳皮質 (CX) (表 15 J) 及び脊髄 (SC) (表 15 K) 中の総 C9orf72 タンパク質を分析した。C9orf72 タンパク質分析のプロトコルは実施例 4 に開示される (キャピラリーウエスタンイムノアッセイ (Wes) を使用する C9orf72 タンパク質発現の定量)。

40

【0 7 2 3】

50

【表 7 4】

表 15B. 転写物分析、脊髄(SC)、全転写物

PBS 4 週間	WV-30210 4 週間	PBS 12 週間	WV-30210 12 週間	PBS 18 週間	WV-30210 18 週間	PBS 24 週間	WV-30210 24 週間
1.34	0.49	1.03	0.52	1.07	0.69	1.18	0.50
0.95		1.03	0.53	0.95	0.57	0.76	0.51
0.87	0.43	0.96	0.50	0.84	0.54	1.36	0.47
0.93	0.43	0.92	0.57	1.17		0.92	0.50
0.98	0.55	1.07	0.54	1.02	0.58	0.89	0.46
1.21	0.45	0.91	0.55	0.94	0.55	0.93	0.67
0.89	0.64	0.97	0.54	0.99	0.80	0.96	
0.82	0.45	1.11	0.51	1.02	0.61	1.00	0.43

10

【0 7 2 4】

【表 7 5】

表 15C. 転写物分析、脊髄(SC)、V3

PBS 4 週間	WV-30210 4 週間	PBS 12 週間	WV-30210 12 週間	PBS 18 週間	WV-30210 18 週間	PBS 24 週間	WV-30210 24 週間
1.09	0.17	1.07	0.11	1.13	0.49	1.01	0.28
0.97		1.01	0.16	0.86	0.17	0.83	0.23
0.97	0.09	0.98	0.10	1.05	0.19	1.48	0.21
1.03	0.09	0.99	0.15	1.01		0.82	0.37
0.95	0.18	1.00	0.09	1.01	0.37	0.88	0.25
1.17	0.09	0.91	0.22	1.05	0.26	1.01	0.54
0.99	0.43	0.94	0.10	0.97	0.69	0.95	
0.82	0.10	1.10	0.14	0.93	0.21	1.01	0.32

20

30

【0 7 2 5】

【表 7 6】

表 15D. 転写物分析、大脳皮質(CX)、全転写物

PBS 4 週間	WV-30210 4 週間	PBS 12 週間	WV-30210 12 週間	PBS 18 週間	WV-30210 18 週間	PBS 24 週間	WV-30210 24 週間
0.99	0.54	0.90	0.53	1.10	0.82	0.89	0.64
1.07		0.91	0.65	1.00	0.52	0.88	0.56
0.91	0.54	0.87	0.54	0.98	0.58	1.23	0.61
1.07	0.54	1.00	0.53	0.99		1.11	0.77
0.85	0.56	1.16	0.52	1.00	0.73	0.91	0.64
1.03	0.51	1.04	0.48	0.96	0.61	0.95	0.62
0.88	0.65	1.06	0.80	1.01	0.83	1.14	
1.22	0.54	1.07	0.61	0.96	0.62	0.89	0.73

40

【0 7 2 6】

50

【表 7 7】

表 15E. 転写物分析、大脳皮質(CX)、V3

PBS 4 週間	WV-30210 4 週間	PBS 12 週間	WV-30210 12 週間	PBS 18 週間	WV-30210 18 週間	PBS 24 週間	WV-30210 24 週間
1.00	0.58	0.90	0.44	0.92	0.79	0.81	0.52
1.09		1.06	0.58	1.02	0.38	0.91	0.62
0.96	0.58	0.90	0.51	1.02	0.64	1.38	0.46
0.92	0.46	0.87	0.53	1.05		1.02	0.77
1.03	0.56	1.03	0.45	0.95	0.72	0.89	0.56
1.07	0.47	1.07	0.28	0.94	0.64	0.97	0.47
0.87	0.77	1.02	0.64	1.12	0.83	0.95	
1.06	0.48	1.14	0.66	0.98	0.56	1.07	0.63

