(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-541639
(P2023-541639A)
(43)公表日　令和5年10月3日(2023.10.3)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/54 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/54	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*9/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ	*15/87 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/87	Ｚ

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全73頁）　最終頁に続く

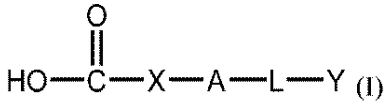
(21)出願番号　特願2023-516798(P2023-516798)
(86)(22)出願日　令和3年9月15日(2021.9.15)
(85)翻訳文提出日　令和5年5月12日(2023.5.12)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/075386
(87)国際公開番号　WO2022/058386
(87)国際公開日　令和4年3月24日(2022.3.24)
(31)優先権主張番号　63/079,179
(32)優先日　令和2年9月16日(2020.9.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　391008951
アストラゼネカ・アクチエボラーグ
ＡＳＴＲＡＺＥＮＥＣＡ ＡＫＴＩＥＢＯＬＡＧ
スウェーデン国エスエー－１５１ ８５ セーデルテイエ
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷 道子
(74)代理人　100156144
弁理士　落合 康
(72)発明者　アンデション，シャリニ
スウェーデン、エスエー－１５１ ８５ セーデルテイエ、アストラゼネカ・アクチエボラーグ
(72)発明者　クネール，ダニエル ローラン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　脂肪酸にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチド

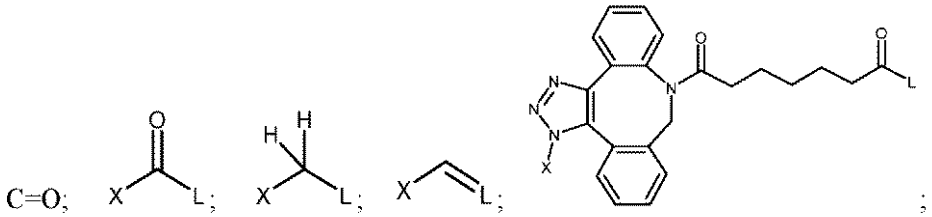
(57)【要約】
体内の特定の組織へのオリゴヌクレオチドの送達を可能にする脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドが提供される。コンジュゲートオリゴヌクレオチド上の脂質は、遊離末端カルボン酸基を有するアシル基を含む。また、遊離末端カルボン酸基を有するアシル基を含む脂質を有する脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドを合成するための方法、並びに脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドを送達するための方法、及び疾患を治療するために脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドを使用するための方法も提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）カルボキシアシル基；
ｂ）オリゴヌクレオチド；及び
ｃ）前記カルボキシアシル基を前記オリゴヌクレオチドに接続するリンカー
を含む、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項２】
前記カルボキシアシル基が、C_4～C_{32}である、請求項１に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項３】
前記カルボキシアシル基が、飽和である、請求項１又は２に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項４】
前記カルボキシアシル基が、一価不飽和又は多価不飽和である、請求項１又は２に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項５】
前記リンカーが、前記オリゴヌクレオチドの５’末端に結合している、請求項１～４のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項６】
前記リンカーが、前記カルボキシアシル基に接続されたアミノ末端を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項７】
前記リンカーが、前記オリゴヌクレオチドに接続されたリン酸末端を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項８】
前記オリゴヌクレオチドが、ＤＮＡである、請求項１～７のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項９】
前記オリゴヌクレオチドが、ＲＮＡである、請求項１～８のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１０】
前記オリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項１～９のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１１】
前記オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである、請求項１～１０のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１２】
式（Ｉ）：
【化１】

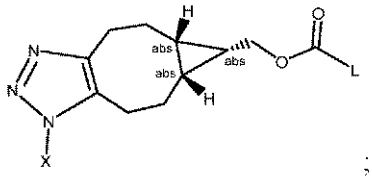
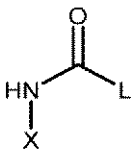
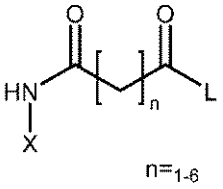
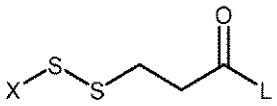


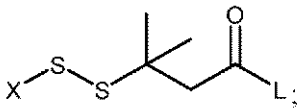
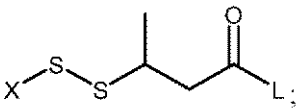
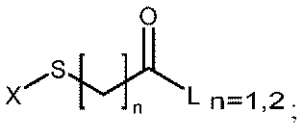
（式中、
Ｘは、C_4～C_{32}アルキル又はアルケニルであり；
Ａは、コンジュゲーション基であり；
Ｌは、リンカーであり；
Ｙは、オリゴヌクレオチドである）
の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１３】

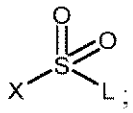
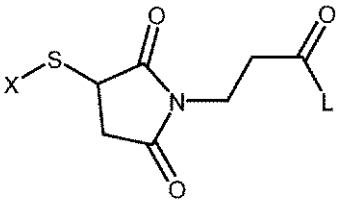
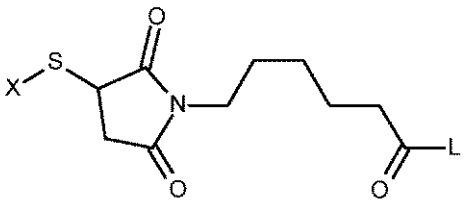
Ｘが、Ｃ１０～Ｃ２６アルキル又はアルケニルである、請求項１２に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１４】
Ｘが、Ｃ１４、Ｃ１６、又はＣ２２アルキル又はアルケニルである、請求項１２に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１５】
Ｘが、Ｃ１０～Ｃ２６アルキルである、請求項１２に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１６】
Ｘが、Ｃ１０～Ｃ２２アルキルである、請求項１５に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１７】
Ｘが、Ｃ１４アルキル、Ｃ１６アルキル、又はＣ２２アルキルである、請求項１５に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１８】
Ｘが、アルケニルである、請求項１５に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項１９】
Ｘが、Ｃ１０～Ｃ２６アルケニルである、請求項１８に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項２０】
Ａが、
【化２】

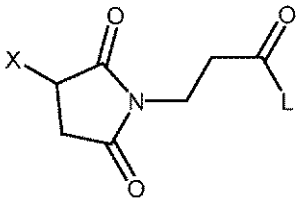
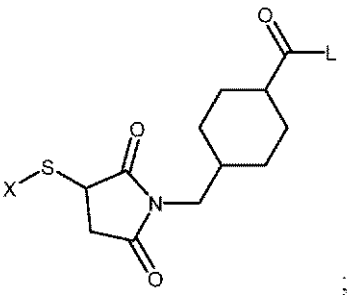
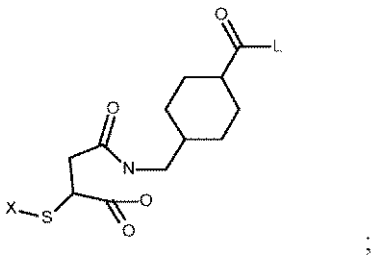


【化３】


;

;

n=1-6 ;

;


;

;

n=1,2 ;

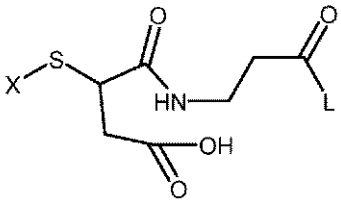
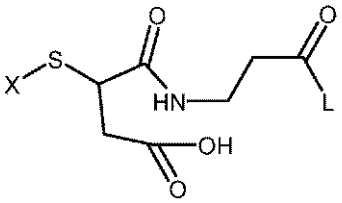

;

;



;

;

;

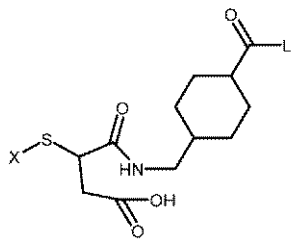
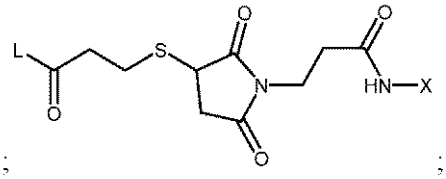
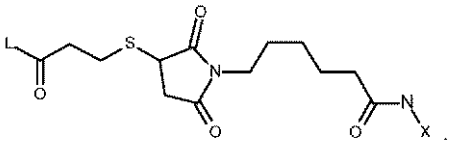
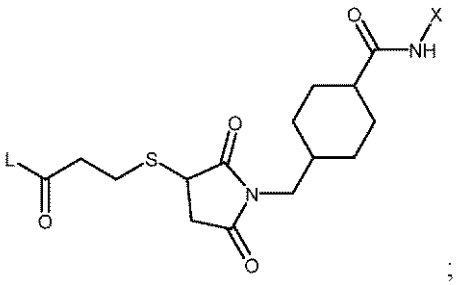
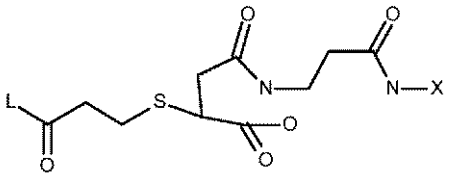
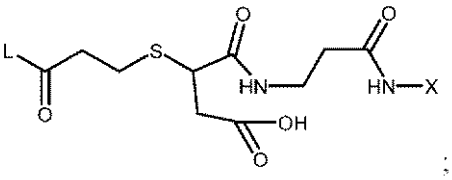
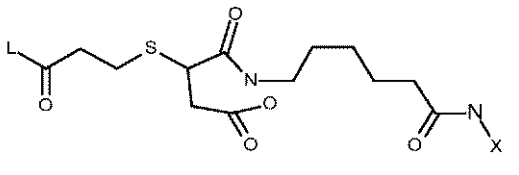
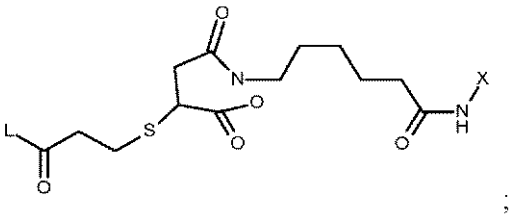
;

;

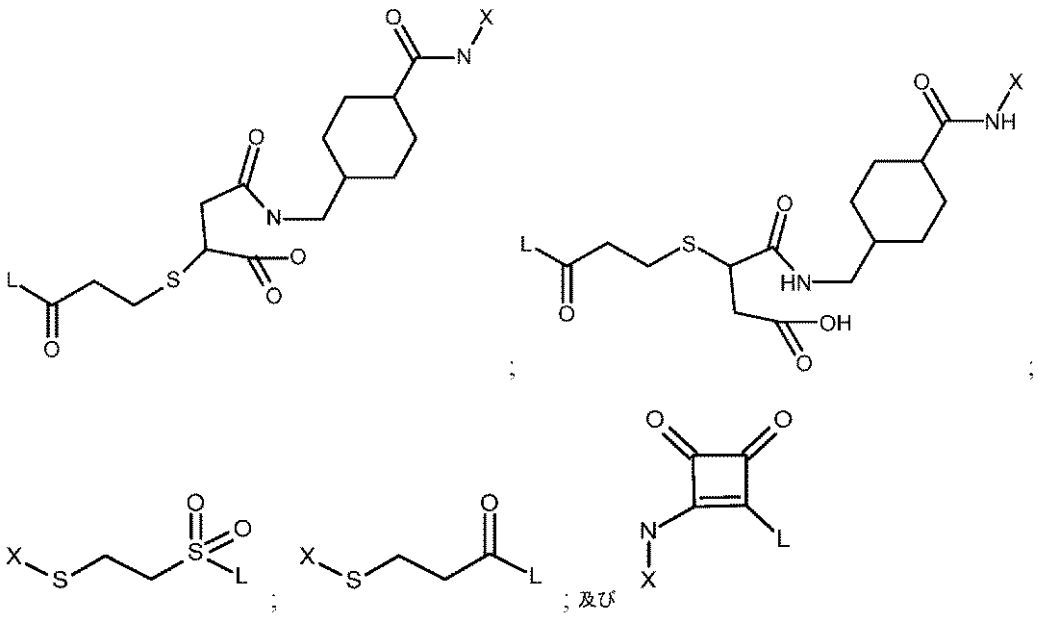
;


;

;

【化４】


;

;

;

;

;

;

;

;

【化５】


;

;

;

;及び

から選択される、請求項１２に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。

【請求項２１】

Ａが、Ｃ＝Ｏである、請求項２０に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。

【請求項２２】

前記リンカー（Ｌ）が、前記オリゴヌクレオチドの５’末端に結合している、請求項１～２１のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。

【請求項２３】

前記リンカー（Ｌ）が、前記カルボキシアシル基に接続されたアミノ末端を含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。

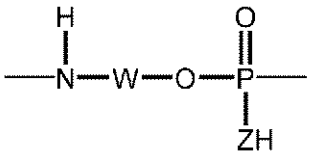
【請求項２４】

前記リンカー（Ｌ）が、前記オリゴヌクレオチドに接続されたリン酸末端を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。

【請求項２５】

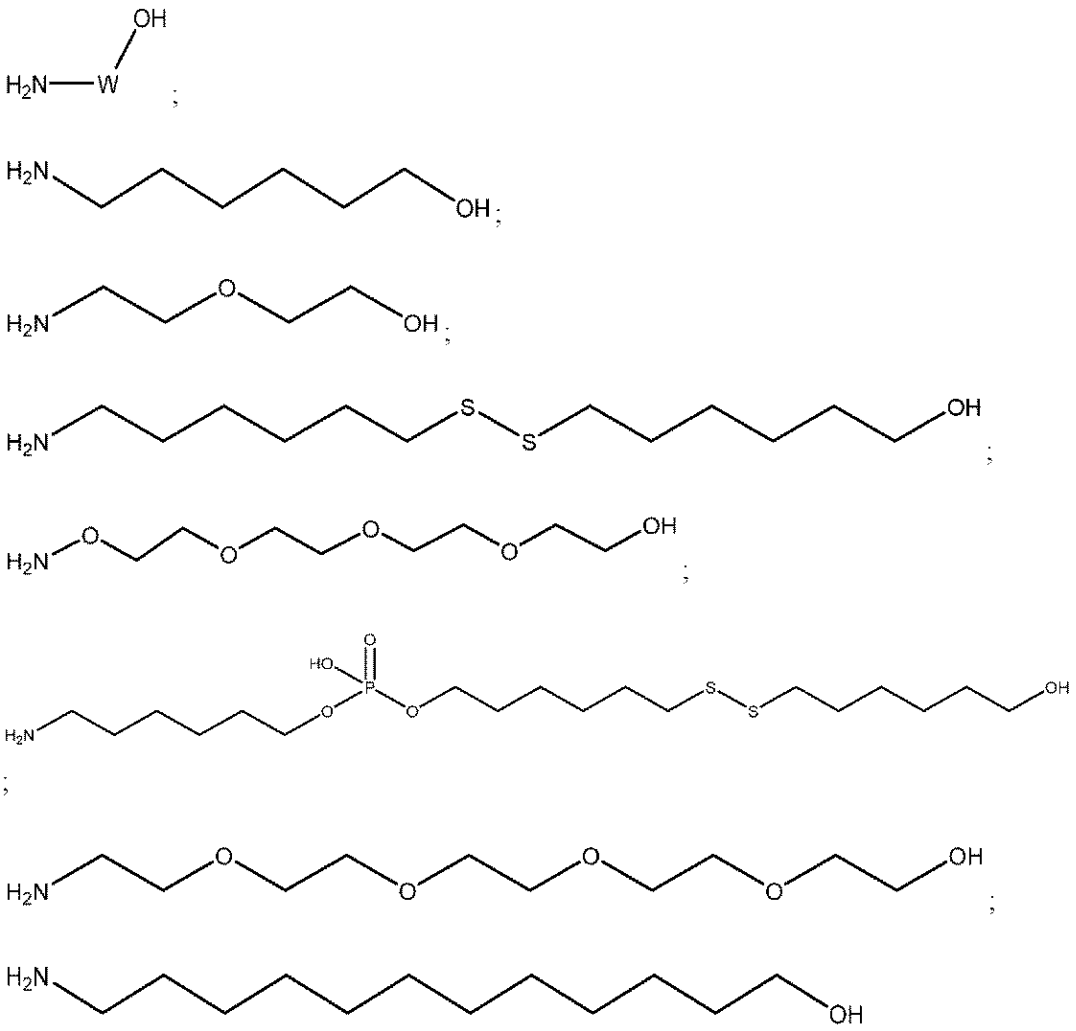
前記リンカー（Ｌ）が、

【化６】



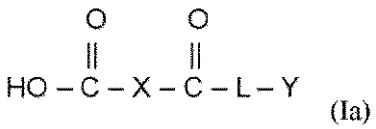
（式中、Ｚは、Ｏ又はＳであり、Ｗは、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{10}$アルキル若しくはアルケニル、又は以下：

【化７】



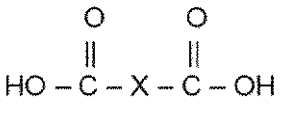
のうちの１つから選択される）
である、請求項１～２４のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項２６】
Ｗが、Ｃ$_4$～Ｃ$_8$アルキルである、請求項２５に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項２７】
前記リンカー（Ｌ）が、－ＮＨ－Ｃ$_6$Ｈ$_{12}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である、請求項１～２６のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項２８】
前記リンカー（Ｌ）が、リン酸結合を介して前記オリゴヌクレオチドに結合している、請求項１～２７のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項２９】
前記オリゴヌクレオチドが、ＤＮＡである、請求項１～２８のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項３０】
前記オリゴヌクレオチドが、ＲＮＡである、請求項１～２９のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。

【請求項３１】
前記オリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項１～３０のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項３２】
前記オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである、請求項１～３１のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項３３】
式（Ｉａ）：
【化８】



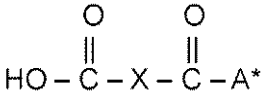
(Ia)

（式中、
Ｘは、Ｃ$_{10}$～Ｃ$_{26}$アルキルであり；
Ｌは、リンカー－ＮＨ－Ｃ$_{6}$Ｈ$_{12}$－Ｏ－ＰＯ$_{2}$－であり；
Ｙは、ＤＮＡであり、
前記リンカーが、前記ＤＮＡの５’末端でリン酸結合を介して前記ＤＮＡに結合している）の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項３４】
前記オリゴヌクレオチドが、非アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドと比較して心臓細胞発現の低減を改善する、請求項１～３３のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項３５】
前記オリゴヌクレオチドが、ＭＡＬＡＴ１に特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項１～３４のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチド。
【請求項３６】
式（Ｉａ）の酸アシルオリゴヌクレオチドの作製方法であって、
Ａ）式（ＩＩ）
【化９】



(II)

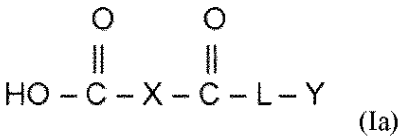
の脂肪二酸を提供すること；
Ｂ）前記脂肪二酸を活性化基Ａと反応させて、式（ＩＩＩ）：
【化１０】



(III)

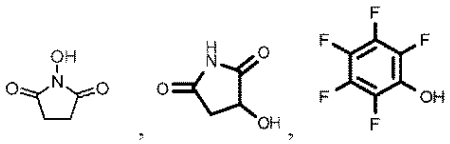
の酸アシル化合物（式中、Ａ＊は、前記脂肪アシル化合物に結合した前記活性化基である）を形成すること；
Ｃ）式（ＩＩＩ）の前記化合物を、式（ＩＶ）：
＊Ｌ－Ｙ　（ＩＶ）
（式中、＊Ｌは、反応性基を有するリンカーである）の化合物と反応させて、
式（Ｉａ）：

【化１１】



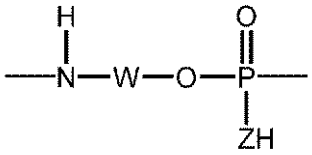
(Ia)

（式中、Ｘは、Ｃ４～Ｃ３２アルキル又はアルケニルであり；Ｌは、リンカーであり；Ｙは、オリゴヌクレオチドである）の前記化合物を形成すること、
を含む、方法。
【請求項３７】
Ｂ）における反応が、カルボン酸をアミンと反応させて活性化エステルアミンを形成する、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記アミンが、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）であり、前記活性化エステルアミンが、ＮＨＳエステルである、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記活性化基Ａが、
【化１２】



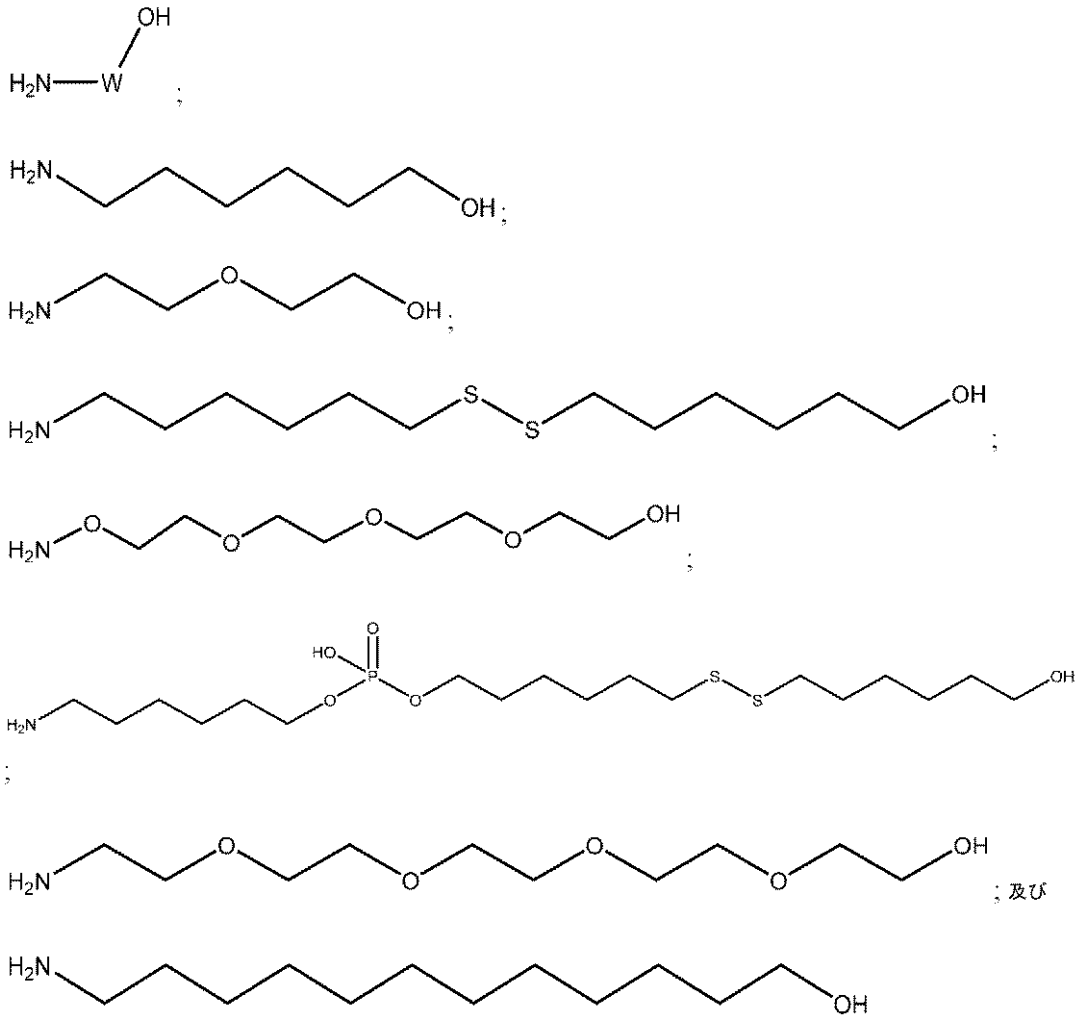
、ＴＢＴＵ、及びＨＡＴＵから選択される、請求項３６に記載の作製方法。
【請求項４０】
ｃ）における反応が、前記脂肪アシル化合物に結合した前記活性化基Ａ＊と前記リンカー（Ｌ）上の第一級アミンとの間のカップリングである、請求項３６～３９のいずれか一項に記載の作製方法。
【請求項４１】
前記脂肪アシル化合物に結合した前記活性化基Ａ＊が、活性化エステルアミンである、請求項３６～４０のいずれか一項に記載の作製方法。
【請求項４２】
前記Ｌ＊が、Ｃ３～Ｃ１０アミンである、請求項３６～４１のいずれか一項に記載の作製方法。
【請求項４３】
前記Ｌ＊が、ヘキシルアミンである、請求項３６～４１のいずれか一項に記載の作製方法。
【請求項４４】
Ｘが、Ｃ１０～Ｃ２６アルキル又はアルケニルである、請求項３６～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
Ｘが、Ｃ１６～Ｃ２２アルキル又はアルケニルである、請求項３６～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
Ｘが、アルキルである、請求項３６～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
Ｘが、Ｃ１０～Ｃ２６アルキルである、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
Ｘが、Ｃ１６アルキル又はＣ２２アルキルである、請求項４６に記載の方法。
【請求項４９】

Ｘが、アルケニルである、請求項３６～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
Ｘが、Ｃ１０～Ｃ２６アルケニルである、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記アルケニルが、一価不飽和である、請求項４９又は請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記アルケニルが、多価不飽和である、請求項４９又は請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
前記リンカー（Ｌ）が、前記オリゴヌクレオチドの５’末端に結合している、請求項３６～５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
前記リンカー（Ｌ）が、前記カルボキシアシル基に接続されたアミノ末端を含む、請求項３６～５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５】
前記リンカー（Ｌ）が、前記オリゴヌクレオチドに接続されたリン酸末端を含む、請求項３６～５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
前記リンカー（Ｌ）が、
【化１３】



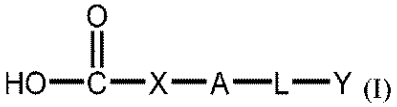
（式中、Ｚは、Ｏ又はＳであり、Ｗは、Ｃ１～Ｃ１０アルキル若しくはアルケニル、又は以下：

【化１４】

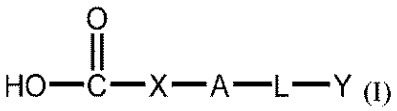


のうちの１つから選択される）
である、請求項３６～５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
Ｗが、Ｃ$_4$～Ｃ$_8$アルキルである、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記リンカー（Ｌ）が、－ＮＨ－Ｃ$_6$Ｈ$_{12}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である、請求項３６～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】
前記リンカー（Ｌ）が、リン酸結合を介して前記オリゴヌクレオチドに結合している、請求項３６～５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記オリゴヌクレオチドが、ＤＮＡである、請求項３６～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
前記オリゴヌクレオチドが、ＲＮＡである、請求項３６～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
前記オリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項３６～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】

前記オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである、請求項３６～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４】
対象の心臓組織にオリゴヌクレオチドを送達する方法であって、
ａ）請求項１～３５のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供すること、及び
ｂ）前記酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを前記対象に投与すること、
を含む、方法。
【請求項６５】
前記酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドが、式（Ｉ）：
【化１５】



（式中、
Ｘは、Ｃ１０～Ｃ２６アルキルであり；
Ａは、Ｃ＝Ｏであり；
Ｌは、リンカー－ＮＨ－Ｃ６Ｈ１２－Ｏ－ＰＯ２－であり；
Ｙは、ＤＮＡであり、
前記リンカーが、前記ＤＮＡの５’末端でリン酸結合を介して前記ＤＮＡに結合している）の化合物である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記オリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項６４又は６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記オリゴヌクレオチドが、ＭＡＬＡＴ１から選択される標的に特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項６４～６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８】
前記対象が、哺乳動物である、請求項６４～６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９】
前記哺乳動物が、ヒトである、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記オリゴヌクレオチドが、心疾患を治療するために投与される、請求項６４～６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１】
対象の心臓細胞における目的遺伝子の発現を低減させる方法であって、
ａ）請求項１～３５のいずれか一項に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供すること、及び
ｂ）前記酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを前記対象に投与すること、
を含む、方法。
【請求項７２】
前記酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドが、式（Ｉ）：
【化１６】



