

【選択図】 図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載されている発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年7月13日に出願された米国特許仮出願第61/671,655号、2012年7月13日に出願された同第61/671,656号、2012年7月14日に出願された同第61/671,722号、および2012年7月14日に出願された同第61/671,724号の優先権を主張し、各出願の全文は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

10

【0002】

技術分野

オリゴヌクレオチドは、治療、診断、研究およびナノ材料の応用に有用である。

背景技術

天然核酸（例えば、無修飾DNAまたはRNA）の治療用途での使用は、例えば、細胞外および細胞内ヌクレアーゼおよび／またはそれらの低い細胞透過性および低い細胞分布のために、制限され得る。加えて、生体外研究により、結合親和性、相補RNAへの特異的結合配列（Cosstick and Eckstein, 1985; LaPlanche et al., 1986; Latimer et al., 1989; Hacia et al., 1994; Mesmaeker et al., 1995）、およびヌクレアーゼ安定性などのアンチセンスオリゴヌクレオチドの特性が、リン原子の絶対立体化学的配置により影響され得ることが分かった（Cookら、米国特許公開第005599797号）。従って、新規な改良されたオリゴヌクレオチド組成物が必要とされている。

20

【発明の概要】

【0003】

本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物およびその新規合成方法の必要性があるという認識を包含する。本発明は、全キラル制御された組成物、特に、複数のオリゴヌクレオチド型を含む組成物の合成を妨げる問題を含む、キラルオリゴヌクレオチド合成の従来手法における、ある特定の問題の原因を特定すること包含する。

30

【0004】

いくつかの実施形態では、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0005】

いくつかの実施形態では、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の製造方法を提供する。

【0006】

いくつかの実施形態では、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の使用方法を提供する。

【0007】

40

本出願で引用した全ての刊行物および特許は、その全文を参照することにより、本明細書に組み入れられるものとする。

【0008】

定義

脂肪族：本明細書中で使用されるとき、「脂肪族」または「脂肪族基」という語は、他の分子へのひとつの結合点を有する、完全に飽和もしくは1つ以上の不飽和単位を含有する直鎖（すなわち、分岐でない）もしくは分岐鎖、置換もしくは非置換炭化水素鎖、または完全に飽和もしくは1つ以上の不飽和単位を含有するが、芳香族でない単環式炭化水素もしくは多環式炭化水素（本明細書で、「炭素環」、「脂環式」または「シクロアルキル」とも呼ぶ）を意味する。いくつかの実施形態では、脂肪族基は、1～50個の脂肪族炭

50

素原子を含む。特に指定しない限り、脂肪族基は、1～10個の脂肪族炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、脂肪族基は、1～6個の脂肪族炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、脂肪族基は、1～5個の脂肪族炭素原子を含む。他の実施形態では、脂肪族基は、1～4個の脂肪族炭素原子を含む。更に他の実施形態では、脂肪族基は、1～3個の脂肪族炭素原子を含み、更に他の実施形態では、脂肪族基は、1～2個の脂肪族炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、「脂環式」（または「炭素環」または「シクロアルキル」）は、他の分子へのひとつの結合点を有する、完全に飽和もしくは1つ以上の不飽和単位を含有するが、芳香族でない単環式もしくは二環式 $C_3 \sim C_{10}$ 炭化水素を表す。いくつかの実施形態では、「脂環式」（または「炭素環」または「シクロアルキル」）は、他の分子へのひとつの結合点を有する、完全に飽和もしくは1つ以上の不飽和単位を含有するが、芳香族でない単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭化水素を表す。適切な脂肪族基としては、直鎖または分岐鎖、置換または非置換アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、および（シクロアルキル）アルキル、（シクロアルケニル）アルキルまたは（シクロアルキル）アルケニルなどのそれらの複合体が挙げられるが、これに限定されない。

10

【0009】

アルキレン：「アルキレン」という語は、二価アルキル基を表す。「アルキレン鎖」は、ポリメチレン基、すなわち、 $-(CH_2)_n-$ であり、式中、 n は正整数、好ましくは、1～6、1～4、1～3、1～2、または2～3である。置換アルキレン鎖は、1つ以上のメチレン水素原子が、置換基で置換されたポリメチレン基である。適切な置換基としては、置換脂肪族基について下に記載のものが挙げられる。

20

【0010】

アルケニレン：「アルケニレン」という語は、二価アルケニル基を表す。置換アルケニレン基は、1つ以上の水素原子が、置換基で置換された、少なくとも1つの二重結合を含有するポリメチレン基である。適切な置換基としては、置換脂肪族基について下に記載のものが挙げられる。

【0011】

動物：本明細書中で使用されるとき、「動物」という語は、動物界の任意の成員を表す。いくつかの実施形態では、「動物」は、発育の任意の段階における、ヒトを表す。いくつかの実施形態では、「動物」は、発育の任意の段階における、非ヒト動物を表す。特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳類（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、および／またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物としては、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、および／または蠕虫類を挙げられるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子組み換え動物、および／またはクローンであり得る。

30

【0012】

およそ：本明細書中で使用されるとき、数を表すときの「およそ」または「約」という語は、一般に、特に明記もしくは特に文脈から明白でない限り（かかる数が、0%より小さいまたは100%超の可能な値である場合を除き）、該数のどちらの方向でも（より大きいまたはより小さい）、5%、10%、15%、または20%の範囲内に含まれる数を含むと考える。いくつかの実施形態では、投与量を表すときの「約」という語の使用は、 $\pm 5 \text{ mg/kg/day}$ を意味する。

40

【0013】

アリール：単独でまたは「アラルキル」、「アラルコシ」、または「アリールオキシアルキル」として大きな部分の一部として使用される「アリール」という語は、構造の少なくとも1つの環が芳香族であり、構造の各環が3～7環員を含む、全5～14環員を有する単環式および二環式環構造を表す。「アリール」という語は、「アリール環」という語と、互換的に使用され得る。本発明の特定の実施形態では、「アリール」は、限定されないが、1つ以上の置換基を有してもよい、フェニル、ピフェニル、ナフチル、アントラシル（anthracyl）などを含む芳香族環構造を表す。インダニル、フタルイミジル、ナフトイミジル（naphthimidylyl）、フェナントリジニル、またはテトラヒドロナフチルなどの、

50

芳香族環が1つ以上の非芳香族環と縮合している基も、本明細書で、「アリール」という語の範囲に含まれる。

【0014】

特徴的部分：本明細書中で使用されるとき、タンパク質またはポリペプチドの「特徴的部分」という言い回しは、全体で、タンパク質またはポリペプチドの特徴である一続きのアミノ酸、または一続きのアミノ酸の集合を含むものである。かかる各連続鎖は、一般に、少なくとも2つのアミノ酸を含むだろう。さらに、当業者は、通常、少なくとも、5、10、15、20またはそれ以上のアミノ酸が、タンパク質の特徴であるために必要であることを認識するだろう。一般に、特徴的部分は、上記特定の配列相同性に加えて、少なくとも1つの機能的特徴を、関連性ある無傷タンパク質と共有する。

10

【0015】

特徴的配列：「特徴的配列」は、ポリペプチドまたは核酸のファミリーの全成員中で見られる配列であり、従って、該ファミリーの成員を定義するために、当業者により使用され得る。

【0016】

特徴的構造要素：「特徴的構造要素」という語は、ポリペプチド、小分子、または核酸のファミリーの全成員中で見られる、はっきりと区別できる構造要素（例えば、骨格構造、懸垂部分の集合、配列要素、他）を表し、従って、該ファミリーの成員を定義するために、当業者により使用され得る。

20

【0017】

同等：「同等」という語は、得られた結果または観察された現象の比較を可能となるように、互いに十分似ている状態または環境の2つ（またはそれ以上）のセットを言い表すために、本明細書で使用される。いくつかの実施形態では、状態または環境の同等なセットは、複数の実質的に同じ特徴および1つまたは少数の変更された特徴により特徴付けられる。当業者は、実質的に同じ特徴の十分な数と型により特徴付けられ、異なるセットの状態または環境下で得られる結果または観察される現象における違いが、状態のセットが、変更されるそれらの特徴中の差異を原因とするまたは示すという合理的結論を正当化できるとき、互いに同等であることを認識するだろう。

【0018】

投与計画：本明細書中で使用されるとき、「投与計画」または「治療レジメン」は、通常、ある期間により分けられて、対象に個別に投与される1組の単位用量（通常、1つ以上）を表す。いくつかの実施形態では、所与の治療薬は、1つ以上の用量を含み得る所要投与計画を有する。いくつかの実施形態では、投与計画は、その各々が、同じ長さの期間により互いに分離した複数の用量を含み；いくつかの実施形態では、投与計画は、複数の用量および別々の用量を分ける少なくとも2つの異なる期間を含む。いくつかの実施形態では、投与計画内の全用量は、同じ単位投与量である。いくつかの実施形態では、投与計画内の異なる用量は、異なる量である。いくつかの実施形態では、投与計画は、1番目の投与量で1番目の用量、次いで、1番目の投与量と異なる2番目の用量で1つ以上の追加の用量を含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、1番目の投与量で1番目の用量、次いで、1番目の投与量と同じ2番目の用量で1つ以上の追加の用量を含む。

30

40

【0019】

同等の薬剤：本開示を読んで、当業者は、本発明の文脈中の有用な薬剤の範囲が、本明細書で具体的に言及または例示したものに限定されないことを認識するだろう。具体的には、当業者は、活性剤が、通常、骨格および結合した懸垂部分から成る構造を有することを認識しており、従ってかかる骨格および／または懸垂部分の簡単な変更が、薬剤の活性を有意に変化させないことを理解するだろう。例えば、いくつかの実施形態では、同等の3次元構造および／または化学反応特性の基を有する1つ以上の懸垂部分の置換は、親の基準化合物または部分と同等の置換された化合物または部分を生成し得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の懸垂部分の付加または分離は、親の基準化合物と同等な置換された化合物を生成し得る。いくつかの実施形態では、例えば、少数の結合（通常、5、4

50

、3、2以下、または1つの結合、およびしばしば一重結合のみ)の付加または分離による骨格構造の変更は、親の基準化合物と同等置換された化合物を生成し得る。多くの実施形態では、同等の化合物は、例えば、容易に入手可能な物質、試薬および従来または提供される合成手順を用いて、下記一般的反応スキームで示された方法、またはその変法により、合成され得る。これらの反応で、それ自体では既知であるが、ここで言及されない変更も利用可能である。

【0020】

同等の投与量：「同等の投与量」という語は、同じ生物学的結果をもたらす異なる薬剤的に活性な薬剤の投与量を比較するために、本明細書で使用される。2つの異なる薬剤の投与量は、もし、それらが、同等のレベルまたは程度の生物学的結果を達成するならば、本発明に従って、互いに「同等」とであると見なされる。いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される異なる医薬の同等の投与量は、本明細書に記載の生体外および／または生体内アッセイを用いて決定される。いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される1つ以上のリソソーム活性剤は、基準リソソーム活性剤の用量と同等の用量で利用され；いくつかの実施形態では、かかる目的の基準リソソーム活性剤は、小分子アロステリック活性化剤（例えば、ピラゾロピリミジン類（pyrazolopyrimidines））、イミノ糖類（imminosugars）（例えば、イソファゴミン）、酸化防止剤（例えば、n-アセチルシステイン）、および細胞輸送の制御因子（例えば、Rab1aポリペプチド）から成る群から選択される。

【0021】

ヘテロ脂肪族：「ヘテロ脂肪族」という語は、C、CH、CH₂、またはCH₃から選択される1つ以上の単位が、独立して、ヘテロ原子により置換された脂肪族基を表す。いくつかの実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルキルである。いくつかの実施形態では、ヘテロ脂肪族基は、ヘテロアルケニルである。

【0022】

ヘテロアリール：単独でまたは大きな部分、例えば、「ヘテロアラキル」、または「ヘテロアラコシ」の一部として使用される「ヘテロアリール」および「ヘテロアルー」という語は、5～10個の環原子、好ましくは、5個、6個、または9個の環原子を有し；環状配列中で共有される6個、10個、または14個のπ電子を有し；および炭素原子に加えて、1～5個のヘテロ原子を有する基を表す。「ヘテロ原子」という語は、窒素、酸素、または硫黄を表し、窒素もしくは硫黄のいずれの酸化形態も、およびいずれの塩基性窒素の四級化形態も含む。ヘテロアリール基としては、チエニル、フラニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、インドリジニル、プリニル、ナフチリジニル、およびプテリジニルが挙げられるが、これに限定されない。本明細書で、「ヘテロアリール」および「ヘテロアルー」という語は、ヘテロ芳香族環が、ラジカルまたは結合点が芳香族環上にある1つ以上のアリール、脂環式、またはヘテロシクリル環に縮合している基も含む。制限されない例としては、インドリル、イソインドリル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、ジベンゾフラニル、インダゾリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、4H-キノリジニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、およびピリド[2,3-b]-1,4-オキサジニ-3(4H)-オンが挙げられる。ヘテロアリール基は、単環式または二環式であり得る。「ヘテロアリール」という語は、「ヘテロアリール環」、「ヘテロアリール基」、または「芳香族複素環」という語と互換的に使用され得、その語のいずれも、置換されていてもよい環を含む。「ヘテロアラキル」という語は、ヘテロアリールにより置換されたアルキル基を表し、該アルキルおよびヘテロアリール部分は、独立して、置換されていてもよい。

【0023】

ヘテロ原子：「ヘテロ原子」という語は、1つ以上の酸素、硫黄、窒素、リン、またはケイ素（窒素、硫黄、リン、もしくはケイ素のいずれもの酸化形態；いずれもの塩基性窒素の四級化形態または；複素環、例えば、N（3，4-ジヒドロ-2H-ピロリル中の）、NH（ピロリジニル中の）もしくはNR⁺（N-置換ピロリジニル中の）の置換可能な窒素を含む）を意味する。

【0024】

複素環：本明細書中で使用されるとき、「複素環 (heterocycle)」、「ヘテロシクリル」、「複素環式ラジカル」、および「複素環 (heterocyclic ring)」という語は、互換的に使用され、飽和あるいは部分的に不飽和であり、炭素原子に加えて、1つ以上の、好ましくは、1～4個の上記のヘテロ原子を有する安定な3～7員単環式または7～10員二環式複素環式部分を表す。複素環の環原子を表すのに使用されるとき、「窒素」という語は、置換された窒素を含む。例えば、酸素、硫黄または窒素から選択される0～3個のヘテロ原子を有する飽和または部分的に不飽和な環で、該窒素は、N（3，4-ジヒドロ-2H-ピロリル中のような）、NH（ピロリジニル中のような）または⁺NR（N-置換ピロリジニル中のような）であり得る。

【0025】

複素環は、安定構造をもたらすいずれのヘテロ原子または炭素原子にあるその側基に結合され得、いずれの環原子も置換されていてもよい。かかる飽和または部分的に不飽和な複素環式ラジカルの例としては、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフエニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピロリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オキサゾリジニル、ピペラジニル、ジオキサニル、ジオキサラニル、ジアゼピニル、オキサゼピニル、チアゼピニル、モルホリニル、およびキヌクリジニルが挙げられるが、これに限定されない。「複素環」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロシクリル環」、「複素環式基」、「複素環式部分」、および「複素環式ラジカル」という用語は、本明細書で、互換的に使用され、インドリニル、3H-インドリル、クロマニル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロキノリニルなどの、ヘテロシクリル環が1つ以上のアリール基、ヘテロアリール基、または脂肪族環に縮合する基を含み、該ラジカルまたは結合点は、ヘテロシクリル環上にある。ヘテロシクリル環は、単環式または二環式であり得る。「ヘテロシクリルアルキル」という語は、ヘテロシクリルにより置換されたアルキル基を表し、該アルキルおよびヘテロシクリル部は、独立して、置換されていてもよい。

【0026】

腹腔内：本明細書中で使用されるとき、「腹腔内投与」および「腹腔内に投与された」という言い回しは、対象の腹膜中への化合物または組成物の投与を表すその技術分野で理解される意味を有する。

【0027】

生体外：本明細書中で使用されるとき、「生体外」という語は、生物（例えば、動物、植物、および／または微生物）内でなく、人工的環境、例えば、試験管または反応器中、細胞培養液中、その他で起こる事象を表す。

【0028】

生体内：本明細書で、「生体内」という語は、生物（例えば、動物、植物、および／または微生物）内で起こる事象を表す。

【0029】

低級アルキル：「低級アルキル」という語は、C₁～₄直鎖または分岐鎖アルキル基を表す。実例として低級アルキル基は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、およびtert-ブチルである。

【0030】

低級ハロアルキル：「低級ハロアルキル」という語は、1つ以上のハロゲン原子で置換されたC₁～₄直鎖または分岐鎖アルキル基を表す。

【0031】

10

20

30

40

50

置換されていてもよい：本明細書に記載されるとき、本発明の化合物は、「置換されていてもよい」部分を含み得る。一般に、「置換された」という語は、「してもよい」という語があるかないかに係わらず、該指定部分の1つ以上の水素が適切な置換基で置換されることを意味する。特に指示されない限り、「置換されていてもよい」基は、いずれかの所与の構造中の1つ以上の位置が、位置毎に同じあるいは異なり得るとき、該基の各置換可能な位置で適切な置換基を有し得る。本発明により考えられる置換基の組み合わせは、好ましくは、安定または化学的に有り得る化合物の生成をもたらすものである。本明細書中で使用されるとき、「安定」という語は、それらの製造、検出、および、特定の実施形態では、本明細書で開示の1つ以上の目的のそれらの回収、精製および使用を可能にする状態にあるとき、実質的に変化しない化合物を表す。

10

【0032】

「置換されていてもよい」基の置換可能な炭素原子上の適切な一価置換基は、独立して、ハロゲン； $-(CH_2)_{0 \sim 4} R^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} OR^\circ$ ； $-O(CH_2)_{0 \sim 4} R^\circ$ 、 $-O-(CH_2)_{0 \sim 4} C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} CH(OR^\circ)_2$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} SR^\circ$ ； R° で置換されていてもよい $(CH_2)_{0 \sim 4} Ph$ ； R° で置換されていてもよい $(CH_2)_{0 \sim 4} O(CH_2)_{0 \sim 1} Ph$ ； R° で置換されていてもよい $CH=CHPh$ ； R° で置換されていてもよい $(CH_2)_{0 \sim 4} O(CH_2)_{0 \sim 1}$ -ピリジル； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-N_3$ ； $(CH_2)_{0 \sim 4} N(R^\circ)_2$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ； $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ； $N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ； $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ； $N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ； $N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} C(O)R^\circ$ ； $-C(S)R^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} C(O)OR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} C(O)SR^\circ$ ； $(CH_2)_{0 \sim 4} C(O)OSiR^\circ_3$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} OC(O)R^\circ$ ； $-OC(O)(CH_2)_{0 \sim 4} SR^\circ$ 、 $SC(S)SR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} SC(O)R^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} C(O)NR^\circ_2$ ； $-C(S)NR^\circ_2$ ； $-C(S)SR^\circ$ ； $SC(S)SR^\circ$ 、 $(CH_2)_{0 \sim 4} OC(O)NR^\circ_2$ ； $C(O)N(OR^\circ)R^\circ$ ； $-C(O)C(O)R^\circ$ ； $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$ ； $-C(NOR^\circ)R^\circ$ ； $(CH_2)_{0 \sim 4} SSR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} S(O)_2R^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} S(O)_2OR^\circ$ ； $-(CH_2)_{0 \sim 4} OS(O)_2R^\circ$ ； $-S(O)_2NR^\circ_2$ ； $(CH_2)_{0 \sim 4} S(O)R^\circ$ ； $N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$ ； $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$ ； $-N(OR^\circ)R^\circ$ ； $-C(NH)NR^\circ_2$ ； $-P(O)_2R^\circ$ ； $P(O)R^\circ_2$ ； $OP(O)R^\circ_2$ ； $-OP(O)(OR^\circ)_2$ ； $-SiR^\circ_3$ ； $-(C_{1 \sim 4}$ 直鎖または分岐鎖アルキレン) $O-N(R^\circ)_2$ ；または $-(C_{1 \sim 4}$ 直鎖または分岐鎖アルキレン) $C(O)O-N(R^\circ)_2$ （式中、各 R° は、下記のように置換されてもよく、独立して、水素、 $C_{1 \sim 6}$ 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0 \sim 1}Ph$ 、 $-CH_2-$ （5～6員ヘテロアリール環）または5～6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0～4個のヘテロ原子を有するアリール環、または、上記定義にもかかわらず、独立して出現する2つの R° が、それらの介在する原子と一緒にあって、下記のように置換されてもよく、独立して、窒素、酸素、もしくは硫黄から選択される0～4個のヘテロ原子を有する3～12員飽和、部分的に不飽和、もしくはアリール単環式もしくは二環式環を形成する）である。

20

30

40

【0033】

R° 上の適切な一価置換基（または独立して出現する2つの R° が、それらの介在する原子と一緒にあって形成する環）は、独立して、ハロゲン、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} R^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} OH$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} OR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} CH(OR^\bullet)_2$ ； $O(H)R^\bullet$ 、 $-CN$ 、 $-N_3$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} C(O)R^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} C(O)OR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} SR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} SH$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} NH_2$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} NHR^\bullet$ 、 $-(CH_2)_{0 \sim 2} NR^\bullet_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SiR^\bullet_3$ 、 $-OSiR^\bullet_3$

50

、 $C(O)SR^{\bullet}$ 、 $-(C_{1\sim 4}\text{直鎖または分岐鎖 アルキレン})C(O)OR^{\bullet}$ 、または $-SSR^{\bullet}$ （式中、各 $R^{\bullet}$ は非置換または、「ハロ」が前に付く場合、1つ以上のハロゲンでのみ置換され、および、独立して、 $C_{1\sim 4}$ 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0\sim 1}Ph$ 、または5～6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0～4個のヘテロ原子を有するアリール環から選択される）である。 R° の飽和炭素原子上の適切な二価置換基としては、 $=O$ および $=S$ が挙げられる。

【0034】

「置換されていてもよい」基の飽和炭素原子上の適切な二価置換基としては、次のもの： $=O$ 、 $=S$ 、 $=NNR^*_2$ 、 $=NNHC(O)R^*$ 、 $=NNHC(O)OR^*$ 、 $=NNHS(O)_2R^*$ 、 $=NR^*$ 、 $=NOR^*$ 、 $-O(C(R^*_2))_{2\sim 3}O-$ 、または $-S(C(R^*_2))_{2\sim 3}S-$ （式中、独立して出現する各 R^* は、水素、下記の置換され得る $C_{1\sim 6}$ 脂肪族、または非置換5～6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0～4個のヘテロ原子を有するアリール環から選択される）が挙げられる。「置換されていてもよい」基の隣接する置換可能な炭素に結合した適切な二価置換基として： $-O(CR^*_2)_{2\sim 3}O-$ （式中、独立して出現する各 R^* は、水素、下記の置換され得る $C_{1\sim 6}$ 脂肪族、または非置換5～6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0～4個のヘテロ原子を有するアリール環から選択される）が挙げられる。

【0035】

R^* の脂肪族基上の適切な置換基としては、ハロゲン、 $-R^{\bullet}$ 、 $-(ハロR^{\bullet})$ 、 $-OH$ 、 $-OR^{\bullet}$ 、 $-O(ハロR^{\bullet})$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^{\bullet}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^{\bullet}$ 、 $-NR^{\bullet}_2$ 、または $-NO_2$ （式中、各 $R^{\bullet}$ は、非置換または、「ハロ」が前に付く場合、1つ以上のハロゲンにのみ置換され、および、独立して、 $C_{1\sim 4}$ 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0\sim 1}Ph$ 、または5～6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0～4個のヘテロ原子を有するアリール環である）が挙げられる。

【0036】

「置換されていてもよい」基の置換可能な窒素上の適切な置換基としては、 $-R^+$ 、 $-NR^+_2$ 、 $-C(O)R^+$ 、 $-C(O)OR^+$ 、 $-C(O)C(O)R^+$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^+$ 、 $-S(O)_2R^+$ 、 $S(O)_2NR^+_2$ 、 $-C(S)NR^+_2$ 、 $-C(NH)NR^+_2$ 、または $-N(R^+)S(O)_2R^+$ ；（式中、各 R^+ は、独立して、ハロゲン、下記の置換され得る $C_{1\sim 6}$ 脂肪族、非置換 $-OPh$ 、または非置換5～6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0～4個のヘテロ原子を有するアリール環、または、上記定義にもかかわらず、独立して出現する2つの R^+ が、それらの介在する原子と一緒に、独立して、窒素、酸素、もしくは硫黄から選択される0～4個のヘテロ原子を有する非置換3～12員飽和、部分的に不飽和、もしくはアリール単環式もしくは二環式環を形成する）が挙げられる。

【0037】

R^+ の脂肪族基上の適切な置換基は、独立して、ハロゲン、 $-R^{\bullet}$ 、 $-(ハロR^{\bullet})$ 、 $-OH$ 、 $-OR^{\bullet}$ 、 $-O(ハロR^{\bullet})$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)OR^{\bullet}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^{\bullet}$ 、 $-NR^{\bullet}_2$ 、または $-NO_2$ （式中、各 $R^{\bullet}$ は、非置換または、「ハロ」が前に付く場合、1つ以上のハロゲンにのみ置換され、および、独立して、 $C_{1\sim 4}$ 脂肪族、 $-CH_2Ph$ 、 $-O(CH_2)_{0\sim 1}Ph$ 、または5～6員飽和、部分的に不飽和、または窒素、酸素、もしくは硫黄から独立して選択される0～4個のヘテロ原子を有するアリール環である）である。

【0038】

経口：本明細書中で使用されるとき、「経口投与」および「経口的に投与した」という言い回しは、化合物または組成物の、口による投与を表し、その技術分野で理解される意味を有する。

【0039】

10

20

30

40

50

非経口：本明細書中で使用されるとき、「非経口投与」および「非経口的に投与した」という言い回しは、通常注射による、腸内および局所的投与でない投与方法を表す、その技術分野で理解される意味を有し、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、および胸骨内注射および注入が挙げられるが、これに限定されない。

【0040】

部分的に不飽和：本明細書中で使用されるとき、「部分的に不飽和」という語は、少なくとも1つの二重結合または三重結合を含む環部分を表す。「部分的に不飽和」という語は、不飽和の複数部を有する環を包含することを意図するが、本明細書で定義したアリアルまたはヘテロアリアル部分を含むことを意図しない。

10

【0041】

中で使用されるときで、「医薬組成物」という語は、1つ以上の薬剂的に許容可能な担体と一緒に処方した活性剤を表す。いくつかの実施形態では、活性剤は、適切な集団に投与した時に、所定の治療効果を達成する統計的有意な確率を示す治療レジメンでの投与に適切な単位投与量中に存在する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、固体または液体の形態で投与するために特に処方され得、次の用途のもの：経口投与、例えば、水薬（水性もしくは非水性溶液または懸濁液）、錠剤、例えば、口腔、舌下、および全身吸収用途のもの、巨丸剤、散剤、顆粒剤、舌に適用するペースト剤；例えば、滅菌溶液もしくは懸濁液、または徐放処方物として、例えば、皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射による非経口投与；例えば、皮膚、肺、もしくは口腔に適用するクリーム剤、軟膏剤、または徐放性パッチ剤もしくはスプレー剤として局所投与；例えば、ベッサリー、クリーム剤、もしくは泡末剤として腔腔内または直腸内に；舌下に；眼に；経皮的に；または経鼻的に、肺、および他の粘膜面が挙げられる。

20

【0042】

薬剂的に許容可能：本明細書中で使用されるとき、「薬剂的に許容可能」という言い回しは、健全な医学的判断内で、合理的な利益／リスク比に見合っており、過剰な有害性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症なしで、ヒトおよび動物の組織と接触して使用するのに適切な、化合物、物質、組成物、および／または剤形を表す。

【0043】

薬剂的に許容可能な担体：本明細書中で使用されるとき、「薬剂的に許容可能な担体」という語は、1つの器官、または身体の部分から、別の器官、または身体の部分に運搬または輸送にかかわる液体もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、または溶媒封入材料などの薬剂的に許容可能な材料、組成物または媒体を意味する。各担体は、処方物の他成分と適合性があり、患者に有害でないという意味で、「許容可能」でなければならない。薬剂的に許容可能な担体として役立ち得る材料のいくつかの例としては：ラクトース、グルコースおよびショ糖などの糖類；コーンスターチおよびジャガイモデンプンなどのデンプン類；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなどのセルロースおよびその誘導体；トラガント；麦芽；ゼラチン；タルク；カカオ脂および坐薬蠟などの賦形剤；ピーナッツ油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油などの油類；プロピレングリコールなどのグリコール類；グリセリンなどのポリオール類、ソルビトール、マニトールおよびポリエチレングリコール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル類；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；発熱物質フリー水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；pH緩衝溶液；ポリエステル類、ポリカーボネート類および／またはポリ酸無水物；および製剤処方物で使用される他の無害性適合物質が挙げられる。

30

40

【0044】

薬剂的に許容可能な塩：本明細書中で使用されるとき、「薬剂的に許容可能な塩」という語は、薬剂的文脈中での使用に適切なかかる化合物の塩、すなわち、健全な医学的判断内で、合理的な利益／リスク比に見合っており、過度の有害性、刺激、アレルギー応答な

50

どがなく、ヒトおよび下等動物の組織と接触して使用するのに適切な塩を表す。薬剂的に許容可能な塩は、当技術分野で周知である。例えば、S. M. Bergeらは、J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977)で、詳細に、薬剂的に許容可能な塩を記載している。いくつかの実施形態では、薬剂的に許容可能な塩としては、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩 (camphorate)、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサナ酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシーエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリル酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などが挙げられるが、これに限定されない。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩類は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む。いくつかの実施形態では、薬剂的に許容可能な塩としては、適切な場合、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、1～6個の炭素原子を有するアルキルスルホン酸塩およびアリールスルホン酸塩などの対イオンを用いて生成した無害性のアンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンカチオンが挙げられる。

10

20

【0045】

プロドラッグ：一般的、「プロドラッグ」は、本明細書で使用される語として、当技術分野で理解されるように、生物に投与した時、身体中で代謝されて、興味ある活性（例えば、治療または診断）剤を送達する実体である。典型的に、かかる代謝は、活性剤が生成されるように、少なくとも1つの「プロドラッグ部分」の除去を引き起こす。「プロドラッグ」の様々な形態が、当技術分野で周知である。かかるプロドラッグ部分の例としては：

- a) Design of Prodrugs, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) and Methods in Enzymology, 42:309-396, edited by K. Widder, et al. (Academic Press, 1985);
- b) Prodrugs and Targeted Delivery, edited by J. Rautio (Wiley, 2011);
- c) Prodrugs and Targeted Delivery, edited by J. Rautio (Wiley, 2011);
- d) A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krogsgaard-Larsen;
- e) Bundgaard, Chapter 5 “Design and Application of Prodrugs”, by H. Bundgaard, p. 113-191 (1991);
- f) Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8:1-38 (1992);
- g) Bundgaard, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77:285 (1988); および
- h) Kakeya, et al., Chem. Pharm. Bull., 32:692 (1984)

30

40

参照。

【0046】

本明細書に記載の他の化合物のように、プロドラッグは、様々な形態、例えば、結晶形、塩形態、他などのいずれでも、提供され得る。いくつかの実施形態では、プロドラッグは、その薬剂的に許容可能な塩として提供される。

【0047】

保護基：本明細書中で使用されるとき、「保護基」という語は、当技術分野で周知であり、Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999（この全文をおは、参照することにより、本明細書中に組み入れられたものとする）中、詳細に記載されたものを含む。Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, edited by Serge L. Beaucage et al. 06/2012（第2章の全

50

文は、参照することにより、本明細書中に組み入れられたものとする）中に記載のヌクレオチドおよびヌクレオチド化学に特に適応される保護基も含まれる。適切なアミノ保護基としては、メチルカルバメート、エチルカルバメート、9-フルオレニルメチルカルバメート (Fmoc)、9-(2-スルホ)フルオレニルメチルカルバメート、9-(2, 7-ジブromo)フルオレニルメチルカルバメート、2, 7-ジ-*t*-ブチル-[9-(10, 10-ジオキソ-10, 10, 10, 10-テトラヒドロチオキサンチル)]メチルカルバメート (DBD-Tmoc)、4-メトキシフェナンシルカルバメート (Phenoc)、2, 2, 2-トリクロロエチルカルバメート (Troc)、2-トリメチルシリルエチルカルバメート (Teoc)、2-フェニルエチルカルバメート (hZ)、1-(1-アダマンチル)-1-メチルエチルカルバメート (Adpoc)、1, 1-ジメチル-2-ハロエチルカルバメート、1, 1-ジメチル-2, 2-ジブromoエチルカルバメート (DB-t-BOC)、1, 1-ジメチル-2, 2, 2-トリクロロエチルカルバメート (TCBOC)、1-メチル-1-(4-ビフェニル)エチルカルバメート (Bpoc)、1-(3, 5-ジ-*t*-ブチルフェニル)-1-メチルエチルカルバメート (t-Bumeoc)、2-(2'-および4'-ピリジル)エチルカルバメート (Pyoc)、2-(N, N-ジシクロヘキシルカルボキサミド)エチルカルバメート、*t*-ブチルカルバメート (BOC)、1-アダマンチルカルバメート (Adoc)、ビニルカルバメート (Voc)、アリルカルバメート (Alloc)、1-イソプロピルアリルカルバメート (Ipaoc)、シンナミルカルバメート (Coc)、4-ニトロシンナミルカルバメート (Noc)、8-キノリルカルバメート、N-ヒドロキシピペリジニルカルバメート、アルキルジチオカルバメート、ベンジルカルバメート (Cbz)、*p*-メトキシベンジルカルバメート (Moz)、*p*-ニトロベンジルカルバメート、*p*-ブromoベンジルカルバメート、*p*-クロロベンジルカルバメート、2, 4-ジクロロベンジルカルバメート、4-メチルスルフィニルベンジルカルバメート (MsZ)、9-アントリルメチルカルバメート、ジフェニルメチルカルバメート、2-メチルチオエチルカルバメート、2-メチルスルホニルエチルカルバメート、2-(*p*-トルエンスルホニル)エチルカルバメート、[2-(1, 3-ジチアニル)]メチルカルバメート (Dmoc)、4-メチルチオフエニルカルバメート (Mtpc)、2, 4-ジメチルチオフエニルカルバメート (Bmpc)、2-ホスホニオエチルカルバメート (Peoc)、2-トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバメート (Ppoc)、1, 1-ジメチル-2-シアノエチルカルバメート、*m*-クロロ-*p*-アクリロキシベンジルカルバメート、*p*-(ジヒドロキシボリル)ベンジルカルバメート、5-ベンズイソオキサゾリルメチルカルバメート、2-(トリフルオロメチル)-6-クロモニルメチルカルバメート (Tcroc)、*m*-ニトロフェニルカルバメート、3, 5-ジメトキシベンジルカルバメート、*o*-ニトロベンジルカルバメート、3, 4-ジメトキシ-6-ニトロベンジルカルバメート、フェニル(*o*-ニトロフェニル)メチルカルバメート、フェノチアジニル-(10)-カルボニル誘導体、N'-*p*-トルエンスルホニルアミノカルボニル誘導体、N'-フェニルアミノチオカルボニル誘導体、*t*-アミルカルバメート、*S*-ベンジルチオカルバメート、*p*-シアノベンジルカルバメート、シクロブチルカルバメート、シクロヘキシルカルバメート、シクロペンチルカルバメート、シクロプロピルメチルカルバメート、*p*-デシルオキシベンジルカルバメート、2, 2-ジメトキシカルボニルビニルカルバメート、*o*-(N, N-ジメチルカルボキサミド)ベンジルカルバメート、1, 1-ジメチル-3-(N, N-ジメチルカルボキサミド)プロピルカルバメート、1, 1-ジメチルプロピニルカルバメート、ジ(2-ピリジル)メチルカルバメート、2-フラニルメチルカルバメート、2-ヨードエチルカルバメート、イソボルニルカルバメート、イソブチルカルバメート、イソニコチニルカルバメート、*p*-(*p*'-メトキシフェニルアゾ)ベンジルカルバメート、1-メチルシクロブチルカルバメート、1-メチルシクロヘキシルカルバメート、1-メチル-1-シクロプロピルメチルカルバメート、1-メチル-1-(3, 5-ジメトキシフェニル)エチルカルバメート、1-メチル-1-(*p*-フェニルアゾフェニル)エチルカルバメート、1-メチル-1-フェニルエチルカルバメート、1-メチル-1-(4-ピリジル)エ

10

20

30

40

50

チルカルバメート、フェニルカルバメート、p-（フェニルアゾ）ベンジルカルバメート、2, 4, 6-トリート-ブチルフェニルカルバメート、4-（トリメチルアンモニウム）ベンジルカルバメート、2, 4, 6-トリメチルベンジルカルバメート、ホルムアミド、アセトアミド、クロロアセトアミド、トリクロロアセトアミド、トリフルオロアセトアミド、フェニルアセトアミド、3-フェニルプロパンアミド、ピコリンアミド、3-ピリジルカルボキサミド、N-ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、ベンズアミド、p-フェニルベンズアミド、o-ニトロフェニルアセトアミド、o-ニトロフェノキシアセトアミド、アセトアセトアミド、（N'-ジチオベンジルオキシカルボニルアミノ）アセトアミド、3-（p-ヒドロキシフェニル）プロパンアミド、3-（o-ニトロフェニル）プロパンアミド、2-メチル-2-（o-ニトロフェノキシ）プロパンアミド、2-メチル-2-（o-フェニルアゾフェノキシ）プロパンアミド、4-クロロブタンアミド、3-メチル-3-ニトロブタンアミド、o-ニトロシンナミド、N-アセチルメチオニン誘導体、o-ニトロベンズアミド、o-（ベンゾイルオキシメチル）ベンズアミド、4, 5-ジフェニル-3-オキサゾリン-2-オン、N-フタルイミド、N-ジチアコハク酸イミド（Dts）、N-2, 3-ジフェニルマレイミド、N-2, 5-ジメチルピロール、N-1, 1, 4, 4-テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物（STABASE）、5-置換1, 3-ジメチル-1, 3, 5-トリアザシクロヘキサ-2-オン、5-置換1, 3-ジベンジル-1, 3, 5-トリアザシクロヘキサ-2-オン、1-置換3, 5-ジニトロ-4-ピリドン、N-メチルアミン、N-アリルアミン、N-[2-（トリメチルシリル）エトキシ]メチルアミン（SEM）、N-3-アセトキシプロピルアミン、N-（1-イソプロピル-4-ニトロ-2-オキソ-3-ピロリン-3-イル）アミン、第四級アンモニウム塩類、N-ベンジルアミン、N-ジ（4-メトキシフェニル）メチルアミン、N-5-ジベンゾスベリルアミン、N-トリフェニルメチルアミン（Tr）、N-[（4-メトキシフェニル）ジフェニルメチル]アミン（MMTr）、N-9-フェニルフルオレニルアミン（PhF）、N-2, 7-ジクロロ-9-フルオレニルメチレンアミン、N-フェロセニルメチルアミノ（Fcm）、N-2-ピコリルアミノN'-オキシド、N-1, 1-ジメチルチオメチレンアミン、N-ベンジリデンアミン、N-p-メトキシベンジリデンアミン、N-ジフェニルメチレンアミン、N-[（2-ピリジル）メチル]メチレンアミン、N-（N', N'-ジメチルアミノメチレン）アミン、N, N'-イソプロピリデンアミン、N-p-ニトロベンジリデンアミン、N-サリシリデンアミン、N-5-クロロサリシリデンアミン、N-（5-クロロ-2-ヒドロキシフェニル）フェニルメチレンアミン、N-シクロヘキシリデンアミン、N-（5, 5-ジメチル-3-オキソ-1-シクロヘキセニル）アミン、N-ボラン誘導体、N-ジフェニルボリン酸誘導体、N-[フェニル（ペンタカルボニルクロム-またはタングステン）カルボニル]アミン、N-銅キレート、N-亜鉛キレート、N-ニトロアミン、N-ニトロソアミン、アミンN-オキシド、ジフェニルホスフィンアミド（Dpp）、ジメチルチオホスフィンアミド（Mpt）、ジフェニルチオホスフィンアミド（Ppt）、ジアルキルホスホロアミダート類、ジベンジルホスホロアミダート、ジフェニルホスホロアミダート、ベンゼンスルフェナミド、o-ニトロベンゼンスルフェナミド（Nps）、2, 4-ジニトロベンゼンスルフェナミド、ペンタクロロベンゼンスルフェナミド、2-ニトロ-4-メトキシベンゼンスルフェナミド、トリフェニルメチルスルフェナミド、3-ニトロピリジンスルフェナミド（Npys）、p-トルエンスルホンアミド（Ts）、ベンゼンスルホンアミド、2, 3, 6, -トリメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド（Mtr）、2, 4, 6-トリメトキシベンゼンスルホンアミド（Mtb）、2, 6-ジメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド（Pme）、2, 3, 5, 6-テトラメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド（Mte）、4-メトキシベンゼンスルホンアミド（Mbs）、2, 4, 6-トリメチルベンゼンスルホンアミド（Mts）、2, 6-ジメトキシ-4-メチルベンゼンスルホンアミド（iMds）、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホンアミド（Pmc）、メタンスルホンアミド（Ms）、β-トリメチルシリルエタンスルホンアミド（SES）、9-アントラセンスルホンアミド、4-（4'

10

20

30

40

50

、8'-ジメトキシナフチルメチル)ベンゼンスルホンアミド(DNMB S)、ベンジル
スルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミド、およびフェナシルスルホンアミド
が挙げられる。

【0048】

適切に保護されたカルボン酸としては、シリル-、アルキル-、アルケニル-、アリー
ル-、およびアリールアルキル-保護カルボン酸が挙げられるが、これに限定されない。
適切なシリル基の例としては、トリメチルシリル、トリエチルシリル、*t*-ブチルジメチ
ルシリル、*t*-ブチルジフェニルシリル、トリイソプロピルシリルなどが挙げられる。適
切なアルキル基の例としてはメチル、ベンジル、*p*-メトキシベンジル、3, 4-ジメト
キシベンジル、トリチル、*t*-ブチル、テトラヒドロピラン-2-イルが挙げられる。適
切なアルケニル基の例としては、アリルが挙げられる。適切なアリール基の例としては、
置換されていてもよいフェニル、ビフェニル、またはナフチルが挙げられる。適切なアリ
ールアルキル基の例としては、置換されていてもよいベンジル(例えば、*p*-メトキシベ
ンジル(MPM)、3, 4-ジメトキシベンジル、*O*-ニトロベンジル、*p*-ニトロベン
ジル、*p*-ハロベンジル、2, 6-ジクロロベンジル、*p*-シアノベンジル)、および2
-および4-ピコリルが挙げられる。

【0049】

適切なヒドロキシル保護基としては、メチル、メトキシメチル(MOM)、メチルチオ
メチル(MTM)、*t*-ブチルチオメチル、(フェニルジメチシリル)メトキシメチル(
SMOM)、ベンジルオキシメチル(BOM)、*p*-メトキシベンジルオキシメチル(P
MBM)、(4-メトキシフェノキシ)メチル(*p*-AOM)、グアヤコールメチル(G
UM)、*t*-ブトキシメチル、4-ペンテニルオキシメチル(POM)、シロキシメチル
、2-メトキシエトキシメチル(MEM)、2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル、ビス
(2-クロロエトキシ)メチル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル(SEMO
R)、テトラヒドロピラニル(THP)、3-ブromotetraヒドロピラニル、テトラヒド
ロチオピラニル、1-メトキシシクロヘキシル、4-メトキシテトラヒドロピラニル(M
THP)、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラ
ニルS、S-ジオキシド、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル]-4-メトキシ
ピペラジン-4-イル(CTMP)、1, 4-ジオキサ-2-イル、テトラヒドロフラ
ニル、テトラヒドロチオフラニル、2, 3, 3a, 4, 5, 6, 7, 7a-オクタヒドロ
-7, 8, 8-トリメチル-4, 7-メタノベンゾフラン-2-イル、1-エトキシエチ
ル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、1-メチル-1-メトキシエチル、1-メチル
-1-ベンジルオキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチル、
2, 2, 2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、2-(フェニルセレニル)
)エチル、*t*-ブチル、アリル、*p*-クロロフェニル、*p*-メトキシフェニル、2, 4-
ジニトロフェニル、ベンジル、*p*-メトキシベンジル、3, 4-ジメトキシベンジル、*o*-
ニトロベンジル、*p*-ニトロベンジル、*p*-ハロベンジル、2, 6-ジクロロベンジル
、*p*-シアノベンジル、*p*-フェニルベンジル、2-ピコリル、4-ピコリル、3-メチ
ル-2-ピコリルN-オキシド、ジフェニルメチル、*p*, *p*'-ジニトロベンズヒドリル
、5-ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、 α -ナフチルジフェニルメチル、*p*-メ
トキシフェニルジフェニルメチル、ジ(*p*-メトキシフェニル)フェニルメチル、トリ(
p-メトキシフェニル)メチル、4-(4'-ブromofenasilオキシフェニル)ジフェ
ニルメチル、4, 4', 4''-トリス(4, 5-ジクロロフタルイミドフェニル)メチ
ル、4, 4', 4''-トリス(レブリノイルオキシフェニル)メチル、4, 4', 4''
-トリス(ベンゾイルオキシフェニル)メチル、3-(イミダゾール-1-イル)ビス
(4', 4''-ジメトキシフェニル)メチル、1, 1-ビス(4-メトキシフェニル)
-1'-ピレニルメチル、9-アントリル、9-(9-フェニル)キサントニル、9-(
9-フェニル-10-オキソ)アントリル、1, 3-ベンゾジチオラン-2-イル、ベン
ズイソチアゾリルS、S-ジオキシド、トリメチルシリル(TMS)、トリエチルシリル
(TES)、トリイソプロピルシリル(TIPS)、ジメチルイソプロピルシリル(IP

10

20

30

40

50

DMS)、ジエチルイソプロピルシリル(DEIPS)、ジメチルテキシルシリル、*t*-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、*t*-ブチルジフェニルシリル(TBDPS)、トリベンジルシリル、トリ-*p*-キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル(DPMS)、*t*-ブチルメトキシフェニルシリル(TBMPS)、ギ酸エステル、ベンゾイルギ酸エステル、酢酸エステル、クロロ酢酸エステル、ジクロロ酢酸エステル、トリクロロ酢酸エステル、トリフルオロ酢酸エステル、メトキシ酢酸エステル、トリフェニルメトキシ酢酸エステル、フェノキシ酢酸エステル、*p*-クロロフェノキシ酢酸エステル、3-フェニルプロピオン酸エステル、4-オキソペンタン酸エステル(レプリン酸エステル)、4, 4-(エチレンジチオ)ペンタン酸エステル(レプリノイルジチオアセタール)、ピバル酸エステル、アダマンテート、クロトン酸エステル、4-メトキシクロトン酸エステル、安息香酸エステル、*p*-フェニル安息香酸エステル、2, 4, 6-トリメチル安息香酸エステル(メシトエート(mesitoate))、炭酸アルキルメチル、炭酸9-フルオレニルメチル(Fmoc)、炭酸アルキルエチル、炭酸アルキル2, 2, 2-トリクロロエチル(Troc)、炭酸2-(トリメチルシリル)エチル(TMSEC)、炭酸2-(フェニルスルホニル)エチル(Psec)、炭酸2-(トリフェニルホスホニオ)エチル(Peoc)、炭酸アルキルイソブチル、炭酸アルキルビニル、炭酸アルキルアリル、炭酸アルキル*p*-ニトロフェニル、炭酸アルキルベンジル、炭酸アルキル*p*-メトキシベンジル、炭酸アルキル3, 4-ジメトキシベンジル、炭酸アルキル*o*-ニトロベンジル、炭酸アルキル*p*-ニトロベンジル、チオ炭酸アルキル*S*-ベンジル、炭酸4-エトキシ-1-ナフチル、ジチオ炭酸メチル、2-ヨード安息香酸エステル、4-アジド酪酸エステル、4-ニトロ-4-メチルペンタン酸エステル、*o*-(ジブロモメチル)安息香酸エステル、2-ホルミルベンゼンスルホン酸エステル、2-(メチルチオメトキシ)エチル、4-(メチルチオメトキシ)酪酸エステル、2-(メチルチオメトキシメチル)安息香酸エステル、2, 6-ジクロロ-4-メチルフェノキシ酢酸エステル、2, 6-ジクロロ-4-(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェノキシ酢酸エステル、2, 4-ビス(1, 1-ジメチルプロピル)フェノキシ酢酸エステル、クロロジフェニル酢酸エステル、イソ酪酸エステル、モノコハク酸エステル、(E)-2-メチル-2-ブテン酸エステル、*o*-(メトキシカルボニル)安息香酸エステル、 α -ナフトエ酸、硝酸エステル、アルキルN, N, N', N'-テトラメチルホスホロジアミダート、アルキルN-フェニルカルバメート、ハウ酸エステル、ジメチルホスフィノチオニル、アルキル2, 4-ジニトロフェニルスルフェネート、硫酸エステル、メタンスルホン酸エステル(メシル酸エステル)、ベンジルスルホン酸エステル、およびトシレート(Ts)が挙げられる。1, 2-または1, 3-ジオール類を保護するためには、該保護基としては、メチレンアセタール、エチリデンアセタール、1-*t*-ブチルエチリデンケタール、1-フェニルエチリデンケタール、(4-メトキシフェニル)エチリデンアセタール、2, 2, 2-トリクロロエチリデンアセタール、アセトニド、シクロペンチリデンケタール、シクロヘキシリデンケタール、シクロヘプチリデンケタール、ベンジリデンアセタール、*p*-メトキシベンジリデンアセタール、2, 4-ジメトキシベンジリデンケタール、3, 4-ジメトキシベンジリデンアセタール、2-ニトロベンジリデンアセタール、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、ジメトキシメチレンオルトエステル、1-メトキシエチリデンオルトエステル、1-エトキシエチリデンオルトエステル、1, 2-ジメトキシエチリデンオルトエステル、 α -メトキシベンジリデンオルトエステル、1-(N, N-ジメチルアミノ)エチリデン誘導体、 α -(N, N'-ジメチルアミノ)ベンジリデン誘導体、2-オキサシクロペンチリデンオルトエステル、ジ-*t*-ブチルシリレン基(DTBS)、1, 3-(1, 1, 3, 3-テトライソプロピルジシロキサニリデン)誘導体(TIPDS)、テトラ-*t*-ブトキシジシロキサン-1, 3-ジイリデン誘導体(TBDS)、環状炭酸エステル類、環状ボロン酸エステル類、ボロン酸エチル、およびボロン酸フェニルが挙げられる。

【0050】

いくつかの実施形態では、ヒドロキシル保護基は、アセチル、*t*-ブチル、*t*-ブトキ

10

20

30

40

50

シメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、2-トリメチルシリルエチル、p-クロロフェニル、2, 4-ジニトロフェニル、ベンジル、ベンゾイル、p-フェニルベンゾイル、2, 6-ジクロロベンジル、ジフェニルメチル、p-ニトロベンジル、トリフェニルメチル(トリチル)、4, 4'-ジメトキシトリチル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリフェニルシリル、トリイソプロピルシリル、ベンゾイルギ酸エステル、クロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチル、ピバロイル、炭酸9-フルオレニルメチル、メシレート、トシレート、トリフレート、トリチル、モノメトキシトリチル(MMT r)、4, 4'-ジメトキシトリチル、(DMT r) および4, 4', 4''-トリメトキシトリチル(TMT r)、2-シアノエチル(CEまたはCne)、2-(トリメチルシリル)エチル(TSE)、2-(2-ニトロフェニル)エチル、2-(4-シアノフェニル)エチル2-(4-ニトロフェニル)エチル(NPE)、2-(4-ニトロフェニルスルホニル)エチル、3, 5-ジクロロフェニル、2, 4-ジメチルフェニル、2-ニトロフェニル、4-ニトロフェニル、2, 4, 6-トリメチルフェニル、2-(2-ニトロフェニル)エチル、ブチルチオカルボニル、4, 4', 4''-トリス(ベンゾイルオキシ)トリチル、ジフェニルカルバモイル、レブリニル、2-(ジブロモメチル)ベンゾイル(Dbmb)、2-(イソプロピルチオメトキシメチル)ベンゾイル(Ptmt)、9-フェニルキサンテン-9-イル(pixyl)または9-(p-メトキシフェニル)キサンチン-9-イル(MOX)である。いくつかの実施形態では、ヒドロキシル保護基の各々は、独立して、アセチル、ベンジル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリルおよび4, 4'-ジメトキシトリチルから選択される。いくつかの実施形態では、ヒドロキシル保護基は、トリチル、モノメトキシトリチルおよび4, 4'-ジメトキシトリチル基から成る群から選択される。

10

20

30

40

50

【0051】

いくつかの実施形態では、亜リン酸保護基は、オリゴヌクレオチド合成の至る所でのヌクレオチド間亜リン酸結合に結合した基である。いくつかの実施形態では、該亜リン酸保護基は、ヌクレオチド間ホスホロチオエート結合の硫黄原子に結合する。いくつかの実施形態では、該亜リン酸保護基は、ヌクレオチド間ホスホロチオエート結合の酸素原子に結合する。いくつかの実施形態では、該亜リン酸保護基は、ヌクレオチド間リン酸結合の酸素原子に結合する。いくつかの実施形態では、該亜リン酸保護基は、2-シアノエチル(CEまたはCne)、2-トリメチルシリルエチル、2-ニトロエチル、2-スルホニルエチル、メチル、ベンジル、o-ニトロベンジル、2-(p-ニトロフェニル)エチル(NPEまたはNpe)、2-フェニルエチル、3-(N-tert-ブチルカルボキサミド)-1-プロピル、4-オキソペンチル、4-メチルチオ-1-ブチル、2-シアノ-1, 1-ジメチルエチル、4-N-メチルアミノブチル、3-(2-ピリジル)-1-プロピル、2-[N-メチル-N-(2-ピリジル)]アミノエチル、2-(N-ホルミル, N-メチル)アミノエチル、4-[N-メチル-N-(2, 2, 2-トリフルオロアセチル)アミノ]ブチルである。

【0052】

タンパク質：本明細書中で使用されるとき、「タンパク質」という語は、ポリペプチド(すなわち、ペプチド結合によりもう1つと結合した少なくとも2つのアミノ酸の鎖)を表す。いくつかの実施形態では、タンパク質は、天然に存在するアミノ酸のみを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、1つ以上の天然に存在しないアミノ酸(例えば、隣接アミノ酸と1つ以上のペプチド結合を形成する部分)を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質鎖の1つ以上の残基は、非アミノ酸部分(例えば、グリカン、他)を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、例えば、1つ以上のジスルフィド結合により結合または他手段により会合した1つより多いポリペプチド鎖を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または両方を含む；いくつかの実施形態では、タンパク質は、当技術分野で周知の1つ以上のアミノ酸修飾物または類似体を含む。有用な修飾としては、例えば、末端アセチル化、アミド化、メチル化、他が挙げ

られる。「ペプチド」という語は、一般に、約100個未満のアミノ酸、約50個未満のアミノ酸、約20個未満のアミノ酸、または約10個未満のアミノ酸の長さを有するポリペプチドを表すために使用される。いくつかの実施形態では、タンパク質は抗体、抗体フラグメント、その生物学的活性部分、および／またはその特徴的部分である。

【0053】

試料：本明細書中で使用されるとき、「試料」という語は、本明細書に記載の、対象となる源から得られたまたは由来の生物試料を表す。いくつかの実施形態では、対象となる源は、動物またはヒトなどの生物を含む。いくつかの実施形態では、生物試料は、生物組織または生体液を含む。いくつかの実施形態では、生物試料は、骨髓；血液；血液細胞；腹水；組織または細針生検試料；細胞含有体液；浮遊核酸；痰；唾液；尿；脳脊髄液、腹水；胸水；糞便；リンパ液；婦人科液；皮膚スワブ；膺スワブ；口腔スワブ；鼻スワブ；導管洗浄液または気管支肺胞洗浄液などの洗液または洗浄液；吸引液；擦過；骨髓検体；組織生検検体；外科検体；糞便、他の体液、分泌液、および／またはそれからの細胞、他であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、生物試料は、個体から得られる細胞であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、試料は、いずれかの適切な手段により、対象となる源から直接得られる「一次試料」である。例えば、いくつかの実施形態では、一次生物試料は、生検（例えば、細針吸引または組織生検）、手術、体液（例えば、血液、リンパ液、糞便、他）の収集、他から成る群から選択される方法により得られる。いくつかの実施形態では、文脈から明白になるように、「試料」という語は、一次試料を処理により（例えば、その1つ以上の成分の除去および／またはそれに1つ以上の薬剤の添加により）得られる調製物を表す。例えば、半透膜を用いた濾過。かかる「処理試料」は、例えば、試料から抽出または一次試料を、mRNAの増幅もしくは逆転写、単離および／または特定成分の精製、他などの技術による処理により得られる核酸またはタンパク質を含み得る。

【0054】

立体化学異性体：本明細書中で使用されるとき、「立体化学異性体」という言い回しは、同じ一連の結合により結合された同じ原子で組み立てられているが、互換性でない異なる三次元構造を有する異なる化合物を表す。本発明のいくつかの実施形態では、提供される化学組成物は、化合物の個々の立体化学異性体の純粋な合成物であり得、またはそれを含み得る；いくつかの実施形態では、提供される化学組成物は、該化合物の2つ以上の立体化学異性体の混合物であり得、またはそれを含み得る。特定の実施形態では、かかる混合物は、同量の異なる立体化学異性体を含む；特定の実施形態では、かかる混合物は、異なる量の少なくとも2つの異なる立体化学異性体を含む。いくつかの実施形態では、化学組成物は、該化合物の全ジアステレオマーおよび／または鏡像異性体を含み得る。いくつかの実施形態では、化学組成物は、化合物の全部より少ないジアステレオマーおよび／または鏡像異性体を含み得る。いくつかの実施形態では、もし、本発明の化合物の特定の鏡像異性体が所望されるならば、例えば、不斉合成、またはキラル補助基を用いた誘導により合成され得、得られたジアステレオマー混合物は分離し、補助基を開裂して、純粋な所望の鏡像異性体を得る。あるいは、分子がアミノなどの塩基性官能基を含む場合、ジアステレオマー塩を、適切な光学活性酸を用いて生成し、例えば、分別再結晶により分割する。

【0055】

対象：本明細書中で使用されるとき、「対象」または「被験者」という語は、提供される化合物または組成物が、例えば、実験、診断、予防、および／または治療目的用途で、本発明に従って投与されるいずれもの生物を表す。典型的な対象としては、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、およびヒト；昆虫；蠕虫；他などの哺乳類）および植物が挙げられる。いくつかの実施形態では、対象は、疾病、障害、および／または症状を患っている、および／またはこれらにかかり易い。

【0056】

実質的：本明細書中で使用されるとき、「実質的」という語は、対象としている特徴ま

10

20

30

40

50

たは特性の全部またはほとんど全部の範囲もしくは程度を示す定性的状態を表す。生物学技術分野の当業者は、生物学および化学的現象が、めったに、完結および／または完了もしくは達成もしくは絶対的結果を回避しないことを理解するだろう。従って、「実質的」という語は、多くの生物学および／または化学的現象に本来備わる完全性の潜在的欠如を取り込むために、本明細書で使用される。

【0057】

患っている：疾病、障害、および／または症状を「患っている」個体は、疾病、障害、および／または症状の1つ以上の症候を診断された、および／または示している。

【0058】

（病気に）かかり易い：疾病、障害、および／または症状「にかかり易い」個体は、一般社会の成員よりも、該疾病、障害、および／または症状を発病するリスクが高いものである。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および／または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および／または症状と診断されない可能性がある。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および／または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および／または症状の症候を示し得る。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および／または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および／または症状の症候を示さない可能性がある。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および／または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および／または症状を発病するだろう。いくつかの実施形態では、疾病、障害、および／または症状にかかり易い個体は、該疾病、障害、および／または症状を発病しないだろう。

【0059】

全身的：本明細書中で使用されるとき、「全身的投与」、「全身的に投与された」、「末梢投与」、および「末梢的に投与された」という言い回しは、それが、レシピエントの全身に入るように化合物または組成物を投与することを表す、その技術分野で理解される意味を有する。

【0060】

互変異性体：本明細書中で使用されるとき、「互変異性体」という言い回しは、容易に転換可能な異なる異性体の有機化合物を言い表すために使用される。互変異性体は、一重結合および隣接する二重結合の転換と同時に起こる、水素原子またはプロトンのホルマー移動により特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、互変異性体は、プロトン互変異性（すなわち、プロトンの再配置）からもたらされ得る。いくつかの実施形態では、互変異性体は、原子価互変異性（すなわち、結合電子の急速な再配置）からもたらされ得る。かかる全互変異性体は、本発明の範囲内に含まれるものとする。いくつかの実施形態では、化合物の互変異性体は、別々の物質を合成する試みが、結果的に、混合物を生成するように、互いに可動な平衡中に存在する。いくつかの実施形態では、化合物の互変異性体は、分離可能および単離可能な化合物である。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、化合物の単一の互変異性体の純粋な合成物である、またはそれを含みものを提供され得る。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、化合物の2つ以上の互変異性体の混合物として提供され得る。特定の実施形態では、かかる混合物は、同量の異なる互変異性体を含む；特定の実施形態では、かかる混合物は、化合物の、異なる量の少なくとも2つの互変異性体を含む。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、化合物の全互変異性体を含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、化合物の全部より少ない互変異性体を含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、化学組成物は、相互転換の結果として時間とともに変化する量で、化合物の1つ以上の互変異性体を含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、該互変異性は、ケトエノール互変異性である。化学技術分野の当業者は、ケトエノール互変異性を、化学技術分野で周知のいずれかの適切な試薬を用いて、「捕捉」（すなわち、「エノール」体を保持するように化学的に修飾）し得、当技術分野で周知の1つ以上の適切な技術を用いて、引き続いて単離され得るエノール誘導体を得られる。特に指示がない限り、本発明は、純粋な形態または互いの混合物であろうとなかろうと、関連する化合物の全互変異性体を包含する。

【0061】

治療薬：本明細書中で使用されるとき、「治療薬」という語は、対象に投与されたとき、治療効果および／または所望の生物学的および／または薬理学的効果を誘発するいずれもの薬剤を表す。いくつかの実施形態では、治療薬は、疾病、障害、および／または症状の1つ以上の症候もしくは特徴を、軽減、寛解、解放、抑制、予防、発病遅延、重篤度軽減、および／または発生率低下させるために使用され得るいずれもの物質である。

【0062】

治療有効量：本明細書中で使用されるとき、「治療有効量」という語は、治療レジメンの一部として投与されるとき、所望の生物学的応答を誘発する物質（例えば、治療薬、組成物、および／または処方物）の量を意味する。いくつかの実施形態では、物質の治療有効量は、疾病、障害、および／または症状を患っている、またはかかり易い対象に投与するとき、該疾病、障害、および／または症状を治療、診断、予防、および／または発病遅延するために十分な量である。当業者により認識されるように、物質の有効量は、所望の生物学的エンドポイント、送達される物質、標的の細胞または組織、他などの要因に依存して変化し得る。例えば、疾病、障害、および／または症状を治療するための処方物中の化合物の有効量は、該疾病、障害、および／または症状の1つ以上の症候もしくは特徴を、軽減、寛解、解放、抑制、予防、発病遅延、重篤度軽減、および／または発生率低下させる量である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、単一の用量で投与される；いくつかの実施形態では、複数の単位用量が、治療有効量を送達するために必要である。

【0063】

治療：本明細書中で使用されるとき、「治療する」、「治療」または「治療すること」という語は、疾病、障害、および／または症状の1つ以上の症候もしくは特徴を、部分的にもしくは完全に、軽減、寛解、解放、抑制、予防、発病遅延、重篤度軽減、および／または発生率低下させるために使用されるいずれもの方法表す。治療は、疾病、障害、および／または症状の徴候を示さない対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、例えば、疾病、障害、および／または症状に関連する病理を発病するリスクを低下させる目的で、治療は、該疾病、障害、および／または症状の初期徴候のみ示す対象に投与され得る。

【0064】

不飽和：本明細書中で使用されるとき、「不飽和」という語は、部分が、1つ以上の不飽和単位を有することを意味する。

【0065】

単位用量：本明細書中で使用されるとき、「単位用量」という表現は、医薬組成物の単一用量として、および／または物理的に別々単位で投与される量を表す。多くの実施形態では、単位用量は、所定量の活性薬を含む。いくつかの実施形態では、単位用量は、全単一用量の該薬剤を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の単位用量は、全単一用量を達成するために投与される。いくつかの実施形態では、複数の単位用量の投与は、意図された効果を達成するために、必要または必要であると期待される。単位用量は、例えば、所定量の1つ以上の治療薬、所定量の固体形態、徐放性処方物または所定量の1つ以上の治療薬を含む薬剤送達装置、他を含むある体積の液体（例えば、許容可能な担体）であり得る。単位用量は、治療薬に加えて、いずれかの様々な成分を含む処方物中に存在し得ることは、認識されるだろう。例えば、許容可能な担体（例えば、薬剤的に許容可能な担体）、希釈剤、安定剤、緩衝剤、保存剤、他が、下記のように、含まれ得る。多くの実施形態では、特定治療薬の1日の適切な全投与量が、一部分、または複数の単位用量を含み得、例えば、健全な医学的判断の範囲内で主治医により決定され得ることは、当業者により理解されるだろう。いくつかの実施形態では、いずれかの特定対象もしくは生物のための具体的有効用量レベルは、治療される障害および該障害の重篤度；使用される具体的活性化合物の活性度；使用される具体的組成物；対象の年齢、体重、健康状態、性別および食事；投与回数、および使用される具体的化合物の排出率；治療持続期間；使用される具体的化合物と併用または同時使用される薬剤および／または追加療法、および医学分野で周知の同様な要因を含む様々な要因に依存し得る。

10

20

30

40

50

【0066】

野生型：本明細書中で使用されるとき、「野生型」という語は、「正常な」（突然変異の、病気の、変更された、他とは対照的に）状態または文脈中に、実際に見られる構造および／または活性を有する実体を表す、その技術分野で理解される意味を有する。当業者は、野生型遺伝子およびポリペプチドが、しばしば、複数の異なる形態（例えば、アレル）で存在することを認識するだろう。

【0067】

核酸：「核酸」という語は、いずれものヌクレオチド、その類似体、およびその重合体を含む。本明細書中で使用されるとき、「ポリヌクレオチド」という語は、いずれもの長さのヌクレオチド類の重合形態、リボヌクレオチド（RNA）あるいはデオキシリボヌクレオチド（DNA）を表す。これらの語は、該分子の一次構造を表し、従って、二本鎖および一本鎖DNA、および二本鎖および一本鎖RNAを含む。これらの語は、同等物として、限定されないが、メチル化、保護化および／またはキャップされたヌクレオチドまたはポリヌクレオチドなどのヌクレオチド類似体および修飾ポリヌクレオチドから合成されたRNAあるいはDNAいずれかの類似体を含む。該語は、ポリまたはオリゴリボヌクレオチド（RNA）およびポリまたはオリゴデオキシリボヌクレオチド（DNA）；核酸塩基および／または修飾核酸塩基のN-グリコシド類またはC-グリコシド類由来のRNAまたはDNA；糖類および／または修飾糖類由来の核酸類；およびリン酸架橋および／または修飾リン原子架橋（本明細書中、「ヌクレオチド間結合」とも呼ぶ）由来の核酸類を包含する。該語は、核酸塩基、修飾核酸塩基、糖類、修飾糖類、リン酸架橋または修飾リン原子架橋のいずれかの組み合わせを含む核酸を包含する。例としては、限定されないが、リボース部分を含む核酸、デオキシリボース部分を含む核酸、リボース部分とデオキシリボース部分の両方を含む核酸、リボース部分と修飾リボース部分を含む核酸が挙げられる。接頭語ポリは、2～約10,000ヌクレオチドモノマー単位を含む核酸を表し、接頭語オリゴは、2～約200ヌクレオチドモノマー単位を表す。

【0068】

ヌクレオチド：本明細書中で使用されるとき、「ヌクレオチド」という語は、複素環式塩基、糖、および1つ以上のリン酸基またはリン含有ヌクレオチド間結合から成るポリヌクレオチドのモノマー単位を表す。天然塩基（グアニン（G）、アデニン（A）、シトシン（C）、チミン（T）、およびウラシル（U））は、プリンまたはピリミジン誘導体であるが、天然および非天然塩基類似体も含まれると理解すべきである。天然糖は、ペントース（五炭糖）デオキシリボース（DNAを形成する）またはリボース（RNAを形成する）であるが、天然および非天然塩基類似体も含まれると理解すべきである。ヌクレオチドは、ヌクレオチド間結合を介して結合して、核酸、またはポリヌクレオチドを生成する。多くのヌクレオチド間結合は、当技術分野で周知である（限定されないが、リン酸、ホスホロチオエート、ボラノリン酸など）。人工核酸としては、PNA類（ペプチド核酸）、ホスホトリエステル類、ホスホロチオナート類、H-ホスホン酸エステル、アミド亜リン酸エステル類、ボラノリン酸エステル類、メチルホスホン酸エステル類、ホスホノ酢酸エステル類、チオホスホノ酢酸エステル類および本明細書に記載したものなど天然核酸のリン酸骨格の他の変異体が挙げられる。

【0069】

ヌクレオシド：「ヌクレオシド」という語は、核酸塩基または修飾核酸塩基が、糖または修飾糖に共有結合で結合している部分を表す。

【0070】

糖：「糖」という語は、閉形態および／または開形態の単糖を表す。糖類としては、リボース、デオキシリボース、ペントフラノース、ペントピラノース、およびヘキソピラノース部分を挙げられるが、これに限定されない。本明細書で、該語は、その重合体が核酸類似体、グリコール核酸（「GNA」）の骨格を形成するグリコールなどの通常の糖分子の代わりに使用される構造的類似体も包含する。

【0071】

修飾糖：「修飾糖」という語は、糖を置き換え得る部分を表す。該修飾糖は、空間配置、電子状態、または糖のいくつかの他物理化学的特性を模倣する。

【0072】

核酸塩基：「核酸塩基」という語は、配列特異的方法で、1つの核酸鎖をもう1つの相補鎖と結合させる水素結合に関連する核酸部分を表す。ほとんどの天然核酸塩基は、アデニン（A）、グアニン（G）、ウラシル（U）、シトシン（C）、およびチミン（T）である。いくつかの実施形態では、該天然核酸塩基は、修飾されたアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、またはチミンである。いくつかの実施形態では、該天然核酸塩基は、メチル化されたアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、またはチミンである。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、「修飾核酸塩基」、例えば、アデニン（A）、グアニン（G）、ウラシル（U）、シトシン（C）、およびチミン（T）以外の核酸塩基である。いくつかの実施形態では、該修飾核酸塩基は、メチル化されたアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、またはチミンである。いくつかの実施形態では、該修飾核酸塩基は、空間配置、電子状態、または核酸塩基のいくつかの他物理化学的特性を模倣し、配列特異的方法で、1つの核酸鎖をもう1つの相補鎖と結合させる水素結合の特性を保持する。いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、融解挙動、細胞間酵素による認識またはオリゴヌクレオチド二本鎖の活性に実質的に影響なしで、該5つの全天然塩基（ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、またはグアニン）と対合し得る。

10

【0073】

キラルリガンド：「キラルリガンド」または「キラル助剤」という語は、キラルであり、反応が特定の立体選択性を有して実行され得るように、反応物中に取り入れ得る部分を表す。

20

【0074】

縮合試薬：縮合反応で、「縮合試薬」という語は、反応性の低い部位を活性化し、別試薬との作用感受性をより高くする試薬を表す。いくつかの実施形態では、かかる別試薬は、求核剤である。

【0075】

ブロック基：「ブロック基」という語は、官能基の反応性を遮蔽する基を表す。該官能基は、続いて、該ブロック基の除去により遮蔽を取り除き得る。いくつかの実施形態では、ブロック基は、保護基である。

30

【0076】

部分：「部分」という語は、分子の特異的セグメントまたは官能基を表す。化学的部分は、分子中に組み込まれた、または追加された化学的実体と、しばしば認識される。

【0077】

固形担体：「固形担体」という語は、核酸の合成を可能にするいずれもの担体を表す。いくつかの実施形態では、該語は、核酸合成を実行し、反応性基を導入するために誘導化する反応ステップで使用される媒体中に不溶なガラスまたは重合体を表す。いくつかの実施形態では、該固形担体は、高度架橋ポリスチレン（HCP）またはコントロールドポアガラス（CPG）である。いくつかの実施形態では、該固形担体は、コントロールドポアガラス（CPG）である。いくつかの実施形態では、該固形担体は、コントロールドポアガラス（CPG）および高度架橋ポリスチレン（HCP）の複合担体である。

40

【0078】

結合部分：「結合部分」という語は、末端ヌクレオチドと該固形担体間または末端ヌクレオチドと別のヌクレオチド、ヌクレオチドまたは核酸間に位置してもよいいずれの部分を表す。

【0079】

DNA分子：「DNA分子」という語は、その一本鎖形態または二重らせんデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）の重合形態を表す。本用語は、該分子の一次および二次構造のみを表し、いずれの特定の三次形態にも限定しない。従って、本用語は、とりわけ、直鎖DNA分子（例えば、制限酵素フラグメント）、

50

ウィルス、プラスミド、および染色体中に見られる二本鎖DNAを含む。特定二本鎖DNA分子構造を論じる中で、配列は、非転写鎖のDNA（すなわち、mRNAと相同配列を有する鎖）に沿って5'から3'の方向の配列のみを与える通例に従って、本明細書中で記載され得る。

【0080】

コード配列：DNA「コード配列」または「コード領域」は、適切な発現制御配列の制御下に置かれたとき、生体内ポリペプチドに転写および翻訳される二本鎖DNAである。コード配列の境界（「オープンリーディングフレーム」または「ORF」）は、5'（アミノ）末端での開始コドンおよび3'（カルボン酸）末端での翻訳終止コドンにより決定される。コード配列としては、限定されないが、原核生物配列、原核生物のmRNAからのcDNA、原核生物（例えば、哺乳類）のDNAからのゲノムDNA配列、および合成DNA配列が挙げられる。ポリアデニル化シグナルおよび転写終止配列は、通常、該コード配列の3'側に位置する、「非コード配列」または「非コード領域」という語は、アミノ酸に翻訳されないポリヌクレオチド配列の領域（例えば、5'および3'非翻訳領域）を表す。

【0081】

リーディングフレーム：「リーディングフレーム」という語は、二本鎖DNA分子の各方向に3つの計6つの可能なリーディングフレームの内の1つを表す。使用される該リーディングフレームは、DNA分子のコード配列内のアミノ酸をコードするために、どのコドンを使用するかを決定する。

【0082】

アンチセンス：本明細書中で使用されるとき、「アンチセンス」核酸分子は、例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補の、mRNA配列に相補の、または遺伝子コード鎖に相補の「センス」核酸コードタンパク質に相補の核酸配列を含む。従って、アンチセンス核酸分子は、センス核酸分子と水素結合を介して会合し得る。

【0083】

ゆらぎ位置：本明細書中で使用されるとき、「ゆらぎ位置」は、コドンの3番目の位置を表す。いくつかの実施形態では、コドンのゆらぎ位置内のDNA分子中の突然変異は、アミノ酸レベルでサイレント変異または保存的変異をもたらす。例えば、グリシンをコードする4つのコドン、すなわち、GGU、GGC、GGAおよびGGGがあり、従って、いずれものゆらぎ位置のヌクレオチドの、A、U、CおよびGから選択される他のヌクレオチドへの変異は、コードされるタンパク質のアミノ酸レベルでの変化をもたらさず、従って、サイレント置換である。

【0084】

サイレント置換：「サイレント置換」または「サイレント変異」は、コドン内のヌクレオチドが変更されるが、該コドンによりコードされるアミノ酸残基の変化がもたらされないものである。例としては、AGGに変異したときでもまだ、Argをコードするコドン「CGG」などの特定のコドンの1番目の位置だけでなく、コドンの3番目の位置の突然変異が挙げられる。

【0085】

遺伝子：本明細書中で使用されるとき、「遺伝子」、「組み換え遺伝子」および「遺伝子構築物」という語は、タンパク質またはその部分をコードするDNA分子、またはDNA分子部分を表す。該DNA分子は、該タンパク質（エキソン配列として）をコードするオープンリーディングフレームを含み得、イントロン配列をさらに含み得る。本明細書で、「イントロン」という語は、タンパク質に翻訳されない所与の遺伝子中に存在、および全ての場合ではないが、いくつかの場合に、エキソン間で見られるDNA配列を表す。当技術分野で周知であるように、遺伝子が、1つ以上のプロモーター、エンハンサー、リプレッサーおよび／または該遺伝子の活性または発現を調節する他の制御配列と作動可能に結合する（または含み得る）ことは望まれ得る。

【0086】

相補DNA：本明細書中で使用されるとき、「相補DNA」または「cDNA」は、mRNAの逆転写により合成された組み換えポリヌクレオチドを含み、それから、介在配列（イントロン）が除去される。

【0087】

相同性：「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つの核酸分子間の配列類似性を表す。相同性および同一性は各々、比較目的で配置し得る各配列の位置の比較により決定され得る。該比較される配列の同位置が、同じ塩基により占有されるとき、その時、該分子は、その位置で同一である；同部位が、同じまたは類似の核酸残基（例えば、立体的および／または電子状態で類似）により占有されるとき、その時、該分子は、その位置で相同（類似）であると呼ばれ得る。相同性／類似性または同一性の百分率での表現は、比較される配列により共有される位置で、同一または類似の核酸の数の関数を表す。「無関係」または「非相同」な配列は、本明細書に記載の配列と、40%未満の同一性、35%未満の同一性、30%未満の同一性、または25%未満の同一性を共有する。2つの配列を比較するとき、残基（アミノ酸または核酸）の欠如または余分な残基の存在も、該同一性および相同性／類似性を低下させる。

【0088】

いくつかの実施形態では、「相同性」という語は、類似の機能またはモチーフと同一の遺伝子に使用される配列類似性の数学的に基づいた比較を記述する。本明細書に記載の核酸配列は、例えば、他のファミリー成員、関連する配列または相同体を特定するために、公開データベースに対して検索実行するための「問い合わせ配列」として使用され得る。いくつかの実施形態では、かかる検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を用いて実行され得る。いくつかの実施形態では、BLASTヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア＝100、ワード長＝12で実行され得る。いくつかの実施形態では、比較目的でギャップアライメントを得るため、ギャップBLASTを、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402中に記載のように利用され得る。BLASTおよびギャップBLASTプログラムを利用するとき、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびBLAST）のデフォルトパラメータを使用され得る（www.ncbi.nlm.nih.gov参照）。

【0089】

同一性：本明細書中で使用されるとき、「同一性」は、配列を、配列マッチングが最大限になるように、すなわち、ギャップおよび挿入を考慮して、アライメントするとき、2つ以上の配列中の対応する位置における同一のヌクレオチド残基の百分率を意味する。同一性は、既知の方法により、容易に算出され得、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)に記載のものが挙げられるが、これに限定されない。同一性を決定する方法は、被検配列間で最大に一致するように設計されている。さらに、同一性を決定する方法は、公的に入手可能なコンピュータープログラムでコードされている。2つの配列間の同一性を決定するコンピュータープログラム方法としては、GCGプログラムパッケージ（Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990) and Altschul et al. Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))が挙げられるが、これに限定されない。BLAST Xプログラムは、NCBIおよび他出所から公的に入手可能である（BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。

周知のスミスウォーターマンアルゴリズムも、同一性決定に使用できる。

【0090】

非相同的：DNA配列の「非相同」領域は、より大きな配列に関連して全く発見されないより大きなDNA配列内のDNAの同定可能なセグメントである。従って、非相同領域が哺乳類遺伝子をコードするとき、該遺伝子は、通常、源生物ゲノム中の哺乳類ゲノムDNAに隣接しないDNA側にあり得る。非相同性コード配列の別例は、該コード配列自体が、全く発見されない配列（例えば、ゲノムコード配列が無修飾遺伝子と異なるコドンまたはモチーフを有するイントロンまたは合成配列を含むcDNA）である。アレル変異または天然突然変異イベントは、本明細書に定義のDNAの非相同領域を生じさせない。

【0091】

塩基転位型突然変異：「塩基転位型突然変異」という語は、ピリミジン（シチジン（C）またはチミジン（T））が、別のピリミジンにより置換される、またはプリン（アデノシン（A）またはグアノシン（G））が、別のプリンにより置換される、DNA配列中の塩基の変化を表す。

【0092】

塩基転換型突然変異：「塩基転換型突然変異」という語は、ピリミジン（シチジン（C）またはチミジン（T））が、プリンにより置換される、またはプリン（アデノシン（A）またはグアノシン（G））が、ピリミジンにより置換される、DNA配列中の塩基の変化を表す。

【0093】

オリゴヌクレオチド：「オリゴヌクレオチド」という語は、核酸塩基、修飾核酸塩基、糖、修飾糖、リン酸架橋、または修飾リン原子架橋（本明細書中、本明細書にさらに定義の「ヌクレオチド間結合」とも呼ぶ）のいずれもの組み合わせを含むヌクレオチドモノマーの重合体またはオリゴマーを表す。

【0094】

オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であり得る。本明細書で、「オリゴヌクレオチド鎖」という語は、一本鎖オリゴヌクレオチドを包含する。一本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖領域を有し得、二本鎖オリゴヌクレオチドは、一本鎖領域を有し得る。実例となるオリゴヌクレオチドとしては、構造遺伝子、制御領域および終端領域を含む遺伝子、ウィルスまたはプラスミドDNA、一本鎖および二本鎖siRNAおよび他のRNA干渉剤（RNAi剤またはiRNA剤）などの自己複製系、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNA、マイクロRNA擬態、スーパーmir（supermir）、アプタマー、抗mir（antimir）、アンタゴmir（antagomir）、U1アダプター、三重鎖形成性オリゴヌクレオチド、グアニン四重鎖オリゴヌクレオチド、RNAアクチベーター、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、およびデコイオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】

RNA干渉の誘導に有効である二本鎖および一本鎖オリゴヌクレオチドは、本明細書中、siRNA、RNAi剤、またはiRNA剤とも呼ぶ。いくつかの実施形態では、これらのRNA干渉誘導オリゴヌクレオチドは、RNAi誘導サイレンシング複合体（RISC）として知られる細胞質多タンパク質複合体と関連する。多くの実施形態では、一本鎖および二本鎖RNAi剤は、それらが、RISC機構に入り、標的配列、例えば、標的mRNAのRISC介在の切断に関与し得るより小さいオリゴヌクレオチドを産生するために、内因性分子、例えば、ダイサーにより切断され得るほど十分に長い。

【0096】

本発明のオリゴヌクレオチドは、様々な長さであり得る。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、約2～約200ヌクレオチド長さの範囲であり得る。様々な関係する実施形態では、一本鎖、二本鎖、および三本鎖のオリゴヌクレオチドは、約4～約10ヌクレオチド、約10～約50ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約15～約30ヌクレオチド、約20～約30ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、該オリゴヌクレオチドは、約 9 ～ 約 39ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 4ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 5ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 6ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 7ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 8ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 9ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 10ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 11ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 12ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 15ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 20ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 25ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 30ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 18ヌクレオチド長さの二本鎖の相補鎖である。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 21ヌクレオチド長さの二本鎖の相補鎖である。

10

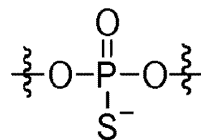
【0097】

ヌクレオチド間結合：本明細書中で使用されるとき、「ヌクレオチド間結合」という言い回しは、一般に、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位間のリン含有結合を表し、上記および本明細書中で、「糖間結合」および「リン原子架橋」と同義である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間結合は、天然 DNA および RNA 分子中に見られるホスホジエステル結合である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間結合は、該ホスホジエステル結合の各酸素原子が任意におよび独立して、有機部分または無機部分により置換される「修飾ヌクレオチド間結合」である。いくつかの実施形態では、かかる有機部分または無機部分は、 $=S$ 、 $=Se$ 、 $=NR'$ 、 $-SR'$ 、 $-SeR'$ 、 $-N(R')_2$ 、 $B(R')_3$ 、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、および $-N(R')-$ (式中、各 R' は、独立して、下記定義および記載の通りである) から選択されるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド間結合は、ホスホトリエステル結合、ホスホロチオエートジエステル結合

20

30

【化 1】



または修飾ホスホロチオエートトリエステル結合である。該ヌクレオチド間結合が、該結合の酸または塩基部分の存在により、所与の pH において、アニオンまたはカチオンとして存在し得ることを、当業者は理解している。

40

【0098】

特に指定しない限り、オリゴヌクレオチド配列を用いて使用されるとき、各 s 、 s_1 、 s_2 、 s_3 、 s_4 、 s_5 、 s_6 および s_7 は、独立して、下記表 1 に示される次の修飾ヌクレオチド間結合を表す。

【0099】

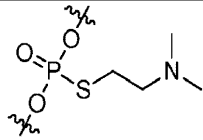
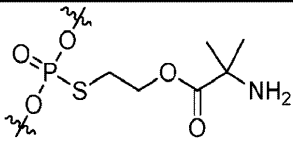
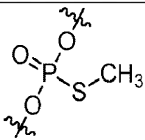
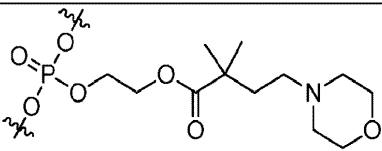
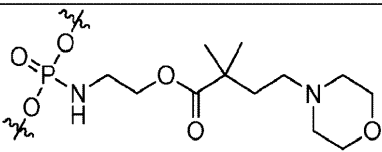
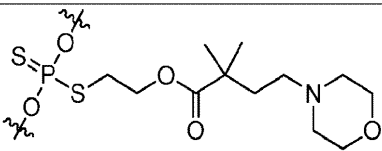
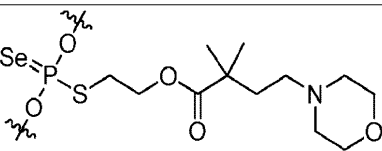
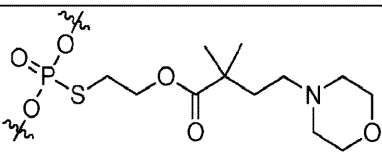
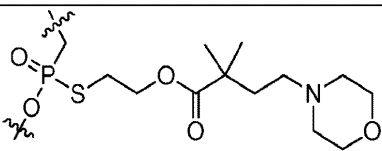
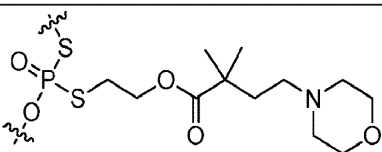
表 1. 実例となる修飾ヌクレオチド間結合

【表 1】

記号	置換ヌクレオチド間結合
s	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---O---P---O---} \\ \\ \text{S}^- \end{array}$ ホスホロチオエート ()
s1	
s2	
s3	
s4	

10

20

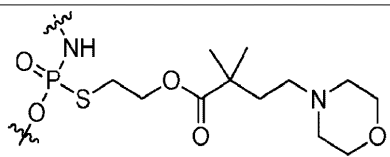
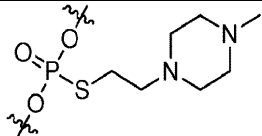
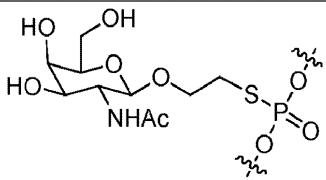
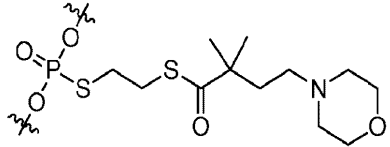
s5	
s6	
s7	
s8	
s9	
s10	
s11	
s12	
s13	
s14	

10

20

30

40

s15	
s16	
s17	
s18	

10

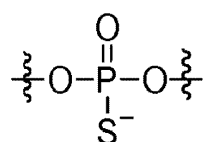
【0100】

20

例えば、(R_p, S_p) - A T s C s 1 G Aは、1) TとC間のホスホロチオエートヌクレオチド間結合

(

【化2】

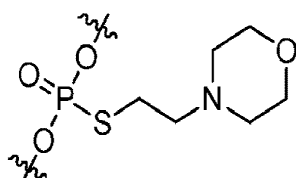


30

)

；および2) CとG間の

【化3】



40

の構造を有するホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を有する。特に指定しない限り、オリゴヌクレオチド配列に先行するR_p/S_pの表記は、該オリゴヌクレオチド配列の順次5'から3'の該ヌクレオチド間結合のキラル結合リン原子の立体配置を言い表す。例えば、(R_p, S_p) - A T s C s 1 G Aでは、TとC間の「s」結合のリンは、R_p立体配置を有し、CとG間の「s1」結合のリンは、S_p立体配置を有する。いくつかの実施形態では、「全(R_p)」または「全(S_p)」は、オリゴヌクレオチドの全キラル結合リン原子が、それぞれ、同じR_pまたはS_p立体配置を有することを示すために使用される。例えば、全(R_p) - G s C s C s T s C s A s G s T s C s T s G s C s T s T s C s G s C s A s C s Cは、該オリゴヌクレオチドの全ての該キラル結合リン原子が、R_p立体配置を有することを示す；全(S_p) - G s C s C s T s C s A s G s T s C s T s G s C s T s T s C s G s C s A s C s Cは、該オリゴヌクレオチドの全ての該キラル結合リン原子が、S_p立体配置を有することを示す。

50

【0101】

オリゴヌクレオチド型：本明細書中で使用されるとき、「オリゴヌクレオチド型」という言い回しは、特定の塩基配列、骨格結合パターン（すなわち、ヌクレオチド間結合型パターン、例えば、リン酸、ホスホロチオエート、他）、骨格キラル中心パターン（すなわち、結合リン立体化学パターン（R_p/S_p））、および骨格リン修飾パターン（例えば、式Iの「-XLR¹」基のパターン）を有するオリゴヌクレオチドを定義するために使用される。共通に表記された「型」のオリゴヌクレオチドは、互いに、構造的に同一である。

【0102】

当業者は、オリゴヌクレオチド鎖の各ヌクレオチド単位が、該結合リンにおける特定の立体化学および／または該結合リンにおける特定の修飾および／または特定の塩基および／または特定の糖を有するように、設計されおよび／または前以て選択され得るように、本発明の合成方法が、オリゴヌクレオチド鎖の合成中にある程度の制御を提供することを認識するだろう。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖は、該結合リンにおける特定の組み合わせの修飾を有するように、設計されおよび／または決定される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖は、特定の組み合わせの塩基を有するため、設計されおよび／または選択される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖は、特定の組み合わせの1つ以上の上記構造的な特徴を有するように、設計されおよび／または選択される。本発明は、複数のオリゴヌクレオチド分子を含むまたはから成る組成物（例えば、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物）を提供する。いくつかの実施形態では、かかる全分子は、同じ型である（すなわち、互いに構造的に同一である）。しかしながら、多くの実施形態では、提供される組成物は、通常、所定の相対量で、異なる型の複数のオリゴヌクレオチドを含む。

【0103】

キラル制御：本明細書中で使用されるとき、「キラル制御」は、オリゴヌクレオチド鎖内のキラル結合リン毎の立体化学表記を制御する能力を表す。「キラル制御されたオリゴヌクレオチド」という言い回しは、該キラル結合リンに関して単一のジアステレオ異性体で存在するオリゴヌクレオチドを表す。

【0104】

キラル制御オリゴヌクレオチド組成物：本明細書中で使用されるとき、「キラル制御オリゴヌクレオチド組成物」という言い回しは、所定のレベルの個々のオリゴヌクレオチド型を含むオリゴヌクレオチド組成物を表す。例えば、いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物は、1つのオリゴヌクレオチド型を含む。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチド型の混合物を含む。実例となるキラル制御オリゴヌクレオチド組成物が、本明細書中にさらに記載される。

【0105】

キラル純粋：本明細書で、「キラル純粋」という言い回しは、全オリゴヌクレオチドが、該結合リンに関して単一のジアステレオ異性体で存在するキラル制御オリゴヌクレオチド組成物を言い表すために使用される。

【0106】

キラル均一：本明細書中で使用されるとき、「キラル均一」という言い回しは、全ヌクレオチド単位が、該結合リンにおいて、同じ立体化学を有するオリゴヌクレオチド分子または型を言い表すために使用される。例えば、そのヌクレオチド単位が、全て、結合リンにおいて、R_p立体化学を有するオリゴヌクレオチドは、キラル均一である。同様に、そのヌクレオチド単位が、全て、結合リンにおいて、S_p立体化学を有するオリゴヌクレオチドは、キラル均一である。

【0107】

所定の：所定は、例えば、無作為に起こるまたは達成の反対語として、計画的に選択されることを意味する。当業者は、本明細書を読み、本発明が、提供される組成物の調剤お

10

20

30

40

50

よび／または封入のための特定のオリゴヌクレオチド型の選択を可能にし、提供される組成物が調剤されるように、任意に、選択された特定の相対量で、正確に、選択された特定の型の制御された調剤をさらに可能にする新規および驚くべき技術を提供することを理解するであろう。かかる提供される組成物は、本明細書に記載の「所定の」ものである。それらが、偶然、特定のオリゴヌクレオチド型の意図的な作成を制御できないプロセスを通して作成されたので、特定の個々のオリゴヌクレオチド型を含み得る組成物は、「所定の」組成物ではない。いくつかの実施形態では、所定の組成物は、（例えば、制御されたプロセスの反復を通して）意図的に複製され得るものである。

【0108】

結合リン：本明細書中で定義されるとき、「結合リン」という言い回しは、表される特定のリン原子が、ヌクレオチド間結合中に存在し、該リン原子が、天然DNAおよびRNA中に起こるヌクレオチド間結合のホスホジエステルのリン原子に対応することを示すために使用される。いくつかの実施形態では、結合リン原子は、修飾ヌクレオチド間結合中にあり、ホスホジエステル結合の各酸素原子が、有機または無機部分により、任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態では、結合リン原子は、式IのP*である。いくつかの実施形態では、結合リン原子は、キラルである。いくつかの実施形態では、キラル結合リン原子は、式IのP*である。

【0109】

P修飾：本明細書中で使用されるとき、「P修飾」という語は、立体化学的修飾以外の結合リンにおけるいずれもの修飾を表す。いくつかの実施形態では、P修飾は、結合リンに共有結合した懸垂部分の付加、置換、または除去を含む。いくつかの実施形態では、該「P修飾」は、 $-X-L-R^1$ （式中、X、Lおよび R^1 は、独立して、本明細書および下記に定義および記載の通りである）である。

【0110】

ブロックマー：本明細書中で使用されるとき、「ブロックマー」という語は、その各個別のヌクレオチド単位を特徴付ける構造的特徴のパターンが、該ヌクレオチド間リン結合において共通の構造的特徴を共有する少なくとも2つの連続したヌクレオチド単位の存在により特徴付けられるオリゴヌクレオチド鎖を表す。共通の構造的特徴は、該結合リンにおける共通立体化学または該結合リンにおける共通修飾を意味する。いくつかの実施形態では、該ヌクレオチド間リン結合における共通構造的特徴を共有する該少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、「ブロック」と呼ばれる。

【0111】

いくつかの実施形態では、ブロックマーは、「ステレオブロックマー」であり、例えば、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて、同じ立体化学を有する。かかる少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、「ステレオブロックマー」を形成する。例えば、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位、TsおよびCs1が、結合リン（両方のSp）において、同じ立体化学を有するので、 $(Rp, Sp)-ATsCs1GA$ は、ステレオブロックマーである。同じオリゴヌクレオチドでは、 $(Rp, Sp)-ATsCs1$ は、ブロックを形成し、それは、立体ブロックである。

【0112】

いくつかの実施形態では、ブロックマーは、「P修飾ブロックマー」であり、例えば、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて、同じ修飾を有する。かかる少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、「P修飾ブロック」を形成する。例えば、 $(Rp, Sp)-ATsCsGA$ は、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位、TsおよびCsが、同じP修飾（すなわち、両方がホスホロチオエートジエステルである）を有するので、P修飾ブロックマーである。 $(Rp, Sp)-ATsCsGA$ の同じオリゴヌクレオチドでは、TsCsは、ブロックを形成し、それは、P修飾ブロックである。

【0113】

いくつかの実施形態では、ブロックマーは、「結合ブロックマー」であり、例えば、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて、同じ立体化学および同じ修

10

20

30

40

50

飾を有する。少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位は、「結合ブロック」を形成する。例えば、少なくとも2つの連続ヌクレオチド単位、TsおよびCsが、同じ立体化学（両方のRp）およびP修飾（両方のホスホロチオエート）を有するので、(Rp, Rp) - ATsCsGAは、結合ブロックマーである。(Rp, Rp) - ATsCsGAの同じオリゴヌクレオチドでは、TsCsは、ブロックを形成し、結合ブロックである。

【0114】

いくつかの実施形態では、ブロックマーは、独立して、立体ブロック、P修飾ブロックおよび結合ブロックから選択される1つ以上のブロックを含む。いくつかの実施形態では、ブロックマーは、1つのブロックに対するステレオブロックマー、および／または別のブロックに対するP修飾ブロックマー、および／またはさらに別のブロックに対する結合ブロックマーである。例えば、(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp) - AAsTsCsGsAs1Ts1Cs1Gs1ATCGは、立体ブロックAsTsCsGsAs1（結合リンにおける全Rp）もしくはTs1Cs1Gs1（結合リンにおける全Sp）に関してステレオブロックマーであり、P修飾ブロックAsTsCsGs（全s結合）もしくはAs1Ts1Cs1Gs1（全s1結合）に関してP修飾ブロックマーであり、または結合ブロックAsTsCsGs（結合リンにおける全Rpおよび全s結合）もしくはTs1Cs1Gs1（結合リンにおける全Spおよび全s1結合）に関して結合ブロックマーである。

10

【0115】

アルトマー (altmer)：本明細書中で使用されるとき、「アルトマー」という語は、各個別のヌクレオチド単位を特徴付けるその構造的特徴パターンが、該ヌクレオチド間リン結合における特定の構造的特徴を共有する、オリゴヌクレオチド鎖中に連続する2つのヌクレオチド単位がないことで特徴付けられるオリゴヌクレオチド鎖を表す。いくつかの実施形態では、アルトマーは、それが、繰り返しパターンを含むように設計される。いくつかの実施形態では、アルトマーは、それが、繰り返しパターンを含まないように設計される。

20

【0116】

いくつかの実施形態では、アルトマーは、「ステレオアルトマー」であり、例えば、該結合リンにおいて同じ立体化学を有する連続する2つのヌクレオチド単位はない。例えば、(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp) - GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsCs。

30

【0117】

いくつかの実施形態では、アルトマーは、「P修飾アルトマー」であり、例えば、該結合リンにおいて同じ修飾を有する連続する2つのヌクレオチド単位はない。例えば、各結合リンが、他と異なるP修飾を有する、全(Sp)CA s1GsT。

【0118】

いくつかの実施形態では、アルトマーは、「結合アルトマー」であり、例えば、該結合リンにおいて同一の立体化学または同一の修飾を有する連続する2つのヌクレオチド単位はない。例えば、(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp) - GsCs1CsTs1CsAs1GsTs1CsTs1GsCs1TsTs2CsGs3CsAs4CsCs。

40

【0119】

ユニマー：本明細書中で使用されるとき、「ユニマー」という語は、各個別のヌクレオチド単位を特徴付けるその構造的特徴パターンは、鎖内の全ヌクレオチド単位が、該ヌクレオチド間リン結合における少なくとも1つの共通構造的特徴を共有するものであるオリゴヌクレオチド鎖を表す。共通構造的特徴は、該結合リンにおける共通立体化学または該結合リンにおける共通修飾を意味する。

【0120】

いくつかの実施形態では、ユニマーは、「ステレオユニマー」であり、例えば、全ヌク

50

レオチド単位は、該結合リンにおいて同じ立体化学を有する。例えば、該結合全てが S p リンを有する、全 (S p) - C s A s 1 G s T。

【0121】

いくつかの実施形態では、ユニマーは、「P修飾ユニマー」であり、例えば、全ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて同じ修飾を有する。例えば、該ヌクレオチド間結合全てがホスホロチオエートジエステルである、(R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p , S p R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p , S p , R p) - G s C s C s T s C s A s G s T s C s T s G s C s T s T s C s G s C s A s C s C。

【0122】

いくつかの実施形態では、ユニマーは、「結合ユニマー」であり、例えば、全ヌクレオチド単位は、該結合リンにおいて同じ立体化学および同じ修飾を有する。例えば、該ヌクレオチド間結合全てが、S p 結合リンを有するホスホロチオエートジエステルである、全 (S p) - G s C s C s T s C s A s G s T s C s T s G s C s T s T s C s G s C s A s C s C。

10

【0123】

ギャップマー：本明細書中で使用されるとき、「ギャップマー」という語は、オリゴヌクレオチド鎖の少なくとも1つのヌクレオチド間リン結合がリン酸ジエステル結合、例えば、天然DNAまたはRNA中に見られるものなどであることで特徴付けられるオリゴヌクレオチド鎖を表す。いくつかの実施形態では、該オリゴヌクレオチド鎖の1つ以上のヌクレオチド間リン結合は、天然DNAまたはRNA中に見られるものなどのリン酸ジエステル結合である。例えば、CとA間の該ヌクレオチド間結合がリン酸ジエステル結合である、全 (S p) - C A s 1 G s T。

20

【0124】

スキップマー：本明細書中で使用されるとき、「スキップマー」という語は、該オリゴヌクレオチド鎖の1つおきのヌクレオチド間リン結合が、リン酸ジエステル結合、例えば、天然DNAまたはRNA中に見られるものなどであり、該オリゴヌクレオチド鎖の1つおきのヌクレオチド間リン結合が、修飾されたヌクレオチド間結合である、ギャップマーの型を表す。例えば、全 (S p) - A s T C s 1 G A s 2 T C s 3 Gである。

【0125】

本発明の目的のため、化学元素は、C A S 編集、化学と物理のハンドブック、67版、1986-87年、内表紙の元素周期表に従って特定される。

30

【0126】

本発明の化合物および組成物に関する本明細書に記載の方法および構造は、薬剂的に許容可能な酸または塩基付加酸ならびにこれらの化合物および組成物の全立体異性体にも適用する。

【図面の簡単な説明】

【0127】

【図1】キラル制御オリゴヌクレオチドは、ステレオランダム (stereorandom) オリゴヌクレオチドと比較して、H P L Cで有意に異なる保持時間を有する。A：粗キラル制御オリゴヌクレオチド (オリゴヌクレオチド101)；C：対応するステレオランダムオリゴヌクレオチド (オリゴヌクレオチド118)。

40

【0128】

【図2】キラル制御オリゴヌクレオチドおよびステレオランダムオリゴヌクレオチドのH P L C。A：オリゴヌクレオチド101 (全 R p)；B：オリゴヌクレオチド102 (全 S p)；およびC：オリゴヌクレオチド118 (ステレオランダム)。

【0129】

【図3】キラル制御オリゴヌクレオチドおよびステレオランダムオリゴヌクレオチドの T m。

【0130】

【図4】代表的データ：標的および内在性コントロールペア産出単一単位複製配列の融解

50

【 0 1 3 1 】

【 0 1 3 2 】

【 0 1 3 3 】

10

【 0 1 3 4 】

20

【 0 1 3 5 】

20

【 0 1 3 6 】

30

【 0 1 3 7 】

30

【 0 1 3 8 】

40

【 0 1 3 9 】

40

【 0 1 4 0 】

50

【 0 1 4 1 】

【図 15】粗 (R p, R p, R p, S p, S p, S p, S p, S p, R p, R p, R p)

—d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] (3R-5S-3R、ステレオブロックマーおよびP修飾ユニマー (s1ユニマー)) のHPLC。

【0142】

【図16】精製 (Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp) —d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] (3R-5S-3R、ステレオブロックマーおよびP修飾ユニマー (s1ユニマー)) のHPLC。

【0143】

【図17】 (Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp) —d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] (3R-5S-3R、ステレオブロックマーおよびP修飾ユニマー (s1ユニマー)) のLCMS。

10

【0144】

【図18】粗全 (Rp) —d [Cs3As3Gs3T] (P修飾ユニマー (s3ユニマー)、ステレオユニマーおよび結合ユニマー) のHPLC。

【0145】

【図19】全 (Rp) —d [Cs3As3Gs3T] (P修飾ユニマー (s3ユニマー)、ステレオユニマーおよび結合ユニマー) のLCMS。

【0146】

【図20】粗全 (Rp) —d [Cs2As2Gs2T] (P修飾ユニマー (s2ユニマー)、ステレオユニマーおよび結合ユニマー) のHPLC。

20

【0147】

【図21】全 (Rp) —d [Cs2As2Gs2T] (P修飾ユニマー (s2ユニマー)、ステレオユニマーおよび結合ユニマー) のLCMS。

【0148】

【図22】粗全 (Sp) —d [Cs1AGs1T] (ギャップマー、ステレオアルトマー、P修飾アルトマーおよび結合アルトマー) のHPLC。

【0149】

【図23】全 (Sp) —d [Cs1AGs1T] (ギャップマー、ステレオアルトマー、P修飾アルトマーおよび結合アルトマー) のLCMS。

30

【0150】

【図24】粗全 (Rp) —d [TsCs1AsT] (ステレオユニマー、P修飾アルトマーおよび結合アルトマー)。

【0151】

【図25】全 (Rp) —d [TsCs1AsT] (ステレオユニマー、P修飾アルトマーおよび結合アルトマー) のLCMS。

【0152】

【図26】WO2012/030683に記載および本発明の方法を用いた合成で企図される、実例となるオリゴヌクレオチド。

40

【0153】

【図27】WO2012/030683に記載および本発明の方法を用いた合成で企図される、実例となるオリゴヌクレオチド。

【0154】

【図28】WO2012/030683に記載および本発明の方法を用いた合成で企図される、実例となるオリゴヌクレオチド。

【0155】

【図29】WO2012/030683に記載および本発明の方法を用いた合成で企図される、実例となるオリゴヌクレオチド。

【0156】

50

【図30】WO2012/030683に記載および本発明の方法を用いた合成で企図される、実例となるオリゴヌクレオチド。

【0157】

【図31】本発明の方法で使用するためのWO2012/030683に記載の実例となるリンカー。

【0158】

【図32】本発明の方法で使用するためのWO2012/030683に記載の実例となるリンカー。

【0159】

【図33】本発明の方法で使用するためのWO2012/030683に記載の実例となるリンカー。

10

【0160】

【図34】本発明の方法で使用するためのWO2012/030683に記載の実例となるリンカー。

【0161】

【図35】粗DMT処理オリゴヌクレオチド：ONT-75（パネルA）；ONT-80（パネルB）；ONT-77（パネルC）；ONT-81（パネルD）；ONT-87（パネルE）；ONT-88（パネルF）；ONT-89（パネルG）；ONT-82（パネルH）；ONT-84（パネルI）；ONT-85（パネルJ）；ONT-86（パネルK）の逆相HPLC。

20

【0162】

【図36】精製DMT処理なしオリゴヌクレオチド：ONT-75（パネルA）；ONT-80（パネルB）；ONT-77（パネルC）；ONT-81（パネルD）；ONT-87（パネルE）；ONT-88（パネルF）；ONT-89（パネルG）；ONT-82（パネルH）；ONT-84（パネルI）；ONT-85（パネルJ）；ONT-86（パネルK）の逆相HPLC。

【0163】

【図37】精製DMT処理なしオリゴヌクレオチド：ONT-75、ONT-77、ONT-80、ONT-81、ONT-87、ONT-88、ONT-89、andONT-41（パネルA）のオーバーレイ；ONT-75、ONT-77、ONT-80、ONT-81、ONT-87、ONT-88、ONT-89、およびONT-41（パネルB）の逆相HPLCトレースのオーバーレイ。

30

【0164】

【図38】精製DMT処理なしオリゴヌクレオチド：ONT-82、ONT-84、ONT-85、ONT-86、およびONT-83（パネルA）の逆相HPLCトレースのオーバーレイ；ONT-82、ONT-84、ONT-85、ONT-86、およびONT-83（パネルB）の逆相HPLCトレースのオーバーレイ。

【0165】

【図39】キラル制御オリゴヌクレオチドONT-81、ONT-41、ONT-75、ONT-77、およびONT-80のT_mオーバーレイ。

40

【0166】

【図40】ONT-41、ONT-75、ONT-80、ONT-77、およびONT-81に対する、5mg/kgの立体異性体またはミボメルセンをhuApobマウスに腹腔内投与後の、PBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベルの時間経過の図示。下矢印は投薬日を示す。

【0167】

【図41】ミボメルセン、「全R」ミボメルセン、「全S」ミボメルセン、「RSR」ミボメルセン、および「SSR」ミボメルセンに対する、5mg/kgの立体異性体またはミボメルセンをhuApobマウスに腹腔内投与後の、PBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベルの時間経過の図示。下矢印は投薬日を示す。

50

【0168】

【図42】ミボメルセン、「全R」ミボメルセン、「全S」ミボメルセン、「RSR」ミボメルセン、および「SRS」ミボメルセンに対する、10mg/kgの立体異性体またはミボメルセンをhuApobマウスに腹腔内投与後の、PBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベルの時間経過の図示。下矢印は投薬日を示す。

【0169】

【図43】ミボメルセン、ONT-87、ONT-88、およびONT-89に対する、5mg/kgの立体異性体またはミボメルセンをhuApobマウスに腹腔内投与後の、PBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベルの時間経過の図示。下矢印は投薬日を示す。

10

【0170】

【図44】ONT-87、ONT-88、およびONT-89に対する、10mg/kgの立体異性体またはミボメルセンをhuApobマウスに腹腔内投与後の、PBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベルの時間経過の図示。下矢印は投薬日を示す。

【0171】

【図45】siRNA二本鎖を用いたHe p 3 B処置後の残留PCSK-9 mRNA %の図示。

【0172】

【図46】siRNA二本鎖カーブフィッティングを用いたHe p 3 B処置後の残留PCSK-9 mRNA %の図示。

20

【0173】

【0174】

【図47】siRNA二本鎖を用いたHeLa処置後の残留PCSK-9 mRNA %の図示。

【0175】

【図48】siRNA二本鎖カーブフィッティングを用いたHeLa処置後の残留PCSK-9 mRNA %の図示。

【0176】

【図49】3ホスホロチオエート立体中心を含むsiRNA二本鎖を用いたHeLa処置後の残留PCSK-9 mRNA %の図示。

30

【0177】

【図50】3ホスホロチオエート立体中心カーブフィッティングを含むsiRNA二本鎖を用いたHeLa処置後の残留PCSK-9 mRNA %の図示。

【0178】

【図51】精製DMT処理なしオリゴヌクレオチド：ONT-108、ONT-109、およびONT-114の逆相HPLCトレースのオーバーレイ。

【0179】

【図52】精製DMT処理なしオリゴヌクレオチド：ONT-106、ONT-107、およびONT-114の逆相HPLCトレースのオーバーレイ。

40

【0180】

【図53】10mg/kgの立体異性体またはミボメルセンをhuApobマウスに腹腔内投与後の、PBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベルの時間経過の図示。下矢印は投薬日を示す。

【0181】

【図54】5mg/kgの立体異性体またはミボメルセンをhuApobマウスに複数回腹腔内投与（n = 3 ~ 4）後の、PBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベルの時間経過の図示。下矢印は投薬日を示す。

【0182】

50

【図55】10mg/kgの立体異性体(ONT-87、ONT-88またはONT-89)またはミボメルセンをhuApobマウスに腹腔内投与後の、17日目のPBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベル。

【0183】

【図56】10mg/kgの立体異性体(ONT-87、ONT-88またはONT-89)またはミボメルセンをhuApobマウスに腹腔内投与後の、24日目のPBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベル。

【0184】

【図57】10mg/kgの立体異性体(ONT-41、ONT-87、ONT-88またはONT-89)をhuApobマウスに投与後の、PBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベル。

10

【0185】

【図58】10mg/kgの立体異性体(ONT-87、ONT-88またはONT-89)をhuApobマウスに投与後の、PBSと比較した血清ヒトアポリポタンパク質Bタンパク質レベル。

【0186】

【図59】オリゴヌクレオチドONT-75、ONT-77、ONT-80、ONT-81、ONT-87、ONT-88、ONT-89およびONT-41に対するsvPDE消化研究のイオン交換HPLC定量分析のプロット。

【0187】

【図60】オリゴヌクレオチドONT-75(全(Rp))-Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mCに対する、nPlを用いた酵素消化研究のイオン交換HPLC。

20

【0188】

【図61】オリゴヌクレオチドONT-77(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC(5R-10S-4R)に対する、nPlを用いた酵素消化研究のイオン交換HPLC。

【0189】

【図62】オリゴヌクレオチドONT-80(全(Sp))-Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mCに対する、nPlを用いた酵素消化研究のイオン交換HPLC。

30

【0190】

【図63】オリゴヌクレオチドONT-81(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC(5S-10R-4S)に対する、nPlを用いた酵素消化研究のイオン交換HPLC。

【0191】

【図64】オリゴヌクレオチドONT-87(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC(5R-(SSR)₃-5R)に対する、nPlを用いた酵素消化研究のイオン交換HPLC。

40

【0192】

【図65】オリゴヌクレオチドONT-88(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC(5S-(RRS)₃-5S)に対する、nPlを用

50

いた酵素消化研究のイオン交換HPLC。

【0193】

【図66】オリゴヌクレオチドONT-89 (Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp) - Gs 5mCs 5mCs Ts 5mCs As Gs Ts 5mCs Ts Gs 5mCs Ts Ts 5mCs Gs 5mCs As 5mCs 5mC ((SR), S) に対する、nPlを用いた酵素消化研究のイオン交換HPLC。

【0194】

【図67】オリゴヌクレオチドONT-41 (ジアステレオ混合物) - Gs 5mCs 5mCs Ts 5mCs As Gs Ts 5mCs Ts Gs 5mCs Ts Ts 5mCs Gs 5mCs As 5mCs 5mC に対する、nPlを用いた酵素消化研究のイオン交換HPLC。

10

【0195】

【図68】キラル純粋オリゴヌクレオチドONT-75およびONT-77の、プレインキュベートしたラット全肝臓ホモジネートのステレオランダム「親」オリゴヌクレオチドONT-41 (ミボメルセン) との安定性比較。

【0196】

【図69】13bモノマーを用いたオリゴヌクレオチド誘導体製造のUPLCプロファイル。

【0197】

【図70】27モノマーを用いたオリゴヌクレオチド誘導体製造のUPLCプロファイル。

20

【0198】

【図71】立体異性体 (ONT-82、ONT-83、ONT-84、ONT-85またはONT-86) での初代培養マウス肝細胞のトランスフェクション後の模擬および未処理対照と比較したマウスアポリポタンパク質B/GAPDHmRNAレベル。

【0199】

【図72】立体異性体 (ONT-83、ONT-84、ONT-85またはONT-86) での初代培養マウス肝細胞のトランスフェクション後の模擬および未処理対照と比較したマウスアポリポタンパク質B/GAPDHmRNAレベル。

【発明を実施するための形態】

30

【0200】

合成オリゴヌクレオチドは、幅広い種類の応用へ有用な分子ツールを提供する。例えば、オリゴヌクレオチドは、治療、診断、研究および新規ナノマテリアル用途において有用である。天然の核酸の使用は (例えば、非修飾DNAまたはRNA)、例えば、エンドおよびエキソヌクレアーゼに対するそれらの感受性により制限される。よって、これらの短所を回避するために、さまざまな合成同等物が開発されている。合成同等物にはそれらの分子を分解されにくくする骨格修飾を含む合成オリゴヌクレオチドが含まれる。構造的な観点から見ると、そのようなインターヌクレオチドのリン酸結合に対する修飾は、キラリティーを導入する。オリゴヌクレオチドのある特性は、オリゴヌクレオチドの骨格を形成するリン原子の配置により影響を受ける可能性があることが明らかになっている。例えば、インビトロの研究では、結合親和性、相補RNAと特に結合する配列、ヌクレアーゼに対する安定性といったアンチセンスヌクレオチドの特性は、特に、骨格のキラリティーによって影響を受けることを示している (例えば、リン原子の配置)。よって、本発明は、リン原子修飾核酸並びにその関連組成物および方法を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドの必要性があるという認識を包含する。いくつかの実施形態において、本発明は、構造的に最適化され、例えば、インビトロおよび/またはインビボでの応用における安定性の向上および有効性の増加など、特定の望ましい特性を示すキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。

