

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7658900号
(P7658900)

(45)発行日 令和7年4月8日(2025.4.8)

(24)登録日 令和7年3月31日(2025.3.31)

| | | | | |
|--------------------------|----------------|-------|---------|--|
| (51)国際特許分類 | F I | | | |
| C 1 2 N 15/113 (2010.01) | C 1 2 N 15/113 | | Z Z N A | |
| C 0 7 K 7/00 (2006.01) | C 0 7 K 7/00 | | | |
| A 6 1 P 21/04 (2006.01) | A 6 1 P 21/04 | | | |
| 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 P 43/00 | 1 1 1 | | |
| 請求項の数 28 (全121頁) 最終頁に続く | | | | |

| | | | |
|-------------------|-------------------------------|----------|---|
| (21)出願番号 | 特願2021-531988(P2021-531988) | (73)特許権者 | 501237039 |
| (86)(22)出願日 | 令和1年12月11日(2019.12.11) | | サレプタ セラピューティクス, インコーポレイテッド |
| (65)公表番号 | 特表2022-511055(P2022-511055 A) | | アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ファースト ストリート 2 1 5 |
| (43)公表日 | 令和4年1月28日(2022.1.28) | (74)代理人 | 100078282 |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2019/065581 | | 弁理士 山本 秀策 |
| (87)国際公開番号 | WO2020/123574 | (74)代理人 | 100113413 |
| (87)国際公開日 | 令和2年6月18日(2020.6.18) | | 弁理士 森下 夏樹 |
| 審査請求日 | 令和4年12月2日(2022.12.2) | (72)発明者 | シュネル, フレデリック ジョゼフ |
| (31)優先権主張番号 | 62/779,028 | | アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ファースト ストリート 2 1 5, サレプタ セラピューティクス, インコーポレイテッド |
| (32)優先日 | 平成30年12月13日(2018.12.13) | | 最終頁に続く |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | |

(54)【発明の名称】 筋ジストロフィーに対するエクソンスキッピングオリゴマーコンジュゲート

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

選択された標的に結合してヒトジストロフィン遺伝子においてエクソンスキッピングを誘導することができるアンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩であって、前記アンチセンスオリゴマーが、アニーリング部位として指定されるジストロフィンプレmRNAのエクソン50標的領域に相補的であり、前記アンチセンスオリゴマーの塩基配列およびアニーリング部位が、以下であり、

【表 3 0】

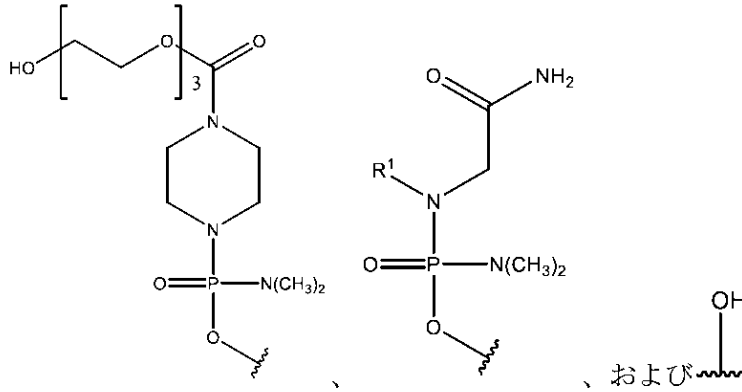
| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|--------------------------------|--------|
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |

ここで、配列番号：3のTが、チミンまたはウラシルであり、
前記アンチセンスオリゴマーの核酸塩基は、モルホリノ環構造に連結されている、
アンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

前記アンチセンスオリゴマーが、前記アンチセンスオリゴマーの5'末端に結合され部
分を含有し、前記部分が、以下から選択され、

【化 1 4 6】



10

ここで、 R^1 は CH_3 であり、
前記アンチセンスオリゴマーが、ヒトジストロフィン遺伝子においてエクソスキッピングを誘導する、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 3】

前記アンチセンスオリゴマーが、細胞膜透過性ペプチドに連結されている、請求項 2 に記載のアンチセンスオリゴマー。

20

【請求項 4】

細胞膜透過性ペプチドが、前記アンチセンスオリゴマーの 3' 末端に結合される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 5】

前記細胞膜透過性ペプチドが、アルギニンリッチペプチドである、請求項 4 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 6】

前記アルギニンリッチペプチドが、 $-(RXR)_4-R^a$ (配列番号: 15)、 $R-(FFR)_3-R^a$ (配列番号: 16)、 $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (配列番号: 17)、 $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (配列番号: 18)、 $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (配列番号: 19)、 $-GLY-R_5-R^a$ (配列番号: 20)、 $-R_5-R^a$ (配列番号: 21)、 $-GLY-R_6-R^a$ (配列番号: 11)、および $-R_6-R^a$ (配列番号: 10) からなる群から選択され、ここで、 R^a が、H、アシル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、R が、アルギニンであり、X が、6-アミノヘキサン酸であり、B が、 α -アラニンであり、F が、フェニルアラニンであり、GLY (または G) が、グリシンである、請求項 5 に記載のアンチセンスオリゴマー。

30

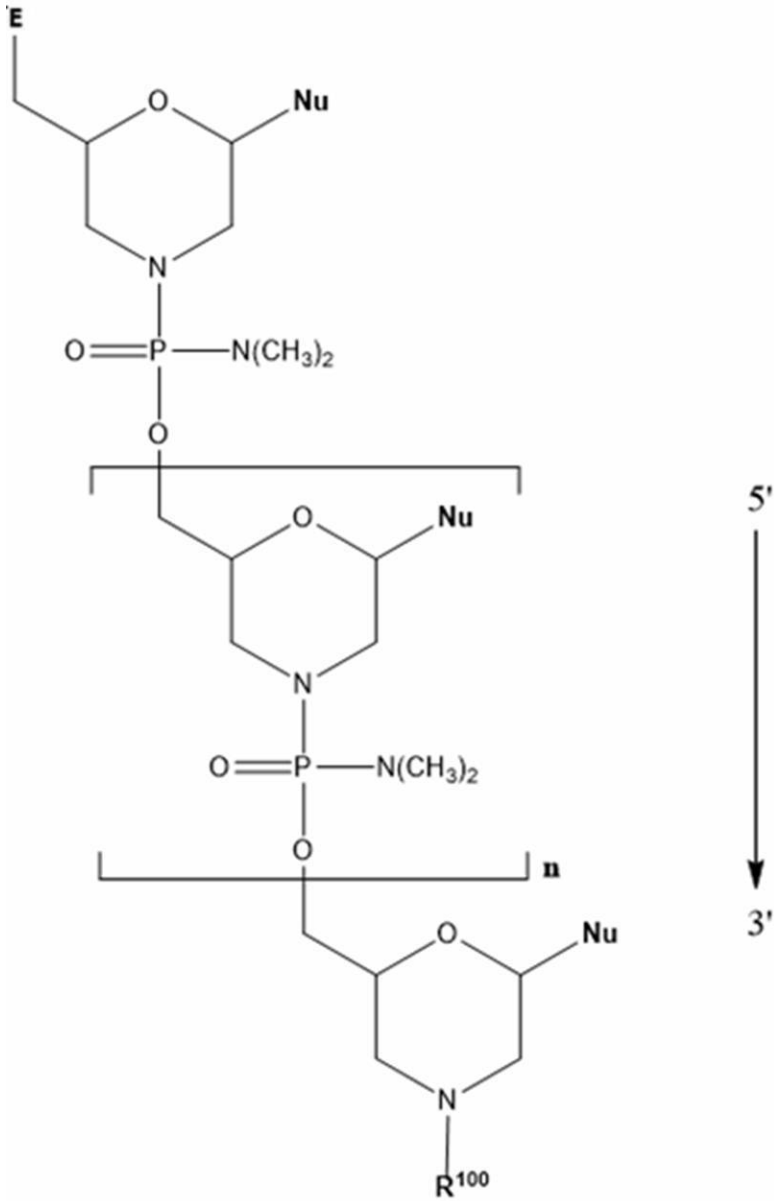
【請求項 7】

式 (I) に従うアンチセンスオリゴマー、

40

50

【化 1 4 7】



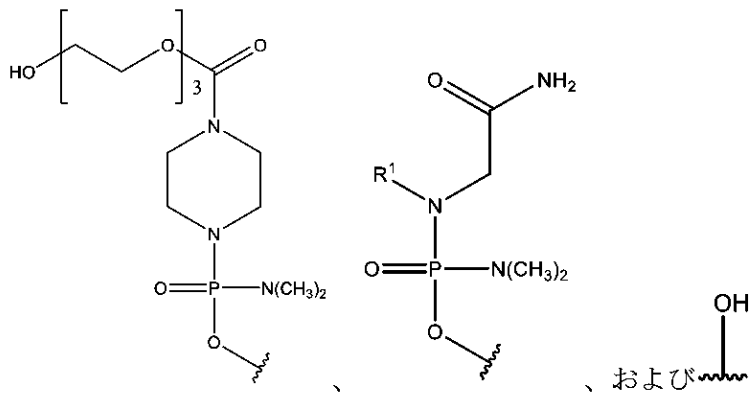
10

20

30

またはその薬学的に許容される塩であって、ここで、
各 Nu が、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、
E が、

【化 1 4 8】



40

から選択される部分であり、ここで、R¹はCH₃であり、

50

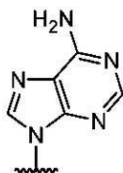
R¹⁰⁰が、水素または細胞膜透過性ペプチドであり、
前記標的化配列が以下であり、

【表 3 1】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から 3'] | 配列番号: |
|--------------|--------------------------------|--------|
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |

ここで、Aが、

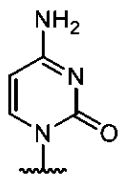
【化 1 4 9】



10

であり、Cが、

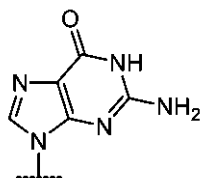
【化 1 5 0】



20

であり、Gが、

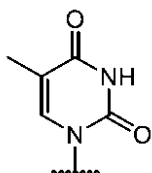
【化 1 5 1】



30

であり、Tが、

【化 1 5 2】



である、アンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 8】

前記E部分の遠位 - OHまたは - NH₂が、細胞膜透過性ペプチドに連結されている、請求項 7 に記載のアンチセンスオリゴマー。

40

【請求項 9】

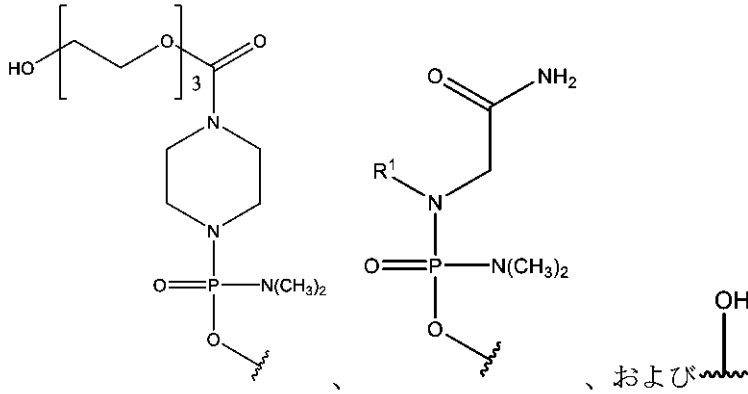
前記アンチセンスオリゴマーが、1個の細胞膜透過性ペプチドを含有する、請求項 7 または 8 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 10】

Eが、以下から選択される部分であり、ここで、R¹はCH₃である、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

50

【化 1 5 3】

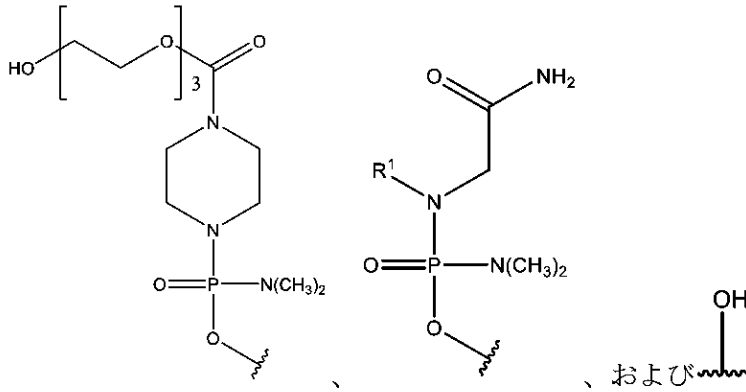


10

【請求項 1 1】

Eが、以下から選択される部分であり、

【化 1 5 4】



20

ここで、 R^1 は CH_3 であり、

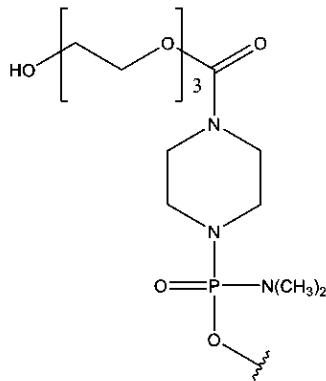
R^{100} が、細胞膜透過性ペプチドである、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

30

【請求項 1 2】

Eが、

【化 1 5 5】



40

であり、

R^{100} が、細胞膜透過性ペプチドである、請求項 11 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 1 3】

前記細胞膜透過性ペプチドが、アルギニンリッチペプチドである、請求項 7 ~ 12 のい

50

ずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 14】

前記アルギニンリッチペプチドが、 $-(RXR)_4-R^a$ (配列番号: 15)、 $R-(FFR)_3-R^a$ (配列番号: 16)、 $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (配列番号: 17)、 $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (配列番号: 18)、 $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (配列番号: 19)、 $-GLY-R_5-R^a$ (配列番号: 20)、 $-R_5-R^a$ (配列番号: 21)、 $-GLY-R_6-R^a$ (配列番号: 11)、および $-R_6-R^a$ (配列番号: 10) からなる群から選択され、ここで、 R^a が、H、アシル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、R が、アルギニンであり、X が、6-アミノヘキサン酸であり、B が、 α -アラニンであり、F が、フェニルアラニンであり、GLY (または G) が、グリシンである、請求項 13 に記載のアンチセンスオリゴマー。

10

【請求項 15】

前記アンチセンスオリゴマーが、遊離塩基形態である、請求項 7 ~ 14 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

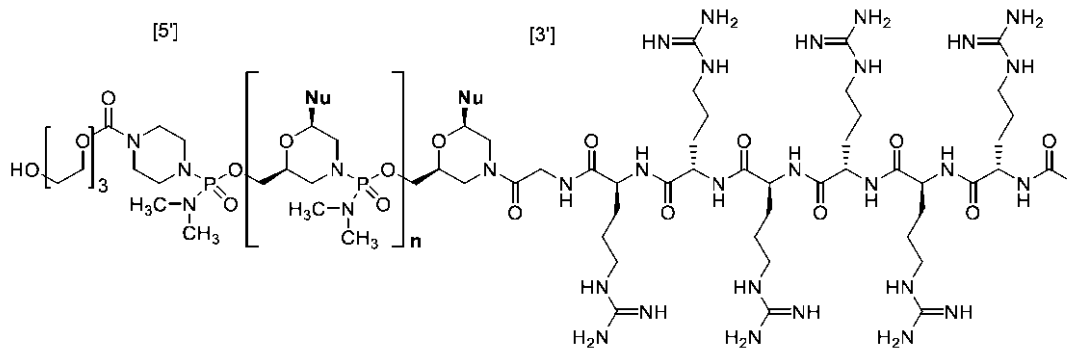
【請求項 16】

前記アンチセンスオリゴマーが、その薬学的に許容される塩である、請求項 7 ~ 14 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 17】

式 (III) に従うアンチセンスオリゴマー、

【化 156】



(III)

30

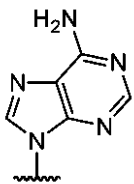
またはその薬学的に許容される塩であって、各 Nu は核酸塩基であり一緒になって標的化配列を形成し、前記標的化配列が以下であり、

【表 32】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|--------------------------------|--------|
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |

ここで、A が、

【化 157】

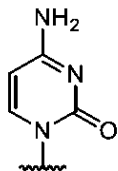


であり、C が、

40

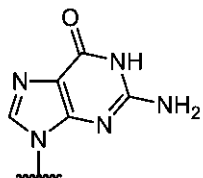
50

【化 1 5 8】



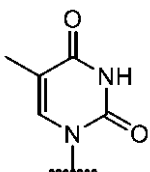
であり、Gが、

【化 1 5 9】



であり、Tが、

【化 1 6 0】



である、アンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 1 8】

式 (I I I) の遠位 - O H が、細胞膜透過性ペプチドに連結されている、請求項 1 7 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 1 9】

前記アンチセンスオリゴマーが、遊離塩基形態である、請求項 1 7 または 1 8 に記載のアンチセンスオリゴマー。

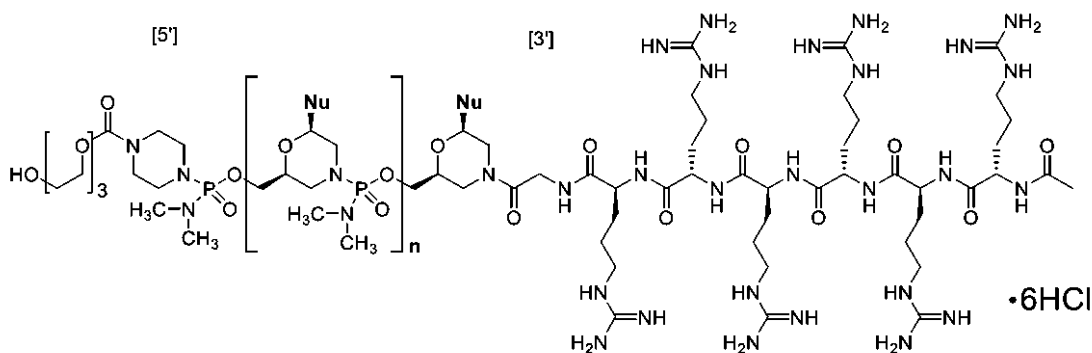
【請求項 2 0】

前記アンチセンスオリゴマーが、その薬学的に許容される塩である、請求項 1 7 または 1 8 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 2 1】

式 (I V) に従うアンチセンスオリゴマーであって、

【化 1 6 1】



(I V)

各 Nu は核酸塩基であり一緒になって標的化配列を形成し、前記標的化配列が以下であり、

10

20

30

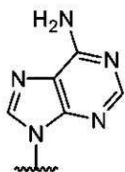
40

50

【表 3 3】

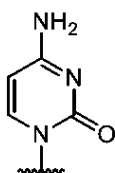
| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から 3'] | 配列番号: |
|--------------|--------------------------------|--------|
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |

ここで、Aが、
【化 1 6 2】



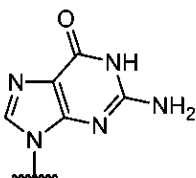
10

であり、Cが、
【化 1 6 3】

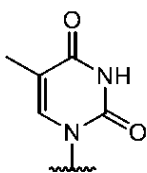


20

であり、Gが、
【化 1 6 4】



であり、Tが、
【化 1 6 5】



30

である、アンチセンスオリゴマー。

【請求項 2 2】

式 (I V) の遠位 - O H が、細胞膜透過性ペプチドに連結されている、請求項 2 1 に記載のアンチセンスオリゴマー。

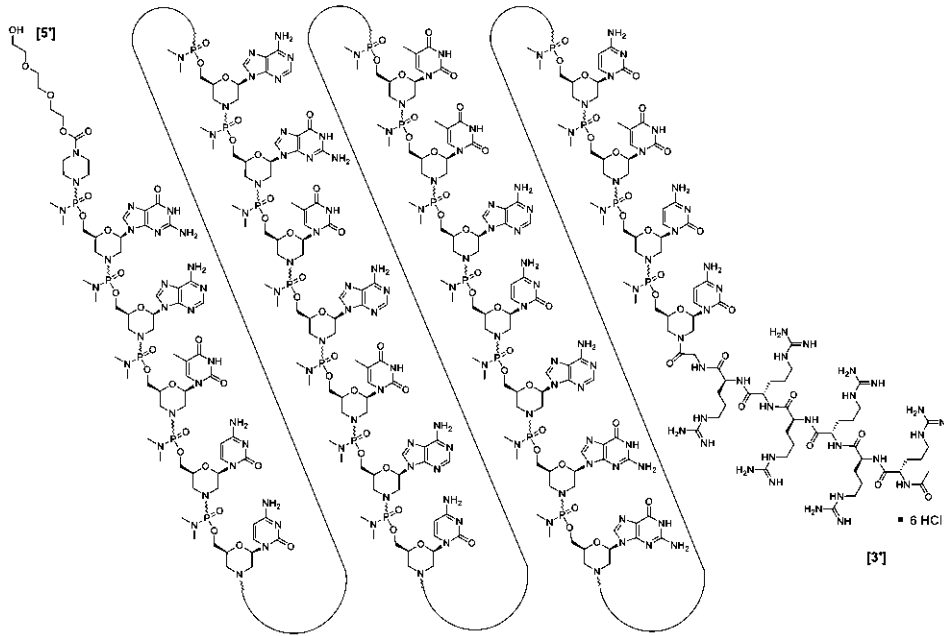
40

【請求項 2 3】

前記アンチセンスオリゴマーが、式 (I V a) の構造に従う、請求項 2 1 または 2 2 に記載のアンチセンスオリゴマー。

50

【化 1 6 6】



(I V a)

10

20

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩、および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 2 5】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の治療を必要とする対象においてそれを行うための、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマーを含む組成物または請求項 2.4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

前記対象が、エクソン 50 スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する、請求項 2.5 に記載の組成物。

30

【請求項 2 7】

対象においてジストロフィン産生を誘導するために mRNA リーディングフレームを修復するための、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマーを含む組成物または請求項 2.4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

前記対象が、エクソン 50 スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する、請求項 2.7 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

関連出願

本出願は、2018年12月13日に提出された米国仮出願第62/779,028号に対する優先権を主張する。上記の出願の教示全体は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【0002】

EFS - WEB を介して電子的に提出された配列表への言及

本明細書と同時に提出された電子的に提出された配列表（名称：8171_50_WO00_SL.txt、サイズ：10,080バイト、作成日：2019年11月6日）の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

50

【 0 0 0 3 】

本開示は、ヒトジストロフィン遺伝子におけるエクソン50スキッピングに好適な新規のアンチセンスオリゴマーおよびその医薬組成物に関する。本開示はまた、新規のアンチセンスオリゴマーを使用してエクソン50スキッピングを誘導するための方法、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する対象においてジストロフィンを産生するための方法、およびエクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する対象を治療するための方法も提供する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、タンパク質ジストロフィンの発現の欠陥によって引き起こされる。タンパク質をコードする遺伝子は、DNAの200万を超えるヌクレオチドにわたって拡散された79個のエクソンを含有する。エクソンのリーディングフレームを変化させるか、または停止コドンを導入するか、または全アウトオブフレームエクソン（複数可）の除去もしくは1つ以上のエクソンの重複を特徴とする、任意のエクソンの変異は、機能性ジストロフィンの産生を妨げ、DMDをもたらす可能性がある。

【 0 0 0 5 】

変異、典型的には1つ以上のエクソンの欠失が、全ジストロフィン転写物に沿った正しいリーディングフレームをもたらし、これにより、mRNAのタンパク質への翻訳が早期に終結されない場合、より重症度の低い形態の筋ジストロフィーであるベッカー型筋ジストロフィー（BMD）が生じることが分かっている。変異ジストロフィンプレmRNAのプロセッシングにおける上流エクソンと下流のエクソンの結合が、遺伝子の正しいリーディングフレームを維持する場合、結果は、ある程度の活性を保持する短い内部欠失を有するタンパク質をコードするmRNAであり、ベッカー表現型がもたらされる。

【 0 0 0 6 】

ジストロフィンを産生し、DMDを治療するための治療方法に有用である、エクソン50スキッピングに好適なアンチセンスオリゴマーおよび対応する医薬組成物のニーズが存在する。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

アンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩は、選択された標的に結合してヒトジストロフィン遺伝子においてエクソンスキッピングを誘導することができ、アンチセンスオリゴマーは、アニーリング部位として指定されるジストロフィンプレmRNAのエクソン50標的領域に相補的である塩基の配列を含み、塩基配列およびアニーリング部位は、以下から選択され、

【 表 9 】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5' から 3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

【 0 0 0 8 】

Tは、チミンまたはウラシルである。一態様において、各Tは、チミンである。

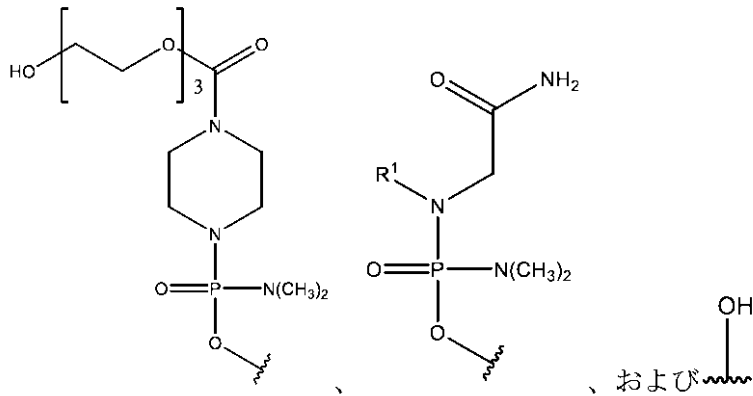
【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態において、1～n個の各Nuは、5'から3'に、以下：配列番号：1、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、または配列番号：9のうちの一つにおける核酸塩基に対応する。いくつかの実施形態において、1～n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号：3における核酸塩基に対応する。

【0010】

一態様において、アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーの5'末端に結合されたT部分を含有し、T部分は、以下から選択される。

【化1】



10

20

【0011】

ある特定の実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、1個以上の細胞膜透過性ペプチド（本明細書では「CPP」と呼称される）にコンジュゲートされる。ある特定の実施形態において、1個以上のCPPは、アンチセンスオリゴマーの末端に結合される。ある特定の実施形態において、少なくとも1個のCPPは、アンチセンスオリゴマーの5'末端に結合される。ある特定の実施形態において、少なくとも1個のCPPは、アンチセンスオリゴマーの3'末端に結合される。ある特定の実施形態において、第1のCPPは、アンチセンスオリゴマーの5'末端に結合され、第2のCPPは、アンチセンスオリゴマーの3'末端に結合される。

30

【0012】

いくつかの実施形態において、CPPは、アルギニンリッチペプチドである。「アルギニンリッチ」という用語は、少なくとも2個、好ましくは2、3、4、5、6、7、または8個のアルギニン残基を有するCPPを指し、各々が任意に1個以上の非荷電疎水性残基によって分離され、任意に約6～14個の氨基酸残基を含有する。以下に説明されるように、CPPは、好ましくは、そのカルボキシ末端でリンカーを介してアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'および/または5'末端に連結され、リンカーはまた、1個以上のアミノ酸であり得、かつ好ましくは、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、またはステアロイルから選択されるR^aを含む置換基R^aによってそのアミノ末端でキャッピングされる。いくつかの実施形態において、R^aは、アセチルである。

40

【0013】

以下の表に見られるように、本明細書で使用するためのCPPの非限定的な例としては、-(RXR)₄-R^a（配列番号：15）、-R-(FFR)₃-R^a（配列番号：16）、-B-X-(RXR)₄-R^a（配列番号：17）、-B-X-R-(FFR)₃-R^a（配列番号：18）、-GLY-R-(FFR)₃-R^a（配列番号：19）、-GLY-R₅-R^a（配列番号：20）、-R₅-R^a（配列番号：21）、-GLY-R₆-R^a（配列番号：11）、および-R₆-R^a（配列番号：10）が挙げられ、式中、R^aは、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、Rは、アルギニンであり、Xは、6-アミノヘキサン酸であり、Bは、-アラニンであり、Fは、フェニルアラニンであり、GLY（またはG）は、グリシンである。CPP「R₅（配列番

50

号：21)」は、アミド結合を介して一緒に連結された5個のアルギニン残基のペプチドを示すことを意味する(単一の置換基、例えば、R⁵(配列番号：21)ではない)。CPP「R₆(配列番号：10)」は、アミド結合を介して一緒に連結された6個のアルギニン残基のペプチドを示すことを意味する(単一の置換基、例えば、R⁶(配列番号：10)ではない)いくつかの実施形態において、R^aは、アセチルである。

【0014】

例示的なCPPを表1(配列番号：10、11、および15~21)に示す。

【表1-1】

| 名称 | 配列 | 配列番号: |
|------------------------|----------------|-------|
| R ₆ G | RRRRRRG | 11 |
| R ₆ | RRRRRR | 10 |
| (RXR) ₄ | RXRRXRRXRRXR | 15 |
| (RFF) ₃ R | RFFRFFRFFR | 16 |
| (RXR) ₄ XB | RXRRXRRXRRXRXB | 17 |
| (RFF) ₃ RXB | RFFRFFRFFRXB | 18 |
| (RFF) ₃ RG | RFFRFFRFFRG | 19 |
| R ₅ G | RRRRRG | 20 |
| R ₅ | RRRRR | 21 |

Rは、アルギニン、Xは、6-アミノヘキサン酸、Bは、β-アラニン、Fは、フェニルアラニン、Gはグリシンである

【0015】

CPP、それらの合成、およびオリゴマーにコンジュゲートする方法は、米国出願公開第US2012/0289457号、ならびに国際特許出願公開第WO2004/097017号、同第WO2009/005793号、および同第WO2012/150960号にさらに記載されており、これらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0016】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、CPPとリンカーの組み合わせとして定義される置換基「Z」を含む。リンカーは、そのカルボキシ末端でCPPをオリゴヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に架橋する。様々な実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、オリゴマーの3'末端に連結された1個のCPPのみを含み得る。他の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、オリゴマーの5'末端に連結された1個のCPPのみを含み得る。

【0017】

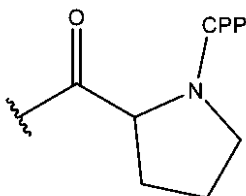
Z内のリンカーは、例えば、1、2、3、4、または5個のアミノ酸を含み得る。

【0018】

特定の実施形態において、Zは、以下から選択され、

- C(O)(CH₂)₅NH-CPP、
- C(O)(CH₂)₂NH-CPP、
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP、
- C(O)CH₂NH-CPP、および以下の式：

【化2】



10

20

30

40

50

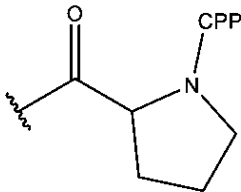
式中、CPPは、CPPカルボキシ末端でのアミド結合によってリンカー部分に結合される。

【0019】

様々な実施形態において、CPPは、本明細書に記載され、かつ表1に示される、アルギニンリッチペプチドである。様々な実施形態において、アルギニンリッチCPPは、 $-R_5-R^a$ （すなわち、5個のアルギニン残基、配列番号：21）であり、式中、 R^a は、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される。ある特定の実施形態において、 R^a は、アセチルである。様々な実施形態において、CPPは、配列番号：21であり、リンカーは、 $-C(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)CH_2NH-$ 、および

10

【化3】



からなる群から選択される。

20

【0020】

いくつかの実施形態において、リンカーは、1、2、3、4、または5個のアミノ酸を含む。

【0021】

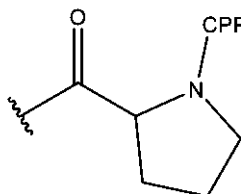
いくつかの実施形態において、CPPは、配列番号：21であり、リンカーは、Glyである。いくつかの実施形態において、CPPは、配列番号：20である。

【0022】

ある特定の実施形態において、アルギニンリッチCPPは、 $-R_6-R^a$ （すなわち、6個のアルギニン残基、配列番号：10）であり、式中、 R^a は、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される。ある特定の実施形態において、 R^a は、アセチルである。様々な実施形態において、CPPは、配列番号：10、15、または16から選択され、リンカーは、 $-C(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$ 、 $-C(O)CH_2NH-$ 、および

30

【化4】



からなる群から選択される。

40

【0023】

いくつかの実施形態において、リンカーは、1、2、3、4、または5個のアミノ酸を含む。

【0024】

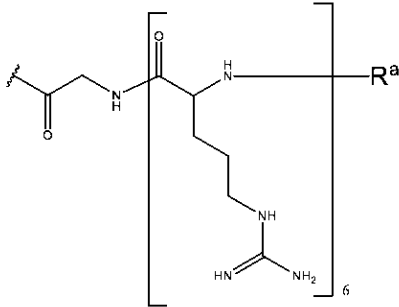
いくつかの実施形態において、CPPは、配列番号：10であり、リンカーは、Glyである。いくつかの実施形態において、CPPは、配列番号：11である。

【0025】

50

ある特定の実施形態において、Zは、オリゴマーの5'および/または3'末端で本開示のアンチセンスオリゴマーに共有結合している $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ (「R₆」は、配列番号：10として開示される) であり、式中、R^aは、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、またはステアロイルであり、R₆のアミノ末端をキャップする(配列番号：10)。ある特定の実施形態において、R^aは、アセチルである。これらの非限定的な例において、CPPは、 $-R_6-R^a$ (配列番号：10) であり、リンカーは、 $-C(O)CH_2NH-$ (すなわち、GLY) である。Z = $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ (「R₆」は、配列番号：10として開示される) のこの特定の例はまた、以下の構造によって例示され、

【化5】



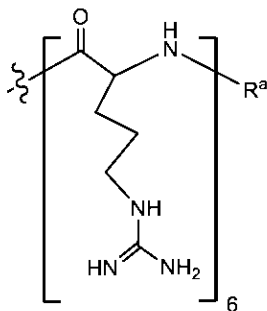
10

式中、R^aは、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される。いくつかの実施形態において、R^aは、アセチルである。

【0026】

様々な実施形態において、CPPは、 $-R_6-R^a$ (配列番号：10) であり、以下の式としても例示され、

【化6】



20

30

式中、R^aは、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される。ある特定の実施形態において、CPPは、配列番号：11である。いくつかの実施形態において、R^aは、アセチルである。

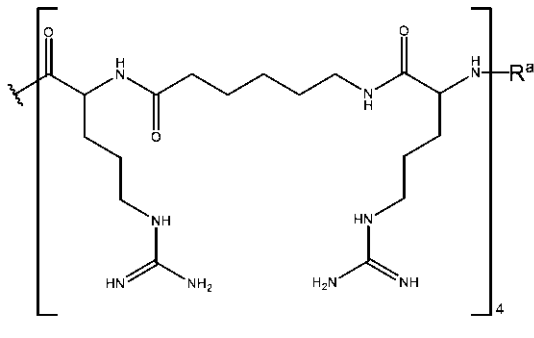
【0027】

いくつかの実施形態において、CPPは、 $-(RXR)_4-R^a$ (配列番号：15) であり、以下の式としても例示される。

40

50

【化 7】

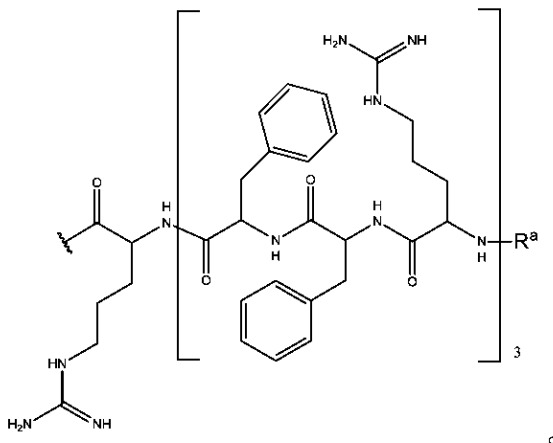


10

【0028】

様々な実施形態において、CPPは、 $-R-(FFR)_3-R^a$ （配列番号：16）であり、以下の式としても例示される。

【化 8】



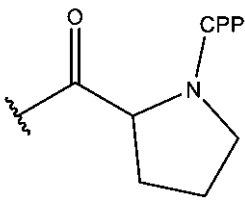
20

【0029】

様々な実施形態において、Zは、以下から選択され、

- C(O)(CH₂)₅NH-CPP、
- C(O)(CH₂)₂NH-CPP、
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP、
- C(O)CH₂NH-CPP、および以下の式：

【化 9】



40

式中、CPPは、CPPカルボキシ末端でのアミド結合によってリンカー部分に結合され、かつCPPは、以下：

50

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴマーの核酸塩基は、ペプチド核酸 (PNA) に連結され、リン酸 - 糖ポリヌクレオチド骨格は、核酸塩基が連結している可撓性擬似ペプチドポリマーで置換されている。

【0033】

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴマーの核酸塩基のうちの少なくとも1つは、ロックド核酸 (LNA) に連結され、ロックド核酸構造は、リボース部分が2' 酸素と4' 炭素を結合する余分な架橋を有する、化学的に修飾されたヌクレオチド類似体である。

【0034】

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴマーの核酸塩基のうちの少なくとも1つは、架橋核酸 (BNA) に連結され、糖立体構造は、フラノース骨格への追加の架橋構造の導入によって制限またはロックされる。

10

【0035】

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴマーの核酸塩基のうちの少なくとも1つは、2' - O, 4' - C - エチレン架橋核酸 (ENA) に連結される。

【0036】

いくつかの態様において、修飾アンチセンスオリゴマーは、アンロックド核酸 (UNA) サブユニットを含有し得る。UNAおよびUNAオリゴマーは、サブユニットのC2' - C3' 結合が切断されているRNAの類似体である。

【0037】

いくつかの態様において、修飾アンチセンスオリゴマーは、非架橋酸素のうちの1つが硫黄で置換されている、1つ以上のホスホロチオエート (またはS - オリゴ) を含有する。いくつかの態様において、修飾アンチセンスオリゴマーは、リボースの2' - OHが、それぞれ、メチル、メトキシエチル、2 - (N - メチルカルバモイル) エチル、またはフルオロ基で置換されている、1つ以上の2' O - メチル、2' O - MOE、MCE、および2' - Fを含有する。

20

【0038】

いくつかの態様において、修飾アンチセンスオリゴマーは、トリシクロ - DNA (tc - DNA) であり、これは、骨格の立体構造的柔軟性を制限し、かつねじれ角の骨格形状を最適化するために、各ヌクレオチドがシクロプロパン環の導入によって修飾されている、拘束されたDNA類似体である。

30

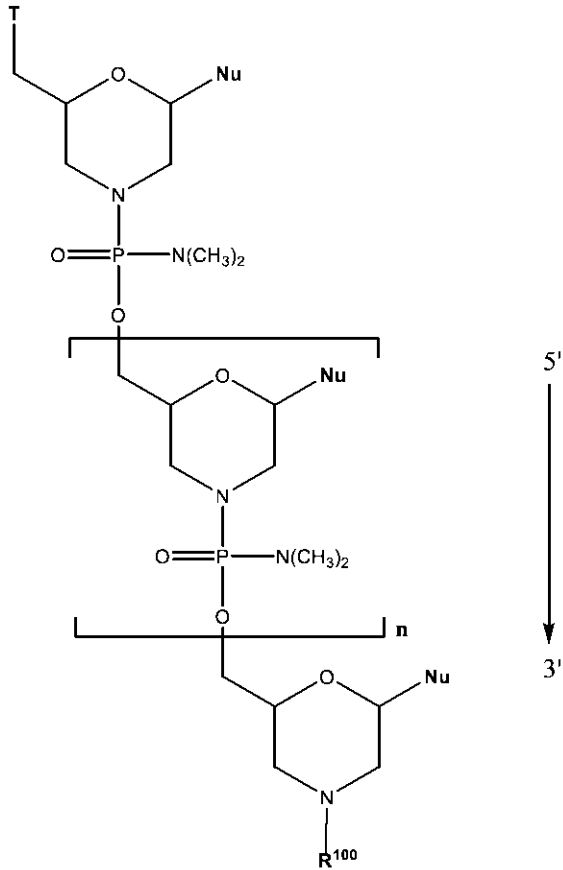
【0039】

様々な態様において、本開示は、式 (I) に従うアンチセンスオリゴマー、

40

50

【化 1 3】



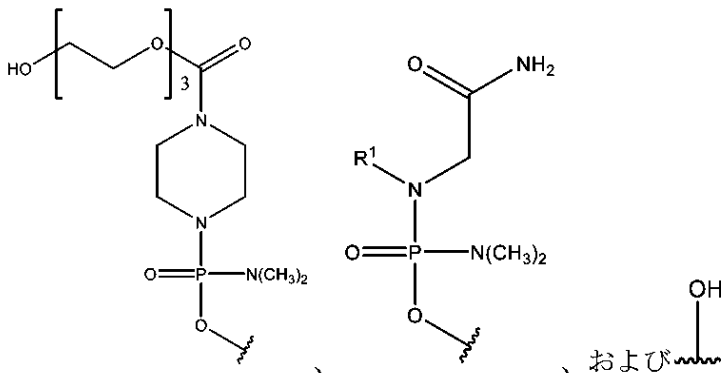
10

20

またはその薬学的に許容される塩を提供し、式中、
各 Nu は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、
T は、