（式中、
Ｘは、Ｃ１０～Ｃ２６アルキルであり；

Ａは、Ｃ＝Ｏであり；
Ｌは、リンカー－ＮＨ－Ｃ$_{6}$Ｈ$_{12}$－Ｏ－ＰＯ$_{2}$－であり；
Ｙは、ＤＮＡであり、
前記リンカーが、前記ＤＮＡの５’末端でリン酸結合を介して前記ＤＮＡに結合している）
の化合物である、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
前記オリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項７１又は７２に記載の方法。
【請求項７４】
前記オリゴヌクレオチドが、ＭＡＬＡＴ１から選択される標的に特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項７１～７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５】
前記対象が、哺乳動物である、請求項７２～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】
前記哺乳動物が、ヒトである、請求項７５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、末端カルボキシル基を有するアシル鎖にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドに関する。いくつかの実施形態では、本開示は、末端カルボキシル基を有するアシル鎖にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドの作製方法を提供する。
【背景技術】
【０００２】
オリゴヌクレオチドベースの療法、例えば、アンチセンス療法、遺伝子療法、及びＣＲＩＳＰＲ遺伝子編集療法は、様々な状態の治療に有望であると考えられている。しかしながら、体内の特定の組織へのオリゴヌクレオチドの送達は、オリゴヌクレオチドベースの療法の課題となっている。
【０００３】
オリゴヌクレオチドを特定の組織に送達するための１つの戦略は、脂質ナノ粒子又はポリマーナノ粒子にパッケージングされたオリゴヌクレオチドを送達することである。オリゴヌクレオチドは、別途修飾されていない限りポリアニオン性主鎖を有していることから、ナノ粒子の形成にはカチオン性脂質又はポリマーが使用される。アニオン性オリゴヌクレオチドとカチオン性脂質又はポリマーとの間の静電相互作用により、ナノ粒子が形成される。
【０００４】
多種多様な脂質ナノ粒子が開発されているが、これらのナノ粒子のほとんど全てが療法での使用に対して制約がある。制約の１つは、担体（即ち、オリゴヌクレオチドの投与を補助するために送達されなければならない材料である脂質）の量である。例えば、脂質ナノ粒子にパッケージングされた低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の場合、ｓｉＲＮＡは送達物の総質量の数パーセントしか占めておらず、残りの質量は脂質である。非特許文献１。多くの生体高分子はアニオン性であり、カチオン性脂質と静電的に会合して毒性問題を引き起こすことから、大量のカチオン性脂質の送達は問題となり得る。
【０００５】
更に、脂質ナノ粒子は、典型的には、有窓（例えば、有孔）内皮を有する組織、即ち、肝臓、脾臓、及び一部の腫瘍組織にのみ蓄積する。非特許文献２。これにより、オリゴヌクレオチドを他の組織に送達する必要がある療法に対する脂質ナノ粒子の使用が現実的ではなくなる。
【０００６】
脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの送達を改善するため

に開発されている。オリゴヌクレオチドは脂質に化学結合しているため、両者間の静電相互作用は不要であり、潜在的に毒性であるカチオン性脂質は必要とされない。更に、単一のオリゴヌクレオチド分子は、通常１つ又は２つの脂質鎖のみにコンジュゲートされるため、脂質担体材料の量が大幅に低減される。したがって、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドに伴う副作用は低減されるはずである。

【０００７】

コンジュゲーションに使用される脂質は脂質ナノ粒子の形成に適している必要はないため、より多様な脂質を使用することができる。脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドの脂質部分を変化させることにより、コンジュゲートの取り込みのためにより幅広い範囲の組織を標的とすることが可能である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００８】

【非特許文献１】Ｊｕｌｉａｎｏ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２０１６，４４（１４）：６５１８－６５４８

【非特許文献２】Ｏｓｂｏｒｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０１８，２８（３）：１２８－１３６

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本開示は、

ａ）カルボキシアシル基；

ｂ）オリゴヌクレオチド；及び

ｃ）カルボキシアシル基をオリゴヌクレオチドに接続するリンカー、を含む、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドに関する。

【００１０】

いくつかの実施形態では、カルボキシアシル基は、Ｃ$_4$～Ｃ$_{32}$であり、飽和、例えば一価不飽和、又は不飽和、例として多価不飽和であり得る。

【００１１】

いくつかの実施形態では、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの５’末端に結合したリンカーを含む。いくつかの実施形態では、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドは、カルボキシアシル基に接続されたアミノ末端を含むリンカーを含む。いくつかの実施形態では、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに接続されたリン酸末端を含むリンカーを含む。

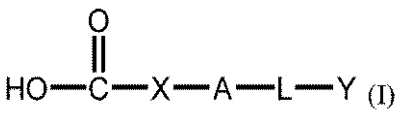
【００１２】

いくつかの実施形態では、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドは、ＲＮＡオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである。

【００１３】

本開示によれば、本開示の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドは、式（Ｉ）：

【化１】

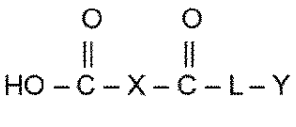


（式中、

Ｘは、Ｃ$_4$～Ｃ$_{32}$アルキル又はアルケニルであり；

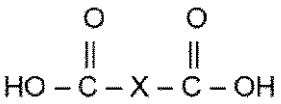
Ａは、コンジュゲーション基であり；

Ｌは、リンカーであり；
Ｙは、オリゴヌクレオチドである）の化合物から選択され得る。
【００１４】
本明細書には、式（Ｉａ）：
【化２】



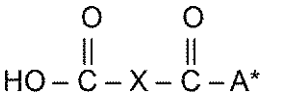
(Ia)

（式中、
Ｘは、Ｃ１０～Ｃ２６アルキルであり；
Ｌは、リンカー－ＮＨ－Ｃ６Ｈ１２－Ｏ－ＰＯ２－であり；
Ｙは、ＤＮＡであり、
このリンカーは、ＤＮＡの５’末端でリン酸結合を介してＤＮＡに結合している）の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドも開示される。
【００１５】
本開示は、本明細書に開示される酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを哺乳動物に投与することを含む、比較された心臓細胞発現の低減を改善する方法であって、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドが、非アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドと比較して心臓細胞発現の低減を改善する、方法を更に含む。
【００１６】
また、哺乳動物の心臓細胞における目的遺伝子の発現を低減させる方法であって、本明細書に開示される酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを哺乳動物に投与することを含み、酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドが、非アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドと比較して心臓細胞における目的遺伝子の発現を低減させる、方法も開示される。
【００１７】
更に、式（Ｉａ）の酸アシルオリゴヌクレオチドの作製方法であって、
Ａ）式（ＩＩ）
【化３】



(II)

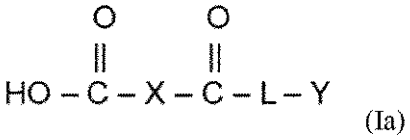
の脂肪二酸を提供すること；
Ｂ）脂肪二酸を活性化基Ａと反応させて、式（ＩＩＩ）：
【化４】



(III)

の酸アシル化合物（式中、Ａ＊は、脂肪アシル化合物に結合した活性化基である）を形成すること；
Ｃ）式（ＩＩＩ）の化合物を、式（ＩＶ）：
＊Ｌ－Ｙ　（ＩＶ）
（式中、＊Ｌは、反応性基を有するリンカーである）の化合物と反応させて；

式（Ｉａ）：
【化５】



(Ia)

の化合物を形成すること、を含む方法が、本明細書で開示される。
【００１８】
本開示は、対象の心臓組織にオリゴヌクレオチドを送達する方法であって、
ａ）本開示による酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供すること、及び
ｂ）酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを対象に投与すること、を含む方法を更に提供する。
【００１９】
以下の説明において、様々な実施形態の完全な理解を提供するために、特定の詳細が記載される。しかしながら、当業者は、開示された実施形態がこれらの詳細なしで実施され得ることを理解するであろう。これら及び他の実施形態は、以下の詳細な説明及び添付の図面を参照することで明らかになるであろう。
【図面の簡単な説明】
【００２０】
【図１】実施例２５に例示されるように表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって測定した、ヒト（ＨＳＡ）及びラット（ＲＳＡ）血清アルブミンからの５’脂質コンジュゲートＭａｌａｔ－１　ＡＳＯの解離定数を示す。
【図２】実施例２６に例示されるようにＦＡ－ＡＳＯコンジュゲートで処理した後の、ヒトＴＨＰ－１単球におけるＭａｌａｔ－１遺伝子発現の濃度依存性ノックダウンを示す。
【図３Ａ－Ｄ】実施例１２（図３Ａ）、実施例１３（図３Ｂ）、実施例１４（図３Ｃ）、及び実施例１５（図３Ｄ）の脂質付加ＣａｍＫ２Ｄ　ＡＳＯがインビトロで機能的活性を維持したという実施例２７の結果を示す。
【図４Ａ－Ｂ】飽和Ｃ$_{22}$酸又はＣ$_{18}$（９Ｚ）一価不飽和脂肪二酸へのコンジュゲーションが、親ＡＳＯと比較して、心臓において同様のノックダウン又はノックダウンの増加をもたらしたのみならず、肝臓及び腎臓において測定されたノックダウンの減弱をももたらしたことを示しており、図４Ａは、心臓における実施例１２及び１５のＭＡＬＡＴ－１遺伝子発現を例示しており、図４Ｂは、肝臓及び腎臓における実施例７及び１０のＭＡＬＡＴ－１遺伝子発現を例示している。ｎｓ：分析は二元配置ＡＮＯＶＡ、続いてボンフェローニ多重比較により行った。＊＊＊：ｐ＜０．００１、一元配置ＡＮＯＶＡとそれに続くダネット多重比較。
【図５】心臓、腎臓、及び肝臓におけるＣａｍＫ２Ｄ遺伝子発現レベルを示しており、実施例２９に例示されるように、ネイキッド親ＡＳＯと比較して、飽和Ｃ$_{22}$酸鎖コンジュゲーションが、心臓におけるノックダウンを改善し、腎臓及び肝臓などのシンク器官におけるノックダウンを減弱させる傾向があることを示す。＊＊ｐ＜０．０１。＊＊＊ｐ＜０．００１、二元配置ＡＮＯＶＡとそれに続くボンフェローニ多重比較。
【発明を実施するための形態】
【００２１】
本開示は、脂質がアシル基及び遊離末端カルボン酸基を含む、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。本開示は、脂質がアシル基及び遊離末端カルボン酸基を含む、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドの作製方法を含む。本開示は、本明細書に開示される脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドを対象に送達する方法を含む。本開示はまた、対象の疾患を治療するために本明細書に開示される脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドを投与する方法を含む。

【００２２】
本明細書で示されており且つ説明されている特定の実施は例であり、いかなる形であれ他の点で本出願の範囲を限定することを意図するものではないことを理解されたい。
【００２３】
本明細書で互換的に使用される「核酸」、「核酸分子」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「オリゴヌクレオチド」、又は「ポリヌクレオチド」は、共有結合ヌクレオチドを含むポリマー化合物を意味する。ヌクレオチドは、リン酸基に連結したヌクレオシドを含む。ヌクレオシドは、核酸塩基及び糖部分を含む。核酸塩基は、天然に存在するもの又は合成のものであり得る。核酸塩基及び糖部分は、それぞれ独立して、修飾されているか又は非修飾であり得る。「修飾ヌクレオシド」は、修飾核酸塩基及び／又は修飾糖部分を含むヌクレオシドを意味する。修飾ヌクレオシドには、核酸塩基を欠く脱塩基ヌクレオシドが含まれ得る。ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、修飾されているか又は非修飾であり得、１つ以上の修飾ヌクレオシドを含有し得る。「修飾ポリヌクレオチド」又は「修飾オリゴヌクレオチド」は、少なくとも１つの糖、核酸塩基、又はヌクレオシド間結合が修飾されているポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドを意味する。いくつかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチド又は修飾オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドであり、ホスホロチオエートポリヌクレオチドである。「非修飾ポリヌクレオチド」は、いかなる糖修飾も、核酸塩基修飾も、ヌクレオシド間修飾も含まないポリヌクレオチドを意味する。「核酸」という用語には、リボ核酸（ＲＮＡ）及びデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）が含まれ、その両方とも一本鎖又は二本鎖であり得る。ＤＮＡとしては、限定されるものではないが、相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、ゲノムＤＮＡ、プラスミド又はベクターＤＮＡ、及び合成ＤＮＡが挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、二本鎖ＤＮＡである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、一本鎖ＤＮＡである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、二本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、一本鎖ＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、アンチセンスＲＮＡである。本開示の核酸は、任意の長さであってよい。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される核酸は、８～８０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される核酸は、１０～７０ヌクレオチド長、１２～６０ヌクレオチド長、１５～５０ヌクレオチド長、１５～４５ヌクレオチド長、１６～４０ヌクレオチド長、１７～３５ヌクレオチド長、１８～３０ヌクレオチド長、１９～２９ヌクレオチド長、又は２０～２８ヌクレオチド長である。
【００２４】
本明細書で使用される場合、「アンチセンス分子」という用語は、例えば水素結合を介した、標的核酸へのハイブリダイゼーションを受けることができるオリゴマー分子を意味する。アンチセンス分子の例としては、一本鎖核酸及び二本鎖核酸、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、及びメロデュプレックス（ｍｅｒｏｄｕｐｌｅｘ）（ｍｄＲＮＡ）、並びにサテライト反復配列などが挙げられる。
【００２５】
「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は「ＡＳＯ」は、標的核酸又はその領域若しくはセグメントに相補的な配列を含むポリヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、ＡＳＯは、標的核酸又はその領域若しくはセグメントに特異的にハイブリダイズ可能である。いくつかの実施形態では、ＡＳＯは、ＲＮＡプロセシングに影響を与え、且つ／又はタンパク質発現を調節することができる。一般に、ＡＳＯは、一本鎖ＲＮＡに結合してＲＮＡを不活化する一本鎖オリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ＡＳＯは、遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）に結合することによってその遺伝子を不活化する。いくつかの実施形態では、ＡＳＯは、ノンコーディングｍＲＮＡに結合すること

によって、そのノンコーディングｍＲＮＡの機能を妨害する。いくつかの実施形態では、ＡＳＯは、遺伝子をコードするｍＲＮＡの転写開始部位、翻訳開始部位、５’非翻訳配列、３’非翻訳配列、コーディング配列、プレｍＲＮＡ配列、ｍＲＮＡスプライス部位、及び／又はイントロン／エクソン接合部に結合することによってその遺伝子を不活化する。いくつかの実施形態では、ＡＳＯは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む。ＡＳＯは更に、例えば、Ｇｏｏｄｃｈｉｌｄ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ７６４：１－１５，２０１１；Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ Ｒｅｖ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｏｘｉｃｏｌ ５９：６０５－６３０，２０１９；及びＳｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ２５（５）：１０６９－１０７５，２０１７に記載されている。

【００２６】

上記のいずれかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、非修飾のＤＮＡ、ＲＮＡであり得るか、又は修飾されていてもよい。修飾オリゴヌクレオチドは、非修飾ＲＮＡ又はＤＮＡに対して少なくとも１つの修飾を含む（即ち、少なくとも１つの修飾ヌクレオシド（修飾糖部分及び／若しくは修飾核酸塩基を含む、並びに／又は少なくとも１つの修飾ヌクレオシド間結合を含む）。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれかから選択され得る。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含有する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾糖部分、例えば、フラノシル部分などの二環式糖部分（例えば、２つの環を含み、第２の環が、第１の環の原子のうちの２つを接続する架橋を介して形成されることにより、二環式構造が形成されている）を含有する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾核酸塩基を含有する。

【００２７】

カルボキシアシル基及びリンカー

実施形態では、本開示は、オリゴヌクレオチドに接続されたカルボキシアシル基を含む、アシル酸コンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。実施形態では、カルボキシアシル基は、リンカーによってオリゴヌクレオチドに接続されている。

【００２８】

実施形態では、コンジュゲートのカルボキシアシル基は、遊離末端カルボン酸基を有する脂肪酸鎖である。実施形態では、アシル基は、C_4～C_{32}の長さを有する。実施形態では、アシル基は、C_6～C_{30}の長さを有する。実施形態では、アシル基は、C_8～C_{28}の長さを有する。実施形態では、アシル基は、C_{10}～C_{26}の長さを有する。実施形態では、アシル基は、C_{12}～C_{26}の長さを有する。実施形態では、アシル基は、C_{14}～C_{24}の長さを有する。実施形態では、アシル基は、C_{16}～C_{22}の長さを有する。実施形態では、アシル基は、C_{16}の長さを有する。実施形態では、アシル基は、C_{18}の長さを有する。実施形態では、アシル基は、C_{22}の長さを有する。

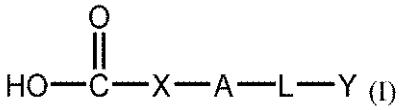
【００２９】

実施形態では、アシル基のカルボキシ末端は、投与されると特定の組織及び／又は器官におけるコンジュゲートオリゴヌクレオチドの取り込みの改善をもたらす。実施形態では、アシル基のカルボキシ末端は、心臓組織又は肝臓組織における取り込みの改善をもたらす。実施形態では、アシル基のカルボキシル末端は、心臓又は肝臓における取り込みの改善をもたらす。実施形態では、アシル基のカルボキシル末端は、心臓組織における取り込みの改善をもたらす。実施形態では、アシル基のカルボキシル末端は、心臓における取り込みの改善をもたらす。

【００３０】

実施形態では、アシル基は飽和である、即ち、単一の炭素－炭素結合のみを有する。実施形態では、アシル基は不飽和である、即ち、１つ以上の炭素－炭素二重結合を有する。実施形態では、アシル基は、一価不飽和である。実施形態では、アシル基は多価不飽和であり、例えば、２～１５個の二重結合を有し、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９

、１０、１１、１２、１３、１４、又は１５個の二重結合を有する。
【００３１】
実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに結合した単一のカルボキシアシル基を含み得る。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに結合した２つのカルボキシアシル基を含み得る。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに結合した３つ以上のカルボキシアシル基を含み得る。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに結合した単一のカルボキシアシル基を、末端カルボキシを有さない１つ、２つ、又はそれ以上の他のアシル基とともに含み得る。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに結合した２つのカルボキシアシル基を、末端カルボキシを有さない１つ、２つ、又はそれ以上の他のアシル基とともに含み得る。
【００３２】
実施形態では、カルボキシルアシル基は、オリゴヌクレオチドの５’末端に結合している。実施形態では、カルボキシルアシル基は、オリゴヌクレオチドの３’末端に結合している。実施形態では、カルボキシアシル基は、オリゴヌクレオチドの５’末端又は３’末端の代わりに、オリゴヌクレオチド中の修飾塩基でオリゴヌクレオチドに結合している。
【００３３】
実施形態では、カルボキシルアシル基は、リンカーによってオリゴヌクレオチドに接続されている。実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドの５’末端に結合している。実施形態では、リンカーは、カルボキシアシル基とアミド結合を形成する。実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドに接続されたリン酸結合を含む。実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドの３’末端に結合している。実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチド中の修飾塩基でオリゴヌクレオチドに結合している。
【００３４】
リンカーは、リンカーの一端でカルボキシアシル基と、リンカーの他端でオリゴヌクレオチドと化学的に結合することを可能にする任意の化学的部分であり得る。実施形態では、リンカーは、カルボキシアシル基とアミド結合を形成する。実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドに接続されたリン酸結合を含む。実施形態では、リンカーのリン酸結合は、オリゴヌクレオチド上の５’リン酸であり得る。
【００３５】
実施形態では、リンカーは、末端間にアシル鎖を含む。実施形態では、リンカーは、Ｃ１～Ｃ１０の長さのアシル鎖を含む。実施形態では、アシル鎖は、飽和であり得る。実施形態では、アシル鎖は、一価不飽和又は多価不飽和であり得る。実施形態では、リンカーは、カルボキシアシル基とのアミド結合、オリゴヌクレオチドとのリン酸結合、及びアミド結合をリン酸末端と接続するＣ１～Ｃ１０の長さのアシル鎖を形成する。
【００３６】
実施形態では、本開示は、式（Ｉ）
【化６】



（式中、Ｘは、Ｃ４～Ｃ３２アルキル又はアルケニルであり；Ａは、コンジュゲーション基であり；Ｌは、リンカーであり；Ｙは、オリゴヌクレオチドである）の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。
【００３７】
式（Ｉ）の実施形態では、Ｘは、Ｃ６～Ｃ３０アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ８～Ｃ２８アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１０～Ｃ２６アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１２～Ｃ２６アルキ

ル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４～Ｃ２４アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１６アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ２０アルキル又はアルケニルである。

【００３８】

式（Ｉ）の実施形態では、Ｘは、Ｃ６～Ｃ３０アルキルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ８～Ｃ２８アルキルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１０～Ｃ２６アルキルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１２～Ｃ２６アルキルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４～Ｃ２４アルキルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４アルキルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１６アルキルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ２０アルキルである。

【００３９】

式（Ｉ）の実施形態では、Ｘは、Ｃ６～Ｃ３０一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ８～Ｃ２８一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１０～Ｃ２６一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１２～Ｃ２６一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４～Ｃ２４一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１６一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ２０一価不飽和アルケニルである。

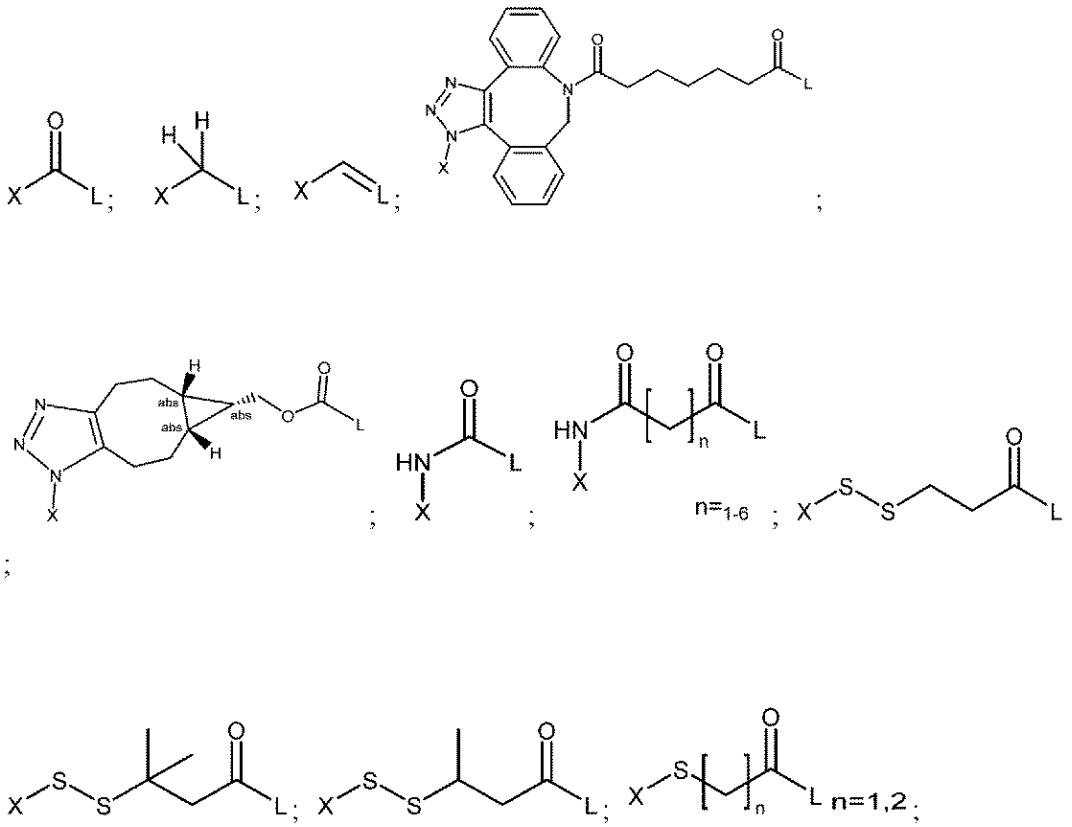
【００４０】

式（Ｉ）の実施形態では、Ｘは、Ｃ６～Ｃ３０多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ８～Ｃ２８多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１０～Ｃ２６多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１２～Ｃ２６多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４～Ｃ２４多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１６多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ２０多価不飽和アルケニルである。