10

【0 7 2 7】

【表 7 8】

表 15F. ポリ GP レベル(全ての用量)、大脳皮質(CX)

PBS 4 週間	WV-30210 4 週間	PBS 12 週間	WV-30210 12 週間	PBS 18 週間	WV-30210 18 週間	PBS 24 週間	WV-30210 24 週間
0.45	0.09	0.76	0.05	0.69	0.21	0.92	0.06
0.97		0.97	0.08	0.33	0.06	1.2	0.08
0.93	0.14	1.28	0.03	1.33	0.08		0.08
1.22	0.03	0.5	0.05	1.33		0.53	0.17
0.86	0.1	1.34	0.12	1.3	0.18	0.91	0.16
0.74	0.15	0.99	0.04	0.96	0.13	0.88	0.17
1.32	0.2	0.54	0.04	1.03	0.29	1.32	
1.5	0.15	1.61	0.09	1.02	0.16	1.23	0.18

20

30

【0 7 2 8】

【表 7 9】

表 15G. ポリ GP レベル(全ての用量)、脊髄(SC)

PBS 4 週間	WV-30210 4 週間	PBS 12 週間	WV-30210 12 週間	PBS 18 週間	WV-30210 18 週間	PBS 24 週間	WV-30210 24 週間
		1.07	0	0.87	0	1.09	0.01
			0	1.33	0	0.44	0
1.64	0	2.17	0	1.48	0	2.22	0.01
	0	0.7	0	0.44		0.62	
1.37		0.7	0	1.4	0	1.07	
0.35	0	0.46	0.01	0.6	0.02	0.47	0.25
0.64	0	1.31	0	0.81	0.08	1.56	
	0	0.6	0	1.07	0	0.53	0.02

40

【0 7 2 9】

50

【表 8 0】

表 15H. 脊髄(SC)における組織曝露(ug オリゴヌクレオチド/g 組織)

PBS 4 週間	WV- 30210 4 週間	PBS 12 週間	WV- 30210 12 週間	PBS 18 週間	WV- 30210 18 週間	PBS 24 週間	WV- 30210 24 週間
0.00	3.25	0.00	1.32	0.00	0.64	0.00	0.86
0.00	2.67	0.00	1.88	0.00	3.54	0.00	2.03
0.00	9.96	0.00	3.70	0.00	3.69	0.00	1.69
0.00	9.27	0.00	3.07	0.00		0.00	0.42
0.00	3.24	0.00	5.01	0.00	1.82	0.00	0.80
0.00	7.02	0.00	1.16	0.00	1.74	0.00	0.14
0.00	1.61	0.00	2.60	0.00	0.56	0.00	0.82
0.00	5.66	0.00	1.88	0.00	1.46	0.00	0.35

10

【0 7 3 0】

【表 8 1】

表 15I. 大脳皮質(CX)における組織曝露(ug オリゴヌクレオチド/g 組織)

PBS 4 週間	WV- 30210 4 週間	PBS 12 週間	WV- 30210 12 週間	PBS 18 週間	WV- 30210 18 週間	PBS 24 週間	WV- 30210 24 週間
0.00	1.71	0.00	1.87	0.07	0.40	0.00	1.36
0.00	4.56	0.00	1.29	0.00	1.83	0.00	0.63
0.00	2.64	0.00	2.90	0.00	1.44	0.00	0.95
0.00	5.08	0.00	2.57	0.00		0.00	0.30
0.00	2.29	0.00	1.48	0.00	0.90	0.00	0.52
0.00	3.38	0.00	0.85	0.00	0.69	0.00	1.24
0.00	1.15	0.00	0.70	0.00	0.33	0.00	0.91
0.00	2.47	0.00	0.67	0.00	0.48	0.00	0.42