40

【0201】

インターヌクレオチドのリン酸の2個の非架橋酸素原子のうち、1または2個が、異なる

50

る種類の原子または置換基で置き換えられたオリゴヌクレオチドは、治療薬として有用であることが知られており、酵素反応の仕組みを明らかにする調査が行われている。しかしながら、そのようなオリゴヌクレオチドは、多くの用途においてその使用をできなくする望ましくない特性を示すことがある（例えば、ヌクレアーゼによる分解に対する感受性、不十分な細胞膜透過性）。よって、さまざまな種類の化学修飾が、特性を改善するおよび／または新しい機能を与えるために開発された。

【0202】

修飾オリゴヌクレオチド構造

上述の通り、さまざまな用途および症状におけるオリゴヌクレオチド組成物の有用性を考慮して、当業者は、天然のオリゴヌクレオチド分子と比較し、例えば、特定の用途および症状に利用される、好ましいまたは望ましい特性や性質を有し得るオリゴヌクレオチド構造の修飾の開発の努力を行ってきた。そのような例示的な修飾が、以下に記載される。

【0203】

国際公開第2010/141471号（以下「Traversa I」）は、還元された正味ポリアニオン電荷を有するように修飾された異なる種類の核酸構成の修飾を教示している。国際公開第2010/039543号（以下「Travera II」）は、還元ポリアニオン電荷を用いた中性ポリヌクレオチド（NN）の組成物および作製方法を教示している。国際公開第2008/008476号（ここでは、「Traversa III」）は、SATE（Imbach-タイプ）リン酸プロドラッグの合成について記載している。Traversa I、IIおよびIIIは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

【0204】

国際公開第2010/072831号（以下「Girindusら」）もまた、オリゴヌクレオチドの修飾を教示している。特に、Girindusらは、プロドラッグとしてのホスホロチオエートトリエステルを生成する硫化剤の使用を開示している。Girindusらは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

【0205】

同様に、国際公開第2004/085454号（以下「Avecia I」）は、例えば、ポリ-H-ホスホネートジエステルの一時的なシリル化を通じたホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの調製について教示している。国際公開第2001/027126号（以下「Avecia II」）は、H-ホスホネートモノマーを固体支持された5'-ヒドロキシルオリゴヌクレオチドにカップリングし、さらに、得られたH-ホスホネートジエステルをホスホロチオエートトリエステルに硫化するホスホトリエステルオリゴヌクレオチドの固相合成のプロセスを教示している。国際公開第2001/064702号（以下「Avecia III」）の開示は、Avecia IIに類似しており、さらに異なる固体支持体に関する固相合成を記載している。Avecia I、II、およびIIIは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

【0206】

国際公開第1997/006183号（以下「Chiron」）は、カチオンインターヌクレオチド結合を有し、立体的に純粋なアミド化物などの非対称のリンを含むオリゴヌクレオチドを教示している。Chironは、ジアステレオマーの混合物または例えば、カラムクロマトグラフィーなどの解決手段を用いて結晶化させて得られた立体的に純粋なオリゴヌクレオチドを教示している。Chironは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を教示していない。

【0207】

国際公開第2009/146123号（以下「Spring Bank I」）は、置換されたリン酸オリゴヌクレオチドおよびホスホロチオエートトリエステルを用いた、ウ

ウイルス感染を治療する組成物および方法を開示している。国際公開第2007/070598号（以下「Spring Bank II」）は、抗ウイルス核酸としてのホスホトリエステルプロドラッグおよびホスホロチオエートプロドラッグの合成について教示している。Spring Bank IおよびIIは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

【0208】

欧州特許第0779893号（以下「Hybridon」）は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの多くの細胞を取り込む脂溶性プロドラッグを教示しており、RpおよびSpホスホロチオエートおよびホスホロチオエートトリエステルダイマーは、異なる酵素安定性を有することを確認した。Hybridonは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

10

【0209】

国際公開第1997/047637号（以下「Imbach I」）は、一般的にImbach「SATE」（S-アシルチオエチル）プロドラッグオリゴヌクレオチド組成物および方法を教示している。Imbach Iは、例えば、生物可逆性ホスホトリエステルプロドラッグ、および合成後のアルキル化またはプロドラッグ基を含むホスホラミダイトを用いたあるプロドラッグオリゴヌクレオチドの調製を記載している。米国特許第6,124,445号（以下「Imbach II」）は、修飾アンチセンスおよびキメラプロドラッグオリゴヌクレオチドを教示している。Imbach IおよびIIは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

20

【0210】

国際公開第2006/065751号（以下「Beaucage」）は、熱的に不安定な置換基（ホスホラミダイトモノマーを通じて導入される置換基）を含むCpGオリゴヌクレオチドホスホロチオエートプロドラッグおよびその用途について教示している。Beaucageは、本発明に記載されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、その組成物、およびそれを用いた作成方法を開示していない。

【0211】

Takeshi Wadaらは、アミダイトキラル補助剤を用いたP-キラル核酸の立体制御された合成の新規方法を開発した（日本特許第4348077号、国際公開第2005/014609号、国際公開第2005/92909号、および国際公開第2010/064146号、ここで「Wada I」と順に呼ぶ）。特に、国際公開第2010/064146号（ここで「Wada II」と呼ぶ）は、リンにおける立体化学的な配置が制御された、リン酸原子修飾核酸の合成方法を開示している。しかしながら、Wada IIの方法は、各キラル結合したリン酸の個々のP-修飾を制御および設計された方法で提供していないという点において限定される。つまり、Wada IIのP-修飾の結合方法は、一度、所望の長さで作られると、結合したリン酸で質量変更され、例えば、所望のホスホロチオエートジエステル、ホスホロアミド酸またはボラノリン酸または別のそのようなリン酸原子修飾核酸を提供する、縮合中間体ポリH-ホスホネートオリゴヌクレオチド鎖の生成を提供する（文献中、ルートBと呼ぶ、スキーム6、36頁）。さらに、Wada IIのH-ホスホネートオリゴヌクレオチド鎖は、より短い長さである（例えば、ダイマー、トリマー、またはテトラマー）。カップリングステップ、経路Bにおいてカップリングステップが含まれておらず、それは「n-1」型副生成物の蓄積の結果として、一般的に低い純度を示す事実と組み合わせると、Wada II経路には、より長いオリゴヌクレオチドの合成に関して限定が含まれる。Wada IIは、特定のオリゴヌクレオチドが、結合した各リン酸での異なる修飾を含みうることが予想されると一般的に企図するが、Wada IIでは、そのような制御された修飾を繰り返し組み込む、本明細書に記載する方法を記載または示唆していない。Wada IIは、結合したリン酸での修飾より前にH-ホスホネート中間体オリゴヌクレオチドが完全に組み込まれることを必要としない合成サイクルを記載している限りにおいて（文献中では、ルートA、35頁、

30

40

50

スキーム5、「ルートAを通じた式1のキラルX-ホスホネート部分を含む核酸の合成」と呼ぶ)、この一般的な開示は、本発明によって提供される、あるP-修飾を組み込むために必要とされる重要なステップを教示しておらず、このサイクルがキラル制御されたP-修飾のオリゴヌクレオチドの合成、特により長いオリゴヌクレオチドの合成において、有用となり得るほどの効率性や多様性を有しているわけでもない。

【0212】

Wada I Iにおける少なくともそのような1つの非効率性は、Wada et alの国際公開第2012/039448号(以下「Wada I I I」)によって記載されている。Wada I I Iは、新規キラル補助剤をWada I Iの方法に使用して、一度構築したH-ホスホネートオリゴヌクレオチドを生成し、連続的に修飾して、とりわけ、ホスホロチオエートなどを得ることを開示している。Wadaらは、Wada I Iで開示されている4つの種類のキラル補助剤は、結合したリン酸において、リンとの強い結合を形成するため、効率的に除去できないことをWada I I Iの中で確認した。Wada I I Iは、Wada I Iのキラル補助剤を除去するためには、オリゴヌクレオチド生成物の統合性を損なう傾向がある厳しい条件が必要とされる、と記載している。Wada I I Iは、長鎖オリゴヌクレオチドを合成する場合、この点が特に問題であることを確認した。その理由としては、少なくとも分解反応が進むにつれ、さらにオリゴヌクレオチド生成物と反応し、オリゴヌクレオチド生成物を分解する更なる副生成物が生成されるためである。したがって、Wada I I Iは、S_N1の仕組みを用いて、弱酸性の状態下でH-ホスホネートインターヌクレオチド結合を開放し(ルートB)、または、比較的弱塩基性条件下のβ-除去経路を通じてオリゴヌクレオチドから効率よく切断できるキラル補助剤を提供している。

【0213】

化学および合成の技術分野の当業者は、例えば、本発明により提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドの生成に関連する複雑さを容易に理解できるであろう。例えば、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを合成および単離するために、モノマー1回ごとの添加の条件は、以下のとおりになるように設計されなければならない。(1)化学作用は、増加するオリゴヌクレオチドの各部分と適合する；(2)各モノマーを添加する間に生成される副生成物は、増加するオリゴヌクレオチドの構成的および立体化学的な統合性を損なわない；および(3)最終粗生成物の組成は、所望のキラル制御されたオリゴヌクレオチド生成物を単離させる組成である。

【0214】

オリゴヌクレオチドホスホロチオエートは、治療の潜在的な可能性を示した(Stein et al., Science (1993), 261:1004-12; Agrawal et al., Antisense Res. and Dev. (1992), 2:261-66; Bayever et al., Antisense Res. and Dev. (1993), 3:383-390)。ホスホロチオエートの立体化学と関連せずに調製されたオリゴヌクレオチドホスホロチオエートは、2ⁿジアステレオマーの混合物として存在し、ここでnは、インターヌクレオチドホスホロチオエート結合の数である。これらのジアステレオマーホスホロチオエートの化学的および生物学的な特性は、他のものとは明確に異なり得る。例えば、Wadaら(Nucleic Acids Symposium Series No. 51 p. 119-120; doi:10.1093/nass/nrm060)は、立体的に定義された-(Rp)-(Ups)9U/(Ap)9A二本鎖は、通常の-(Up)9U/(Ap)9Aおよび立体的に定義され二本鎖を形成しなかった-(Sp)-(Ups)9Uよりも、より高いTm値を示すことを発見した。別の例において、Tangらによる研究は、(Nucleosides Nucleotides (1995), 14:985-990)立体的に純粋なRpオリゴデオキシリボヌクレオシドホスホロチオエートは、定義されていないリンキラリティを有する親オリゴデオキシリボヌクレオシドホスホロチオエートよりも、ヒト血清に内在するヌクレアーゼに対して低い安定性を有することが発

見された。

【0215】

キラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物
本発明は、粗高純度および高ジアステレオマー純度のキラル制御されたオリゴヌクレオチ
ド、およびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態
において、本発明は、粗純度が高いキラル制御されたオリゴヌクレオチド、およびキラル
制御されたオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、本発明
は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド、およびキラル制御されたジアステレオマーの
純度が高いオリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【0216】

いくつかの実施形態において、本発明は、少なくとも1つの種類の複数のオリゴヌクレ
オチドを含み、各種類は、以下：1) 塩基配列；2) 骨格結合のパターン；3) 骨格キラ
ル中心のパターン；および4) 骨格P-修飾のパターン、により定義されるキラル制御さ
れた組成物を提供する。

【0217】

いくつかの実施形態において、本発明は、同一の種類の複数のオリゴヌクレオチドを含
み、各種類は、以下：1) 塩基配列；2) 骨格結合のパターン；3) 骨格キラル中心のパ
ターン；および4) 骨格P-修飾のパターン、により定義されるキラル制御された組成物
を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、2以上の種類の複数のオリゴヌク
レオチドを含み、各種類は、以下：1) 塩基配列；2) 骨格結合のパターン；3) 骨格キラ
ル中心のパターン；および4) 骨格P-修飾のパターン、により定義されるキラル制御
された組成物を提供する。

【0218】

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル結合したリン酸に関してジアステレオ
マー的に純粋なインターヌクレオチド結合を1以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。
いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの構造を有するジアステレオマー的に純粋
なインターヌクレオチド結合を1以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実
施形態において、本発明は、キラル結合したリン酸に関してジアステレオマー的に純粋な
インターヌクレオチド結合を1以上、およびリン酸ジエステル結合を1以上含むオリゴヌ
クレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、ジアステレオマー的に
純粋な式Iの構造を有するインターヌクレオチド結合を1以上、およびリン酸ジエステル
結合を1以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明
は、ジアステレオマー的に純粋な式I-cの構造を有するインターヌクレオチド結合を1
以上、およびリン酸ジエステル結合を1以上含むオリゴヌクレオチドを提供する。いく
つかの実施形態において、そのようなオリゴヌクレオチドは、本出願に記載されるとおり、
立体選択的オリゴヌクレオチド合成を使用して調製され、キラル結合したリン酸に関して
予め設計されたジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合を形成する。例え
ば、 $(R_p/S_p, R_p/S_p, R_p/S_p, R_p, R_p, S_p, S_p, S_p, S_p, S_p, S_p, S_p, S_p, S_p, S_p, S_p, R_p, R_p, R_p, R_p, R_p) - d [G_s C_s C_s T_s C_s A_s G_s T_s C_s T_s G_s C_s T_s T_s C_s G_s 1 C_s 1 A_s 1 C_s C]$ で示される1
つの例示的なオリゴヌクレオチドにおいて、始めの3つのインターヌクレオチド結合は、
従来のオリゴヌクレオチド合成方法を用いて作製され、ジアステレオマー的に純粋なイン
ターヌクレオチド結合は、本出願に記載されるとおり、立体化学的な制御により作製さ
れる。例示的なインターヌクレオチド結合には、式Iの構造を有する結合も含まれるが、さ
らに以下に記載される。いくつかの実施形態において、そのようなオリゴヌクレオチドは、
さらに本出願に記載される配列を含み、表2ならびに4、および付属書類A、Bならび
にCに記載されるものを含むが、限定されるものではない。

【0219】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、結合したリン酸での
キラリティーに関して、立体的に純粋なかつ立体的にランダムなインターヌクレオチド結

10

20

30

40

50

合の組み合わせを含む。例えば、いくつかの実施形態において、結合したリン酸でのキラリティーに関して、それ以外では立体的にランダムであるオリゴヌクレオチド内に、1以上の立体的に定義されたインターヌクレオチド結合のブロックを有することが望ましい。いくつかの実施形態において、結合したリン酸でのキラリティーに関して、それ以外では立体的に定義されている、オリゴヌクレオチド内に立体的にランダムな1以上のインターヌクレオチド結合のブロックを有することが望ましい。

【0220】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの少なくとも1個のヌクレオチド単位が、本出願に記載される、立体選択的オリゴヌクレオチド合成を用いて組み込まれ、キラル結合したリン酸に関して予め設計されたジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合を形成する。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの少なくとも2個のヌクレオチド単位は、本出願に記載される、立体選択的オリゴヌクレオチド合成を用いて組み込まれ、キラル結合したリン酸に関して予め設計されたジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合を少なくとも2個形成する。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの少なくとも3個のヌクレオチド単位は、本出願に記載される、立体選択的オリゴヌクレオチド合成を用いて組み込まれ、キラル結合したリン酸に関して予め設計されたジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合を少なくとも3個形成する。いくつかの実施形態において、少なくとも1、2、または3個の予め設計されたジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合は、互いに隣接する。いくつかの実施形態において、少なくとも1、2、または3個の予め設計されたジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合は、互いに隣接していない。

【0221】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%は、本出願に記載される立体選択的オリゴヌクレオチド合成を用いて組み込まれ、キラル結合したリン酸に関して予め設計されたジアステレオマー的に純粋なインターヌクレオチド結合を形成する。ここに記載される通り、いくつかの実施形態において、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%のヌクレオチド単位が、1以上のブロック内に発生し、ブロックマーを提供する。いくつかの実施形態において、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%のヌクレオチド単位が、交互パターンに発生し、アルトマーを提供する。関連技術の当業者は、望ましいパターンは、いずれもここで検討された本発明の方法を用いて実現可能であることを理解するであろう。

【0222】

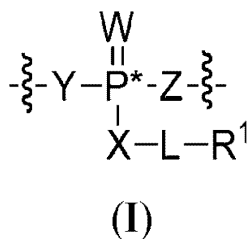
いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、互いに異なる立体化学および／または異なるP-修飾を有する。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の少なくとも2個の個々のインターヌクレオチド結合は、互いに異なるP-修飾を有する。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、異なるP-修飾を互いに有し、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合を含む。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、異なるP-修飾を互いに有し、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも1個のホスホロチオエートジエステルインターヌクレオチド結合を含む。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、異なる

P-修飾を互いに有し、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のホスホロチオエートトリエステルインターヌクレオチド結合を含む。ある特定の実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、異なるP-修飾を互いに有し、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも1個のホスホロチオエートトリエステルインターヌクレオチド結合を含む。

【0223】

ある特定の実施形態において、本発明は、独立して式I：

【化4】



10

の構造を有する1以上の修飾インターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、各変数は、下記のとおり定義され、記載するとおりである。いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの1個以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のインターヌクレオチド結合が互いに異なるP-修飾を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの1個以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のインターヌクレオチド結合は、互いに異なる-X-L-R¹を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの1個以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のインターヌクレオチド結合は、互いに異なるXを有する。いくつかの実施形態において、本発明は、式Iの1個以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の式Iの個々のインターヌクレオチド結合は、互いに異なる-L-R¹を有する。

20

30

【0224】

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、互いに異なる立体化学および／または異なるP-修飾を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、互いに異なる立体化学を有し、少なくともキラル制御されたオリゴヌクレオチドの構造の一部分は、交互の立体化学の繰り返しパターンを特徴とする。

40

【0225】

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、-X-L-R¹部分で異なるX原子を有する、および／または-X-L-R¹部分で異なるL基を有する、および／または-X-L-R¹部分で異なるR¹原子を有するという意味で、異なるP-修飾を互いに有する。

【0226】

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチド内の個々のインターヌクレオチド結合の少なくとも2個は、互いに異なる立体化学および／または異なるP-修飾を有し、オリゴヌクレオチドは、下記の

50

式：

$$[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$$

によって表される構造を有し、

ここで、各 R^B は、独立して、結合したリン酸において R 配置を有するヌクレオチド単位のブロックを表し；

各 S^B は、独立して、結合したリン酸において S 配置を有するヌクレオチド単位のブロックを表し；

$n_1 \sim n_y$ のそれぞれは、少なくとも 1 つの奇数 n および少なくとも 1 つの偶数 n は、ゼロ以外の数であるという要件のもとに、ゼロまたは整数であることにより、オリゴヌクレオチドは、互いに異なる立体化学の少なくとも 2 個の個々のインターヌクレオチド結合を含み；および

ここで、 $n_1 \sim n_y$ の合計は、2～200 であり、およびいくつかの実施形態においては、下限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 以上から成るグループから選択され、上限は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、および 200 以上から成るグループから選択され、上限は、下限より大きい。

【0227】

そのようないくつかの実施形態において、各 n は、同じ値である；いくつかの実施形態において、各偶数 n は、互いに偶数 n と同じ値である；いくつかの実施形態において、各奇数 n は、互いに奇数 n と同じ値である；いくつかの実施形態において、少なくとも 2 個の偶数 n は、互いに異なる値である；いくつかの実施形態において、少なくとも 2 個の奇数 n は、互いに異なる値である。

【0228】

いくつかの実施形態において、少なくとも 2 個の隣接する n は、互いに等しく、提供されるオリゴヌクレオチドは、等しい長さの S 立体化学結合および R 立体化学結合の隣接するブロックを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、等しい長さの S および R 立体化学結合の繰り返しブロックを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、S および R 立体化学結合の繰り返しブロックを含み、少なくとも 2 個のそのようなブロックは、互いに異なる長さである；いくつかのそのような実施形態において、各 S 立体化学ブロックは、同じ長さで、各 R 立体化学の長さとは異っており、各 R 立体化学の長さは、互いに任意に同じ長さであっても良い。

【0229】

いくつかの実施形態において、 n 以外をスキップして隣接する少なくとも 2 つの n は、互いに等しく、提供されるオリゴヌクレオチドは、互いに長さが等しい第 1 立体化学の結合を少なくとも 2 ブロックを含み、別の立体化学の結合のブロックごとに分割され、分割されたブロックは、第 1 立体化学のブロックと同じ長さまたは異なる長さであっても良い。

【0230】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドの末端で結合ブロックに関連する n は、は、同じ長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、同じ結合立体化学の末端ブロックを有する。そのようないくつかの実施形態において、末端ブロックは、別の結合立体化学の中間ブロックにより、互いに分離される。

【0231】

いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B n_y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオスキップマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n_1 R^B n_2 S^B n_3 R^B n_4 \dots S^B n_x R^B$

10

20

30

40

50

$n y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n 1 R^B n 2 S^B n 3 R^B n 4 \dots S^B n x R^B n y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。

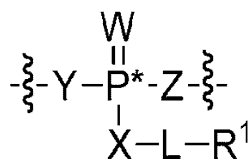
【0232】

いくつかの実施形態において、式 $[S^B n 1 R^B n 2 S^B n 3 R^B n 4 \dots S^B n x R^B n y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、上記に記載したいずれのパターンであってもよく、さらにP-修飾のパターンを含む。例えば、いくつかの実施形態において、式 $[S^B n 1 R^B n 2 S^B n 3 R^B n 4 \dots S^B n x R^B n y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオスキップマーであり、P-修飾スキップマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n 1 R^B n 2 S^B n 3 R^B n 4 \dots S^B n x R^B n y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーであり、P-修飾アルトマーである。いくつかの実施形態において、式 $[S^B n 1 R^B n 2 S^B n 3 R^B n 4 \dots S^B n x R^B n y]$ で示され、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーであり、およびP-修飾ブロックマーである。

【0233】

いくつかの実施形態において、式 $[S^B n 1 R^B n 2 S^B n 3 R^B n 4 \dots S^B n x R^B n y]$ で示される、提供されるオリゴヌクレオチドは、独立して式 I :

【化5】



(I)

の構造を有する1以上の修飾されたインターヌクレオチドの結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドであり、

ここで、 P^* は、不斉リン原子であり、 R_p または S_p のいずれかであり；

W は、O、SまたはSeであり；

X 、 Y および Z のそれぞれは、独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(-L-R^1)-$ 、またはLであり；

L は、共有結合または置換されていてもよい、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、ここで L の1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され；

R^1 は、ハロゲン、R、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され；

各 R' は、独立して $-R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-CO_2R$ 、もしくは $-SO_2R$ であるか、または：

同じ窒素上の2つの R' は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテ

ロ環式、もしくはヘテロアリール環を形成するか、または同じ炭素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒にあって、置換されていてもよいアリール、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリール環を形成し；
 -C y-は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい2価の環であり；
 各Rは、独立して水素である、または、C₁～C₆脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基であり；および各



10

は、独立してヌクレオシドとの結合を表す。

【0234】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾されたインターヌクレオチドのリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、例えば、ホスホロチオエートまたはホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも2個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも3個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも4個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも5個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。そのような例示的な修飾インターヌクレオチドのリン酸結合は、さらにここに記載される。

20

【0235】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、異なるインターヌクレオチドのリン酸結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも1個の修飾インターヌクレオチド結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも1個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも2個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも3個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも4個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも5個のホスホロチオエートトリエステル結合を含む。そのような例示的な修飾されたインターヌクレオチドのリン酸結合については、さらにここに記載される。

30

40

【0236】

いくつかの実施形態において、ホスホロチオエートトリエステル結合は、例えば、反応の立体選択性を制御するために用いられるキラル補助剤を含む。いくつかの実施形態において、ホスホロチオエートトリエステル結合は、キラル補助剤を含まない。いくつかの実施形態において、ホスホロチオエートトリエステル結合は、対象に対して投与を行うまで、および／または投与の間中、意図的に持続される。

【0237】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、固体支持体に

50

結合されている。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、固体支持体から切断される。

【0238】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および連続して修飾されたインターヌクレオチド結合を少なくとも2個含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個のリン酸ジエステルインターヌクレオチド結合および少なくとも2個の連続するホスホロチオエートトリエステルインターヌクレオチド結合を含む。

【0239】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ブロックマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、P-修飾ブロックマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、結合ブロックマーである。

【0240】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、アルトマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、P-修飾アルトマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、結合アルトマーである。

【0241】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ユニマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ステレオユニマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、P-修飾ユニマーである。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、結合ユニマーである。

【0242】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。

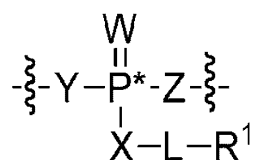
【0243】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、スキップマーである。

【0244】

いくつかの実施形態において、本発明は、式 I :

【化6】



(I)

の構造を独立して有する1以上の修飾されたインターヌクレオチドの結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、

ここで、P*は、不斉リン原子であり、R_pまたはS_pのいずれかであり；

Wは、O、SまたはSeであり；

X、YおよびZのそれぞれは、独立して-O-、-S-、-N(-L-R¹)-、またはLであり；

Lは、共有結合または置換されていてもよい、直鎖または分岐のC₁~C₁₀アルキレン

であり、ここでLの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され；

R^1 は、ハロゲン、R、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 10
 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され；

各 R' は、独立して $-R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-CO_2R$ 、もしくは $-SO_2R$ であるか、または：

同じ窒素上の2つの R' は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテロ環式、もしくはヘテロアリール環を形成するか、または

同じ炭素上の2つの R' は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいアリール、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリール環を形成し；

$-Cy-$ は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい2価の環であり；

各Rは、独立して水素である、または、 $C_1 \sim C_6$ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基であり；および各



は、独立してヌクレオシドとの結合を表す。

【0245】

一般的に上記およびここに記載される通り、 P^* は、不斉リン原子であり、 R_p または S_p のいずれかである。いくつかの実施形態において、 P^* は、 R_p である。別の実施形態において、 P^* は、 S_p である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、各 P^* は、独立して R_p または S_p である式Iのインターヌクレオチド結合を1以上含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、各 P^* は、 R_p である式Iのインターヌクレオチド結合を1以上含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、各 P^* は、 S_p である式Iのインターヌクレオチド結合を1以上含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、 P^* は、 R_p である式Iのインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、の、 P^* は、 S_p である式Iのインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、 P^* は、 R_p である式Iのインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む、 P^* は、 S_p である式Iのインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む。

【0246】

一般的に上記およびここに記載される通り、Wは、O、S、またはSeである。いくつかの実施形態において、Wは、Oである。いくつかの実施形態において、Wは、Sである。いくつかの実施形態において、Wは、Seである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、式Iのインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む、Wは、Oである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、式Iのインターヌクレオチド結合を少なくとも1個含む、Wは、Sである。いくつかの実施形態において、オリゴヌ

クレオチドは、Wは、S eである式 I のインターヌクレオチド結合を少なくとも 1 個含む。

【0247】

一般的に上記およびここに記載される通り、各 R は、独立して水素、または、C₁～C₆ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基である。

【0248】

いくつかの実施形態において、R は、水素である。いくつかの実施形態において、R は、C₁～C₆ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基である。

10

【0249】

いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい C₁～C₆ 脂肪族である。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい C₁～C₆ アルキルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい、直鎖または分岐のヘキシルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい、直鎖または分岐のペンチルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい、直鎖または分岐のブチルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい、直鎖または分岐のプロピルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいエチルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいメチルである。

20

【0250】

いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいフェニルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されたフェニルである。いくつかの実施形態において、R は、フェニルである。

【0251】

いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいカルボシクリルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい C₃～C₁₀ カルボシクリルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい単環式カルボシクリルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいシクロヘブチルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいシクロヘキシルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいシクロペンチルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいシクロブチルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいシクロプロピルである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい 2 環式カルボシクリルである。

30

【0252】

いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいアリールである。いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよい 2 環式アリール環である。

【0253】

いくつかの実施形態において、R は、置換されていてもよいヘテロアリールである。いくつかの実施形態において、R は、独立して窒素、硫黄、または酸素から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい 5～6 員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、R は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する、置換された 5～6 員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、R は、独立して窒素、硫黄、または酸素から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する、非置換の 5～6 員単環式ヘテロアリール環である。

40

【0254】

いくつかの実施形態において、R は、独立して窒素、酸素または硫黄から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい 5 員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、R は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい 6 員単環式ヘテロアリール環であ

50

る。

【0255】

いくつかの実施形態において、Rは、窒素、酸素または硫黄から選択される1個のヘテロ原子を有する、置換されていてもよい5員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、ピロリル、フラニル、またはチエニルから選択される。

【0256】

いくつかの実施形態において、Rは、窒素、酸素、または硫黄から独立して選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5員ヘテロアリール環である。ある特定の実施形態において、Rは、1個の窒素原子を有する置換されていてもよい5員ヘテロアリール環であり、さらなるヘテロ原子は、硫黄または酸素から選択される。例示的なR基は、置換されていてもよいピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリルまたはイソオキサゾリルを含む。

【0257】

いくつかの実施形態において、Rは、1～3個の窒素原子を有する6員ヘテロアリール環である。別の実施形態において、Rは、1～2個の窒素原子を有する置換されていてもよい6員ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、2個の窒素原子を有する置換されていてもよい6員ヘテロアリール環である。ある特定の実施形態において、Rは、1個の窒素を有する置換されていてもよい6員ヘテロアリール環である。例示的なR基は、置換されていてもよいピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、またはテトラジニルである。

【0258】

ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい8～10員2環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5, 6-縮合ヘテロアリール環である。別の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5, 6-縮合ヘテロアリール環である。ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいインドリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいアザビシクロ[3.2.1]オクタニルである。ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいアザインドリル(azaindolyl)である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいベンズイミダゾリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいベンゾチアゾリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいベンゾオキサゾリルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいインダゾリルである。ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される3個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5, 6-縮合ヘテロアリール環である。

【0259】

ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6, 6-縮合ヘテロアリール環である。別の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいキノリニルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいイソキノリニルである。ある観点によれ

ば、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、Rは、キナゾリンまたはキノキサリンである。

【0260】

いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいヘテロシクリルである。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい3~7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換された3~7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する非置換の3~7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。

10

【0261】

いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいヘテロシクリルである。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい部分的に不飽和の6員ヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、2個の酸素原子を有する置換されていてもよい部分的に不飽和の6員ヘテロ環式環である。

20

【0262】

ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する3~7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。ある特定の実施形態において、Rは、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフランニル、テトラヒドロピラニル、オキセパニル、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、アゼパニル、チイラニル、チエタニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、チエパニル、ジオキサラニル、オキサチオラニル、オキサゾリジニル、イミダゾリジニル、チアゾリジニル、ジチオラニル、ジオキサニル、モルホリニル、オキサチアニル、ピペラジニル、チオモルホリニル、ジチアニル、ジオキセパニル、オキサゼパニル、オキサチエパニル、ジチエパニル、ジアゼパニル、ジヒドロフラノニル、テトラヒドロピラノニル、オキセパノニル、ピロリジノニル、ピペリジノニル、アゼパノニル、ジヒドロチオフェノニル、テトラヒドロチオピラノニル、チエパノニル、オキサゾリジノニル、オキサジナノニル、オキサゼパノニル、ジオキサラノニル、ジオキサノニル、ジオキセパノニル、オキサチオリノニル、オキサチアノニル、オキサチエパノニル、チアゾリジノニル、チアジナノニル、チアゼパノニル、イミダゾリジノニル、テトラヒドロピリミジノニル、ジアゼパノニル、イミダゾリジンジオニル、オキサゾリジンジオニル、チアゾリジンジオニル、ジオキサランジオニル、オキサチオランジオニル、ピペラジンジオニル、モルホリンジオニル、チオモルホリンジオニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフランニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピロリジニル、テトラヒドロチオフェニル、またはテトラヒドロチオピラニルである。いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。

30

40

【0263】

ある特定の実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1~2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5~6員部分的に不飽和の単環式環である。ある特定の実施形態において、Rは、置換されていてもよいテトラヒドロピリジニル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロオキサゾリル、またはオキサゾリニル基である。

【0264】

いくつかの実施形態において、Rは、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される

50

1～4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい8～10員2環式飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいインドリニルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよいイソインドリニルである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい1、2、3、4-テトラヒドロキノリンである。いくつかの実施形態において、Rは、置換されていてもよい1、2、3、4-テトラヒドロイソキノリンである。

【0265】

一般的に上記およびここに記載される通り、各R'は、独立して-R、-C(O)R、-CO₂R、もしくは-SO₂Rであるか、または：

同じ窒素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテロ環式、もしくはヘテロアリール環を形成するか、または

同じ炭素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいアリール、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリール環を形成する；

【0266】

いくつかの実施形態において、R'は、-R、-C(O)R、-CO₂R、または-SO₂Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0267】

いくつかの実施形態において、R'は、-Rであり、Rは、上記およびここに定義し記載したとおりである。である。いくつかの実施形態において、R'は、水素である。

【0268】

いくつかの実施形態において、R'は、-C(O)Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R'は、-CO₂Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、R'は、-SO₂Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0269】

いくつかの実施形態において、同じ窒素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテロ環式、もしくはヘテロアリール環を形成する。いくつかの実施形態において、同じ炭素上の2つのR'は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいアリール、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリール環を形成する。

【0270】

一般的に上記およびここに記載される通り、-Cy-は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい2価の環である。

【0271】

いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいフェニレンである。いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいカルボシクリレンである。いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいアリーレンである。いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいヘテロアリーレンである。いくつかの実施形態において、-Cy-は、置換されていてもよいヘテロシクリレンである。

【0272】

一般的に上記およびここに記載される通り、X、YおよびZのそれぞれは、独立して-O-、-S-、-N(-L-R¹)-、またはLであり、LおよびR¹のそれぞれは、独立して上記のとおり定義し、下記に記載されるとおりである。

【0273】

いくつかの実施形態において、Xは、-O-である。いくつかの実施形態において、Xは、-S-である。いくつかの実施形態において、Xは、-O-または-S-である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、式Iのインター

10

20

30

40

50

ヌクレオチドの結合を含み、Xは、 $-O-$ である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチドの結合を含み、Xは、 $-S-$ である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチド結合を含み、Xは、 $-O-$ であり、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチド結合を含み、Xは、 $-S-$ である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチド結合を含み、Xは、 $-O-$ であり、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチド結合を含み、Xは、 $-S-$ であり、少なくとも1個の、式Iのインターヌクレオチド結合を含み、Lは、置換されていてもよい、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。

10

【0274】

いくつかの実施形態において、Xは、 $-N(-L-R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Xは、 $-N(R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Xは、 $-N(R')$ である。いくつかの実施形態において、Xは、 $-N(R)-$ である。いくつかの実施形態において、Xは、 $-NH-$ である。

20

【0275】

いくつかの実施形態において、Xは、Lである。いくつかの実施形態において、Xは、共有結合である。いくつかの実施形態において、Xは、置換されていてもよい、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、Xは、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンまたは $C_1 \sim C_{10}$ アルケニレンである。いくつかの実施形態において、Xは、メチレンである。

30

【0276】

いくつかの実施形態において、Yは、 $-O-$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-S-$ である。

【0277】

いくつかの実施形態において、Yは、 $-N(-L-R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-N(R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-N(R')$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-N(R)-$ である。いくつかの実施形態において、Yは、 $-NH-$ である。

40

【0278】

いくつかの実施形態において、Yは、Lである。いくつかの実施形態において、Yは、共有結合である。いくつかの実施形態において、Yは、置換されていてもよい、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。

50

$S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、Yは、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンまたは $C_1 \sim C_{10}$ アルケニレンである。いくつかの実施形態において、Yは、メチレンである。

【0279】

いくつかの実施形態において、Zは、 $-O-$ である。いくつかの実施形態において、Zは、 $-S-$ である。

【0280】

いくつかの実施形態において、Zは、 $-N(-L-R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Zは、 $-N(R^1)-$ である。いくつかの実施形態において、Zは、 $-N(R')-$ である。いくつかの実施形態において、Zは、 $-N(R)-$ である。いくつかの実施形態において、Zは、 $-NH-$ である。

【0281】

いくつかの実施形態において、Zは、Lである。いくつかの実施形態において、Zは、共有結合である。いくつかの実施形態において、Zは、または置換されていてもよい、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、Zは、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンまたは $C_1 \sim C_{10}$ アルケニレンである。いくつかの実施形態において、Zは、メチレンである。

【0282】

一般的に上記およびここに記載される通り、Lは、共有結合または任意に置換され、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。

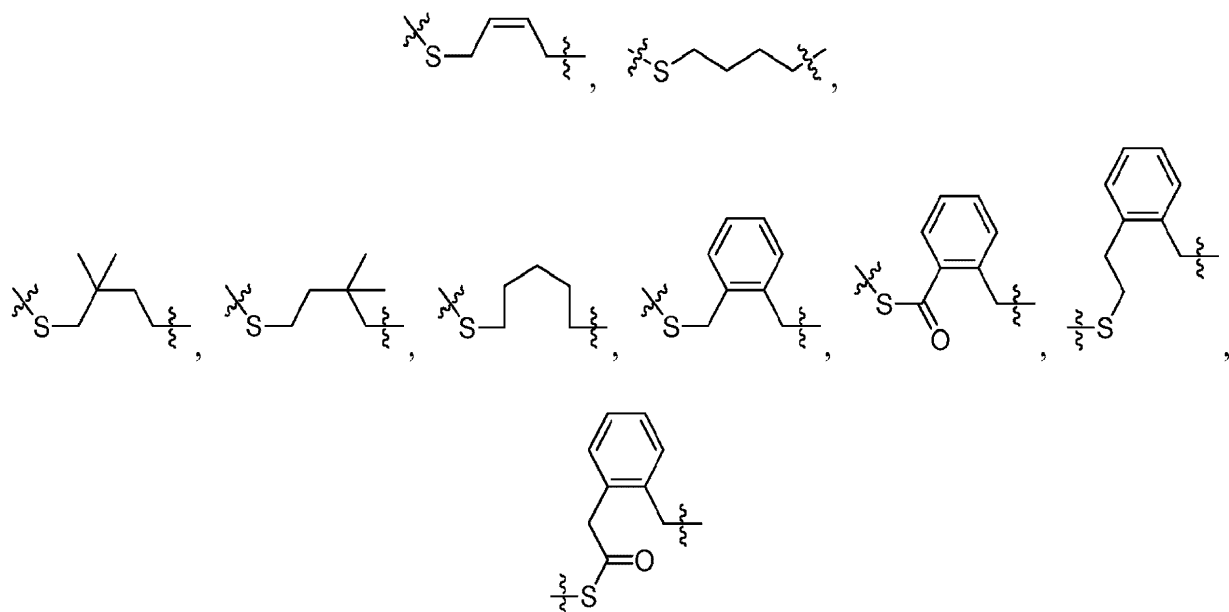
【0283】

いくつかの実施形態において、Lは、共有結合である。いくつかの実施形態において、Lは、任意に置換され、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、Lの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換される。

【0284】

いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^1-V-$ の構造を有し、ここで L^1 は、置換されていてもよい基：

【化 7】

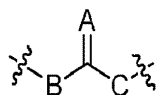


10

$C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、カルボシクリレン、アリーレン、 $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、ヘテロシクリレン、およびヘテロアリーレンから選択され；
 V は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'-$ 、 $C(R')_2$ 、 $-S-S-$ 、 $-B-S-S-C-$ 、

20

【化 8】



、または、 $C_1 \sim C_6$ アルキレン、アリーレン、 $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキレン、ヘテロシクリレン、およびヘテロアリーレンから選択される置換されていてもよい基から選択され；

30

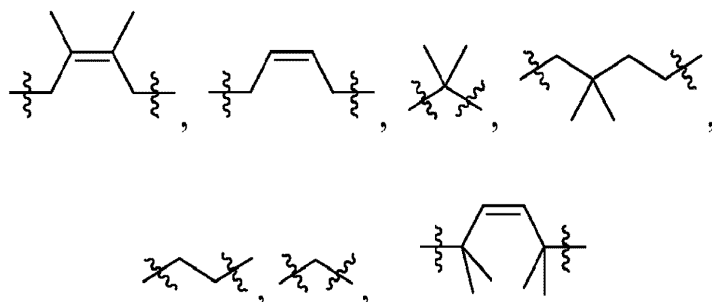
A は、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=NR'$ 、または $=C(R')_2$ であり；

B および C のそれぞれは、独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'-$ 、 $-C(R')_2-$ 、または、 $C_1 \sim C_6$ アルキレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロシクリレン、またはヘテロアリーレンから選択される置換されていてもよい基であり；および各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0285】

いくつかの実施形態において、 L^1 は、

【化 9】



40

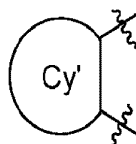
である。

【0286】

いくつかの実施形態において、 L^1 は、

50

【化 1 0】

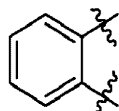


であり、

ここで環 Cy' は、置換されていてもよいアリーレン、カルボシクリレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンである。いくつかの実施形態において、L¹ は、置換されていてもよい

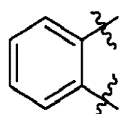
10

【化 1 1】



である。いくつかの実施形態において、L¹ は、

【化 1 2】



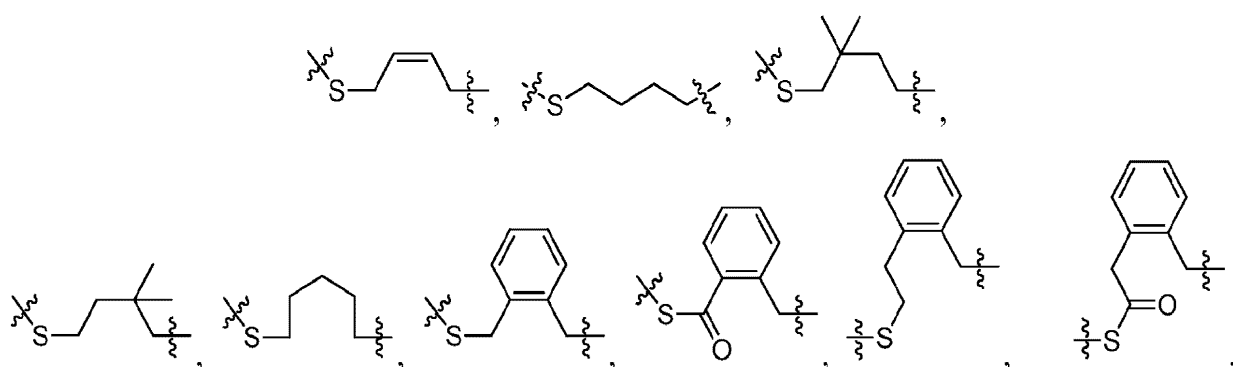
20

である。

【0 2 8 7】

いくつかの実施形態において、L¹ は、X と結合している。である。いくつかの実施形態において、L¹ は、置換されていてもよい基

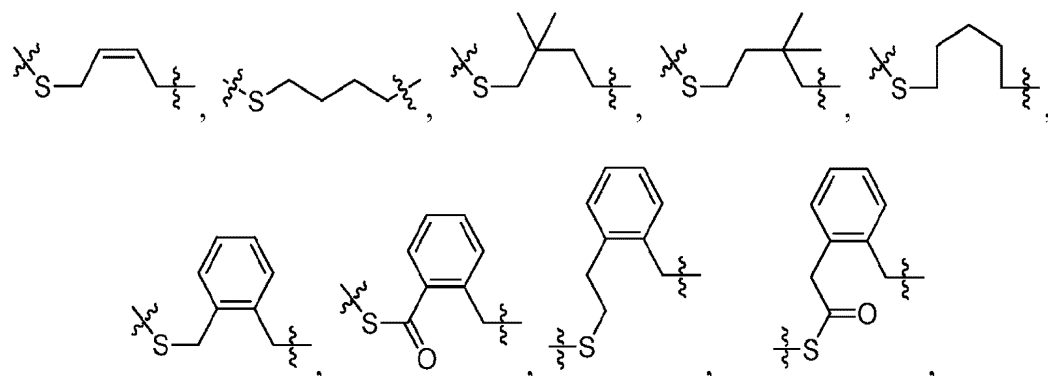
【化 1 3】



30

から選択され、硫黄原子は V に結合されている。いくつかの実施形態において、L¹ は、置換されていてもよい基

【化 1 4】



40

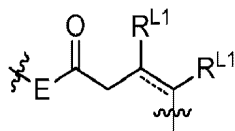
50

から選択され、炭素原子はXに結合されている。

【0288】

いくつかの実施形態では、Lは、

【化15】



の構造を有し、

ここで、

Eは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}'-$ 又は $-\text{C}(\text{R}')_2-$ であり；

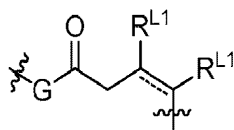
$---$ は単結合又は二重結合であり；

2つの $\text{R}^{\text{L}1}$ は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されていてよいアリール、炭素環式、ヘテロアリール又はヘテロ環式環を形成し；各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0289】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化16】



の構造を有し、

ここで、

Gは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{NR}'$ であり；

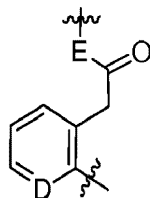
$---$ は単結合又は二重結合であり；および

2つの $\text{R}^{\text{L}1}$ は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されていてよいアリール、 $\text{C}_3 \sim \text{C}_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリール又はヘテロ環式環を形成し。

【0290】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化17】



の構造を有し、

ここでEは、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}'-$ 又は $-\text{C}(\text{R}')_2-$ であり；

Dは、 $=\text{N}-$ 、 $=\text{C}(\text{F})-$ 、 $=\text{C}(\text{Cl})-$ 、 $=\text{C}(\text{Br})-$ 、 $=\text{C}(\text{I})-$ 、 $=\text{C}(\text{CN})-$ 、 $=\text{C}(\text{NO}_2)-$ 、 $=\text{C}(\text{CO}_2-(\text{C}_1 \sim \text{C}_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=\text{C}(\text{CF}_3)-$ であり；および

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0291】

いくつかの実施形態において、Lは、

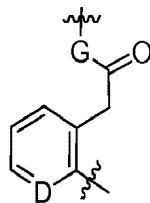
10

20

30

40

【化 1 8】



の構造を有し、

ここで、

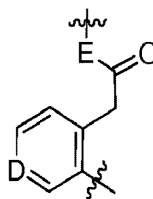
Gは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ である。

【0 2 9 2】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化 1 9】



の構造を有し、

ここで、

Eは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'$ 、又は $-C(R')_2-$ であり；

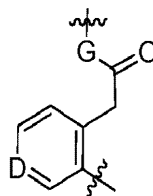
Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 2 9 3】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化 2 0】



の構造を有し、

ここで、

Gは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ である。

【0 2 9 4】

いくつかの実施形態において、Lは、

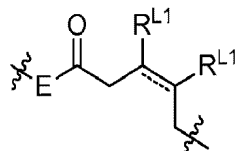
10

20

30

40

【化 2 1】



の構造を有し、

ここで E は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}'-$ 又は $-\text{C}(\text{R}')_2-$ であり；

$---$ は単結合又は二重結合であり；

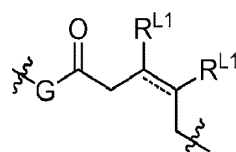
2つの $\text{R}^{\text{L}1}$ は、これらが結合している 2 個の炭素原子と一緒にあって、置換されていて 10
もよいアリール、 $\text{C}_3 \sim \text{C}_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリール又はヘテロ環式環を形成し；

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 2 9 5】

いくつかの実施形態において、L は、

【化 2 2】



20

の構造を有し、

ここで G は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{NR}'$ であり；

$---$ は単結合又は二重結合であり；

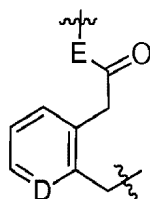
2つの $\text{R}^{\text{L}1}$ は、これらが結合している 2 個の炭素原子と一緒にあって、置換されても良
いアリール、 $\text{C}_3 \sim \text{C}_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリールまたはヘテロ環式環を形成し；

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 2 9 6】

いくつかの実施形態において、L は、

【化 2 3】



30

の構造を有し、

ここで、

E は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}'-$ 又は $-\text{C}(\text{R}')_2-$ であり；

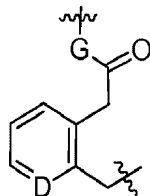
D は、 $=\text{N}-$ 、 $=\text{C}(\text{F})-$ 、 $=\text{C}(\text{Cl})-$ 、 $=\text{C}(\text{Br})-$ 、 $=\text{C}(\text{I})-$ 、 $=\text{C}(\text{CN})-$ 、 $=\text{C}(\text{NO}_2)-$ 、 $=\text{C}(\text{CO}_2-(\text{C}_1 \sim \text{C}_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=\text{C}(\text{CF}_3)-$ であり；および 40

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 2 9 7】

いくつかの実施形態において、L は、

【化 2 4】



の構造を有し、

ここで G は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

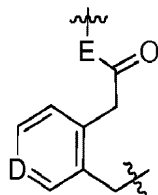
D は、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0298】

いくつかの実施形態において、L は、

【化 2 5】



の構造を有し、

ここで E は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'$ 、または $-C(R')_2-$ であり；

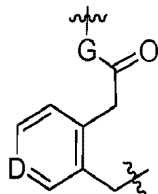
D は、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0299】

いくつかの実施形態において、L は、

【化 2 6】



の構造を有し、

ここで G は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

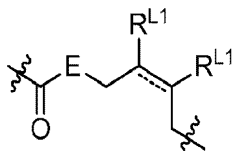
D は、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0300】

いくつかの実施形態において、L は、

【化 2 7】



の構造を有し、

ここで E は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}'-$ 又は $-\text{C}(\text{R}')_2-$ であり；

$-\text{--}-$ は単結合又は二重結合であり；

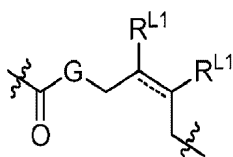
2つの $\text{R}^{\text{L}1}$ は、これらが結合している 2 個の炭素原子と一緒にあって、置換されても良いアリール、 $\text{C}_3 \sim \text{C}_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリールまたはヘテロ環式環を形成し；

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0301】

いくつかの実施形態において、L は、

【化 2 8】



の構造を有し、

ここで G は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{NR}'$ であり；

$-\text{--}-$ は単結合又は二重結合であり；

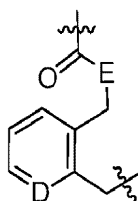
2つの $\text{R}^{\text{L}1}$ は、これらが結合している 2 個の炭素原子と一緒にあって、置換されても良いアリール、 $\text{C}_3 \sim \text{C}_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリールまたはヘテロ環式環を形成し；

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0302】

いくつかの実施形態において、L は、

【化 2 9】



の構造を有し、

ここで E は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}'-$ 又は $-\text{C}(\text{R}')_2-$ であり；

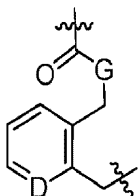
D は、 $=\text{N}-$ 、 $=\text{C}(\text{F})-$ 、 $=\text{C}(\text{Cl})-$ 、 $=\text{C}(\text{Br})-$ 、 $=\text{C}(\text{I})-$ 、 $=\text{C}(\text{CN})-$ 、 $=\text{C}(\text{NO}_2)-$ 、 $=\text{C}(\text{CO}_2-(\text{C}_1 \sim \text{C}_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=\text{C}(\text{CF}_3)-$ であり；および

各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0303】

いくつかの実施形態において、L は、

【化 3 0】



10

20

30

40

50

の構造を有し、

ここで、

Gは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

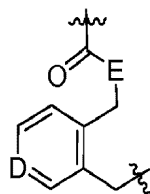
R'は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0304】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化31】

10



の構造を有し、

ここで、

Eは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR'$ 、または $-C(R')_2-$ であり；

Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

20

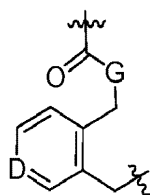
各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0305】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化32】

30



の構造を有し、

ここで、

Gは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NR'$ であり；

Dは、 $=N-$ 、 $=C(F)-$ 、 $=C(Cl)-$ 、 $=C(Br)-$ 、 $=C(I)-$ 、 $=C(CN)-$ 、 $=C(NO_2)-$ 、 $=C(CO_2-(C_1 \sim C_6 \text{ 脂肪族}))-$ 、または $=C(CF_3)-$ であり；および

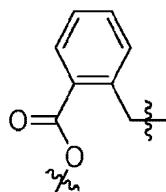
R'は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0306】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化33】

40



の構造を有し、

ここで、フェニル環は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、フェニル

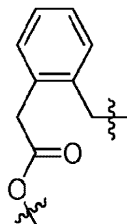
50

環は、置換されない。いくつかの実施形態において、フェニル環は、置換される。

【0307】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化34】



10

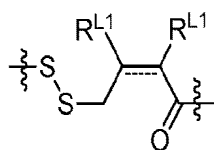
の構造を有し、

ここで、フェニル環は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、フェニル環は、置換されない。いくつかの実施形態において、フェニル環は、置換される。

【0308】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化35】



20

の構造を有し、

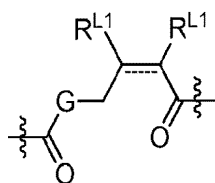
ここで- - -は単結合又は二重結合であり；および

2つの R^{L1} は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されていてもよいアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリール又はヘテロ環式環を形成する。

【0309】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化36】



30

の構造を有し、

ここで、

Gは、-O-、-S-、または-NR'であり；

- - -は単結合又は二重結合であり；および

2つの R^{L1} は、これらが結合している2個の炭素原子と一緒にあって、置換されてもよいアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ 炭素環式、ヘテロアリールまたはヘテロ環式環を形成する。

40

【0310】

一般的に上記およびここに記載される通り、Eは、-O-、-S-、-NR'-または-C(R')₂-であり、各R'は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、Eは、-O-、-S-、または-NR'-である。いくつかの実施形態において、Eは、-O-、-S-、または-NH-である。いくつかの実施形態において、Eは、-O-である。いくつかの実施形態において、Eは、-S-である。いくつかの実施形態において、Eは、-NH-である。

【0311】

一般的に上記およびここに記載される通り、Gは、-O-、-S-、または-NR'で

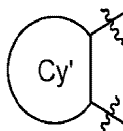
50

あり、各 R' は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 G は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、または $-NH-$ である。いくつかの実施形態において、 G は、 $-O-$ である。いくつかの実施形態において、 G は、 $-S-$ である。いくつかの実施形態において、 G は、 $-NH-$ である。

【0312】

いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^3-G-$ であり、ここで L^3 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_5$ アルキレンまたはアルケニレンであり、1以上のメチレン単位は、任意におよび独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または

【化37】



により置換され、

G および R' のそれぞれおよび環 Cy' は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

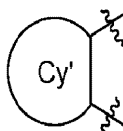
【0313】

いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^3-S-$ であり、 L^3 は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^3-O-$ であり、 L^3 は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^3-N(R')$ であり、ここで L^3 および R' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 L は、 $-L^3-NH-$ であり、 L^3 および R' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0314】

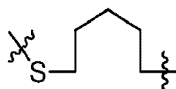
いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_5 アルキレンまたはアルケニレンであり、1以上のメチレン単位は、任意におよび独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または

【化38】



により置換され、 R' および環 Cy' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_5 アルキレンである。いくつかの実施形態において、 $-L^3-G-$ は、

【化39】



である。

【0315】

いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_4 アルキレンまたはアルケニレンであり、1以上のメチレン単位は、任意におよび独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または

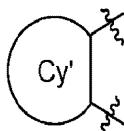
10

20

30

40

【化 4 0】

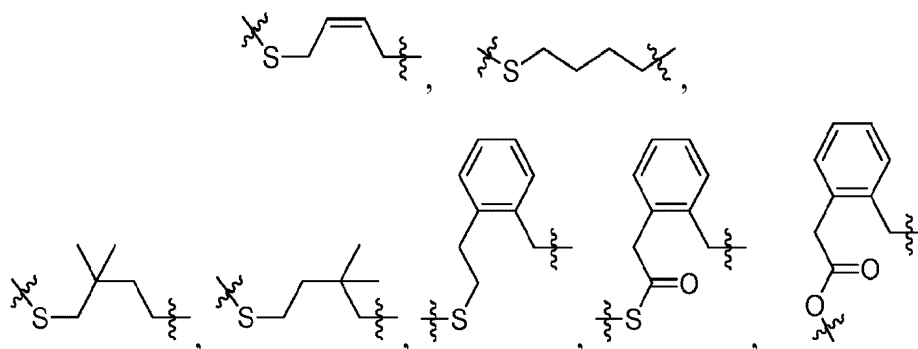


により置換され、 R' および Cy' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 3 1 6】

いくつかの実施形態において、 $-L^3-G-$ は、

【化 4 1】

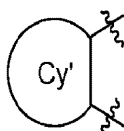


である。

【0 3 1 7】

いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_3 アルキレンまたはアルケニレンであり、1 以上のメチレン単位は、任意におよび独立して $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または

【化 4 2】

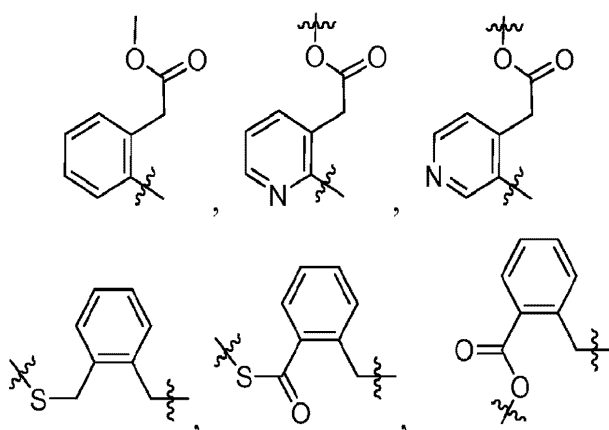


により置換され、 R' および Cy' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 3 1 8】

いくつかの実施形態において、 $-L^3-G-$ は、

【化 4 3】



である。

【0 3 1 9】

10

20

30

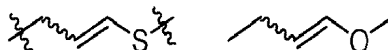
40

50

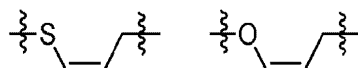
いくつかの実施形態において、Lは、
【化44】



である。いくつかの実施形態において、Lは、
【化45】



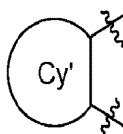
である。いくつかの実施形態において、Lは、
【化46】



である。

【0320】

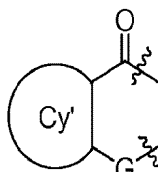
いくつかの実施形態において、 L^3 は、置換されていてもよい C_2 は、アルキレンまたはアルケニレンであり、1以上のメチレン単位は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または
【化47】



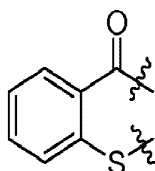
により任意におよび独立して置換され、 R' および Cy' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0321】

いくつかの実施形態において、 $-L^3-G-$ は、
【化48】



であり、Gおよび Cy' のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、Lは、
【化49】



である。

【0322】

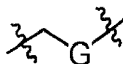
いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_2$ アルキレンである；およびGは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_2$ アルキレンである；Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである；Gは、 R^1 に結合されている。いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、置換されていてもよいメチレンである；Gは、上記のとおり

定義し、ここに記載したとおりである；およびGは、 R^1 と結合している。いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、メチレンである；Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである；およびGは、 R^1 と結合している。いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、置換されていてもよい $-(CH_2)_2-$ である；Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである；およびGは、 R^1 と結合している。いくつかの実施形態において、Lは、 $-L^4-G-$ であり、 L^4 は、 $-(CH_2)_2-$ である；Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである；およびGは、 R^1 と結合している。

【0323】

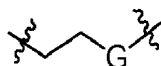
いくつかの実施形態において、Lは、
【化50】

10



または

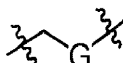
【化51】



であり、ここで、Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりであり、Gは、 R^1 に結合されている。いくつかの実施形態において、Lは、

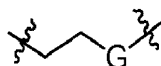
20

【化52】



であり、Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりであり、Gは、 R^1 に結合されている。いくつかの実施形態において、Lは、

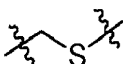
【化53】



30

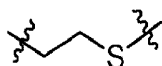
であり、Gは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりであり、Gは、 R^1 に結合されている。いくつかの実施形態において、Lは、

【化54】



または

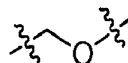
【化55】



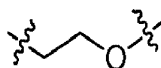
40

であり、ここで硫黄原子は、 R^1 に結合されている。いくつかの実施形態において、Lは、

【化56】



または

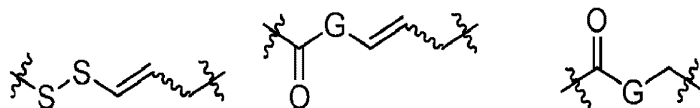


であり、ここで酸素原子は、 R^1 に結合されている。

【0324】

いくつかの実施形態において、 L は、

【化57】



10

であり、 G は、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0325】

いくつかの実施形態において、 L は、 $-S-R^{L3}-$ または $-S-C(O)-R^{L3}-$ であり、 R^{L3} は、任意に置換され、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_9$ アルキレンであり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、ここで、 R' および $-Cy-$ のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 L は、 $-S-R^{L3}-$ または $-S-C(O)-R^{L3}-$ であり、 R^{L3} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレンである。いくつかの実施形態において、 L は、 $-S-R^{L3}-$ または $-S-C(O)-R^{L3}-$ であり、 R^{L3} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルケニレンである。いくつかの実施形態において、 L は、 $-S-R^{L3}-$ または $-S-C(O)-R^{L3}-$ であり、 R^{L3} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレンであり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、アリーレン、またはヘテロアリーレンにより任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、いくつかの実施形態において、 R^{L3} は、置換されていてもよい $-S-(C_1 \sim C_6 \text{ アルケニレン})-$ 、 $-S-(C_1 \sim C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-S-(C_1 \sim C_6 \text{ アルキレン})-\text{アリーレン}-(C_1 \sim C_6 \text{ アルキレン})-$ 、 $-S-CO-\text{アリーレン}-(C_1 \sim C_6 \text{ アルキレン})-$ 、または $-S-CO-(C_1 \sim C_6 \text{ アルキレン})-\text{アリーレン}-(C_1 \sim C_6 \text{ アルキレン})-$ である。

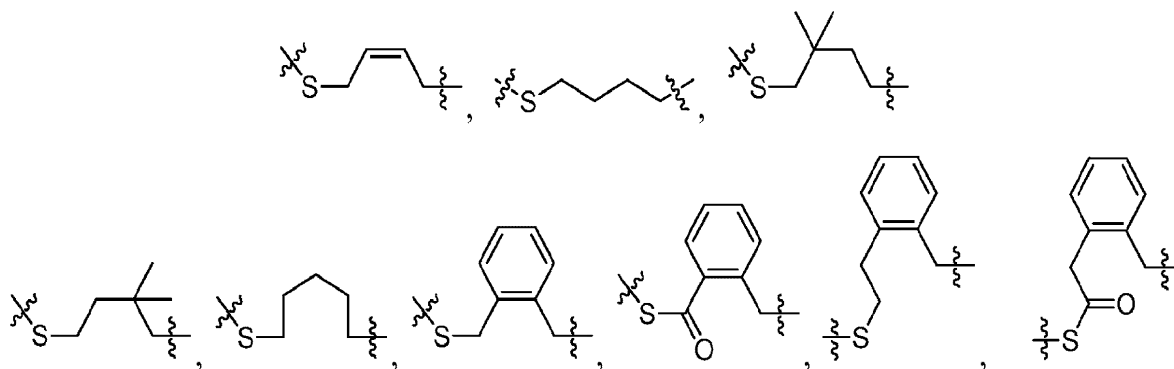
20

30

【0326】

いくつかの実施形態において、 L は、

【化58】



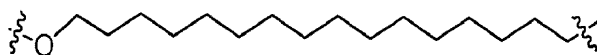
40

である。

【0327】

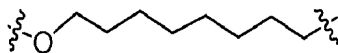
50

いくつかの実施形態において、Lは、
【化59】



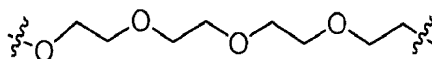
である。

いくつかの実施形態において、Lは、
【化60】



である。

いくつかの実施形態において、
【化61】



である。

【0328】

いくつかの実施形態において、上記およびここに記載する実施形態におけるLの硫黄原子は、Xと結合している。いくつかの実施形態において、上記およびここに記載する実施形態におけるLの硫黄原子は、 R^1 に結合されている。

【0329】

一般的に上記およびここに記載される通り、 R^1 は、ハロゲン、R、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、ハロゲン、R、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0330】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、水素である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、ハロゲンである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $-F$ である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $-Cl$ である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $-Br$ である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $-I$ である。

【0331】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、Rであり、Rは、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0332】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、水素である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $C_1 \sim C_{50}$ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、ま

10

20

30

40

50

たはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基である。

【0333】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 脂肪族である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ 脂肪族である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ 脂肪族である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、任意に置換され、直鎖または分岐のヘキシルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、任意に置換され、直鎖または分岐のペンチルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、任意に置換され、直鎖または分岐のブチルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、任意に置換され、直鎖または分岐のプロピルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいエチルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいメチルである。

10

【0334】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいフェニルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されたフェニルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、フェニルである。

【0335】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいカルボシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい単環式カルボシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロヘプチルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロヘキシルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロペンチルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロブチルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいシクロプロピルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい2環式カルボシクリルである。

20

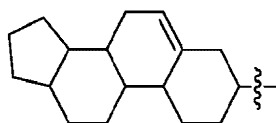
【0336】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 多環式炭化水素である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 多環式炭化水素であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい

30

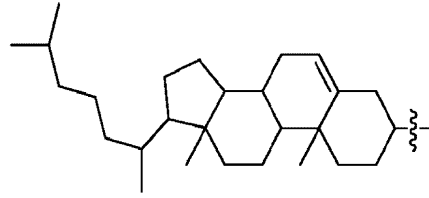
40

【化62】



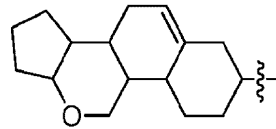
である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、

【化 6 3】



である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい

【化 6 4】

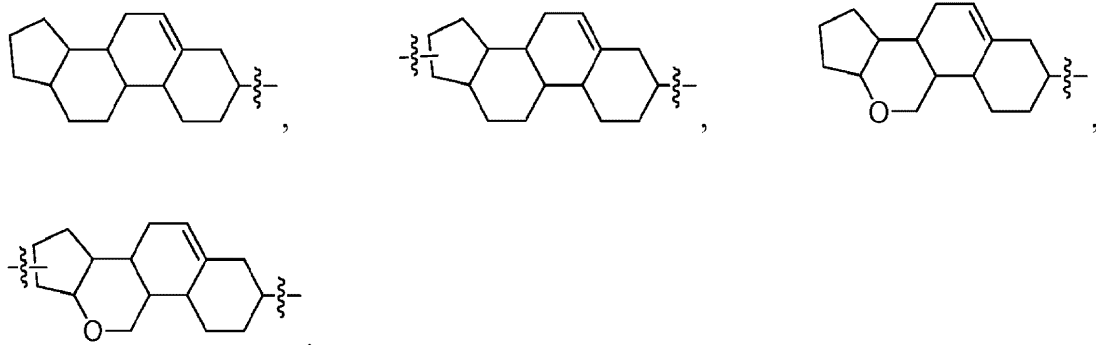


である。

【0 3 3 7】

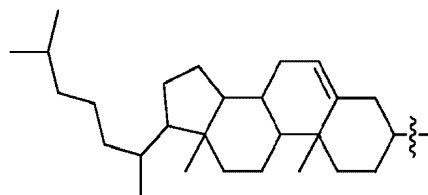
いくつかの実施形態において、 R^1 は、1 以上の、置換されていてもよい多環式炭化水素部分を含む置換されていてもよい $C_{1} \sim C_{50}$ 脂肪族である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、1 以上の、置換されていてもよい多環式炭化水素部分を含む置換されていてもよい $C_{1} \sim C_{50}$ 脂肪族であり、1 以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_{1} \sim C_{6}$ アルキレン、 $C_{1} \sim C_{6}$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、1 以上の、置換されていてもよい $C_{1} \sim C_{50}$ 脂肪族

【化 6 5】



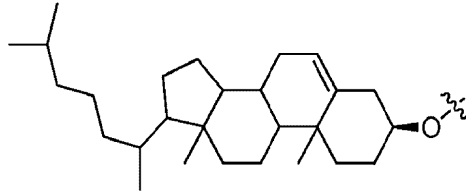
を含む。いくつかの実施形態において、 R^1 は、

【化 6 6】



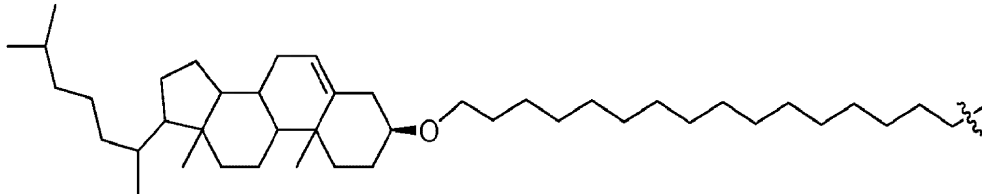
である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、

【化 6 7】



である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、

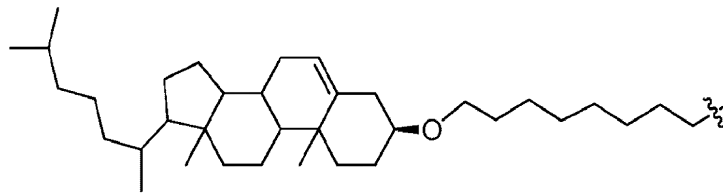
【化 6 8】



10

である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、

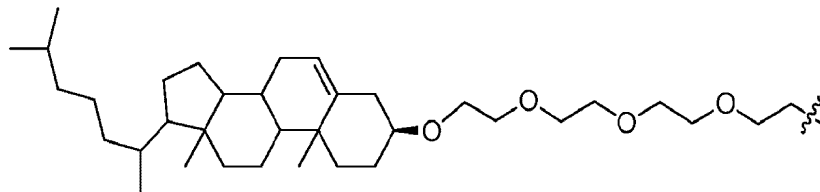
【化 6 9】



20

である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、

【化 7 0】



30

である。

【0 3 3 8】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいアリールである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい 2 環式アリール環である。

【0 3 3 9】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいヘテロアリールである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、硫黄、または酸素から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 5～6 員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する置換された 5～6 員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、硫黄、または酸素から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する非置換の 5～6 員単環式ヘテロアリール環である。

40

【0 3 4 0】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素または硫黄から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 5 員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1～3 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 6 員単環式ヘテロアリール環である。

【0 3 4 1】

50

いくつかの実施形態において、 R^1 は、窒素、酸素または硫黄から選択される 1 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 5 員単環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、ピロリル、フラニル、またはチエニルから選択される。

【0342】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、窒素、酸素、または硫黄から独立して選択される 2 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 5 員ヘテロアリール環である。ある特定の実施形態において、 R^1 は、1 個の窒素原子を有する置換されていてもよい 5 員ヘテロアリール環であり、さらなるヘテロ原子は、硫黄または酸素から選択される。例示的な R^1 基は、置換されていてもよいピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリルまたはイソオキサゾリルを含む。

10

【0343】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、1～3 個の窒素原子を有する 6 員ヘテロアリール環である。別の実施形態において、 R^1 は、1～2 個の窒素原子を有する置換されていてもよい 6 員ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、2 個の窒素原子を有する置換されていてもよい 6 員ヘテロアリール環である。ある特定の実施形態において、 R^1 は、1 個の窒素を有する置換されていてもよい 6 員ヘテロアリール環である。例示的な R 基は、置換されていてもよいピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、またはテトラジニルである。

【0344】

ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 8～10 員 2 環式ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 5, 6-縮合ヘテロアリール環である。別の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1～2 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 5, 6-縮合ヘテロアリール環である。ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 5, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいインドリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいアザビシクロ [3.2.1] オクタニルである。ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 2 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 5, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいアザインドリル (azaindoly) である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいベンズイミダゾリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいベンゾチアゾリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいベンゾオキサゾリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいインダゾリルである。ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 3 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 5, 6-縮合ヘテロアリール環である。

20

30

【0345】

ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 6, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1～2 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 6, 6-縮合ヘテロアリール環である。別の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 1 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 6, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいキノリニルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいイソキノリニルである。ある態様によれば、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される 2 個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい 6, 6-縮合ヘテロアリール環である。いくつかの実施

40

50

形態において、 R^1 は、キナゾリンまたはキノキサリンである。

【0346】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいヘテロシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい3～7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換された3～7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する非置換の3～7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。

10

【0347】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいヘテロシクリルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい6員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい部分的に不飽和の6員ヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、2個の酸素原子を有する置換されていてもよい部分的に不飽和の6員ヘテロ環式環である。

【0348】

ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する3～7員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。ある特定の実施形態において、 R^1 は、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、オキセパニル、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ペペリジニル、アゼパニル、チイラニル、チエタニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、チエパニル、ジオキサラニル、オキサチオラニル、オキサゾリジニル、イミダゾリジニル、チアゾリジニル、ジチオラニル、ジオキサニル、モルホリニル、オキサチアニル、ペペラジニル、チオモルホリニル、ジチアニル、ジオキセパニル、オキサゼパニル、オキサチエパニル、ジチエパニル、ジアゼパニル、ジヒドロフランニル、テトラヒドロピラノニル、オキセパノニル、ピロリジノニル、ペペリジノニル、アゼパノニル、ジヒドロチオフェノニル、テトラヒドロチオピラノニル、チエパノニル、オキサゾリジノニル、オキサジナノニル、オキサゼパノニル、ジオキサラノニル、ジオキサノニル、ジオキセパノニル、オキサチオリノニル、オキサチアノニル、オキサチエパノニル、チアゾリジノニル、チアジナノニル、チアゼパノニル、イミダゾリジノニル、テトラヒドロピリミジノニル、ジアゼパノニル、イミダゾリジンジオニル、オキサゾリジンジオニル、チアゾリジンジオニル、ジオキサランジオニル、オキサチオランジオニル、ペペラジンジオニル、モルホリンジオニル、チオモルホリンジオニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ペペリジニル、ペペラジニル、ピロリジニル、テトラヒドロチオフェニル、またはテトラヒドロチオピラニルである。いくつかの実施形態において、 R は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5員飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。

20

30

40

【0349】

ある特定の実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～2個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい5～6員部分的に不飽和の単環式環である。ある特定の実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいテトラヒドロピリジニル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロオキサゾリル、またはオキサゾリニル基である。

【0350】

50

いくつかの実施形態において、 R^1 は、独立して窒素、酸素、または硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する置換されていてもよい8～10員2環式飽和または部分的に不飽和のヘテロ環式環である。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいインドリニルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよいイソインドリニルである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい1、2、3、4-テトラヒドロキノリンである。いくつかの実施形態において、 R は、置換されていてもよい1、2、3、4-テトラヒドロイソキノリンである。

【0351】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、任意の $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により、任意におよび独立して置換され、各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0352】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、

10

20

30

[illegible]

10

20



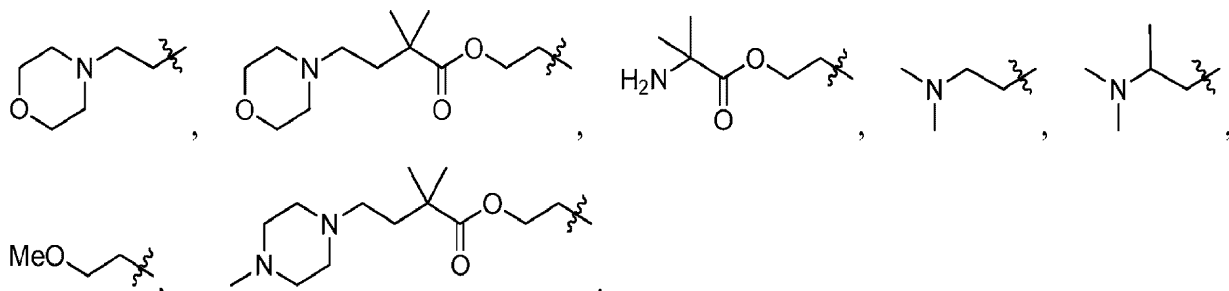
40



【0354】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、 L に結合された置換されていてもよい $-(CH_2)_2-$ 部分を有する末端を含む。そのような例示的な R^1 基は、下記の通りである：

【化73】

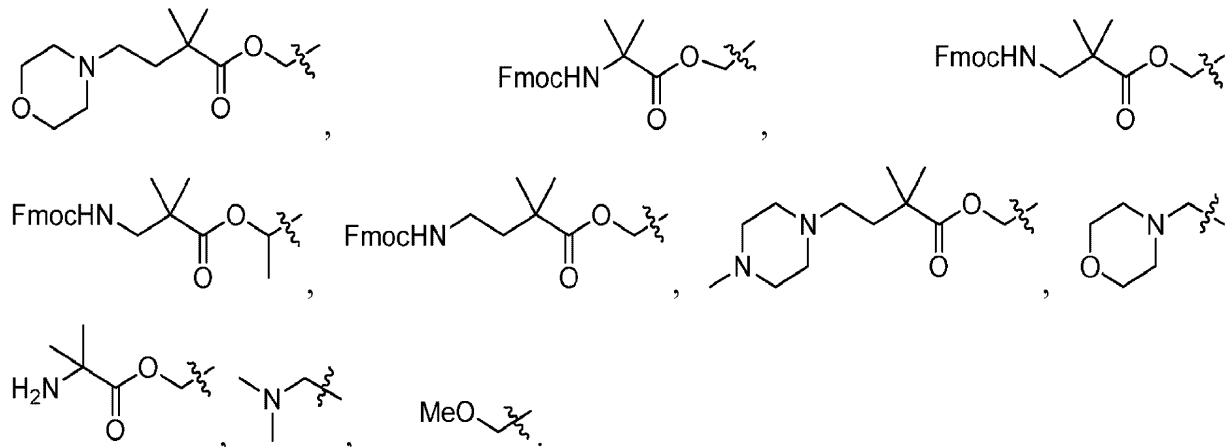


10

【0355】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、 L に結合され、置換されていてもよい置換されていてもよい $-(CH_2)-$ 部分を含む。そのような例示的な R^1 基は、下記の通りである：

【化74】



20

30

【0356】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $-S-R^{L2}$ であり、 R^{L2} は、であり、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、 R' および $-Cy-$ のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $-S-R^{L2}$ であり、硫黄原子は、 L 基の硫黄原子と結合される。

40

【0357】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $-C(O)-R^{L2}$ であり、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')$ 、 $-S(O)$

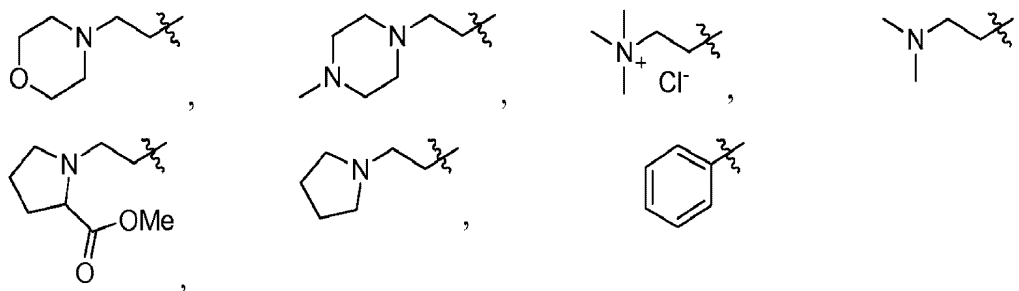
50

) -、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、 R' および $-Cy-$ のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $-C(O)-R^{L2}$ であり、カルボニル基は、 L 基の G と結合される。いくつかの実施形態において、 R^1 は、 $-C(O)-R^{L2}$ であり、カルボニル基は、 L 基の硫黄原子と結合される。

【0358】

いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族である。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ アルキルである。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ アルケニルである。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、任意におよび独立して $-Cy-$ または $-C(O)-$ により置換される。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、 $-Cy-$ により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいヘテロシレンにより任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよいアリーレンにより任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、以上のメチレン単位は、置換されていてもよいヘテロアリーレンにより任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリレンにより任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、2つのメチレン単位は、 $-Cy-$ または $-C(O)-$ により任意におよび独立して置換される。いくつかの実施形態において、 R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、2つのメチレン単位は、 $-Cy-$ または $-C(O)-$ により任意におよび独立して置換される。例示的な R^{L2} 基は、下記の通りである：

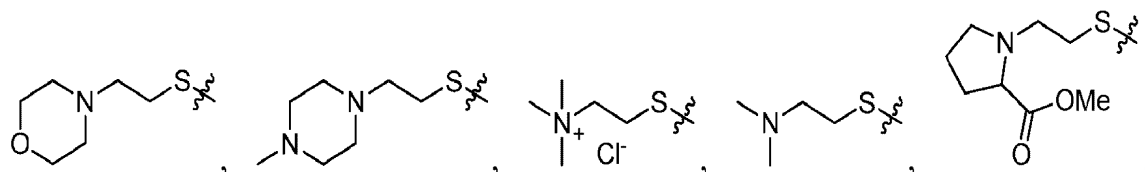
【化75】

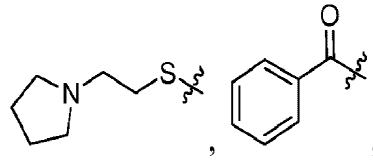


【0359】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、水素であり、または、置換されていてもよい基

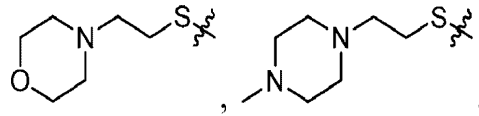
【化76】



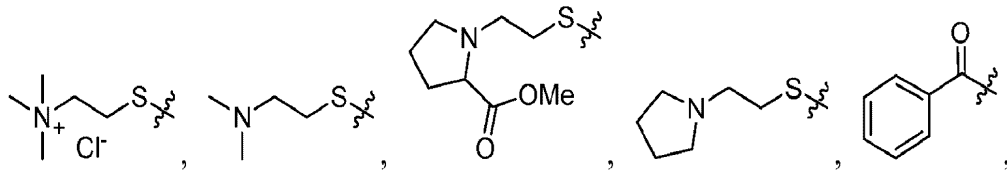


—S—(C₁～C₁₀ 脂肪族)、C₁～C₁₀ 脂肪族、アリール、C₁～C₆ ヘテロアルキル、ヘテロアリールおよびヘテロシクリルから選択される。いくつかの実施形態において、R¹ は、

【化 7 7】

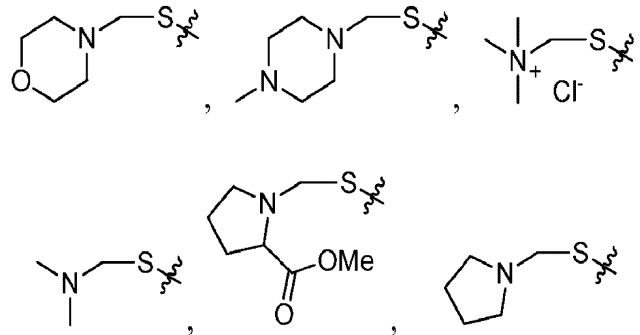


10



または—S—(C₁～C₁₀ 脂肪族)である。いくつかの実施形態において、R¹ は、

【化 7 8】



20

である。

30

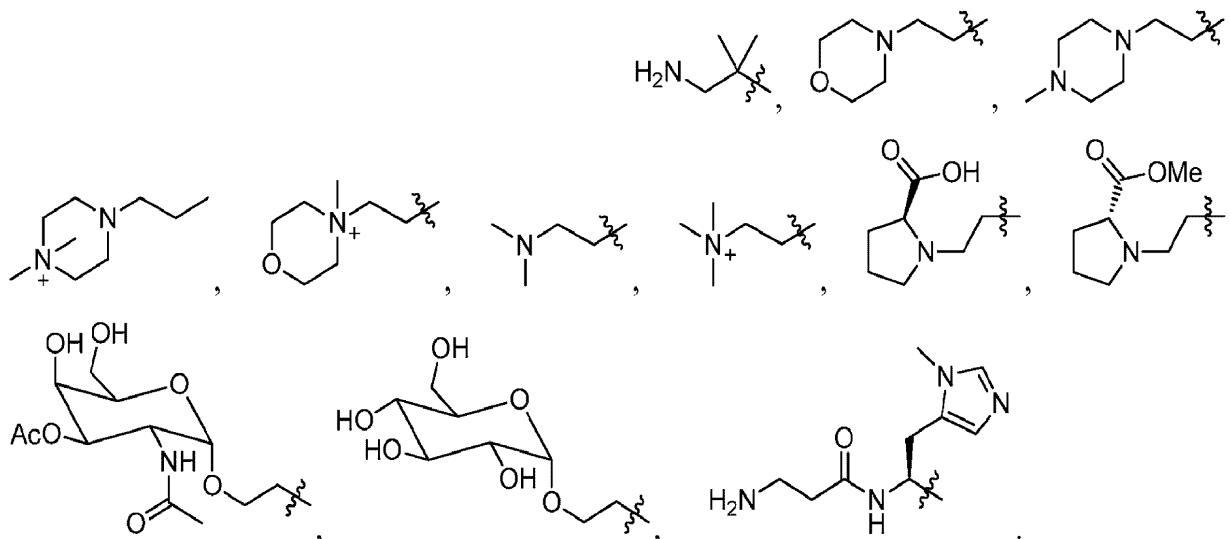
【0 3 6 0】

いくつかの実施形態において、R¹ は、—S—(C₁～C₆ 脂肪族)、C₁～C₁₀ 脂肪族、C₁～C₆ ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールから選択される置換されていてもよい基である。

【0 3 6 1】

いくつかの実施形態において、R¹ は、

【化 7 9】



10

である。

【0362】

いくつかの実施形態において、上記およびここに記載した R^1 の実施形態の硫黄原子は、上記およびここに記載した L の実施形態の硫黄原子、 G 、 E 、または $-C(O)-$ 部分に結合されている。いくつかの実施形態において、上記およびここに記載した R^1 の実施形態の $-C(O)-$ 部分は、上記およびここに記載した L の実施形態の硫黄原子、 G 、 E 、または $-C(O)-$ 部分と結合されている。

20

【0363】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、上記およびここに記載した L の実施形態および R^1 の実施形態組み合わせのいずれかである。

【0364】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-L^3-G-R^1$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0365】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-L^4-G-R^1$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

30

【0366】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-L^3-G-S-R^{L2}$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0367】

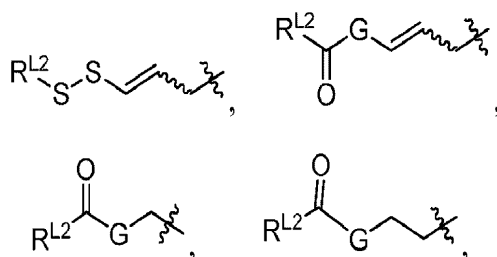
いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-L^3-G-C(O)-R^{L2}$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0368】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

40

【化 8 0】



であり、ここで R^{L2} は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_9$ 脂肪族であり、1以上のメチ

50

レン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-C_y-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され、各Gは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0369】

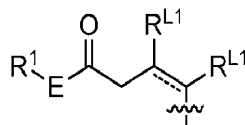
いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-R^{L3}-S-S-R^{L2}$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、 $-R^{L3}-C(O)-S-S-R^{L2}$ であり、ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

10

【0370】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化81】



20

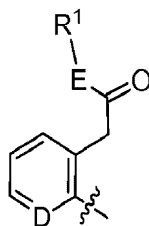
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0371】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化82】



30

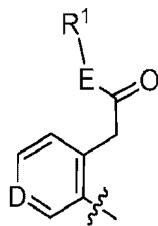
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0372】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化83】



40

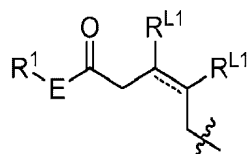
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0373】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 8 4】



の構造を有し、

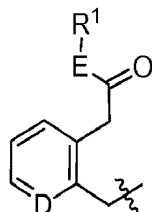
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 3 7 4】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

10

【化 8 5】



の構造を有し、

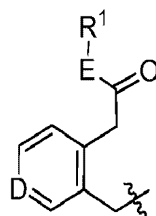
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 3 7 5】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

20

【化 8 6】



の構造を有し、

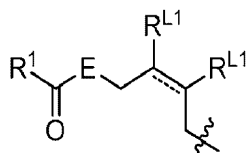
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

30

【0 3 7 6】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 8 7】



の構造を有し、

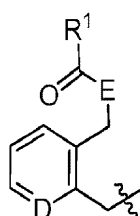
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

40

【0 3 7 7】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 8 8】



の構造を有し、

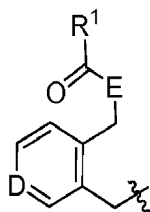
50

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0378】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化89】



10

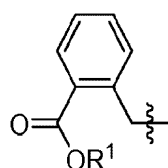
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0379】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化90】



20

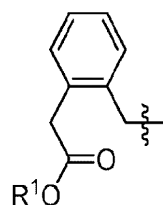
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0380】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化91】



30

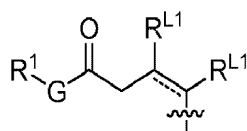
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0381】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化92】



40

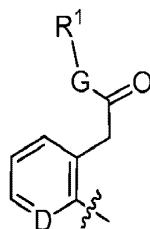
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0382】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 9 3】



の構造を有し、

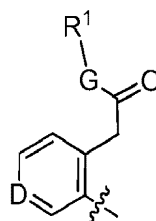
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

10

【0383】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 9 4】



の構造を有し、

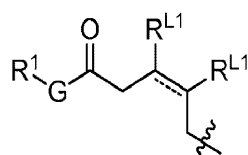
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

20

【0384】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 9 5】



の構造を有し、

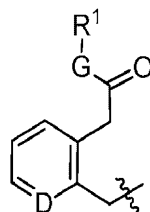
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

30

【0385】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 9 6】



の構造を有し、

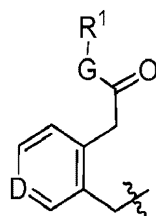
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

40

【0386】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 9 7】



の構造を有し、

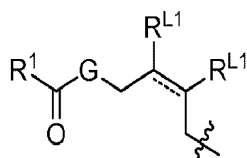
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0387】

10

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 9 8】



の構造を有し、

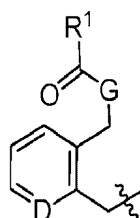
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0388】

20

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 9 9】



の構造を有し、

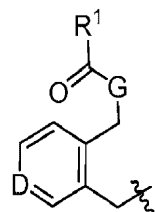
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0389】

30

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 100】



の構造を有し、

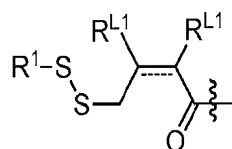
ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0390】

40

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 101】



の構造を有し、

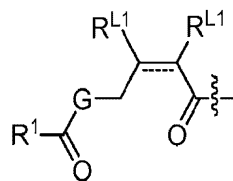
50

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0391】

いくつかの実施形態において、Lは、

【化102】



10

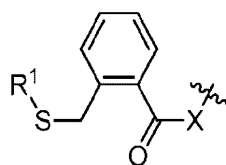
の構造を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0392】

いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

【化103】



20

の構造を有し、

ここでフェニル環は、置換されていてもよく、および

R^1 および X のそれぞれは、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

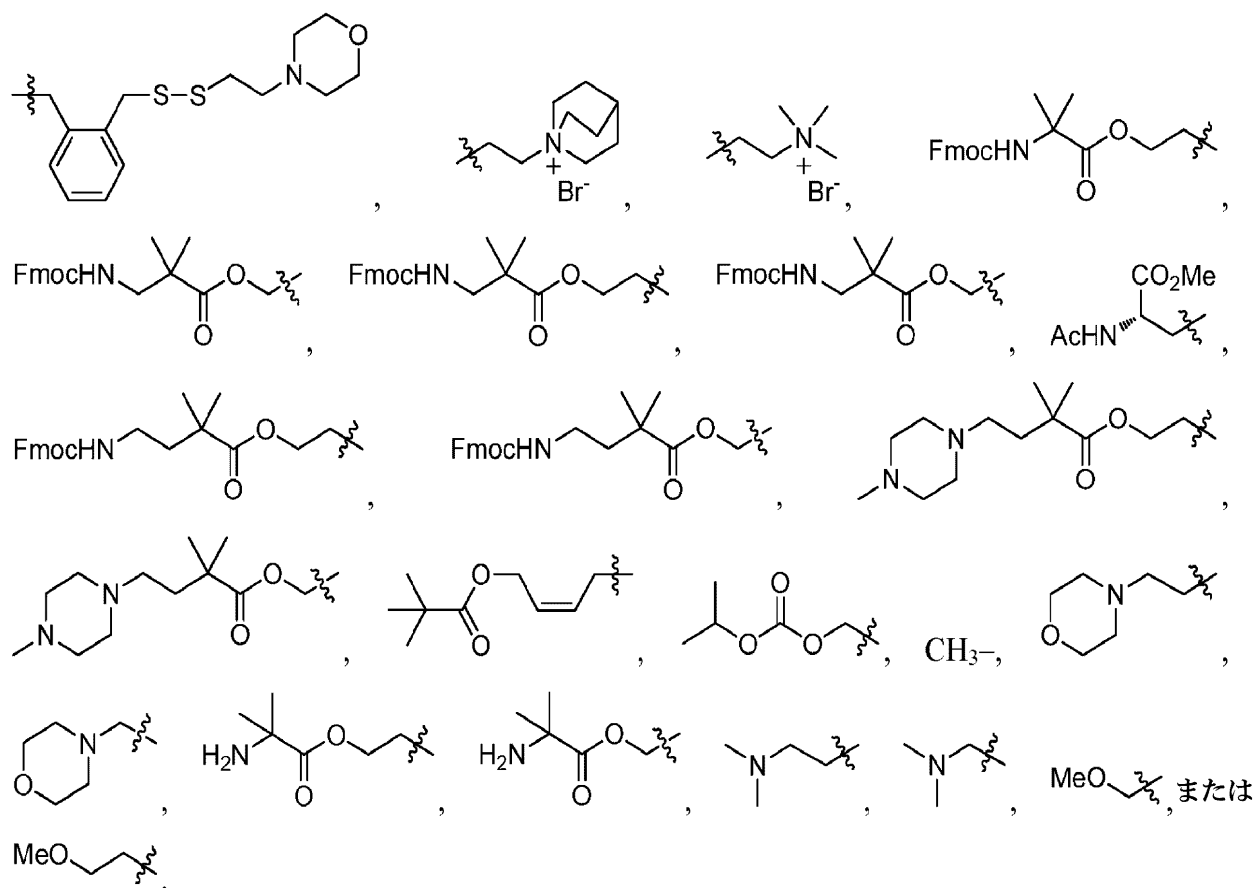
【0393】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

10



30



10

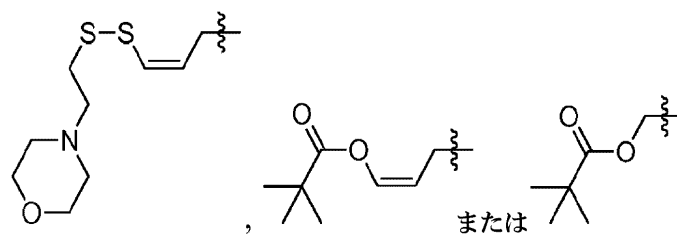
20

である。

【0394】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化105】



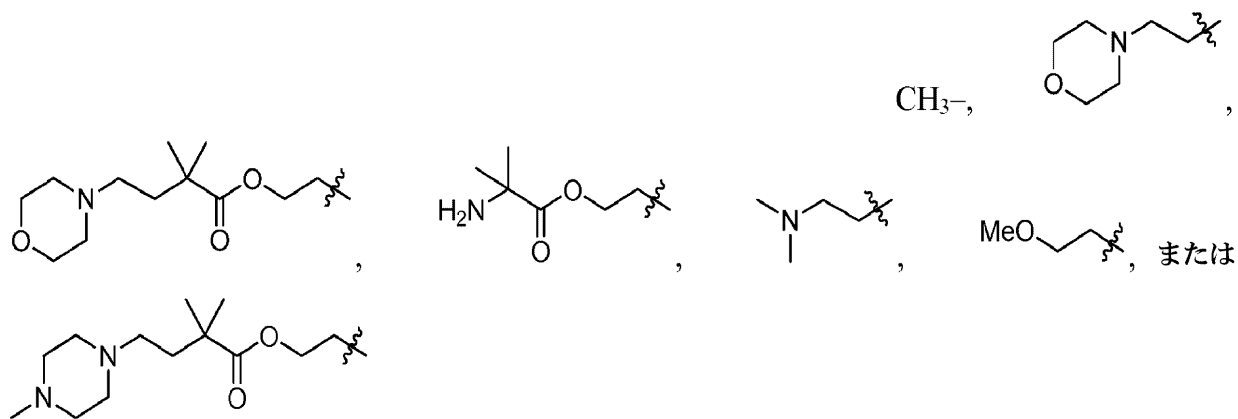
30

である。

【0395】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

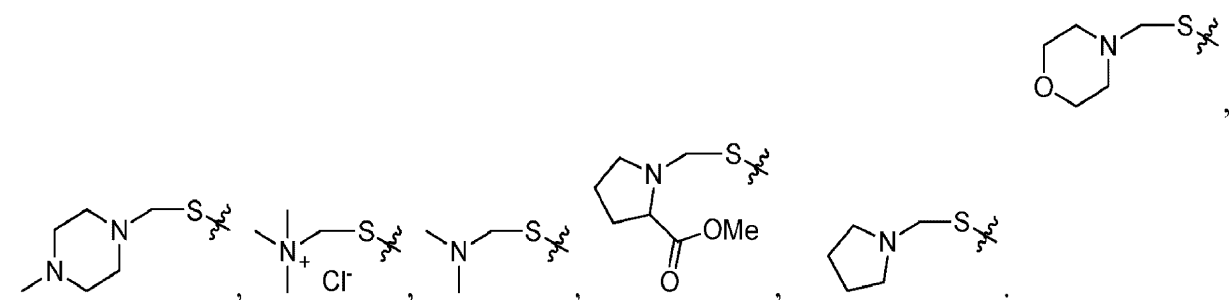
【化 106】



10

である。いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 107】



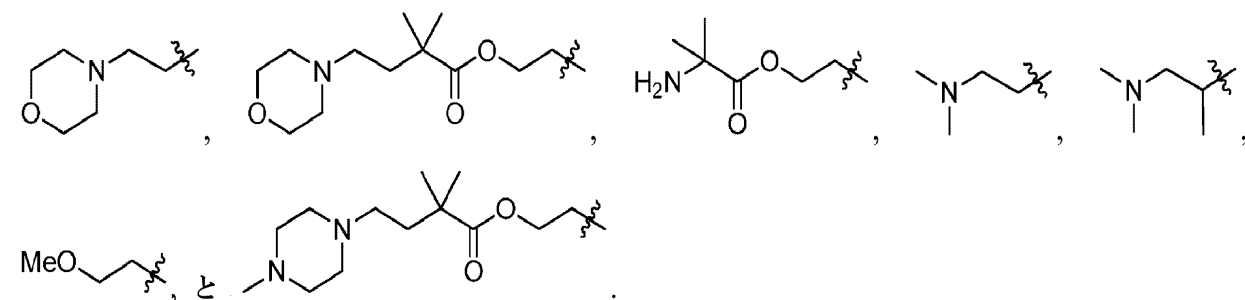
20

である。

【0396】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、Xに結合された置換されていてもよい $-(CH_2)_2$ 一部分の末端を含む。いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、Xに結合された $-(CH_2)_2$ 一部分の末端を含む。そのような例示的な $-L-R^1$ 部分は、下記の通りである：

【化 108】



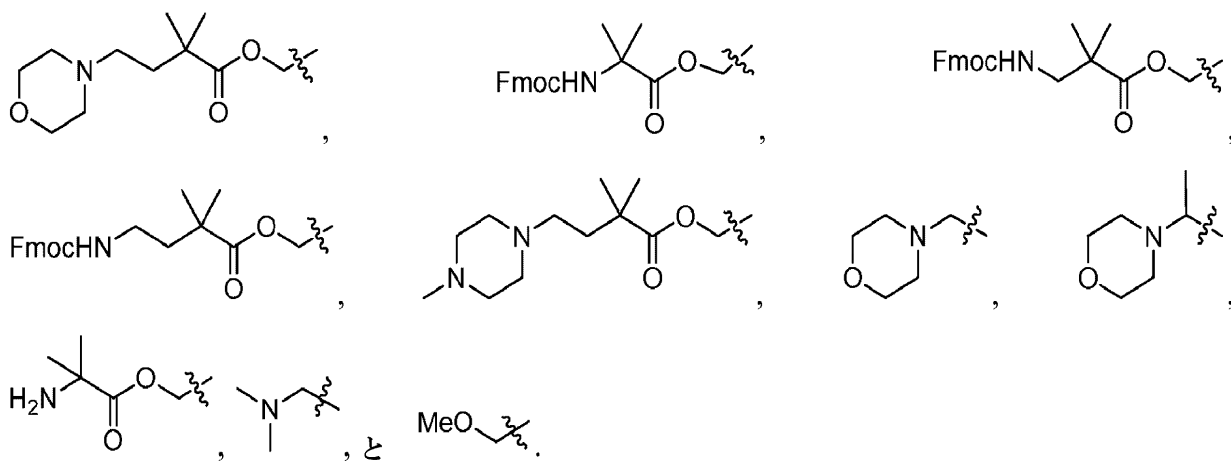
30

【0397】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、Xに結合された置換されていてもよい $-(CH_2)_2$ 一部分の末端を含む。いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、Xに結合された $-(CH_2)_2$ 一部分の末端を含む。そのような例示的な $-L-R^1$ 部分は、下記の通りである：

40

【化 1 0 9】



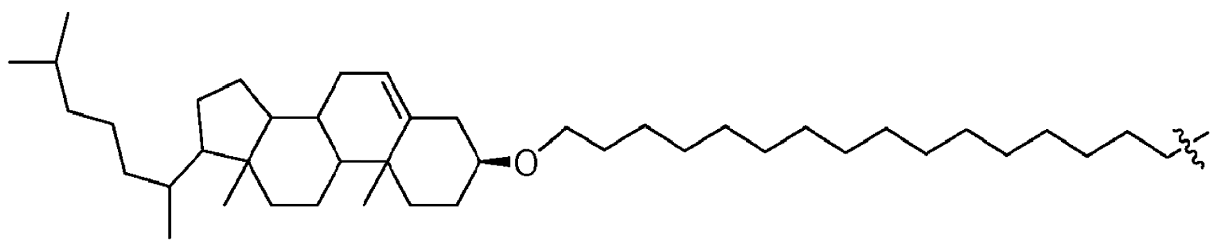
10

。

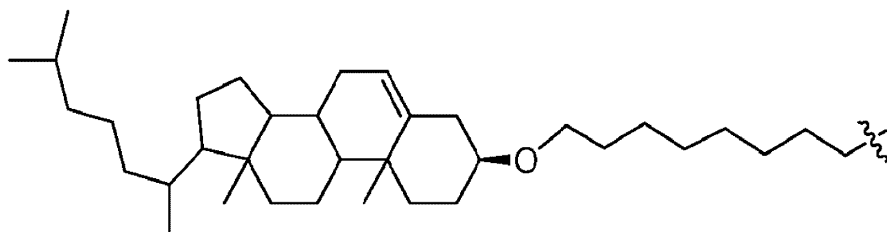
【 0 3 9 8】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 1 1 0】

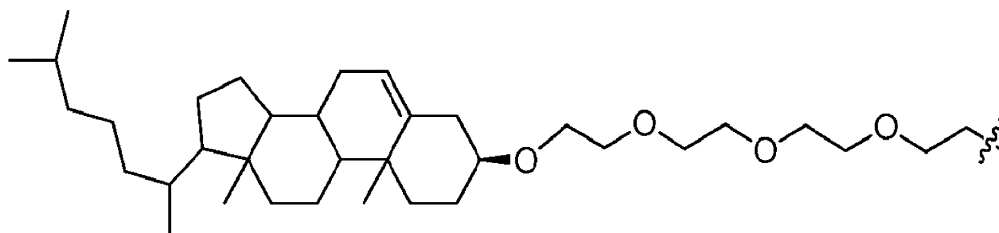


20



30

, または



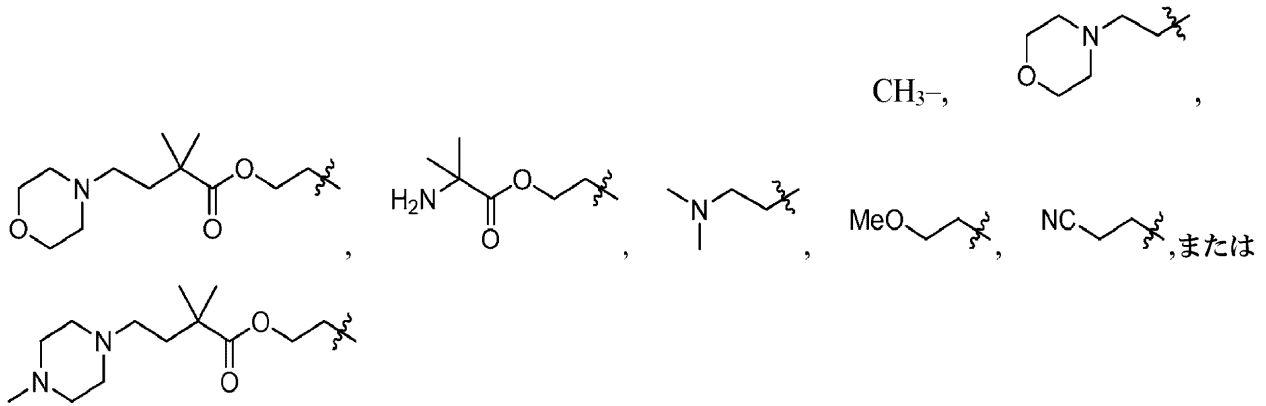
40

である。

【 0 3 9 9】

いくつかの実施形態において、 $-L-R^1$ は、

【化 1 1 1】



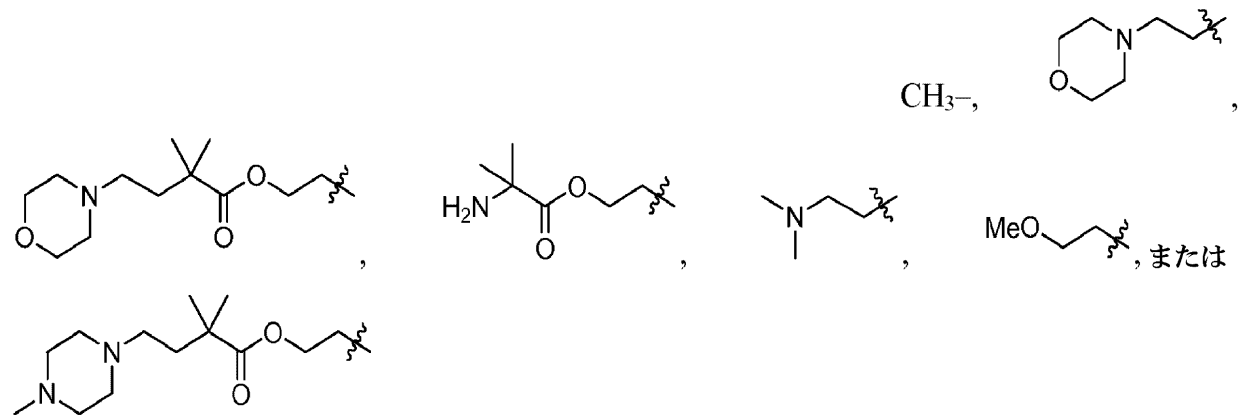
10

であり；および X は、 $-\text{S}-$ である。

【0 4 0 0】

いくつかの実施形態において、 $-\text{L}-\text{R}^1$ は、

【化 1 1 2】



20

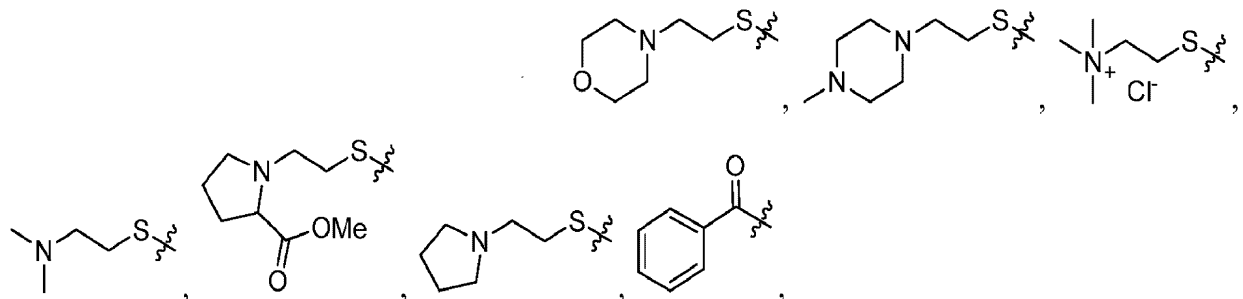
であり、X は、 $-\text{S}-$ 、W は、O、Y は、 $-\text{O}-$ 、および Z は、 $-\text{O}-$ である。

30

【0 4 0 1】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、

【化 1 1 3】



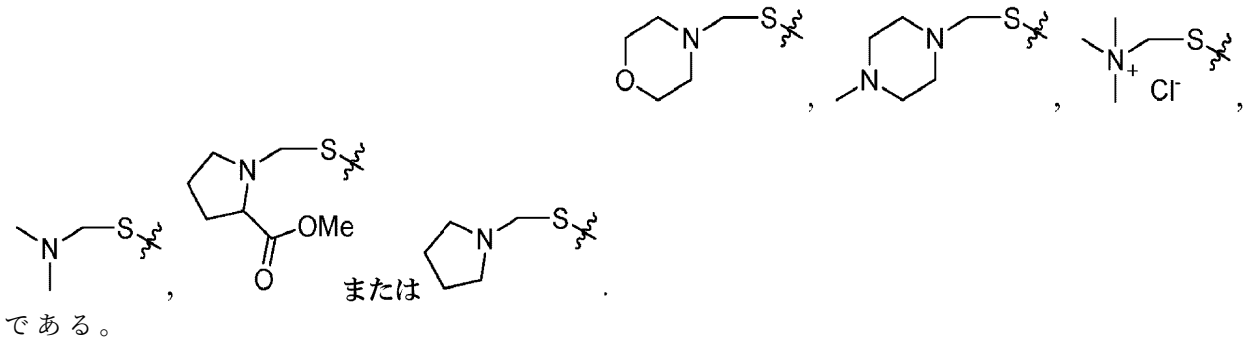
40

または $-\text{S}-$ ($\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ 脂肪族) である。

【0 4 0 2】

いくつかの実施形態において、 R^1 は、

【化 1 1 4】

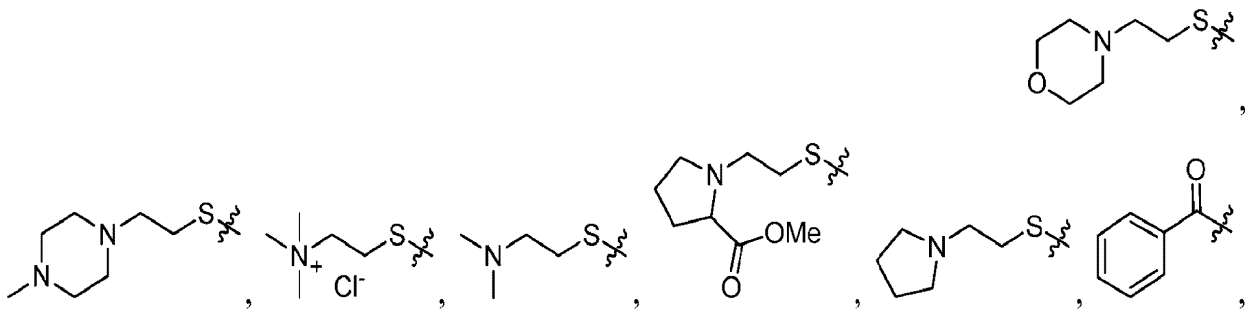


10

【0 4 0 3】

いくつかの実施形態において、Xは、-O-または-S-であり、およびR¹は、

【化 1 1 5】



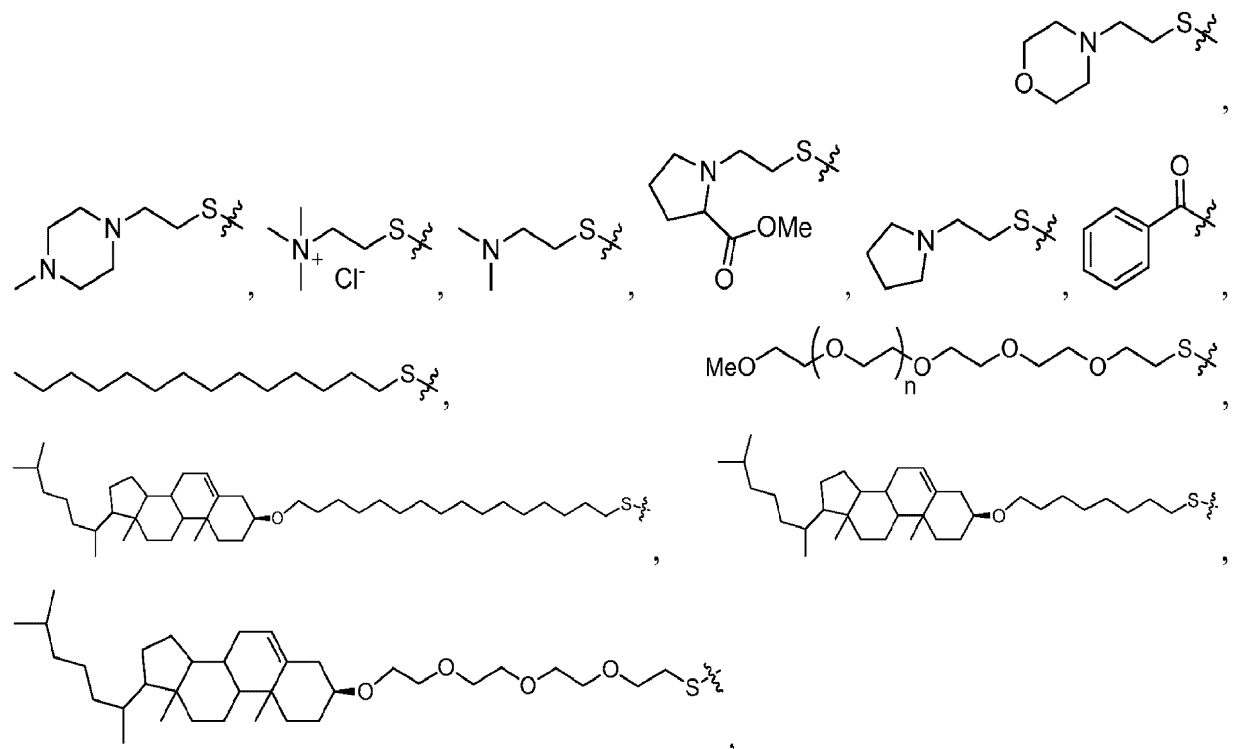
20

または-S-(C₁~C₁₀ 脂肪族)である。

【0 4 0 4】

いくつかの実施形態において、Xは、-O-または-S-であり、およびR¹は、

【化 1 1 6】



30

40

-S-(C₁~C₁₀ 脂肪族)または-S-(C₁~C₅₀ 脂肪族)である。

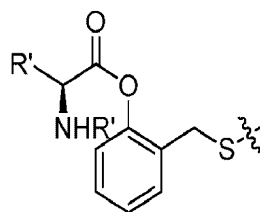
【0 4 0 5】

いくつかの実施形態において、Lは、共有結合であり、-L-R¹は、R¹である。

【0 4 0 6】

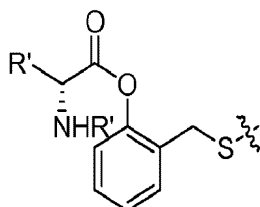
50

【化 1 2 1】



である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

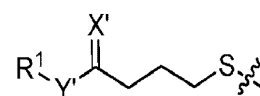
【化 1 2 2】



10

である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

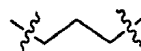
【化 1 2 3】



20

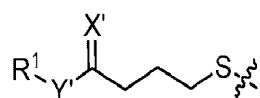
の構造を有し、 X' は、 O または S であり、 Y' は、 $-O-$ であり、 $-S-$ または $-NR'$ であり、部分