30

【化 1 4】



40

から選択される部分であり、T 部分の遠位 - OH または - NH₂ は、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結され、

R¹⁰⁰ は、水素または細胞膜透過性ペプチドであり、

1 ~ n 個の各 Nu は、5' から 3' に、以下のうちの 1 つにおける核酸塩基に対応し、

50

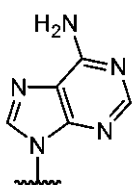
【表 1 0】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から 3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

10

式中、Aは、

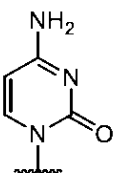
【化 1 5】



20

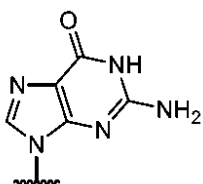
であり、Cは、

【化 1 6】



であり、Gは、

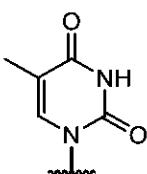
【化 1 7】



30

であり、Tは、

【化 1 8】



40

である。

【 0 0 4 0】

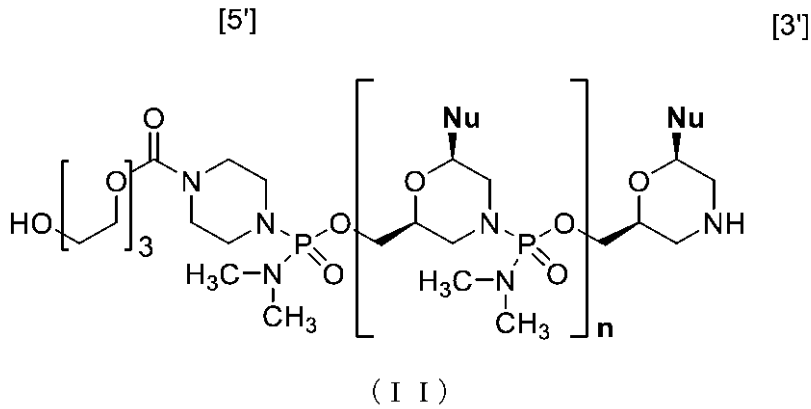
いくつかの実施形態において、1～n個の各Nuは、5'から3'に、以下：配列番号：1、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、または配列番号：9のうちの1つにおける核酸塩基に対応する。いくつかの実施形態において、1～n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

50

【 0 0 4 1 】

別の態様において、本開示は、式 (I I) のアンチセンスオリゴマー、

【 化 1 9 】



10

またはその薬学的に許容される塩を提供し、式中、1 ~ n個の各Nuは、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、

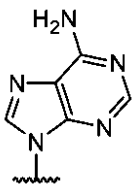
【 表 1 1 】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

20

式中、Aは、

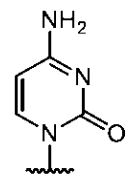
【 化 2 0 】



30

であり、Cは、

【 化 2 1 】

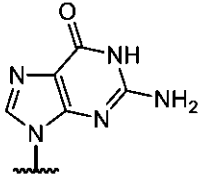


40

であり、Gは、

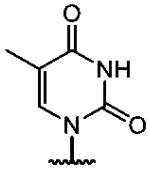
50

【化 2 2】



であり、Tは、

【化 2 3】



10

である。

【0042】

いくつかの実施形態において、式(II)の遠位-OHは、細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0043】

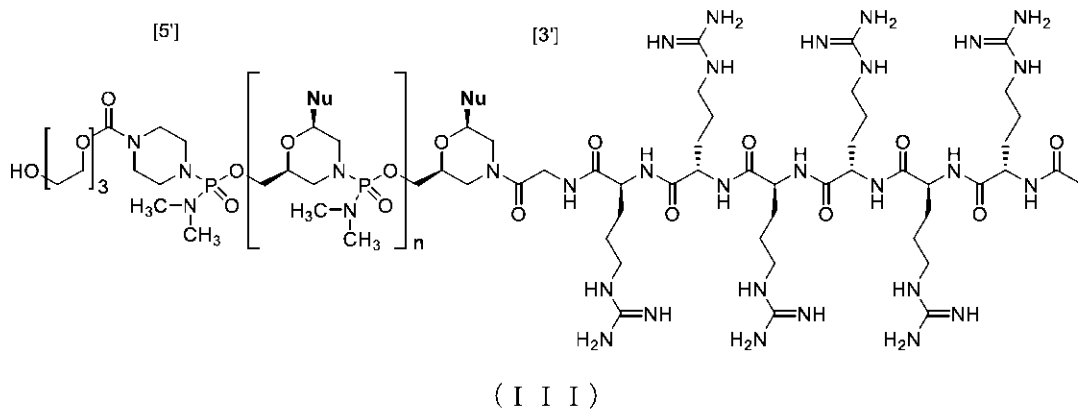
いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、以下：配列番号：1、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、または配列番号：9のうちの1つにおける核酸塩基に対応する。いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

20

【0044】

別の態様において、本開示は、式(III)のアンチセンスオリゴマー、

【化 2 4】



30

またはその薬学的に許容される塩を提供し、式中、1~n個の各Nuは、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、

40

50

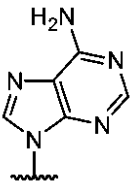
【表 1 2】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から 3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

10

式中、Aは、

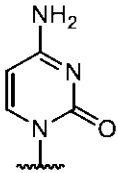
【化 2 5】



20

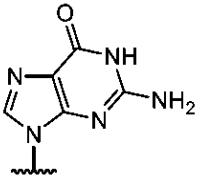
であり、Cは、

【化 2 6】



であり、Gは、

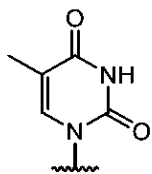
【化 2 7】



30

であり、Tは、

【化 2 8】



40

である。

【0045】

いくつかの実施形態において、式(III)の遠位-OHは、細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0046】

いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応

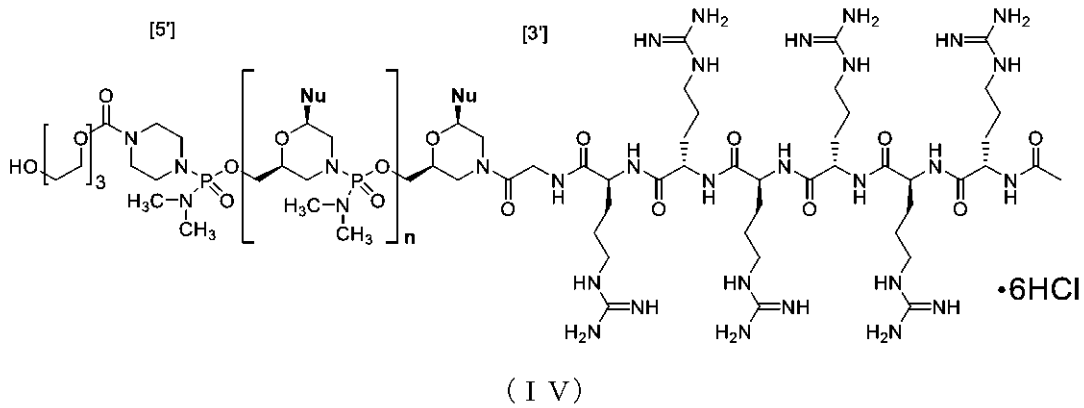
50

する。

【 0 0 4 7 】

別の態様において、本開示は、式 (I V) のアンチセンスオリゴマーを提供し、

【 化 2 9 】



10

式中、1 ~ n個の各Nuは、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、

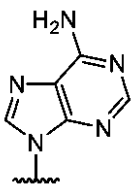
【 表 1 3 】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5' から 3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

20

式中、Aは、

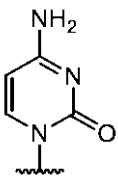
【 化 3 0 】



30

であり、Cは、

【 化 3 1 】

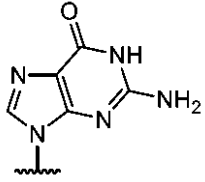


40

であり、Gは、

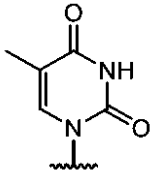
50

【化 3 2】



であり、Tは、

【化 3 3】



10

である。

【0048】

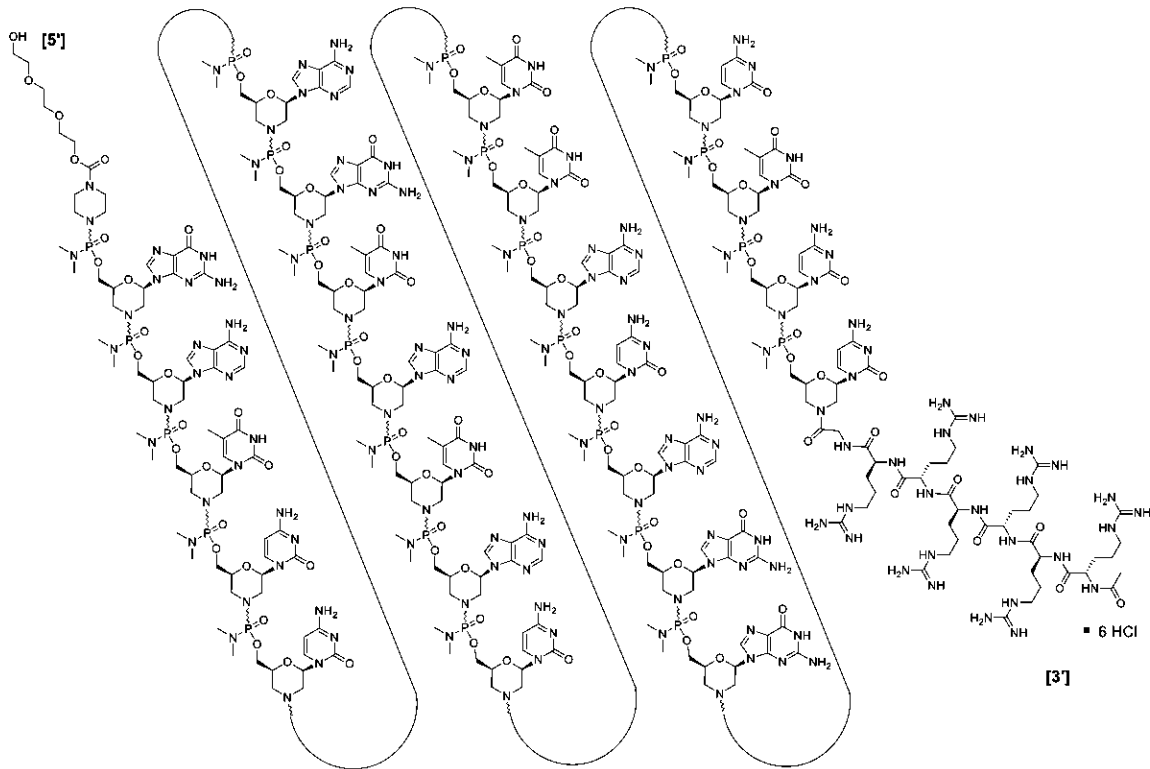
いくつかの実施形態において、1 ~ n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

【0049】

式(IV)についてのいくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、式(IVa)に従う。

20

【化 3 4】



30

40

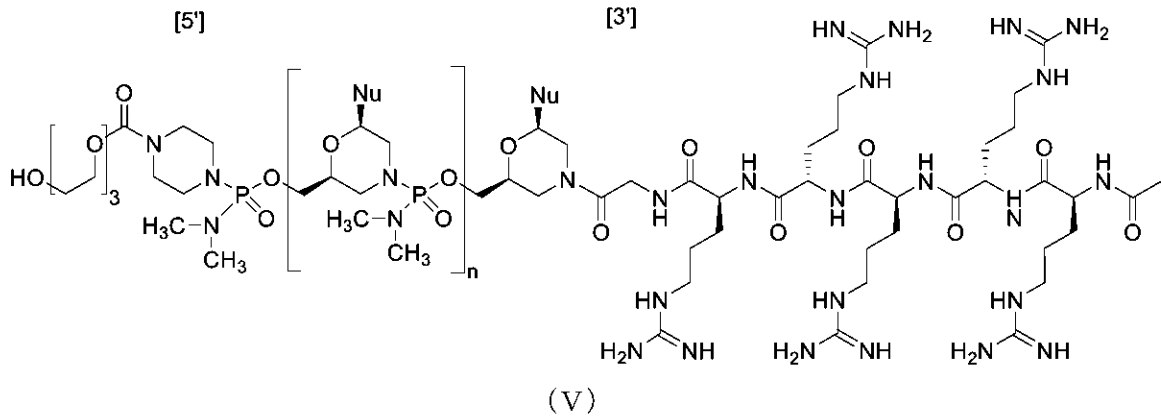
(IVa)

【0050】

別の態様において、本開示は、式(V)のアンチセンスオリゴマーを提供し、

50

【化 3 5】



10

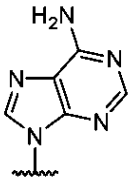
式中、1 ~ n個の各Nuは、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、
【表 1 4】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

20

式中、Aは、

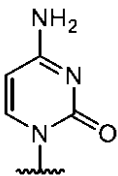
【化 3 6】



30

であり、Cは、

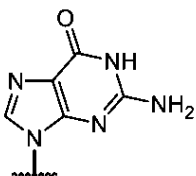
【化 3 7】



40

であり、Gは、

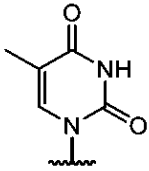
【化 3 8】



50

であり、Tは

【化39】



である。いくつかの実施形態において、1～n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

【0051】

別の態様において、本開示は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の治療を必要とする対象においてそれを行うための方法を提供し、対象は、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有し、方法は、本開示のアンチセンスオリゴマーを対象に投与することを含む。本開示はまた、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の治療を必要とする対象においてそれを行うための薬剤の製造のための、本開示のアンチセンスオリゴマーの使用にも対処し、対象は、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する。

【0052】

別の態様において、本開示は、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する対象においてジストロフィン産生を誘導するためにmRNAリーディングフレームを修復する方法を提供し、方法は、本開示のアンチセンスオリゴマーを対象に投与することを含む。別の態様において、本開示は、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する対象において、mRNAプロセッシング中にジストロフィンプレmRNAからエクソン50を排除する方法を提供し、方法は、本開示のアンチセンスオリゴマーを対象に投与することを含む。別の態様において、本開示は、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する対象において、ジストロフィンプレmRNAのエクソン50、イントロン49、および/またはイントロン50を結合する方法を提供し、方法は、本開示のアンチセンスオリゴマーを対象に投与することを含む。

【0053】

別の態様において、本開示は、療法で使用するための、本開示のアンチセンスオリゴマーを本明細書に提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療で使用するための、本開示のアンチセンスオリゴマーを提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、療法で使用するための薬剤の製造で使用するための、本開示のアンチセンスオリゴマーを提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療のための薬剤の製造で使用するための、本開示のアンチセンスオリゴマーを提供する。

【0054】

別の態様において、本開示はまた、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の治療を必要とする対象においてそれを行うためのキットも提供し、対象は、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有し、キットは、少なくとも、好適な容器に包装された本開示のアンチセンスオリゴマーと、その使用のための説明書と、を含む。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

（項目1）

選択された標的に結合してヒトジストロフィン遺伝子においてエクソンスキッピングを誘導することができるアンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩であって、前記アンチセンスオリゴマーが、アニーリング部位として指定されるジストロフィンプレmRNAのエクソン50標的領域に相補的である塩基の配列を含み、前記塩基配列お

10

20

30

40

50

よびアニーリング部位が、以下から選択され、

【表 3 0】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から 3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

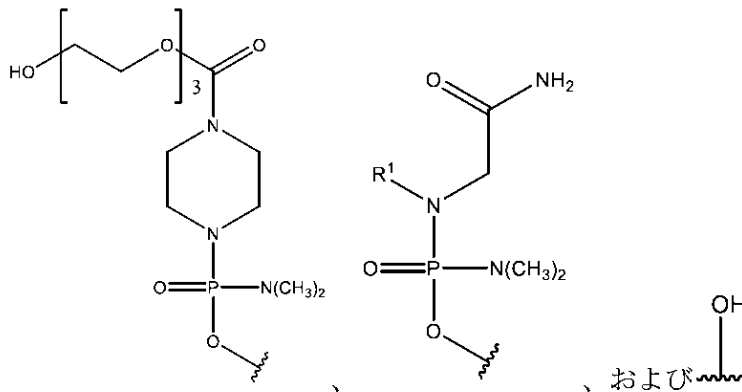
10

式中、配列番号：1～9の各々のTが、チミンまたはウラシルである、アンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩。

(項目 2)

前記アンチセンスオリゴマーが、前記アンチセンスオリゴマーの5'末端に結合されたT部分を含むし、前記T部分が、以下から選択され、

【化 1 4 6】



20

前記アンチセンスオリゴマーが、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結され、

前記アンチセンスオリゴマーが、ヒトジストロフィン遺伝子においてエクソンスキッピングを誘導する、項目 1 に記載のアンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩。

(項目 3)

細胞膜透過性ペプチドが、前記アンチセンスオリゴマーの3'末端に結合される、項目 1～2のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目 4)

前記細胞膜透過性ペプチドが、アルギニンリッチペプチドである、項目 3 に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目 5)

前記アルギニンリッチペプチドが、 $-(R X R)_4-R^a$ (配列番号：15)、 $R-(F F R)_3-R^a$ (配列番号：16)、 $-B-X-(R X R)_4-R^a$ (配列番号：17)、 $-B-X-R-(F F R)_3-R^a$ (配列番号：18)、 $-G L Y-R-(F F R)_3-R^a$ (配列番号：19)、 $-G L Y-R_5-R^a$ (配列番号：20)、 $-R_5-R^a$ (配列番号：21)、 $-G L Y-R_6-R^a$ (配列番号：11)、および $-R_6-R^a$ (配列番号：10) からなる群から選択され、式中、 R^a が、H、アシル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、R が、アルギニンであり、X が、6-アミノヘキサン酸であり、B が、 $-$ アラニンであり、F が、フェニルアラニンであり、G L Y (または G) が、グリシンである、項目 4 に記載のアンチセンスオリゴマー。

40

50

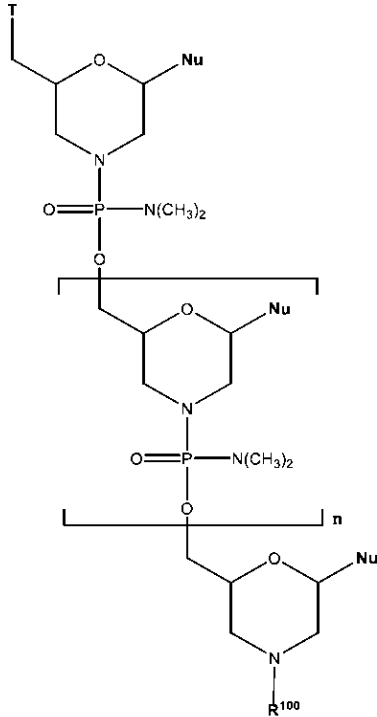
(項目6)

前記アンチセンスオリゴマーの核酸塩基が、モルホリノ環構造に連結される、項目1～5のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目7)

式(I)に従うアンチセンスオリゴマー、

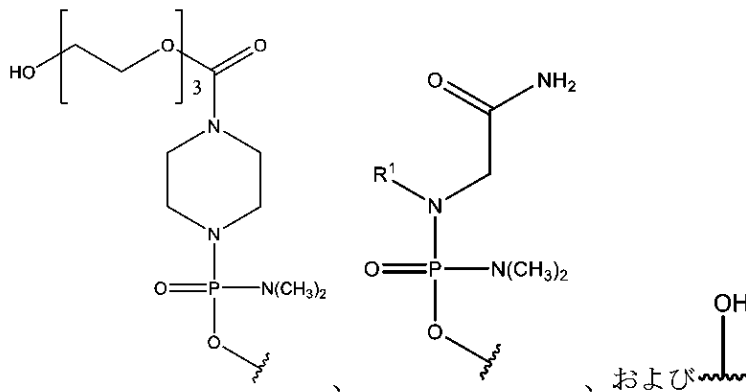
【化147】



(I)

またはその薬学的に許容される塩であって、式中、
各Nuが、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、
Tが、

【化148】



から選択される部分であり、前記T部分の遠位-OHまたは-NH₂が、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結され、

R¹⁰⁰が、水素または細胞膜透過性ペプチドであり、

1～n個の各Nuが、5'から3'に、以下のうちの1つにおける前記核酸塩基に対応し、

10

20

30

40

50

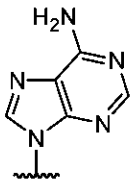
【表 3 1】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

10

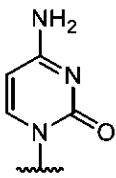
式中、Aが、

【化 1 4 9】



であり、Cが、

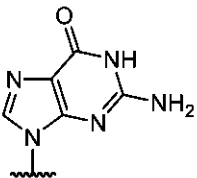
【化 1 5 0】



20

であり、Gが、

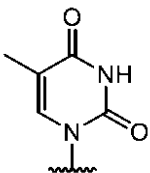
【化 1 5 1】



30

であり、Tが、

【化 1 5 2】



40

である、アンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩。

(項目 8)

1 ~ n 個の各 Nu が、5' から 3' に、配列番号: 3 に対応する、項目 7 に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目 9)

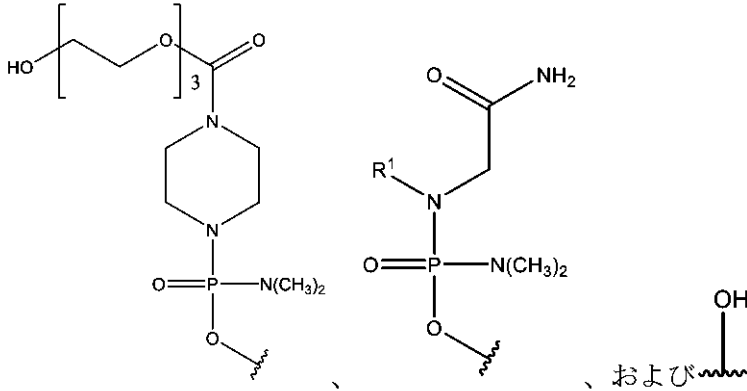
前記アンチセンスオリゴマーが、1 個の細胞膜透過性ペプチドを含有する、項目 7 または 8 に記載のアンチセンスオリゴマー。

50

(項目10)

1が、以下から選択される部分である、項目7~9のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【化153】

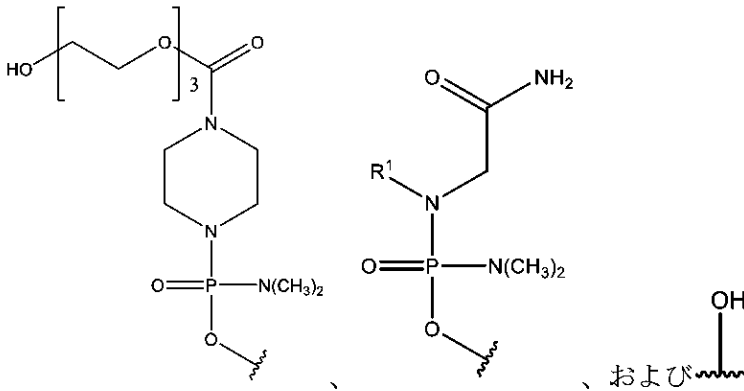


10

(項目11)

1が、以下から選択される部分であり、

【化154】



20

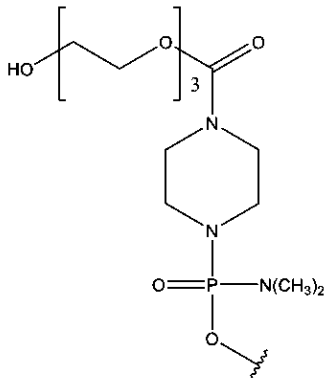
30

R¹⁰⁰が、細胞膜透過性ペプチドである、項目7~10のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目12)

1が、

【化155】



40

であり、

R¹⁰⁰が、細胞膜透過性ペプチドである、項目11に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目13)

50

前記細胞膜透過性ペプチドが、アルギニンリッチペプチドである、項目7～12のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目14)

前記アルギニンリッチペプチドが、 $-(RXR)_4-R^a$ (配列番号: 15)、 $R-(FFR)_3-R^a$ (配列番号: 16)、 $-B-X-(RXR)_4-R^a$ (配列番号: 17)、 $-B-X-R-(FFR)_3-R^a$ (配列番号: 18)、 $-GLY-R-(FFR)_3-R^a$ (配列番号: 19)、 $-GLY-R_5-R^a$ (配列番号: 20)、 $-R_5-R^a$ (配列番号: 21)、 $-GLY-R_6-R^a$ (配列番号: 11)、および $-R_6-R^a$ (配列番号: 10) からなる群から選択され、式中、 R^a が、H、アシル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、Rが、アルギニンであり、Xが、6-アミノヘキサン酸であり、Bが、 α -アラニンであり、Fが、フェニルアラニンであり、GLY (またはG) が、グリシンである、項目13に記載のアンチセンスオリゴマー。

10

(項目15)

前記アンチセンスオリゴマーが、遊離塩基形態である、項目7～14のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

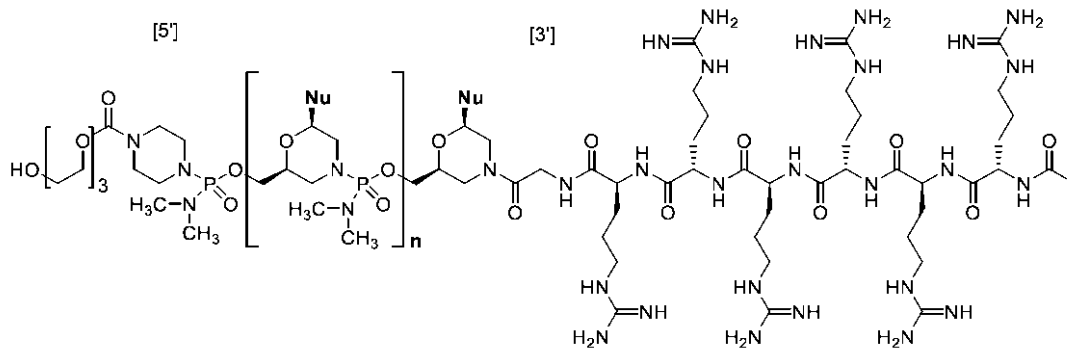
(項目16)

前記アンチセンスオリゴマーが、その薬学的に許容される塩である、項目7～14のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目17)

式(III)に従うアンチセンスオリゴマー、
【化156】

20



30

(III)

またはその薬学的に許容される塩であって、式中、1～n個の各Nuが、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、

【表32】

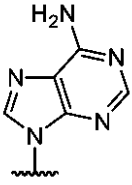
| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

40

式中、Aが、

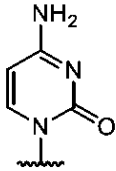
50

【化 1 5 7】



であり、Cが、

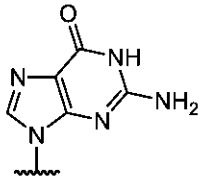
【化 1 5 8】



10

であり、Gが、

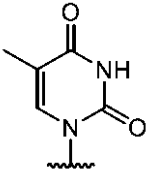
【化 1 5 9】



20

であり、Tが、

【化 1 6 0】



30

であり、式 (I I I) の遠位 - O H が、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結される、アンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容される塩。

(項目 1 8)

式 (I I I) の 1 ~ n 個の各 N u が、5 ' から 3 ' に、配列番号 : 3 に対応する、項目 1 7 に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目 1 9)

前記アンチセンスオリゴマーが、遊離塩基形態である、項目 1 7 ~ 1 8 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目 2 0)

前記アンチセンスオリゴマーが、その薬学的に許容される塩である、項目 1 7 ~ 1 8 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目 2 1)

1 ~ n 個の各 N u が、5 ' から 3 ' に、配列番号 : 3 に対応する、項目 2 0 に記載のアンチセンスオリゴマー。

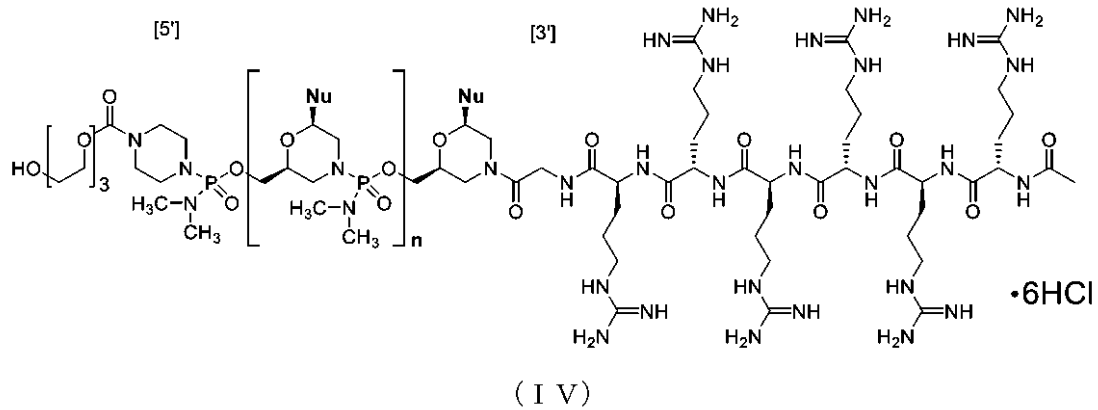
(項目 2 2)

式 (I V) に従うアンチセンスオリゴマーであって、

40

50

【化 1 6 1】



10

式中、1 ~ n個の各Nuが、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し

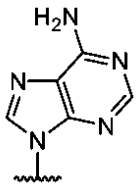
【表 3 3】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

20

式中、Aが、

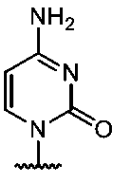
【化 1 6 2】



30

であり、Cが、

【化 1 6 3】

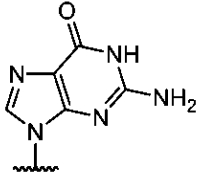


40

であり、Gが、

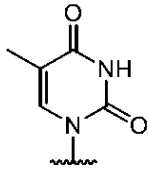
50

【化 1 6 4】



であり、Tが、

【化 1 6 5】



10

であり、式 (I V) の遠位 - O H が、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結される、アンチセンスオリゴマー。

(項目 2 3)

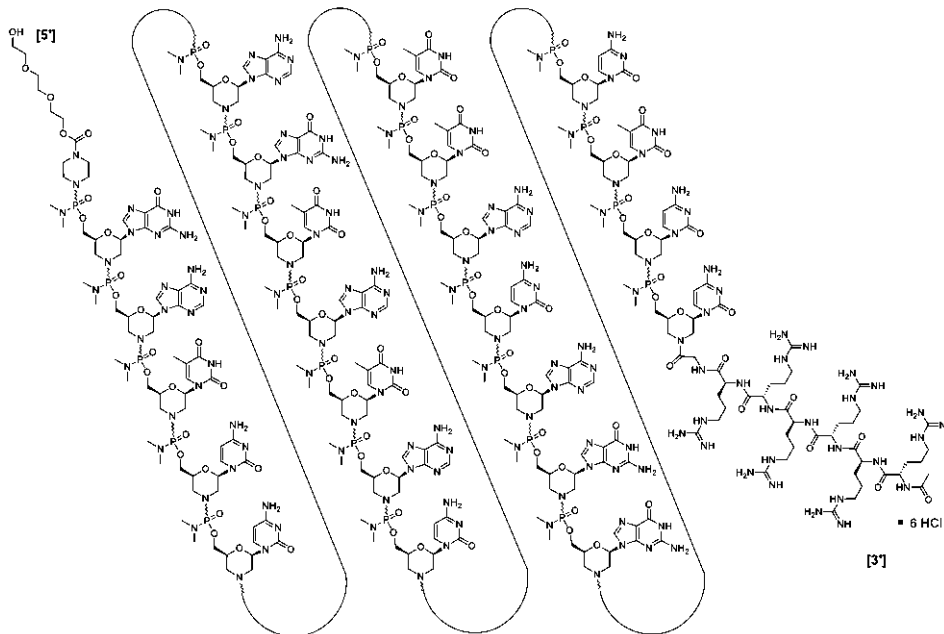
式 (I V) の 1 ~ n 個の各 Nu が、5 ' から 3 ' に、配列番号 : 3 に対応する、項目 2 2 に記載のアンチセンスオリゴマー。

20

(項目 2 4)

前記アンチセンスオリゴマーが、式 (I V a) の構造に従う、項目 2 2 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【化 1 6 6】



30

(I V a)

40

(項目 2 5)

項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩、および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

(項目 2 6)

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) の治療を必要とする対象においてそれを行うための方法であって、前記方法が、治療有効量の項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の

50

アンチセンスオリゴマーまたは項目 2 5 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを
含む、方法。

(項目 2 7)

前記対象が、エクソン 5 0 スキッピングに適している前記ジストロフィン遺伝子の変異
を有する、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

対象においてジストロフィン産生を誘導するために mRNA リーディングフレームを修
復する方法であって、前記方法が、治療有効量の項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のアン
チセンスオリゴマーまたは項目 2 5 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含
む、方法。

(項目 2 9)

前記対象が、エクソン 5 0 スキッピングに適している前記ジストロフィン遺伝子の変異
を有する、項目 2 8 に記載の方法。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 5 】

本開示の実施形態は、概して、改善されたアンチセンスオリゴマーおよびその使用方法
に関し、この方法は、ヒトジストロフィン遺伝子においてエクソンスキッピングを誘導す
るように特異的に設計される。ジストロフィンは筋機能において重要な役割を果たし、様
々な筋肉関連疾患がこの遺伝子の変異型を特徴とする。したがって、ある特定の実施形態
において、本明細書に記載される改善されたアンチセンスオリゴマーは、デュシェンヌ型
筋ジストロフィー (D M D) およびベッカー型筋ジストロフィー (B M D) に見られる変
異ジストロフィン遺伝子などのヒトジストロフィン遺伝子の変異型においてエクソンスキ
ッピングを誘導する。

【 0 0 5 6 】

変異によって引き起こされる異常な mRNA スプライシング事象により、これらの変異
ヒトジストロフィン遺伝子は、欠陥のあるジストロフィンタンパク質を発現するか、また
は測定可能なジストロフィンを全く発現しないかのいずれかであり、これは様々な形態の
筋ジストロフィーを引き起こす状態である。この状態を治療するために、本開示のアンチ
センスオリゴマーは、変異ヒトジストロフィン遺伝子の予めプロセシングされた mRNA
の選択された領域にハイブリダイズし、そうでなければ異常にスプライシングされたジス
トロフィン mRNA においてエクソンスキッピングおよび差次的スプライシングを誘導し
、それにより、筋細胞が機能性ジストロフィンタンパク質をコードする mRNA 転写物を
産生することを可能にする。ある特定の実施形態において、結果として生じるジストロフ
インタンパク質は、必ずしも「野生型」の形態のジストロフィンではなく、むしろ、先端
を切断されたが機能的な形態のジストロフィンである。

【 0 0 5 7 】

筋細胞における機能性ジストロフィンタンパク質のレベルを高めることによって、これ
らおよび関連する実施形態は、筋ジストロフィー、特にそのような形態の筋ジストロフィ
ー、例えば D M D および B M D などの予防および治療に有用であり、これらは、異常な m
R N A スプライシングによる欠陥のあるジストロフィンタンパク質の発現を特徴とする。
本明細書に記載される特定のアンチセンスオリゴマーは、他のオリゴマーよりも改善され
たジストロフィン - エクソン特異的標的化をさらに提供し、それにより、関連する形態の
筋ジストロフィーを治療する代替的な方法よりも有意かつ実用的な利点を提供する。

【 0 0 5 8 】

したがって、本開示は、選択された標的に結合してヒトジストロフィン遺伝子において
エクソンスキッピングを誘導することができるアンチセンスオリゴマーまたはその薬学的
に許容される塩に関し、アンチセンスオリゴマーは、アニーリング部位として指定される
ジストロフィンプレ mRNA のエクソン 5 0 標的領域に相補的である塩基の配列を含み、
塩基配列およびアニーリング部位は、以下から選択され、

10

20

30

40

50

【表 1 5】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から 3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

10

T は、チミンまたはウラシルである。

【 0 0 5 9】

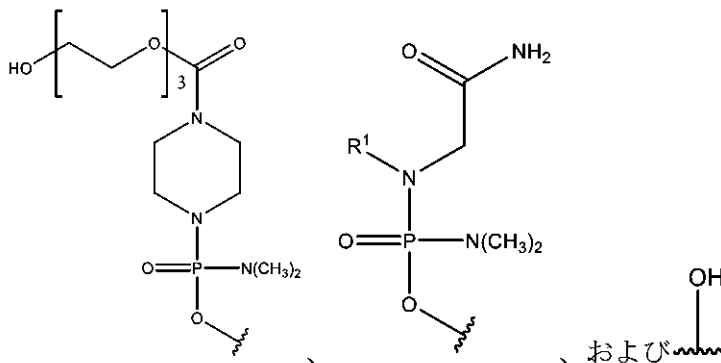
いくつかの実施形態において、1 ~ n 個の各 Nu は、5' から 3' に、以下：配列番号：1、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、または配列番号：9 のうちの 1 つにおける核酸塩基に対応する。いくつかの実施形態において、1 ~ n 個の各 Nu は、5' から 3' に、配列番号：3 における核酸塩基に対応する。

20

【 0 0 6 0】

一態様において、アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーの 5' 末端に結合された T 部分を含み、T 部分は、以下から選択される。

【化 4 0】



30

【 0 0 6 1】

ある特定の実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、1 個以上の細胞膜透過性ペプチド（本明細書では「CPP」と呼称される）にコンジュゲートされる。ある特定の実施形態において、1 個以上の CPP は、アンチセンスオリゴマーの末端に結合される。ある特定の実施形態において、少なくとも 1 個の CPP は、アンチセンスオリゴマーの 5' 末端に結合される。ある特定の実施形態において、少なくとも 1 個の CPP は、アンチセンスオリゴマーの 3' 末端に結合される。ある特定の実施形態において、第 1 の CPP は、アンチセンスオリゴマーの 5' 末端に結合され、第 2 の CPP は、アンチセンスオリゴマーの 3' 末端に結合される。

40

【 0 0 6 2】

いくつかの実施形態において、CPP は、アルギニンリッチペプチドである。「アルギニンリッチ」という用語は、少なくとも 2 個、好ましくは 2、3、4、5、6、7、または 8 個のアルギニン残基を有する CPP を指し、各々が任意に 1 個以上の非荷電疎水性残基によって分離され、任意に約 6 ~ 14 個のアミノ酸残基を含有する。以下に説明されるように、CPP は、好ましくは、そのカルボキシ末端でリンカーを介してアンチセンスオ

50

リゴヌクレオチドの3' および/または5' 末端に連結され、リンカーはまた、1個以上のアミノ酸であり得、かつ好ましくは、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、またはステアロイルから選択されるR^aを含む置換基R^aによってそのアミノ末端でキャッピングされる。いくつかの実施形態において、R^aは、アセチルである。

【0063】

以下の表に見られるように、本明細書で使用するためのCPPの非限定的な例としては、-(RXR)₄-R^a (配列番号: 15)、R-(FFR)₃-R^a (配列番号: 16)、-B-X-(RXR)₄-R^a (配列番号: 17)、-B-X-R-(FFR)₃-R^a (配列番号: 18)、-GLY-R-(FFR)₃-R^a (配列番号: 19)、-GLY-R₅-R^a (配列番号: 20)、-R₅-R^a (配列番号: 21)、-GLY-R₆-R^a (配列番号: 11)、および-R₆-R^a (配列番号: 10)が挙げられ、式中、R^aは、H、アシル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、Rは、アルギニンであり、Xは、6-アミノヘキサン酸であり、Bは、 β -アラニンであり、Fは、フェニルアラニンであり、GLY(またはG)は、グリシンである。CPP「R₅(配列番号: 21)」は、アミド結合を介して一緒に連結された5個のアルギニン残基のペプチドを示すことを意味する(単一の置換基、例えば、R⁵(配列番号: 21)ではない)。CPP「R₆(配列番号: 10)」は、アミド結合を介して一緒に連結された6個のアルギニン残基のペプチドを示すことを意味する(単一の置換基、例えば、R⁶(配列番号: 10)ではない)。いくつかの実施形態において、R^aは、アセチルである。