20

30

【0 7 3 1】

【表 8 2】

表 15J. 24 週間における大脳皮質(CX)における C9orf72 タンパク質分析

PBS	WV-30210
1.0173	0.9617
0.9275	0.981
0.9412	0.8581
1.0999	1.0275
1.036	0.9953
0.9894	0.9102
0.9887	0.918

40

【0 7 3 2】

50

【表 8 3】

表 15K. 24 週間における脊髄(SC)における C9orf72 タンパク質分析

PBS	WV-30210
1.1115	0.88
0.9836	0.8175
1.0792	0.6414
0.9599	0.8703
0.9427	1.1028
0.9101	1.0617
1.013	0.8591

10

【0733】

本明細書に実証される通り、WV-30210は、様々な病態、障害又は疾患に関連し得るC9orf72転写物及びそれによってコードされる産物の持続的低減を提供し得る。

【0734】

実施例10. C9orf72オリゴヌクレオチド組成物は様々なアッセイにおいて活性及び／又は選択的である

20

とりわけ、本明細書に実証される通り、本開示は、病態、障害又は疾患に関連し、伸長リピートを含むC9orf72転写物及び／又はそれによってコードされる産物の発現、活性及び／又はレベルを有効に及び／又は選択的に低減し得る技術を提供する。以下の表に、C9orf72オリゴヌクレオチド組成物での処理後のHPRT1に対する様々なC9orf72転写物（例えば、全てのV転写物、V3転写物のみなど）の特定の残留レベルを示し、1.000は100%の相対転写物レベル（ノックダウンなし）を表し、0.000は0%の相対転写物レベル（例えば、100%のノックダウン）を表す。レプリケート実験からの特定の結果を示す。実験はALS運動ニューロンにおいて実施した。追加のアッセイ条件は本明細書及び／又は国際公開第2019/032607号に記載される。

30

【0735】

表16A. 特定のC9orf72オリゴヌクレオチド組成物の活性

この表は、ALS運動ニューロン中のC9orf72転写物（V3転写物のみ）のノックダウンにおける様々なC9orf72オリゴヌクレオチド組成物の特定のデータを示す。他の「V3転写物のみ」評価におけるように、C9orf72／HPRT1におけるV3の相対倍率変化を示す。

【0736】

40

50

【表 8 4】

用量 (uM)	WV- 38627	WV- 39524	WV- 39526	WV- 30206	WV- 39527	WV- 39528	WV- 30212
0.08	0.89	0.94	0.96	0.75	0.45	0.55	0.57
	0.81	0.88	0.85	0.76	0.45	0.52	0.56
	0.82	0.88	0.81	0.85	0.45	0.55	0.49
0.4	0.66	0.67	0.56	0.39	0.15	0.20	0.26
	0.66	0.61	0.66	0.41	0.13	0.25	0.27
	0.71	0.60	0.61	0.41	0.14	0.21	0.24
2	0.44	0.32	0.30	0.17	0.03	0.05	0.07
	0.43	0.36	0.32	0.18	0.03	0.05	0.07
	0.43	0.30	0.32	0.17	0.03	0.06	0.09

10

用量 (uM)	WV- 30211	WV- 39523	WV- 39525	WV- 34452	WV- 34453	WV- 34466	WV- 39814
0.08	0.65	0.37	0.53	0.34	0.47	0.54	0.96
	0.59	0.34	0.53	0.33	0.49	0.50	0.91
	0.61	0.35	0.48	0.38	0.45	0.52	1.02
0.4	0.27	0.09	0.18	0.09	0.15	0.19	0.91
	0.25	0.08	0.16	0.08	0.14	0.17	1.01
	0.24	0.09	0.17	0.09	0.14	0.17	0.91
2	0.08	0.01	0.04	0.02	0.04	0.05	0.87
	0.08	0.02	0.03	0.02	0.03	0.04	1.01
	0.07	0.02	0.04	0.02	0.04	0.05	0.89

20

【0737】

表 16 B. 特定の C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド組成物の活性

30

この表は、A L S 運動ニューロン中の C 9 o r f 7 2 転写物（全 V 転写物）のノックダウンにおける様々な C 9 o r f 7 2 オリゴヌクレオチド組成物のデータを示す。C 9 o r f 7 2 / H P R T 1 における相対倍率変化を示す