【化 1 2 4】



は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、 Y' は、 $-O-$ であり、 $-S-$ または $-NH-$ である。いくつかの実施形態において、

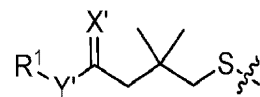
【化 1 2 5】



30

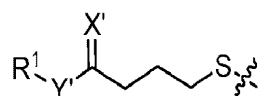
は、

【化 1 2 6】



である。いくつかの実施形態において、

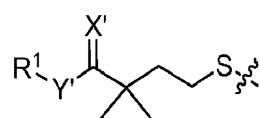
【化 1 2 7】



40

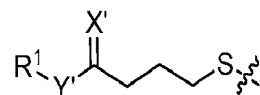
は、

【化 1 2 8】



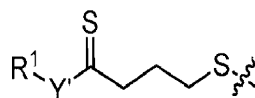
である。いくつかの実施形態において、

【化 1 2 9】



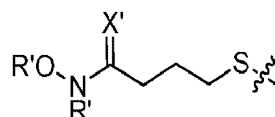
は、

【化 1 3 0】

である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

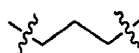
10

【化 1 3 1】



の構造を有し、X' は、O または S であり、部分

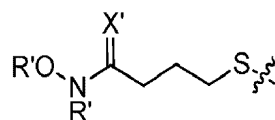
【化 1 3 2】



は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、

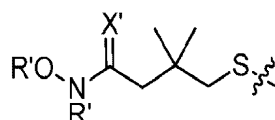
20

【化 1 3 3】



は、

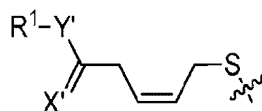
【化 1 3 4】



30

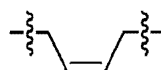
である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

【化 1 3 5】



であり、

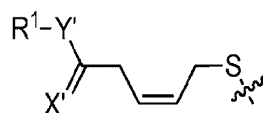
【化 1 3 6】



40

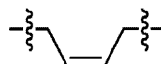
は、置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

【化 1 3 7】



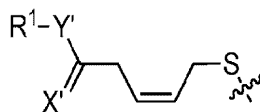
であり、

【化 1 3 8】



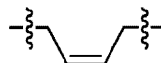
は、置換される。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

【化 1 3 9】



であり、

【化 1 4 0】

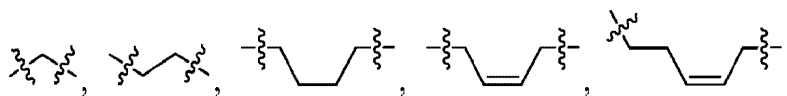


は、非置換である。

【0 4 0 9】

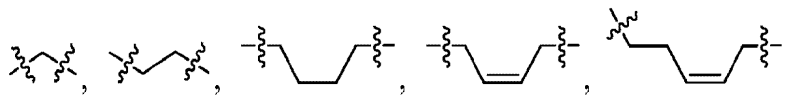
いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、 $R^1-C(O)-S-L^x-S-$ であり、 L^x は、置換されていてもよい基

【化 1 4 1】



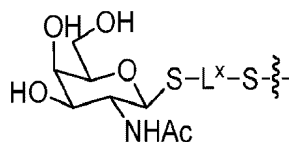
から選択される。いくつかの実施形態において、 L^x は、

【化 1 4 2】



である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、 $(CH_3)_3C-S-S-L^x-S-$ である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、 $R^1-C(=X')-Y'-C(R)_2-S-L^x-S-$ である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、 $R-C(=X')-Y'-CH_2-S-L^x-S-$ である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、

【化 1 4 3】



である。

【0 4 1 0】

技術分野の当業者によって理解されるように、ここに記載した $-X-L-R^1$ 基の多くは、切断可能で、対象に対して投与を行った後に、 $-X^-$ へ変換可能である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、切断可能である。いくつかの実施形態において、 $-X-L-R^1$ は、 $-S-L-R^1$ であり、対象に対して投与を行った後に $-S^-$ へ変換される。いくつかの実施形態において、対象の酵素により変換が促される。技術分野の当業者によって理解されるように、 $-S-L-R^1$ 基は、投与後に $-S^-$ に変換されることは、技術分野において公知であり、薬物代謝や薬物動態の研究に用いられるものを含め、実践されている。

【0 4 1 1】

いくつかの実施形態において、式 I の構造を有するインターヌクレオチド結合は、

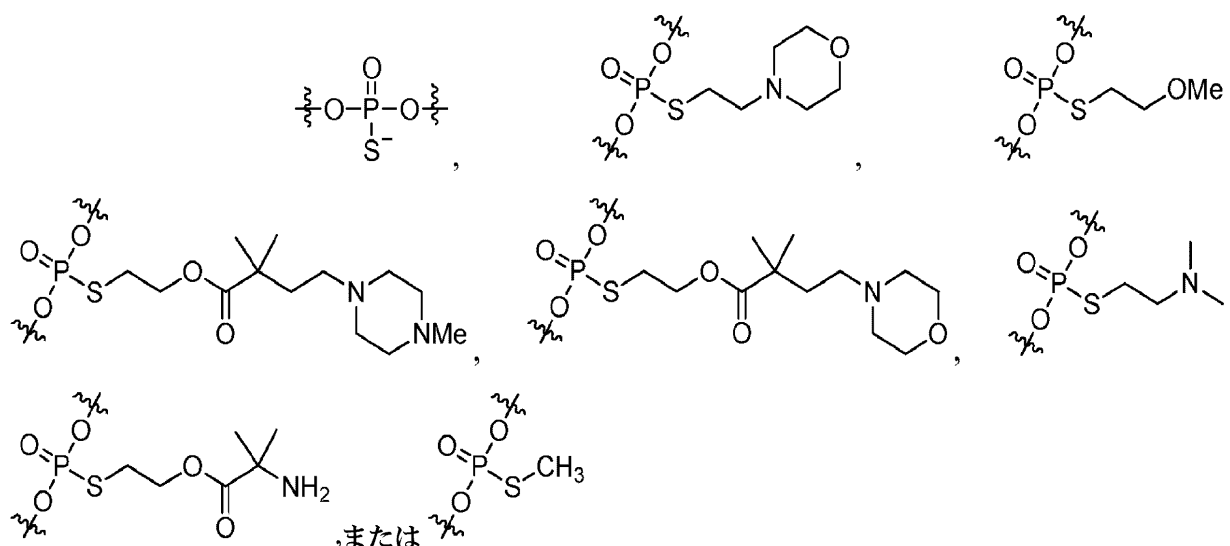
10

20

30

40

【化 1 4 4】

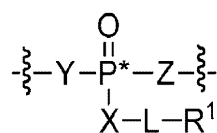


である。

【0 4 1 2】

いくつかの実施形態において、式 I のインターヌクレオチド結合は、式 I - a の構造：

【化 1 4 5】



(I-a)

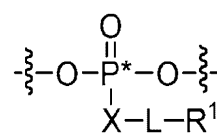
を有する。

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 4 1 3】

いくつかの実施形態において、式 I のインターヌクレオチド結合は、式 I - b の構造：

【化 1 4 6】



(I-b)

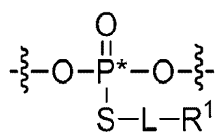
を有し、

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0 4 1 4】

いくつかの実施形態において、式 I のインターヌクレオチド結合は、式 I - c :

【化 1 4 7】



(I-c)

の構造を有するホスホロチオエートトリエステル結合であり、

ここで、P* は、不斉リン原子であり、R_pまたはS_pのいずれかであり；

10

20

30

40

50

Lは、共有結合または任意に置換され、直鎖または分岐の $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、ここでLの1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され；

R^1 は、ハロゲン、R、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 脂肪族であり、1以上のメチレン単位は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により任意におよび独立して置換され；

各 R' は、独立して $-R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-CO_2R$ 、もしくは $-SO_2R$ であるか、または：

同じ窒素上の2つの R' は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいヘテロ環式、もしくはヘテロアリール環を形成するか、または

同じ炭素上の2つの R' は、それらの介在原子と一緒に置換されていてもよいアリール、炭素環式、ヘテロ環式、またはヘテロアリール環を形成し；

$-Cy-$ は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい2価の環であり；

各Rは、独立して水素であるか、または、 $C_1 \sim C_6$ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基であり；および

各



は、独立してヌクレオシドとの結合を表し；

R^1 は、Lが共有結合のとき、 $-H$ 以外である。

【0415】

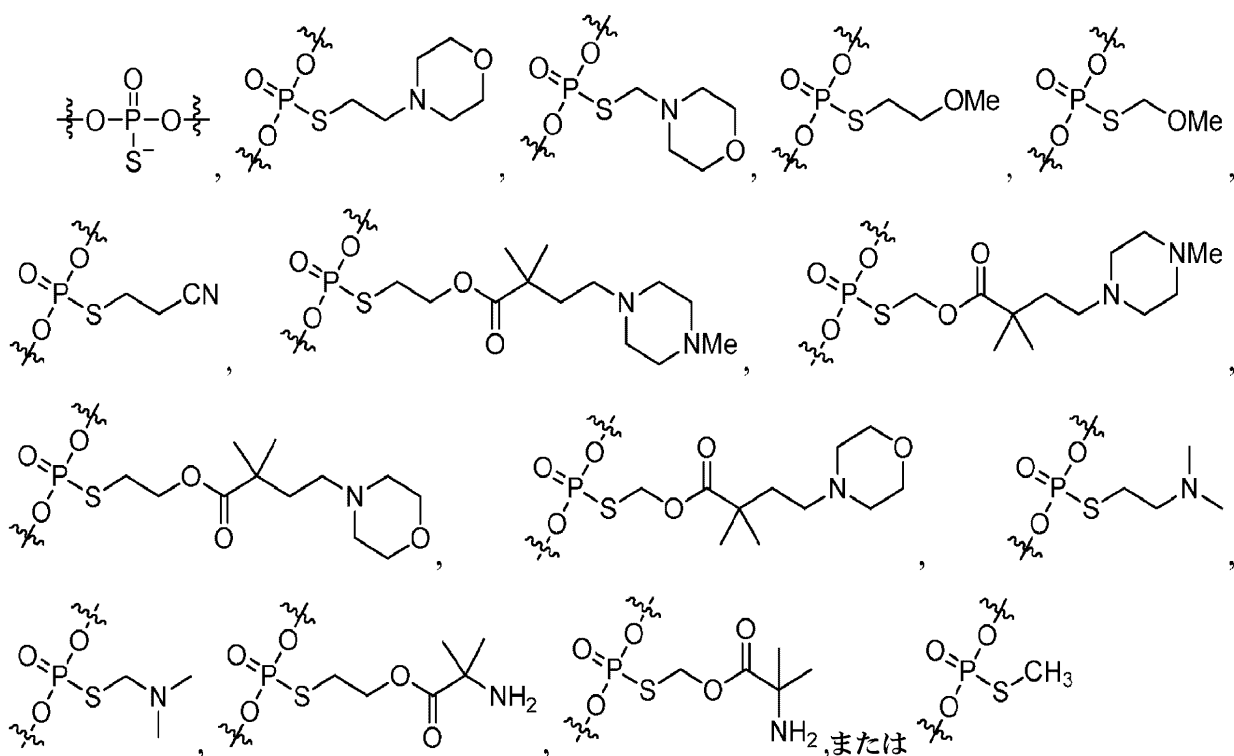
いくつかの実施形態において、式Iの構造を有するインターヌクレオチド結合は、

10

20

30

【化 1 4 8】



10

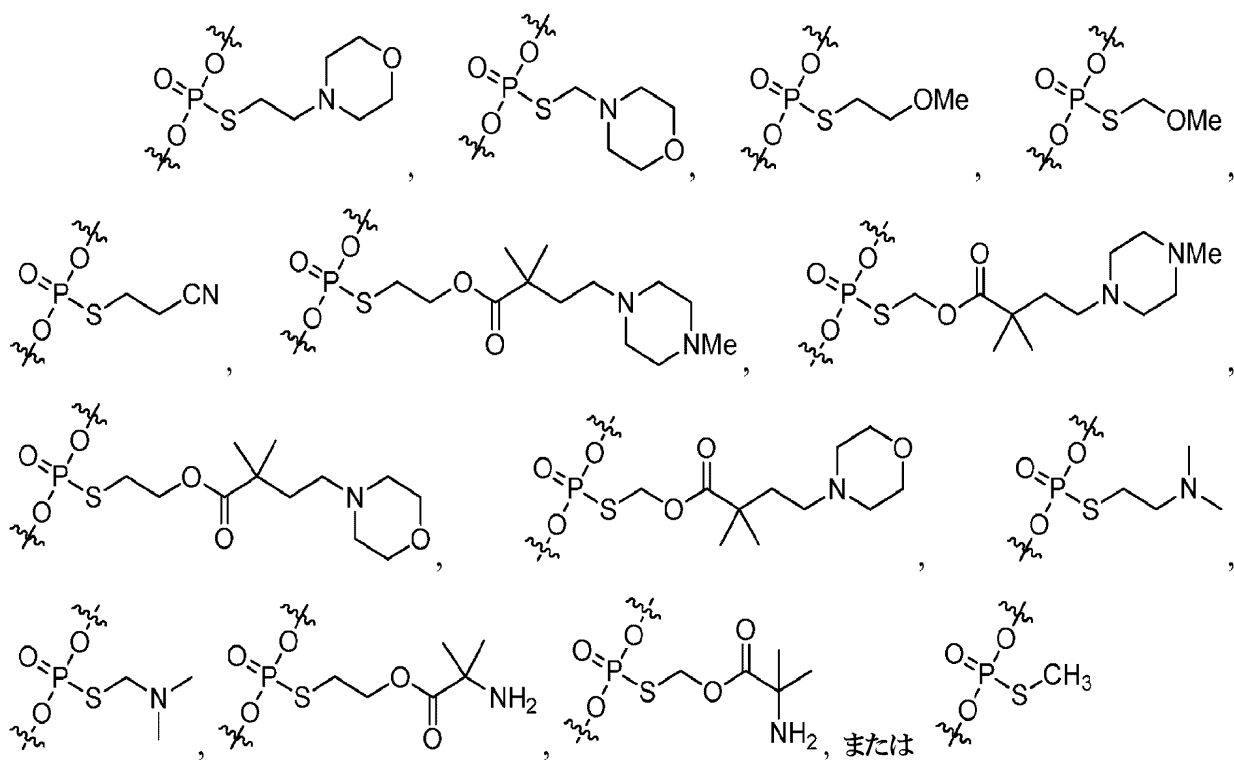
20

である。

【0 4 1 6】

いくつかの実施形態において、式 I - c の構造を有するインターヌクレオチド結合は、

【化 1 4 9】



30

40

である。

【0 4 1 7】

いくつかの実施形態において、本発明は、1以上のリン酸ジエステル結合、および式 I - a、I - b、または I - c を有する1以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。

50

10

20

30

40

50

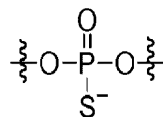
いくつかの実施形態において、本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cと50%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cと60%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cと70%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cと80%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cと90%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、前記配列は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cと95%以上の同一性を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリ

ゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCの配列を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。

【0421】

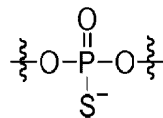
いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、キラル結合したリン酸を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式Iの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、式Iの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式I-cの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、式I-cの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

【化150】



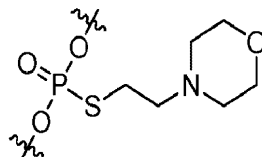
である。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、

【化151】



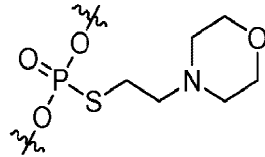
である。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

【化152】



である。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCTCAGTCCTGCTTCGCACCCに示される配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、

【化 1 5 3】

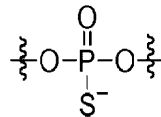


である。

【0 4 2 2】

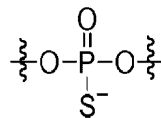
いくつかの実施形態において、本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C C
 の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、少なくとも1個のインターヌ
 クレオチド結合は、キラル結合したリン酸を有する。本発明は、GCC T C A G T C T G
 C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、少なくと
 も1個のインターヌクレオチド結合は、式 I の構造を有する。本発明は、GCC T C A G
 T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、
 各インターヌクレオチド結合は、式 I の構造を有する。本発明は、GCC T C A G T C T
 G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供し、少なく
 とも1個のインターヌクレオチド結合は、式 I - c の構造を有する。本発明は、GCC T
 C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提
 供し、各インターヌクレオチド結合は、式 I - c の構造を有する。本発明は、GCC T C
 A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド提供
 し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

【化 1 5 4】



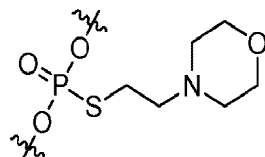
である。本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御
 されたオリゴヌクレオチド提供し、各インターヌクレオチド結合は、

【化 1 5 5】



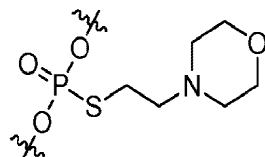
である。本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御
 されたオリゴヌクレオチド提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

【化 1 5 6】



である。本発明は、GCC T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むを」キラル
 制御されたオリゴヌクレオチド提供し、各インターヌクレオチド結合は、

【化 1 5 7】



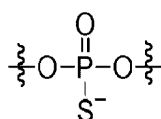
である。

【0423】

いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、キラル結合したリン酸を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式Iの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、式Iの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、式I-cの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、式I-cの構造を有する。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

10

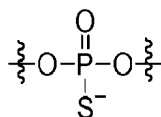
【化158】



20

である。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、

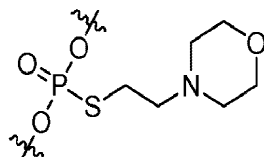
【化159】



である。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1個のインターヌクレオチド結合は、

30

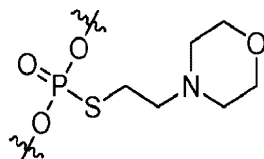
【化160】



である。いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C Cの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各インターヌクレオチド結合は、

40

【化161】



である。

【0424】

いくつかの実施形態において、本発明は、G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C

50

の配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの結合したリン酸は、R_pである。ある特定の実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、RNA配列を含み、各Tは、独立してかつ任意にUと置換されることは、技術分野の当業者により理解される。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、結合したリン酸のそれぞれは、R_pである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの結合したリン酸は、S_pである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、結合したリン酸のそれぞれは、S_pである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ブロックマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、P-修飾ブロックマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、結合ブロックマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、アルトマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、P-修飾アルトマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、結合アルトマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ユニマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ステレオユニマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、P-修飾ユニマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、結合ユニマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは、スキップマーである。

【0425】

いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各シトシンは、任意におよび独立して5-メチルシトシンに置換される。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つのシトシンは、任意におよび独立して5-メチルシトシンに置換される。いくつかの実施形態において、本発明は、GCCCTCAGTCTGCTTTCGCACCCの配列を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供し、各シトシン

は、任意におよび独立して 5-メチルシトシンに置換される。G C C T C A G T C T G C T T C G C A C C の配列を含む例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、下記の表 2 に示される。

【 0 4 2 6 】

例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチド

【表 2】

オリゴ	立体化学／配列	摘要
101	All-(<i>Rp</i>)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	All-R
102	All-(<i>Sp</i>)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	All-S

103	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	5R-9S-5R
104	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	5S-9R-5S
105	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	1S-17R-1S
106	(Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	1R-17S-1R
107	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	(R/S) ₉ R
108	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	(S/R) ₉ S
109	(Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	3S-13R-3S
110	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	3R-13S-3R
111	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R ¹⁹
112	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R ⁹
113	(Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R ²
114	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	(RRS) ₆ -R
115	(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	S-(RRS) ₆
116	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	RS-(RRS) ₅ -RR
122	All-(Rp)- d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	All-R
123	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	1S-17R-1S
124	All-(Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	All-S
125	All-(Rp)-d[5mCs1As1Ts1G]	All-R
126	All-(Rp)-d[Cs2As2Gs2T]	All-R
127	All-(Rp)-d[Cs3As3Gs3T]	All-R
128	All-(Sp)-d[Cs4As4Gs4T]	All-S
129	All-(Sp)-d[Cs5As5Gs5T]	All-S
130	All-(Sp)-d[Cs6As6Gs6T]	All-S
131	All-(Rp)-d[Gs7Cs7Cs7Ts7Cs7As7Gs7Ts7Cs7Ts7Gs7Cs7Ts7Ts7Cs7Gs7Cs7As7Cs7C]	All-R
132	All-(Sp)-d[Gs7Cs7Cs7Ts7Cs7As7Gs7Ts7Cs7Ts7Gs7Cs7Ts7Ts7Cs7Gs7Cs7As7Cs7C]	All-S

10

20

30

40

133	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)-d[Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1Gs15mCs1As15mCs15mC]	5R-9S-5R
134	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1Gs15mCs1As15mCs15mC]	5S-9R-5S
135	All-(Rp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	All-R
136	All-(Sp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	All-S
137	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	1S-9R-1S
138	(Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	2S-7R-2S
139	(Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	1R-9S-1R
140	(Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	2R-7S-2R
141	(Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	3S-5R-3S
142	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	3R-5S-3R
143	(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	(SSR) ₃ -SS
144	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp)-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	(RRS) ₃ -RR
145	All-(Rp)-d[5mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1Gs15mC]	All-R
146	All-(Rp)-d[Gs15mCs1Ts1G]	All-R
147	All-(Rp)-d[5mCs1As1Gs1T]	All-R
148	All-(Rp)-d[5mCs2As2Gs2Ts25mCs2Ts2Gs25mCs2Ts2Ts25mCs2G]	All-R
149	All-(Rp)-d[5mCs4As4Gs4Ts45mCs4Ts4Gs45mCs4Ts4Ts45mCs4G]	All-R
150	All-(Rp)-d[TsCs1AsT]	All-R
151	All-(Sp)-d[Cs1AsGs1T]	All-S
152	All-(Sp)-d[Cs1AGs1T]	All-S
153	All-(Sp)-d[CA1GsT]	All-S
154	All-(Rp)-d[Ts1Cs1As1T]	All-R
155	All-(Rp)-d[Ts2Gs2As2C]	All-R
156	All-(Sp)-d[Gs15mCs1Ts1G]	All-S
157	All-(Sp)-d[5mCs1As1Gs1T]	All-S
158	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCs1GsCsACsC]	5S-9R-4S
159	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1CsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCs1GsCs2As2Cs2C]	5S-9R-5S
160	All-(Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOED} [AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	All-R

10

20

30

40

161	All-(Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	All-S
162	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	5R-9S-5R
163	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	5S-9R-5S
164	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	1S-17R-1S
165	(Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	1R-17S-1R
166	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	(R/S) ₉ R
167	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	(S/R) ₉ S
168	(Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	3S-13R-3S
169	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	3R-13S-3R
170	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	18S/R ¹⁹
171	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	18S/R ⁹
172	(Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	18S/R ²
173	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	(RRS) ₆ -R
174	(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	S-(RRS) ₆
175	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	RS-(RRS) ₅ -RR

10

20

30

40

176	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)(Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1) _{MOE} d[As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1] (Gs15mCs1As15mCs15mC) _{MOE}	RS-(RRS) ₅ -RR
177	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)(Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1) _{MOE} d[AGT5mCTG5mCTT5mC] (Gs25mCs2As25mCs25mC) _{MOE}	RS-(RRS) ₅ -RR
178	(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp)-(Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _F (F: 2-fluorodeoxyribose)	S-(RRS) ₆
179	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs8Cs8Cs8Ts8Cs8As8Gs8Ts8Cs8Ts8Gs8Cs8Ts8Ts8Cs8Gs8Cs8As8Cs8C]	RS-(RRS) ₅ -RR
180	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs9Cs9Cs9Ts9Cs9As9Gs9Ts9Cs9Ts9Gs9Cs9Ts9Ts9Cs9Gs9Cs9As9Cs9C]	RS-(RRS) ₅ -RR
181	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs10Cs10Cs10Ts10Cs10As10Gs10Ts10Cs10Ts10Gs10Cs10Ts10Ts10Cs10Gs10Cs10As10Cs10C]	RS-(RRS) ₅ -RR
182	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs11Cs11Cs11Ts11Cs11As11Gs11Ts11Cs11Ts11Gs11Cs11Ts11Ts11Cs11Gs11Cs11As11Cs11C]	RS-(RRS) ₅ -RR
183	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs12Cs12Cs12Ts12Cs12As12Gs12Ts12Cs12Ts12Gs12Cs12Ts12Ts12Cs12Gs12Cs12As12Cs12C]	RS-(RRS) ₅ -RR
184	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs13Cs13Cs13Ts13Cs13As13Gs13Ts13Cs13Ts13Gs13Cs13Ts13Ts13Cs13Gs13Cs13As13Cs13C]	RS-(RRS) ₅ -RR
185	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs14Cs14Cs14Ts14Cs14As14Gs14Ts14Cs14Ts14Gs14Cs14Ts14Ts14Cs14Gs14Cs14As14Cs14C]	RS-(RRS) ₅ -RR
186	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[Gs15Cs15Cs15Ts15Cs15As15Gs15Ts15Cs15Ts15Gs15Cs15Ts15Ts15Cs15Gs15Cs15As15Cs15C]	RS-(RRS) ₅ -RR
187	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp)d[GsCsCs1TsCsAs]GsUs2CsUsGsd[CtTs3TsCsGs]CsAs4CsC	RS-(RRS) ₅ -RR
188	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsACsC]	5S-9R-4S
189	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1CsACs1C]	5S-9R-4S
190	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[Gs8Cs8Cs8Ts8Cs8As8Gs8Ts8Cs8Ts8Gs8Cs8Ts8Ts8Cs8Gs8Cs1ACs8C]	5S-9R-4S
191	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[Gs9Cs9Cs9Ts9Cs9As9Gs9Ts9Cs9Ts9Gs9Cs9Ts9Ts9Cs9Gs9Cs1ACs9C]	5S-9R-4S

10

20

30

40

192	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs10Cs10Cs10Ts10Cs10As10Gs10Ts10Cs10Ts10Gs10Cs10Ts10Ts 10Cs10Gs10Cs1ACs10C]	5S-9R-4S
193	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs11Cs11Cs11Ts11Cs11As11Gs11Ts11Cs11Ts11Gs11Cs11Ts11Ts 11Cs11Gs11Cs1ACs11C]	5S-9R-4S
194	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs12Cs12Cs12Ts12Cs12As12Gs12Ts12Cs12Ts12Gs12Cs12Ts12Ts 12Cs12Gs12Cs1ACs12C]	5S-9R-4S
195	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs13Cs13Cs13Ts13Cs13As13Gs13Ts13Cs13Ts13Gs13Cs13Ts13Ts 13Cs13Gs13Cs1ACs13C]	5S-9R-4S
196	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs14Cs14Cs14Ts14Cs14As14Gs14Ts14Cs14Ts14Gs14Cs14Ts14Ts 14Cs14Gs14Cs1ACs14C]	5S-9R-4S
197	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs15Cs15Cs15Ts15Cs15As15Gs15Ts15Cs15Ts15Gs15Cs15Ts15Ts 15Cs15Gs15Cs1ACs15C]	5S-9R-4S
198	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- GsCsCsUsCsAsGsUsCsUsGsCsUsUsCsGsCsACsC	5S-9R-4S
199	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs1Cs1Cs1Us1Cs1As1Gs1Us1Cs1Us1Gs1Cs1Us1Us1Cs1Gs1CsACs 1C	5S-9R-4S
200	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs8Cs8Cs8Us8Cs8As8Gs8Us8Cs8Us8Gs8Cs8Us8Us8Cs8Gs8Cs1AC s8C	5S-9R-4S
201	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs9Cs9Cs9Us9Cs9As9Gs9Us9Cs9Us9Gs9Cs9Us9Us9Cs9Gs9Cs1AC s9C	5S-9R-4S
202	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs10Cs10Cs10Us10Cs10As10Gs10Us10Cs10Us10Gs10Cs10Us10Us 10Cs10Gs10Cs1ACs10C	5S-9R-4S
203	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs11Cs11Cs11Us11Cs11As11Gs11Us11Cs11Us11Gs11Cs11Us11Us 11Cs11Gs11Cs1ACs11C	5S-9R-4S
204	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs12Cs12Cs12Us12Cs12As12Gs12Us12Cs12Us12Gs12Cs12Us12Us 12Cs12Gs12Cs1ACs12C	5S-9R-4S
205	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs13Cs13Cs13Us13Cs13As13Gs13Us13Cs13Us13Gs13Cs13Us13Us 13Cs13Gs13Cs1ACs13C	5S-9R-4S
206	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs14Cs14Cs14Us14Cs14As14Gs14Us14Cs14Us14Gs14Cs14Us14Us 14Cs14Gs14Cs1ACs14C	5S-9R-4S
207	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs15Cs15Cs15Us15Cs15As15Gs15Us15Cs15Us15Gs15Cs15Us15Us	5S-9R-4S
	15Cs15Gs15Cs1ACs15C	

【 0 4 2 7 】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1以上のヌク

10

20

30

40

50

レオチドが、ある特定状況下においてオートリリースしやすいリン酸修飾を含むように設計されている。つまり、ある条件下において、特定のリン修飾が、オリゴヌクレオチドから自力で切断し、天然のDNAおよびRNA内に見られる、例えば、リン酸ジエステルを得るように設計される。いくつかの実施形態において、そのようなリン酸修飾は、 $-O-L-R^1$ の構造を有し、Lおよび R^1 のそれぞれは、は、独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、オートリリース基は、モルホリノ基を含む。いくつかの実施形態において、オートリリース基は、インターヌクレオチドのリン酸リンカーに薬剤を送達する能力を特徴としており、薬剤は、例えば、脱硫などで、リン原子の修飾を促進する。いくつかの実施形態において、薬剤は、水であり、加水分解により更に修飾され、天然のDNAおよびRNAに見られるリン酸ジエステルを形成する。

【0428】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、得られる薬剤の性質がリン酸での1以上の特定の修飾を通じて改善されるように設計されている。あるオリゴヌクレオチドがヌクレアーゼにより急速に分解され、細胞膜を通じた細胞の取り込みが低下することは、当該技術分野において、多くの文書に記載されている (Poijarvi-Virta et al., Curr. Med. Chem. (2006), 13(28):3441-65; Wagner et al., Med. Res. Rev. (2000), 20(6):417-51; Peyrottes et al., Mini Rev. Med. Chem. (2004), 4(4):395-408; Gosselin et al., (1996), 43(1):196-208; Bologna et al., (2002), Antisense & Nucleic Acid Drug Development 12:33-41)。例えば、Vivesら (Nucleic Acids Research (1999), 27(20):4071-76) は、親オリゴヌクレオチドと比較すると、tert-ブチルSATEプロ-オリゴヌクレオチドの細胞透過性が著しく上昇することを示したことを発見した。。

【0429】

いくつかの実施形態において、結合したリン酸おける修飾は、天然のDNAおよびRNAに存在するようなリン酸ジエステルへ変換される能力を特徴としており、1以上のエステラーゼ、ヌクレアーゼ、および／またはシトクロムP450酵素、下記の表3に列挙するものにより変換されるが、これらに限定されるものではない。

例示的な酵素

【表3】

ファミリー	遺伝子

CYP1	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
CYP2	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1
CYP3	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43
CYP4	CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1
CYP5	CYP5A1
CYP7	CYP7A1, CYP7B1
CYP8	CYP8A1 (prostacyclin synthase), CYP8B1 (bile acid biosynthesis)
CYP11	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2
CYP17	CYP17A1
CYP19	CYP19A1
CYP20	CYP20A1
CYP21	CYP21A2
CYP24	CYP24A1
CYP26	CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1
CYP27	CYP27A1 (bile acid biosynthesis), CYP27B1 (vitamin D3 1-alpha hydroxylase, activates vitamin D3), CYP27C1 (unknown function)

10

20

30

40

CYP39	CYP39A1
CYP46	CYP46A1
CYP51	CYP51A1 (lanosterol 14-alpha demethylase)

【0430】

いくつかの実施形態において、リン酸における修飾が、プロドラッグとして機能することを特徴とするP-修飾部分になり、例えば、P-修飾部分は、オリゴヌクレオチドを除去する前に所望の位置へ送達しやすくする。例えば、いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、結合したリン酸でのペグ化によるものである。関連技術の当業者は、さまざまなPEG鎖の長さが有用であり、鎖の長さの選択は、一部は、ペグ化により実現しようとする結果によって決定されることを理解するであろう。例えば、いくつかの実施形態において、ペグ化は、RES取り込みを少なくし、オリゴヌクレオチドのインビボでの循環寿命を延ばす効果がある。

10

【0431】

いくつかの実施形態において、本発明によるペグ化に用いる試薬は、分子量が約300 g/mol～約100,000 g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約300 g/mol～約10,000 g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約300 g/mol～約5,000 g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約1000 g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約3000 g/molである。いくつかの実施形態において、ペグ化に用いる試薬の分子量は、約5000 g/molである。

20

【0432】

ある特定の実施形態において、ペグ化に用いる試薬は、PEG500である。ある特定の実施形態において、ペグ化に用いる試薬は、PEG1000である。ある特定の実施形態において、ペグ化に用いる試薬は、PEG3000である。ある特定の実施形態において、ペグ化に用いる試薬は、PEG5000である。

30

【0433】

いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、例えば、脂質、PEG化脂質などのPKエンハンサーとして機能することを特徴とする。

【0434】

いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、膜破壊脂質またはペプチドなどの細胞への侵入および／またはエンドソームの回避を促進する薬剤として機能することを特徴とする。

【0435】

いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、標的薬剤として機能することを特徴とする。いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、標的薬剤である、または標的薬剤を含む。ここでの「標的薬剤」という用語は、対象のペイロードと関連するものであり（例えば、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド組成物と関連）、また対象の標的部位と相互に作用する。そのため、確認されるより、または対象のペイロードが標的薬剤と関連していない場合の同等の状況下よりも、実質的により多くの標的薬剤と関連するとき、対象のペイロードが対象の標的部位を標的にする。標的薬剤は、例えば、小分子部分、核酸、ポリペプチド、炭水化物など種々の化学的部分のいずれかであってもよい、またはこれらを含む。標的薬剤は、さらにAdarsh et al., “Organelle Specific Targeted Drug Delivery – A R

40

50

review, " International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2011, p. 895に記載される。

【0436】

例示的なそのような標的薬剤には、限定するものではないが、タンパク質（例えば、トランスフェリン）、オリゴペプチド（例えば、環式および非環式のRGD含有オリゴペプチド）、抗体（単クローン抗体および多クローン性抗体、例えば、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE抗体）、糖／炭水化物（例えば、単糖および／またはオリゴ糖（マンノース、マンノース-6-リン酸、ガラクトースなど））、ビタミン（例えば、葉酸）、または別の小生体分子が含まれる。いくつかの実施形態において、標的部分は、ステロイド分子である（例えば、コール酸、デオキシコール酸、デヒドロコール酸を含む胆汁酸；コルチゾン；ジゴキシゲニン；テストステロン；コレステロール；コルチゾン環の3位での二重結合を通じて結合するトリメチルアミノメチルヒドラジド基を有するコルチゾンなどのカチオン性ステロイドなど）。いくつかの実施形態において、標的部分は、脂溶性分子（例えば、脂環式炭化水素、飽和および不飽和脂肪酸、ワックス、テルペン、およびエナメル質およびバックミンスターフラーレンなどの多脂環式炭化水素）である。いくつかの実施形態において、脂溶性分子は、ビタミンA、レチノイン酸、レチナール、またはデヒドロレチナールなどのテルペノイドである。いくつかの実施形態において、標的部分は、ペプチドである。

10

【0437】

いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、式—X—L—R¹で示される標的薬剤であり、X、L、およびR¹のそれぞれは、上記の式Iに定義のとおりである。

20

【0438】

いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、細胞の特異的送達を容易にすることを特徴とする。

【0439】

いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、上記記載の1以上のカテゴリーに含まれることを特徴とする。例えば、いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、PKエンハンサーおよび標的リガンドとして機能する。いくつかの実施形態において、P-修飾部分は、プロドラッグおよびエンドソーム回避剤として機能する。関連技術の当業者であれば、本発明により、そのような組み合わせが他にも数多く可能であり、企図されることを理解するであろう。

30

【0440】

核酸塩基

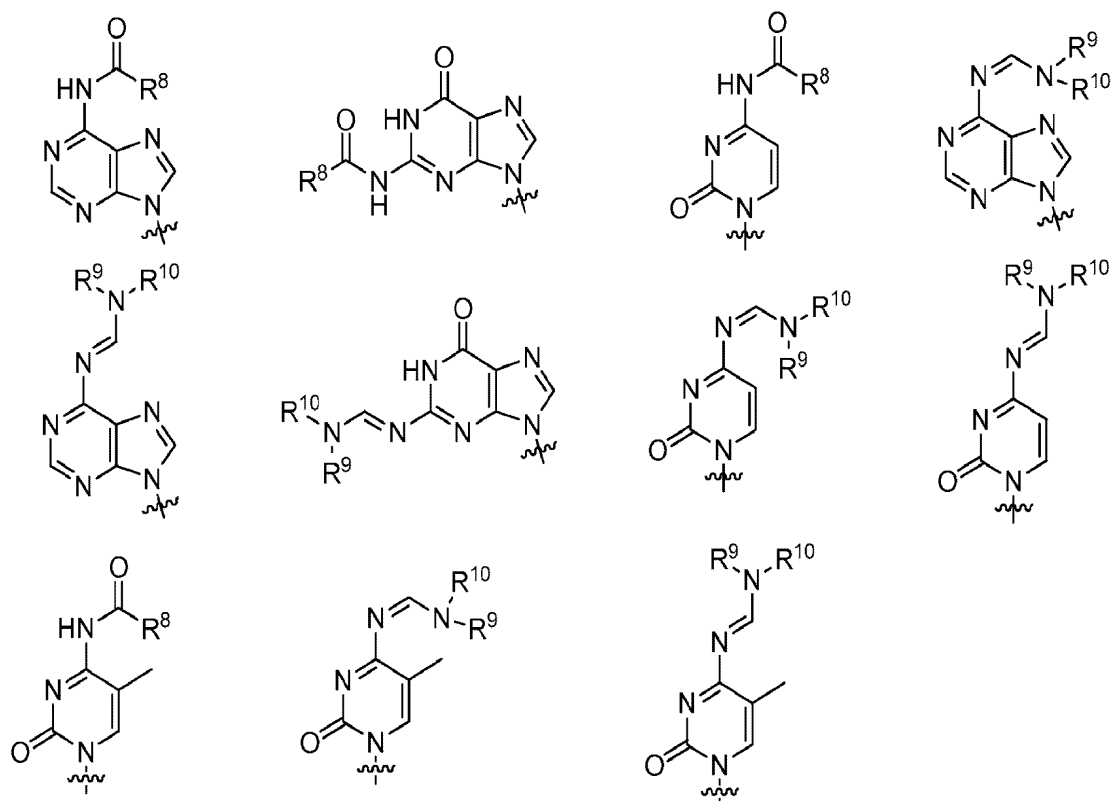
いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドに存在する核酸塩基は、自然の核酸塩基である、または自然の核酸塩基に由来する修飾された核酸塩基である。例としては、限定するものではないが、それぞれのアミノ基がアシル保護基により保護されているウラシル、チミン、アデニン、シトシン、およびグアニン、2-フルオロウラシル、2-フルオロシトシン、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、2, 6-ジアミノプリン、アザシトシン、疑似イソシトシンや疑似ウラシルなどのピリミジン類似体、および8-置換プリン、キサンチン、またはヒポキサンチンなどの別の修飾された核酸塩基が挙げられる（最後の2つは、自然分解生成物）。例示的な修飾された核酸塩基は、Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196 and Revankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313に開示される。

40

【0441】

以下の一般式で表される化合物もまた、修飾された核酸塩基として企図される：

【化 1 6 2】



10

20

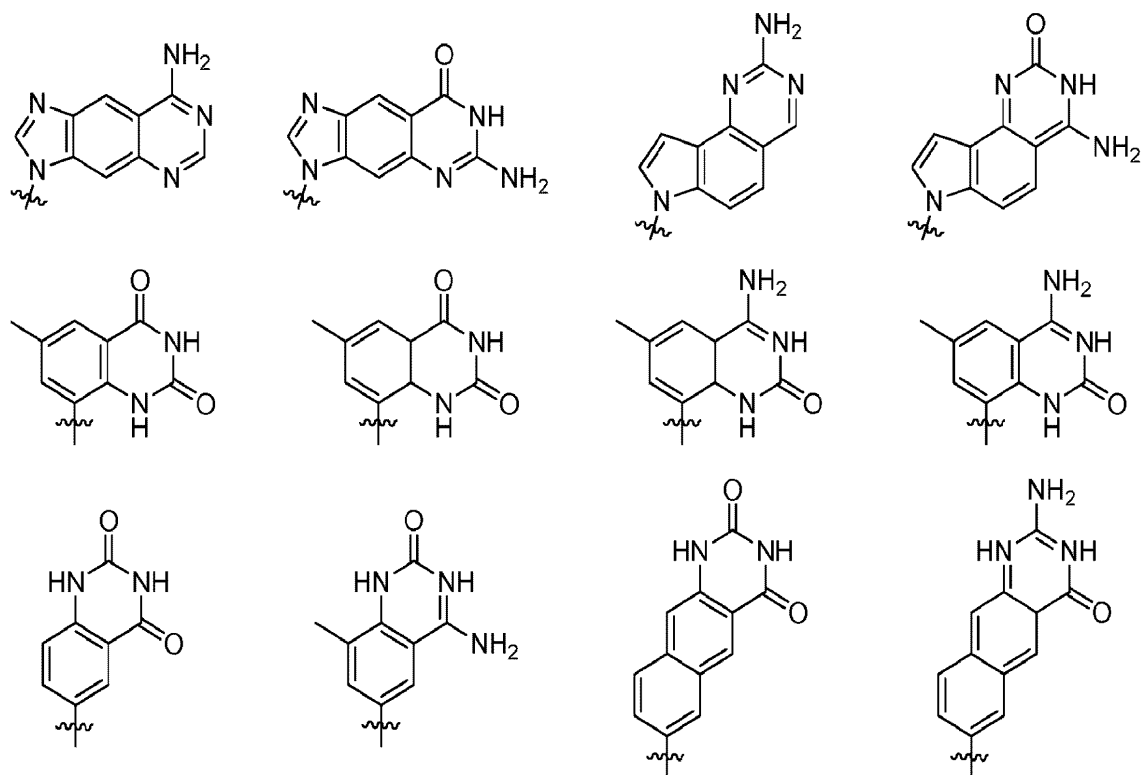
ここで、R⁸は、置換されていてもよい、脂肪族、アリール、アラルキル、アリールオキシアルキル、カルボシクリル、1～15個の炭素原子を有するヘテロシクリルまたはヘテロアリール基から選択される直鎖または分岐の基であり、例にすぎないが、メチル、イソプロピル、フェニル、ベンジル、またはフェノキシメチル基が含まれ；およびR⁹ならびにR¹⁰のそれぞれは、独立して直鎖または分岐の脂肪族、カルボシクリル、アリール、ヘテロシクリルおよびヘテロアリールから選択される置換されていてもよい基である。

【0442】

修飾された核酸塩基には、例えばフェニル環などの1以上のアリール環が加えられた、拡大された大きさの核酸塩基も含まれる。核塩基の置換は、the Glen Research catalog (www.glenresearch.com); Krueger AT et al, Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A., et al., Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627に記載され、本明細書中に記載される核酸の合成に有用であると考えられる。拡大された大きさの核酸塩基のいくつかの例は、下記の通りである。

30

【化 1 6 3】



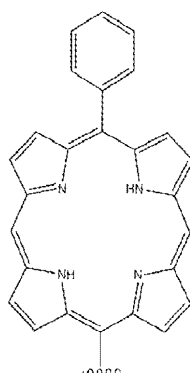
10

20

【0 4 4 3】

ここで、修飾された核酸塩基は、核酸塩基とは見做されない構造も含有されるが、例えば、限定するものではないが、コリンまたはポルフィリン誘導環のような別の部分である。ポルフィリン誘導塩基置換は、Morales-Rojas, H and Kool, ET, Org. Lett., 2002, 4, 4377-4380に記載されている。塩基置換として使用されるポルフィリン誘導環の一例を以下に示す：

【化 1 6 4】



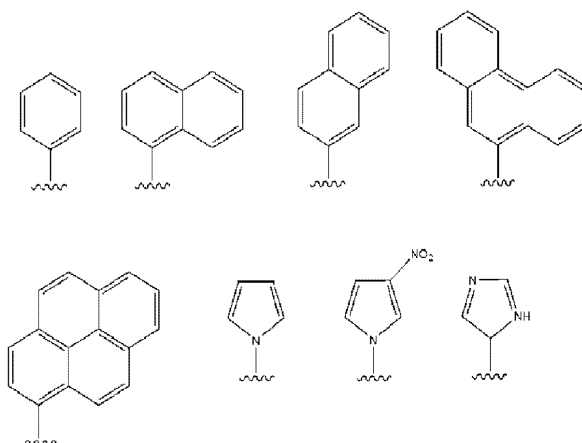
30

【0 4 4 4】

いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、以下の構造のいずれかであり、置換されていてもよい：

40

【化 1 6 5】

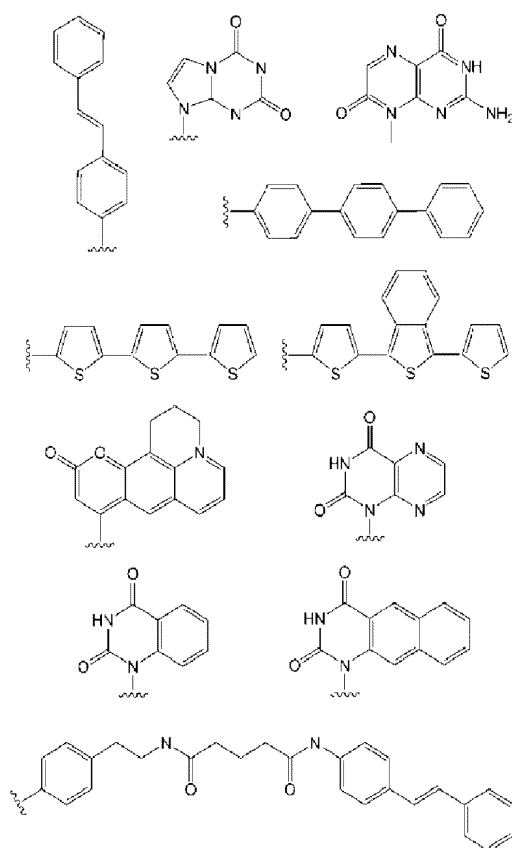


10

【 0 4 4 5 】

いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、蛍光性である。そのような蛍光性の例示的な修飾された核酸塩基には、以下に示すフェナントレン、ピレン、スチルベン、イソキサントシン、イソザントプテリン (isozanthopterin)、テルフェニル、テルチオフエン、ベンゾテルチオフエン、クマリン、ルマジン、テザースチルベン、ベンゾーウラシル、およびナフトーウラシルが含まれる：

【化 1 6 6】



30

40

【 0 4 4 6 】

いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、非置換である。いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、置換される。いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、例えば、ヘテロ原子、アルキル基、または蛍光部分に結合された結合部分、ビオチンもしくはアビジン部分、または別のタンパク質もしくはペプチドを含むよ

50

うに置換される。いくつかの実施形態において、修飾された核酸塩基は、最も古典的な意味では核酸塩基ではないが、核酸塩基と同様に機能する「ユニバーサル塩基」である。そのようなユニバーサル塩基の代表的な一例は、3-ニトロピロールである。

【0447】

いくつかの実施形態において、別のヌクレオシドもまた本明細書中に開示されるプロセスにおいて使用することができ、修飾された核酸塩基、または修飾された糖と共有結合する核酸塩基を組み込んだヌクレオシドを含む。修飾された核酸塩基を組み込むヌクレオシドのいくつかの例には、4-アセチルシチジン；5-（カルボキシヒドロキシルメチル）ウリジン；2'-O-メチルシチジン；5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン；5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン；ジヒドロウリジン；2'-O-メチルプソイドウリジン；ベータD-ガラクトシルキューオシン（beta,D-galactosylqueosine）；2'-O-メチルグアノシン；N⁶-イソペンテニルアデノシン；1-メチルアデノシン；1-メチルプソイドウリジン；1-メチルグアノシン；1-メチルイノシン；2,2-ジメチルグアノシン；2-メチルアデノシン；2-メチルグアノシン；N⁷-メチルグアノシン；3-メチル-シチジン；5-メチルシチジン；5-ヒドロキシメチルシチジン；5-ホルミルシトシン；5-カルボキシルシトシン；N⁶-メチルアデノシン；7-メチルグアノシン；5-メチルアミノエチルウリジン；5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン；ベータD-マンノシルキューオシン（beta,D-mannosylqueosine）；5-メトキシカルボニルメチルウリジン；5-メトキシウリジン；2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデノシン；N-（（9-ベータDリボフラノシル-2-メチルチオプリン-6-イル）カルバモイル）トレオニン；N-（（9-ベータDリボフラノシルプリン-6-イル）-N-メチルカルバモイル）トレオニン；ウリジン-5-オキシ酢酸メチルエステル；ウリジン-5-オキシ酢酸（v）；プソイドウリジン；キューオシン（queosine）；2-チオシチジン；5-メチル-2-チオウリジン；2-チオウリジン；4-チオウリジン；5-メチルウリジン；2'-O-メチル-5-メチルウリジン；および2'-O-メチルウリジンである。

【0448】

いくつかの実施形態において、ヌクレオシドは、6'位に（R）または（S）のいずれかのキラリティーを有する6'-修飾2環式ヌクレオシド類似体を含み、米国特許第7,399,845号に記載される類似体を含む。別の実施形態において、ヌクレオシドは、5'位に（R）または（S）のいずれかのキラリティーを有する5'-修飾2環式ヌクレオシド類似体を含み、米国特許出願公開第20070287831号に記載される類似体を含む。

【0449】

いくつかの実施形態において、核酸塩基または修飾された核酸塩基は、例えば、抗体、抗体フラグメント、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、受容体リガンド、またはキレート部分などの1以上の生体分子結合部分を含む。別の実施形態において、核酸塩基または修飾された核酸塩基は、5-プロモウラシル、5-ヨードウラシル、または2,6-ジアミノプリンである。いくつかの実施形態において、核酸塩基または修飾された核酸塩基は、蛍光または生体分子結合部分の置換により修飾される。いくつかの実施形態において、核酸塩基または修飾された核酸塩基上の置換基は、蛍光部分である。いくつかの実施形態において、核酸塩基上の置換基または修飾された核酸塩基は、ビオチンまたはアビジンである。

【0450】

上記の修飾された核酸塩基および別の修飾された核酸塩基のうちのある特定のものの作製について教示する代表的な米国特許は、限定するものではないが、上述の米国特許第3,687,808号、および米国特許第4,845,205号；第5,130,30号；第5,134,066号；第5,175,273号；第5,367,066号；第5,432,272号；第5,457,187号；第5,457,191号；第5,459,255号；第5,484,908号；第5,502,177号；第5,525,711号；第5,552,540号；

第5,587,469号;5,594,121,第5,596,091号;第5,614,617号;第5,681,941号;第5,750,692号;第6,015,886号;第6,147,200号;第6,166,197号;第6,222,025号;第6,235,887号;第6,380,368号;第6,528,640号;第6,639,062号;第6,617,438号;第7,045,610号;第7,427,672号;および第7,495,088号、が挙げられ、これらは、そのまま本明細書に組み込まれるものとする。

【0451】

糖

最も一般的な天然のヌクレオチドは、核酸塩基、アデノシン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、およびチミン(T)またはウラシル(U)に結合したリボース糖から成る。また、ヌクレオチド内のリン酸基または結合したリン酸が、糖または修飾された糖のさまざまな位置に結合可能である修飾されたヌクレオチドが企図される。非制限的な例としては、リン酸基または結合したリン酸は、糖または修飾された糖の2'、3'、4'または5'ヒドロキシル部分に結合可能である。本明細書中で記載される修飾された核酸塩基を組み込むヌクレオチドもまたこの文脈で企図される。いくつかの実施形態において、保護されていない-OH部分を含むヌクレオチドまたは修飾されたヌクレオチドが、本発明の方法により使用される。

【0452】

別の修飾された糖もまた提供されるオリゴヌクレオチド内に組み込まれる。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、以下のうちの1つ: -F; -CF₃、-CN、-N₃、-NO、-NO₂、-OR'、-SR'、または-N(R')₂を2位に含む1以上の置換基を含み、ここで、各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである; -O-(C₁~C₁₀アルキル)、-S-(C₁~C₁₀アルキル)、-NH-(C₁~C₁₀アルキル)、または-N(C₁~C₁₀アルキル)₂; -O-(C₂~C₁₀アルケニル)、-S-(C₂~C₁₀アルケニル)、-NH-(C₂~C₁₀アルケニル)、または-N(C₂~C₁₀アルケニル)₂; -O-(C₂~C₁₀アルキニル)、-S-(C₂~C₁₀アルキニル)、-NH-(C₂~C₁₀アルキニル)、または-N(C₂~C₁₀アルキニル)₂; または-O-O-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-O-(C₁~C₁₀アルキル)、-O-(C₁~C₁₀アルキレン)-NH-(C₁~C₁₀アルキル)もしくは-O-(C₁~C₁₀アルキレン)-NH(C₁~C₁₀アルキル)₂、-NH-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-(C₁~C₁₀アルキル)、または-N(C₁~C₁₀アルキル)-(C₁~C₁₀アルキレン)-O-(C₁~C₁₀アルキル)、ここで、アルキル、アルキレン、アルケニルおよびアルキニルは、置換若しくは非置換であってよい。置換基の例としては、限定するものではないが、-O(CH₂)_nOCH₃および-O(CH₂)_nNH₂が挙げられ、ここで、nは、1から約10であり、MOE、DMAOE、DMAEOEが挙げられる。また、ここで企図されるものは、国際公開第2001/088198号;およびMartin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504に記載される修飾された糖である。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、置換されたシリル基、RNA切断基、レポーター基、蛍光標識、インターカレーター、核酸の薬物動態性を向上させる基、核酸の薬力学的性質を向上させる基、または同様の性質を持つ別の置換基から選択される1以上の基を含む。いくつかの実施形態において、3'-末端ヌクレオチドの糖の3'位または5'-末端ヌクレオチドの5'位を含む、糖または修飾された糖の2'、3'、4'、5'、または6'位の1以上で修飾が行われる。

【0453】

いくつかの実施形態において、リボースの2'-OHは、以下: -H、-F; -CF₃、-CN、-N₃、-NO、-NO₂、-OR'、-SR'、または-N(R')₂の1つを含む置換基と置換され、ここで、各R'は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである; -O-(C₁~C₁₀アルキル)、-S-(C₁~C₁₀アルキル)、-NH-(C₁~C₁₀アルキル)、または-N(C₁

$\sim C_{10}$ アルキル)₂; $-O-$ (C_2-C_{10} アルケニル)、 $-S-$ (C_2-C_{10} アルケニル)、 $-NH-$ (C_2-C_{10} アルケニル)、または $-N$ (C_2-C_{10} アルケニル)₂; $-O-$ (C_2-C_{10} アルキニル)、 $-S-$ (C_2-C_{10} アルキニル)、 $-NH-$ (C_2-C_{10} アルキニル)、または $-N$ (C_2-C_{10} アルキニル)₂; または $-O-$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキレン) $-O-$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキル)、 $-O-$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキレン) $-NH-$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキル) もしくは $-O-$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキレン) $-NH$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキル)₂、 $-NH-$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキレン) $-O-$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキル)、または $-N$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキル) $-(C_1 \sim C_{10}$ アルキレン) $-O-$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキル)、ここで、アルキル、アルキレン、アルケニルおよびアルキニルは、置換若しくは非置換であってよい。いくつかの実施形態において、2'-OH は、 $-H$ (デオキシリボース) により置換される。いくつかの実施形態において、2'-OH は、 $-F$ により置換される。いくつかの実施形態において、2'-OH は、 $-OR'$ により置換される。いくつかの実施形態において、2'-OH は、 $-OMe$ により置換される。いくつかの実施形態において、2'-OH は、 $-OCH_2CH_2OMe$ により置換される。

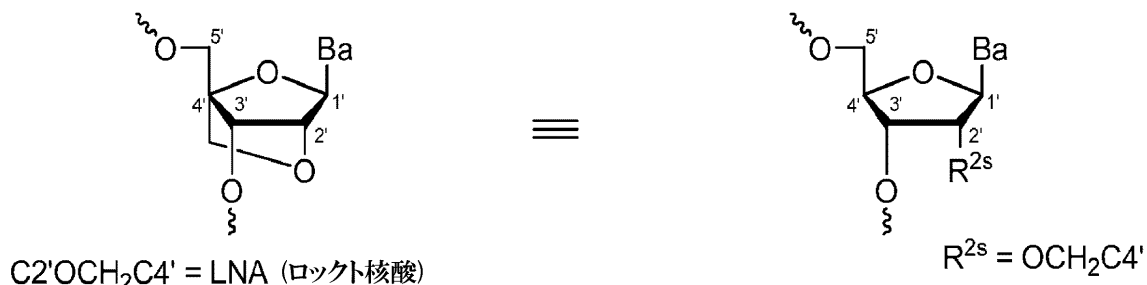
10

【0454】

修飾された糖はまたロックド核酸 (LNA) を含む。いくつかの実施形態において、ロックド核酸は、以下に示す構造を有する。以下の構造のロックド核酸において、Ba は、本明細書中に記載される通り、核酸塩基または修飾された核酸塩基を示し、 R^{2s} は、 $-OCH_2C4'$ である。

20

【化167】



【0455】

いくつかの実施形態において、修飾された糖は、例えば、Seth et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2010 October 27; 132(42): 14942-14950 に記載されるような ENA である。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、XNA (ゼノ核酸) に見られるものであり、例えば、アラビノース、アンヒドロヘキシトール、トレオース、2'-フルオロアラビノース、またはシクロヘキセンである。

30

【0456】

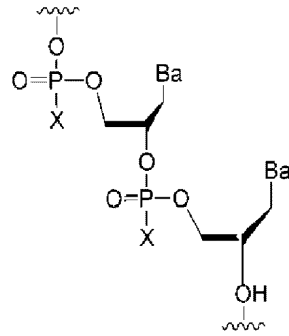
修飾された糖は、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチルまたはシクロペンチル部分のような糖の模倣物を含む。そのような修飾された糖の構造の調製を教示する代表的な米国特許は、限定するものではないが、米国特許第 4,981,957 号; 5,118,800 号; 5,319,080 号; および 5,359,044 号が挙げられる。企図されるいくつかの修飾された糖には、リボース環の酸素原子が、窒素、硫黄、セレン、または炭素で置換される糖が含まれる。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、修飾されたリボースであり、リボース環内の酸素原子は、窒素と置換され、窒素は、アルキル基 (例えば、メチル、エチル、イソプロピルなど) と置換されていてもよい。

40

【0457】

修飾された糖の非限定的な例としては、グリセロール核酸 (GNA) 類似体を形成するグリセロールを含む。GNA 類似体の一例は、以下に示され、Zhang, R et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 5846-5847; Zhang L, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 4174-4175 and Tsai CH et al., *PNAS*, 2007, 14598-14603 ($X = O^-$) に記載される:

【化 1 6 8】



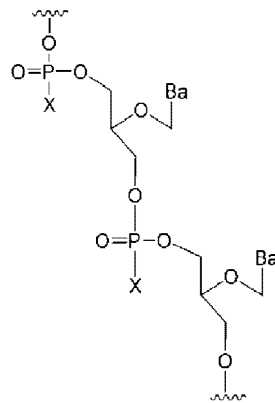
10

。

【0 4 5 8】

GNA誘導類似体の別の例である、ホルミルグリセロールの混合アセタールアミナールに基づく柔軟性核酸（FNA）は、Joyce GF et al., PNAS, 1987, 84, 4398-4402およびHeuberger BD and Switzer C, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 412-413に記載され、以下の通りである：

【化 1 6 9】



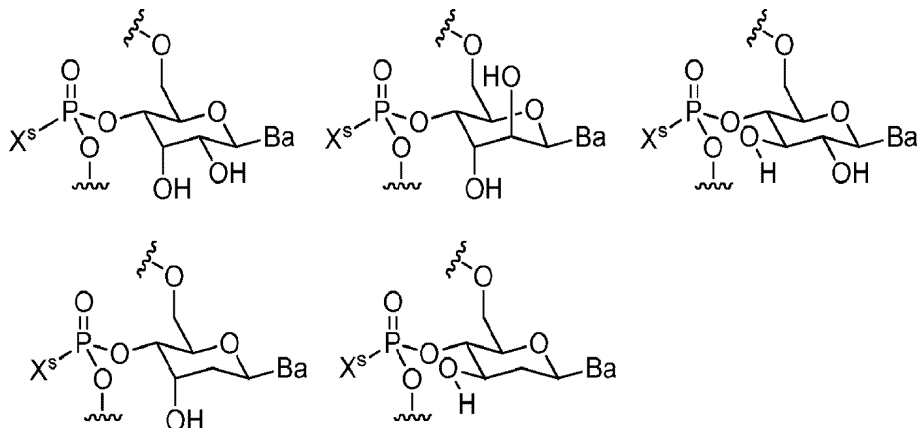
20

。

【0 4 5 9】

修飾された糖のさらなる非限定的な例は、ヘキソピラノシル（6'～4'）、ペントピラノシル（4'～2'）、ペントピラノシル（4'～3'）、またはテトロフラノシル（3'～2'）糖が挙げられる。いくつかの実施形態において、ヘキソピラノシル（6'～4'）糖は、次式：

【化 1 7 0】



40

,

のいずれか 1 つであり、

ここで、 X^s は、本明細書中に記載される P-修飾基「 $-XLR^1$ 」に対応し、Ba は、

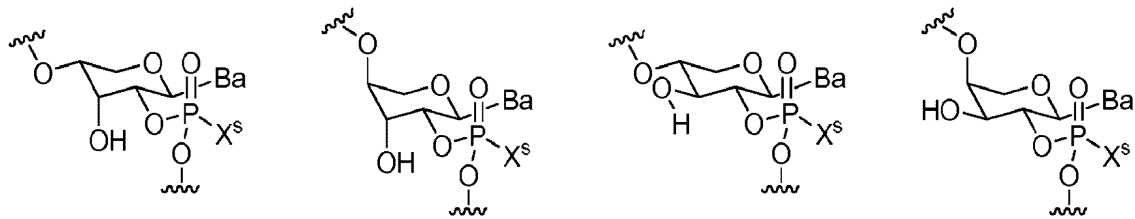
50

ここに定義するとおりである。

【0460】

いくつかの実施形態において、ペントピラノシル（4'～2'）糖は、次式：

【化171】



10

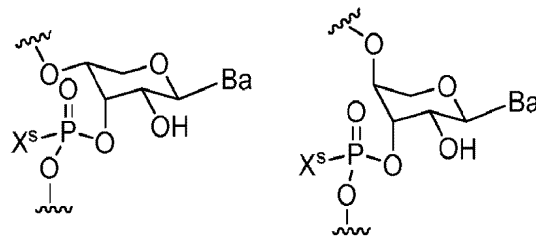
のいずれか1つであり、

ここで、X^sは、本明細書中に記載されるP-修飾基「-XLR¹」に対応し、Baは、ここに定義するとおりである。

【0461】

いくつかの実施形態において、ペントピラノシル（4'～3'）糖は、次式：

【化172】



20

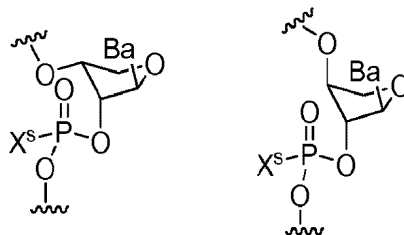
のいずれか1つであり、

ここで、X^sは、本明細書中に記載されるP-修飾基「-XLR¹」に対応し、Baは、ここに定義するとおりである。

【0462】

いくつかの実施形態において、テトロフラノシル（3'～2'）糖は、次式：

【化173】



30

のいずれかであり、

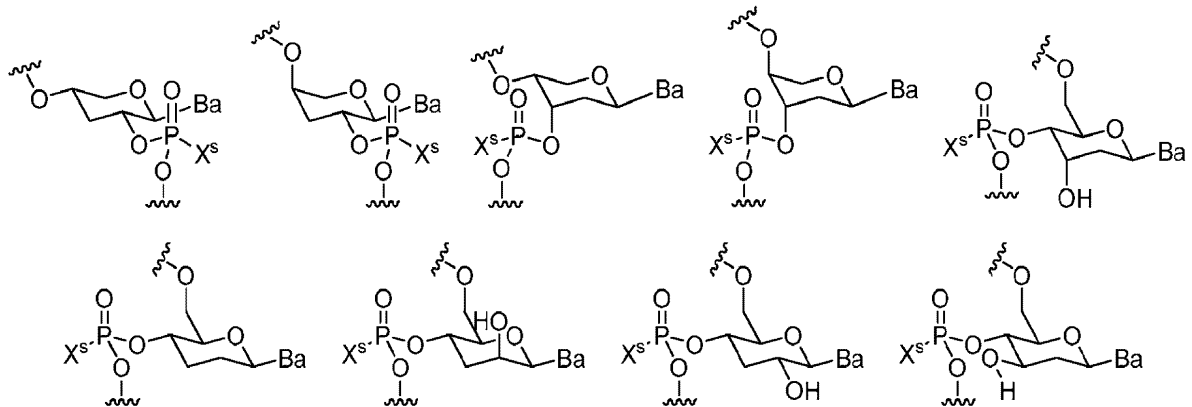
ここで、X^sは、本明細書中に記載されるP-修飾基「-XLR¹」に対応し、Baは、ここに定義するとおりである。

【0463】

いくつかの実施形態において、修飾された糖は、次式：

40

【化 1 7 4】



10

のいずれか 1 つであり、

ここで、 X^s は、本明細書中に記載される P-修飾基「 $-XLR^1$ 」に対応し、Ba は、ここに定義するとおりである。

【0464】

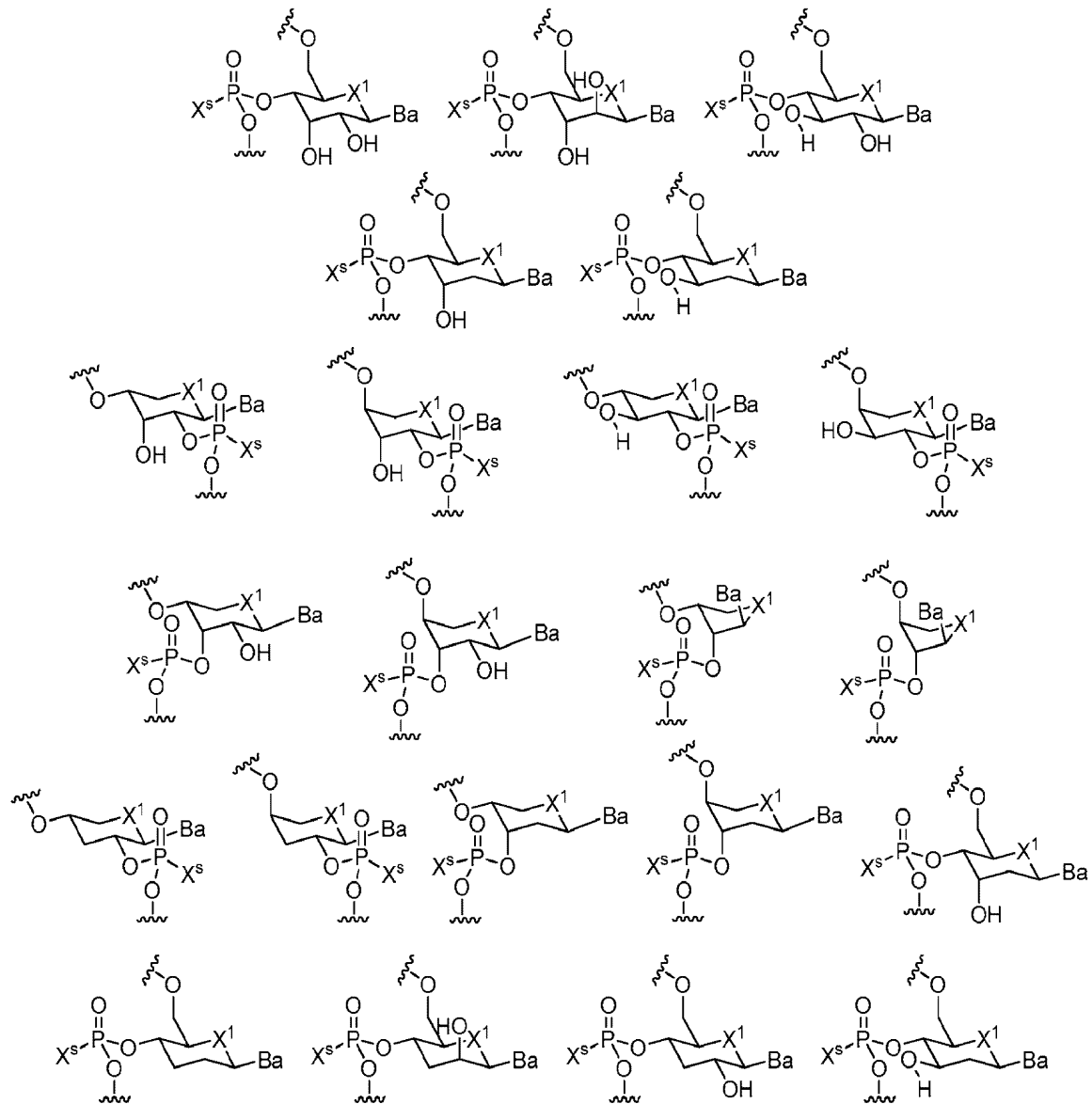
いくつかの実施形態において、糖部分の 1 以上のヒドロキシル基は、独立してハロゲン、 $R'-N(R')_2$ 、 $-OR'$ 、または $-SR'$ で置換されていてもよく、各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。

【0465】

いくつかの実施形態において、糖の模倣物は、以下に示されるとおりであり、 X^s は、本明細書中に記載される P-修飾基「 $-XLR^1$ 」に対応し、Ba は、ここに定義するとおりであり、 X^1 は、 $-S-$ 、 $-Se-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NMe-$ 、 $-NEt-$ または $-NiPr-$ から選択される。

20

【化 1 7 5】



【0 4 6 6】

いくつかの実施形態において、少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、またはそれ以上（例えば、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、またはそれ以上）（それらを含む）キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の糖が、修飾される。いくつかの実施形態において、プリン残留物のみが修飾される（例えば、約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、またはそれ以上 [例えば、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または以上] のプリン残留物が修飾される）。いくつかの実施形態において、ピリミジン残留物のみが修飾される（例えば、約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14

%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、またはそれ以上〔例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上〕のピリジミン (pyridimine) 残留物が修飾される)。いくつかの実施形態において、プリンおよびピリジン残留物の両方が修飾される。

【0467】

修飾された糖および糖の模倣物は、公知の方法により調製可能であり、限定されるものではないが、A.Eschenmoser, Science(1999), 284:2118; M.Bohringer et al, Helv.Chim.Acta(1992), 75:1416-1477; M.Egli et al, J.Am.Chem.Soc.(2006), 128(33):10847-56; A.Eschenmoser in Chemical Synthesis:GnosistoPrognosis, C.Chatgililoglu and V.Sniekus, Ed., (Kluwer Academic, Netherlands, 1996), p.293; K.-U.Schoning et al, Science(2000), 290:1347-1351; A.Eschenmoser et al, Helv.Chim.Acta(1992), 75:218; J.Hunziker et al, Helv.Chim.Acta(1993), 76:259; G.Otting et al, Helv.Chim.Acta(1993), 76:2701; K.Groebke et al, Helv.Chim.Acta(1998), 81:375; and A.Eschenmoser, Science(1999), 284:2118が含まれる。2'修飾に対する修飾は、Verma, S. et al. Annu. Rev. Biochem. 1998, 67, 99-134およびそれに記載されるすべての文献に記載される。リボースに対する具体的な修飾は、以下の文献に記載される: 2'-fluoro(Kawasaki et al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841), 2'-MOE(Martin, P. Helv. Chim. Acta 1996, 79, 1930-1938), "LNA"(Wengel, J. Acc. Chem. Res. 1999, 32, 301-310)。いくつかの実施形態において、修飾された糖は、PCT公開、国際公開第2012/030683号に記載されるいずれかであり、公報は、参照により、本明細書に組み込まれものとし、本出願の図26~30に記載される。

【0468】

オリゴヌクレオチド

いくつかの実施形態において、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物を提供する。例えば、いくつかの実施形態において、提供される組成物は、1以上の個々のオリゴヌクレオチドタイプの所定のレベルを含み、オリゴヌクレオチドタイプは、1)塩基配列; 2)骨格結合のパターン; 3)骨格キラル中心のパターン; および4)骨格P-修飾のパターンにより定義される。

【0469】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ユニマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、P-修飾ユニマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオユニマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、Rp配置のステレオユニマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、Sp配置のステレオユニマーである。

【0470】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アルトマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、P-修飾アルトマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオアルトマーである。

【0471】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ブロックマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、P-修飾ブロックマーである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ステレオブロックマーである。

【0472】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。

10

20

30

40

50

【0473】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、スキップマーである。

【0474】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ユニマー、アルトマー、ブロックマー、ギャップマー、およびスキップマーのうちの1以上の組み合わせである。例えば、いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アルトマーおよびギャップマーの両方である。いくつかの実施形態において、提供されるヌクレオチドは、ギャップマーおよびスキップマーの両方である。数多くの別のパターンの組み合わせが可能であり、それらは、本発明による方法に基づき提供されるオリゴヌクレオチドを合成するために必要である成分が市販され入手可能であるか、および／または合成の利用可能性によってのみ限定されることが、化学および合成分野の当業者により認識されるであろう。

10

【0475】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたLNAを含む。

20

【0476】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された核酸塩基を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された天然核酸塩基を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された修飾された核酸塩基を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の5-メチルシチジン；5-ヒドロキシメチルシチジン，5-ホルミルシトシン、または5-カルボキシルシトシンを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の5-メチルシチジンを含む。

30

【0477】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された糖を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換された、天然のDNAおよびRNAに見出される糖を含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたリボースまたはデオキシリボースを含む。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたリボースまたはデオキシリボースを含み、リボースまたはデオキシリボース部分の1以上のヒドロキシル基は、独立してハロゲン、 R' 、 $-N(R')$ 、 $-OR'$ または $-SR'$ により置換されていてもよく、各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立してハロゲン、 R' 、 $-N(R')$ 、 $-OR'$ 、または $-SR'$ により置換されていてもよく、各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立してハロゲンにより置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立して1以上の $-F$ 、ハロゲンにより置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの2'位は、独立して $-OR'$ により置換

40

50

されていてもよく、各 R' は独立して、上記のとおり定義し、ここに記載したとおりである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1 以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの 2' 位は、独立して -OR' により置換されていてもよく、各 R' は、独立して置換されていてもよい C₁ ~ C₆ 脂肪族である。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1 以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの 2' 位は、独立して -OR' により置換されていてもよく、各 R' は、独立して置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキルである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1 以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの 2' 位は、独立して -OMe により置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1 以上の任意に置換されたデオキシリボースを含み、デオキシリボースの 2' 位は、独立して -O-メトキシエチルにより置換されていてもよい。

10

【0478】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、一本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0479】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド鎖である。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、部分的にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド鎖である。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、完全にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド鎖である。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、二本鎖オリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、三重鎖オリゴヌクレオチド（例えば、三重鎖）である。

20

【0480】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、キメラ性である。例えば、いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、DNA-RNA キメラ、DNA-LNA キメラなどである。

【0481】

いくつかの実施形態において、国際公開第 2012/030683 号に記載されるオリゴヌクレオチドを含む構造のいずれか 1 つは、本発明の方法に基づき修飾され、キラル制御されたその変異体を提供する。例えば、いくつかの実施形態において、キラル制御された変異体は、1 以上の結合したリン酸のいずれかに立体化学的な修飾を含む、および／または 1 以上の結合したリン酸のいずれかに P-修飾を含む。例えば、いくつかの実施形態において、国際公開第 2012/030683 号のオリゴヌクレオチドの特定のヌクレオチド単位は、予め選択され、そのヌクレオチド単位の結合したリン酸で立体化学的に修飾される、および／またはそのヌクレオチド単位の結合したリン酸で、P-修飾されるようにする。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、図 26 ~ 30 に示されるいずれか 1 つの構造である。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、図 26 ~ 30 に示されるいずれか 1 つの構造の変異体（例えば、修飾されたバージョン）である。国際公開第 2012/030683 号の開示内容は、参照により全体を本明細書に組み込まれるものとする。

30

40

【0482】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、治療の薬剤である。

【0483】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0484】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アンチジーンオリゴヌクレオチドである。

【0485】

50

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、デコイオリゴヌクレオチドである。

【0486】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、DNAワクチンの一部である。

【0487】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、免疫調節オリゴヌクレオチド、例えば、免疫刺激性オリゴヌクレオチドおよび免疫抑制オリゴヌクレオチドである。

【0488】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アジュバントである。

【0489】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、アプタマーである。

【0490】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、リボザイムである。

【0491】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、デオキシリボザイム（DNAザイムまたはDNA酵素）である。

【0492】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、低分子干渉RNAである。

【0493】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、マイクロRNA（microRNA）、またはマイクロRNA（miRNA）である。

【0494】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ncRNA（非コードRNA）であり、長鎖非コードRNA（lncRNA）およびPiwi結合RNA（piRNA）などの小分子非コードRNAが含まれる。

【0495】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、構造的RNA、例えば、tRNAに対して相補的である。

【0496】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、核酸類似体であり、例えば、GNA、LNA、PNA、TNAおよびモルホリノである。

【0497】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、P-修飾のプロドラッグである。

【0498】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、プライマーである。いくつかの実施形態において、プライマーは、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase-based chain reactions）（すなわちPCR）に用いるものを使い、核酸を増幅させる。いくつかの実施形態において、プライマーは、逆転写PCR（RT-PCR）およびリアルタイムPCRのような、公知のPCRの変形のいずれかに用いるものである。

【0499】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、RNA分解酵素H活性化を調節する能力を有することの特徴とする。例えば、いくつかの実施形態において、RNA分解酵素H活性化は、立体制御されたホスホロチオエート核酸類似体の存在により調節され、天然のDNA/RNAは、Rp立体異性体と比べて同等またはより高い感受性があり、Rp立体異性体は、対応するSp立体異性体よりもより高い感受性がある。

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、タンパク質の活性を間接的もしくは直接的に増加もしくは減少させる、または、タンパク質の発現を抑制もしくは促進する能力を有することを特徴とする。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、細胞の増殖、ウイルス複製、および／または別の細胞シグナル伝達過程の制御において有用であることを特徴とする。

[illegible]

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約4～約200ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約4～約180ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約4～約160ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約4～約140ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約4～約120ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約4～約100ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約4～約90ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約4～約80ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、約4～約70ヌクレオチド単位の長さである。いくつかの実施形態において、

50

は 3' 末端は、修飾される。いくつかの実施形態において提供されるオリゴヌクレオチドの 5' 末端および／または 3' 末端は、末端キャップ部分で修飾される。末端キャップ部分を含むそのような例示的な修飾は、本明細書中や技術分野で詳しく記載され、例えば、限定されるものではないが、米国特許出願公開第 2009/0023675 A1 に記載される。

【0506】

オリゴヌクレオチドの種

ある実施形態において、式 I のオリゴヌクレオチドは、上記の表 2 に示すまたは実施例に記載される構造のいずれか 1 つである。

【0507】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、ミボメルセンの配列を、またはミボメルセンの配列の一部を含む。ミボメルセンは、以下の塩基配列 G C C T / U C A G T / U C T / U G C T / U T / U C G C A C C に基づく。いくつかの実施形態において、1 以上のヌクレオチドまたは結合のいずれかは、本発明に基づき、修飾されてもよい。いくつかの実施形態において、本発明は、3' → 5' のホスホロチオエート結合で以下の配列：G* - C* - C* - U* - C* - d A - d G - d T - d C - d T - d G - d m C - d T - d T - d m C - G* - C* - A* - C* - C* [d = 2' - デオキシ、* = 2' - O - (2 - メトキシエチル)] を有するキラル制御されたオリゴヌクレオチドを提供する。例示的な修飾されたミボメルセン配列は、本出願を通じて記載され、限定するものではないが、表 4 に記載されるものが含まれる。

【0508】

ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、ミボメルセンユニマーである。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、R_p 配置のミボメルセンユニマーである。ある実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、S_p 配置のミボメルセンユニマーである。

【0509】

ミボメルセンの配列、またはミボメルセンの配列の一部を含む例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、以下の表 4 に記載される。

【0510】

例示的なミボメルセンに関連する配列

10

20

30

【表 4】

オリゴ	立体化学／配列	摘要
101	All-(Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	All-R
102	All-(Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	All-S
103	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	5R-9S-5R
104	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	5S-9R-5S
105	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	1S-17R-1S
106	(Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	1R-17S-1R
107	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	(R/S) ₉ R
108	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	(S/R) ₉ S
109	(Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	3S-13R-3S
110	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	3R-13S-3R
111	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R ¹⁹
112	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R ⁹
113	(Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R ²
114	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	(RRS) ₆ -R
115	(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	S-(RRS) ₆
116	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]	RS-(RRS) ₅ -RR
122	All-(Rp)- d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1 As1Cs1C]	All-R
123	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1 Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	1S-17R-1S
124	All-(Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1 Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]	All-S
126	All-(Rp)-d[Cs2As2Gs2T]	All-R
127	All-(Rp)-d[Cs3As3Gs3T]	All-R

10

20

30

40

128	All-(Sp)-d[C _s 4As ₄ Gs ₄ T]	All-S
129	All-(Sp)-d[C _s 5As ₅ Gs ₅ T]	All-S
130	All-(Sp)-d[C _s 6As ₆ Gs ₆ T]	All-S
131	All-(Rp)-d[Gs ₇ Cs ₇ Cs ₇ Ts ₇ Cs ₇ As ₇ Gs ₇ Ts ₇ Cs ₇ Ts ₇ Gs ₇ Cs ₇ Ts ₇ Cs ₇ Gs ₇ Cs ₇ As ₇ Cs ₇ C]	All-R
132	All-(Sp)-d[Gs ₇ Cs ₇ Cs ₇ Ts ₇ Cs ₇ As ₇ Gs ₇ Ts ₇ Cs ₇ Ts ₇ Gs ₇ Cs ₇ Ts ₇ Cs ₇ Gs ₇ Cs ₇ As ₇ Cs ₇ C]	All-S
133	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)-d[Gs ₁₅ mCs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ As ₁₅ mCs ₁₅ mC]	5R-9S-5R
134	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[Gs ₁₅ mCs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ As ₁₅ mCs ₁₅ mC]	5S-9R-5S
135	All-(Rp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	All-R
136	All-(Sp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	All-S
137	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	1S-9R-1S
138	(Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	2S-7R-2S
139	(Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	1R-9S-1R
140	(Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	2R-7S-2R
141	(Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	3S-5R-3S
142	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	3R-5S-3R
143	(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	(SSR) ₃ -SS
144	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ G]	(RRS) ₃ -RR
145	All-(Rp)-d[5mCs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ As ₁ Gs ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ Ts ₁₅ mCs ₁ Gs ₁₅ mC]	All-R
146	All-(Rp)-d[Gs ₁₅ mCs ₁ Ts ₁ G]	All-R
147	All-(Rp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ T]	All-R
148	All-(Rp)-d[5mCs ₂ As ₂ Gs ₂ Ts ₂₅ mCs ₂ Ts ₂ Gs ₂₅ mCs ₂ Ts ₂ Ts ₂₅ mCs ₂ G]	All-R
149	All-(Rp)-d[5mCs ₄ As ₄ Gs ₄ Ts ₄₅ mCs ₄ Ts ₄ Gs ₄₅ mCs ₄ Ts ₄ Ts ₄₅ mCs ₄ G]	All-R
151	All-(Sp)-d[C _s 1AsGs ₁ T]	All-S
152	All-(Sp)-d[C _s 1AGs ₁ T]	All-S
153	All-(Sp)-d[CA _s 1GsT]	All-S
157	All-(Sp)-d[5mCs ₁ As ₁ Gs ₁ T]	All-S
158	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCs ₁ GsCsACsC]	5S-9R-4S
159	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp,	5S-9R-5S

10

20

30

40

	Sp)-d[Gs1Cs1Cs1Ts1CsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCs1GsCs2As2Cs2C]	
160	All-(Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	All-R
161	All-(Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	All-S
162	(Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	5R-9S-5R
163	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	5S-9R-5S
164	(Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	1S-17R-1S
165	(Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	1R-17S-1R
166	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	(R/S) ₉ R
167	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	(S/R) ₉ S
168	(Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	3S-13R-3S
169	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	3R-13S-3R
170	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	18S/R ¹⁹
171	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	18S/R ⁹
172	(Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	18S/R ²
173	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs] (Gs5mCsAs5mCs5mC) _{MOE}	(RRS) ₆ -R
174	(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp)- (Gs5mCs5mCsTs5mCs) _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs]	S-(RRS) ₆

10

20

30

40

	Cs8C]	
191	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs9Cs9Cs9Ts9Cs9As9Gs9Ts9Cs9Ts9Gs9Cs9Ts9Ts9Cs9Gs9Cs1A Cs9C]	5S-9R-4S
192	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs10Cs10Cs10Ts10Cs10As10Gs10Ts10Cs10Ts10Gs10Cs10Ts10Ts 10Cs10Gs10Cs1ACs10C]	5S-9R-4S
193	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs11Cs11Cs11Ts11Cs11As11Gs11Ts11Cs11Ts11Gs11Cs11Ts11Ts 11Cs11Gs11Cs1ACs11C]	5S-9R-4S
194	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs12Cs12Cs12Ts12Cs12As12Gs12Ts12Cs12Ts12Gs12Cs12Ts12Ts 12Cs12Gs12Cs1ACs12C]	5S-9R-4S
195	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs13Cs13Cs13Ts13Cs13As13Gs13Ts13Cs13Ts13Gs13Cs13Ts13Ts 13Cs13Gs13Cs1ACs13C]	5S-9R-4S
196	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs14Cs14Cs14Ts14Cs14As14Gs14Ts14Cs14Ts14Gs14Cs14Ts14Ts 14Cs14Gs14Cs1ACs14C]	5S-9R-4S
197	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs15Cs15Cs15Ts15Cs15As15Gs15Ts15Cs15Ts15Gs15Cs15Ts15Ts 15Cs15Gs15Cs1ACs15C]	5S-9R-4S
198	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- GsCsCsUsCsAsGsUsCsUsGsCsUsUsCsGsCsACsC	5S-9R-4S
199	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs1Cs1Cs1Us1Cs1As1Gs1Us1Cs1Us1Gs1Cs1Us1Us1Cs1Gs1CsACs 1C	5S-9R-4S
200	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs8Cs8Cs8Us8Cs8As8Gs8Us8Cs8Us8Gs8Cs8Us8Us8Cs8Gs8Cs1AC s8C	5S-9R-4S
201	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs9Cs9Cs9Us9Cs9As9Gs9Us9Cs9Us9Gs9Cs9Us9Us9Cs9Gs9Cs1AC s9C	5S-9R-4S
202	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs10Cs10Cs10Us10Cs10As10Gs10Us10Cs10Us10Gs10Cs10Us10Us 10Cs10Gs10Cs1ACs10C	5S-9R-4S
203	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs11Cs11Cs11Us11Cs11As11Gs11Us11Cs11Us11Gs11Cs11Us11Us 11Cs11Gs11Cs1ACs11C	5S-9R-4S
204	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs12Cs12Cs12Us12Cs12As12Gs12Us12Cs12Us12Gs12Cs12Us12Us 12Cs12Gs12Cs1ACs12C	5S-9R-4S
205	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs13Cs13Cs13Us13Cs13As13Gs13Us13Cs13Us13Gs13Cs13Us13Us 13Cs13Gs13Cs1ACs13C	5S-9R-4S
206	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-	5S-9R-4S

10

20

30

40

	Gs14Cs14Cs14Us14Cs14As14Gs14Us14Cs14Us14Gs14Cs14Us14Us 14Cs14Gs14Cs14ACs14C	
207	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs15Cs15Cs15Us15Cs15As15Gs15Us15Cs15Us15Gs15Cs15Us15Us 15Cs15Gs15Cs14ACs15C	5S-9R-4S

【0511】

オリゴヌクレオチド組成物

本発明は、複数の提供されるオリゴヌクレオチドを含む組成物、または、複数の提供されるオリゴヌクレオチドから成る組成物を提供する（例えば、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物）。いくつかの実施形態において、そのような提供されるオリゴヌクレオチドは、全て同じタイプであり、つまり、全て同じ塩基配列、骨格結合のパターン（つまり、インターヌクレオチド結合タイプのパターン、例えば、リン酸塩、ホスホロチオエートなど）、骨格キラル中心のパターン（つまり、結合したリン酸の立体化学（Rp / Sp）のパターン）、およびリン酸骨格修飾のパターン（例えば、式 I のパターンの「-XLR¹」基）を有する。しかしながら、多くの実施形態において、提供される組成物は、一般的には、予め決められた相対量の複数のオリゴヌクレオチドタイプを含む。

【0512】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、キラル的に純粋なミボメルセン組成物である。すなわち、いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、結合したリン酸の配置に関して、1つのジアステレオマーとしてミボメルセンを提供する。

【0513】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、キラル的に均一なミボメルセン組成物である。つまり、いくつかの実施形態において、ミボメルセンのそれぞれ全ての結合したリン酸は、Rp 配置で存在するか、またはミボメルセンのそれぞれ全ての結合したリン酸は、Sp 配置で存在する。

【0514】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせを含む。提供される組成物における、提供されるオリゴヌクレオチドの1以上の各タイプの選択および量は、組成物の使用目的によって決まることは、化学および医薬分野の当業者により、認識されるであろう。つまり、関連技術分野の当業者は、提供されるオリゴヌクレオチドに含まれる量およびタイプが、組成物全体としてある望ましい特性（例えば、生物学的に好ましい特性、治療上好ましい特性、等）を有するように、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を設計するであろう。

【0515】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、2以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、3以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、4以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、5以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、6以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、7以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、8以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提

10

20

30

40

50

供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、9以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、10以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、15以上の提供されるオリゴヌクレオチドタイプの組み合わせである。

【0516】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、R_p配置のキラル的に均一なミボメルセンの一定量およびS_p配置のキラル的に均一なミボメルセンの一定量の組み合わせである。

10

【0517】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、R_p配置のキラル的に均一なミボメルセンの一定量、S_p配置のキラル的に均一なミボメルセンの一定量および、所望のジアステレオマー形態の1以上のキラル的に純粋なミボメルセンの一定量の組み合わせである。

【0518】

キラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびその組成物の作製方法

本発明は、1以上の特異なヌクレオチドタイプを含むキラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびキラル制御された組成物の作製方法を提供する。上記の通り、ここでの「オリゴヌクレオチドタイプ」という用語は、特定の塩基配列、骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、およびリン酸骨格修飾のパターン（例えば、「-XLR¹」基）を有するオリゴヌクレオチドを定義する。一般的に指定される「タイプ」のオリゴヌクレオチドは、塩基配列、骨格結合のパターン、骨格キラル中心のパターン、およびリン酸骨格修飾のパターンに関して互いに構造的に同一である。

20

【0519】

いくつかの実施形態において、本発明で提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物に対応するものとは異なる性質を有する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物のものとは異なる脂溶性を有する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、HPLCにおいて異なる保持時間を有する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物に対応するものとは、大きく異なるピーク保持時間であってよい。一般的に技術分野で行われるように、HPLCを用いたオリゴヌクレオチド精製の間、ある特定のキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、完全にではないにせよ、大部分が失われる。一般的に技術分野で行われるように、HPLCを用いたオリゴヌクレオチド精製の間ある特定のキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、完全にではないにせよ、大部分が失われる。1つの結果は、立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物の、ある特定のジアステレオマー（あるキラル制御されたオリゴヌクレオチド）は、アッセイで試験されない。別の結果は、バッチごとに、不可避な機器的および人為的エラーにより、「純粋」であると推定される立体的にランダムなオリゴヌクレオチドは、組成物中のジアステレオマーおよびそれらの相対量ならびに絶対量がバッチごとで異なるという点において矛盾した組成物を含むであろう。キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、1つのジアステレオマーとして、キラル制御された方法で合成され、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、所定のレベルの1以上の個々のオリゴヌクレオチドタイプを含むため、本発明で提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドおよびキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、そのような問題点を克服する。

30

40

【0520】

化学および合成分野の当業者は、本発明の合成方法が、提供されるオリゴヌクレオチドの合成の各ステップの間、ある程度の制御を提供し、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオチド単位が予め、結合したリン酸で特定の立体化学、および／または、結合したリン酸で特

50

定の修飾、および／または、特定の塩基、および／または、特定の糖を有するように設計可能および／または選択可能であることを認識するであろう。いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、インターヌクレオチド結合の結合したリン酸で立体中心の特定の組み合わせを有するように予め設計および／または選択される。

【0521】

いくつかの実施形態において、本発明の方法を用いて作られ、提供されるオリゴヌクレオチドは、結合したリン酸修飾の特定の組み合わせを有するように設計および／または決定される。いくつかの実施形態において、本発明の方法を用いて作られ、提供されるオリゴヌクレオチドは、塩基の特定の組み合わせを有するように設計および／または決定される。いくつかの実施形態において、本発明の方法を用いて作られ、提供されるオリゴヌクレオチドは、糖の特定の組み合わせを有するように設計および／または決定される。いくつかの実施形態において、本発明の方法を用いて作られ、提供されるオリゴヌクレオチドは、1以上の上記の構造的特性の特定の組み合わせを有するように設計および／または決定される。

10

【0522】

本発明の方法は、高度なキラル制御を示す。例えば、本発明の方法は、提供されるオリゴヌクレオチド内で各1個の結合したリン酸の立体化学的な配置の制御を容易にする。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、独立して式Iの構造を有する、1以上の修飾されたインターヌクレオチド結合を含むオリゴヌクレオチドを提供する。

【0523】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、ミボメルセンユニマーであるオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、R_p配置のミボメルセンユニマーであるオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、S_p配置のミボメルセンユニマーであるオリゴヌクレオチドを提供する。

20

【0524】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物、つまり、所定のレベルの個々のオリゴヌクレオチドタイプを含むオリゴヌクレオチド組成物を提供する。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1つのオリゴヌクレオチドタイプを含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、1より多いオリゴヌクレオチドタイプを含む。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチドタイプを含む。本発明により作製される例示的なキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書中に記載されるとおりである。

30

【0525】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、結合したリン酸の配置に関してキラル的に純粋なミボメルセン組成物を提供する。つまり、いくつかの実施形態において、本発明の方法は、結合したリン酸の配置に関してミボメルセンが単一のジアステレオマーの形態で組成物に存在するミボメルセンの組成物を提供する。

【0526】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、結合したリン酸の配置に関して、キラル的に均一なミボメルセン組成物を提供する。つまり、いくつかの実施形態において、本発明の方法は、全てのヌクレオチド単位が結合したリン酸の配置に関して、同じ立体化学を有するミボメルセンの組成物を提供し、例えば、全てのヌクレオチド単位が、結合したリン酸において、R_p配置である、または全てのヌクレオチド単位が、結合したリン酸において、S_p配置である組成物である。

40

【0527】

いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、50%超純粋である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、約55%超純粋である。いくつかの実施形態において、提供されるキラル

50

20

30

50

な組成物は、約 98% ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約 99% ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約 99.5% ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約 99.6% ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約 99.7% ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約 99.8% ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、約 99.9% ジアステレオマー的に純粋である。いくつかの実施形態において、そのような組成物は、少なくとも約 99% ジアステレオマー的に純粋である。

【0529】

いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物は、複数のオリゴヌクレオチドタイプを含むように設計された組成物である。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドのライブラリの生成を可能にし、任意の 1 以上のキラル制御されたオリゴヌクレオチドタイプの予め選択された量を任意の 1 以上の別のキラル制御されたオリゴヌクレオチドタイプと混合させ、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物を作るようにできる。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドタイプの予め選択された量は、上記記載のジアステレオマー純度のいずれか 1 つを有する組成物である。

【0530】

いくつかの実施形態において、本発明は、以下のステップ：

- (1) カップリング；
 - (2) キャッピング；
 - (3) 修飾；
 - (4) 脱ブロッキング；および
 - (5) 所望の長さが実現されるまで、(1)～(4)の繰り返しステップを行う
- を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド作製方法を提供する。

【0531】

提供される方法を記載する場合、「サイクル」という用語は、当業者に理解される通常の意味を有する。いくつかの実施形態において、(1)～(4)のステップの一巡をサイクルと呼ぶ。

【0532】

いくつかの実施形態において、本発明は、以下のステップ：

- (a) 第 1 のキラル制御されたオリゴヌクレオチドの一定量を提供する；および
 - (b) 任意で 1 以上のさらなるキラル制御されたオリゴヌクレオチドの一定量を提供すること
- を含むキラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物の作製方法を提供する。

【0533】

いくつかの実施形態において、第 1 のキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、本明細書中に記載されるオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態において、1 以上のさらなるキラル制御されたオリゴヌクレオチドは、本明細書中に記載される 1 以上のオリゴヌクレオチドタイプである。

【0534】

関連する化学および合成分野の当業者は、本発明の方法を用いて合成する場合、提供されるオリゴヌクレオチドは、一定の多用途性を有し、構造的変形ならびに立体化学的な配置に対して制御が可能であることを理解するであろう。例えば、第 1 のサイクル完了後、次に続くサイクルに対して個々に選択されたヌクレオチド単位を使用して次に続くサイクルを行うことが可能であり、いくつかの実施形態においては、第 1 サイクルの核酸塩基および／または糖とは異なる核酸塩基および／または糖が含まれる。同様に、次に続くサイクルのカップリングステップで用いられるキラル補助剤は、第 1 サイクルで用いられるキラル補助剤とは、異なっているとしてもよく、第 2 サイクルでは、異なった立体化学的な配置の

10

20

30

40

50

リン酸結合を生成する。いくつかの実施形態において、新たに形成されたインターヌクレオチド結合で結合したリン酸の立体化学は、立体化学的に純粋なホスホラミダイトを使用して制御される。さらに、次に続くサイクルの修飾ステップで使用される修飾剤は、第1または前のサイクルで使用された修飾剤とは異なってもよい。この反復的な構築アプローチの累積的な効果は、提供されるオリゴヌクレオチドの各成分が、構造的および配置的に、高度に目的に合わせることができる。本アプローチのさらなる利点は、「 $n-1$ 」不純物の形成を最小限にするキャッピングステップである。キャッピングステップがない場合、提供されるオリゴヌクレオチドの単離は、特に長いオリゴヌクレオチドに関して、非常に難しくなるであろう。

【0535】

10

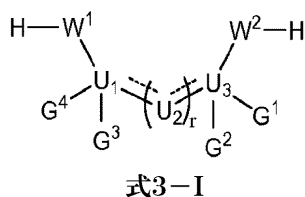
いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドを作る方法の例示的なサイクルが、スキーム I に記載される。スキーム I では、

【化176】



は、固体支持体を示し、固体支持体と結合した成長するキラル制御されたオリゴヌクレオチドの一部であっても良い。例示的なキラル補助剤は、式3-I：

【化177】



20

の構造を有し、

さらなる詳細は以下に記載される。「キャップ」は、キャッピングステップで窒素原子に導入される化学部分であり、いくつかの実施形態において、アミノ保護基である。第1サイクルでは、開始時に固体支持体に結合したヌクレオシドは、1つのみである可能性があるが、脱ブロッキングの前にサイクルの終了を行ってもよいことを、当業者は理解する。当業者により理解される通り、B^{P R O}は、オリゴヌクレオチド合成で使用する保護基である。スキームIの上記のサイクルの各ステップは、さらに以下に記載される。

30

【0536】

スキーム I. キラル制御されたオリゴヌクレオチドの合成

10



30

40

50

において、無機ポリマー支持体は、シリカ、アルミナ、シリカゲル支持体、またはアミノプロピルCPGなどの制御ポリグラス（CPG）である。別の有用な固体支持体には、フルオラス固体支持体（例えば、WO／2005／070859参照）、長鎖アルキルアミン（LCAA）制御多孔性ガラス（CPG）固体支持体（例えば、S. P. Adams, K. S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Holder and G. R. Galluppi, J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 661-663; G. R. Gough, M. J. Bruden and P. T. Gilham, Tetrahedron Lett., 1981, 22, 4177-4180参照）が挙げられる。膜支持体およびポリマー膜（例えば、Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides, Proteins and Nucleic Acids, ch 21 pp 157-162, 1994, Ed. Roger Eptonおよび米国特許第4, 923, 901号参照）もまた核酸の合成に有用である。いったん形成されると、膜は、核酸合成において使用するために、化学的に官能化させることができる。膜への官能基の結合に加えて、膜に結合されたリンカーまたはスパーサ基の使用が、膜と合成鎖との間の立体障害を最小に抑えるために、用いられる。

10

【0539】

別の好ましい固体支持体には、技術分野で一般的に知られ、固相方法で用いられる好ましいものが含まれ、例えば、Primer TM200サポートとして販売されるガラス、制御多孔性ガラス（CPG）、オキサリル制御多孔性ガラス（例えば、Alul, et al., Nucleic Acids Research, 1991, 19, 1527を参照）、TentaGelサポートアミノポリエチレングリコール誘導支持体（例えば、Wright, et al., Tetrahedron Lett., 1993, 34, 3373を参照）およびPorosーポリスチレン／ジビニルベンゼンの共重合体が挙げられる。

20

【0540】

表面活性されたポリマーは、いくつかの固体支持体媒体上で天然および修飾された核酸やタンパク質の合成に利用されている。固体支持体の材料は、どのようなポリマーであってもよく、多孔度が均一で、十分なアミン含有量、および十分な柔軟性を有して、統合性を失うことなく、付随するどのような操作にも耐えうるものが好ましい。選択される材料の例としては、好ましくは、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、およびニトロセルロースである。別の材料が、研究者の設計に依存して、固体支持体として機能し得る。いくつかの設計を考慮すると、例えば、特に金または白金をコーティングした金属が選択され得る（例えば、米国公開公報第20010055761参照）。オリゴヌクレオチド合成の一実施形態において、例えば、ヌクレオシドは、ヒドロキシルまたはアミノ残基を用いて官能化された固体支持体に固定される。また、固体支持体は、誘導体化され、トリメトキシトリチル基（TMT）のような、酸に不安定なトリアルコキシトリチル基を提供する。理論に縛られることなく、トリアルコキシトリチル保護基の存在は、DNA合成装置で一般的に使用される条件下で、初期の脱トリチル化を可能にすることが予想される。アンモニア水溶液中のオリゴヌクレオチド材料をより早く切り離すためには、ジグリコートリンカー（diglycoate linker）を支持体上に導入してもよい。

30

【0541】

いくつかの実施形態において、提供されるオリゴヌクレオチドは、代替として、5' - 3' 方向で合成される。いくつかの実施形態において、核酸は、成長する核酸の5' 末端を通じて固体支持体に結合され、それにより3' 基を反応のために提示する。すなわち5' -ヌクレオシドホスホラミダイトを用いて、または酵素反応中で反応が起こる（例えば、ヌクレオシド5' -三リン酸を用いたライゲーションおよび重合）。5' - 3' 合成を考慮する場合、本発明の反復ステップは、変化しない（つまり、キラルリン酸のキャッピングおよび修飾）。

40

【0542】

結合部分

固体支持体を、自由求核部分を含む化合物に結合させるために結合部分またはリンカーを用いても良い。好適なリンカー、例えば、固相合成技術において固体支持体を初期ヌク

50

レオシド分子の官能基（例えば、ヒドロキシル基）に結合させるように機能する短分子が知られている。いくつかの実施形態において、結合部分は、スクシンアミド酸リンカー、またはコハク酸リンカー（ $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ）、またはオキサリルリンカー（ $-\text{CO}-\text{CO}-$ ）である。いくつかの実施形態において、結合部分およびヌクレオシドはエステル結合を介して一緒に結合される。いくつかの実施形態において、結合部分およびヌクレオシドはアミド結合を介して一緒に結合する。いくつかの実施形態において、結合部分はヌクレオシドを別のヌクレオチドまたは核酸に結合させる。開示される好ましいリンカーは、例えば、Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach, Ekstein, F. Ed., IRL Press, N.Y., 1991, Chapter 1 および Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis, Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28に記載される。

10

【0543】

リンカー部分は、自由求核部分を含む化合物を別のヌクレオシド、ヌクレオチド、または核酸に結合させるために使用される。いくつかの実施形態において、結合部分は、ホスホジエステル結合である。いくつかの実施形態において、結合部分は、H-ホスホネート部分である。いくつかの実施形態において、結合部分は、本明細書中に記載される修飾されたリン酸結合である。いくつかの実施形態において、ユニバーサルリンカー（ユニリンカー（UnyLinker））が、固体支持体にオリゴヌクレオチドを結合させるために使用される（Ravikumar et al., Org. Process Res. Dev., 2008, 12 (3), 399-410）。いくつかの実施形態において、別のユニバーサルリンカーが使用される（Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28）。いくつかの実施形態において、さまざまな直交するリンカー（例えば、ジスルフィドリンカー）が使用される（Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28）。

20

【0544】

一般的な条件—合成に用いる溶媒

提供されるオリゴヌクレオチドの合成は、一般的に非プロトン性有機溶媒中で行われる。いくつかの実施形態において、溶媒は、例えば、アセトニトリルのようなニトリル溶媒中で行われる。いくつかの実施形態において、溶媒は、例えば、ピリジンのような塩基性アミン溶媒である。いくつかの実施形態において、溶媒は、例えば、テトラヒドロフランのようなエーテル溶媒である。いくつかの実施形態において、溶媒は、例えば、ジクロロメタンのようなハロゲン化炭化水素である。いくつかの実施形態において、溶媒の混合物を使用する。ある実施形態において、溶媒は、上記記載の分類の1以上の溶媒の混合物である。

30

【0545】

いくつかの実施形態において、非プロトン性有機溶媒が塩基性ではない場合、塩基が、反応ステップに存在する。いくつかの実施形態において、塩基が存在する場合、塩基は、例えば、ピリジン、キノリン、またはN, N-ジメチルアニリンのように、アミン塩基である。例示的な別のアミン塩基には、ピロリジン、ペペリジン、N-メチルピロリジン、ピリジン、キノリン、N, N-ジメチルアミノピリジン（DMA P）、またはN, N-ジメチルアニリンが挙げられる。

40

【0546】

いくつかの実施形態において、塩基は、アミン塩基以外である。

【0547】

いくつかの実施形態において、非プロトン性有機溶媒は、無水である。いくつかの実施形態において、無水非プロトン性有機溶媒は、新たに蒸留される。いくつかの実施形態において、新たに蒸留される無水非プロトン性有機溶媒は、例えば、ピリジンのような塩基性アミン溶媒である。いくつかの実施形態において、新たに蒸留される無水非プロトン性有機溶媒は、例えば、テトラヒドロフランなどのエーテル溶媒である。いくつかの実施形態において、新たに蒸留される無水非プロトン性有機溶媒は、例えば、アセトニトリルのようなニトリル溶媒である。

50

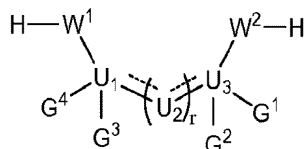
【0548】

キラル試薬

提供される方法において、キラル試薬が、キラル制御されたオリゴヌクレオチドの生産において立体選択性を与えるために使用される。キラル補助剤として、当業者により、本明細書中に引用される多くの異なるキラル試薬を、本発明の方法の方法により使用しても良い。そのような例示的なキラル試薬は、本明細書中や上記の文献、Wada I, IIおよびIIIに記載されるとおりである。ある実施形態において、キラル試薬は、Wada Iに記載されるとおりであり。いくつかの実施形態において、本発明の方法により使用されるキラル試薬は、以下の式3-I:

【0549】

【化179】



式3-I

であり、

ここで W^1 および W^2 は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、または $-\text{N}\text{G}^5-$ のいずれかであり、 U_1 および U_3 は、単結合、二重結合または三重結合を通じて、 U_2 が存在する場合、 U_2 と結合する炭素原子、または r が、0の場合、互いに結合する炭素原子である。 U_2 は、 $-\text{C}-$ 、 $-\text{C}\text{G}^8-$ 、 $-\text{C}\text{G}^8\text{G}^8-$ 、 $-\text{N}\text{G}^8-$ 、 $-\text{N}-$ 、 $-\text{O}-$ 、または $-\text{S}-$ であり、 r は、0~5の整数であり、2個を超えるヘテロ原子が隣接することはない。 U_2 のいずれか1つがCである場合、三重結合が、Cである第2の事例の U_2 の間に形成されなければならない、または U_1 もしくは U_3 のいずれか1つに形成されなければならない。同様に、 U_2 のいずれか1つが CG^8 である場合、二重結合が、 $-\text{C}\text{G}^8-$ もしくは $-\text{N}-$ である第2の事例の U_2 の間に形成される、または、 U_1 もしくは U_3 のいずれか1つに形成される。

【0550】

いくつかの実施形態において、 $-\text{U}_1-(\text{U}_2)_r-\text{U}_3-$ は、 $-\text{C}\text{G}^3\text{G}^4-\text{C}\text{G}^1\text{G}^2-$ である。いくつかの実施形態において、 $-\text{U}_1-(\text{U}_2)_r-\text{U}_3-$ は、 $-\text{C}\text{G}^3=\text{C}\text{G}^1-$ である。いくつかの実施形態において、 $-\text{U}_1-(\text{U}_2)_r-\text{U}_3-$ は、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ である。いくつかの実施形態において、 $-\text{U}_1-(\text{U}_2)_r-\text{U}_3-$ は、 $-\text{C}\text{G}^3=\text{C}\text{G}^8-\text{C}\text{G}^1\text{G}^2-$ である。いくつかの実施形態において、 $-\text{U}_1-(\text{U}_2)_r-\text{U}_3-$ は、 $-\text{C}\text{G}^3\text{G}^4-\text{O}-\text{C}\text{G}^1\text{G}^2-$ である。いくつかの実施形態において、 $-\text{U}_1-(\text{U}_2)_r-\text{U}_3-$ は、 $-\text{C}\text{G}^3\text{G}^4-\text{O}-\text{C}\text{G}^1\text{G}^2-$ である。いくつかの実施形態において、 $-\text{U}_1-(\text{U}_2)_r-\text{U}_3-$ は、 $-\text{C}\text{G}^3\text{G}^4-\text{N}\text{G}^8-\text{C}\text{G}^1\text{G}^2-$ である。いくつかの実施形態において、 $-\text{U}_1-(\text{U}_2)_r-\text{U}_3-$ は、 $-\text{C}\text{G}^3\text{G}^4-\text{N}-\text{C}\text{G}^2-$ である。いくつかの実施形態において、 $-\text{U}_1-(\text{U}_2)_r-\text{U}_3-$ は、 $-\text{C}\text{G}^3\text{G}^4-\text{N}=\text{C}\text{G}^8-\text{C}\text{G}^1\text{G}^2-$ である。

【0551】

ここに定義される、 G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^4 、 G^5 、および G^8 は、独立して水素、または、アルキル、アラキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、およびアリールから選択される任意に置換されている基である；または2個の G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^4 、および G^5 ならびに G^6 は、一緒になって置換されているいてもよい、飽和、部分的に不飽和もしくは不飽和の炭素環式、または単環式もしくは多環式の最大約20の環原子のヘテロ原子を含有する環を形成し、これは、縮合環または非縮合環である。いくつかの実施形態において、そのように形成された環は、オキソ、チオキソ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアリール、またはアリール部分により置換される。いくつかの実施形態において、2個の G^6 が一緒になって形成された環が置換される場合、それは、反応最中に、立体選択性を与えるのに十分なかさをもつ部分に

10

20

30

40

50

より置換される。

【0552】

いくつかの実施形態において、2個の G^6 が一緒になって形成された環は、置換されていてもよいシクロペンチル、ピロリル、シクロプロピル、シクロヘキセニル、シクロペンテニル、テトラヒドロピラニル、またはピペラジニルである。いくつかの実施形態において、2個の G^6 が一緒になって形成された環は、置換されていてもよいシクロペンチル、ピロリル、シクロプロピル、シクロヘキセニル、シクロペンテニル、テトラヒドロピラニル、ピロリジニル、またはピペラジニルである。

【0553】

いくつかの実施形態において、 G^1 は、置換されていてもよいフェニルである。いくつかの実施形態において、 G^1 は、フェニルである。いくつかの実施形態において、 G^2 は、メチルまたは水素である。いくつかの実施形態において、 G^1 は、置換されていてもよいフェニルであり、 G^2 は、メチルである。いくつかの実施形態において、 G^1 は、フェニルであり、 G^2 は、メチルである。

【0554】

いくつかの実施形態において、 r は、0である。

【0555】

いくつかの実施形態において、 W^1 は、 $-NG^5-$ である。いくつかの実施形態において、 G^3 および G^4 のいずれか1つは、 G^5 と一緒に置換されていてもよいピロリジニル環を形成する。いくつかの実施形態において、 G^3 および G^4 のいずれか1つは、 G^5 と一緒にピロリジニル環を形成する。

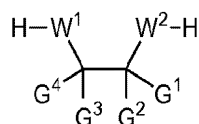
【0556】

いくつかの実施形態において、 W^2 は、 $-O-$ である。

【0557】

いくつかの実施形態において、キラル試薬は、式3-AAの化合物である：

【化180】



式3-AA

ここで、各変数は、独立して、上記のとおり定義され、ここに記載したとおりである。

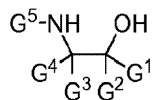
【0558】

式3-AAのいくつかの実施形態において、 W^1 および W^2 は、独立して $-NG^5-$ 、 $-O-$ 、または $-S-$ ； G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^4 、および G^5 は、独立して水素、または、アルキル、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、およびアリールから選択される置換されていてもよい基である；または2個の G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^4 、および G^5 ならびに G^6 は、一緒になって置換されていてもよい、飽和、部分的に不飽和もしくは不飽和の炭素環式、または単環式もしくは多環式の最大約20の環原子のヘテロ原子を含有する環を形成し、これは、縮合環または非縮合環であり、 G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^4 、および G^5 ならびに G^6 は、4を超えることがない。式3-Iと同様に、 G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^4 、または G^5 のいずれかは、オキソ、チオオキソ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアリール、またはアリール部分により置換されていてもよい。いくつかの実施形態において、そのような置換は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドの生産において立体選択性を生じさせる。