10

【0064】

例示的なCPPを表1(配列番号: 10、11、および15~21)に示す。

20

【表1-2】

| 表 1:例示的な細胞膜透過性ペプチド | | |
|--|----------------|-------|
| 名称 | 配列 | 配列番号: |
| R ₆ G | RRRRRRG | 11 |
| R ₆ | RRRRRR | 10 |
| (RXR) ₄ | RXXRXRRXRRXR | 15 |
| (RFF) ₃ R | RFFRFFRFFR | 16 |
| (RXR) ₄ XB | RXXRXRRXRRXRXB | 17 |
| (RFF) ₃ RXB | RFFRFFRFFRXB | 18 |
| (RFF) ₃ RG | RFFRFFRFFRG | 19 |
| R ₅ G | RRRRRG | 20 |
| R ₅ | RRRRR | 21 |
| Rは、アルギニン、Xは、6-アミノヘキサン酸、Bは、 β -アラニン、Fは、フェニルアラニン、Gはグリシンである | | |

30

【0065】

CPP、それらの合成、およびオリゴマーにコンジュゲートする方法は、米国出願公開第US2012/0289457号、ならびに国際特許出願公開第WO2004/097017号、同第WO2009/005793号、および同第WO2012/150960号にさらに記載されており、これらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0066】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、CPPとリンカーの組み合わせとして定義される置換基「Z」を含む。リンカーは、そのカルボキシ末端でCPPをオリゴヌクレオチドの3'末端および/または5'末端に架橋する。様々な実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、オリゴマーの3'末端に連結された1個のCPPのみを含み得る。他の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、オリゴマーの5'末端に連結された1個のCPPのみを含み得る。

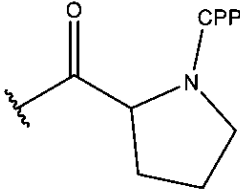
【0067】

50

Z内のリンカーは、例えば、1、2、3、4、または5個のアミノ酸を含み得る。
 特定の実施形態において、Zは、以下から選択され、

- C(O)(CH₂)₅NH - CPP、
- C(O)(CH₂)₂NH - CPP、
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH - CPP、
- C(O)CH₂NH - CPP、および以下の式：

【化41】



10

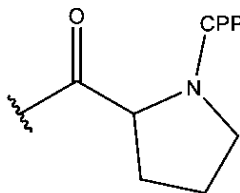
式中、CPPは、CPPカルボキシ末端でのアミド結合によってリンカー部分に結合される。

【0068】

様々な実施形態において、CPPは、本明細書に記載され、かつ表1に示される、アルギニンリッチペプチドである。ある特定の実施形態において、アルギニンリッチCPPは、-R₅-R^a（すなわち、5個のアルギニン残基、配列番号：21）であり、式中、R^aは、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される。ある特定の実施形態において、R^aは、アセチルである。様々な実施形態において、CPPは、配列番号：15、16、または21から選択され、リンカーは、-C(O)(CH₂)₅NH-、-C(O)(CH₂)₂NH-、-C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-、-C(O)CH₂NH-、および

20

【化42】



30

からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、リンカーは、1、2、3、4、または5個のアミノ酸を含む。

【0069】

いくつかの実施形態において、CPPは、配列番号：21であり、リンカーは、Glyである。いくつかの実施形態において、CPPは、配列番号：20である。

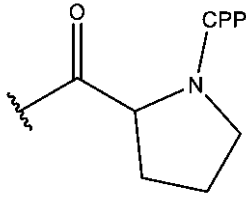
【0070】

ある特定の実施形態において、アルギニンリッチCPPは、-R₆-R^a（すなわち、6個のアルギニン残基、配列番号：10）であり、式中、R^aは、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される。ある特定の実施形態において、R^aは、アセチルである。様々な実施形態において、CPPは、配列番号：10、15、または16から選択され、リンカーは、-C(O)(CH₂)₅NH-、-C(O)(CH₂)₂NH-、-C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-、-C(O)CH₂NH-、および

40

50

【化43】



からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、リンカーは、1、2、3、4、または5個のアミノ酸を含む。

10

【0071】

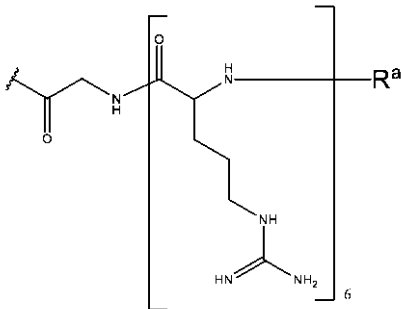
いくつかの実施形態において、CPPは、配列番号：10であり、リンカーは、Glyである。いくつかの実施形態において、CPPは、配列番号：11である。

【0072】

ある特定の実施形態において、Zは、オリゴマーの5'および/または3'末端で本開示のアンチセンスオリゴマーに共有結合している $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ (「 R_6 」は、配列番号：10として開示される) であり、式中、 R^a は、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、またはステアロイルであり、 R_6 のアミノ末端をキャップする(配列番号：10)。ある特定の実施形態において、 R^a は、アセチルである。これらの非限定的な例において、CPPは、 $-R_6-R^a$ (配列番号：10) であり、リンカーは、 $-C(O)CH_2NH-$ (すなわち、GLY) である。Z = $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ (「 R_6 」は、配列番号：10として開示される) のこの特定の例はまた、以下の構造によって例示され、

20

【化44】



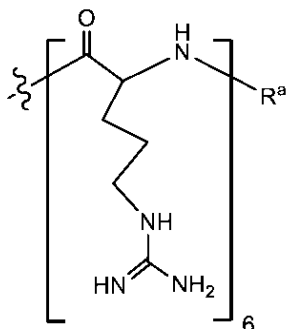
30

式中、 R^a は、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される。

【0073】

様々な実施形態において、CPPは、 $-R_6-R^a$ (配列番号：10) であり、以下の式としても例示され、

【化45】



40

式中、 R^a は、H、アシル、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択される

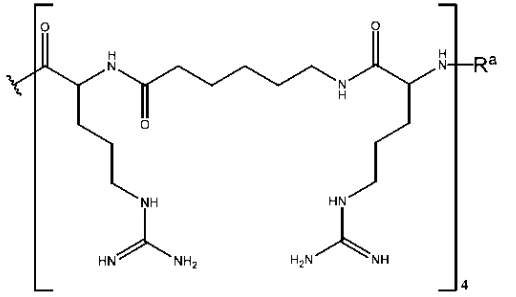
50

。ある特定の実施形態において、CPPは、配列番号：11である。いくつかの実施形態において、R^aは、アセチルである。

【0074】

いくつかの実施形態において、CPPは、-(R^xR)₄-R^a（配列番号：15）であり、以下の式としても例示される。

【化46】

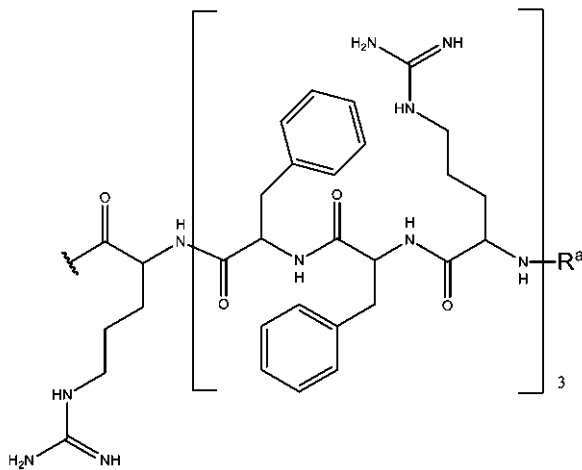


10

【0075】

様々な実施形態において、CPPは、-R-(F^fR)₃-R^a（配列番号：16）であり、以下の式としても例示される。

【化47】



20

30

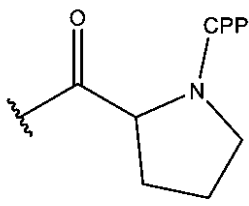
【0076】

様々な実施形態において、Zは、以下から選択され、

- C(O)(CH₂)₅NH-CPP、
- C(O)(CH₂)₂NH-CPP、
- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP、
- C(O)CH₂NH-CPP、および以下の式：

40

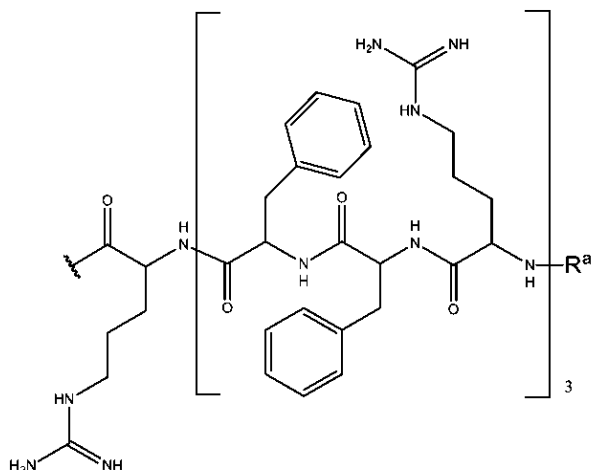
【化48】



式中、CPPは、CPPカルボキシ末端でのアミド結合によってリンカー部分に結合され、かつCPPは、以下：

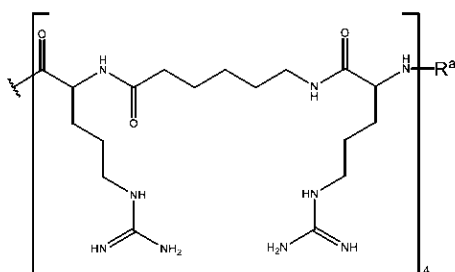
50

【化49】



10

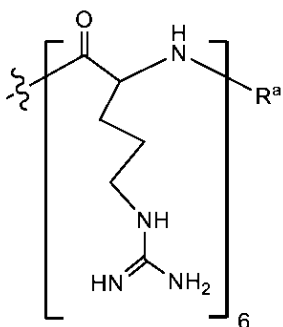
(- R - (F F R)₃ - R^a) (配列番号 : 16)、
【化50】



20

(- (R X R)₄ - R^a) (配列番号 : 15)、
【化51】

30



40

または (- R₆ - R^a) (配列番号 : 10)

から選択される。いくつかの実施形態において、R^aは、アセチルである。

【0077】

いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

【0078】

いくつかの態様において、修飾アンチセンスオリゴマーの核酸塩基は、モルホリノ環構造に連結され、モルホリノ環構造は、1つの環構造のモルホリノ窒素を隣接する環構造の5'環外炭素に結合するリン含有サブユニット間連結によって結合される。そのような態様において、配列番号: 1~9の各々のTは、好ましくは、チミンである。

50

【0079】

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴマーの核酸塩基は、ペプチド核酸(PNA)に連結され、リン酸-糖ポリヌクレオチド骨格は、核酸塩基が連結している可撓性擬ペプチドポリマーで置換されている。

【0080】

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴマーの核酸塩基のうちの少なくとも1つは、ロックド核酸(LNA)に連結され、ロックド核酸構造は、リボース部分が2'酸素と4'炭素を結合する余分な架橋を有する、化学的に修飾されたヌクレオチド類似体である。そのような態様において、配列番号：1～9の各々のLNAに連結される各核酸塩基は、5-メチル基を含む。

10

【0081】

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴマーの核酸塩基のうちの少なくとも1つは、架橋核酸(BNA)に連結され、糖立体構造は、フラノース骨格への追加の架橋構造の導入によって制限またはロックされる。いくつかの態様において、アンチセンスオリゴマーの核酸塩基のうちの少なくとも1つは、2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸(ENNA)に連結される。そのような態様において、配列番号：1～9の各々のBNAまたはENNAに連結される各核酸塩基は、5-メチル基を含む。

【0082】

いくつかの態様において、骨格の化学物質が許容する場合、配列番号1～9：の各チミンは、ウラシルである。

20

【0083】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する当該分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の方法および材料が、本開示の実施または試験で使用され得るが、好ましい方法および材料が記載される。本開示の目的のために、以下の用語が以下に定義される。

【0084】

I. 定義

本明細書で使用される場合、「アルキル」という用語は、別段の定めがない限り、飽和直鎖または分岐炭化水素を指す。ある特定の実施形態において、アルキル基は、第一級、第二級、または第三級炭化水素である。ある特定の実施形態において、アルキル基は、1～10個の炭素原子、すなわち、C₁～C₁₀アルキルを含む。ある特定の実施形態において、アルキル基は、1～6個の炭素原子、すなわち、C₁～C₆アルキルを含む。この用語は、ハロゲン化アルキル基を含む、置換アルキル基および非置換アルキル基の両方を含む。ある特定の実施形態において、アルキル基は、フッ素化アルキル基である。アルキル基が置換され得る部分の非限定的な例は、当業者に既知であるように、例えば、参照により本明細書に組み込まれるGreene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991で教示されるように、保護されていないか、または必要に応じて保護されているかのいずれかの、ハロゲン(フルオロ、クロロ、ブromo、もしくはヨード)、ヒドロキシル、アミノ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルコキシ、アリールオキシ、ニトロ、シアノ、スルホン酸、硫酸塩、ホスホン酸、リン酸塩、またはホスホン酸塩からなる群から選択される。ある特定の実施形態において、アルキル基は、メチル、CF₃、CCl₃、CFCl₂、CF₂Cl、エチル、CH₂CF₃、CF₂CF₃、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、t-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、3-メチルペンチル、2,2-ジメチルブチル、および2,3-ジメチルブチルからなる群から選択される。

30

40

【0085】

「エクソン50スキッピングに適している」とは、対象または患者に関して本明細書で

50

使用される場合、ジストロフィンプレmRNAのエクソン50のスキッピングがないことにより、リーディングフレームがアウトオブフレームとなり、それによりプレmRNAの翻訳が妨げられて、対象または患者が機能性または半機能性ジストロフィンを産生することができなくなる、ジストロフィン遺伝子の1つ以上の変異を有する対象および患者を含むことが意図される。患者がエクソンスキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有するかどうかを決定することは、十分に当業者の理解の範囲内である（例えば、Aartsma-Rus et al. (2009) Hum Mutat. 30: 293-299、Gurvich et al., Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640、およびFletcher et al. (2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223を参照）。

10

【0086】

本明細書で使用される場合、「オリゴマー」という用語は、サブユニット間連結によって結合されるサブユニットの配列を指す。ある特定の事例において、「オリゴマー」という用語は、「アンチセンスオリゴマー」に関連して使用される。「アンチセンスオリゴマー」について、各サブユニットは、(i)リボース糖またはその誘導体と、(ii)それらに結合した核酸塩基とからなり、これにより、塩基対合部分の順序は、サブユニット、サブユニット間連結、またはそれらの両方のいずれかが自然発生的ではないという条件で、標的配列内で核酸：オリゴマーヘテロ二本鎖を形成するために、ワトソン-クリック塩基対合によって核酸（典型的にはRNA）中の標的配列に相補的である塩基配列を形成する。ある特定の実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）である。他の実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、2'-O-メチルホスホロチオエートである。他の実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、または2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸（ENA）などの架橋核酸（BNA）である。追加の例示的な実施形態は、本明細書に記載される。

20

【0087】

「相補的」および「相補性」という用語は、ワトソン-クリック塩基対合則によって互いに関連する2つ以上のオリゴマー（すなわち、各々が核酸塩基配列を含む）を指す。例えば、核酸塩基配列「T-G-A（5'3'）」は、核酸塩基配列「A-C-T（3'5'）」に相補的である。相補性は、「部分的」であり得、所与の核酸塩基配列の全てには満たない核酸塩基が、塩基対合則に従って他の核酸塩基配列とマッチされる。例えば、いくつかの実施形態において、所与の核酸塩基配列と別の核酸塩基配列との間の相補性は、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%であり得る。あるいは、例を続けると、所与の核酸塩基配列と別の核酸塩基配列との間に「完全な（complete）」または「完全な（perfect）」（100%）相補性が存在し得る。核酸塩基配列間の相補性の程度は、配列間のハイブリダイゼーションの効率および強度に有意な影響を与える。

30

【0088】

「有効量」および「治療有効量」という用語は、本明細書において互換的に使用され、所望の治療効果をもたらすのに有効である、単回投与として、または連続投与の一部としてのいずれかで哺乳動物対象に投与される、アンチセンスオリゴマーなどの治療化合物の量を指す。アンチセンスオリゴマーについて、この効果は、典型的には、選択された標的配列の翻訳もしくは天然のスプライスプロセッシングを阻害することによって、または臨床的に有意な量のジストロフィン（統計的有意性）を産生することによってもたらされる。

40

【0089】

いくつかの実施形態において、有効量は、対象を治療するための一定期間にわたって、アンチセンスオリゴマーを含む組成物約1mg/kg～約200mg/kgである。いくつかの実施形態において、有効量は、対象におけるジストロフィン陽性線維の数を増加させるために、アンチセンスオリゴマーを含む組成物約1mg/kg～約200mg/kgである。ある特定の実施形態において、有効量は、例えば6分間歩行試験（6MWT）に

50

において、健康な同等者と比較して患者の歩行距離を安定化、維持、または改善するために、アンチセンスオリゴマーを含む組成物約 1 mg / kg ~ 約 200 mg / kg である。

【0090】

「増強する」もしくは「増強すること」、または「増加させる」もしくは「増加させること」、または「刺激する」もしくは「刺激すること」は、概して、前述のうちのいずれかの1つ以上のアンチセンスオリゴマーまたは医薬組成物が、アンチセンスオリゴマーなし、または対照化合物のいずれかによって引き起こされる応答と比較して、細胞または対象においてより大きい生理学的応答（すなわち、下流効果）をもたらすまたは引き起こす能力を指す。より大きい生理学的応答は、当該技術分野における理解および本明細書の記載から明らかな応答の中でも特に、機能的な形態のジストロフィンタンパク質の発現の増加、または筋組織におけるジストロフィン関連生物活性の増加を含み得る。

10

【0091】

本明細書で使用される場合、「機能」および「機能性」などの用語は、生物学的、酵素学的、または治療的機能を指す。

【0092】

「機能性」ジストロフィンタンパク質は、概して、典型的には、DMDまたはBMDを有するある特定の対象に存在する、改変されたかまたは「欠陥のある」形態のジストロフィンタンパク質と比較して、そうでなければ筋ジストロフィーに特徴的である筋組織の進行性分解を低減するのに十分な生物学的活性を有するジストロフィンタンパク質を指す。一例として、*in vitro*での筋培養におけるジストロフィン関連活性は、筋管のサイズ、筋原線維の組織化（または崩壊）、収縮活性、およびアセチルコリン受容体の自発的クラスター化に従って測定することができる（例えば、Brown et al., *Journal of Cell Science*, 112:209-216, 1999を参照）。また、動物モデルは、疾患の病因を研究するための貴重なリソースであり、ジストロフィン関連活性を試験するための手段を提供する。DMD研究に最も広く使用されている動物モデルのうちの2つは、*mdx*マウスおよびゴールデンレトリバー筋ジストロフィー（GRMD）イヌであり、それらの両方がジストロフィン陰性である（例えば、Collins & Morgan, *Int J Exp Pathol* 84:165-172, 2003を参照）。これらおよび他の動物モデルを使用して、様々なジストロフィンタンパク質の機能活性を測定することができる。先端を切断された形態のジストロフィン、例えば、本開示のある特定のエクソンスキッピングアンチセンスオリゴマーの投与後に産生されるそのような形態が含まれる。

20

30

【0093】

「ミスマッチ」（複数可）という用語は、塩基対合則に従って標的pre-mRNAにマッチしないオリゴマー核酸塩基配列中の1つ以上の核酸塩基（連続的であるか分離しているかにかかわらず）を指す。多くの場合、完全相補性が望ましいが、いくつかの実施形態は、標的pre-mRNAに対して1つ以上、ただし好ましくは6、5、4、3、2、または1つのミスマッチを含み得る。オリゴマー内の任意の位置における変動が含まれる。ある特定の実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、末端付近の核酸塩基配列の変動、内部の変動を含み、存在する場合、典型的には、5'および/または3'末端の約6、5、4、3、2、または1つのサブユニット内にある。ある特定の実施形態において、1、2、または3つの核酸塩基を除去し、なお標的との結合を提供することができる。

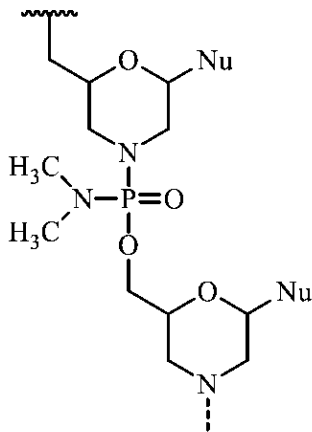
40

【0094】

「モルホリノ」、「モルホリノオリゴマー」、および「PMO」という用語は、以下の一般構造：

50

【化52】



10

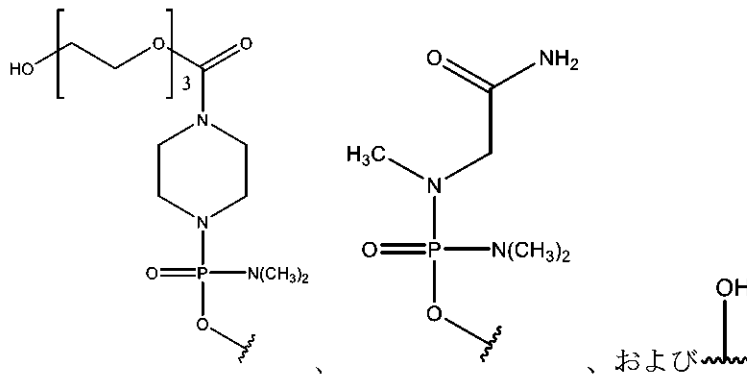
の、かつ Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187 - 195 (1997) の図 2 に記載されるような、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーを指す。本明細書に記載されるモルホリノは、上記の一般構造の全ての立体異性体および互変異性体を含む。モルホリノオリゴマーの合成、構造、および結合特性は、米国特許第 5,698,685 号、同第 5,217,866 号、同第 5,142,047 号、同第 5,034,506 号、同第 5,166,315 号、同第 5,521,063 号、同第 5,506,337 号、同第 8,076,476 号、および同第 8,299,206 号に詳述されており、これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0095】

ある特定の実施形態において、モルホリノは、オリゴマーの 5' または 3' 末端で「テール」部分とコンジュゲートされて、その安定性および/または溶解性を高める。例示的なテールは、

【化53】



30

を含む。T 部分の遠位 -OH または -NH₂ は、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結される。

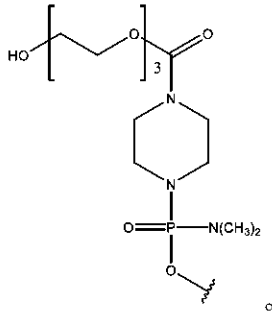
40

【0096】

上記の例示的なテール部分のうち、「TEG」または「EG3」は、以下のテール部分を指す。

50

【化 5 4】

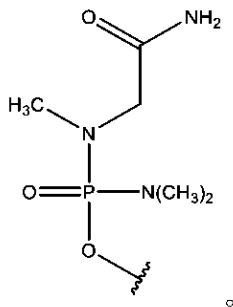


10

【0097】

上記の例示的なテール部分のうち、「GT」は、以下のテール部分を指す。

【化 5 5】



20

【0098】

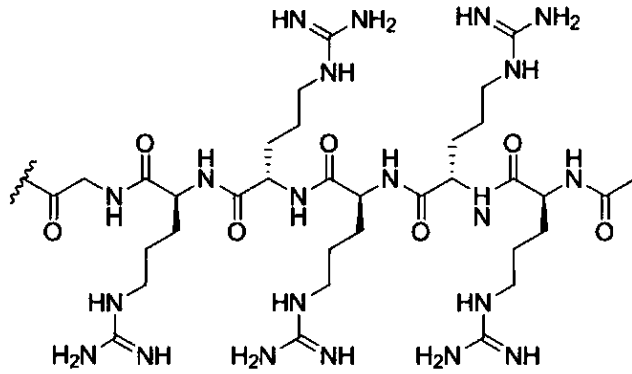
本明細書で使用される場合、「-G-R₅ (配列番号: 20)」および「-G-R₅-Ac (配列番号: 20)」という用語は、互換的に使用され、本開示のアンチセンスオリゴマーにコンジュゲートされたペプチド部分を指す。様々な実施形態において、「G」は、アミド結合によって「R₅ (配列番号: 21)」にコンジュゲートされたグリシン残基を表し、各「R」は、アミド結合によって一緒にコンジュゲートされたアルギニン残基を表し、これにより「R₅ (配列番号: 21)」は、アミド結合によって一緒にコンジュゲートされた5個のアルギニン残基を意味する。アルギニン残基は、任意の立体配置を有することができ、例えば、アルギニン残基は、L-アルギニン残基、D-アルギニン残基、またはD-アルギニン残基とL-アルギニン残基の混合物であり得る。ある特定の実施形態において、「-G-R₅ (配列番号: 20)」または「-G-R₅-Ac (配列番号: 20)」は、「テール」部分の遠位-OHまたはNH₂に連結される。ある特定の実施形態において、「-G-R₅ (配列番号: 20)」または「-G-R₅-Ac (配列番号: 20)」は、本開示のPMOアンチセンスオリゴマーの最も3'のモルホリノサブユニットのモルホリン環窒素にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、「-G-R₅ (配列番号: 20)」または「-G-R₅-Ac (配列番号: 20)」は、本開示のアンチセンスオリゴマーの3'末端にコンジュゲートされ、以下の式のものである。

30

40

50

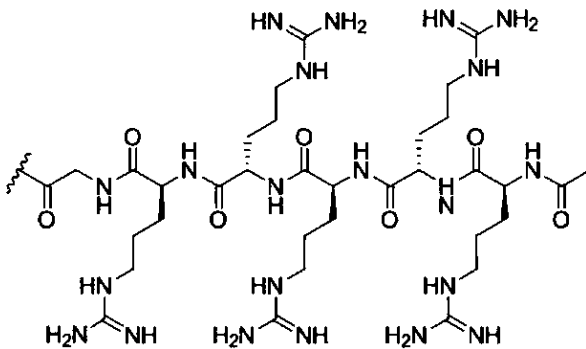
【化56】



10

もしくはその薬学的に許容される塩、または

【化57】



20

• 5HCl

【0099】

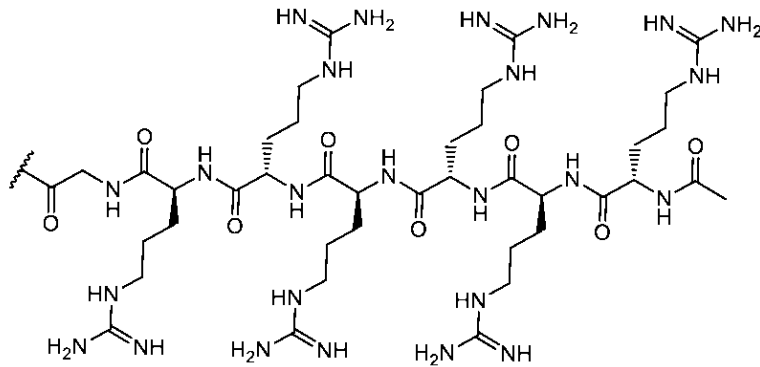
本明細書で使用される場合、「-G-R₆ (配列番号: 11)」および「-G-R₆-Ac (配列番号: 11)」および「R₆G (配列番号: 11)」という用語は、互換的に使用され、本開示のアンチセンスオリゴマーにコンジュゲートされたペプチド部分を指す。様々な実施形態において、「G」は、アミド結合によって「R₆ (配列番号: 10)」にコンジュゲートされたグリシン残基を表し、各「R」は、アミド結合によって一緒にコンジュゲートされたアルギニン残基を表し、これにより「R₆ (配列番号: 10)」は、アミド結合によって一緒にコンジュゲートされた6個のアルギニン残基を意味する。アルギニン残基は、任意の立体配置を有することができ、例えば、アルギニン残基は、L-アルギニン残基、D-アルギニン残基、またはD-アルギニン残基とL-アルギニン残基の混合物であり得る。ある特定の実施形態において、「-G-R₆ (配列番号: 11)」または「-G-R₆-Ac (配列番号: 11)」は、「テール」部分の遠位-OHまたは-NH₂に連結される。ある特定の実施形態において、「-G-R₆ (配列番号: 11)」または「-G-R₆-Ac (配列番号: 11)」は、本開示のPMOアンチセンスオリゴマーの最も3'のモルホリノサブユニットのモルホリン環窒素にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、「-G-R₆ (配列番号: 11)」または「-G-R₆-Ac (配列番号: 11)」は、本開示のアンチセンスオリゴマーの3'末端にコンジュゲートされ、以下の式のものである。

30

40

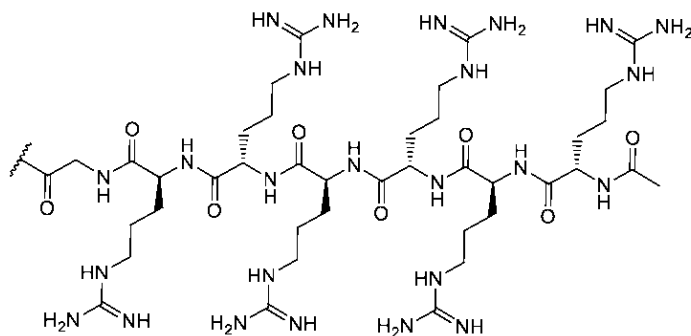
50

【化58】



10

、または



.6HCl

20

【0100】

「核酸塩基」(Nu)、「塩基対合部分」、または「塩基」という用語は、互換的に使用され、自然発生または「天然」DNAもしくはRNA(例えば、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、およびグアニン)で見られるプリンまたはピリミジン塩基、ならびにこれらの自然発生的プリンおよびピリミジンの類似体を指す。これらの類似体は、結合親和性などの改善された特性をオリゴマーに付与し得る。例示的な類似体としては、ヒポキサンチン(イノシンの塩基構成成分)、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾ピリミジン、10-(9-(アミノエトキシ)フェノキサジニル)(G-クランプ)などが挙げられる。

30

【0101】

塩基対合部分のさらなる例としては、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、グアニン、およびヒポキサンチン(イノシン)(アシル保護基によって保護されたそれらのそれぞれアミノ基を有する)、2-フルオロウラシル、2-フルオロシトシン、5-プロモウラシル、5-ヨードウラシル、2,6-ジアミノプリン、アザシトシン、偽イソシトシンおよび偽ウラシルなどのピリミジン類似体、ならびに8-置換プリン、キサンチン、またはヒポキサンチン(後者の2つは自然分解生成物である)などの他の修飾核酸塩基が挙げられるが、これらに限定されない。Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048; Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196、および Revankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313に開示される修飾核酸塩基もまた企図され、これらの内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

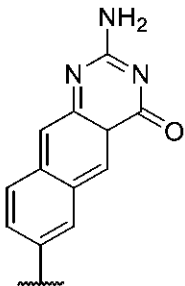
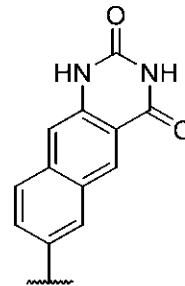
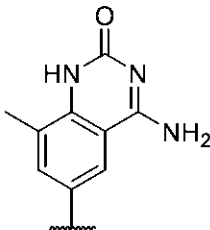
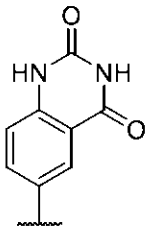
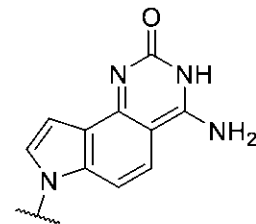
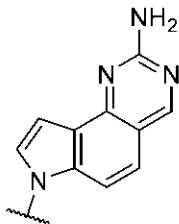
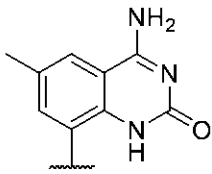
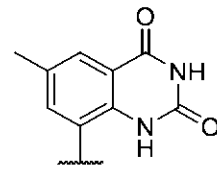
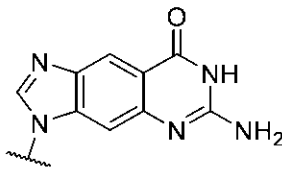
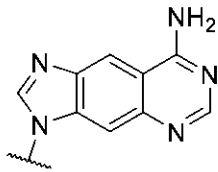
【0102】

塩基対合部分のさらなる例としては、1つ以上のベンゼン環が付加された拡大サイズの核酸塩基が挙げられるが、これらに限定されない。Glen Researchカタログ(www.glenresearch.com)、Krueger AT et al., Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150、Kool, ET, Ac

50

c. Chem. Res., 2002, 35, 936-943、Benner S. A., et al., Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543、Romberg, F. E., et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733、および Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627 (これらの内容は、参照により本明細書に組み込まれる)に記載される核酸塩基置換は、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーにおいて有用であると企図される。拡大サイズの核酸塩基の例としては、以下に示されるもの、ならびにその互変異性体が挙げられる。

【化59】



10

20

30

【0103】

本明細書で使用される場合、「非経口投与」および「非経口的に投与される」という語句は、通常は注射による、腸内および局所投与以外の投与様式を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、および胸骨内の注射および注入を含むが、これらに限定されない。

40

【0104】

本明細書で使用される場合、構造式内で使用される一組の括弧は、括弧間の構造特徴が繰り返されることを示す。いくつかの実施形態において、使用される括弧は、「[」および「]」であり得、ある特定の実施形態において、繰り返す構造特徴を示すために使用される括弧は、「(」および「)」であり得る。いくつかの実施形態において、括弧間の構造特徴の繰り返し反復数は、括弧の外側に示される数、例えば、2、3、4、5、6、7などである。様々な実施形態において、括弧間の構造特徴の繰り返し反復数は、「Z」な

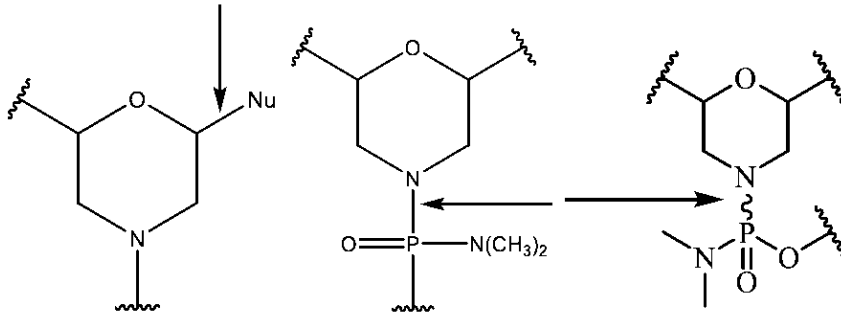
50

どの括弧の外側に示される変数によって示される。

【0105】

本明細書で使用される場合、構造式内のキラル炭素またはリン原子に引き寄せられた直鎖結合または曲がりくねった (squiggly) 結合は、キラル炭素またはリンの立体化学が未定義であり、キラル中心の全ての形態および/またはそれらの混合物を含むことが意図されていることを示す。そのような図の例が以下に示される。

【化60】



10

【0106】

「薬学的に許容される」という語句は、物質または組成物が、製剤を含む他の成分および/またはそれを用いて治療される対象と、化学的および/または毒性学的に適合性がなければならないことを意味する。

20

【0107】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という語句は、非毒性、不活性固体、半固体もしくは液体充填剤、希釈剤、封入材料、または任意の種類製の補助剤を意味する。薬学的に許容される担体として役立つ材料のいくつかの例としては、製剤者の判断に従って、糖類、例えば、ラクトース、グルコース、スクロース；デンプン、例えば、トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン；セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルナトリウムセルロース、エチルセルロース、および酢酸セルロース；粉末トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；賦形剤、例えば、カカオバターおよび坐剤ワックス；油、例えば、ピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油；グリコール、例えば、プロピレングリコールエステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；寒天；緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；アルギニン酸；発熱性物質除去蒸留水；等張生理食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；リン酸緩衝液；非毒性適合性潤滑剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム；着色剤；離型剤；コーティング剤；甘味剤；香味剤；芳香剤；防腐剤；および酸化防止剤がある。

30

【0108】

ジストロフィン合成または産生に関する「修復」という用語は、概して、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーを用いた治療後の筋ジストロフィー患者における、先端を切断された形態のジストロフィンを含むジストロフィンタンパク質の産生を指す。治療後の患者のジストロフィン陽性線維の割合は、既知の技術を使用して筋生検によって決定され得る。例えば、筋生検は、患者の上腕二頭筋などの好適な筋肉から採取され得る。

40

【0109】

陽性ジストロフィン線維の割合の分析は、治療前および/もしくは治療後、または治療過程全体を通じた時点において実施され得る。いくつかの実施形態において、治療後の生検は、治療前の生検と対側の筋肉から採取される。治療前および治療後のジストロフィン発現分析は、ジストロフィンのための任意の好適なアッセイを使用して実施され得る。いくつかの実施形態において、免疫組織化学的検出は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などのジストロフィンのためのマーカーである抗体を使用して、筋生検からの組織切片上で実施される。例えば、ジストロフィンのための高感度マーカーである M A N

50

D Y S 1 0 6 抗体が使用され得る。任意の好適な二次抗体が使用され得る。

【 0 1 1 0 】

いくつかの実施形態において、ジストロフィン陽性線維の割合は、陽性線維数を、カウントした総線維数で割ることによって計算される。正常な筋肉試料は、100%のジストロフィン陽性線維を有する。したがって、ジストロフィン陽性線維の割合は、正常の割合として表され得る。治療前の筋肉ならびに復帰突然変異線維におけるジストロフィンの微量レベルの存在を制御するために、治療後の筋肉におけるジストロフィン陽性線維をカウントする場合、ベースラインは、患者からの治療前の筋肉切片を使用して設定され得る。これは、その患者の治療後の筋肉切片におけるジストロフィン陽性線維をカウントするための閾値として使用され得る。他の実施形態において、抗体で染色された組織切片は、B i o q u a n t 画像分析ソフトウェア (B i o q u a n t I m a g e A n a l y s i s C o r p o r a t i o n , N a s h v i l l e , T N) を使用したジストロフィン定量化にも使用され得る。総ジストロフィン蛍光シグナル強度は、正常の割合として報告され得る。さらに、モノクローナルまたはポリクローナル抗ジストロフィン抗体を用いたウェスタンブロット分析を使用して、ジストロフィン陽性線維の割合を決定することができる。例えば、L e i c a B i o s y s t e m s からの抗ジストロフィン抗体 N C L - D y s 1 が使用され得る。また、ジストロフィン陽性線維の割合は、サルコグリカン複合体 (,) および / または神経 N O S の構成成分の発現を決定することによっても分析され得る。

10

【 0 1 1 1 】

いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーを用いた治療は、治療なしで予想される D M D 患者における進行性呼吸筋機能障害および / または不全を遅らせるか、または低減する。いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーを用いた治療は、治療なしで予想される換気補助の必要性を低減または排除し得る。いくつかの実施形態において、疾患の経過を追跡するための呼吸機能の測定、ならびに可能性のある治療介入の評価には、最大吸気圧 (M I P) 、最大呼気圧 (M E P) 、および努力肺活量 (F V C) が含まれる。M I P および M E P は、それぞれ、吸入中および呼気中に人が発生させることができる圧力レベルを測定し、かつ呼吸筋力の感度尺度である。M I P は、横隔膜の筋力低下の尺度である。

20

【 0 1 1 2 】

いくつかの実施形態において、M E P は、M I P および F V C を含む他の肺機能検査における変化の前に低下し得る。ある特定の実施形態において、M E P は、呼吸機能障害の早期指標であり得る。ある特定の実施形態において、F V C は、最大吸気後の努力呼気中に排出される空気の総体積を測定するために使用され得る。D M D 患者において、F V C は、10代前半まで身体的成長と同時に増加する。しかしながら、成長が病気の進行によって遅くなるまたは不良になり、筋力低下が進行すると、肺活量は下降期に入り、10 ~ 12歳の後、年間約8 ~ 8.5パーセントの平均速度で低下する。ある特定の実施形態において、予測M I P パーセント (M I P は体重で調整) 、予測M E P パーセント (M E P は年齢で調整) 、および予測F V C パーセント (F V C は年齢および身長で調整) は、支持的分析である。