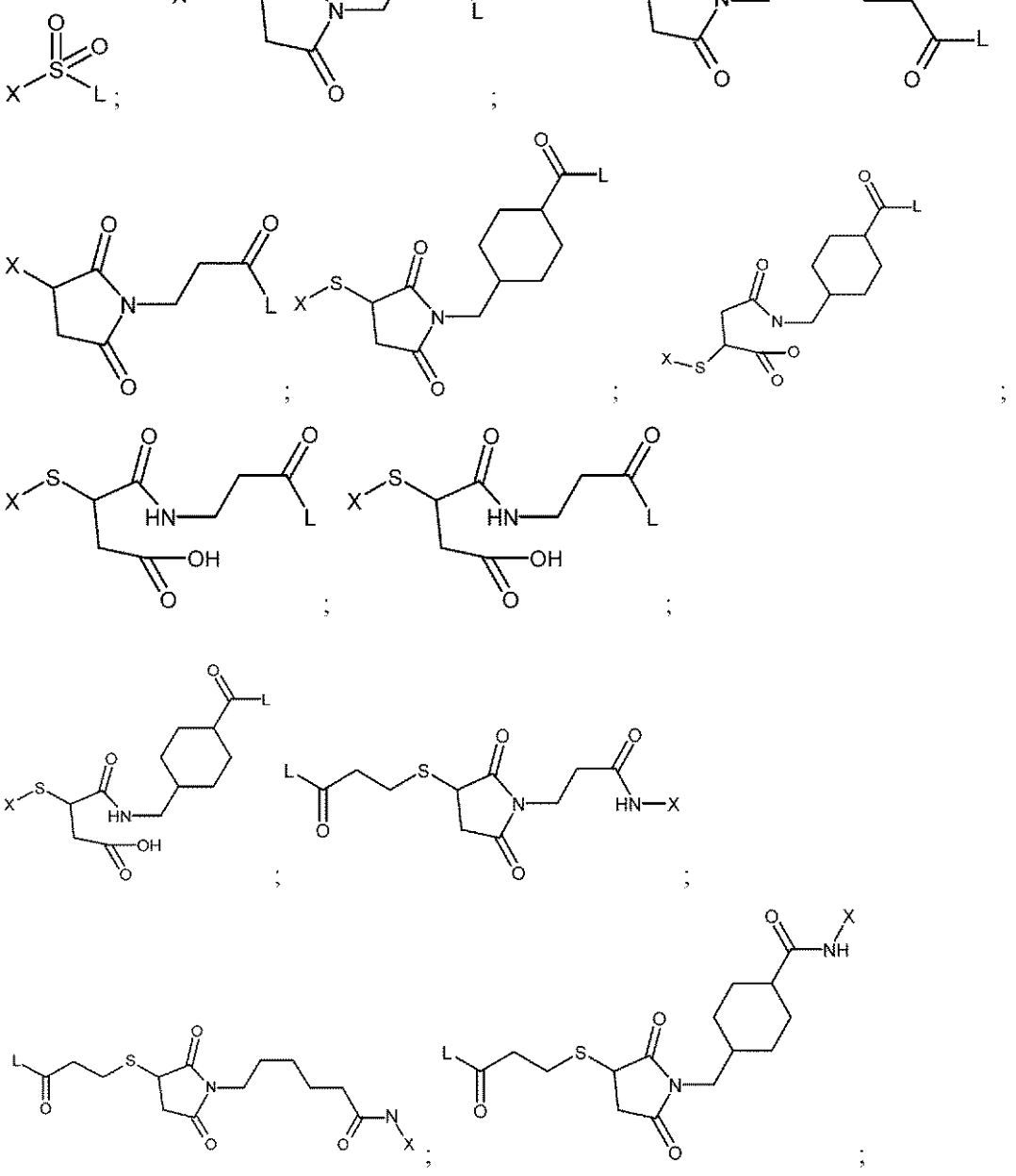
【００４１】

式（Ｉ）の実施形態では、Ａは、コンジュゲーション基であり、ＡはＣ＝Ｏである。ある特定の実施形態では、Ａは、

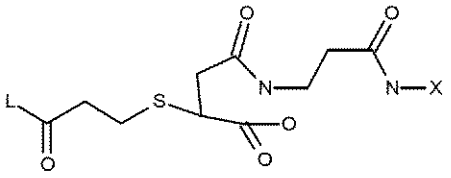
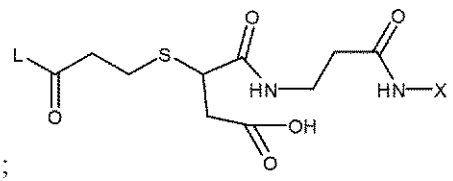
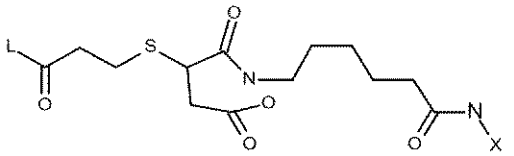
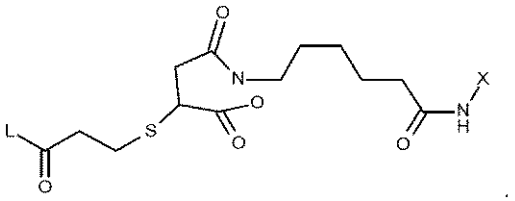
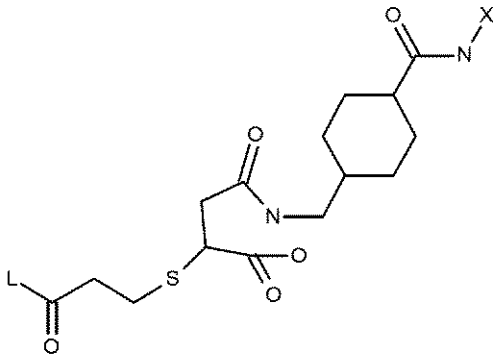
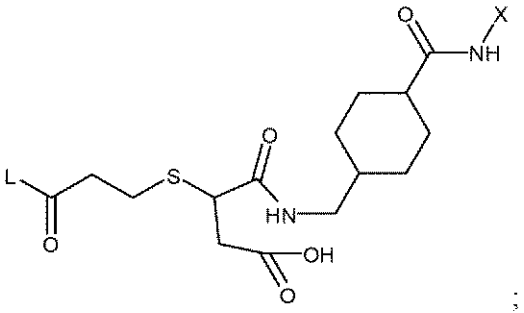
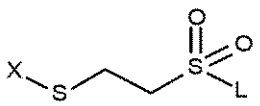
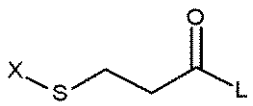
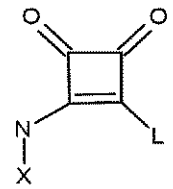
【化７】



【化８】



【化９】

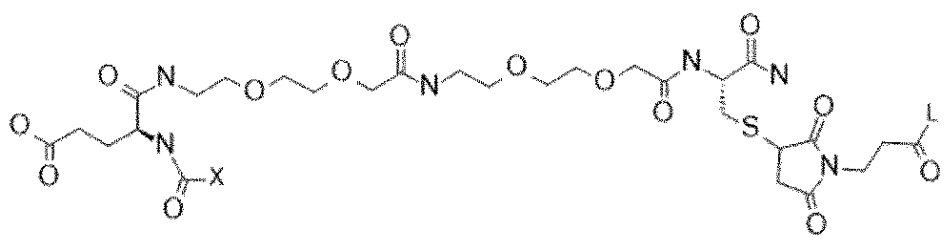

;

;

;

;

;

;

;

;


から選択されるコンジュゲーション基である。

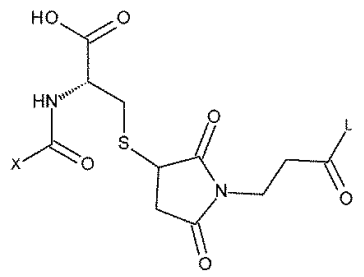
【００４２】

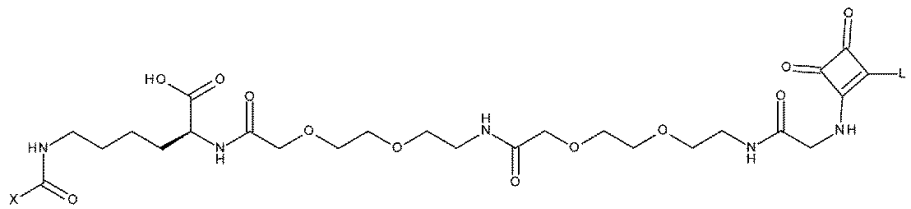
いくつかの実施形態では、コンジュゲーション基Ａは、コンジュゲーション基Ａと上記式（Ｉ）のＸとの間に、少なくとも１つのスペーサー（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖（例えば、１００～２０００Ｄａの範囲の分子量）及び／又は少なくとも１つのアミノ酸（例えば、システイン、グルタミン酸、リジン、グリシンなど）を含有する。非限定的な例としては、

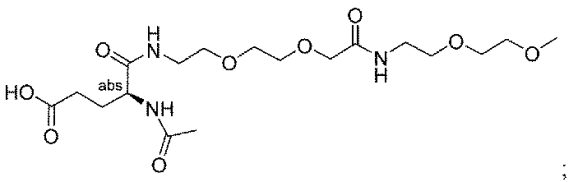
【化１０】

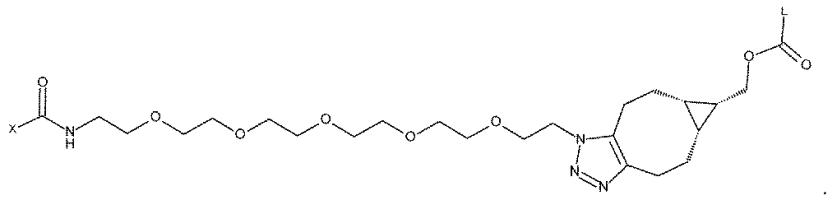

;

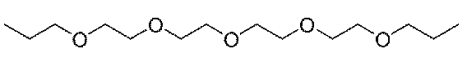
【化１１】

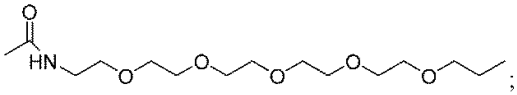

;

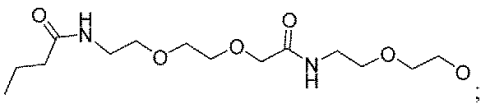

;


;

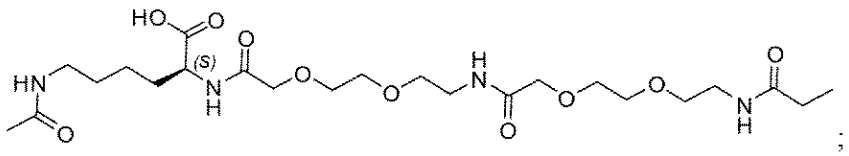

;

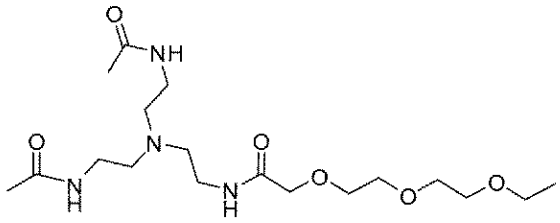

;


;


;

【化１２】


;

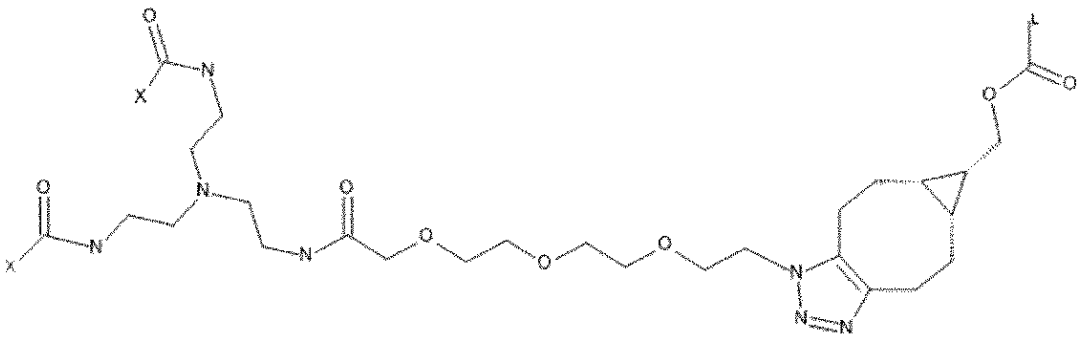


が挙げられる。

【００４３】

いくつかの実施形態では、コンジュゲーション基Ａは、式（Ｉ）の脂肪酸鎖以外の少なくとも１つの他の脂肪酸鎖を含有する。例えば、コンジュゲーション基Ａは、以下に例示されるような２つの脂肪酸鎖を含有する：

【化１３】

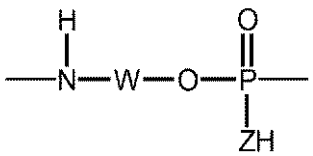


（式中、それぞれの場合において、Ｘは、Ｃ$_4$～Ｃ$_{32}$アルキル又はアルケニルである）。

【００４４】

式（Ｉ）の実施形態では、Ｌは、リンカー：

【化１４】



であり、式中、Ｚ及びＷは以下に定義される。

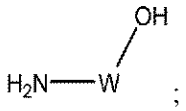
【００４５】

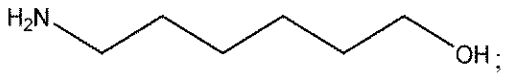
式（Ｉ）の実施形態では、Ｚは、Ｏ又はＳである。

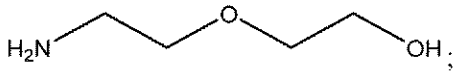
【００４６】

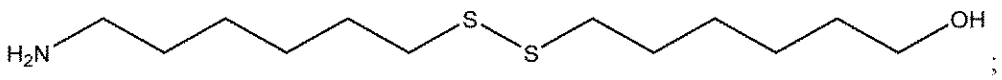
式（Ｉ）の実施形態では、Ｗは、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$アルキル若しくはアルケニルであり、又はいくつかの実施形態では、Ｗは、

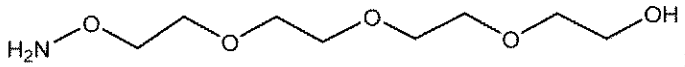
【化１５】

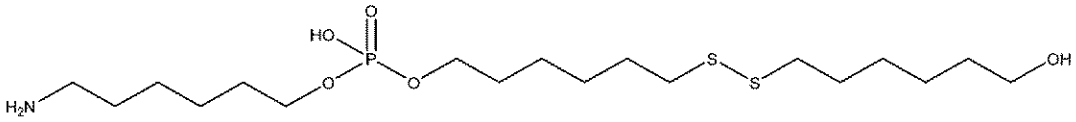


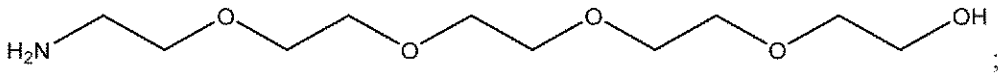


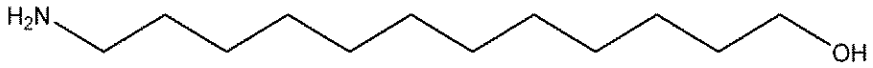












である。

【００４７】

実施形態では、Ｗは、Ｃ３～Ｃ８アルキルなどのＣ２～Ｃ９アルキルであり、例えばＷは、Ｃ４～Ｃ８アルキルである。いくつかの実施形態では、Ｗは、Ｃ５～Ｃ７アルキルである。

【００４８】

実施形態では、Ｗは、Ｃ２～Ｃ９一価不飽和アルケニルであり、例としてＷは、Ｃ３～Ｃ８一価不飽和アルケニルである。いくつかの実施形態では、Ｗは、Ｃ４～Ｃ８一価不飽和アルケニルであり、例えばＷは、Ｃ５～Ｃ７一価不飽和アルケニルである。

【００４９】

実施形態では、Ｗは、Ｃ２～Ｃ９多価不飽和アルケニルであり、例えばＷは、Ｃ３～Ｃ８多価不飽和アルケニルである。いくつかの実施形態では、Ｗは、Ｃ４～Ｃ８多価不飽和アルケニルであり、例えばＷは、Ｃ５～Ｃ７多価不飽和アルケニルである。

【００５０】

実施形態では、Ｗは、Ｃ１アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ２アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ３アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ４アルキルである

。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_5$アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_6$アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_7$アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_8$アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_9$アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_{10}$アルキルである。

【００５１】

実施形態では、Ｗは、Ｃ$_2$一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_3$一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_4$一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_5$一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_6$一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_7$一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_8$一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_9$一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_{10}$一価不飽和アルケニルである。

【００５２】

実施形態では、Ｗは、Ｃ$_2$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_3$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_4$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_5$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_6$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_7$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_8$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_9$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_{10}$多価不飽和アルケニルである。

【００５３】

実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_2$Ｈ$_4$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_3$Ｈ$_6$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_4$Ｈ$_8$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_5$Ｈ$_{10}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_6$Ｈ$_{12}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_7$Ｈ$_{14}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_8$Ｈ$_{16}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_9$Ｈ$_{18}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_{10}$Ｈ$_{20}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。

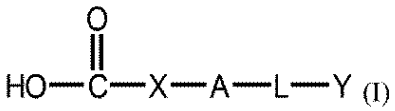
【００５４】

実施形態では、Ｌは、オリゴヌクレオチドＹの５’末端に結合している。実施形態では、Ｌのリン酸基は、オリゴヌクレオチド上の５’リン酸基である。実施形態では、Ｌは、オリゴヌクレオチドＹの３’末端に結合している。実施形態では、Ｌは、オリゴヌクレオチドＹ中の修飾塩基でオリゴヌクレオチドに結合している。

【００５５】

実施形態では、本開示は、式（Ｉ）

【化１６】

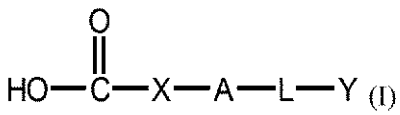


（式中、Ｘは、Ｃ$_{10}$～Ｃ$_{26}$アルキルであり；Ａは、上記の群から選択されるコンジュゲーション基であり；Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_6$Ｈ$_{12}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－であり；Ｙは、Ｙの５’末端でＬに結合した本明細書に記載のオリゴヌクレオチドである）の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。

【００５６】

実施形態では、本開示は、式（Ｉ）

【化１７】

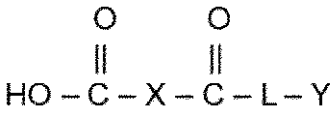


（式中、Ｘは、Ｃ１４アルキル、Ｃ１６アルキル、及びＣ２０アルキルから選択され；Ａは、上記の群から選択されるコンジュゲーション基であり；Ｌは、－ＮＨ－Ｃ６Ｈ１２－Ｏ－ＰＯ２－であり；Ｙは、Ｙの５’末端でＬに結合した本明細書に記載のオリゴヌクレオチドである）の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。

【００５７】

実施形態では、本開示は、式（Ｉａ）

【化１８】



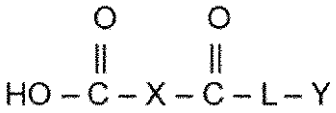
(Ia)

（式中、Ｘは、Ｃ１４アルキルであり；Ｌは、－ＮＨ－Ｃ６Ｈ１２－Ｏ－ＰＯ２－であり；Ｙは、Ｙの５’末端でＬに結合した本明細書に記載のオリゴヌクレオチドである）の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。

【００５８】

実施形態では、本開示は、式（Ｉａ）

【化１９】



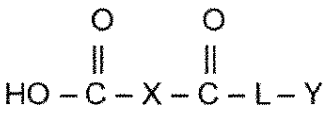
(Ia)

（式中、Ｘは、Ｃ１６アルキルであり；Ｌは、－ＮＨ－Ｃ６Ｈ１２－Ｏ－ＰＯ２－であり；Ｙは、Ｙの５’末端でＬに結合した本明細書に記載のオリゴヌクレオチドである）の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。

【００５９】

実施形態では、本開示は、式（Ｉａ）

【化２０】



(Ia)

（式中、Ｘは、Ｃ２０アルキルであり；Ｌは、－ＮＨ－Ｃ６Ｈ１２－Ｏ－ＰＯ２－であり；Ｙは、Ｙの５’末端でＬに結合した本明細書に記載のオリゴヌクレオチドである）の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供する。

【００６０】

式（Ｉ）の上記実施形態のいずれかでは、オリゴヌクレオチドＹは、本明細書に記載の任意のオリゴヌクレオチドであり得る。

【００６１】

コンジュゲーション用オリゴヌクレオチド及び治療方法

本開示のいずれかの実施形態では、本明細書に記載の化合物のオリゴヌクレオチド（Ｙ）は、非天然骨格を有するＤＮＡ、ＲＮＡ、又は核酸を含み得る。オリゴヌクレオチドは、天然のＤＮＡ及びＲＮＡ核酸塩基、即ち、アデニン（Ａ）、シトシン（Ｃ）、グアニン（Ｇ）、チミン（Ｔ）、及びウラシル（Ｕ）を含むことができ、非天然及び修飾核酸塩基を含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格などの非天然骨格を有し得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、一本鎖である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、二本鎖である。

【００６２】

実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞中で発現され得る配列、例えば、遺伝子又はメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）などのコーディング配列を含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、タンパク質をコードしないが細胞中で別の機能を有する配列、例えば、ノンコーディングＲＮＡ、転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、又は核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）を含む。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）である。

【００６３】

実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１、アポリポタンパク質Ｂ、アポリポタンパク質Ｃ　ＩＩＩ、内皮リパーゼ、ｐ５３、クラステリン、シグナル伝達兼転写活性化因子３（ＳＴＡＴ３）、デカペンタプレジックホモログ７に対するマザー（ＳＭＡＤ７）、細胞間接着分子１（ＣＤ５４）、ジストロフィン（例えば、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ（ＤＭＰＫ）、トランスサイレチン（ＴＴＲ）、ハンチンチン（ＨＴＴ）、マイクロＲＮＡ－１２２（ｍｉＲ－１２２）を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ジストロフィンｍＲＮＡのスプライシングに干渉するアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、エテプリルセン、ゴロディルセン、カシメルセン、ドリサペルセン、及びビルトラルセンである）。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、上記標的のいずれかの発現を低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、上記標的のいずれかのｍＲＮＡスプライシングを低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、上記標的のいずれかの発現を低減させるために、ノンコーディング配列、例えば、エクソン、５’ノンコーディング配列又は３’ノンコーディング配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【００６４】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞中で発現され得る配列、例えば遺伝子によって発現されるタンパク質を含み、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、そのタンパク質の十分な発現を欠く対象を治療する方法において、例えば遺伝子療法タイプの治療法において使用され得る。タンパク質をコードしないが別の機能を有する配列をオリゴヌクレオチドが含む実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドによって提供される機能を欠く対象を治療する方法において使用され得る。

【００６５】

オリゴヌクレオチドが標的に対してアンチセンスである実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、標的の発現レベルの増加に関連する障害を有する対象を治療する方法において使用され得る。オリゴヌクレオチドが標的に対してアンチセンスである実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞中の標的の発現を約１％～約１００％低減させる。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞中の標的の発現を約１％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、又は約１００％低減させる。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞中の標的の発現を約１％～約１００％、約５％～約５０％、約１０％～約５０％、約３０％、約１０％～約３０％、又は約１５％～約２５％低減させる。

【００６６】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、心臓に影響を及ぼす状態を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、これは、カルボキシアシルコンジュゲートを使用して、オリゴヌクレオチドを心臓組織に対して優先的に標的化することができるためである。オリゴヌクレオチドが標的に対してアンチセンスである実施形態では、オリゴヌクレオチドは、心臓細胞中の標的の発現を約１％～約１００％低減させる。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、心臓細胞中の標的の発現を約１％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、又は約１００％低減させる。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、心臓細胞中の標的の発現

を約１％～約１００％、約５％～約５０％、約１０％～約５０％、約３０％、約１０％～約３０％、又は約１５％～約２５％低減させる。

【００６７】

実施形態では、オリゴヌクレオチドは、転移関連肺腺癌転写物１（ＭＡＬＡＴ１）を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１のバリアント１（配列番号１）を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１のバリアント２（配列番号２）を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１のバリアント３（配列番号３）を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、配列：ｔｃａｇｃａｔｔｃｔａａｔａｇｃａｇｃ（配列番号４）を有する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、配列：ｔｍ５ｃａｇｍ５ｃａｔｔｍ５ｃｔａａｔａｇｍ５ｃａｇｍ５ｃ（ｍ５ｃは５－メチルシチジンである）（配列番号５）を有する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、配列：ｇｃａｔｔｃｔａａｔａｇｃａｇｃ（配列番号６）を有する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、配列：ｇｍ５ｃａｔｔｍ５ｃｔａａｔａｇｍ５ｃａｇｍ５ｃ（ｍ５ｃは５－メチルシチジンである）（配列番号７）を有する。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、細胞中のＭＡＬＡＴ１の発現を約１％～約１００％低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、細胞中のＭＡＬＡＴ１の発現を約１％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、又は約１００％低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【００６８】

実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ロックされた糖修飾部分を有する少なくとも１つの核酸（「ＬＮＡ」）を含む、転移関連肺腺癌転写物１（ＭＡＬＡＴ１）を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。そのような実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、配列：ＧＭ５ＣＡｔｔｍ５ｃｔａａｔａｇｍ５ｃＡＧＭ５Ｃ（ｍ５ｃは５－メチルシチジンであり、大文字はＬＮＡヌクレオシドである）（配列番号８）を有する。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、細胞中のＭＡＬＡＴ１の発現を約１％～約１００％低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、細胞中のＭＡＬＡＴ１の発現を約１％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、又は約１００％低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【００６９】

実施形態では、オリゴヌクレオチドは、カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼＩＩデルタ（ＣＡＭＫ２Ｄ）を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、ＣＡＭＫ２Ｄを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ロックされた糖修飾部分を有する少なくとも１つの核酸（「ＬＮＡ」）を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＣＡＭＫ２Ｄを標的とし、配列：ＧＴＴｔｇｇｔａｔｔｍ５ｃｔｔＴＡＧ（ｍ５ｃは５－メチルシチジンであり、大文字はＬＮＡヌクレオシドである）（配列番号９）を有する。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＣＡＭＫ２Ｄを標的とし、配列：ＧＴＧｔｍ５ｃａａｍ５ｃａａｍ５ｃｍ５ｃａＴＴＴ（ｍ５ｃは５－メチルシチジンであり、大文字はＬＮＡヌクレオシドである）（配列番号１０）を有する。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＣＡＭＫ２Ｄを標的とし、配列：Ｍ５ＣＡＭ５ＣＡａａｔｔｔａｔｔａａＭ５ＣＴＭ５ＣＴ（ｍ５ｃは５－メチルシチジンであり、大文字はＬＮＡヌクレオシドである）（配列番号１１）を有する。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＣＡＭＫ２Ｄを標的とし、配列：Ｍ５ＣＴＧｔｔｍ５ｃｔｔｍ５ｃａＡｔａ

ＡＴＧ（ｍ５ｃは５－メチルシチジンであり、大文字はＬＮＡヌクレオシドである）（配列番号１２）を有する。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＣＡＭＫ２Ｄを標的とし、配列：ＡＭ５ＣＭ５Ｃａｔｇａｇｍ５ｃｔａｔａＭ５ＣＴＴ（ｍ５ｃは５－メチルシチジンであり、大文字はＬＮＡヌクレオシドである）（配列番号１３）を有する。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＣＡＭＫ２Ｄを標的とし、細胞中のＣＡＭＫ２Ｄの発現を約１％～約１００％低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＣＡＭＫ２Ｄを標的とし、細胞中のＣＡＭＫ２Ｄの発現を約１％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、又は約１００％低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【００７０】

実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、心臓細胞中のＭＡＬＡＴ１の発現を約１％～約１００％低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＭＡＬＡＴ１を標的とし、心臓細胞中のＭＡＬＡＴ１の発現を約１％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、又は約１００％低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【００７１】

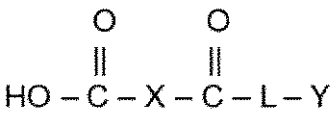
オリゴヌクレオチドがＭＡＬＡＴ１を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、対象の心疾患の治療方法において使用され得る。オリゴヌクレオチドがＭＡＬＡＴ１を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、対象の心筋梗塞の治療方法において使用され得る。オリゴヌクレオチドがＭＡＬＡＴ１を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、対象の心筋梗塞の予防方法において使用され得る。オリゴヌクレオチドがＭＡＬＡＴ１を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである実施形態では、オリゴヌクレオチドは、心筋梗塞のリスクがある対象に投与される。

【００７２】

脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドの作製方法

実施形態では、本開示は、本明細書に記載の脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドの作製方法を提供する。実施形態では、本開示は、式（Ｉａ）：

【化２１】



(Ia)

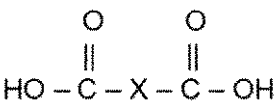
（式中、Ｘは、Ｃ$_{4}$～Ｃ$_{32}$アルキル又はアルケニルであり；Ｌは、リンカーであり；Ｙは、オリゴヌクレオチドである）の酸アシルオリゴヌクレオチドの作製方法を提供する。

【００７３】

実施形態では、式（Ｉ）の作製方法は、以下のステップ：

Ａ）式（ＩＩ）

【化２２】

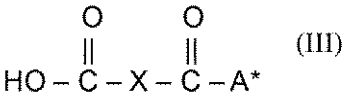


(II)

の脂肪二酸を提供するステップ；

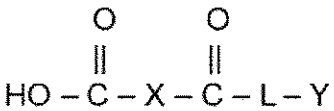
Ｂ）脂肪二酸を活性化基Ａと反応させて、式（ＩＩＩ）：

【化２３】



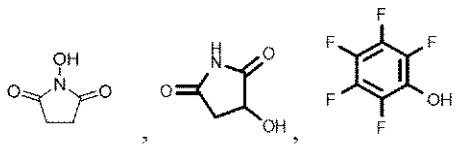
(III)

の酸アシル化合物（式中、Ａ＊は、脂肪アシル化合物に結合した活性化基である）を形成するステップ；及び
Ｃ）式（ＩＩＩ）の化合物を、式（ＩＶ）：
＊Ｌ－Ｙ　（ＩＶ）
（式中、＊Ｌは、反応性基を有するリンカーである）の化合物と反応させて；
式（Ｉａ）：
【化２４】