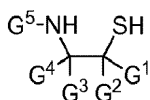
【0559】

いくつかの実施形態において、キラル試薬は、次式：

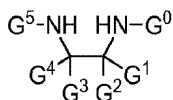
【化 1 8 1】



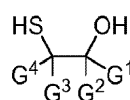
式 3-AB



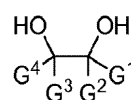
3-BB



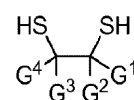
3-CC



3-DD



3-EE



3-FF

のいずれか 1 つである。

【0 5 6 0】

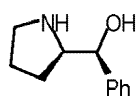
いくつかの実施形態において、キラル試薬は、アミノアルコールである。いくつかの実施形態において、キラル試薬は、アミノチオールである。いくつかの実施形態において、キラル試薬は、アミノフェノールである。いくつかの実施形態において、キラル試薬は、(S)-および(R)-2-メチルアミノ-1-フェニルエタノール、(1R, 2S)-エフェドリン、または(1R, 2S)-2-メチルアミノ-1, 2-ジフェニルエタノールである。

10

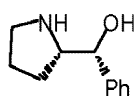
【0 5 6 1】

本発明のいくつかの実施形態において、キラル試薬は、次式：

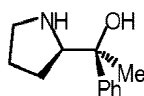
【化 1 8 2】



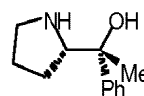
式O



式P



式Q



式R

20

いずれか 1 つの化合物である。

【0 5 6 2】

キラル試薬の選択、例えば、式Qにより表される異性体、または、式Rにより表されるその立体異性体は、結合したリン酸で、キラリティーの特異な制御を可能にする。よって、RpまたはSp配置のいずれかが、各合成サイクルにおいて選択可能であり、キラル制御されたオリゴヌクレオチドの3次元構造全体に対して制御が可能になる。いくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、全部がRp立体中心を有する。本発明のいくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、全部がSp立体中心を有する。本発明のいくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドの各結合したリン酸は、独立してRpまたはSpである。本発明のいくつかの実施形態において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドの各結合したリン酸は、独立してRpまたはSp、および少なくとも1つはRp、および少なくとも1つはSpである。いくつかの実施形態において、RpおよびSpの中心の選択は、キラル制御されたオリゴヌクレオチドに対して特定の3次元超構造を与えるように行われる。そのような例示的な選択は、さらに詳細に本明細書中に記載される。

30

【0 5 6 3】

いくつかの実施形態において、本発明により使用されるキラル試薬は、上記のサイクル中にあるステップで除去される能力によって選択される。例えば、いくつかの実施形態において、結合したリン酸の修飾ステップの最中に、キラル試薬を取り除くことが望ましい。いくつかの実施形態において、結合したリン酸の修飾ステップの前に、キラル試薬を取り除くことが望ましい。いくつかの実施形態において、結合したリン酸の修飾ステップの後に、キラル試薬を取り除くことが望ましい。いくつかの実施形態において、第2のカップリングの最中に、キラル試薬が、成長するオリゴヌクレオチド上に存在しないように、第1のカップリングステップを行った後、かつ、第2カップリングステップを行う前にキラル試薬を取り除くことが望ましい（およびさらにそれに続くカップリングステップも同様である）。いくつかの実施形態において、キラル試薬は、結合したリン酸の修飾後であるが、次に続くサイクルが始まる前に行う「脱ブロッキング」反応の最中に除去される。除去のための例示的な方法および試薬は、本明細書中に記載される。

40

50

【0564】

いくつかの実施形態において、スキーム I に記載される修飾および／または脱ブロッキングステップを行う場合に、キラル補助剤の除去が実現される。修飾および脱ブロッキングのような別の変換と一緒にキラル補助剤の除去を組み合わせることが有益である。ステップ／変換を省略することにより、例えば、特により長いオリゴヌクレオチドの収率および生成物の純度に関して、合成の全体的な効率を高め得ることができることを当業者は理解するであろう。修飾および／または脱ブロッキングの最中にキラル補助剤が除去される一例は、スキーム I に記載される。

【0565】

いくつかの実施形態において、本発明の方法により用いられるキラル試薬は、ある条件下で除去可能であることを特徴とする。例えば、いくつかの実施形態において、キラル試薬は、酸性条件下で、除去される能力により選択される。ある実施形態において、キラル試薬は、弱酸性条件下で、除去される能力により選択される。ある実施形態において、キラル試薬は、E1 除去反応の方法で、除去される能力により選択される（例えば、酸性条件下で、キラル試薬上にカチオン中間体が形成して除去を行い、キラル試薬をオリゴヌクレオチドから切り離す）。いくつかの実施形態において、キラル試薬は、E1 除去反応に適応またはそれを促進することが可能であると認識される構造を有することを特徴とする。どの構造がそのような除去反応に耐える傾向があるか予見しうることを関連技術分野の当業者は、理解するであろう。

【0566】

いくつかの実施形態において、キラル試薬は、求核試薬を用いて除去される能力により選択される。いくつかの実施形態において、キラル試薬は、アミン求核試薬を用いて除去される能力により選択される。いくつかの実施形態において、キラル試薬は、アミン以外の求核試薬を用いて除去される能力により選択される。

【0567】

いくつかの実施形態において、キラル試薬は、塩基を用いて除去される能力により選択される。いくつかの実施形態において、キラル試薬は、アミンを用いて除去される能力により選択される。いくつかの実施形態において、キラル試薬は、アミン以外の塩基を用いて除去される能力により選択される。

【0568】

キラル試薬のさらなる実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、キラル制御オリゴヌクレオチドを合成するのに使用されるキラル試薬に関する。

【0569】

いくつかの実施形態では、本発明は、上及び本明細書に記載されるカップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、上及び本明細書に記載される修飾及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、上及び本明細書に記載される硫化及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、上及び本明細書に記載される酸化のステップに対して安定性のあるキラル試薬を提供する。いくつかの実施形態では、かかるキラル試薬は式 Z-I の構造を有する。

【0570】

いくつかの実施形態では、本発明は、塩基及び／又は求核試薬による処理によって除去されるキラル試薬を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、塩基及び／又は求核試薬による処理によって除去され、上及び本明細書に記載されるカップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、アミンを含む処理によって除去されるキラル試薬を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、アミンを含む処理によって除去され、上及び本明細書に記載されるカップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキング

の各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、本願に記載される脱保護／切断条件によって除去され、上及び本明細書に記載されるカップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を提供する。いくつかの実施形態では、かかるキラル試薬は式 Z-I の構造を有する。

【0571】

いくつかの実施形態では、カップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を用いて、上及び本明細書に記載されるキラル制御オリゴヌクレオチドを合成する。いくつかの実施形態では、カップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を用いて、上及び本明細書に記載されるキラル制御オリゴヌクレオチドを合成し、キラル制御ヌクレオチドは1つ又は複数のリン酸ジエステル結合又はホスホロチオエートジエステル結合を含む。いくつかの実施形態では、カップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を用いて、1つ又は複数のリン酸ジエステル結合又はホスホロチオエートジエステル結合を含むキラル制御オリゴヌクレオチドを合成し、試薬は、オリゴヌクレオチドが所望の長さに達するまで除去しない。いくつかの実施形態では、カップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を用いて、1つ又は複数のリン酸ジエステル結合又はホスホロチオエートジエステル結合を含むキラル制御オリゴヌクレオチドを合成し、試薬は、サイクル終了後まで除去しない。いくつかの実施形態では、カップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を用いて、1つ又は複数のリン酸ジエステル結合又はホスホロチオエートジエステル結合を含むキラル制御オリゴヌクレオチドを合成し、試薬は、固体支持体からの切断まで除去しない。いくつかの実施形態では、カップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬を用いて、1つ又は複数のリン酸ジエステル結合又はホスホロチオエートジエステル結合を含むキラル制御オリゴヌクレオチドを合成し、試薬は、固体支持体からの切断まで除去せず、除去を固体支持体からの切断と同じステップで実施する。いくつかの実施形態では、かかるキラル試薬は式 Z-I の構造を有する。

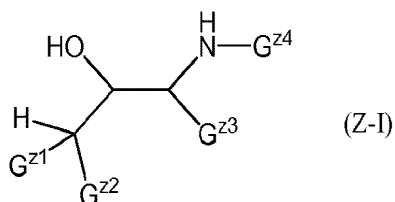
【0572】

いくつかの実施形態では、カップリング、キャッピング、修飾、及び脱ブロッキングの各ステップに対して安定性のあるキラル試薬をオリゴヌクレオチド合成において用いる場合、カップリングできる状態にある 5'-OH をもったオリゴヌクレオチドは、スキーム I、I-b、I-c、I-d、Z-1 及び Z-2 に記載されるものも含めて、いずれの合成サイクルからのものでもよい。いくつかの実施形態では、カップリングできる状態にある 5'-OH をもったオリゴヌクレオチドは、上及び本明細書に記載される種々のタイプのヌクレオチド間結合を含む。カップリングの後、本願に記載される修飾ステップは、結合リンに所望の修飾を導入する。生成物は、5'-OH の脱ブロッキングの前後にサイクル終了へ行くか、5'-OH を脱ブロッキングした後に次のサイクルへ入るか、いずれでもよい。次のサイクルとは、スキーム I、I-b、I-c、I-d、Z-1 及び Z-2 に記載されるものを含むが、それらに限定されず、本願に記載される合成サイクルのいずれでもよい、ということが当業者に理解される。

【0573】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用するキラル試薬又はその塩は、化学式 (Z-I) のものである。

【化 1 8 3】



【0 5 7 4】

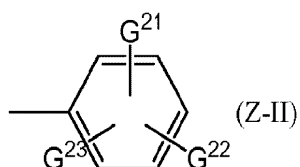
式 (Z-I) において、 G^{Z1} 及び G^{Z2} は互いに独立して水素原子、ニトロ基 ($-NO_2$)、ハロゲン原子、シアノ基 ($-CN$)、式 (Z-III) 若しくは (Z-III') の基、又は、 G^1 及び G^2 の両方が一緒になって式 (Z-V) の基を形成したもの、である。

10

【0 5 7 5】

いくつかの実施形態では、式 (Z-III) の基は下に示される通りであり：

【化 1 8 4】



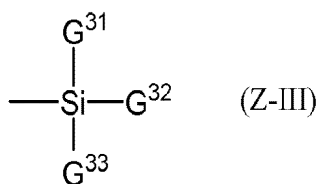
20

、
式中、 $G^{21} \sim G^{23}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基又は $C_1 \sim C_3$ アルキル基である。

【0 5 7 6】

いくつかの実施形態では、式 (Z-III') の基は下に示される通りであり：

【化 1 8 5】



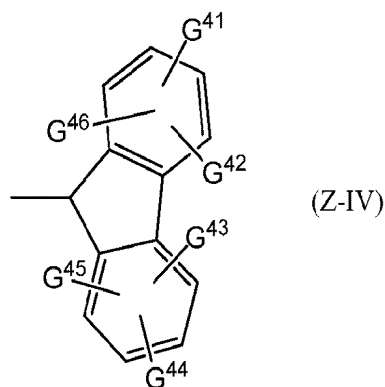
30

、
式中、 $G^{31} \sim G^{33}$ は互いに独立して $C_1 \sim C_4$ アルキル基、 $C_6 \sim C_{14}$ アリール $C_1 \sim C_4$ アルコキシ基、 $C_7 \sim C_{14}$ アラルキル基、 $C_1 \sim C_4$ アルキル $C_6 \sim C_{14}$ アリール基、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ $C_6 \sim C_{14}$ アリール基、又は $C_6 \sim C_{14}$ アリール $C_1 \sim C_4$ アルキル基である。

【0 5 7 7】

いくつかの実施形態では、式 (Z-V) の基は下に示される通りであり：

【化 1 8 6】



10

、
 式中、 $G^{41} \sim G^{46}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。

【0 5 7 8】

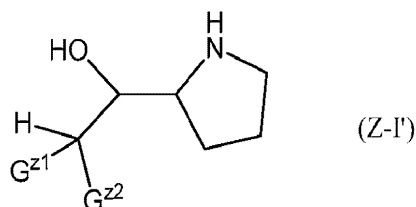
G^{z3} 及び G^{z4} は互いに独立して水素原子、 $C_1 \sim 3$ アルキル基、 $C_6 \sim 14$ アリール基、又は、 G^{z3} 及び G^{z4} の両方が一緒になって 3 ～ 16 の炭素原子を有するヘテロ原子含有環を式 (Z-I) 中 NH 成分とともに形成したもの、である。

【0 5 7 9】

20

いくつかの実施形態では、キラル試薬は次の化学式 (Z-I') を有し：

【化 1 8 7】



、式中、 G^{z1} 及び G^{z2} は上に同じである。即ち、 G^{z1} 及び G^{z2} は、互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、式 (Z-III) 若しくは (Z-IIII) の基、又は、 G^{z1} 及び G^{z2} の両方が一緒になって式 (Z-IV) の基を形成したもの、である。

30

【0 5 8 0】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} 及び G^{z2} のそれぞれは式 (Z-III) の基であり、式中、 $G^{21} \sim G^{23}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。

【0 5 8 1】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} 及び G^{z2} のそれぞれは式 (Z-III) の基であり、 $G^{21} \sim G^{23}$ のそれぞれは水素原子である。

【0 5 8 2】

40

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-III) の基であり、 $G^{21} \sim G^{23}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。

【0 5 8 3】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-III) の基であり、 G^{21} 及び G^{22} のそれぞれは水素原子であり、 G^{23} はニトロ基である。

【0 5 8 4】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (III) の基であり、 $G^{31} \sim G^{33}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ ア

50

ルキル基、 $C_6 \sim 14$ アリール基、 $C_7 \sim 14$ アラルキル基、 $C_1 \sim 4$ アルキル $C_6 \sim 14$ アリール基、 $C_1 \sim 4$ アルコキシ $C_6 \sim 14$ アリール基、又は $C_6 \sim 14$ アリール $C_1 \sim 4$ アルキル基である。

【0585】

いくつかの実施形態では、キラル試薬は化学式 (I') を有し、 G^1 は水素原子であり、 G^2 は式 (III) の基であり、 $G^{31} \sim G^{33}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基、 C_6 アリール基、 $C_7 \sim 10$ アラルキル基、 $C_1 \sim 4$ アルキル C_6 アリール基、 $C_1 \sim 4$ アルコキシ C_6 アリール基、又は C_6 アリール $C_1 \sim 4$ アルキル基である。

【0586】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-III) の基であり、 $G^{31} \sim G^{33}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基又は C_6 アリール基である。 $C_1 \sim 4$ アルキル基の例としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、及び *tert*-ブチル基がある。

10

【0587】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-III) の基であり、 $G^{31} \sim G^{33}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基である。

【0588】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-III) の基であり、 G^{31} 及び G^{33} は C_6 アリール基であり、 G^{32} は $C_1 \sim 4$ アルキル基である。

20

【0589】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} 及び G^{z2} は一緒になって式 (Z-IV) の基を形成し、 $G^{41} \sim G^{46}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 4$ アルキル基である。

【0590】

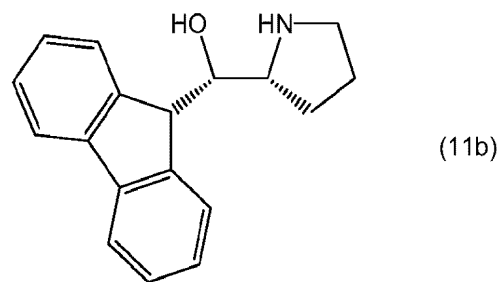
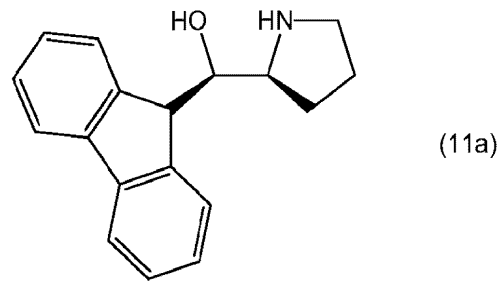
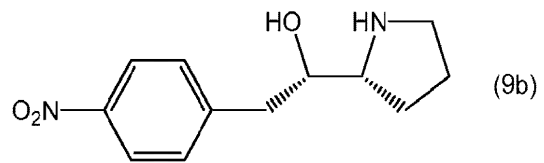
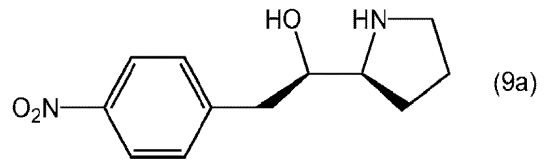
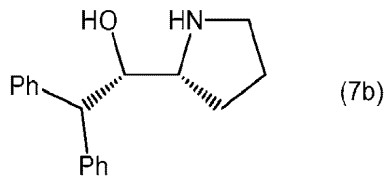
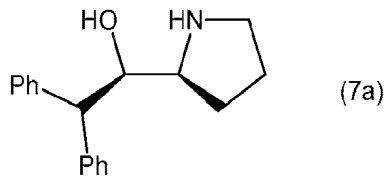
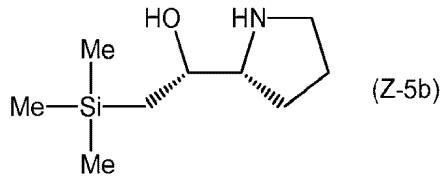
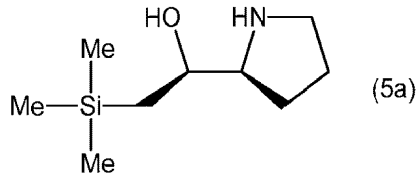
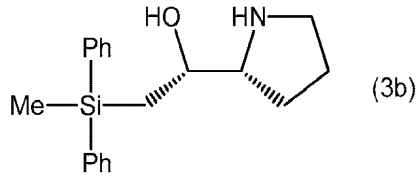
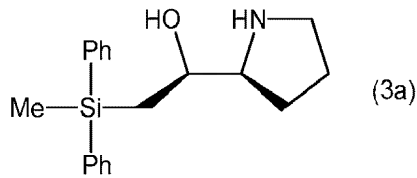
ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{z1} 及び G^{z2} は一緒になって式 (Z-IV) (式中、 $G^{41} \sim G^{46}$ のそれぞれは水素原子である) の基を形成する。

30

【0591】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 3a、3b、5a、Z-5b、7a、7b、9a、9b、11a、及び 11b：

【化 1 8 8】

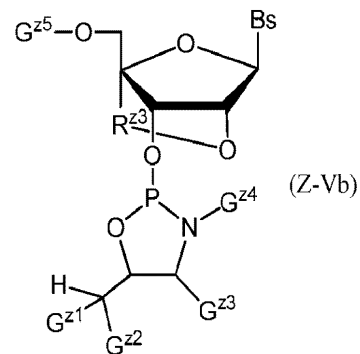
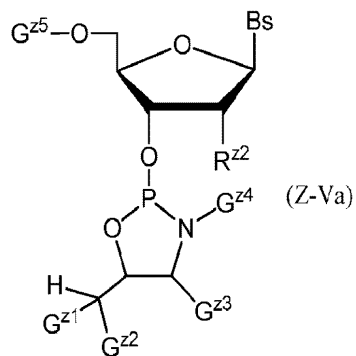


の 1 つより選択される。

【 0 5 9 2】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用するヌクレオシド 3'-ホスホラミダイト誘導体は式 (Z-Va) 又は (Z-Vb) によって表され：

【化 1 8 9】



、
式中、 $G^{z1} \sim G^{z4}$ は上に同じであり、 G^{z5} はヒドロキシル基の保護基であり、Bs は、次の式 (Z-VI) ~ (Z-XI) によって表される基より選択される基又はその誘導体である。

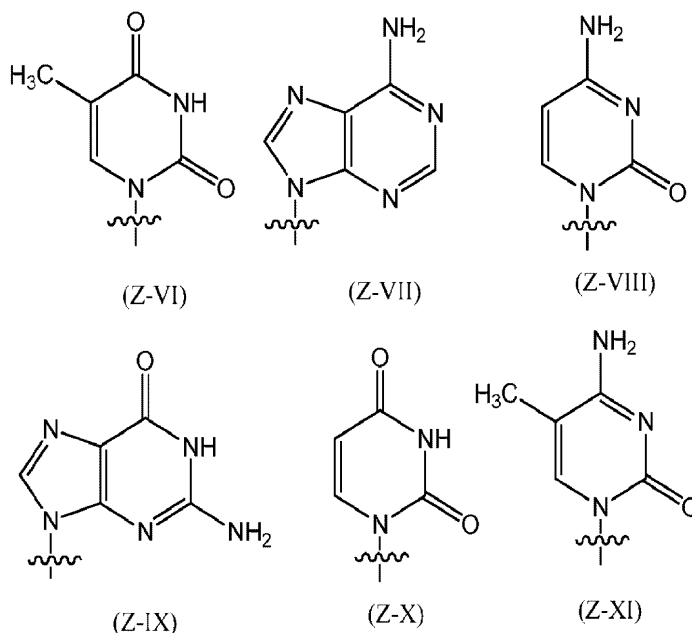
10

20

30

40

【化 190】



10

Bsの例としては、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、ウラシル、5-メチルシトシン、又はその誘導体があり；

20

R^{z2} は互いに独立して水素、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NR^dR^d$ 、 $-N_3$ 、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキル- Y^1 -、アルケニル- Y^1 -、アルキニル- Y^1 -、アリール- Y^1 -、ヘテロアリール- Y^1 -、 $-OR^b$ 、又は $-SR^b$ であり、式中、 R^b はブロック成分である；

Y^1 はO、 NR^d 、S、又はSeであり；

R^d は互いに独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アシル、置換シリル、カルバメート、 $-P(O)(R^e)_2$ 、又は $-HP(O)(R^e)$ であり；

R^e は互いに独立して水素、アルキル、アリール、アルケニル、アルキニル、アルキル- Y^2 -、アルケニル- Y^2 -、アルキニル- Y^2 -、アリール- Y^2 -、又はヘテロアリール- Y^2 -、又は、 Na^+ 、 Li^+ 、若しくは K^+ である陽イオン、又は $-O^-$ であり；

30

Y^2 はO、 NR^d 、又はSであり；

R^{z3} は、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CH_2NH-$ 、又は $-CH_2N(CH_3)-$ で表される基である。

【0593】

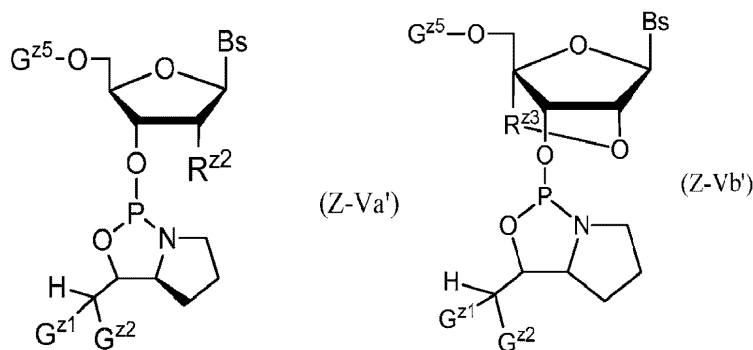
G5の例としては、トリチル、4-モノメトキシトリチル、4,4'-ジメトキシトリチル、4,4',4''-トリメトキシトリチル、9-フェニルキサンチン-9-イル（ピキシル）及び9-（p-メトキシフェニル）キサンチン-9-イル（MOX）がある。

【0594】

いくつかの実施形態では、ヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体は式（Z-Va'）又は（Z-Vb'）で表され；

40

【化 1 9 1】



10

式中、G^{z1}、G^{z2}、G^{z5}、Bs、R^{z2}、及びR^{z3}のそれぞれは互いに独立して上に定義され本明細書に記載される通りである。

【0595】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの合成方法に関する。

【0596】

いくつかの実施形態では、提供される方法は、アキラルなH-ホスホネート成分を含む分子と、第1の活性化試薬と、キラル試薬又はその塩とを反応させてモノマーを形成する第1ステップを含む。いくつかの実施形態では、キラル試薬は化学式(Z-I)を有し、モノマーは式(Z-Va)、(Z-Vb)、(Z-Va')、又は(Z-Vb')で表すことができる。モノマーは第2の活性化試薬及びヌクレオシドと反応して縮合中間体を形成する。いくつかの実施形態では、続くステップは縮合中間体をキラルなX-ホスホネート成分を含む核酸に変換することを含む。

20

【0597】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、安定な市販材料を出発材料として提供する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、アキラルな出発材料を用いた立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチドを提供する。

【0598】

実施例に示す通り、いくつかの実施形態では、本発明の方法は、脱保護ステップの間分解を起こさない。さらに本方法では特別なキャッピング剤を必要とすることなくリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体を産生する。

30

【0599】

いくつかの実施形態では、本発明は、アキラルなモノマーを用いた、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体の合成方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1のステップでは、式(Z-Va)、(Z-Vb)、(Z-Va')、又は(Z-Vb')で表されるヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を第2の活性化試薬及びヌクレオシドと反応させて縮合中間体を形成する。第2のステップでは縮合中間体を、キラルなX-ホスホネート成分を含む核酸に変換する。

【0600】

本明細書に開示される全ての文献及び特許出願はその全体が、各個別の文献又は特許出願が参照により援用されることが具体的個別的に示された場合と同じ程度に、参照により本明細書に援用される。

40

【0601】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「活性化試薬」という用語は、縮合反応において、反応性のより低い部位を活性化させてそれが求核試薬による攻撃を受けやすくなるようにする試薬を指す。

【0602】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキル」基は、脂肪族炭化水素基を指す。アルキル成分は飽和アルキル基であってもよく（不飽和の単位、例

50

えば炭素－炭素二重結合又は炭素－炭素三重結合を含まないということの意味する）、あるいはアルキル成分は不飽和アルキル基であってもよい（不飽和の単位を少なくとも1つ含むということの意味する）。アルキル成分は、飽和か不飽和かにかかわらず、分岐鎖、直鎖であってもよく、あるいは環式部分を含んでいてもよい。アルキルの結合点は、環の部分でない炭素原子にある。「アルキル」成分は1～10の炭素原子を有していてもよい（本明細書に見られる場合、「1～10」等の数字範囲は所与の範囲における各整数を指し、例えば「1～10の炭素原子」は、アルキル基が1つの炭素原子、2つの炭素原子、3つの炭素原子等、10までかつ10を含む数の炭素原子からなっているということの意味し、但し、本定義はまた、数字範囲が指定されない「アルキル」という用語の現れることをも包含する）。アルキルは分岐及び直鎖アルキル基の両方を含む。本明細書に記載される化合物のアルキル基は「C₁～C₆アルキル」と表記するか又は同様の表記としている場合がある。ほんの一例として、「C₁～C₆アルキル」は、アルキル鎖中に1、2、3、4、5、又は6の炭素原子がある、即ち、アルキル鎖は例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、及びtert-ブチルより選択される、ということを示す。典型的なアルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、三級ブチル、ペンチル、ヘキシル、アリル、シクロプロピルメチル、シクロブチルメチル、シクロペンチルメチル、シクロヘキシルメチル等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。一態様では、アルキルはC₁～C₆アルキルである。C₁～₃アルキル基は、1～3の炭素原子を有する直鎖又は分岐アルキル基を意味する。C₁～₃アルキル基の例としては、メチル、エチル、プロピル及びイソプロピルがある。C₁～₄アルキル基は、1～4の炭素原子を有する直鎖又は分岐アルキル基を意味する。C₁～₄アルキル基の例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、及びtert-ブチルがある。

10

20

30

【0603】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アリール」という用語は、環を形成する原子のそれぞれが炭素原子である芳香環を指す。アリール環は、5、6、7、8、9、又は9を超える数の炭素原子で形成される。アリール基は置換又は非置換のものである。一態様では、アリールはフェニル又はナフタレニルである。構造により、アリール基は、モノラジカル又はジラジカル（即ちアリーレン基）であってもよい。一態様では、アリールはC₆～C₁₀アリールである。C₆～₁₄アリール基は、6～14の炭素原子を有するアリール基を意味する。C₆～₁₄アリール基の例としては、フェニル、ピフェニル、ナフチル、アントラシル（anthracyl）、インダニル、フタルイミジル、ナフチミジル（naphthimidyl）、フェナントリジニル、及びテトラヒドロナフチルがある。

【0604】

「アラルキル」という用語は、アリール基で置換されるアルキル基を指す。適切なアラルキル基としては、ベンジル、ピコリル等が挙げられ、全てそれは置換されていてもよい。

【0605】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アシル成分」は、アルキル（C＝O）基、アリール（C＝O）基、又はアラルキル（C＝O）基を指す。アシル成分は、カルボニル基及び炭化水素基の間に、オキシ、アミノ、チオ、又はセレノである介在成分（Y）を有していてもよい。例えば、アシル基としては、アルキル－Y－（C＝O）、アリール－Y－（C＝O）又はアラルキル－Y－（C＝O）がある。

40

【0606】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルケニル」基は少なくとも1つの炭素－炭素二重結合を含有する直鎖、分岐鎖、及び環式炭化水素基である。アルケニル基は置換されていてもよい。

【0607】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキニル」基は少な

50

くとも1つの炭素－炭素三重結合を含有する直鎖、分岐鎖、及び環式炭化水素基である。
アルキニル基は置換されていてもよい。

【0608】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルコキシ」基は、酸素に結合するアルキル基、即ち（アルキル）－O－基を指し、アルキルは本明細書に定義される通りである。例としては、メトキシ（－OCH₃）又はエトキシ（－OCH₂CH₃）基が挙げられる。

【0609】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルケニルオキシ」基は、酸素に結合するアルケニル基、即ち（アルケニル）－O－基を指し、アルケニルは本明細書に定義される通りである。

10

【0610】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキニルオキシ」基は、酸素に結合するアルキニル基、即ち（アルキニル）－O－基を指し、アルキニルは本明細書に定義される通りである。

【0611】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アリールオキシ」基は、酸素に結合するアリール基、即ち（アリール）－O－基を指し、アリールは本明細書に定義される通りである。例としては、フェノキシ（－OC₆H₅）基がある。

【0612】

20

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキルセレノ」という用語は、アルキル基に置換セレノ基が結合したものの、即ち（アルキル）－Se－基を指し、アルキルは本明細書に定義される。

【0613】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルケニルセレノ」という用語は、アルケニル基に置換セレノ基が結合したものの、即ち（アルケニル）－Se－基を指し、アルケニルは本明細書に定義される。

【0614】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキニルセレノ」という用語は、アルキニル基に置換セレノ基が結合したものの、即ち（アルキニル）－Se－基を指し、アルケニルは本明細書に定義される。

30

【0615】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキルチオ」という用語は、架橋イオウ原子に結合したアルキル基、即ち（アルキル）－S－基を指し、アルキルは本明細書に定義される。例えば、アルキルチオはメチルチオ等である。

【0616】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルケニルチオ」という用語は、架橋イオウ原子に結合したアルケニル基、即ち（アルケニル）－S－基を指し、アルケニルは本明細書に定義される。

【0617】

40

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキニルチオ」という用語は、架橋イオウ原子に結合したアルキニル基、即ち（アルキニル）－S－基を指し、アルケニルは本明細書に定義される。

【0618】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキルアミノ」という用語は、少なくとも1つのアルキル基で置換されるアミノ基、即ち、－NH（アルキル）又は－N（アルキル）₂を指し、アルキルは本明細書に定義される。

【0619】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルケニルアミノ」という用語は、少なくとも1つのアルケニル基で置換されるアミノ基、即ち、－NH（アル

50

ケニル)又は-N(アルケニル)₂を指し、アルケニルは本明細書に定義される。

【0620】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキニルアミノ」という用語は、少なくとも1つのアルキニル基で置換されるアミノ基、即ち、-NH(アルキニル)又は-N(アルキニル)₂を指し、アルキニルは本明細書に定義される。

【0621】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「ハロゲン」という用語は、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素を含むことを意図する。

【0622】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「蛍光基」は、選択波長を有する光で励起させると異なる波長の光を発光する分子を指す。蛍光基としては、インドール基、フルオレセイン、テトラメチルローダミン、テキサスレッド、ボディパイ、5-[(2-アミノエチル)アミノ]ナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)、クマリ

10

【0623】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アンモニウムイオン」は、化学式NH₄⁺の正電荷多原子陽イオンである。

【0624】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アルキルアンモニウムイオン」は、水素原子の少なくとも1つがアルキル基で置換されるアンモニウムイオンを指し、アルキルは本明細書に定義される。例としては、トリエチルアンモニウムイオン、N,N-ジイソプロピルエチルアンモニウムイオンが挙げられる。

20

【0625】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「イミニウムイオン」は、一般構造(R^x)₂C=N(R^x)₂⁺を有する。R^x基は、本明細書に記載されるアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基を指す。「複素環式芳香族イミニウムイオン」は、窒素及びその結合R^x基が芳香族複素環を形成するイミニウムイオンを指す。「複素環式イミニウムイオン(heterocyclic iminium ion)」は、窒素及びその結合R^x基が複素環を形成するイミニウムイオンを指す。

【0626】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、「アミノ」又は「アミン」という用語は、-N(R^h)₂ラジカル基を指し、各R^hは、本明細書に他に具体的に記載がなければ、互いに独立して水素、アルキル、フルオロアルキル、カルボシクリル(carbocyclyl)、カルボシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロシクリル(heterocyclyl)、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール又はヘテロアリールアルキルである。-N(R^h)₂基が水素以外に2つのR^hを有する場合、それらは窒素原子と化合して4、5、6、又は7員環を形成することができる。例えば、-N(R^h)₂は1-ピロリジニル及び4-モルホリニルを含むことが意図されるが、これらに限定されない。水素、アルキル、フルオロアルキル、カルボシクリル、カルボシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテ

30

40

50

キル、カルボシクリル、カルボシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール、又はヘテロアリールアルキルである。

【0627】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、本明細書で使用される「カルバメート」は、式 $-C(O)OR$ を有する、アミノ基に結合する成分を指し、Rはアルキル、フルオロアルキル、カルボシクリル、カルボシクリルアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリール又はヘテロアリールアルキルである。例としては、Boc (tert-ブチル-OC(O)-)、CBz (ベンジル-OC(O)-)、Teoc (Me₃SiCH₂CH₂OC(O)-)、alloc (アリル-OC(O)-)、又はFmoc (9-フルオレニルメチル-OC(O)-) 基が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0628】

本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、本明細書で使用される「置換シリル」は、式 R^x_3Si- を有する成分を指す。例としては、TBDMs (tert-ブチルジメチルシリル)、TBDPS (tert-ブチルジフェニルシリル) 又はTMS (トリメチルシリル) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0629】

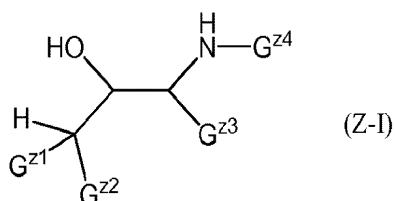
本「キラル試薬のさらなる実施形態」の項で使用される場合、本明細書で使用される「チオール」という用語は-SH基を指し、置換チオール基、即ち、-SR_J基を含み、R_Jはそれぞれ互いに独立して置換又は非置換のアルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリールアラルキル、ヘテロシクリル又はヘテロシクリルアルキル基であり、これらは本明細書に定義される通りである。

20

【0630】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル試薬又はその塩を提供する。いくつかの実施形態では、キラル試薬は次の化学式 (Z-I) のものであり：

【化192】



30

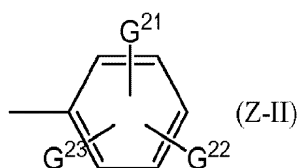
、
式中、 G^{Z1} 及び G^{Z2} は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基 (-CN)、式 (Z-III) 若しくは (Z-IIII) の基、又は、 G^{Z1} 及び G^{Z2} の両方が一緒になって (Z-IV) の基を形成したもの、である。いくつかの実施形態では、「キラル試薬」という用語は、立体制御されたリン原子修飾ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド誘導体を産生するように使用される化学組成物である。キラル試薬はヌクレオシドと反応してキラル中間体を形成する。

【0631】

40

いくつかの実施形態では、式 (Z-II) の基は次の式のものであり：

【化193】



、
式中、 $G^{21} \sim G^{23}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim C_3$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、 $G^{21} \sim G^{23}$ の例としては

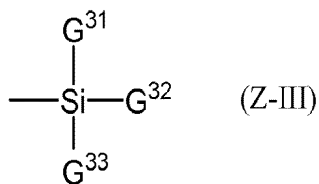
50

水素原子が挙げられる。

【0632】

いくつかの実施形態では、式（Z-I I I）の基は次の式のものであり：

【化194】



10

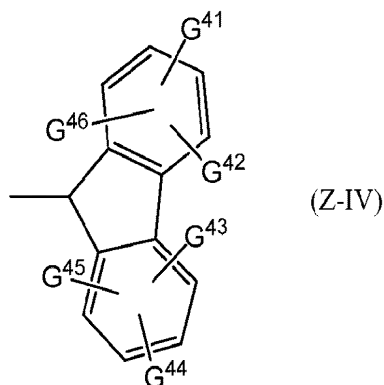
、
式中、 $\text{G}^{31} \sim \text{G}^{33}$ は互いに独立して $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルキル基、 $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基、 $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルコキシ基、 $\text{C}_{7 \sim 14}$ アラルキル基、 $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルキル $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基、 $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルコキシ $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基、又は $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルキル基である。 $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルキル $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基の例としては、メチルフェニル基、及びエチルフェニル基が挙げられる。 $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルコキシ $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基の例としては、メトキシフェニル基及びエトキシフェニル基が挙げられる。 $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルキル基の例としては、ベンジル基及びフェニルエチル基が挙げられる。いくつかの実施形態では、 $\text{G}^{31} \sim \text{G}^{33}$ の例としては、互いに独立してメチル基及びフェニル基であるものが挙げられる。

20

【0633】

いくつかの実施形態では、式（Z-I V）の基は次の式のものであり：

【化195】



30

、
式中、 $\text{G}^{41} \sim \text{G}^{46}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $\text{C}_{1 \sim 3}$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、 $\text{G}^{41} \sim \text{G}^{46}$ の例としては水素原子が挙げられる。

【0634】

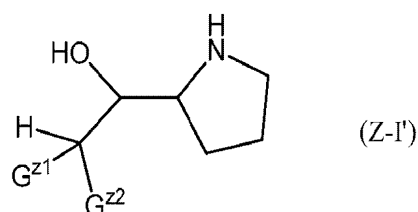
G^{z3} 及び G^{z4} は互いに独立して水素原子、 $\text{C}_{1 \sim 3}$ アルキル基、 $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基、又は、 G^{z3} 及び G^{z4} の両方が一緒になって $3 \sim 16$ の炭素原子を有するヘテロ原子含有環を形成したもの、である。いくつかの実施形態では、 G^3 及び G^4 の例としては、それらが一緒になって式（I）中NH成分とともに $3 \sim 16$ の炭素原子を有するヘテロ原子含有環を形成したものが挙げられる。

40

【0635】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は次の化学式（Z-I'）を有する。

【化 1 9 6】



【0 6 3 6】

式 (Z-I') において、 G^{Z1} 及び G^{Z2} は上に同じであり、 G^{Z1} 及び G^{Z2} は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、式 (Z-III) 又は (Z-III') の基、又は、 G^{Z1} 及び G^{Z2} の両方が一緒になって式 (Z-IV) の基を形成したもの、である。

10

【0 6 3 7】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{Z1} 及び G^{Z2} のそれぞれは式 (Z-III) の基であり、式中、 $G^{Z1} \sim G^{Z3}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。

【0 6 3 8】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{Z1} 及び G^{Z2} のそれぞれは式 (Z-III) の基であり、 $G^{Z1} \sim G^{Z3}$ のそれぞれは水素原子である。

20

【0 6 3 9】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{Z1} は水素原子、 G^{Z2} は式 (Z-III) の基、 $G^{Z1} \sim G^{Z3}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。

【0 6 4 0】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{Z1} は水素原子であり、 G^{Z2} は式 (Z-III) の基であり、 G^{Z1} 及び G^{Z2} のそれぞれは水素原子であり、 G^{Z3} はニトロ基 ($-\text{NO}_2$) である。

【0 6 4 1】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{Z1} は水素原子であり、 G^{Z2} は式 (Z-III') の基であり、 $G^{Z1} \sim G^{Z3}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基、 $C_6 \sim 14$ アリール基、 $C_7 \sim 14$ アラルキル基、 $C_1 \sim 4$ アルキル $C_6 \sim 14$ アリール基、 $C_1 \sim 4$ アルコキシ $C_6 \sim 14$ アリール基、又は $C_6 \sim 14$ アリール $C_1 \sim 4$ アルキル基である。

30

【0 6 4 2】

いくつかの実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{Z1} は水素原子であり、 G^{Z2} は式 (Z-III') の基であり、 $G^{Z1} \sim G^{Z3}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基又は C_6 アリール基 (フェニル基) である。 $C_1 \sim 4$ アルキル基の例としては、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、及び t -ブチル基が挙げられる。

【0 6 4 3】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{Z1} は水素原子であり、 G^{Z2} は式 (Z-III') の基であり、 $G^{Z1} \sim G^{Z3}$ は互いに独立して $C_1 \sim 2$ アルキル基 (メチル基又はエチル基) 又は C_6 アリール基 (フェニル基) である。

40

【0 6 4 4】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{Z1} は水素原子であり、 G^{Z2} は式 (Z-III') の基であり、 $G^{Z1} \sim G^{Z3}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基である。

【0 6 4 5】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I') を有し、 G^{Z1} は水素原子であり、 G^{Z2} は式 (Z-III') の基であり、 G^{Z1} 及び G^{Z3} は C_6 アリール基 (フ

50

エニル基)であり、 $G^{3,2}$ は $C_1 \sim 2$ アルキル基である。

【0646】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式($Z-I'$)を有し、 $G^{z,1}$ 及び $G^{z,2}$ は一緒になって式($Z-IV$)の基を形成し、 $G^{4,1} \sim G^{4,6}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。

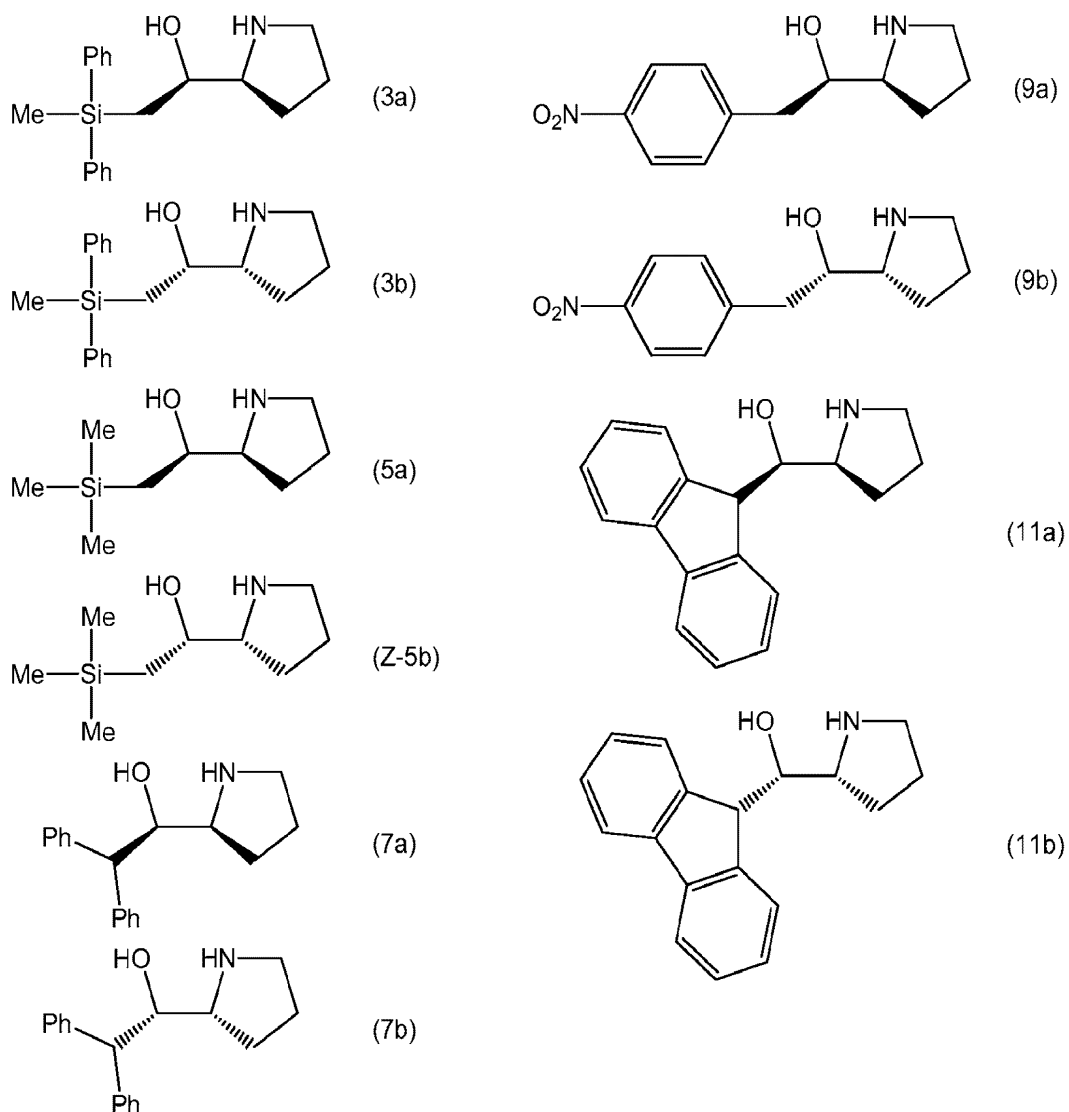
【0647】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式($Z-I'$)を有し、 $G^{z,1}$ 及び $G^{z,2}$ は一緒になって式($Z-IV$)の基を形成し、式中、 $G^{4,1} \sim G^{4,6}$ のそれぞれは水素原子である。

【0648】

ある特定の実施形態では、キラル試薬は化学式3a、3b、5a、Z-5b、7a、7b、9a、9b、11a、及び11bの1つより選択される：

【化197】



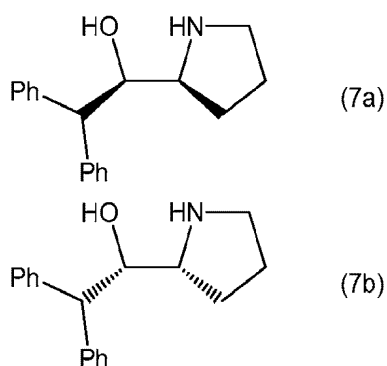
即ち、いくつかの実施形態では、キラル試薬は：

(S)-2-(メチルジフェニルシリル)-1-((S)-1-ピロリジン-2-イル)エタノール(3a)、

(R)-2-(メチルジフェニルシリル)-1-((R)-1-ピロリジン-2-イル)エタノール(3b)、

(S)-2-(トリメチルシリル)-1-((S)-1-ピロリジン-2-イル)エタノール(5a)、

(R)-2-(トリメチルシリル)-1-((R)-1-ピロリジン-2-イル)エタノール(5b)、



10

20

30

40

50

ール (Z-5b)、
 (R)-2,2-ジフェニル-1-((S)-ピロリジン-2-イル)エタノール (7a)
)、
 (S)-2,2-ジフェニル-1-((R)-ピロリジン-2-イル)エタノール (7b)
)、
 (R)-2-(4-ニトロフェニル)-1-((S)-ピロリジン-2-イル)エタノール (9a)、
 (S)-2-(4-ニトロフェニル)-1-((R)-ピロリジン-2-イル)エタノール (9b)、
 (R)-(9H-フルオロレン (Fluorene)-9-イル)((S)-ピロリジン-2-イル)メタノール (11a)、又は
 (S)-(9H-フルオロレン-9-イル)((R)-ピロリジン-2-イル)メタノール (11b)
 より選択される。

10

【0649】

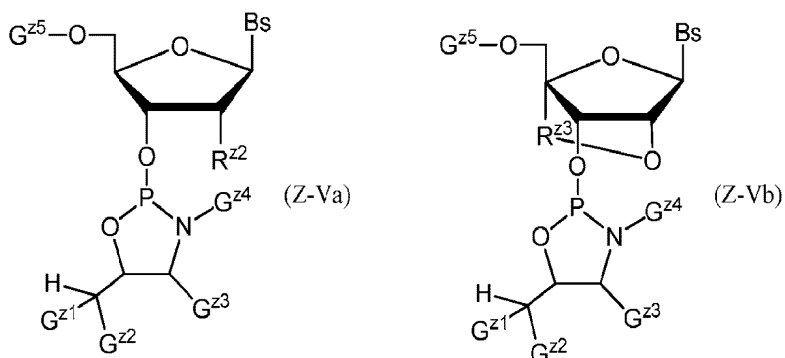
キラル試薬は、核酸又は修飾核酸と反応して非対称性補助基となる。ヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体は、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体を作る中間体であり、キラル試薬が核酸又は修飾核酸と反応することによって得られる。

【0650】

いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-Va) 又は (Z-Vb) で表されるヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を提供する。式 (Z-Va) 及び (Z-Vb) の化合物は、オリゴヌクレオチド誘導体の合成で用いられるモノマーとして知られる。これらの化合物はまたオキサザホスホリジンモノマーとも言われる。式 (Z-Vb) で表される化合物の糖成分はBNA及びLNAとして知られる (R^{z3} がメチレン基の場合)。

20

【化198】

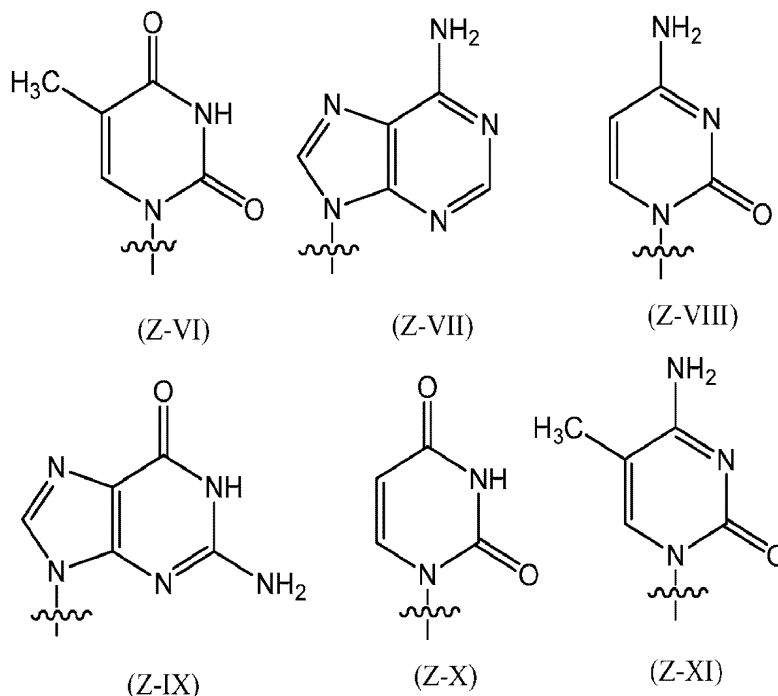


30

【0651】

式 (Z-Va) 及び (Z-Vb) において、 $G^{z1} \sim G^{z4}$ は上に同じであり、 G^{z5} はヒドロキシル基の保護基であり、Bsは式 (Z-VI) ~ (Z-XI) で表される基より選択される基又はその誘導体である。

【化 1 9 9】



10

20

Bs の例は、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、ウラシル、5-メチルシトシン、又はその誘導体であり；

R^{z2} は互いに独立して水素、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NR^dR^d$ 、 $-N_3$ 、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキル- Y^1 -、アルケニル- Y^1 -、アルキニル- Y^1 -、アリール- Y^1 -、ヘテロアリール- Y^1 -、 $-OR^b$ 、又は $-SR^b$ であり、式中、 R^b はブロッキング成分であり；

Y^1 はO、 NR^d 、S、又はSeであり；

R^d は互いに独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アシル、置換シリル、カルバメート、 $-P(O)(R^e)_2$ 、又は $-HP(O)(R^e)$ であり；

R^e は互いに独立して水素、アルキル、アリール、アルケニル、アルキニル、アルキル- Y^2 -、アルケニル- Y^2 -、アルキニル- Y^2 -、アリール- Y^2 -、若しくはヘテロアリール- Y^2 -、又は、陽イオンである Na^+ 、 Li^+ 、若しくは K^+ 、又は $-O^-$ であり；

Y^2 はO、 NR^d 、又はSであり；

R^{z3} は $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CH_2NH-$ 、又は $-CH_2N(CH_3)-$ で表される基である。

30

【0652】

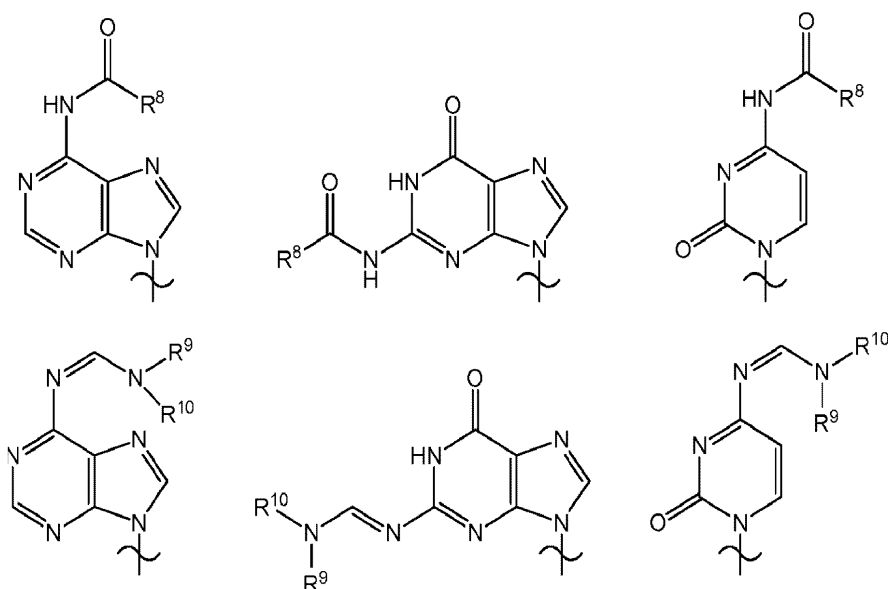
G^{z5} の例としては、トリチル、4-モノメトキシトリチル、4,4'-ジメトキシトリチル、4,4',4''-トリメトキシトリチル、9-フェニルキササンチン-9-イル（ピキシル）及び9-（p-メトキシフェニル）キササンチン-9-イル（MOX）がある。

40

【0653】

いくつかの実施形態では、Bs はアデニン、チミン、シトシン、グアニン、又はその誘導体である。いくつかの実施形態では、Bs は核酸塩基又は修飾核酸塩基である。例示的な誘導体としては、例えば、JP 2005-89441Aに開示されるものがあり、次の通り表され：

【化 2 0 0】



10

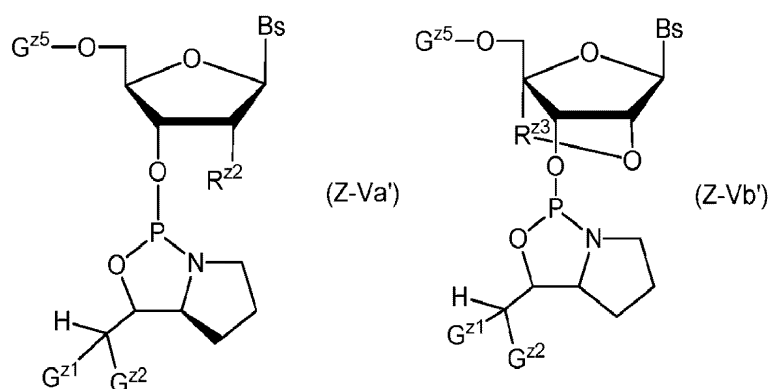
、
 上記式中、 $R^8 \sim R^{10}$ のそれぞれは互いに独立して $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ アラルキル、又は $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシアルキルである。
 いくつかの実施形態では、 R^8 はメチル、イソプロピル、フェニル、ベンジル、及びフェノキシメチルである。いくつかの実施形態では、 R^9 及び R^{10} は $C_1 \sim C_4$ アルキル基である。

20

【0 6 5 4】

いくつかの実施形態では、ヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体は式(Z-Va')又は(Z-Vb')で表され：

【化 2 0 1】



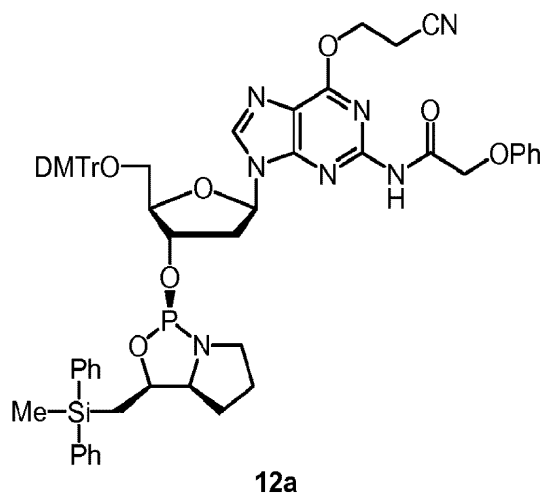
30

、
 式(Z-Va')及び(Z-Vb')中、 G^{z1} 、 G^{z2} 、 G^{z5} 、Bs、 R^{z2} 及び R^{z3} のそれぞれは上に同じである)。ある特定の実施形態では、ヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体は、立体制御されたリン原子修飾ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドを産生するように用いられるキラルモノマーである。ヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体の例は、次の式で表される：

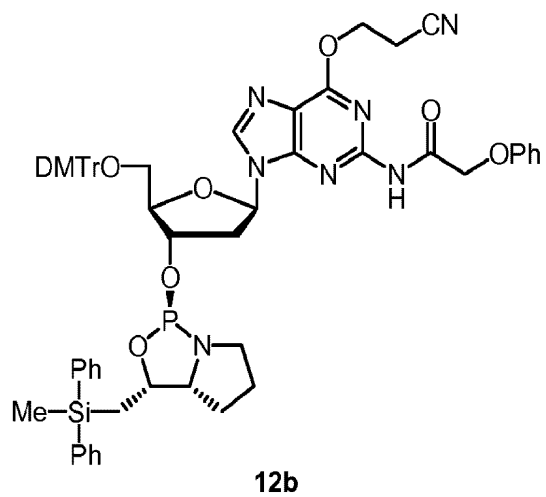
40

12a、12b、13a、13b、14a、14b、15a、15b、16a、16b、
 17a、17b、18a、18b、19a、19b、20a、20b、21a、21b、
 22a、22b、23a、23b、24a、24b、25a、25b、26a、26b、
 27a、27b、28a、28b、29a、29b、30a、30b、31a、31b、
 32a、32b、33a、33b、34a、34b、及び35a。

【化 2 0 2】

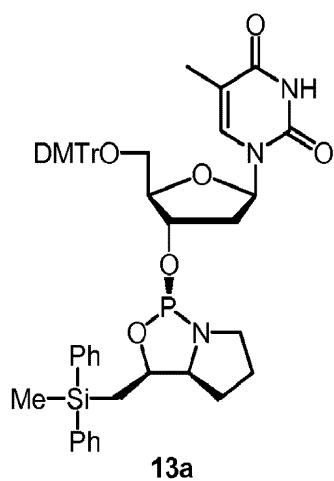


12a

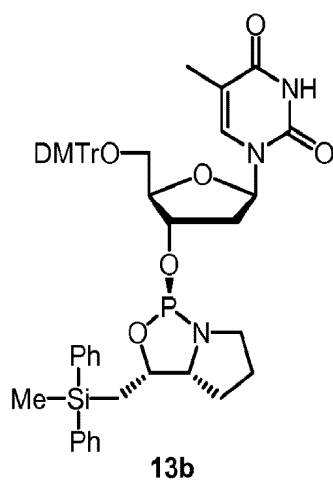


12b

10

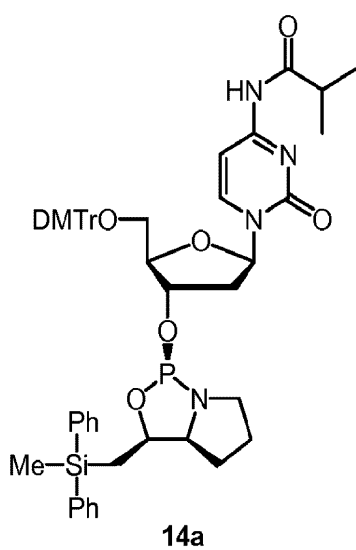


13a

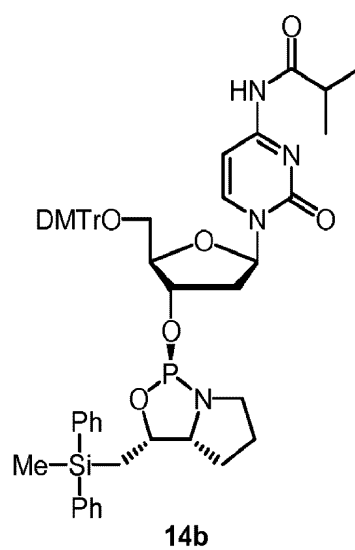


13b

20



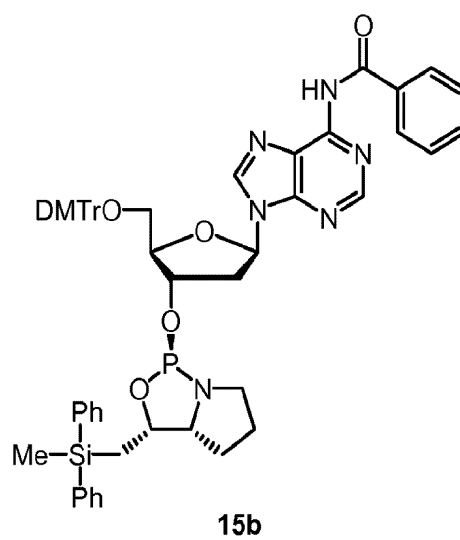
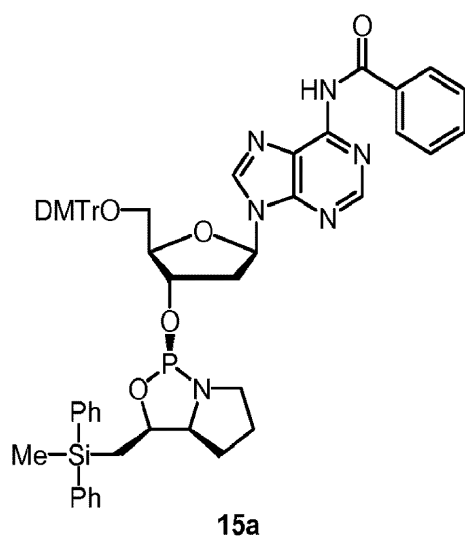
14a



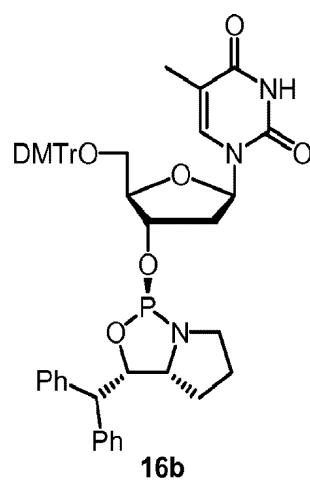
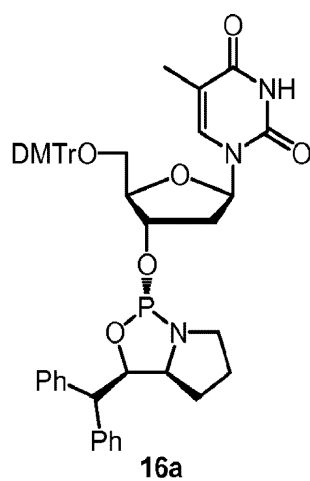
14b

30

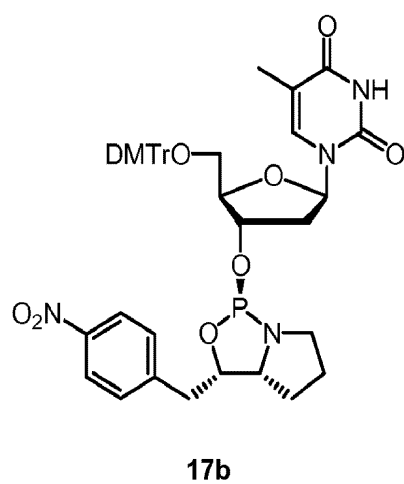
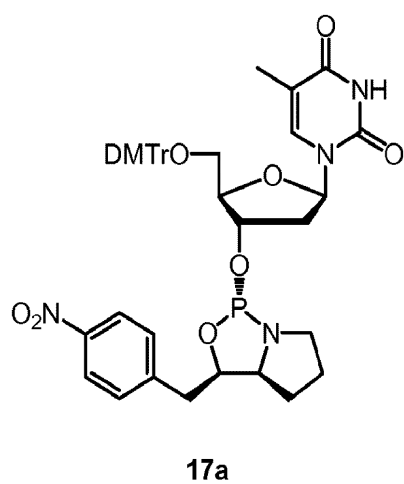
40



10

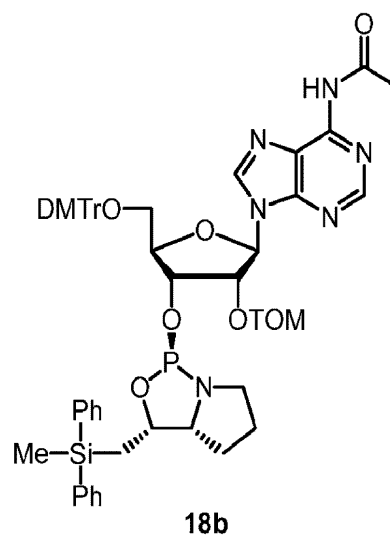
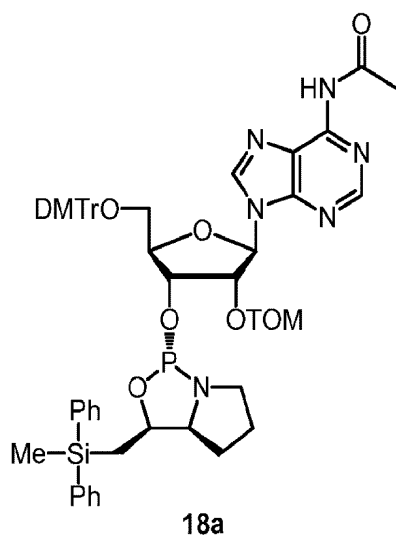


20

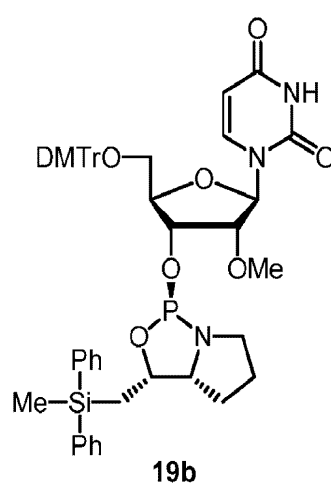
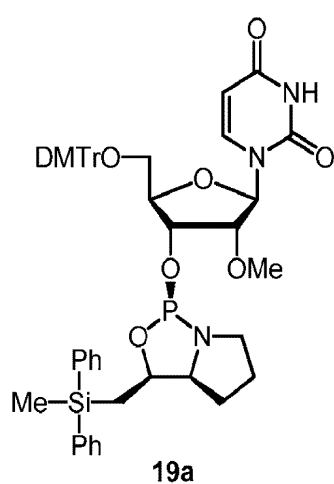


30

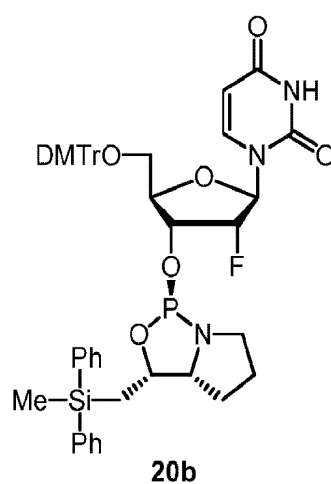
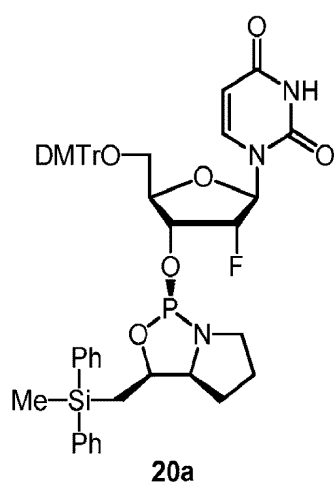
40



10

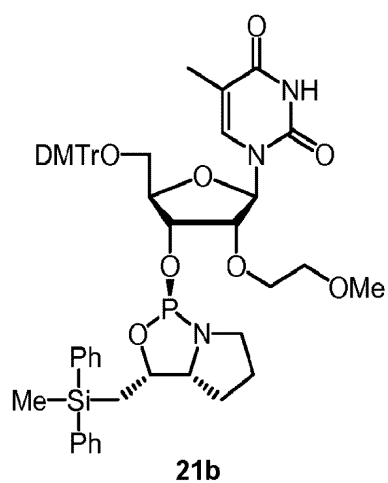
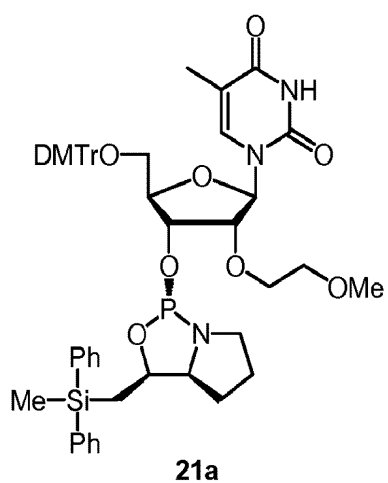


20

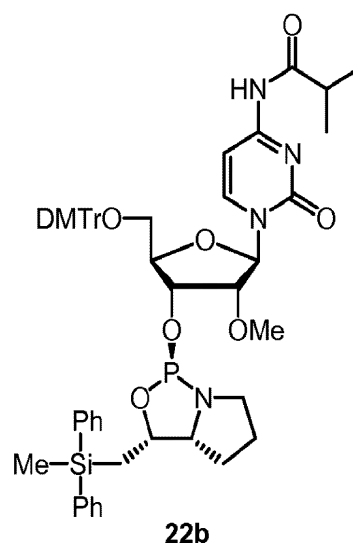
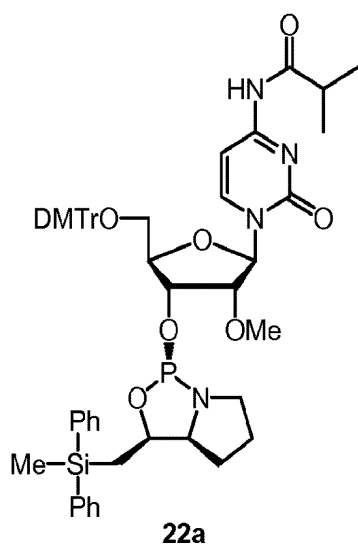


30

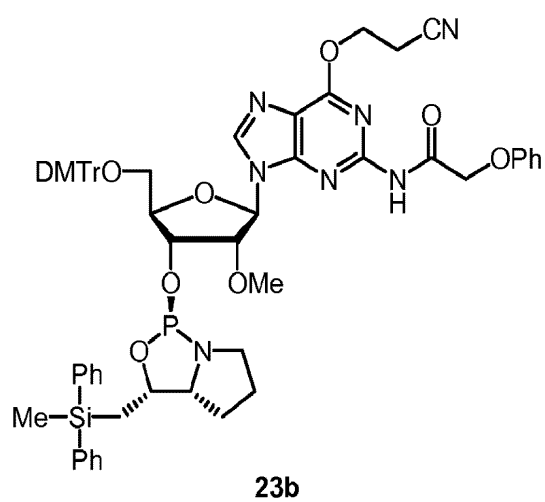
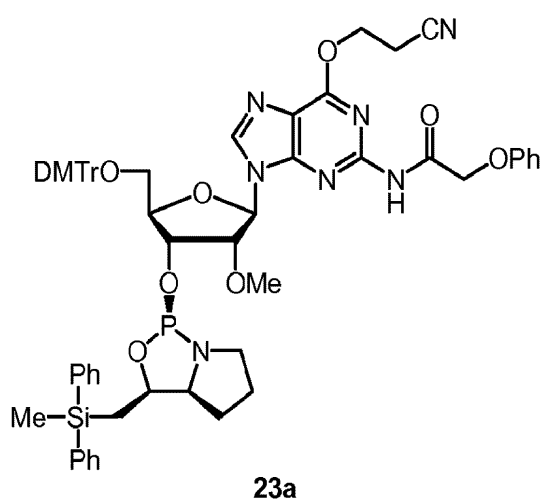
40



10

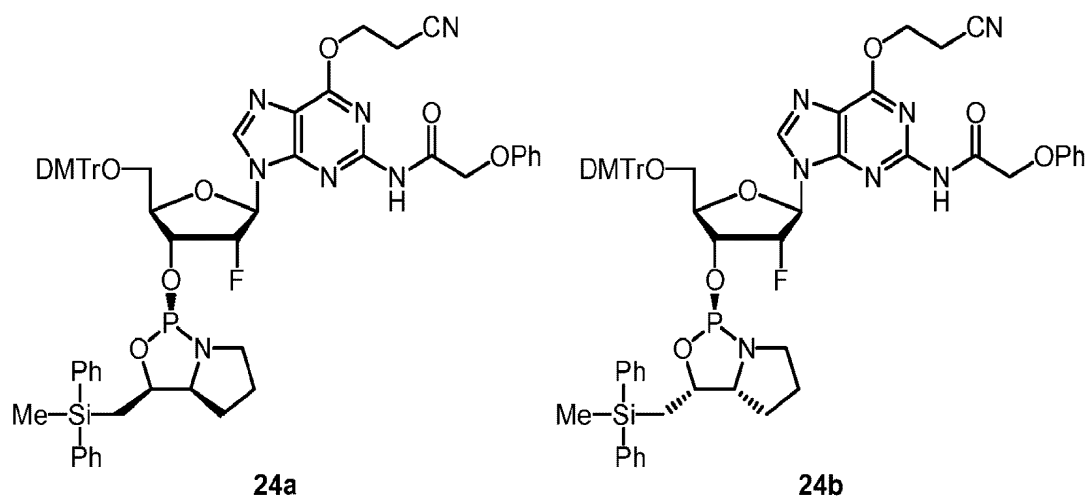


20

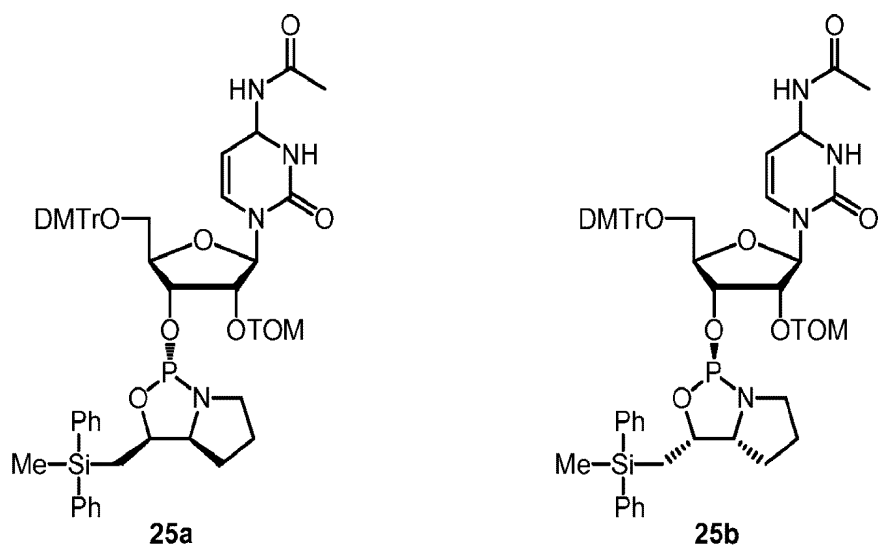


30

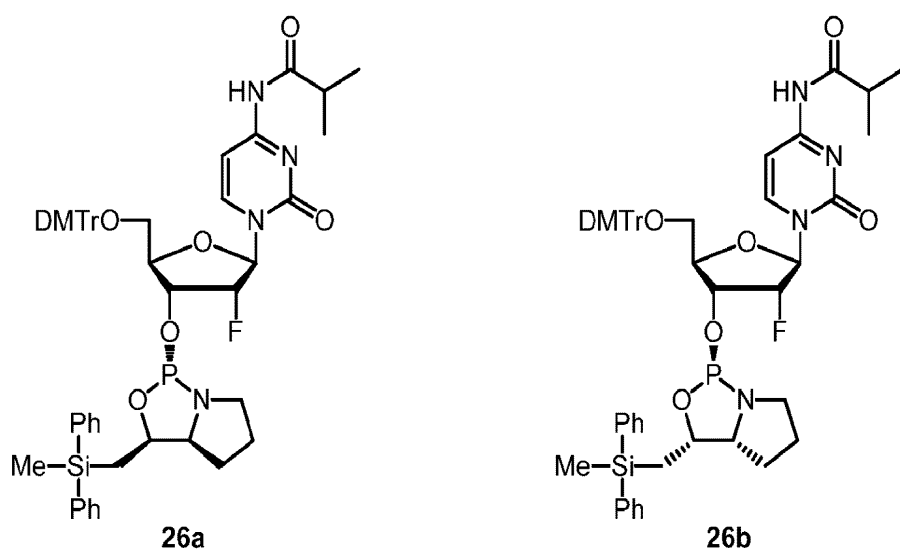
40



10

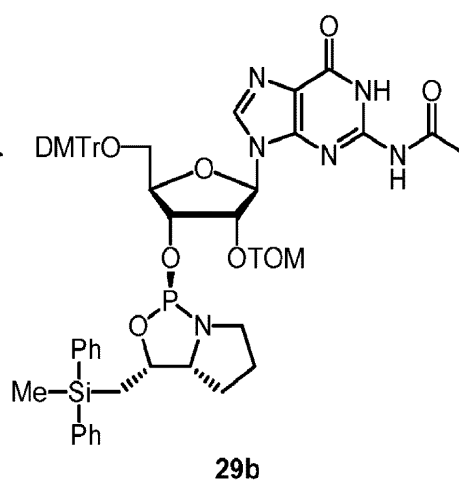
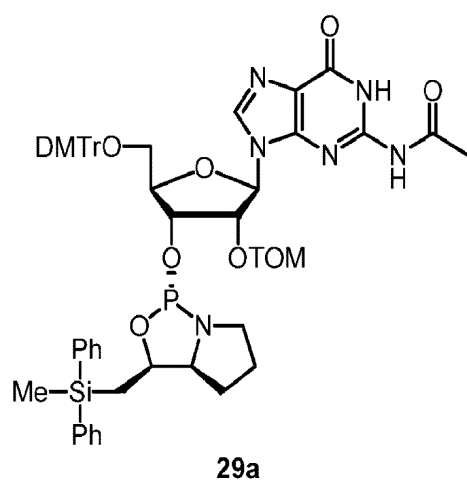
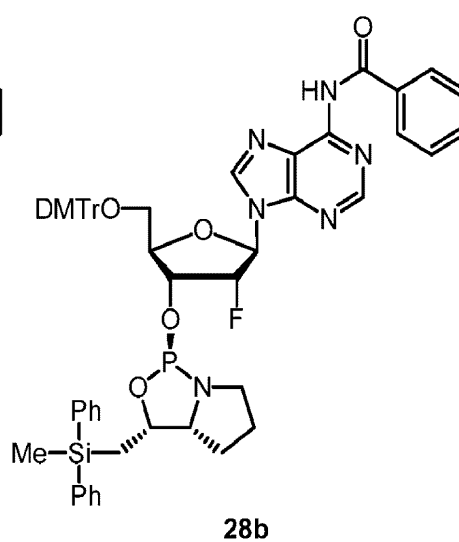
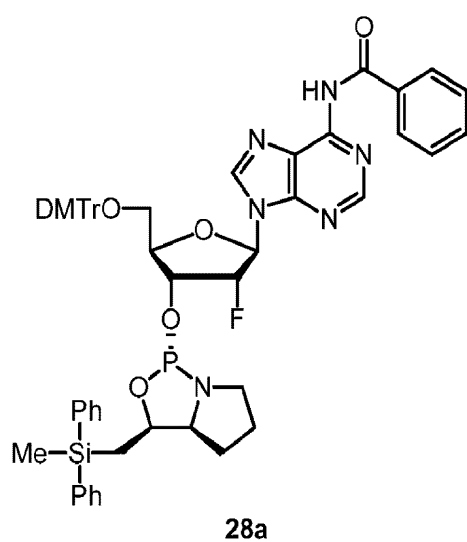
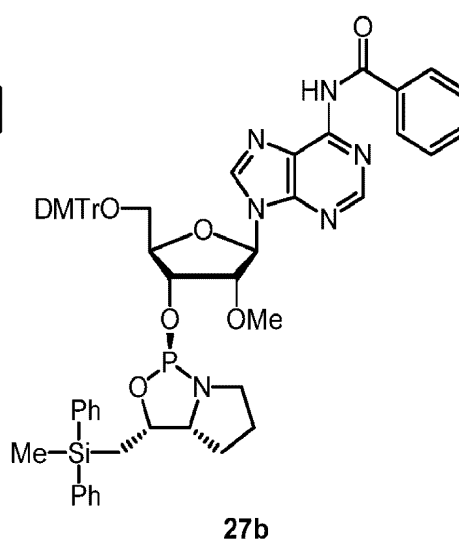
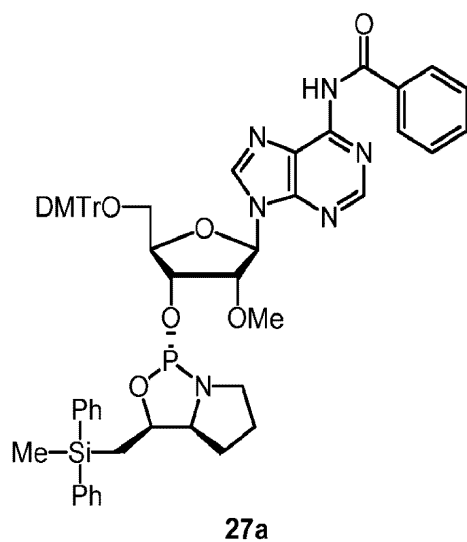


20

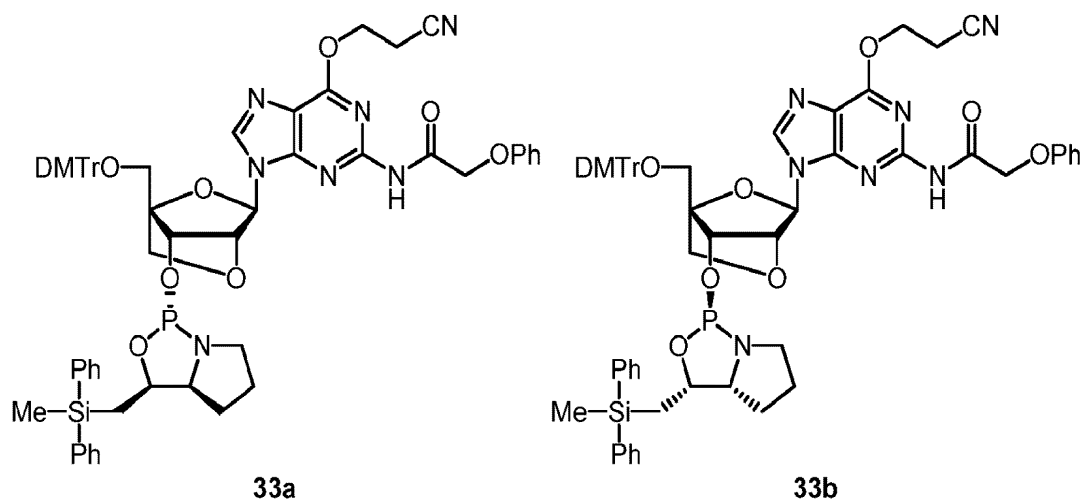


30

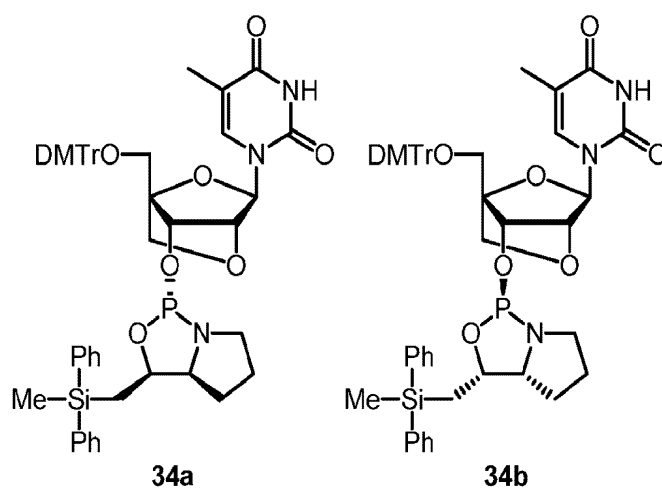
40



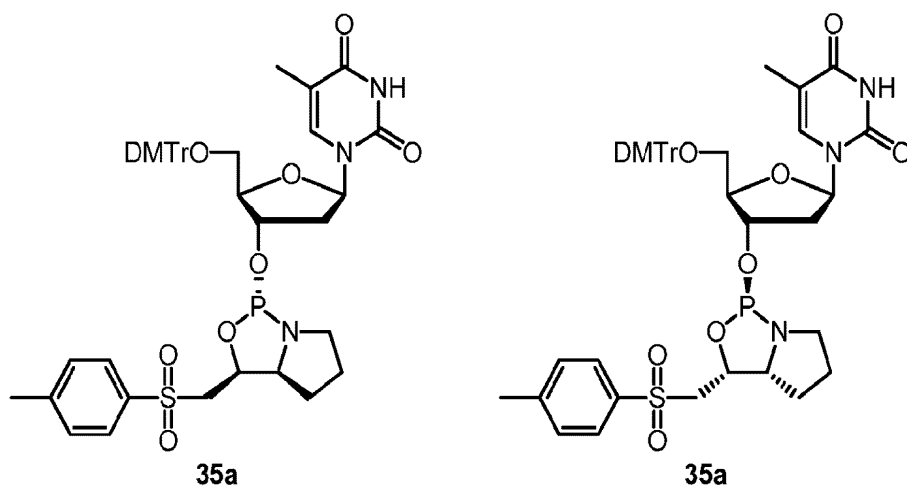




10



20



30

40

DMTrは、4,4'-ジメトキシトリチル基を表し、TOMはトリイソプロピルシロキシメチル基を表す。

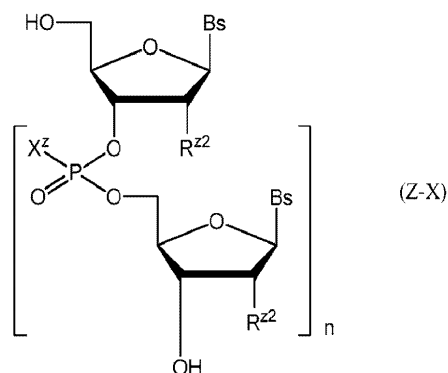
【0655】

ヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を用いた例が、例えばJP2005-89441Aに開示される。縮合及び脱保護のステップを繰り返すことにより、本発明の方法は、本明細書に記載される通り、オリゴヌクレオチドの鎖の延長を促進する。

【0656】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは式(Z-X)に示す通りであり：

【化 2 0 3】



10

式 (Z-X) 中、 X^Z はスルフィド (=S)、 $C_1 \sim 3$ アルキル、 $C_1 \sim 3$ アルコキシ、 $C_1 \sim 3$ アルキルチオ、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ アラルキル、又は $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシアルキル (aryloxyalkyl) を表す。いくつかの実施形態では、 X^Z はスルフィド (=S) を表す。 n^Z は、1~150、1~100、1~50、又は 1~30 を表す整数である。いくつかの実施形態では、 n^Z は、好ましくは 2~100、好ましくは 10~100、好ましくは 10~50、及びより好ましくは 15~30 である。

【0657】

いくつかの実施形態では、本発明は、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体の合成方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1のステップは、アキラルな H-ホスホネート成分を含む分子と、第1の活性化試薬と、キラル試薬又はその塩とを反応させてモノマーを形成するステップである。いくつかの実施形態では、キラル試薬は化学式 (Z-I) 又は (Z-I') を有し、モノマーは式 (Z-Va)、(Z-Vb)、(Z-Va')、又は (Z-Vb') で表されるものであってもよい。モノマーは、第2の活性化試薬及びヌクレオシドと反応して縮合中間体を形成する。次のステップは、縮合中間体を、キラルな X-ホスホネート成分を含む核酸に変換するステップである。いくつかの実施形態では、本方法は WO 2010/064146 に記載される通りである。いくつかの実施形態では、ステップは WO 2010/064146 の経路 A 及び経路 B に記載される通りである。

20

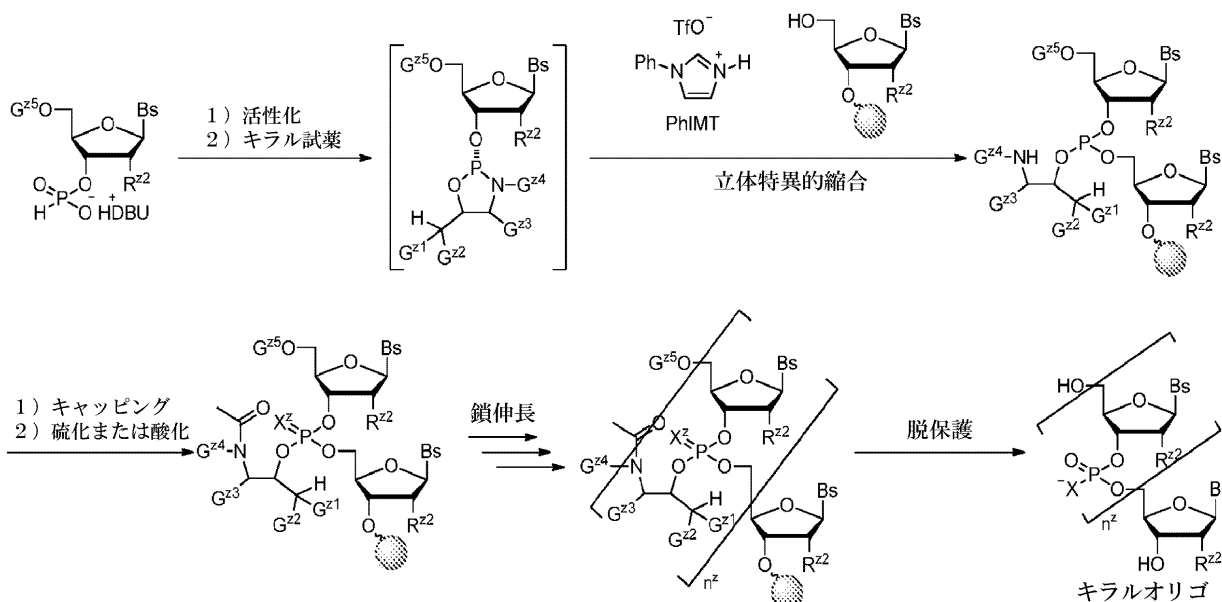
30

【0658】

いくつかの実施形態では、本発明は、下のスキーム Z-1 に例示されるキラル制御オリゴヌクレオチドを合成する方法を提供する。

スキーム Z-1

【化 2 0 4】



10

【0 6 5 9】

活性化

20

アキラルなH-ホスホネート成分を第1の活性化試薬で処理して第1の中間体を形成する。一実施形態では、第1の活性化試薬を縮合ステップの間に反応混合物に加える。第1の活性化試薬の使用は、反応に用いる溶媒等、反応条件による。第1の活性化試薬の例としては、ホスゲン、クロロギ酸トリクロロメチル、ビス(トリクロロメチル)カーボネート(BTC)、塩化オキサリル、 Ph_3PCl_2 、 $(\text{PhO})_3\text{PCl}_2$ 、N,N'-ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド(BopCl)、1,3-ジメチル-2-(3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール-1-イル)-2-ピロリジン-1-イル-1,3,2-ジアザホスホリジニウムヘキサフルオロホスフェート(MNTP)、又は3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール-1-イル-トリリス(ピロリジン-1-イル)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyNTP)がある。

30

【0 6 6 0】

アキラルなH-ホスホネート成分の例としては、上記スキームに示す化合物がある。DBUは、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エンを表す。 H^+DBU は、例えば、それぞれが第1級、第2級、第3級若しくは第4級のアンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、複素環式芳香族イミニウムイオン、又は複素環式イミニウムイオンであってもよく、一価金属イオンであってもよい。

【0 6 6 1】

キラル試薬との反応

第1の活性化ステップの後、活性化したアキラルなH-ホスホネート成分は、式(Z-I)又は(Z-I')で表されるキラル試薬と反応して、式(Z-Va)、(Z-Vb)、(Z-Va')、又は(Z-Vb')のキラル中間体を形成する。

40

【0 6 6 2】

立体特異的縮合ステップ

式Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va')、又は(Z-Vb'))のキラル中間体を第2の活性化試薬及びヌクレオシドで処理して縮合中間体を形成する。ヌクレオシドは固体支持体上にあってもよい。第2の活性化試薬の例としては、4,5-ジシアノイミダゾール(DCI)、4,5-ジクロロイミダゾール、1-フェニルイミダゾリウムトリフレート(PhIMT)、ベンジミダゾリウムトリフレート(BIT)、ベンゾトリアゾール(benzotriazole)、3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(NT)、テトラゾール、5-エチルチオテトラゾール(ETT)、5-ベンジルチオテトラゾール(B

50

TT)、5-(4-ニトロフェニル)テトラゾール、N-シアノメチルピロリジニウムトリフレート(CMPT)、N-シアノメチルピペリジニウムトリフレート、N-シアノメチルジメチルアンモニウムトリフレートが挙げられる。式Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va'))、又は(Z-Vb')のキラル中間体はモノマーとして単離してもよい。通常、Z-Va((Z-Vb)、(Z-Va'))、又は(Z-Vb')のキラル中間体は単離せず、同じ容器の中でヌクレオシド又は修飾ヌクレオシドと反応を起こさせ、キラル垂リン酸化合物、即ち縮合中間体を得る。他の実施形態では、本方法を固相合成によって実施する場合、化合物を含む固体支持体からろ過によって副産物、不純物、及び／又は試薬を取り除く。

【0663】

キャッピング・ステップ

最終的な核酸がダイマーより大きい場合、未反応の-OH成分をブロック基でキャッピングし、化合物中のキラル補助基もまたブロック基でキャッピングして、キャッピングされた縮合中間体を形成してもよい。最終的な核酸がダイマーである場合、キャッピング・ステップは必要ない。

【0664】

修飾ステップ

化合物は、求電子試薬との反応によって修飾する。キャッピングされた縮合中間体に修飾ステップを行ってもよい。いくつかの実施形態では、修飾ステップをイオウ求電子試薬、セレンウム求電子試薬、又はホウ素化剤を用いて実施する。修飾ステップの例としては、酸化及び硫化のステップがある。

【0665】

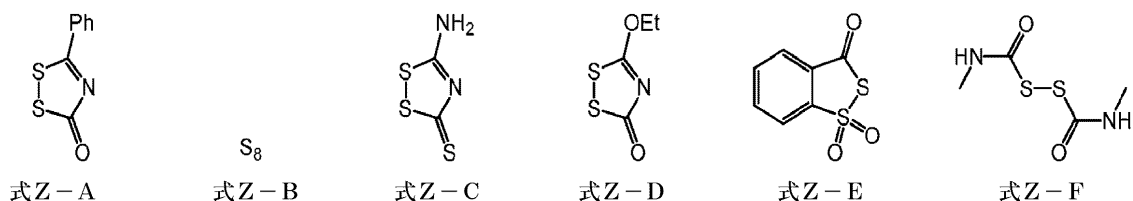
本方法のいくつかの実施形態では、イオウ求電子試薬は、次の式の1つを有する化合物であり：

S_8 (式Z-B)、 $Z^{z1}-S-S-Z^{z2}$ 、又は $Z^{z1}-S-V^z-Z^{z2}$ 、式中、 Z^{z1} 及び Z^{z2} は互いに独立してアルキル、アミノアルキル、シクロアルキル、複素環式、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アシル、アミド、イミド、又はチオカルボニル、又は、 Z^{z1} 及び Z^{z2} が一緒になって3～8員環の脂環式環又は複素環を形成したものであり、これらは置換されていても置換されていなくてもよく； V^z は SO_2 、O、又は NR^f であり； R^f は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、又はアリールである。

【0666】

本方法のいくつかの実施形態では、イオウ求電子試薬は次の式Z-A、Z-B、Z-C、Z-D、Z-E、又はZ-Fの化合物である：

【化205】



【0667】

いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬は、次の式の1つを有する化合物であり：

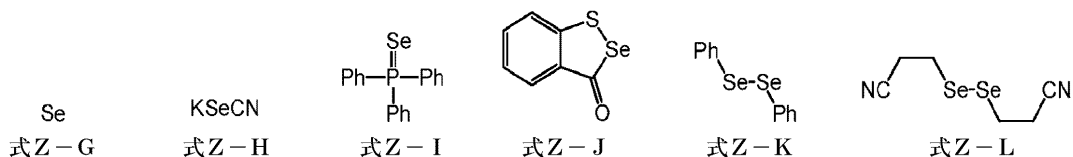
Se (式Z-G)、 $Z^{z3}-Se-Se-Z^{z4}$ 、又は $Z^{z3}-Se-V^z-Z^{z4}$ 、式中、 Z^{z3} 及び Z^{z4} は互いに独立してアルキル、アミノアルキル、シクロアルキル、複素環式、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アシル、アミド、イミド、又はチオカルボニル、又は、 Z^{z3} 及び Z^{z4} は一緒になって3～8員環の脂環式環又は

複素環を形成したものであり、これらは置換されていても置換されていなくてもよく；
 V^z は SO_2 、S、O、又は NR^f であり；
 R^f は水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、又はアリールである。

【0668】

いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬は式 $Z-G$ 、 $Z-H$ 、 $Z-I$ 、 $Z-J$ 、 $Z-K$ 、又は $Z-L$ の化合物である。

【化206】



10

【0669】

いくつかの実施形態では、ホウ素化剤は、ボラン-N、N-ジイソプロピルエチルアミン ($BH_3 \cdot DIPEA$)、ボラン-ピリジン ($BH_3 \cdot Py$)、ボラン-2-クロロピリジン ($BH_3 \cdot CPy$)、ボラン-アニリン ($BH_3 \cdot An$)、ボラン-テトラヒドロフィラン ($tetrahydrofuran$) ($BH_3 \cdot THF$)、又はボラン-ジメチルスルフィド ($BH_3 \cdot Me_2S$) である。

【0670】

本方法のいくつかの実施形態では、修飾ステップは酸化ステップである。本方法のいくつかの実施形態では、修飾ステップは、本願において上に記載する同様の条件を用いた酸化ステップである。いくつかの実施形態では、酸化ステップは、例えば JP 2010-265304A 及び WO 2010/064146 に開示される通りである。

20

【0671】

鎖伸長サイクル及び脱保護ステップ

キャッピングされた縮合中間体は、脱ブロックして、増殖している核酸鎖の 5'-末端でブロック基を除去して、化合物を提供する。化合物は、鎖伸長サイクルに再度入って、縮合中間体、キャッピングされた縮合中間体、修飾されキャッピングされた縮合中間体、及び 5'-脱保護され修飾されキャッピングされた中間体を形成してもよい。鎖伸長サイクルを少なくとも 1 周した後、5'-脱保護され修飾されキャッピングされた中間体は、キラル補助基リガンド及び他の保護基、例えば核酸塩基、修飾核酸塩基、糖及び修飾糖保護基の除去によってさらに脱ブロックし、核酸を提供する。他の実施形態では、5'-OH 成分を含むヌクレオシドは、本明細書に記載される前出の鎖伸長サイクルからの中間体である。なおも別の実施形態では、5'-OH 成分を含むヌクレオシドは、他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。固体支持体を用いる実施形態では、次いで、リン原子修飾核酸を固体支持体から切断する。ある特定の実施形態では、核酸は、精製を目的として固体支持体上に付けたままとし、次いで、精製後に固体支持体から切断する。

30

【0672】

なおも別の実施形態では、5'-OH 成分を含むヌクレオシドは、他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。なおも別の実施形態では、5'-OH 成分を含むヌクレオシドは、本願に記載される他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。なおも別の実施形態では、5'-OH 成分を含むヌクレオシドは、スキーム I に示す 1 つ又は複数のサイクルを含む他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。なおも別の実施形態では、5'-OH 成分を含むヌクレオシドは、スキーム I-b、I-c、又は I-d に例示する 1 つ又は複数のサイクルを含む他の既知の核酸合成方法から得られる中間体である。

40

【0673】

いくつかの実施形態では、本発明は、出発材料として安定な市販される材料を用いるオリゴヌクレオチド合成方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、アキラルな

50

出発材料を用いた立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体を產生するようにオリゴヌクレオチド合成方法を提供する。

【0674】

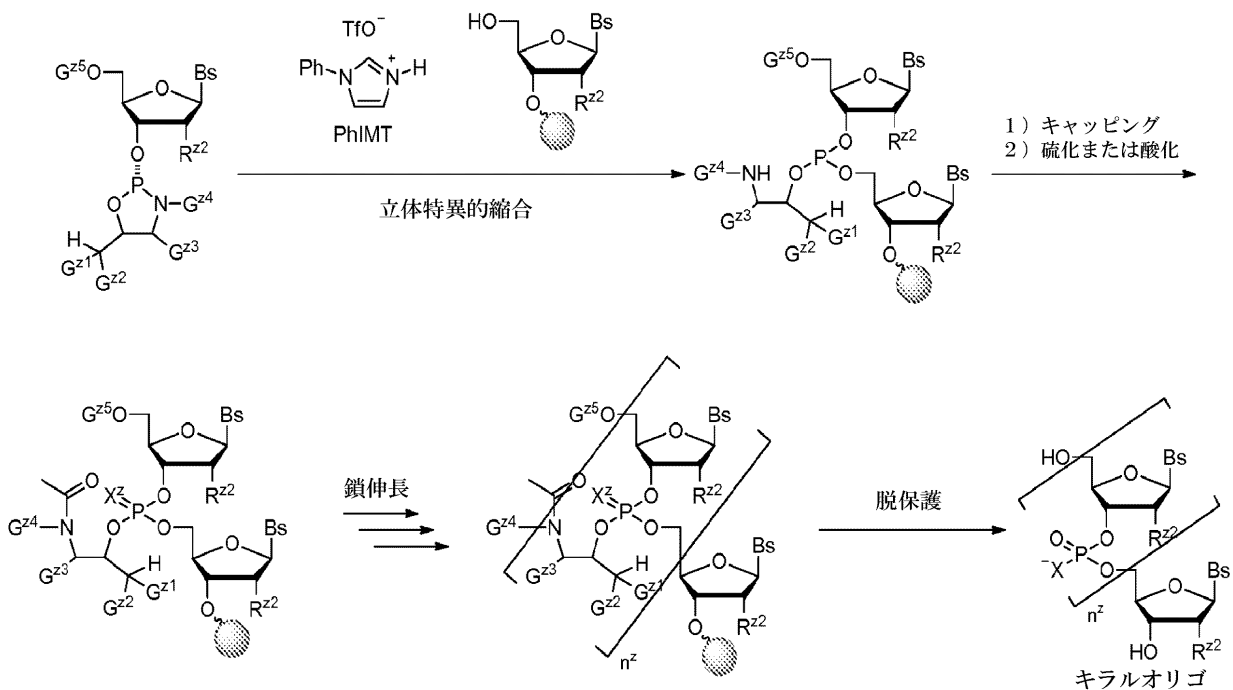
いくつかの実施形態では、本方法は脱保護ステップの下で分解を起こさない。さらに本方法では特別なキャッピング剤を必要とすることなくリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体を產生する。

【0675】

いくつかの実施形態では、本発明は、アキラルなモノマーを用いた、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体の合成方法を提供する。いくつかの実施形態では、第1のステップで、式(Z-Va)、(Z-Vb)、(Z-Va')、又は(Z-Vb')で表されるヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を第2の活性化試薬及びヌクレオシドと反応させて縮合中間体を形成する。第2のステップでは縮合中間体を、キラルなX-ホスホネート成分を含む核酸に変換する。例示的な方法を下のスキームZ-2に例示する。

スキームZ-2

【化207】



【0676】

スキームZ-2の詳細な条件はスキームZ-1のそれと同様である。式Z-Va (Z-Vb) の出発材料、特に式Z-Va' (又はZ-Vb') の出発材料は化学的に安定である。実施例に示す通り、本方法は、脱保護ステップの下で分解を起こさない。さらに本方法では特別なキャッピング剤を必要とすることなくリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体を產生する。

【0677】

いくつかの実施形態では、補助基の除去のメカニズムは、下のスキームZ-3に例示する通りである。

スキームZ-3

スキーム Z-3 において、Nu は求核試薬を表す。いくつかの実施形態では、スキーム Z-3 におけるメカニズムは、前出の補助基除去メカニズムとは異なると考えられる。

いくつかの実施形態では、本発明は次の化学式（Z-I）を有するキラル試薬又はその塩を提供し：

$$\begin{array}{c}
 \text{HO} \\
 | \\
 \text{H} \quad \text{N}-\text{G}^{z4} \\
 \diagdown \quad \diagup \\
 \text{C} \quad \text{C} \\
 \diagup \quad \diagdown \\
 \text{G}^{z1} \quad \text{G}^{z2} \quad \text{G}^{z3}
 \end{array}
 \quad (\text{Z-I})$$

式中、 G^{z-1} 及び G^{z-2} は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、式 (Z-III) 若しくは (Z-IIII) の基、又は、 G^{z-1} 及び G^{z-2} の両方が一緒になって式 (Z-IV) の基を形成したものであり、

(Z-II)

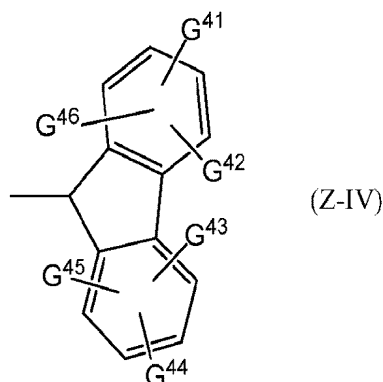
式中、 $G^{2-1} \sim G^{2-3}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は C_{1-3} アルキル基、

$$\begin{array}{c} \text{G}^{31} \\ | \\ \text{---Si---G}^{32} \\ | \\ \text{G}^{33} \end{array} \quad (\text{Z-III})$$

であり、

式中、 $G^{3\ 1} \sim G^{3\ 3}$ は互いに独立して $C_{1 \sim 4}$ アルキル基、 $C_{1 \sim 4}$ アルコキシ基、 $C_{6 \sim 14}$ アリール基、 $C_{7 \sim 14}$ アラルキル基、 $C_{1 \sim 4}$ アルキル $C_{6 \sim 14}$ アリール基、 $C_{1 \sim 4}$ アルコキシ $C_{6 \sim 14}$ アリール基、又は $C_{6 \sim 14}$ アリール $C_{1 \sim 4}$ アルキル基、

【化 2 1 2】



10

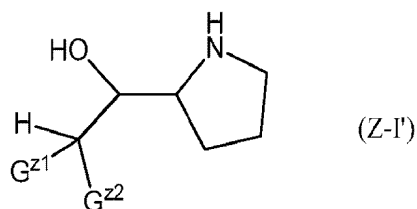
であり、

式中、 $G^{41} \sim G^{46}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基であり、 G^{43} 及び G^{44} は互いに独立して水素原子、 $C_1 \sim 3$ アルキル基、 $C_6 \sim 14$ アリール基、又は、 G^{43} 及び G^{44} の両方が一緒になって $3 \sim 16$ の炭素原子を有するヘテロ原子含有環を形成したもの、である。

【0679】

いくつかの実施形態では、本発明は、次の化学式 (Z-I') を有する式 Z-1 のキラル試薬又はその塩を提供し：

【化 2 1 3】



20

式中、各変数は互いに独立して上に定義され本明細書に記載される通りである。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} 及び G^{z2} のそれぞれは式 (Z-II) の基であり、 $G^{21} \sim G^{23}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} 及び G^{z2} のそれぞれは式 (Z-II) の基であり、 $G^{21} \sim G^{23}$ のそれぞれは水素原子である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-II) の基であり、 $G^{21} \sim G^{23}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-II) の基であり、 G^{21} 及び G^{22} のそれぞれは水素原子であり、 G^{23} はニトロ基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-III) の基であり、 $G^{31} \sim G^{33}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基、 $C_6 \sim 14$ アリール基、 $C_7 \sim 14$ アラルキル基、 $C_1 \sim 4$ アルキル $C_6 \sim 14$ アリール基、 $C_1 \sim 4$ アルコキシ $C_6 \sim 14$ アリール基、又は $C_6 \sim 14$ アリール $C_1 \sim 4$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-III) の基であり、 $G^{31} \sim G^{33}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基、 C_6 アリール基、 $C_7 \sim 10$ アラルキル基、 $C_1 \sim 4$ アルキル C_6 アリール基、 $C_1 \sim 4$ アルコキシ C_6 アリール基、又は C_6 アリール $C_1 \sim 4$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-III) の基であり、 $G^{31} \sim G^{33}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基、又は C_6 アリール基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩

30

40

50

を提供し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-I I I) の基であり、 G^{31} 及び G^{33} は C_6 アリール基であり、 G^{32} は $C_1 \sim 2$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-I I I) の基であり、 $G^{31} \sim G^{33}$ は互いに独立して $C_1 \sim 4$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-I I I) の基であり、 G^{31} 及び G^{33} は C_6 アリール基であり、 G^{32} は $C_1 \sim 4$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} は水素原子であり、 G^{z2} は式 (Z-I V) の基であり、 $G^{41} \sim G^{46}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} 及び G^{z2} が一緒になって式 (Z-I V) の基を形成し、 $G^{41} \sim G^{46}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基である。いくつかの実施形態では、本発明は、式 (Z-1') のキラル試薬又はその塩を提供し、 G^{z1} 及び G^{z2} が一緒になって式 (Z-I V) の基を形成し、 $G^{41} \sim G^{46}$ のそれぞれは水素原子である。

10

【0680】

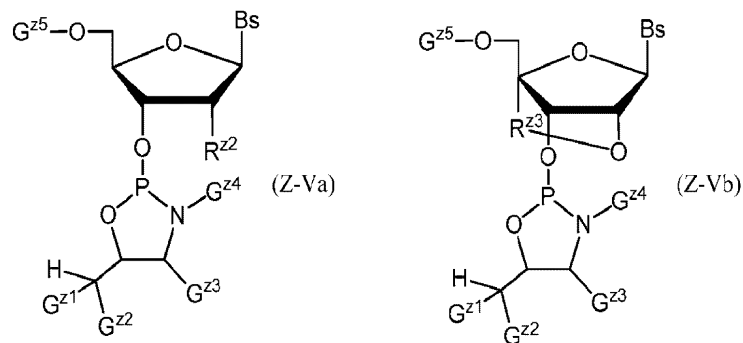
いくつかの実施形態では、キラル試薬又はその塩は、式 3 a、3 b、5 a、Z-5 b、7 a、7 b、9 a、9 b、11 a、及び 11 b より選択される。

【0681】

20

いくつかの実施形態では、本発明は、式 Z-V a 又は Z-V b で表されるヌクレオシド 3'-ホスホラミダイト誘導体を提供し：

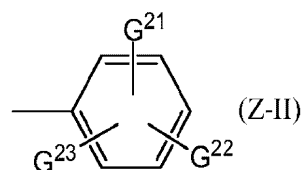
【化214】



30

、
式中、 G^{z1} 及び G^{z2} は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、式 (Z-I I) 若しくは (Z-I I I) の基、又は、 G^{z1} 及び G^{z2} の両方が一緒になって式 (Z-I V) の基を形成したもの、であり、

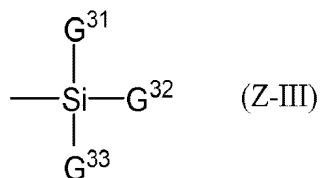
【化216】



40

式中、 $G^{21} \sim G^{23}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $C_1 \sim 3$ アルキル基、

【化 2 1 7】

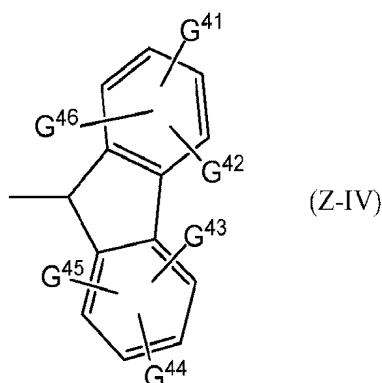


であり、

式中、 $\text{G}^{31} \sim \text{G}^{33}$ は互いに独立して $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルキル基、 $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルコキシ基、 $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基、 $\text{C}_{7 \sim 14}$ アラルキル基、 $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルキル $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基、 $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルコキシ $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基、又は $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール $\text{C}_{1 \sim 4}$ アルキル基、

10

【化 2 1 8】



20

であり、

式中、 $\text{G}^{41} \sim \text{G}^{46}$ は互いに独立して水素原子、ニトロ基、ハロゲン原子、シアノ基、又は $\text{C}_{1 \sim 3}$ アルキル基であり；

G^{z3} 及び G^{z4} は互いに独立して水素原子、 $\text{C}_{1 \sim 3}$ アルキル基、 $\text{C}_{6 \sim 14}$ アリール基、又は、 G^{z3} 及び G^{z4} の両方が一緒になって 3～16 の炭素原子を有するヘテロ原子含有環を形成したもの、であり、

G^{z5} はヒドロキシ基の保護基であり；

R^{z2} は互いに独立して水素、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NR}^{\text{d}}\text{R}^{\text{d}}$ 、 $-\text{N}_3$ 、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキル- Y^1 -、アルケニル- Y^1 -、アルキニル- Y^1 -、アリール- Y^1 -、ヘテロアリール- Y^1 -、 $-\text{OR}^{\text{b}}$ 、又は $-\text{SR}^{\text{b}}$ であり、 R^{b} はブロック成分であり；

30

Y^1 は O 、 NR^{d} 、 S 、又は Se であり；

R^{d} は互いに独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アシル、置換シリル、カルバメート、 $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^{\text{e}})_2$ 、又は $-\text{HP}(\text{O})(\text{R}^{\text{e}})$ であり；

R^{e} は互いに独立して水素、アルキル、アリール、アルケニル、アルキニル、アルキル- Y^2 -、アルケニル- Y^2 -、アルキニル- Y^2 -、アリール- Y^2 -、若しくはヘテロアリール- Y^2 -、又は、 Na^+ 、 Li^+ 、若しくは K^+ である陽イオン、又は $-\text{O}^-$ であり；

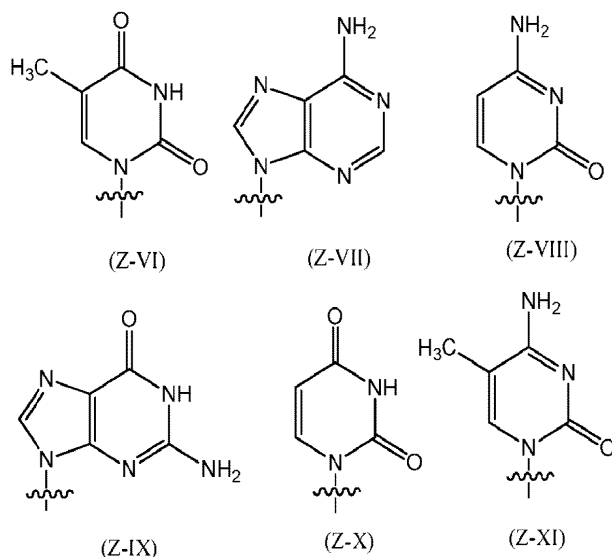
40

Y^2 は O 、 NR^{d} 、又は S であり；

R^{z3} は $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、又は $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)-$ で表される基であり；