【0738】

40

50

【表 8 5】

用量 (uM)	WV- 38627	WV- 39524	WV- 39526	WV- 30206	WV- 39527	WV- 39528	WV- 30212
0.08	0.94	0.96	0.85	0.75	0.84	0.86	0.81
	0.90	0.94	0.91	0.81	0.83	0.83	0.79
	0.86	0.92	0.88	0.66	0.78	0.77	0.78
0.4	0.95	0.83	0.84	0.66	0.69	0.63	0.71
	0.88	0.92	0.79	0.74	0.65	0.68	0.74
	0.83	0.88	0.92	0.78	0.67	0.68	0.64
2	0.65	0.66	0.68	0.71	0.41	0.51	0.56
	0.77	0.65	0.60	0.59	0.47	0.48	0.50
	0.70	0.64	0.76	0.62	0.47	0.47	0.57

10

用量 (uM)	WV- 30211	WV- 39523	WV- 39525	WV- 34452	WV- 34453	WV- 34466	WV- 39814
0.08	0.96	0.77	0.85	0.82	0.79	0.84	0.95
	0.89	0.79	0.76	0.75	0.83	0.82	0.92
	0.89	0.82	0.82	0.79	0.87	0.83	1.05
0.4	0.76	0.63	0.69	0.69	0.72	0.70	1.00
	0.72	0.62	0.59	0.66	0.73	0.69	1.04
	0.75	0.62	0.63	0.67	0.63	0.70	0.90
2	0.52	0.37	0.38	0.42	0.48	0.45	1.09
	0.58	0.37	0.39	0.42	0.52	0.46	1.00
	0.57	0.37	0.46	0.44	0.55	0.41	1.23

20

【0739】

実証される通り、様々なオリゴヌクレオチド組成物が、標的化された転写物、例えば、伸長リピートを含むし得、様々な病態、障害又は疾患に関連し得る転写物（例えば、V3転写物）を有効に及び選択的に低減し得る。

30

【0740】

別に注記のない限り、様々な実験において、実験で使用する細胞及び動物は、それらの細胞又は動物に典型的な状態で使用した。別に注記のない限り、インビトロ実験において、様々な細胞は、標準条件（例えば、特定の細胞タイプ、細胞系又は同様の細胞タイプ若しくは系に使用される最も一般的な条件）下で、例えば、Cambridge、MAに典型的な通常の成長培地、通常温度（37℃）並びに重力及び大気圧で成長させた。動物は、標準実験室条件下で、一般に室温又は数度涼しい温度で、Massachusettsに典型的な食餌、ケージサイズ、重力及び大気圧などの通常の条件で飼育した。別に注記のない限り、細胞も動物も、極端な温度（例えば、低温ショック又は熱ショック）、圧力、重力、周囲音、食料又は栄養枯渇などに供さなかった。

40

【0741】

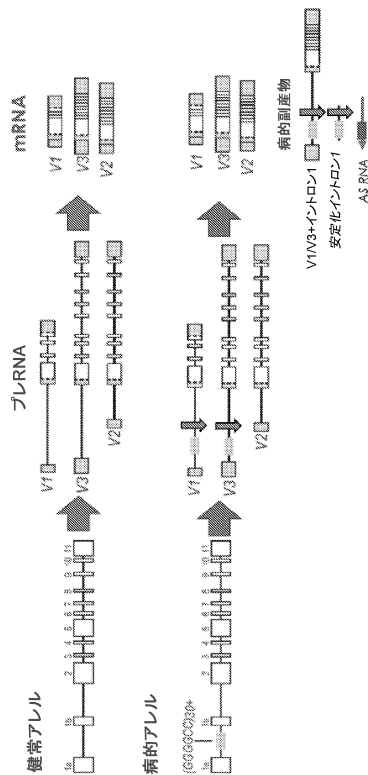
本明細書には様々な実施形態が記載及び例示されているが、当業者は、本開示に記載される機能を果たし、且つ／又は結果及び／若しくは利点の1つ以上を達成するための種々の他の手段及び／又は構造を容易に想定することができ、かかる変形形態及び／又は改良形態の各々は、包含されると見なされる。より一般的には、当業者は、本明細書に記載される全てのパラメータ、寸法、材料及び構成が例示であると意図され、且つ実際のパラメータ、寸法、材料及び／又は構成は、本開示の教示が用いられる具体的な1つ又は複数の適用に依存し得ることを容易に理解するであろう。当業者は、本開示に記載される本開示