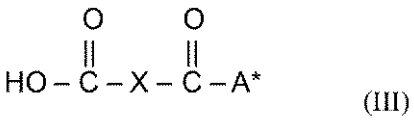
(Ia)

（式中、Ｘは、Ｃ４～Ｃ３２アルキル又はアルケニルであり；Ｌは、リンカーであり；Ｙは、オリゴヌクレオチドである）の化合物を形成するステップを含む。
【００７４】
式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、活性化基Ａ＊は、活性化エステルアミンである。実施形態では、ステップＢ）の活性化基Ａ＊は、
【化２５】

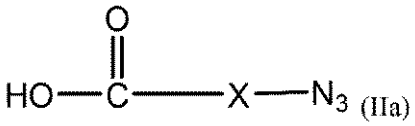


、ＴＢＴＵ、及びＨＡＴＵから選択され得る。
【００７５】
式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、ステップＢ）における反応は、カルボン酸をアミンと反応させて活性化エステルアミンを形成することを必要とする。実施形態では、作製方法のステップＢ）における反応は、カルボン酸をＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）と反応させて、活性化エステルアミンとしてＮＨＳエステルを形成することを必要とする。
【００７６】
実施形態では、作製方法のステップＢ）における反応は、有機溶媒中で実施される。実施形態では、作製方法のステップＢ）における反応は、酢酸エチル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルフラン、及びジクロロメタン、並びにそれらの混合物のうちの１つ以上を含む溶媒中で実施される。
【００７７】
実施形態では、作製方法のステップＢ）における反応は、カップリング試薬の存在下で実施される。実施形態では、カップリング試薬は、ジイミンである。実施形態では、カップリング試薬は、ジシクロヘキシルメタンジイミンである。
【００７８】
式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、ステップＣ）における反応は、脂肪アシル化合物に結合した活性化基Ａ＊とリンカー（Ｌ）上の第一級アミンとの間のカップリングを必要

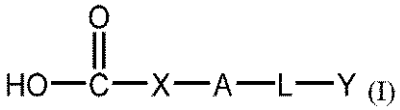
とする。
【００７９】
式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、式（ＩＶ）
＊Ｌ－Ｙ　（ＩＶ）
の化合物は、水性緩衝液に溶解している。実施形態では、式（ＩＶ）の化合物は、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、酢酸緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液、ＨＥＰＥＳ緩衝液、ＭＯＰＳ緩衝液、若しくはＰＩＰＥＳ緩衝液に溶解しているか、又はトリエチルアミン若しくはＤＩＰＥＡなどの塩基とともに純水に溶解している。
【００８０】
式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、式（ＩＩＩ）
【化２６】


(III)

の化合物は、極性非プロトン性溶媒に溶解している。式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、式（ＩＩＩ）の化合物は、アセトニトリルに溶解している。式（Ｉ）の作製方法の他の実施形態では、式（ＩＩＩ）の化合物は、ジメチルスルホキシドに溶解している。式（Ｉ）の作製方法の他の実施形態では、式（ＩＩＩ）の化合物は、アセトニトリルとジメチルスルホキシドとの混合物に溶解している。
【００８１】
他の実施形態では、式（Ｉ）の作製方法は、以下のステップ：
Ａ）式（ＩＩａ）
【化２７】

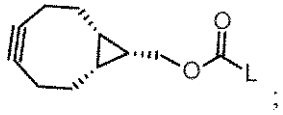

(IIa)

の脂肪酸を提供するステップ；
Ｂ）式（ＩＩａ）の化合物を、式（ＩＶ）：
＊Ｌ－Ｙ　（ＩＶ）
（式中、＊Ｌは、反応性基を有するリンカーである）の化合物と反応させて；
式（Ｉ）：
【化２８】

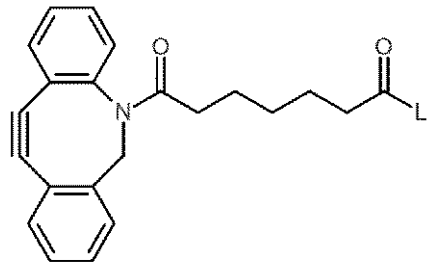

(I)

（式中、Ｘは、$Ｃ_4$～$Ｃ_{32}$アルキル又はアルケニルであり；Ａは、コンジュゲーション基であり；Ｌは、リンカーであり；Ｙは、上記のオリゴヌクレオチドである）の化合物を形成するステップを含む。
【００８２】
式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、反応性基を有するリンカーＬ＊は、

【化２９】



;



である。

【００８３】

式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、ステップＢ）及び／又はステップＣ）のいずれかの結果として生じる生成物は、精製され得る。実施形態では、ステップＢ）及び／又はステップＣ）のいずれかの結果として生じる生成物は、クロマトグラフィーによって精製される。実施形態では、ステップＢ）及び／又はステップＣ）のいずれかの結果として生じる生成物は、フラッシュクロマトグラフィーによって精製される。

【００８４】

式（Ｉ）を作製するための上記方法のいずれかの実施形態では、アシル基Ｘの長さは、C_6～C_{30}アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_8～C_{28}アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{10}～C_{26}アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{12}～C_{26}アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{14}～C_{24}アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{14}アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{16}アルキル又はアルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{20}アルキル又はアルケニルである。

【００８５】

式（Ｉ）を作製するための上記方法のいずれかの実施形態では、アシル基Ｘの長さは、C_6～C_{30}アルキルである。実施形態では、Ｘは、C_8～C_{28}アルキルである。実施形態では、Ｘは、C_{10}～C_{26}アルキルである。実施形態では、Ｘは、C_{12}～C_{26}アルキルである。実施形態では、Ｘは、C_{14}～C_{24}アルキルである。実施形態では、Ｘは、C_{14}アルキルである。実施形態では、Ｘは、C_{16}アルキルである。実施形態では、Ｘは、C_{20}アルキルである。

【００８６】

式（Ｉ）を作製するための上記方法のいずれかの実施形態では、Ｘは、C_6～C_{30}一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_8～C_{28}一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{10}～C_{26}一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{12}～C_{26}一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{14}～C_{24}一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{14}一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{16}一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{20}一価不飽和アルケニルである。

【００８７】

式（Ｉ）を作製するための上記方法のいずれかでは、Ｘは、C_6～C_{30}多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_8～C_{28}多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、C_{10}～C_{26}多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ

１２～Ｃ２６多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４～Ｃ２４多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１４多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ１６多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｘは、Ｃ２０多価不飽和アルケニルである。

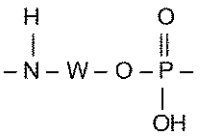
【００８８】

式（Ｉ）を作製するための上記方法のいずれかの実施形態では、リンカー（Ｌ）は、Ｃ３～Ｃ１０アミンを含む。式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、リンカー（Ｌ）は、Ｃ４～Ｃ９アミンを含む。式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、リンカー（Ｌ）は、Ｃ５～Ｃ８アミンを含む。式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、リンカー（Ｌ）は、Ｃ６～Ｃ７アミンを含む。式（Ｉ）の作製方法の実施形態では、リンカー（Ｌ）は、Ｃ６アミン（ヘキシルアミン）を含む。

【００８９】

実施形態では、リンカー（Ｌ）は、カルボキシアシル基とアミド結合を形成する。実施形態では、リンカー（Ｌ）は、オリゴヌクレオチドに接続されたリン酸末端を含む。いくつかの実施形態では、リンカー（Ｌ）は、

【化３０】



であり、式中、Ｗは、Ｃ１～Ｃ１０アルキル又はアルケニルである。

【００９０】

実施形態では、Ｗは、Ｃ２～Ｃ９アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ３～Ｃ８アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ４～Ｃ８アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ５～Ｃ７アルキルである。

【００９１】

実施形態では、Ｗは、Ｃ２～Ｃ９一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ３～Ｃ８一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ４～Ｃ８一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ５～Ｃ７一価不飽和アルケニルである。

【００９２】

実施形態では、Ｗは、Ｃ２～Ｃ９多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ３～Ｃ８多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ４～Ｃ８多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ５～Ｃ７多価不飽和アルケニルである。

【００９３】

実施形態では、Ｗは、Ｃ１アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ２アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ３アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ４アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ５アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ６アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ７アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ８アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ９アルキルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ１０アルキルである。

【００９４】

実施形態では、Ｗは、Ｃ２一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ３一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ４一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ５一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ６一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ７一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ８一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ９一価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ１０一価不飽和アルケニルである。

【００９５】

実施形態では、Ｗは、Ｃ$_2$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_3$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_4$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_5$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_6$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_7$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_8$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_9$多価不飽和アルケニルである。実施形態では、Ｗは、Ｃ$_{10}$多価不飽和アルケニルである。

【００９６】

実施形態では、リンカー（Ｌ）は、－ＮＨ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_3$Ｈ$_6$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_4$Ｈ$_8$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_5$Ｈ$_{10}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_6$Ｈ$_{12}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_7$Ｈ$_{14}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_8$Ｈ$_{16}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_9$Ｈ$_{18}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。実施形態では、Ｌは、－ＮＨ－Ｃ$_{10}$Ｈ$_{20}$－Ｏ－ＰＯ$_2$－である。

【００９７】

式（Ｉ）を作製するための上記方法のいずれかの実施形態では、Ｌは、オリゴヌクレオチドＹの５’末端に結合している。実施形態では、Ｌは、オリゴヌクレオチドＹの３’末端に結合している。実施形態では、Ｌは、オリゴヌクレオチドＹ中の修飾塩基でオリゴヌクレオチドに結合している。

【００９８】

式（Ｉ）を作製するための上記方法のいずれかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、非修飾のＤＮＡ、ＲＮＡであり得るか、又は修飾されていてもよい。修飾オリゴヌクレオチドは、非修飾ＲＮＡ又はＤＮＡに対して少なくとも１つの修飾を含む（即ち、少なくとも１つの修飾ヌクレオシド（修飾糖部分及び／若しくは修飾核酸塩基を含む、並びに／又は少なくとも１つの修飾ヌクレオシド間結合を含む）。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれかから選択され得る。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含有する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾糖部分、例えば、二環式糖部分（例えば、２つの環を含み、第２の環が、第１の環の原子のうちの２つを接続する架橋を介して形成されることにより、二環式構造が形成されている）を含有する。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの修飾核酸塩基を含有する。

【００９９】

脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドの送達方法及び使用方法

実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、投与されると体内の特定の組織に優先的に送達される。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、例として、投与されると心臓組織に送達される。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、例えば、投与されると肝臓組織に送達される。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、例として、投与されると脾臓組織に送達される。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、例えば、投与されると腎臓組織に送達される。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、例えば、投与されると皮膚組織に送達される。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、例えば、投与されると筋組織に送達される。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、例えば、投与されると肺組織に送達される。実施形態では、脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、例えば、投与されると脂肪組織に送達される。

【０１００】

実施形態では、本開示は、対象の心臓組織にオリゴヌクレオチドを送達する方法であって、ａ）本明細書に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供すること、及びｂ）酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを対象に投与すること、を含む方法

を提供する。
【０１０１】
実施形態では、本開示は、対象の心臓細胞における目的遺伝子の発現を低減させる方法であって、ａ）本明細書に記載の酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを提供すること、及びｂ）酸アシルコンジュゲートオリゴヌクレオチドを対象に投与すること、を含む方法を提供する。
【０１０２】
対象の心臓細胞における目的遺伝子の発現を低減させる方法の実施形態では、目的遺伝子は、本明細書に記載の任意のアンチセンス標的である。対象の心臓細胞における目的遺伝子の発現を低減させる方法の実施形態では、目的遺伝子は、ＭＡＬＡＴ１である。
【０１０３】
本明細書の方法の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又は修飾オリゴヌクレオチドであり得る。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれかから選択され得る。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格を有する。
【０１０４】
本明細書の方法の実施形態では、対象は、哺乳動物である。本明細書の方法の実施形態では、哺乳動物対象は、農業動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ）、研究動物（例えば、マウス、ラット、サル、チンパンジー）、又は伴侶動物（例えば、イヌ、ネコ、及びウサギ）などの動物である。本明細書の方法の実施形態では、哺乳動物対象は、ヒトである。
【０１０５】
本明細書の方法の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、心疾患を治療するために投与される。本明細書の方法の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、心筋梗塞を治療するために投与される。本明細書の方法の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、心筋梗塞を予防するために投与される。対象の心臓組織にオリゴヌクレオチドを送達する方法の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、心筋梗塞のリスクがある対象に投与される。
【０１０６】
医薬製剤
実施形態では、本明細書に記載の脂質コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、薬学的に許容される製剤に製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬製剤は更に、薬学的に許容される賦形剤、例えば、等張化剤、防腐剤、可溶化剤、錯化剤、分散剤、緩衝剤、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、患者への投与に適している。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、患者への筋肉内投与、皮下投与、静脈内投与、腹腔内投与、又は経口投与に適している。
【実施例】
【０１０７】
中間体
活性化Ｃ２２酸（中間体１）　－　２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸
【化３１】



ドコサン二酸（０．５ｇ、１．３５ｍｍｏｌ）、１－ヒドロキシピロリジン－２，５－ジオン（０．１５５ｇ、１．３５ｍｍｏｌ）、及びＮ，Ｎ－ジメチルピリジン－４－アミン（触媒量）を、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）（１７ｍＬ）に添加し、室温で１０分間撹拌した。ＴＨＦ（６．００ｍＬ）に溶媒和したジシクロヘキシルメタンジイミン（０．２７８ｇ、１．３５ｍｍｏｌ）を３０分間滴加して、次いで、混合物を室温で２４時間撹

拌した。濾過後、混合物を蒸発させた。メタノール（ＭｅＯＨ）（５ｍｌ）を残渣に添加し、４５℃に加熱して、次いで室温で１時間撹拌した。生成物（２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸）を晶析させ、濾過により分離し、少量のＭｅＯＨで洗浄し、減圧下で乾燥させて、所望の生成物：２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸を得た。収量は３５３ｍｇ（５６％）であった。ＬＣ／ＭＳ及びＨ，ＮＭＲは、予想生成物と一致している。

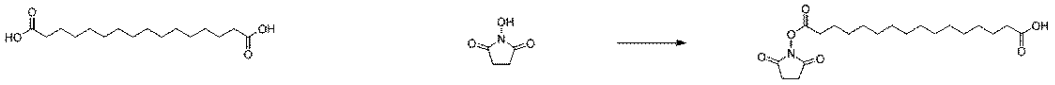
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　４６６．６［Ｍ－Ｈ］$^-$

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）１．１－１．４６（３３Ｈ，ｍ），１．６３（２Ｈ，ｔ），１．６８－１．７９（２Ｈ，ｍ），２．３５（２Ｈ，ｔｄ），２．６０（２Ｈ，ｔ）２．８４（４Ｈ，ｄ），

【０１０８】

ＮＨＳ活性化Ｃ１６酸（中間体２）　－　１６－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１６－オキソヘキサデカン酸

【化３２】



この化合物を、ヘキサデカン二酸（０．３ｇ、１．０５ｍｍｏｌ）から出発して中間体１に従って作製した。晶析後、１／１の酢酸エチル／ヘプタンを溶離液として使用したシリカでのフラッシュクロマトグラフィーで残渣を精製した。純粋画分を蒸発させて、所望の生成物（１６－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１６－オキソヘキサデカン酸）を得た。収量：１２０ｍｇ（３０％）。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　３８２．０［Ｍ－Ｈ］$^-$

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）１．２８（２１Ｈ，ｄ），１．６４（２Ｈ，ｔｄ），１．６９－１．７９（２Ｈ，ｍ），２．３５（２Ｈ，ｔｄ），２．６０（２Ｈ，ｔ），２．８４（４Ｈ，ｄ）．

【０１０９】

ＮＨＳ活性化Ｃ１７酸（中間体３）　－　１７－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１７－オキソヘプタデカン酸

【化３３】



この化合物を、ヘプタデカン二酸（０．３ｇ、１．０ｍｍｏｌ）から出発して中間体１に従って作製した。晶析後、１／１の酢酸エチル／ヘプタンを溶離液として使用したシリカでのフラッシュクロマトグラフィーで残渣を精製した。純粋画分を蒸発させて、所望の生成物（１７－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１７－オキソヘプタデカン酸）を得た。収量：９９ｍｇ、２５％。

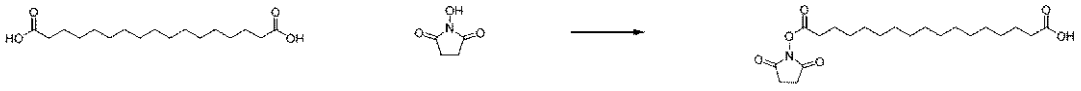
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　３９６．２［Ｍ－Ｈ］$^-$

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）１．２７（２３Ｈ，ｄ），１．５５－１．６９（２Ｈ，ｍ），１．７４（２Ｈ，ｐ），２．３５（２Ｈ，ｔｄ），２．６０（２Ｈ，ｔ），２．７６－２．９１（４Ｈ，ｍ）．

【０１１０】

ＮＨＳ活性化Ｃ１８酸（中間体４）　－　１８－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１８－オキソオクタデカン酸

【化３４】



この化合物を、オクタデカン二酸（０．３ｇ、０．９５ｍｍｏｌ）から出発して中間体１に従って作製した。晶析後、２／１の酢酸エチル／ヘプタンを溶離液として使用したシリカでのフラッシュクロマトグラフィーで残渣を精製した。純粋画分を蒸発させて、所望の生成物（１８－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１８－オキソオクタデカン酸）を得た。収量：９３ｍｇ、２４％。

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　４１０．３［Ｍ－Ｈ］$^{-}$

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）１．２５（２５Ｈ，ｓ），１．６３（２Ｈ，ｑ），１．７４（２Ｈ，ｐ），２．３５（２Ｈ，ｔ），２．６０（２Ｈ，ｔ），２．８３（４Ｈ，ｓ）．

【０１１１】

ＮＨＳ活性化Ｃ２０酸（中間体５）　－　２０－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２０－オキソイコサン酸

【化３５】



化合物（２０－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２０－オキソイコサン酸）を、イコサン二酸（０．３ｇ、０．８８ｍｍｏｌ）から出発して中間体１に従って作製した。収量：２２９ｍｇ、５９％。

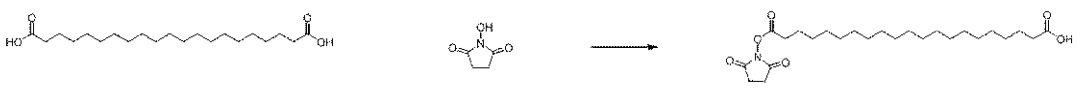
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　４３８．２［Ｍ－Ｈ］$^{-}$

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）１．２－１．４５（２９Ｈ，ｍ），１．６３（２Ｈ，ｑｄ），１．７４（２Ｈ，ｐ），２．３５（２Ｈ，ｔｄ），２．６０（２Ｈ，ｔ），２．８３（４Ｈ，ｄ）．

【０１１２】

ＮＨＳ活性化Ｃ２１酸（中間体６）　－　２１－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２１－オキソヘンイコサン酸

【化３６】



この化合物を、ヘンイコサン二酸（０．３ｇ、１．０５ｍｍｏｌ）から出発して中間体１に従って作製した。晶析後、１／１の酢酸エチル／ヘプタンを溶離液として使用したシリカでのフラッシュクロマトグラフィーで残渣を精製した。純粋画分を蒸発させて、所望の生成物（２１－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２１－オキソヘンイコサン酸）を得た。収量：２１ｍｇ、（６％）。

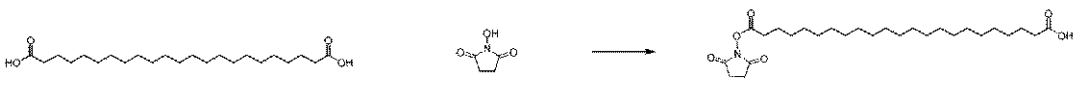
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　４５２．０［Ｍ－Ｈ］$^{-}$

１Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）１．２７（３１Ｈ，ｄ），１．５８－１．６９（２Ｈ，ｍ），１．６９－１．８１（２Ｈ，ｍ），２．３５（２Ｈ，ｔ），２．６０（２Ｈ，ｔ），２．７７－２．９１（４Ｈ，ｍ）．

【０１１３】

ＮＨＳ活性化Ｃ２３酸（中間体７）　－　２３－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２３－オキソトリコサン酸

【化３７】

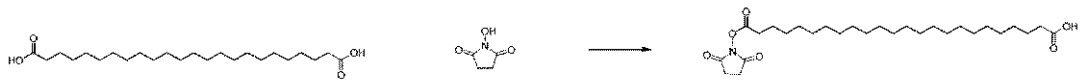


化合物（２３－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２３－オキソトリコサン酸）を、トリコサン二酸（６６ｍｇ、０．１７ｍｍｏｌ）から出発して中間体１に従って作製した。固体を遠心分離により単離した。収量：６０ｍｇ、（７３％）。
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　４８０．１［Ｍ－Ｈ］$^{-}$
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）１．２６（３５Ｈ，ｄ），１．６４（２Ｈ，ｔｄ），１．７４（２Ｈ，ｐ），２．３－２．３８（２Ｈ，ｍ），２．６０（２Ｈ，ｔ），２．７７－２．９（４Ｈ，ｍ）．

【０１１４】

ＮＨＳ活性化Ｃ２４酸（中間体８）　－　２４－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２４－オキソテトラコサン酸

【化３８】



この化合物を、テトラコサン二酸（０．３ｇ、０．７５ｍｍｏｌ）から出発して中間体１に従って作製した。晶析後、１／１の酢酸エチル／ヘプタンを溶離液として使用したシリカでのフラッシュクロマトグラフィーで残渣を精製した。純粋画分を蒸発させて、所望の生成物（２４－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２４－オキソテトラコサン酸）を得た。収量：４４ｍｇ、１２％。
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　４９４．１［Ｍ－Ｈ］$^{-}$
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）１．２５（３７Ｈ，ｓ），１．６－１．６７（２Ｈ，ｍ），１．６９－１．７９（２Ｈ，ｍ），２．３５（２Ｈ，ｔ），２．６０（２Ｈ，ｔ），２．８４（４Ｈ，ｄ）．

【０１１５】

ＮＨＳ活性化Ｃ１９酸（中間体９）　－　１－（ｔｅｒｔ－ブチル）１９－（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）ノナデカンジオアート

【化３９】



１９－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）－１９－オキソノナデカン酸（０．４ｇ、１．０４ｍｍｏｌ）、１－ヒドロキシピロリジン－２，５－ジオン（０．１２０ｇ、１．０４ｍｍｏｌ）、及びＮ，Ｎ－ジメチルピリジン－４－アミン（０．６３５ｍｇ、５．２０μｍｏｌ）を、ＴＨＦ（７ｍＬ）に添加し、室温で１０分間撹拌した。ＴＨＦ（３ｍＬ）に溶解したジシクロヘキシルメタンジイミン（０．２１５ｇ、１．０４ｍｍｏｌ）を３０分間にわたり滴加して、次いで混合物を室温で２４時間撹拌した。濾過後、混合物を蒸発させた。ＭｅＯＨ（５ｍｌ）を残渣に添加し、６０℃に加熱して、次いで室温で１時間撹拌した。生成物（１－（ｔｅｒｔ－ブチル）１９－（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）ノナデカンジオアート）を晶析させ、濾過により分離し、少量のＭｅＯＨで洗浄し、減圧下で乾燥させた。収量：３６１ｍｇ、７２％
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）１．２７（２４Ｈ，ｄ），１．４０（２Ｈ，ｓ），１．４４（９Ｈ，ｓ），１．５１－１．６３（２Ｈ，ｍ），１．６９－１．８（２Ｈ，ｍ），２．１９（２Ｈ，ｔ），２．６０（２Ｈ，ｔ），２．８３（４Ｈ，ｄ）．

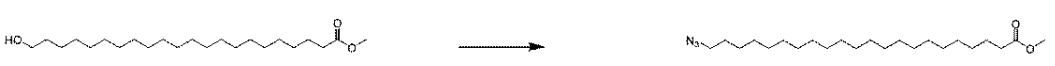
【０１１６】
中間体１０　－　１９－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１９－オキソノナデカン酸
【化４０】



中間体９　－　１－（ｔｅｒｔ－ブチル）１９－（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）ノナデカンジオアート（１５０ｍｇ、０．３１ｍｍｏｌ）を２，２，２－トリフルオロ酢酸（３ｍＬ、０．３１ｍｍｏｌ）に添加して、反応混合物を室温で４時間撹拌した。ＴＦＡを蒸発させ、トルエンで３回、ＤＣＭで１回共蒸発させた。残渣を６０℃でＭｅＯＨ（４ｍｌ）に溶解させ、溶液を室温で１５分間撹拌した。生成物を沈殿させ、濾過し、真空下で乾燥させて、７６ｍｇ（５７％）の所望の化合物（１９－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１９－オキソノナデカン酸）を得た。
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　４２４．０［Ｍ－Ｈ］$^{-}$
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）１．２６（２７Ｈ，ｄ），１．６３（２Ｈ，ｑ），１．７４（２Ｈ，ｐ），２．３５（２Ｈ，ｔ），２．６０（２Ｈ，ｔ），２．７６－２．９（４Ｈ，ｍ）．
【０１１７】
ＮＨＳ活性化Ｃ１８（９Ｚ）酸（中間体１１）　－　（Ｚ）－１８－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１８－オキソオクタデカ－９－エン酸
【化４１】



（Ｚ）－オクタデカ－９－エン二酸（８８ｍｇ、０．２８ｍｍｏｌ）、１－ヒドロキシピロリジン－２，５－ジオン（３２．４ｍｇ、０．２８ｍｍｏｌ）、及びＮ，Ｎ－ジメチルピリジン－４－アミン（０．３４４ｍｇ、２．８２μｍｏｌ）をＴＨＦ（２ｍＬ）に添加し、室温で１０分間撹拌した。溶液を氷浴で０ｇｒに冷却し、ＴＨＦ（１ｍＬ）に溶解したジシクロヘキシルメタンジイミン（５８．１ｍｇ、０．２８ｍｍｏｌ）を１５分間にわたり滴加して、次いで混合物を室温で２４時間撹拌した。濾過後、混合物を蒸発させた。ＭｅＯＨ（０．５ｍｌ）を残渣に添加した。固体（不純物）を濾過により除去し、濾液を蒸発させて、所望の生成物（Ｚ）－１８－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１８－オキソオクタデカ－９－エン酸）を得た。収量：９０ｍｇ（７８％）
ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　４０８．２［Ｍ－Ｈ］$^{-}$
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$）１．２２－１．４５（１６Ｈ，ｍ），１．６２（３Ｈ，ｑｄ），１．７４（２Ｈ，ｐ），２．００（４Ｈ，ｑ），２．３－２．３９（２Ｈ，ｍ），２．５９（２Ｈ，ｔ），２．８３（４Ｈ，ｄ），５．３－５．４２（２Ｈ，ｍ）．
【０１１８】
アジド（Ａｚｉｄ）Ｃ２２酸（中間体１２）　－　メチル２２－アジドドコサノアート（ａｚｉｄｏｄｏｃｏｓａｎｏａｔｅ）
【化４２】