Bs は次の式 (Z-VI) ～ (Z-XI) で表される基より選択される基又はその誘導体である。

【化 2 1 9】



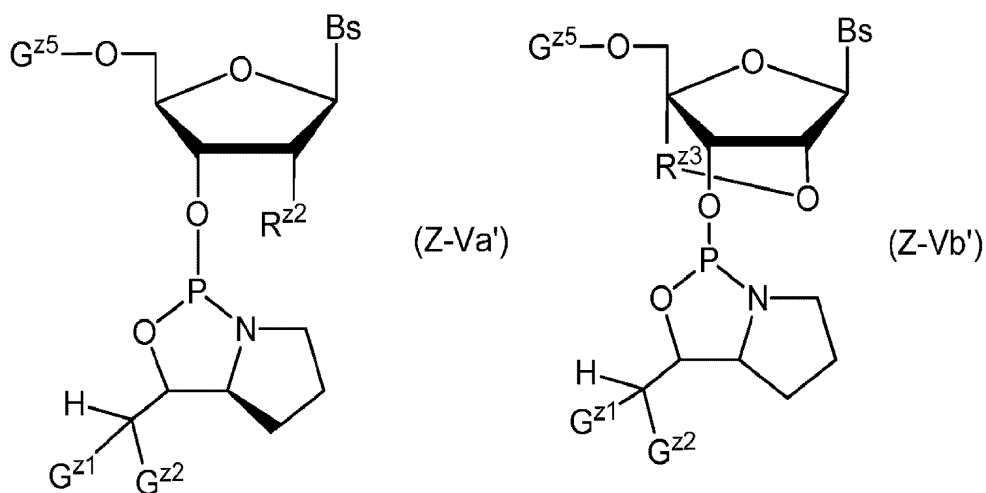
10

【0682】

いくつかの実施形態では、本発明は、(Z-Va')又は(Z-Vb')の構造を有する式Z-Va又はZ-Vbのヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を提供し：

【化 2 2 0】

20



30

、
式中、各変数は互いに独立して上に定義され本明細書に記載される通りである。

【0683】

いくつかの実施形態では、本発明は、式12a、12b、13a、13b、14a、14b、15a、15b、16a、16b、17a、17b、18a、18b、19a、19b、20a、20b、21a、21b、22a、22b、23a、23b、24a、24b、25a、25b、26a、26b、27a、27b、28a、28b、29a、29b、30a、30b、31a、31b、32a、32b、33a、33b、34a、34b、及び35aより選択されるヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、式12a、12b、13a、13b、14a、14b、15a、15b、16a、16b、17a、17b、18a、18b、19a、19b、20a、20b、21a、21b、22a、22b、23a、23b、24a、24b、25a、25b、26a、又は26bより選択されるヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を提供する。

40

【0684】

いくつかの実施形態では、本発明は、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド

50

誘導体の合成方法を提供し、本方法は、

アキラルなH-ホスホネート成分を含む分子、キラル試薬又はその塩を反応させてヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体のモノマーを形成するステップと；

モノマー及びヌクレオシドを反応させて縮合中間体を形成するステップと；

縮合中間体を、キラルなX-ホスホネート成分を含む核酸に変換するステップと、を含み、

キラル試薬は次の化学式（Z-I）を有する。

【0685】

いくつかの実施形態では、本発明は、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体の合成方法を提供し、本方法は、

アキラルなH-ホスホネート成分を含む分子、キラル試薬又はその塩を反応させてヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体のモノマーを形成するステップと；

モノマー及びヌクレオシドを反応させて縮合中間体を形成するステップと；

縮合中間体を、キラルなX-ホスホネート成分を含む核酸に変換するステップと、を含み、

キラル試薬は次の化学式（Z-I'）を有する。

【0686】

いくつかの実施形態では、本発明は、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体の合成方法を提供し、本方法は、

アキラルなH-ホスホネート成分を含む分子、キラル試薬又はその塩を反応させてヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体のモノマーを形成するステップと；

モノマー及びヌクレオシドを反応させて縮合中間体を形成するステップと；

縮合中間体を、キラルなX-ホスホネート成分を含む核酸に変換するステップと、を含み、

キラル試薬は式3a、3b、5a、Z-5b、7a、7b、9a、9b、11a及び11bより選択される。

【0687】

いくつかの実施形態では、本発明は、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体の合成方法を提供し、本方法は、

式（Z-Va）又は（Z-Vb）で表されるヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を、活性化試薬及びヌクレオシドと反応させて縮合中間体を形成するステップと；

縮合中間体を、キラルなX-ホスホネート成分を含む核酸に変換するステップと、を含む。

【0688】

いくつかの実施形態では、本発明は、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体の合成方法を提供し、本方法は、

式（Z-Va）又は（Z-Vb）で表されるヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を、活性化試薬及びヌクレオシドと反応させて縮合中間体を形成するステップと；

縮合中間体を、キラルなX-ホスホネート成分を含む核酸に変換するステップと、を含み；

式（Z-Va）又は（Z-Vb）で表されるヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体は、式12a、12b、13a、13b、14a、14b、15a、15b、16a、16b、17a、17b、18a、18b、19a、19b、20a、20b、21a、21b、22a、22b、23a、23b、24a、24b、25a、25b、26a、26b、27a、27b、28a、28b、29a、29b、30a、30b、31a、31b、32a、32b、33a、33b、34a、34b、及び35aより選択される。

いくつかの実施形態では、本発明は、立体制御されたリン原子修飾オリゴヌクレオチド誘導体の合成方法を提供し、本方法は、

式（Z-Va）又は（Z-Vb）で表されるヌクレオシド3'-ホスホラミダイト誘導体を、活性化試薬及びヌクレオシドと反応させて縮合中間体を形成するステップと；

10

20

30

40

50

縮合中間体を、キラルな X-ホスホネート成分を含む核酸に変換するステップと、を含み；

式 (Z-Va) 又は (Z-Vb) で表されるヌクレオシド 3'-ホスホラミダイト誘導体は、式 12a、12b、13a、13b、14a、14b、15a、15b、16a、16b、17a、17b、18a、18b、19a、19b、20a、20b、21a、21b、22a、22b、23a、23b、24a、24b、25a、25b、26a、及び 26b より選択される。

式 Z-I の所定のキラル補助基の調製及び使用

略語

ac : アセチル

bz : ベンゾイル

CSO : (1S) - (+) - (10-カンファースルフォニル (camphorsulfonyl)) オキサジリジン

DBU : 1, 8-ジアザビシクロ [5. 4. 0] ウンデカ-7-エン

DCA : ジクロロ酢酸

DCM : ジクロロメタン、CH₂Cl₂

Tr : トリチル、トリフェニルメチル

MeIm : N-メチルイミダゾール

NIS : N-ヨードスクシンイミド

pac : フェノキシアセチル

Ph : フェニル

PhIMT : N-フェニルイミダゾリウムトリフレート

POS : 3-フェニル-1, 2, 4-ジチアゾリン (dithiazoline) -5-オン

TBS : tert-ブチルジメチルシリル

TBDPS : tert-ブチルジフェニルシリル

TOM : トリイソプロピルシロキシメチル

TFA : トリフルオロ酢酸

【0689】

キラル制御オリゴヌクレオチドの合成の一般的手順-1

キラル制御オリゴヌクレオチドの自動化された固相合成を表 Z-1 に示すサイクルに従って実施した。

表 Z-1 合成手順

【表 5】

ステップ	操作	試薬及び溶媒	体積	待ち時間
1	脱トリチル化	3% DCA/DCM	1.6 mL	20秒
2	カップリング	0.1M モノマー/MeCN + 1M PhIMT	0.5 mL	5分
3	キャッピング	Ac ₂ O/THF-ピリジン + 16% MeIm/THF	0.5 mL	30秒
4	酸化/硫化	0.5M CSO/MeCN または 0.1M POS/MeCN	0.5 mL	90秒

【0690】

キラル制御オリゴヌクレオチドの合成の一般的手順-2

キラル制御オリゴヌクレオチドの自動化された固相合成を表 Z-2 に示すサイクルに従って実施した。

表 Z-2

【表 6】

ステップ	操作	試薬及び溶媒	体積	待ち時間
1	脱トリチル化	3% DCA/DCM	1.6 mL	20秒
2	カップリング	予備活性化モノマー*/MeCN + 1M PhIMT	0.5 mL	5分
3	キャッピング	Ac ₂ O/THF-ピリジン + 16% MeIm/THF	0.5 mL	30秒
4	酸化/硫化	0.5M CSO/MeCN または 0.1M POS/MeCN	0.5 mL	90秒

【0691】

10

* 表 Z-2 のステップ 2 における予備活性化モノマーの調製

脱水トルエンで共沸を繰り返し行うことによってヌクレオシド-3'-H-ホスホネートモノエステルを脱水し、次いで、脱水MeCN中に溶解させる。Ph₃PCl₂を溶液に加え、混合物を5分間攪拌する。脱水トルエンで共沸を繰り返し行い脱水MeCN中に溶解させたキラル試薬の溶液を混合物にシリンジで滴下して加え、混合物をアルゴン下で5分間攪拌する。

【0692】

合成の後、樹脂を25%NH₃水溶液(1mL)にて、55℃で12時間処理した。混合物を室温に冷却し、樹脂を膜ろ過によって除去した。ろ液を真空下で濃縮乾固した。残渣をH₂O(3mL)に溶解させ、RP-UPLC-MSにより、0.1M酢酸トリエチルアンモニウム・バッファー(pH7.0)中アセトニトリルの直線勾配(0~50%/30分)で、50℃下、0.3mL/分の速度にて分析した。

20

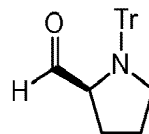
【0693】

実施例 Z-1

【0694】

(S)-1-トリチルピロリジン-2-カルバルデヒド(1a)

【化221】



1a

30

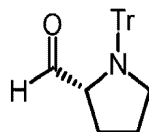
【0695】

化合物1aを、文献(Guga, P. Curr. Top. Med. Chem. 2007, 7, 695-713.)に記載される手順に従ってL-プロリンから合成した。

【0696】

(R)-1-トリチルピロリジン-2-カルバルデヒド(1b)

【化222】



1b

40

【0697】

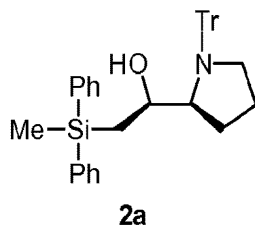
化合物1bを、化合物1aと同様にしてD-プロリンから合成した。

【0698】

(S)-2-(メチルジフェニルシリル)-1-((S)-1-トリチルピロリジン-2-イル)エタノール(2a)

50

【化 2 2 3】



【0699】

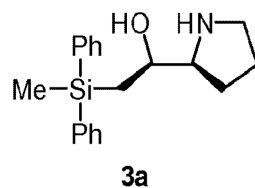
THF (14 mL) 中クロロメチルジフェニルメチルシラン (4.02 g、16.3 mmol) 及びマグネシウム (402 mg、16.3 mmol) から調製した THF 中メチルジフェニルシリルメチル塩化マグネシウムの溶液に、氷冷下、THF (30 mL) 中 1a (2.79 g、8.14 mmol) 溶液を加えた。氷冷下、1.5 時間攪拌した後、混合物を室温に温め、30 分間攪拌を継続した。飽和水性 NH₄Cl (100 mL) を反応混合物に 0℃ で加え、ジエチルエーテル (100 mL) で 3 回抽出を実施した。抽出物を合わせて Na₂SO₄ 上で乾燥し、ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルでクロマトグラフすると、2a が無色泡状物 (3.91 g、87%) として得られた。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.48–7.08 (25H, m), 4.33–4.23 (1H, m), 3.16–2.89 (3H, m), 2.84 (1H, br s), 1.70–1.54 (1H, m), 1.35 (1H, dd, J=14.7, 6.3 Hz), 1.10 (1H, dd, J=14.7, 8.1 Hz), 1.18–1.05 (1H, m), 1.04–0.90 (1H, m), 0.34 (3H, s), –0.17–0.36 (1H, m)。

【0700】

(S)-2-(メチルジフェニルシリル)-1-((S)-1-ピロリジン-2-イル)エタノール (3a)

【化 2 2 4】



【0701】

2a (3.91 g、7.06 mmol) を DCM (70 mL) 中 3% DCA に溶解させ、室温で 10 分間攪拌した。混合物に、1M NaOH (200 mL) を加え、抽出を DCM (100 mL) で 3 回実施した。抽出物を合わせて Na₂SO₄ 上で乾燥し、ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルでクロマトグラフすると、3a が淡黄色の油 (1.99 g、90%) として得られた。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.57–7.52 (5H, m), 7.38–7.33 (5H, m), 3.77 (1H, ddd, J=8.9, 5.4, 3.5 Hz), 3.01 (1H, dt, J=7.4, 3.6 Hz), 2.97–2.79 (2H, m), 2.27 (2H, br s), 1.76–1.53 (4H, m), 1.38 (1H, dd, J=15.0, 9.0 Hz), 1.24 (1H, dd, J=15.0, 5.4 Hz), 0.65 (3H, s); ¹³C NMR (100.4 MHz, CDCl₃) δ 137.4, 137.1, 134.6, 134.5, 129.1, 127.8, 69.5, 64.1, 47.0, 25.8, 24.0, 19.6, –3.4. MALDI TOF-MS m/z C₁₉H₂₆NOSi [M+H]⁺ の計算値 312.18, 測定値 312.06。

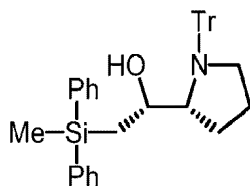
【0702】

実施例 Z-2

【0703】

(R)-2-(メチルジフェニルシリル)-1-((R)-1-トリチルピロリジン-2-イル)エタノール(2b)

【化225】



2b

10

【0704】

化合物2bを、化合物2aと同様にして、ただし1aの代わりに1bを用いて得た。

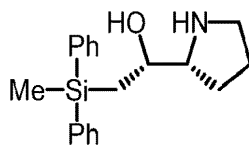
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.48–7.12 (25H, m), 4.33–4.24 (1H, m), 3.16–2.89 (3H, m), 2.86 (1H, br s), 1.69–1.52 (1H, m), 1.35 (1H, dd, $J=14.4, 6.0$ Hz), 1.10 (1H, dd, $J=14.4, 8.4$ Hz), 1.18–1.05 (1H, m), 1.03–0.89 (1H, m), 0.33 (3H, s), –0.19–0.39 (1H, m); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 144.5, 137.5, 136.8, 134.6, 134.3, 129.8, 129.0, 127.8, 127.7, 127.4, 126.1, 77.9, 71.7, 65.1, 53.5, 25.0, 24.8, 19.6, –4.0. MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{NOSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 554.29, 測定値 554.09。

20

【0705】

(R)-2-(メチルジフェニルシリル)-1-((R)-1-ピロリジン-2-イル)エタノール(3b)

【化226】



3b

30

【0706】

化合物3bを、化合物3aと同様にして、ただし2aの代わりに2bを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.58–7.52 (5H, m), 7.38–7.33 (5H, m), 3.78 (1H, ddd, $J=9.0, 5.1, 3.6$ Hz), 3.00 (1H, dt, $J=7.4, 3.3$ Hz), 2.97–2.78 (2H, m), 2.19 (2H, br s), 1.76–1.53 (4H, m), 1.38 (1H, dd, $J=14.6, 9.0$ Hz), 1.24 (1H, dd, $J=14.6, 5.1$ Hz), 0.66 (3H, s); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 137.5, 137.1, 134.5, 134.4, 129.0, 127.7, 69.2, 64.2, 46.9, 25.8, 24.0, 19.7, –3.4. MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NOSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 312.18, 測定値 312.09。

40

【0707】

実施例 Z-3

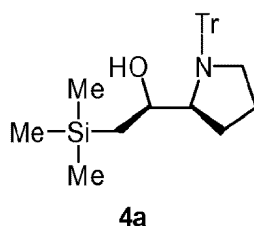
【0708】

(S)-2-(トリメチルシリル)-1-((S)-1-トリチルピロリジン-2-イル)

50

ル) エタノール (4a)

【化227】



【0709】

10

化合物4aを、化合物2aと同様にして、ただし「クロロメチルジフェニルメチルシラン」の代わりに「クロロメチルトリメチルシラン」を用いて得た。

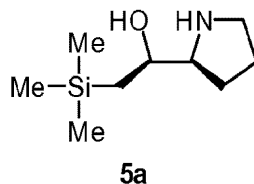
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.58–7.51 (5H, m), 7.31–7.14 (10H, m), 4.13 (1H, dt, $J=7.5, 3.0$ Hz), 3.39–3.31 (1H, m), 3.20–2.99 (2H, m), 2.84 (1H, s), 1.74–1.57 (1H, m), 1.29–1.10 (2H, m), 0.74 (1H, dd, $J=14.4, 7.2$ Hz), 0.46 (1H, dd, $J=14.4, 7.2$ Hz), –0.15 (9H, s). MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{NO Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 430.26, 測定値 430.09。

【0710】

20

(S)-2-(トリメチルシリル)-1-((S)-1-ピロリジン-2-イル)エタノール (5a)

【化228】



【0711】

30

化合物5aを、化合物3aと同様にして、ただし2aの代わりに4aを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.76 (1H, ddd, $J=8.8, 5.7, 3.3$ Hz), 3.08 (1H, dt, $J=7.8, 3.3$ Hz), 3.02–2.87 (2H, m), 2.48 (2H, brs), 1.81–1.58 (4H, m), 0.83 (1H, dd, $J=14.7, 8.7$ Hz), 0.68 (1H, dd, $J=14.7, 6.0$ Hz), 0.05 (9H, s); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 69.6, 64.3, 46.9, 25.8, 23.9, 22.0, –0.8. MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{NO Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 188.15, 測定値 188.00。

【0712】

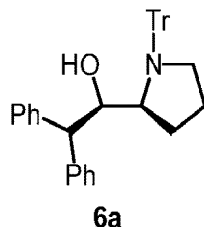
40

実施例Z-5

【0713】

(R)-2,2-ジフェニル-1-((S)-1-トリチルピロリジン-2-イル)エタノール (6a)

【化 2 2 9】



【0 7 1 4】

無水THF（36 mL）中ジフェニルメタン（6.7 mL、40 mmol）の溶液にn-BuLi（ヘキサンの1.67 M溶液、24 mL、40 mmol）を室温で滴下して加え、1時間攪拌した。無水THF（40 mL）中の、トルエンで共沸を繰り返し行うことによって脱水した1a（3.41 g、10 mmol）を0℃でゆっくりと混合物に加え、45分間攪拌を続けた。次いで、飽和NH₄Cl水溶液（100 mL）及びEt₂O（100 mL）を加え、有機層を分離し、水層をEt₂O（2×100 mL）で抽出した。有機層を合わせて、Na₂SO₄上で乾燥し、ろ過し、減圧濃縮した。残渣をクロマトグラフィーによってシリカゲルで精製すると、6a（1.41 g、28%）が白い泡状物として得られた。

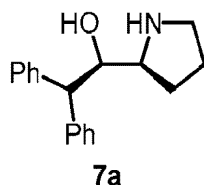
10

【0 7 1 5】

(R)-2,2-ジフェニル-1-((S)-ピロリジン-2-イル)エタノール (7a)

20

【化 2 3 0】



【0 7 1 6】

6a（650 mg、1.27 mmol）をDCM（13 mL）中3% DCAに溶解させ、室温で10分間攪拌した。混合物に1M NaOH（40 mL）を加え、DCM（30 mL）で3回抽出を実施した。抽出物を合わせて、Na₂SO₄上で乾燥し、ろ過し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルでクロマトグラフすると、7aが淡黄色の油（316 mg、93%）として得られた。

30

¹H NMR（300 MHz, CDCl₃）δ 7.44–7.38（2H, m）, 7.33–7.14（8H, m）, 4.46（1H, dd, J=9.9, 3.3 Hz）, 3.91（1H, d, J=9.9 Hz）, 3.02–2.88（2H, m）, 2.81–2.69（1H, m）, 2.52（2H, br s）, 1.88–1.56（4H, m）; ¹³C NMR（75.5 MHz, CDCl₃）δ 142.3, 142.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 126.5, 126.4, 73.5, 60.1, 55.8, 46.6, 25.8, 23.4. MALDI TOF-MS m/z C₁₈H₂₂NO [M+H]⁺の計算値 268.17, 測定値 268.06。

40

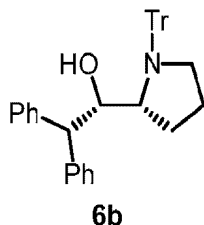
【0 7 1 7】

実施例 Z-6

【0 7 1 8】

(S)-2,2-ジフェニル-1-((R)-1-トリチルピロリジン-2-イル)エタノール (6b)

【化 2 3 1】



【0 7 1 9】

化合物 6 b を、化合物 6 a と同様にして、ただし 1 a の代わりに 1 b を用いて得た。

10

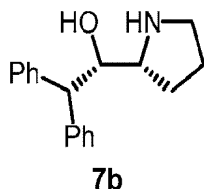
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.44–7.37 (6 H, m), 7.30–7.01 (17 H, m), 6.66–6.61 (2 H, m), 4.80 (1 H, d, $J=10.8$ Hz), 3.63 (1 H, d, $J=10.8$ Hz), 3.36–3.28 (1 H, m), 3.22–3.09 (1 H, m), 3.01–2.89 (1 H, m), 2.66 (1 H, s), 1.90–1.75 (1 H, m), 1.29–1.04 (2 H, m), 0.00–0.19 (1 H, m); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 144.2, 142.9, 141.6, 130.0, 128.5, 128.4, 127.9, 127.8, 127.4, 126.4, 126.2, 77.9, 75.9, 61.9, 55.4, 53.4, 24.7, 24.5. MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 510.28, 測定値 510.11。

20

【0 7 2 0】

(S)-2, 2-ジフェニル-1-((R)-ピロリジン-2-イル)エタノール (7 b)

【化 2 3 2】



30

【0 7 2 1】

化合物 7 b を、化合物 7 a と同様にして、ただし 6 a の代わりに 6 b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.45–7.14 (10 H, m), 4.45 (1 H, dd, $J=9.9, 3.3$ Hz), 3.91 (1 H, d, $J=9.9$ Hz), 3.00–2.89 (2 H, m), 2.82–2.71 (1 H, m), 2.40 (2 H, br s), 1.87–1.55 (4 H, m); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 142.3, 142.0, 128.5, 128.3, 128.1, 126.3, 126.2, 73.4, 60.1, 55.9, 46.5, 25.8, 23.5. MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 268.17, 測定値 268.03。

40

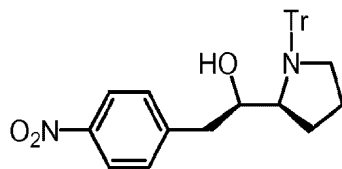
【0 7 2 2】

実施例 Z-7

【0 7 2 3】

(R)-2-(4-ニトロフェニル)-1-((S)-1-トリチルピロリジン-2-イル)エタノール (8 a)

【化 2 3 3】



8a

【0 7 2 4】

化合物 8 a を、化合物 6 a と同様にして、ただし「ジフェニルメタン」の代わりに「4-ニトロベンジルクロライド」を用いて得た。

10

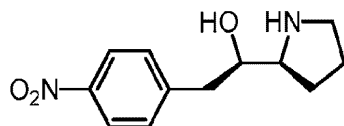
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09–8.03 (2 H, m), 7.49–7.43 (6 H, m), 7.28–7.09 (1 H, m), 4.23 (1 H, dd, $J=8.3, 5.6, 3.0$ Hz), 3.43–3.33 (1 H, m), 3.23–3.11 (1 H, m), 3.07–2.96 (1 H, m), 2.83 (1 H, br s), 2.74 (1 H, dd, $J=13.8, 8.4$ Hz), 2.49 (1 H, dd, $J=13.8, 5.1$ Hz), 1.83–1.67 (1 H, m), 1.41–1.17 (2 H, m), 0.27–0.08 (1 H, m); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 147.3, 146.3, 144.3, 129.8, 129.6, 127.5, 126.3, 123.4, 77.9, 74.8, 63.5, 53.2, 39.5, 25.0, 24.9. MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 479.23, 測定値 479.08。

20

【0 7 2 5】

(R)-2-(4-ニトロフェニル)-1-((S)-ピロリジン-2-イル)エタノール (9 a)

【化 2 3 4】



9a

30

【0 7 2 6】

化合物 9 a を、化合物 7 a と同様にして、ただし 6 a の代わりに 8 a を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (2 H, d, $J=8.7$ Hz), 7.42 (2 H, d, $J=8.7$ Hz), 3.86–3.79 (1 H, m), 3.16–3.07 (1 H, m), 2.99–2.68 (6 H, m), 1.84–1.68 (4 H, m); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 147.4, 146.2, 129.9, 123.2, 72.4, 62.0, 46.6, 40.4, 25.7, 24.4. MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 237.12, 測定値 237.01。

40

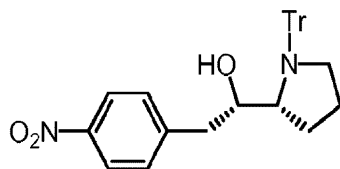
【0 7 2 7】

実施例 Z-8

【0 7 2 8】

(S)-2-(4-ニトロフェニル)-1-((R)-1-トリチルピロリジン-2-イル)エタノール (8 b)

【化 2 3 5】



8b

【0 7 2 9】

化合物 8 b を、化合物 8 a と同様にして、ただし 1 a の代わりに 1 b を用いて得た。

10

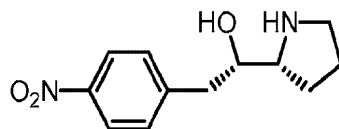
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.09–8.04 (2H, m), 7.49–7.43 (6H, m), 7.28–7.09 (11H, m), 4.22 (1H, d d d, $J=8.4, 5.6, 3.0$ Hz), 3.43–3.33 (1H, m), 3.24–3.10 (1H, m), 3.08–2.94 (1H, m), 2.81 (1H, b r s), 2.75 (1H, d d, $J=14.0, 8.1$ Hz), 2.49 (1H, d d, $J=14.0, 5.1$ Hz), 1.81–1.67 (1H, m), 1.40–1.16 (2H, m), 0.26–0.09 (1H, m); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 147.3, 144.3, 129.8, 129.6, 129.4, 126.3, 123.5, 77.9, 74.8, 63.5, 53.2, 39.5, 25.0, 24.9. MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 479.23, 測定値 479.08。

20

【0 7 3 0】

(S)-2-(4-ニトロフェニル)-1-((R)-ピロリジン-2-イル)エタノール (9 b)

【化 2 3 6】



9b

30

【0 7 3 1】

化合物 9 b を、化合物 9 a と同様にして、ただし 8 a の代わりに 8 b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.19–8.13 (2H, m), 7.45–7.39 (2H, m), 3.83 (1H, d d d, $J=7.7, 5.4, 3.9$ Hz), 3.14 (1H, d t, $J=7.7, 3.9$ Hz), 3.01–2.87 (2H, m), 2.83 (1H, d, $J=3.3$ Hz), 2.81 (1H, s), 2.62 (2H, b r s), 1.79–1.72 (4H, m); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 147.3, 146.5, 130.0, 123.5, 72.7, 61.7, 46.7, 40.1, 25.8, 24.2. MALDI TOF-MS m/z $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 237.12, 測定値 237.02。

40

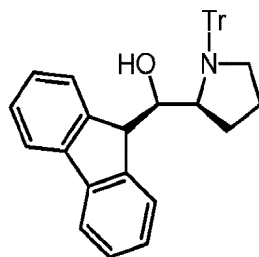
【0 7 3 2】

実施例 Z-9

【0 7 3 3】

(R)- (9H-フルオレン-9-イル) ((S)-1-トリチルピロリジン-2-イル)メタノール (10 a)

【化 2 3 7】



10a

【0 7 3 4】

10

化合物 10 a を、化合物 6 a と同様にして、ただし「ジフェニルメタン」の代わりに「フルオレン」を用いて得た。

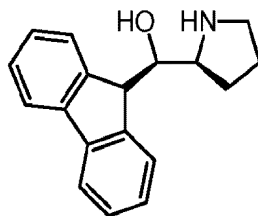
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.70 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 7.66 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 7.55 (2H, d, $J=7.5$ Hz), 7.44–7.09 (18H, m), 6.87–6.62 (1H, m), 4.55–4.48 (1H, m), 4.06 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 3.43–3.34 (1H, m), 3.18–3.06 (1H, m), 2.98–2.88 (1H, m), 2.85 (1H, br s), 1.42–1.24 (1H, m), 1.18–1.04 (1H, m), 0.53–0.39 (1H, m), –0.02–0.20 (1H, m); MALDI TOF–MS m/z $\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 508.26, 測定値 508.12。

20

【0 7 3 5】

(R)–(9H–フルオレン–9–イル) ((S)–ピロリジン–2–イル) メタノール (11 a)

【化 2 3 8】



11a

30

【0 7 3 6】

化合物 11 a を、化合物 7 a と同様にして、ただし 6 a の代わりに 10 a を用いて得た。

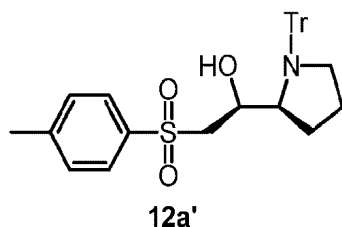
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (2H, d, $J=7.5$ Hz), 7.68 (2H, t, $J=8.0$ Hz), 7.43–7.35 (2H, m), 7.34–7.25 (2H, m), 4.28 (1H, d, $J=6.3$ Hz), 4.03 (1H, dd, $J=6.5, 4.2$ Hz), 3.19–3.11 (1H, m), 2.97–2.88 (1H, m), 2.86–2.76 (1H, m), 2.02 (2H, br s), 1.77–1.53 (3H, m), 1.38–1.23 (1H, m); MALDI TOF–MS m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値 266.15, 測定値 266.04。

40

【0 7 3 7】

(S)–2–トリシル–1–((S)–1–トリチルピロリジン–2–イル) エタノール (12 a')

【化 2 3 9】



【0 7 3 8】

化合物 1 2 a ' を、化合物 2 a と同様にして、ただし「クロロメチルジフェニルメチルシラン」の代わりに「クロロメチル p - トリルスルホン」を用いて得た。

10

【0 7 3 9】

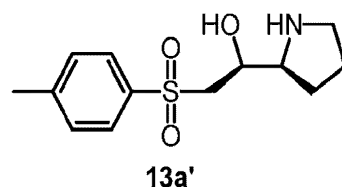
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.48–7.44 (6H, m), 7.35 (2H, d, J = 7.2 Hz), 7.21–7.13 (9H, m), 4.39–4.36 (1H, m), 3.33 (1H, s), 3.24–3.20 (1H, m), 3.19–3.10 (2H, m), 2.98–2.92 (2H, m), 2.49 (3H, s), 1.55–1.49 (1H, m), 1.33–1.26 (1H, m), 1.12–1.04 (1H, m), 0.22–0.14 (1H, m); ¹³C NMR (150.9 MHz, CDCl₃) δ 144.6, 144.5, 136.3, 129.9, 129.5, 128.1, 127.5, 126.2, 78.0, 69.1, 63.9, 60.2, 52.6, 25.5, 24.7, 21.7。

20

【0 7 4 0】

(S) - 2 - トシル - 1 - ((S) - 1 - トリチルピロリジン - 2 - イル) エタノール (1 3 a ')

【化 2 4 0】



30

【0 7 4 1】

化合物 1 3 a ' を、化合物 3 a と同様にして、ただし 2 a の代わりに 1 2 a ' を用いて得た。

【0 7 4 2】

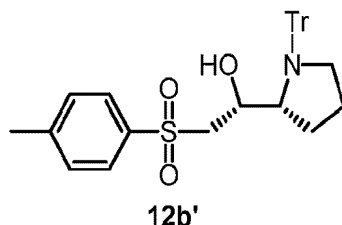
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.37 (2H, d, J = 8.4 Hz), 4.01 (1H, ddd, J = 12.0, 5.1, 3.0 Hz), 3.32 (1H, dd, J = 14.4, 3.0 Hz), 3.25 (1H, dd, J = 14.4, 9.0 Hz), 3.16 (1H, dt, J = 7.8, 5.1 Hz), 2.90–2.82 (2H, m), 2.46 (3H, s), 2.04 (2H, br s), 1.78–1.63 (3H, m), 1.62–1.55 (1H, m); ¹³C NMR (150.9 MHz, CDCl₃) δ 144.5, 136.7, 129.7, 127.7, 67.4, 61.8, 60.1, 46.7, 25.7, 21.4. MALDI TOF-MS m/z C₁₃H₂₀NO₃S [M+H]⁺ の計算値 270.12, 測定値 270.04。

40

【0 7 4 3】

(R) - 2 - トシル - 1 - ((R) - 1 - トリチルピロリジン - 2 - イル) エタノール (1 2 b ')

【化 2 4 1】



【0 7 4 4】

化合物 1 2 b ' を、化合物 1 2 a ' と同様にして、1 a の代わりに 1 b を用いて得た。

10

【0 7 4 5】

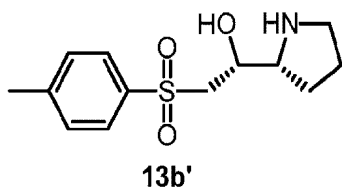
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.47–7.44 (6H, m), 7.35 (2H, d, J = 7.8 Hz), 7.21–7.13 (9H, m), 4.37 (1H, dt, J = 8.6, 2.4 Hz), 3.33 (1H, s), 3.23–3.20 (1H, m), 3.19–3.12 (2H, m), 2.98–2.92 (2H, m), 2.49 (3H, s), 1.56–1.49 (1H, m), 1.32–1.26 (1H, m), 1.11–1.03 (1H, m), 0.23–0.15 (1H, m); ¹³C NMR (150.9 MHz, CDCl₃) δ 144.6, 144.5, 136.3, 129.9, 129.6, 128.1, 127.6, 126.2, 78.0, 69.1, 63.9, 60.2, 52.6, 25.5, 24.7, 21.7。

20

【0 7 4 6】

(R)-2-トシル-1-((R)-1-トリチルピロリジン-2-イル)エタノール (1 3 b ')

【化 2 4 2】



30

【0 7 4 7】

化合物 1 3 b ' を、化合物 1 3 a ' と同様にして、ただし 1 2 a ' の代わりに 1 2 b ' を用いて得た。

【0 7 4 8】

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.37 (2H, d, J = 8.4 Hz), 4.01 (1H, ddd, J = 9.0, 5.1, 3.0 Hz), 3.32 (1H, dd, J = 14.4, 3.0 Hz), 3.25 (1H, dd, J = 14.4, 9.0 Hz), 3.17 (1H, dt, J = 7.2, 5.1 Hz), 2.89–2.83 (2H, m), 2.46 (3H, s), 2.04 (2H, br s), 1.79–1.64 (3H, m), 1.62–1.55 (1H, m); ¹³C NMR (150.9 MHz, CDCl₃) δ 144.8, 136.6, 129.8, 127.9, 67.7, 61.8, 60.1, 46.8, 25.9, 25.8, 21.6. MALDI TOF-MS m/z C₁₃H₂₀NO₃S [M+H]⁺ の計算値 270.12, 測定値 270.05。

40

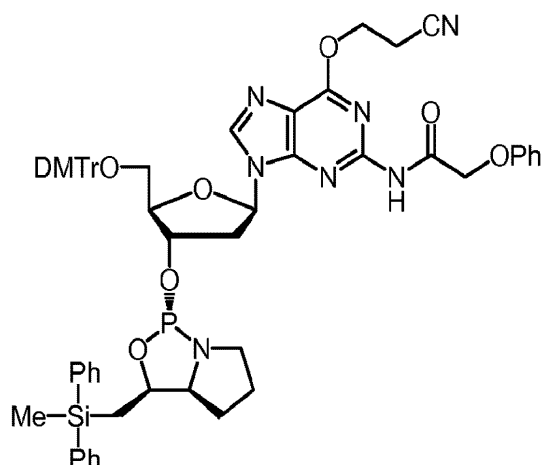
【0 7 4 9】

実施例 Z-10

【0 7 5 0】

オキサザホスホリジンモノマー 1 2 a

【化 2 4 3】



12a

10

【0 7 5 1】

脱水トルエンで共沸を繰り返し行うことによって3a (560mg、1.80mmol)を脱水し、アルゴン下、脱水ジエチルエーテル(0.90mL)中に溶解させた。N-メチルモルホリン(400マイクロL、3.60mmol)を溶液に加え、得られた溶液を脱水ジエチルエーテル(0.90mL)中PCl₃(160マイクロL、1.80mmol)の溶液に、アルゴン下、0℃で攪拌しながら滴下して加えた。次いで、混合物を室温に温め、30分間攪拌した。得られたN-メチルモルホリンヒドロクロリドを窒素下ろ別除去し、ろ液を減圧濃縮乾固すると、粗2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジン誘導体が得られた。その粗材料を、新たに蒸留したTHF(3.6mL)に溶解させて0.5M溶液を作製し、これを用いて、さらに精製することなくヌクレオシド3'-O-オキサザホスホリジンを合成した。

20

【0 7 5 2】

5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル)グアノシン(636mg、0.84mmol)を、脱水トルエンで共沸を繰り返し行うことによって脱水し、アルゴン下、新たに蒸留したTHF(2.5mL)に溶解させた。Et₃N(0.58mL、4.2mmol)を加え、混合物を-78℃に冷却した。新たに蒸留したTHF(3.6mL、1.80mmol)中当該粗2-クロロ-1,3,2-オキサザホスホリジン誘導体の0.5M溶液をシリンジで滴下して加え、混合物を室温で15分間攪拌した。次いで、飽和NaHCO₃水溶液(70mL)及びCHCl₃(70mL)を加え、有機層を分離し、飽和NaHCO₃水溶液(2×70mL)で洗浄した。水層を合わせて、CHCl₃(70mL)で逆抽出した。有機層を合わせて、Na₂SO₄上で乾燥し、ろ過し、減圧濃縮した。残渣をクロマトグラフィーによってシリカゲルで精製すると、12a(829mg、90%)が白い泡状物として得られた。

30

40

¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 8.77(1H, brs), 7.99(1H, s), 7.54-6.98(24H, m), 6.81-6.73(4H, m), 6.35(1H, dd, J=8.0, 6.3Hz), 4.89-4.73(4H, m), 4.68(2H, brs), 4.05-3.98(1H, m), 3.75(6H, s), 3.62-3.46(1H, m), 3.41-3.20(3H, m), 3.18-3.04(1H, m), 3.08(2H, t, J=6.6Hz), 2.58-2.36(2H, m), 1.94-1.59(2H, m), 1.56(1H, dd, J=15.0, 8.7Hz), 1.43(1H, dd, J=15.0, 5.7Hz), 1.33-1.16(2H, m), 0.62(3H, s); ³¹P NMR(121.5MHz, CDCl₃) δ 153.5(1P, s)。

50

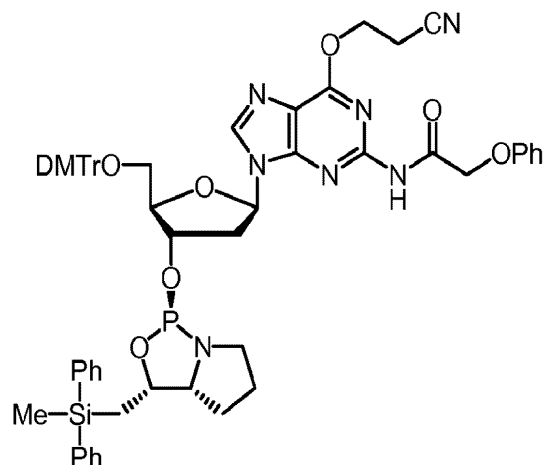
【 0 7 5 3 】

実施例 Z-11

【 0 7 5 4 】

オキサザホスホリジンモノマー 12b

【化 2 4 4】



12b

10

【 0 7 5 5 】

化合物 12b を、化合物 12a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

20

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.80 (1H, br s), 7.96 (1H, s), 7.54–6.96 (24H, m), 6.79–6.71 (4H, m), 6.19 (1H, t, $J=6.6$ Hz), 4.90–4.73 (4H, m), 4.66 (2H, br s), 4.16–4.08 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.60–3.36 (2H, m), 3.29 (1H, d, $J=3.9$ Hz), 3.27–3.12 (2H, m), 3.09 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 2.59–2.46 (1H, m), 2.07–1.97 (1H, m), 1.94–1.41 (5H, m), 1.36–1.18 (1H, m), 0.65 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 157.1 (1P, s)。

30

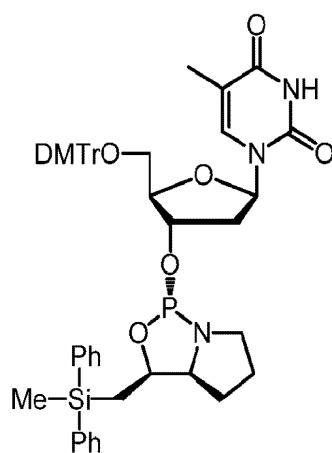
【 0 7 5 6 】

実施例 Z-12

【 0 7 5 7 】

オキサザホスホリジンモノマー 13a

【化 2 4 5】



13a

40

50

【0758】

化合物13aを、化合物12aと同様にして、ただし5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル)グアノシンの代わりに5'-O-(DMTr)チミジンを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.58–7.23 (2H, m), 6.86–6.79 (4H, m), 6.35 (1H, dd, $J=8.1, 5.7$ Hz), 4.79–4.67 (2H, m), 3.83–3.78 (1H, m), 3.78 (6H, s), 3.59–3.43 (1H, m), 3.34 (1H, dd, $J=10.5, 2.4$ Hz), 3.35–3.24 (1H, m), 3.20 (1H, dd, $J=10.5, 2.4$ Hz), 3.16–3.02 (1H, m), 2.36–2.26 (1H, m), 2.15–2.02 (1H, m), 1.92–1.77 (1H, m), 1.74–1.59 (1H, m), 1.52 (1H, dd, $J=14.7, 9.0$ Hz), 1.40 (3H, s), 1.45–1.15 (3H, m), 0.60 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 153.7 (1P, s)。

10

【0759】

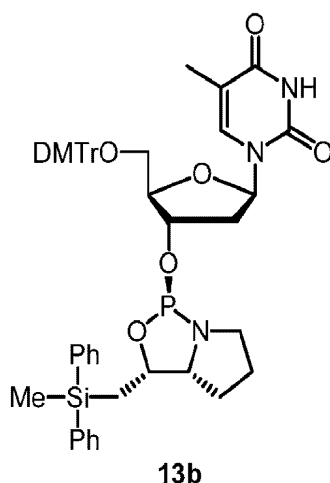
実施例Z-13

【0760】

オキサザホスホリジンモノマー13b

【化246】

20



30

【0761】

化合物13bを、化合物13aと同様にして、ただし3aの代わりに3bを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.46 (1H, br s), 7.59–7.20 (20H, m), 6.86–6.79 (4H, m), 6.26 (1H, t, $J=6.8$ Hz), 4.78–4.65 (2H, m), 4.01–3.95 (1H, m), 3.78 (6H, s), 3.55–3.40 (1H, m), 3.42 (1H, dd, $J=10.5, 2.7$ Hz), 3.40–3.28 (1H, m), 3.22 (1H, dd, $J=10.5, 3.0$ Hz), 3.19–3.06 (1H, m), 2.16–1.95 (2H, m), 1.90–1.54 (3H, m), 1.49–1.35 (1H, m), 1.43 (3H, s), 1.34–1.17 (2H, m), 0.67 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 156.2 (1P, s)。

40

上記化合物13bを用い、上に開示される一般的方法によってオリゴを合成した。

【0762】

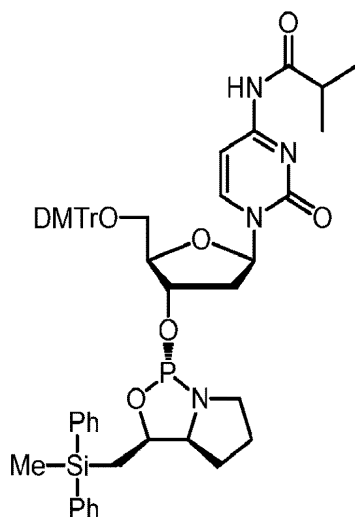
実施例Z-14

【0763】

オキサザホスホリジンモノマー14a

50

【化 2 4 7】

**14a**

【0 7 6 4】

化合物 1 4 a を、化合物 1 2 a と同様にして、5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル)グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-4-N-(イソブチリル)シチジンを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.33 (1H, brs), 8.17 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 7.52-7.22 (19H, m), 7.07 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 6.88-6.81 (4H, m), 6.20 (1H, t, $J=6.2$ Hz), 4.81-4.64 (2H, m), 3.93-3.87 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.59-3.43 (1H, m), 3.39-3.29 (3H, m), 3.16-3.02 (1H, m), 2.69-2.52 (2H, m), 2.12-2.00 (1H, m), 1.91-1.50 (3H, m), 1.47-1.32 (2H, m), 1.27-1.16 (7H, m), 0.60 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 154.8 (1P, s)。

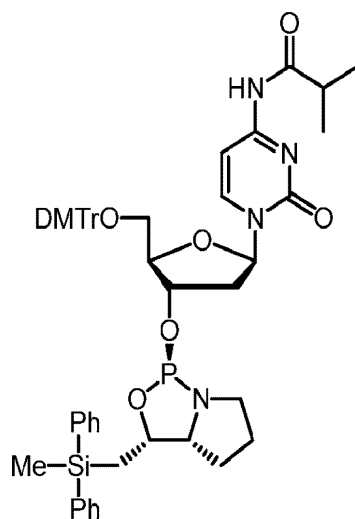
【0 7 6 5】

実施例 Z-16

【0 7 6 6】

オキサザホスホリジンモノマー 1 4 b

【化 2 4 8】

**14b**

【0 7 6 7】

化合物 14b を、化合物 14a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.33 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 8.23 (1H, br s), 7.57–7.22 (19H, m), 7.12 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 6.88–6.81 (4H, m), 6.15 (1H, dd, $J=6.6, 4.2$ Hz), 4.82–4.63 (2H, m), 4.03–3.97 (1H, m), 3.80 (6H, s), 3.55–3.26 (4H, m), 3.19–3.05 (1H, m), 2.59 (1H, quintet, $J=6.9$ Hz), 2.39–2.27 (1H, m), 2.21–2.10 (1H, m), 1.90–1.56 (3H, m), 1.50–1.32 (2H, m), 1.26–1.17 (7H, m), 0.66 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 157.2 (1P, s)。

10

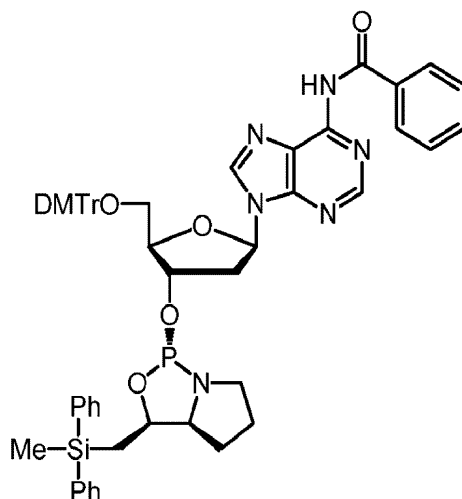
【0768】

実施例 Z-17

【0769】

オキサザホスホリジンモノマー 15a

【化249】



20

15a

30

【0770】

化合物 15a を、化合物 12a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-6-N-(ベンゾイル) アデノシンを用いて得た。

【0771】

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.71 (1H, s), 8.12 (1H, s), 8.04 (2H, d, $J=7.8$ Hz), 7.62–7.15 (23H, m), 6.80–6.75 (4H, m), 6.37 (1H, dd, $J=7.8, 6.0$ Hz), 4.94–4.88 (1H, m), 4.80 (1H, ddd, $J=12.0, 6.0, 5.4$ Hz), 4.07–4.04 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.58–3.49 (1H, m), 3.41–3.34 (1H, m), 3.33 (1H, dd, $J=10.8, 4.8$ Hz), 3.25 (1H, dd, $J=10.8, 4.8$ Hz), 3.13–3.06 (1H, m), 2.66–2.58 (1H, m), 2.40–2.35 (1H, m), 1.91–1.84 (1H, m), 1.73–1.66 (1H, m), 1.56 (1H, dd, $J=15.0, 9.0$ Hz), 1.44 (1H, dd, $J=15.0, 5.4$ Hz), 1.47–1.41 (1H, m), 1.30–1.23 (1H, m), 0.63 (3H, s); ^{31}P NMR (243.0 MHz, CDCl_3) δ 151.8 (1P, s)。

40

【0772】

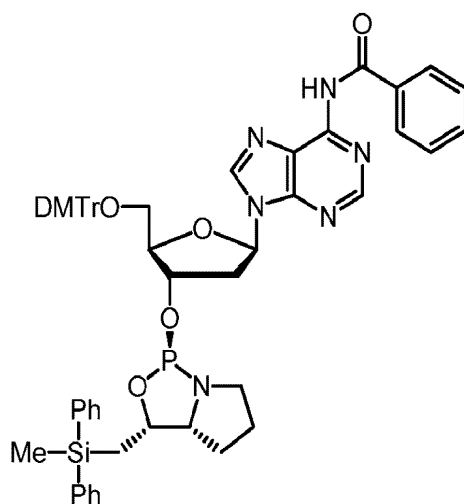
実施例 Z-18

50

【0773】

オキサザホスホリジンモノマー15b

【化250】



15b

【0774】

化合物15bを、化合物15aと同様にして、ただし3aの代わりに3bを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.06 (1H, br s), 8.76 (1H, s), 8.12 (1H, s), 8.07–7.99 (2H, m), 7.64–7.14 (22H, m), 6.83–6.75 (4H, m), 6.25 (1H, t, $J=6.6$ Hz), 4.86–4.75 (2H, m), 4.20–4.15 (1H, m), 3.77 (6H, s), 3.61–3.38 (2H, m), 3.36 (1H, dd, $J=10.2$, 4.2 Hz), 3.27 (1H, dd, $J=10.2$, 4.2 Hz), 3.27–3.13 (1H, m), 2.71–2.59 (1H, m), 2.12–2.01 (1H, m), 1.94–1.42 (5H, m), 1.36–1.20 (1H, m), 0.67 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 157.3 (1P, s)。

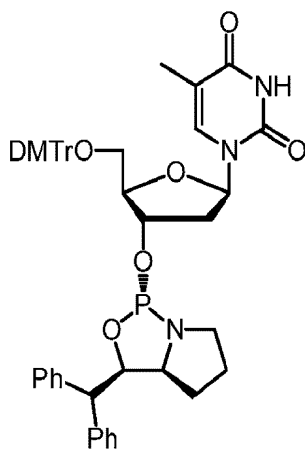
【0775】

実施例Z-19

【0776】

オキサザホスホリジンモノマー16a

【化251】



16a

【0777】

化合物16aを、化合物13aと同様にして、ただし3aの代わりに7aを用いて得た。

10

20

30

40

50

。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (1H, d, $J=0.9$ Hz), 7.37–6.94 (20H, m), 6.87–6.78 (4H, m), 6.48 (1H, dd, $J=8.6, 5.7$ Hz), 5.42 (1H, dd, $J=11.0, 5.1$ Hz), 4.81–4.71 (1H, m), 4.02 (1H, d, $J=11.0$ Hz), 3.83 (1H, d, $J=2.1$ Hz), 3.79 (6H, s), 3.61–3.41 (2H, m), 3.24–3.09 (1H, m), 3.16 (1H, dd, $J=10.8, 2.4$ Hz), 3.02 (1H, dd, $J=10.8, 2.4$ Hz), 2.54–2.44 (1H, m), 2.34–2.22 (1H, m), 1.94–1.79 (1H, m), 1.74–1.56 (1H, m), 1.38 (3H, s), 1.38–1.28 (2H, m) ; ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 160.9 (1P, s)。

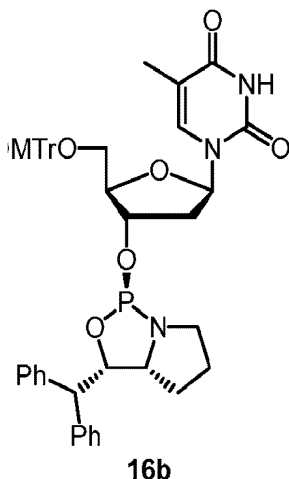
【0778】

実施例 Z-20

【0779】

オキサザホスホリジンモノマー 16b

【化252】



【0780】

化合物 16b を、化合物 16a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (1H, d, $J=1.5$ Hz), 7.43–7.11 (20H, m), 6.85–6.78 (4H, m), 6.48 (1H, dd, $J=7.5, 5.7$ Hz), 5.58 (1H, dd, $J=11.4, 5.1$ Hz), 4.82–4.73 (1H, m), 4.17–4.02 (2H, m), 3.78 (6H, s), 3.56–3.40 (3H, m), 3.32 (1H, dd, $J=10.7, 2.4$ Hz), 3.22–3.07 (1H, m), 2.26–2.04 (2H, m), 1.95–1.81 (1H, m), 1.74–1.56 (1H, m), 1.40 (3H, d, $J=1.5$ Hz), 1.44–1.34 (2H, m) ; ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 162.2 (1P, s)。

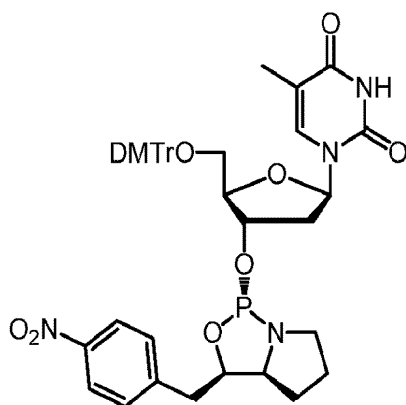
【0781】

実施例 Z-21

【0782】

オキサザホスホリジンモノマー 17a

【化 2 5 3】



17a

【0 7 8 3】

化合物 1 7 a を、化合物 1 3 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 9 a を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.22 (1H, br s), 8.05–7.99 (2H, m), 7.52 (1H, d, $J=1.2$ Hz), 7.41–7.19 (1H, m), 6.87–6.79 (4H, m), 6.37 (1H, dd, $J=8.4, 5.7$ Hz), 4.88–4.75 (2H, m), 3.86–3.80 (1H, m), 3.79 (6H, d, $J=1.2$ Hz), 3.64–3.49 (2H, m), 3.27–3.12 (3H, m), 2.97 (2H, d, $J=6.6$ Hz), 2.51–2.41 (1H, m), 2.33–2.20 (1H, m), 2.03–1.75 (2H, m), 1.72–1.59 (1H, m), 1.46–1.36 (1H, m), 1.40 (3H, s); ^3P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 157.5 (1P, s)。

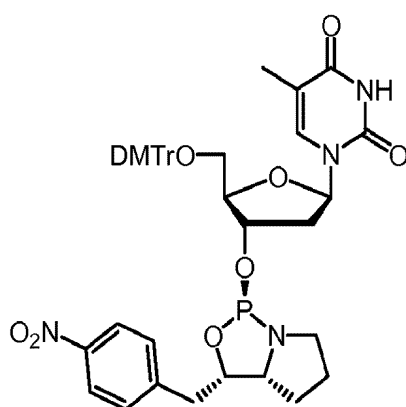
【0 7 8 4】

実施例 Z-2 2

【0 7 8 5】

オキサザホスホリジンモノマー 1 7 b

【化 2 5 4】



17b

【0 7 8 6】

化合物 1 7 b を、化合物 1 7 a と同様にして、ただし 9 a の代わりに 9 b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.67 (1H, br s), 8.18–8.11 (2H, m), 7.57 (1H, d, $J=1.2$ Hz), 7.47–7.22 (1

1 H, m), 6.86–6.79 (4 H, m), 6.29 (1 H, t, $J = 6.6$ Hz), 4.87 (1 H, dt, $J = 7.5, 5.7$ Hz), 4.80–4.72 (1 H, m), 4.11–4.05 (1 H, m), 3.79 (6 H, s), 3.67–3.47 (2 H, m), 3.43 (1 H, dd, $J = 10.8, 2.7$ Hz), 3.27 (1 H, dd, $J = 10.8, 2.4$ Hz), 3.25–3.13 (1 H, m), 3.07–2.99 (2 H, m), 2.19–2.12 (2 H, m), 2.03–1.62 (3 H, m), 1.46–1.30 (1 H, m), 1.41 (3 H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 158.1 (1 P, s)。

【0787】

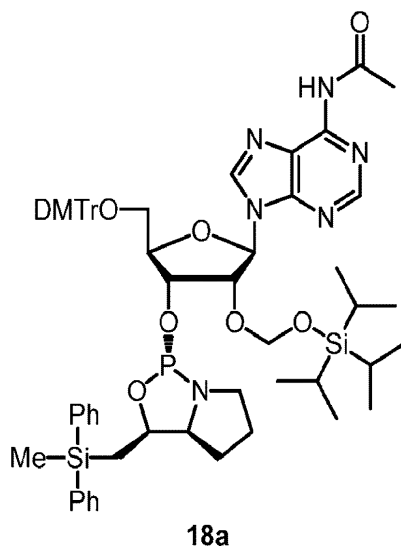
実施例 Z-23

10

【0788】

オキサザホスホリジンモノマー 18a

【化255】



20

【0789】

化合物 18a を、化合物 12a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O-TOM-6-N-(アセチル) アデノシンを用いて得た。

30

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.82 (1 H, br s), 8.49 (1 H, s), 8.10 (1 H, s), 7.58–7.17 (19 H, m), 6.83–6.73 (4 H, m), 6.11 (1 H, d, $J = 6.6$ Hz), 5.15 (1 H, dd, $J = 6.6, 5.4$ Hz), 4.98–4.77 (4 H, m), 4.18–4.11 (1 H, m), 3.76 (6 H, s), 3.59–3.25 (4 H, m), 3.16–3.02 (1 H, m), 2.62 (3 H, s), 1.91–1.53 (3 H, m), 1.49–1.18 (3 H, m), 0.96–0.80 (3 H, m), 0.90 (18 H, s), 0.62 (3 H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 156.7 (1 P, s)。

40

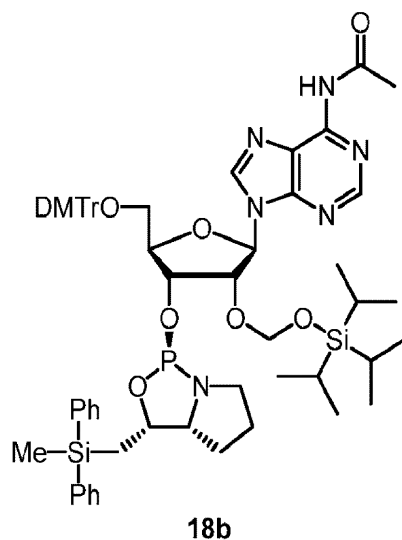
【0790】

実施例 Z-24

【0791】

オキサザホスホリジンモノマー 18b

【化 2 5 6】



10

【0 7 9 2】

化合物 1 8 b を、化合物 1 8 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 3 b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (1H, br s), 8.55 (1H, s), 8.13 (1H, s), 7.57–7.17 (19H, m), 6.82–6.73 (4H, m), 6.16 (1H, d, $J = 5.7$ Hz), 5.06 (1H, t, $J = 5.6$ Hz), 4.93 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 4.83 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 4.81–4.69 (2H, m), 4.27–4.19 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.55–3.40 (2H, m), 3.33–3.16 (2H, m), 3.12–2.97 (1H, m), 2.63 (3H, s), 1.88–1.52 (3H, m), 1.45–1.16 (3H, m), 0.91–0.79 (3H, m), 0.86 (18H, s), 0.64 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 154.8 (1P, s)。

20

【0 7 9 3】

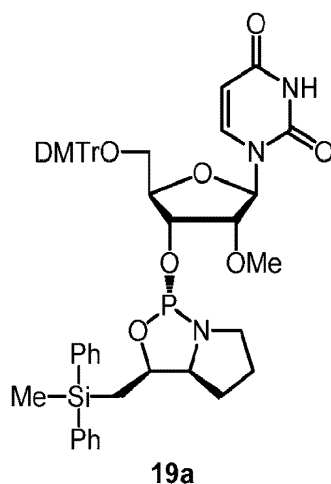
実施例 Z-25

30

【0 7 9 4】

オキサザホスホリジンモノマー 1 9 a

【化 2 5 7】



40

【0 7 9 5】

化合物 1 9 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル)グアノシンの代わりに 5'-O-

50

(DMTr)-2'-O-(メチル)ウリジンを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.58–7.20 (19H, m), 6.88–6.80 (4H, m), 5.96 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 5.19 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.88–4.78 (1H, m), 4.66–4.57 (1H, m), 4.03–3.95 (1H, m), 3.90–3.74 (1H, m), 3.78 (6H, s), 3.77–3.71 (1H, m), 3.58–3.29 (2H, m), 3.45 (3H, s), 3.13–2.82 (2H, m), 1.88–1.53 (3H, m), 1.49–1.16 (3H, m), 0.60 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 155.3 (1P, s).

10

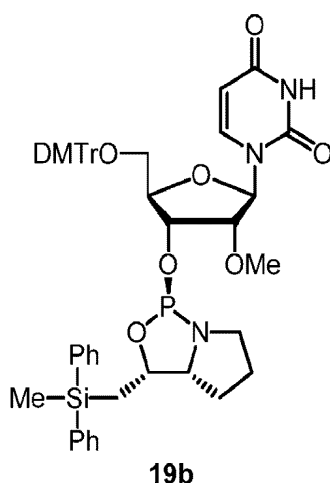
【0796】

実施例 Z-26

【0797】

オキサザホスホリジンモノマー 19b

【化258】



20

【0798】

化合物 19b を、化合物 19a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

30

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.10 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.58–7.20 (19H, m), 6.87–6.79 (4H, m), 5.89 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 5.21 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 4.92–4.82 (1H, m), 4.73–4.63 (1H, m), 4.15–4.08 (1H, m), 3.89–3.73 (1H, m), 3.78 (6H, s), 3.66–3.62 (1H, m), 3.57–3.27 (2H, m), 3.30 (3H, s), 3.17–2.82 (2H, m), 1.89–1.55 (3H, m), 1.55–1.40 (1H, m), 1.35–1.15 (2H, m), 0.66 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 157.5 (1P, s)。

40

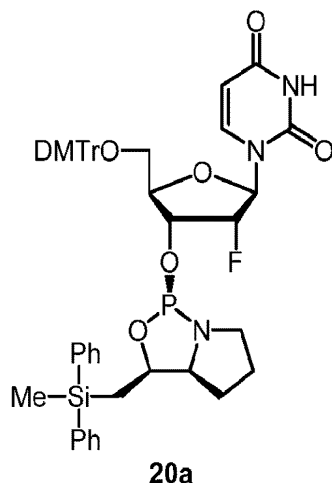
【0799】

実施例 Z-27

【0800】

オキサザホスホリジンモノマー 20a

【化 2 5 9】



10

【0801】

化合物 20a を、化合物 12a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル)グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.85 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.58–7.20 (19H, m), 6.87–6.79 (4H, m), 5.98 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 5.23 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 4.86–4.61 (3H, m), 3.99 (1H, d, $J = 6.9$ Hz), 3.76 (6H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.56–3.34 (4H, m), 3.10–2.96 (1H, m), 1.88–1.74 (1H, m), 1.72–1.52 (2H, m), 1.48–1.16 (3H, m), 0.61 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 154.3 (1P, d, $J = 8.9$ Hz)。

20

【0802】

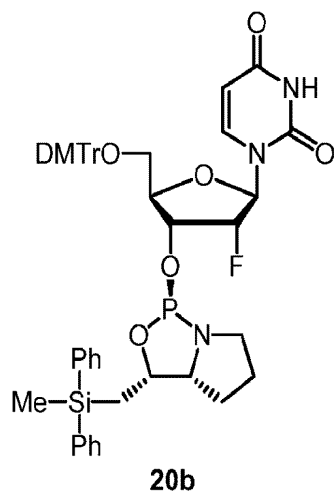
実施例 Z-28

【0803】

オキサザホスホリジンモノマー 20b

30

【化 2 6 0】



40

【0804】

化合物 20b を、化合物 20a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.01 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.58–7.20 (19H, m), 6.87–6.79 (4H, m), 6.03 (1H

50

, d, $J = 16.2 \text{ Hz}$), 5.29 (1H, d, $J = 8.4 \text{ Hz}$), 4.96 (1H, dd, $J = 13.1, 7.5 \text{ Hz}$), $4.80 - 4.54$ (2H, m), 4.15 (1H, d, $J = 9.0 \text{ Hz}$), 3.78 (6H, s), $3.61 - 3.39$ (3H, m), $3.37 - 3.25$ (1H, m), $3.23 - 3.09$ (1H, m), $1.91 - 1.56$ (3H, m), $1.51 - 1.13$ (3H, m), 0.66 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz , CDCl_3) $\delta 158.9$ (1P, d, $J = 4.4 \text{ Hz}$)。

【0805】

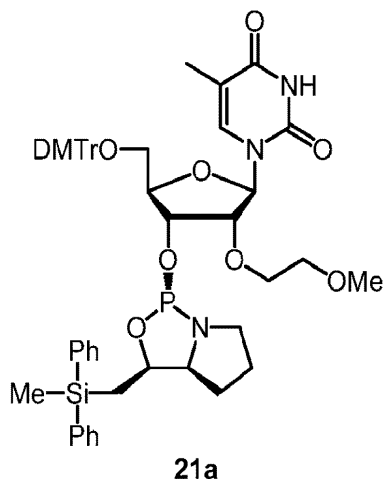
実施例 Z-29

【0806】

オキサザホスホリジンモノマー 21a

10

【化261】



20

【0807】

化合物 21a を、化合物 12a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジンを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz , CDCl_3) $\delta 7.62 - 7.18$ (2H, m), 6.84 (4H, d, $J = 8.7 \text{ Hz}$), 6.07 (1H, d, $J = 5.7 \text{ Hz}$), $4.86 - 4.76$ (1H, m), $4.63 - 4.54$ (1H, m), 4.20 (1H, t, $J = 5.4 \text{ Hz}$), $3.95 - 3.89$ (1H, m), 3.78 (6H, s), $3.78 - 3.71$ (2H, m), $3.60 - 3.48$ (2H, m), $3.44 - 3.02$ (5H, m), 3.31 (3H, s), $1.88 - 1.15$ (6H, m), 1.35 (3H, s), 0.58 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz , CDCl_3) $\delta 156.3$ (1P, s)。

30

【0808】

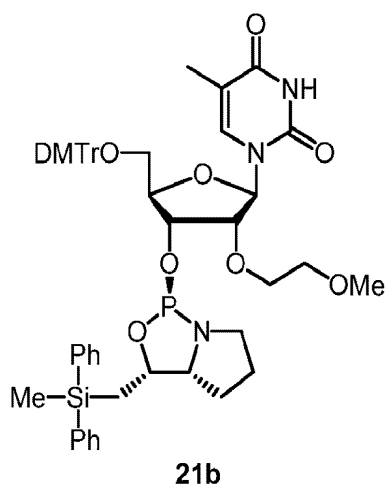
実施例 Z-30

【0809】

オキサザホスホリジンモノマー 21b

40

【化 2 6 2】



10

【0 8 1 0】

化合物 2 1 b を、化合物 2 1 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 3 b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.71 (1H, d, $J = 1.2$ Hz), 7.55–7.22 (20H, m), 6.86–6.78 (4H, m), 5.99 (1H, d, $J = 3.9$ Hz), 4.78–4.62 (2H, m), 4.13–4.08 (1H, m), 4.07–4.02 (1H, m), 3.77 (6H, s), 3.77–3.70 (1H, m), 3.65–3.56 (1H, m), 3.52–3.36 (4H, m), 3.33–3.14 (2H, m), 3.29 (3H, s), 3.08–2.94 (1H, m), 1.86–1.72 (1H, m), 1.71–1.55 (2H, m), 1.30 (3H, d, $J = 1.2$ Hz), 1.47–1.16 (3H, m), 0.64 (3H, s); ^3P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 155.6 (1P, s)。

20

【0 8 1 1】

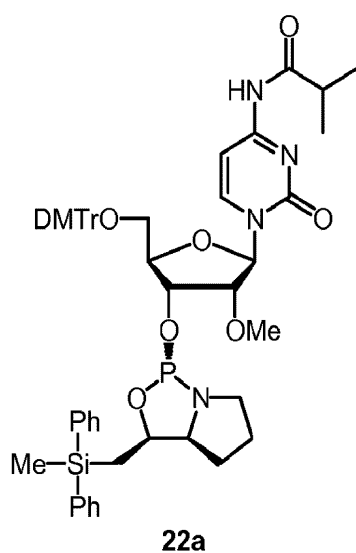
実施例 Z-3 1

【0 8 1 2】

オキサザホスホリジンモノマー 2 2 a

30

【化 2 6 3】



40

【0 8 1 3】

化合物 2 2 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル)グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O-メチル-4-N-(イソブチリル)シチジンを用いて得た。

50

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.49 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 7.58–7.20 (19H, m), 6.96 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 6.90–6.82 (4H, m), 5.98 (1H, s), 4.84 (1H, dd, $J=13.1$, 7.5 Hz), 4.59 (1H, dt, $J=8.3$, 4.5 Hz), 4.19–4.13 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.78–3.72 (1H, m), 3.63–3.40 (3H, m), 3.55 (3H, s), 3.36–3.24 (1H, m), 3.09–2.95 (1H, m), 2.59 (1H, 七重線, $J=6.9$ Hz), 1.85–1.53 (5H, m), 1.48–1.37 (1H, m), 1.24–1.17 (6H, m), 0.59 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 155.2 (1P, s)。

10

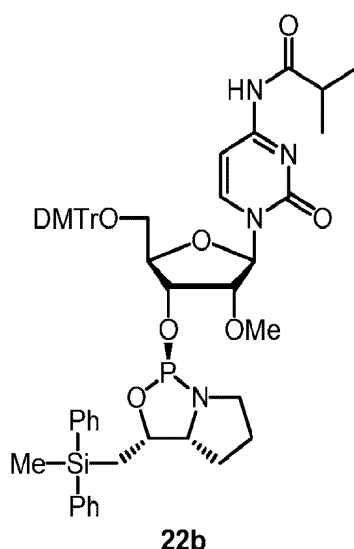
【0814】

実施例 Z-32

【0815】

オキサザホスホリジンモノマー 22b

【化264】



22b

20

30

【0816】

化合物 22b を、化合物 22a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.62 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 7.57–7.23 (19H, m), 7.02 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 6.89–6.81 (4H, m), 5.92 (1H, s), 4.90 (1H, dt, $J=9.0$, 5.7 Hz), 4.61 (1H, dt, $J=8.7$, 4.8 Hz), 4.25–4.17 (1H, m), 3.81 (6H, s), 3.67 (1H, d, $J=4.5$ Hz), 3.62–3.25 (4H, m), 3.38 (3H, s), 3.16–3.02 (1H, m), 2.58 (1H, septet, $J=6.9$ Hz), 1.87–1.40 (6H, m), 1.26–1.14 (6H, m), 0.64 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 158.2 (1P, s)。

40

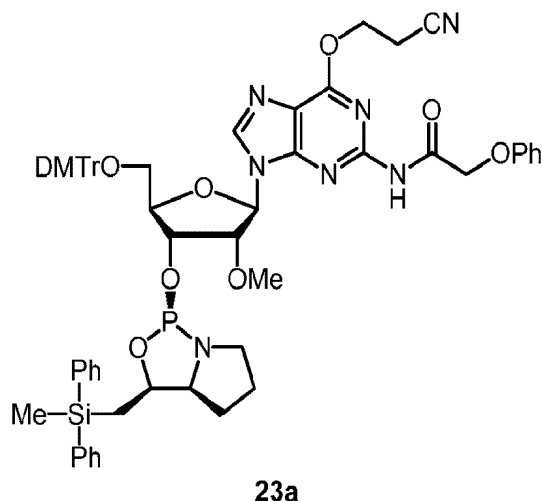
【0817】

実施例 Z-33

【0818】

オキサザホスホリジンモノマー 23a

【化 2 6 5】



10

【0 8 1 9】

化合物 2 3 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O-メチル-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンを用いて得た。

20

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.67 (1H, brs), 8.01 (1H, s), 7.56–7.16 (24H, m), 6.83–6.74 (4H, m), 6.08 (1H, d, $J=6.9$ Hz), 4.85–4.76 (1H, m), 4.84 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 4.65–4.56 (1H, m), 4.59 (2H, brs), 4.48 (1H, dd, $J=6.6, 5.1$ Hz), 4.09–4.05 (1H, m), 3.75 (6H, s), 3.60–3.42 (2H, m), 3.40–3.26 (2H, m), 3.35 (3H, s), 3.18–3.05 (1H, m), 3.08 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 1.89–1.49 (3H, m), 1.48–1.16 (3H, m), 0.59 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 156.9 (1P, s)。

30

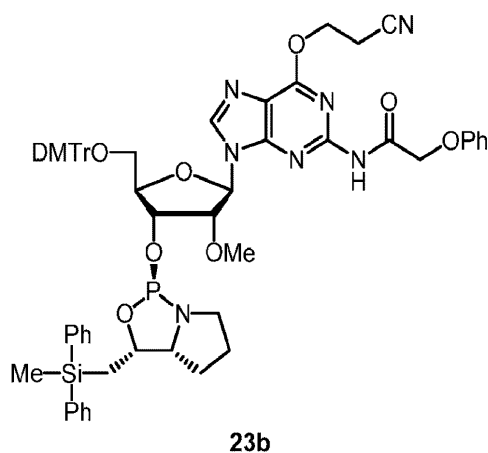
【0 8 2 0】

実施例 Z-34

【0 8 2 1】

オキサザホスホリジンモノマー 2 3 b

【化 2 6 6】



40

【0 8 2 2】

50

化合物 23b を、化合物 23a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.74 (1H, brs), 8.09 (1H, s), 7.56–6.94 (24H, m), 6.84–6.71 (4H, m), 6.09 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 4.83–4.70 (2H, m), 4.83 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 4.63 (2H, brs), 4.35 (1H, t, $J=5.0$ Hz), 4.23–4.16 (1H, m), 3.75 (6H, s), 3.58–3.19 (4H, m), 3.32 (3H, s), 3.16–3.04 (1H, m), 3.07 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 1.90–1.55 (3H, m), 1.48–1.15 (3H, m), 0.64 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 154.6 (1P, s)。

10

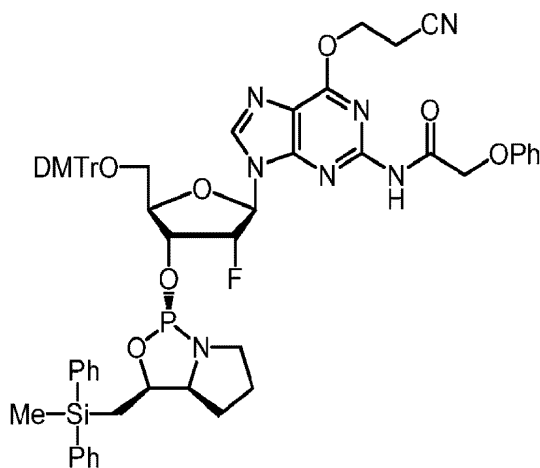
【0823】

実施例 Z-35

【0824】

オキサザホスホリジンモノマー 24a

【化267】



24a

20

30

【0825】

化合物 24a を、化合物 12a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-デオキシ-2'-フルオロ-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンを用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.74 (1H, brs), 8.03 (1H, s), 7.55–6.94 (24H, m), 6.80–6.69 (4H, m), 6.21 (1H, dd, $J=14.9, 3.6$ Hz), 5.34 (1H, dt, $J=52.3, 3.6$ Hz), 5.01–4.75 (2H, m), 4.84 (1H, t, $J=6.6$ Hz), 4.62 (2H, brs), 4.15–4.07 (1H, m), 3.73 (6H, s), 3.59–3.29 (4H, m), 3.15–3.00 (1H, m), 3.07 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 1.90–1.49 (3H, m), 1.47–1.12 (3H, m), 0.58 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 155.6 (1P, d, $J=10.9$ Hz)。

40

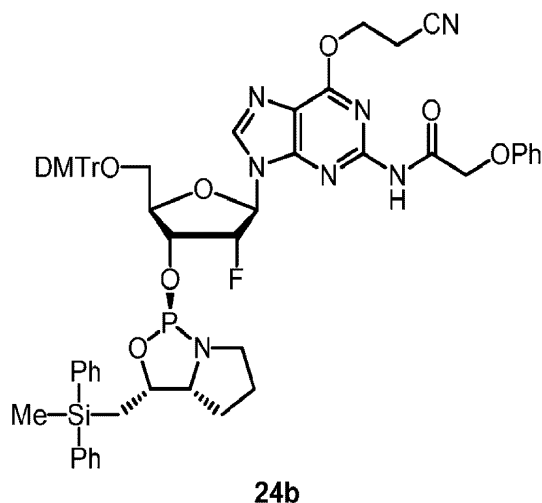
【0826】

実施例 Z-36

【0827】

オキサザホスホリジンモノマー 24b

【化 2 6 8】



10

【0 8 2 8】

化合物 2 4 b を、化合物 2 4 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 3 b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.81 (1H, brs), 8.06 (1H, s), 7.55–6.95 (24H, m), 6.77–6.69 (4H, m), 6.06 (1H, d, $J=17.1$ Hz), 5.24–5.08 (1H, m), 5.04–4.80 (2H, m), 4.87 (1H, t, $J=6.6$ Hz), 4.62 (2H, brs), 4.25–4.19 (1H, m), 3.73 (6H, s), 3.58–3.02 (5H, m), 3.10 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 1.90–1.56 (3H, m), 1.50–1.15 (3H, m), 0.63 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 158.0 (1P, d, $J=4.4$ Hz)。

20

【0 8 2 9】

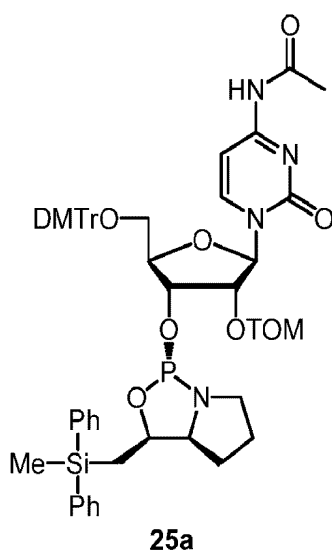
実施例 Z-37

【0 8 3 0】

オキサザホスホリジンモノマー 2 5 a

30

【化 2 6 9】



40

【0 8 3 1】

化合物 2 5 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O-TOM-4-N-(アセチル) シチジンを用いて得た。

50

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.04 (1H, br s), 8.30 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 7.51–7.21 (19H, m), 6.99 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 6.89–6.81 (4H, m), 6.12 (1H, d, $J=3.3$ Hz), 5.07 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 5.05 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 4.84–4.75 (1H, m), 4.62–4.52 (1H, m), 4.31–4.25 (1H, m), 4.08–4.01 (1H, m), 3.78 (6H, d, $J=3.0$ Hz), 3.55–3.23 (4H, m), 3.10–2.96 (1H, m), 2.24 (3H, s), 1.84–1.49 (3H, m), 1.46–0.96 (24H, m), 0.58 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 156.5 (1P, s)。

10

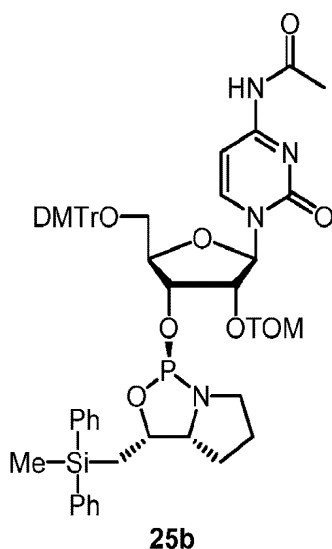
【0832】

実施例 Z-38

【0833】

オキサザホスホリジンモノマー 25b

【化270】



20

30

【0834】

化合物 25b を、化合物 25a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.19 (1H, br s), 8.46 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 7.54–7.23 (19H, m), 7.01 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 6.88–6.79 (4H, m), 6.19 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 5.11 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 5.07 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 4.81–4.71 (1H, m), 4.60–4.51 (1H, m), 4.26–4.18 (2H, m), 3.79 (6H, s), 3.63–3.55 (1H, m), 3.48–3.28 (2H, m), 3.21–2.94 (2H, m), 2.26 (3H, s), 1.81–1.49 (3H, m), 1.43–0.96 (24H, m), 0.62 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 156.4 (1P, s)。

40

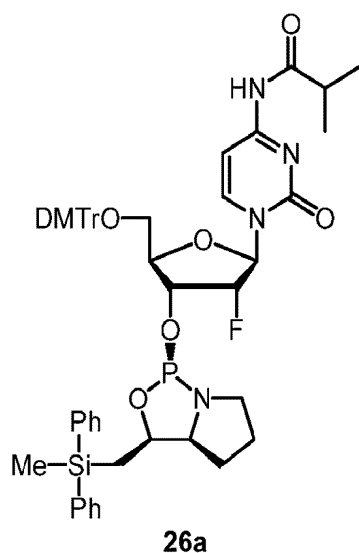
【0835】

実施例 Z-39

【0836】

オキサザホスホリジンモノマー 26a

【化 2 7 1】



10

【0 8 3 7】

化合物 2 6 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5' - O - (DMTr) - 2 - N - (フェノキシアセチル) - 6 - O - (シアノエチル) グアノシンの代わりに 5' - O - (DMTr) - 2' - デオキシ - 2' - フルオロ - 4 - N - (イソブチリル) シチジンを

20

用いて得た。
 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.66 (1H, brs), 8.41 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.55–7.20 (19H, m), 7.01 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 6.89–6.81 (4H, m), 6.06 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 4.85 (1H, dd, $J = 51.4, 3.9$ Hz), 4.84 (1H, dd, $J = 12.9, 7.5$ Hz), 4.77–4.59 (1H, m), 4.15–4.08 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.63–3.29 (4H, m), 3.10–2.96 (1H, m), 2.65 (1H, septet, $J = 6.9$ Hz), 1.85–1.53 (3H, m), 1.48–1.17 (3H, m), 1.21 (3H, d, $J = 4.8$ Hz), 1.19 (3H, d, $J = 4.8$ Hz), 0.59 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 155.5 (1P, d, $J = 6.6$ Hz)。

30

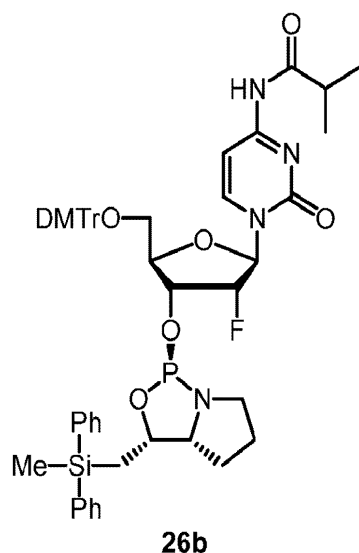
【0 8 3 8】

実施例 Z - 4 0

【0 8 3 9】

オキサザホスホリジンモノマー 2 6 b

【化 2 7 2】



10

【0 8 4 0】

化合物 2 6 b を、化合物 2 6 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 3 b を用いて得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.53 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 7.57–7.23 (20H, m), 7.10 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 6.89–6.81 (4H, m), 6.10 (1H, d, $J=15.9$ Hz), 5.00–4.92 (1H, m), 4.84 (1H, dd, $J=51.5, 3.3$ Hz), 4.75–4.58 (1H, m), 4.24 (1H, d, $J=9.3$ Hz), 3.81 (6H, s), 3.65–3.39 (3H, m), 3.32–3.06 (2H, m), 2.59 (1H, septet, $J=6.9$ Hz), 1.88–1.53 (4H, m), 1.49–1.34 (2H, m), 1.27–1.18 (6H, m), 0.65 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 159.0 (1P, d, $J=4.4$)。

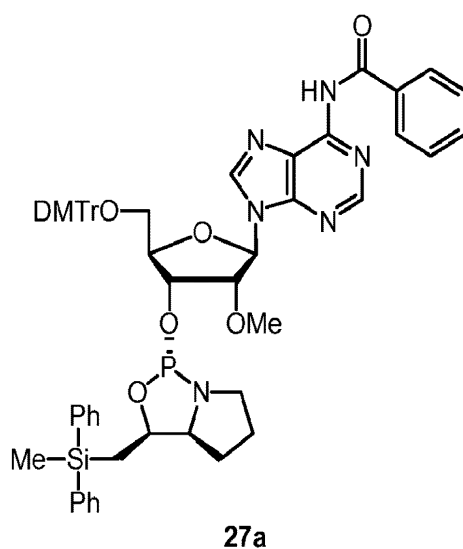
20

【0 8 4 1】

オキサザホスホリジンモノマー 2 7 a

30

【化 2 7 3】



40

【0 8 4 2】

化合物 2 7 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O-メチル-6-N-(ベンゾイル) アデノシンを用いて得た。

50

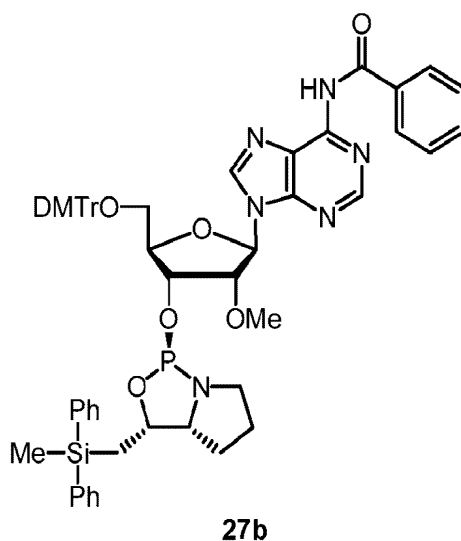
【0843】

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.66 (1H, s), 8.13 (1H, s), 8.03 (2H, d, $J=7.2$ Hz), 7.64–7.16 (23H, m), 6.79 (4H, d, $J=8.7$ Hz), 6.08 (1H, d, $J=6.3$ Hz), 4.91–4.81 (1H, m), 4.77–4.69 (1H, m), 4.64–4.57 (1H, m), 4.15–4.10 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.60–3.23 (4H, m), 3.35 (3H, s), 3.14–3.00 (1H, m), 1.90–1.19 (6H, m), 0.62 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 155.8 (1P, s)。

【0844】

オキサザホスホリジンモノマー 27b

【化274】



【0845】

化合物 27b を、化合物 27a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

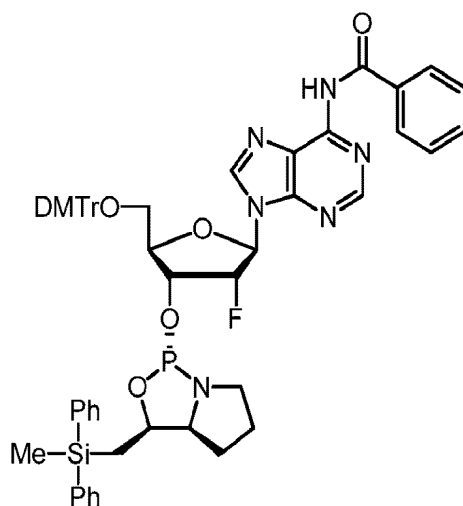
【0846】

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.12 (1H, brs), 8.73 (1H, s), 8.24 (1H, s), 8.07–8.01 (2H, m), 7.62–7.17 (22H, m), 6.83–6.77 (4H, m), 6.12 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 4.84–4.73 (2H, m), 4.43 (1H, t, $J=4.8$ Hz), 4.25–4.19 (1H, m), 3.77 (6H, s), 3.55–3.20 (4H, m), 3.28 (3H, s), 3.16–3.03 (1H, m), 1.90–1.17 (6H, m), 0.65 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 155.0 (1P, s)。

【0847】

オキサザホスホリジンモノマー 28a

【化 2 7 5】

**28a**

10

【0 8 4 8】

化合物 28 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5' - O - (DMTr) - 2 - N - (フェノキシアセチル) - 6 - O - (シアノエチル) グアノシンの代わりに 5' - O - (DMTr) - 2' - デオキシ - 2' - フルオロ - 6 - N - (ベンゾイル) アデノシンを用いて得た。

20

【0 8 4 9】

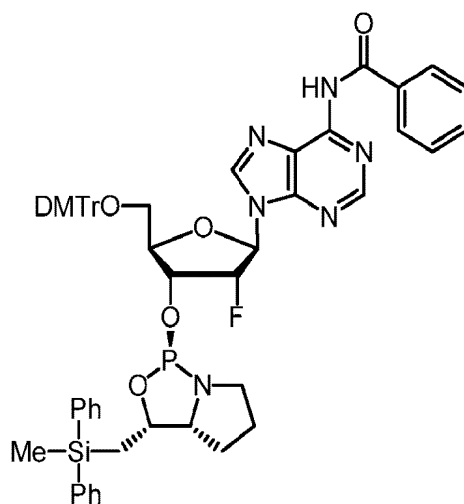
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.64 (1H, s), 8.14 (1H, s), 8.06 - 8.01 (2H, m), 7.63 - 7.07 (23H, m), 6.78 - 6.70 (4H, m), 6.12 (1H, dd, $J = 18.0, 2.4$ Hz), 5.24 - 5.01 (2H, m), 4.94 - 4.84 (1H, m), 4.17 - 4.06 (1H, m), 3.73 (6H, s), 3.55 - 3.40 (3H, m), 3.30 - 3.22 (1H, m), 3.03 - 2.88 (1H, m), 1.92 - 1.19 (6H, m), 0.62 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 150.5 (1P, d, $J = 7.7$ Hz)。

30

【0 8 5 0】

オキサザホスホリジンモノマー 28 b

【化 2 7 6】

**28b**

40

【0 8 5 1】

化合物 28 b を、化合物 28 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 3 b を用いて得た

50

°

【0852】

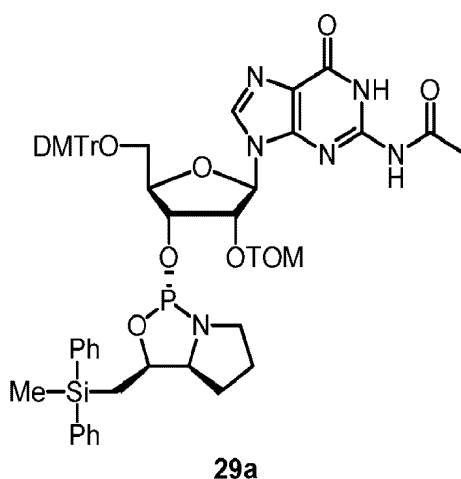
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.07 (1H, br s), 8.80 (1H, s), 8.24 (1H, s), 8.08–8.01 (2H, m), 7.66–7.15 (22H, m), 6.81–6.75 (4H, m), 6.14 (1H, dd, $J=18.0, 1.8$ Hz), 5.16–4.91 (3H, m), 4.28–4.21 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.57–3.11 (5H, m), 1.82–1.16 (6H, m), 0.65 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 157.8 (1P, d, $J=5.6$ Hz)。

【0853】

10

オキサザホスホリジンモノマー29a

【化277】



20

【0854】

化合物29aを、化合物12aと同様にして、ただし5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル)グアノシンの代わりに5'-O-(DMTr)-2'-O-TOM-2-N-(アセチル)グアノシンを用いて得た。

【0855】

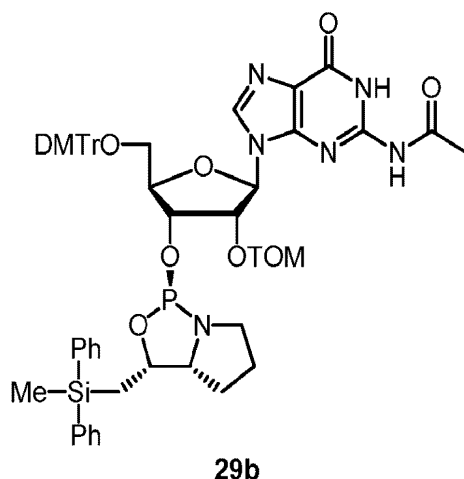
30

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.70 (1H, s), 7.63–7.13 (21H, m), 6.84–6.76 (4H, m), 5.77 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 5.41–5.33 (1H, m), 4.90 (2H, s), 4.78–4.68 (2H, m), 3.86 (1H, br s), 3.75 (3H, s), 3.74 (3H, s), 3.56–3.41 (2H, m), 3.32–2.90 (3H, m), 1.92–1.10 (9H, m), 0.97–0.87 (21H, m), 0.52 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 158.1 (1P, s)。

【0856】

オキサザホスホリジンモノマー29b

【化 2 7 8】



10

【0 8 5 7】

化合物 2 9 b を、化合物 2 9 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 3 b を用いて得た。

【0 8 5 8】

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (1H, s), 7.56–7.15 (21H, m), 6.82–6.75 (4H, m), 5.86 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 5.26–5.17 (1H, m), 4.95 (1H, d, $J=5.4$ Hz), 4.85 (1H, d, $J=5.4$ Hz), 4.78–4.71 (1H, m), 4.59–4.49 (1H, m), 4.10–4.05 (1H, m), 3.74 (6H, s), 3.52–3.37 (2H, m), 3.30–3.18 (1H, m), 3.11–2.85 (2H, m), 1.85–1.15 (9H, m), 0.93–0.84 (21H, m), 0.62 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 152.3 (1P, s)。

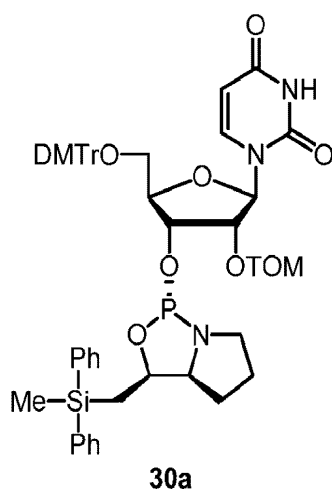
20

【0 8 5 9】

オキサザホスホリジンモノマー 3 0 a

【化 2 7 9】

30



40

【0 8 6 0】

化合物 3 0 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル)グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O-TOM-ウリジンを用いて得た。

【0 8 6 1】

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (1H, d, $J=8.1$ Hz)

50

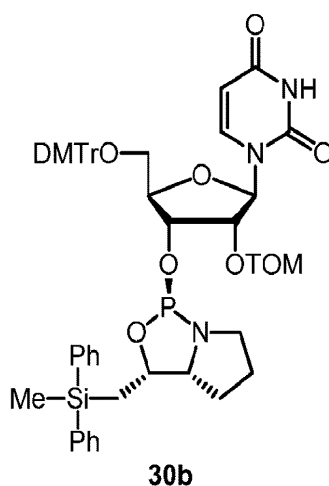
, 7.55–7.18 (20H, m), 6.88–6.80 (4H, m), 6.11 (1H, d, $J=6.0$ Hz), 5.32 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 4.99 (1H, d, $J=5.1$ Hz), 4.93 (1H, d, $J=5.1$ Hz), 4.84–4.75 (1H, m), 4.54–4.46 (1H, m), 4.38 (1H, t, $J=5.7$ Hz), 3.87–3.83 (1H, m), 3.78 (3H, s), 3.77 (3H, s), 3.56–3.42 (1H, m), 3.39–3.28 (1H, m), 3.36 (1H, dd, $J=11.0, 2.7$ Hz), 3.25 (1H, dd, $J=11.0, 2.7$ Hz), 3.16–3.03 (1H, m), 1.88–1.12 (6H, m), 1.08–0.97 (21H, m), 0.59 (3H, s); ^3P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 156.6 (1P, s)。

10

【0862】

オキサザホスホリジンモノマー 30b

【化280】



20

【0863】

化合物 30b を、化合物 30a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

【0864】

30

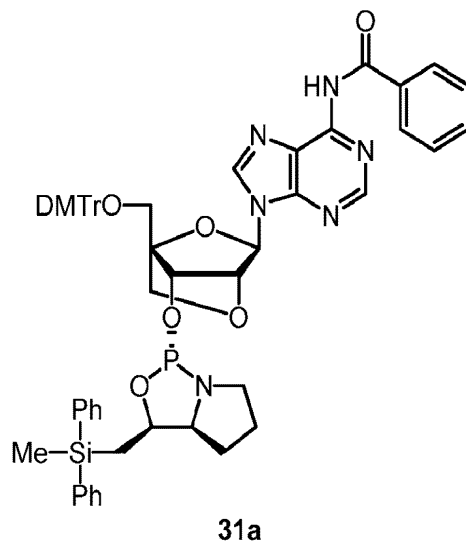
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.87 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 7.52–7.48 (4H, m), 7.38–7.21 (16H, m), 6.83–6.79 (4H, m), 6.14 (1H, d, $J=4.8$ Hz), 5.33 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 4.99 (1H, d, $J=5.4$ Hz), 4.89 (1H, d, $J=5.4$ Hz), 4.67 (1H, dd, $J=13.8, 7.2$ Hz), 4.52 (1H, dt, $J=10.4, 4.8$ Hz), 4.31 (1H, t, $J=4.8$ Hz), 4.06–4.03 (1H, m), 3.78 (3H, s), 3.77 (3H, s), 3.47 (1H, dd, $J=10.4, 2.4$ Hz), 3.47–3.39 (1H, m), 3.22–3.17 (2H, m), 3.00 (1H, ddd, $J=19.5, 10.4, 4.8$ Hz), 1.82–1.74 (1H, m), 1.68–1.58 (1H, m), 1.56 (1H, dd, $J=14.4, 8.4$ Hz), 1.38 (1H, dd, $J=14.4, 7.2$ Hz), 1.31–1.25 (1H, m), 1.26–1.17 (1H, m), 1.08–0.98 (21H, m), 0.63 (3H, s); ^3P NMR (243.0 MHz, CDCl_3) δ 154.3 (1P, s)。

40

【0865】

オキサザホスホリジンモノマー 31a

【化 2 8 1】



10

【0 8 6 6】

化合物 31a を、化合物 12a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O, 4'-C-メチレン-6-N-(ベンゾイル) アデノシンを用いて得た。

20

【0 8 6 7】

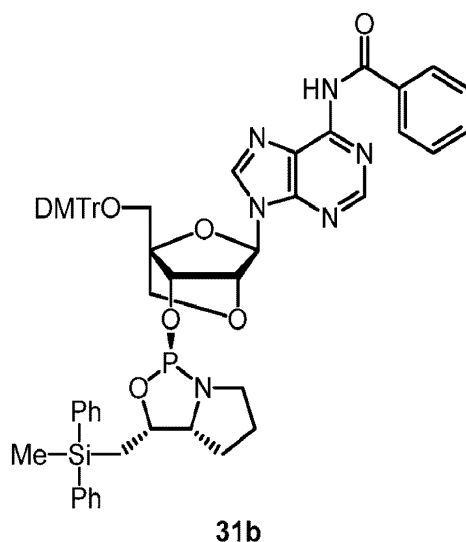
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.10 (1H, br s), 8.76 (1H, s), 8.32 (1H, s), 8.04 (2H, d, $J=7.2$ Hz), 7.64–7.18 (22H, m), 6.84 (4H, d, $J=8.7$ Hz), 6.10 (1H, s), 4.76 (1H, d, $J=6.9$ Hz), 4.58 (1H, s), 4.61–4.51 (1H, m), 3.91 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.77 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.75 (6H, s), 3.50 (1H, s), 3.47–3.33 (1H, m), 3.31–3.19 (1H, m), 3.03–2.88 (1H, m), 1.84–1.09 (6H, m), 0.51 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 152.9 (1P, s)。

30

【0 8 6 8】

オキサザホスホリジンモノマー 31b

【化 2 8 2】



40

【0 8 6 9】

50

化合物 3 1 b を、化合物 3 1 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 3 b を用いて得た。

【0870】

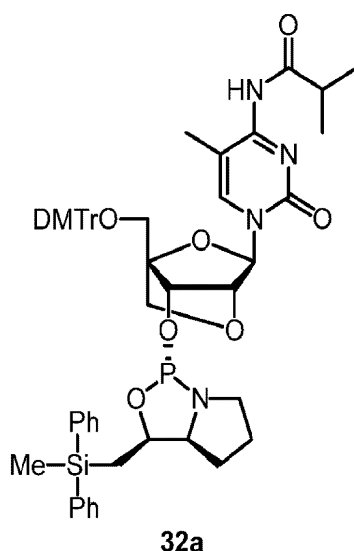
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.81 (1H, s), 8.30 (1H, s), 8.07–8.00 (2H, m), 7.64–7.17 (22H, m), 6.86–6.79 (4H, m), 6.12 (1H, s), 4.81–4.72 (1H, m), 4.62 (1H, d, $J=7.2\text{ Hz}$), 4.57 (1H, s), 3.94 (1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$), 3.89 (1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$), 3.77 (6H, s), 3.48 (2H, s), 3.46–3.32 (1H, m), 3.24–3.13 (1H, m), 3.10–2.97 (1H, m), 1.84–1.49 (3H, m), 1.42–1.09 (3H, m), 0.58 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 157.3 (1P, s)。

10

【0871】

オキサザホスホリジンモノマー 3 2 a

【化283】



32a

20

30

【0872】

化合物 3 2 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O, 4'-C-メチレン-4-N-(イソブチリル)-5-メチルシチジンをを用いて得た。

【0873】

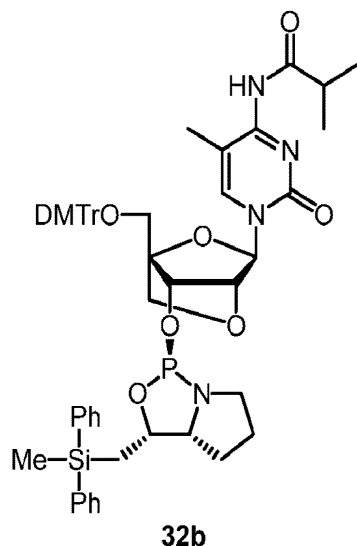
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.88 (1H, br s), 7.58–7.18 (20H, m), 6.88–6.80 (4H, m), 5.65 (1H, s), 4.69–4.60 (1H, m), 4.52 (1H, d, $J=6.6\text{ Hz}$), 4.49 (1H, s), 3.81–3.74 (1H, m), 3.75 (3H, s), 3.73 (3H, s), 3.64 (1H, d, $J=8.1\text{ Hz}$), 3.56 (1H, d, $J=11.1\text{ Hz}$), 3.53 (1H, d, $J=8.1\text{ Hz}$), 3.46 (1H, d, $J=11.1\text{ Hz}$), 3.56–3.40 (1H, m), 3.32–3.20 (1H, m), 3.14–3.00 (1H, m), 1.85–1.12 (6H, m), 1.60 (3H, s), 1.19 (6H, d, $J=6.9\text{ Hz}$), 0.55 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 155.9 (1P, s)。

40

【0874】

オキサザホスホリジンモノマー 3 2 b

【化 2 8 4】



10

【0 8 7 5】

化合物 3 2 b を、化合物 3 2 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 3 b を用いて得た。

【0 8 7 6】

20

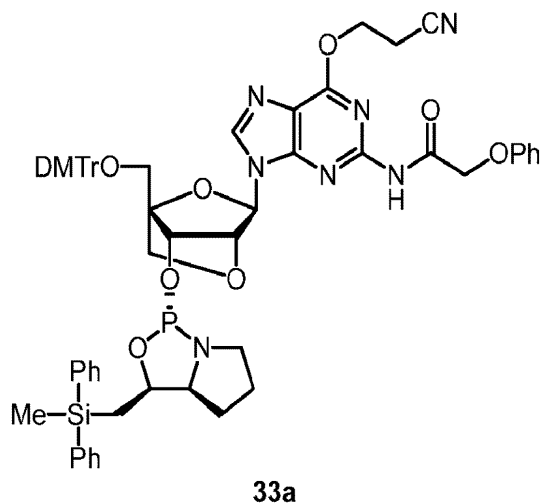
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (1H, brs), 7.56–7.19 (20H, m), 6.88–6.79 (4H, m), 5.69 (1H, s), 4.86–4.76 (1H, m), 4.46 (1H, s), 4.45 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 3.80–3.75 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.74 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 3.69 (1H, d, $J=8.1$ Hz), 3.51 (1H, d, $J=11.1$ Hz), 3.44–3.30 (1H, m), 3.39 (1H, d, $J=11.1$ Hz), 3.29–3.17 (1H, m), 3.11–2.97 (1H, m), 1.86–1.52 (3H, m), 1.64 (3H, s), 1.45–1.10 (3H, m), 1.21 (6H, d, $J=6.6$ Hz), 0.62 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 158.2 (1P, s)。

30

【0 8 7 7】

オキサザホスホリジンモノマー 3 3 a

【化 2 8 5】



40

【0 8 7 8】

化合物 3 3 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル) グアノシンの代わりに 5'-O-

50

(DMTr) - 2' - O, 4' - C - メチレン - 2 - N - (フェノキシアセチル) - 6 - O - (シアノエチル) グアノシンを用いて得た。

【0879】

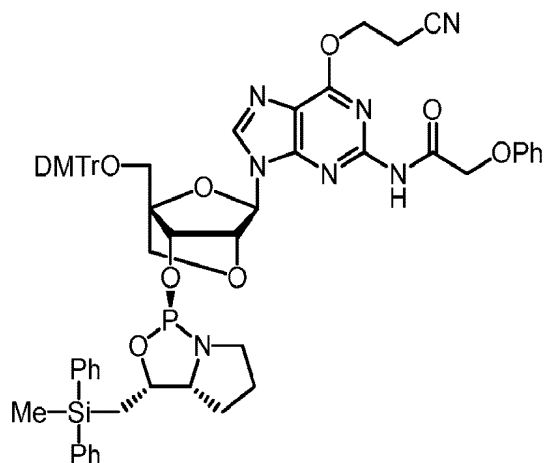
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.71 (1H, br s), 8.16 (1H, s), 7.50–7.17 (21H, m), 7.09–7.01 (3H, m), 6.86–6.79 (4H, m), 6.03 (1H, s), 4.84 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 4.72 (2H, s), 4.68 (1H, d, $J=7.2$ Hz), 4.55–4.46 (1H, m), 4.50 (1H, s), 3.90 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.77 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.75 (6H, s), 3.51 (1H, d, $J=10.8$ Hz), 3.47 (1H, d, $J=10.8$ Hz), 3.45–3.21 (2H, m), 3.08 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 3.03–2.89 (1H, m), 1.80–1.08 (6H, m), 0.47 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 153.2 (1P, s)。

10

【0880】

オキサザホスホリジンモノマー 33b

【化286】



33b

20

30

【0881】

化合物 33b を、化合物 33a と同様にして、ただし 3a の代わりに 3b を用いて得た。

【0882】

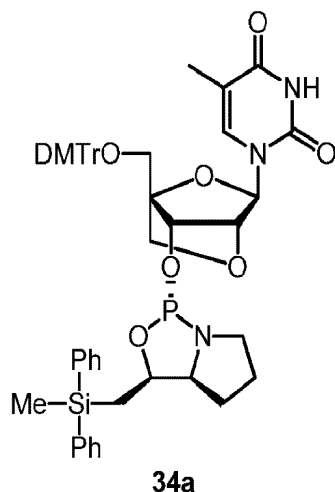
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.86 (1H, br s), 8.13 (1H, s), 7.55–7.17 (21H, m), 7.08–6.98 (3H, m), 6.95–6.78 (4H, m), 6.01 (1H, s), 4.86 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 4.82–4.73 (1H, m), 4.70 (2H, s), 4.64 (1H, d, $J=7.5$ Hz), 4.49 (1H, s), 3.94 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.89 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.77 (6H, s), 3.46 (2H, s), 3.45–3.30 (1H, m), 3.24–3.12 (1H, m), 3.09 (2H, t, $J=6.6$ Hz), 3.09–2.96 (1H, m), 1.81–1.50 (3H, m), 1.41–1.06 (3H, m), 0.58 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 157.4 (1P, s)。

40

【0883】

オキサザホスホリジンモノマー 34a

【化 2 8 7】



10

【0 8 8 4】

化合物 3 4 a を、化合物 1 2 a と同様にして、ただし 5'-O-(DMTr)-2-N-(フェノキシアセチル)-6-O-(シアノエチル)グアノシンの代わりに 5'-O-(DMTr)-2'-O、4'-C-メチレン-5-メチルウリジンを用いて得た。

【0 8 8 5】

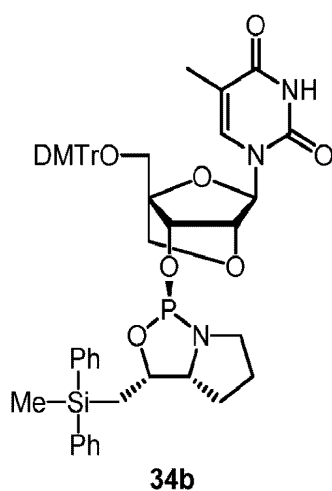
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.71 (1H, d, $J=0.9$ Hz), 7.50–7.17 (20H, m), 6.87–6.80 (4H, m), 5.61 (1H, s), 4.69–4.60 (1H, m), 4.55 (1H, d, $J=6.9$ Hz), 4.41 (1H, s), 3.74 (3H, s), 3.73 (3H, s), 3.64 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.55 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.53 (1H, d, $J=10.8$ Hz), 3.46 (1H, d, $J=10.8$ Hz), 3.56–3.42 (1H, m), 3.35–3.24 (1H, m), 3.13–3.00 (1H, m), 1.85–1.45 (3H, m), 1.55 (3H, d, $J=0.9$ Hz), 1.41–1.12 (3H, m), 0.56 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 155.1 (1P, s)。

30

【0 8 8 6】

オキサザホスホリジンモノマー 3 4 b

【化 2 8 8】



40

【0 8 8 7】

化合物 3 4 b を、化合物 3 4 a と同様にして、ただし 3 a の代わりに 3 b を用いて得た。

50

【0888】

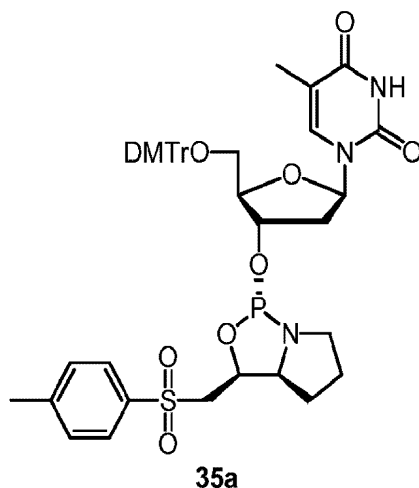
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (1H, s), 7.56–7.19 (20H, m), 6.88–6.79 (4H, m), 5.66 (1H, s), 4.87–4.77 (1H, m), 4.47 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 4.40 (1H, s), 3.78 (6H, s), 3.74 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.68 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 3.50 (1H, d, $J=10.8$ Hz), 3.46–3.32 (1H, m), 3.39 (1H, d, $J=10.8$ Hz), 3.30–3.19 (1H, m), 3.12–2.98 (1H, m), 1.85–1.56 (3H, m), 1.59 (3H, s), 1.46–1.12 (3H, m), 0.63 (3H, s); ^{31}P NMR (121.5 MHz, CDCl_3) δ 158.1 (1P, s)。

10

【0889】

オキサザホスホリジンモノマー 35a

【化289】



20

【0890】

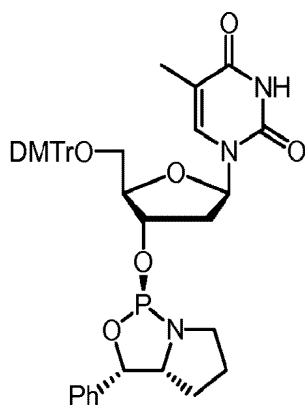
化合物 35a を、化合物 13a と同様にして、ただし 3a の代わりに 13a' を用いて得た。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (2H, d, $J=9.0$ Hz), 7.62 (1H, d, $J=1.2$ Hz), 7.40 (2H, d, $J=7.2$ Hz), 7.32–7.23 (10H, m), 6.85 (4H, d, $J=8.4$ Hz), 6.41 (1H, dd, $J=8.4, 5.4$ Hz), 4.94 (1H, dd, $J=12.3, 5.4$ Hz), 4.84–4.79 (1H, m), 4.03–4.01 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.59–3.53 (1H, m), 3.52–3.44 (2H, m), 3.41 (1H, dd, $J=14.7, 7.2$ Hz), 3.37–3.30 (2H, m), 3.13 (1H, ddd, $J=19.3, 10.3, 4.1$ Hz), 2.50–2.44 (1H, m), 2.39 (3H, s), 2.35–2.29 (1H, m), 1.91–1.72 (2H, m), 1.64–1.59 (1H, m), 1.40 (3H, s), 1.12–1.05 (1H, m); ^{31}P NMR (243.0 MHz, CDCl_3) δ 154.2 (1P, s)。

30

40

【0891】

実施例 Z-41



Z-27

10

【0892】

上記化合物 Z-27 は、従来のモノマーを表し、これを用いてオリゴを産生した。図 70 は、比較例 Z-1 を通して得る産物のチャートを示す。図 69 及び 70 に示す通り、本発明のモノマーは、より完全な脱保護とより少ない副産物を提供したということであり、このことは、産物の単離及び／又は精製をより容易とする。

【0893】

いくつかの実施形態では、本発明は化学的に安定なモノマーを提供する。例示的なかかるモノマーは上に実施例において示されている。いくつかの実施形態では、本発明は高い単離収率でモノマーを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は常法より高い単離収率でモノマーを提供する。いくつかの実施形態では、単離収率は 80 % を超える。例示的なかかるモノマーは上に実施例において示されている。

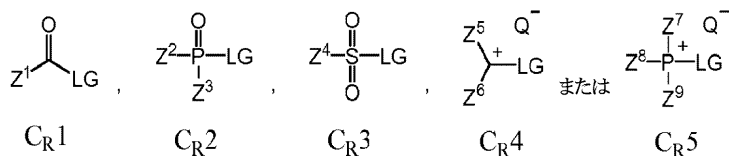
20

【0894】

縮合試薬

本発明の方法に従って有用な縮合試薬 (C_R) は、次の一般式のいずれのものでもよく：

【化 290】



30

、
式中、 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^6 、 Z^7 、 Z^8 、及び Z^9 は、互いに独立してアルキル、アミノアルキル、シクロアルキル、複素環、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルオキシ、アリールオキシ、若しくはヘテロアリールオキシより選択される、任意に置換された置換基であってもよく、あるいは、 Z^2 と Z^3 、 Z^5 と Z^6 、 Z^7 と Z^8 、 Z^8 と Z^9 、 Z^9 と Z^7 、若しくは Z^7 と Z^8 と Z^9 、のいずれかの組み合わせにより 3 ~ 20 員環脂環式環又は複素環を形成し； Q^- は対アニオンであり、LG は脱離基である。

40

【0895】

いくつかの実施形態では、縮合試薬 C_R の対イオンは Cl^- 、 Br^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 TfO^- 、 Tf_2N^- 、 AsF_6^- 、 ClO_4^- 、又は SbF_6^- であり、Tf は CF_3SO_2 である。いくつかの実施形態では、縮合試薬 C_R の脱離基は F、Cl、Br、I、3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール、イミダゾール、アルキルトリアゾール、テトラゾール、ペンタフルオロベンゼン、又は 1-ヒドロキシベンゾトリアゾールである。