50

の具体的な実施形態の均等物を多く認識するか、又はルーチンに過ぎない実験を用いて確認することが可能であろう。従って、前述の実施形態は、単に例として提示されており、添付の特許請求の範囲及びその均等物の範囲内において、特許請求される技術は、具体的に記載され且つ特許請求されているものと別様に実施され得ることが理解されなければならない。加えて、2つ以上の特徴、システム、論文、材料、キット及び／又は方法の任意の組み合わせは、かかる特徴、システム、論文、材料、キット及び／又は方法が互いに矛盾しない場合、本開示の範囲内に包含される。

【図面】

【図 1】



【配列表】

2022550915000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/54307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 31/7125; A61K 31/7115; A61K 31/712; C12N 15/113; A61P 25/28; C07H 21/00 (2020.01) CPC - A61K 31/7125; A61K 31/712; A61K 31/7115; C12N 15/113; A61P 25/28; C07H 21/00		
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	WO 2019/032607 A1 (WAVE LIFE SCIENCES LTD., et al.) 14 February 2019; paragraphs [00157], [00177], [00186], [00189], [00640], [001079]; Claims 1-4, 7, 13	1-11, 27
X	WO 2015/143078 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 24 September 2015; entire document	1
X	US 9,605,263 B2 (IONIS PHARMACEUTICALS, INC.) 28 March 2017; entire document	1
A	(HU, J et al.) Recognition of c9orf72 Mutant RNA by Single-Stranded Silencing RNAs. Nucleic Acid Therapeutics. April 2017, Vol. 27, No. 2; pages 87-94; DOI: 10.1089/nat.2016.0655	1-11, 27
☐ 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 18 March 2021 (18.03.2021)		Date of mailing of the international search report APR 08 2021
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/US20/54307

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US20/54307

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.: 28-57
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.:
Groups I+, Claims 1-22, 24, 26, 27 (in-part), and an oligonucleotide encompassing the base sequence:
ACTCACCCACTCGCCACCGC, encompassing a core encompassing a pattern of backbone chiral centers of:
(Np)l((Op/Rp)n(Sp)m)y, wherein Np is Rp, Op/Rp is Op, and each of l, n, m, and y is 1 (oligonucleotide structure)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US20/54307

-***-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 1-22, 24, 26, 27 (in-part), and an oligonucleotide encompassing the base sequence: ACTCACCCACTCGCCACCGC, encompassing a core encompassing a pattern of backbone chiral centers of: (Np)l((Op/Rp)n(Sp)m)y, wherein Np is Rp, Op/Rp is Op, and each of l, n, m, and y is 1 (oligonucleotide structure) are directed toward oligonucleotides comprising at least one modification of a sugar, base, or internucleotidic linkage.

The oligonucleotides will be searched to the extent they encompass an oligonucleotide encompassing the base sequence: ACTCACCCACTCGCCACCGC, encompassing a core encompassing a pattern of backbone chiral centers of: (Np)l((Op/Rp)n(Sp)m)y, wherein Np is Rp, Op/Rp is Op, and each of l, n, m, and y is 1 (first exemplary oligonucleotide structure). Applicant is invited to elect additional oligonucleotide(s), with fully specified structure(s) thereof (i.e. no optional or variable chiral centers, nucleobases, modifications or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional oligonucleotide(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-10, 11 (in-part), and 27 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass an oligonucleotide encompassing the base sequence: ACTCACCCACTCGCCACCGC, encompassing a core encompassing a pattern of backbone chiral centers of: (Np)l((Op/Rp)n(Sp)m)y, wherein Np is Rp, Op/Rp is Op, and each of l, n, m, and y is 1 (oligonucleotide structure). Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected 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 an oligonucleotide having the structure of: mA *Sm5Ceo n001R Teo m5Ceo n001RmA *SC *SC *SC *RA *SC *ST *Sm5C *SG *Rm5C *SC *SmA *SmC n001R m5Ceo *SmG *SmC, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein: m represents a 2'-OMe modification to a nucleoside; *S represents a Sp phosphorothioate linkage; m5Ceo represents 5-methyl 2'-O-methoxyethyl C; n001R represents a Rp n001 linkage, wherein a n001 linkage has the structure of (shown dimethylimidazolidine-2-imine phosphate group); co represents a 2'-OCH2CH2OCH3 modification to a nucleoside; *R represents a Rp phosphorothioate linkage; and m5 represents a methyl at 5-position of C (oligonucleotide structure).