ＴＨＦ（１ｍＬ）に溶解したジフェニルリン酸アジド（４６．４μｌ、０．２２ｍｍｏｌ）を、ＴＨＦ（２ｍＬ）に溶解したメチル２２－ヒドロキシドコサノアート（４０ｍｇ

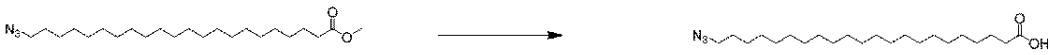
、０．１１ｍｍｏｌ）、ジイソプロピル（Ｅ）－ジアゼン－１，２－ジカルボキシレート（４２．５μｌ、０．２２ｍｍｏｌ）、及びトリフェニルホスファン（５６．６ｍｇ、０．２２ｍｍｏｌ）に室温で添加した。反応混合物を３時間撹拌した。ＴＨＦを蒸発させ、１０／１のヘプタン／酢酸エチルを溶離液として使用したシリカでのフラッシュクロマトグラフィーで残渣を精製した。生成物を再度フラッシュ精製した。１０／１のヘプタン／酢酸エチル。純粋画分を蒸発させて、３１ｍｇ、９１％の所望の生成物（メチル２２－アジドドコサノアート）を得た。

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）１．２５（３４Ｈ，ｓ），１．５４－１．６６（４Ｈ，ｍ），２．２９（２Ｈ，ｔ），３．２５（２Ｈ，ｔ），３．６６（３Ｈ，ｓ）．

【０１１９】

中間体１３　－　２２－アジドドコサン酸（ａｚｉｄｏｄｏｃｏｓａｎｏｉｃ　ａｃｉｄ）

【化４３】



中間体１２　－　メチル２２－アジドドコサノアート（３５ｍｇ、０．０９ｍｍｏｌ）を、ＭｅＯＨ（０．５ｍＬ）及び水（０．１ｍＬ）中の水酸化リチウム（１０．５９ｍｇ、０．４４ｍｍｏｌ）溶液に添加した。反応混合物を室温で一晩撹拌した。酢酸エチル（１ｍｌ）、水（１ｍｌ）、及び塩化水素（３６．９μｌ、０．４４ｍｍｏｌ）を添加した。有機相を分離し、Ｎａ２ＳＯ４で乾燥させ、濾過し、蒸発させて、所望の化合物（２２－アジドドコサン酸）を得た。収量：２８ｍｇ、８３％

ＭＳ（ＥＳＩ）ｍ／ｚ　３８０．３［Ｍ－Ｈ］$^-$

^{1}Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）１．２５（３５Ｈ，ｓ），１．５５－１．６７（４Ｈ，ｍ），２．３４（２Ｈ，ｔ），３．２５（２Ｈ，ｔ）．

【０１２０】

中間体１４　－　［（１Ｒ，８Ｓ）－９－ビシクロ［６．１．０］ノン－４－イニル］メチル活性化ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ

ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミンを水（２４００μｌ）に溶解させ、トリエチルアミン（２８．２μｌ、０．２０ｍｍｏｌ）を添加した。アセトニトリル（６５０μｌ）に予め溶解させた（（１Ｒ，８Ｓ，９ｓ）－ビシクロ［６．１．０］ノン－４－イン－９－イル）メチル（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）カーボネート（９．８９ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）を添加し、反応混合物を５分間撹拌した。完全に変換されたことがＬＣＭＳで示された。ｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（３００μｌ）を添加し、エタノール（２４ｍｌ）を添加することによりオリゴを沈殿させ、短時間ボルテックスし、－２０Ｃで一晩放置した。これを０Ｃで１０分間、３８００ｒｐｍで遠心分離し、透明上清を除去して、ペレットを真空で乾燥させた。収量：１０１ｍｇ。

ＭＳ（ＥＳＩ$^-$）ｍ／ｚ　１４２４．８（ｚ＝４）

【０１２１】

中間体１５　－　ｔｅｒｔ－ブチル（１－アジド－１５－｛２－［（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ］エチル｝－１１－オキソ－３，６，９－トリオキサ－１２，１５－ジアザヘプタデカン－１７－イル）カルバメート

ジクロロメタン（１ｍＬ）及び０．２ｍＬのジメチルホルムアミド（０．２ｍＬ）中の２－（２－（２－（２－アジドエトキシ）エトキシ）エトキシ）酢酸（９４ｍｇ、０．４０ｍｍｏｌ）溶液を氷冷し、Ｎ－エチル－Ｎ－イソプロピルプロパン－２－アミン（０．１４０ｍＬ、０．８０ｍｍｏｌ）及び２－（３Ｈ－［１，２，３］トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジン－３－イル）－１，１，３，３－テトラメチルイソウロニウムヘキサフルオロホスフェート（Ｖ）（１５３ｍｇ、０．４０ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を５分間撹拌し、次いでジクロロメタン及びジメチルホルムアミド（０．２ｍＬ）中のジ－ｔｅｒｔ－ブチル（（（２－アミノエチル）アザンジイル）ビス（エタン－２，１－ジイル））ジ

カルバメート（ＣＡＳ　１６１０３８－１１－５）（１３９ｍｇ、０．４０ｍｍｏｌ）の溶液を添加した。黄色反応混合物を室温で１時間撹拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水及びブラインで洗浄した。有機相を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、蒸発乾固させた。流量１００ｍＬ／分で２０分にわたるアンモニア（０．２％）緩衝液中の２０～７５％アセトニトリルの勾配を使用して、化合物をＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８カラム（１０μｍ　ＩＤ　２５０×５０ｍｍ）での分取ＨＰＬＣにより精製した。ＬＳ－ＭＳ分析により生成物を検出した。生成物画分を濃縮して、所望の化合物（ｔｅｒｔ－ブチル（１－アジド－１５－｛２－［（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ］エチル｝－１１－オキソ－３，６，９－トリオキサ－１２，１５－ジアザヘプタデカン－１７－イル）カルバメート）を得た。収量１３１ｍｇ（５８．１％）

ＭＳ（ＥＳＩ$^{+}$）ｍ／ｚ　５６２．５（ｚ＝１）

１Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）１．４６（１８Ｈ，ｓ），３．３０（４Ｈ，ｓ），３．４－３．４７（３Ｈ，ｍ），３．４８－３．６３（４Ｈ，ｍ），３．７２（１３Ｈ，ｄｑ），４．０５（２Ｈ，ｓ），５．８４（２Ｈ，ｓ），７．８７（１Ｈ，ｓ）．

【０１２２】

中間体１６　－　１－アジド－１５－（２－（２１－カルボキシヘンイコサンアミド）エチル）－１１，１９－ジオキソ－３，６，９－トリオキサ－１２，１５，１８－トリアザテトラコンタン－４０－オイック酸

ジクロロメタン（５００μｌ）中の中間体１５（６０ｍｇ、１１０μｍｏｌ）とトリイソプロピルシラン（５μｌ、１１０μｍｏｌ）との溶液に、２，２，２－トリフルオロ酢酸（５００μｌ）を室温で添加した。混合物を室温で５時間撹拌し、蒸発乾固させた（ＭＳ（ＥＳＩ$^{+}$）ｍ／ｚ　３６２．４（ｚ＝１）。粗ＴＦＡ塩（１５ｍｇ、３０μｍｏｌ）に、アセトニトリル（１００μｌ）、水（１００μｌ）、トリエチルアミン（２８．３μｌ、０．２１ｍｍｏｌ）、及びＮ，Ｎ－ジメチルピリジン－４－アミン（０．１５６ｍｇ、１．２８μｍｏｌ）を添加して、透明溶液を得た。テトラヒドロフラン（３００μｌ）に溶解した中間体１（４０ｍｇ、９０μｍｏｌ）を添加して、混合物を４５℃で４時間撹拌した。反応物を蒸発させ、ＤＭＳＯで希釈し、流量１００ｍＬ／分で２０分にわたるアンモニア（０．２％）緩衝液中の２０～７５％アセトニトリルの勾配を使用して、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８カラム（１０μｍ　ＩＤ　２５０×５０ｍｍ）での分取ＨＰＬＣにより精製した。ＬＳ－ＭＳ分析により生成物を検出した。生成物画分を濃縮して、所望の化合物（１－アジド－１５－（２－（２１－カルボキシヘンイコサンアミド）エチル）－１１，１９－ジオキソ－３，６，９－トリオキサ－１２，１５，１８－トリアザテトラコンタン－４０－オイック酸）を得た。収量４．４ｍｇ（１６．２％）

ＭＳ（ＥＳＩ$^{+}$）ｍ／ｚ　１０６６．６（ｚ＝１）

【０１２３】

中間体１７　－　マレイミド活性化ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ

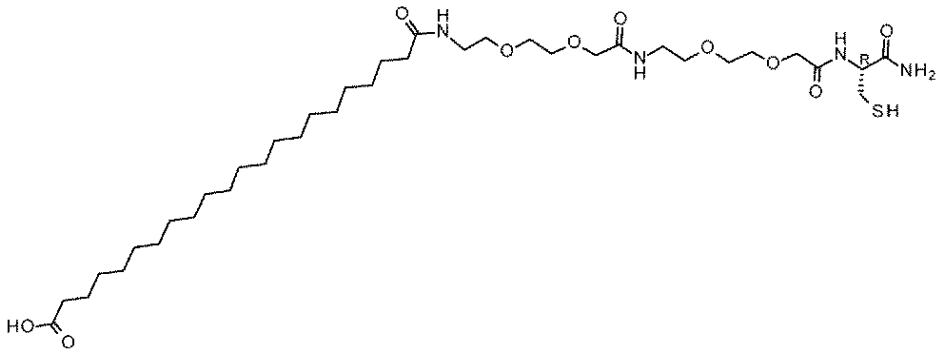
【化４４】



ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミンをリン酸緩衝液（０．１Ｍ　ｐＨ７．３４、６６０μｌ）に溶解させ、アセトニトリル（３３０μＬ）に溶解した２，５－ジオキソピロリジン－１－イル３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）プロパノアート（９．７６ｍｇ、０．０４ｍｍｏｌ）を添加した。透明溶液を室温で１．５時間撹拌した。酢酸ナトリウム（３Ｍ、ｐＨ５．２、１００μｌ）を添加して、次いでエタノール（４ｍＬ）を添加することによりオリゴを沈殿させ、短時間ボルテックスし、－２０Ｃで３０分間静置した。混合物を０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離

し、透明上清を除去した。ペレットを水１ｍＬ及びｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（１００μｌ）に溶解させることにより（完全な溶解には振盪が必要）オリゴをもう一度洗浄し、続いて４ｍＬのエタノールを添加し、－２０で３０分間冷却し、次いで０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットを窒素流下で乾燥させた。
収量２７ｍｇ（９７％）
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４１８．１（ｚ＝４）
【０１２４】
中間体１８　－　ジ－ｔｅｒｔ－ブチル２２，２２’－（（（２Ｒ，２’Ｒ）－ジスルファンジイルビス（３－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）－３－オキソプロパン－１，２－ジイル））ビス（アザンジイル））ビス（２２－オキソドコサノアート）
　Ｎ－メチル－ピロリジノン（１ｍｌ）中の２２－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）－２２－オキソドコサン酸（８７ｍｇ、０．２０ｍｍｏｌ）に、ＤＩＰＥＡ（３１．７μｌ、０．１８ｍｍｏｌ）及び２－（３Ｈ－［１，２，３］トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジン－３－イル）－１，１，３，３－テトラメチルイソウロニウムヘキサフルオロホスフェート（Ｖ）（６９ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）を添加した。次いで、ジメチルホルムアミド（１ｍｌ）中のジ－ｔｅｒｔ－ブチル３，３’－ジスルファンジイル（２Ｒ，２’Ｒ）－ビス（２－アミノプロパノアート）（３２ｍｇ、０．０９ｍｍｏｌ）を添加した。得られた不透明反応混合物を室温で２４時間撹拌した。混合物をジエチルエーテルで希釈し、水、重炭酸ナトリウム（１０％）、硫酸水素カリウム（０．５Ｍ）、水、及びブラインで洗浄した。有機相を蒸発させ、残渣をヘプタン及び徐々に増加させたジエチルエーテルとともに２ｇのシリカプラグに通した。モリブデン酸セリウムアンモニウム染色を用いたＴＬＣにより生成物を検出した。純粋生成物画分を蒸発させて、所望の生成物（ジ－ｔｅｒｔ－ブチル２２，２２’－（（（２Ｒ，２’Ｒ）－ジスルファンジイルビス（３－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）－３－オキソプロパン－１，２－ジイル））ビス（アザンジイル））ビス（２２－オキソドコサノアート）を得た。収量：８５ｍｇ、（８０％）。
１Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）１．２７（６４Ｈ，ｓ），１．４７（１９Ｈ，ｓ），１．５０（１７Ｈ，ｓ），１．５５－１．６２（４Ｈ，ｍ），１．６６（４Ｈ，ｔ），２．２２（４Ｈ，ｔ），２．２７（４Ｈ，ｔｄ），３．２２（４Ｈ，ｄｄ），４．７７（２Ｈ，ｄｔ），６．４６（２Ｈ，ｄ）．
【０１２５】
中間体１９　－　２２，２２’－（（（１Ｒ，１’Ｒ）－ジスルファンジイルビス（１－カルボキシエタン－２，１－ジイル））ビス（アザンジイル））ビス（２２－オキソドコサン酸）
　ジクロロメタン（１００μｌ）中の中間体１８（１５ｍｇ、１０μｍｏｌ）溶液に、２，２，２－トリフルオロ酢酸（５００μｌ）を室温で添加した。混合物を室温で１５時間撹拌し、蒸発乾固させ、次いでトルエンと共蒸発させて、所望の化合物（２２，２２’－（（（１Ｒ，１’Ｒ）－ジスルファンジイルビス（１－カルボキシエタン－２，１－ジイル））ビス（アザンジイル））ビス（２２－オキソドコサン酸））を得た。
収量１２ｍｇ（９９％）
ＭＳ（ＥＳＩ＋）ｍ／ｚ　９４４．１（ｚ＝１）
【０１２６】
中間体２１　－　（１－｛［（２Ｒ）－１－アミノ－１－オキソ－３－スルファニルプロパン－２－イル］アミノ｝－１，１０，１９－トリオキソ－３，６，１２，１５－テトラオキサ－９，１８－ジアザテトラコンタン－４０－オイック酸）

【化４５】



マイクロ波加熱器を備えたＢｉｏｔａｇｅ　Ａｌｓｔｒａペプチド合成装置で自動固相合成により合成を実施した。Ｒｉｎｋ　ａｍｉｄｅ　Ｃｈｅｍ　Ｍａｔｒｉｘ樹脂（０．４ｇ、０．１６ｍｍｏｌ、充填量０．４ｍｍｏｌ／ｇ）を１０ｍＬの反応バイアルに量り取り、撹拌下、５５℃で１０分間、ＤＭＦ中で２回膨潤させた。Ｎ－（（（９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ）カルボニル）－Ｓ－トリチル－Ｌ－システイン（０．３８７ｇ、０．２Ｍ、３．３ｍＬ、０．６６ｍｍｏｌ）、オキシマ（０．５Ｍ、４ｍＬ、１．３ｍＬ、０．６６ｍｍｏｌ）、及びジイソプロピルカルボジイミド（２Ｍ、０．２６５ｍＬ、０．５３ｍｍｏｌ）のＮＭＰ溶液を添加し、反応物を４０℃で２０分間撹拌した。樹脂をＤＭＦで洗浄し（４回）、ピペリジン（ＤＭＦ中２０％）で２回、３＋１０分間処理した。１－（９Ｈ－フルオレン－９－イル）－３－オキソ－２，７，１０－トリオキサ－４－アザドデカン－１２－オイック酸について、同じカップリング手順を２回繰り返した。

【０１２７】

次に、２２－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）－２２－オキソドコサン酸（１３７ｍｇ、０．３２ｍｍｏｌ）（４当量、ＤＭＦ／ＮＭＰ１：１（４ｍＬ）中）、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］ピリジン－１－イウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート（Ｖ）（ＨＡＴＵ）（１２２ｍｇ、０．３２ｍｍｏｌ）、及びＮ－エチル－Ｎ－イソプロピルプロパン－２－アミン（６２．９μｌ、０．３６ｍｍｏｌ）の溶液を樹脂に添加して、反応物を室温で１時間４５分撹拌した。樹脂を最終的にＤＭＦ（４回）、メタノール、及びＤＣＭで洗浄した。ＴＦＡ／Ｈ２Ｏ／ＤＯＤＴ／／ＴＩＰＳ（９４／２．５／２．５／１）（３ｍＬ）の混合物を樹脂に添加して、反応混合物を室温で２時間撹拌した。樹脂を濾別し、ＴＦＡ（約２ｍＬ）で洗浄して、これを濾液と合わせた。生成物を冷Ｅｔ２Ｏ中に沈殿させた。沈殿した生成物を遠心分離し、上清を廃棄した。冷Ｅｔ２Ｏを添加し、遠心分離することによって固体物質を３回洗浄した。得られた固体物質をＭｅＣＨ／Ｈ２Ｏ／ＴＦＡ（５０／５０／０．１）に懸濁させ、凍結乾燥させた。

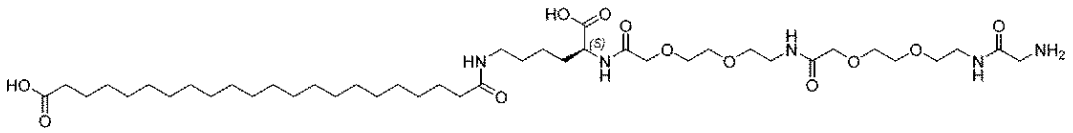
【０１２８】

流量１００ｍＬ／分で２０分にわたるＨ２Ｏ／ＡＣＮ／ＦＡ　９５／５／０．２の緩衝液中の３５～８０％アセトニトリルの勾配を使用して、化合物をＫｒｏｍａｓｉｌ　Ｃ８カラム（１０μｍ　ＩＤ　２５０×５０ｍｍ）での分取ＨＰＬＣにより精製した。化合物を２２０ｎｍのＵＶにより検出した。生成物画分を凍結乾燥させて、所望の化合物を得た。

収量２７ｍｇ（４４％）

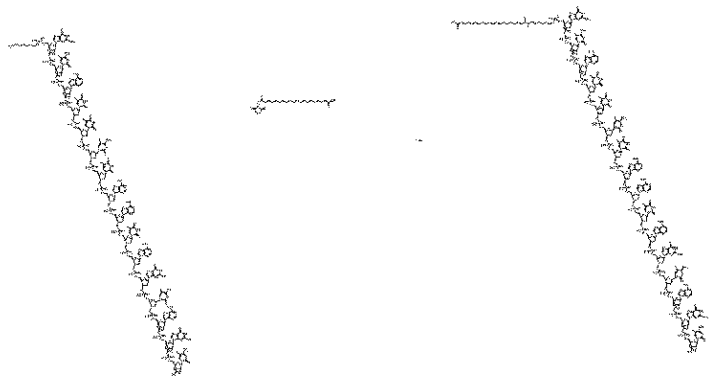
１Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_3$）１．２７（３２Ｈ，ｓ），１．６１－１．６７（４Ｈ，ｍ），２．２３（２Ｈ，ｔ），２．３４（２Ｈ，ｔ），２．６５（３Ｈ，ｓ），２．８５（１Ｈ，ｄｄｄ），３．０９（１Ｈ，ｄｄｄ），３．４５－３．５４（３Ｈ，ｍ），３．５９（２Ｈ，ｔ），３．６１－３．７３（１０Ｈ，ｍ），３．７８（１Ｈ，ｑｄ），４．０５（２Ｈ，ｓ），４．７８（１Ｈ，ｄｄｄ），６．５２（２Ｈ，ｄ），６．７５（１Ｈ，ｓ），７．３２（１Ｈ，ｔ），７．７８（１Ｈ，ｄ）．カルボン酸プロトン

は積分せず。
ＭＳ（ＥＳＩ＋）ｍ／ｚ　７６３．９（ｚ＝１）
【０１２９】
中間体２２　－　（Ｓ）－１－アミノ－２２－カルボキシ－２，１１，２０，２８－テトラオキソ－６，９，１５，１８－テトラオキサ－３，１２，２１，２７－テトラアザノナテトラコンタン－４９－オイック酸
【化４６】



Ｗａｎｇ樹脂に結合した（Ｓ）－２－（（（（９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）－６－（（１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソシクロヘキシリデン）－３－メチルブチル）アミノ）ヘキサン酸（Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ－ＩｖＤｄｅ－Ｗａｎｇ樹脂、充填量０．６ｍｍｏｌ／ｇ、０．３ｇ、）、１－（９Ｈ－フルオレン－９－イル）－３－オキソ－２，７，１０－トリオキサ－４－アザドデカン－１２－オイック酸、及び（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）グリシンから出発して、中間体２１の合成のためのカップリング及び脱保護ステップについて記載された方法に従って、樹脂に結合した前駆体（Ｓ）－２３－（４－（（１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソシクロヘキシリデン）－３－メチルブチル）アミノ）ブチル）－１－（９Ｈ－フルオレン－９－イル）－３，１２，２１－トリオキソ－２，７，１０，１６，１９－ペンタオキサ－４，１３－ジアザテトラコサン－２４－オイック酸を合成した。次に、樹脂を５％ヒドラジン／ＤＭＦで６回、２＋５＋５＋５＋５＋５分間、室温で処理することによりＩｖＤｄｅ基を除去した。次に、中間体２１の合成で使用したものと同じ手順を、２２－（ｔｅｒｔ－ブトキシ）－２２－オキソドコサン酸（１３７ｍｇ、０．３２ｍｍｏｌ）のカップリング、並びに最終生成物の切断及び精製のために実施した。
ＭＳ（ＥＳＩ＋）ｍ／ｚ　８４６．７（ｚ＝１）
１Ｈ　ＮＭＲ（５００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ）１．２３（３４Ｈ，ｓ），１．３３（２Ｈ，ｐ），１．４６（４Ｈ，ｄｔ），１．５６（１Ｈ，ｄ），１．６８（１Ｈ，ｄ），２．００（２Ｈ，ｔ），２．１７（２Ｈ，ｔ），２．９５（２Ｈ，ｑ），３．２８（３Ｈ，ｐ），３．３２（１Ｈ，ｄ），３．４２（２Ｈ，ｓ），３．４７（４Ｈ，ｑ），３．５１－３．６３（８Ｈ，ｍ），３．８４（２Ｈ，ｓ），３．８８－３．９６（３Ｈ，ｍ），７．５８（１Ｈ，ｄ），７．７１（１Ｈ，ｄ），７．８７（１Ｈ，ｔ），８．４５（１Ｈ，ｓ）．ＮＨ２及び２×ＣＯ２Ｈは積分せず
【０１３０】
実施例１　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のＣ$_{20}$飽和酸コンジュゲートの合成

【化４７】



ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（３４ｍｇ、６．１５μｍｏｌ）を水（８００μｌ）に溶解させ、トリエチルアミン（９．５３μｌ、０．０７ｍｍｏｌ）を添加した。温かい（６０℃）アセトニトリル（２００μｌ）とＤＭＳＯ（１２０μｌ）との混合物に溶解した２０－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２０－オキソイコサン酸（４．０６ｍｇ、９．２３μｍｏｌ）（中間体５）を、溶解したオリゴヌクレオチドに添加して、反応混合物を室温で６０分間撹拌した。ｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（９０μｌ）を添加して、次いでエタノール（８０００μｌ）を添加することによりオリゴコンジュゲートを沈殿させ、混合物を０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離し、透明上清を除去した。ペレットを真空下で乾燥させ、残渣を室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の５～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させ、所望の化合物をアンモニウム塩として得た。収量は１５ｍｇ（４０％）であった。
ＭＳ（ＥＳＩ⁻）ｍ／ｚ　１４６１．４（ｚ＝４）

【０１３１】

実施例２　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{16}飽和酸コンジュゲートの合成

実施例２の化合物を、ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（３６ｍｇ、６．５２μｍｏｌ）及び１６－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１６－オキソヘキサデカン酸（５．００ｍｇ、１３．０μｍｏｌ（中間体２）から出発して、実施例１（Ｃ２０酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ）に従って作製した。収量は２０ｍｇ（５０％）であった。
ＭＳ（ＥＳＩ⁻）ｍ／ｚ　１４４７．５（ｚ＝４）

【０１３２】

実施例３　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{17}飽和酸コンジュゲートの合成

実施例３の化合物を、ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（３４ｍｇ、６．１５μｍｏｌ）及び１７－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１７－オキソヘプタデカン酸（４．８９ｍｇ、１２．３μｍｏｌ）（中間体３）から出発して、実施例１（Ｃ２０酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ）に従って作製した。反応時間１０分間。収量は１８ｍｇ（４８％）であった。
ＭＳ（ＥＳＩ⁻）ｍ／ｚ　１４５０．９（ｚ＝４）

【０１３３】

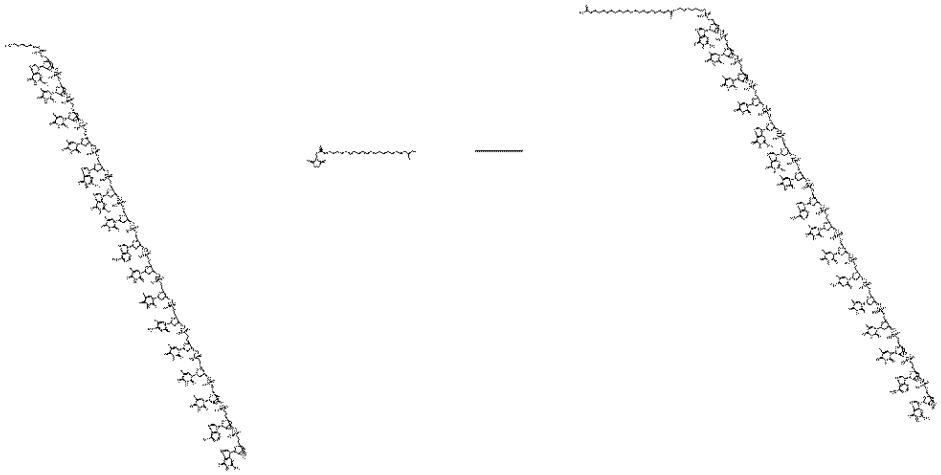
実施例４　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{18}飽和酸コンジュゲートの合成

実施例４の化合物を、ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（３８ｍｇ、６．８８μｍｏｌ）から出発し、実施例１（Ｃ２０酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ）に従って作製して、トリエチルアミン（９．５３μｌ、０．０７ｍｍｏｌ）を添加した。１８－（（２，５－

ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１８－オキソオクタデカン酸（５．６６ｍｇ、１３．８μｍｏｌ）（中間体４）。反応時間：９０分。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１５～９０％アセトニトリルの勾配を使用することによる、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムでの精製。収量：２４ｍｇ（５７％）。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４５４．４（ｚ＝４）
【０１３４】
実施例５　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{19}飽和酸コンジュゲートの合成
　この化合物を、ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（３４ｍｇ、６．１５μｍｏｌ）及び１９－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１９－オキソノナデカン酸（５．２４ｍｇ、１２．３ｍｍｏｌ）（中間体１０）から出発して、実施例１（Ｃ２０酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ）に従って作製した。反応時間：３０分。収量は２１ｍｇ（５６％）であった。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４５７．７（ｚ＝４）
【０１３５】
実施例６　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{21}飽和酸コンジュゲートの合成
　この化合物を、ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（３４ｍｇ、６．１５μｍｏｌ）及び２１－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２１－オキソヘンイコサン酸（５．５８ｍｇ、１２．３μｍｏｌ　ｌ）（中間体６）から出発して、実施例１（Ｃ２０酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ）に従って作製した。収量２０ｍｇ（５３％）。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４６５．１（ｚ＝４）
【０１３６】
実施例７　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{22}飽和酸コンジュゲートの合成
　水（２．４ｍｌ）に溶解したＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（１００ｍｇ、０．０２ｍｍｏｌ）とトリエチルアミン（１０．０３μｌ、０．０７ｍｍｏｌ）、及び温アセトニトリル（４００μｌ）とＤＭＳＯ（２００μｌ）とに溶解した２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸（２１．１６ｍｇ、０．０５ｍｍｏｌ）（中間体１）を添加した。４０℃で２４時間撹拌した。追加の２．５当量の活性化脂質を添加し、混合物を更に４０℃で２４時間撹拌した。ｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（２７０μｌ）を添加して、次いでエタノール（２４ｍｌ）を添加することによりオリゴを沈殿させた。混合物を０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離し、透明上清を除去した。残渣をＥｔＯＨ（５ｍｌ．）で洗浄し、ペレットを真空下で乾燥させた。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１５～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで残渣を精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させた。収量：２８ｍｇ（２５％）。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４６８．６（ｚ＝４）
【０１３７】
実施例８　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{23}飽和酸コンジュゲートの合成
　この化合物を、ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（３９ｍｇ、７．０６μｍｏｌ）及び２３－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２３－オキソトリコサン酸（８．５０ｍｇ、１５．２μｍｏ）（中間体７）から出発して、実施例１（Ｃ２０酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ）に従って作製した。収量は１７ｍｇ（３９％）であった。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４７２．５（ｚ＝４）
【０１３８】
実施例９　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{24}飽和酸コンジュゲートの合成
　この化合物を、ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（４１ｍｇ、７．４２μｍｏｌ