30

【 0 1 1 3 】

本明細書で使用される場合、「対象」および「患者」という用語は、D M D もしくは B M D 、またはこれらの状態に関連する症状のいずれか (例えば、筋線維の消失) を有する、またはそのリスクがある対象 (または患者) など、本開示のアンチセンスオリゴマーを用いて治療され得る症状を示す、または症状を示すリスクがある任意の動物を含む。好適な対象 (または患者) には、実験動物 (マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットなど) 、家畜、および家庭用動物またはペット (ネコまたはイヌなど) が含まれる。非ヒト霊長類、および好ましくはヒト患者 (または対象) が含まれる。また、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する対象 (または患者) においてジストロフィンを産生する方法も含まれる。

40

50

【0114】

本明細書で使用される場合、「全身投与」、「全身に投与される」、「末梢投与」、および「末梢に投与される」という語句は、中枢神経系への直接の投与以外の、化合物、薬物、または他の材料の投与を意味し、これにより患者の系内に入り、ひいては代謝および他の類似のプロセス、例えば、皮下投与などの対象となる。

【0115】

「標的化配列」または「塩基配列」という語句は、標的プレmRNA中のヌクレオチドの配列に相補的であるオリゴマーの核酸塩基の配列を指す。本開示のいくつかの実施形態において、標的プレmRNA中のヌクレオチドの配列は、H50D(+04-18)、H50D(+07-18)、H50D(+07-16)、H50D(+07-17)、H50A(-19+07)、H50D(+07-15)、H50A(-02+23)、H50D(+06-18)、またはH50D(+07-20)として指定されるジストロフィンプレmRNA中のエクソン50、イントロン49、および/またはイントロン50アニーリング部位である。一実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーによって標的化されるアニーリング部位は、H50D(+07-16)である。

10

【0116】

対象（例えば、ヒトなどの哺乳動物）または細胞の「治療」は、対象または細胞の自然経過を変化させる試みにおいて使用される任意の種類 of 介入である。治療は、限定するものではないが、オリゴマーまたはその医薬組成物の投与を含み、予防的に、または病理学的事象の開始後もしくは病原体との接触後のいずれかに実施され得る。治療は、ある特定の形態の筋ジストロフィーのような、ジストロフィタンパク質に関連した疾患または状態の症状または病理に対する任意の望ましい効果を含み、例えば、治療されている疾患または状態の、1つ以上の測定可能なマーカーの最小限の変化または改善を含み得る。また、治療されている疾患もしくは状態の進行速度を低下させること、その疾患もしくは状態の発症を遅延させること、またはその発症の重症度を低減することを対象とし得る、「予防的」治療も含まれる。「治療」または「予防」は、必ずしも疾患もしくは状態またはその随伴症状の完全な根絶、治癒、または予防を示すものではない。

20

【0117】

いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーを用いた治療は、治療なしで予想され得る、新規のジストロフィン産生を増加させ、疾患進行を遅延させ、歩行不能を遅らせるかもしくは低減し、筋肉の炎症を低減し、筋肉損傷を低減し、筋機能を改善し、肺機能の喪失を低減し、かつ/または筋肉再生を増強する。いくつかの実施形態において、治療は、疾患進行を維持するか、遅延させるか、または遅らせる。いくつかの実施形態において、治療は、歩行を維持するか、または歩行不能を低減する。いくつかの実施形態において、治療は、肺機能を維持するか、または肺機能の喪失を低減する。いくつかの実施形態において、治療は、例えば、6分間歩行試験(6MWT)によって測定されるように、患者の安定した歩行距離を維持するか、または増加させる。いくつかの実施形態において、治療は、10メートルを歩行/走行する時間を維持するか、または減少させる(すなわち、10メートル歩行/走行試験)。いくつかの実施形態において、治療は、仰臥位から起立するまでの時間を維持するか、または低減する(すなわち、起立時間試験)。いくつかの実施形態において、治療は、4つの標準階段を上る時間を維持するか、または低減する(すなわち、4階段昇段試験)。いくつかの実施形態において、治療は、例えば、MRI(例えば、脚筋のMRI)によって測定されるように、患者の筋肉の炎症を維持するか、または低減する。いくつかの実施形態において、MRIは、T2および/または脂肪画分を測定して、筋変性を特定する。MRIは、炎症、浮腫、筋肉損傷、および脂肪浸潤によって引き起こされる筋肉の構造および組成の変化を特定することができる。

30

40

【0118】

いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーを用いた治療は、新規のジストロフィン産生を増加させ、治療なしで予測される歩行不能を遅らせるか、または低減する。例えば、治療は、対象の歩行能力(例えば、歩行の安定化)を安定化するか、

50

維持するか、改善するか、または増加させ得る。いくつかの実施形態において、治療は、例えば、McDonaldら（Muscle Nerve, 2010; 42: 966-74、参照により本明細書に組み込まれる）によって記載される6分間歩行試験（6MWT）によって測定されるように、患者の安定した歩行距離を維持するか、または増加させる。6分間歩行距離（6MWD）の変化は、絶対値、変化率、または%予測値の変化として表され得る。健康な同等者の典型的なパフォーマンスと比較した6MWTにおけるDMD患者のパフォーマンスは、%予測値を計算することによって決定することができる。例えば、%予測6MWDは、男性の場合、以下の方程式を使用して計算され得る： $196.72 + (39.81 \times \text{年齢}) - (1.36 \times \text{年齢}^2) + (132.28 \times \text{身長(メートル)})$ 。女性の場合、%予測6MWDは、以下の方程式を使用して計算され得る： $188.61 + (51.50 \times \text{年齢}) - (1.86 \times \text{年齢}^2) + (86.10 \times \text{身長(メートル)})$ （Henricson et al. PLoS Curr., 2012, version 2、参照により本明細書に組み込まれる）。

10

【0119】

DMD患者の筋機能の喪失は、正常な小児の成長および発達の背景に反して起こり得る。実際に、DMDを有する小児は、進行性筋肉障害にもかかわらず、約1年の課程にわたって6MWT中の歩行距離の増加を示し得る。いくつかの実施形態において、DMD患者からの6MWDは、定型発達の対照対象、ならびに年齢および性別が一致した対象からの既存の標準データと比較される。いくつかの実施形態において、正常な成長および発達は、標準データにフィッティングされた年齢および身長に基づく方程式を使用して説明され得る。そのような方程式を使用して、DMDを有する対象における6MWDをパーセント予測（%予測）値に変換することができる。ある特定の実施形態において、%予測6MWDデータの分析は、正常な成長および発達を説明する方法を表し、若年齢（例えば、7歳以下）における機能の増加が、DMD患者における能力の改善というよりむしろ安定を表すことを示し得る（Henricson et al. PLoS Curr., 2012, version 2、参照により本明細書に組み込まれる）。

20

【0120】

異なるアンチセンス分子を区別するために、アンチセンス分子の命名法システムが提案および公開された（Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654を参照）。この命名法は、以下に示されるように、全てが同じ標的領域に向けられたいくつかのわずかに異なるアンチセンス分子を試験する場合に、特に適切なものとなった。

30

H#A/D(x:y)

【0121】

最初の文字は、種を示す（例えば、H：ヒト、M：マウス、C：イヌ）。「#」は、標的ジストロフィンエクソン番号を示す。「A/D」は、それぞれエクソンの始点および終点におけるアクセプターまたはドナープライス部位を示す。(x y)は、アニーリング座標を表し、「-」または「+」は、それぞれイントロンまたはエクソン配列を示す。例えば、A(-6+18)は、標的エクソンの前にあるイントロンの最後の6塩基、および標的エクソンの最初の18塩基を示す。最も近いプライス部位がアクセプターになるため、これらの座標の前に「A」が付く。ドナープライス部位におけるアニーリング座標の記載は、D(+2-18)であり得、最後の2エクソン塩基および最初の18イントロン塩基が、アンチセンス分子のアニーリング部位に対応する。エクソンアニーリング座標全体は、A(+65+85)、つまり、そのエクソンの始点から65番目~85番目のヌクレオチドの部位によって表される。

40

【0122】

II. アンチセンスオリゴマー

A. エクソン50スキッピングを誘導するように設計されたアンチセンスオリゴマー

ある特定の実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、ジストロフィン遺伝子のエクソン50、イントロン49、および/またはイントロン50標的領域に相補的

50

であり、かつエクソン50スキッピングを誘導する。特に、本開示は、アニーリング部位として指定されるジストロフィンプレmRNAのエクソン50、イントロン49、および/またはイントロン50標的領域に相補的なアンチセンスオリゴマーに関する。いくつかの実施形態において、アニーリング部位は、H50D(+04-18)、H50D(+07-18)、H50D(+07-16)、H50D(+07-17)、H50A(-19+07)、H50D(+07-15)、H50A(-02+23)、H50D(+06-18)、またはH50D(+07-20)から選択される。いくつかの実施形態において、アニーリング部位は、H50D(+07-16)である。

【0123】

本開示のアンチセンスオリゴマーは、ジストロフィンプレmRNAを標的化し、エクソン50のスキッピングを誘導するため、成熟したスプライシングされたmRNA転写物から除外またはスキッピングされる。エクソン50をスキッピングすることによって、破壊されたリーディングフレームは、インフレーム変異に修復される。DMDは様々な遺伝的サブタイプからなるが、本開示のアンチセンスオリゴマーは、ジストロフィンプレmRNAのエクソン50をスキッピングするように特異的に設計された。エクソン50のスキッピングに適しているDMD変異は、DMD患者のサブグループ(4%)を含む。

【0124】

エクソン50スキッピングを誘導するアンチセンスオリゴマーの核酸塩基配列は、ジストロフィンプレmRNAのエクソン50、イントロン49、および/またはイントロン50内の特定の標的配列に相補的であるように設計される。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、PMOであり、PMOの各モルホリノ環は、例えば、DNA(アデニン、シトシン、グアニン、およびチミン)中に見られる核酸塩基を含む核酸塩基に連結される。

【0125】

B. オリゴマー化学物質の特徴

本開示のアンチセンスオリゴマーは、様々なアンチセンスオリゴマー化学物質を用いることができる。オリゴマー化学物質の例としては、モルホリノオリゴマー、ホスホロチオエート修飾オリゴマー、2'-O-メチル修飾オリゴマー、ペプチド核酸(PNA)、ロックド核酸(LNA)、ホスホロチオエートオリゴマー、2'-O-MOE修飾オリゴマー、2'-フルオロ修飾オリゴマー、2'-O,4'-C-エチレン架橋核酸(ENA)、トリシクロ-DNA、トリシクロ-DNAホスホロチオエートサブユニット、2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]修飾オリゴマー(上記のいずれかの組み合わせを含む)が挙げられるが、これらに限定されない。ホスホロチオエートと2'-O-Me修飾化学物質を組み合わせ、2'-O-Me-ホスホロチオエート骨格を生成することができる。例えば、PCT公開第WO/2013/112053号および同第WO/2009/008725号(これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)を参照されたい。利用される化学物質によって許容される場合、配列番号:1~9のうちのいずれかにおける各Tは、ウラシルであり得る。利用される化学物質によって許容される場合、配列番号:1~9のうちのいずれかにおける関連する核酸塩基は、5-メチル基を含み得る。本開示のオリゴマー化学物質の例示的な実施形態が以下にさらに記載される。

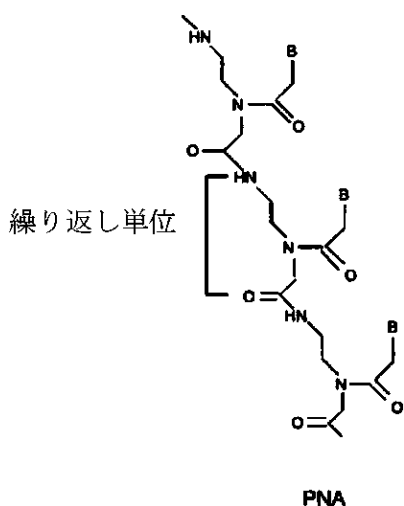
【0126】

1. ペプチド核酸(PNA)

ペプチド核酸(PNA)は、骨格がデオキシリボース骨格と構造的に同形であり、ピリミジンまたはプリン塩基が結合するN-(2-アミノエチル)グリシン単位からなる、DNAの類似体である。天然ピリミジンおよびプリン塩基を含有するPNAは、ワトソン-クリック塩基対合則に従い相補的なオリゴマーにハイブリダイズし、塩基対認識の点でDNAを模倣する。PNAの骨格は、ホスホジエステル結合というよりむしろペプチド結合によって形成され、アンチセンス用途によく適したものになる(以下の構造を参照)。骨格は非荷電性であり、通常を超える熱安定性を示すPNA/DNAまたはPNA/RNA二本鎖をもたらす。PNAは、ヌクレアーゼまたはプロテアーゼによって認識されない。

PNAの非限定的な例が以下に示される。

【化61】



10

【0127】

自然構造に対する根本的構造変化にもかかわらず、PNAは、DNAまたはRNAへのヘリックス形態での配列特異的結合が可能である。PNAの特徴には、相補的なDNAまたはRNAに対する高い結合親和性、単一塩基ミスマッチによって引き起こされる不安定化作用、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼに対する耐性、塩濃度に依存しないDNAまたはRNAとのハイブリダイゼーション、ならびにホモプリンDNAとの三重鎖形成が含まれる。PANAGENE（商標）は、その独自のBts PNAモノマー（Bts、ベンゾチアゾール-2-スルホニル基）および独自のオリゴマー化プロセスを開発してきた。Bts PNAモノマーを使用したPNAオリゴマー化は、脱保護、カップリング、およびキャッピングの反復サイクルから構成される。PNAは、当該技術分野において既知の任意の技術を使用して合成的に産生され得る。例えば、米国特許第6,969,766号、同第7,211,668号、同第7,022,851号、同第7,125,994号、同第7,145,006号、および同第7,179,896号を参照されたい。また、PNAの調製について、米国特許第5,539,082号、同第5,714,331号、および同第5,719,262号も参照されたい。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 254: 1497-1500, 1991に見ることができる。上記の各々は、参照によりその全体が組み込まれる。

20

30

【0128】

2. ロックド核酸 (LNA)

アンチセンスオリゴマーはまた、「ロックド核酸」サブユニット(LNA)を含有し得る。「LNA」は、架橋核酸(BNA)と呼ばれる修飾のクラスのメンバーである。BNAは、リボース環の立体構造をC3'-エンド(ノーザン)糖バッカーにロックする共有結合を特徴とする。LNAの場合、架橋は、2'-O位置と4'-C位置との間のメチレンから構成される。LNAは、骨格の事前組織化および塩基スタッキングを増強して、ハイブリダイゼーションおよび熱安定性を高める。

40

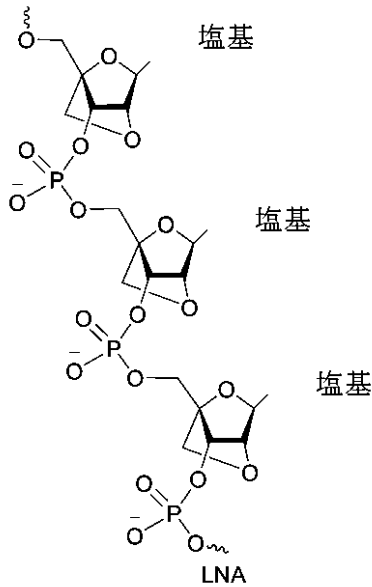
【0129】

LNAの構造は、例えば、Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455、Koshkin et al., Tetrahedron (1998) 54: 3607、Jesper Wengel, Accounts of Chem. Research (1999) 32: 301、Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38: 8735、Obika, et al., Tetrahedron Letters (1998) 39: 5401、およびObika, et al., Bioorganic Medicinal Chemi

50

stry (2008) 16:9230に見ることができ、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。LNAの非限定的な例が以下に示される。

【化62】



10

20

【0130】

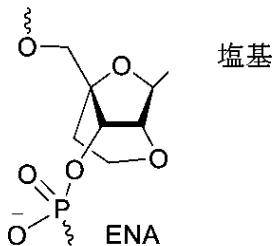
本開示のアンチセンスオリゴマーは、1つ以上のLNAを組み込み得る。場合によっては、アンチセンスオリゴマーは、LNAから完全に構成され得る。個々のLNAヌクレオシドサブユニットの合成およびそれらのオリゴマーへの組み込みのための方法は、例えば、米国特許 第7,572,582号、同第7,569,575号、同第7,084,125号、同第7,060,809号、同第7,053,207号、同第7,034,133号、同第6,794,499号、および同第6,670,461号に記載され、これらの各々は、参照によりその全体が組み込まれる。典型的なサブユニット間リンカーとしては、ホスホジエステル部分およびホスホロチオエート部分が挙げられる。あるいは、非リン含有リンカーが用いられ得る。さらなる実施形態は、LNA含有アンチセンスオリゴマーを含み、各LNAサブユニットは、DNAサブユニットによって分離される。ある特定のアンチセンスオリゴマーは、交互のLNAおよびDNAサブユニットから構成され、サブユニット間リンカーは、ホスホロチオエートである。

30

【0131】

2' O, 4' C - エチレン架橋核酸 (ENA) は、BNAのクラスの別のメンバーである。非限定的な例が以下に示される。

【化63】



40

【0132】

ENAオリゴマーおよびその調製は、Obika et al., Tetrahedron Lett (1997) 38(50):8735に記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本開示のアンチセンスオリゴマーは、1つ以上のENAサブユニットを組み込み得る。

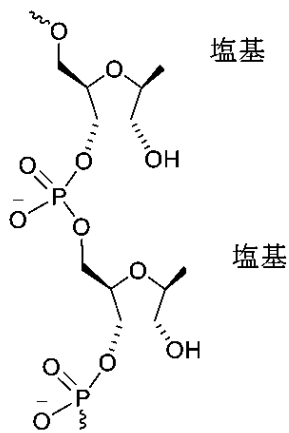
50

【 0 1 3 3 】

3 . アンロックド核酸 (U N A)

アンチセンスオリゴマーはまた、アンロックド核酸 (U N A) サブユニットを含有し得る。U N A および U N A オリゴマーは、サブユニットの C 2 ' - C 3 ' 結合が切断されている R N A の類似体である。L N A は、(D N A および R N A に対して) 立体構造的に制限されるが、U N A は、非常に柔軟である。U N A は、例えば、W O 2 0 1 6 / 0 7 0 1 6 6 に開示されている。U N A の非限定的な例が以下に示される。

【 化 6 4 】



10

20

【 0 1 3 4 】

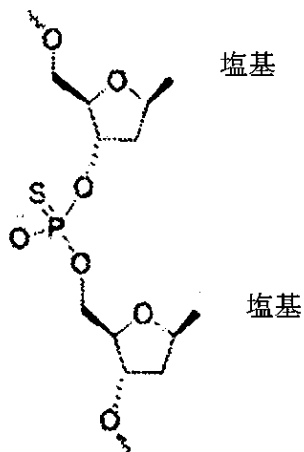
典型的なサブユニット間リンカーとしては、ホスホジエステル部分およびホスホロチオエート部分が挙げられる。あるいは、非リン含有リンカーが用いられ得る。

【 0 1 3 5 】

4 . ホスホロチオエート

「ホスホロチオエート」(または S - オリゴ)は、非架橋酸素のうちの 1 つが硫黄で置換されている正常な D N A のバリエーションである。ホスホロチオエートの非限定的な例が以下に示される。

【 化 6 5 】



40

【 0 1 3 6 】

ヌクレオチド間結合の硫化は、5 ' から 3 ' および 3 ' から 5 ' の D N A P O L 1 エキソヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ S 1 および P 1、R N a s e、血清ヌクレアーゼ、ならびにヘビ毒ホスホジエステラーゼを含む、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼの作用

50

を低減する。ホスホロチオエートは、ホスホン酸水素に対する二硫化炭素中の元素硫黄の溶液の作用、または亜リン酸トリエステルをテトラエチルチウラムジスルフィド (TETD) もしくは 3H-1,2-ベンソジチオール-3-オン1,1-ジオキシド (BDTD) のいずれかで硫化する方法、の2つの主要な経路によって作製される (例えば、Iyer et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990 (これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照)。後者の方法は、ほとんどの有機溶媒中の元素硫黄の不溶性、および二硫化炭素の毒性の問題を回避する。TETDおよびBDTD法はまた、より高い純度のホスホロチオエートをもたらす。

【0137】

5. トリシクロ-DNAおよびトリシクロ-ホスホロチオエートサブユニット

10

トリシクロ-DNA (tc-DNA) は、骨格の立体構造的柔軟性を制限し、かつねじれ角の骨格形状を最適化するために、各ヌクレオチドがシクロプロパン環の導入によって修飾されている、拘束されたDNA類似体のクラスである。ホモ塩基アデニンおよびチミン含有tc-DNAは、相補的RNAと非常に安定したA-T塩基対を形成する。トリシクロ-DNAおよびその合成は、国際特許出願公開第WO2010/115993号に記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本開示のアンチセンスオリゴマーは、1つ以上のトリシクロ-DNAサブユニットを組み込み得る。場合によっては、アンチセンスオリゴマーは、トリシクロ-DNAサブユニットから完全に構成され得る。

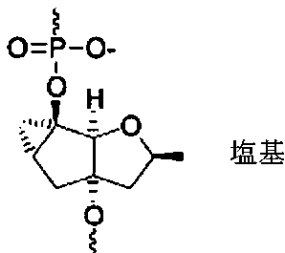
【0138】

20

トリシクロ-ホスホロチオエートサブユニットは、ホスホロチオエートサブユニット間連結を有するトリシクロ-DNAサブユニットである。トリシクロ-ホスホロチオエートサブユニットおよびその合成は、国際特許出願公開第WO2013/053928号に記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本開示のアンチセンスオリゴマーは、1つ以上のトリシクロ-DNAサブユニットを組み込み得る。場合によっては、アンチセンスオリゴマーは、トリシクロ-DNAサブユニットから完全に構成され得る。トリシクロ-DNA/トリシクロ-ホスホロチオエートサブユニットの非限定的な例が以下に示される。

【化66】

30



トリシクロ-DNA

【0139】

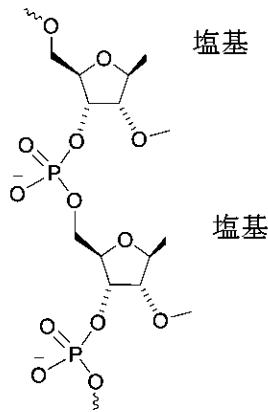
6. 2'-O-メチル、2'-O-MOE、および2'-Fオリゴマー

40

「2'-O-Meオリゴマー」分子は、リボース分子の2'-OH残基にメチル基を有する。2'-O-Me-RNAは、DNAと同じ (または類似の) 挙動を示すが、ヌクレアーゼ分解から保護される。2'-O-Me-RNAはまた、さらなる安定化のためにホスホロチオエートオリゴマー (PTO) と組み合わせることができる。2'-O-Meオリゴマー (ホスホジエステルまたはホスホロチオエート) は、当該技術分野の常用技術に従って合成することができる (例えば、Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32: 2008-16, 2004 (これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を参照)。2'-O-Meオリゴマーの非限定的な例が以下に示される。

50

【化 6 7】



2' O-Me

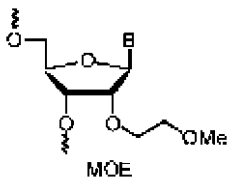
10

【0140】

2'-O-メトキシエチルオリゴマー(2'-O-MOE)は、リボース分子の2'-OH残基にメトキシエチル基を有し、Martin et al., Helv. Chim. Acta, 78, 486-504, 1995で考察されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2'-O-MOEサブユニットの非限定的な例が以下に示される。

20

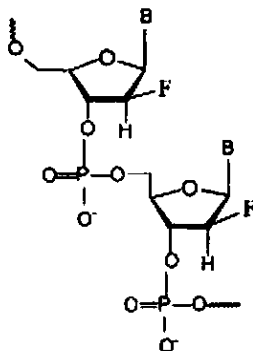
【化 6 8】



【0141】

2'-フルオロ(2'-F)オリゴマーは、2'-OHの代わりに2'位に蛍光ラジカルを有する。2'-Fオリゴマーの非限定的な例が以下に示される。

【化 6 9】



2'-F

40

【0142】

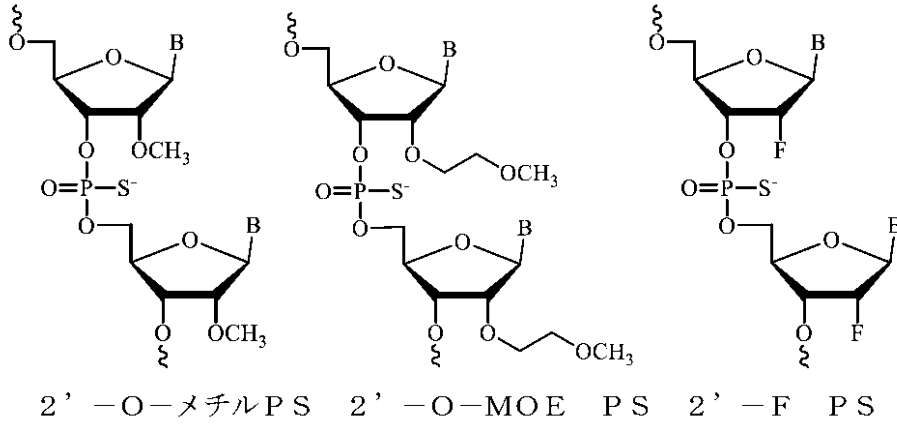
2'-フルオロオリゴマーは、WO2004/043977にさらに記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0143】

2'-O-メチル、2'-O-MOE、および2'-Fオリゴマーはまた、以下に示されるように、1つ以上のホスホロチオエート(PS)連結を含み得る。

50

【化70】

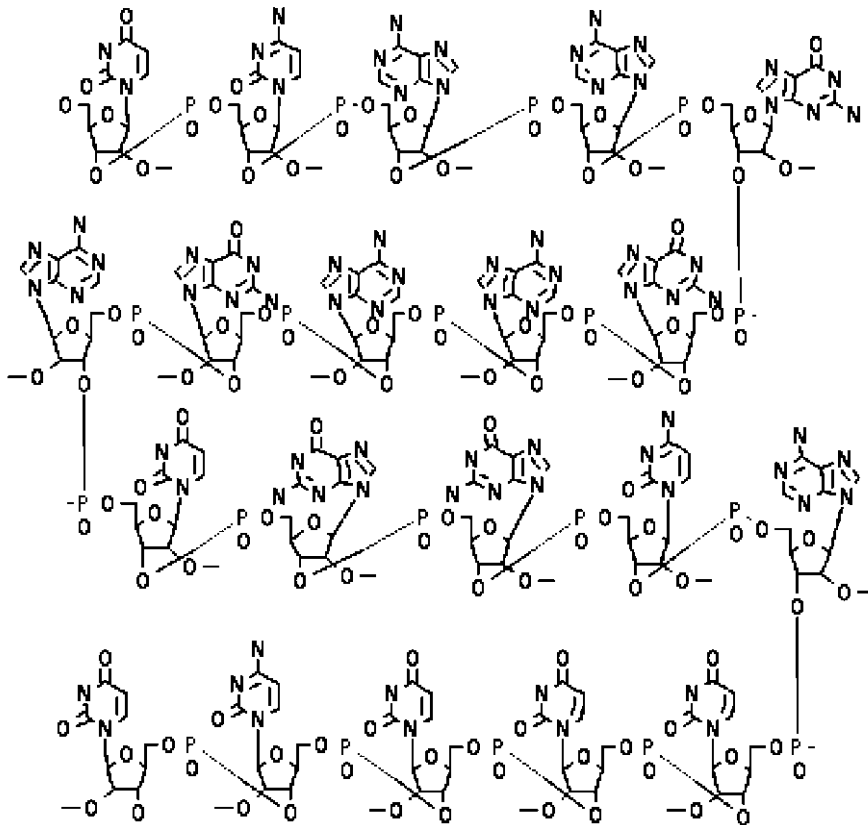


10

【0144】

さらに、2' - O - メチル、2' - O - MOE、および2' - Fオリゴマーは、例えば、以下に示される2' - O - メチルPSオリゴマードリサベルセンのように、オリゴマー全体にわたってPSサブユニット間連結を含み得る。

【化71】



20

30

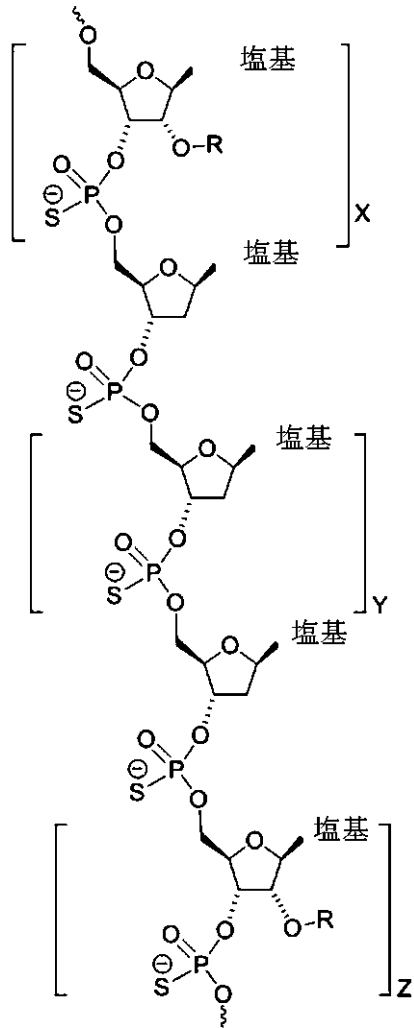
40

【0145】

あるいは、2' - O - メチル、2' - O - MOE、および/または2' - Fオリゴマーは、以下に示されるように、オリゴマーの末端にPS連結を含み得る。

50

【化 7 2】



10

20

30

【0146】

式中、

Rは、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ （メトキシエチルまたはMOE）であり、

X、Y、およびZは、それぞれ、指定された5'-ウィング、中央ギャップ、および3'-ウィングの各領域内に含有されるヌクレオチドの数を表す。

【0147】

本開示のアンチセンスオリゴマーは、1つ以上の2'-O-メチル、2'-O-MOE、および2'-Fサブユニットを組み込み得、本明細書に記載されるサブユニット間連結のいずれかを利用し得る。いくつかの事例において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、2'-O-メチル、2'-O-MOE、または2'-Fサブユニットから完全に構成され得る。本開示のアンチセンスオリゴマーの一実施形態は、2'-O-メチルサブユニットから完全になる。

40

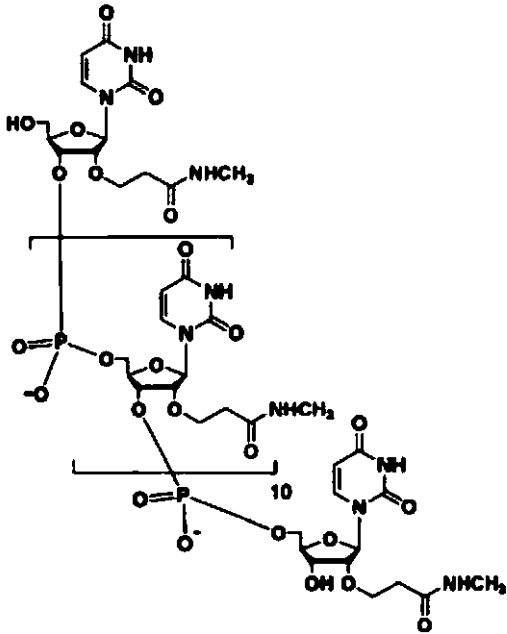
【0148】

7. 2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]オリゴマー(MCE)

MCEは、本開示のアンチセンスオリゴマーで有用な2'-O修飾リボヌクレオシドの別の例である。ここで、2'-OHは、ヌクレアーゼ耐性を高めるために2-(N-メチルカルバモイル)エチル部分へと誘導体化される。MCEオリゴマーの非限定的な例が以下に示される。

50

【化 7 3】



10

【0149】

MCEおよびその合成は、Yamada et al., J. Org. Chem. (2011) 76(9): 3042-53に記載され、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本開示のアンチセンスオリゴマーは、1つ以上のMCEサブユニットを組み込み得る。

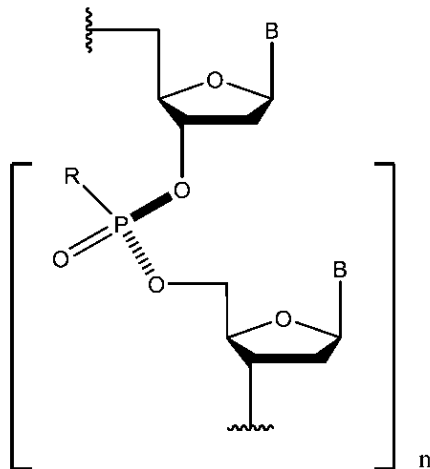
20

【0150】

8. 立体特異的オリゴマー

立体特異的オリゴマーは、各リン含有連結の立体化学が、実質的に立体的に純粋なオリゴマーが産生されるような合成方法によって固定されるものである。立体特異的オリゴマーの非限定的な例が以下に示される。

【化 7 4】



30

40

【0151】

上記の例において、オリゴマーの各リンは、同一の立体配置を有する。追加の例としては、本明細書に記載されるオリゴマーが挙げられる。例えば、LNA、ENA、トリシクロ-DNA、MCE、2'-O-メチル、2'-O-MOE、2'-F、およびモルホリノ系オリゴマーは、立体特異的リン含有ヌクレオシド間連結、例えば、ホスホロチオエート、ホスホジエステル、ホスホロアミダート、ホスホロジアミデート、または他のリン含有ヌ

50

クレオシド間連結などを用いて調製することができる。そのようなオリゴマーの調製で使用するための立体特異的オリゴマー、調製方法、キラル制御合成、キラル設計、およびキラル補助剤は、例えば、WO 2017/192664、WO 2017/192679、WO 2017/062862、WO 2017/015575、WO 2017/015555、WO 2015/107425、WO 2015/108048、WO 2015/108046、WO 2015/108047、WO 2012/039448、WO 2010/064146、WO 2011/034072、WO 2014/010250、WO 2014/012081、WO 2013/0127858、およびWO 2011/005761に詳述されており、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0152】

立体特異的オリゴマーは、R_pまたはS_p配置においてリン含有ヌクレオシド間連結を有し得る。連結の立体配置が制御されるキラルリン含有連結は、「立体純粋」と称され、連結の立体配置が制御されないキラルリン含有連結は、「立体不規則的」と称される。ある特定の実施形態において、本開示のオリゴマーは、複数の立体純粋および立体不規則的連結を含み、これにより得られるオリゴマーは、オリゴマーの予め指定された位置に立体純粋サブユニットを有する。立体純粋サブユニットの位置の例は、図7Aおよび図7Bの国際特許出願公開第WO 2017/062862(A2)号に提供される。一実施形態において、オリゴマー中の全てのキラルリン含有連結は、立体不規則的である。一実施形態において、オリゴマー中の全てのキラルリン含有連結は、立体純粋である。

【0153】

n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個全てのキラルリン含有連結は、立体不規則的である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個全てのキラルリン含有連結は、立体純粋である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個のリン含有連結のうち少なくとも10%(整数に四捨五入)は、立体純粋である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個のリン含有連結のうち少なくとも20%(整数に四捨五入)は、立体純粋である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個のリン含有連結のうち少なくとも30%(整数に四捨五入)は、立体純粋である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個のリン含有連結のうち少なくとも40%(整数に四捨五入)は、立体純粋である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個のリン含有連結のうち少なくとも50%(整数に四捨五入)は、立体純粋である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個のリン含有連結のうち少なくとも60%(整数に四捨五入)は、立体純粋である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個のリン含有連結のうち少なくとも70%(整数に四捨五入)は、立体純粋である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個のリン含有連結のうち少なくとも80%(整数に四捨五入)は、立体純粋である。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマー中のn個のリン含有連結のうち少なくとも90%(整数に四捨五入)は、立体純粋である。

【0154】

n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマーは、同じ立体配向(すなわち、S_pまたはR_pのいずれか)の少なくとも2個の連続的な立体純粋リン含有連結を含有する。n個(nは1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマーは、同

10

20

30

40

50

なくとも2個の連続的な立体純粋リン含有連結と、他の立体配向の少なくとも2個の連続的な立体純粋リン含有連結とを含有する。例えば、オリゴマーは、 S_P 配向の少なくとも2個の連続的な立体純粋リン含有連結のと、 R_P 配向の少なくとも2個の連続的な立体純粋リン含有連結とを含有し得る。

【0156】

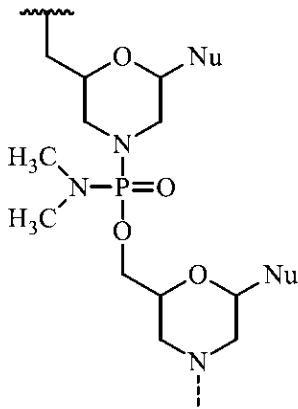
n 個 (n は1以上の整数である)のキラルリン含有連結を有するオリゴマーの一実施形態において、オリゴマーは、交互のパターンで同じ立体配向の少なくとも2個の連続的な立体純粋リン含有連結を含有する。例えば、オリゴマーは、順番に、以下：2個以上の R_P 、2個以上の S_P 、および2個以上の R_P 等を含有し得る。

【0157】

9. モルホリノオリゴマー

本開示の例示的な実施形態は、以下の一般構造：

【化75】

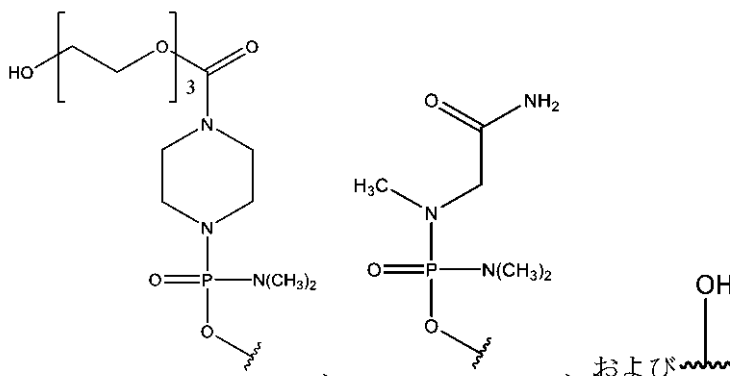


の、かつ Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7:187-195 (1997) の図2に記載されるような、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーに関する。本明細書に記載されるモルホリノは、上記の一般構造の全ての立体異性体および互変異性体を含むことが意図されている。モルホリノオリゴマーの合成、構造、および結合特性は、米国特許第5,698,685号、同第5,217,866号、同第5,142,047号、同第5,034,506号、同第5,166,315号、同第5,521,063号、同第5,506,337号、同第8,076,476号、および同第8,299,206号に詳述されており、これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる。

【0158】

ある特定の実施形態において、モルホリノは、オリゴマーの5'または3'末端で「テール」部分とコンジュゲートされて、その安定性および/または溶解性を高める。例示的なテールは、

【化76】



10

20

30

40

50

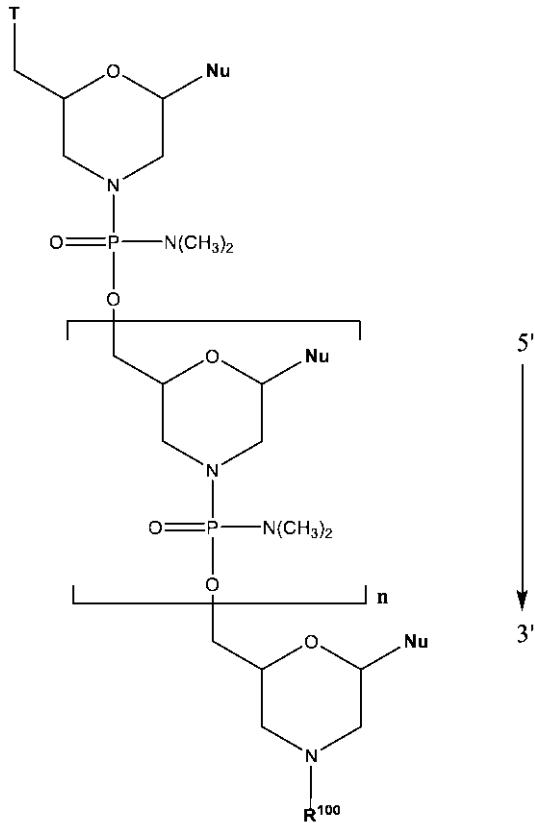
を含み、

「テール」部分の遠位 - OH または - NH₂ は、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0159】