。

【0896】

50

本発明の方法に従って用いる縮合試薬の例としては、ペンタフルオロベンゾイルクロリド、カルボニルジイミダゾール (CDI)、1-メシチレンスルフォニル-3-ニトロトリアゾール (MSNT)、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド (EDCI-HCl)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP)、N, N'-ビス (2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド (BopCl)、2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HATU)、及びO-ベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU)、DIPCDI; N, N'-ビス (2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸ブロミド (BopBr)、1, 3-ジメチル-2-(3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル)-2-ピロリジン-1-イル-1, 3, 2-ジアザホスホリジニウムヘキサフルオロホスフェート (MNTP)、3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル-トリス (ピロリジン-1-イル)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyNTP)、プロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBrOP); O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (TBTU); 及びテトラメチルフルオロホルムアミジニウムヘキサフルオロホスフェート (TFFH)が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、縮合試薬C_Rの対イオンはCl⁻、Br⁻、BF₄⁻、PF₆⁻、TfO⁻、Tf₂N⁻、AsF₆⁻、ClO₄⁻、又はSbF₆⁻であり、TfはCF₃SO₂である。

10

20

【0897】

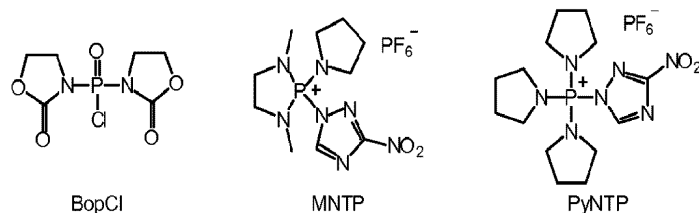
いくつかの実施形態では、縮合試薬は、1-(2, 4, 6-トリイソプロピルベンゼンスルホニル)-5-(ピロリジン-2-イル)テトラゾリド、ピバロイルクロリド、プロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、N, N'-ビス (2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド (BopCl)、又は2-クロロ-5, 5-ジメチル-2-オキソ-1, 3, 2-ジオキサホスフィナンである。いくつかの実施形態では、縮合試薬はN, N'-ビス (2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸クロリド (BopCl)である。いくつかの実施形態では、縮合試薬はWO 2006/066260に記載のものより選択される。

30

【0898】

いくつかの実施形態では、縮合試薬は1, 3-ジメチル-2-(3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル)-2-ピロリジン-1-イル-1, 3, 2-ジアザホスホリジニウムヘキサフルオロホスフェート (MNTP)、又は3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル-トリス (ピロリジン-1-イル)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyNTP) :

【化291】



40

である。

【0899】

ヌクレオシド・カップリングパートナーの塩基及び糖の選択

本明細書に記載される通り、本発明の方法に従って用いられるヌクレオシド・カップリングパートナーは、互いに同じでもよく、互いに異なってもよい。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの合成において用いられるヌクレオチド・カップ

50

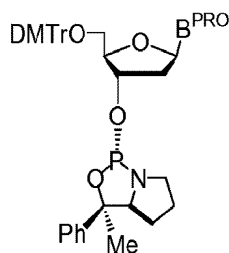
リングパートナーは、互いに同じ構造及び／又は立体化学的配置のものである。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの合成において用いられる各ヌクレオシド・カップリングパートナーは、オリゴヌクレオチドの所定の他のヌクレオシド・カップリングパートナーとは同じ構造及び／又は立体化学的配置のものではない。本発明の方法に従って用いられる例示的な核酸塩基及び糖は本明細書に記載される。関連する化学・合成技術分野の当業者は、本明細書に記載される核酸塩基及び糖のどのような組み合わせも本発明の方法による使用が意図されていると、認識するであろう。

【0900】

カップリング・ステップ

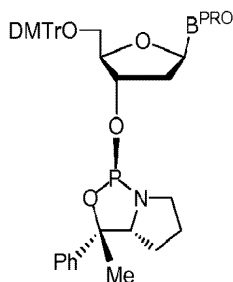
本発明に従って用いられる例示的なカップリング手順、キラル試薬、及び縮合試薬は、とりわけ、Wada I (JP 4348077; WO 2005/014609; WO 2005/092909)、Wada II (WO 2010/064146)、及びWada III (WO 2012/039448)に概説される。本発明に従って用いられるキラルヌクレオシド・カップリングパートナーはまた、本明細書では「Wadaアミダイト」と称す。いくつかの実施形態では、カップリングパートナーは、

【化292】



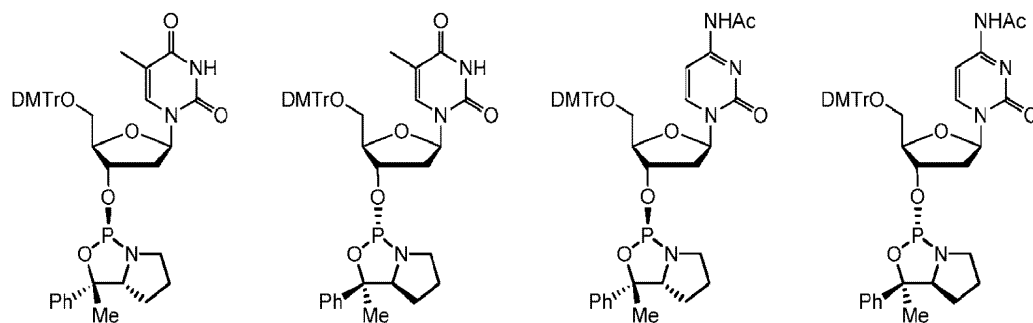
の構造を有し、 B^{PRO} は保護核酸塩基である。いくつかの実施形態では、カップリングパートナーは、

【化293】

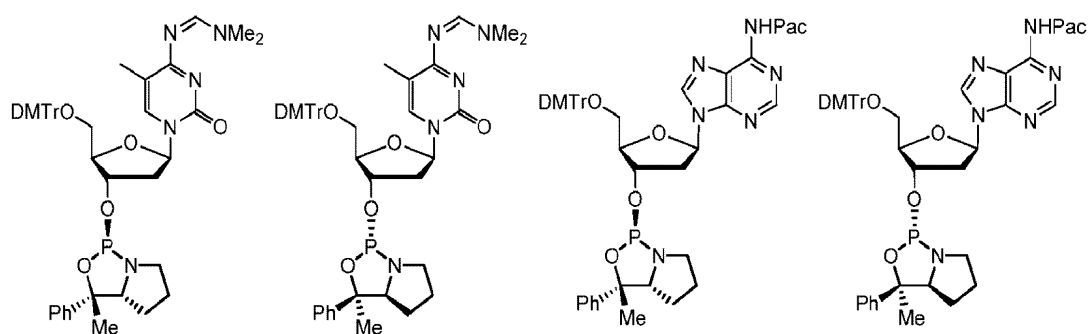


の構造を有し、 B^{PRO} は保護核酸塩基である。カップリングパートナーとして例示的なキラルホスホラミダイトを下に示す。

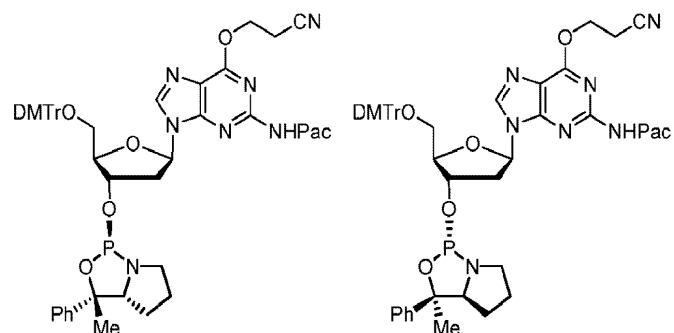
【化 2 9 4】



10



20



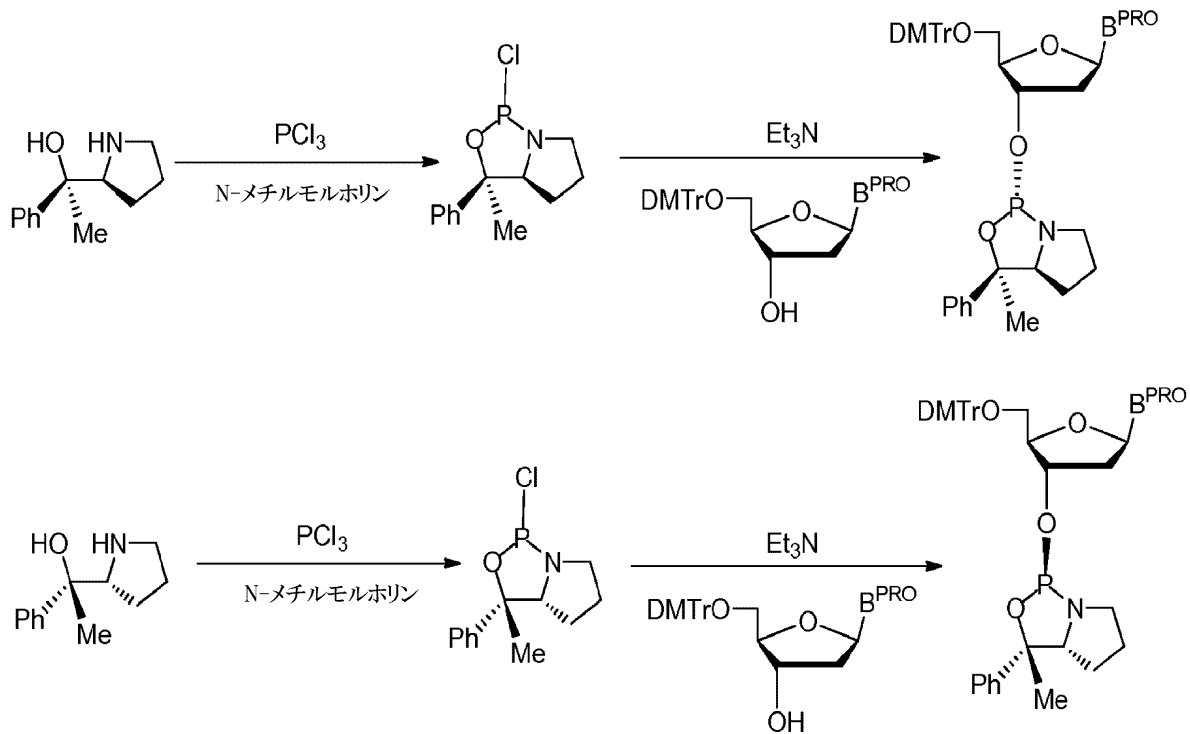
30

【0901】

カップリングパートナーを合成するために用いる方法の1つを下スキームIIに示す。

スキームII カップリングパートナーの合成例

【化 2 9 5】



10

20

【0902】

いくつかの実施形態では、カップリングのステップは、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位の遊離ヒドロキシル基をヌクレオシド・カップリングパートナーと適切な条件下で反応させてカップリングを起こすことを含む。いくつかの実施形態では、カップリングのステップの前に脱ブロックのステップを行う。例えば、いくつかの実施形態では、増殖しているオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基はブロックされ（即ち、保護され）、その後ヌクレオシド・カップリングパートナーと反応させるためには脱ブロックしなければならない。

【0903】

増殖しているオリゴヌクレオチドの適切なヒドロキシル基を脱ブロックした後、キラル試薬を含む溶液と活性化剤を含む溶液との送り込みの準備に当たって、支持体を洗浄し、乾燥する。いくつかの実施形態では、キラル試薬及び活性化剤を同時に送り込む。いくつかの実施形態では、同時の送り込みは、溶液（例えば、ホスホラミダイト溶液）中キラル試薬いくらかと、溶液（例えば、CMP T溶液）中活性化剤いくらかとを、ニトリル溶媒（例えば、アセトニトリル）等の極性非プロトン性溶媒中に送り込むことを含む。

【0904】

いくつかの実施形態では、カップリングのステップは、キラル亜リン酸エステル産物が95%超のジアステレオマー過剰率で存在する粗産物組成物を提供する。いくつかの実施形態では、キラル亜リン酸エステル産物が96%超のジアステレオマー過剰率で存在する。いくつかの実施形態では、キラル亜リン酸エステル産物が97%超のジアステレオマー過剰率で存在する。いくつかの実施形態では、キラル亜リン酸エステル産物が98%超のジアステレオマー過剰率で存在する。いくつかの実施形態では、キラル亜リン酸エステル産物が99%超のジアステレオマー過剰率で存在する。

【0905】

キャッピング・ステップ

キラル制御オリゴヌクレオチドを作るために提供される方法は、キャッピングのステップを含む。いくつかの実施形態では、キャッピングのステップは単一のステップである。いくつかの実施形態では、キャッピングのステップは2つのステップである。いくつかの実施形態では、キャッピングのステップは2つより多くのステップである。

30

40

50

【0906】

いくつかの実施形態では、キャッピングのステップは、キラル補助基の遊離アミンをキャッピングするステップと、残留未反応5'ヒドロキシル基をキャッピングするステップとを含む。いくつかの実施形態では、キラル補助基の遊離アミンと未反応5'ヒドロキシル基は、同じキャッピング基でキャッピングされる。いくつかの実施形態では、キラル補助基の遊離アミンと未反応5'ヒドロキシル基は、同じキャッピング基でキャッピングされる。いくつかの実施形態では、キラル補助基の遊離アミンと未反応5'ヒドロキシル基は、異なるキャッピング基でキャッピングされる。ある特定の実施形態では、異なるキャッピング基でのキャッピングは、オリゴヌクレオチドの合成の間、1つのキャッピング基を他のキャッピング基より先に選択的に除去することを可能とする。いくつかの実施形態では、両方の基のキャッピングは同時に起こる。いくつかの実施形態では、両方の基のキャッピングは繰り返し起こる。

10

【0907】

ある特定の実施形態では、キャッピングは繰り返し起こり、遊離アミンをキャッピングする第1ステップと、その後遊離5'ヒドロキシル基をキャッピングする第2ステップとを含み、遊離アミン及び5'ヒドロキシル基の両方は同じキャッピング基でキャッピングされる。例えば、いくつかの実施形態では、キラル補助基の遊離アミンは、無水物（例えばフェノキシ酢酸無水物、即ち Pac_2O ）で5'ヒドロキシル基がキャッピングされる前に、同じ無水物を用いてキャッピングされる。ある特定の実施形態では、その同じ無水物による5'ヒドロキシル基のキャッピングは異なる条件下（例えば、1つ又は複数の追加試薬の存在下）で起こる。いくつかの実施形態では、5'ヒドロキシル基のキャッピングは、エーテル性溶媒中アミン塩基（例えば、THF中NMI（N-メチルイミダゾール））の存在下で起こる。「キャッピング基」という表現は本明細書では、「保護基」及び「ブロック基」という句と互換的に用いられる。

20

【0908】

いくつかの実施形態では、アミンキャッピング基は、中間体亜リン酸エステル種の転位及び／又は分解を防ぐようにアミンを効果的にキャッピングすることを特徴とする。いくつかの実施形態では、キャッピング基は、それがヌクレオチド間結合リンの分子内切断を防ぐことを目的としてキラル補助基のアミンを保護する能力で選択される。

【0909】

いくつかの実施形態では、「ショートマー（shortmers）」例えば、「 $n-m$ 」（ m 及び n は整数であり、 $m < n$ であり； n は標的オリゴヌクレオチドにおける塩基の数である）不純物であって、第1サイクルで反応せず次の1つ又は複数のサイクルで反応するオリゴヌクレオチド鎖の反応から起こる不純物、の発生を防ぐようにヒドロキシル基を効果的にキャッピングすることを、5'ヒドロキシル基キャッピング基は特徴とする。かかるショートマー、特に「 $n-1$ 」の存在は、粗オリゴヌクレオチドの純度に有害な影響を有し、オリゴヌクレオチドの最終的な精製を時間がかかって概して低収率なものとする。

30

【0910】

いくつかの実施形態では、特定のキャップは、特定の条件下で特定のタイプの反応を容易にする傾向に基づいて選択される。例えば、いくつかの実施形態では、キャッピング基はE1脱離反応を容易にする能力で選択され、この反応はキャップ及び／又は補助基を増殖しているオリゴヌクレオチドから切断する。いくつかの実施形態では、キャッピング基はE2脱離反応を容易にする能力で選択され、この反応はキャップ及び／又は補助基を増殖しているオリゴヌクレオチドから切断する。いくつかの実施形態では、キャッピング基は β -脱離反応を容易にする能力で選択され、この反応はキャップ及び／又は補助基を増殖しているオリゴヌクレオチドから切断する。

40

【0911】

修飾ステップ

本明細書で使われる場合、「修飾ステップ（modifying step）」、「修

50

飾ステップ (modification step)」、及び「P-修飾ステップ」という句は互換的に用いられ、修飾ヌクレオチド間結合を導入するように用いられるいずれか1つ又は複数のステップを一般的に指す。いくつかの実施形態では、式 I の構造を有する修飾ヌクレオチド間結合。本発明の P-修飾ステップは、提供されるオリゴヌクレオチドの構築が完了する後ではなく、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の間に起こる。こうして、提供されるオリゴヌクレオチドの各ヌクレオチド単位は、ヌクレオチド単位が導入されるサイクルの間、結合リンで個別に修飾され得る。

【0912】

いくつかの実施形態では、適切な P-修飾試薬はイオウ求電子試薬、セレンウム求電子試薬、酸素求電子試薬、ホウ素化試薬、又はアジド試薬である。

10

【0913】

例えば、いくつかの実施形態では、セレンウム試薬は元素セレンウム、セレンウム塩、又は置換ジセレニドである。いくつかの実施形態では、酸素求電子試薬は元素酸素、ペルオキシド、又は置換ペルオキシドである。いくつかの実施形態では、ホウ素化試薬は、ボラン-アミン (例えば、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (BH₃ · DIPEA)、ボラン-ピリジン (BH₃ · Py)、ボラン-2-クロロピリジン (BH₃ · CPy)、ボラン-アニリン (BH₃ · An))、ボラン-エーテル試薬 (例えば、ボラン-テトラヒドロフラン (BH₃ · THF))、ボラン-ジアルキルスルフィド試薬 (例えば、BH₃ · Me₂S)、アニリン-シアノボラン、又はトリフェニルホスフィン-カルボアルコキシボランである。いくつかの実施形態では、アジド試薬は、続く還元を経てアミン基を提供することができるアジド基を含む。

20

【0914】

いくつかの実施形態では、P-修飾試薬は本明細書に記載される硫化試薬である。いくつかの実施形態では、修飾のステップは、リンを硫化してホスホロチオエート結合又はホスホロチオエートトリエステル結合を提供することを含む。いくつかの実施形態では、修飾のステップは式 I のヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドを提供する。

【0915】

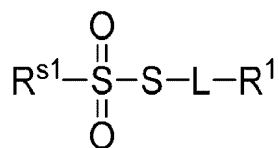
いくつかの実施形態では、本発明は硫化試薬、同試薬を作る方法、及び同試薬の使用法を提供する。

【0916】

いくつかの実施形態では、かかる硫化試薬はチオスルホン酸試薬である。いくつかの実施形態では、チオスルホン酸試薬は式 S-I の構造を有し：

30

【化296】



S-I

40

S-I、

式中、

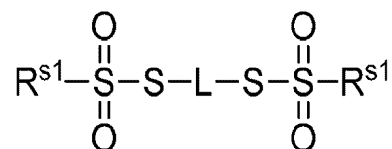
R^{s1} は R であり；

R、L、及び R¹ のそれぞれは互いに独立して上及び本明細書に定義され記載される通りである。

【0917】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はビス (チオスルホン酸) 試薬である。いくつかの実施形態では、ビス (チオスルホン酸) 試薬は式 S-II の構造を有し：

【化 2 9 7】



S-II

S-I I、

式中、 $\text{R}^{\text{s}1}$ 及び L のそれぞれは互いに独立して上及び本明細書に定義され記載される通りである。

10

【0 9 1 8】

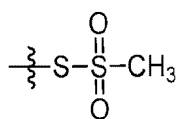
一般的に上に定義される通り、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は R であり、R は上及び本明細書に定義され記載される通りである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよい脂肪族、アリール、ヘテロシクリル、又はヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよいアルキルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよいアルキルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はメチルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はシアノメチルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はニトロメチルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよいアリールである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は置換されてもよいフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は p-ニトロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は p-メチルフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は p-クロロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は o-クロロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ は 2, 4, 6-トリクロロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はペンタフルオロフェニルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はされてもよい置換ヘテロシクリルである。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}$ はされてもよい置換ヘテロアリールである。

20

【0 9 1 9】

いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}-\text{S}(\text{O})_2\text{S}-$ は

【化 2 9 8】

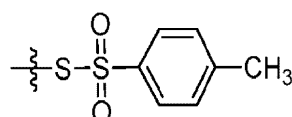


30

(M T S)

である。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}-\text{S}(\text{O})_2\text{S}-$ は

【化 2 9 9】

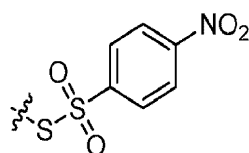


40

(T T S)

である。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}-\text{S}(\text{O})_2\text{S}-$ は

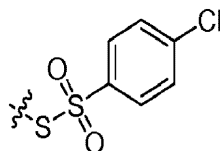
【化 3 0 0】

(NO₂ P h e T S)

である。いくつかの実施形態では、 $\text{R}^{\text{s}1}-\text{S}(\text{O})_2\text{S}-$ は

50

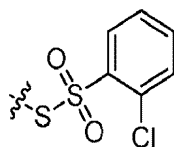
【化 3 0 1】



(p-ClPhETS)

である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は

【化 3 0 2】

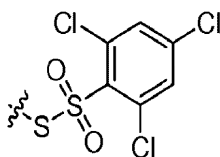


10

(o-ClPhETS)

である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は

【化 3 0 3】

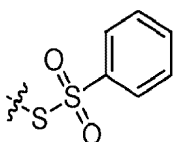


20

(2,4,6-TrichloroPhETS)

である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は

【化 3 0 4】

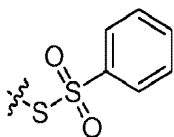


30

(PhETS)

である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は

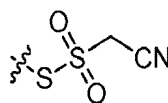
【化 3 0 5】



(PFPhETS)

である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は

【化 3 0 6】

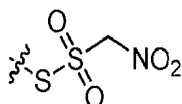


40

(a-CNMTS)

である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は

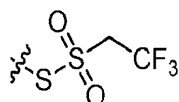
【化 3 0 7】



50

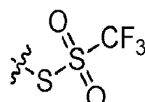
(a-NO₂MTS)

である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は
【化308】



(a-CF₃MTS)

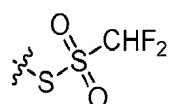
である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は
【化309】



10

(a-CF₃TS)

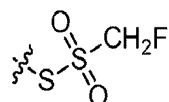
である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は
【化310】



(a-CHF₂TS)

である。いくつかの実施形態では、 $R^{s1}-S(O)_2S-$ は
【化311】

20



(a-CH₂FTS)

である。

【0920】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はS-I又はS-IIの構造を有し、Lは-S-R^{L3}-又は-S-C(O)-R^{L3}-である。いくつかの実施形態では、Lは-S-R^{L3}-又は-S-C(O)-R^{L3}-であり、R^{L3}は置換されてもよいC₁~C₆アルキレンである。いくつかの実施形態では、Lは-S-R^{L3}-又は-S-C(O)-R^{L3}-であり、R^{L3}は置換されてもよいC₁~C₆アルケニレンである。いくつかの実施形態では、Lは-S-R^{L3}-又は-S-C(O)-R^{L3}-であり、R^{L3}は置換されてもよいC₁~C₆アルキレンであり、1つ又は複数のメチレン単位は、置換されていてもよいC₁~C₆アルケニレン、アリーレン、又はヘテロアリーレンによって互いに独立して置換されていてもよい。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、R^{L3}は置換されていてもよい-S-(C₁~C₆アルケニレン)-、-S-(C₁~C₆アルキレン)-、-S-(C₁~C₆アルキレン)-アリーレン-(C₁~C₆アルキレン)-、-S-CO-アリーレン-(C₁~C₆アルキレン)-、又は-S-CO-(C₁~C₆アルキレン)-アリーレン-(C₁~C₆アルキレン)-である。いくつかの実施形態では、硫化試薬はS-I又はS-IIの構造を有し、Lは-S-R^{L3}-又は-S-C(O)-R^{L3}-であり、イオウ原子はR¹に結合する。

30

40

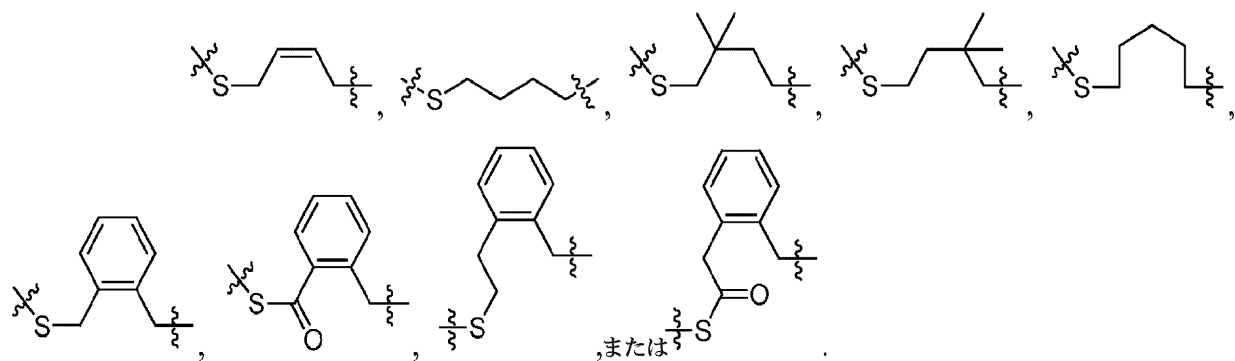
【0921】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はS-I又はS-IIの構造を有し、Lはアルキレン、アルケニレン、アリーレン、又はヘテロアリーレンである。

【0922】

いくつかの実施形態では、硫化試薬はS-I又はS-IIの構造を有し、Lは

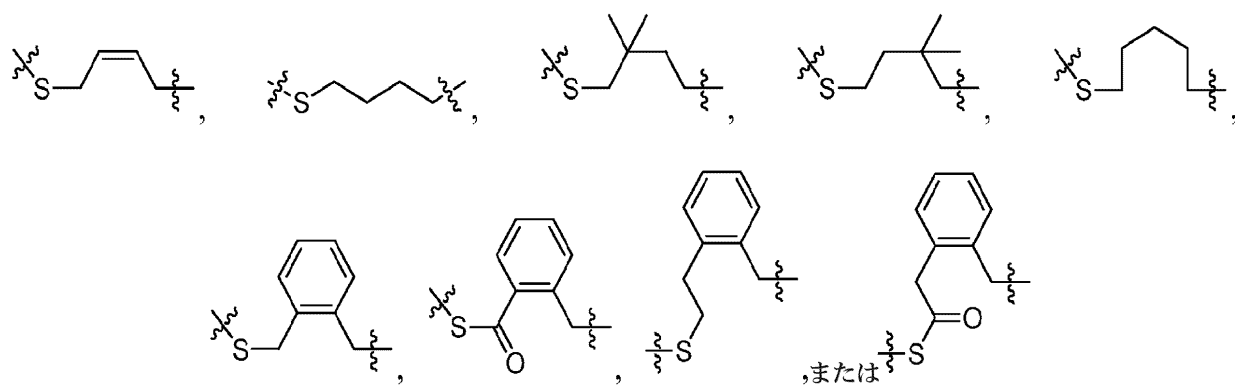
【化 3 1 2】



10

である。いくつかの実施形態では、Lは

【化 3 1 3】



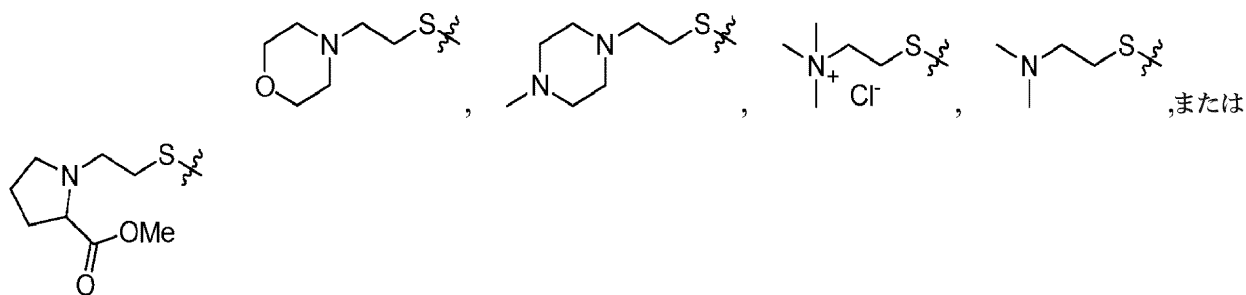
20

であり、イオウ原子は R^1 に結合する。

【0 9 2 3】

いくつかの実施形態では、硫化試薬は S-I 又は S-I I の構造を有し、 R^1 は

【化 3 1 4】

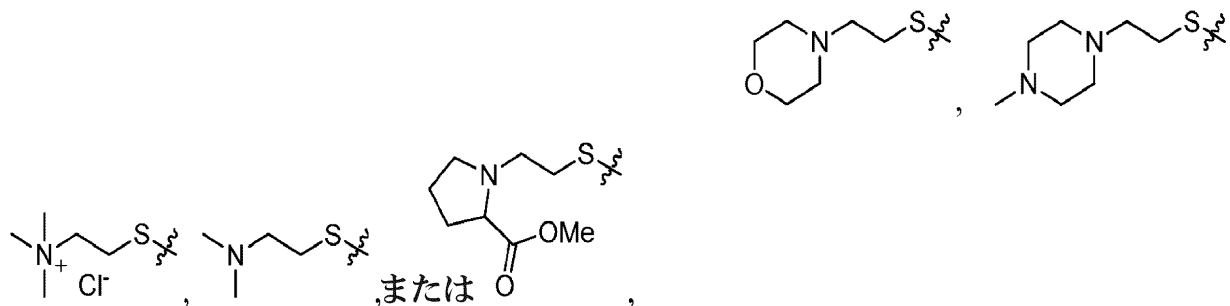


30

である。いくつかの実施形態では、 R^1 は

40

【化 3 1 5】



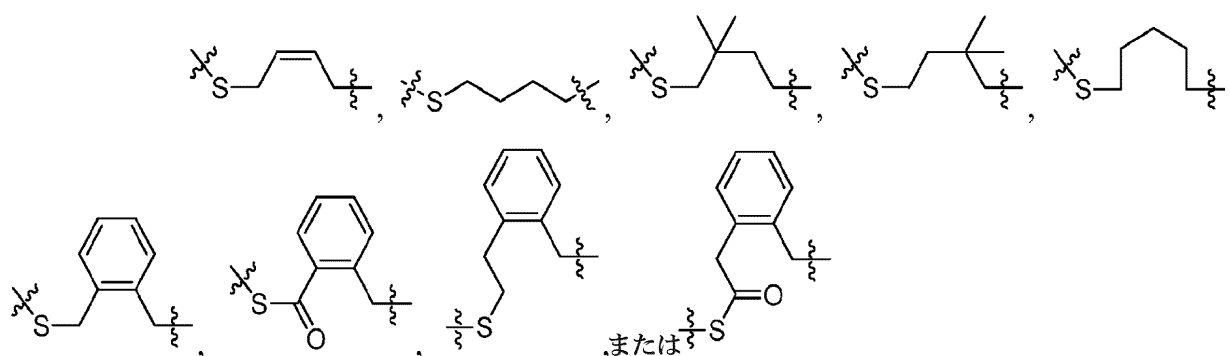
10

であり、イオウ原子は L に結合する。

【0 9 2 4】

いくつかの実施形態では、硫化試薬は S-I 又は S-I I の構造を有し、L は

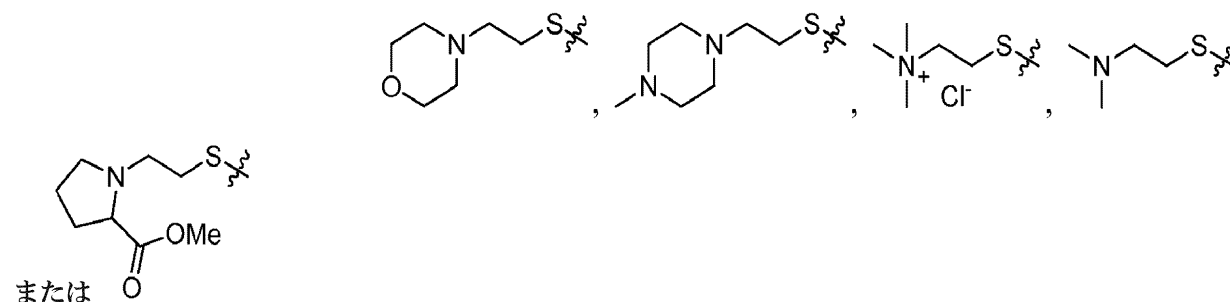
【化 3 1 6】



20

であり、イオウ原子は R¹ に結合し、R¹ は

【化 3 1 7】



30

であり、イオウ原子は L に結合する。

【0 9 2 5】

いくつかの実施形態では、硫化試薬は S-I 又は S-I I の構造を有し、R¹ は -S-R^{L2} であり、R^{L2} は上及び本明細書に定義され記載される通りである。いくつかの実施形態では、R^{L2} は -S-(C₁~C₆ アルキレン)-ヘテロシクリル、-S-(C₁~C₆ アルケニレン)-ヘテロシクリル、-S-(C₁~C₆ アルキレン)-N(R')₂、-S-(C₁~C₆ アルキレン)-N(R')₃ より選択される置換されていてよい基であり、各 R' は上に定義され本明細書に記載される通りである。

40

【0 9 2 6】

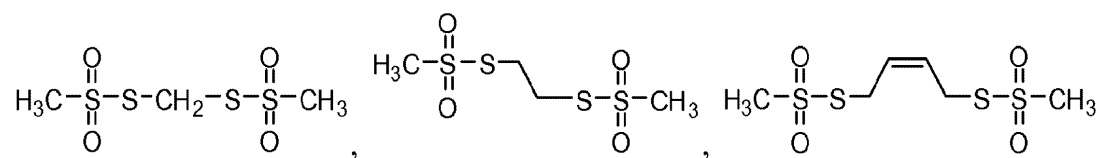
いくつかの実施形態では、-L-R¹ は -R^{L3}-S-S-R^{L2} であり、各変数は互いに独立して上に定義され本明細書に記載される通りである。いくつかの実施形態では、-L-R¹ は -R^{L3}-C(O)-S-S-R^{L2} であり、各変数は互いに独立して上に定義され本明細書に記載される通りである。

【0 9 2 7】

50

式 S-I I の例示的ビス（チオスルホン酸）試薬を下に示す：

【化 3 1 8】



【0 9 2 8】

いくつかの実施形態では、硫化試薬は次の式のうちの 1 つを有する化合物であり：

S_8 、 $R^{s2}-S-S-R^{s3}$ 、又は $R^{s2}-S-X^s-R^{s3}$ 、

10

式中、

R^{s2} 及び R^{s3} のそれぞれは互いに独立して、脂肪族、アミノアルキル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アシル、アミド、イミド、又はチオカルボニルより選択される置換されていてもよい基であり；又は

R^{s2} 及び R^{s3} はそれらが結合している原子とともに一緒になって、置換されていてもよい複素環又はヘテロアリール環を形成し；

X^s は $-S(O)_2-$ 、 $-O-$ 、又は $-N(R')$ であり；及び

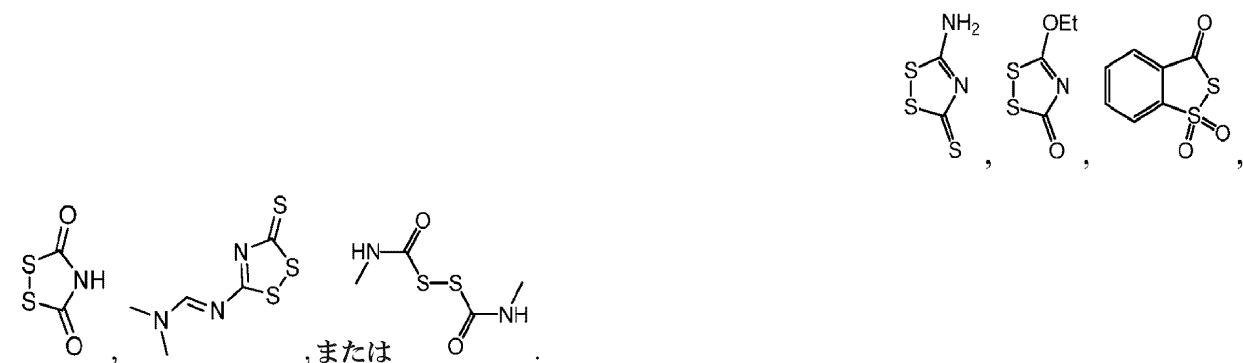
R' は上及び本明細書に定義され記載される通りである。

【0 9 2 9】

20

いくつかの実施形態では、硫化試薬は S_8 、

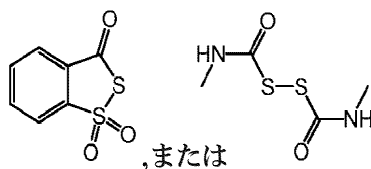
【化 3 1 9】



30

である。いくつかの実施形態では、硫化試薬は S_8 、

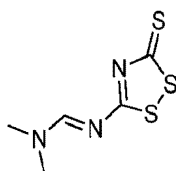
【化 3 2 0】



40

である。いくつかの実施形態では、硫化試薬は

【化 3 2 1】

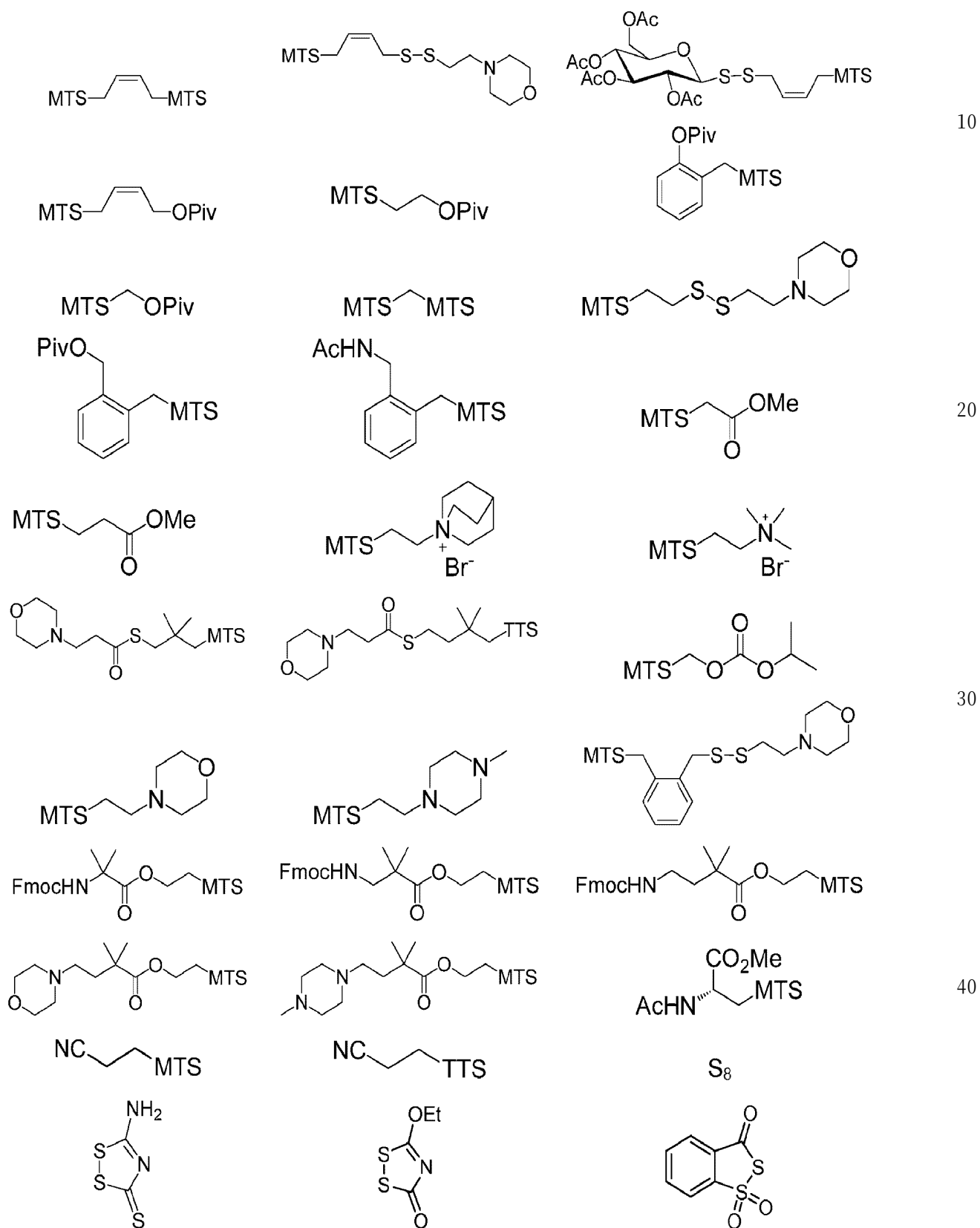


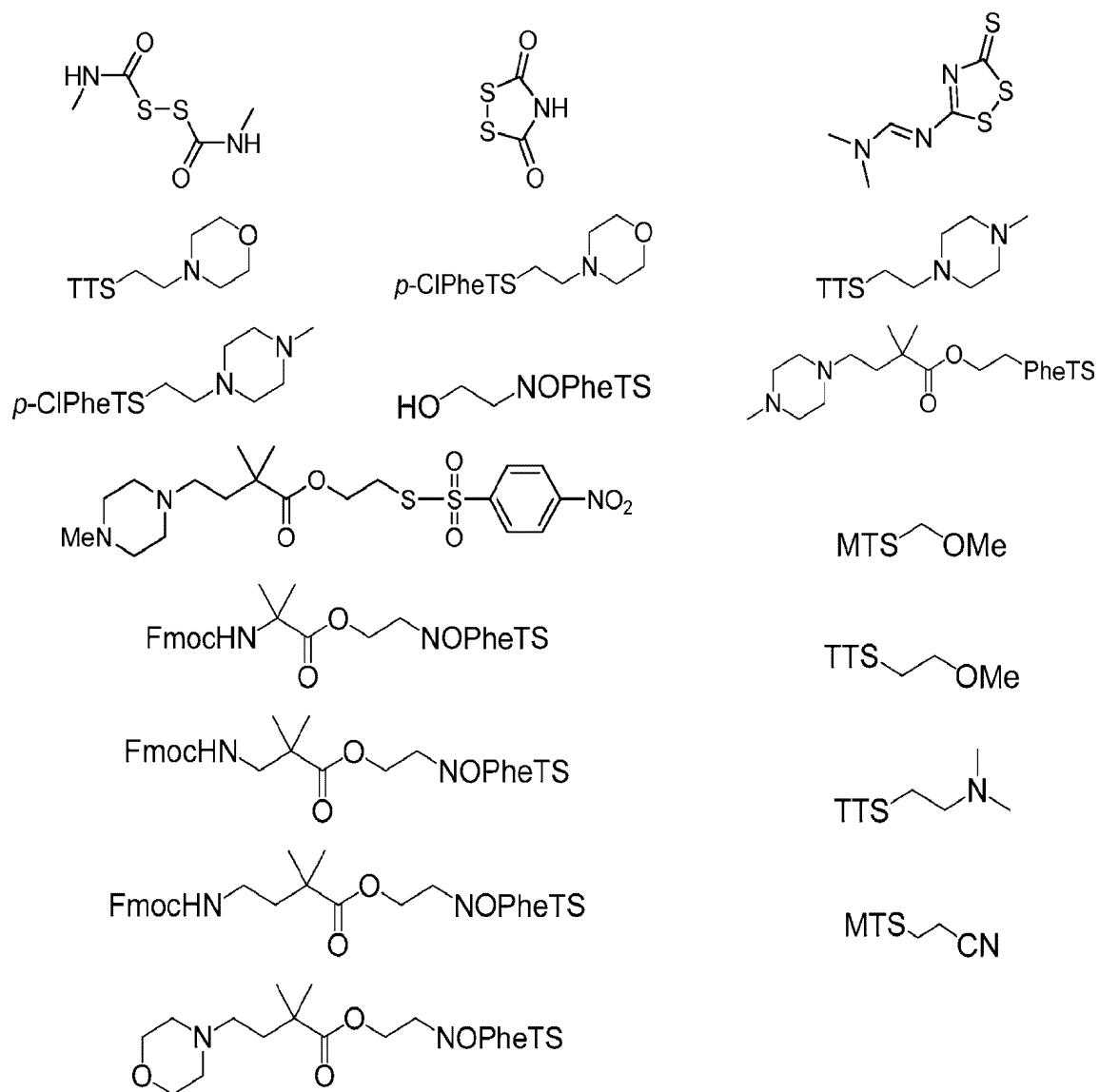
である。

50

例示的な硫化試薬を下の表 5 に示す。

【表 7】





10

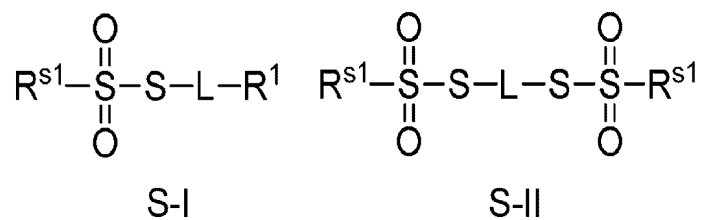
20

30

【0931】

いくつかの実施形態では、提供される硫化試薬を用いてH-ホスホネートを修飾する。例えば、いくつかの実施形態では、H-ホスホネートオリゴヌクレオチドは、例えば、Wada I又はWada IIの方法を用いて合成し、式S-I又はS-IIの硫化試薬を用いて修飾する：

【化322】



40

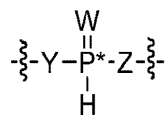
式中、 R^{s1} 、L、及び R^1 のそれぞれは上及び本明細書に記載され定義される通りである。

【0932】

いくつかの実施形態では、本発明はホスホロチオエートトリエステルを合成する方法を提供し、本方法は、

i) 構造：

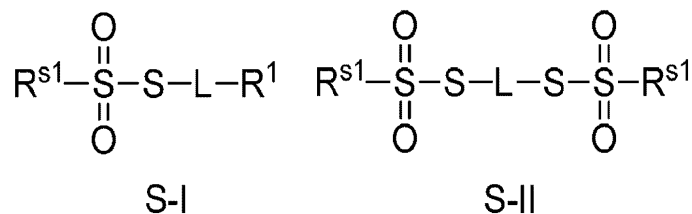
【化 3 2 3】



(式中、W、Y、及びZのそれぞれは上及び本明細書に記載され定義される通りであり、シリル化試薬とともにシリルオキシホスホネートを提供する)のH-ホスホネートを反応させるステップと、

i i) シリルオキシホスホネートを構造 S-I 又は S-II :

【化 3 2 4】



10

の硫化試薬と反応させ、ホスホロチオトリエステルを提供するステップと、を含む。

【0 9 3 3】

いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬を硫化試薬の代わりに用いてヌクレオチド間結合へ修飾を導入する。いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬は次の式の1つを有する化合物であり：

20

Se 、 $\text{R}^{\text{s}2}-\text{Se}-\text{Se}-\text{R}^{\text{s}3}$ 、又は $\text{R}^{\text{s}2}-\text{Se}-\text{X}^{\text{s}}-\text{R}^{\text{s}3}$ 、

式中、 $\text{R}^{\text{s}2}$ 及び $\text{R}^{\text{s}3}$ のそれぞれは互いに独立して、脂肪族、アミノアルキル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルキルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アシル、アミド、イミド、又はチオカルボニルより選択される置換されていてもよい基であり；又は

$\text{R}^{\text{s}2}$ 及び $\text{R}^{\text{s}3}$ はそれらが結合している原子とともに一緒になって、置換されていてもよい複素環又はヘテロアリール環を形成し；

X^{s} は $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、又は $-\text{N}(\text{R}')$ であり；及び

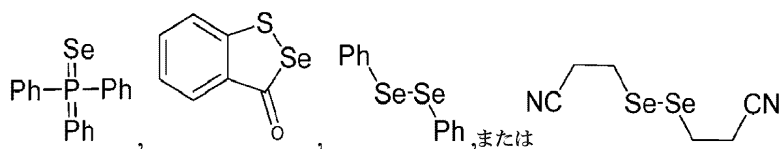
30

R' は上及び本明細書に定義され記載される通りである。

【0 9 3 4】

他の実施形態では、セレンウム求電子試薬は Se 、 KSeCN 、

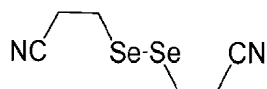
【化 3 2 5】



の化合物である。いくつかの実施形態では、セレンウム求電子試薬は Se 又は

40

【化 3 2 6】



である。

【0 9 3 5】

いくつかの実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、硫化の間リンに移動する成分が単一イオウ原子（例えば、 $-\text{S}-$ 又は $=\text{S}$ ）ではなく置換イオウ（例えば、 $-\text{SR}$ ）であることを特徴とする。

【0 9 3 6】

50

いくつかの実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、試薬の活性が、所定の電子吸引基又は電子供与基で試薬を修飾することによって調節可能であることを特徴とする。

【0937】

いくつかの実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、それが結晶性であることを特徴とする。いくつかの実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、それが高い結晶化度を有することを特徴とする。ある特定の実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、例えば再結晶によって試薬の精製が容易であることを特徴とする。ある特定の実施形態では、本発明に従って用いられる硫化試薬は、それにイオウ含有不純物が実質的にないことを特徴とする。いくつかの実施形態では、イオウ含有不純物が実質的にない硫化試薬は効率の向上を示す。

10

【0938】

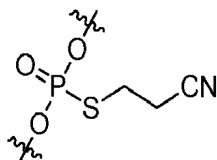
いくつかの実施形態では、提供されるキラル制御オリゴヌクレオチドは1つ又は複数のリン酸ジエステル結合を含む。かかるキラル制御オリゴヌクレオチドを合成するために、1つ又は複数の修飾ステップを酸化ステップに置き換えて、同等のリン酸ジエステル結合を導入してもよい。いくつかの実施形態では、酸化ステップは、通常のオリゴヌクレオチド合成と同様に実施する。いくつかの実施形態では、酸化ステップは、 I_2 の使用を含む。いくつかの実施形態では、酸化ステップは、 I_2 及びピリジンの使用を含む。いくつかの実施形態では、酸化ステップは、THF／ピリジン／水（70：20：10－v／v／v）共溶媒系中0.02M I_2 の使用を含む。例示的サイクルをスキームI－cに示す。

20

【0939】

いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート前駆体を用いて、ホスホロチオエート結合を含むキラル制御オリゴヌクレオチドを合成する。いくつかの実施形態では、かかるホスホロチオエート前駆体は

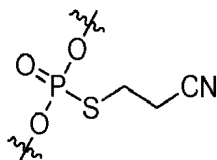
【化327】



30

である。いくつかの実施形態では、

【化328】



は、サイクル終了後、標準脱保護／放出手順の間、ホスホロチオエートジエステル結合へと変換される。例をさらに下に示す。

【0940】

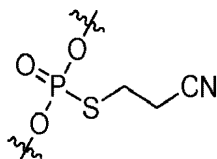
40

いくつかの実施形態では、提供されるキラル制御オリゴヌクレオチドは1つ又は複数のリン酸ジエステル結合及び1つ又は複数のホスホロチオエートジエステル結合を含む。いくつかの実施形態では、提供されるキラル制御オリゴヌクレオチドは1つ又は複数のリン酸ジエステル結合及び1つ又は複数のホスホロチオエートジエステル結合を含み、少なくとも1つのリン酸ジエステル結合は、3'から5'に合成されるとき全てのホスホロチオエートジエステル結合の後で導入される。かかるキラル制御オリゴヌクレオチドを合成するために、いくつかの実施形態では、1つ又は複数の修飾ステップを酸化ステップに置き換えて、同等のリン酸ジエステル結合を導入してもよく、ホスホロチオエート前駆体をホスホロチオエートジエステル結合のそれぞれに対して導入する。いくつかの実施形態では、所望のオリゴヌクレオチド長を達成した後、ホスホロチオエート前駆体をホスホロチオ

50

エートジエステル結合に変換する。いくつかの実施形態では、サイクル終了の間か後の脱保護／放出ステップでホスホロチオエート前駆体をホスホロチオエートジエステル結合に変換する。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート前駆体は、それをβ脱離経路によって除去できることを特徴とする。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート前駆体は

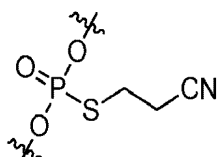
【化 3 2 9】



10

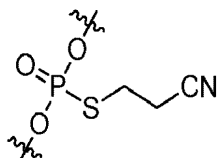
である。当業者に理解されるように、合成の間、ホスホロチオエート前駆体、例えば、

【化 3 3 0】



を使用する利点の 1 つは、

【化 3 3 1】



20

はある特定の条件下でホスホロチオエートより安定しているということである。

【0 9 4 1】

いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート前駆体は、本明細書に記載されるリン保護基、例えば、2-シアノエチル (CE 又は Cne)、2-トリメチルシリルエチル、2-ニトロエチル、2-スルホニルエチル、メチル、ベンジル、o-ニトロベンジル、2-(p-ニトロフェニル)エチル (NPE 又は Npe)、2-フェニルエチル、3-(tert-ブチルカルボキサミド)-1-プロピル、4-オキソペンチル、4-メチルチオ-1-ブチル、2-シアノ-1, 1-ジメチルエチル、4-N-メチルアミノブチル、3-(2-ピリジル)-1-プロピル、2-[N-メチル-N-(2-ピリジル)]アミノエチル、2-(N-ホルミル、N-メチル)アミノエチル、4-[N-メチル-N-(2, 2, 2-トリフルオロアセチル)アミノ]ブチルである。例をさらに下に示す。

30

【0 9 4 2】

所望の硫化試薬を合成する方法は、本明細書及び実施例の項に記載される。

【0 9 4 3】

上に記する通り、いくつかの実施形態では、硫化は、増殖しているオリゴヌクレオチドからキラル試薬を切断する条件下で起こる。いくつかの実施形態では、硫化は、増殖しているオリゴヌクレオチドからキラル試薬を切断しない条件下で起こる。

40

【0 9 4 4】

いくつかの実施形態では、硫化試薬を適切な溶媒に溶解させ、カラムに送り込む。ある特定の実施形態では、溶媒は、ニトリル溶媒等の極性非プロトン性溶媒である。いくつかの実施形態では、溶媒はアセトニトリルである。いくつかの実施形態では、硫化試薬の溶液は、ニトリル溶媒 (例えば、アセトニトリル) 中で、硫化試薬 (例えば、本明細書に記載されるチオスルホン酸誘導体) を BSTFA (N, O-ビス-トリメチルシリル-トリフルオロアセトアミド) と混合することによって調製する。いくつかの実施形態では、BSTFA を含まない。例えば、本発明者は、一般式 $R^{s2} - S - S(O)_2 - R^{s3}$ の比

50

較的より反応性のある硫化試薬がしばしば、B S T F A の不存在下、硫化反応に問題なく関与できることを見い出した。ほんの一例を挙げると、発明者は、 $R^s 2$ が p-ニトロフェニルで、 $R^s 3$ がメチルである場合 B S T F A が不要ないことを例証した。本開示を参考にすると、当業者は、B S T F A を必要としない他の状況及び／又は硫化試薬を決定することが容易に可能となるであろう。

【0945】

いくつかの実施形態では、硫化ステップを室温で実施する。いくつかの実施形態では、硫化ステップをより低い温度、例えば、約 0°C 、約 5°C 、約 10°C 、又は約 15°C で実施する。いくつかの実施形態では、硫化ステップを約 20°C より高い温度で実施する。

【0946】

いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分～約 120 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分～約 90 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分～約 60 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分～約 30 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分～約 25 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分～約 20 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分～約 15 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 1 分～約 10 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 5 分～約 60 分間行う。

【0947】

いくつかの実施形態では、硫化反応は約 5 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 10 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 15 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 20 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 25 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 30 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 35 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 40 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 45 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 50 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 55 分間行う。いくつかの実施形態では、硫化反応は約 60 分間行う。

【0948】

本発明の方法に従って作られる硫化修飾産物のいくつかは予想外に安定であることが期待せずに見い出された。いくつかの実施形態では、予想外に安定な産物はホスホロチオエートトリエステルである。いくつかの実施形態では、予想外に安定な産物は、式 I-c の構造を有する 1 つ又は複数のヌクレオチド間結合を含むキラル制御オリゴヌクレオチドである。

【0949】

当業者は、本明細書に記載される硫化方法及び本明細書に記載される硫化試薬はまた、Wada I I (WO2010/064146) に記載されるもの等、修飾 H-ホスホネートオリゴヌクレオチドに関連して有用であることを認識する。

【0950】

いくつかの実施形態では、硫化反応は、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、又は 98% の段階的硫化効率を有する。いくつかの実施形態では、硫化反応は少なくとも純度 98% の粗ジヌクレオチド産物組成物を提供する。いくつかの実施形態では、硫化反応は少なくとも純度 90% の粗テトラヌクレオチド産物組成物を提供する。いくつかの実施形態では、硫化反応は少なくとも純度 70% の粗ドデカヌクレオチド産物組成物を提供する。いくつかの実施形態では、硫化反応は少なくとも純度 50% の粗イコサヌクレオチド産物組成物を提供する。

【0951】

結合リンを修飾するステップが完了すると、オリゴヌクレオチドは、サイクルを再開するための準備として別の脱ブロッキングステップを経る。いくつかの実施形態では、キラル補助基は硫化後無傷のままであり、続く脱ブロッキングステップの間脱ブロッキングされ、この脱ブロッキングステップはサイクルを再開する前に必ず起こる。脱ブロッキング、カップリング、キャッピング、及び修飾のステップは、増殖しているオリゴヌクレオチ

ドが所望の長さに達するまで繰り返し、所望の長さに達した時点でオリゴヌクレオチドを、固体支持体から直ぐに切断するか、精製目的の支持体に付けたままとして後で切断するか、どちらかが可能である。いくつかの実施形態では、1つ又は複数の保護基は、ヌクレオチド塩基の1つ又は複数において存在し、支持体からのオリゴヌクレオチドの切断と塩基の脱保護は単一ステップにおいて起こる。いくつかの実施形態では、1つ又は複数の保護基は、ヌクレオチド塩基の1つ又は複数において存在し、支持体からのオリゴヌクレオチドの切断と塩基の脱保護は1つより多数のステップにおいて起こる。いくつかの実施形態では、脱保護と、支持体からの切断とは、例えば、1つ又は複数のアミン塩基を用いた塩基性条件下で起こる。ある特定の実施形態では、1つ又は複数のアミン塩基はプロピルアミンを含む。ある特定の実施形態では、1つ又は複数のアミン塩基はピリジンを含む。

10

【0952】

いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び／又は脱保護は、約30℃～約90℃の高温で起こる。いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び／又は脱保護は、約40℃～約80℃の高温で起こる。いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び／又は脱保護は、約50℃～約70℃の高温で起こる。いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び／又は脱保護は、約60℃の高温で起こる。いくつかの実施形態では、支持体からの切断及び／又は脱保護は、周囲温度で起こる。

【0953】

例示的な精製手順は、本明細書に記載されかつ当技術分野で周知であるか、又はそのいずれかである。

20

【0954】

注目すべきは、各サイクル中、増殖しているオリゴヌクレオチドからキラル補助基を除去することが少なくとも次の理由で有利であることであり、その理由とは、

(1) 敏感な可能性のある官能基をリンに導入するオリゴヌクレオチド合成の最後に、何らかの分離ステップで補助基を除去する必要がないこと、(2) 副反応を起こしやすく、かつ／又は後続化学作用へ干渉しやすい不安定なリンー補助基中間体が避けられることである。このようにして、各サイクル中のキラル補助基の除去は合成全体をより効率的にする。

【0955】

脱ブロッキングのステップがサイクルとの関連において上に記載されているが、一方、追加の一般的方法が下の通り含まれる。

30

【0956】

脱ブロッキングステップ

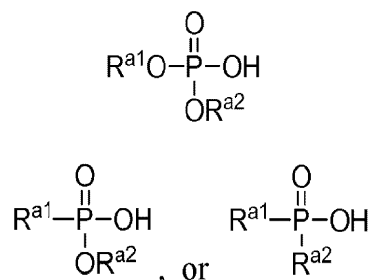
いくつかの実施形態では、カップリングのステップは、その前に脱ブロッキングのステップが来る。例えば、いくつかの実施形態では、増殖しているオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基をブロッキングし(即ち、保護し)、それを続いてヌクレオシド・カップリングパートナーと反応させるためには脱ブロッキングしなければならない。

【0957】

いくつかの実施形態では、酸性化を用いてブロック基を除去する。いくつかの実施形態では、酸はブレンステッド酸又はルイス酸である。有用なブレンステッド酸としては、有機溶媒又は水(80%酢酸の場合)中に0.6(トリフルオロ酢酸)～4.76(酢酸)の pK_a (水中25℃)値を有する、カルボン酸、アルキルスルホン酸、アリールスルホン酸、リン酸及びその誘導体、ホスホン酸及びその誘導体、アルキルホスホン酸及びそれらの誘導体、アリールホスホン酸及びそれらの誘導体、ホスフィン酸、ジアルキルホスフィン酸、並びにジアリールホスフィン酸がある。酸性化ステップで用いられる酸(1～80%)の濃度は酸の酸性度による。強酸性条件は、脱プリン／脱ピリミジンを生じ、プリン塩基又はピリミジニル塩基がリボース環及び／又は他の糖環から切断されるので、酸強度を考慮に入れなければならない。いくつかの実施形態では、酸は $R^{a1}COOH$ 、 $R^{a1}SO_3H$ 、 $R^{a3}SO_3H$ 、

40

【化 3 3 2】



より選択され、式中、 $\text{R}^{\text{a}1}$ 及び $\text{R}^{\text{a}2}$ のそれぞれは互いに独立して水素又は置換されていてもよいアルキル若しくはアリールであり、 $\text{R}^{\text{a}3}$ は置換されていてもよいアルキル又はアリールである。

10

【0958】

いくつかの実施形態では、酸性化は有機溶媒中ルイス酸によって達成する。例示的なかかる有用なルイス酸としては、 $\text{Zn}(\text{X}^{\text{a}})_2$ があり、 X^{a} は Cl 、 Br 、 I 、又は CF_3SO_3 である。

【0959】

いくつかの実施形態では、酸性化のステップは、プリン成分を縮合中間体から除去することなくブロック基を除去するのに有効な量のプレnstेटド酸又はルイス酸を添加することを含む。

20

【0960】

酸性化ステップに有用な酸としてはまた、有機溶媒中 10% リン酸、有機溶媒中 10% 塩酸、有機溶媒中 1% トリフルオロ酢酸、有機溶媒中 3% ジクロロ酢酸又はトリクロロ酢酸又は水中 80% 酢酸が挙げられるが、これらに限定されない。このステップで用いられるどのようなプレnstेटド酸又はルイス酸の濃度も、酸の濃度が、糖成分からの核酸塩基の切断を起こす濃度を超えないように選択する。

【0961】

いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中約 1% トリフルオロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中約 0.1% ~ 約 8% トリフルオロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中 3% のジクロロ酢酸又はトリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中約 0.1% ~ 約 10% ジクロロ酢酸又はトリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中 3% トリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、有機溶媒中約 0.1% ~ 約 10% トリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、水中 80% 酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、水中約 50% ~ 約 90%、又は約 50% ~ 約 80%、約 50% ~ 約 70%、約 50% ~ 約 60%、約 70% ~ 約 90% 酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、酸性化は、さらに酸性溶媒ヘカチオンスカベンジャーを添加することを含む。ある特定の実施形態では、カチオンスカベンジャーはトリエチルシラン又はトリイソプロピルシランであってもよい。いくつかの実施形態では、ブロック基を酸性化によって脱ブロッキングし、これは有機溶媒中 1% トリフルオロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、ブロック基を酸性化によって脱ブロッキングし、これは有機溶媒中 3% ジクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、ブロック基を酸性化によって脱ブロッキングし、これは有機溶媒中 3% トリクロロ酢酸を添加することを含む。いくつかの実施形態では、ブロック基を酸性化によって脱ブロッキングし、これはジクロロメタン中 3% トリクロロ酢酸を添加することを含む。

30

40

【0962】

ある特定の実施形態では、本発明の方法は、合成装置上で完了し、増殖しているオリゴヌクレオチドのヒドロキシル基を脱ブロッキングするステップは、いくらかの量の溶媒を

50

合成装置カラムへ送り込むことを含み、このカラムは、オリゴヌクレオチドを付ける固体支持体を含有する。いくつかの実施形態では、溶媒は、ハロゲン化溶媒（例えば、ジクロロメタン）である。ある特定の実施形態では、溶媒は、いくらかの量の酸を含む。いくつかの実施形態では、溶媒は、いくらかの量の有機酸、例えばトリクロロ酢酸を含む。ある特定の実施形態では、酸は約1%～約20% w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は約1%～約10% w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は約1%～約5% w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は約1%～約3% w/vの量で存在する。ある特定の実施形態では、酸は約3% w/vの量で存在する。ヒドロキシル基を脱ブロッキングする方法は本明細書にさらに記載される。いくつかの実施形態では、酸は、ジクロロメタン中3% w/vで存在する。

10

【0963】

いくつかの実施形態では、キラル補助基は、脱ブロッキングステップの前に除去する。いくつかの実施形態では、キラル補助基は脱ブロッキングステップの間に除去する。

【0964】

いくつかの実施形態では、サイクル終了を脱ブロッキングステップの前に実施する。いくつかの実施形態では、サイクル終了を脱ブロッキングステップの後に実施する。

【0965】

ブロック基／保護基除去の一般的条件

核酸塩基又は糖成分上に位置するヒドロキシル成分又はアミノ成分等の官能基は、合成の間ブロック（保護）基（成分）でルーチン的にブロッキングされ、その後脱ブロッキングされる。一般に、ブロック基は分子の化学官能成分を特定の反応条件に対して不活性とし、後でブロック基を分子内のそのような官能成分から、分子の残りを実質的に損傷することなく除去することが可能である（例えば、Green and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1991参照）。例えば、アミノ基は、フタルイミド、9-フルドレニルメトキシカルボニル（*fludrenylmethoxycarbonyl*）（FMOC）、トリフェニルメチルスルフェニル、*t*-BOC、4, 4'-ジメトキシトリチル（DMTr）、4-メトキシトリチル（MMTr）、9-フェニルキサンチン-9-イル（ピキシル）、トリチル（Tr）、又は9-（*p*-メトキシフェニル）キサンチン-9-イル（MOX）等の窒素ブロック基でブロッキングすることができる。カルボキシル基はアセチル基として保護できる。ヒドロキシル基は、テトラヒドロピラニル（THP）、*t*-ブチルジメチルシリル（TBDMS）、1-〔（2-クロロ-4-メチル）フェニル〕-4-メトキシピペリジン-4-イル（Ct mp）、1-（2-フルオロフェニル）-4-メトキシピペリジン-4-イル（Fp mp）、1-（2-クロロエトキシ）エチル、3-メトキシ-1, 5-ジカルボメトキシペンタン-3-イル（MDP）、ビス（2-アセトキシエトキシ）メチル（ACE）、トリイソプロピルシリルオキシメチル（TOM）、1-（2-シアノエトキシ）エチル（CEE）、2-シアノエトキシメチル（CEM）、〔4-（*N*-ジクロロアセチル-*N*-メチルアミノ）ベンジルオキシ〕メチル、2-シアノエチル（CN）、ピバロイルオキシメチル（PivOM）、レヴュニル（*levunyl*）オキシメチル（ALE）等として保護できる。他の代表的なヒドロキシルブロック基については記載がなされている（例えば、Beaucage et al., *Tetrahedron*, 1992, 46, 2223参照）。いくつかの実施形態では、ヒドロキシルブロック基は、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、トリメトキシトリチル、9-フェニルキサンチン-9-イル（ピキシル）及び9-（*p*-メトキシフェニル）キサンチン-9-イル（MOX）等、酸に不安定な基である。化学官能基はまた、それらを前駆体形式で含むことによってブロッキングすることが可能である。このようにして、アジド基は容易にアミンに変換されるので、アミンのブロッキング形式と考えることができる。核酸合成において利用されるさらなる代表的保護基が知られている（例えば、Agrawal et al., *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, Eds.

20

30

40

50

, Humana Press, New Jersey, 1994, Vol. 26, pp. 1-72 参照)。

【0966】

核酸からブロック基を除去する種々の方法が知られ、用いられる。いくつかの実施形態では、全てのブロック基を除去する。いくつかの実施形態では、ブロック基の一部を除去する。いくつかの実施形態では、反応条件は、所定のブロック基を選択的に除去するように調整可能である。

【0967】

いくつかの実施形態では、核酸塩基ブロック基が存在する場合、それは、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の後、酸性試薬で切断可能である。いくつかの実施形態では、核酸塩基ブロック基が存在する場合、それは、酸性条件下でも塩基性条件下でも切断可能ではなく、例えば、フッ化物塩又はフッ化水素酸複合体で切断可能である。いくつかの実施形態では、核酸塩基ブロック基が存在する場合、それは、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の後、塩基又は塩基性溶媒の存在下で切断可能である。ある特定の実施形態では、核酸塩基ブロック基の1つ又は複数は、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の後、塩基又は塩基性溶媒の存在下で切断可能であるが、提供されるオリゴヌクレオチドの構築の間に起こる1つ又は複数の脱保護ステップの特定の条件に対して安定していることを特徴とする。

【0968】

いくつかの実施形態では、核酸塩基にブロック基は必要とされない。いくつかの実施形態では、核酸塩基にブロック基が必要とされる。いくつかの実施形態では、所定の核酸塩基は1つ又は複数のブロック基を必要とし、一方、他の核酸塩基は1つ又は複数のブロック基を必要としない。

【0969】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、合成の後固体支持体から切断される。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、ピリジン中プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、ピリジン中20%プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、無水ピリジン中プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、無水ピリジン中20%プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、アセトニトリル、NMP、DMSO、スルホン、及び／又はルチジン等の極性非プロトン性溶媒の使用を含む。いくつかの実施形態では、固体支持体からの切断は、溶媒、例えば極性非プロトン性溶媒、並びに1つ若しくは複数の一次アミン（例えば、C₁~₁₀アミン）、並びに／又は、1つ又は複数のメトキシルアミン（methoxylamine）、ヒドラジン、及び純無水アンモニアの1つ若しくは複数、の使用を含む。

【0970】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護はプロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護はピリジン中プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護はピリジン中20%プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護は無水ピリジン中プロピルアミンの使用を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの脱保護は無水ピリジン中20%プロピルアミンの使用を含む。

【0971】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、切断中に脱保護される。

【0972】

いくつかの実施形態では、固体支持体からのオリゴヌクレオチドの切断、又はオリゴヌクレオチドの脱保護は、およそ室温で実施する。いくつかの実施形態では、固体支持体からのオリゴヌクレオチドの切断、又はオリゴヌクレオチドの脱保護は、高温で実施する。いくつかの実施形態では、固体支持体からのオリゴヌクレオチドの切断、又はオリゴヌク

いくつかの実施形態では、固体支持体からのオリゴヌクレオチドの切断、又はオリゴヌクレオチドの脱保護は、プロピルアミンの使用を含み、室温又は高温で、0.1時間、1時間、2時間、5時間、10時間、15時間、20時間、24時間、30時間、又は40時間のそれぞれより長く実施する。例示的な条件は、室温で約18時間ピリジン中20%プロピルアミン、及び60℃で約18時間ピリジン中20%プロピルアミンである。

【0976】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

10

(5) 所望の長さを達成するまで(1)～(4)のステップを繰り返すステップと、を含み、キラル制御オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエートジエステル結合又は少なくとも1つの、式I-cの構造を有するヌクレオチド間結合を含む。

【0977】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

20

(5) 所望の長さを達成するまで(1)～(4)のステップを繰り返すステップと、を含み、(1)～(4)のうち少なくとも1つのサイクルはホスホロチオエートジエステル結合を形成する。

【0978】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

30

(5) 所望の長さを達成するまで(1)～(4)のステップを繰り返すステップと、を含み、(1)～(4)のうち少なくとも1つのサイクルは、式I-cの構造を有するヌクレオチド間結合を形成する。

【0979】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

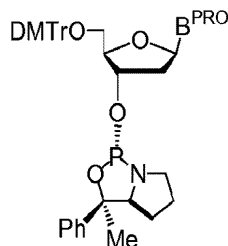
- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

40

(5) 所望の長さを達成するまで(1)～(4)のステップを繰り返すステップと、を含み、

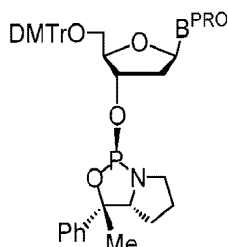
カップリングステップは活性化基及び

【化 3 3 3】



又は

【化 3 3 4】



を含み、式中、 B^{PRO} は保護核酸塩基であり；

キャッピングステップはキラル補助基におけるアミノ基のキャッピング及び未反応 5' -OH のキャッピングを含み；

修飾ステップは結合リンへの $-S-L-R^1$ 基の導入を含み、式中、 L 及び R^1 のそれぞれは互いに独立して上に定義され本明細書に記載される通りである；

脱ブロッキング (de locking) ステップは酸の使用を含む。

【0980】

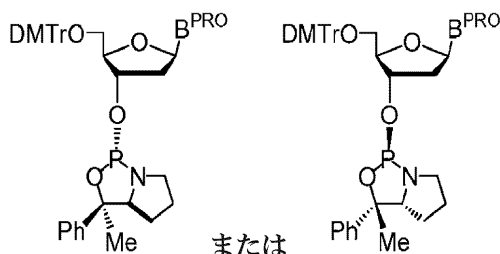
いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

(5) 所望の長さを達成するまで (1) ~ (4) のステップを繰り返すステップと、を含み、

カップリングステップは C M P T 及び

【化 3 3 5】



または

を含み、式中、 B^{PRO} は保護核酸塩基であり；

キャッピングステップはキラル補助基におけるアミノ基のキャッピング及び未反応 5' -OH のキャッピングを含み；

修飾ステップは結合リンへの $-S-L-R^1$ 基の導入を含み、式中、 L 及び R^1 のそれぞれは互いに独立して上に定義され本明細書に記載される通りである；

脱ブロッキング (de locking) ステップは酸の使用を含む。

【0981】

いくつかの実施形態では、活性化剤は「Wada」活性化剤であり、即ち、活性化剤は、上に引用される Wada I、II、又は III 文書のいずれかを拠り所とする。

【 0 9 8 2 】

例示的な活性化基を下に示す：

【 化 3 3 6 】

	X = 非求核性アニオン	X = OTf^- , BF_4^- , PF_6^- , TfN^-		

10

20

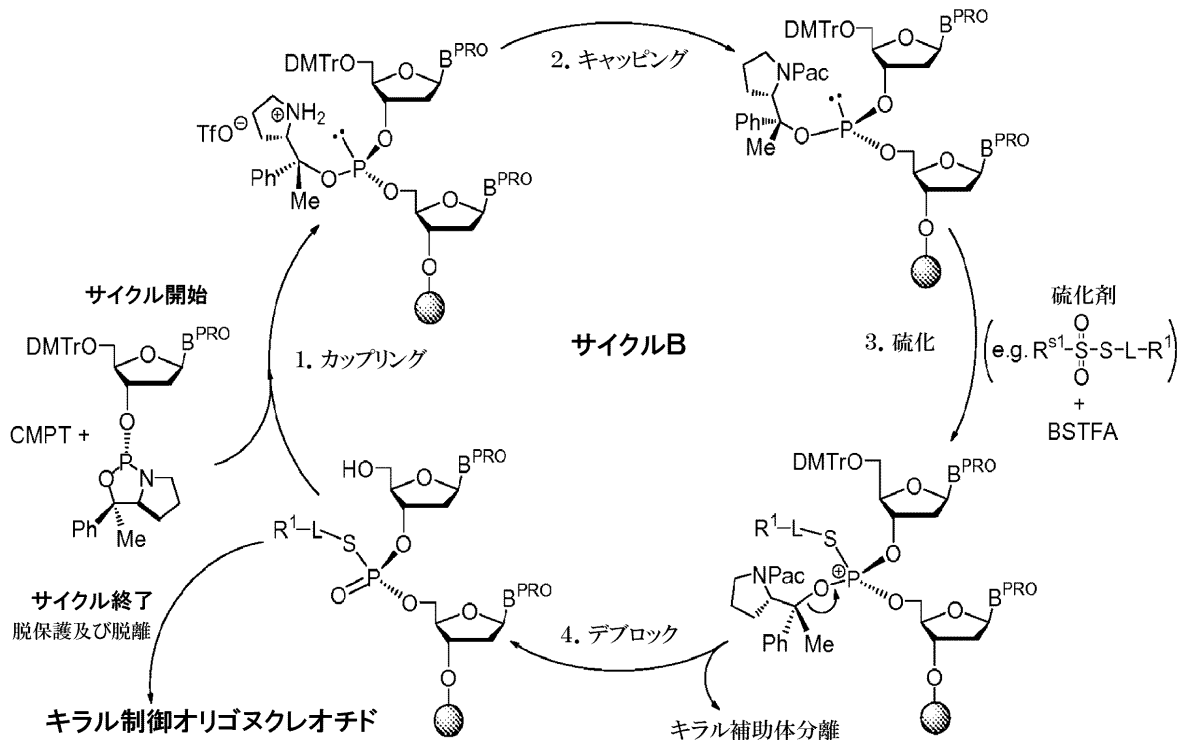
30

【 0 9 8 3 】

例示的なサイクルをスキーム I - b に示す。

スキーム I - b ホスホロチオエート結合の導入

【化 3 3 7】



【0984】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

(5) 所望の長さを達成するまで(1)～(4)のステップを繰り返すステップと、を含み、

キラル制御オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエートジエステル結合又は少なくとも1つの式I-cのヌクレオチド間結合、及び少なくとも1つのリン酸ジエステルヌクレオチド間結合を含み；

少なくとも1つの修飾ステップは、酸化ステップによって置き換えられる。

【0985】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

(5) 所望の長さを達成するまで(1)～(4)のステップを繰り返すステップと、を含み、

キラル制御オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエートジエステル結合又は少なくとも1つの式I-cのヌクレオチド間結合、及び少なくとも1つのリン酸ジエステルヌクレオチド間結合を含み；

少なくとも1つの修飾ステップは、 I_2 の使用を含む酸化ステップによって置き換えられる。

【0986】

例示的サイクルをスキームI-cに示す。

10

20

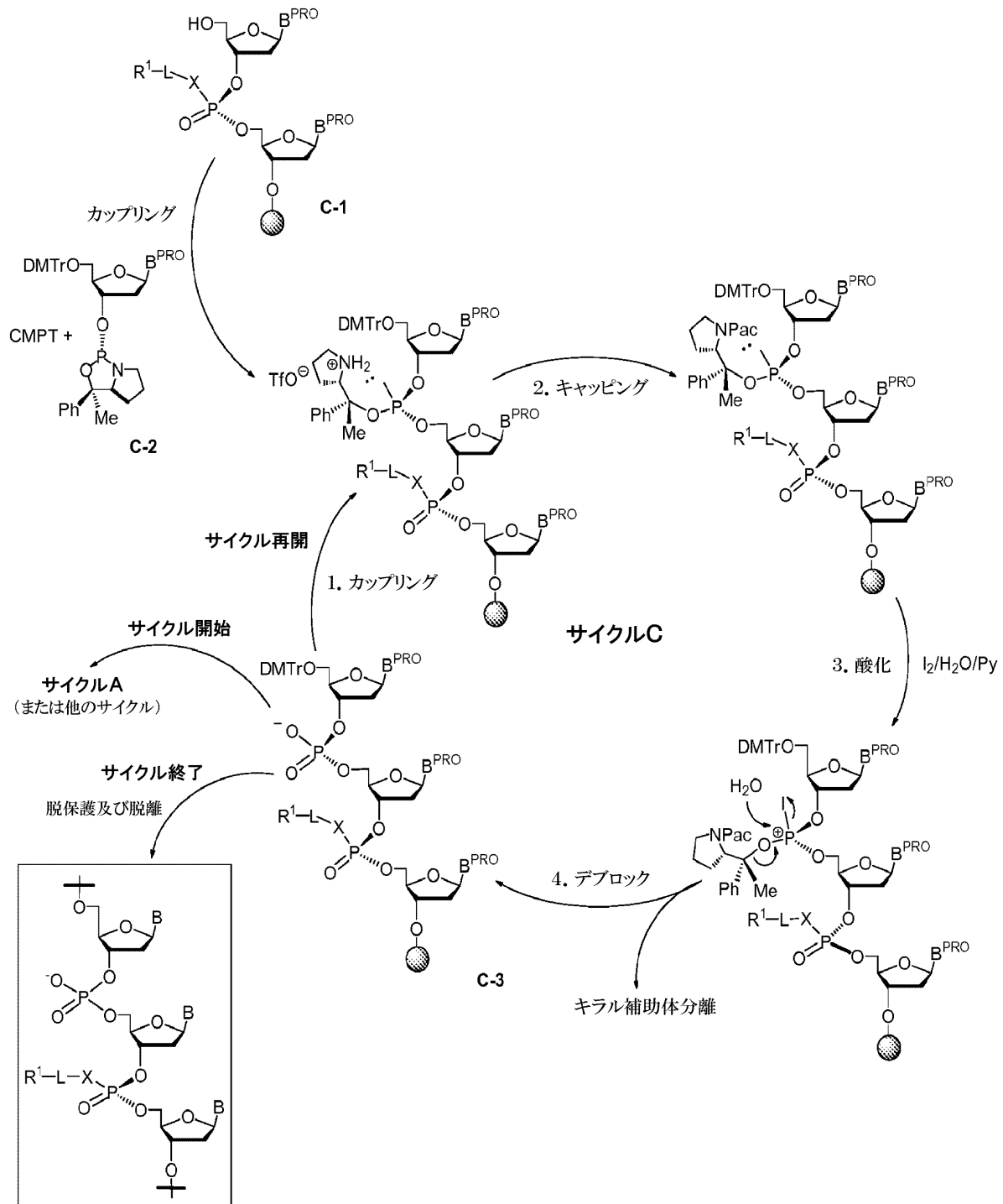
30

40

50

スキーム I - c キラル制御オリゴヌクレオチドにおけるリン酸ジエステル及び修飾ヌクレオチド間結合の両方の導入

【化 3 3 8】



【0987】

スキーム I - c において、固体支持体 (C-1) 上のオリゴヌクレオチド (又はヌクレオチド、又は、修飾ヌクレオチド間結合をもったオリゴヌクレオチド) は、ホスホラミダイト C-2 とカップリングされる。カップリングとキャッピングの後、酸化ステップを実施する。脱ブロッキングの後、リン酸ジエステル結合を形成する。サイクル産物 C-3 は、サイクル C を再開してさらにリン酸ジエステル結合を導入するか、他のサイクルを開始して他のタイプのヌクレオチド間結合を導入するか、又はサイクル終了へと進むか、いずれかとなる。

【0988】

10

20

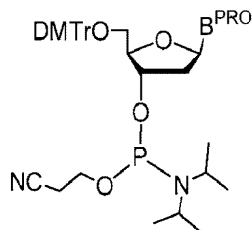
30

40

50

いくつかの実施形態では、非キラル純粋ホスホラミダイトを、スキーム I - c において C - 2 の代わりに用いることができる。いくつかの実施形態では、DMTr で保護した β -シアノエチルホスホラミダイトを用いる。いくつかの実施形態では、用いられるホスホラミダイトは

【化 3 3 9】



10

の構造を有する。

【0989】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

20

(5) 所望の長さを達成するまで (1) ~ (4) のステップを繰り返すステップと、を含み、

キラル制御オリゴヌクレオチドは 1 つ又は複数のホスホロチオエートジエステル結合を含み；

1 つ又は複数のホスホロチオエートジエステル前駆体は、当該ホスホロチオエートジエステル結合のそれぞれに対して形成される。

【0990】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

30

(5) 所望の長さを達成するまで (1) ~ (4) のステップを繰り返すステップと、を含み、

キラル制御オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 つのホスホロチオエートジエステル結合を含み；

1 つ又は複数のホスホロチオエートジエステル前駆体は、当該ホスホロチオエートジエステル結合のそれぞれに対して形成され；

各ホスホロチオエートジエステル前駆体は、所望の長さが達成された後、ホスホロチオエートジエステル結合に変換される。

40

【0991】

いくつかの実施形態では、本発明はキラル制御オリゴヌクレオチドの作製方法を提供し、本方法は、

- (1) カップリングのステップと、
- (2) キャッピングのステップと、
- (3) 修飾のステップと、
- (4) 脱ブロッキングのステップと

(5) 所望の長さを達成するまで (1) ~ (4) のステップを繰り返すステップと、を含み、

50

キラル制御オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエートジエステル結合及び少なくとも1つのリン酸ジエステルヌクレオチド間結合を含み；

少なくとも1つの修飾ステップは、酸化ステップによって置き換えられ；

少なくとも1つの修飾ステップは、ホスホロチオエートジエステル結合のそれぞれになるためのホスホロチオエートジエステル前駆体を導入するように実施され；

各ホスホロチオエートジエステル前駆体は、所望の長さが達成された後、ホスホロチオエートジエステル結合に変換される。

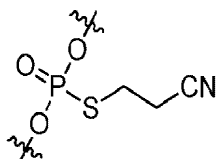
【0992】

いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用は、合成の間、オリゴヌクレオチドの安定性を増加させる。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用はキラル制御オリゴヌクレオチド合成の効率を向上させる。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用はキラル制御オリゴヌクレオチド合成の収率を向上させる。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用はキラル制御オリゴヌクレオチド合成の産物純度を向上させる。

【0993】

いくつかの実施形態では、上記方法におけるホスホロチオエートジエステル前駆体は、

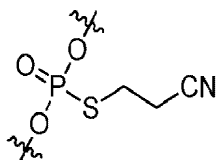
【化340】



20

である。いくつかの実施形態では、

【化341】



は、脱保護／放出の間、ホスホロチオエートジエステル結合に変換される。例示的なサイクルをスキーム I - d に示す。さらに例を下に示す。

30

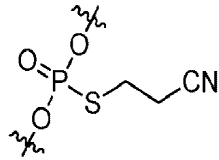
スキーム I - d キラル制御オリゴヌクレオチド合成におけるホスホロチオエートジエステル前駆体

The diagram illustrates a multi-step chemical synthesis of a cyclic phosphonate derivative. The process begins with a nucleoside derivative (a sugar ring with a phosphate group and a nucleobase) reacting with a phosphonate reagent (a phosphonate group with a nucleobase). This is followed by a cyclization step (labeled "1. カップリング") to form a cyclic phosphonate intermediate. This intermediate then undergoes a deprotection step (labeled "2. キャッピング") to yield a nucleoside derivative. The final product is a cyclic phosphonate derivative, which is shown in a box at the bottom left. The reaction scheme also includes labels for "DMTrO", "B^{PRO}", "R¹-L-X", and "S-(CH₂)₂-CN or -O⁻".

40

スキーム I - d に例示する通り、ホスホロチオエート及びリン酸ジエステル結合の両方を、同じキラル制御オリゴヌクレオチドに組み入れることができる。当業者に理解される通り、提供される方法は、ホスホロチオエートジエステルとリン酸ジエステルが連続していることを必要とせず、両者間に他のヌクレオチド間結合が、上に記載のサイクルを用いて形成され得る。スキーム I - d において、ホスホロチオエートジエステル前駆体、

【化 3 4 3】



が、ホスホロチオエートジエステル結合の代わりに導入される。いくつかの実施形態では、かかる置き換えは、所定のステップ、例えば酸化ステップの間、合成効率の向上を提供した。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエートジエステル前駆体の使用は一般的に、合成及び／又は貯蔵の間の、キラル制御オリゴヌクレオチドの安定性を向上させる。サイクルの後、脱保護／放出の間、ホスホロチオエートジエステル前駆体はホスホロチオエートジエステル結合に変換される。いくつかの実施形態では、キラル制御オリゴヌクレオチドにリン酸ジエステル結合が存在しないとき、又は、合成の間酸化ステップが必要でないときでも、ホスホロチオエートジエステル前駆体を用いることは有益である。

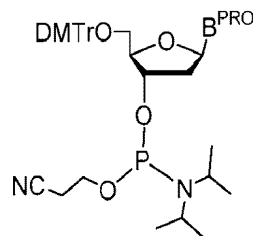
10

【0995】

スキーム I - c にある通り、いくつかの実施形態では、非キラル純粋ホスホラミダイトを、酸化ステップを含むサイクルに用いることができる。いくつかの実施形態では、DMTrで保護されたβ-シアノエチルホスホラミダイトを用いる。いくつかの実施形態では、用いられるホスホラミダイトは

【化 3 4 4】

20



の構造を有する。

【0996】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、特定のオリゴヌクレオチドタイプに濃縮されるキラル制御オリゴヌクレオチド組成物を提供する。

30

【0997】

いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約10%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約20%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約30%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約40%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約50%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約60%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約70%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約80%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約90%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される粗組成物の少なくとも約95%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。

40

【0998】

いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約1%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約2%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約3%は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、

50

提供される組成物の少なくとも約４％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約５％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約１０％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約２０％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約３０％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約４０％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約５０％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約６０％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約７０％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約８０％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約９０％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。いくつかの実施形態では、提供される組成物の少なくとも約９５％は特定のオリゴヌクレオチドタイプである。

10

【０９９９】

生物学的応用

本明細書に詳細に論じられる通り、本発明は他のことに加えてとりわけキラル制御オリゴヌクレオチド組成物を提供し、このことはその組成物が少なくとも１つのタイプのオリゴヌクレオチドを複数含有することを意味する。特定の「タイプ」の各オリゴヌクレオチド分子は、（１）塩基配列、（２）骨格結合のパターン、（３）骨格キラル中心のパターン、及び（４）骨格Ｐ－修飾成分のパターン、の点から予め選択した（例えば、所定の）構造要素からなる。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、単一の合成プロセスで調製されるオリゴヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、単一オリゴヌクレオチド分子（例えば、オリゴヌクレオチドに沿った複数の異なる残基が異なる立体化学を有する）内に１つより多いキラル構成を有するオリゴヌクレオチドを含有し；いくつかの実施形態では、かかるオリゴヌクレオチドは、１つより多いキラル結合をもった個々のオリゴヌクレオチド分子を二次的な結合ステップで生成する必要なく、単一の合成プロセスで得ることができる。

20

【１０００】

本明細書で提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、転写、翻訳、免疫応答、エピジェネティクス等を含み、但しこれらに限定されないいくつかの細胞関連のプロセス及び機構を調節する剤として用いることができる。加えて、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、研究及び／又は診断目的の試薬として用いることができる。当業者は、本明細書の本発明開示は、特定の使用に限定されないが、合成オリゴヌクレオチドの使用が望ましいどのような状況にも応用し得るということを容易に認識するものである。他のことに加えてとりわけ、提供される組成物は、治療、診断、農業、及び／又は研究の種々の用途において有用である。

30

【１００１】

いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に詳細に記載される１つ又は複数の構造的修飾を含むオリゴヌクレオチド及び／又はその残基を含む。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、１つ又は複数の核酸類縁体を含有するオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルホリノ及びロックト（locked）核酸（ＬＮＡ）、グリコン（glycon）核酸（ＧＮＡ）、トレオース核酸（ＴＮＡ）、ゼノ核酸（ＺＮＡ）、並びにそのいずれもの組み合わせ等、但しそれらに限定されない１つ又は複数の人工的核酸又は残基を含有するオリゴヌクレオチドを含む。

40

【１００２】

いずれの実施形態においても本発明は、遺伝子発現、免疫応答等のオリゴヌクレオチドに基づく調節に有用である。したがって、本発明の立体的に規定されるオリゴヌクレオチ

50

ド組成物は、所定のタイプの（即ち、キラル制御されており、任意でキラル純粋である）オリゴヌクレオチドを含有するものであり、従来の立体的にランダム又はキラル不純（*chirally impure*）な相当物の代わりに用いることができる。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、意図する効果の増強及び／又は望ましくない副作用の低減を示す。本発明の生物学的用途及び臨床的／治療的用途のある特定の実施形態は、下に明示的に論じる。

【1003】

種々の投与計画を利用して、提供されるキラル制御オリゴヌクレオチド組成物を投与することが可能である。いくつかの実施形態では、時間の間隔を空けて複数単位用量を投与する。いくつかの実施形態では、所与の組成物は推奨投与計画を有し、これには1回又は複数回の服用が関わる。いくつかの実施形態では、投与計画は、同じ長さの時間によってそれぞれ互いに隔てられる複数回の服用を含み；いくつかの実施形態では、投与計画は複数回の服用と、個々の服用を隔てる少なくとも2つの異なる時間とを含む。いくつかの実施形態では、投与計画内の全ての服用は、単位用量が同じである。いくつかの実施形態では、投与計画内の複数の異なる服用は、量が異なる。いくつかの実施形態では、投与計画は、第1の用量の第1の服用と、それに続く第1の用量とは異なる第2の用量の1回又は複数回の服用を含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、第1の用量の第1の服用と、それに続く第1の服用（又は前の別の服用）の量と同じか又は異なる第2の（又は後続の）用量の1回又は複数回の追加服用を含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、少なくとも1日間に少なくとも1単位用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、少なくとも1日の期間、時には1日より長い期間にわたって1回分より多い用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は少なくとも週の期間にわたって複数回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、期間は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40週間、又はそれ以上（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100週間、又はそれ以上）の期間である。いくつかの実施形態では、投与計画は、1週間より長い間に、1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40週間、又はそれ以上（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100週間、又はそれ以上）の期間に、1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、2週間より長い間に、2週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40週間、又はそれ以上（例えば、約45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100週間、又はそれ以上）の期間に、2週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、1ヶ月間に1ヶ月当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、1ヶ月より長い間に1ヶ月当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月、又はそれより長い間に1ヶ月当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、約10週間に1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、約20週間に1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、約30週間に1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与計画は、26週間に1週間当たり1回分の用量を投与することを含む。いくつかの実施形態で

10

20

30

40

50

20

30

50

チドよりも、単一用量及び／又は総用量が多い量で投与し、それは安全性が向上することによる。

【1005】

生物活性オリゴヌクレオチド

本明細書で使用される、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、一本鎖及び／又は複数鎖のオリゴヌクレオチドを含んでよい。いくつかの実施形態では、一本鎖オリゴヌクレオチドは、使用される一本鎖オリゴヌクレオチドさえも少なくとも部分的に二本鎖の特性を有することができるように、関連条件下でハイブリダイズし得る自己相補性部分を含む。いくつかの実施形態では、提供される組成物に含まれるオリゴヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、又は三本鎖である。いくつかの実施形態では、提供される組成物に含まれるオリゴヌクレオチドは、該オリゴヌクレオチド内に一本鎖部分及び複数鎖部分を含む。いくつかの実施形態では、上記のように、各々の一本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖領域及び複数鎖領域を有することができる。

【1006】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、以下の鎖に完全に又は部分的に相補的な1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む：構造遺伝子、遺伝子制御及び／又は終端領域、及び／又は自己複製系、例えばウイルス又はプラスミドDNA。いくつかの実施形態では、提供される組成物は、siRNA又は他のRNA干渉試薬（RNAi剤又はiRNA剤）、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、自己開裂RNA、リボザイム、その断片及び／又はその変異体（例えば、ペプチジルトランスフェラーゼ23S rRNA、RNase P、グループI及びグループIIイントロン、GIR1分岐リボザイム、レッドザイム、ヘアピンリボザイム、ハンマーヘッド型リボザイム、HDVリボザイム、哺乳動物CPEB3リボザイム、VSリボザイム、glmSリボザイム、CoTCリボザイム等）、マイクロRNA、マイクロRNAミミック、スーパーmir、アプタマー、アンチmir、アンタゴニスト、アンタゴmir、UIアダプター、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、RNAアクチベータ、長鎖非コーディングRNA、短鎖非コーディング（例えば、piRNAs）、免疫調節オリゴヌクレオチド（免疫刺激オリゴヌクレオチド、免疫阻害オリゴヌクレオチド）、GNA、LNA、ENA、PNA、TNA、モルフォルノ、G-四重鎖（RNA及びDNA）、抗ウイルスオリゴヌクレオチド、及びデコイ・オリゴヌクレオチドである、又はそのようなものとして働く、1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1007】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、1又はそれ以上のハイブリッド（例えば、キメラ）オリゴヌクレオチドを含む。本開示の文脈において、「ハイブリッド」という用語は、オリゴヌクレオチドの混合構成成分を広く意味する、ハイブリッドオリゴヌクレオチドは、例えば、（1）混合した種類のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド分子、例えば、単一分子（例えば、DNA-RNA）内の部分的DNA及び部分的RNA；（2）DNA-RNA塩基対形成が分子内又は分子間のいずれか、あるいはその両方で起こるような、異なった種類の核酸の相補対；（3）2又はそれ以上の種類の骨格又は塩基間結合を有するオリゴヌクレオチド、である。

【1008】

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、単一分子内に1種類超の核酸残基を含む1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。例えば、本明細書に記載の実施態様のいずれかでは、オリゴヌクレオチドは、DNA部分及びRNA部分を含み得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、不変部分及び変更部分を含み得る。

【1009】

提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、例えば本明細書に記載の、多数の変更のいずれかを含むオリゴヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、例えば意図した使用の点から特定の変更が選択される。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチド（又は、一本鎖オリゴヌクレオチドの二本鎖部分）の1又は両鎖を変更することが好ましい。いくつかの実施形態では、該二本鎖（又は部分）は、異なった変更を含む。いくつかの実施形態では、該二本鎖は、同一の変更を含む。当業者は、本発明の方法に

よって可能となる変更の程度及び種類が、変更の多数の順列を作成できることを理解するだろう。このような変更の例は、本明細書に記載され、限定されるものではない。

【1010】

RNA干渉

提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、RNA干渉における適用について、他のものの中で有用である。

【1011】

RNA干渉 (RNAi) は、RNA分子による遺伝子発現の阻害を意味する。典型的には、小さな、二本鎖RNA分子が存在する。遺伝子発現はほとんどの細胞プロセスを制御するので、遺伝子発現を阻害する能力は、ヒト及び/又は動物 (例えば、家畜又はペット) の病気を含 10
む生物学的症状を調節するための潜在的に力強いツールを提供する。疾患関連遺伝子発現を調節又は制御することにおけるRNAiの使用を証明するために、多数の研究が行われている。例えば以下参照: Cullen, K.A., Hall, M.J. & Golosinskiy, A. 米国の外来外科ht
tp://www.rxipharma.com/wp-content/uploads/2012/05/Cullen-2009.pdf, 2006. Natl He
alth Stat Report 2009; 1-25; Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Web
er K, Tuschl T., 21ヌクレオチドRNAの二重鎖は培養哺乳動物細胞におけるRNA干渉を介
在する, Nature 2001; 411: 494-498; Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Drive
ri SE & Mello C. カエノラバディティス・エレガンスにおける二本鎖RNAによる強力かつ
特異的RNA干渉, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Pub
Med&dopt=Citation&list_uids=9486653 Nature 1998; 391 (6669): 806-811; Gauglitz, 20
G.G., Kortin, H.C., Pavicic, T., Ruzicka, T., & Jeschke, M.G., 肥厚性瘢痕及び/又
はケロイド: 病理機構及び現代の治療法, Mol Med 2011; 17(1-2): 113-125; Li-Tsang,
C.W., Lau, J.C. & Chan, C.C., 肥厚性瘢痕形成の罹患及び中国人のその特徴, Burns 20
05; 31, 610-616; Wang H, Ghosh A, Baigude H, Yang C, Qui L, Xia L他, 突然変異SOD
1に対する化学的修飾siRNAによって送達された治療的遺伝子サイレンシングがALS進行を
遅延させる, JBC 2008; 283 (23): 15845-15852; Weiser, T.G., Regenbogen, S.E., Tho
mpson, K.D., Haynes, A.B., Lipsitz, S.R., Berry, W.R. & Gawande, A.A., 世界の外
科手術の推定: 入手できるデータに基づくモデル戦略, Lancet 2008; 372(9633): 139-44
。

【1012】

RNA干渉の現象は、最初に、C. elegansにおいて示され、そこではdsRNA分子の挿入が相
補的遺伝子発現を阻害した。siRNAの使用は、遺伝子発現を下方調節するための幅広く使
用されているツールとなっているが、真核生物での天然経路の存在が十分に記載されてい
る。内因性siRNA (又はmiRNA) の起源は、トランスポゾン、ウイルス、反復配列及び遺伝
子でよい。効率的な内因性siRNAを製造するステップは、3つの酵素によって制御されて
いる。RNA依存的RNAポリメラーゼは、一本鎖RNAを二本鎖RNAに変換する。あるいは、DNA
依存的RNAポリメラーゼは、逆側DNA繰り返し配列を転写することによってdsRNAを生成す
る。得られた大きなRNA分子は、リボヌクレアーゼIII (Dicer) による消化に供されて、
短い二本鎖siRNA分子を生成する。アルゴノートタンパク質は、次いで、RISCとして知ら
れている複合体 (RNA誘導サイレンス複合体) を形成するために。siRNA分子に結合されな 40
ければならない。RISCは、二本鎖RNA断片を認識し、該二本鎖を二分割し、RISC複合体中
で一本鎖を維持する。次いで、RISCは、RNA指向DNAメチル化又は標的RNA開裂によって、
エピジェネティクス・サイレンシングを促進することができる。タンパク質翻訳は相当に
ノックダウンされ得るが、siRNAは通常、遺伝子標的の発現を完全に除外しない。従って
、RISCは、RNAのガイド鎖を、その対応する細胞メッセンジャーRNA標的に結合させ、崩壊
させ得る。よって、RNAiは、疾患を引き起こすタンパク質の作製を潜在的に遮断する方
法を提供する。

【1013】

siRNA技術は有用な分子ツールを示す。遺伝子発現を人工的に操作するためのRNA干渉の
使用は、細胞の抗ウイルスメカニズムの活性化によって元々限定されていた。30超のヌ

10

20

30

40

50

クレオチド長の配列への細胞の曝露は、インターフェロン遺伝子発現を誘導して、非特異的RNA分解及び減少したタンパク質合成をもたらす、ことが明らかになっている。しかしながら、この問題は、短い（例えば、19～22ヌクレオチド）siRNA配列によって回避され得る。細胞へのsiRNA送達のための方法は、制限なく、媒体への精製されたりボヌクレオチドのリボソーム型付加、又はsiRNA分子を発現するように設計されたプラスミドベクターのトランスフェクションを含む。プラスミドベクターは、siRNA分子の転写を駆動するために2つのRNAポリメラーゼIIIプロモーター（U6及びH1）の使用に依拠する。標的配列（19～29ヌクレオチド）は、（短いヘアピンRNA又はshRNA）間的小スペーサー群と共にセンス及びアンチセンス方向に配置される。一旦転写されると、Dicerによって認識され開裂され得るヘアピン構造が形成される。あるいは、RNA二本鎖は、ヘアピン構造なしで転写され、RISCによって直接にプロセシングされる。現在、siRNA、shRNA、又は一本鎖siRNA（ss-siRNA）分子を生成するために類似の概念を利用する様々なプラスミド及びウイルスベクターが存在する（例えば、以下を参照：2012 Cell-150-883 Walt Lima等、ssRNAiは動物中でRNAiを活性化する）。

【1014】

いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド組成物は、ss-siRNA又はGalNAc複合化 siRNAとして有用である。

【1015】

本技術は、ツールとしてのsiRNAに影響を与えるある構造的特徴に精通している。siRNAの発見後、siRNA設計に必要とされる最適な特徴を同定するために数々の研究が試みられた。要件の中には、PKR活性化を避けるために30ヌクレオチドより短い配列を用いること、3'末端に対するアンチセンス鎖の5'末端での配列安定性、及びTTオーバーハングを挿入することを含む。これらのような研究に基づいて、所定の遺伝子の最も効率的な標的配列を予測するために、学術的及び工業的研究室によって、多数のアルゴリズムが開発されてきた。これらのプログラムのほとんどは完全ではないが、予測された配列を得る可能性は、推奨された特徴を考慮することなく配列を設計するよりも高い。複数の配列の合成及び試験が必要とされるかもしれない。siRNA実験の設計は、いくつかの潜在的な落とし穴を含むので、好適な制御及び測定可能なエンドポイントを含むように設計がなされるべきである。負の制御は、有効なsiRNA配列と熱力学的に同様な性質を有する非相補的配列を含み得る。プラスミドベクターをトランスフェクトとしてsiRNA又はshRNAを導入する場合には、脂質の核酸に対する割合は同等でよく、制御ベクターは、細胞内で転写されそしてプロセシングされる、配列を含み得る。siRNA効果の評価はまた、RNA及びタンパク質発現の両方を測定することによっても行われ得る。

【1016】

ある実施態様では、本明細書で使用される提供されるオリゴヌクレオチドは、二本鎖である。典型的には、20～23の二本鎖構造、具体的には21塩基対、を含む二本鎖オリゴヌクレオチドは、RNA干渉を誘導する点で特に効果的であると評価されてきた（Elbashir他, EMBO 2001, 20: 6877-6888）。しかしながら、より短い又はより長い二本鎖オリゴヌクレオチドも効果的であることが見出されている。

【1017】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される二本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖構造を形成するようにハイブリダイズできるように十分に相補的である、2つのオリゴヌクレオチド鎖を含む。いくつかの実施形態では、二本鎖は約12～約45塩基対長である。いくつかの実施形態では、二本鎖は約18～約25塩基対長である。いくつかの実施形態では、二本鎖は約19～約24塩基対長である。いくつかの実施形態では、二本鎖は約19～約21塩基対長である。いくつかの実施形態では、二本鎖は約25～約30塩基対長の二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、二本鎖は約10～約15塩基対長の二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、二本鎖は少なくとも約21塩基長である。

【1018】

いくつかの実施形態では、本発明に従って利用される二本鎖オリゴヌクレオチドは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、該アンチセンスRNA鎖は標的配列の少なくとも一部に相補的である相補性の領域を有し、二本鎖領域は約14～約30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、標的配列への相補性領域は、約14～約30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、標的配列への相補性領域は、約18～約25ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、標的配列への相補性領域は、約19～約24ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、標的配列への相補性領域は、約19～約21ヌクレオチド長である。

【1019】

本明細書で使用される用語「アンチセンス鎖」は、対象の標的配列に実質的に又は100%相補性であるオリゴヌクレオチドを意味する。「アンチセンス鎖」という用語は、2つの別々の鎖から形成される両オリゴヌクレオチドのアンチセンス領域、及びヘアピン又はダンベル型構造を形成することができる単分子オリゴヌクレオチドを含む。「アンチセンス」及び「ガイド鎖」という用語は本明細書で交換的に使用される。

【1020】

「センス鎖」という用語は、全部又は一部において、メッセージャーRNA又はDNAの配列のような標的配列と同一のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを意味する。「センス鎖」という用語及び「パッセージャー鎖」は本明細書で交換的に使用される。

【1021】

「標的配列」は、その発現又は活性が調節される任意の核酸配列を意味する。標的核酸は、DNA又はRNA、例えば、内因性DNAもしくはRNA、ウイルスDNAもしくはウイルスRNA、又は遺伝子によってコードされる他のRNA、ウイルス、細菌、真菌、哺乳動物、あるいは植物でよい。いくつかの実施形態では、標的配列は疾患又は障害に関連する。

【1022】

「特異的にハイブリダイズすることができる」及び「相補的」は、核酸が、典型的なワトソンクリック又は他の非典型型のいずれかによって、もう一つの核酸と水素結合（複数）を形成することができることを意味する。本発明の核酸分子と関連して、核酸分子とその相補性配列との結合自由エネルギーは、核酸の関連機能を進行させる、例えば、RNAi活性、には十分である。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は、当該分野では周知である（例えば、Turner 他, 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LIT pp.123-133; Frier他., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA83: 9373-9377; Turner他, 1987, /. Ain. Chem. Soc. 109: 3783-3785参照）。

【1023】

相補性のパーセントは、第二の核酸配列との水素結合（例えば、ワトソンクリック塩基対）を形成できる核酸分子中の連続残基のパーセンテージを示す（例えば、10個のうち5、6、7、8、9、10個は、50%、60%、70%、80%、90%、及び100%相補性である）。「完全に相補性」又は100%相補性は、核酸配列のすべての連続残基が同数の第2核酸配列中の連続残基と水素結合を形成することになる、ことを意味する。完全ではない相補性とは、2つの鎖のヌクレオチド単位の一部、但しすべてではない、が互いに水素結合を形成できる状態を意味する。「実質的に相補性」とは、非相補性であるように選択される、オーバーハングのようなポリヌクレオチド鎖領域を除いて、90%以上の相補性を示すポリヌクレオチド鎖を意味する。特異的結合は、特異的結合が望ましい条件下、例えばインビボアッセイ又は治療方法の場合、又はアッセイが行われる条件下でのインビトロアッセイの場合の生理学的条件下で、オリゴマー化合物の非標的配列への非特異的結合を避けるために十分な相補性の程度を必要とする。いくつかの実施形態では、非標的配列は、対応する標的配列と少なくとも5個のヌクレオチドが異なる。

【1024】

二重鎖オリゴヌクレオチド

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される二重鎖オリゴヌクレオチドは、より小さな二重鎖オリゴヌクレオチド、例えばRNAi剤、を生成するために、内因性分子、例

10

20

30

40

50

えばDicerによって、開裂され得る程に十分大きい。いくつかの実施形態では、提供される二重鎖オリゴヌクレオチドは、標的配列のRISC介在開裂によって標的遺伝子の発現を調節する。

【1025】

いくつかの実施形態では、二重鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖領域は、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、23、24、25、26、27、28、29又は30ヌクレオチド対長であるか、あるいはそれに等しい。

【1026】

いくつかの実施形態では、二重鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖は、少なくとも14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、23、24、25、26、27、28、29又は30ヌクレオチド長であるか、あるいはそれに等しい。

【1027】

いくつかの実施形態では、二重鎖オリゴヌクレオチドのセンス鎖は、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、23、24、25、26、27、28、29又は30ヌクレオチド長であるか、あるいはそれに等しい。

【1028】

いくつかの実施形態では、1つの鎖は、二重鎖領域中に1~5個の一本鎖ヌクレオチドの少なくとも1つのストレッチを有する。「二重鎖領域中に一本鎖ヌクレオチドのストレッチ」とは、一本鎖ストレッチの両末端に少なくとも1つのヌクレオチド塩基対が存在することを意味する。いくつかの実施形態では、2つの鎖は、二重鎖領域中に1~5個（例えば、1、2、3、4又は5個）の一本鎖ヌクレオチドの少なくとも1つのストレッチを有する。2つの鎖が二重鎖領域中に1~5個の一本鎖ヌクレオチドのストレッチを有する時に、このような一本鎖ヌクレオチドは互いに反対であり得るか（例えば、ミスマッチのストレッチ）、あるいは、第2鎖が第1鎖の一本鎖オリゴヌクレオチドに反対の、及びその逆の一本鎖ヌクレオチドを有さないように位置付けられ得る（例えば、一本鎖ループ）。いくつかの実施形態では、一本鎖オリゴヌクレオチドは、いずれかの末端から8ヌクレオチド内、例えば、2つの鎖間の相補性領域の5'又は3'末端のいずれかから8、7、6、5、4、3又は2ヌクレオチド内に存在する。

【1029】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される二重鎖オリゴヌクレオチドの各々の鎖は、その内容はその全体が本明細書に組み込まれる、2004年3月8日に出願された国際特許出願第PCT/US2004/07070号に記載されているように、ZXY構造を有する。

【1030】

ヘアピン及びダンベル

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される二重鎖オリゴヌクレオチドは、自己相補性領域を含む単一分子であり；よって、二重鎖領域の2つの「鎖」は、実際には、互いに共有結合している。このような2つの鎖は、両末端又は1末端のみで互いに結合し得る。1末端での結合は、第1鎖の5'末端が第2鎖の3'末端に結合されるか、又は第1鎖の3'末端が第2鎖の5'末端に結合されることを意味する。この2つの鎖が両末端で互いに結合される時、第1鎖の5'末端は第2鎖の3'末端に結合され、第1鎖の3'末端は第2鎖の5'末端に結合される。いくつかの実施形態では、2つの鎖は、 $(N)_n$ ；Nは、独立に修飾又は非修飾ヌクレオチドであり、nは3~23であるものを含むがこれに限定されないオリゴヌクレオチドリンカーによって一緒に結合される。いくつかの実施形態では、nは、3~10、例えば3、4、5、6、7、8、9又は10である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドリンカーは、GNRA、 $(G)_4$ 、 $(U)_4$ 及び $(dT)_4$ （ここで、Nは修飾又は非修飾ヌクレオチドであり、Rは修飾又は非修飾プリンヌクレオチドである）から成る群より選ばれる。いくつかの実施形態では、リンカー中のヌクレオチドの一部は、リンカー中の他のヌクレオチドとの塩基対相互作用に参与している。いくつかの実施形態では、2つの鎖は、非ヌクレオシドリンカーによって互いに結合されている。

【1031】

いくつかの実施形態では、ヘアピン及びダンベル型RNAi剤は、少なくとも14、15、15、16、17、18、19、29、21、22、23、24又は25ヌクレオチド対又はそれに等しい二重鎖を有する。いくつかの実施形態では、二重鎖領域は、200、100又は50ヌクレオチド対長以下である。いくつかの実施形態では、二重鎖領域の範囲は、約15～約30、約17～約23、約19～約23、及び約19～約21ヌクレオチド対長である。いくつかの実施形態では、ヘアピンオリゴヌクレオチドは、マイクロRNAの天然前駆体を模倣する。

【1032】

いくつかの実施形態では、ヘアピンRNAi剤は、例えばヘアピンのアンチセンス側の3'末端の、一本鎖オーバーハング又は末端不對領域を有し得る。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、約1～約4ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、約2～約3ヌクレオチド長である。

10

【1033】

いくつかの実施形態では、ヘアピンRNAi剤は、アンチセンス鎖の3'末端がセンス鎖の5'末端に結合されていることを特徴とする。いくつかの実施形態では、ヘアピンRNAi剤は、アンチセンス鎖の5'末端がセンス鎖の3'末端に結合されていることを特徴とする。提供されるヘアピンオリゴヌクレオチドは、本明細書において「shRNA」としても言及される。

【1034】

一本鎖オリゴヌクレオチド

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される一本鎖オリゴヌクレオチドは、遺伝子発現産物をコードする「センス」核酸に実質的に相補的、例えば二本鎖cDNA分子のコーディング鎖に相補的であるか、又はRNA配列、例えばプレmRNA、mRNA、miRNA又はプレmiRNAに相補的、である核酸配列を含む。提供される一本鎖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及び一本鎖RNAi剤を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、相補性領域は、約30未満のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、相補性領域は、少なくとも約15未満のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、提供される一本鎖オリゴヌクレオチドは、約10～約25ヌクレオチド長（例えば、約11、12、13、14、15、16、18、19、20、21、22、23又は24ヌクレオチド長）である。いくつかの実施形態では、提供される一本鎖オリゴヌクレオチドは、約25～約30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、提供される一本鎖オリゴヌクレオチドは、約15～約29ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、提供される一本鎖オリゴヌクレオチドは、mRNA、RNA又はDNA arcに対して100%未満の相補性を有することを特徴とする。いくつかの実施形態では、提供される一本鎖オリゴヌクレオチドは、2004年3月8日に出願された国際特許出願第PCT/US2004/07070号に記載されているように、ZXY構造を有する。