）及び２４－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２４－オキソテトラコサン酸（７．３６ｍｇ、０．０１ｍｍｏｌ）（中間体８）から出発して、実施例１Ｃ２０酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡに従って作製した。反応時間：一晩。収量は２３ｍｇ（５０％）であった。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４７６．０（ｚ＝４）
【０１３９】
実施例１０　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のＣ$_{18}$（９Ｚ）飽和酸コンジュゲートの合成
　ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（１８０ｍｇ、０．０３ｍｍｏｌ）を、ｐＨ９．５の０．１Ｍホウ酸緩衝液（４．８ｍｌ）に溶解させた。アセトニトリル（１．２ｍＬ）に溶解した（Ｚ）－１８－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－１８－オキソオクタデカ－９－エン酸（中間体１１）（２６．７ｍｇ、０．０７ｍｍｏｌ）を添加して、混合物を室温で４５分間撹拌した。更に１当量の（中間体１１）を添加して、混合物を更に２時間撹拌した。１Ｍ　ＮａＯＨ溶液（１．４ｍｌ）を１時間にわたり添加した。ｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（５４０μＬ）を添加して、次いでエタノール（４８ｍｌ）を添加することによりオリゴを沈殿させた。混合物を０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離し、透明上清を除去した。ペレットを真空下で乾燥させた。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の５～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで残渣を精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させた。収量：７９ｍｇ（４０％）。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４５４．１（ｚ＝４）
【０１４０】
実施例１１　－　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のＣ$_{22}$クリック（ＣＬＩＣＫ）飽和酸コンジュゲートの合成
　［（１Ｒ，８Ｓ）－９－ビシクロ［６．１．０］ノン－４－イニル］メチル活性化ＭＡＬＡＴ１－（中間体１４）（５０ｍｇ、８．７７μｍｏｌ）を、ＤＭＳＯ（０．２ｍＬ）及びアセトニトリル（０．２００ｍＬ）中の２２－アジドドコサン酸（５．０２ｍｇ、０．０１ｍｍｏｌ）（中間体１３）の混合物に添加した。水（０．５ｍＬ）を添加して、混合物を３時間撹拌した。ｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（１２０μＬ）及びエタノール（１０ｍＬ）を添加した。混合物を０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離し、透明上清を除去した。ペレットを真空下で乾燥させた。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１０～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで残渣を精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させた。収量：５．０ｍｇ。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１５２０．１（ｚ＝４）
【０１４１】
実施例１２　－　ＣＡＭＫ２Ｄアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号９）のＣ$_{22}$飽和酸コンジュゲートの合成

【化４８】



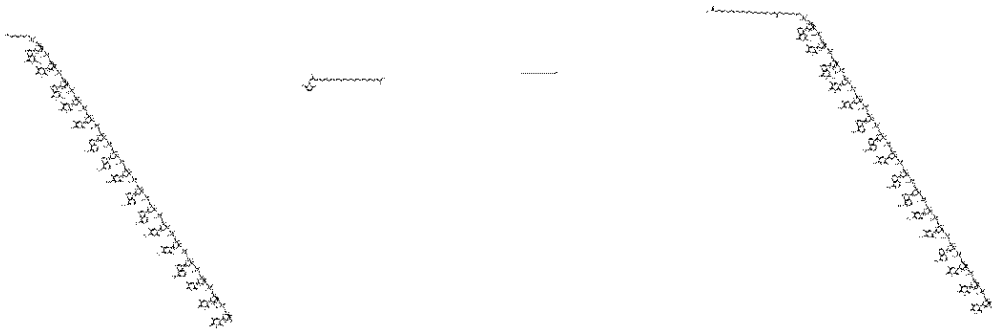
この化合物を、ＣａｍＫ２Ｄ　ＡＳＯ－ヘキシルアミン（４０ｍｇ、７．２４μｍｏｌ）及び２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸（中間体１）（６．７７ｍｇ、１４．５μｍｏｌ）から出発して、実施例１（Ｃ２０酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ）に従って作製した。反応時間：９０分。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１５～９０％メタノールの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで精製した。収量は８ｍｇ（１８％）であった。

ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４６９．２（ｚ＝４）

【０１４２】

実施例１３　－　ＣＡＭＫ２Ｄアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号１０）のC_{22}飽和酸コンジュゲートの合成

【化４９】



この化合物を、ＣａｍＫ２Ｄ　ＡＳＯ－ヘキシルアミン（４０ｍｇ、７．２４μｍｏｌ）及び２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸（中間体１）（６．７７ｍｇ、１４．５μｍｏｌ）から出発して、実施例１（Ｃ２０酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ）に従って作製した。反応時間：１２０分。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１０～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで精製した。収量は１６ｍｇ（３６％）であった。

ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４６２．９（ｚ＝４）

【０１４３】

実施例１４　－　ＣＡＭＫ２Ｄアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号１１）のC_{22}飽和酸コンジュゲートの合成

【化５０】

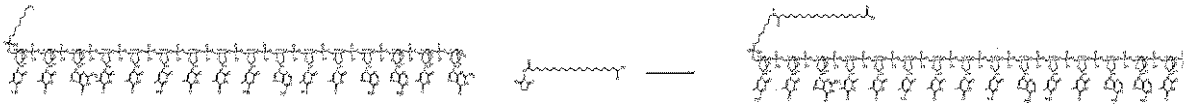


この化合物を、ＣａｍＫ２Ｄ　ＡＳＯ－ヘキシルアミン（３５ｍｇ、５．６８μｍｏｌ）及び２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸（中間体１）（５．３１ｍｇ、１１．４μｍｏｌ）から出発して、実施例２　Ｃ２２酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡに従って作製した。反応時間：４０分。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１０～５０％アセトニトリル（１１分）、５０～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで精製した。収量は２０．４ｍｇ（５２％）であった。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１６２８．５（ｚ＝４）

【０１４４】

実施例１５　－　ＣＡＭＫ２Ｄアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号１２）のC_{22}飽和酸コンジュゲートの合成

【化５１】

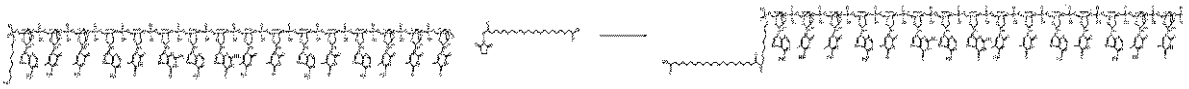


この化合物を、ＣａｍＫ２Ｄ　ＡＳＯ－ヘキシルアミン（３５ｍｇ、５．６８μｍｏｌ）及び２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸（中間体１）（５．３１ｍｇ、１１．４μｍｏｌ）から出発して、実施例２　Ｃ２２酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡに従って作製した。反応時間：４０分。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１０～５０％ＡＣ（１１分）、５０～９０％ＡＣＮの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで精製した。収量は２０．４ｍｇ（５６％）であった。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４５８．４（ｚ＝４）

【０１４５】

実施例１６　－　ＣＡＭＫ２Ｄアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号１３）のC_{22}飽和酸コンジュゲートの合成

【化５２】

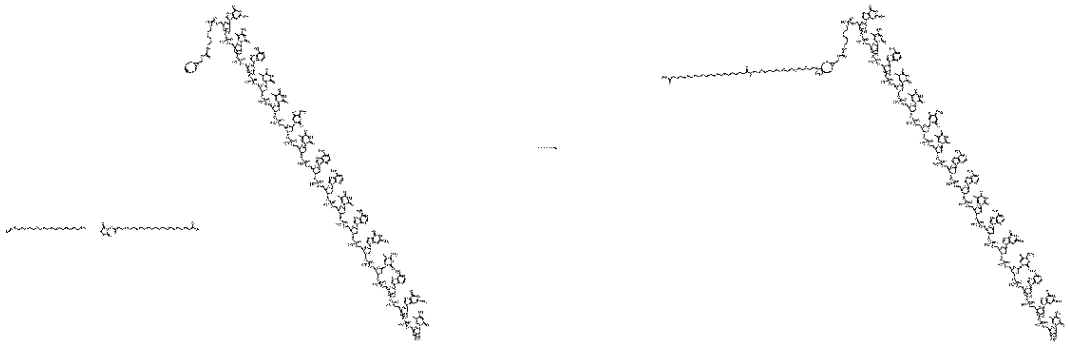


この化合物を、ＣａｍＫ２Ｄ　ＡＳＯ－ヘキシルアミン（３５ｍｇ、５．６８μｍｏｌ）及び２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸（中間体１）（５．３１ｍｇ、１１．４μｍｏｌ）から出発して、実施例２　Ｃ２２酸－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡに従って作製した。反応時間：４０分。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１０～５０％アセトニトリル（１１分）、５０～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで精製した。収量は１８．５ｍｇ（５３％）であった。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１４６２．６（ｚ＝４）

【０１４６】

実施例１７　－　ＰＥＧ－４　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{22}飽和酸コンジュゲートの合成

【化５３】

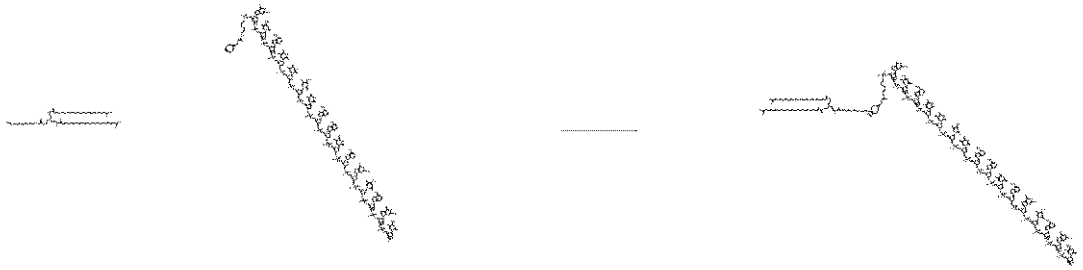


水（６００μｌ）に溶解した中間体１４（２０ｍｇ、３．５μｍｏｌ）に、アセトニトリル（１５０μｌ）及びＤＭＳＯ（９０μｌ）中の１７－アジド－３，６，９，１２，１５－ペンタオキサヘプタデカン－１－アミン溶液を添加した。室温にて３０分間撹拌した。反応混合物にトリエチルアミン（５．８３μｌ）を添加した。混合物を４５℃に加熱し、２２－（（２，５－ジオキソピロリジン－１－イル）オキシ）－２２－オキソドコサン酸（中間体１）（５ｍｇ、１０．５μｍｏｌ）の温溶液を添加した。混合物を４５℃で３０分間撹拌した。ｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（５００μｌ）を添加して、次いでエタノール（２４ｍｌ）を添加することによりオリゴを沈殿させた。混合物を０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離し、透明上清を除去した。残渣をＥｔＯＨ（５ｍｌ．）で洗浄し、ペレットを真空下で乾燥させた。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１５～６０％アセトニトリル（１１分）、６０～９０％アセトニトリル（３分）の勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで残渣を精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させた。収量：９．８ｍｇ（４２％）。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１５８９．９（ｚ＝４）

【０１４７】

実施例１８　－　ＰＥＧ－４　ＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）の二脂質（ＢＩＬＩＰＩＤ）C_{22}飽和酸コンジュゲートの合成

【化５４】



水（２００μｌ）及びＴＨＦ（１００μｌ）中の中間体１６（４．３ｍｇ、４．０５μｍｏｌ）の温溶液に、水（３００μｌ）及びテトラヒドロフラン（２００μｌ）中の中間体１４（２１ｍｇ、３．６８μｍｏｌ）の温溶液を添加した。混合物を４５℃で３時間撹拌した。ｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（５００μｌ）を添加して、次いでエタノール（２４ｍｌ）を添加することによりオリゴを沈殿させた。混合物を０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離し、透明上清を除去した。残渣をＥｔＯＨ（５ｍｌ．）で洗浄し、ペレットを真空下で乾燥させた。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の２０～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで残渣を精製した。純粋画分を体積の２／３まで蒸発させ、２回凍結乾燥させた。収量：３ｍｇ（１１％）。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１６９１．３（ｚ＝４）

【０１４８】
実施例１９　－　オープンマレイミドＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のＣ$_{22}$飽和酸コンジュゲートの合成
【化５５】



Ｃ２２酸マレイミド－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ（４０ｍｇ、６．３１μｍｏｌ）に、炭酸水素ナトリウム（２ｍｌ）、水（０．６ｍＬ）、及びアセトニトリル（０．６００ｍｌ）の飽和水溶液を添加した。混合物を室温で３時間撹拌した。水酸化ナトリウム（１Ｍ、１５０μｌ、１５０μｍｏｌ）。反応物を３０℃で１７時間、次いで４０℃で１０時間撹拌した。混合物を氷冷し、ｐＨを酢酸でｐＨ５に調整した。乳白色溶液を濾過し、凍結乾燥させた。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１０～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで残渣を精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させた。収量：１３ｍｇ（３２．２％）。
ＭＳ（ＥＳＩ$^-$）ｍ／ｚ　１５１６．１（ｚ＝４）
【０１４９】
実施例２０　－　システインマレイミドＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のＣ$_{22}$飽和酸コンジュゲートの合成
【化５６】



中間体１９（６．８ｍｇ、７．２μｍｏｌ）を、テトラヒドロフラン（３００μｌ）と、酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ５．３、３Ｍ、５０．０μｌ）と、水（１００μｌ）との混合物中の３，３’，３’’－ホスファントリイルトリプロピオン酸塩酸塩（４．１２ｍｇ、１０μｍｏｌ）で１０分間、４０℃で処理した。混合物を水で希釈し、硫化物をジクロロメタンで抽出した。有機相を蒸発させ、所望の硫化物（３ｍｇ、６．３３μｍｏｌ）をジメチルホルムアミド（０．２００ｍＬ）に溶解させ、酢酸ナトリウム緩衝液（３Ｍ、ｐＨ５．２、１００μｌ）、水（５００μｌ）、及びジメチルホルムアミド（２００μｌ）中の中間体１７（マレイミド－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ（２５ｍｇ、４．４０μｍｏｌ）に添加した。混合物を４５℃で２時間加熱した。アセトニトリル（１００μｌ）及びジメチルホルムアミド（０．２００ｍＬ）に溶解した別口の硫化物（３ｍｇ、６．３３μｍｏｌ）を添加して、更に１時間加熱を続けた。エタノール（１４ｍＬ）を添加することによりオリゴを沈殿させ、短時間ボルテックスし、－２０Ｃで３０分間静置した。混合物を０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離し、透明上清を除去した。ペレットを水１ｍＬ及びｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（１００μｌ）に溶解させることによりオリゴをもう一度洗浄し、続いて１４ｍＬのエタノールを添加し、－２０で３０分間冷却し、次いで０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離した。上清を廃棄し、生成物を真空中で乾燥させた。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の５～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで残渣を精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させた。収量：７．５ｍｇ（２６．４％）。
ＭＳ（ＥＳＩ$^-$）ｍ／ｚ　１５３６．７（ｚ＝４）
【０１５０】
実施例２１　－　ＰＥＧシステインマレイミドＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のＣ$_{22}$飽和酸コンジュゲートの合成

【化５７】



水（１ｍｌ）中の中間体１７（マレイミド－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ（３０ｍｇ、５．２８μｍｏｌ）の溶液に、中間体２１（１－｛［（２Ｒ）－１－アミノ－１－オキソ－３－スルファニルプロパン－２－イル］アミノ｝－１，１０，１９－トリオキソ－３，６，１２，１５－テトラオキサ－９，１８－ジアザテトラコンタン－４０－オイック酸）（１２．１ｍｇ、２０μｍｏｌ）を、ジメチルホルムアミド（１．５ｍｌ）溶液として添加した。混合物を４５℃で３０分間加熱した。水（１ｍｌ）を添加したところ、いくらかの沈殿物が生じた。混合物をジエチルエーテル／テトラヒドフラン（ｔｅｔｒａｈｙｄｏｆｕｒａｎ）（０．５ｍｌ）で抽出して、過剰の中間体２１を除去した。次に、水相にエタノール（１４ｍＬ）を添加してオリゴを沈殿させた。混合物を短時間ボルテックスし、－２０Ｃで３０分間静置し、０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離して、透明上清を除去した。ペレットを水１ｍＬに溶解させ、ｐＨ５．２の３Ｍ酢酸ナトリウム（１００μｌ）を添加することによりオリゴをもう一度洗浄し、続いて１４ｍＬのエタノールを添加し、－２０で３０分間冷却し、次いで０℃で１０分間、３５００ｒｐｍで遠心分離した。上清を廃棄し、生成物を真空中で乾燥させた。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１０～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで残渣を精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させた。収量：１１．５ｍｇ（３２．３％）。

ＭＳ（ＥＳＩ$^-$）ｍ／ｚ　１６０９．０（ｚ＝４）

【０１５１】

実施例２２　－　マレイミドＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{22}飽和酸コンジュゲートの合成

【化５８】



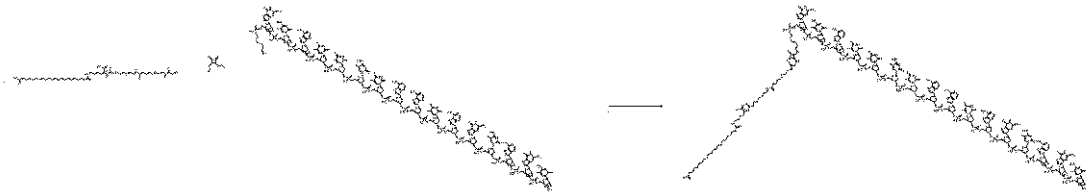
この化合物を、中間体１７（マレイミド－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ（１０ｍｇ、１．７６μｍｏｌ）及び２２－メルカプトドコサン酸（２．００ｍｇ、５．２８μｍｏｌ）公開化合物ＪＡＣＳ　２００３（１２５）ｐ７７０４－７７１４　Ｋｈｏｓｈｔａｒｉｙａ，Ｄｉｍｉｔｒｉ　ｅｔ　ａｌ）から出発して、Ｃ２２酸システインマレイミド－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡに従って作製した。収量は２．７ｍｇ（２４．２％）であった。

ＭＳ（ＥＳＩ$^-$）ｍ／ｚ　１５１１．３（ｚ＝４）

【０１５２】

実施例２３　－　ＬＹＳ－ＰＥＧスクエアアミドＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{22}飽和酸コンジュゲートの合成

【化５９】

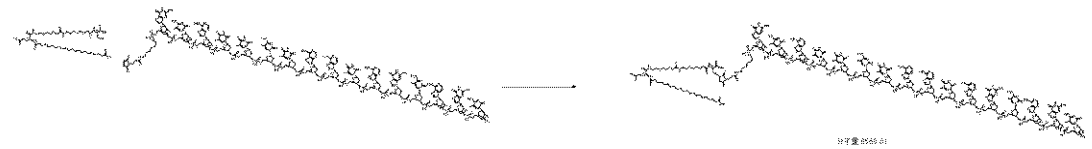


炭酸水素ナトリウム（ｐＨ１０．０、０．０２５Ｍ、６００μＬ）及びアセトニトリル（２００μＬ）中のＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ－ヘキシルアミン（２７ｍｇ、４．８９μｍｏｌ）に、アセトニトリル（１２７μｌ）中の３，４－ジエトキシシクロブト－３－エン－１，２－ジオン（１．１ｍｇ、６．３５μｍｏｌ）の溶液を添加した。混合物を室温で３０分間撹拌した。次に、アセトニトリル（１２７μｌ）中の別口の３，４－ジエトキシシクロブト－３－エン－１，２－ジオン（１．１ｍｇ、６．３５μｍｏｌ）を添加して、反応を完了させた。３０分間撹拌した後、次いでＤＭＳＯ（３００μＬ）及び０．１５Ｍ重炭酸ナトリウム（４８９μｌ、０．０７ｍｍｏｌ）中の中間体２２　（Ｓ）－１－アミノ－２２－カルボキシ－２，１１，２０，２８－テトラオキソ－６，９，１５，１８－テトラオキサ－３，１２，２１，２７－テトラアザノナテトラコンタン－４９－オイック酸（２０．６７ｍｇ、０．０２ｍｍｏｌ）の溶液を添加して、反応物を４０℃で１８時間加熱した。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１０～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで生成物を精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させた。収量：８．５ｍｇ（２５．７％）。
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１６１１．４（ｚ＝４）

【０１５３】

実施例２４　－　ガンマＧＬＵ－ＰＥＧマレイミドＭＡＬＡＴ－１　ＬＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号８）のC_{22}飽和酸コンジュゲートの合成

【化６０】



中間体１７（マレイミド－ＭＡＬＡＴ１－ＬＮＡ）（３２ｍｇ、５．６４μｍｏｌ）を水（１ｍＬ）に溶解させ、ＤＭＦ／ＡＣＮ／水（０．２ｍｌ／０．２ｍｌ／０．０５ｍ）中の（２Ｒ，２３Ｓ）－１－アミノ－２３－（２－カルボキシエチル）－２－（メルカプトメチル）－１，４，１３，２２，２５－ペンタオキソ－６，９，１５，１８－テトラオキサ－３，１２，２１，２４－テトラアザヘキサテトラコンタン－４６－オイック酸（７．５４ｍｇ、８．４６μｍｏｌ）の温溶液を添加した。ＤＭＦ（０．５ｍＬ）を添加して透明溶液を得た。混合物を４５℃で３０分間撹拌した。室温でNH_4HCO_3（５０ｍＭ、ｐＨ８）中の１０～９０％アセトニトリルの勾配を使用することにより、ＸＢｒｉｄｇｅ　Ｃ１８、５μｍ　１９×１５０ｍｍカラムで生成物を精製した。純粋画分を２回凍結乾燥させた。収量１２．５ｍｇ（３２．３％）
ＭＳ（ＥＳＩ－）ｍ／ｚ　１６４１．２（ｚ＝４）

【０１５４】

実施例２５　－　表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）バイオセンサーを使用した、５’脂質コンジュゲートＭＡＬＡＴ－１　ＡＳＯのアルブミン結合親和性の決定及び遊離画分の推定

Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｓ２００（Ｃｙｔｉｖａ）を使用し、異なるリガンドを保有するＭａｌａｔ１　ＡＳＯギャップマーを用いて、異なる種（ヒト、ウシ、ラット）に由来する血

清アルブミンの親和性決定を行った。全ての実験は、泳動緩衝液（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、３０μｌ／分）を使用して、ＨＬＣ３０Ｍチップ（Ｘａｎｔｅｃ）上にて２０℃で実施した。１０ｍＭ酢酸緩衝液（ｐＨ５．０）中の１００ｎＭアルブミンを注入することにより、ＥＤＣ－ＮＨＳ活性化カップリングによってチップ上にアルブミンを共有結合的に固定化した。リファレンスフローセルは固定化タンパク質を欠いていた。分析物溶液を、泳動緩衝液中の１５０μＭまでの３倍段階希釈として、分析物あたり１１種の濃度で三連で注入した。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｓ２００評価ソフトウェア（Ｃｙｔｉｖａ）でデータを評価し、得られたセンサーグラムを１：１の定常状態の親和性（固定のＲｍａｘ）にフィットさせた。得られた見かけの親和性（Ｋｄ、ａｐｐ）を使用して、

【数１】

$$fu = 1 - \frac{[L]_{bound}}{[L]_{tot}} = 1 - \frac{[R]}{\alpha K_{d,app} + [R]}$$

に従って遊離画分（ｆｕ）を推定する。式中、［Ｒ］はアルブミンの血漿濃度、αはアッセイのキャリブレーション係数である。推定から、アルブミン相互作用が血漿タンパク質結合の主要寄与因子であり、［Ｒ］＝［Ｒ］ｔｏｔ（即ち、［Ｒ］＞＞［Ｌ］）であることが想定される。

【０１５５】

図１のデータにより、アルブミンに対する脂質－ＡＳＯコンジュゲートの親和性の増大が、脂肪酸部分の親油性／鎖長の増大と良好に相関することが示された。これは、脂肪酸鎖に不飽和を導入することによって更に調節することができるが、オリゴヌクレオチドと脂肪酸鎖の間のリンカー及びスペーサーの特性（親油性及び追加の極性基の導入）を変更することによっても調節することができる。脂質及びリンカーの組成の相違に基づくアルブミン親和性の観察された調節は、試験した種全体で良好に変換された。

【０１５６】

実施例２６　－　ＴＨＰ－１細胞における選択した５’脂質コンジュゲートＭＡＬＡＴ－１ＡＳＯのノックダウン効率の決定

ＴＨＰ－１細胞（ＡＴＣＣ（登録商標）ＴＩＢ－２０２（商標））を、ＧｌｕｔａＭａｘ、２ｇ／Ｌグルコース、ＨＥＰＥＳ、ＭＥＭ非必須アミノ酸、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、１０％ＦＢＳ、及び５０μＭ　β－メルカプトエタノールを含むＲＰＭＩ　１６４０中で標準手順に従って培養した。遠心分離により細胞を収集し、無血清培地に再懸濁させ、９６ウェル培養プレートにウェルあたり７０，０００細胞でプレーティングした。ＦＡ－ＡＳＯコンジュゲートを、１、０．３、０．１、及び０．０３μＭの最終濃度で培地に投与した。

【０１５７】

細胞を３７℃、５％CO_2で２４時間インキュベートした。

【０１５８】

インキュベーション後、細胞を９６ウェルＶ底ポリプロピレンマイクロプレートに移し、５００ｇで３分間ペレット化した。培地を除去し、溶解緩衝液２０μＬ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製４％ＲＮＡｓｅｃｕｒｅ（商標）ＲＮａｓｅ　Ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔを含むＱｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙ　ＲＬＮ溶解緩衝液）中で、細胞を室温で５分間溶解させた。２μＬの溶解物を、２０μＬの逆転写（ＲＴ）反応（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製Ｃｅｌｌｓ－ｔｏ－ＣＴ　Ｂｕｌｋ　ＲＴ　Ｒｅａｇｅｎｔの５０％ＲＴ緩衝液及び５％酵素ミックス）の鋳型として使用して、ＲＴを３７℃で６０分間、次いで９５℃で５分間実施した。

【０１５９】

ｃＤＮＡ試料を１：４に希釈し、リアルタイムＰＣＲ反応を、３μＬのｃＤＮＡ、ＴａｑＭａｎ（商標）Ｆａｓｔ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ、及びＭａｌａｔ

－１又はＧＡＰＤＨ　ＴａｑＭａｎ（商標）Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ａｓｓａｙ（Ｈｓ００２７３９０７＿ｓ１及びＨｓ９９９９９９０５＿ｍ１、全てＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して、総容量１０μＬで設定した。ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ（商標）７　Ｆｌｅｘ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で増幅を実施し、５０℃で２分間、９５℃で１０分間、続いて９５℃で１５秒間と６０℃で１分間とを４０サイクルで行った。定量サイクル（Ｃｑ）値を、自動ベースライン及び自動閾値オプションを使用してソフトウェアにより決定し、次いで参照遺伝子ＧＡＰＤＨ．ｓに対して正規化したＭａｌａｔ－１相対発現量（２＾－ｄＣｑ）を算出するために使用した。