様々な態様において、本開示は、式(I)に従うアンチセンスオリゴマー、

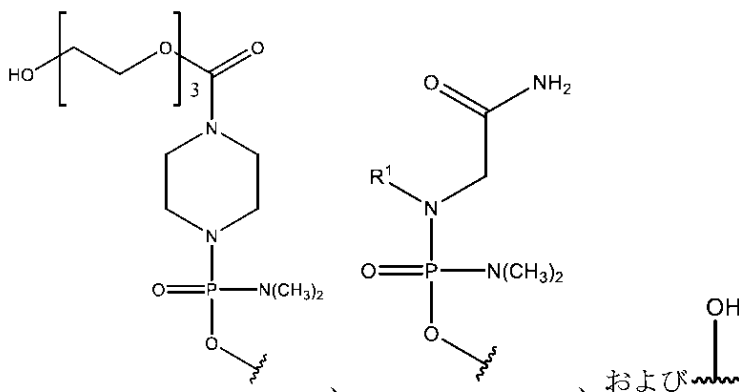
【化77】



(I)

またはその薬学的に許容される塩を提供し、式中、
各 Nu は、一緒になって標的化配列を形成する核酸塩基であり、
T は、

【化78】



から選択される部分であり、T部分の遠位 - OH または - NH₂ は、細胞膜透過性ペプチドに任意で連結され、

R¹⁰⁰ は、水素または細胞膜透過性ペプチドであり、

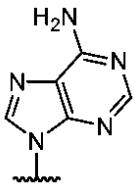
1 ~ n個の各Nuは、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、
【表16】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

10

式中、Aは、

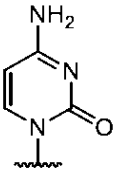
【化79】



20

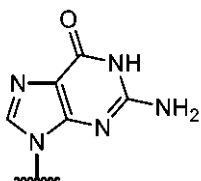
であり、Cは、

【化80】



であり、Gは、

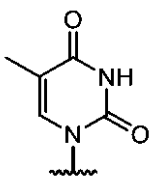
【化81】



30

であり、Tは、

【化82】



40

である。

【0160】

いくつかの実施形態において、1 ~ n個の各Nuは、5'から3'に、以下：配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、または配列番号9のうちの1つに対応する。いくつかの実施形態において、1 ~ n個の各Nuは

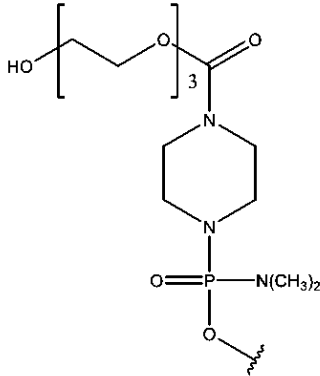
50

、5'から3'に、配列番号3に対応する。

【0161】

様々な実施形態において、Tは、

【化83】



10

であり、T部分の遠位-OHは、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0162】

様々な実施形態において、R¹⁰⁰は、水素である。様々な他の実施形態において、R¹⁰⁰は、細胞膜透過性ペプチドである。様々な実施形態において、R¹⁰⁰は、-R⁵（配列番号：21）である。様々な他の実施形態において、R¹⁰⁰は、-G-R⁵（配列番号：20）である。様々な実施形態において、R¹⁰⁰は、-R⁶（配列番号：10）である。様々な他の実施形態において、R¹⁰⁰は、-G-R⁶（配列番号：11）である。

20

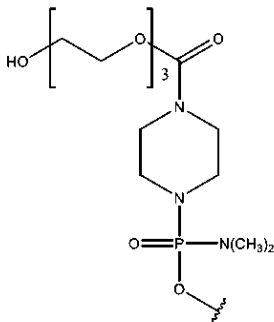
【0163】

いくつかの実施形態において、式(I)のアンチセンスオリゴマーは、遊離塩基形態である。いくつかの実施形態において、式(I)のアンチセンスオリゴマーは、その薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態において、式(I)のアンチセンスオリゴマーは、そのHCl（塩酸）塩である。ある特定の実施形態において、HCl塩は、1HCl、2HCl、3HCl、4HCl、5HCl、または6HCl塩である。ある特定の実施形態において、HCl塩は、6HCl塩である。

【0164】

様々な実施形態において、Tは、

【化84】



40

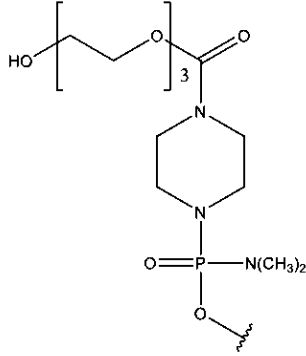
であり、T部分の遠位-OHは、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結され、R¹⁰⁰は、細胞膜透過ペプチドである。

【0165】

様々な実施形態において、Tは、

50

【化 8 5】



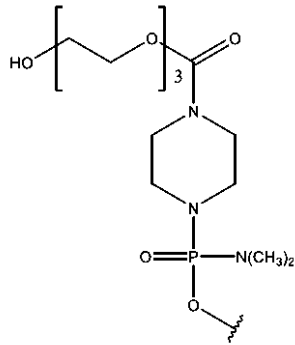
10

であり、 R^{100} は、細胞膜透過性ペプチドである。

【0166】

様々な実施形態において、Tは、

【化 8 6】



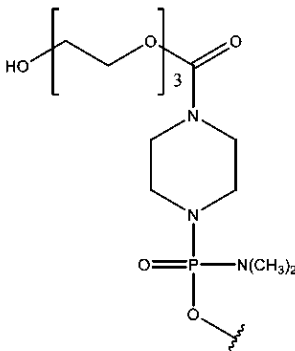
20

であり、 R^{100} は、 $-G-R^5$ (配列番号: 20) である。

【0167】

様々な実施形態において、Tは、

【化 8 7】



40

であり、 R^{100} は、 $-G-R^6$ (配列番号: 11) である。

【0168】

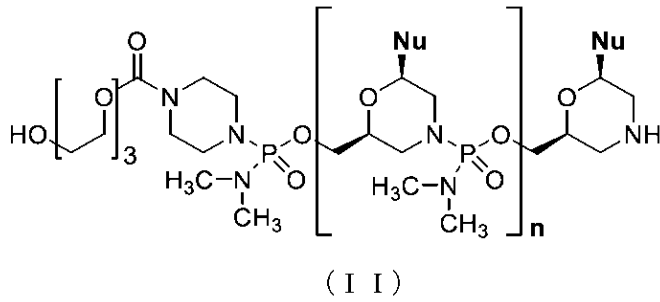
いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式 (II) に従うか、

50

【化 8 8】

[5]

[3']



10

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、1～n個の各Nuは、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、

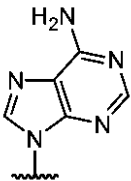
【表 1 7】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

20

式中、Aは、

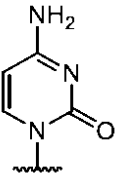
【化 8 9】



30

であり、Cは、

【化 9 0】

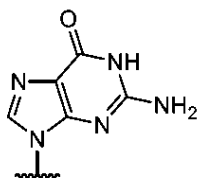


40

であり、Gは、

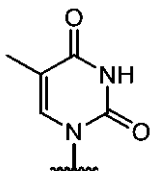
50

【化 9 1】



であり、Tは、

【化 9 2】



である。

【0169】

いくつかの実施形態において、式(II)の遠位-OHは、細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0170】

いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、以下：配列番号1、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、または配列番号9のうちの1つに対応する。いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

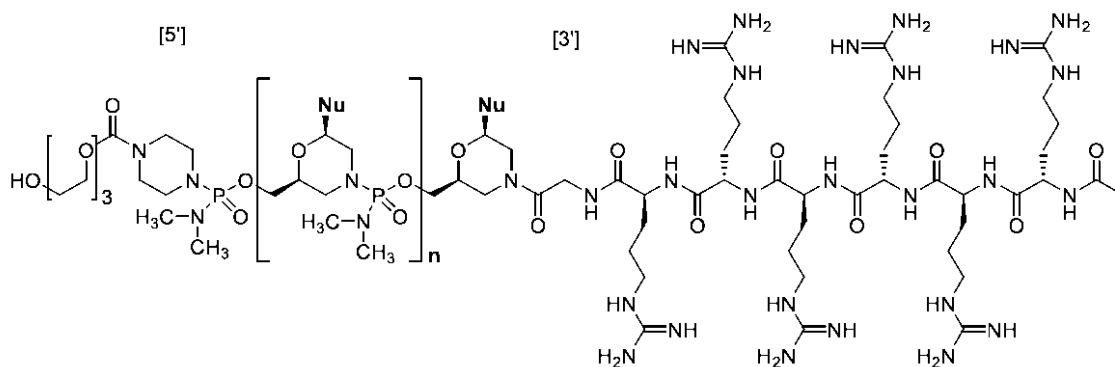
【0171】

いくつかの実施形態において、式(II)のアンチセンスオリゴマーは、遊離塩基形態である。いくつかの実施形態において、式(II)のアンチセンスオリゴマーは、その薬学的に許容される塩形態である。いくつかの実施形態において、式(II)のアンチセンスオリゴマーは、そのHCl(塩酸)塩である。ある特定の実施形態において、HCl塩は、1HCl、2HCl、3HCl、4HCl、5HCl、または6HCl塩である。ある特定の実施形態において、HCl塩は、6HCl塩である。

【0172】

いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(III)に従うか、

【化 9 3】



(III)

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、1~n個の各Nuは、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、

10

20

30

40

50

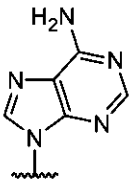
【表 18】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

10

式中、Aは、

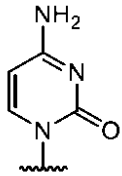
【化94】



20

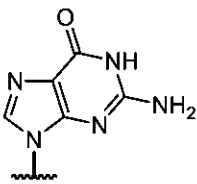
であり、Cは、

【化95】



であり、Gは、

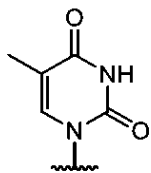
【化96】



30

であり、Tは、

【化97】



40

である。

【0173】

いくつかの実施形態において、式(III)の遠位-OHは、細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0174】

いくつかの実施形態において、式(III)の遠位-OHは、任意に細胞膜透過性ペプ

50

チドに連結される。

【 0 1 7 5 】

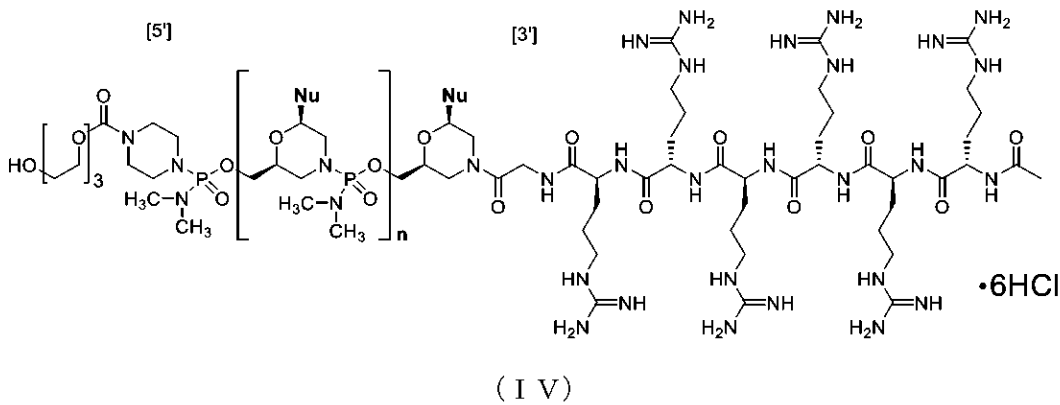
いくつかの実施形態において、1～n個の各Nuは、5'から3'に、以下：配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、または配列番号9のうちの1つに対応する。いくつかの実施形態において、1～n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

【 0 1 7 6 】

いくつかの実施形態において、式(III)のアンチセンスオリゴマーは、遊離塩基形態である。いくつかの実施形態において、式(III)のアンチセンスオリゴマーは、その薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態において、式(III)のアンチセンスオリゴマーは、そのHCl(塩酸)塩である。ある特定の実施形態において、HCl塩は、6HCl塩である。

【 0 1 7 7 】

いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(IV)に従い、【化98】

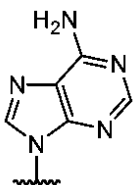


式中、1～n個の各Nuは、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、【表19】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

式中、Aは、

【化99】



であり、Cは、

10

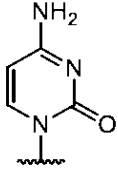
20

30

40

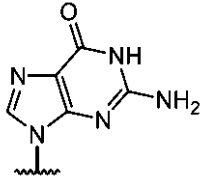
50

【化100】



であり、Gは、

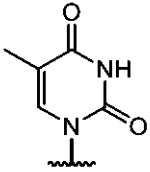
【化101】



10

であり、Tは、

【化102】



20

である。

【0178】

いくつかの実施形態において、式(IV)の遠位-OHは、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0179】

いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、以下：配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、または配列番号9のうちの一つに対応する。いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

30

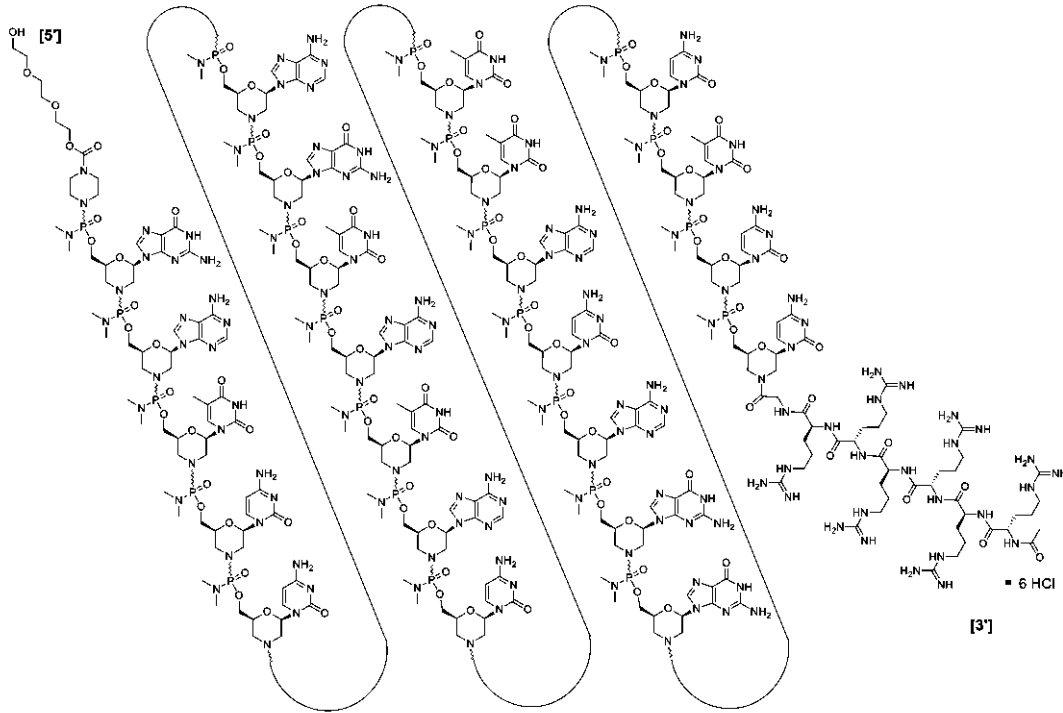
【0180】

例えば、式(IV)のいくつかの実施形態を含む、いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(IVa)に従う。

40

50

【化103】



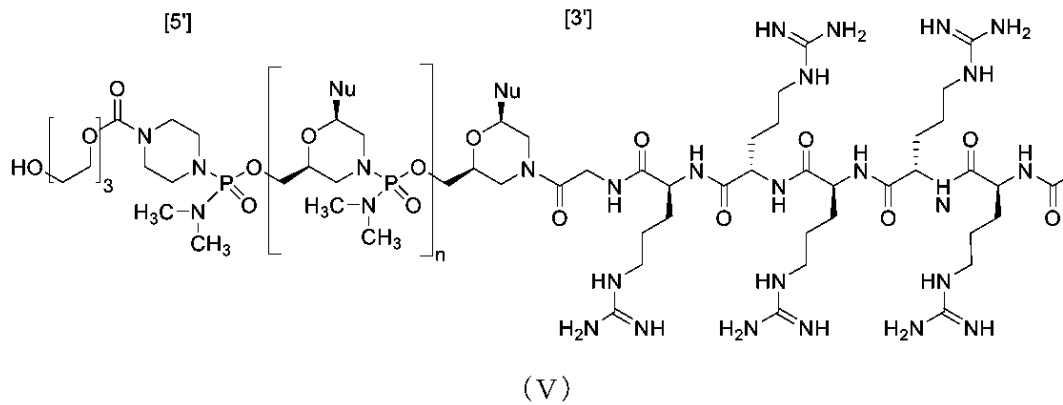
10

20

【0181】

いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(V)に従うか、

【化104】



30

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、1 ~ n個の各Nuは、5'から3'に、以下のうちの1つにおける核酸塩基に対応し、

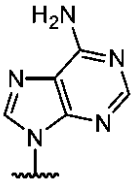
【表20】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

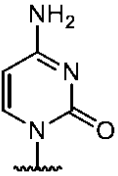
40

50

式中、Aは、
【化105】

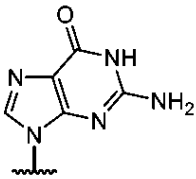


であり、Cは、
【化106】



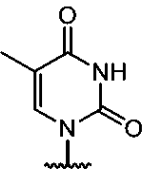
10

であり、Gは、
【化107】



20

であり、Tは、
【化108】



30

である。
【0182】

いくつかの実施形態において、式(IV)の遠位-OHは、細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0183】

いくつかの実施形態において、式(V)の遠位-OHは、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0184】

いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、以下：配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、または配列番号9のうちの一つに対応する。いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

40

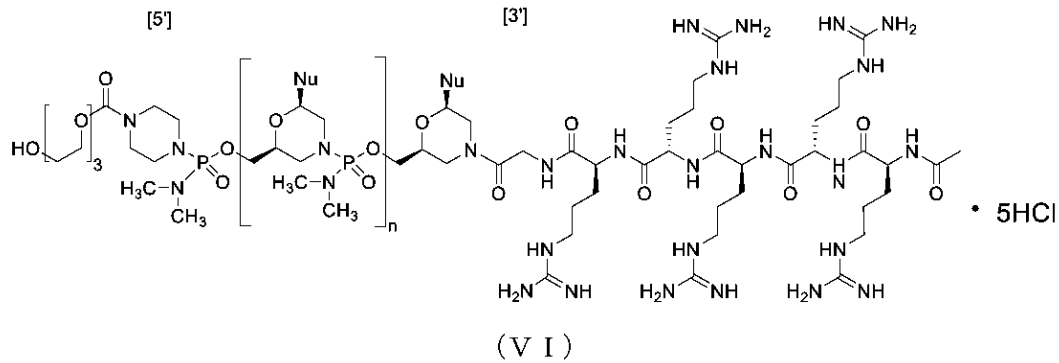
【0185】

いくつかの実施形態において、式(V)のアンチセンスオリゴマーは、遊離塩基形態である。いくつかの実施形態において、式(V)のアンチセンスオリゴマーは、その薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態において、式(V)のアンチセンスオリゴマーは、そのHCl(塩酸)塩である。ある特定の実施形態において、HCl塩は、5HCl塩である。

50

【 0 1 8 6 】

いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式 (V I) に従い、
【 化 1 0 9 】



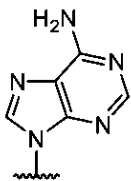
10

式中、1 ~ n 個の各 Nu は、5' から 3' に、以下のうちの 1 つにおける核酸塩基に対応し、
【 表 2 1 】

| アニーリング部位 | 標的化配列[5'から3'] | 配列番号: |
|--------------|-------------------------------------|--------|
| H50D(+04-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 配列番号:1 |
| H50D(+07-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:2 |
| H50D(+07-16) | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 配列番号:3 |
| H50D(+07-17) | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:4 |
| H50A(-19+07) | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 配列番号:5 |
| H50D(+07-15) | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 配列番号:6 |
| H50A(-02+23) | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 配列番号:7 |
| H50D(+06-18) | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 配列番号:8 |
| H50D(+07-20) | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 配列番号:9 |

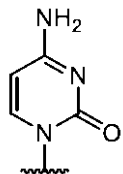
20

式中、A は、
【 化 1 1 0 】



30

であり、C は、
【 化 1 1 1 】

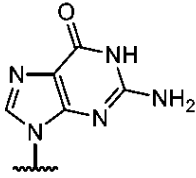


40

であり、G は、

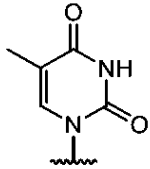
50

【化 1 1 2】



であり、Tは、

【化 1 1 3】



である。

【0 1 8 7】

いくつかの実施形態において、式(VI)の遠位-OHは、任意に細胞膜透過性ペプチドに連結される。

【0 1 8 8】

いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、以下：配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、または配列番号9のうちの一つに対応する。いくつかの実施形態において、1~n個の各Nuは、5'から3'に、配列番号3に対応する。

【0 1 8 9】

10. 核酸塩基修飾および置換

ある特定の実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、RNA核酸塩基およびDNA核酸塩基(多くの場合、当該技術分野では単に「塩基」と称される)から構成される。RNA塩基は、アデニン(A)、ウラシル(U)、シトシン(C)、およびグアニン(G)として一般的に既知である。DNA塩基は、アデニン(A)、チミン(T)、シトシン(C)、およびグアニン(G)として一般的に既知である。様々な実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)、アデニン(A)、5-メチルシトシン(5mC)、ウラシル(U)、およびヒポキサンチン(I)から構成される。

【0 1 9 0】

ある特定の実施形態において、オリゴマー中の1つ以上のRNA塩基またはDNA塩基は、RNA塩基またはDNA塩基以外の塩基で修飾または置換され得る。修飾または置換塩基を含有するオリゴマーは、核酸中で最も一般的に見られる1つ以上のプリンまたはピリミジン塩基が、それほど一般的ではないが、または非天然の塩基で置換されたオリゴマーを含む。

【0 1 9 1】

プリン塩基は、以下の一般式によって記載されるように、イミダゾール環に融合したピリミジン環を含む。

10

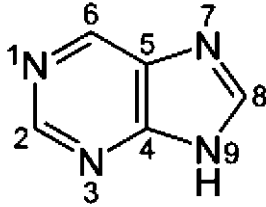
20

30

40

50

【化 1 1 4】



プリン

10

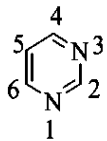
【0 1 9 2】

アデニンおよびグアニンは、核酸中で最も一般的に見られる2つのプリン核酸塩基である。他の自然発生的プリンとしては、 N^6 -メチルアデニン、 N^2 -メチルグアニン、ヒポキサンチン、および7-メチルグアニンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0 1 9 3】

ピリミジン塩基は、以下の一般式によって記載されるように、6員ピリミジン環を含む。

【化 1 1 5】



ピリミジンコア

20

【0 1 9 4】

シトシン、ウラシル、およびチミンは、核酸中で最も一般的に見られるピリミジン塩基である。他の自然発生的ピリミジンとしては、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、偽ウラシル、および4-チオウラシルが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、本明細書に記載されるオリゴマーは、ウラシルの代わりにチミン塩基を含有する。

【0 1 9 5】

他の好適な塩基としては、2, 6-ジアミノプリン、オロチン酸、アグマチジン、リジン、2-チオピリミジン（例えば、2-チオウラシル、2-チオチミン）、G-クランプおよびその誘導体、5-置換ピリミジン（例えば、5-ハロウラシル、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、5-アミノメチルウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、5-アミノメチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、スーパー-T）、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、7-アザ-2, 6-ジアミノプリン、8-アザ-7-デアザグアニン、8-アザ-7-デアザアデニン、8-アザ-7-デアザ-2, 6-ジアミノプリン、スーパー-G、スーパー-A、および N^4 -エチルシトシン、またはそれらの誘導体； N^2 -シクロペンチルグアニン（cPent-G）、 N^2 -シクロペンチル-2-アミノプリン（cPent-AP）、および N^2 -プロピル-2-アミノプリン（Pr-AP）、偽ウラシル、またはそれらの誘導体；ならびに2, 6-ジフルオロトルエンのような縮重塩基もしくはユニバーサル塩基、または脱塩基部位のような非存在塩基（例えば、1-デオキシリボース、1, 2-ジデオキシリボース、1-デオキシ-2-O-メチルリボース；または環酸素が窒素で置換されているピロリジン誘導体（アザリボース））が挙げられるが、これらに限定されない。スーパー-A、スーパー-G、およびスーパー-Tの誘導体の例は、米国特許第6, 683, 173号（Epoch Biosciences）に見ることができ、これは、参照により完全に本明細書に組み込まれる。cPent-G、cPent-AP、およびPr-APは、siRNAに組み込まれた場合、免疫賦活作用を低減することが示された（Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200）。偽ウラシルは、ウラシルの自然発生的異

30

40

50

性化バージョンであり、ウリジンにおける通常のN-グリコシドというよりむしろC-グリコシドによる。偽ウリジン含有合成mRNAは、ウリジン含有mPvNAと比較して、改善された安全性プロファイルを有し得る(WO2009/127230、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0196】

ある特定の核酸塩基は、本開示のアンチセンスオリゴマーの結合親和性を高めるために特に有用である。これらには、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6、およびO-6置換プリン(2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、および5-プロピニルシトシンを含む)が含まれる。5-メチルシトシン置換は、核酸二本鎖の安定性を0.6~1.2増加させることが示されており、さらに具体的には、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合に、現在より好ましい塩基置換である。追加の例示的な修飾核酸塩基には、核酸塩基の少なくとも1つの水素原子がフッ素で置換されているものが含まれる。

10

【0197】

11. アンチセンスオリゴマーの薬学的に許容される塩

本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーのある特定の実施形態は、アミノまたはアルキルアミノなどの塩基性官能基を含有し得、ひいては薬学的に許容される酸と薬学的に許容される塩を形成することができる。この点における「薬学的に許容される塩」という用語は、本開示のアンチセンスオリゴマーの比較的非毒性の無機酸および有機酸付加塩を指す。これらの塩は、投与ビヒクルまたは剤形製造プロセスにおいて原位置で調製される得か、または本開示の精製されたアンチセンスオリゴマーを、その遊離塩基形態で、好適な有機酸もしくは無機酸と別々に反応させ、その後の精製中にそのようにして形成された塩を単離することによって調製され得る。代表的な塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩などが挙げられる。(例えば、Berge et al. (1977)「Pharmaceutical Salts」, J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照)。

20

【0198】

主題のアンチセンスオリゴマーの薬学的に許容される塩は、例えば、非毒性の有機酸または無機酸からの、アンチセンスオリゴマーの従来的な非毒性塩または第四級アンモニウム塩を含む。例えば、そのような従来的な非毒性塩としては、無機酸に由来するもの、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸など;ならびに有機酸から調製された塩、例えば、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パルミチン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸(salicylic)、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンサルホン酸、メタンサルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イソチオン酸(isothionic)などが挙げられる。

30

40

【0199】

ある特定の実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、1つ以上の酸性官能基を含有し得、ひいては薬学的に許容される塩基と薬学的に許容される塩を形成することができる。これらの事例において、「薬学的に許容される塩」という用語は、本開示のアンチセンスオリゴマーの比較的非毒性の無機塩基および有機塩基付加塩を指す。これらの塩は同様に、投与ビヒクルまたは剤形製造プロセスにおいて原位置で調製され得るか、または精製されたアンチセンスオリゴマーを、その遊離酸形態で、好適な塩基、例えば、薬学的に許容される金属カチオンの水酸化物、炭酸塩、もしくは重炭酸塩と、アンモニアと、または薬学的に許容される有機第一級アミン、第二級アミン、もしくは第三級アミンと別々に反応させることによって調製され得る。代表的なアルカリまたはアルカリ土類塩

50

としては、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、およびアルミニウム塩などが挙げられる。塩基付加塩の形成に有用な代表的な有機アミンとしては、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどが挙げられる。(例えば、上記の *Berge et al* を参照)。

【0200】

III. 製剤および投与様式

ある特定の実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーの治療送達に好適な製剤または医薬組成物を提供する。したがって、ある特定の実施形態において、本開示は、1つ以上の薬学的に許容される担体(添加剤)および/または希釈剤と共に製剤化した、治療有効量の本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーのうち1つ以上を含む、薬学的に許容される組成物を提供する。本開示のアンチセンスオリゴマーを単独で投与することは可能であるが、アンチセンスオリゴマーを医薬製剤(組成物)として投与することが好ましい。一実施形態において、製剤のアンチセンスオリゴマーは、式(III)に従うか、またはその薬学的に許容される塩である。

10

【0201】

本開示のアンチセンスオリゴマーに適用可能であり得る核酸分子の送達のための方法は、例えば、*Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, CRC Press*、および *Sullivan et al., PCT WO94/02595* に記載されている。これらおよび他のプロトコルは、本開示のアンチセンスオリゴマーを含む、実質的に任意の核酸分子の送達に利用され得る。

20

【0202】

本開示の医薬組成物は、固体または液体形態での投与のために特別に製剤化され得、以下:(1)経口投与、例えば、浸漬液(水性または非水性の溶液または懸濁液)、錠剤(口腔、舌下、または全身吸収)、ボラス、散剤、顆粒剤、舌に適用するためのペースト、(2)例えば、滅菌溶液もしくは懸濁液または徐放性製剤としての、例えば、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射、または硬膜外注射による非経口投与、(3)例えば、皮膚に適用するためのクリーム、軟膏、または制御放出性パッチもしくは噴霧剤としての局所適用、(4)例えば、ペッサリー、クリーム、もしくは発泡体としての腔内投与または直腸内投与、(5)舌下投与、(6)眼内投与、(7)経皮投与、あるいは(8)経鼻投与に適合されたものを含む。

30

【0203】

薬学的に許容される担体として役立つ材料のいくつかの例としては、(1)糖類、例えば、ラクトース、グルコース、およびスクロース、(2)デンプン、例えば、トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン、(3)セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロース、(4)粉末トラガカント、(5)麦芽、(6)ゼラチン、(7)タルク、(8)賦形剤、例えば、ココアバターおよび坐剤ワックス、(9)油、例えば、ピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、および大豆油、(10)グリコール、例えば、プロピレングリコール、(11)ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール、(12)エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル、(13)寒天、(14)緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム、(15)アルギニン酸、(16)発熱性物質除去蒸留水、(17)等張生理食塩水、(18)リンゲル液、(19)エチルアルコール、(20)pH緩衝液、(21)ポリエステル、ポリカーボネート、および/またはポリ無水物、ならびに(22)医薬製剤に用いられる他の非毒性適合性物質が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0204】

本開示のアンチセンスオリゴマーを用いた製剤に好適な薬剤の追加の非限定的な例とし

50

では、PEGコンジュゲート核酸；リン脂質コンジュゲート核酸；親油性部分を含有する核酸；ホスホロチオエート；様々な組織への薬物の侵入を増強することができるP糖タンパク質阻害剤（Pluronic P85など）；生分解性ポリマー、例えば、埋め込み後の徐放性送達のためのポリ（D，L-ラクチド-コグリコリド）ミクロスフェア（Emrich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58）Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.；および負荷ナノ粒子、例えば、血液脳関門にわたって薬物を送達することができ、神経取込み機構を変化させることができる、ポリブチルシアノアクリレートからなるもの（Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999）が挙げられる。

10

【0205】

本開示はまた、ポリ（エチレングリコール）（「PEG」）脂質（PEG修飾、分岐、および非分岐、もしくはそれらの組み合わせ、または長期循環型リポソームもしくはステルスリポソーム）を含有する、表面修飾リポソームを含む組成物の使用を特徴とする。本開示のオリゴマーコンジュゲートはまた、様々な分子量の共有結合PEG分子も含むことができる。これらの製剤は、標的組織における薬物の蓄積を増加させるための方法を提供する。このクラスの薬物担体は、単核細胞貪食系（MPSまたはRES）によるオプソニン化および排除に抵抗し、それにより、封入薬物の血液循環時間の延長および組織曝露の増強を可能にする（Lasica et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627, Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011）。そのようなリポソームは、おそらく溢血および血管新生標的組織における捕捉によって、腫瘍に選択的に蓄積することが示されている（Lasica et al., Science 1995, 267, 1275-1276, Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90）。長期循環型リポソームは、特にMPSの組織に蓄積することが知られている従来のカチオン性リポソームと比較して、DNAおよびRNAの薬物動態および薬力学を増強する（Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870, Choi et al., 国際PCT公開第WO96/10391号、Ansell et al., 国際PCT公開第WO96/10390号、Holland et al., 国際PCT公開第WO96/10392号）。また、長期循環型リポソームは、肝臓や脾臓などの代謝的に攻撃的なMPS組織において蓄積を回避するそれらの能力に基づいて、カチオン性リポソームと比較して、より大きい程度まで薬物をヌクレアーゼ分解から保護する可能性が高い。

20

30

【0206】

さらなる実施形態において、本開示は、米国特許 第6,692,911号、同第7,163,695号、および同第7,070,807号に記載されるような、送達のために調製されたアンチセンスオリゴマー医薬組成物を含む。この点に関して、一実施形態において、本開示は、単独で、あるいはPEG（例えば、分岐もしくは非分岐PEG、または両方の混合物）と組み合わせ、PEGおよび標的化部分と組み合わせ、あるいは架橋剤と組み合わせた上記のいずれかの、リシンおよびヒスチジン（HK）のコポリマーを含む組成物中の本開示のアンチセンスオリゴマー（米国特許第7,163,695号、同第7,070,807号、および6,692,911号に記載）を提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、グルコン酸修飾ポリヒスチジンまたはグルコニル化ポリヒスチジン/トランスフェリン-ポリリシンを含む医薬組成物中のアンチセンスオリゴマーを提供する。当業者であれば、HisおよびLysに類似した特性を有するアミノ酸が組成物内で置換され得ることも認識するであろう。

40

【0207】

湿潤剤、乳化剤、および潤滑剤（ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなど）、着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、芳香剤、防腐剤、ならびに酸化防止剤も組成物中に存在し得る。

50

【0208】

薬学的に許容される酸化防止剤の例としては、(1)水溶性酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど、(2)油溶性酸化防止剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロールなど、および(3)金属キレート剤、例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などが挙げられる。

【0209】

本開示の製剤としては、経口、経鼻、局所(口腔および舌下を含む)、直腸、膣、および/または非経口投与に好適な製剤が挙げられる。製剤は、便利に単位剤形で提示され得、薬学の技術分野で周知の任意の方法によって調製され得る。単一剤形を生成するために担体材料と組み合わせられ得る有効成分の量は、治療される対象および特定の投与様式に応じて異なる。単一剤形を生成するために担体材料と組み合わせられ得る有効成分の量は、概して、治療効果をもたらす活性成分の量である。概して、この量は、有効成分の約0.1パーセント~約99パーセント、好ましくは約5パーセント~約70パーセント、最も好ましくは約10パーセント~約30パーセントの範囲である。

10

【0210】

ある特定の実施形態において、本開示の製剤は、シクロデキストリン、セルロース、リポソーム、ミセル形成剤、例えば、胆汁酸、およびポリマー担体、例えば、ポリエステルおよびポリ無水物から選択される賦形剤と、本開示のアンチセンスオリゴマーと、を含む。一実施形態において、製剤のアンチセンスオリゴマーは、式(IV)に従う。一実施形態において、製剤のアンチセンスオリゴマーは、式(IVa)に従う。ある特定の実施形態において、上記の製剤は、本開示のアンチセンスオリゴマーを経口的にバイオアベイラビリティにする。

20

【0211】

これらの製剤または医薬組成物を調製する方法は、本開示のアンチセンスオリゴマーを、担体、および任意に1つ以上の副成分と会合させるステップを含む。概して、製剤は、本開示のアンチセンスオリゴマーを、液体担体、もしくは微粉化固体担体、またはその両方と均一かつ密接に会合させ、次いで、必要に応じて生成物を成形することによって調製される。

30

【0212】

経口投与に好適な本開示の製剤は、カプセル、カシェ、丸剤、錠剤、トローチ(風味付けした基剤、通常はスクロースおよびアカシアもしくはトラガカントを使用)、散剤、顆粒剤、または水性もしくは非水性液体の溶液もしくは懸濁液として、または水中油もしくは油中水の液体エマルションとして、またはエリキシル剤もしくはシロップとして、または香錠(不活性塩基、例えば、ゼラチンおよびグリセリン、もしくはスクロースおよびアカシアを使用)として、および/または口内洗浄液として、などの形態であり得、各々が、有効成分として、所定量の本開示のアンチセンスオリゴマーを含有する。本開示のアンチセンスオリゴマーはまた、ポーラス、舐剤、またはペーストとして投与され得る。

40

【0213】

経口投与のための本開示の固形剤形(カプセル、錠剤、丸剤、糖剤、散剤、顆粒剤、トローチなど)において、有効成分は、1つ以上の薬学的に許容される担体、例えば、クエン酸ナトリウムもしくはリン酸二カルシウム、および/または以下:(1)充填剤または増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および/またはケイ酸、(2)結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、および/またはアカシア、(3)保湿剤、例えば、グリセロール、(4)崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム、(5)溶解遅延剤、例えば、パラフィン、(6)吸収促進剤、例えば、第四級アンモニウム化合

50

物および界面活性剤、例えば、ポロキサマーおよびラウリル硫酸ナトリウム、(7) 湿潤剤、例えば、セチルアルコール、モノステアリン酸グリセロール、および非イオン性界面活性剤、(8) 吸収剤、例えば、カオリンおよびベントナイト粘土、(9) 潤滑剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸、およびそれらの混合物、(10) 着色剤、ならびに(11) 放出制御剤、例えば、クロスビドンまたはエチルセルロースのうちのいずれかと混合され得る。カプセル、錠剤、および丸剤の場合、医薬組成物はまた、緩衝剤を含み得る。類似の種類の実体医薬組成物はまた、ラクトースまたは乳糖、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどの賦形剤を使用した、軟質および硬質シエルのゼラチンカプセル中の充填剤としても用いられ得る。

10

【0214】

錠剤は、任意に1つ以上の副成分との圧縮または成型によって作製され得る。圧縮錠剤は、結合剤(例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース)、潤滑剤、不活性希釈剤、防腐剤、崩壊剤(例えば、デンプングリコール酸ナトリウムまたは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム)、界面活性剤または分散剤を使用して調製され得る。成型錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を好適な機械で成型することによって作製され得る。

【0215】

本開示の医薬組成物の錠剤および他の実体剤形、例えば、糖剤、カプセル、丸剤、および顆粒は、任意に、コーティングおよびシエル、例えば、腸溶性コーティング、および医薬品製剤技術で周知の他のコーティングを用いて獲得または調製され得る。また、それらは、所望の放出プロファイル、他のポリマーマトリックス、リボソームおよび/またはミクロスフェアを提供するために、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを様々な割合で使用して、その中の有効成分の徐放または制御放出を提供するように製剤化され得る。それらは、例えば、凍結乾燥など、迅速放出のために製剤化され得る。それらは、例えば、細菌保持フィルタを通した濾過によって、または使用直前に滅菌水中もしくはいくつかの他の滅菌注射用培地中に溶解され得る滅菌実体医薬組成物の形態の滅菌剤を組み込むことによって滅菌され得る。これらの医薬組成物はまた、任意に不透明化剤を含有し得る、消化管のある特定の部分においてのみ、または消化管のある特定の部分において優先的に、任意に遅延した様式で、有効成分(複数可)を放出する組成物であり得る。使用され得る埋め込み組成物の例としては、ポリマー物質およびワックスが挙げられる。有効成分はまた、適切な場合、上記の賦形剤のうちの1つ以上を有するマイクロカプセルの形態でもあり得る。

20

30

【0216】

本開示のアンチセンスオリゴマーの経口投与のための液体剤形としては、薬学的に許容されるエマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシル剤が挙げられる。有効成分に加えて、液体剤形は、例えば、水または他の溶媒、可溶性剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油(特に、綿実油、落花生油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油)、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ソルビタンのポリエチレングリコールおよび脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物など、当該技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤を含有し得る。

40

【0217】

不活性希釈剤に加えて、経口医薬組成物はまた、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、甘味剤、香味剤、着色剤、芳香剤、ならびに防腐剤などのアジュバントも含むことができる。

【0218】

活性化化合物に加えて、懸濁液は、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化

50

アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガカント、ならびにそれらの混合物などの懸濁剤を含有し得る。

【0219】

直腸投与または腔投与のための製剤は、坐剤として提示され得、これは、本開示の1つ以上の化合物を、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤ワックス、またはサリチル酸塩を含む1つ以上の好適な非刺激性賦形剤または担体と混合することによって調製され得、これは室温では固体であるが、体温では液体であり、したがって、直腸または腔で溶解し、活性化化合物を放出する。