Group II, Claims 23, 25, and 27 (in-part) are directed toward an oligonucleotide having the structure of: mC *Sm5Ceo Teo m5Ceo mA *SC *ST *SC *RA *SC *SC *RC *SA *SC *ST *Sm5Ceo *SmG *SmC *Sm5CX *SmG, wherein X represents an additional modification.

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 the base sequence ACTCACCCACTCGCCACCGC, not present in Group II; the special technical features of Group II include the base sequence CCTCACTACCCACTCGCCG, not present in any of Groups I+.

Groups I+ and II share the technical features including: an oligonucleotide having a structure that optionally includes the following: a 2'-OMe modification to a nucleoside, a Sp phosphorothioate linkage, 5-methyl 2'-O-methoxyethyl C, a 2'-OCH2CH2OCH3 modification to a nucleoside, a Rp phosphorothioate linkage, or a methyl at 5-position of C.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2019/032607 A1 to Wave Life Sciences Ltd. (hereinafter "Wave").

an oligonucleotide (an oligonucleotide; abstract, Claim 1) having a structure that optionally includes the following: a 2'-OMe modification to a nucleoside (having a structure that optionally includes the following: a 2'-OMe modification to a nucleoside; paragraph [0147]), a Sp phosphorothioate linkage (a Sp phosphorothioate linkage; paragraph [0009]), 5-methyl 2'-O-methoxyethyl C (5-methyl 2'-O-methoxyethyl C; key to Table 1A, page 281), a 2'-OCH2CH2OCH3 modification to a nucleoside (a 2'-OCH2CH2OCH3 modification to a nucleoside; key to Table 1A, page 281), a Rp phosphorothioate linkage (a Rp phosphorothioate linkage; paragraph [0009]), or a methyl at 5-position of C (a methyl at 5-position of C; key to Table 1A, page 280).

No technical features are shared between the oligonucleotide modifications or chiral patterns of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: an oligonucleotide comprising at least one modification of a sugar, base or internucleotidic linkage, wherein the base sequence of the oligonucleotide is or comprises at least 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 contiguous bases of a base sequence that is at least 80% identical with or complementary to a base sequence of a C9orf72 gene or a transcript thereof; and the nucleobase sequence ACTCACCCACTCGCCACCGC.

However, these shared technical features are previously disclosed by Wave, as above.

Wave discloses an oligonucleotide comprising at least one modification of a sugar, base or internucleotidic linkage (an oligonucleotide comprising at least one modification of a sugar, base or internucleotidic linkage; Claim 1), wherein the base sequence of the oligonucleotide is or comprises at least 15 contiguous bases (wherein the base sequence of the oligonucleotide is or comprises at least 15 contiguous bases; Claim 1) of a base sequence that is at least 80% identical with or complementary to a base sequence of a C9orf72 gene or a transcript thereof (a base sequence that is (at least 80%) identical with or complementary to a base sequence of a C9orf72 gene or a transcript thereof; Claim 1); and the nucleobase sequence ACTCACCCACTCGCCACCGC (wherein the oligonucleotide comprises the sequence ACTCACCCACTCGCCACCGC; paragraph [00640], [00750]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Wave reference, 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)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

(32)優先日 令和2年5月8日(2020.5.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/069,704

(32)優先日 令和2年8月24日(2020.8.24)

(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,IT,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,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 リウ, ユアンジン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者 岩本 直樹

アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, コンコード アヴェニュー 7 3 3, ウェイブ ライフ サイエンスズ 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 サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者 ゾン, ゾン

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 サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者 アンドレウッチ, エイミー, ジェイダ

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 サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者 モナパトラ, スソバン

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 サイエンスズ リミテッド内

F ターム (参考) 4C084 AA13 NA14 ZA151 ZA152 ZA941 ZA942 ZB211 ZB212

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA15 ZA94 ZB21