【０１６０】

図２のデータより、カルボン酸基を保有する飽和脂肪酸鎖のＡＳＯの５’位への導入が、ＴＨＰ－１細胞におけるＭａｌａｔ－１のインビトロノックダウンを改善したことが示された。機能的活性の増大は、脂質成分の親油性（ｌｉｐｏｐｈｉｌｉｃｔｙ）の増大と相関していた。リンカー及びスペーサーの化学的性質を変化させることで、インビトロ活性を調節することができる。

【０１６１】

実施例２７　－　ＬＡ－４細胞における選択した５’脂質コンジュゲートＣＡＭＫ２Ｄ　ＡＳＯのノックダウン効率の決定

ＬＡ－４細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－１９６（登録商標）（商標））を、ＧｌｕｔａＭａｘ、１．８ｇ／Ｌグルコース、１％ＭＥＭ非必須アミノ酸、及び１５％ＦＢＳを含むＨａｍ’ｓ　Ｆ１２栄養混合培地中で標準手順に従って培養した。細胞をトリプシン処理し、標準培養培地に再懸濁させ、３８４ウェル培養プレートにウェルあたり６０００細胞でプレーティングした。１６時間後、細胞から培地を除去し、無血清培地と交換した。１２段階希釈系列（濃度範囲０．０００００８５～１５μＭ）を、ネイキッドＡＳＯとＣ２２脂質コンジュゲートＡＳＯの両方について調製した。これらを培地に投与し、細胞を３７℃、５％CO_2で２４時間インキュベートした。

【０１６２】

インキュベーション後、培地を除去し、細胞をＰＢＳで洗浄し、ウェルあたり１０μＬのＣｅｌｌｓ　ｔｏ　ＣＴ溶解緩衝液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）＋１％ＤＮアーゼに、室温で５分間、振盪しながら溶解させた。次に、２μＬのＣｅｌｌｓ　ｔｏ　ＣＴ停止溶液（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）をウェルごとに添加した。４μＬの各溶解物を、９μＬの逆転写（ＲＴ）反応（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製Ｃｅｌｌｓ－ｔｏ－ＣＴ　Ｂｕｌｋ　ＲＴ　Ｒｅａｇｅｎｔの５０％ＲＴ緩衝液及び５％酵素ミックス）の鋳型として使用して、ＲＴを３７℃で３０分間実施し、続いて９５℃で５分間ＲＴを不活化させた。

【０１６３】

リアルタイムＰＣＲ反応を、３μＬのｃＤＮＡ、ＴａｑＭａｎ（商標）Ｆａｓｔ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ、及びＭａｌａｔ－１又はＲｐｌｐ０　ＴａｑＭａｎ（商標）Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ａｓｓａｙ（Ｍｍ００４９９２６６＿ｍ１及びＭｍ００７２５４４８＿ｓ１、全てＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して、総容量１０μＬで設定した。ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ（商標）７　Ｆｌｅｘ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で増幅を実施し、５０℃で２分間、９５℃で１０分間、続いて９５℃で１５秒間と６０℃で１分間とを４０サイクルで行った。定量サイクル（Ｃｑ）値を、自動ベースライン及び自動閾値オプションを使用してソフトウェアにより決定し、次いで参照遺伝子Ｒｐｌｐ０に対して正規化したＣａｍＫ２Ｄ相対発現量（２＾－ｄＣｑ）を算出するために使用した。次に、ＣａｍＫ２Ｄの２＾－ｄＣｑ値を、H_2O処理試料から得られた値に対して正規化した。図３Ａ～Ｄのデータは、脂質付加ＣａｍＫ２Ｄ　ＡＳＯがインビトロで機能的活性を維持していたことを示している。

【０１６４】

実施例２８　－　Ｂ６ＮＴａｃマウスにおける標的遺伝子に対する脂肪酸コンジュゲートＭＡＬＡＴ－１　ＡＳＯのノックダウン効果

雄Ｂ６ＮＴａｃマウスを８～１０週齢で入手し、２匹／ケージで収容して、固形飼料を与えた。マウスを少なくとも１週間順応させてから試験に供した。－１日目に、マウスの体重を測定し、体重に基づいて適切な薬物治療群に無作為化した。０、２、４、７及び２１日目に、化合物をｐＨ７．４のＰＢＳ中５ｍｇ／Ｋｇで尾静脈を介して皮下注射により投与した。２８日目に、マウスをCO_2吸入により安楽死させた。心臓を摘出し、ＲＮＡ抽出用に約２０ｍｇの心尖部を量り分けた。肝左葉の一部を、ＲＮＡ抽出用に液体窒素中で急速凍結した。右腎を摘出し、ＲＮＡ抽出用に急速凍結した。ノックダウン効果を、実施例２６に記載したようにＲＴ－ｑＰＣＲによって評価した。

【０１６５】

図４Ａ～Ｂに示したデータは、飽和C_{22}酸又はC_{18}（９Ｚ）一価不飽和脂肪二酸へのコンジュゲーションが、親ＡＳＯと比較して、心臓において同様のノックダウン又はノックダウンの増加をもたらしたのみならず、肝臓及び腎臓において測定されたノックダウンの減弱をももたらしたことを示している。

【０１６６】

実施例２９　－　Ｂ６ＮＴａｃマウスにおける標的遺伝子に対する脂肪酸コンジュゲートＣＡＭＫ２Ｄ　ＡＳＯのノックダウン効果

雄Ｂ６ＮＴａｃマウスを８～１０週齢で入手し、２匹／ケージで収容して、固形飼料を与えた。マウスを少なくとも１週間順応させてから試験に供した。０日目に、マウスの体重を測定し、体重に基づいて適切な薬物治療群に無作為化した。１日目に、化合物をｐＨ７．４のＰＢＳ中５ｍｇ／Ｋｇで尾静脈を介して皮下注射により投与した。４日目に、マウスをCO_2吸入により安楽死させた。心臓を摘出し、ＲＮＡ抽出用に約２０ｍｇの心尖部を量り分けた。肝左葉の一部を、ＲＮＡ抽出用に液体窒素中で急速凍結した。右腎を摘出し、ＲＮＡ抽出用に急速凍結した。ノックダウン効果を、実施例２６に記載したように評価した。

【０１６７】

図５に示すデータは、ネイキッド親ＡＳＯと比較して、飽和C_{22}酸鎖コンジュゲーションが、心臓におけるノックダウンを改善し、腎臓及び肝臓などのシンク器官におけるノックダウンを減弱させる傾向があることを示している。

【０１６８】

本明細書ではある特定の実施形態が例示されており且つ説明されているが、特許請求の範囲は、説明されており且つ図示されている特定の形態又は要素の配置に限定されないことを理解されたい。本明細書では、例示的な実施形態が開示されており、特定の用語が用いられているが、それらは、一般的な且つ説明的な意味でのみ使用され、限定目的ではない。上記の教示に照らして、実施形態の修正及び変形は可能である。したがって、実施形態は、具体的に説明されているものとは別の方法で実施され得ることを理解されたい。

【０１６９】

【表１】

配列

配列番号	配列
1	cgcagcctgc agcccgagac ttctgtaaag gactggggcc ccgcaactgg cctctcctgc cctcttaagc gcagcgccat tttagcaacg cagaagcccg gcgccgggaa gcctcagctc gcctgaaggc aggtcccctc tgacgcctcc gggagcccag gtttcccaga gtccttggga cgcagcgacg agttgtgctg ctatcttagc tgtccttata ggctggccat tccaggtggt ggtatttaga taaaaccact caaactctgc agtttggtct tggggtttgg aggaaagctt ttatttttct tcctgctccg gttcagaagg tctgaagctc atacctaacc aggcataaca cagaatctgc aaaacaaaaa cccctaaaaa agcagaccca gagcagtgta aacacttctg ggtgtgtccc tgactggctg cccaaggtct ctgtgtcttc ggagacaaag ccattcgctt agttggtcta ctttaaaagg ccacttgaac tcgctttcca tggcgatttg ccttgtgagc actttcagga gagcctggaa gctgaaaaac ggtagaaaaa tttccgtgcg ggccgtgggg ggctggcggc aactgggggg ccgcagatca gagtgggcca ctggcagcca acggcccccg gggctcaggc ggggagcagc tctgtggtgt gggattgagg cgttttccaa gagtgggttt tcacgtttct aagatttccc aagcagacag cccgtgctgc tccgatttct cgaacaaaaa agcaaaacgt gtggctgtct tgggagcaag tcgcaggact gcaagcagtt gggggagaaa gtccgccatt ttgccacttc tcaaccgtcc ctgcaaggct ggggctcagt tgcgtaatgg aaagtaaagc cctgaactat cacactttaa tcttccttca aaaggtggta aactatacct actgtcccte aagagaacac aagaagtgct ttaagaggta ttttaaaagt tccgggggtt ttgtgaggtg tttgatgacc cgtttaaaat atgatttcca tgtttctttt gtctaaagtt tgcagctcaa atctttccac acgctagtaa tttaagtatt tctgcatgtg tagtttgcat tcaagttcca taagctgtta agaaaaatct agaaaagtaa aactagaacc tatttttaac cgaagaacta cttttgcct ccctcacaaa ggcggcggaa ggtgatcgaa ttccggtgat gcgagttgtt ctccgtctat aaatacgcct cgcccgagct gtgcggtagg cattgaggca gccagcgcag gggcttctgc tgagggggca ggcggagctt gaggaaaccg cagataagtt

【０１７０】

【表２】

	ttttctctt tgaaagatag agattaatac aactacttaa aaaatatagt caataggtta ctaagatatt gcttagcgtt aagttttaa cgtaatttta atagcttaag attttaagag aaaatatgaa gacttagaag agtagcatga ggaaggaaaa gataaaaggt ttctaaaaca tgacggaggt tgagatgaag cttcttcatg gagtaaaaaa tgtatttaaa agaaaattga gagaaaggac tacagagccc cgaattaata ccaatagaag ggcaatgctt ttagattaaa atgaaggtga cttaaacagc ttaaagttta gtttaaaagt tgtaggtgat taaaataatt tgaaggcgat cttttaaaaa gagattaaac cgaaggtgat taaaagacct tgaaatccat gacgcaggga gaattgcgtc atttaaagcc tagttaacgc atttactaaa cgcagacgaa aatggaaaga ttaattggga gtggtaggat gaaacaattt ggagaagata gaagtttgaa gtggaaaact ggaagacaga agtacgggaa ggcgaagaaa agaatagaga agatagggaa attagaagat aaaaacatac ttttagaaga aaaaagataa atttaaacct gaaaagtagg aagcagaaga aaaaagacaa gctaggaaac aaaaagctaa gggcaaaatg tacaaactta gaagaaaatt ggaagataga aacaagatag aaaatgaaaa tattgtcaag agtttcagat agaaaatgaa aaacaagcta agacaagtat tggagaagta tagaagatag aaaaatataa agccaaaaat tggataaaat agcactgaaa aaatgaggaa attattggta accaatttat tttaaaagcc catcaattta atttctggtg gtgcagaagt tagaaggtaa agcttgagaa gatgagggtg tttacgtaga ccagaaccaa tttagaagaa tacttgaagc tagaagggga agttggttaa aaatcacatc aaaaagctac taaaaggact ggtgtaattt aaaaaaaact aaggcagaag gcttttggaa gagttagaag aatttggaag gccttaaata tagtagctta gtttgaaaaa tgtgaaggac tttcgtaacg gaagtaattc aagatcaaga gtaattacca acttaatgtt tttgcattgg actttgagtt aagattattt tttaaatcct gaggactagc attaattgac agctgaccca ggtgctacac agaagtggat tcagtgaatc taggaagaca gcagcagaca ggattccagg aaccagtgtt tgatgaagct aggactgagg agcaagcgag caagcagcag ttcgtggtga agataggaaa agagtccagg agccagtgcg atttggtgaa ggaagctagg aagaaggaag gagcgctaac gatttggtgg tgaagctagg aaaaaggatt ccaggaagga gcgagtgcaa tttggtgatg aaggtagcag gcggcttggc ttggcaacca cacggaggag gcgagcaggc gttgtgcgta gaggatccta gaccagcatg ccagtgtgcc aaggccacag ggaaagcgag tggttggtaa aaatccgtga ggtcggcaat atgttgtttt tctggaactt acttatggta accttttatt tattttctaa tataatgggg gagtttcgta ctgaggtgta aagggattta tatggggacg taggccgatt tccgggtgtt gtaggtttct ctttttcagg cttatactca tgaatcttgt ctgaagcttt tgagggcaga ctgccaagtc ctggagaaat agtagatggc aagtttgtgg gttttttttt tttacacgaa tttgaggaaa accaaatgaa tttgatagcc aaattgagac aatttcagca aatctgtaag cagtttgtat gtttagttgg ggtaatgaag tatttcagtt ttgtgaatag atgacctgtt tttacttcct caccctgaat tcgttttgta aatgtagagt ttggatgtgt aactgaggcg ggggggagtt ttcagtattt ttttttgtgg gggtgggggc aaaatatgtt ttcagttctt ttttccttag gtctgtctag aatcctaaag gcaaatgact caaggtgtaa cagaaaacaa gaaaatccaa tatcaggata atcagaccac cacaggttta cagtttatag aaactagagc agttctcacg ttgaggtctg tggaagagat gtccattgga gaaatggctg gtagttactc ttttttcccc ccacccccct aatcagactt taaaagtgct taacccctta aacttgttat ttttacttg aagcattttg ggatggtctt aacagggaag agagagggtg ggggagaaaa tgttttttc taagattttc cacagatgct atagtactat tgacaaactg ggttagagaa ggagtgtacc gctgtgctgt tggcacgaac accttcaggg actggagctg cttttatcct tggaagagta ttcccagttg aagctgaaaa gtacagcaca gtgcagcttt ggttcatatt cagtcatctc aggagaactt cagaagagct tgagtaggcc aaatgttgaa gttaagtttt ccaataatgt gacttcttaa aagttttatt aaaggggagg ggcaaatatt ggcaattagt tggcagtggc ctgttacggt tgggattggt ggggtgggtt taggtaattg tttagtttat gattgcagat aaactcatgc cagagaactt aaagtcttag aatggaaaaa gtaaagaaat atcaacttcc aagttggcaa gtaactccca atgatttagt ttttttcccc ccagtttgaa ttgggaagct gggggaagtt aaatatgagc cactgggtgt accagtgcat taatttgggc aaggaaagtg

【０１７１】

【表３】

	tcataatttg atactgtatc tgttttcctt caaagtatag agcttttggg gaaggaaagt attgaactgg gggttggtct ggcctactgg gctgacatta actacaatta tgggaaatgc aaaagttgtt tggatatggt agtgtgtggt tctcttttgg aattttttc aggtgattta ataataattt aaaactacta tagaaactgc agagcaaagg aagtggctta atgatcctga agggatttct tctgatggta gcttttgtat tatcaagtaa gattctattt tcagttgtgt gtaagcaagt ttttttttag tgtaggagaa atacttttcc attgtttaac tgcaaaacaa gatgttaagg tatgcttcaa aaattttgta aattgtttat tttaaactta tctgtttgta aattgtaact gattaagaat tgtgatagtt cagcttgaat gtctcttaga gggtgggctt ttgttgatga gggaggggaa acttttttt tttctataga cttttttcag ataacatctt ctgagtcata accagcctgg cagtatgatg gcctagatgc agagaaaaca gctccttggt gaattgataa gtaaaggcag aaaagattat atgtcatacc tccattgggg aataagcata accctgagat tcttactact gatgagaaca ttatctgcat atgccaaaaa attttaagca aatgaaagct accaatttaa agttacggaa tctaccattt taaagttaat tgcttgtcaa gctataacca caaaaataat gaattgatga gaaatacaat gaagaggcaa tgtccatctc aaaatactgc ttttacaaaa gcagaataaa agcgaaaaga aatgaaaatg ttacactaca ttaatcctgg aataaaagaa gccgaaataa atgagagatg agttgggatc aagtggattg aggaggctgt gctgtgtgcc aatgtttcgt ttgcctcaga caggtatctc ttcgttatca gaagagttgc ttcatttcat ctgggagcag aaaacagcag gcagctgtta acagataagt ttaacttgca tctgcagtat tgcatgttag ggataagtgc ttatttttaa gagctgtgga gttcttaaat atcaaccatg gcactttctc ctgacccctt ccctagggga tttcaggatt gagaaatttt tccatcgagc ctttttaaaa ttgtaggact tgttcctgtg ggcttcagtg atgggatagt acacttcact cagaggcatt tgcatcttta aataatttct taaaagcctc taaagtgatc agtgccttga tgccaactaa ggaaatttgt ttagcattga atctctgaag gctctatgaa aggaatagca tgatgtgctg ttagaatcag atgttactgc taaaatttac atgttgtgat gtaaattgtg tagaaaacca ttaaatcatt caaaataata aactattttt attagagaat gtatacttt agaaagctgt ctccttattt aaataaaata gtgtttgtct gtagttcagt gttggggcaa tcttgggggg gattcttctc taatctttca gaaactttgt ctgcgaacac tctttaatgg accagatcag gatttgagcg gaagaacgaa tgtaacttta aggcaggaaa gacaaatttt attcttcata aagtgatgag catataataa ttccaggcac atggcaatag aggccctcta aataaggaat aaataacctc ttagacaggt gggagattat gatcagagta aaaggtaatt acacatttta tttccagaaa gtcaggggtc tataaattga cagtgattag agtaatactt tttcacattt ccaaagtttg catgttaact ttaaatgctt acaatcttag agtggtaggc aatgttttac actattgacc ttatataggg aagggagggg gtgcctgtgg ggttttaaag aattttcctt tgcagaggca tttcatcctt catgaagcca ttcaggattt tgaattgcat atgagtgctt ggctcttcct tctgttctag tgagtgtatg agaccttgca gtgagtttat cagcatactc aaaatttttt tcctggaatt tggagggatg ggaggagggg gtggggctta cttgttgtag cttttttttt ttttacagac ttcacagaga atgcagttgt cttgacttca ggtctgtctg ttctgttggc aagtaaatgc agtactgttc tgatcccgct gctattagaa tgcattgtga aacgactgga gtatgattaa aagttgtgtt ccccaatgct tggagtagtg attgttgaag gaaaaaatcc agctgagtga taaaggctga gtgttgagga aatttctgca gttttaagca gtcgtatttg tgattgaagc tgagtacatt ttgctggtgt attttaggt aaaatgcttt ttgttcattt ctggtggtgg gaggggactg aagcctttag tcttttccag atgcaacctt aaaatcagtg acaagaaaca ttccaaacaa gcaacagtct tcaagaaatt aaactggcaa gtggaaatgt ttaaacagtt cagtgatctt tagtgcattg tttatgtgtg ggtttctctc tcccctccct tggtcttaat tcttacatgc aggaacactc agcagacaca cgtatgcgaa gggccagaga agccagaccc agtaagaaaa aatagcctat ttactttaaa taaaccaaac attccatttt aaatgtgggg attgggaacc actagttctt tcagatggta ttcttcagac tatagaagga gcttccagtt gaattcacca gtggacaaaa tgaggaaaac aggtgaacaa gctttttctg tatttacata caaagtcaga tcagttatgg gacaatagta ttgaatagat ttcagcttta tgctggagta actggcatgt

【０１７２】

【表４】

	gagcaaactg tgttggcgtg ggggtggagg ggtgaggtgg gcgctaagcc ttttttaag atttttcagg taccccctcac taaaggcacc gaaggcttaa agtaggacaa ccatggagcc ttcctgtggc aggagagaca acaaagcgct attatcctaa ggtcaagaga agtgtcagcc tcacctgatt tttattagta atgaggactt gcctcaactc cctctttctg gagtgaagca tccgaaggaa tgcttgaagt acccctgggc ttctcttaac atttaagcaa gctgttttta tagcagctct taataataaa gcccaaatct caagcggtgc ttgaagggga gggaaagggg gaaagcgggc aaccactttt ccctagcttt tccagaagcc tgttaaaagc aaggtctccc cacaagcaac ttctctgcca catcgccacc ccgtgccttt tgatctagca cagacccttc acccctcacc tcgatgcagc cagtagcttg gatccttgtg ggcatgatcc ataatcggtt tcaaggtaac gatggtgtcg aggtctttgg tgggttgaac tatgttagaa aaggccatta atttgcctgc aaattgttaa cagaagggta ttaaaaccac agctaagtag ctctattata atacttatcc agtgactaaa accaacttaa accagtaagt ggagaaataa catgttcaag aactgtaatg ctgggtggga acatgtaact tgtagactgg agaagatagg catttgagtg gctgagaggg cttttgggtg ggaatgcaaa aattctctgc taagactttt tcaggtgaac ataacagact tggccaagct agcatcttag cggaagctga tctccaatgc tcttcagtag ggtcatgaag gtttttcttt tcctgagaaa acaacacgta ttgttttctc aggttttgct ttttggcctt tttctagctt aaaaaaaaaa aaagcaaaag atgctggtgg ttggcactcc tggtttccag gacggggttc aaatccctgc ggcgtctttg ctttgactac taatctgtct tcaggactct ttctgtattt ctccttttct ctgcaggtgc tagttcttgg agttttgggg aggtgggagg taacagcaca atatctttga actatataca tccttgatgt ataatttgtc aggagcttga cttgattgta tattcatatt tacacgagaa cctaatataa ctgccttgtc tttttcaggt aatagcctgc agctggtgtt ttgagaagcc ctactgctga aaacttaaca attttgtgta ataaaaatgg agaagctcta aattgttgtg gttcttttgt gaataaaaaa atcttgattg gggaaaaaa
2	cgcagcctgc agcccgagac ttctgtaaag gactggggcc ccgcaactgg cctctcctgc cctcttaagc gcagcgccat tttagcaacg cagaagcccg gcgccgggaa gcctcagctc gcctgaaggc aggtcccctc tgacgcctcc gggagcccag gtttcccaga gtccttggga cgcagcgacg agttgtgctg ctatcttagc tgtccttata ggctggccat tccaggtggt ggtatttaga taaaaccact caaactctgc agtttggtct tggggtttgg aggaaagctt ttatttttct tcctgctccg gttcagaagg tctgaagctc atacctaacc aggcataaca cagaatctgc aaaacaaaaa cccctaaaaa agcagaccca gagcagtgta aacacttctg ggtgtgtccc tgactggctg cccaaggtct ctgtgtcttc ggagacaaag ccattcgctt agttggtcta ctttaaaagg ccacttgaac tcgctttcca tggcgatttg ccttgtgagc actttcagga gagcctggaa gctgaaaaac ggtagaaaaa tttccgtgcg ggccgtgggg ggctggcggc aactgggggg ccgcagatca gagtgggcca ctggcagcca acggcccccg gggctcaggc ggggagcagc tctgtggtgt gggattgagg cgttttccaa gagtgggttt tcacgtttct aagatttccc aagcagacag cccgtgctgc tccgatttct cgaacaaaaa agcaaaacgt gtggctgtct tgggagcaag tcgcaggact gcaagcagtt gggggagaaa gtccgccatt ttgccacttc tcaaccgtcc ctgcaaggct ggggctcagt tgcgtaatgg aaagtaaagc cctgaactat cacactttaa tcttccttca aaaggtggta aactatacct actgtcccte aagagaacac aagaagtgct ttaagaggcg gcggaaggtg atcgaattcc ggtgatgcga gttgttctcc gtctataaat acgcctcgcc cgagctgtgc ggtaggcatt gaggcagcca gcgcaggggc ttctgctgag ggggcaggcg gagcttgagg aaaccgcaga taagtttttt tctctttgaa agatagagat taatacaact acttaaaaaa tatagtcaat aggttactaa gatattgctt agcgttaagt ttttaacgta attttaatag cttaagattt taagagaaaa tatgaagact tagaagagta gcatgaggaa ggaaaagata aaaggtttct aaaacatgac ggaggttgag atgaagcttc ttcatggagt aaaaaatgta tttaaaagaa aattgagaga aaggactaca gagccccgaa ttaataccaa tagaagggca atgcttttag attaaaatga aggtgactta aacagcttaa agtttagttt aaaagttgta ggtgattaaa

【０１７３】

【表５】

	ataatttgaa ggcgatcttt taaaaagaga ttaaaccgaa ggtgattaaa agaccttgaa atccatgacg cagggagaat tgcgtcattt aaagcctagt taacgcattt actaaacgca gacgaaaatg gaaagattaa ttgggagtgg taggatgaaa caatttggag aagatagaag tttgaagtgg aaaactggaa gacagaagta cgggaaggcg aagaaaagaa tagagaagat agggaaatta gaagataaaa acatactttt agaagaaaaa agataaattt aaacctgaaa agtaggaagc agaagaaaaa agacaagcta ggaaacaaaa agctaagggc aaaatgtaca aacttagaag aaaattggaa gatagaaaca agatagaaaa tgaaaatatt gtcaagagtt tcagatagaa aatgaaaaac aagctaagac aagtattgga gaagtataga agatagaaaa atataaagcc aaaaattgga taaaatagca ctgaaaaaat gaggaaatta ttggtaacca atttatttta aaagcccatc aatttaattt ctggtggtgc agaagttaga aggtaaagct tgagaagatg agggtgttta cgtagaccag aaccaattta gaagaatact tgaagctaga aggggaagtt ggttaaaaat cacatcaaaa agctactaaa aggactggtg taatttaaaa aaaactaagg cagaaggctt ttggaagagt tagaagaatt tggaaggcct taaatatagt agcttagttt gaaaaatgtg aaggactttc gtaacggaag taattcaaga tcaagagtaa ttaccaactt aatgtttttg cattggactt tgagttaaga ttatttttta aatcctgagg actagcatta attgacagct gacccaggtg ctacacagaa gtggattcag tgaatctagg aagacagcag cagacaggat tccaggaacc agtgtttgat gaagctagga ctgaggagca agcgagcaag cagcagttcg tggtgaagat aggaaaagag tccaggagcc agtgcgattt ggtgaaggaa gctaggaaga aggaaggagc gctaacgatt tggtggtgaa gctaggaaaa aggattccag gaaggagcga gtgcaatttg gtgatgaagg tagcaggcgg cttggcttgg caaccacacg gaggaggcga gcaggcgttg tgcgtagagg atcctagacc agcatgccag tgtgccaagg ccacagggaa agcgagtggt tggtaaaaat ccgtgaggtc ggcaatatgt tgtttttctg gaacttactt atggtaacct tttatttatt ttctaatata atgggggagt ttcgtactga ggtgtaaagg gatttatatg gggacgtagg ccgatttccg ggtgttgtag gtttctcttt ttcaggctta tactcatgaa tcttgtctga agcttttgag ggcagactgc caagtcctgg agaaatagta gatggcaagt ttgtgggttt ttttttttta cacgaatttg aggaaaacca aatgaatttg atagccaaat tgagacaatt tcagcaaatc tgtaagcagt ttgtatgttt agttggggta atgaagtatt tcagttttgt gaatagatga cctgttttta cttcctcacc ctgaattcgt tttgtaaatg tagagtttgg atgtgtaact gaggcggggg ggagttttca gtatttttt ttgtgggggt gggggcaaaa tatgttttca gttctttttc ccttaggtct gtctagaatc ctaaaggcaa atgactcaag gtgtaacaga aaacaagaaa atccaatatc aggataatca gaccaccaca ggtttacagt ttatagaaac tagagcagtt ctcacgttga ggtctgtgga agagatgtcc attggagaaa tggctggtag ttactctttt ttccccccac ccccttaatc agactttaaa agtgcttaac cccttaaact tgttatttt tacttgaagc attttgggat ggtcttaaca gggaagagag agggtggggg agaaaatgtt tttttctaag atttttccaca gatgctatag tactattgac aaactgggtt agagaaggag tgtaccgctg tgctgttggc acgaacacct tcagggactg gagctgcttt tatccttgga agagtattcc cagttgaagc tgaaaagtac agcacagtgc agctttggtt catattcagt catctcagga gaacttcaga agagcttgag taggccaaat gttgaagtta agttttccaa taatgtgact tcttaaaagt tttattaaag gggaggggca aatattggca attagttggc agtggcctgt tacggttggg attggtgggg tgggtttagg taattgttta gtttatgatt gcagataaac tcatgccaga gaacttaaag tcttagaatg gaaaaagtaa agaaatatca acttccaagt tggcaagtaa ctcccaatga tttagttttt ttccccccag tttgaattgg gaagctgggg gaagttaaat atgagccact gggtgtacca gtgcattaat ttgggcaagg aaagtgtcat aatttgatac tgtatctgtt ttccttcaaa gtatagagct tttggggaag gaaagtattg aactgggggt tggtctggcc tactgggctg acattaacta caattatggg aaatgcaaaa gttgtttgga tatggtagtg tgtggttctc ttttggaatt tttttcaggt gatttaataa taatttaaaa ctactataga aactgcagag caaaggaagt ggcttaatga tcctgaaggg atttcttctg atggtagctt ttgtattatc aagtaagatt ctattttcag ttgtgtgtaa gcaagttttt ttttagtgta ggagaaatac ttttccattg tttaactgca