【0220】

本明細書に提供されるオリゴマーの局所投与または経皮投与のための製剤または剤形としては、粉末、噴霧剤、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ、および吸入剤が挙げられる。活性オリゴマーコンジュゲートは、滅菌条件下で、薬学的に許容される担体と、および必要とされ得る任意の防腐剤、緩衝剤、または噴射剤と混合され得る。軟膏、ペースト、クリーム、およびゲルは、本開示の活性化化合物に加えて、動物性および植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカンス、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、タルク、および酸化亜鉛、またはそれらの混合物などの賦形剤を含有し得る。

10

【0221】

散剤および噴霧剤は、本開示のアンチセンスオリゴマーに加えて、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などの賦形剤を含有することができる。噴霧剤はさらに、クロロフルオロ炭化水素などの通例の噴射剤、ならびにブタンおよびプロパンなどの揮発性非置換炭化水素を含有することができる。

20

【0222】

経皮パッチは、本開示のアンチセンスオリゴマーの体内への制御送達を提供するというさらなる利点を有する。そのような剤形は、オリゴマーを適切な培地中に溶解するか、または培地中に分散させることによって作製され得る。吸収促進剤もまた、皮膚にわたる薬剤の流れを増加させるために使用され得る。そのような流れの速度は、当該技術分野で公知の方法の中でも特に、速度制御膜を提供すること、またはポリマーマトリックスもしくはゲル中に薬剤を分散させることのいずれかによって制御され得る。

30

【0223】

非経口投与に好適な医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容される滅菌等張水溶液もしくは非水溶液、分散液、懸濁液もしくはエマルション、または使用直前に滅菌注射用溶液もしくは分散液に再構成され得る滅菌粉末と組み合わせて、本開示の1つ以上のオリゴマーコンジュゲートを含み得、これらは、糖、アルコール、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、製剤を意図されたレシピエントの血液と等張にする溶質、または懸濁剤もしくは増粘剤を含有し得る。本開示の医薬組成物で用いられ得る好適な水性および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの好適な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合に必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。一実施形態において、医薬組成物のアンチセンスオリゴマーは、式(IV)に従う。一実施形態において、医薬組成物のアンチセンスオリゴマーは、式(IVa)に従う。

40

【0224】

これらの医薬組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントも含有し得る。主題のオリゴマーコンジュゲートに対する微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロプタノール、フェノールソルビン酸などを含むことによって確保され得る。また、糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含むことが望ましい場合もある。さらに、注射用剤形の持続的吸収は、モノステアリン

50

酸アルミニウムおよびゼラチンなどの、吸収を遅延させる薬剤を含むことによってもたらされ得る。

【0225】

場合によっては、薬物の効果を延長するために、皮下注射または筋肉内注射からの薬物の吸収を遅らせることが望ましい。これは、当該技術分野で既知の方法の中でも特に、水溶性が乏しい結晶性または非晶質材料の液体懸濁液の使用によって達成され得る。次いで、薬物の吸収速度は、その溶解速度に依存し、溶解速度は、順に、結晶サイズおよび結晶形態に依存し得る。あるいは、非経口的に投与された薬物形態の吸収の遅延は、薬物を油ビヒクルに溶解または懸濁することによって達成される。

【0226】

注射用デポー形態は、ポリラクチド - ポリグリコリドなどの生分解性ポリマー中で主題のオリゴマーコンジュゲートのマイクロカプセルマトリックスを形成することによって作製され得る。ポリマーに対するオリゴマーの比率および用いられる特定のポリマーの性質に応じて、オリゴマー放出の速度が制御され得る。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ(オルトエステル)およびポリ(無水物)が挙げられる。デポー注射用製剤はまた、体内組織と適合性のあるリポソームまたはマイクロエマルジョンに薬物を封入することによっても調製され得る。

【0227】

本開示のアンチセンスオリゴマーが、ヒトおよび動物に医薬品として投与される場合、それらは、それ自体で、または例えば、薬学的に許容される担体と組み合わせたアンチセンスオリゴマーの0.1~99% (より好ましくは10~30%) を含有する医薬組成物として投与することができる。

【0228】

本開示の製剤または調製物は、経口的、非経口的、局所的、または直腸に投与され得る。これらは、典型的には、各投与経路に好適な形態で投与される。例えば、それらは、錠剤もしくはカプセルの形態で、注射、吸入、目薬、軟膏、坐剤、もしくは点滴によって、ローションもしくは軟膏によって局所的に、または坐剤によって直腸に投与される。

【0229】

選択される投与経路にかかわらず、好適な水和形態で使用され得る本開示のアンチセンスオリゴマー、および/または本開示の医薬組成物は、当業者に既知の従来的な方法によって薬学的に許容される剤形に製剤化され得る。本開示の医薬組成物中の有効成分の実際の投与量レベルは、患者に対して許容できないほど毒性であることなく、特定の患者、組成物、および投与様式に対して望ましい治療応答を達成するために有効である有効成分の量を得るために変動し得る。

【0230】

選択される投与量レベルは、用いられる本開示の特定のアンチセンスオリゴマー、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与時刻、用いられる特定のオリゴマーの排泄速度または代謝速度、吸収の速度および程度、治療期間、用いられる特定のオリゴマーと組み合わせて使用される他の薬物、化合物、および/または材料、治療中の患者の年齢、性別、体重、条件、全般的な健康状態、および既往歴、ならびに医学技術で周知の同様の要因を含む、様々な要因に依存する。

【0231】

当該技術分野における通常の技術を有する医師または獣医であれば、必要な医薬組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医は、所望の治療効果を達成するために必要とされるレベルよりも低いレベルで、医薬組成物に用いられる本開示のアンチセンスオリゴマーの用量を開始し、所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増加させることができる。概して、本開示のアンチセンスオリゴマーの好適な1日用量は、治療効果をもたらすのに有効な最低用量であるアンチセンスオリゴマーの量である。そのような有効用量は、概して、本明細書に記載される要因に依存する。概して、患者のための本開示のアンチセンスオリゴマーの経口、静脈内、脳室内、および皮下用

10

20

30

40

50

量は、示された効果のために使用される場合、1日当たり体重1キログラム当たり約0.0001～約100mgの範囲である。

【0232】

いくつかの実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、概して、約1～約200mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、静脈内投与のための用量は、約0.5mg～200mg/kgである。

【0233】

いくつかの実施形態において、式(I)のアンチセンスオリゴマーは、概して、約1～約200mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、静脈内投与のための式(I)のアンチセンスオリゴマーの用量は、約0.5mg～約200mg/kgである。いくつかの実施形態において、式(II)のアンチセンスオリゴマーは、概して、約1～約200mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、静脈内投与のための式(II)のアンチセンスオリゴマーの用量は、約0.5mg～約200mg/kgである。いくつかの実施形態において、式(III)のアンチセンスオリゴマーは、概して、約1～約200mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、静脈内投与のための式(III)のアンチセンスオリゴマーの用量は、約0.5mg～約200mg/kgである。いくつかの実施形態において、式(IV)のアンチセンスオリゴマーは、概して、約1～約200mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、静脈内投与のための式(IV)のアンチセンスオリゴマーの用量は、約0.5mg～約200mg/kgである。いくつかの実施形態において、式(IVa)のアンチセンスオリゴマーは、概して、約1～約200mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、静脈内投与のための式(IVa)のアンチセンスオリゴマーの用量は、約0.5mg～約200mg/kgである。いくつかの実施形態において、式(V)のアンチセンスオリゴマーは、概して、約1～約200mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、静脈内投与のための式(V)のアンチセンスオリゴマーの用量は、約0.5mg～約200mg/kgである。いくつかの実施形態において、式(VI)のアンチセンスオリゴマーは、概して、約1～約200mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、静脈内投与のための式(VI)のアンチセンスオリゴマーの用量は、約0.5mg～約200mg/kgである。

【0234】

当該技術分野で理解されるように、毎週、隔週、3週間毎、または毎月の投与は、本明細書で考察されるように、1回以上の投与または部分用量であり得る。

【0235】

本明細書に記載される核酸分子およびアンチセンスオリゴマーは、当業者に既知の様々な方法によって細胞に投与され、このような方法としては、本明細書に記載され、かつ当該技術分野において既知であるような、リポソームへの封入、イオン導入、またはヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセル、および生体接着性マイクロスフェアなどの他のビヒクルへの組み込みが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、マイクロ乳化技術を利用して、親油性(非水溶性)医薬剤のバイオアベイラビリティを改善し得る。例としては、Trimetrine (Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991)、およびREV 5901 (Sheen, P. C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991)が挙げられる。利点の中でも特に、マイクロ乳化は、循環系の代わりにリンパ系への吸収を優先的に誘導し、それにより肝臓を迂回し、肝胆道循環における化合物の破壊を防止することによって、増強されたバイオアベイラビリティを提供する。

【0236】

開示の一態様において、製剤は、本明細書に提供されるオリゴマーから形成されるミセルと、ミセルが約100nm未満の平均直径を有する少なくとも1つの両親媒性担体とを

含有する。より好ましい実施形態は、約50nm未満の平均直径を有するミセルを提供し、さらに好ましい実施形態は、約30nm未満またはさらに約20nm未満の平均直径を有するミセルを提供する。

【0237】

全ての好適な両親媒性担体が企図されるが、現在好ましい担体は、概して、一般的に安全と認められている(GRAS)状態を有し、かつ本開示のアンチセンスオリゴマーを可溶化することと、溶液が複雑な水相(ヒト胃腸管に見られるものなど)と接触する後期段階でマイクロ乳化することとの両方ができる担体である。これらの要件を満たす両親媒性成分は、通常、HLB(親水性-親油性のバランス)値が2-20であり、それらの構造は、C-6からC-20の範囲の直鎖脂肪族ラジカルを含有する。例としては、ポリエチレングリコール化脂肪酸グリセリドおよびポリエチレングリコールがある。

10

【0238】

両親媒性担体の例としては、飽和および一不飽和ポリエチレングリコール化脂肪酸グリセリド、例えば、完全または部分的に水素化された様々な植物油から得られるものが挙げられる。そのような油は、有利に、トリ-、ジ-、およびモノ-脂肪酸グリセリド、ならびに対応する脂肪酸のジ-およびモノ-ポリ(エチレングリコール)エステルからなり得、特に好ましい脂肪酸組成物としては、カプリン酸4~10%、カプリン酸3~9%、ラウリン酸40~50%、ミリスチン酸14~24%、パルミチン酸4~14%、およびステアリン酸5~15%が挙げられる。別の有用なクラスの両親媒性担体としては、飽和もしくは一不飽和脂肪酸(SPANシリーズ)または対応するエトキシ化類似体(TWEEN(登録商標)シリーズ)を有する、部分的にエステル化されたソルビタンおよび/またはソルビトールが挙げられる。

20

【0239】

Gelucireシリーズ、Labrafil、Labrasol、またはLauroglycol(全てGattefosse Corporation, Saint Priest, Franceによって製造および流通)、PEG-モノ-オレイン酸、PEG-ジ-オレイン酸、PEG-モノ-ラウリン酸およびジ-ラウリン酸、レシチン、ポリソルベート80など(米国および世界中の多くの企業によって製造および流通)を含む市販の両親媒性担体が、特に有用であり得る。

【0240】

ある特定の実施形態において、送達は、本開示の医薬組成物を好適な宿主細胞に導入するために、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞などを使用することによって起こり得る。特に、本開示の医薬組成物は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、ナノ粒子、または同様のもののいずれかに封入されて、送達用に製剤化され得る。そのような送達ビヒクルの製剤化および使用は、既知かつ従来の技術を使用して行われ得る。

30

【0241】

本開示での使用に好適な親水性ポリマーは、容易に水溶性であり、小胞形成脂質に共有結合することができ、かつ毒性作用なしに*in vivo*で耐容性がある(すなわち、生体適合性である)ものである。好適なポリマーとしては、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ乳酸(ポリラクチドとも呼ばれる)、ポリグリコール酸(ポリグリコリドとも呼ばれる)、ポリ乳酸-ポリグリコール酸コポリマー、およびポリビニルアルコールが挙げられる。ある特定の実施形態において、ポリマーは、約100もしくは120ダルトン~最大で約5,000もしくは10,000ダルトン、または約300ダルトン~約5,000ダルトンの重量平均分子量を有する。他の実施形態において、ポリマーは、約100~約5,000ダルトンの重量平均分子量を有する、または約300~約5,000ダルトンの重量平均分子量を有する、ポリ(エチレングリコール)である。ある特定の実施形態において、ポリマーは、約750ダルトンの重量平均分子量を有するポリ(エチレングリコール)、例えば、PEG(750)である。ポリマーは、その中のモノマーの数によっても定義され得、本開示の好ましい実施形態は、少なくとも約3つのモノマーの

40

50

ポリマーを利用し、3つのモノマーからなるそのようなPEGポリマーは、分子量が約132ダルトンである。

【0242】

本開示での使用に適し得る他の親水性ポリマーとしては、ポリビニルピロリドン、ポリメトキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、および誘導体化セルロース、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースが挙げられる。

【0243】

ある特定の実施形態において、本開示の製剤は、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、アクリルエステルおよびメタクリルエステルのポリマー、ポリビニルポリマー、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびそのコポリマー、セルロース、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ無水物、ポリ(オルソ)エステル、ポリ(ブチック酸)(butic acid)、ポリ(吉草酸)、ポリ(ラクチド-co-カプロラクトン)、多糖類、タンパク質、ポリヒアルロン酸、ポリシアノアクリレート、ならびにそれらのブレンド、混合物、またはコポリマーからなる群から選択される生体適合性ポリマーを含む。

【0244】

シクロデキストリンは、6、7、または8グルコース単位からなる環状オリゴ糖であり、それぞれギリシャ文字、 α 、 β 、または γ によって示される。グルコース単位は、 α -1,4-グルコシド結合によって連結される。糖単位の椅子型配座の結果として、全ての二次ヒドロキシル基(C-2、C-3における)が環の一方の側に位置する一方で、C-6における全ての一次ヒドロキシル基は、他方の側に位置する。結果として、外面は親水性であり、シクロデキストリンを水溶性にする。対照的に、シクロデキストリンの空洞は、それらが原子C-3およびC-5の水素によって、ならびにエーテル様酸素によって覆われているため、疎水性である。これらのマトリックスは、例えば、17-エストラジオールなどのステロイド化合物を含む、様々な比較的疎水性の化合物との複合体形成を可能にする(例えば、van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113(1994)を参照)。複合体形成は、ファンデルワールス相互作用および水素結合形成によって起こる。シクロデキストリンの化学的性質に関する一般的なレビューについては、Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822(1994)を参照されたい。

【0245】

シクロデキストリン誘導体の物理化学的性質は、置換の種類および程度に大きく依存する。例えば、それらの水溶性は、不溶性(例えば、トリアセチル-ベータ-シクロデキストリン)から147%可溶性(w/v)(G-2-ベータ-シクロデキストリン)の範囲である。さらに、それらは多くの有機溶媒に可溶性である。シクロデキストリンの特性は、それらの溶解性を増減させることによって、様々な製剤構成成分の溶解度の制御を可能にする。

【0246】

多数のシクロデキストリンおよびそれらの調製のための方法が記載されている。例えば、Parmeter(I)ら(米国特許第3,453,259号)およびGramerara(米国特許第3,459,731号)は、電気的中性シクロデキストリンについて記載した。他の誘導体としては、カチオン特性を有するシクロデキストリン[Parmeter(II)、米国特許第3,453,257号]、不溶性架橋シクロデキストリン(Solms、米国特許第3,420,788号)、およびアニオン特性を有するシクロデキストリン[Parmeter(III)、米国特許第3,426,011号]が挙げられる。アニオン特性を有するシクロデキストリン誘導体の中でも、カルボン酸、亜リン酸、亜ホスフィン酸、ホスホン酸、リン酸、チオホスホン酸、チオスルフィン酸、およびスルホン酸が、親シクロデキストリンに付加されている[Parmeter(III)、米国特許第3,453,257号を参照]。さらに、スルホアルキルエーテルシクロデ

10

20

30

40

50

キストリン誘導体は、Steel laら（米国特許第5,134,127号）によって記載されている。

【0247】

リポソームは、水性内部区画を取り囲む少なくとも1つの脂質二重層膜からなる。リポソームは、膜の種類およびサイズによって特徴付けられ得る。小型単一ラメラ小胞（SUV）は、単一膜を有し、典型的には直径が0.02~0.05 μmの範囲であり、大型単一ラメラ小胞（LUV）は、典型的には0.05 μmよりも大きい。大型オリゴラメラ小胞および多重ラメラ小胞は、複数の、通常は同心性の膜層を有し、典型的には0.1 μmよりも大きい。

【0248】

いくつかの非同心膜を有するリポソーム、すなわち、より大きい小胞内に含有されるいくつかのより小さい小胞は、多胞体小胞と呼ばれる。本開示の一態様は、本開示のアンチセンスオリゴマーを含有するリポソームを含む製剤に関し、リポソーム膜は、増加した担持能力を有するリポソームを提供するように製剤化される。あるいは、または加えて、本開示のアンチセンスオリゴマーは、リポソームのリポソーム二重層内に含有され得るか、またはその上に吸着され得る。本開示のアンチセンスオリゴマーは、脂質界面活性剤と凝集され、リポソームの内部空間内に担持され得る。これらの場合、リポソーム膜は、活性薬剤-界面活性剤凝集体の崩壊効果に抵抗するように製剤化される。

【0249】

本開示の一実施形態によると、リポソームの脂質二重層は、ポリ（エチレングリコール）（PEG）で誘導体化された脂質を含有し、これによりPEG鎖は、脂質二重層の内面から、リポソームによって封入された内部空間へと延在し、かつ脂質二重層の外部から周囲環境へと延在する。

【0250】

本開示のリポソーム内に含有される活性薬剤は、可溶化形態である。界面活性剤および活性薬剤の凝集体（対象の活性薬剤を含有するエマルジョンまたはミセルなど）は、本開示によるリポソームの内部空間内に閉じ込められ得る。界面活性剤は、活性薬剤を分散させ可溶化するように作用し、様々な鎖長（例えば、約C14~約C20）の生体適合性リゾホスファチジルコリン（LPG）を含むがこれに限定されない、任意の好適な脂肪族、脂環式、または芳香族界面活性剤から選択され得る。PEG-脂質などのポリマー誘導体化脂質は、ミセル/膜融合を阻害するように作用するため、また界面活性剤分子へのポリマーの添加が界面活性剤のCMCを減少させ、ミセル形成を助けるため、ミセル形成にも利用され得る。マイクロモル範囲のCMOを有する界面活性剤が好ましく、より高いCMC界面活性剤を利用して、本開示のリポソーム内に閉じ込められたミセルを調製し得る。

【0251】

本開示によるリポソームは、当該技術分野で既知の様々な技術のいずれかによって調製され得る。例えば、米国特許第4,235,871号、公開PCT出願第WO96/14057号、New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), pages 33-104、およびLasica DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993を参照されたい。例えば、本開示のリポソームは、リポソーム中で所望の誘導体化脂質の最終モルパーセントに相当する脂質濃度で、親水性ポリマーで誘導体化された脂質を予め形成されたリポソームに拡散することによって、例えば、予め形成されたリポソームを脂質グラフトポリマーから構成されるミセルに曝露することによって、調製され得る。親水性ポリマーを含有するリポソームはまた、当該技術分野で既知のように、均質化、脂質場水和、または押出技術によって形成され得る。

【0252】

別の例示的な製剤化手順において、活性薬剤はまず、疎水性分子を容易に可溶化するリゾホスファチジルコリンまたは他の低CMC界面活性剤（ポリマーグラフト脂質を含む）

10

20

30

40

50

中での音波処理によって分散される。次いで、活性薬剤の得られたミセル懸濁液を使用して、好適なモルパーセントのポリマーグラフト脂質またはコレステロールを含有する乾燥脂質試料を再水和する。次いで、脂質および活性薬剤懸濁液は、当該技術分野で既知の押出技術を使用してリポソームに形成され、得られたリポソームは、標準的なカラム分離によって封入されていない溶液から分離される。

【0253】

本開示の一態様において、リポソームは、選択されたサイズ範囲において実質的に均一なサイズを有するように調製される。1つの効果的なサイズ決定方法は、選択された均一な孔径を有する一連のポリカーボネート膜を通してリポソームの水性懸濁液を押し出すことを伴い、膜の孔径は、その膜を通じた押出によってもたらされるリポソームの最大サイズに概ね相当する。例えば、米国特許 第4,737,323号(1988年4月12日)を参照されたい。ある特定の実施形態において、DharmaFECT(登録商標)およびLipofectamine(登録商標)などの試薬を利用して、ポリヌクレオチドまたはタンパク質を細胞に導入し得る。

10

【0254】

本開示の製剤の放出特性は、封入材料、封入薬物の濃度、および放出調節剤の存在に依存する。例えば、放出は、例えば、胃にあるような低pH、または腸にあるような高pHでのみ放出するpH感受性コーティングを使用して、pH依存性になるように操作され得る。腸溶性コーティングは、胃を通過した後まで放出が起こらないように使用され得る。異なる材料に封入されたシアナミドの複数のコーティングまたは混合物を使用して、胃内で初期放出を得て、続いて腸内で後の放出を得ることができる。放出はまた、塩または細孔形成剤を含むことによっても操作され得、これは、カプセルからの拡散による水取込みまたは薬物の放出を増加させることができる。薬物の溶解性を修正する賦形剤は、放出速度を制御するためにも使用され得る。マトリックスの分解またはマトリックスからの放出を増強する薬剤も組み込まれ得る。それらは、薬物に添加され得、別個の相として(すなわち、微粒子として)添加されるか、または化合物に応じてポリマー相に共溶解され得る。ほとんどの場合、量は、0.1~30パーセント(w/wポリマー)であるべきである。分解促進剤の種類としては、硫酸アンモニウムおよび塩化アンモニウムなどの無機塩、クエン酸、安息香酸、およびアスコルビン酸などの有機酸、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛、および水酸化亜鉛などの無機塩基、ならびにプロタミン硫酸塩、スペルミン、コリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、およびトリエタノールアミンなどの有機塩基、ならびにTween(登録商標)およびPluronic(登録商標)などの界面活性剤が挙げられる。マトリックスに微細構造を付加する細孔形成剤(すなわち、無機塩および糖類などの水溶性化合物)が、微粒子として添加される。範囲は、典型的には、1~30パーセント(w/wポリマー)である。

20

30

【0255】

また、取込みは、腸内の粒子の滞留時間を変化させることによっても操作され得る。これは、例えば、粒子を粘膜接着性ポリマーでコーティングするか、または封入材料として選択することによって達成され得る。例としては、遊離カルボキシル基を有するほとんどのポリマー、例えば、キトサン、セルロース、および特にポリアクリレート(本明細書で使用される場合、ポリアクリレートは、アクリレート基、ならびにシアノアクリレートおよびメタクリレートなどの修飾アクリレート基を含むポリマーを指す)が挙げられる。

40

【0256】

アンチセンスオリゴマーは、外科用もしくは医療用のデバイスまたはインプラント内に含有されるように製剤化され得るか、またはそれによって放出されるように適合され得る。ある特定の態様において、インプラントは、アンチセンスオリゴマーでコーティングされ得るか、または別の方法で処理され得る。例えば、ヒドロゲル、または生体適合性および/もしくは生分解性ポリマーなどの他のポリマーを使用して、本開示の医薬組成物でインプラントをコーティングし得る(すなわち、組成物は、ヒドロゲルまたは他のポリマーを使用することによって医療デバイスと共に使用するように適合され得る)。医療デバイ

50

スを薬剤でコーティングするためのポリマーおよびコポリマーは、当該技術分野で周知である。インプラントの例としては、ステント、薬剤溶出性ステント、縫合糸、人工器官、血管カテーテル、透析カテーテル、血管グラフト、人工心臓弁、心臓ペースメーカー、植込み型除細動器、IV針、接骨および骨形成用デバイス、例えば、ピン、スクリュー、プレート、および他のデバイス、ならびに創傷治癒のための人工組織マトリックスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0257】

本明細書に提供される方法に加えて、本開示による使用のためのアンチセンスオリゴマーは、他の医薬品から類推して、ヒトまたは獣医学で使用するための任意の便利な方法で投与するために製剤化され得る。アンチセンスオリゴマーおよびそれらの対応する製剤は、単独で、または筋芽細胞移植、幹細胞療法、アミノグリコシド系抗生物質の投与、プロテアソーム阻害剤、および上方制御療法（例えば、ジストロフィンの常染色体パラログであるユートロフィンの上方制御）などの筋ジストロフィーの治療における他の治療戦略と組み合わせて投与され得る。

10

【0258】

いくつかの実施形態において、追加の治療薬は、本開示のアンチセンスオリゴマーの投与の前に、それと同時に、またはその後に投与され得る。例えば、アンチセンスオリゴマーは、ステロイドおよび/または抗生物質と組み合わせて投与され得る。ある特定の実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、バックグラウンドステロイド理論（例えば、間欠的または長期/連続的バックグラウンドステロイド療法）を受けている患者に投与される。例えば、いくつかの実施形態において、患者は、アンチセンスオリゴマーの投与前にコルチコステロイドを用いて治療されており、ステロイド療法を受け続けている。いくつかの実施形態において、ステロイドは、糖質コルチコイドまたはプレドニゾンである。

20

【0259】

記載される投与経路は、当業者が任意の特定の動物および状態にとって最適な投与経路および任意の投与量を容易に決定することができるため、指針としてのみ意図される。in vitroおよびin vivoの両方で、機能的な新しい遺伝子材料を細胞に導入するための複数のアプローチが試みられている（Friedmann (1989) Science, 244: 1275 - 1280）。これらのアプローチとしては、発現する遺伝子の修飾レトロウイルスへの組み込み、（Friedmann (1989)、上記、Rosenberg (1991) Cancer Research 51 (18), suppl. : 5074S - 5079S）、非レトロウイルスベクター（例えば、アデノ関連ウイルスベクター）への組み込み（Rosenfeld, et al. (1992) Cell, 68: 143 - 155、Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252: 431 - 434）、またはリポソームを介した異種プロモーター-エンハンサーエレメントに連結された導入遺伝子の送達（Friedmann (1989)、上記、Brigham, et al. (1989) Am. J. Med. Sci., 298: 278 - 281、Nabel, et al. (1990) Science, 249: 1285 - 1288、Hazinski, et al. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4: 206 - 209、およびWang and Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84: 7851 - 7855）、リガンド特異的、カチオン系輸送システムとの結合（Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem., 263: 14621 - 14624）、またはネイキッドDNA、発現ベクターの使用（Nabel et al. (1990)、上記、Wolff et al. (1990) Science, 247: 1465 - 1468）が挙げられる。導入遺伝子の組織への直接注射は、局所発現のみをもたらす（Rosenfeld (1992)、上記、Rosenfeld et al. (1991)、上記、Brigham et al. (1989)、上記、Nabel (1990)、上記、およびHazinski et al. (1991)、上記）。Brighamらのグループ（Am. J. Med. Sci. (1989) 298: 278 - 281およびClinical Resea

30

40

50

rch (1 9 9 1) 3 9 (要 約)) は、DNAリボソーム複合体の静脈内または気管内のいずれかの投与後のマウスの肺の *in vivo* トランスフェクションのみを報告している。ヒト遺伝子治療手順のレビュー文献の一例は、Anderson, Science (1 9 9 2) 2 5 6 : 8 0 8 - 8 1 3 である。

【0260】

さらなる実施形態において、本開示の医薬組成物は、Han et al., Nat. Comm. 7, 10981 (2016) (この全体は、参照により本明細書に組み込まれる) に提供されるように、炭水化物を追加的に含み得る。いくつかの実施形態において、本開示の医薬組成物は、5%のヘキソース炭水化物を含み得る。例えば、本開示の医薬組成物は、5%のグルコース、5%のフルクトース、または5%のマンノースを含み得る。ある特定の実施形態において、本開示の医薬組成物は、2.5%のグルコースおよび2.5%のフルクトースを含み得る。いくつかの実施形態において、本開示の医薬組成物は、5体積%の量で存在するアラビノース、5体積%の量で存在するグルコース、5体積%の量で存在するソルビトール、5体積%の量で存在するガラクトース、5体積%の量で存在するフルクトース、5体積%の量で存在するキシリトール、5体積%の量で存在するマンノース、各々が2.5体積%の量で存在するグルコースとフルクトースの組み合わせ、ならびに5.7体積%の量で存在するグルコース、2.86体積%の量で存在するフルクトース、および1.4体積%の量で存在するキシリトールの組み合わせから選択される炭水化物を含んでもよい。

【0261】

IV. 使用方法

エクソスキッピングを使用したジストロフィンリーディングフレームの修復

ジストロフィン遺伝子のアウトオブフレーム変異によって引き起こされるDMDの治療に対する潜在的な治療アプローチは、インフレーション変異によって引き起こされるBMDとして既知である、より軽度な形態のジストロフィン異常症によって示唆される。アウトオブフレーム変異をインフレーション変異に変換する能力は、仮定では、mRNAリーディングフレームを保持し、内部的に短縮されたがなお機能的なジストロフィンタンパク質を産生する。本開示のアンチセンスオリゴマーを、これを達成するように設計した。

【0262】

式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(IVa)、式(V)、式(VI)のアンチセンスオリゴマーの標的化プレmRNA配列とのハイブリダイゼーションは、プレmRNAスプライシング複合体の形成を阻害し、成熟mRNAからエクソン50を欠失させる。本開示のアンチセンスオリゴマーの構造および立体構造により、相補的配列に対する配列特異的塩基対合が可能となる。

【0263】

全ての79個のエクソンを含有する正常なジストロフィンmRNAは、正常なジストロフィンタンパク質を産生する。各エクソンの形状は、コドンがどのようにエクソン間で分割されるかを示す。注目すべきことに、1つのコドンは、3つのヌクレオチドからなる。長方形のエクソンは、完全なコドンで始まり、終わる。矢印形状のエクソンは、完全なコドンで始まるが、コドンのヌクレオチド#1のみを含有する分割コドンで終わる。このコドンのヌクレオチド#2および#3は、シェブロン形状で始まる後続のエクソンに含有される。

【0264】

ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソン50、イントロン49、および/またはイントロン50の標的領域に相補的であり、エクソン50のスキッピングを誘導する、アンチセンスオリゴマーの効果を実験するための臨床転帰は、ジストロフィン陽性線維(PDPF)の割合、6分間歩行試験(6MWT)、歩行不能(LOA)、ノースター歩行評価(NSAA)、肺機能検査(PFT)、外部の支持なしで(仰臥位から)立ち上がる能力、*de novo*ジストロフィン産生、および他の機能的尺度を含む。

【0265】

いくつかの実施形態において、本開示は、エクソン50のスキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有する対象においてジストロフィンを産生するための方法を提供し、この方法は、本明細書に記載されるように、アンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む。ある特定の実施形態において、本開示は、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有するデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）を有する対象において、ジストロフィンタンパク質産生を誘導するためにmRNAリーディングフレームを修復するための方法を提供する。タンパク質産生は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ウェスタンブロット分析、または免疫組織化学検査（IHC）によって測定され得る。

【0266】

10

いくつかの実施形態において、本開示は、DMDの治療を必要とする対象においてそれを行うための方法を提供し、対象は、エクソン50スキッピングに適しているジストロフィン遺伝子の変異を有し、方法は、本明細書に記載されるようなアンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む。様々な実施形態において、対象の治療は、疾患進行の遅延によって測定される。いくつかの実施形態において、対象の治療は、対象における歩行の維持、または対象における歩行不能の低減によって測定される。いくつかの実施形態において、歩行は、6分間歩行試験（6MWT）を使用して測定される。ある特定の実施形態において、歩行は、ノーススタート歩行評価（NSAA）を使用して測定される。

【0267】

20

いくつかの実施形態において、本開示は、DMDを有する対象において肺機能を維持するか、または肺機能の喪失を低減するための方法を提供し、対象は、エクソン50のスキッピングに適しているDMD遺伝子の変異を有し、方法は、本明細書に記載されるように、アンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、肺機能は、最大呼気圧（MEP）として測定される。ある特定の実施形態において、肺機能は、最大吸気圧（MIP）として測定される。いくつかの実施形態において、肺機能は、努力肺活量（FVC）として測定される。

【0268】

さらなる実施形態において、本開示の医薬組成物は、Han et al., Nat. Comm. 7, 10981 (2016)（この全体は、参照により本明細書に組み込まれる）に提供されるように、同じ製剤または別個の製剤のいずれかで、本開示の方法において炭水化物と同時投与され得る。いくつかの実施形態において、本開示の医薬組成物は、5%のヘキソース炭水化物と同時投与され得る。例えば、本開示の医薬組成物は、5%のグルコース、5%のフルクトース、または5%のマンノースと同時投与され得る。ある特定の実施形態において、本開示の医薬組成物は、2.5%のグルコースおよび2.5%のフルクトースと同時投与され得る。いくつかの実施形態において、本開示の医薬組成物は、5体積%の量で存在するアラビノース、5体積%の量で存在するグルコース、5体積%の量で存在するソルビトール、5体積%の量で存在するガラクトース、5体積%の量で存在するフルクトース、5体積%の量で存在するキシリトール、5体積%の量で存在するマンノース、各々が2.5体積%の量で存在するグルコースとフルクトースの組み合わせ、ならびに5.7体積%の量で存在するグルコース、2.86体積%の量で存在するフルクトース、および1.4体積%の量で存在するキシリトールの組み合わせから選択される炭水化物と同時投与され得る。

30

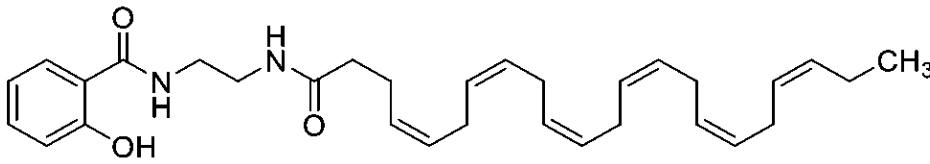
40

【0269】

様々な実施形態において、本開示のアンチセンスオリゴマーは、治療有効量の非ステロイド性抗炎症化合物と同時投与される。いくつかの実施形態において、非ステロイド性抗炎症化合物は、NF-kB阻害剤である。例えば、いくつかの実施形態において、NF-kB阻害剤は、CAT-1004またはその薬学的に許容される塩であり得る。様々な実施形態において、NF-kB阻害剤は、サリチル酸塩とDHAのコンジュゲートであり得る。いくつかの実施形態において、NF-kB阻害剤は、CAT-1041またはその薬

50

学的に許容される塩である。ある特定の実施形態において、NF-κB阻害剤は、サリチル酸塩とEPAのコンジュゲートである。様々な実施形態において、NF-κB阻害剤は、
【化116】



またはその薬学的に許容される塩である。

10

【0270】

いくつかの実施形態において、非ステロイド性抗炎症化合物は、TGF-β阻害剤である。例えば、ある特定の実施形態において、TGF-β阻害剤は、HT-100である。

【0271】

ある特定の実施形態において、療法に使用するための、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーが記載される。ある特定の実施形態において、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療に使用するための、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーが記載される。ある特定の実施形態において、療法に使用するための薬剤の製造に使用するための、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーが記載される。ある特定の実施形態において、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療のための薬剤の製造に使用するための、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマーが記載される。

20

【0272】

V. キット

本開示はまた、遺伝的疾患を有する患者の治療のためのキットを提供し、このキットは、好適な容器に包装された、少なくともアンチセンス分子（例えば、配列番号1～9のいずれかに記載される塩基配列を含むアンチセンスオリゴマー）を、その使用のための説明書と共に含む。キットはまた、緩衝液、安定剤などの周辺試薬も含有し得る。当業者であれば、上記方法の用途が、多くの他の疾患の治療に使用するのに好適なアンチセンス分子を特定するために幅広い用途を有することを理解するべきである。一実施形態において、キットは、式(I)～(VI)のいずれかによるアンチセンスオリゴマーを含む。

30

【実施例】

【0273】

上記の開示は、理解を明確にする目的で、例示および実施例によってある程度詳細に記載されてきたが、本開示の教示を踏まえて、添付の特許請求の範囲の趣旨または範囲から逸脱することなく、ある特定の变更および修正がそれに対して成され得ることは、当業者に容易に明らかになるであろう。以下の実施例は、例示としてのみ提供されるものであり、限定するものではない。当業者であれば、実質的に類似した結果をもたらすように変更または修正され得る様々な重要ではないパラメータを容易に認識するであろう。

【0274】

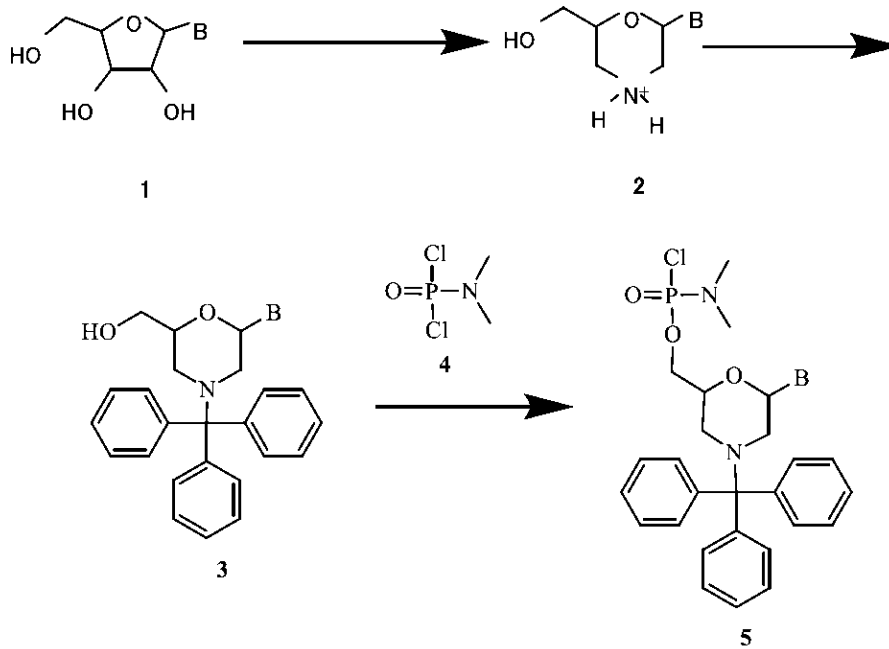
材料および方法

40

モルホリノサブユニットの調製

50

【化 1 1 7】



スキーム 1 : PMOサブユニットへの一般的合成経路

スキーム 1 を参照すると、B は、塩基対合部分を表し、モルホリノサブユニットは、示されるように、対応するリボヌクレオシド (1) から調製され得る。モルホリノサブユニット (2) は、好適な保護基前駆体、例えば、塩化トリチルとの反応によって任意に保護され得る。3' 保護基は、概して、以下により詳細に記載されるように、固体オリゴマー合成中に除去される。塩基対合部分は、固相オリゴマー合成に対して好適に保護され得る。好適な保護基としては、アデニンおよびシトシンに対するベンゾイル、グアニンに対するフェニルアセチル、およびヒポキサンチン (イノシン) に対するピバロイルオキシメチルが挙げられる。ピバロイルオキシメチル基は、ヒポキサンチン複素環塩基の N 1 位置に導入され得る。保護されていないヒポキサンチンサブユニットが用いられてもよいが、活性化反応における収率は、塩基が保護されている場合にはるかに優れている。他の好適な保護基としては、米国特許第 8, 076, 476 号に開示されているものが挙げられ、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 2 7 5 】

活性化されたリン化合物 4 との 3 の反応は、所望の連結部分 5 を有するモルホリノサブユニットをもたらす。

【 0 2 7 6 】

構造 4 の化合物は、当業者に既知の任意の数の方法を使用して調製され得る。次いで、モルホリノ部分とのカップリングは、上記に概説されるとおりに進む。

【 0 2 7 7 】

構造 5 の化合物は、サブユニット間連結を含むオリゴマーを調製するための固相オリゴマー合成に使用され得る。そのような方法は、当該技術分野で周知である。簡潔に言うと、構造 5 の化合物は、5' 末端で修飾されて、固体支持体へのリンカーを含有し得る。一旦支持されると、3' 末端の 5 の保護基 (例えば、トリチル) を除去し、遊離アミンを、構造 5 の第 2 の化合物の活性化リン部分と反応させる。この配列は、所望の配列のオリゴが得られるまで繰り返される。末端の 3' 末端の保護基は、3' 修飾が所望される場合、除去されるか、またはそのままにされるかのいずれかであり得る。オリゴは、任意の数の方法、または固体支持体への連結を切断するための塩基を用いた例示的な処理を使用して、固体支持体から除去することができる。