20

30

【1035】

いくつかの実施形態では、使用される一本鎖オリゴヌクレオチドは、相補性RNA、例えばmRNA、プレ-mRNAにハイブリダイズすることができ、標的RNA転写物への翻訳機構のアクセスを妨げ、それによってタンパク質合成を阻止することができる。いくつかの実施形態では、提供される一本鎖オリゴヌクレオチドは相補的RNAにハイブリダイズすることができ、RNA標的はRNase H等の酵素によって結果的に開裂され得、そのため、標的RNAの翻訳を阻止する。いくつかの実施形態では、提供される一本鎖オリゴヌクレオチドは、標的配列のRISC介在開裂によって標的遺伝子の発現を調整する。

40

【1036】

本明細書で使用される「一本鎖RNAi剤」は、単一分子から成るRNAi剤である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、鎖内塩基対形成によって形成された二重鎖領域を含む、例えばヘアピン又はフライパンの柄構造であるか又はそれを含む。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、標的分子に関してアンチセンスである。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、RISCに入ることができ、標的mRNAのRISC介在開裂に関与できるくらいに十分に長い。例示的な一本鎖siRNA (ss siRNA) が知られており、例えば参照によって本明細書にその全体が組み込まれる、米国特許出願公開第2006/0166901号に記載されてい

50

る。

【1037】

いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、少なくとも約12ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、少なくとも約15ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、少なくとも約20ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、少なくとも約25ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、少なくとも約29ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、少なくとも約30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、少なくとも約35ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、少なくとも約40ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、少なくとも約50ヌクレオチド長である。

10

【1038】

いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、200未満のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、100未満のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、60未満のヌクレオチド長である。

【1039】

いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は5'リン酸化されている。いくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、5'プライム末端でホスホリルアナログを含む。あるいくつかの実施形態では、一本鎖RNAi剤は、約15～約29ヌクレオチド長の長さを有する。

【1040】

本発明のオリゴヌクレオチドの設計のための標的として使用され得、又は鋳型として働き得る、一本鎖siRNA、マイクロRNA又はmirとして記載された及び/又は特定されたオリゴヌクレオチドを含む一本鎖オリゴヌクレオチドは、例えば、参照として本明細書にその内容全体が組み込まれる、「小非コーディングRNAの調節に使用するためのオリゴヌクレオチド及び組成物」との名称の、Esau他の米国特許出願公開第20050261218 (USSN: 10/909125)に教示されている。

20

【1041】

本発明は、一本鎖オリゴヌクレオチドを含む研究及び/又は診断試薬を包含する。いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される一本鎖オリゴヌクレオチドは、プライマーでありかつ/又はプライマーとして働く。いくつかの実施形態では、プライマーは、核酸を増幅するためにポリメラーゼ連鎖反応（すなわち、PCR）で使用される。これらの適用は、逆転写PCR（RT-PCR）及びリアルタイムPCR等のPCRの任意の公知の変形体を含む。

30

【1042】

マイクロRNA

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、マイクロRNAであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1043】

マイクロRNA（miRNA又はmir）は、植物及び動物のゲノム中のDNAから転写される小RNA分子の高度に保存された種類であるが、タンパク質に翻訳されない。プレマイクロRNAはmiRNAにプロセッシングされる。プロセッシングされたマイクロRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）に組み込まれ、そして、発達、細胞増殖、アポトーシス及び分化の重要な調節因子として同定されている、一本鎖の17～25ヌクレオチド（nt）RNA分子である。それらは、特定のmRNAの3'非翻訳領域に結合することによって遺伝子発現の調節に重要な役割を果たすと考えられている。RISCは、翻訳的阻害、転写開裂又はその両方によって遺伝子発現の下方調節を介在する。RISCはまた、幅広い真核生物の核において転写サイレンシングに関係している。

40

【1044】

マイクロRNAはまた、宿主における病原の調節に関連づけられている。例えば、Jopling, C.L.他, Science (2005) vol. 309, pp 1577-1581参照。理論に拘束されるものではないが、マイクロRNA、マイクロRNAミミック、及び/又は抗マイクロRNAオリゴヌクレオチド

50

の投与は、病原の生存、成長、発育、及び/又は複製の調節をもたらす。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、マイクロRNA、マイクロRNAミミック、及び/又は抗マイクロRNAであり、マイクロRNAは宿主マイクロRNAである。これまでに同定されたmiRNA配列の数は、多数であり、増加しており、その例は、例えば、「miRBase: マイクロRIVA配列、標的及び遺伝子の専門語」Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR, 2006, 34, Database Issue, D140-D144; 「The microRNA Registry」Griffiths-Jones S. NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111に見出される。有用なmiRNAの非限定的な例はまた、添付の添付書類 (C) で提供される。

【1045】

リボザイム

10

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、リボザイムであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1046】

リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特定の触媒的ドメインを有するオリゴヌクレオチドである (Kim and Cech, Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec; 84(24): 8788-92; Forster and Symons, Cell. 1987 Apr 24; 49(2): 211-20)。天然酵素RNAの少なくとも6個の塩基性変形体が現在知られている。一般に、酵素核酸は、標的RNAに最初に結合することによって機能する。かかる結合は、標的RNAを開裂するために働く分子の酵素的部分のすぐそばで維持される酵素核酸の標的結合部分を介して生じる。従って、酵素核酸は、標的RNAを最初に認識し、次いで相補性塩基対形成によって結合し、一旦修正部位に結合すると標的RNAを酵素的に切断するように働く。このような標的RNAの戦略的開裂は、コードされたタンパク質の直接合成するその能力を破壊することになる。酵素核酸がそのRNA標的に結合し、標的を開裂した後に、別の標的を検索するために該RNAから放出され、繰り返し新しい標的に結合し開裂する。

20

【1047】

任意の標的配列を標的とするリボザイムを製造する方法は当該分野で知られている。リボザイムは、特に国際特許出公開第WO 93/23569号、及び同第WO 94/02595号に記載されているように設計され得る (各々が具体的に参照によって本明細書に組み込まれており、そこに記載されているようにインビトロ及びインビボで試験されるように合成される)。

【1048】

アプタマー

30

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、アプタマーであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1049】

アプタマーは、高親和性及び特異性を有する対象の特定の分子に結合する核酸又はペプチド分子である (Tuerk and Gold, Science 249:505 (1990); Ellington and Szostak, Nature 346: 818 (1990))。大きなタンパク質から小さな有機分子まで多数の異なった物質に結合するDNA又はRNAアプタマーが成功的に製造されている。Eaton, Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 10-16 (1997), Famulok, Curr. Opin. Struct. Biol. 9: 324-9(1999)、及びHermann and Patel, Science 287: 820-5 (2000)参照。アプタマーはRNA型でもDNA型でもよい。一般的に、アプタマーは、様々な分子標的、例えば低分子、タンパク質、核酸、及び更には細胞、組織及び生物に結合するように、インビトロ選択又は同等の反復、すなわちセレックス (SELEX) (試験管内人工進化法) によって作製される。セレックス法は、標的タンパク質又は他の分子での結合親和性に基づいて、一本鎖オリゴヌクレオチドが莫大な配列ライブラリーから選択される、プロトコールである (C. Tuerk, L. Gold, Science, 249 (1990), pp. 505-510; R. Green, A.D. Ellington, D.P. Bartel, J.W. Szostak, Methods Enzymol., 2 (1991), pp. 75-86; L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, M. Yarus, Annu. Rev. Biochem., 64 (1995), pp. 763-797)。セレックス法は、通常、数 10^{14} ~ 10^{15} のランダムオリゴヌクレオチド配列から成るRNA又はDNAライブラリーで開始される。十分にランダム化されたオリゴヌクレオチドライブラリーでは、各々の分子は、該

40

50

分子のヌクレオチド配列に依拠することになる特有の三次構造を示すだろう。標的タンパク質に対する該オリゴヌクレオチドの結合親和性は、オリゴヌクレオチド表面上の部分と標的タンパク質上のエピトープとの間の適合によつて決定されることになる。広大な多様性のライブラリーから開始した結果として、標的タンパク質に対するnM又はsub-nM親和性、及び高度の構造的ホモロジーを有する他のタンパク質を超える標的タンパク質に対する選択性を有するアプタマーを同定することが通常可能である (K.W. Uphoff, S.D. Bell, A. D. Ellington, Curr. Opin. Struct. Biol., 6 (1996), pp. 281-288)。セレックス法を用いて、RNA又はDNAアプタマーは、多数のタンパク質、ペプチド及びドーパミンを含む低分子 (C. Mannironi, A. Di Nardo, P. Fruscoloni, G.P. Tocchini-Valentini, Biochemistry, 36 (1997), pp. 9726-9734)、物質P (D. Nieuwlandt, M. Wecker, Biochemistry, 34 (1995), pp. 5651-5659)、サブチリシン (H. Takeno, S. Yamamoto, T. Tanaka, Y. Sakano, Y. Kikuchi, J. Biochem., 125 (1999), pp. 1115-1119)、成長因子由来の血小板 (L.S. Green, D. Jellinek, R. Jenison, A. Ostman, C-H. Heldin, N. Janjic Biochemistry, 35 (1996), pp. 14413-14424)、血管内皮細胞成長因子 (L.S. Green, D. Jellinek, C. Bell, L.A. Bebe, B.D. Feistner, S.C. Gill, F.M. Jucker, N. Janjic Chem. Biol., 2 (1995), pp. 683-695)、トロニン (L.C. Bock, L.C. Griffen, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole, Nature, 355 (1992), pp. 564-566)、及びL-セレクチン (D. O'Connell, A. Koenig, S. Jennings, B. Hicke, H.L. Han, T. Fitzwater, Y. F. Chang, N. Varki, D. Parma Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (1996), pp. 5883-5887) に作製されている。

10

20

【1050】

長い間、Dua他 (2008) Recent Patents on DNA & Gene Sequences, 2: 172-186 (本明細書に参照として組み込まれる) でより詳細にレビューされているように、多数の修正セレックスプロトコルが開発されている。修正セレックス法の非限定的な例は、以下の刊行物に記載されている：カウンターセレックス (US5580737)、フローセルセレックス (WO 9833941)、切断セレックス (WO0056930)、融合セレックス (US5683867)、転写 (Transcription) 無しセレックス (US20026387620)、溶液セレックス (US5567588)、キメラセレックス (WO9604403)、組織セレックス (US20026376474)、フォトセレックス (US6001577)、トグルセレックス (US20077312325)、共有結合セレックス/ケミセレックス (US5763595)、ゲノムセレックス (US20016261774)、精製タンパク質無しのセレックス (WO0224954)、CE-セレックス (WO03102212)、鏡像セレックススピア

30

ゲルマー (EP1386972)、及びレーザーセレックス、DeSELEX (WO07035532) (その各々が参照として本明細書にその全体として組み込まれる)。本発明によって包含される立体が特定されたオリゴヌクレオチドは、任意の1又はそれ以上のセレックス法の変形体で使用され得る。

【1051】

アプタマーは、合成、組換え及び精製方法を含む任意の公知の方法によって調製され得、単独で、又は同一の標的に特異的な他のアプタマーと組み合わせて使用され得る。更に本明細書でより十分に記載されるように、「アプタマー」という用語は、具体的には、2又はそれ以上の公知のアプタマーを所定の標的と比較することから得られるコンセンサス配列を含む「二次的アプタマー」を含む。アプタマーは、それらを魅力的な治療剤にするいくつかの特徴を有する。DNAとRNAアプタマーの両方は、低ピコモルから低ナノモルの解離定数 (Kd) でその標的と結合することが示されている。アプタマーの結合は、共通の構造的ドメインを共有する関連タンパク質を識別さえできる高い特異的な相互作用である。アプタマーと抗体との両方の結合親和性は同じ程度であるが、多くの事例でその競争者を圧倒する多数の追加の特徴を有する。抗体とは異なり、アプタマーは、非免疫原性標的に対してさえ標的化することができる。アプタマーは、合成中に、その安定性及び薬物動力学を改善する化学修飾に容易に供され得る。アプタマーは、内因性分子への類似に因って、治療的量でゼロか又は無視できる免疫原性レベルを示す。

40

【1052】

50

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、抗病原剤、例えば、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌剤等として有用である。ウイルス及び細菌等の様々な病原菌のための好適な標的が、既に報告されている。例えば、各々が参照によって本明細書に全体的に組み込まれる、米国特許第5726017号、同第5654151号、同第5496938号、同第5503978号、同第5587468号、同第5527894号、米国特許出願公開第2005233317号、米国特許第5496938号、国際特許出願公開第W008 066231号、日本特許出願公開第2002165594号、国際特許出願公開第W002081494号、米国特許第5861501号、国際特許出願公開第W09720072号、米国特許第5475096号、同第6569630号、中国特許出願公開第101109013号、及び国際特許出願公開第W003106476号を参照。

【1053】

10

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、抗癌剤であるか又はそれとして働く。任意の公知の癌-又は腫瘍-関連因子、例えば、構造的タンパク質及び情報伝達分子を含む、細胞分割又は増殖、細胞周期進行、アポトーシス、細胞移動、DNA修復等の調節に関連するタンパク質が、アプタマーによって標的化され得る。例えば、各々が参照として本明細書にその全体として組み込まれる、オーストラリア特許第775412号、米国特許第6232071号、国際特許出願公開第W0 08/028534号、米国特許第6933114号、国際特許出願公開第W0 04/081574号、オーストラリア特許第242462号、米国特許第6995249号、同第5668264号、同第6699843号、国際特許出願公開第W0 04/094614号、及び米国特許第5846713号を含むが、これらに限定されない。

【1054】

20

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、抗血管新生薬であるか又はそれとして働く。抗血管新生薬の非限定的な例は、VEGF及び関連受容体 (associates receptors)、並びに細胞外液マトリックス又は接着分子である。例えば、各々が参照として本明細書にその全体として組み込まれる、米国特許第6051698号、米国特許出願公開第2003175703号、W0 95/21853及び米国特許第7094535号参照。

【1055】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、抗凝血性薬であるか又はそれとして働く。血液凝固因子及びその機能、並びにプロセッシング等のタンパク質調節については多くが知られている。アプタマーは、心血管疾患及び血液凝固障害等の症状を治療する際の1又はそれ以上の因子を標的とする点で有用である。例えば、その各々が参照として本明細書にその全体として組み込まれる、国際特許出願公開第W0 06/033854号、米国特許第5543293号、国際特許出願公開第W0 07/025049号、米国特許第6774118号、国際特許出願公開第W0 07/140000号を参照。

30

【1056】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、免疫調節剤であるか又はそれとして働く。アプタマーは、自己免疫疾患に関連した免疫調節分子を標的化するように作製されている。本発明は、T細胞及び抗原提示細胞 (APC) 等の免疫細胞上で発現された分子を標的化するために有用であり得る。例えば、各々が参照として本明細書に全体的に組み込まれる、米国特許第5869641号、国際特許出願公開第W0 01/09160号参照。いくつかの実施形態では、C1、C4、C2、C3及びC5等の補体系に関連する分子は、アプタマーによって標的化され得る。補体系は、多数の腎臓の、リウマチ学的、神経の、皮膚の、血液の、アレルギーの、感染性の及び他の疾患に関連している。例えば、各々が参照として本明細書に全体的に組み込まれる、国際特許出願公開第W0 97/28178号及び同第W0 07/103549号参照。他の免疫関連標的は、IL-12、IL-23及びIL-28 (例えば、参照として本明細書に全体的に組み込まれる、国際特許出願公開第W0 07/035922号参照)、IgE (例えば、参照として本明細書に全体的に組み込まれる、国際特許出願公開第W0 05/113813号参照)、Sp-1及びSp1-、CD28、IL-2、GM-CSF (例えば、参照として本明細書に全体的に組み込まれる、米国特許第6994959号)、SDF-1、CXCR4 (例えば、参照として本明細書に全体的に組み込まれる、国際特許出願公開第W0 08/009437号参照)、IL-6、IL-12、IFN γ (例えば、各々が参照として本明細書に全体的に組み込まれる、米国特許第6589940号

40

50

及び米国特許出願公開第2003125279号参照)、及びTLRを含むが、これらに限定されない。立体が特定されたアプタマーは、このよう疾患に対して改善された効果を発揮し得る。

【1057】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、抗炎症剤であるか又はそれとして働く。炎症性疾患、例えば急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、感染性ショック、肺気腫症、嚢胞性線維症、関節リウマチ及び慢性気管支炎は、その病因に関連する好中球エラスターゼを有する。そのため、ヒトエラスターゼは、炎症を調節するアプタマーを用いるこのような疾患を治療するための標的である。他の好適な標的は、ホスホリパーゼA2、例えば非膵分泌性PLA2(参照として本明細書に全体的に組み込まれる、国際特許出願公開第WO 96/27604号参照)、E-、P-及びL-セレクチン(参照として本明細書に全体的に組み込まれる、米国特許第5780228号参照)、3つの相同C-型レクチン、白血球、内皮細胞及び血小板他等の細胞で発現される細胞接着分子; MCP-1(参照として本明細書に全体的に組み込まれる、国際特許出願公開第WO 07/093409号参照)、NF- κ B及びNF-IL6(参照として本明細書に全体的に組み込まれる、国際特許出願公開第WO 00/24404号参照)を含むが、これらに限定されない。立体が特定されたアプタマーは、このよう疾患に対して改善された効果を発揮し得る。

【1058】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、伝達性海綿状脳症(TSE)、及びアルツハイマー病を含むが、これらに限定されない、特定の脳疾患を治療するために有用である。公知の標的は、各々が参照として本明細書に全体的に組み込まれる、国際特許出願公開第WO 2006/138676号及びドイツ特許出願公開第19916417号、及び国際特許出願公開第WO 08/008884号を含む刊行物に記載されている。立体が特定されたアプタマーは、このよう疾患に対して改善された効果を発揮し得る。

【1059】

デコイ・オリゴヌクレオチド

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、デコイ・オリゴヌクレオチドであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1060】

転写因子はその比較的短い結合配列を認識するので、周囲のゲノムDNAの非存在下でさえも、特定の転写因子のコンセンサス結合配列を有する短いオリゴヌクレオチドは、生細胞中での遺伝子発現を操作するためのツールとして使用され得る。この戦略は、その後認識され、標的因子によって結合される、「デコイ・オリゴヌクレオチド」のような細胞内送達を含む。該デコイによる転写因子のDNA結合部位の占有は、転写因子を、標的遺伝子のプロモーター領域に結果的に結合できなくさせる。デコイは、転写因子によって活性化される遺伝子の発現を阻害するか、又は転写因子の結合によって抑制される遺伝子を上方調節するかのいずれかのための、治療剤として使用され得る。デコイ・オリゴヌクレオチドの利用の例は、参照としてその全体が本明細書に明らかに組み込まれるMann et al., J. Clin. Invest., 2000, 106: 1071-1075に見出される。

【1061】

miRNAミミック

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、miRNAミミックであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1062】

miRNAミミックは、1又はそれ以上のmiRNAの活性を調節する遺伝子を模倣するために使用され得る1種の分子を表す。従って、「マイクロRNAミミック」という用語は、RNAi経路に入り、遺伝子発現を調節することができる合成非コーディングRNA(すなわち、miRNAは、内因性miRNAの起源から精製によって得られない)を意味する。miRNAミミックは、成熟分子(例えば、一本鎖)又は模倣前駆体(例えば、プリ-又はプレ-miRNA)として設計され得る。

【1063】

いくつかの実施形態では、miRNAミミックは、二本鎖分子（例えば、約16～約31ヌクレオチド長の二重鎖領域を有する）であり、所定のmiRNAの成熟鎖との同一性を有する1又はそれ以上の配列を含む。

【1064】

いくつかの実施形態では、miRNAミミックは、約16～約31ヌクレオチドの二重鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、提供されるmiRNAミミックは、以下の化学的修飾パターンの1又はそれ以上を含んでよい：センス鎖が（センスオリゴヌクレオチドの5'末端から数えて）ヌクレオチド1及び2の2'-O-メチル修飾、並びにC及びUの全てを含む；アンチセンス鎖修飾がC及びUの全ての2'F修飾、該オリゴヌクレオチドの5'末端のリン酸化、及び2ヌクレオチド3'オーバーハングと関連した安定化ヌクレオチド間結合を含む。

10

【1065】

スーパーmir

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、スーパーmirであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1066】

スーパーmirは、miRNAと実質的に同一であり、その標的に関してアンチセンスである、核酸配列を有する、オリゴヌクレオチド、例えば一本鎖、二本鎖又は部分的に二本鎖のオリゴヌクレオチドを意味する。該用語は、同様に機能する少なくとも1つの非天然部分を含むオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、スーパーmirは、センス鎖を含まない。いくつかの実施形態では、スーパーmirは、顕著な程度には自己ハイブリダイズしない。いくつかの実施形態では、スーパーmirは、二次構造を有するが、生理学的条件下では実質的に一本鎖である。実質的に一本鎖であるスーパーmirは、スーパーmir約の50%未満（例えば、約40%、30%、20%、10%又は5%未満）がそれ自体二重鎖である程度に一本鎖である。スーパーmirは、ヘアピン断片を含み得、例えば3'末端の配列は好ましくは自己ハイブリダイズし、二重鎖領域、例えば少なくとも1、2、3又は4、好ましくは8、7、6又は5ヌクレオチド、例えば5ヌクレオチドの二重鎖を形成し得る。二重鎖領域は、リンカー、例えばヌクレオチドリンカー、例えば3、4、5又は6dT、例えば修飾dTによって結合され得る。いくつかの実施形態では、スーパーmirは、例えばスーパーmirの非末端もしくは中央の3'及び5'末端の両方又はそのいずれかで、例えば5、6、7、8、9又は10ヌクレオチドの長のより短いオリゴヌクレオチドで二重化される。

20

30

【1067】

アンチマー又はmiRNA阻害剤

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、アンチマー又はmiRNA阻害剤であるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1068】

「アンチマー」、「マイクロRNA阻害剤」、又は「miR阻害剤」という用語は同義であり、特定のmiRNAの活性を妨げるオリゴヌクレオチド又は修飾オリゴヌクレオチドを意味する。阻害剤は、一本鎖、二本鎖（RNA/RNA又はRNA/DNA二本鎖）、及びヘアピン設計を含む、様々な構造を採用し得る。いくつかの実施形態では、マイクロRNA阻害剤は、標的とするmiRNAの成熟鎖（又は複数の成熟鎖）と完全に又は部分的に相補性である、配列の1又はそれ以上の配列又は部分を含む。いくつかの実施形態では、miRNA阻害剤は、成熟miRNAの逆補体である配列に5'及び3'に位置する追加された配列を含む。更なる配列は、成熟miRNAが由来するプリmiRNA中の成熟miRNAに隣接する、配列の逆補体でよく、あるいは更なる配列は、（A、G、C、U又はdTの混合物を有する）任意の配列でよい。いくつかの実施形態では、更なる配列の1又は両方は、ヘアピンを形成することができる任意の配列である。従って、いくつかの実施形態では、miRNAの逆補体である配列は、ヘアピン構造によって5'側及び3'側に隣接される。いくつかの実施形態では、マイクロRNA阻害剤は二本鎖である。いくつかの実施形態では、マイクロRNA阻害剤は二本鎖であり、反対鎖のヌクレオチド間にミスマッチを含む。いくつかの実施形態では、マイクロRNA阻害剤は、細胞への阻害剤の取り込みを促進するために、複合体部分と連結される。

40

50

【1069】

ヘアピンmiRNAを含むマイクロRNA阻害剤は、各々が参照として本明細書に全体的に組み込まれる、Vermeulen他, "Double-Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of RISC Function," RNA 13: 723-730 (2007)、及び国際特許出願公開第W02007/095387号及び同第W0 2008/036825号に詳述されている。

【1070】

miRNA型療法の例示的な適用は、その内容が参照によって本明細書に組み込まれる、Pan 他 (2007) World J Gastroenterol 13(33): 4431-36, “小RNAに基づくC型肝炎の新規治療機会”に記載されている。要するに、著者は、肝臓特異的発生調節因子である、hcr遺伝子の非コーディングポリアデニル化RNA転写物から得られた22ヌクレオチドの成熟miR-122を記載している。miR-122はHCVウイルス複製に関連する肝臓特異的miRNAであるので、miR-122のサイレンシングはHCVの治療のために有用であり得る。

【1071】

アンタゴmir

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、アンタゴmirであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1072】

アンタゴmirは、RNアーゼ保護及び亢進された組織及び細胞取り込み等の薬理的性質のための様々な修飾を有するRNA様オリゴヌクレオチドである。それらは、例えば、完全な糖の2'-O-メチル化、チオリン酸エステル糖間結合、例えば3'末端でのコレステロール部分で、通常のRNAとは異なる。いくつかの実施形態では、アンタゴmirは、全てのヌクレオチドでの分子の2'-O-メチル修飾、3'末端でのコレステロール部分、5'末端での最初の2つ位置での2つのチオリン酸エステル糖間結合、及び3'末端での4つのチオリン酸エステル結合を含む。アンタゴmirは、アンタゴmir及び内因性miRNAを含む二重鎖を形成することによって内因性miRNAを効率的に発現停止(silence)するために使用され得、それによって、miRNA誘導遺伝子サイレンシングを阻害することができる。アンタゴmir介在miRNAサイレンシングの例は、参照としてその全体が本明細書に組み込まれる、Krutzfeldt他, Nature, 2005, 438: 685-689に記載のmiR-122のサイレンシングである。

【1073】

修飾単一オリゴヌクレオチド変形体

典型的には、2つの構成要素、すなわちRNAi関連タンパク質による認識のために必要とされる二本鎖核酸モチーフ、及びRISCのアルゴノート触媒的タンパク質において補助因子に結合するmRNAとして働くガイド鎖、が、RNAi機構を活性化するために要求される。より最近では、部分的に相補的な二重鎖に自己重合することができる1つの短い(25~28 nt)オリゴから成る新規な種類のRNAi分子が開発されている。これらの分子は、RISCを効率的に活性化し、有力な慣用的RNAi分子で得られるものに匹敵する標的mRNAサイレンシングを生成する、ことが証明された。例えば、参照としてその全体が本明細書に組み込まれる、Lapierre他, “単一オリゴヌクレオチド化合物を用いる有力かつ系統的なRNAi介在サイレンシング” RNA 2011; 17:00参照。また、参照としてその全体が本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開第W0 2010/090762号 “追加の機能性のための一本鎖チオリン酸エステルヌクレオチド領域を有するRNA二重鎖”(PCT/US2010/00348)参照。

【1074】

従って、本発明は、チオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域を含むRNAiコンストラクト、及び遺伝子サイレンシングにおけるこのようなコンストラクトの使用を含む。

【1075】

いくつかの実施形態では、本発明は、ガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を利用し、ここで、該パッセンジャー鎖は、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域に開裂可能なリンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、本発明は、ガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む単離された二

10

20

30

40

50

本鎖核酸分子を利用し、ここで、ガイド鎖及びパッセンジャー鎖の少なくとも1つは、少なくとも6つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域に開裂可能なリンカーによって結合されている。

【1076】

いくつかの実施形態では、本発明は、ガイド鎖及びパッセンジャー鎖を有する単離された二本鎖核酸分子を利用し、ここで、ガイド鎖及びパッセンジャー鎖の少なくとも1つは、少なくとも3つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域に開裂可能なリンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、二本鎖核酸分子は、以下の性質のうちの少なくとも1つを含む。パッセンジャー鎖は、8~18ヌクレオチド長であり得る。核酸は少なくとも1つの2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾を有し得る。開裂可能な結合は、ヌクレオチド結合以外であり得る。核酸は脂肪親和性基を含み得る。ガイド鎖は、16~18ヌクレオチド長又は26~18ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域はガイド鎖に結合される。

【1077】

いくつかの実施形態では、開裂可能な結合は、1又はそれ以上の非修飾ヌクレオチドを含む。他の実施態様では、開裂可能なリンカーは、ホスホジエステル結合である。ある実施態様では、開裂可能なリンカーはS-Sである。いくつかの実施形態では、開裂可能なリンカーは、DNA又はRNAである。少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域は、パッセンジャー鎖の3'又は5'末端のいずれかにあってよい。いくつかの実施形態では、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域は、DNAであるが、他の実施態様においてはRNAである。

【1078】

いくつかの実施形態では、核酸分子の二本鎖領域は完全な二重鎖である。他の実施態様では、二本鎖領域は少なくとも1つのバルジ領域を含む。いくつかの実施形態では、パッセンジャー鎖は、分子の二本鎖領域内にニックを含む。二本鎖領域は、チオリン酸エステル修飾されている少なくとも1つのヌクレオチドを含んでよい。

【1079】

本発明に従って使用される核酸分子は、化学的に修飾されてよい。ある実施態様では、化学修飾は2'-O-メチル及び/又は2'-フルオロである。いくつかの実施形態では、1超の化学修飾が同一分子に存在する。いくつかの実施形態では、化学修飾は、安定性を増加させ、免疫調節の回避を増加させ、及び/又はオフターゲット遺伝子サイレンシングを阻害する。化学修飾は、パッセンジャー鎖及び/又はガイド鎖上に存在し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域は、細胞において核酸分子の二本鎖領域から開裂される。いくつかの実施形態では、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域は、哺乳動物遺伝子に対する相補性を有する。ある実施態様では、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域は、アンチセンス分子として機能する。二本鎖領域は、少なくとも19ヌクレオチド長でよい。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、少なくとも12ヌクレオチド長である。

【1080】

いくつかの実施形態では、本発明は、RNA干渉で機能する二本鎖領域、及びアンチセンスに機能する一本鎖領域を含む二官能性核酸分子であって、該二本鎖領域がガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含み、該二本鎖領域及び一本鎖領域が開裂可能なリンカーによって結合されている、二官能性核酸分子を利用する。いくつかの実施形態では、開裂可能なリンカーは、1又はそれ以上の非修飾ヌクレオチドを含む。他の実施態様では、開裂可能なリンカーは、ホスホジエステル結合である。ある実施態様では、開裂可能なリンカーはS-Sである。いくつかの実施形態では、開裂可能なリンカーはDNA又はRNAである。

【1081】

いくつかの実施形態では、本発明は、哺乳動物細胞中の標的遺伝子の発現を阻害するための方法であって、哺乳動物細胞を、ガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む単離された二

本鎖核酸分子と接触させることを含み、該パッセンジャー鎖が少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域に開裂可能なリンカーによって結合される、方法に関する。いくつかの実施形態では、開裂可能なリンカーは、1又はそれ以上の非修飾ヌクレオチドを含む。他の実施態様では、開裂可能なリンカーはホスホジエステル結合である。ある特定の実施態様では、開裂可能なリンカーはS-Sである。いくつかの実施形態では、開裂可能なリンカーはDNA又はRNAである。

【1082】

いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドを含み、パッセンジャー鎖の3'又は5'末端のいずれかでよい。いくつかの実施形態では、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域はDNAであり、他の実施態様ではRNAである。いくつかの実施形態では、核酸分子の二本鎖領域は完全な二重鎖である。他の実施態様では、二本鎖領域は、少なくとも1つのバルジ領域を含む。いくつかの実施形態では、パッセンジャー鎖は、分子の二本鎖領域内にニックを含む。二本鎖領域は、チオリン酸エステル修飾されている少なくとも1つのヌクレオチドを含んでよい。

【1083】

本発明に従って使用される核酸分子は、化学的に修飾され得る。ある実施態様では、化学修飾は、2'-O-メチル及び/又は2'-フルオロである。いくつかの実施形態では、1超の化学修飾が同一の分子に存在する。いくつかの実施形態では、化学修飾は、安定性を増加させ、免疫調節の回避を増加させ、及び/又はオフターゲット遺伝子サイレンシングを阻害する。化学修飾は、パッセンジャー鎖及び/又はガイド鎖上に存在し得る。

【1084】

いくつかの実施形態では、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域は、細胞において核酸分子の二本鎖領域から開裂される。いくつかの実施形態では、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域は、哺乳動物遺伝子に対する相補性を有する。ある実施態様では、少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域は、アンチセンス分子として機能する。二本鎖領域は、少なくとも19ヌクレオチド長でよい。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、少なくとも12ヌクレオチド長である。

【1085】

いくつかの実施形態では、本発明は、哺乳動物細胞中の標的遺伝子の発現を阻害するための方法であって、哺乳動物細胞を、ガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子と接触させることを含み、該ガイド鎖が少なくとも8つのチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドの一本鎖領域に開裂可能なリンカーによって結合される、方法に関する。いくつかの実施形態では、開裂可能なリンカーは、1又はそれ以上の非修飾ヌクレオチドを含む。他の実施態様では、開裂可能なリンカーはホスホジエステル結合である。ある実施態様では、開裂可能なリンカーはS-Sである。いくつかの実施形態では、開裂可能なリンカーはDNA又はRNAである。

【1086】

いくつかの実施形態では、本発明は、哺乳動物細胞中の標的遺伝子の発現を阻害する方法であって、哺乳動物細胞を、RNA干渉で機能する二本鎖領域、及びアンチセンスに機能する一本鎖領域を含む二官能性核酸分子と接触させることを含み、該二本鎖領域がガイド鎖及びパッセンジャー鎖を含み、該二本鎖領域及び一本鎖領域が開裂可能なリンカーによって結合されている、方法に関する。他の態様では、哺乳動物細胞中の標的遺伝子の発現を阻害する方法が提供される。該方法は、哺乳動物細胞を、本明細書に記載のT単離された二本鎖核酸分子の任意と接触させることを含む。

【1087】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される単離された二本鎖核酸分子は、安定性を増加させる化学修飾を含む。いくつかの実施形態では、単離された二本鎖核酸分子は、免疫調節の回避を増加させる化学修飾を含む。いくつかの実施形態では、単離された

二本鎖核酸分子は、オフターゲット遺伝子サイレンシングを阻害する化学修飾を含む。

【1088】

いくつかの実施形態では、本明細書で論じるように、使用されるオリゴヌクレオチドは、部分的に相補的な二重鎖に自己重合化することができる単一オリゴヌクレオチド分子である。いくつかの実施形態では、このような単一オリゴヌクレオチドは、約23~30ヌクレオチド長、例えば、23、24、25、26、27、28、29及び30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、部分的に相補的な二重鎖に自己重合化することができる単一オリゴヌクレオチドは、約14~18ヌクレオチドmRNA標的領域、例えば14、15、16、17及び18ヌクレオチドmRNA標的領域を含む。いくつかの実施形態では、部分的に相補的な二重鎖に自己重合化することができる単一オリゴヌクレオチドは、部分的に相補的な二重鎖に自己重合化ならしめる、追加の7~11、例えば7、8、9、10及び11ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、部分的に相補的な二重鎖に自己重合化することができる単一オリゴヌクレオチドは、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）に効率的に入り活性化し得る。

10

【1089】

U1アダプター

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、U1アダプターであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1090】

U1アダプターは、ポリA部位を阻害し、標的遺伝子末端エキソンにおける部位に相補的な標的ドメイン及びU1 snRNPのU1のより小さな核RNA成分に結合する「U1ドメイン」を有する二官能性オリゴヌクレオチドである。例えば、各々が参照として本明細書に全体的に組み込まれる、国際特許出願公開第W02008/121963号及びGoraczniak他、2008, Nature Biotechnology, 27(3), 257-263を参照。U1 snRNPは、プレmRNAエキソン-イントロン境界に結合することによってスプライソソーム形成における初期ステップを指向するように主に機能するリボ核タンパク質複合体である。Brown及びSimpson, 1998, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 77-95参照。

20

【1091】

いくつかの実施形態では、利用されるオリゴヌクレオチドはU1アダプターであって、該オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つのエフェクタドメイン（U1ドメイン）に連結した少なくとも1つのアニーリングドメイン（標的ドメイン）を含み、該アニーリングドメインが標的遺伝子配列にハイブリダイズし、該エフェクタドメインがU1 snRNPのU1 snRNAにハイブリダイズする、U1アダプターである。いくつかの実施形態では、U1アダプターは、1つのアニーリングドメインを含む。いくつかの実施形態では、U1アダプターは、1つのエフェクタドメインを含む。

30

【1092】

理論に拘束されるものではないが、アニーリングドメインは、典型的には約10~約50ヌクレオチド長、より典型的には約10~約30ヌクレオチド長、又は約10~約20ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、アニーリングドメインは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21ヌクレオチド長である。アニーリングドメインは、標的遺伝子に対して、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも約100%相補性であり得る。いくつかの実施形態では、アニーリングドメインは、（例えば、ポリアデニル化部位を介して）末端コーディング領域、及び3' UTR及びポリアデニル化シグナル配列を含むプレmRNAのY末端エキソン内の標的部位にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、標的部位は、プレmRNAのポリ（A）シグナル配列の、約500塩基対、約250塩基対、約100塩基対、又は約50塩基対内にある。いくつかの実施形態では、アニーリングドメインは、標的遺伝子配列と1、2、3又は4個のミスマッチを有する。

40

【1093】

いくつかの実施形態では、エフェクタドメインは、約8ヌクレオチド~約30ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、エフェクタドメインは、約10ヌクレオチド

50

～約20ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、エフェクタドメインは、約10ヌクレオチド～約15ヌクレオチド長の範囲である。U1ドメインは、U1 snRNA、特に5'末端、より具体的にはヌクレオチド2～11とハイブリダイズし得る。いくつかの実施形態では、U1ドメインは、内因性U1 snRNAのヌクレオチド2～11と完全に相補性である。いくつかの実施形態では、U1ドメインは、配列番号1 (5'-GCCAGGIL1AAGUAU-3')、配列番号2 (5'-CCAGGLIAA.GUAI1-3')、配列番号4 (5'-CAGGUAAGUAU-3')、配列番号5 (5'-CAGGLIAAGU-3')、配列番号6 (5'-CM.16ITAAC1-3')、及び配列番号7 (5'-CAGG1IA2= ' , , 3')からなる群より選ばれるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、第IIIドメインは、ヌクレオチド配列、配列番号8 (5'-CAGGUAAGUA-3')を含む。理論に拘束されるものではないが、塩基対形成をステム1に含むように及び/又はU1 snRNAの位置1に塩基対形成を含むようにU1ドメインの長さを増加させることは、U1 snRNAに対するU1アダプターの親和性を改善する。

10

【1094】

U1アダプターのアニーリング及びエフェクタドメインは、エフェクタドメインがアニーリングドメインの5'末端及び/又は3'末端にあるように連結される。この2つのドメインは、1つのドメインの3'末端がもう一方のドメインの5'末端に連結されるか、1つのドメインの3'末端がもう一方のドメインの3'末端に連結されるか、あるいは1つのドメインの5'末端がもう一方のドメインの5'末端に連結されるかのように、連結され得る。アニーリング及びエフェクタドメインは、互いに直接に連結され得るか、又はヌクレオチド型もしくは非ヌクレオチド型リンカーによって連結され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヌクレオチド塩基であり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、最大15、最大20、又は最大25のヌクレオチドを含む。

20

【1095】

いくつかの実施形態では、アニーリングドメインとエフェクタドメインとのリンカーは多価であり、例えば三価、四価、五価である。理論に拘束されるものではないが、多価リンカーは、単一のアニーリングドメインを多数のアダプタードメインと一緒に結合するために使用され得る。

【1096】

いくつかの実施形態では、U1アダプターは、本明細書に記載の任意のオリゴヌクレオチド修飾を含む。例示的なこのような修飾は、細胞及び生物におけるアニーリング親和性、特異性、バイオアベイラビリティ、細胞及び/又は核輸送、安定性、及び/又は分解抵抗性を増加させる修飾を含む。いくつかの実施形態では、U1アダプターは、少なくとも1つの他のRNAi剤と組み合わせて投与され得る。

30

【1097】

RNAアクチベータ

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、RNAアクチベータ又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1098】

最近の研究は、dsRNAがまた、遺伝子発現、すなわち「小RNA誘導遺伝子活性化」又はRNAiと称されるメカニズムを活性化できることが見出されている。例えば、Li, L.C.他 Proc Natl Acad Sci U S A. (2006), 103(46): 17337-42、及びLi L.C. (2008) "小RNA介在遺伝子発現" 遺伝子発現のRNA及び調節: 複雑性の隠された層 Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-25-7参照。dsRNA標的遺伝子プロモーターは、関連遺伝子の強力な転写活性を誘導することが示されている。RNAiを引き起こす内因性miRNAもヒトで見出されている。Check E. Nature (2007) 448 (7156): 855-858。

40

【1099】

別の観察は、RNAiによる遺伝子活性が長時間継続することである。遺伝子発現の誘導は、10日間超続くと考えられている。このRNAiの長期の効果は、dsRNA標的部位での後成的変化に起因し得る。

【1100】

50

いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、提供されるオリゴヌクレオチドが遺伝子発現を増加させるRNAアクチベーターである。いくつかの実施形態では、増加された遺伝子発現は生存性、成長生育、及び/又は再生を阻害する。

【1101】

非コーディングRNA (ncRNA)

本発明は、長い非コーディングRNA (lncRNA) 及び短い非コーディングRNA (sncRNA) 等の、非コーディングRNAを包含する。

【1102】

従って、提供される本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、疾患関連長非コーディングRNAを調節するために有用であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法に従って合成されたオリゴヌクレオチドは、lncRNA領域を標的とするために、転写レプレッサー複合体の結合を特異的にブロックし、それによって関連標的遺伝子の発現を誘導するために使用される。いくつかの実施形態では、転写リプレッサー複合体は、サイレンシング因子である。いくつかの実施形態では、転写リプレッサー複合体は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有する。いくつかの実施形態では、転写リプレッサー複合体は、ヒストンH3をメチル化する。いくつかの実施形態では、転写リプレッサー複合体は、PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) である。

【1103】

ある特定のPRC2関連lncRNAは、潜在的な治療標的及び/又はバイオマーカーとして報告されている (Zhao他, 2010, “RIP配列によるポリコム関連RNAの全ゲノム同定” Molecular Cell 40: 939-53)。PRC2タンパク質の過剰発現は、転移性前立腺癌及び乳癌、及び結腸、乳及び肝臓の癌を含む様々な種類の癌に関連付けられている。PRC2介在遺伝子抑制の薬理的阻害は、インビトロで数個の癌細胞株でアポトーシスを誘導することが見出されたが、様々な種類の正常細胞では見い出されなかった。この系でのアポトーシスの誘導は、PRC2によって抑制された遺伝子の再活性化に依拠する。PRC2介在遺伝子抑制が癌幹細胞の幹細胞性の維持に関連し得る、との証拠もある。この結果は、少なくともいくつかの事例では、PRC2介在遺伝子抑制の阻害 (PRC2を救済するlncRNAsを重要な遺伝子に標的化することによることを含む) が様々な種類の癌を治療するための有力な戦略である、ことを示唆している。本明細書で提供される方法に従って調製され得る核酸の非限定的配列は、例えば、参照として本明細書にその内容が組み込まれる“ポリコム関連非コーディングRNA”というタイトルの国際特許出願公開第WO 2012/065143号 (PCT/US2011/60493) 号に見出される。

【1104】

本発明の提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、piwi-相互作用性RNA (piRNAs) 等の小非コーディングRNAでもよく又はそれとして働いてもよい。piRNAは、動物細胞で発現される小非コーディングRNA分子の最大の種類であり、ゲノム中のクラスターに見出される。piRNAは、piwiタンパク質との相互作用によってRNA-タンパク質複合体を形成することが知られている。piRNA複合体は、レトロトランスポゾンの後成的遺伝子サイレンシングと転写後遺伝子サイレンシングの両方、及び精子形成を含む生殖細胞中の他の遺伝子要素に関連付けられている。典型的には、piRNAは、26~31ヌクレオチド長であり、典型的なmiRNAと比較して、配列保存性を欠き、より高い複雑性を示す。いくつかの実施形態では、本発明に従って利用されるオリゴヌクレオチド組成物は、5' ウリジンを含む。いくつかの実施形態では、本発明に従って利用されるオリゴヌクレオチド組成物は、5' 一リン酸、及び2' 又は3' 酸素のいずれかをブロックするように働く3' 修飾を含む。いくつかの実施形態では、3' 修飾は2' -O-メチル化である。

【1105】

三重鎖形成性オリゴヌクレオチド

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、三重鎖形成性オリゴヌクレオチドであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1106】

最近の研究は、配列特異的な方法で二本鎖螺旋状DNAのポリプリン及び/又はポリピリミジン領域を認識し、結合できる三重鎖形成性オリゴヌクレオチド (TFO) が、設計できることを示している。これらの認識の法則は、Maher III, L.J.他, Science (1989) vol. 245, pp 725-730; Moser, H. E.他, Science (1987) vol. 238, pp 645- 630; Beal, P.A.他, Science (1992) vol. 251, pp 1360-1363; Conney, M.他, Science (1988) vol. 241, pp 456-459、及びHogan, M.E.他, EP公開第375408号によって概説されている。オリゴヌクレオチドの修飾、例えばインターキレータの導入、糖間結合置換、及び結合条件の最適化 (pH及びカチオン濃度) は、電荷反発及び不安定性等のTFO活性に関する固有の障害を解消する点で役に立っており、オリゴヌクレオチドが特定の配列を標的化し得ることが最近示されている (最近のレビューとして、Seidman及びGlazer, Clin Invest 2003 2.:4 87-94参照)。一般的には、三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、以下の配列一致性を有する：

オリゴ3' -A G G T

二重鎖5' -A G C T

二重鎖3' -T C G A

【1107】

しかしながら、A-AT及びG-GC三重鎖が最大の三重螺旋状安定性を有することが示されている (Reither及びJeltsch, BMC Biochem, 2002, Sept12, Epub)。同一の著者は、A-AT及びG-GC規則に従って設計されたTFOが非特異的三重鎖を形成しないことを証明している。該三重鎖形成は実際に配列特異的であることを示している。従って、任意の所定の配列については、三重鎖形成配列が考案され得る。いくつかの実施形態では、三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、少なくとも約15、約25、又は約30以上のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、最大約50又は約100ヌクレオチド長である。

【1108】

標的DNAとの三重鎖螺旋状構造の形成は、立体及び機能的変化を誘導し、転写開始及び伸長をブロックし、内因性DNAの所望の配列変化を導入し、及び遺伝子発現の特有的下方調節をもたらす。TFOによって処理された細胞中の遺伝子発現のこのような抑制の例は、哺乳動物細胞中のエピソームsupFGI及び内因性HPRTのノックアウトを誘導する (Vasquez他, Nucl Acids Res. 1999; 27: 1176-81、及びPuri他, J Biol Chem, 2001; 276: 28991-98)、Ets2転写因子 (Carbone他, Nucl Acid Res. 2003; 31: 833-43) 及び前炎症性ICAM-I遺伝子 (Besch他, J Biol Chem, 2002; 277: 32473-79) の発現の配列-及び標的特異的下方調節は、前立腺癌疫学において重要である。更に、Vuyisich及びBealは、配列特異的TFOがdsRNAに結合でき、RNA依存的キナーゼ等のdsRNA依存的酵素の活性を阻害することを最近示している (Vuyisich及びBeal, Nuc, Acids Res 2000; 28: 2369-74)。

【1109】

更に、上記原理に従って設計されたTFOは、DNA修復を達成できる指向性突然変異を誘発することができ、よって内因性遺伝子の発現の下方調節及び上方調節を提供する (Seidman及びGlazer, JInvest 2003; 112: 487-94)。効果的TFOの設計、合成及び投与の詳細な説明は、本明細書に参照としてその全体の内容が組み込まれる、Froehier他のS. Pat. App. Nos. 2003 017068及び2003 0096980、及びEmanude他の2002 012821/8及び2002 0123476、並びにLawnの米国特許第5,721,138号に見い出される。

【1110】

複合体/リンカー

本発明はまた、いくつかの実施形態では、利用したオリゴヌクレオチドが細胞取り込みのために最適化されることを考慮する。本発明によって包含される任意の利用されるオリゴヌクレオチドにおいて、ガイド及び/又はパッセンジャー鎖は複合体に結合され得る。いくつかの実施形態では、該複合体は疎水性である。疎水性複合体は、10超の分配係数を有する低分子でよい。複合体は、ステロール型分子、例えばコレステロール、又はC17に結合された増加した長さのポリ炭素鎖を有する分子であり、複合体の存在は、脂質トラン

スフェクション試薬と共に又は無しで細胞に取り込まれるRNA分子の能力に影響を与え得る。複合体は、疎水性リンカーによってパッセンジャー又はガイド鎖に結合され得る。いくつかの実施形態では、疎水性リンカーは5~12C長、及び/又はヒドロキシピロリジン型である。いくつかの実施形態では、疎水性複合体は、パッセンジャーに結合され、パッセンジャー及び/又はガイド鎖のいずれかのCU残基は修飾される。いくつかの実施形態では、パッセンジャー及び/又はガイド鎖上のCU残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%は、修飾される。いくつかの実施形態では、本発明に関連する分子は、自己送達する(sd)。本明細書で使用される「自己送達」は、トランスフェクション試薬のような追加の送達ビヒクルのための必要性なしに細胞に送達される分子の能力を意味する。本発明の態様は、RNAiでの使用のための分子を選択することに関する。

10

【1111】

本明細書に包含される態様の任意においては、利用されるオリゴヌクレオチドは、分子を細胞に標的化する及び/又は送達するための疎水性部分と会合し得る。いくつかの実施形態では、疎水性部分は、リンカーを介して核酸分子と会合される。いくつかの実施形態では、会合は非共有結合相互作用による。いくつかの実施形態では、会合は共有結合による。当該分野で知られている任意のリンカーは、疎水性部分を有する核酸と会合するために使用され得る。当該分野で知られているリンカーは、参照として本明細書に組み込まれる、公表されたPCT出願である、国際特許出願公開第WO 92/03464、同第WO 95/23162号、同第WO 2008/021157号、同第WO 2009/021157号、同第WO 2009/134487号、同第WO 2009/126933号、米国特許出願公開第2005/0107325号、米国特許第5,414,077号、同第5,419,966号、同第5,512,667号、同第5,646,126号、及び同第5,652,359号に記載されている。リンカーは多原子リンカーに対する共有結合のように簡単でよい。リンカーは環状でも又は非環状でもよい。リンカーは場合により置換されていてよい。いくつかの実施形態では、リンカーは核酸から開裂され得る。ある実施態様では、リンカーは、生理学的条件下で加水分解され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは酵素(例えば、エステラーゼ又はホスホジエステラーゼ)によって開裂され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは疎水性部分から核酸を分離するためのスペーサー要素を含む。該スペーサー要素は、1~30炭素原子又はヘテロ原子を含み得る。ある実施態様では、リンカー及び/又はスペーサー要素は、プロトン化可能な官能基を含む。このようなプロトン化可能な官能基は、核酸分子のエンドソーム脱出を促進し得る。プロトン化可能な官能基はまた、細胞への核酸の送達を促進し、例えば分子の全体的な荷電を中和する。いくつかの実施形態では、リンカー及び/又はスペーサー要素は、生物学的に不活性である(すなわち、生物学的活性を与えないか、又は得られる核酸分子に機能を与えない)。

20

30

【1112】

疎水性分子は、リンカー分子によってポリヌクレオチドに結合され得る。場合によりリンカー部分は、非ヌクレオチドリリンカー部分である。非ヌクレオチドリリンカーは、例えば、脱塩基の残基(sSpacer)、オリゴエチレングリコール、例えばトリエチレングリコール(スペーサー9)又はヘキサエチレングリコール(スペーサー18)、あるいはアルカンジオール、例えばブタンジオールである。スペーサー単位は、好ましくは、ホスホジエステル又はチオリン酸エステル結合によって連結される。リンカー単位は、例えばホスホジエステル、チオリン酸エステル、メチルリン酸エステル又はアミド結合によって、分子に1回のみ出現してもよく、又は数回組み込まれてもよい。

40

【1113】

典型的な複合化プロトコールは、配列の1又はそれ以上の位置でアミノリンカーを有するポリヌクレオチドの合成を含むが、リンカーは必要とされない。該アミノ基は、次いで、好適なカップリング又は活性化試薬を用いて、複合化される分子と反応する。複合化反応は、固体支持体にそのまま結合されたポリヌクレオチドを用いて、又は溶液相でのポリヌクレオチドの開裂に従ってのいずれかで、達成され得る。HPLCによる修飾ポリヌクレオチドの精製は、典型的には、純粋な物質を与える。

【1114】

50

いくつかの実施形態では、連結基は、ヌクレオモノマーに結合し得、輸送ペプチドは該リンカーに共有結合的に結合され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、輸送ペプチドの両方の結合部位として機能し得、ヌクレアーゼに対する安定性を提供し得る。好適なリンカーの例は、置換又は非置換 C_1 - C_{20} アルキル鎖、 C_2 - C_{20} アルケニル鎖、 C_2 - C_{20} アルキニル鎖、ペプチド、及びヘテロ原子（例えば、S、O、NH等）を含み。他の例示的なリンカーは、二官能性架橋剤、例えばスルホスクシンイミジル-4-（マレイミドフェニル）-酪酸エステル（SMPB）を含む（例えば、Smith他 Biochem J 1991. 276: 417-2参照）。

【1115】

いくつかの実施形態では、本発明の提供されるオリゴヌクレオチドは、遺伝子を細胞に送達するための受容体介在エンドサイトーシス機構を利用する分子複合体として合成される（例えば、Bunnell他 1992. Somatic Cell and Molecular Genetics. 18: 559、及び本明細書で引用されている参考文献参照）。

10

【1116】

標的化剤

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、組成物及び/又はそこに含まれる個々のオリゴヌクレオチドと会合した1又はそれ以上の標的化剤を含む。このような標的化剤の例は、上に記載され、更に本明細書に記載される。「標的化剤」及び「標的化部分」という用語は、本明細書で交換的に使用される。

【1117】

オリゴヌクレオチド及び/又はその組成物の送達は、オリゴヌクレオチドを細胞受容体に送達することによって一般的に改善され得る。標的化部分は、オリゴヌクレオチドに複合化され得るか、又はオリゴヌクレオチドに連結された担体基（例えば、ポリ（L-リジン）又はリポソーム）に結合され得る。本方法は、特定の受容体介在エンドサイトーシスを示す細胞に十分に適合される。

20

【1118】

例えば、6-ホスホマンノシル化タンパク質に対するオリゴヌクレオチド複合体は、遊離のオリゴヌクレオチドよりもマンノース6-リン酸エステル特異的受容体を発現する細胞によって、20倍超効率的に内部に取り入れられる。オリゴヌクレオチドはまた、生分解性リンカーを用いて細胞受容体に対するリガンドに結合され得る。別の例では、送達コンストラクトは、ビオチン化オリゴヌクレオチドとの堅い複合体を形成するマンノシル化ストレプトアビジンである。マンノシル化ストレプトアビジンは、ビオチン化オリゴヌクレオチドの内在化を20倍増加させることが判っている（Vlassov他 1994. Biochimica et Biophysica Acta 1197: 95-108）。

30

【1119】

RNA干渉の分野は、生物学的プロセスの研究に革命を起こした。これらのツールは、低分子阻害RNA（siRNA）、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、及びリボザイムを含む。RNA干渉技術が進歩したことに伴い、使用のための確証済みのRNA標的配列及び試薬のリストも増加している。本願によって包含される、提供される組成物及び方法は、このような標的配列の各々に容易に適用され得る。確証済みのsiRNA標的配列のデータベース、及びRNA干渉実験のために使用され得るキット及び試薬へのリンクについては、例えば、<http://www.rnainterference.org/index.html>参照。本発明に有用な例示的なsiRNA標的配列は、添付の添付書類（A）で提供される。

40

【1120】

免疫調節オリゴヌクレオチド

いくつかの実施形態では、提供される組成物は、免疫調節オリゴヌクレオチドであるか又はそれとして働く1又はそれ以上のオリゴヌクレオチドを含む。

【1121】

本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、免疫調節剤、すなわち、対象に投与される時に免疫応答を調節するか又は制御することができる物質であることができる。そのような物質によって誘起される免疫応答は、生来の及び/又は適合性のある免疫応答で

50

あることができる。免疫系は、より生来の免疫系と、脊椎動物の獲得された適合性免疫系とに分けられる。このうちの後者は、体液性細胞成分に更に分類される。いくつかの実施形態では、免疫応答は粘膜性でよい。本明細書に記載の免疫調節モチーフは、ODNクラス、例えばAクラス、Bクラス、Cクラス、Eクラス、Tクラス及びPクラスを含む免疫調節オリゴヌクレオチドの先に記載のクラスの状況で使用され得る。

【1122】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明に従って使用される免疫調節オリゴヌクレオチドは、1又はそれ以上の免疫調節モチーフを含む。いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、1又はそれ以上の「CpGジヌクレオチド」を含む。CpGジヌクレオチドは、メチル化されても又はメチル化されなくてよい。少なくとも1つの非メチル化CpGジヌクレオチドを含む免疫刺激オリゴヌクレオチドは、非メチル化シトシン-グアニンジヌクレオチド配列（すなわち、非メチル化5'シチジン、その後に結合される3'グアノシンであり、リン酸エステル結合によって連結されている）を含み、免疫系を活性化する、オリゴヌクレオチド分子である；このような免疫刺激オリゴヌクレオチドはCpGオリゴヌクレオチドである。CpGオリゴヌクレオチドは、参照として本明細書にその内容が組み込まれる、米国特許第6,194,388号；同第6,207,646号；同第6,214,806号；同第6,218,371号；同第6,239,116号；及び同第6,339,068号を含む、多数の発行された特許、公表された特許出願、及び他の刊行物に記載されている。いくつかの実施形態では、使用されるオリゴヌクレオチドは、トール様受容体のアゴニストであるか又はそれとして働く。いくつかの実施形態では、使用されるオリゴヌクレオチドは、トール様受容体9 (TLR9) のアゴニストであるか又はそれとして働く。いくつかの実施形態では、使用されるオリゴヌクレオチドは、トール様受容体のアンタゴニストであるか又はそれとして働く。いくつかの実施形態では、使用されるオリゴヌクレオチドは、トール様受容体9 (TLR9) のアンタゴニストであるか又はそれとして働く。いくつかの実施形態では、本発明によって包含される立体が特定されたオリゴヌクレオチドは、立体がランダムな対応物と比べて、各々の受容体/標的に対するより高い親和性を示す。いくつかの実施形態では、本発明によって包含される立体が特定されたオリゴヌクレオチドは、立体がランダムな対応物と比べて、個体間の変動の程度が低い特定の臨床的基準を満たす対象に投与された時に、1又はそれ以上の免疫応答を誘起する。いくつかの実施形態では、本発明によって包含される立体が特定されたオリゴヌクレオチドは、立体がランダムな対応物と比べて、臨床的基準を満たす対象に投与された時に、低度の毒性副作用を起こすか又はほとんど副作用を起こさない。

【1123】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される免疫刺激オリゴヌクレオチドは、CpGジヌクレオチドモチーフを有さない。CpGジヌクレオチドモチーフを有さないこれらのオリゴヌクレオチドは、非CpGオリゴヌクレオチドと言われ、非CpG免疫刺激モチーフを有する。いくつかの実施形態では、これらは、T-豊富免疫刺激オリゴヌクレオチド、例えば少なくとも80% Tを有するオリゴヌクレオチドである。

【1124】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される免疫刺激オリゴヌクレオチドは、Bクラス免疫調節オリゴヌクレオチドである。

【1125】

「Bクラス」ODNは、B細胞の活性化に強力であるが、IFN- α 及びNK細胞活性化を誘導する点では比較的弱い。BクラスCpGオリゴヌクレオチドは、典型的には十分に安定化され、特定の好ましい塩基事情内に非メチル化CpGジヌクレオチドを含む。例えば、米国特許第6,194,388号；同第6,207,646号；同第6,214,806号；同第6,218,371号；同第6,239,116号；及び同第6,339,068号参照。

【1126】

別のクラスは、IFN- α 及びNK細胞活性化に強力であるが、B細胞を刺激する点で比較的弱い；このクラスは、「Aクラス」と称される。いくつかの実施形態では、本発明に従っ

て使用される免疫刺激オリゴヌクレオチドは、Aクラス免疫調節オリゴヌクレオチドである。AクラスCpGオリゴヌクレオチドは、典型的には、5' 及び3' 末端において安定化したポリG配列、及び少なくとも6ヌクレオチドにおいてパリンδροームホスホジエステルCpGジヌクレオチド配列を含む。例えば、公表された特許出願PCT/US00/26527 (WO 01/22990) を参照。

【1127】

CpGオリゴヌクレオチドの更に別のクラスは、B細胞及びNK細胞を活性化し、IFN- α を誘導する；このクラスはCクラスと呼ばれる。いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される免疫刺激オリゴヌクレオチドは、Cクラス免疫調節オリゴヌクレオチドである。

「Cクラス」免疫刺激オリゴヌクレオチドは、少なくとも2つの異なったモチーフを含み、免疫系の細胞に対する特有かつ望ましい刺激効果を有する。これらのODNの中には、典型的な「刺激的」CpG配列と、「GC-リッチ」又は「B細胞中和」モチーフとの両方を有するものがある。これらの組み合わせモチーフオリゴヌクレオチドは、B細胞活性化及び樹状細胞(DC)活性化の強力な誘導因子である、典型的な「クラスB」CpG ODNに関連した免疫刺激効果と、IFN- α 及びナチュラルキラー (NK) 細胞活性化の強力なインデューサであるがB細胞及びDC活性化の比較的弱い誘導因子である、免疫刺激オリゴヌクレオチド (「クラスA」CpG ODN) のより最近記載されテイルクラスに関連した免疫刺激効果との間のどこかに含まれる、免疫刺激効果を有する。Krieg AM他 (1995) Nature 374: 546-9; Ballas ZK 他 (1996) J Immunol 157: 1840-5; Yamamoto S他 (1992) J Immunol 48: 4072-6。好ましいクラスB CpG ODNは、多くの場合チオリン酸エステル骨格を有し、好ましいクラスA CpG ODNは、混合又はキメラ骨格を有するが、組み合わせモチーフ免疫刺激オリゴヌクレオチドのCクラスは、安定化される、例えばチオリン酸エステル、キメラ、又はホスホジエステル骨格のいずれかを有してよく、そして、いくつかの実施形態では、準ソフトな骨格を有する。このクラスは、その全体内容が参照として本明細書に組み込まれる、2002年8月19日に出版された米国特許出願第USI 0/224,523号に記載されている。

【1128】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される免疫刺激オリゴヌクレオチドは、Eクラス免疫調節オリゴヌクレオチドである。「Eクラス」オリゴヌクレオチドは、IFN- α の分泌を誘導する亢進された能力を有する。これらのODNは、YGZモチーフの親油性置換ヌクレオチドアナログ5' 及び/又は3' を有する。Eクラス式の化合物は、例えば、以下の親油性置換ヌクレオチドアナログのいずれかを有する：置換ピリミジン、置換ウラシル、疎水性Tアナログ、置換トルエン、置換イミダゾール又はピラゾール、置換トリアゾール、5-クロロ-ウラシル、5-プロモ-ウラシル、5-ヨード-ウラシル、5-エチル-ウラシル、5-プロピル-ウラシル、5-プロピニル-ウラシル、(E)-5-(2-プロモビニル)-ウラシル、又は2,4-ジフルオロ-トルエン。Eクラスオリゴヌクレオチドは、少なくとも米国仮出願第60/847,811号に記載されている。

【1129】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される免疫刺激オリゴヌクレオチドは、Tクラス免疫調節オリゴヌクレオチドである。「Tクラス」オリゴヌクレオチドは、本発明のODN、IFN-関連サイトカイン及びケモカインにおけるように修飾されない場合には、B又はCクラスオリゴヌクレオチドよりもIFN- α のより低レベルの分泌を誘発すると同時に、Bクラスオリゴヌクレオチドに類似のIL-10レベルを誘発する能力を保持する。Tクラスオリゴヌクレオチドは、少なくとも、参照として本明細書にその全体的内容が組み込まれる、米国特許第出願第11/099,683号に記載されている。

【1130】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される免疫刺激オリゴヌクレオチドは、Pクラス免疫調節オリゴヌクレオチドである。「Pクラス」免疫調節オリゴヌクレオチドは、5TLR活性化ドメイン、2二重鎖形成領域及び任意のスペーサー及び3' テイルを含む、数個のドメインを有する。この種類のオリゴヌクレオチドは、場合によっては、Cクラスよりもはるかに高いレベルのIFN- α を誘導する能力を有する。Pクラスオリゴヌクレオチド

は、インビトロ及び/インビボのいずれかで自発的に自己集合してコンカタマーになる能力を有する。これらの分子の作用の方法について任意の特定の理論に拘束されるものではないが、1つの可能な仮説は、この性質が、特定の免疫細胞内でTLR9に、より高く架橋する能力を有するPクラスオリゴヌクレオチドに提供し、先に記載のCpGオリゴヌクレオチドのクラスと比べて免疫活性化の明確に異なったパターンを誘導することである。TLR9受容体の架橋は、形質細胞様樹状細胞におけるI型IFNRフィードバックループによるより強いIFN- α の活性化を誘導し得る。Pクラスオリゴヌクレオチドは、少なくとも米国特許出願第11/706,561号に記載されている。

【1131】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用される免疫刺激オリゴヌクレオチドは、Sクラス免疫調節オリゴヌクレオチドである。本発明の免疫調節オリゴヌクレオチドは、免疫抑制オリゴヌクレオチドであり得る。本明細書に記載の免疫調節モチーフは、「Sクラス」等のODNクラスを含む免疫抑制オリゴヌクレオチドの上記クラスの文脈で使用され得る。阻害の、又はSクラスのODNは、免疫刺激を阻害するために望ましい場合にはいつでも有用である。阻害ODNは、感染性ショック、炎症、アレルギー、喘息、移植拒絶、移植片対宿主病（GvHD）、自己免疫疾患、Th1-又はTh2-介在疾患、細菌感染症、寄生虫感染症、自発吸収、及び腫瘍を予防及び治療するために使用され得る。阻害ODNは、一般的に、関連TLRを発現する全ての細胞の活性化を阻害するために、より具体的には抗原提示細胞、B細胞、形質細胞様樹状細胞（pDC）、単球、単球由来細胞、好酸球、及び好中球の活性化を阻害するために、使用され得る。SクラスODNは、少なくとも米国特許出願第10/977,560号に更に記載されている。

【1132】

本発明によれば、免疫調節オリゴヌクレオチドは、安定化FANAプリンヌクレオチド（複数）に加えて安定化ヌクレオチド間結合の骨格、又は安定化されたホスホジエステルヌクレオチド結合のキメラ骨格を有し得る。「安定化ヌクレオチド間結合」は、ホスホジエステルヌクレオチド結合と比べて、（例えば、エキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼによる）インビボ分解に比較的抵抗性である、ヌクレオチド間結合を意味するものとする。いくつかの実施形態では、安定化ヌクレオチド間結合は、チオリン酸エステル、ジチオリン酸エステル、メチルリン酸エステル、チオメチルリン酸エステル、ホスホノ酢酸エステル、Rp-チオリン酸エステル、Sp-チオリン酸エステル、ボラノリン酸エステル、又は3'-チオホルムアセタール、又はそれらの混合物を含むが、これらに限定されない。他の安定化オリゴヌクレオチドは以下を含む：非イオン性DNAアナログ、例えばアルキル及びアリールリン酸エステル（荷電したリン酸エステル酸素がアルキル又はアリール基によって置換されている）、ホスホジエステル、及び荷電した酸素部分がアルキル化されているアルキルホスホトリエステル。ジオール、例えばテトラエチレングリコール又はヘキサエチレングリコールを末端のいずれか又は両方に含むオリゴヌクレオチドはまた、ヌクレアーゼ分解に実質的に抵抗性であることが判っている。

【1133】

本明細書でより詳細に記載されているように、本発明によれば、これらの及び他の修飾は、立体特異的なオリゴヌクレオチド分子を得るようにオリゴヌクレオチド内の予備決定された位置（複数）/パターン（複数）に選択的に導入され得る。更に、本発明によれば、多数のこのようなオリゴヌクレオチドを含む組成物は、相当に高い純度（例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、本質的に100%）で得られる。従って、1又はそれ以上の予備決定された種類のオリゴヌクレオチドを含む提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、インビボ投与に好適である。組成物中のオリゴヌクレオチドの高度の構造的純度によって（それによって組成物が1つの特定の種類のオリゴヌクレオチドを含む）、提供される組成物は、対象に投与された時に、改善された生物学的活性、増加された効率、減少された応答変数、及び/又は減少された望ましくない副作用を発揮し得る。

【1134】

従って、本発明の使用されたオリゴヌクレオチドは、具体的には、医薬組成物に製剤化され場合に治療剤として有用である。いくつかの実施形態では、このような治療剤は、免疫調節剤である。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節剤は、免疫刺激剤である。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節剤は、免疫阻害（又は免疫抑制）剤である。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節剤は、アジュバントとして働く。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節剤は、炎症性Th2応答を抑制できるTh1型サイトカインを誘導することによってTh2型免疫応答をTh1型免疫応答に転じることができる。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、遺伝子発現を制御する物質として有用である。例えば、いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、対象の遺伝子、例えば疾患又は障害に関連した遺伝子をサイレンシングすることができる物質として有用である。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、RNAスプライシングを制御するための物質として有用である。

10

【1135】

例えば、このようなオリゴヌクレオチドの実施態様には、少なくとも1つのCpGジヌクレオチドモチーフを含むものを含む。いくつかの実施形態では、そのようなオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの非メチル化CpGジヌクレオチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、本発明に有用なCpG含有オリゴヌクレオチドは、クラスA（クラスD）オリゴヌクレオチドとして分類される。いくつかの実施形態では、本発明に有用なCpG含有オリゴヌクレオチドは、クラスB（クラスK）オリゴヌクレオチドとして分類される。いくつかの実施形態では、本発明に有用なCpG含有オリゴヌクレオチドは、クラスCオリゴヌクレオチドとして分類される。いくつかの実施形態では、本発明に有用なCpG含有オリゴヌクレオチドは、クラスPオリゴヌクレオチドとして分類される。いくつかの実施形態では、本発明に有用なCpG含有オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのパリンδροーム配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明に有用なCpG含有オリゴヌクレオチドは、「ダンベル様」構造を形成し得る。いくつかの実施形態では、本発明に有用なCpG含有オリゴヌクレオチドは、「Y」状構造又はその多量体を形成し得る。いくつかの実施形態では、本発明に有用なCpG含有オリゴヌクレオチドは、四面体構造を形成し得る。レビューのために、例えば、Bode他（2011）Expert Rev. Vaccines 10(4): 499-511; Hanagata（2012）Int. J. Nanomedicine 7: 2181-95参照。

20

【1136】

いくつかの実施形態では、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、トール様受容体（複数）を発現する細胞に対する免疫調節効果を誘発する。いくつかの実施形態では、このようなオリゴヌクレオチドに対して応答する標的細胞は、抗原提示細胞（APC）、抗原特異的T及びB細胞、細胞傷害性T細胞（CTL）、ナチュラルキラー（NK）細胞、及び樹状細胞（DC）を含むがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、免疫調節効果は、このようなオリゴヌクレオチドを認識する受容体又は複数の受容体が発現する細胞によって誘発される直接的効果である。いくつかの実施形態では、このようなオリゴヌクレオチドは、トール様受容体9（TLR9）をリガンドとして発現する細胞に対する免疫調節効果を誘発する。例えば、本発明の実施態様の中には、1又はそれ以上のトール様受容体のアゴニストとして働くCpGオリゴヌクレオチドを含むものもある。本発明の実施態様の中には、1又はそれ以上のトール様受容体のアンタゴニストとして働くCpGオリゴヌクレオチドを含むものもある。いくつかの実施形態では、免疫調節効果は、必ずしもこのようなオリゴヌクレオチドに直接に応答し又はそのような受容体が発現しない細胞を含む、下流で起こる間接的効果である。

30

40

【1137】

いくつかの実施形態では、本発明のために有用であるCpGオリゴヌクレオチドは、TLR-9によってヒトB細胞及び形質細胞様樹状細胞を直接活性化することの特徴とする。いくつかの実施形態では、本発明のために有用であるCpGオリゴヌクレオチドは、ナチュラルキラー細胞、T細胞及び単球/マクロファージの成熟及び増殖を間接的に支持することの特徴とする。

50

【1138】

いくつかの実施形態では、本発明のために有用であるCpGオリゴヌクレオチドは、Th1型及び前炎症性サイトカイン、ケモカイン及び多反応性IgMの産生によって特徴付けられる。

【1139】

いくつかの実施形態では、本発明のために有用であるCpGオリゴヌクレオチドは、慣用的なタンパク質抗原及びペプチド型ワクチンの免疫原性がそのようなオリゴヌクレオチドによって亢進されることを特徴とする。特定の理論に拘束されるものではないが、このようなアジュバント効果は、専門の抗原提示細胞の改善された機能、及び体液性及び細胞性ワクチン特異的免疫応答の得られた世代によって介在され则认为られている。

10

【1140】

いくつかの実施形態では、本発明のために有用であるCpGオリゴヌクレオチドは、該CpGオリゴヌクレオチドがワクチン誘発応答の程度を増加させ、該応答の進行を促進することの特徴とする。それらはまた、記憶の誘発を改善し、それによって体液性及び細胞性免疫の期間を延長する。

【1141】

いくつかの実施形態では、本発明のために有用であるCpGオリゴヌクレオチドは、減少した免疫機能を有する対象群（例えば、患者集団）、例えば高齢及び抑制免疫系を有する人、の免疫を高めることを特徴とする。これらは、全身的に又は粘膜的にいずれかで投与される時に効果的である。混合キラリティー（例えば、キラルに純粋でない）のCpGオリゴヌクレオチドを用いる前臨床及び臨床試験は、感染性疾患及び癌を標的化するワクチンの免疫原性を高めることができる。更に、臨床試験は、ワクチンアジュバントとして投与された時に、CpGオリゴヌクレオチドが合理的に安全でありことを指摘する。

20

【1142】

本発明の開示に従って調製された免疫調節オリゴヌクレオチドは、多数の治療的適用に有用である。そのため、使用された免疫調節オリゴヌクレオチドは、好適な医薬組成物に製剤化され得る。かかる医薬組成物は、好適な投与経路によって本明細書に更に記述される、疾患、障害又は症状を治療するために有効な量で対象に投与され得る。本発明によれば、免疫刺激オリゴヌクレオチドの有効量は、免疫系を高める（例えば、亢進された免疫応答）ことから利益を得ようである対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、臨床的利点は、例えばそのツール様受容体タンパク質へのリガンドの結合によって、その標的免疫細胞に対して作用する免疫調節オリゴヌクレオチドによって直接的に与えられる。いくつかの実施形態では、臨床的利点は、対象の免疫系を全体的に高めることによって少なくとも一部は間接的に達成される。

30

【1143】

本明細書で使用される用語「有効量」及び「有効投薬量」は、その意図した目的（複数）すなわち、許容される利益/リスク比で組織又は対象での望ましい生物学的又は医薬的応答、を充たすために十分である化合物又は組成物の任意の量又は投薬量を指す。適切な意図した目的は、客観的（すなわち、ある試験又はマーカーによって測定可能）でも、又は主観的（すなわち、対象が効果の兆候を示すか、又は効果を感じる）でもよい。いくつかの実施形態では、治療上有効量は、（例えば、顕在化された症状、疾患進行/段階、遺伝的プロファイル等によって決定されるような）疾患又は障害についての特定の臨床的基準を満たす対象群に投与された時に、統計的に顕著な治療的応答が該集団で得られる量である。治療上有効量は、複数の単位投薬量を含み得る投薬レジメで一般的に投与される。任意の特定の医薬物質について、治療上有効量（及び/又は有効な投薬レジメ内の好適な単位投薬量）は、例えば、他の医薬物質と組み合わせた投薬経路に依って変動し得る。いくつかの実施形態では、任意の特定の患者についての具体的な治療上有効量（及び/又は単位投薬量）は、治療されるべき疾患及び疾患の重度；採用される具体的な医薬物質の活性；採用される具体的な組成物；患者の年齢、体重、全身的な健康、性別及び栄養；採用される投与時間、投与経路、及び/又は具体的医薬物質の排出及び代謝速度；治療期間；

40

50

並びに医薬分野で周知である類似の要因、を含む様々な要因に依拠し得る。当業者は、本発明のいくつかの実施形態では、陽性の結果と関連する投薬レジメの文脈で単、位投薬量が投与の好適量を含む場合に、有効量を含むと考えられる。従って、いくつかの実施形態では、本発明に従って調製されたCpGオリゴヌクレオチドは、そのキラル純度のために改善された有効性及び免疫調節効果を奏し得る。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節オリゴヌクレオチドの有効量は、純度の低い対応物よりも低い。

【1144】

いくつかの実施形態では、免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、健常な対象に投与される。いくつかの実施形態では、免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、ワクチンの一部として対象に投与され、該免疫調節オリゴヌクレオチドはアジュバントとして働く。いくつかの実施形態では、免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、抑制された（例えば、損傷された）免疫系で対象に投与される。いくつかの実施形態では、免疫系が抑制され、慣用的なワクチンに十分に応答しない対象は、本発明によって包含される免疫調節オリゴヌクレオチドを含むワクチンに応答する。いくつかの実施形態では、このようなワクチンから利益を得るかもしれない対象は、感染症、例えばウイルス感染症、例えばHIV、HBV、HCV等に関連した免疫系を抑制している。

【1145】

本発明は、免疫応答の刺激又は抑制によって治療され得る症状を有する対象の治療のために本明細書で企図される免疫調節オリゴヌクレオチドの使用を包含する。従って、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、感染症、癌、アレルギー、喘息、炎症性症状、自己免疫疾患、及びそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない、疾患又は症状の治療に有用である。

【1146】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、臨床的症状を発症するリスクのある対象の治療のために本発明のある態様において有用である。非限定的な臨床的症状は、アレルギー、喘息、感染性生物による感染症、炎症及び自己免疫疾患を含む。本明細書で使用されるリスクのある対象は、病原菌、癌又はアレルゲンを引き起こす感染への曝露の何らのリスクを有するか、あるいは癌を発症するリスクを有する、対象である。例えば、リスクのある対象は、感染性物質の特定の種類が見出される地域に旅行を計画している対象であり得、その生活様式を介して又は医療手段を介して感染性生物を含み得る体液に曝露されるか、又は直接に該生物に曝露される対象であり得、あるいは感染性生物又はアレルゲンが同定されている地域に住んでいる任意の対象ですらあり得る。感染症を発症するリスクのある対象はまた、医療機関が特定の感染性生物抗原でのワクチン接種を推奨している一般的集団を含む。抗原がアレルゲンであり、対象が該特定の抗原に対してアレルギー反応を発症し、対象が該抗原にすなわち花粉の季節において曝露され得る場合には、該対象は該抗原への曝露のリスクにある。アレルギー又は喘息を発症するリスクにある対象は、アレルギー又は喘息を有すると特定されているが免疫調節オリゴヌクレオチド治療中に活動性疾患を有さない対象、及び一般的又は環境的因子のためにそれらの疾患を発症するリスクにあると考えられる対象を含む。癌を発症するリスクにある対象は、癌を発症する高い確率を有する人である。これらの対象は、例えば、全身性異常であって、その存在が癌を発症するより高い可能性と相関関係と有すると証明されている全身性異常を有する対象、及びタバコ、アスベスト又は他の化学的毒素等の癌を引き起こす物質に曝露された対象、又は癌についてこれまでに治療されたことがあり、明らかに寛解にある対象である。癌を発症するリスクにある対象が、該対象が発症するリスクにある癌種に特異的な抗原及びCpG免疫刺激オリゴヌクレオチドで治療される時に、該対象は癌細胞が発症するにつれて該細胞を殺し得る。腫瘍が該対象において形成し始めるならば、該対象は腫瘍抗原に対する特定の免疫応答を進行させるだろう。

【1147】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、喘息、アレルギー及び関連症状を含む免疫疾患又は障害を有する対象を治療するために有用である

。

【1148】

アレルギーを有する対象は、アレルゲンに反応したアレルギー反応を発症するリスクを有するか又はそのリスクにある対象である。アレルギーは、物質（アレルゲン）に対する獲得過敏性を指す。アレルギー症状は、湿疹、アレルギー性鼻炎又は鼻感冒、枯れ草熱、結膜炎、気管支喘息、じんましん（urticaria）（じんましん（hives））及び食物アレルギー、及び他のアトピー性症状を含むが、これらに限定されない。

【1149】

アレルギーは、一般的に、無害のアレルゲンに対するIgE抗体産生によって起こる。免疫調節オリゴヌクレオチドの全身性又は粘膜投与によって誘発されるサイトカインは、主に、Th1と称されるクラス（例えば、IL-12、IP-10、IFN- α 及びIFN- γ ）であり、これらは体液性及び細胞性免疫応答を誘発する。IL-4及びIL-5サイトカインの産生に関連する免疫応答の他の主な種類は、Th2免疫応答と称される。一般的に、アレルギー疾患はTh2型免疫応答によって介在されるようである。主なTh2（IgE抗体及びアレルギーの産生に関連する）からTh2/Th1バランス応答（アレルギー反応に対して保護的である）まで対象において免疫応答をシフトする免疫調節オリゴヌクレオチドの能力に基づいて、免疫調節オリゴヌクレオチドの免疫応答を誘発するための有効投薬量は、喘息及びアレルギーを治療又は予防するために対象に投与され得る。

【1150】

従って、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、喘息のようなアレルギー及び非アレルギー症状の治療において顕著な治療的有用性を有する。Th2サイトカイン、特にIL-4及びIL-5は、喘息対象の気道で上昇する。これらのサイトカインは、IgE同型転換（isotope switching）、好酸球走化因子、活性化及び肥満細胞増殖を含む、喘息性炎症応答に重要な局面を促進する。Th1サイトカイン、特にIFN- γ 及びIL-12は、Th2クローンの形成及びTh2サイトカインの産生を抑制することができる。喘息は、炎症、気道の狭小化、及び吸引剤への気道の増加した反応性によって特徴付けられる呼吸器系の障害を指す。喘息は、多くの場合、それに限られるわけではないが、アトピー又はアレルギー症状を伴う。

【1151】

提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、抗アレルギー療法と組み合わせて投与されてもよい。アレルギーを治療又は予防するための慣用的な方法は、アレルギー医薬又は鈍化療法の使用を含んでいる。アレルギーを治療又は予防するためのいくつかの進化的療法は、抗IgE抗体を中和する使用を含む。アレルギー反応の化学的メディエータの効果を妨害する抗ヒスタミン及び他の薬物は、アレルギー症状の重度を制御することに役立つが、アレルギー反応を防止せず、次に起こるアレルギー応答に対して何の効果も有さない。鈍化療法は、アレルゲンに対するIgG型応答を誘発するために、通常皮下での注射によって、アレルゲンの少量を与えることによって行われる。IgG抗体の存在は、IgEステップの誘発から起こるメディエータの産生を中和するために役立つと考えられている。最初に、対象は、重度の反応を誘発しないようにアレルゲンの極低量で治療され、次いで該投薬量がゆっくり増加される。この種の治療法は、アレルギー応答を引き起こす化合物が対象に実際に投与され、重度のアレルギー反応が起こり得るので、危険である。

【1152】

抗アレルギー医薬は、抗ヒスタミン、コルチステロイド、及びプロスタグランジン誘導剤を含むが、これらに限定されない。抗ヒスタミンは、巨細胞又は好塩基球によって放出されたヒスタミンを中和する化合物である。これらの化合物は当該分野で周知であり、アレルギーの治療に一般的に使用される。抗ヒスタミンは、アクリバスチン、アステミゾール、アザタジン、アゼラスチン、ベタタスチン、ブロムフェニラミン、ブクリジン、セチリジン、セチリジンアナログ、クロルフェニラミン、クレマチスン、CS 560、シプロヘプタジン、デスロラタジン、デキスクロルフェニルアミン、エバスチン、エピナスチン、フェキソフェナジン、HSR 609、ヒドロキシジン、レボカバスチ

10

20

30

40

50

ン、ロラチジン、メトスコポラミン、ミゾラスチン、ノラステミゾール、フェニダミン、プロメタジン、ピリラミン、テルフェナジン、及びトラニラストを含むが、これらに限定されない。コルチコステロイドは、メチルプレドニソロン、プレドニソロン、ベクロメタゾン、ブデソニド、デキサメタソン、フルニソリド、フルシカゾンプロピオン酸塩、及びトリアムシノロンを含むが、これらに限定されない。デキサメタソンは、抗炎症活性を有するコルチコステロイドであるが、高度に吸収され、有効投薬量で長期間の抑制副作用を有するために、吸入形態でのアレルギー又は喘息の治療のために恒常的に使用されない。しかしながら、デキサメタソンは、アレルギー又は喘息を治療するために本発明に従って使用され得る。本発明の組成物と組み合わせて投与された時に副作用を減少させるために低用量で投与され得るからである。コルチコステロイド使用に関連した副作用の中には、咳、発音障害、口内がこう瘡（カンジダ症）が含まれ、より高用量では、全身性の効果、例えば副腎抑制、ブドウ糖不耐性、骨粗鬆症、骨の無菌壊死、白内障形成、成長抑制、高血圧、筋衰弱、皮膚菲薄化、及び容易に打撲傷ができやすいことが含まれる。Barnes及びPeterson (1993) Am Rev Respir Dis 148: S1-S26; 及びKamada AK他 (1996) Am J Respir Crit Care Med 153: 1739-48。

10

【1153】

本発明に従う提供されるオリゴヌクレオチド組成物及び方法は、単独で、又は喘息の治療のために有用である他の物質及び方法を組み合わせて使用され得る。1つの態様では、本発明は、喘息を有する対象を治療する方法を提供する。本発明のこの態様に従う方法は、喘息を有する対象に、該対象を治療するために本発明の組成物の有効量を投与するステップを含む。

20

【1154】

いくつかの実施形態では、本発明は喘息を有する対象を治療する方法を提供する。本発明の態様に従う方法は、喘息を有する対象に本発明の組成物の有効量を投与するステップ及び該対象を治療するための抗喘息療法を含む。

【1155】

本明細書で使用される「喘息」は、炎症及び気道の狭窄化、及び吸入剤への気道の増加した反応性によって特徴付けられる呼吸器系の障害を指す。喘息は、多くの場合、それに限られるわけではないが、アトピー又はアレルギー症状を伴う。喘息の症状は、気流閉塞から起こる、息切れ（wheezing）、息切れ（breathlessness）、胸部絞扼感及び咳、の再発性エピソードを含む。喘息に伴う気道炎症は、多数の生理学的変化、例えば気道粘膜上皮の浸食、基底膜下のコラーゲン沈着、浮腫、巨細胞活性化、好中球、好酸球及びリンパ球を含む炎症性細胞侵入の観察によって検出され得る。気道炎症の結果、喘息患者は、通常、気道過剰反応性、気流制限、呼吸器症状、及び疾患の慢性化を経験する。気流制限は、急性急性気管支収縮、気道浮腫、粘液栓形成、及び気道リモデリング、一般的に気管支閉塞を招く特徴を含む。喘息のいくつかの症例では、基底膜下線維症が起こることがあり、このことは肺機能の持続性の異常を招く。

30

【1156】

過去数年に渡る研究は、喘息が炎症性細胞、メデュータ、及び気道に存在する他の細胞及び組織間の複雑な相互作用から得られるようであることを明らかにした。巨細胞、好酸球、上皮細胞、マクロファージ、及び活性化T細胞はすべて、喘息に関連する炎症性プロセスで重要な役割を果たす。Djukanovic R他 (1990) Am Rev Respir Dis 142: 434-457。これらの細胞は、局所組織に対して直接的又は間接的に作用し得る、予備形成そして新規に合成されたメデュータの分泌を介して、気道機能に影響を及ぼし得る、と考えられている。Tリンパ球（Th2）の亜集団は、選択的サイトカインを放出し、疾患慢性を確立することによって、気道においてアレルギー炎症を制御する点で重要な役割を果たしていると認識されてもいる。Robinson DS他 (1992) N Engl J Med 326: 298-304。

40

【1157】

喘息は、様々な発達段階で起こる複雑な障害であり、症状の程度に基づいて急性、亜急性又は慢性に分類され得る。急性炎症性応答は、気道への細胞の初期の動員と関連する。

50

亜急性炎症性応答は、細胞の動員、及び常在細胞の活性化が関与し、持続性の炎症パターンを起こす。慢性炎症性応答は、気道における永続的異常を招き得る、持続性レベルの細胞損傷、及び進行する修復プロセスによって特徴付けられる。

【1158】

「喘息を有する対象」は、炎症及、気道の狭窄化、及び吸入剤への気道の増加した反応性によって特徴付けられる呼吸器系の障害を有する対象である。喘息の開始と関連する因子は、アレルゲン、寒冷温度、運動、ウイルス感染及びSO₂を含むが、これらに限定されない。

【1159】

上記のように、喘息は、Th2サイトカインであるIL-4及びIL-5、並びにIgE抗体同型置換によって少なくとも部分的に特徴付けられる、免疫応答のTh2型と関連し得る。Th1及びTh2免疫応答は、免疫応答のTh1型への免疫応答の傾きがアレルギーを含む免疫応答のTh2型を抑制又は緩和し得るように、相互に拮抗的作用的である。従って、本発明の提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、喘息を有する対象を治療するためにそれ自体有用である。なぜならば、アナログは免疫応答のTh1型に免疫応答を傾かせ得るからである。

【1160】

本発明の提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、喘息療法と組み合わせて投与されてもよい。喘息を治療又は予防するための慣用的方法は、抗アレルギー療法（上記）及び吸入剤を含む多数の他の物質の使用を含む。

【1161】

喘息治療のための医療は、一般的に、2つのカテゴリー、すなわち迅速緩和医療及び長期管理医療に分類される。喘息患者は、持続性の喘息の管理を達成し維持するための毎日の原則に基づいて長期管理医療を受けている。長期管理医療は、抗炎症剤、例えばコルチコステロイド、クロモリンナトリウム及びネドクロミル；長期作用気管支拡張薬、例えば長期作用 β_2 -アゴニスト及びメチルキサンチン；及びロイコトリエン修飾因子を含む。迅速緩和医療は、短時間作用 β_2 -アゴニスト、抗コリン作働性薬、及び全身性コルチコステロイドを含む。これらの薬物の各々と関連した多くの副作用が存在し、薬物のいずれも、単独又は組み合わせて、喘息を予防し又は完全に治療することができない。

【1162】

抗喘息医薬は、PDE-4阻害剤、気管支拡張薬/ β_2 -アゴニスト、カリウム（K⁺）チャネル開口薬、VLA-4アンタゴニスト、ニューロキニンアンタゴニスト、トロンビン A2（TXA2）合成阻害剤、キサンチン、アラキドン酸アンタゴニスト、5 リポオキシゲナーゼ阻害剤、TXA2受容体アンタゴニスト、TXA2アンタゴニスト、5-リボックス活性化タンパク質の阻害剤、及びプロテアーゼ阻害剤を含むが、これらに限定されない。

【1163】

気管支拡張薬/ β_2 -アゴニストは、気管支拡張又は平滑筋拡張を引き起こす化合物の種類である。気管支拡張薬/ β_2 -アゴニストは、サルメテロール、サルブタモール、アルブテロール、テルブタリン、D2522/ホルモテロール、フェノテロール、ビトルテロール、ピルブエロールメチルキサンチン、及びオルシプレナリンを含むが、これらに限定されない。長期作用 β_2 -アゴニスト及び気管支拡張薬は、抗炎症療法に加えて長期間症状抑制のために使用される化合物である。長期作用 β_2 -アゴニストは、サルメテロール及びアルブテロールを含むがこれらに限定されない。これらの化合物は、通常、コルチコステロイドと組合せて使用され、一般的に何からの炎症療法なしには使用されない。それらは、副作用、例えば、頻拍、骨格筋振戦、低カリウム血、及び過剰投与量でのQTc間隔の延長が伴っている。

【1164】

メチルキサンチンは、例えばテオフィリンを含み、症状の長期制御及び抑制のために使用されている。これらの化合物は、ホスホジエステラーゼ阻害剤から起こる気管支拡張、及びおそらくアデノシン拮抗を引き起こす。用量関連急性毒性が、これらの種類の化合物に関して特定の問題である。結果として、毎日の血清濃度が、代謝クリアランスの個々の

10

20

30

40

50

差から起こる毒性及び狭い治療的範囲を考慮するために監視されなければならない。副作用は、頻脈、頻脈性不整脈、吐き気及び嘔吐、中枢神経系刺激、頭痛、発作、吐血、高血糖症、及び低カリウム血を含むが、それらに限定されない。短時間作用 β_2 アゴニストは、アルブテロール、ピトルテロール、ピルブテロール、及びテルブタリンを含むが、これらに限定されない。短時間作用 β_2 アゴニストの投与に関連する逆作用の一部は、頻脈、骨格筋振戦、増加した乳酸、頭痛、及び高血糖症を含む。

【1165】

クロモリンナトリウム及びネドクロミルは、運動から起こる喘息症状又はアレルゲンから起こるアレルギー症状を主に抑制するための長期間制御医薬として使用される。これらの化合物は、塩化物チャネル機能を妨げることによってアレルゲンへの早期及び遅延反応を遮断すると考えられている。それらはまた、巨細胞膜を安定させ、好酸球（inosineophils）及び上皮細胞からのメディエータの活動及び放出を阻害する。最大の利益を達成するために、4～6週間の投与が一般的に必要とされる。

【1166】

抗コリン作働性薬は、一般的に、急性気管支痙攣の緩和のために使用される。これらの化合物は、ムスカリン性コリン受容体の拮抗阻害によって機能すると考えられている。抗コリン作働性薬は、イプラトロピウムブロミドを含むが、これらに限定されない。これらの化合物は、コリン作働性介在気管支痙攣のみを逆転し、抗原に対する反応を何ら変更しない。副作用は、口及び呼吸器分泌物の乾燥、個体によっては増加した喘鳴、及び眼に噴霧した場合には視力障害を含む。

【1167】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、気道リモデリングを治療するために有用であり得る。気道リモデリングは平滑筋細胞増殖及び/又は気道中の粘膜下肥厚をもたらし、究極的には気道の狭小化を起こし、これは制限された気流を招く。本発明の免疫調節オリゴヌクレオチドは、更なるリモデリングを抑制し、おそらく、リモデリングプロセスから起こる組織構築を減少さえし得る。

【1168】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、炎症性障害を有する対象を治療するために有用である。本明細書で用いられる「炎症性障害」という用語は、感染、毒素曝露又は細胞損傷の部位において、白血球及び血漿タンパク質の蓄積及び活性化を含む生来の免疫系の抗原非特異的反応と関連する症状を指す。炎症に特徴的であるサイトカインは、腫瘍壊死因子（TNF- α ）、インターロイキン1（IL-1）、IL-6、IL-12、インターフェロン α （IFN- α ）、インターフェロン β （IFN- β ）、及びケモカインを含む。従って、喘息、アレルギー、及び自己免疫障害のある種類は、炎症性障害の特徴を有することがある。炎症性障害はまた、例えば、心血管疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気管支拡張症、慢性胆嚢炎、結核、橋本病、敗血症、サルコイドーシス、硅肺及び他の塵肺症、及び創傷における移植された異物を含むが、これらに限定されない。本明細書で使用される「敗血症」という用語は、微生物侵入に対する宿主の全身性炎症性応答に関連したよく知られた臨床的症候群を指す。本明細書で使用される「敗血症」という用語は、発熱又は低体温症、頻脈及び急速呼吸によって典型的には前兆とされる症状を言い、重度の場合には、低血圧、臓器不全、死にさえ進行し得る。

【1169】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、感染症を有する対象を治療するために有用である。いくつかの実施形態では、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、病原又は複数の病原に曝露されたかもしれない人を含む、感染症に罹患し易い対象を治療するために有用である。本発明に従って使用される免疫調節オリゴヌクレオチドはまた、いくつかの実施形態では、ウイルス、細菌、真菌、又は寄生虫による感染症を治療又は抑制するために使用され得る。感染症を有する対象は、感染性病原菌に曝露されており、体内に該病原菌の急性又は慢性の検出可能なレベルを有する、対象である。免疫調節オリゴヌクレオチドは、感染性病原菌のレベルを減少させ又は感

染性病原菌を全滅させることができる、抗原特異的全身性又は粘膜性免疫応答を高めるために、抗原と共に又は抗原なしで使用され得る。本明細書で使用される感染性疾患は、体内において外来微生物の存在から起こる疾患である。病原菌の侵入の主な部位である体内の粘膜表面を保護するために有効なワクチン戦略及び治療を開発することは特に重要である。

【1170】

ウイルスは、一般的に核酸コア及びタンパク質被覆を含むが、独立して生物ではない、小さな感染性作用物である。ウイルスはまた、タンパク質を欠く感染性核酸の形態をとり得る。ウイルスは、中で複製できる細胞の非存在下では生存することができない。ウイルスは、エンドサイトーシス又はDNA（ファージ）の直接的な注入のいずれかによって特定の細胞に入り、増殖して疾患を引き起こす。増殖したウイルスは、次いで、放出され、更なる細胞を感染し得る。ウイルスの一部はDNA含有ウイルスであり、他のウイルスはRNA含有ウイルスである。DNAウイルスは、ポックス、ヘルペス、アデノ、パポバ、パルボ、及びヘパドナヘパドナを含む。RNAウイルスは、ピコルナ、カリシ、アストロ、トガ、フラビ、コロナ、パラミキソ、オルトミキソ、ブニヤ、アレナ、ラブド、フィオオ、ボルナ、レオ及びレトロを含む。ある態様では、本発明はまた、プリオンが疾患進行で関係している疾患、例えば、牛海綿状脳症（すなわち、狂牛病、BSE）又は動物のスクレイピー感染症、又はヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病を治療することを意図する。

【1171】

ウイルスは、エンテロウイルス（ピコルナウイルス科ファミリーのウイルス、例えばポリオウイルス、コクサッキー（Coxsackie）ウイルス、エコーウイルスを含むがこれらに限定されない）、ロタウイルス、アデノウイルス、及び肝炎ウイルス、例えばA、B、C、D及びE型肝炎ウイルスを含むが、これらに限定されない。ヒトで見出されているウイルスの具体例は、以下を含むが、これらに限定されない：レトロウイルス科（Retroviridae）（例えば、ヒト免疫不全ウイルス、例えばHIV-1（HTLV-III、LAV又はHTLV-III/LAV、又はHIV-IIIとも呼ばれる）；及び他の単離物、例えばHIV-LP；ピコルナウイルス科（Picornaviridae）（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキー（Coxsackie）ウイルス、リノウイルス、エコーウイルス）；カリシウイルス科（Caliciviridae）（例えば、胃腸炎を引き起こす株）；トガウイルス科（Togaviridae）（例えば、ウマ脳炎ウイルス、ルベラウイルス）；フラビウイルス科（Flaviviridae）（例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（Coronaviridae）（例えば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（Rhabdoviridae）（例えば、水疱性口炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（Filoviridae）（例えば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（Paramyxoviridae）（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻しんウイルス、呼吸系発疹ウイルス）；オルソミクソウイルス科（Orthomyxoviridae）（例えば、インフルエンザウイルス）；ブニヤウイルス科（Bunyaviridae）（例えば、ハンタン（Hantaan）ウイルス、ブニヤウイルス、フレボウイルス、及びナイロ（Nairo）ウイルス）；アレナウイルス科（Arenaviridae）（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（Reoviridae）（例えば、レオウイルス、オルビウイルス、及びロタウイルス）；ビルナウイルス科（Birnaviridae）；ヘパドナウイルス科（Hepadnaviridae）（B型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（Parvoviridae）（パルボウイルス）；パポバウイルス科（Papovaviridae）（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス科（Adenoviridae）（ほとんどがアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（Herpesviridae）（ヘルペス単純ウイルス（HSV）1型及び2型、水痘・帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV））；ポックスウイルス科（Poxviridae）（痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；イリドウイルス科（Iridoviridae）（例えば、アフリカ豚コレラウイルス）；及び他のウイルス、急性喉頭気管支炎ウイルス、アルファウイルス（Alphavirus）、カボジ肉腫関連ヘルペスウイルス、ニューカッスル（Newcastle）病ウイルス、ニパ（Nipah）ウイルス、ノルウォーク（Norwalk）ウイルス、パピローマウイルス（Papillomavirus）、パラインフルエンザウイルス、鳥インフルエン

10

20

30

40

50

ザ、SARインフルエンザ、西ナイル熱。植物に感染するウイルスは、例えば、以下の科及び/又は属一のウイルス：アルファウイルス（Alfamoviruses）：プロモウイルス科（Bromoviridae）、アルファクリプトウイルス（Alphacryptoviruses）：パルティティウイルス科（Partitiviridae）、パドナウイルス（Badnaviruse）、ベータクリプトウイルス（Betacryptoviruses）：パルティティウイルス（Partitiviridae）、ビゲミニウイルス（Bige miniviruses）：ジェミニウイルス（Geminiviridae）、プロモウイルス（Bromoviruses）：プロモウイルス科（Bromoviridae）、ビモウイルス（Bymoviruses）：ポチウイルス科（Potyviridae）、カプロウイルス（Capilloviruses）；カルラウイルス（Carlaviruses）、カルモウイルス（Carmovirus virus）：トムブスウイルス科（Tombusviridae）、カリモウイルス（Caulimoviruses）、クロステロウイルス（Closteroviruses）、コモウイルス（Comovirus viruses）：コモウイルス科（Comoviridae）、クロステロウイルス（Closteroviruses）、コモウイルス（Comoviruses）：コモウイルス科（Comoviridae）、ククモウイルス（Cucumoviruses）：プロモウイルス科（Bromoviridae）、サイトラブドウイルス（Cytorhabdoviruses）：ラブドウイルス科（Rhabdoviridae）、ダイアンソウイルス（Dianthoviruses）、エナモウイルス（Enamoviruses）、ファバウイルス（Fabaviruses）：コモウイルス科（Comoviridae）、フィジーウイルス Fijiviruses）：レオウイルス科（Reoviridae）、フロウイルス（Furoviruses）、ホルデイウイルス（Hordeiviruses）、ヒブリジェミニウイルス（Hybrigeminiviruses）：ジェミニウイルス科（Geminiviridae）、イダエオウイルス（Idaeoviruses）、イラルウイルス（Ilarviruses）：プロモウイルス科（Bromoviridae）、イポモウイルス（Ipomoviruses）：ポチウイルス科（Potyviridae）、ルテオウイルス（Luteoviruses）、マクロモウイルス（Machlomoviruses）、マクルラウイルス（Macluraviruses）、マラフィウイルス（Marafiviruses）、モノジェミニウイルス（Monogeminiviruses）：ジェミニウイルス科（Geminiviridae）、ナナウイルス（Nanaviruses）、ネクロウイルス（Necroviruses）、ネポウイルス（Nepoviruses）：コモウイルス科（Comoviridae）、ヌクレオラブドウイルス（Nucleorhabdoviruses）：ラブドウイルス科（Rhabdoviridae）、オリザウイルス（Oryzaviruses）：レオウイルス科（Reoviridae）、ウルミアウイルス（Ourmiaviruses）、リトレオウイルス（Phytoreoviruses）：レオウイルス科（Reoviridae）、ポテクスウイルス（Potexviruses）、ポチウイルス（Potyviruses）：ポチウイルス科（Potyviridae）、リモウイルス（Rymoviruses）：ポチウイルス科（Potyviridae）、サテライトRNA、サテライトウイルス（Satelliviruses）、セキウイルス（Sequiviruses）：セキウイルス科（Sequiviridae）、ソベモウイルス（Sobemoviruses）、テヌイウイルス（Tenuiviruses）、トバモウイルス（Tobamoviruses）、トブラウイルス（Tobraviruses）、トムブスウイルス（Tombusviruses）：トスポウイルス（Tospoviruses）：ブニヤウイルス科（Bunyaviridae）、トリコウイルス（Trichoviruses）、チモウイルス（Tymoviruses）、ウムブラウイルス（Umbraviruses）、未帰属ポチウイルス：ポチウイルス科（Potyviridae）、未帰属ラブドウイルス科：バリコサウイルス（Varicosaviruses）、ワイカウイルス（Waikaviruses）：セキウイルス科（Sequiviridae）、未分類ウイルス、プロモウイルス、ポチウイルス科及びチモウイルス；特定の関連植物ウイルスは、例えば、タバコモザイクウイルス（Tobacco mosaic virus (TMV)）、トマト・スポッテッド・ウィルトウイルス（Tomato spotted wilt virus）、トマト黄化葉巻ウイルス（Tomato yellow leaf curl virus）、キュウリモザイクウイルス（Cucumber mosaic virus）、ジャガイモYウイルス（Potato virus Y）、カリフラワーモザイクウイルス（Cauliflower mosaic virus）、アフリカキャッサバモザイクウイルス（African cassava mosaic virus）、プラム・ポックス・ウイルス（Plum pox virus）、ブロムモザイクウイルス（Brome mosaic virus）、ジャガイモXウイルス（Potato virus X）、カンキツトリステザウイルス（Citrus tristeza virus）、オオムギ黄化萎縮ウイルス（Barley yellow dwarf virus）、ジャガイモ葉捲病ウイルス（Potato leaf roll virus）、及びトマトブッシースタントウイルス（Tomato bushy stunt virus）。

ウイルス性肝炎は、腫れ、圧痛、時には肝臓への永続的な損傷を生じ得る、臓の炎症である。肝臓の炎症が少なくとも6ヶ月以上継続する場合には、慢性肝炎と言われる。A、B、C、D及びE型肝炎を含む、ウイルス性肝炎を引き起こすことが知られている少なくとも5種のウイルスが存在する。A型肝炎は、一般的に、ヒトの糞で汚染された食物又は飲み水によって伝染する。B型肝炎は、一般的に、血液のような体液を介して蔓延する。例えば、母親から出生時の子供に、性交、汚染された血液輸液及び針を介して、蔓延し得る。C型肝炎は、極めて一般的であり、B型肝炎と類似し、血液輸液及び汚染された針を介して一般的に蔓延する。D型肝炎は、それが互いに関連付けられるB型肝炎ウイルスを保持するIV薬物使用者に最も頻繁に見出される。E型肝炎は、ウイルス性A型肝炎に類似し、一般的に衛生不良に関連する。

10

【1173】

グラム陰性及びグラム陽性細菌は、脊椎動物において抗原として働く。かかるグラム陽性細菌は、パステラ (*Pasteurella*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococci*) 属、及びストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属を含むが、これらに限定されない。グラム陰性細菌は、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、及びサルモネラ (*Salmonella*) 属を含むが、これらに限定されない。感染性細菌の具体的な例は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、マイコバクテリウム (*Mycobacteria*) 属 (例えば、*M. チュベルクロシス*、*M. アビウム*、*M. イントラセルラーレ*、*M. カンサシー*、*M. ゴルドナエ*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、ナイセリア・ゴナーリエ (*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギタイディス (*Neisseria meningitidis*)、リステリア・モノサイト

20

ゲネス (*Listeria monocytogenes*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) (群Aストレプトコッカス)、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) (群Bストレプトコッカス)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) (viridans group)、ストレプトコッカス・フェカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) (嫌気性属)、ストレプトコッカス・

30

ニウモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター (*Campylobacter*) 属、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属、ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*)、バチルス・アンシラシス (*Bacillus anthracis*)、コリネバクテリウム・ジフセリエ (*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、エリジペロスリックス・ルジオパシエ (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、クロストリジウム・ペルリングルス (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・テタニ (*Clostridium tetani*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、パステラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、バクテロイデス (*Bacteroides*) 属、フゾバクテリウム・ヌクレアータム (*Fusobacterium nucleatum*)、

40

【1174】

ストレプトバシラス・モニリフォルミス (*Streptobacillus moniliformis*)、トレポネーマ・パリダム (*Treponema pallidum*)、トレポネーマ・ペルテニュー (*Treponema pertenue*)、レプトスピラ (*Leptospira*) 属、リケッチア (*Rickettsia*)、及びアクチノマイセス・イスラエリ (*Actinomyces israelii*) を含むが、これらに限定されない。

【1175】

真菌の例は、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、ブラストミセス・デルマチチジス (*Blastomyces dermatitidis*)、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、カンジダ・アルビカンズ (*Candida albicans*) を含む。

50

【1176】

他の感染性生物（すなわち、原生生物）は、プラスモディウム（*Plasmodium*）属、例えば、プラスモディウム・ファルシパルム（*Plasmodium falciparum*）、プラスモディウム・マラリエ（*Plasmodium malariae*）、プラスモディウム・オバレ（*Plasmodium ovale*）、プラスモディウム・ビバックス（*Plasmodium vivax*）、及びトキソプラズマ・ゴンジイ（*Toxoplasma gondii*）を含む。

血液によって感染する寄生虫及び/又は組織寄生虫は、プラスモディウム属、バベシア・ミクロチ（*Babesia microti*）、バベシア・ジベルゲンス（*Babesia divergens*）、リーシュ

マニア・トロピカ（*Leishmania tropica*）、リーシュ

マニア（*Leishmania*）属、リーシュ

マニア・ブラジリエンシス（*Leishmania braziliensis*）、リーシュマニア・ドノバニ（*Leishmania donovani*）、トリパノソーマ・ガンビエンセ（*Trypanosoma gambiense*）及びトリパノソーマ・ロデシエンセ（*Trypanosoma rhodesiense*）（アフリカ睡眠病）、トリパノソーマ・クルーズ（*Trypanosoma cruzi*）（シャーガス病）、及びトキソプラズマ・ゴンジイを含む。

【1177】

他の医薬的に関連する微生物は文献に広範に記載されており、例えば、参照として本明細書にその全体の内容が組み込まれる、C.G.A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983を参照のこと。農業上関連する微生物（例えば、作物及び/又は家畜に感染する微生物）も知られている、例えば、George N. Agrios, *Plant Pathology*, Elsevier Academic Press, 第5版, 2005; John Lucas, *Plant Pathology and Plant Pathogens*, Wiley-Blackwell; 第3版, 1998; Dwight C. Hirsh, N. James MacLachlan, Richard L. Walker, *Veterinary Microbiology*, Wiley-Blackwell; 2 edition, 2004; 及びP. J. Quinn, et al, *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Wiley-Blackwell; 第2版, 2011に記載の微生物を含むが、これらに限定されない。

【1178】

本発明の提供されるオリゴヌクレオチド組成物は、抗菌剤と共に、対象（ヒト対象、又はいくつかの実施形態では、動物（例えば、家畜又はペット）又は植物（例えば、作物対象）に投与され得る。本明細書で使用される抗菌剤は、感染性微生物を殺し又は阻害することができる天然又は合成化合物を指す。本発明に従って有用である抗菌剤の種類は、対象が感染される又は感染されるリスクにある微生物の種類に依拠することになる。抗菌剤は、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤及び抗寄生虫剤を含むが、これらに限定されない。

「抗感染剤」、「抗菌剤」、「抗ウイルス剤」、「抗真菌剤及」、「抗寄生虫剤」及び「殺寄生虫薬」のような用語は、当業者に良く知られた意味を有し、標準的な医療テキストで定義されている。すなわち、抗菌剤は細菌を殺し又は阻害し、抗生物質及び同様な機能を有する他の合成又は天然化合物を含む。抗生物質は、細胞による二次代謝として産生される低分子量分子、例えば微生物である。一般的に、抗生物質は、微生物に特異的であって宿主細胞に存在しない、1又はそれ以上の細菌性機能又は構造を妨害する。抗ウイルス剤は、天然源から単離されるか又は合成され得、ウイルスを殺し又は阻害するために有用である。抗真菌剤は、表在性の真菌感染症並びに日和見性の及び主要な全身性真菌感染症を治療するために使用される。抗寄生虫剤は寄生虫を殺す又は阻害する。

【1179】

抗寄生虫薬の例は、ヒト投与に有用である殺寄生虫薬ともいわれ、アルベンダゾール、アンホテリシンB、ベンズニダゾール、ピチオノール、クロロキンHCl、クロロキンリン酸塩、クリンダマイシン、デヒドロエメチン、ジエチルカルバマジン、フロニド酸ジロキサニド、エフロルニチン、フラゾリダオン、グルココルチコイド、ハロファントリン、ヨードキノール、イベルメクチン、メベンダゾール、メフロキン、アンチモン酸メグルミオン、メラルソプロール、メトリホネート、メトロニダゾール、ニクロサミド、ニフルチモックス、オキサニキン、パロモマイシン、イセチオン酸ペンタミジン、ピペラ

10

20

30

40

50

ジン、プラジカンテル、プリマキンリン酸塩、プログアニル、パモ酸ピランテル、ピリメタンミン・スルホンアミド、ピリメタンミン・スルファドキシン、キナクリンHCl、キニーネ硫酸塩、キニジグルコネート、スピラマイシン、スチボグルコン酸ナトリウム（グルコン酸アンチモンナトリウム）、スラミン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、チアベンダゾール、チニダゾール、トリメトプリム-スルファメトザゾール、及びトリパルサミドを含むが、これらに限定されない。それらの内の一部は単独で又は他のものと組み合わせて使用される。

【1180】

抗菌剤は細菌の増殖又は機能を殺すか又は阻害する。抗菌剤の大きな類は抗生物質である。幅広い範囲の細菌を殺し又は阻害するために有効である抗生物質は、広域スペクトル抗生物質と言われる。他の種類の抗生物質は、グラム陽性又はグラム陰性クラスの細菌に対して主に有効である。これらの種類の抗生物質は、狭域スペクトル抗生物質と言われる。単一の生物又は疾患に対して有効であるが他の種類の細菌に対しては有効性ない他の抗生物質は、制限スペクトル抗生物質と言われる。抗菌剤は、その主な作用形式に基づいて分類されることがある。一般的に、抗菌剤は、細胞壁合成阻害性、細胞膜阻害剤、タンパク質合成阻害剤、核酸合成又は機能性阻害剤、及び拮抗阻害剤である。

【1181】

抗ウイルス剤は、ウイルスによる細胞の感染又は該細胞内でのウイルスの複製を抑制する化合物である。抗菌薬よりもずっと少ない抗ウイルス薬が存在する。ウイルス複製のプロセスは宿主細胞内のDNAの複製に非常に密接に関連するために、非特異的抗ウイルス剤は一般に宿主に対して毒性であるからである。抗ウイルス剤によって遮断又は阻害されるウイルス感染のプロセスには数個の段階が存在する。これらの段階は、宿主細胞へのウイルスの接着（免疫グロブリン又は結合ペプチド）、ウイルスの脱コーティング（例えば、アマンタジン）、ウイルス性mRNAの合成又は翻訳（例えば、インターフェéron）、ウイルス性RNA又はDNAの複製（例えば、ヌクレオチドアナログ）、新規ウイルスタンパク質の成熟（例えば、プロテアーゼ阻害剤）、及びウイルスの発芽及び放出、を含む。

【1182】

ヌクレオチドアナログは、ヌクレオチドに似ているが、不完全なもしくは異常なデオキシリボース又はリボース基を有する、合成化合物である。一旦ヌクレオチドアナログが細胞内にあると、それらはリン酸化されて、ウイルス性DNA又はRNAへの取り込みのために正常なヌクレオチドと拮抗する、形成三リン酸エステルを生成する。一旦ヌクレオチドアナログの三リン酸エステル形態が成長する核酸鎖に取り込まれると、ウイルス性ポリメラーゼとの不可逆的な会合を引き起こし、そのため連鎖停止を引き起こす。核酸アナログは、アシクロビル（ヘルpes単純ウイルス及び水痘-帯状疱疹の治療のために使用される）、ガンシクロビル（サイトメガロウイルスの治療のために有用である）、イドクスウリジン、リバビリン（呼吸器多核体ウイルスの治療のために有用である）、ジデオキシイノシン、ジデオキシシチジン、ジドブジン（アジドチミジン）、イミキモド、及びレシキモドを含むが、これらに限定されない。

【1183】

インターフェéronは、ウイルス感染細胞及び免疫細胞によって分泌されるサイトカインである。インターフェéronは、感染細胞に隣接した細胞上の特定の受容体に結合することによって機能し、ウイルスによる感染から細胞を保護する細胞中の変化を引き起こし； α 及び β -インターフェéronはまた、感染細胞表面上にクラスI及びクラスII MHC分子の発現を誘発し、宿主免疫細胞認識のための増加した抗原提示をもたらす； α 及び β -インターフェéronは、組換え体として入手でき、慢性肝炎B及びC感染症の治療のために使用されている。抗ウイルス療法に効果的である投薬量において、インターフェéronは、発熱、不調及び体重減少のような重度の副作用を有する。