【０１７４】

【表６】

	aaacaagatg ttaaggtatg cttcaaaaat tttgtaaatt gtttatttta aacttatctg tttgtaaatt gtaactgatt aagaattgtg atagttcagc ttgaatgtct cttagagggt gggcttttgt tgatgaggga ggggaaactt ttttttttc tatagacttt tttcagataa catcttctga gtcataacca gcctggcagt atgatggcct agatgcagag aaaacagctc cttggtgaat tgataagtaa aggcagaaaa gattatatgt catacctcca ttggggaata agcataaccc tgagattctt actactgatg agaacattat ctgcatatgc caaaaaattt taagcaaatg aaagctacca atttaaagtt acggaatcta ccatttttaaa gttaattgct tgtcaagcta taaccacaaa aataatgaat tgatgagaaa tacaatgaag aggcaatgtc catctcaaaa tactgctttt acaaaagcag aataaaagcg aaaagaaatg aaaatgttac actacattaa tcctggaata aaagaagccg aaataaatga gagatgagtt gggatcaagt ggattgagga ggctgtgctg tgtgccaatg tttcgtttgc ctcagacagg tatctcttcg ttatcagaag agttgcttca tttcatctgg gagcagaaaa cagcaggcag ctgttaacag ataagtttaa cttgcatctg cagtattgca tgttagggat aagtgcttat ttttaagagc tgtggagttc ttaaatatca accatggcac tttctcctga ccccttccct aggggatttc aggattgaga aatttttcca tcgagccttt ttaaaattgt aggacttgtt cctgtgggct tcagtgatgg gatagtacac ttcactcaga ggcatttgca tctttaaata atttcttaaa agcctctaaa gtgatcagtg ccttgatgcc aactaaggaa atttgtttag cattgaatct ctgaaggctc tatgaaagga atagcatgat gtgctgttag aatcagatgt tactgctaaa atttacatgt tgtgatgtaa attgtgtaga aaaccattaa atcattcaaa ataataaact atttttatta gagaatgtat acttttagaa agctgtctcc ttatttaaat aaaatagtgt ttgtctgtag ttcagtgttg gggcaatctt gggggggatt cttctctaat ctttcagaaa ctttgtctgc gaacactctt taatggacca gatcaggatt tgagcggaag aacgaatgta actttaaggc aggaaagaca aattttattc ttcataaagt gatgagcata taataattcc aggcacatgg caatagaggc cctctaaata aggaataaat aacctcttag acaggtggga gattatgatc agagtaaaag gtaattacac attttatttc cagaaagtca ggggtctata aattgacagt gattagagta atacttttttc acatttccaa agtttgcatg ttaactttaa atgcttacaa tcttagagtg gtaggcaatg ttttacacta ttgaccttat atagggaagg gaggggggtgc ctgtggggtt ttaaagaatt ttcctttgca gaggcatttc atccttcatg aagccattca ggattttgaa ttgcatatga gtgcttggct cttccttctg ttctagtgag tgtatgagac cttgcagtga gtttatcagc atactcaaaa tttttttcct ggaatttgga gggatgggag gagggggtgg ggcttacttg ttgtagcttt ttttttttt acagacttca cagagaatgc agttgtcttg acttcaggtc tgtctgttct gttggcaagt aaatgcagta ctgttctgat cccgctgcta ttagaatgca ttgtgaaacg actggagtat gattaaaagt tgtgttcccc aatgcttgga gtagtgattg ttgaaggaaa aaatccagct gagtgataaa ggctgagtgt tgaggaaatt tctgcagttt taagcagtcg tatttgtgat tgaagctgag tacattttgc tggtgtattt ttaggtaaaa tgcttttttgt tcatttctgg tggtgggagg ggactgaagc ctttagtctt ttccagatgc aaccttaaaa tcagtgacaa gaaacattcc aaacaagcaa cagtcttcaa gaaattaaac tggcaagtgg aaatgtttaa acagttcagt gatctttagt gcattgttta tgtgtgggtt tctctctccc ctcccttggt cttaattctt acatgcagga acactcagca gacacacgta tgcgaagggc cagagaagcc agacccagta agaaaaaata gcctatttac tttaaataaa ccaaacattc cattttaaat gtggggattg ggaaccacta gttctttcag atggtattct tcagactata gaaggagctt ccagttgaat tcaccagtgg acaaaatgag gaaaacaggt gaacaagctt tttctgtatt tacatacaaa gtcagatcag ttatgggaca atagtattga atagatttca gctttatgct ggagtaactg gcatgtgagc aaactgtgtt ggcgtggggg tggaggggtg aggtgggcgc taagcctttt tttaagattt ttcaggtacc cctcactaaa ggcaccgaag gcttaaagta ggacaaccat ggagccttcc tgtggcagga gagacaacaa agcgctatta tcctaaggtc aagagaagtg tcagcctcac ctgattttta ttagtaatga ggacttgcct caactccctc tttctggagt gaagcatccg aaggaatgct tgaagtaccc ctgggcttct cttaacattt aagcaagctg tttttatagc agctcttaat aataaagccc aaatctcaag cggtgcttga aggggaggga

【０１７５】

【表７】

	aaggggaaa gcgggcaacc acttttcect agcttttcca gaagcctgtt aaaagcaagg tctccccaca agcaacttct ctgccacatc gccaccccgt gccttttgat ctagcacaga ccettcaccc ctcacctcga tgcagccagt agcttggatc cttgtgggca tgatccataa tcggtttcaa ggtaacgatg gtgtcgaggt ctttggtggg ttgaactatg ttagaaaagg ccattaattt gcctgcaaat tgttaacaga agggtattaa aaccacagct aagtagctct attataatac ttatccagtg actaaaacca acttaaacca gtaagtggag aaataacatg ttcaagaact gtaatgctgg gtgggaacat gtaacttgta gactggagaa gataggcatt tgagtggctg agagggcttt tgggtgggaa tgcaaaaatt ctctgctaag acttttcag gtgaacataa cagacttggc caagctagca tcttagcgga agctgatctc caatgctctt cagtagggtc atgaaggttt ttcttttcct gagaaaacaa cacgtattgt tttctcaggt tttgcttttt ggccttttte tagcttaaaa aaaaaaaaag caaaagatgc tggtggttgg cactcctggt ttccaggacg gggttcaaat ccctgcggcg tctttgcttt gactactaat ctgtcttcag gactctttct gtatttctcc ttttctctgc aggtgctagt tcttggagtt ttggggaggt gggaggtaac agcacaatat ctttgaacta tatacatcct tgatgtataa tttgtcagga gcttgacttg attgtatatt catatttaca cgagaaccta atataactgc cttgtctttt tcaggtaata gcctgcagct ggtgttttga gaagccctac tgctgaaaac ttaacaattt tgtgtaataa aaatggagaa gctctaaatt gttgtggttc ttttgtgaat aaaaaaatct tgattgggga aaaaa
3	cgcagcctgc agcccgagac ttctgtaaag gactggggcc ccgcaactgg cctctcctgc cctcttaagc gcagcgccat tttagcaacg cagaagcccg gcgccgggaa gcctcagctc gcctgaaggc aggtccccte tgacgcctcc gggagcccag gtttcccaga gtccttggga cgcagcgacg agttgtgctg ctatcttagc tgtccttata ggctggccat tccaggtggt ggtatttaga taaaaccact caaactctgc agtttggtct tggggtttgg aggaaagctt ttatttttct tcctgctccg gttcagaagg tctgaagctc atacctaacc aggcataaca cagaatctgc aaaacaaaaa cccctaaaaa agcagaccca gagcagtgta aacacttctg ggtgtgtccc tgactggctg cccaaggtct ctgtgtcttc ggagacaaag ccattcgctt agttggtcta ctttaaaagg ccacttgaac tcgctttcca tggcgatttg ccttgtgagc actttcagga gagcctggaa gctgaaaaac ggtagaaaaa tttccgtgcg ggccgtgggg ggctggcggc aactgggggg ccgcagatca gagtgggcca ctggcagcca acggcccccg gggctcaggc ggggagcagc tctgtggtgt gggattgagg cgttttccaa gagtgggttt tcacgtttct aagatttccc aagcagacag cccgtgctgc tccgatttct cgaacaaaaa agcaaaacgt gtggctgtct tgggagcaag tcgcaggact gcaagcagtt gggggagaaa gtccgccatt ttgccacttc tcaaccgtcc ctgcaaggct ggggctcagt tgcgtaatgg aaagtaaagc cctgaactat cacactttaa tcttccttca aaaggtggta aactatacct actgtcccte aagagaacac aagaagtgct ttaagaggcg gcggaaggtg atcgaattcc ggtgatgcga gttgttctcc gtctataaat acgcctcgcc cgagctgtgc ggtaggcatt gaggcagcca gcgcaggggc ttctgctgag ggggcaggcg gagcttgagg aaaccgcaga taagtttttt tctctttgaa agatagagat taatacaact acttaaaaaa tatagtcaat aggttactaa gatattgctt agcgttaagt ttttaacgta attttaatag cttaagattt taagagaaaa tatgaagact tagaagagta gcatgaggaa ggaaaagata aaaggtttct aaaacatgac ggaggttgag atgaagcttc ttcatggagt aaaaaatgta tttaaaagaa aattgagaga aaggactaca gagccccgaa ttaataccaa tagaagggca atgcttttag attaaaatga aggtgactta aacagcttaa agtttagttt aaaagttgta ggtgattaaa ataatttgaa ggcgatcttt taaaaagaga ttaaaccgaa ggtgattaaa agaccttgaa atccatgacg cagggagaat tgcgtcattt aaagcctagt taacgcattt actaaacgca gacgaaaatg gaaagattaa ttgggagtgg taggatgaaa caatttggag aagatagaag tttgaagtgg aaaactggaa gacagaagta cgggaaggcg aagaaaagaa tagagaagat agggaaatta gaagataaaa acatacttit agaagaaaaa agataaattt aaacctgaaa agtaggaagc agaagaaaaa agacaagcta ggaaacaaaa agctaagggc aaaatgtaca

【０１７６】

【表８】

	aacttagaag aaaattggaa gatagaaaca agatagaaaa tgaaaatatt gtcaagagtt tcagatagaa aatgaaaaac aagctaagac aagtattgga gaagtataga agatagaaaa atataaagcc aaaaattgga taaaatagca ctgaaaaaat gaggaaatta ttggtaacca atttatttta aaagcccatc aatttaattt ctggtggtgc agaagttaga aggtaaagct tgagaagatg agggtgttta cgtagaccag aaccaattta gaagaatact tgaagctaga aggggaagtt ggttaaaaat cacatcaaaa agctactaaa aggactggtg taatttaaaa aaaactaagg cagaaggctt ttggaagagt tagaagaatt tggaaggcct taaatatagt agcttagttt gaaaaatgtg aaggactttc gtaacggaag taattcaaga tcaagagtaa ttaccaactt aatgttttg cattggactt tgagttaaga ttatttttta aatcctgagg actagcatta attgacagct gacccaggtg ctacacagaa gtggattcag tgaatctagg aagacagcag cagacaggat tccaggaacc agtgtttgat gaagctagga ctgaggagca agcgagcaag cagcagttcg tggtgaagat aggaaaagag tccaggagcc agtgcgattt ggtgaaggaa gctaggaaga aggaaggagc gctaacgatt tggtggtgaa gctaggaaaa aggattccag gaaggagcga gtgcaatttg gtgatgaagg tagcaggcgg cttggcttgg caaccacacg gaggaggcga gcaggcgttg tgcgtagagg atcctagacc agcatgccag tgtgccaagg ccacagggaa agcgagtggt tggtaaaaat ccgtgaggtc ggcaatatgt tgtttttctg gaacttactt atggtaacct tttatttatt ttctaatata atgggggagt ttcgtactga ggtgtaaagg gatttatatg gggacgtagg ccgatttccg ggtgttgtag gtttctcttt ttcaggctta tactcatgaa tcttgtctga agcttttgag ggcagactgc caagtcctgg agaaatagta gatggcaagt ttgtgggttt ttttttttta cacgaatttg aggaaaacca aatgaatttg atagccaaat tgagacaatt tcagcaaatc tgtaagcagt ttgtatgttt agttggggta atgaagtatt tcagttttgt gaatagatga cctgttttta cttcctcacc ctgaattcgt tttgtaaatg tagagtttgg atgtgtaact gaggcggggg ggagttttca gtatttttt ttgtgggggt gggggcaaaa tatgttttca gttctttttc ccttaggtct gtctagaatc ctaaaggcaa atgactcaag gtgtaacaga aaacaagaaa atccaatatc aggataatca gaccaccaca ggtttacagt ttatagaaac tagagcagtt ctcacgttga ggtctgtgga agagatgtcc attggagaaa tggctggtag ttactctttt ttccccccac ccccttaatc agactttaaa agtgcttaac cccttaaact tgttatttt tacttgaagc atttgggat ggtcttaaca gggaagagag agggtggggg agaaaatgtt ttttctaag attttccaca gatgctatag tactattgac aaactgggtt agagaaggag tgtaccgctg tgctgttggc acgaacacct tcagggactg gagctgcttt tatccttgga agagtattcc cagttgaagc tgaaaagtac agcacagtgc agctttggtt catattcagt catctcagga gaacttcaga agagcttgag taggccaaat gttgaagtta agttttccaa taatgtgact tcttaaaagt tttattaaag gggaggggca aatattggca attagttggc agtggcctgt tacggttggg attggtgggg tgggtttagg taattgttta gtttatgatt gcagataaac tcatgccaga gaacttaaag tcttagaatg gaaaaagtaa agaaatatca acttccaagt tggcaagtaa ctcccaatga tttagttttt ttccccccag tttgaattgg gaagctgggg gaagttaaat atgagccact gggtgtacca gtgcattaat ttgggcaagg aaagtgtcat aatttgatac tgtatctgtt ttccttcaaa gtatagagct tttggggaag gaaagtattg aactgggggt tggtctggcc tactgggctg acattaacta caattatggg aaatgcaaaa gttgtttgga tatggtagtg tgtggttctc ttttggaatt tttttcaggt gatttaataa taatttaaaa ctactataga aactgcagag caaaggaagt ggcttaatga tcctgaaggg atttcttctg atggtagctt ttgtattatc aaacttttt cagataacat cttctgagtc ataaccagcc tggcagtatg atggcctaga tgcagagaaa acagctcctt ggtgaattga taagtaaagg cagaaaagat tatatgtcat acctccattg gggaataagc ataaccctga gattcttact actgatgaga acattatctg catatgccaa aaaatttaa gcaaatgaaa gctaccaatt taaagttacg gaatctacca ttttaaagtt aattgcttgt caagctataa ccacaaaaat aatgaattga tgagaaatac aatgaagagg caatgtccat ctcaaaatac tgcttttaca aaagcagaat aaaagcgaaa agaaatgaaa atgttacact acattaatcc tggaataaaa gaagccgaaa taaatgagag atgagttggg atcaagtgga

【０１７７】

【表９】

	ttgaggaggc tgtgctgtgt gccaatgttt cgtttgcctc agacaggtat ctcttcgtta tcagaagagt tgcttcattt catctgggag cagaaaacag caggcagctg ttaacagata agtttaactt gcatctgcag tattgcatgt tagggataag tgcttatttt taagagctgt ggagttctta aatatcaacc atggcacttt ctcctgaccc cttccctagg ggatttcagg attgagaaat ttttccatcg agccttttta aaattgtagg acttgttcct gtgggcttca gtgatgggat agtacacttc actcagaggc atttgcatct ttaaataatt tcttaaaagc ctctaaagtg atcagtgcct tgatgccaac taaggaaatt tgtttagcat tgaatctctg aaggctctat gaaaggaata gcatgatgtg ctgttagaat cagatgttac tgctaaaatt tacatgttgt gatgtaaatt gtgtagaaaa ccattaaatc attcaaaata ataaactatt tttattagag aatgtatact tttagaaagc tgtctcctta tttaaataaa atagtgtttg tctgtagttc agtgttgggg caatcttggg ggggattctt ctctaatctt tcagaaactt tgtctgcgaa cactctttaa tggaccagat caggatttga gcggaagaac gaatgtaact ttaaggcagg aaagacaaat tttattcttc ataaagtgat gagcatataa taattccagg cacatggcaa tagaggccct ctaaataagg aataaataac ctcttagaca ggtgggagat tatgatcaga gtaaaaggta attacacatt ttatttccag aaagtcaggg gtctataaat tgacagtgat tagagtaata ctttttcaca tttccaaagt ttgcatgtta actttaaatg cttacaatct tagagtggta ggcaatgttt tacactattg accttatata gggaagggag ggggtgcctg tggggttttа aagaattttc ctttgcagag gcatttcatc cttcatgaag ccattcagga ttttgaattg catatgagtg cttggctctt ccttctgttc tagtgagtgt atgagacctt gcagtgagtt tatcagcata ctcaaaattt ttttcctgga atttggaggg atgggaggag ggggtggggc ttacttgttg tagcttttтt ttttttttaca gacttcacag agaatgcagt tgtcttgact tcaggtctgt ctgttctgtt ggcaagtaaa tgcagtactg ttctgatccc gctgctatta gaatgcattg tgaaacgact ggagtatgat taaaagttgt gttccccaat gcttggagta gtgattgttg aaggaaaaaa tccagctgag tgataaaggc tgagtgttga ggaaatttct gcagttttaa gcagtcgtat ttgtgattga agctgagtac atttttgctgg tgtatttttа ggtaaaatgc tttttgttca tttctggtgg tgggagggga ctgaagcctt tagtcttttc cagatgcaac cttaaaatca gtgacaagaa acattccaaa caagcaacag tcttcaagaa attaaactgg caagtggaaa tgtttaaaca gttcagtgat ctttagtgca ttgtttatgt gtgggtttct ctctcccctc ccttggtctt aattcttaca tgcaggaaca ctcagcagac acacgtatgc gaagggccag agaagccaga cccagtaaga aaaaatagcc tatttacttt aaataaacca aacattccat tttaaatgtg gggattggga accactagtt ctttcagatg gtattcttca gactatagaa ggagcttcca gttgaattca ccagtggaca aaatgaggaa aacaggtgaa caagcttttt ctgtatttac atacaaagtc agatcagtta tgggacaata gtattgaata gatttcagct ttatgctgga gtaactggca tgtgagcaaa ctgtgttggc gtgggggtgg aggggtgagg tgggcgctaa gccttttttt aagatttttc aggtacccct cactaaaggc accgaaggct taaagtagga caaccatgga gccttcctgt ggcaggagag acaacaaagc gctattatcc taaggtcaag agaagtgtca gcctcacctg attttтatta gtaatgagga cttgcctcaa ctccctcttt ctggagtgaa gcatccgaag gaatgcttga agtacccctg ggcttctctt aacatttaag caagctgttt ttatagcagc tcttaataat aaagcccaaa tctcaagcgg tgcttgaagg ggagggaaag ggggaaagcg ggcaaccact tttccctagc ttttccagaa gcctgttaaa agcaaggtct ccccacaagc aacttctctg ccacatcgcc accccgtgcc ttttgatcta gcacagaccc ttcacccctc acctcgatgc agccagtagc ttggatcctt gtgggcatga tccataatcg gtttcaaggt aacgatggtg tcgaggtctt tggtgggttg aactatgtta gaaaaggcca ttaatttgcc tgcaaattgt taacagaagg gtattaaaac cacagctaag tagctctatt ataatactta tccagtgact aaaaccaact taaaccagta agtggagaaa taacatgttc aagaactgta atgctgggtg ggaacatgta acttgtagac tggagaagat aggcatttga gtggctgaga gggcttttgg gtgggaatgc aaaaattctc tgctaagact ttttcaggtg aacataacag acttggccaa gctagcatct tagcggaagc tgatctccaa tgctcttcag tagggtcatg aaggtttttc ttttcctgag aaaacaacac gtattgtttt ctcaggtttt

【０１７８】

【表１０】

	gctttttggc ctttttctag cttaaaaaaa aaaaaagcaa aagatgctgg tggttggcac tcctggtttc caggacgggg ttcaaatccc tgcggcgtct ttgctttgac tactaatctg tcttcaggac tctttctgta tttctccttt tctctgcagg tgctagttct tggagttttg gggaggtggg aggtaacagc acaatatctt tgaactatat acatccttga tgtataattt gtcaggagct tgacttgatt gtatattcat atttacacga gaacctaata taactgcctt gtctttttca ggtaatagcc tgcagctggt gttttgagaa gccctactgc tgaaaactta acaattttgt gtaataaaaa tggagaagct ctaaattgtt gtggttcttt tgtgaataaa aaaatcttga ttggggaaaa aa
4	tcagcattctaatagcagc
5	tm5cagm5cattm5ctaatagm5cagm5c m5c – 5-メチルシチジン
6	gcattctaatagcagc
7	gm5cattm5ctaatagm5cagm5c m5c – 5-メチルシチジン
8	GM5CAttm5ctaatagm5cAGM5C m5c– 5-メチルシチジン、大文字はLNAヌクレオシドである
9	GTTtggtattm5cttTAG m5c– 5-メチルシチジン、大文字はLNAヌクレオシドである
10	GTGtm5caam5caam5cm5caTTT m5c – 5-メチルシチジン、大文字はLNAヌクレオシドである
11	M5CAM5CAaatttattaaM5CTM5CT m5c – 5-メチルシチジン、大文字はLNAヌクレオシドである
12	M5CTGttm5cttm5caAtaATG m5c – 5-メチルシチジン、大文字はLNAヌクレオシドである
13	AM5CM5Catgagm5ctataM5CTT m5c – 5-メチルシチジン、大文字はLNAヌクレオシドである

【図面】

【図１】

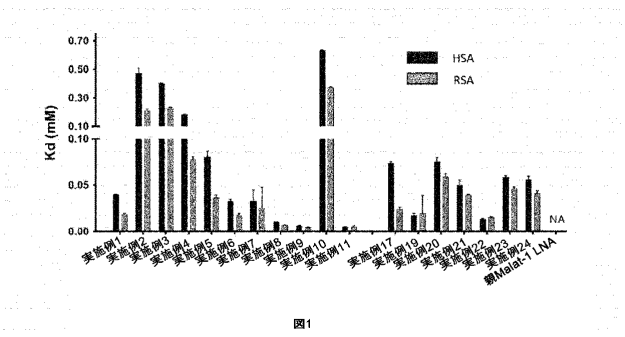


図1

【図２】

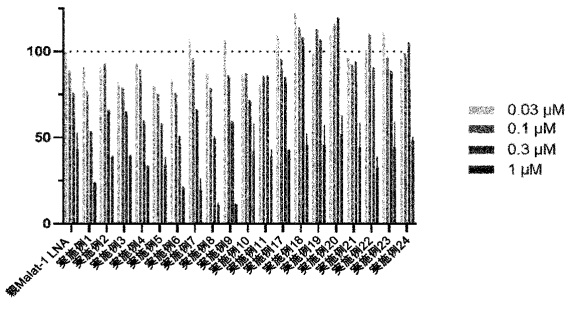


図2

【図３Ａ－Ｄ】

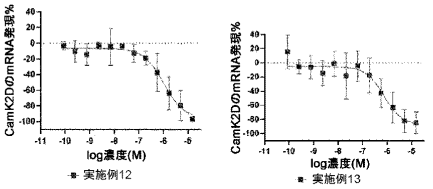


図3A　図3B

図3C　図3D

【図４Ａ－Ｂ】

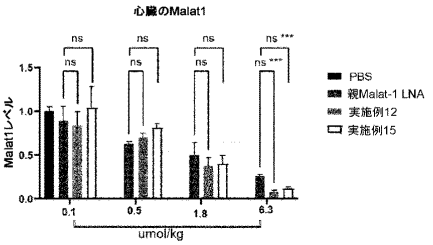


図4A

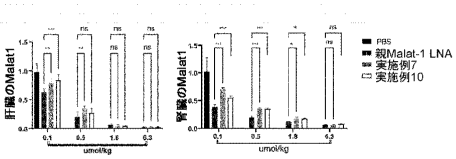


図4B

【図５】

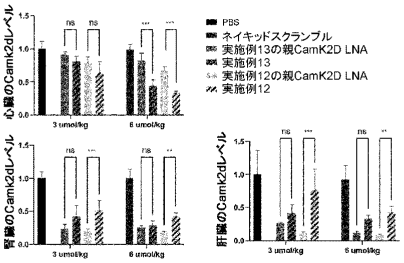


図5

【配列表】

<u>2023541639000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2021/075386

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/075386

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/54
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/046846 A1 (ROLOFF ALEXANDER [US] ET AL) 13 February 2020 (2020-02-13) paragraphs [0002], [0006], [0007], [0020], [0077], [0084] tables 1-3 claims 1-40 example 1 reaction scheme on page 12	1-76
X,P	WO 2021/046497 A2 (SHEN HAIFA [US]) 11 March 2021 (2021-03-11) paragraphs [0036], [0044], [0074] - [0079], [0109] examples 8, 9 claims 1, 2, 9-16, 23-29 figures 2, 5A-5H, 17A, 17B	1-76

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 December 2021	22/12/2021

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Birikaki, Lemonia

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/075386

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020046846 A1	13-02-2020	AU 2018237139 A1	17-10-2019
		CA 3057292 A1	27-09-2018
		CN 110636865 A	31-12-2019
		EP 3600439 A1	05-02-2020
		JP 2020514383 A	21-05-2020
		KR 20190123351 A	31-10-2019
		SG 11201908771Y A	30-10-2019
		US 2020046846 A1	13-02-2020
		WO 2018175592 A1	27-09-2018
WO 2021046497 A2	11-03-2021	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類	FI	テーマコード（参考）
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

スウェーデン、エスエー－１５１　８５セーデルテイエ、アストラゼネカ・アクチエボラーグ

(72)発明者　ミュラース，エリック

スウェーデン、エスエー－１５１　８５セーデルテイエ、アストラゼネカ・アクチエボラーグ

Ｆターム（参考）　4B065　AA93X AA93Y AB01 AC14 BA01 BB12 BB15 BB25 BB32 BC03
BC07 BC11 BD16 CA23 CA24 CA44
4C076　AA95 CC11 CC41 DD47 EE59 FF70
4C084　AA13 NA14 ZA36