【 0 2 7 8 】

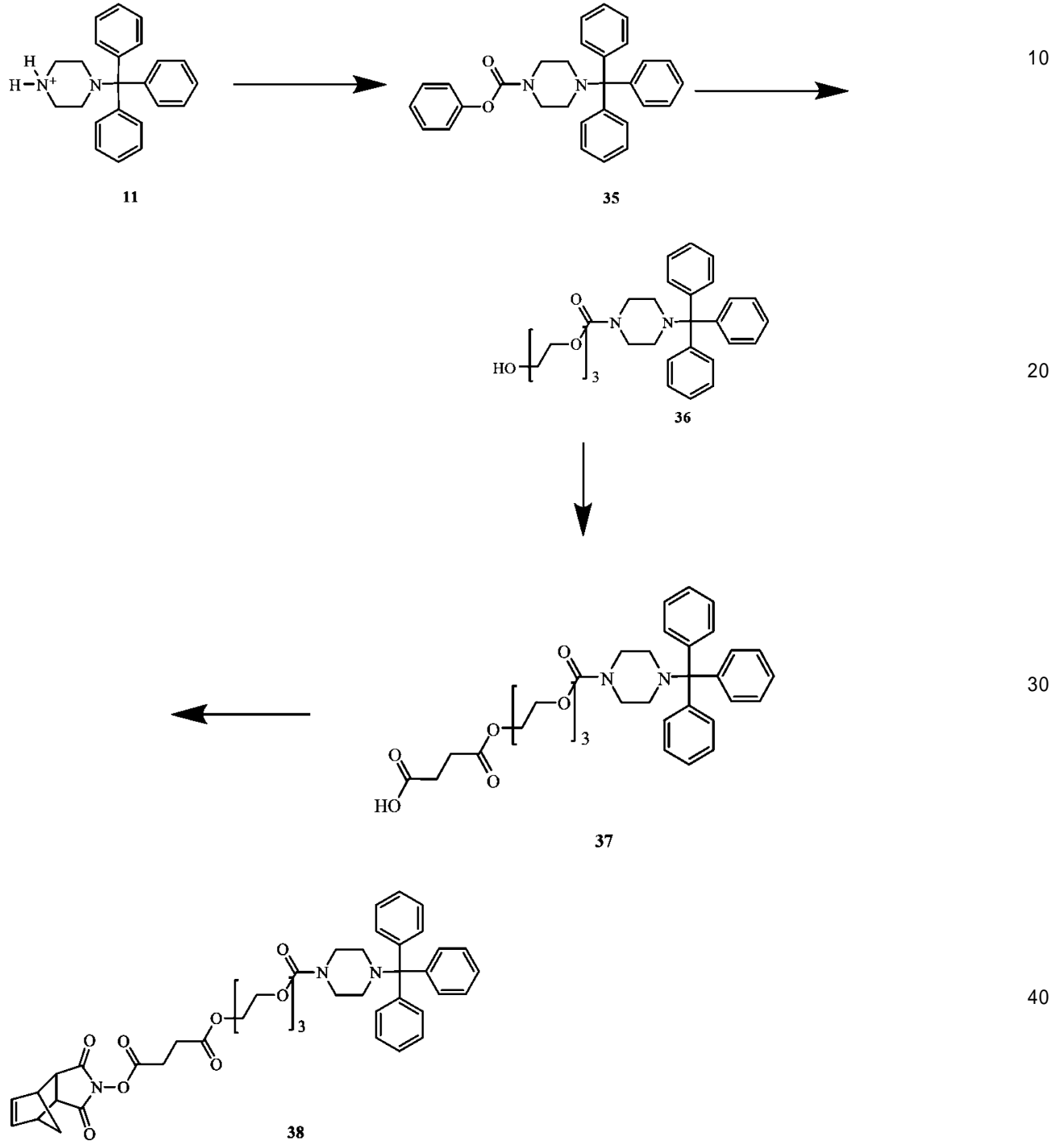
本開示の一般のおよび具体的なホルホリノオリゴマーにおけるホルホリノオリゴマーの調製は、実施例においてより詳細に説明される。

【0279】

ホルホリノオリゴマーの調製

本開示の化合物の調製は、スキーム2に従って、以下のプロトコルを使用して実施することができる。

【化118】



スキーム2：活性化テール酸の調製

【0280】

トリチルピペラジンフェニルカルバメート35の調製：ジクロロメタン中の化合物11の冷却懸濁液（6 mL / g の11）に、水中の炭酸カリウム（3.2当量）の溶液（4 mL

10

20

30

40

50

L / g の炭酸カリウム) を添加する。この二相混合物に、ジクロロメタン中のクロロギ酸フェニル (1 . 0 3 当量) の溶液 (2 g / g のクロロギ酸フェニル) をゆっくりと添加する。反応混合物を 2 0 に加温する。反応完了時 (1 ~ 2 時間) に、層を分離する。有機層を水で洗浄し、無水炭酸カリウム上で乾燥させる。生成物 3 5 をアセトニトリルからの結晶化によって単離する。

【 0 2 8 1 】

カルバメートアルコール 3 6 の調製：水素化ナトリウム (1 . 2 当量) を、1 - メチル - 2 - ピロリジノン中に懸濁する (3 2 m L / g の水素化ナトリウム) 。トリエチレングリコール (1 0 . 0 当量) および化合物 3 5 (1 . 0 当量) を、この懸濁液に添加し得る。得られたスラリーを 9 5 に加熱する。反応完了時 (1 ~ 2 時間) に、混合物を 2 0 に冷却する。この混合物に、3 0 % のジクロロメタン / メチル t e r t - ブチルエーテル (v : v) および水を添加する。生成物含有有機層を、水性 N a O H 、水性コハク酸、および飽和水性塩化ナトリウムで連続的に洗浄する。生成物 3 6 を、ジクロロメタン / メチル t e r t - ブチルエーテル / ヘプタンからの結晶化によって単離する。

10

【 0 2 8 2 】

テール酸 3 7 の調製：テトラヒドロフラン中の化合物 3 6 の溶液 (7 m L / g の 3 6) に、コハク酸無水物 (2 . 0 当量) および D M A P (0 . 5 当量) を添加する。混合物を 5 0 に加熱する。反応完了時 (5 時間) に、混合物を 2 0 に冷却し、水性 N a H C O ₃ を用いて p H 8 . 5 に調整する。メチル t e r t - ブチルエーテルを添加し、生成物を水層中に抽出する。ジクロロメタンを添加し、水層混合物を水性クエン酸で p H 3 に調整する。生成物含有有機層を、p H = 3 のクエン酸緩衝液と飽和水性塩化ナトリウムの混合物で洗浄する。この 3 7 のジクロロメタン溶液を、化合物 3 8 の調製において単離することなく使用する。

20

【 0 2 8 3 】

3 8 の調製：N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2 , 3 - ジカルボン酸イミド (H O N B) (1 . 0 2 当量) 、4 - ジメチルアミノピリジン (D M A P) (0 . 3 4 当量) 、次いで 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N ' - エチルカルボジイミド塩酸塩 (E D C) (1 . 1 当量) を、化合物 3 7 の溶液に添加する。混合物を 5 5 に加熱する。反応完了時 (4 ~ 5 時間) に、混合物を 2 0 に冷却し、1 : 1 の 0 . 2 M クエン酸 / ブラインおよびブラインで連続的に洗浄する。ジクロロメタン溶液を、アセトンへ、次いで N , N - ジメチルホルムアミドへ溶媒交換させ、生成物を、アセトン / N , N - ジメチルホルムアミドから飽和水性塩化ナトリウム中への沈殿によって単離する。粗生成物を水中で数回再スラリー化して、残留 N , N - ジメチルホルムアミドおよび塩を除去する。

30

【 0 2 8 4 】

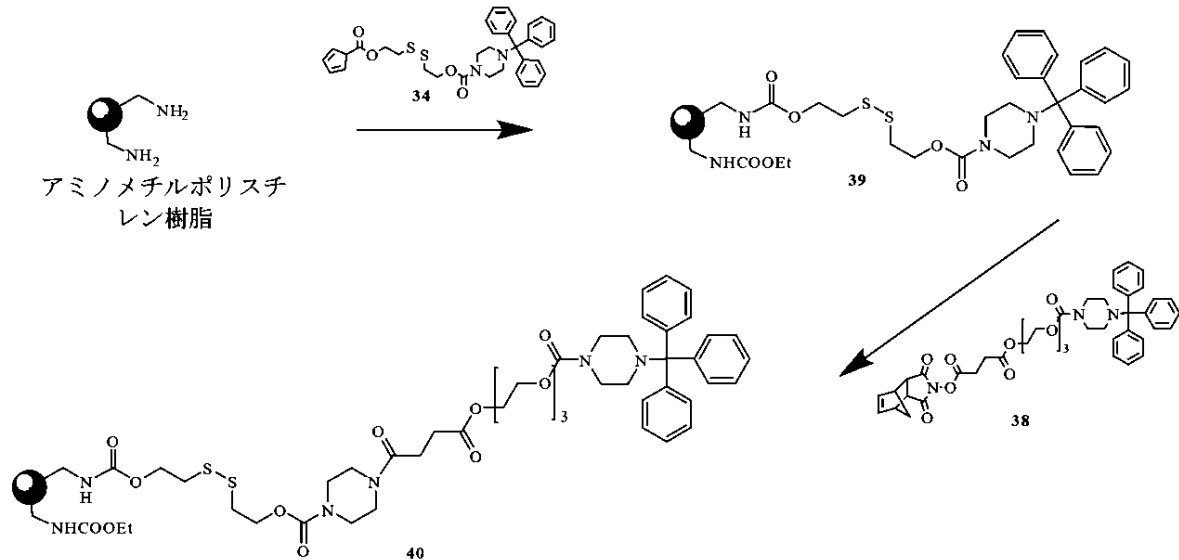
P M O 合成方法 A : ジスルフィドアンカーの使用

アンカー装填樹脂への活性化「テール」の導入を、固相合成中のサブユニットの組み込みに使用される手順によって、ジメチルイミダゾリジノン (D M I) 中で実施する。

40

50

【化 1 1 9】



スキーム 3 : モルホリノオリゴマーの合成のための固体支持体の調製

【 0 2 8 5】

この手順を、シラン処理したジャケット付きペプチド槽 (ChemGlass, NJ, USA) 内で、粗多孔性 (40 ~ 60 μm) ガラスフリット、オーバーヘッド攪拌器、およびテフロン (登録商標) 三方活栓を用いて実施して、N₂ がフリットまたは真空抽出によって泡立つことを可能にし得る。

【 0 2 8 6】

以下の手順の樹脂処理 / 洗浄ステップは、樹脂流動化または攪拌床反応器および溶媒 / 溶液抽出の 2 つの基本操作からなる。樹脂流動化については、N₂ がフリットによって上方に流動することを可能にするように活栓を配置し、指定の樹脂処理 / 洗浄液を反応器に添加し、樹脂に浸透させ、完全に湿らせる。次いで、混合を開始し、樹脂スラリーを所定時間混合する。溶媒 / 溶液抽出については、混合および N₂ 流動を停止し、真空ポンプを起動し、次いで、樹脂処理 / 洗浄液を排出して廃棄することを可能にするように活栓を配置する。特に記載のない限り、樹脂処理 / 洗浄液体積は全て、15 mL / g の樹脂である。

【 0 2 8 7】

1 - メチル - 2 - ピロリジノン (NMP; 20 mL / g 樹脂) を、シラン処理したジャケット付きペプチド槽内のアミノメチルポリスチレン樹脂 (100 ~ 200 メッシュ; 窒素置換に基づいて約 1.0 mmol / g 装填; 75 g、1 当量、Polymer Labs, UK、部品番号 1464 - X799) に添加し、樹脂を、1 ~ 2 時間混合しながら膨潤させる。膨潤溶媒の排出後、樹脂をジクロロメタン (2 × 1 ~ 2 分)、25% イソプロパノール / ジクロロメタン中の 5% ジイソプロピルエチルアミン (2 × 3 ~ 4 分)、およびジクロロメタン (2 × 1 ~ 2 分) で洗浄する。最終洗浄液の排出後、樹脂を、1 - メチル - 2 - ピロリジノン中のジスルフィドアンカー 34 の溶液 (0.17 M; 15 mL / g 樹脂、約 2.5 当量) で処理し、樹脂 / 試薬混合物を 45 °C で 60 時間加熱する。反応完了時に、加熱を中断し、アンカー溶液を排出し、1 - メチル - 2 - ピロリジノン (4 × 3 ~ 4 分) およびジクロロメタン (6 × 1 ~ 2 分) で樹脂を洗浄する。樹脂を、ジクロロメタン中の 10% (v/v) 二炭酸ジエチル (DEDC) の溶液 (16 mL / g、2 × 5 ~ 6 分) で処理し、次いで、ジクロロメタン (6 × 1 ~ 2 分) で洗浄する。樹脂 39 を、N₂ 流下で 1 ~ 3 時間、次いで真空下で一定重量 (± 2%) になるまで乾燥させる。

【 0 2 8 8】

アミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂の装填量の決定: 樹脂の装填量 (潜在的に利用可能な反応部位の数) を、樹脂 1 グラム当たりのトリフェニルメチル (トリチル)

基の数の分光アッセイによって決定する。

【0289】

既知の重量の乾燥樹脂 ($25 \pm 3 \text{ mg}$) をシラン処理した 25 mL のメスフラスコに移し、ジクロロメタン中の約 5 mL の 2% (v/v) トリフルオロ酢酸を添加する。内容物を穏やかに巡回させて混合し、 30 分間放置する。体積は、さらなるジクロロメタン中の 2% (v/v) トリフルオロ酢酸で最大 25 mL になり、内容物を完全に混合する。ポジティブディスプレイメント式ピペットを使用して、トリチル含有溶液 ($500 \mu\text{L}$) のアリコートに 10 mL のメスフラスコに移し、その体積をメタンスルホン酸で 10 mL にする。

【0290】

最終溶液中のトリチルカチオン含有量を、 431.7 nm の UV 吸光度によって測定し、樹脂装填量を、適切な体積、希釈、消散係数 ($: 41 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)、および樹脂重量を使用して、樹脂 1 グラム当たりのトリチル基 ($\mu\text{mol/g}$) で測定する。アッセイを三つ組で実施し、平均装填量を計算する。

【0291】

本実施例の樹脂装填手順は、約 $500 \mu\text{mol/g}$ の装填量を樹脂に提供する。ジスルフィドアンカー組み込みステップを室温で 24 時間実施する場合、 $300 \sim 400 \mu\text{mol/g}$ の装填量を得る。

【0292】

テール装填量：アミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂の調製と同じ設定および体積を使用して、テールを固体支持体に導入することができる。アンカー装填樹脂を、最初に酸性条件下で脱保護し、得られた材料をカップリング前に中和する。カップリングステップでは、ジスルフィドアンカー溶液の 1 - メチル - 2 - ピロリジノンの代わりに、 4 - エチルモルホリン (NEM, 0.4 M) を含有する DMI 中の 38 の溶液 (0.2 M) を使用する。 45 で 2 時間後、樹脂 39 を 25% イソプロパノール / ジクロロメタン中の 5% ジイソプロピルエチルアミンで 2 回、および DCM で 1 回洗浄する。無水安息香酸 (0.4 M) および NEM (0.4 M) の溶液を、樹脂に添加する。 25 分後、反応器ジャケットを室温に冷却し、樹脂を 25% イソプロパノール / ジクロロメタン中の 5% ジイソプロピルエチルアミンで 2 回、および DCM で 8 回洗浄する。樹脂 40 を濾過し、高真空下で乾燥させる。樹脂 40 の装填量を、テール装填量で使用される元のアミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂 39 の装填量と定義する。

【0293】

固相合成：モルホリノオリゴマーを、 4 mL の BioComma ポリプロピレン反応カラム (部品番号 CT003-BC) 中の特別注文製 BioAutomation 128 AVB (Plano, TX) 上で調製する。カラムを合成器上に置く場合、水流用のチャンネルを備えたアルミニウムブロックをカラムの周囲に配置する。AVB 128 は代替的に試薬 / 洗浄溶液を添加し、指定の時間保持し、真空を使用してカラムを空にする。

【0294】

最大約 25 サブユニットの長さの範囲のオリゴマーについては、 $500 \mu\text{mol/g}$ に近い樹脂の装填量を伴うアミノメチルポリスチレンジ - スルフィド樹脂が好ましい。より大きいオリゴマーについては、 $300 \sim 400 \mu\text{mol/g}$ の樹脂の装填量を伴うアミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂が好ましい。 $5'$ - テールを有する分子が所望される場合、テールが装填されている樹脂は、同じ装填量ガイドラインで選択される。

【0295】

以下の試薬溶液を調製する。

脱トリチル化溶液： $4:1$ のジクロロメタン / トリフルオロエタノール溶液中の 1% の 4 シアノピリジンおよびトリフルオロ酢酸 (w/w)、

中和溶液： $5:1$ のジクロロメタン / イソプロパノール溶液中の 3% のジイソプロピルエチルアミン、ならびに

カップリング溶液： $1, 3$ - ジメチルイミダゾリジノン (DMI) 溶液中の所望の塩基お

10

20

30

40

50

よび連結型の 0.18 M (または 20 サブユニットよりも長く成長しているオリゴマーについては 0.24 M) の活性化モルホリノサブユニットならびに 0.4 M の N - エチルモルホリン。

ジクロロメタン (DCM) を、異なる試薬溶液洗浄液を分離する移行洗浄液として使用する。

ブロックを 42 に設定した合成器において、2 mL の 1 - メチル - 2 - ピロリジノン、30 mg のアミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂 (またはテール樹脂) を含有する各カラムに添加して、室温で 30 分間放置する。2 mL のジクロロメタンで 2 回洗浄した後、以下の合成サイクルを用い得る。

【表 2 2】

| ステップ | 体積 | 送達 | 保持時間 |
|--------|-------------------|--------|------|
| 脱トリチル化 | 1.5 mL | マニホールド | 15 秒 |
| 脱トリチル化 | 1.5 mL | マニホールド | 15 秒 |
| 脱トリチル化 | 1.5 mL | マニホールド | 15 秒 |
| 脱トリチル化 | 1.5 mL | マニホールド | 15 秒 |
| 脱トリチル化 | 1.5 mL | マニホールド | 15 秒 |
| 脱トリチル化 | 1.5 mL | マニホールド | 15 秒 |
| 脱トリチル化 | 1.5 mL | マニホールド | 15 秒 |
| DCM | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| 中和 | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| 中和 | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| 中和 | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| 中和 | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| 中和 | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| 中和 | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| DCM | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| カップリング | 350 ~ 500 μ L | シリンジ | 40 分 |
| DCM | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| 中和 | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| 中和 | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| DCM | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| DCM | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |
| DCM | 1.5 mL | マニホールド | 30 秒 |

【0296】

個々のオリゴマーの配列を、各カラムが適切な配列中の適切なカップリング溶液 (A、C、G、T、または I) を受けるように合成器にプログラムする。カラム内のオリゴマーがその最終サブユニットの組み込みを完了している場合、カラムをブロックから除去し、4 - メトキシトリフェニルメチルクロリド (DMI 中 0.32 M) および 0.89 M の 4 - エチルモルホリンを含有するカップリング溶液を使用して、手動で最終サイクルを実施する。

【0297】

樹脂からの切断ならびに塩基および骨格保護基の除去：メトキシトリチル化後、樹脂を 2 mL の 1 - メチル - 2 - ピロリジノンで 8 回洗浄する。1 - メチル - 2 - ピロリジノン中の 0.1 M の 1, 4 - ジチオスレイトール (DTT) および 0.73 M のトリエチルアミンからなる 1 mL の切断溶液を添加し、カラムに蓋をし、室温で 30 分間放置する。その後、12 mL の Wheaton バイアルに排出する。大きく収縮した樹脂を 300 μ L の切断溶液で 2 回洗浄する。溶液に、4.0 mL の濃縮水性アンモニア (-20 で保存) を添加し、バイアルに (テフロン (登録商標) ライナー付きスクリュウキャップで) きつく蓋をし、混合物を旋回させて溶液を混合する。バイアルを 45 のオープン内に 16

～ 24 時間置き、塩基および骨格保護基の切断をもたらす。

【0298】

粗生成物精製：バイアル入りのアンモノリシス溶液をオープンから取り出し、室温に冷却させる。溶液を 20 mL の 0.28% 水性アンモニアで希釈し、Macroprep HQ 樹脂 (BioRad) を含有する 2.5 × 10 cm のカラムに通す。塩勾配 (A : 0.28% アンモニア、B : 0.28% アンモニア中の 1 M 塩化ナトリウム、60 分間で 0 ~ 100% B) を使用して、メトキシトリチル保護オリゴマーを溶出する。組み合わせた画分をプールし、所望の生成物に応じてさらに処理する。

【0299】

モルホリノオリゴマーの脱メトキシトリチル化：Macroprep 精製からのプールされた画分を 1 M の H₃PO₄ で処理して、pH を 2.5 に低下させる。最初の混合後、試料を室温で 4 分間放置し、その時点で 2.8% アンモニア / 水で pH 10 ~ 11 に中和する。生成物を固相抽出 (SPE) によって精製する。

10

【0300】

SPE カラム充填および調整：Amberchrome CG-300M (Dow Chemicals (Rohm and Haas); Midland, MI) (3 mL) を、20 mL フリットカラム (BioRad Econo-Pac Chromatography Columns (732-1011)) に充填し、樹脂を、3 mL の以下：0.28% NH₄OH / 80% アセトニトリル、0.5 M NaOH / 20% エタノール、水、50 mM H₃PO₄ / 80% アセトニトリル、水、0.5 M NaOH / 20% エタノール、水、0.28% NH₄OH ですすぐ。

20

【0301】

SPE 精製：脱メトキシトリチル化からの溶液をカラムに装填し、樹脂を 8 mL の 0.28% 水性アンモニアで 3 回すすぐ。Wheaton バイアル (12 mL) をカラムの下に配置することができ、生成物を、0.28% 水性アンモニア水中の 2 mL の 45% アセトニトリルで 2 回洗浄することによって溶出することができる。

【0302】

生成物単離：溶液をドライアイス中で凍結させ、バイアルを凍結乾燥機に少なくとも 2 日間入れ、ふわふわした白色粉末を得る。次いで、試料を水中に溶解し、シリンジを使用して 0.22 ミクロンのフィルタ (Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mm シリンジフィルタ、0.2 ミクロンの HT Tuffryn 膜を備える) に通して濾過し、光学密度 (OD) を UV 分光光度計上で測定して、存在するオリゴマーの OD 単位を決定し、かつ分析用の試料を分注する。次いで、溶液を、凍結乾燥のために Wheaton バイアルに戻す。

30

【0303】

MALDI によるモルホリノオリゴマーの分析：MALDI-TOF 質量分析を使用し、精製物中の画分の組成を決定し、かつオリゴマーの同一性 (分子量) の証拠を得ることができる。3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (シナピン酸)、3, 4, 5-トリヒドキシアセトフェノン (THAP)、またはアルファ-シアノ-4-ヒドキシケイ皮酸 (HCCA) の溶液をマトリックスとして用いて希釈した後、試料を実験することができる。

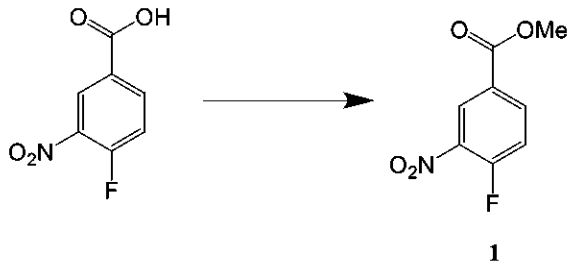
40

【0304】

PMO 合成方法 B：ニトロカルボキシフェニルプロピル (NCP2) アンカーの使用
NCP2 アンカー合成：

1.4-フルオロ-3-ニトロ安息香酸メチルの調製 (1)

【化 1 2 0】



12.7 kg の 4 - フルオロ - 3 - ニトロ安息香酸、40 kg のメタノール、および 2.82 kg の濃硫酸を、100 L フラスコに添加することができる。混合物を、36 時間還流撹拌（65）する。反応混合物を 0 に冷却する。結晶を約 38 で形成することができる。混合物を 0 で 4 時間保持し、次いで窒素下で濾過する。100 L フラスコを洗浄し、濾過ケーキを、0 に冷却されている 10 kg のメタノールで洗浄する。固体濾過ケーキを漏斗上で 1 時間乾燥させ、トレイに移し、室温において真空オープン内で一定重量になるまで乾燥させる。

10

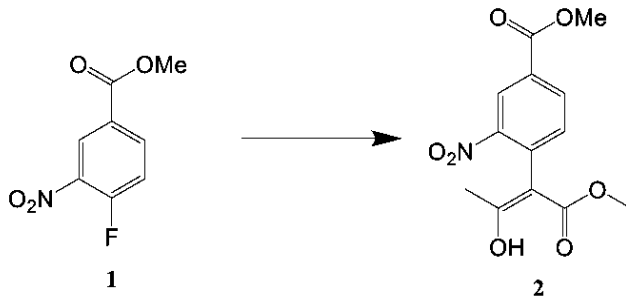
【0305】

2.3 - ニトロ - 4 - (2 - オキソプロピル) 安息香酸の調製

A. (Z) - メチル 4 - (3 - ヒドロキシ - 1 - メトキシ - 1 - オキソブタ - 2 - エン - 2 - イル) - 3 - ニトロ安息香酸塩 (2)

20

【化 1 2 1】



3.98 kg の前のステップからの 4 - フルオロ - 3 - ニトロ安息香酸メチル (1)、9.8 kg の DMF、および 2.81 kg のアセト酢酸メチルを、100 L フラスコに添加することができる。混合物を撹拌し、0 に冷却する。温度を 5 以下に維持しながら、3.66 kg の DBU を約 4 時間にわたって添加する。混合物をさらに 1 時間撹拌する。反応温度を 15 以下に維持しながら、37.5 kg の精製水中の 8.15 kg のクエン酸の溶液を添加する。添加後、反応混合物をさらに 30 分間撹拌し、次いで窒素下で濾過する。湿潤濾過ケーキを 14.8 kg の精製水と共に 100 L フラスコに戻す。スラリーを 10 分間撹拌し、次いで濾過する。湿潤ケーキを 100 L フラスコに再び戻し、14.8 kg の精製水で 10 分間スラリー化し、粗 (Z) - メチル 4 - (3 - ヒドロキシ - 1 -

30

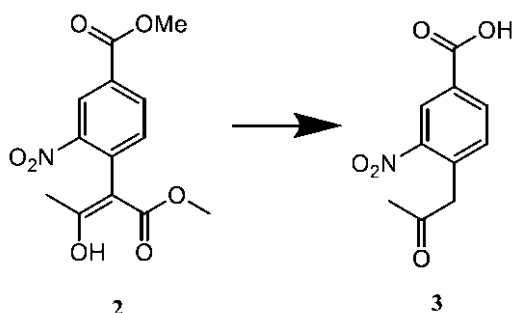
40

【0306】

B. 3 - ニトロ - 4 - (2 - オキソプロピル) 安息香酸

50

【化 1 2 2】



10

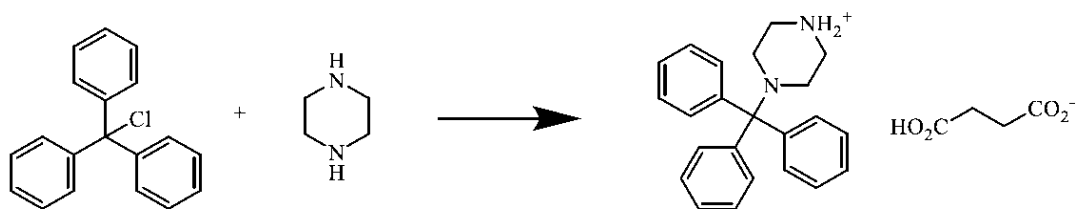
粗 (Z) - メチル 4 - (3 - ヒドロキシ - 1 - メトキシ - 1 - オキソブタ - 2 - エン - 2 - イル) - 3 - ニトロ安息香酸塩を、窒素下で 100 L 反応フラスコに充填することができる。14.2 kg の 1, 4 - ジオキサンを添加し、次いで攪拌する。反応混合物の温度を 15 未満に維持しながら、16.655 kg の濃縮 HCl および 13.33 kg の精製水の溶液 (6 M HCl) を 2 時間にわたって添加する。添加が完了すると、反応混合物を 24 時間還流加熱 (80) し、室温に冷却し、窒素下で濾過する。固体濾過ケーキを 14.8 kg の精製水で粉碎し、濾過し、14.8 kg の精製水で再び粉碎し、濾過する。固体を 39.9 kg の DCM と共に 100 L フラスコに戻し、1 時間攪拌しながら還流させる。1.5 kg の精製水を添加して、残りの固体を溶解する。底部有機層を、予め加温した 72 L フラスコに分配し、次いで、清潔な乾燥 100 L フラスコに戻す。溶液を 0 に冷却し、1 時間保持し、次いで濾過する。固体濾過ケーキを、9.8 kg の DCM および 5 kg のヘプタンの溶液でそれぞれ 2 回洗浄し、次いで漏斗上で乾燥させる。固体をトレイに移し、1.855 kg の一定重量の 3 - ニトロ - 4 - (2 - オキソプロピル) 安息香酸になるまで乾燥させる。

20

【0307】

3. N - トリチルピペラジンコハク酸塩 (NTP) の調製

【化 1 2 3】



30

1.805 kg のトリフェニルメチルクロリドおよび 8.3 kg のトルエン (TPC 溶液) を、窒素下で 72 L ジャケット付きフラスコに充填することができる。混合物を、固体が溶解するまで攪拌する。5.61 kg のピペラジン、19.9 kg のトルエン、および 3.72 kg のメタノールを、窒素下で 100 L ジャケット付き反応フラスコに添加する。混合物を攪拌し、0 に冷却する。反応温度を 10 以下に維持しながら、TPC 溶液を、数回に分けて 4 時間にわたってゆっくりと添加する。混合物を 10 で 1.5 時間攪拌し、次いで 14 に加温させる。32.6 kg の精製水を 72 L フラスコに充填し、次いで内部バッチ温度を 20 + / - 5 に維持しながら、100 L フラスコに移すことができる。層を分割させ、底部水層を分離および保存する。有機層をそれぞれ 32 kg の精製水で 3 回抽出し、水層を分離し、保存された水溶液と組み合わせる。

40

【0308】

残りの有機層を 18 に冷却し、10.87 kg の精製水中の 847 g のコハク酸の溶液を、数回に分けてゆっくりと有機層に添加する。混合物を 20 + / - 5 で 1.75 時間攪拌する。混合物を濾過し、固体を 2 kg の TBME および 2 kg のアセトンで洗浄し、次いで漏斗上で乾燥させる。濾過ケーキを、それぞれ 5.7 kg のアセトンで 2 回粉碎

50

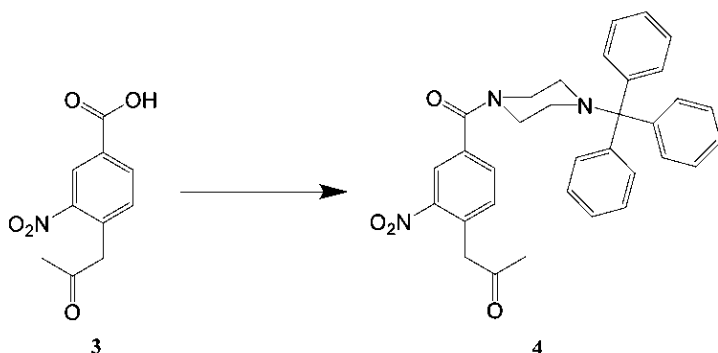
し、濾過し、粉碎間に1kgのアセトンで洗浄する。固体を漏斗上で乾燥させ、次いでトレイに移し、室温において真空オープン内で一定重量になるまで乾燥させる。

【0309】

4. (4-(2-ヒドロキシプロピル)-3-ニトロフェニル)(4-トリチルピペラジン-1-イル)メタノンの調製

A. 1-(2-ニトロ-4(4-トリチルピペラジン-1-カルボニル)フェニル)プロパン-2-オンの調製

【化124】



10

2kgの3-ニトロ-4-(2-オキソプロピル)安息香酸(3)、18.3kgのDCM、および1.845kgのN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC·HCl)を、窒素下で100Lジャケット付きフラスコに充填することができる。溶液を、均質な混合物が形成されるまで攪拌する。3.048kgのNTPを室温で30分間にわたって添加し、8時間攪拌する。5.44kgの精製水を反応混合物に添加し、30分間攪拌する。層を分離させ、生成物を含む底部有機層を排出および保存する。水層を5.65kgのDCMで2回抽出する。組み合わせた有機層を、4.08kgの精製水中の1.08kgの塩化ナトリウムの溶液で洗浄する。有機層を1.068kgの硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過する。硫酸ナトリウムを、1.3kgのDCMで洗浄する。組み合わせた有機層を、252gのシリカゲルでスラリー化し、252gのシリカゲルの床を含むフィルタ漏斗を通して濾過する。シリカゲル床を、2kgのDCMで洗浄する。組み合わせた有機層をロータリーエバポレーター上で蒸発させ、次いで4.8kgのTHFを残渣に添加し、THF中の2.5体積の粗1-(2-ニトロ-4(4-トリチルピペラジン-1-カルボニル)フェニル)プロパン-2-オンに達するまでロータリーエバポレーター上で蒸発させる。

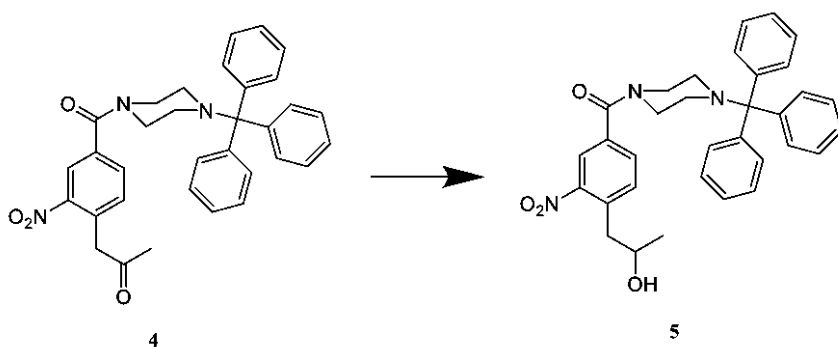
20

30

【0310】

B. (4-(2-ヒドロキシプロピル)-3-ニトロフェニル)(4-トリチルピペラジン-1-イル)メタノン(5)の調製

【化125】



40

3600gの前のステップからの4および9800gのTHFを、100Lジャケット付きフラスコに窒素下で充填することができる。攪拌溶液を5以下に冷却する。溶液を

50

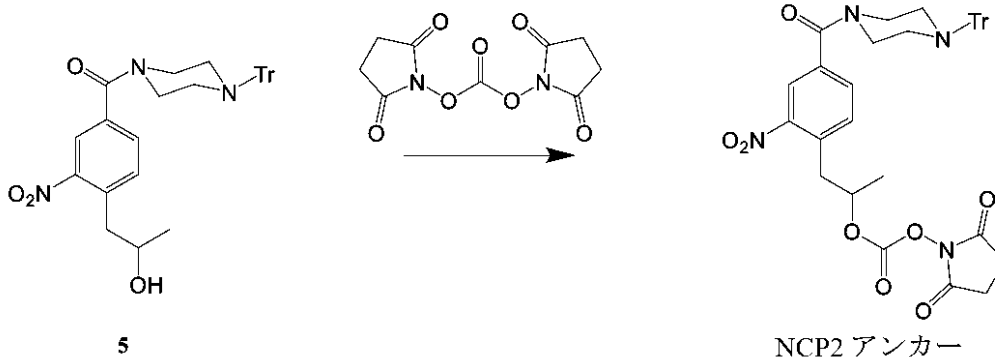
11525 gのエタノールで希釈し、194 gの水素化ホウ素ナトリウムを5 以下で約2時間にわたって添加する。反応混合物を5 以下でさらに2時間攪拌する。反応を、3 kgの水中の1.1 kgの塩化アンモニウムの溶液をゆっくりと添加することによってクエンチして、温度を10 以下に維持する。反応混合物をさらに30分間攪拌し、濾過して無機物を除去し、100 Lジャケット付きフラスコに再充填し、23 kgのDCMで抽出する。有機層を分離し、水層をそれぞれ4.7 kgのDCMでさらに2回抽出する。組み合わせた有機層を、3 kgの水中の800 gの塩化ナトリウムの溶液で洗浄し、次いで2.7 kgの硫酸ナトリウム上で乾燥させる。懸濁液を濾過し、濾過ケーキを2 kgのDCMで洗浄する。組み合わせた濾液を2.0体積に濃縮し、約360 gの酢酸エチルで希釈し、蒸発させる。粗生成物を、窒素下で、DCMで充填した4 kgのシリカのシリカゲルカラムに装填し、7.2 kgのDCM中の2.3 kgの酢酸エチルで溶出する。組み合わせた画分を蒸発させ、残渣を11.7 kgのトルエンに取り込む。トルエン溶液を濾過し、濾過ケーキをそれぞれ2 kgのトルエンで2回洗浄する。濾過ケーキを、一定重量になるまで乾燥させる。

10

【0311】

5.2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル (1 - (2 - ニトロ - 4 - (4 - トリフェニルメチルピペラジン - 1カルボニル) フェニル) プロパン - 2 - イル) 炭酸塩 (NCP2 アンカー) の調製

【化126】



20

4.3 kgの化合物5 (^1H NMRによる残留トルエンに基づいて調整した重量; これ以降の全ての試薬は適宜スケール調整される) および12.7 kgのピリジンを、100 Lジャケット付きフラスコに窒素下で充填することができる。3.160 kgのDSC (^1H NMRにより78.91重量%) を、内部温度を35 以下に維持しながらこれに添加する。反応混合物を周囲室温で約22時間エージングし、次いで濾過する。濾過ケーキを、200 gのピリジンで洗浄する。それぞれ1/2の濾液体積を含む2つのバッチにおいて、濾液洗浄液を、50 kgの水中の11 kgのクエン酸の溶液を含有する100 Lジャケット付きフラスコにゆっくりと充填し、30分間攪拌して、固体沈殿を可能にすることができる。固体をフィルタ漏斗で回収し、1回の洗浄当たり4.3 kgの水で2回洗浄し、フィルタ漏斗上で、真空下で乾燥させる。

30

40

【0312】

組み合わせた固体を、100 Lジャケット付きフラスコに充填し、28 kgのDCM中に溶解し、4.3 kgの水中の900 gの炭酸カリウムの溶液で洗浄する。1時間後、層を分離させ、水層を除去する。有機層を10 kgの水で洗浄し、分離し、3.5 kgの硫酸ナトリウム上で乾燥させる。DCMを濾過し、蒸発させ、真空下で6.16 kgのNCP2 アンカーになるまで乾燥させる。

【0313】

NCP2 アンカー装填樹脂合成

約52 LのNMPおよび2300 gのアミノメチルポリスチレン樹脂を、テフロン (登録商標) 活栓を備えた75 L固相合成反応器に充填し得る。樹脂を、NMP中で約2時間

50

攪拌して膨潤させ、次いで排出する。樹脂を、1回の洗浄当たり4LのDCMで2回、次いで1回の洗浄当たり39Lの中和溶液で2回、次いで1回の洗浄当たり39LのDCMで2回洗浄する。NCP2アンカー溶液を攪拌樹脂溶液にゆっくりと添加し、室温で24時間攪拌し、次いで排出する。樹脂を、1回の洗浄当たり39LのNMPで4回、および1回の洗浄当たり39LのDCMで6回洗浄する。樹脂を、1/2の二炭酸ジエチル(DED C)キャッピング溶液で30分間処理および攪拌し、排出し、残りの1/2のDED Cキャッピング溶液で30分間処理および攪拌し、排出する。樹脂を、1回の洗浄当たり39LのDCMで6回洗浄し、次いでオープン内で3573.71gの一定重量のアンカー装填樹脂になるまで乾燥させる。

【0314】

NCP2アンカーを使用したモルホリノオリゴマーの調製
PMO粗原薬の50L固相合成

1. 材料

【表2】

表2：出発材料

| 材料名 | 化学名 | CAS 番号 | 化学式 | 分子量 |
|----------------|---|--------------|---|-------|
| 活性化 A サブユニット | ホスホルアミド塩化物酸 (Phosphoramidochloridic acid)、N,N-ジメチル-,[6-[6-(ベンゾイルアミノ)-9H-プリン-9-イル]-4-(トリフェニルメチル)-2-モルホリニル]メチルエステル | 1155373-30-0 | C ₃₈ H ₃₇ ClN ₇ O ₄ P | 722.2 |
| 活性化 C サブユニット | ホスホルアミド塩化物酸 (Phosphoramidochloridic acid)、N,N-ジメチル-,[6-[4-(ベンゾイルアミノ)-2-オキソ-1(2H)-ピリミジニル]-4-(トリフェニルメチル)-2-モルホリニル]メチルエステル | 1155373-31-1 | C ₃₇ H ₃₇ ClN ₅ O ₅ P | 698.2 |
| 活性化 DPG サブユニット | プロパン酸、2,2-ジメチル-,4-[[[9-[6-[[[クロロ(ジメチルアミノ)ホスフィニル]オキシ]メチル]-4-(トリフェニルメチル)-2-モルホリニル]-2-[(2-フェニルアセチル)アミノ]-9H-プリン-6-イル]オキシ]メチル]フェニルエステル | 1155309-89-9 | C ₅₁ H ₅₃ ClN ₇ O ₇ P | 942.2 |
| 活性化 T サブユニット | ホスホルアミド塩化物酸 (Phosphoramidochloridic acid)、N,N-ジメチル-,[6-(3,4-ジヒドロ-5-メチル-2,4-ジオキソ-1(2H)-ピリミジニル)-4-(トリフェニルメチル)-2-モルホリニル]メチルエステル | 1155373-34-4 | C ₃₁ H ₃₄ ClN ₄ O ₅ P | 609.1 |
| 活性化 EG3 テール | ブタン二酸、1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-ヘキサヒドロ-1,3-ジオキソ-4,7-メタノ-2H-イソインドール-2-イル]4-[2-[2-[2-[[[4-(トリフェニルメチル)-1-ピペラジニル]カルボニル]オキシ]エトキシ]エトキシ]エチル]エステル | 1380600-06-5 | C ₄₃ H ₄₇ N ₃ O ₁₀ | 765.9 |

出発材料の化学構造：

A . 活性化 E G 3 テール

10

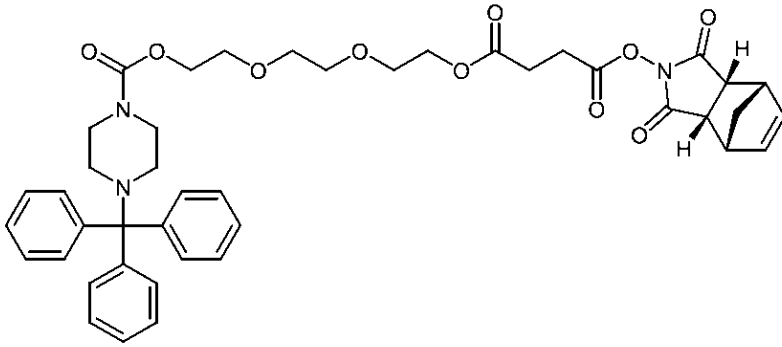
20

30

40

50

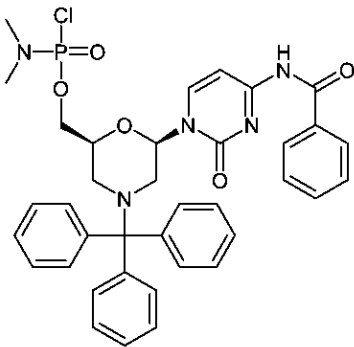
【化 1 2 7】



10

B. 活性化Cサブユニット (調製については、米国特許第 8,067,571号を参照)

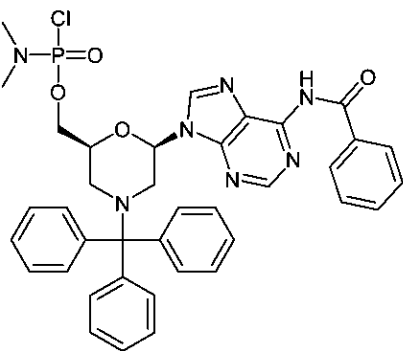
【化 1 2 8】



20

C. 活性化Aサブユニット (調製については、米国特許第 8,067,571号を参照)

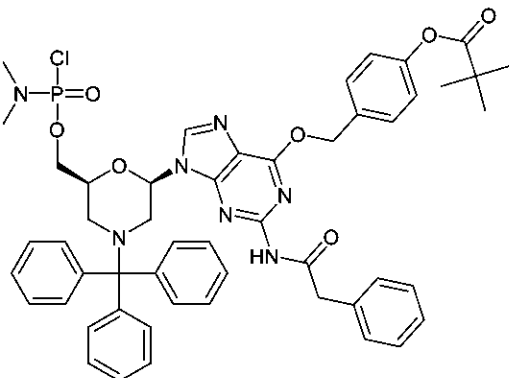
【化 1 2 9】



30

D. 活性化DPGサブユニット (調製については、WO 2009/064471を参照)

【化 1 3 0】

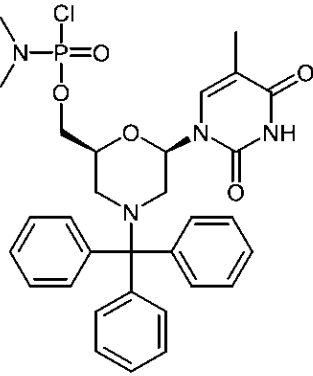


40

50

E．活性化Tサブユニット（調製については、WO2013/082551を参照）

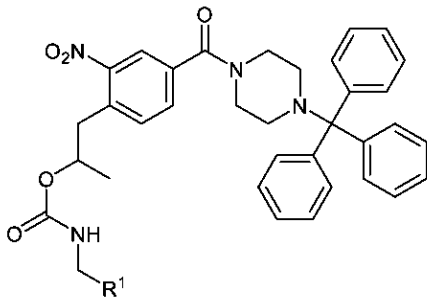
【化131】



10

F．アンカー装填樹脂

【化132】



20

式中、R¹は、支持培地である。

【表3】

表3：PMO粗原薬の固相オリゴマー合成用の溶液の説明

| 溶液名 | 溶液組成 |
|----------------|--|
| NCP2 アンカー溶液 | 37.5L の NMP および 1292g の NCP2 アンカー |
| DEDIC キャッピング溶液 | 4.16L の 二炭酸ジエチル(DEDIC)、3.64L の NEM、および 33.8L の DCM |
| CYTFA 溶液 | 2.02kg の 4-シアノピリジン、158L の DCM、1.42L の TFA、39L の TFE、および 2L の 精製水 |
| 中和溶液 | 35.3L の IPA、7.5L の DIPEA、および 106.5L の DCM |
| 切断溶液 | 1,530.04g の DTT、6.96L の NMP、および 2.98L の DBU |

30

【0315】

2．PMO粗原薬の合成

A．樹脂膨潤

40

750gのアンカー装填樹脂および10.5LのNMPのアリコートをし、50Lのシリコン処理した反応器に充填し、3時間攪拌し得る。NMPを排出し、アンカー装填樹脂を、それぞれ5.5LのDCMで2回、およびそれぞれ5.5Lの30%TFE/DCMで2回、洗浄する。

【0316】

B．サイクル0：EG3テールカップリング

アンカー装填樹脂を、それぞれ5.5Lの30%TFE/DCMで3回洗浄し、排出し、5.5LのCYTFA溶液で15分間洗浄し、排出し、5.5LのCYTFA溶液で15分間、排出することなく再び洗浄し、それに122mLの1:1のNEM/DCMを充填し、懸濁液を2分間攪拌し、排出し得る。樹脂を、5.5Lの中和溶液で5分間、2

50

回洗浄し、排出し、次いでそれぞれ5.5LのDCMで2回洗浄し、排出する。3LのDMI中の706.2gの活性化EG3テールおよび234mLのNEMの溶液を樹脂に充填し、室温で3時間攪拌し、排出し得る。樹脂を、1回の洗浄当たりそれぞれ5.5Lの中和溶液で5分間、2回、次いで5.5LのDCMで1回洗浄し、排出する。2680mLのNMP中の374.8gの無水安息香酸および195mLのNEMの溶液を充填し、15分間攪拌し、排出し得る。樹脂を、5.5Lの中和溶液で5分間攪拌し、次いで5.5LのDCMで1回、およびそれぞれ5.5Lの30%TFE/DCMで2回洗浄する。樹脂を、5.5Lの30%TFE/DCM中に懸濁し、14時間保持する。

【0317】

C. サブユニットカップリングサイクル1～n

【表4】

表4 一般的な塩基サブユニットカップリング

| サイクル番号: サブユニット(SU) | カップリング前の処置 | | | | カップリングサイクル | | カップリング後の処置 | |
|--------------------|------------------|----------------------------|--------|-----------|---|--------------------------------|------------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 数量 SU(g) NEM(L) DMI(L) | 室温 カップ リング 時間 (時間) | 1 | 2 |
| | 30%TFE/DCM 洗浄 | CYTFA 溶液 ¹ | 中和溶液 | DCM 洗浄 | | | DCM 洗浄 | 30%TFE/DCM 洗浄 |
| 1:C | 5.5L | a)5.5L b)5.5L、 122mL | 3×5.5L | 5.5L | 536.7g、 195mL の NEM、 3.2Lの DMI | 5 | 5.5L | 2×5.5L |

¹mLは1:1のNEM/DCMの量を示す

i. カップリング前の処理

各カップリングサイクルの前に、樹脂を、1) 30%TFE/DCMで洗浄し、2) a) CYTFA溶液で15分間処理し、排出し、b) CYTFA溶液で15分間処理し、それに1:1のNEM/DCMを添加し、攪拌し、排出し、3) 中和溶液で3回攪拌し、4) DCMで2回洗浄する。

【0318】

ii. カップリング後の処理

各サブユニット溶液を排出した後、樹脂を、1) DCMで洗浄し、2) 30%TFE/DCMで2回洗浄する。樹脂を次のカップリングサイクルの前に一定期間保持する場合、2回目のTFE/DCM洗浄液は排出せず、樹脂を当該TFE/DCM洗浄溶液中に保持する。

【0319】

iii. 活性化サブユニットカップリングサイクル

各カップリングサイクルを、各塩基含有サブユニットについて表2に初期C(シトシン)モノマーカップリングについて概説するように実施する。

【0320】

iv. 最終IPA洗浄

最終カップリングステップを実施した後、樹脂を、それぞれ19.5LのIPAで8回洗浄し、真空下で室温で約63.5時間乾燥させて、乾燥重量を5,579.8gとする。

【0321】

C. 切断

上記の樹脂結合PMO粗原薬を2ロットに分割し、各ロットを以下のように処理する。2,789.9gの樹脂のロットを、1) 10LのNMPで2時間攪拌し、次いで、NM

10

20

30

40

50

Pを排出し、2)それぞれ10Lの30% TFE/DCMで3回洗浄し、3)10LのCYTFA溶液で15分間処理し、4)10LのCYTFA溶液で15分間処理し、次いでそれに130mLの1:1のNEM/DCMを添加し、2分間攪拌し、排出する。樹脂を、それぞれ10Lの中和溶液で3回処理し、10LのDCMで6回、およびそれぞれ10LのNMPで8回洗浄する。樹脂を、6.96LのNMP中の1530.4gのDTTおよび2980DBUの切断溶液で2時間処理し、PMO粗原薬を樹脂から切り離す。切断溶液を排出し、別個の槽に保持する。反応器および樹脂を、切断溶液と組み合わせた4.97LのNMPで洗浄する。

【0322】

D. 脱保護

組み合わせた切断溶液とNMP洗浄液を圧力槽に移し、それに、冷凍庫内で-10 ~ -25の温度に予め冷却した39.8LのNH₄OH(NH₃・H₂O)を添加した。圧力槽を密封し、45に16時間加熱し、次いで25に冷却させる。PMO粗原薬を含有するこの脱保護溶液を、精製水で3:1に希釈し、pHを2Mリン酸で3.0に、次いでNH₄OHでpH8.03に調整する。

【0323】

E. PMO粗原薬の精製

PMO粗原薬を含有する上記のパートDからの脱保護溶液を、Toyo Pearl Super-Q 650Sアニオン交換樹脂(Tosoh Bioscience)のカラム上に装填し、17カラム体積に対して0~35%Bの勾配で溶出し(緩衝液A:10mMの水酸化ナトリウム、緩衝液B:10mMの水酸化ナトリウム中の1Mの塩化ナトリウム)、許容される純度の画分(C18およびSCX HPLC)をプールして、精製された医薬品溶液とする。

【0324】

精製された原薬溶液を脱塩し、凍結乾燥させて、精製されたPMO原薬とする。

【表5】

表5. 頭字語

| 頭字語 | 名称 |
|-------|----------------------|
| CYTFA | 4-シアノピリジントリフルオロ酢酸 |
| CPP | 細胞膜透過性ペプチド |
| DBU | 1,8-ジアザビシクロウンデク-7-エン |
| DCM | ジクロロメタン |
| DEDC | 二炭酸ジエチル |
| DIPEA | N,N-ジイソプロピルエチルアミン |
| DMI | 1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン |
| DMSO | ジメチルスルホキシド |
| DTT | DL-ジチオスレイトール |
| HPLC | 高性能液体クロマトグラフィー |
| IPA | イソプロピルアルコール |
| MW | 分子量 |
| NEM | N-エチルモルホリン |
| NMP | N-メチル-2-ピロリドン |
| SAX | 強力なアニオン交換 |
| SCX | 強力なカチオン交換 |
| SPE | 固相抽出 |
| RT | 室温 |
| TFA | 2,2,2-トリフルオロ酢酸 |
| TFE | 2,2,2-トリフルオロエタノール |

10

20

30

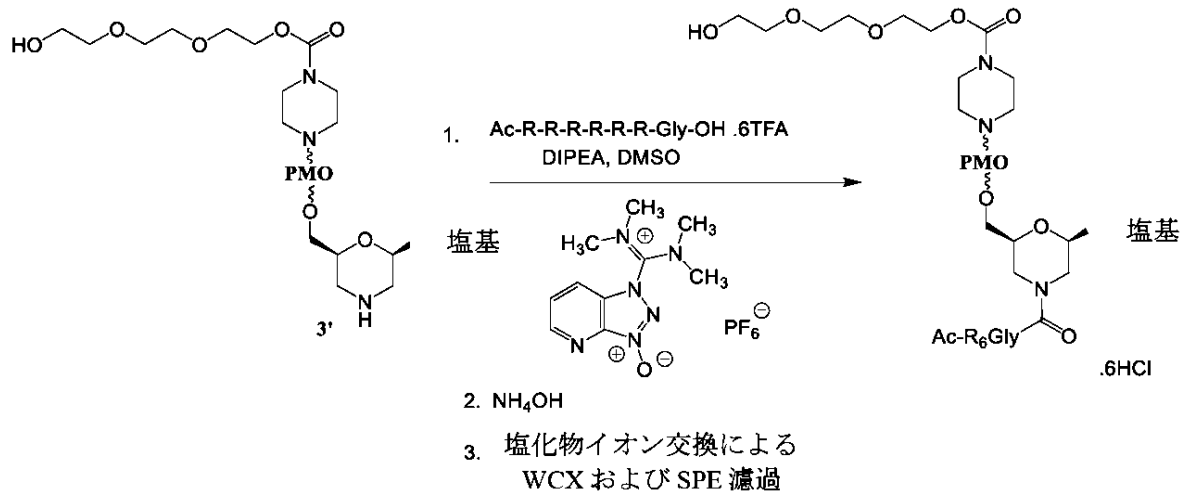
40

50

【0325】

C P Pコンジュゲート(「R6Gly」は、配列番号：11として開示される)

【化133】



10

分析手順：マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量スペクトル(MALDI-TOF-MS)を、シナピン酸(SA)マトリックスを使用して、Bruker Autoflex(商標)Speed上で記録することができる。3000ダイオードアレイ検出器およびProPacTM SCX-20カラム(250×4mm)を備えたThermo Dionex Ultimate 3000システム上で、1.0mL/分の流速(pH=2、カラム温度30)を使用して、SCX-HPLCを実施することができる。移動相は、A(24mMのH₃PO₄を含有する水中の25%アセトニトリル)およびB(1MのKClおよび24mMのH₃PO₄を含有する水中の25%アセトニトリル)であり得る。勾配溶出を用い得る：0分、35% B；2分、35% B；22分、80% B；25分、80% B；25.1分、35% B；30分、35% B。

20

【0326】

Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH(配列番号：11)ヘキサトリフルオロアセテート(614.7mg、0.354mmol)、および1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロリン酸塩(HATU、134.4mg、0.354mmol)、およびジメチルスルホキシド(DMSO、20mL)を、PMO(2日間の凍結乾燥によって新たに乾燥させた)の混合物に添加する。混合物を室温で3分間攪拌し、次いで、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA、68.5mg、0.530mmol)を添加する。5分後、濁った混合物は、透明な溶液になる。反応をSCX-HPLCによって監視することができる。2時間後、20mLの10%水酸化アンモニウム溶液(2.8% NH₃*H₂O)を添加する。混合物を室温でさらに2時間攪拌する。反応を400mLの水の添加によって終了する。トリフルオロエタノール(2.0mL)を溶液に添加する。

30

40

【0327】

溶液を2つの分量に分割し、各分量をWCXカラム(カラム当たり10gの樹脂)によって精製することができる。各WCXカラムを、最初に水中の20%アセトニトリル(v/v)で洗浄して、PMO出発材料を除去する。MALDI-TOF質量スペクトル分析がPMOシグナルの不在を示す場合、洗浄(各カラムに対して225mL)を停止することができる。次いで、各カラムを水(カラム当たり100mL)で洗浄する。所望の生成物を、2.0MのグアニジンHCl(各カラムに対して140mL)で溶出することができる。精製溶液を一緒にプールし、次いで2つの分量に分割し、各々をSPEカラム(各カラムに対して10gの樹脂)によって脱塩する。

【0328】

50

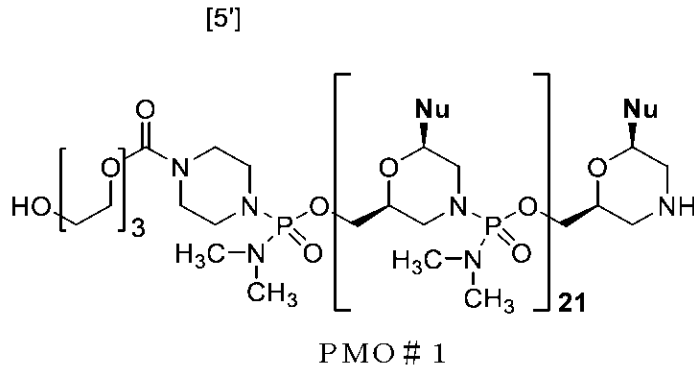
SPEカラムを、最初に1.0MのNaCl水溶液(各カラムに対して100mL)で洗浄して、六塩酸塩の塩形態を生成することができる。次いで、各SPEカラムを水(各カラムに対して200mL)で洗浄する。最終脱塩生成物は、水中の50%アセトニトリル(v/v、各カラムに対して150mL)を使用して溶出することができる。アセトニトリルは減圧下で排出することにより除去することができる。得られた水溶液を凍結乾燥して、六塩酸塩として所望の生成物を得ることができる。

【0329】

実施例1: PMO

上述のPMO合成方法を使用して、PMO#1、PMO#2、およびPMO#3を以下のように合成した。

【化134】

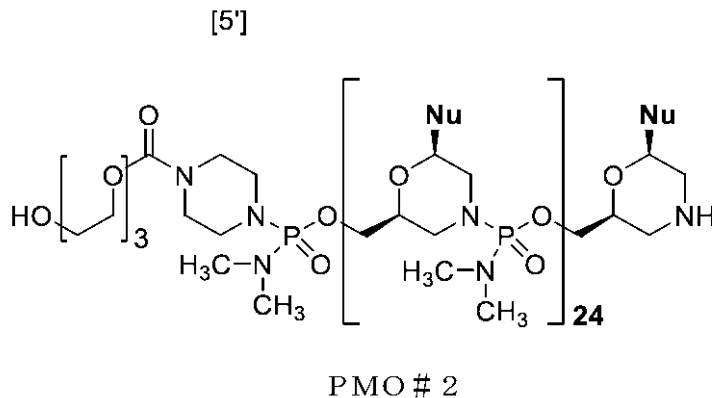


式中、1~22および5'から3'の各Nuは、H50D(+04-18)(配列番号:1)である。

【表23】

| 位置 5'から3' | Nu | 位置 5'から3' | Nu | 位置 5'から3' | Nu | 位置 5'から3' | Nu | 位置 5'から3' | Nu |
|--------------|----|--------------|----|--------------|----|--------------|----|--------------|----|
| 1 | G | 6 | C | 11 | A | 16 | T | 21 | G |
| 2 | G | 7 | C | 12 | T | 17 | A | 22 | C |
| 3 | G | 8 | A | 13 | A | 18 | C | | |
| 4 | A | 9 | G | 14 | C | 19 | A | | |
| 5 | T | 10 | T | 15 | T | 20 | G | | |

【化135】



式中、1~25および5'から3'の各Nuは、H50D(+07-18)(配列番号:2)である。

10

20

30

40

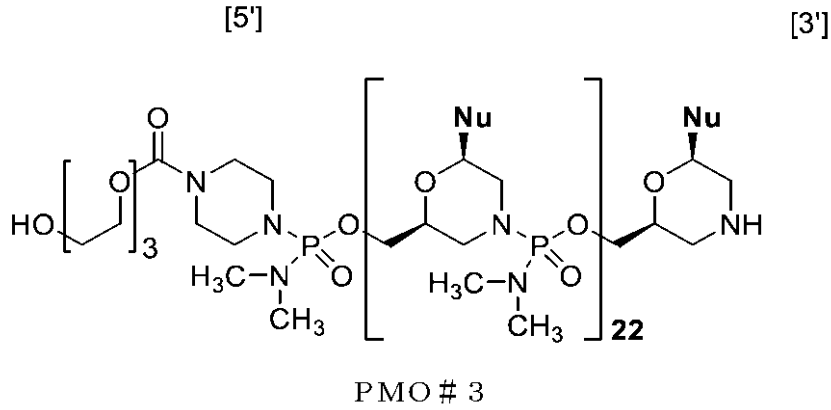
50

【表 2 4】

| 位置 5'から 3' | Nu | 位置 5'から 3' | Nu | 位置 5'から 3' | Nu | 位置 5'から 3' | Nu | 位置 5'から 3' | Nu |
|---------------|----|---------------|----|---------------|----|---------------|----|---------------|----|
| 1 | G | 6 | C | 11 | A | 16 | T | 21 | G |
| 2 | G | 7 | C | 12 | T | 17 | A | 22 | C |
| 3 | G | 8 | A | 13 | A | 18 | C | 23 | T |
| 4 | A | 9 | G | 14 | C | 19 | A | 24 | C |
| 5 | T | 10 | T | 15 | T | 20 | G | 25 | C |

【化 1 3 6】

10



20

式中、1 ~ 23 および 5' から 3' の各 Nu は、H50D(+07-16) (配列番号 : 3) である。

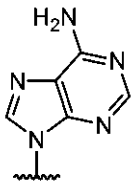
【表 2 5】

| 位置 5'から 3' | Nu | 位置 5'から 3' | Nu | 位置 5'から 3' | Nu | 位置 5'から 3' | Nu | 位置 5'から 3' | Nu |
|---------------|----|---------------|----|---------------|----|---------------|----|---------------|----|
| 1 | G | 6 | A | 11 | A | 16 | C | 21 | T |
| 2 | A | 7 | G | 12 | C | 17 | A | 22 | C |
| 3 | T | 8 | T | 13 | T | 18 | G | 23 | C |
| 4 | C | 9 | A | 14 | T | 19 | G | | |
| 5 | C | 10 | T | 15 | A | 20 | C | | |

30

式中、A は、

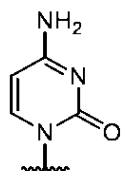
【化 1 3 7】



40

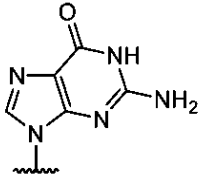
であり、C は、

【化 1 3 8】

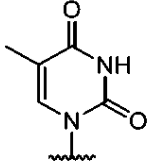


50

であり、Gは、
【化139】



であり、Tは、
【化140】



である。

【0330】

PMO # 1 (配列番号: 1) は、医薬品製剤を許容にするには限定されすぎた溶解性特性を有する生成物をもたらし、PMO # 2 (配列番号: 2) は、十分な収率および純度を有して製造することができない生成物をもたらした。

【0331】

PMO # 1 および PMO # 2 の合成とは対照的に、PMO # 3 (5' 末端の PMO # 2 とは 2 塩基のみが異なる) の合成は、溶解性または精製の問題がなく、PMO # 3 からの PPMO # 3 のその後の合成を可能にした (実施例 2 - 以下)。

【表 2 6】

| 標的化配列(5'から3') | 配列番号: | PMO 製造の問題: |
|---------------------------|-------|---|
| GGGATCCAGTATACTTACAGGC | 1 | 溶解性:粗 PMO は保存後に沈殿し、その後の PPMO 合成を実行不可能にし、かつ医薬品候補として役立つには限定された溶解性および溶液安定性を示す。 |
| GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC | 2 | 精製:粗 PMO は、その後の PPMO 合成に必要な、かつ医薬品候補としての役立つのに適切な純度レベルまで精製することができなかった。 |
| GATCCAGTATACTTACAGGCTCC | 3 | なし(純度 91%、水中に溶解する) |

【0332】

類似のプロセスを使用して、PMO # 4、PMO # 5、PMO # 6、PMO # 7、PMO # 8、および PMO # 9 を合成した。

【0333】

実施例 2 : PPMO # 3

上述のプロトコルを使用して、PPMO # 3 を PMO # 3 (配列番号 3) から合成した。

10

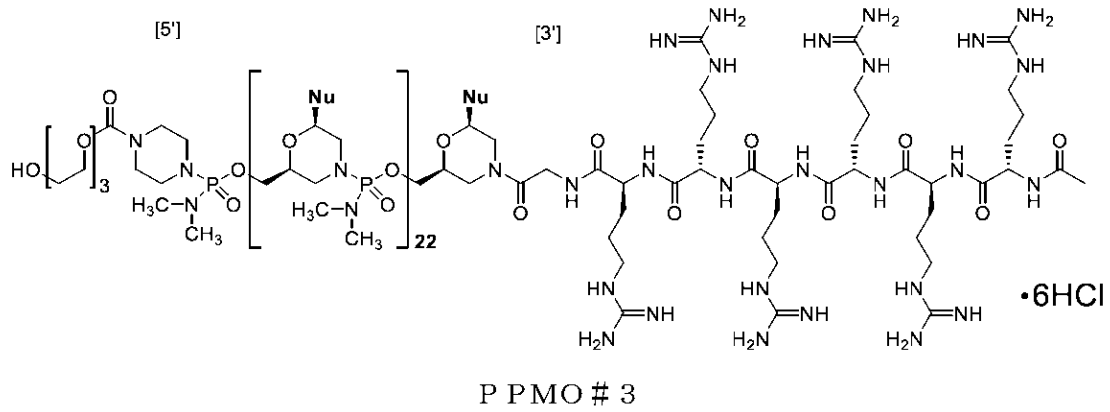
20

30

40

50

【化 1 4 1】



10

式中、1～23および5'から3'の各Nuは、配列番号：3である。

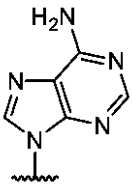
【表 2 7】

| 位置 5'から3' | Nu | 位置 5'から3' | Nu | 位置 5'から3' | Nu | 位置 5'から3' | Nu | 位置 5'から3' | Nu |
|--------------|----|--------------|----|--------------|----|--------------|----|--------------|----|
| 1 | G | 6 | A | 11 | A | 16 | C | 21 | T |
| 2 | A | 7 | G | 12 | C | 17 | A | 22 | C |
| 3 | T | 8 | T | 13 | T | 18 | G | 23 | C |
| 4 | C | 9 | A | 14 | T | 19 | G | | |
| 5 | C | 10 | T | 15 | A | 20 | C | | |

20

式中、Aは、

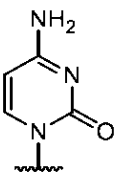
【化 1 4 2】



30

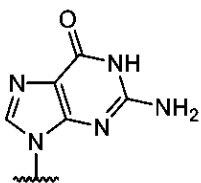
であり、Cは、

【化 1 4 3】



であり、Gは、

【化 1 4 4】

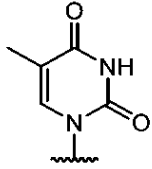


であり、Tは

40

50

【化 1 4 5】



である。

【0 3 3 4】

実施例 3 : *in vitro*でのエクソン 50 スキッピング

以下の表に記載されるように、ヒトジストロフィン (DMD) エクソン 50 を標的とする 2 つの化合物、PMO # 3 および PPMO # 3 (両方が同じ配列を含有する) を、健康なヒト筋管における DMD エクソン 50 スキッピングについて評価した。

【表 2 8】

PMO # 3 および PPMO # 3 の配列 :

| 名称 | 標的化配列(TS) | 配列番号 | 5' | 3' |
|--------|-------------------------|------|-----|-----------------------------|
| PMO#3 | GATCCAGTATACTTACAGGCTCC | 3 | EG3 | H |
| PPMO#3 | GATCCAGTATACTTACAGGCTCC | 3 | EG3 | -G-R ₆ (配列番号:11) |

【0 3 3 5】

具体的には、健康なヒト筋芽細胞 (Zen-Bio, Inc. から購入したパッセージ 5 ~ 6、SKB-F-SL) を、低血清培地 (SKM-D、Zen-Bio, Inc.) 中でインキュベートすることにより分化を開始する前に、SKM-M 培地中で 80 ~ 90 % の培養密度を達成するように培養した。分化の 5 日後、成熟筋管を様々な濃度 (すなわち、40 μ m、20 μ m、10 μ m、5 μ m、2.5 μ m、および 1.25 μ m) で上記化合物とインキュベートした。96 時間のインキュベーション後、筋管を PBS で洗浄し、1 % の β -メルカプトエタノールを補充した RNeasy Micro キット (カタログ番号 74004、Qiagen) 中で RLT 緩衝液により溶解した。RNA を溶出するために 20 μ L の RNase 不含水を使用したことを除いて、製造業者の推奨に従って全 RNA を単離した。

【0 3 3 6】

両方の化合物による DMD エクソン 50 スキッピングを決定するために、ワンステップエンドポイント RT-PCR を実施した。cDNA 合成および PCR 増幅は、100 ng の総 RNA、遺伝子特異的プライマー、および SuperScript III ワンステップ RT-PCR システムをプラチナ Taq DNA ポリメラーゼ (カタログ番号 12574-026、Invitrogen) と共に使用して実行した。遺伝子特異的プライマーを、ヒト DMD エクソン 49 および 52 (フォワードプライマー : CCA GCC ACT CAG CCA GTG AAG (配列番号 : 12)、リバースプライマー : CGA TCC GTA ATG ATT GTT CTA GCC (配列番号 : 13)) で標的化するように設計した。cDNA 合成および PCR 増幅は、表 6 に示されるプログラムを使用して、BioRad CFX 96 リアルタイムサーマルサイクラーによって実施した。スキッピングされたおよびスキッピングされていない PCR 産物の発現を、製造業者の説明書に従って、DNA 1K 試薬 (カタログ番号 760517 および CLS 760673、Perkin Elmer) により調製された LabChip GX システムの DNA 拡張範囲 LabChip 上に 22 μ L の PCR 産物を装填することによって評価した。DMD エクソン 50 スキッピングの割合を、スキッピングされたおよびスキッピングされていないバンドの合計モル濃度 (nmol/L) と比較した、エクソン 50 スキッピングされたバンドのモル濃度の割合として計算する。

10

20

30

40

50

【0337】

両側の、対応のないスチューデントのt検定（等分散的）を使用して、2群の平均値が各用量で互いに統計的に異なるかどうかを評価した。0.05未満のP値は、統計的に有意であると考えられる。

【表6】

表6. エクソン50スキッピングありまたはなしで、DMDアンプリコンを増幅させるために使用されるサーモサイクラープログラム。

| ステップ | 温度 | 時間 |
|----------------|--------|-----|
| 1.逆転写 | 55℃ | 30分 |
| 2.逆転写酵素の不活性化 | 94℃ | 2分 |
| 3.変性 | 94℃ | 45秒 |
| 4.アニール | 59℃ | 45秒 |
| 5.伸長 | 68℃ | 1分 |
| 6.ステップ3~4を繰り返す | 45サイクル | |
| 7.最終伸長 | 68℃ | 10分 |
| 8.保存 | 4℃ | ∞ |

10

【0338】

結果は、PPMO#3がPMO#3と比較してDMDエクソン50スキッピングを有意に増加させることを示し、（PPMO#3のPMO#に対するスキッピングの比率として）以下の表に示される。

20

【表7】

表7. ヒト筋管におけるPMO#3およびPPMO#3によるDMDエクソン50スキッピングの割合。

| 化合物/ 用量(μm) | 相対的エクソンスキッピング | | | | | |
|----------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1.25 | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 40 |
| PMO#3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| PPMO#3 | 2.6 | 3.2 | 3.0 | 2.4 | 2.1 | 1.9 |

30

【0339】

上記の表7のデータは、全ての濃度でのPMO#3と比較して、細胞がPPMO#3で処理された場合に、より高いエクソン50スキッピングが筋管において生じることを示す。この改善は、実施例4の非ヒト霊長類（NHP）研究などのin vivo比較試験でさらに実証され得、NHPは、PPMO#3またはPMO#3で処理され、エクソン50スキッピングは、様々な関連する筋組織で測定される（詳細は実施例4を参照）。

【0340】

実施例4：NHPにおけるエクソン50スキッピング

PPMOアンチセンスオリゴマーのエクソンスキッピングの有効性をさらに実証するために、非ヒト霊長類を利用する。具体的には、無傷の筋組織を有するカニクイザルに、PPMO#3（実施例2）、PMO#3（実施例1）、または生理食塩水を静脈内注射する。

40

【0341】

動物を、臨床観察（例えば、皮膚および毛皮の評価、呼吸への影響）ならびに体重測定を含め、研究全体を通して観察する。血液および尿検体を、少なくとも検査開始前、ならびに初回投与および最終投与の24時間後（該当する場合）に採取する。

【0342】

予定された各剖検時に、または臨終に安楽死させた時に、横隔膜、十二指腸の平滑筋、食道、および大動脈、大腿四頭筋、三角筋、二頭筋、および心臓の切片を採取し、急速凍結させる。エクソン50スキッピング率を、上記のようにRT-PCRを使用して決定す

50

る。

【0343】

実施例5：in vitroでのPMOによるエクソン50スキッピング

一連のPMO（配列番号1～7、PMO#1～#7）を調製し、エクソン50スキッピングの効率について試験した。簡潔に言うと、ヒトの初代筋芽細胞を、標準的な技術を使用して培養した。凍結乾燥したPMOをヌクレアーゼ不含水に再懸濁し、モル濃度を検証するために、PMO溶液をNanoDrop 2000分光光度計（Thermo Scientific）を使用して測定した。用量範囲のPMOを、製造業者の説明書およびP3キット（Lonza）に従い、ヌクレオポレーションを使用して筋芽細胞（例えば、0.625、1.25、2.5、5、10、および20 μM）に送達し、RNA抽出前に、37、5%のCO₂のインキュベーター中で一晩インキュベートした。RNAを、GE Healthcare製のRNA spin 96ウェルRNA単離キットを使用してPMO処理細胞から抽出し、ヒトDMDエクソン49～52を増幅させたプライマーと共に標準的な技術を使用してRT-PCRに供した。Caliper LabChipバイオアナライザーを使用してスキッピングを測定し、エクソンスキッピング%（すなわち、全長PCR産物と比較したエクソンスキッピングされた産物のバンド強度）を、式[エクソン50スキッピングされた産物 / (エクソン50スキッピングされた産物とエクソン50スキッピングされていない産物との合計) × 100]によって計算し、EC₅₀値を、各濃度で誘導されたスキッピング率に基づいて計算した。表8に示されるように、エクソン50のスプライスアクセプターまたはスプライスドナー領域を標的とするように設計された本開示のPMOオリゴマーは、エクソン50のスキッピングをPMO#1、PMO#2、およびPMO#3で提供し、最高レベルのエクソン50スキッピング活性（EC₅₀ < 1.0 μM）を提供した。

【表8】

表8.

| 配列番号: | 化合物 | 活性(EC ₅₀ ⁽¹⁾) |
|-------|---------------|--------------------------------------|
| 1 | PMO#1(+04-18) | **** |
| 2 | PMO#2(+07-18) | **** |
| 3 | PMO#3(+07-16) | **** |
| 4 | PMO#4(+07-17) | ** |
| 5 | PMO#5(-19+07) | ** |
| 6 | PMO#6(+07-15) | * |
| 7 | PMO#7(-02+23) | * |

【0344】

(1) **** = EC₅₀ 1.0 μM未満、** = EC₅₀ 1.0 ~ 3.0 μM、* = EC₅₀ 3.0 μM以上。

前述の発明を実施するための形態および不随する実施例は、単に例示であり、添付の特許請求の範囲およびそれらの同等物によってのみ定義される本発明の範囲に対する限定として取られるべきではないことを理解されたい。

【0345】

本開示の実施形態に対する様々な変更および修正は、当業者に明らかであろう。本発明の化学構造、置換基、誘導體、中間体、合成、組成物、製剤、または使用方法に関連するものを含むがこれに限定されない、このような変更および修正は、それらの趣旨または範囲から逸脱することなく行われ得る。

10

20

30

40

50

【表 2 9】

配列表*

| 説明 | PMO 識別子 | PPMO 識別子 | 配列(5'から3'またはN末端からC末端) | 配列番 号 |
|------------------------------------|--|-------------|-------------------------------------|----------|
| H50D(+04-18) | PMO#1 | PPMO#1 | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C | 1 |
| H50D(+07-18) | PMO#2 | PPMO#2 | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 2 |
| H50D(+07-16) | PMO#3 | PPMO#3 | GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC | 3 |
| H50D(+07-17) | PMO#4 | PPMO#4 | GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 4 |
| H50A(-19+07) | PMO#5 | PPMO#5 | ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC | 5 |
| H50D(+07-15) | PMO#6 | PPMO#6 | ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C | 6 |
| H50A(-02+23) | PMO#7 | PPMO#7 | GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T | 7 |
| H50D(+06-18) | PMO#8 | PPMO#8 | GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC | 8 |
| H50D(+07-20) | PMO#9 | PPMO#9 | ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC | 9 |
| R ₆ | | | RRRRRR | 10 |
| R ₆ G | | | RRRRRRG | 11 |
| ヒトエクソン 49 結合順方向 プライマー | | | CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG | 12 |
| ヒトエクソン 52 結合逆方向 プライマー | | | CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC | 13 |
| PMO-G | PMO-G | PPMO-G | GTTGCCTCCGGTCTGAAGGTGTTC | 14 |
| (RXR) ₄ | | | RXRRXRRXRRXR | 15 |
| (RFF) ₃ R | | | RFFRFFRFFR | 16 |
| (RXR) ₄ XB | | | RXRRXRRXRRXRXB | 17 |
| (RFF) ₃ RXB | | | RFFRFFRFFRXB | 18 |
| (RFF) ₃ RG | | | RFFRFFRFFRG | 19 |
| R ₅ G | | | RRRRRG | 20 |
| R ₅ | | | RRRRR | 21 |
| イントロン 49-エクソン 50-イントロン 50 | atctcaaatggttaacgaataagtaagtgtgatgcttttctgttaaagAGGAAGTTAGAAGATCTGAGCTCTG AGTGGAAGGCGGTAAACCGTTTACTTCAAGAGCTGAGGGCAAA GCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCCTg taagtatactggatcccattctttggctctagctattgttcaaaag | | 22 | |

* 核酸塩基を連結するために利用される化学物質に応じて、Tは、チミンまたはウラシル
であり得る。

【配列表】

[0007658900000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

| | | | |
|---------|------------------|---------|---------|
| A 6 1 K | 31/7088(2006.01) | A 6 1 K | 48/00 |
| A 6 1 K | 31/712(2006.01) | A 6 1 K | 31/7088 |
| A 6 1 K | 47/64 (2017.01) | A 6 1 K | 31/712 |
| | | A 6 1 K | 47/64 |

気付

(72)発明者

ツァイ, バオジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ファースト ストリート 2 1
5, サレプタ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

デサイ, アンクール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ファースト ストリート 2 1
5, サレプタ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

ベストウィック, リチャード ケー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, ファースト ストリート 2 1
5, サレプタ セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

審査官 市島 洋介

(56)参考文献

特表2018-530560(JP,A)

(58)調査した分野

(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)