【1184】

本発明で有用な抗ウイルス剤は、免疫グロブリン、アマンタジン、インターフェéron、ヌクレオチドアナログ、及びプロテアーゼ阻害剤を含むが、これらに限定されない。抗ウ

イルス剤の具体例は、アシクロビル；アシクロビルナトリウム；アデホビル；アロジン；アルビル

セプトスドトックス（Alvircept Sudotox）；塩酸アマンタジン；アラノチン；アリルドン；

メシル酸アテビルジン；アブリジン；シドフォビル；シバムフィリン；塩酸シタラビン；メシル

酸デラビルジン；デスシクロビル；ジダノシン；Disoxaril；エドクスジン；エンピラデン；エンピロキシム；ファミチクロビル；塩酸ファミチン；フィアシタビン；フィアルリジン；フォサリレート；ホスカルネットナトリウム；ホスホネットナトリウム；ガンシクロビル；ガンシクロビルナトリウム；イドクスウリジン；ケトキサール；ラミブジン；ロブカビル；塩酸メモチン；

メチサゾン；ネビラピン；ペンシクロビル；ピロダビル；リバビリン；塩酸リマンタジン；メシル酸サキナビル；塩酸ソマンタジン；ソリブジン；スタトロノ；スタブジン；塩酸チクロン；トリフルリジン；塩酸バラシクロビル；ビダラビン；リン酸ビダラビン；ビダラビンナトリウムリン酸；ピロ

キシム；ザルシタビン；及びジンピロキシムを含むが、これら限定されない。

【1185】

抗真菌剤は、感染性真菌の治療及び予防のために有用である。抗真菌剤は、時にはその作用機構によって分類される。抗真菌剤の中には、グルコース合成酵素を阻害することによって細胞壁阻害剤として機能するものもある。これらは、

【1186】

バシウンギン/ECBを含むがこれ限定されない。他の抗真菌剤は、膜統合性を不安定化することによって機能する。これらは、イミダゾール、例えばクロトリマゾール、セルタコナゾール、フルコナゾール、イントラコナゾール、ケトコナゾール、ミコナゾール及びボリコナゾール、並びにFK 463、アンホテリシンB、BAY 38-9502、MK 991、プラディマイシン、UK 292、ブテナフィン、及びテルビナフィンを含むが、これらに限定されない。他の抗真菌剤は、キチン（例えば、キチナーゼ）を切断することによって、又は免疫抑制（501クリーム）によって機能する。

【1187】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、癌等の細胞増殖性疾患を有する対象を治療するために有用である。癌を有する対象は、検出可能な癌性細胞を有する対象である。癌は、悪性、又は非悪性癌であり得る。癌又は腫瘍は、胆管癌；脳腫瘍；乳癌；子宮頸癌；絨毛癌；結腸癌；子宮内膜癌螺旋；食道癌；胃癌；上皮内腫瘍；リンパ腫；肝臓癌；肺癌（例えば、小細胞及び非小細胞）；メラノーマ；神経芽細胞腫；経口癌；卵巣癌；脾癌；前立腺癌；直腸癌；肉腫；皮膚癌；睾丸癌；甲状腺癌；及び腎癌、及び他の悪性腫瘍及び肉腫を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、癌は、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄性白血病、癌性T細胞白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、悪性メラノーマ、扁平上皮癌、腎癌、前立腺癌、膀胱細胞癌、又は結腸癌である。

【1188】

提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、単独で又は抗癌療法と組み合わせて投与され得る。抗癌療法は、放射線療法、化学療法、免疫療法、又は癌ワクチン、ホルモン療法、生物学的応答修飾因子、及び外科的手段を含むが、これらに限定されない。癌医薬は、癌を治療する目的で対象に投与される物質を意味する。本明細書で使用される「癌を治療すること」は、癌の進行を防止すること、癌の症状を減少させること、及び/又は確立した癌の成長を阻害することを含む。他の態様では、癌医薬は、癌の発症のリスクを減少させる目的で癌を進行するリスクにある対象に投与される。癌の治療のための医薬の様々な種類が本明細書に記載される。この特定の目的で、癌医薬は、化学療法剤、免疫療法剤、癌ワクチン、ホルモン療法及び生物学的応答修飾因子として分類される。

【1189】

更に、本発明の方法は、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物と共に1より多い医薬の使用を包含することを意図する。例として、好適には、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物は、化学療法剤及び免疫療法剤の両方と共に投与され得る。あるいは、癌医薬は、免疫療法剤及び癌ワクチン、又は化学療法剤及び癌ワクチン、又は化学療法剤、免疫療法剤及び癌ワクチンを包含し得、これらはすべて、癌を有する又は癌の発症のリスクにある対象を治療する目的で1対象に投与される。

【1190】

化学療法剤は、以下から成る群から選択することができるが、それらに限定されない：メトトレキサート、ビンクリスチン、アドリアマイシン、シスプラチン、非糖含有クロロエチルニトロソウレア、5-フルオロウラシル、マイトマシニンC、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ダカルバジン、タキソール、フラギリシン、メグラミンGLA、バルルビシン、カルムスタイン及びポリフェルボサン、MMI270、BAY 12-9566、RASファルネシル基転移酵素阻害剤 (farnesyl transferase inhibitor)、ファルネシル基転移酵素阻害剤 (farnesyl transferase inhibitor)、MMP、MTA/LY231514、LY264618/ロメテキソール、グラモレック、CI-994、TNP-470、ハイカムチン/トポテカン、PKC412、バルスポダール/PSC833、ノバントロン/ミトキサントロン、メタレット/スラミン、パチマスタット、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、インセル/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN 698、TA 2516/マルミスタット、BB2516/マルミスタット、CDP 845、D2163、PD183805、DX8951f、レモナールDP 2202、FK 317、ピシバニル/OK-432、AD 32/バルルビシン、メタストロン/ストロンチウム誘導体、テモダール/テモゾロミド、エバセット/リボソーム化ドキソルビシン、イエウタキサン/パクリタキセル、タキソール/パクリタキセル、ゼローダ/カペシタビン、フルツロン/ドキシフルリジン、シクロパックス/経口パクリタキセル、経口トキソイド、SPU-077/シスプラチン、HMR 1275/フラボピリドール、CP-358 (774)/EGFR、CP-609 (754)/RAS癌遺伝子阻害剤、BMS-182751/経口プラチナ、UFT(テガフル/ウラシル)、エルガミゾール/レバミゾール、エニルラシル/776C85/5FUエンハンサー、カンプト/レバミゾール、カンプトサル/イリノテカン、トミュデックス/ラルチトレキセド、レウスタチン/クラドリビン、パクセクス/パクリタキセル、ドキシル/リボソーム化ドキソルビシン、カエリクスリボソーム化ドキソルビシン、フルダラ/フルダラビン、ファルモルビシン/エピルビシン、デボCyt、ZD1839、LU 79553/ビスナフタレンイミド (Bis-Naphtalimide)、LU 103793/ドラスタチン、カエチクス/リボソーム化ドキソルビシン、ジェムザール/ゲムシタビン、ZD 0473/アノルメド、YM 116、ヨードシード、CDK4及びCDK2阻害剤、PARP阻害剤、D4809/デキシフォサミド、イフェス/メスネクス/イフォサミド、ブモン/テニポシド、パラプラチン/カルボプラチン、プランチノール/カルボプラチン、プランチノール/シスプラチン、ベペシド/エトポシド、ZD 9331、タキソテレ/ドセタキセル、グアニンアラビノシドのプロドラッグ、タキサンアナログ、ニトロソウレア、アルキル化剤、例えばメルフェラン及びシクロホスファミド、アミノグルテチミド、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クロラムブシル、シタラビンHCl、ダクチノマイシン、ダウノルビシンHCl、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エトポシド (VP16-213)、フルオロキシウリジン、フルオロウラシル (5-FU)、フルタミド、ヒドロキシウレア (ヒドロキシカルバミド)、イソスファミソ、インターフェロン α -2a、 α -2b、酢酸リユープロリド (LHRH-放出因子アナログ)、ロムスチン (CCNU)、メイロレタミンHCl (窒素マスタード)、メルカプトプリン、メスナ、ミトタン (o.p'-DDD)、ミトキサントロンHCl、オクトレオチド、プリカマイシン、プロカルバジンHCl、ストレプトゾシン、

【1191】

タモキシフェンクエン酸塩、チオグアニン、チオテバ、ビンブラスチン硫酸塩、アムサクリン (m-AMSA)、アザシチジン、エリスロポイエチン、ヘキサメチルメラミン (HMM)、インターロイキン2、ミトグアゾン (メチル-GAG; メチルグリオキールビス-グアニルヒドラゾン; MGBG)、ペントスタチン (2'-デオキシコホルマイシン)、セムスチン (メチル-CCNU)、テニポシド (VM-26) 及びビンデシン硫酸塩。

【1192】

10

20

30

40

50

免疫治療剤は、リブタキシン、ハーセプチン、クアドラメット、パノレックス、IDEC-Y 2B8、BEC2、C225、オンコリム、SMART M195、アトラジェン、オバレックス、ベキサール、LDP-03、ior t β 、MDX-210、MDX-11、MDX-22、OV103、3622W94、抗VEGF、Zenapax、MDX-220、MDX-447、MELIMMUNE-2、MELIMMUNE-1、シアシド、プレターゲット、NovoMAb-G2、TNT、Gliomab-H、GNI-250、EMD-72000、LymphoCide、CMA 676、monopharm-C、4B5、ior egf.r3、ior c5、BABS、抗FLK-2、MDX-260、ANA Ab、SMART 1 D10 Ab、SMART ABL 364 Ab、及びImmuRAIT-CEAから成る群より選ばれ得るが、これらに限定されない。

【1193】

癌ワクチンは、EGF、抗ヨード型癌ワクチン、Gp75抗原、GMKメラノーマワクチン、MGV ガングリオシド複合体ワクチン、Her2/neu、Ovarex、M-Vax、O-Vax、L-Vax、STn-KHL the ratope、BLP25 (MUC-1)、リポソーム性ヨウ素ワクチン、メラチン、ペプチド抗原ワクチン、毒素/抗原ワクチン、MVA-型ワクチン、PACIS、BCGワクチン、TA-HPV、TA-CIN、DISC-ウイルス及びImmuCyst/TheraCysから成る群から選択することができるが、それらに限定されない。

【1194】

本明細書で使用される「癌抗原」及び「腫瘍抗原」という用語は、癌細胞によって差別的に発現され、それによって癌細胞を標的とするために利用され得る、抗原を指すために、互換的に使用される。癌抗原は、明らかに腫瘍特異的免疫応答を潜在的に刺激することができる抗原である。これらの抗原の中には、正常細胞によって必ずしも発現されないが、コードされるものもある。これらの抗原は、正常細胞中では通常サイレント（すなわち、発現されない）もの、分化の特定の段階でのみ発現されるもの、及び胚性抗原及び胎児抗原のような一時的に発現されるものとして特徴付けられる。他の癌抗原は、突然変異細胞遺伝子、例えば癌遺伝子（例えば、活性化されたras癌遺伝子）、サプレッサ遺伝子（例えば、変異体p53）、内部削除又は染色体転位から得られる融合タンパク質によってコードされる。なお更に他の癌抗原は、ウイルス性遺伝子、例えばRNA及びDNA腫瘍ウイルス上に担持されたものによってコードされ得る。

【1195】

いくつかの実施形態では、提供される免疫調節オリゴヌクレオチド組成物はまた、自己免疫疾患を治療及び予防するために有用であり得る。自己免疫疾患は、対象自身の抗体が宿主組織と反応するか、又は免疫エフェクタT細胞が内因性自己ペプチドに対して自己反応性であり組織崩壊を引き起こす、疾患類である。従って、免疫応答は、自己抗原と称される、対象自身の抗原に対してなされる。自己免疫疾患は、円形脱毛症、後天性血友病、強直性せきつい炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫関連不妊症、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性糖尿病、自己免疫性血小板減少性紫斑病、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、慢性疲労免疫不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、チャージ・ストラウス症候群、眼部瘢痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、皮膚筋炎、円板状紅斑性狼瘡、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症、線維筋炎、ギラン・バレー症候群、橋本病、糸球体腎炎（例えば、急速進行性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎）、グレーブス病、移植片対宿主病、グッドパスチャー症候群、天疱瘡（例えば、尋常性天疱瘡）、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病、インスリン抵抗性、特発性アジソン病、IgA腎症、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む）、若年性関節炎、扁平紅色苔癬、重症筋無力症、多発性硬化症、混合性結合組織病、多発筋炎、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レーノー現象、ライター症候群、若年性及び成人関節リウマチ、シェーグレン症候群、抗コラーゲン抗体関連強皮症、スティッフパーソン症候群、全身性紅斑性狼瘡（SLE）、高安動脈炎、臓器移植拒絶、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、ぶどう膜炎、潰瘍性大腸炎、脈管炎、及び尋常性白斑を含むが、これらに限定されない。

【1196】

本明細書で用いられる「自己抗原」は、正常な宿主組織の抗原を指す。正常な宿主組織

は癌細胞を含まない。従って、自己免疫疾患の文脈において、自己抗原に対して起こった免疫応答は、望ましくない免疫応答であり、組織の崩壊及び損傷の原因となるが、癌抗原に対して起こった免疫応答は望ましい免疫応答であり、腫瘍又は癌の崩壊に寄与する。従って、自己免疫疾患を治療することを目的とする本発明のいくつかの態様において、免疫調節オリゴヌクレオチドが自己抗原、特に自己免疫疾患の標的である自己抗原と一緒に投与されることは推奨されない。

【1197】

他の例では、本発明に従って使用される免疫調節オリゴヌクレオチドは、低投薬量の自己抗原と共に送達され得る。多数の動物試験は、低投薬量の抗原の粘膜投与が免疫低応答性又は「寛容」の状態をもたらすことを証明している。活動的な機構は、主としてTh2及びTh3に対してTh1から離れたサイトカイン介在免疫誘導（すなわち、TGF- β 支配）であるようである。低投薬量抗原による活動的な抑制はまた、自己免疫疾患、例えば慢性関節リウマチ及びSLEの治療において非常に興味深い非関連免疫応答を抑制する（バイスタンダー効果）。バイスタンダー効果は、前炎症性及びTh1サイトカインが抗原特異的又は抗原非特異的な方法のいずれかで放出される局所環境での、Th1拮抗制御性、抑制性サイトカインの分泌を含む。本明細書で用いられる「寛容」は、この現象を指す。実際に、経口寛容は、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、実験的自己免疫性重症筋無力症、コラーゲン誘発関節炎（CIA）、及びインスリン依存性糖尿病を含む動物の多数の自己免疫疾患の治療に効果的となっている。これらのモデルでは、自己免疫疾患の予防及び抑制は、Th1からTh2/Th3応答までの抗原特異的体液性及び細胞性応答におけるシフトと関連する。

【1198】

本発明に従って使用され得る有用な免疫調節オリゴヌクレオチドの非限定的な例は、添付の添付書類（B）で提供される。

【1199】

RIptide

いくつかの実施形態では、本発明に従って利用されるオリゴヌクレオチドは、RNA相互作用ポリヌクレオチド（「RIptide」）である、またはそれとして作用する。RIptideは、疾病に関係づけられる構造的RNAを不活性化することにより、「創薬可能でない（undruggable）」標的の空白の可能性を開くことを意図した療法の1つである。RIptideは、典型的に、構造RNAの作用を結合および分裂させる小ヌクレオチド配列（約8ヌクレオチド）である。それらの大きさのため、これらの分子は、容易に細胞膜を通過できる。例えば、米国特許第6,080,585号参照。

【1200】

RIptideは、いくつかの臨床応用に対して有用であり得る。癌治療との関連で、少なくとも1つの標的は、癌細胞中約90%存在するテロメラーゼである。従って、いくつかの実施形態では、本発明の立体制御されたオリゴヌクレオチドは、様々な癌治療用途で、テロメラーゼを標的とするために使用され得る。加えて、RIptideは、感染症治療用途に有用であり得る。HIVおよびC型肝炎などのウイルスは、複製するために、宿主細胞を乗っ取ることができる必要がある。従って、構造RNAは、多くのウイルスの成熟および複製に重要な役割を果たし得る。従って、いくつかの実施形態では、本発明の立体制御されたオリゴヌクレオチドは、ウイルスの成熟および／または複製に関連するDNAまたはRNAの部分を標的とするために使用され得る。

【1201】

従って、本発明は、様々なウイルス性感染症治療用途に有用である。ウイルスとしては、エンテロウイルス（ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルスなどのピコルナウイルス科のウイルスを含むがこれに限定されない）、ロタウイルス、アデノウイルス、およびA型、B型、C型、D型およびE型肝炎などの肝炎ウイルスが挙げられるが、これに限定されない。ヒト中に見られるウイルスの具体例としては：レトロウイルス科（例えば、HIV1型などのヒト免疫不全ウイルス、（HTLV-IIIとも呼ばれる）、LAVまたはHTLV-III/LAV、またはHIV-III；およびHIV-LPな

どの他の分離株；ピコルナウイルス科（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カリシウイルス科（例えば、胃腸炎の原因となる株）；トガウイルス科（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（例えば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（例えば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、RSウイルス）；オルトミクソウイルス科（例えば、インフルエンザウイルス）；ブニヤウイルス科（例えば、ハンタンウイルス、ブニヤウイルス、フレボウイルスおよびナイロウイルス）；アレナウイルス科（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（例えば、レオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス）；ビルナウイルス科；ヘパドナウイルス科（B型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（パルボウイルス）；パポバウイルス科（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス科（主にアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（単純ヘルペスウイルス（HSV）1型および2型、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV））；ボックスウイルス科（痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルス）；イリドウイルス科（例えば、アフリカブタコレラウイルス）；および他のウイルス急性喉頭気管支炎ウイルス、アルファウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ニパーウイルス、ノーウォークウイルス、パピローマウイルス、パラインフルエンザウイルス、トリインフルエンザ、SARSウイルス、ウエストナイルウイルスが挙げられるが、これに限定されない。

10

20

【1202】

アンチセンス薬

本発明は、様々なアンチセンスに基づく療法も包含する。典型的に、アンチセンス薬は、好ましい薬物特性を設計するために化学的に修飾された小DNA様またはRNA様化合物（12～21ヌクレオチド）である。当技術分野で有用ないくつかのアンチセンス薬としては、ホスホロチオエートまたはデオキシオリゴヌクレオチドが挙げられ、この場合、硫黄基は、リン酸骨格上の非架橋酸素と交換される。これは、リボヌクレアーゼ分解に対する耐性を増加し、薬理的安定性を改良する。さらに、他の薬剤、いわゆる「次世代アンチセンス分子」では、該オリゴヌクレオチドは、該骨格の2'-O-メトキシエチル修飾であり、これは、標的RNAのこれらのオリゴヌクレオチドに対する親和性を増加させ得る。しかしながら、場合によっては、これらの薬剤の多くは、望ましくない免疫応答などの副作用を伴う。少なくともいくつかの状況においては、かかるこれらの薬剤の望ましくない特性は、それらのステレオランダムな本性に、少なくとも部分的に起因している。本発明は、改良された親油性およびRNA結合増加などの好ましい特性を有する立体制御された相当物を提供する。

30

【1203】

いくつかのアンチセンスに基づく療法が開発されている、または開発中である。アンチセンス療法の限定されない例を下記に挙げる。本明細書に記載の立体制御された（例えば、キラル純粋な）オリゴヌクレオチドは、当技術分野で現在利用可能なアンチセンス薬と比較して、有効性の改良、標的への親和性増加、副作用の低減、薬物動態の改良、安定性強化および／または生物学的利用度増加を達成するために合成され得る。いくつかの実施形態では、アンチセンス療法としては、モルホリノ薬類が挙げられる。例えば：Morcos, PA (2007). "Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos". Biochem Biophys Res Commun 358 (2): 521-7参照。

40

【1204】

サイトメガロウイルス性網膜炎：ホミビルセン（ビトラベンとして市販）は、サイトメガロウイルス性網膜炎用治療として、1988年8月に、米国食品医薬品局により認可された。

【1205】

50

出血熱ウイルス：2006年初頭に、米国陸軍感染症研究所でエボラ出血熱ウイルス研究の科学者は、4頭のアカゲザルが感染して、米国バイオ企業であるアビバイオフーマにより開発されたアンチセンスモルホリノ薬で治療の後、75%回復したと公表した。[米国陸軍感染症研究所、メリーランド州フォートデトリック。新聞発表：遺伝子特異性エボラ治療が非ヒト霊長類を致命的病気から守る。2006年1月13日] エボラウイルスに感染したサル通常の死亡率は100%である。2008年後半に、アビバイオフーマは、マールブルクウイルスおよびエボラウイルスのためのその2つのリード商品を、米国食品医薬品局に、成功裏に治験薬（IND）申請した。これらの薬剤、AVI-6002（Lu, X; Yu, Q; Binder, GK; Chen, Z; Slepishkina, T; Rossi, J; Dropulic, B (2004). "Antisense-Mediated Inhibition of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Replication by Use of an HIV Type 1-Based Vector Results in Severely Attenuated Mutants Incapable of Developing Resistance". Journal of Virology 78 (13): 7079-88) およびAVI-6003は、抗ウイルス効力が、モルホリノオリゴマー鎖への正帯電した成分の添加により増強される、AVIのPMOアンチセンス化学品に基づいた新規類似体である。AVI-6002およびAVI-6003の前臨床結果は、それぞれ、エボラおよびマールブルクウイルスの致命的感染に曝露された非ヒト霊長類の再現性のある高生存率を示した（メディカルニューストゥデイ。アビバイオフーマは、米国食品医薬品局が、エボラおよびマールブルクウイルス治療用RNA治療薬の臨床試験の治験薬申請を承認すると発表。2008年12月30日）。

10

【1206】

20

癌：また、2006年に、ドイツの医師は、高悪性度グリオーマを患っている患者の化合物AP12009（ヒトトランスフォーミング増殖因子TGF- β 2のmRNAに特異性のあるホスホロチオエートアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド）の用量漸増研究を報告した。報告時に、全生存中央値は得られず、著者は、潜在的治療薬を示唆した（G004の結果、再発性未分化星状細胞腫を対象とした、TGF- β 2を標的とする化合物AP12009の第IIb相アクティブ制御臨床試験-Hauら24（18補足）：1566—米国臨床腫瘍学会ミーティング抄録）。

【1207】

例えば、トラベデルセン（AP12009-P001）は、進行型膵癌、悪性メラノーマ、脳腫瘍、未分化星状細胞腫、および結腸直腸癌を患っている患者の治療用途の単剤療法として開発される。AP12009-P001は、TGF- β 2を過剰産生することが知られている進行性固形腫瘍を患っている、確立した療法で治療可能でない、あるいはもはや治療可能でない61名の患者にトラベデルセンの静脈内投与の安全性および耐受性を評価する非盲検多施設第I/I相用量漸増試験において評価されている。

30

【1208】

癌中で過剰発現されるタンパク質を標的とするアンチセンス薬の他の例としては：前立腺癌細胞中の増殖因子TGF β および転写制御因子TWIST1により誘導される上皮間葉転換を調節するクラスタリン（OGX-011/TVO1011）；前立腺癌治療のATL1101（インスリン様成長因子I受容体（IGF-IR）の次世代アンチセンス阻害剤）；慢性リンパ性白血病治療用オブリメルセン（商品名：ジェナセンス）；慢性骨髄性白血病、メラノーマ、神経芽細胞腫、ならびに乳房、膵臓および結腸の癌の治療用G4460およびLR3001（c-myc阻害剤）；腎細胞癌の治療用MG98（DNAメチルトランスフェラーゼI阻害剤）；ISIS5132（c-Rafアンチセンス）；LY900003（タンパク質キナーゼC α アンチセンス）；G3139（Bcl-2アンチセンス）、他が挙げられる。

40

【1209】

HIV/AIDS：2004年に開始して、米国の研究者らは、HIVと闘うためにアンチセンス技術を使用して研究を行っている。HIV型1ベースベクターの使用によるヒト免疫不全ウイルス（HIV）複製のアンチセンス介在阻害が、耐性を生じることが不可能なひどく弱毒な変異株をもたらすことが知られている。2010年2月に、研究者らは

50

、回収、RNAアンチセンス鎖を用いて、HIVウイルス性エンベロープタンパク質に修飾、およびレトロウイルスの薬物療法の計画経過中に患者中に再注入された該患者T細胞を用いて、HIVウイルス量の減少に成功したと報告した。

【1210】

高コレステロール：2010年に、ミボメルセン（以前のISIS301012、商品名Kynamro）は、高コレステロールのいくつかの型に対して、第三相試験を、成功裏に完了した。ミボメルセンは、コレステロール低下薬候補である。それは、アポリポタンパク質Bに対するメッセンジャーRNAを標的とするアンチセンス治療である。Merki E, Graham MJ, Mullick AE, et al. (August 2008)参照。「ヒトアポリポタンパク質B-100を対象とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、リポタンパク質（a）トランスジェニックマウス中のヒトアポリポタンパク質B-100粒子上のリポタンパク質（a）量および酸化リン脂質を減少させる」。Circulation 118 (7): 743-53; El Harchaoui K, Akdim F, Stroes ES, Trip MD, Kastelein JJ (2008)。「低密度リポタンパク質-コレステロールを達成できない患者の管理のための現在と将来の薬理的選択肢は、スタチン系薬剤で達成される」。Am J Cardiovasc Drugs 8 (4): 233-42; Athyros VG, Kakafika A I, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP (July 2008)。「循環器疾患の予防または治療のためのアンチセンス技術：次の画期的新薬は？」。Expert Opin Investig Drugs 17 (7): 969-72。それは、週1回の注射で投与される。該化合物は、「次世代」アンチセンスオリゴヌクレオチド；該ヌクレオチドは、RNAとDNAのホスホジエステル結合でなく、ホスホロチオエート結合で結合され、該糖部分は、該分子の中間部分のデオキシリボースおよび該両末端の2'-O-メトキシエチル修飾リボースである。これらの修飾は、該薬剤のヌクレアーゼによる分解耐性を、毎週投薬されることを可能にする。該薬剤は、肝臓に蓄積し、そのことは、アポリポタンパク質Bがそこで支配的に作用するので、好都合である。該完全な配列は、

$$\underline{G}^* - \underline{C}^* - C^* - \underline{U}^* - C^* - d \underline{A} - d G - d \underline{T} - d C - d T - d G - d \underline{mC} - d T - d T - d mC - G^* - C^* - A^* - C^* - C^* [d = 2' - \text{デオキシ}, * = 2' - O - (2 - \text{メトキシエチル})] (3' \rightarrow 5' \text{ホスホロチオエート結合を有する})$$
である。第三相試験は、家族性高コレステロール血症（FH）、ホモ接合（h o）およびヘテロ接合（h e）の両方を有する患者において行われた。FHは、例外的に高レベルの低密度リポタンパク質コレステロールの原因となる遺伝性疾患である。両方に試験は、それらの2つの患者集団中で今まで見られた最高の有効性、および他の注射可能な薬剤と比較して相対的に低中退率を有する例外的性能を示した。

【1211】

デュシェンヌ型筋ジストロフィ：デュシェンヌ型筋ジストロフィ（DMD）では、患者の筋肉細胞が破壊し失って、進行性筋力低下および死に至る。AVI-4658は、ジストロフィン、デュシェンヌ型筋ジストロフィ患者が欠乏する主要タンパク質の発現を回復する標的アンチセンス治療である。19名の患者の非盲検第二相用量漸増研究からの結果は、治療が完了したとき、筋生検を各患者から採取したことを示した。該チームは、「エキソンスキッピング」を通して機能的mRNAを産生する患者の能力が、AVI-4658の使用で修復され、最終的に、彼らが、機能的ジストロフィタンパク質を作ることができることを発見した。

【1212】

筋緊張性ジストロフィー：筋緊張性ジストロフィーは、主に骨格筋、心臓および神経系を冒す成人の最も一般的な筋疾患である。DMPKと呼ばれる遺伝子中の遺伝子コード（CTG）の3文字の多くのリピートの原因となる突然変異によって引き起こされる。それは、変異遺伝子から産生されたメッセンジャーRNAは、該RNAが細胞核内に集積する原因となる異常なリピート伸長も含む。そこで、それは、Muscleblind-like 1と呼ばれるタンパク質の機能を隔離および遮断し、CELF1と呼ばれる別のタンパク質を活性化する。これらのタンパク質は、もう1つのタンパク質を拮抗し、その結果、成体組織内の多くの他の遺伝子からタンパク質を異常発現し、疾病に至る。これに対抗

するため、Cooperおよび同僚らは、該異常なRNAリピート部分を探求し、リボヌクレアーゼHを、その分解の原因となる該有害RNAを対象に標的化する遺伝子材料の単純鎖であるアンチセンスオリゴヌクレオチドを作り出した。該アンチセンスオリゴヌクレオチドを、該隔離されたMuscleblind-like1の放出を助ける他のアンチセンスオリゴヌクレオチドと併用すると、該効果を増強し得ることも報告された。

【1213】

糖尿病：SGLT2（ISS388626）は、糖尿病患者の血中グルコースレベルの有意な低下をもたらすナトリウム-グルコース共輸送体2（SGLT2）レベルの低下を達成するアンチセンス薬である。

【1214】

肝炎：持続性C型肝炎ウイルス（HCV）感染は、肝疾患の主要原因である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、抗ウイルス薬の有望な分類である。開発中のかかる薬剤としては、HCV複製およびタンパク質発現を阻害する20単位ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドであるISS14803が挙げられる。

【1215】

治療方法

本明細書に記載の提供されるオリゴヌクレオチドおよびその組成物は、抗ウイルス薬としての使用を含む様々な病状に対する治療薬として有用である。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、DNAおよび／またはRNA活性の調節を通して疾病の治療用薬剤として使用され得る。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、特異的遺伝子発現を阻害するために使用され得る。例えば、提供されるオリゴヌクレオチドは、特異的標的メッセンジャーRNA（mRNA）配列に相補的であり得る。それは、種々のウイルスのウイルス性複製を阻害するために使用され得る。実例となるウイルスファミリーとしては、オルトミクソウイルス、ボックスウイルス、ヘルペスウイルス、パピローマウイルス、ピコルナウイルス、フラビウイルス、レトロウイルス、肝炎ウイルス、パラミクソウイルス、レオウイルス、バルボウイルス、フィロウイルス、コロナウイルス、アレナウイルス、ラブドウイルスおよびアデノウイルスが挙げられる。さらにウイルスファミリーが知られており、本明細書中において企図されている。他の例としては、HIV RNAもしくは他のレトロウイルス性RNAに対する、またはtatタンパク質をコードするHIV mRNAへ、またはHIV mRNAのTAR領域へハイブリダイズするためのアンチセンス化合物としての使用が挙げられる。いくつかの実施形態では、該核酸は、HIV mRNAのTAR領域の二次構造を模倣し、そうすることにより、tatタンパク質と結合する。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、細胞を提供されるオリゴヌクレオチドと接触させることにより、該細胞中の他のタンパク質発現は阻害しない、または最小限にのみ阻害し、標的タンパク質の発現を阻害するために使用される。いくつかの実施形態では、標的タンパク質阻害は、哺乳類の生体内で起こる。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドの治療効果が、標的タンパク質発現を阻害するために投与される。

【1216】

発現が調節され得るタンパク質の他の例としては、Jun-N末端キナーゼ（JNK）タンパク質、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼI、アポリポタンパク質B、グルカゴン受容体、オーロラB、アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ2、C反応性タンパク質、タンパク質のSTAT（シグナル伝達物質および転写活性化剤）ファミリー、およびMDR P糖タンパク質が挙げられる。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、タンパク質ホスファターゼ1B（PTP1B）発現、RNA依存性RNAウイルス性ポリメラーゼを阻害するために使用され得る。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、癌細胞内のアポトーシスなどのイベントを誘導するため、または細胞がアポトーシスを起こしやすくするために使用され得る。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、タンパク質活性を調節するために使用され得る。いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、多

10

20

30

40

50

剤耐性（MDR）RNA分子を標的化するリボヌクレアーゼH活性の調節を手助けし得る。

【1217】

いくつかの実施形態では、本発明は、望ましくない遺伝子発現を介した疾病の治療にかかる治療を必要とする対象（例えば、ヒトなどの哺乳類）において行う方法を提供する。

「疾病」は、疾病、または病徴を意味する。方法は、例えば、提供されるオリゴヌクレオチドの効果量を、該対象に投与することを含む。

【1218】

望ましくない遺伝子発現により媒介される疾病の例としては、癌（例えば、白血病、腫瘍、および転移）、アレルギー、喘息、肥満症、炎症（例えば、炎症性呼吸器疾患症候群などの炎症性疾患）、高コレステロール血症、血液疾患、重症急性呼吸器症候群（SARS）、閉塞性気道疾患、喘息、自己免疫疾患、AIDSまたはHIVなどのレトロウイルス性疾患、他のウイルス性感染症、子宮内感染症、代謝疾患、感染（例えば、細菌性、ウイルス性、酵母、真菌性）、中枢神経疾患、脳癌腫瘍、変性神経疾患、循環器疾患、および血管新生関連性疾患、血管新生、および血管形成が挙げられる。

【1219】

いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、膵癌、および異常細胞増殖を有する他の疾患または障害を含む癌治療用途に有用である。

【1220】

上腹部（後腹膜内）の位置し、膵臓は、消化系および内分泌系の二重機能腺である。場合によっては、膵臓は、内分泌腺（例えば、いくつかの重要なホルモン類を産生する）として機能する。場合によっては、膵臓は、内分泌腺（例えば、小腸を通過する消化酵素を含む分泌液）として機能する。

【1221】

膵癌は、米国で4番目に多い癌死亡の原因（肺癌、結腸癌および乳癌の次）であり、全癌関連死の6%である。2008年に、米国で、推定37,680名が、新たに膵癌患者と診断され、34,290名が死亡するだろう。発病率は、喫煙（喫煙者は、非喫煙者より4倍該疾患を発病しやすくなる）という決定的リスク因子のみで、50歳になると直線的に上昇する。浸潤性膵癌は、ほとんどの場合、致命的である。全患者の生存期間の集団中央値は4～6ヶ月である。相対的な1年生存率は24%であり；全体の5年生存率は5%未満である。

【1222】

膵癌は、早期では無症候性であり、しばしば、数ヶ月診断されないままとなる（発症後2ヶ月以内で診断される患者は3分の1未満）。場合によっては、診断が遅延した結果、（部分的にあるいは全部）癌性細胞が肝臓またはリンパ節に転移する。

【1223】

現在、手術（膵臓切除）が、膵癌の主要な、唯一の治療的療法である。しかしながら、診断時に、腫瘍の15～25%しか切除可能でなく、手術を行った患者の10～20%が、2年以上生存するのみである。一旦、腫瘍湿潤が起こり、他組織が侵されると、手術はもはや不可能である。

【1224】

場合によって、糖尿病または膵炎は、個体を病気に罹らせて、複数の膵細胞の増殖性疾患を発病する。場合によって、個体は、遺伝性非ポリポーシス大腸癌（HNPCC）および家族性大腸腺腫症（FAP）から成る群から選択される遺伝性症候群のため、複数の膵細胞の増殖性疾患を発病するリスクが増大している。場合によって、個体は、MSH2、MSH6、MLH1、およびAPCから成る群から選択される遺伝子突然変異のため、複数の膵細胞の増殖性疾患を発病するリスクが増大している。

【1225】

理想的には、膵癌の効果的治療は、（i）初期腫瘍量を、最初にそして引き続き抑制し、（ii）転移性腫瘍細胞を治療すべきである。化学予防（薬剤、生物製剤、栄養剤など

10

20

30

40

50

の薬剤投与)は、発癌の進行を示し、無効にし、または阻害し、それによって、湿潤性または臨床的に有意な疾患を発病するリスクを低減する。

【1226】

特定の実施形態では、本明細書中に、膵癌治療の方法が開示される。本明細書で使用时、「膵癌」は、膵臓の癌の形態を包含する。いくつかの実施形態では、膵癌は、転移性膵癌である。いくつかの実施形態では、膵癌は、癌腫、肉腫、癌、またはその組み合わせである。いくつかの実施形態では、治療される膵癌は、散発性および遺伝性膵癌を包含する。いくつかの実施形態では、膵癌は、管細胞癌、腺房細胞癌、乳頭粘液性癌、印環癌、腺扁平上皮癌、未分化癌、粘液性癌、巨細胞癌、小細胞癌、嚢腫癌、漿液性嚢腫癌、粘液嚢腫癌、未分類膵癌、膵芽腫、またはその組み合わせである。

10

【1227】

いくつかの実施形態では、膵癌の治療を必要とする個体は、膵臓の局所腫瘍の症状が見られる。いくつかの実施形態では、膵癌の治療を必要とする個体は、陰性所属リンパ節生検の症状が見られる。いくつかの実施形態では、膵癌の治療を必要とする個体は、結節性陰性膵腫瘍(例えば、リンパ節転移陰性)の症状が見られる。いくつかの実施形態では、膵癌の治療を必要とする個体は、結節性陽性腫瘍(例えば、リンパ節転移陽性)の症状が見られる。

【1228】

いくつかの実施形態では、膵癌の治療を必要とする個体の膵癌は、体内の他の場所に転移している。いくつかの実施形態では、膵癌は、リンパ節、胃、胆管、肝臓、骨、卵巣、腹膜および脳から成る群から選択される場所に転移している。

20

【1229】

いくつかの実施形態では、癌細胞または前癌性細胞は、組織試料(例えば、生検試料)の組織の分類または類別により特定される。いくつかの実施形態では、癌細胞または前癌性細胞は、適切な分子マーカーの使用を通して特定される。

【1230】

いくつかの実施形態では、膵癌の治療を必要とする個体の膵癌は、アメリカ癌合同委員会(AJCC)TNM分類システムに従って段階分類され、腫瘍(T)は、Txの病期、T1、T2、T3、T4に分類され；所属リンパ節(N)は、Nxの病期、N0、N1に分類され；遠隔転移(M)は、Mxの病期、M0、またはM1に分類される。いくつかの実施形態では、膵癌の治療を必要とする個体の膵癌は、病期0、I、IA、IB、II、IIA、IIB、III、およびIV膵癌に段階分類される。いくつかの実施形態では、膵癌の治療を必要とする個体の膵癌は、悪性度GX(例えば、悪性度は評価できない)、悪性度1、悪性度2、悪性度3または悪性度4に段階分類される。

30

【1231】

提供されるオリゴヌクレオチドを用いて治療される癌のより具体例としては、乳癌、肺癌、メラノーマ、結腸直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、扁平上皮癌、神経膠腫、カボジ肉腫、多発性骨髄腫、および白血病が挙げられる。

【1232】

癌の評価および治療

40

「腫瘍細胞抗原」という語は、無関係の腫瘍細胞、正常細胞、または正常体液より、腫瘍細胞または体液中に高い量で存在する抗原として、本明細書で定義される。該抗原の存在は、当業者に周知のいくつかのアッセイにより試験され得、ELISAアッセイ、ラジオイムノアッセイ、またはウェスタンブロット法などの抗体を用いた正のおよび/または負の選択が挙げられるが、これに限定されない。

【1233】

「アポトーシス誘導剤」は、アポトーシス/プログラム細胞死を誘導することとして、本明細書で定義され、例えば、抗癌薬および細胞(例えば、腫瘍細胞)がプログラム細胞死を起こすように誘導される治療を含む。実例となるアポトーシス誘導剤は、下記にさらに詳細に記載する。

50

【1234】

「アポトーシス」または「プログラム細胞死」という語は、不必要なまたは無用の細胞が、発育および他の正常な生物学的過程の中で取り除かれる生物学的過程を表す。アポトーシスは、正常な生物学的条件下で起こる細胞死の形式であり、該細胞は、その自身の終焉（「細胞の自殺」）に積極的参加する。それは、正常な細胞回転および組織の恒常性、胚形成、誘導および免疫寛容の維持、神経系の発達および内分泌依存性組織萎縮中、ほとんどの場合に見られる。アポトーシスを起こす細胞は、特有の形態的および生化学的特徴を示す。これらの特徴としては、クロマチン凝縮、核および細胞質凝縮、リボソームを含む小胞に結合した膜中への細胞質および核の分割、形態的に無傷のミトコンドリアおよび核物質が挙げられる。生体内で、これらのアポトーシス小体は、即座に、マクロファージ、樹状細胞または隣接上皮細胞により認識され貪食される。生体内のアポトーシス細胞を取り除くこの効率的な機序のおかげで、炎症反応が誘発されない。生体外では、残った細胞断片だけでなく、アポトーシス小体が、極度に膨潤し最終的に溶解する。生体外細胞のこの終末過程は、「二次的ネクローシス」と名付けられている。アポトーシスは、DNA断片化、アネキシンVの曝露、カスパーゼの活性化、チトクロムcの放出、他などの当業者に周知の方法により測定され得る。死に誘導された細胞は、本明細書中、「アポトーシス細胞」と呼ぶ。アポトーシスは、標準アネキシンVアポトーシスアッセイを用いても試験され得る：NIH：OVCA R-3細胞を6ウェルプレート（NUNC）で生育し、照射またはアンタゴニスト（または別の抗癌薬と併用して）で4〜48時間処理し、洗浄し、アネキシンV-FITC（BDファージンジェン）で1時間染色する。細胞を、フローサイトメトリー（ベクトンディッキンソン社Cell Quest）により分析し、ヨウ化プロピジウムを用いて対比染色して、フローサイトメトリーで再度分析する。

【1235】

患者は、治療レジメン前に、間に、および後に含む、1つ以上の時点で、症状に関して評価され得る。治療は、結果として、該対象の症状を改善し、1つ以上の次の因子、すなわち腫瘍の縮小、細胞増殖減少、細胞数減少、血管新生減少、アポトーシス増加、または腫瘍細胞の少なくとも一部の生存率低下が起こったかどうかを決定することにより評価され得る。いくつかの場合、これら1つ以上が起こると、結果として、該癌の部分的または全排除および該患者の生存期間延長をもたらす得る。あるいは、末期癌では、治療は、結果として、病気の小康、生活の質向上および／または生存期間延長をもたらす得る。

【1236】

細胞遊走アッセイ方法

細胞遊走アッセイは、文献、例えば、by Brooks, et al., J. Clin. Invest 1997, 99: 1390-1398に記載されており、細胞遊走の測定方法は、当業者に周知である。本明細書に記載の1つの細胞遊走測定方法では、トランスウェル遊走チャンバーからの膜を、基質でコートし、該トランスウェルを洗浄し、非特異性結合部位をBSAでブロックする。サブコンフルエント培養から腫瘍細胞を回収し、洗浄して、アッセイ抗体のありなしで、遊走緩衝液中に再懸濁する。該腫瘍細胞を、該コート済みトランスウェル膜の裏面に遊走可能にした後、該膜の上面に残った細胞を除去し、該裏面に遊走する細胞を、クリスタルバイオレットで染色する。それから、細胞遊走を、顕微鏡視野当たりの細胞数を直接定量化する。

【1237】

腫瘍増殖アッセイ方法

腫瘍増殖は、当業者に周知の方法、例えば、SCIDマウスモデル、ヌードマウスモデル、および同系腫瘍を有するBALB/cマウスによりアッセイされ得る。腫瘍増殖用SCIDマウスモデルは、次のように実行される：サブコンフルエントヒトM21メラノーマ細胞（またはいずれかの所望の腫瘍細胞型）を回収し、洗浄して、滅菌PBS（20 x 106/mL）中に再懸濁する。SCIDマウスに、100 μLのM21ヒトメラノーマ細胞（2 x 106）懸濁液を皮下注射する。腫瘍細胞注射後3日目に、マウスは、処置しない、または所望の用量範囲のアンタゴニストで腹腔内にで処置をする。該マウスを、2

4日間毎日処置する。腫瘍サイズを、ノギスで測定し、該体積を、式 $V = (L \times W^2) / 2$ （式中、 V は容量と同じ、 L は長さと同じ、および W は幅と同じ）を用いて見積もる。

【1238】

あるいは、ヌードマウスモデル、SCIDマウスモデルおよび／またはBALB/c同系マウスモデルを、本明細書に記載のヒト化抗エンドグリン抗体または抗原結合フラグメントにより、腫瘍増殖およびその阻害を評価するためにも利用することができる。

【1239】

細胞増殖アッセイ方法

細胞増殖は、当業者に周知の方法によりアッセイされ得る。本明細書に記載のように、サブコンフルエントヒト内皮細胞（HUEC）を、ECVまたはECVL細胞からCM（25μL）のありなしで、低（5.0%）血清を含む増殖緩衝液中に再懸濁し、内皮細胞を、24時間増殖させ得る。増殖を、市販のWST-1アッセイキット（ケミコン社）を用いて、ミトコンドリアの脱水素酵素活性の測定により定量化する。また、本明細書に記載のように、増殖は、標準法を用いて3H取込みの測定により定量化され得る。（Sheetal., Int. J. Cancer, 108: 251-257 (2004)）。

【1240】

細胞増殖評価の他の方法は、当分野で周知であり、本明細書で企図される。さらに、制限されない例を、実施例により詳細に記載している。

【1241】

本明細書に記載の分類および段階分類システムは、本明細書に記載の癌治療を評価することを意味している表し；加えて、他の段階分類スキームは、当分野で周知であり、本明細書に記載の方法と共に使用され得ることは理解するはずである。例のみとして、悪性腫瘍のTNM分類は、患者体内の癌の程度を説明するための癌段階分類システムとして使用され得る。Tは、腫瘍サイズおよび隣接組織に浸潤しているかどうかを記述し、Nは、関わる所属リンパ節を記述し、Mは、遠隔転移を記述する。TNMは、国際対癌協会（UICC）により維持され、アメリカ癌合同委員会（AJCC）および国際婦人科産科学連盟（FIGO）により採用されている。例えば、脳腫瘍など、全ての腫瘍がTNM分類を有するわけではない。一般に、T（a, is, (0), 1~4）は、原発性腫瘍のサイズまたは直接の程度として測定される。N（0~3）は、所属リンパ節への拡散の程度を表し：N0は、腫瘍細胞が所属リンパ節にないことを意味し；N1は、腫瘍細胞が所属リンパ節の最近接部または少数に拡散していることを意味し、N2は、腫瘍細胞がN1とN3の間の程度で拡散していることを意味し；N3は、腫瘍細胞が最遠隔部または多数の所属リンパ節に拡散していることを意味する。M（0/1）は、転移の存在を表し：M0は、遠隔転移が存在しないことを意味し；M1は、転移が遠隔器官（所属リンパ節を超えて）に起こっていることを意味する。他のパラメーターも評価され得る。G（1~4）は、癌細胞の悪性度を表す（すなわち、それらが、もし、正常細胞と類似して見えるならば、低悪性度であり、もし、低分化に見えるならば高悪性度である）。R（0/1/2）は、手術の完全性（すなわち、切除境界の癌細胞がないかどうか）を表す。L（0/1）は、リンパ管中への浸潤を表す。V（0/1）は、静脈中への浸潤を表す。C（1~4）は、Vの確実性（質）因子を表す。

【1242】

本明細書中で、癌細胞を分解、増殖阻害または死滅するために有効な、本明細書に記載の化合物のある量と、該細胞を接触させることを含む、該癌細胞を分解、増殖阻害または死滅するための方法が提供される。

【1243】

本明細書中で、腫瘍サイズ増大を抑制、腫瘍サイズ縮小、腫瘍増殖低減または腫瘍増殖阻止するために、本明細書に記載の化合物の効果量を、個体に投与することを含む、前記個体の腫瘍サイズ増大を抑制、腫瘍サイズ縮小、腫瘍増殖低減または腫瘍増殖阻止する方法が提供される。いくつかの場合に、腫瘍治療は、症状の小康、すなわち、該患者の治療

により、該癌が悪化せず、該患者の生存期間が延長されることを含む。

【1244】

患者は、治療レジメン前に、間に、および後に含む、1つまたはそれ以上の複数時点で、症状に関して評価され得る。治療は、結果として、該対象の症状を改善し、1つ以上の次のイベント：腫瘍の縮小、腫瘍細胞増殖の減少、細胞数減少、血管新生減少および／またはアポトーシス増加が起こるかどうかを決定することにより評価され得る。いくつかの場合、これら1つ以上が起こると、結果として、該癌の部分的または全排除および該患者の生存期間延長をもたらす得る。あるいは、末期癌では、治療は、結果として、病気の小康、生活の質向上および／または生存期間延長をもたらす得る。

【1245】

治療を評価する他の方法は、当分野で周知であり、本明細書中で企図される。例示的实施形態では、本発明のプロオリゴヌクレオチドは、医学的疾患、例えば、癌、または望まれない細胞分類の存在により特徴付けられる非悪性症状に患っている、哺乳類（例えば、ヒト）などの対象に投与される。

【1246】

主要結果尺度は、本明細書に記載の方法を用いて治療される患者で評価され得、例えば、無増悪生存期間を含む。一実施形態では、無増悪生存期間増加は、治療のない場合と比較して、約2倍、5倍、10倍、20倍、50倍またはそれ以上多い量で観察される。別の実施形態では、無増悪生存期間増加は、治療のない場合と比較して、約3ヶ月、約6ヶ月、約9ヶ月、約12ヶ月、約18ヶ月、約2年、約3年、約4年、約5年またはそれ以上長く生存期間が増加する。

【1247】

副次結果尺度も評価され得、奏効期間、腫瘍進行時間、全生存、重篤および重篤でない有害事象を含む。例えば、治療は、病気の進行を阻止（すなわち、小康）または改善をもたらす得る。あるいは、または加えて、他の目的は、1つ以上の次のもの：腫瘍量減少、血管新生減少、副作用減少、有害反応減少、および／または患者のコンプライアンス向上に関して測定され得る。

【1248】

本発明の化合物または組成物による治療が治療または予防に有用である、疾病または障害の他の具体例としては、移植片拒絶（例えば、腎臓、肝臓、心臓、肺、島細胞、膵臓、骨、骨髄、角膜、小腸、皮膚同種移植または異種移植および他の移植片）、移植片対宿主病、変形性関節症、関節リウマチ、多発性硬化症、糖尿病、糖尿病性網膜症、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、および他の腸疾患）、腎疾患、悪液質、敗血症性ショック、ループス、重症筋無力症、乾癬、皮膚炎、湿疹、脂漏、アルツハイマー病、パーキンソン病、化学療法中幹細胞保護、自家または同種骨髄移植のための生体外選択または生体外浄化、眼球内疾患、網膜症（例えば、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、および他の網膜症）、角膜疾患、緑内障、感染症（例えば、細菌性、ウイルス性、または真菌性）、これに限定されないが再狭窄を含む心疾患が挙げられるが、これに限定されない。

【1249】

リボヌクレアーゼLの活性化

2'-5'オリゴアデニル化（2-5A）／リボヌクレアーゼL経路は、インターフェロンにより誘導される酵素経路の1つである。リボヌクレアーゼLは、2'-5'アデニル酸の5'-リン酸化フラグメントに結合後活性化される。2'-5'アデニル酸（2-5A）のこれらのフラグメントは、2'-5'オリゴ（A）シンテターゼの制御下産生される。この経路は、自然免疫系の部分であり、ウイルス性感染症の予防に重要な役割を有する。一本鎖RNAの2-5A誘導切断は、アポトーシスをもたらす。2-5Aの生体内安定なホスホロチオエート類似体は、リボヌクレアーゼLの強力な活性剤であることが示されている（Xianh et al., Cancer Research (2003), 63:6795-6801）。この研究では、該2-5A類似体は、リボヌクレアーゼL活性を誘導し、末期転移ヒト前立腺癌細胞株DU145、PC3およびLNCaPの培養液中アポトーシスを引き起こした。

10

20

30

40

50

【1250】

リボヌクレアーゼLの持続的活性化は、癌性／腫瘍細胞だけでなく、ウイルス感染細胞を除去するアポトーシスのミトコンドリア経路を開始させる。リボヌクレアーゼLは、線維肉腫増殖、前立腺癌増殖、結腸直腸癌増殖および膵癌増殖を阻害し得る。種々の癌でリボヌクレアーゼLの共通の役割が与えられ、本明細書に記載の本発明は、いずれもの型の癌の治療に使用され得ることが企図されている。Silverman, RH, Cytokine Growth Factor Rev, 18(5-6): 381-388 (2007); Bisbal, C. and Silverman, RH, Biochimie. 89(6-7): 789-798 (2007)。例として、リボヌクレアーゼLの下方制御は、典型的健康人集団のリボヌクレアーゼLの所定レベルと比較して、リボヌクレアーゼLをコードする遺伝子（単数）または遺伝子（複数）の発現レベルのいずれもの減少、リボヌクレアーゼLをコードする遺伝子（単数）または遺伝子（複数）のサイレンシング、リボヌクレアーゼLを含むタンパク質の発現／翻訳のレベルの低減、細胞内に存在するリボヌクレアーゼLの量の減少、および／またはリボヌクレアーゼLの活性のいずれもの低下を表す。あるいは、本明細書に記載のリボヌクレアーゼLレベルのいずれもの減少は、リボヌクレアーゼLの下方制御を示し得る。

10

【1251】

いくつかの実施形態では、提供されるオリゴヌクレオチドは、下方制御されたリボヌクレアーゼLを有する疾病の治療のために有用である。いくつかの実施形態では、下方制御されたリボヌクレアーゼLに関連する疾病は癌である。いくつかの実施形態では、該癌は、膵癌、前立腺癌、または結腸直腸癌である。あるいは、本明細書に記載の提供されるオリゴヌクレオチドは、発現上昇したリボヌクレアーゼLを有する疾病の治療のために有用である。いくつかの実施形態では、発現上昇したリボヌクレアーゼLを有する疾病は、慢性疲労症候群である。発現上昇したリボヌクレアーゼLを有するさらなる疾病は、当分野で周知であり、本明細書中に考察される。

20

【1252】

治療として使用されるとき、提供されるオリゴヌクレオチドは、医薬組成物として投与される。いくつかの実施形態では、該医薬組成物は、その薬剤的に許容可能な塩を含む提供されるオリゴヌクレオチド、またはその薬剤的に許容可能な塩の治療効果量、および薬剤的に許容可能な希釈剤、薬剤的に許容可能な賦形剤、および薬剤的に許容可能な担体から選択される少なくとも1つの薬剤的に許容可能な不活性成分を含む。別の実施形態では、該医薬組成物は、静脈注射、経口投与、口腔投与、吸入、鼻腔内投与、局所投与、眼投与または耳投与用途に処方される。さらなる実施形態では、該医薬組成物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、吸入剤、点鼻液剤、坐剤、懸濁剤、ゲル剤、コロイド剤、分散剤、懸濁剤、液剤、乳剤、軟膏剤、ローション剤、点眼剤または点耳剤である。

30

【1253】

医薬組成物

治療として使用されるとき、本明細書に記載の提供されるオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド組成物は、医薬組成物として投与される。いくつかの実施形態では、該医薬組成物は、提供されるオリゴヌクレオチド、またはその薬剤的に許容可能な塩の治療効果量、および薬剤的に許容可能な希釈剤、薬剤的に許容可能な賦形剤、および薬剤的に許容可能な担体から選択される少なくとも1つの薬剤的に許容可能な不活性成分を含む。いくつかの実施形態では、該医薬組成物は、静脈注射、経口投与、口腔投与、吸入、鼻腔内投与、局所投与、眼投与または耳投与用途に処方される。いくつかの実施形態では、該医薬組成物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、吸入剤、点鼻液剤、坐剤、懸濁剤、ゲル剤、コロイド剤、分散剤、懸濁剤、液剤、乳剤、軟膏剤、ローション剤、点眼剤または点耳剤である。

40

【1254】

いくつかの実施形態では、本発明は、キラル制御されたオリゴヌクレオチド、または薬剤的に許容可能な賦形剤と混合したその組成物を含む医薬組成物を提供する。当業者は、該医薬組成物は、上記の該キラル制御されたオリゴヌクレオチドの薬剤的に許容可能な塩

50

、またはその組成物を含むことを認識するだろう。

【1255】

送達を増強および標的化する化合物

本明細書に記載の提供されるオリゴヌクレオチドは、様々なリガンドとの核酸複合体、ならびにナノ担体のアプローチの使用を含む様々な送達戦略を用いて送達され得る。いずれの核酸送達戦略も、本明細書に記載の提供されるオリゴヌクレオチドの使用が企図される。これに限定されないが、化学複合体、カチオン性脂質／リボソーム輸送媒体および超分子ナノ担体を含む典型的送達戦略間の選択は、該治療の状況に依存し、最適な送達様式を決定する方法は、当業者に周知であり、本明細書でさらに考察される。

【1256】

細胞貫通性化合物（「CPC」）

多数の化合物が、核酸などの積荷の担体として作用し、生体内設定の細胞中の核酸の流入を促進することが知られている。実例となる担体は、Dietz et al., Molecular & Cellular Neuroscience, 27(2): 85-131 (2004)（参照することにより、本明細書中に組み入れられるものとする）に記載されている。Tatおよびアンテナペディア転写制御因子由来プロトタイプCPCは、大多数の新しい部分によって連結されている。例として、ペプチドであるCPCは、アルギニンおよびリジンが多い相対的に短い（9～30アミノ酸）ポリカチオン性ペプチド、または膜相互作用疎水性配列であり得る。CPCは、組み換えDNA技術により結合またはペプチド、オリゴヌクレオチドもしくはナノ担体と化学的に結合し得、それから、CPCの「積荷」を含む。

【1257】

細胞標的リガンド（「CTL」）

別の戦略は、効率的インターナリゼーションが可能な細胞表面受容体と高親和性で結合するCTLの使用により、オリゴヌクレオチドを送達することである。有望なリガンドとしては、抗体、ファージディスプレイライブラリー由来のポリペプチド、および小有機分子が上げられる。さらなる細胞標的リガンドは、当業者に周知であり、または開発されるだろうし、本明細書に記載の本発明での使用が企図される（ASGPRのため—GalNAc複合化siRNAおよびオリゴヌクレオチド、例えば、国際公開WO第2012037254号A1）。様々な受容体が、しばしば、特定の細胞型で選択的に発現されるので、このアプローチは、該オリゴヌクレオチド試薬に対する改良された選択性の可能性を提供する。実例となる受容体標的としては、リボタンパク質受容体（肝臓中のものなど）、インテグリン、受容体型チロシンキナーゼ、およびGタンパク質共役受容体（GPCR）スーパーファミリーが挙げられるが、これに限定されない。

【1258】

ナノ担体

様々な超分子ナノ担体は、核酸の送達のために使用され得る。実例となるナノ担体としては、リボソーム、カチオン性ポリマー複合体および様々な高分子が上げられるが、これに限定されない。様々なポリカチオンと核酸の複合体形成は、細胞間送達のための別のアプローチであり；これは、PEG化ポリカチオン、ポリエチレンアミン（PEI）複合体、カチオン性ブロック共重合体、およびデンドリマーの使用が挙げられる。PEIおよびポリアミドアミンデンドリマーを含むいくつかのカチオン性ナノ担体は、エンドソームからの内容物の放出を助ける。他のアプローチとしては、ポリマーナノ粒子、ポリマーミセル、量子ドットおよびリポプレックスの使用が挙げられる。

【1259】

さらなる核酸送達戦略が、本明細書に記載の例示的送達戦略に加えて知られている。

【1260】

治療および／または診断応用では、本発明の化合物は、全身および局所または局在的投与を含む様々な投与方法用途で処方され得る。技術および処方物は、一般に、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed. 2000)中に見出される。

【1261】

提供されるオリゴヌクレオチド、およびその組成物は、広い用量範囲に渡って有効である。例えば、成人治療では、1日に、約0.01～約1000mg、約0.5～約100mg、約1～約50mg、および1日に、約5～約100mgが、使用され得る用量の例である。正確な用量は、投与経路、化合物が投与される形態、被治療対象、被治療対象の体重、ならびに主治医の選好および経験に依存するだろう。

【1262】

薬剤的に許容可能な塩は、一般に、当業者に周知であり、例えば、酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ベシル酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、重酒石酸塩、臭化物、エデト酸カルシウム、カルンシレート (carnsylate)、炭酸塩、クエン酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、エシレート、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニレート、ヘキシルレゾルシン酸塩、ヒドラバミン、臭化水素、塩化水素、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、粘液酸塩、ナプシル酸塩、硝酸塩、パモ酸塩 (パモ酸塩)、パントテン酸塩、リン酸塩／ニリン酸塩、ポリガラクトツロ酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、塩基性酢酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、またはテオクル酸塩が挙げられるが、これに限定されない。他の薬剤的に許容可能な塩は、例えば、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)で、見られ得る。好ましい薬剤的に許容可能な塩としては、例えば、酢酸塩、安息香酸塩、臭化物、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、臭化水素、塩化水素、マレイン酸塩、メシル酸塩、ナプシル酸塩、パモ酸塩 (エンボン酸塩)、リン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、または酒石酸塩が挙げられる。

【1263】

治療される特定の症状に依存して、かかる薬剤は、液または固体剤形に処方され、全身的にまたは局所的に投与され得る。該薬剤は、例えば、当業者に周知の時限的または持続的低放出形態で送達され得る。製剤技術および投与は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20th ed. 2000)で見出され得る。適当な経路としては、経口、口腔、吸入スプレー、舌下、直腸内、経皮、経膈、経粘膜、経鼻または腸投与；筋肉内、皮下、くも膜下腔内、直接的脳（心）室内、静脈内、関節内、胸骨内、髄液包内、肝内、病巣内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内、または眼内注射だけでなく、髄内注射を含む非経口送達、または他の送達方法が挙げられ得る。

【1264】

注射用では、本発明の薬剤は、ハックス液、リンゲル溶液、または生理食塩水などの生理的に適合した緩衝液中などの水溶液中に処方および希釈され得る。かかる経粘膜投与用では、浸透される該関門に適切な浸透剤が、該処方物に使用される。かかる浸透剤は、一般に、当分野で周知である。

【1265】

全身投与に適切な製剤中に、本発明の実践のため開示された本明細書中の化合物を処方するための薬剤的に許容可能な不活性担体の使用は、本発明の範囲内である。担体の適切な選択および適切な製造実践で、本発明の組成物、特に、液剤のこれらの処方物は、静脈内注射など、非経口投与され得る。

【1266】

該化合物は、経口投与用途に適切な製剤中に、当業者に周知の薬剤的に許容可能な担体を使用して、容易に処方され得る。かかる担体は、本発明の化合物を、被治療対象（例えば、患者）の経口摂取用途の錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとしての処方を可能にする。

【1267】

経鼻または吸入送達用途では、本発明の薬剤は、当業者に周知の方法によっても処方され得、例えば、生理食塩水などの可溶化、希釈、または分散物質、ベンジルアルコールなどの保存剤、吸収促進剤、およびフッ化炭素の例が挙げられるが、これに限定されない。

【1268】

10

20

30

40

50

本発明の使用に適切な医薬組成物としては、該活性成分がその意図される目的を達成するための効果量で含有される組成物が挙げられる。効果量の決定は、特に、本明細書で提供される詳細な開示に照らして、当業者なら十分に行うことができる。

【1269】

該活性成分に加えて、これらの医薬組成物は、薬剂的に使用され得る製剤中に、該活性化合物の過程を促進する賦形剤および助剤を含む適当な薬剂的に許容可能な担体を含み得る。経口投与用途に処方される該製剤は、錠剤、糖衣剤、カプセル剤、または液剤の形態であり得る。

【1270】

経口使用用途の医薬製剤は、該活性化合物を、適当な助剤を添加後、必要に応じて、錠剤または糖衣剤コアを得るために、固体賦形剤と混合し、得られた混合物を粉碎してもよく、および顆粒剤の混合加工により得られ得る。適当な賦形剤は、特に、ラクトース、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類；セルロース製剤、例えば、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース（CMC）ナトリウム、および／またはポリビニルピロリドン（PVP：ポビドン）などの充填剤である。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩など、崩壊剤が添加され得る。

【1271】

糖衣剤コアは、適当なコーティングと一緒に提供される。この目的のため、高濃度糖溶液が使用され得、これは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール（PEG）、および／または二酸化チタン、ラッカー液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含有してもよい。色素または顔料が、種々の組み合わせの活性化合物用量を識別または特徴付けするために、該錠剤または糖衣剤コーティングに添加され得る。

【1272】

経口的に使用され得る医薬製剤としては、ゼラチンで製造される密封軟カプセル剤およびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤だけでなく、ゼラチンで製造されたプッシュフィットカプセル剤が挙げられる。該プッシュフィットカプセル剤は、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、および／またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤との混合物中、および安定剤を混合してもよく、該活性成分を含み得る。軟カプセル剤中、該活性化合物は、脂肪油、流動パラフィンまたは液体ポリエチレングリコール（PEG）などの適当な液体中に溶解または懸濁され得る。加えて、安定剤が添加され得る。

【1273】

治療または予防される特定に症状または病状に依存して、その症状を治療または予防するために正常に投与される追加の治療薬は、本発明の阻害剤と一緒に投与され得る。例えば、化学療法薬または他の抗増殖剤は、増殖性疾患および癌を治療するため、本発明の阻害剤と併用し得る。周知の化学療法薬の例としては、アドリアマイシン、デキサメタゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、トポテカン、タキソール、インターフェロン類、および白金誘導体が挙げられるが、これに限定されない。

【1274】

薬剤の他の例、本発明の非ラセミプロオリゴヌクレオチドは、限定されないが、副腎皮質ステロイド類、TNF遮断薬類、IL-1 RA、アザチオプリン、シクロホスファミド、およびスルファサラジンなどの抗炎症薬類；シクロスポリン、タクロリムス、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、インターフェロン類、副腎皮質ステロイド類、シクロホスファミド、アザチオプリン、およびスルファサラジンなどの免疫調節薬類および免疫抑制薬類；アセチルコリンエステラーゼ阻害薬類、MAO阻害剤類、インターフェロン類、鎮座薬類、イオンチャネル遮断薬類、リルゾール、および抗パーキンソン薬などの神経栄養因子類； β 遮断薬類、ACE阻害薬、利尿薬、硝酸薬類、カルシウムチャネル遮

10

20

30

40

50

断薬類、およびスタチン系薬剤などの循環器疾患治療薬類；副腎皮質ステロイド類、コレステラミン、インターフェロン類、および抗ウイルス薬類などの肝疾患治療薬類；副腎皮質ステロイド類、抗白血病薬類、および増殖因子類などの血液疾患治療薬類；インスリン、インスリン類似体などの糖尿病治療薬、 α グルコシダーゼ阻害薬、ビッグアナイド、およびインスリン感受性改善薬類；および γ グロブリンなどの免疫不全症治療薬類とも併用され得る。

【1275】

これらの追加の薬剤は、複数の投薬レジメンの部分として、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、およびその組成物と別々に投与され得る。あるいは、これらの追加の薬剤は、単一の組成物中に、提供されるキラル制御されたオリゴヌクレオチド、およびその組成物と一緒に混合した単一剤形の部分であり得る。

10

【1276】

下記に提供される実施例および製剤は、提供されるオリゴヌクレオチドおよびその組成物、およびその製造方法を、さらに例示および例証する。本発明の範囲が、次の実施例および製剤の範囲により、決して制限されないことを理解されるものとする。

【1277】

本発明のこれらおよび他の実施形態の機能および利点は、下記実施例からもっと詳しく理解されるだろう。次の実施例は、本発明の利益を例示することを意図し、本発明の全範囲を例証するものではない。

【1278】

オリゴヌクレオチド組成物の分析方法

いくつかの実施形態では、本発明は、オリゴヌクレオチド組成物を分析する方法を提供する。いくつかの実施形態では、提供される方法は、例えば、1つ以上のオリゴヌクレオチドの同定、純度、定量および／または品質を検出、決定、および／または定量化する。いくつかの実施形態では、本発明は、

20

a) 複数の種々の型のオリゴヌクレオチドを含む1番目の組成の1番目の分析を実施するステップ；および

b) 該実施した1番目の分析を、該オリゴヌクレオチドのキラル制御された組成物である2番目の組成物の2番目の分析と、該1番目の分析と同等な条件下で比較するステップであり、該1番目と2番目の分析間の差が、該2番目の組成物と比較して、該1番目の少なくとも1つの該オリゴヌクレオチドの存在下またはレベルでの差を反映するステップを含む方法を提供する。

30

【1279】

いくつかの実施形態では、2番目の組成物は、該オリゴヌクレオチドの単一の型のみを含む。いくつかの実施形態では、2番目の組成物は、該オリゴヌクレオチドの1つ以上の型を含む。いくつかの実施形態では、提供される方法は、例えば、実施例17および48に示されるオリゴヌクレオチド組成物の品質制御のために使用される。当業者により認識されるように、実施例48に示したデータは、該組成物を比較する示した分析は、該ランダムオリゴヌクレオチド組成物（該1番目組成物）が、非キラル制御オリゴヌクレオチド合成により合成されるとき、該キラル制御組成物（該2番目組成物）の全R_pまたはS_pなどの特定のオリゴヌクレオチド型を極端に低いレベルで含むことを示していることを確認している。

40

【実施例】

【1280】

前述のものは、本発明の特定の非限定的な実施形態の記載である。したがって、本明細書において記載される本発明の実施形態は、本発明の原理の適用について単に説明するものであることが理解されるべきである。説明する実施形態の詳細について、本明細書における言及は、請求の範囲を限定することを意図するものではない。

【1281】

オリゴヌクレオチド合成の概要

50

【1282】

前記のとおり、およびここに記載するとおり、いくつかの実施形態においては、本発明はオリゴヌクレオチドおよびその調製方法を提供する。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチドの合成は固体担体を使用して行う。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチドの合成は溶液中で行う。いくつかの実施形態においては、オリゴヌクレオチドの合成は、固体担体を使用するステップと、溶液相におけるステップを含む。いくつかの実施形態においては、固体担体を使用するステップは、オリゴヌクレオチド合成装置で行う。

【1283】

固体担体の調製：

担体（高架橋ポリスチレン（HCP）または制御多孔性ガラス（CPG））を使用して、オリゴヌクレオチド配列に含有される第1の5'-O-DMTr保護ヌクレオシドを充填した。いくつかの実施形態においては、AlulらのOxalyl-CPG: a labile support for synthesis of sensitive oligonucleotide derivatives, Nucleic Acids Research 1991, 19(7), 1527において記載の通り、オキサリル基を使用して第1ヌクレオシドの3'-OH基を固体担体のアミノ基に結合した。いくつかの実施形態においては、標準的なサクシニル基をリンカーとして使用した。

【1284】

固体担体上でのヌクレオチドの脱トリチル：

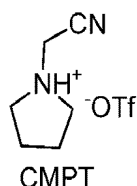
3% TCA（トリクロロ酢酸）ジクロロメタン（DCM、CH₂Cl₂）溶液を、合成装置に設置した、担体を含有するカラムに展開し、5'-O-DMTrを脱ブロックした。

【1285】

CMPT媒介キラルホスホラミダイトカップリング：

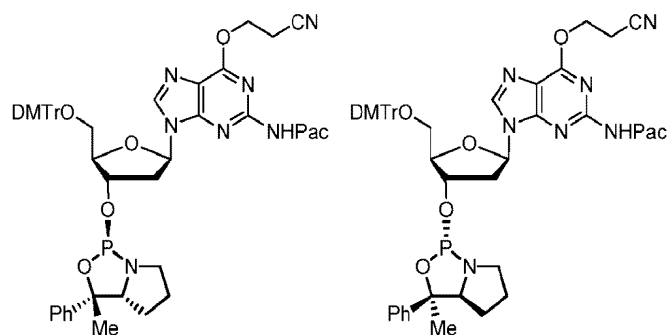
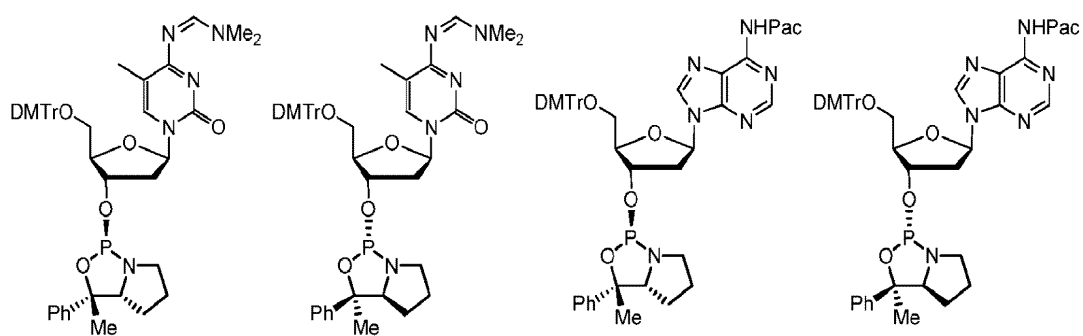
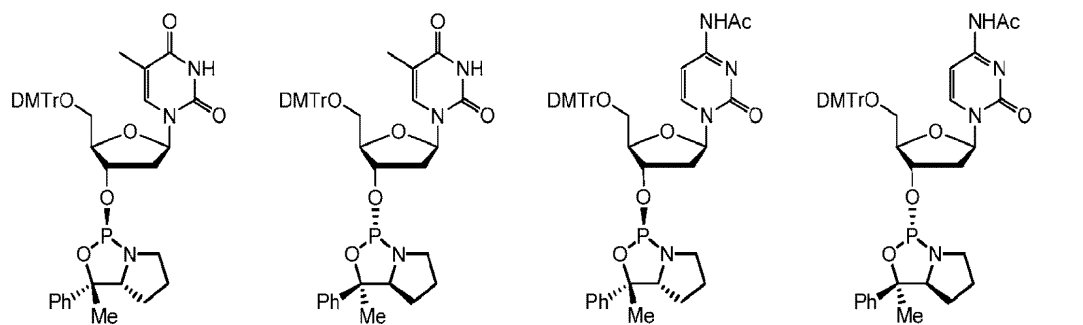
固体担体を無水アセトニトリル（ACN）で洗浄し、乾燥アルゴンの逆流により乾燥した後、遊離の5'-OHを、オリゴヌクレオチド配列中の次のヌクレオチドと結合し、3'末端から5'末端に伸長させた。WadaらのJ. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 16031-1603; Angew. Chem. Intern. Ed. 2009, 48, 496-499に記載されるとおり、これはCMPT（下記）を伴ったキラルホスホラミダイト溶液の固体担体への共展開をもたらし、その結果、高効率なカップリングと優れた鏡像体過剰率（典型的に、99%超）を示し、キラル亜リン酸ジエステル生成物を得た。溶媒は通常アセトニトリル（ACN）であったが、他の溶媒も使用することができた。

【化345】

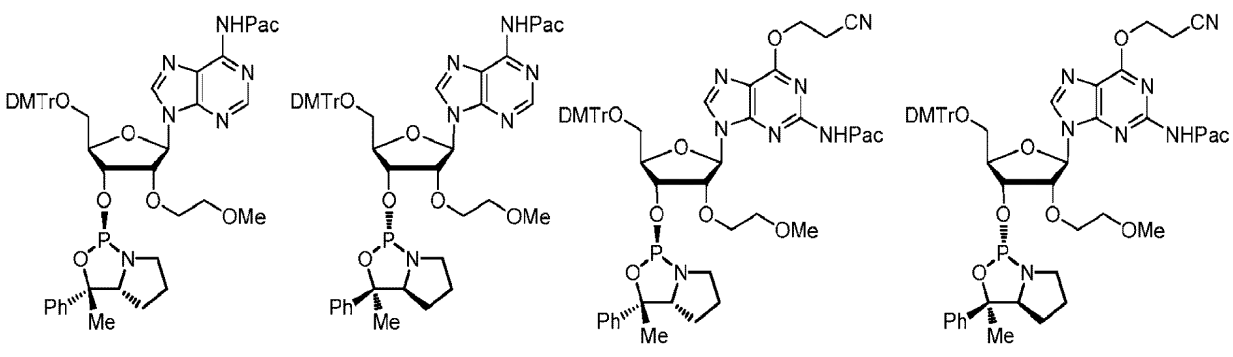


これらの研究で使用したキラルホスホラミダイトは以下の通りである：

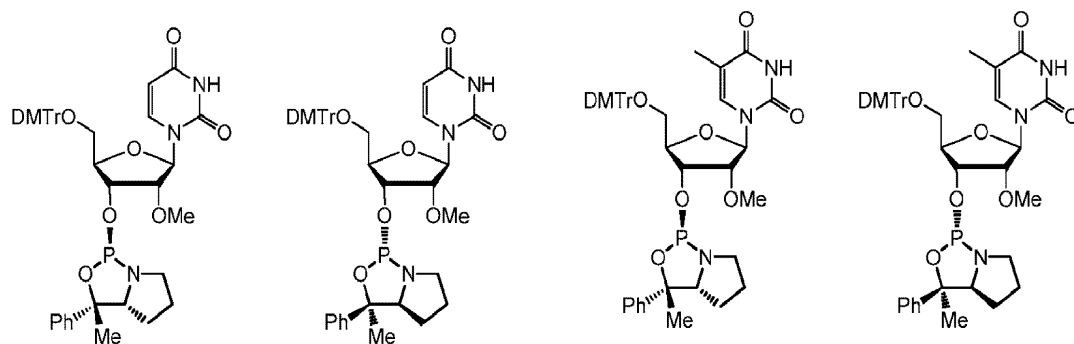
【化 3 4 6】



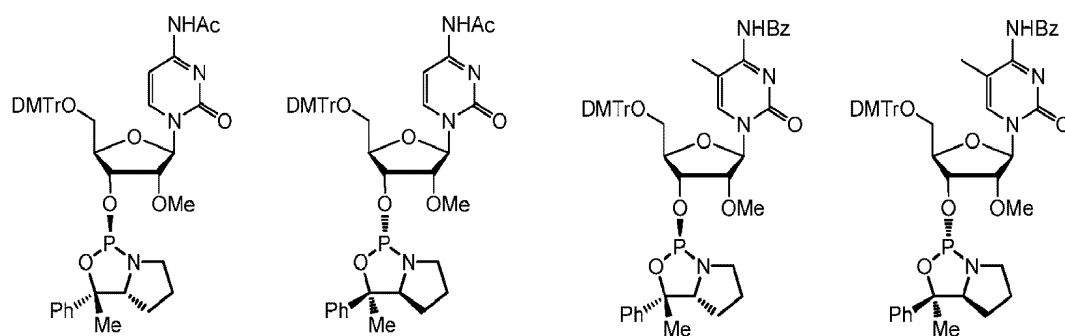
10



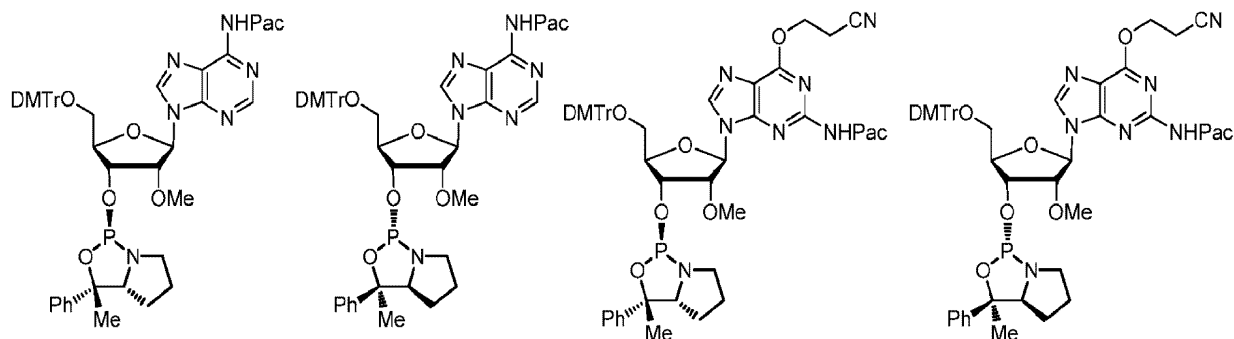
【化 3 4 8】



10

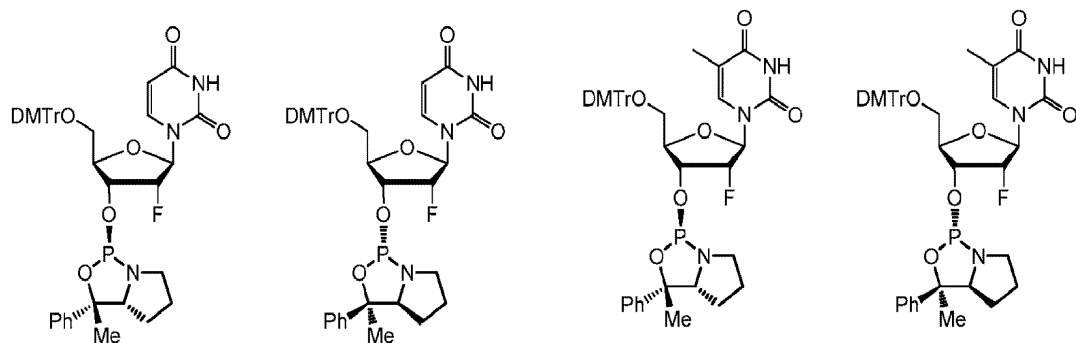


20

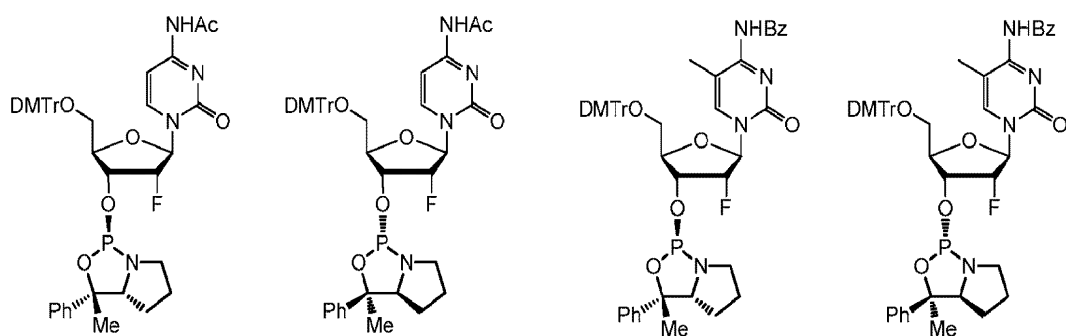


30

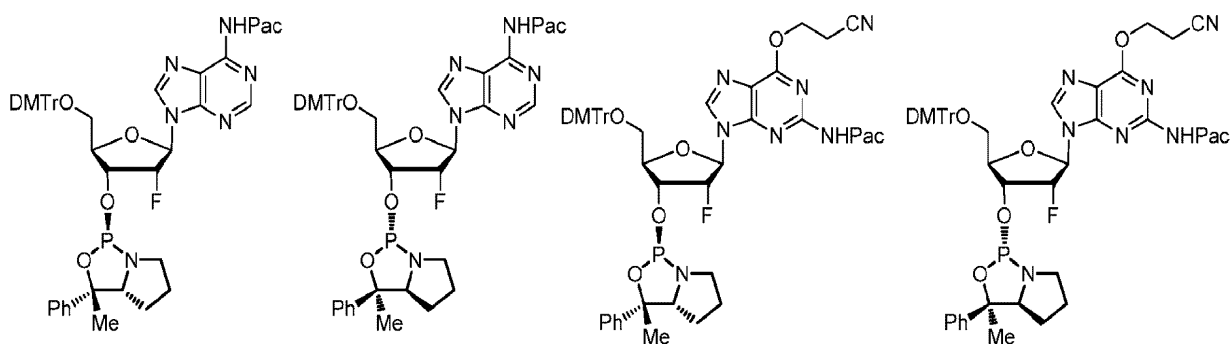
【化 3 4 9】



10



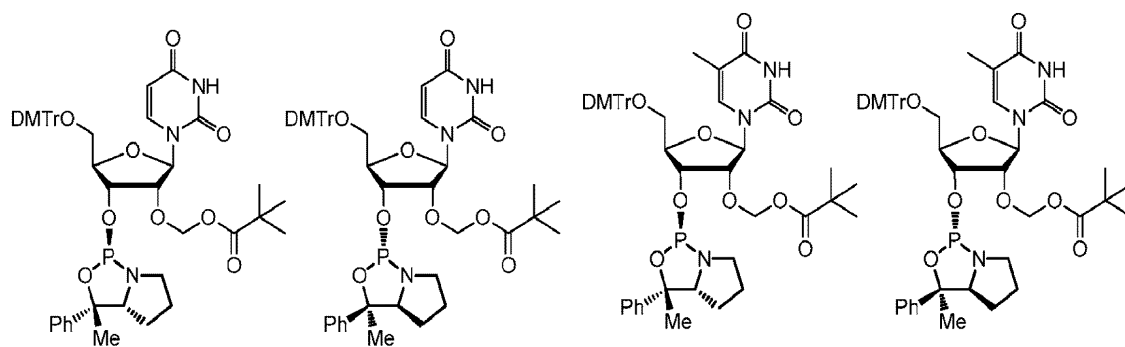
20



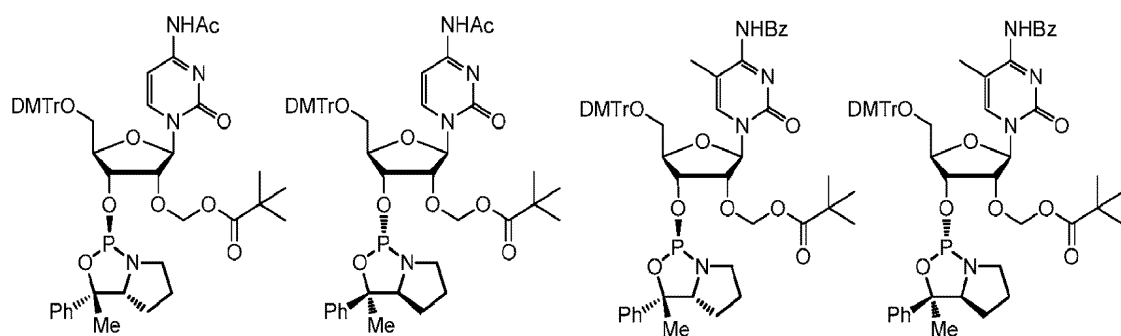
30

さらなるホスホラミダイトは以下の通りである：

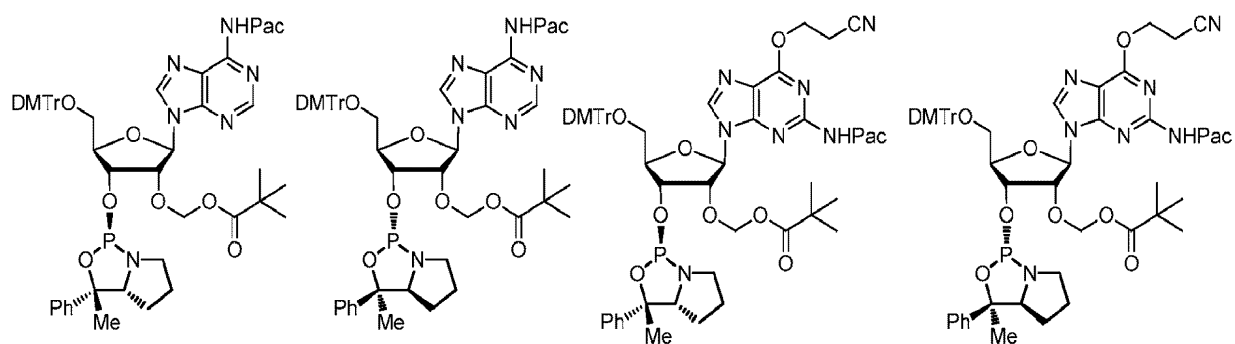
【化 3 5 0】



10

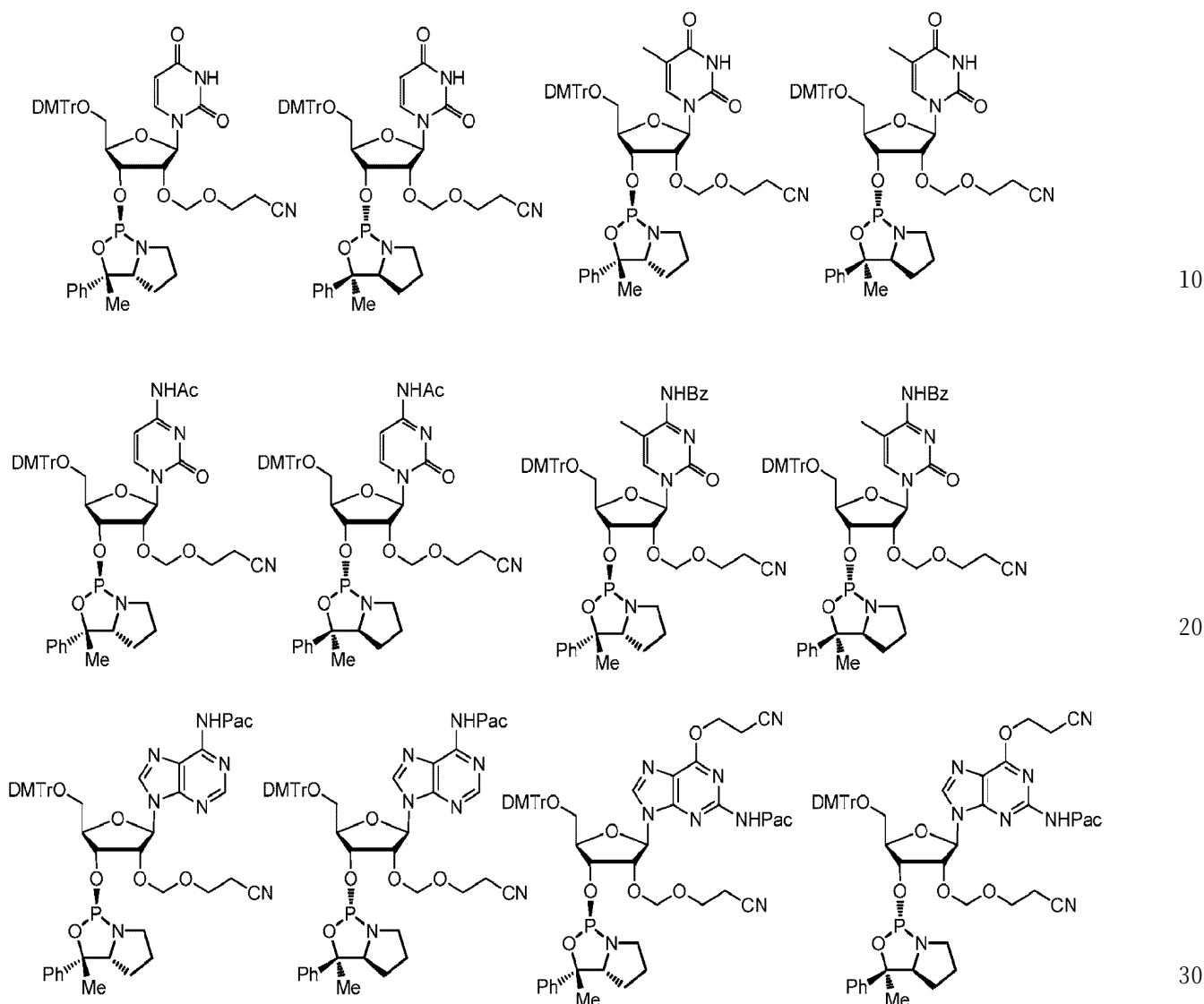


20



30

【化 3 5 1】



【1 2 8 6】

キャッピング：

いくつかの実施形態においては、キャッピングステップは2ステップで行った。いくつかの実施形態においては、上記の2つのキャッピングステップを1つに組み合わせ、ワンポットで行った。他に明記されない限り、本明細書において記載される実施例の合成においては、2ステップキャッピングを使用した。

【1 2 8 7】

2ステップキャッピングでは、固体担体を無水ACNで洗浄し、乾燥アルゴンの逆流により乾燥した後、通常2, 6-ルチジン/THF-1:4 (v/v) 中に5% Pac₂O₂溶液を含む「キャップA」試薬を固体担体に展開した。理論により限定されることを意図するものではないが、キャップAは、キラル補助基の遊離アミンを効率的にキャップする（アシル化する）のに十分に反応性であった。いくつかの実施形態においては、このような保護が中間体亜リン酸エステルの再配列/分解を妨げる。この処理後ただちに、「キャップA」および「キャップB」試薬の1:1混合物を、固体担体を含有するカラムに流した。「キャップB」は、16% N-メチルイミダゾール (NMI) THF溶液であり、「キャップA」と混合すると、例えば固体担体に結合した未反応の5'-OHオリゴヌクレオチドのキャッピングを生じさせる。理論により限定されることを意図するものではないが、キラル補助基のアミノ基のキャッピング無しでは、例えば補助基の遊離アミンのリン原子への望まれない分子間求核攻撃に起因して、次のサイクル内の硫化ステップがヌクレ

オチド間結合の開裂およびオリゴヌクレオチドの分解を引き起こす点において、キャッピングステップは非常に重要であった。さらに、最終精製が不可能でないにしても、不良配列の伸長の蓄積および冗長に起因する低収率ならびに困難を避けて、高純度の粗製完全長オリゴヌクレオチドを得ることに關して、流出した未カップリングの固体担持されたオリゴヌクレオチドショートマー (shortmer) の 5' - OH 基のキャッピングが非常に重要であった。

【1288】

硫化：

固体担体を無水 ACN で洗浄し、乾燥アルゴンの逆流により乾燥した後、生成したキャップされた亜リン酸トリエステル中間体を酸化的硫化に付した。硫化剤溶液は、ACN 中で、例えばチオスルホン酸アルキル誘導体 (300 mM) である硫化剤と N, O - ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセタミド (BSTFA) (100 mM) を混合することにより調製した。次にこれを、固体担体を含有するカラムに展開し、ある特定の時間 (通常 5 ~ 60 分) 反応させた。いくつかの実施形態においては、BSTFA を添加せず、硫化剤のチオスルホネート試薬を無水 ACN 中の 300 mM 溶液として使用した。いくつかの実施形態においては、BSTFA を有する試薬溶液および BSTFA を有さない試薬溶液は同様の結果を生じた。

10

【1289】

酸化：

いくつかの実施形態においては、硫化ステップの代わりに、リン酸ジエステルへの酸化を行った。THF / ピリジン / 水 (70 : 20 : 10 - v / v / v) 共溶媒系中の 0.02 M I_2 溶液を展開して酸化を達成し、非キラルリン酸ジエステル結合を形成した。

20

【1290】

DMTr 基の 5' - 脱ブロック：

DMTr の除去は、DCM 中の 3% TCA を使用して行った。脱ブロック後、次に、カップリング、キャッピング、硫化 / 酸化 (次サイクルのそれぞれについて、同じ硫化剤を用いた硫化、もしくは異なる硫化剤を用いた硫化、または硫化の代わりに酸化のいずれか) および脱ブロックのさらなる反復ラウンドへサイクルを進めることができる。あるいは、あらかじめ設計した長さに到達した際は、オリゴヌクレオチドをサイクル出口および任意に合成後処理に付した。いくつかの実施形態においては、末端 5' - O - DMTr 基の脱ブロック前にオリゴヌクレオチドを除去した。

30

【1291】

キラル補助基の自発的除去：

キラル補助基の自発的除去は、硫化、酸化、DMTr 基の脱ブロック、またはそれらの組合せの間に達成した。キラル補助基を除去するのに、特定のステップは必要としなかった。

【1292】

開裂および脱保護：

所望の長さのオリゴヌクレオチドを、対応するリンカー (オキサリルまたはサクシニル結合 HCP または CPG) を開裂することにより、その固体担体から除去し、それと同時にオリゴヌクレオチドの保護基を脱保護した。いくつかの実施形態においては、Reese および Yan の J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2002, 2619. に記載の通り、固体に担持されたオリゴヌクレオチドをまず、脱水 ACN - 塩化トリメチルシリル - 16 : 1 (v / v) 中の無水 1 M 1 , 5 - ジアザビシクロ (4. 3. 0) ノナ - 5 - エン (DBN) または 1, 8 - ジアザビシクロウンデカ - 7 - エン (DBU) 溶液を用いて室温で 10 分間処理し、次に脱水 CN で洗浄した。いくつかの実施形態においては、その物質を脱水プロピルアミンの脱水ピリジン溶液 (通常、1 : 4 の比) を用いて、室温で 18 時間、または 60 °C で 2 時間処理した。いくつかの実施形態においては、どちらの条件においても同質の粗製化合物を生じた。いくつかの実施形態においては、28% アンモニア水を用いて、室温で 18 時間、または 60 °C で 5 時間処理することにより、粗製オリゴヌクレオチドを担体

40

50

から開裂させ、脱保護した。いくつかの実施形態においては、どちらの条件においても同質の粗製化合物を生じた。次に溶媒を蒸発させ、0～50% DMSOと混合した約pH 1.5（所望であれば、pHを変化させてもよい）の水溶液で残渣を処理し、粗製生成物をHPLCおよびUPLC/MSの組合せによる分析に付した。逆相HPLC（RP-HPLC）、順相HPLC、イオン交換HPLC（IE-HPLC）もしくは分子ふるいクロマトグラフィーの1つ、またはそれらの組合せにより生成物を精製した。いくつかの実施形態においては、DMTr基の脱ブロック前にオリゴヌクレオチドを担体から除去し、脱保護し、精製した。

【1293】

実施例1：硫化剤の合成およびホスホラミダイトの合成

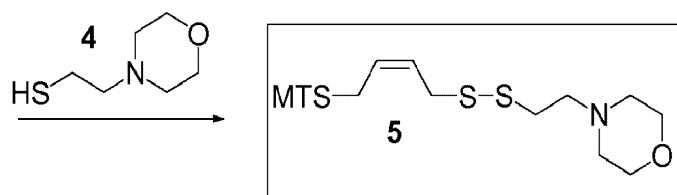
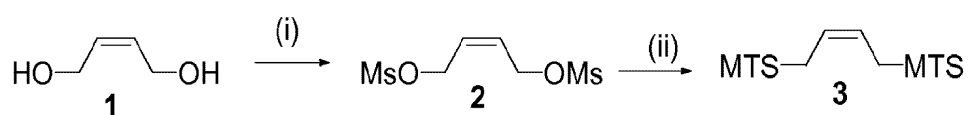
10

【1294】

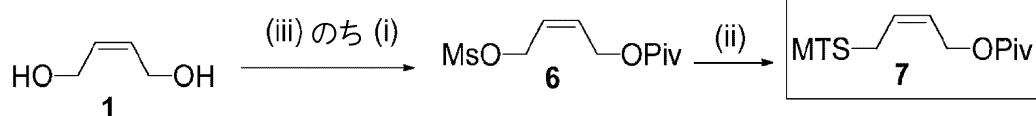
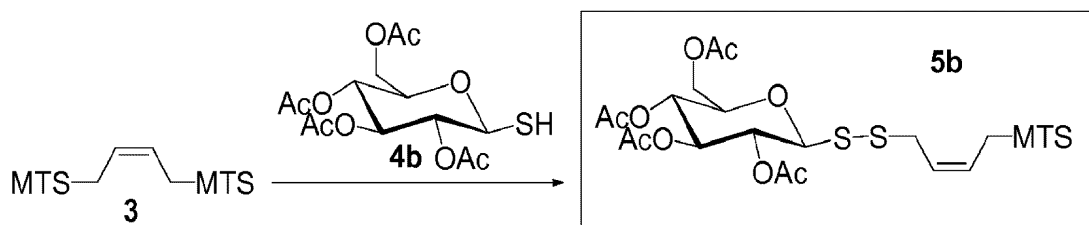
いくつかの実施形態において、本発明は硫化剤およびその作製方法を提供する。いくつかの実施形態においては、提供する硫化剤を、本願において記載されるオリゴヌクレオチドの合成において使用した。例示的な硫化剤およびそれらの合成をスキームE-1に図示する。

スキームE-1 硫化剤の合成

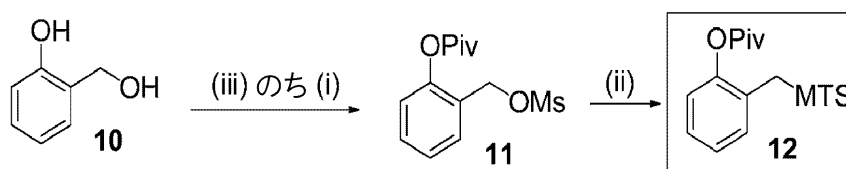
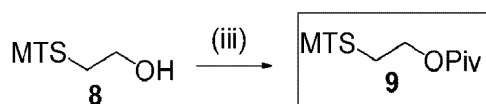
【化 3 5 2】



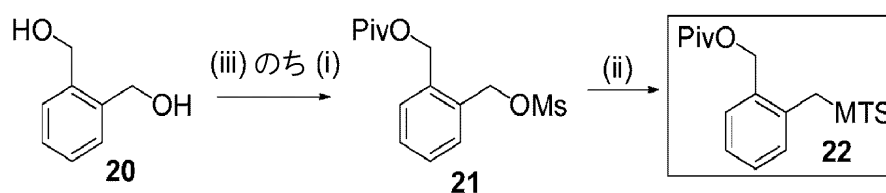
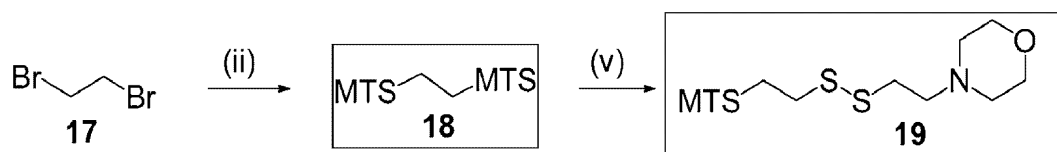
10



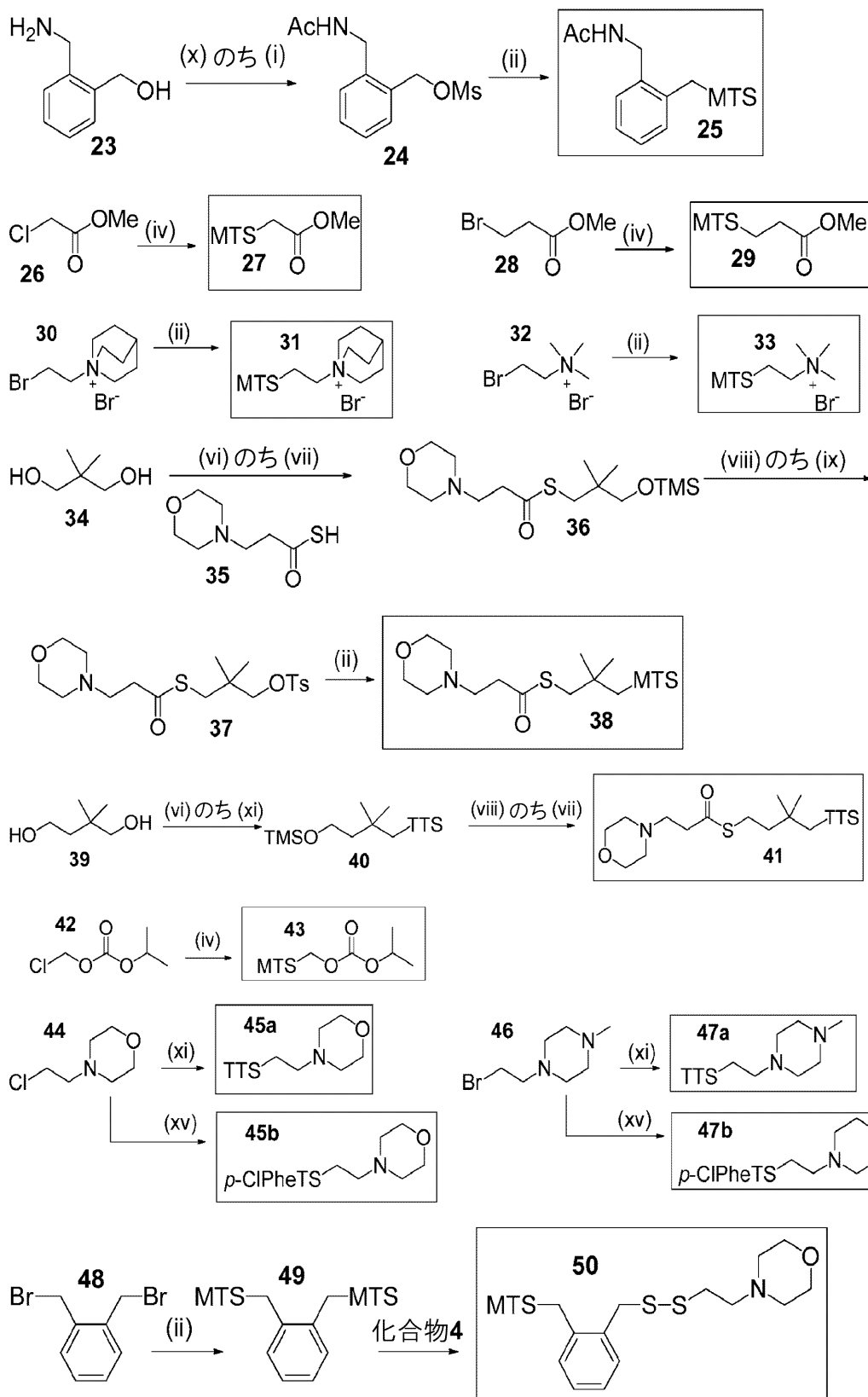
20



30



40

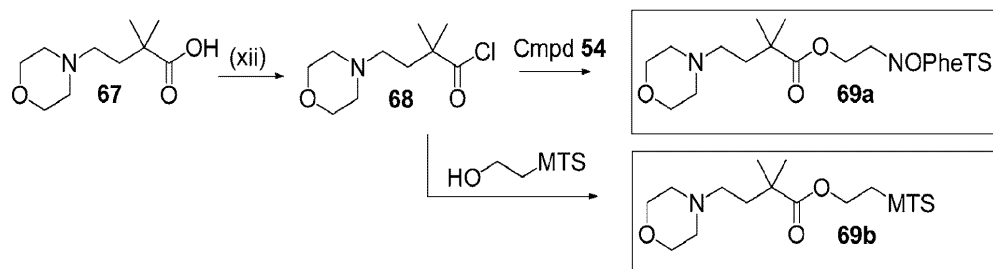
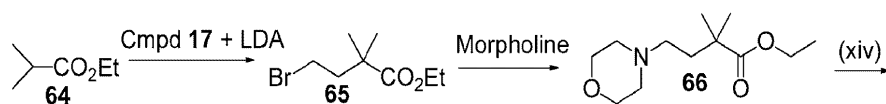
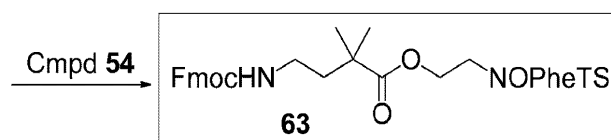
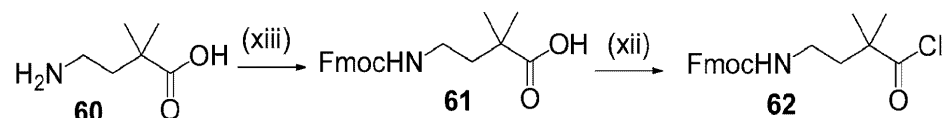
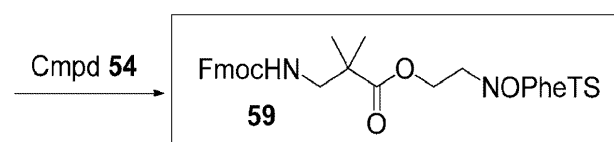
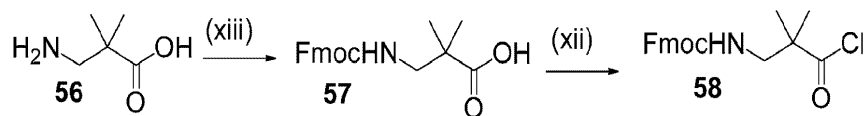
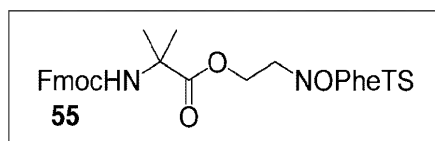
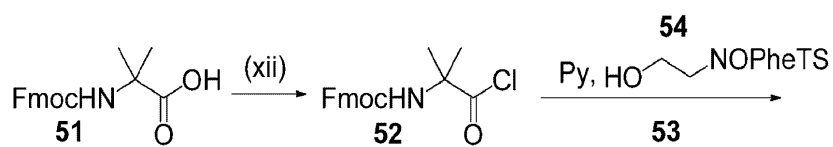


10

20

30

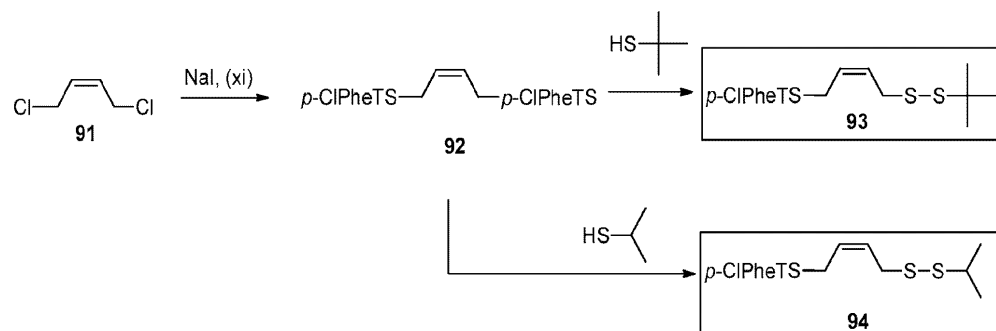
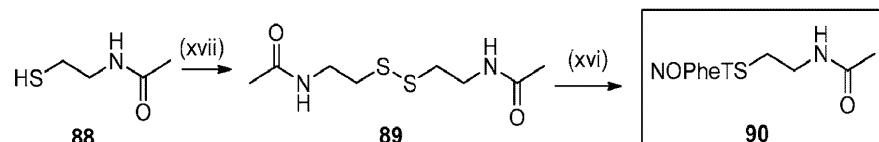
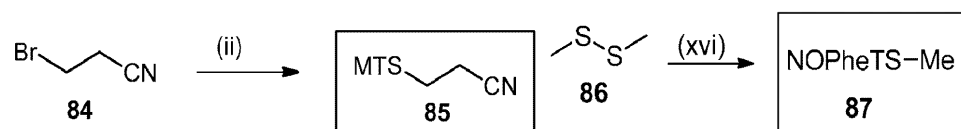
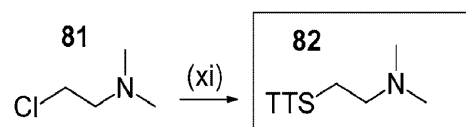
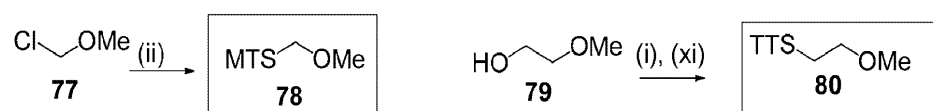
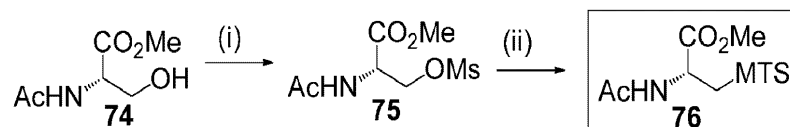
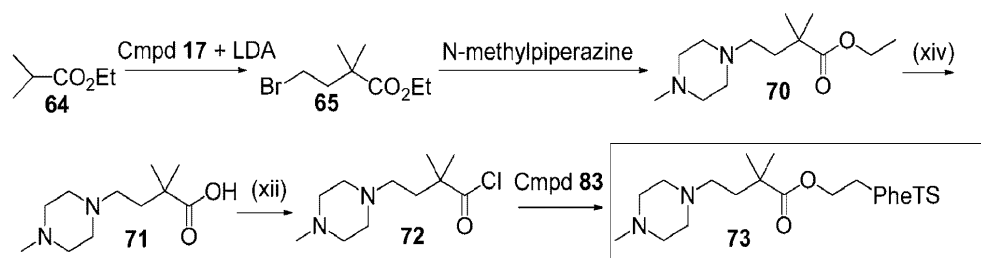
40



10

20

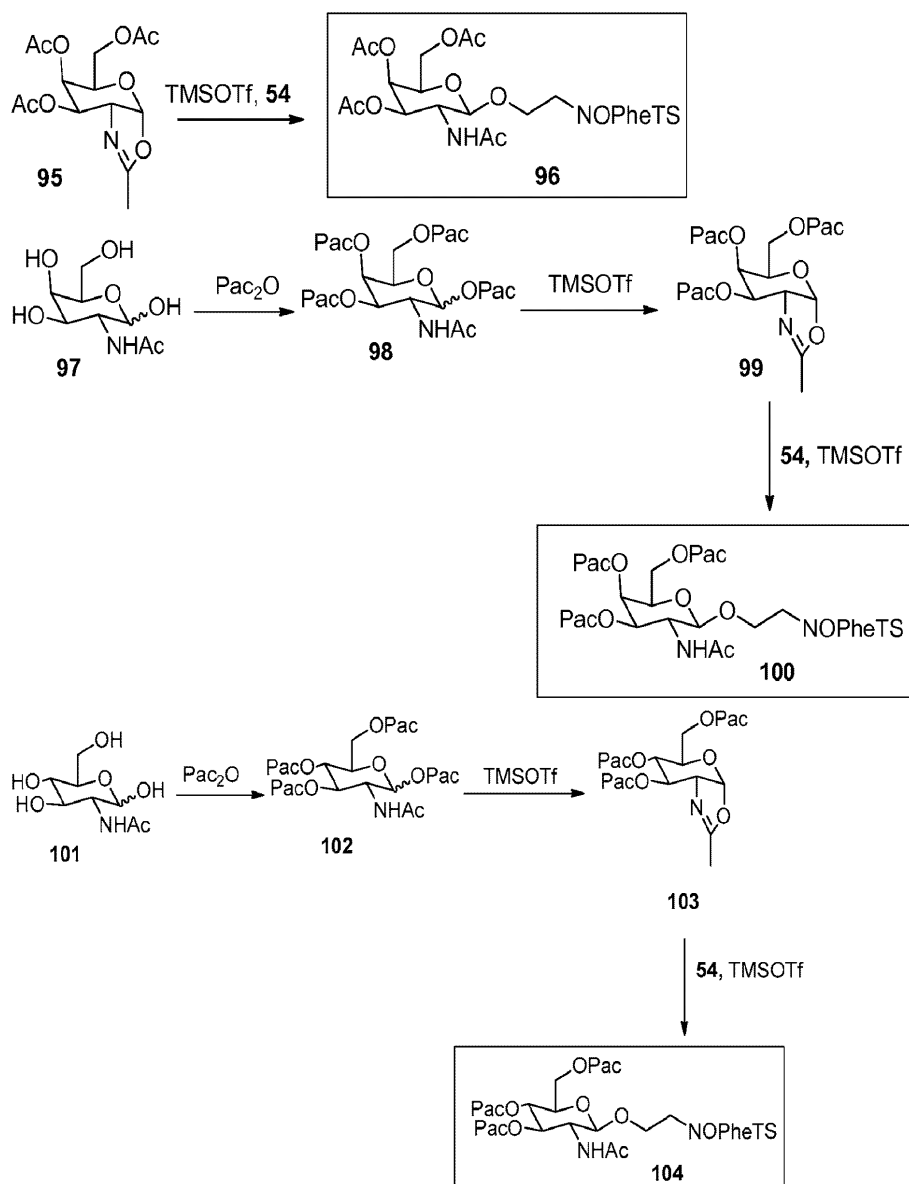
30



10

20

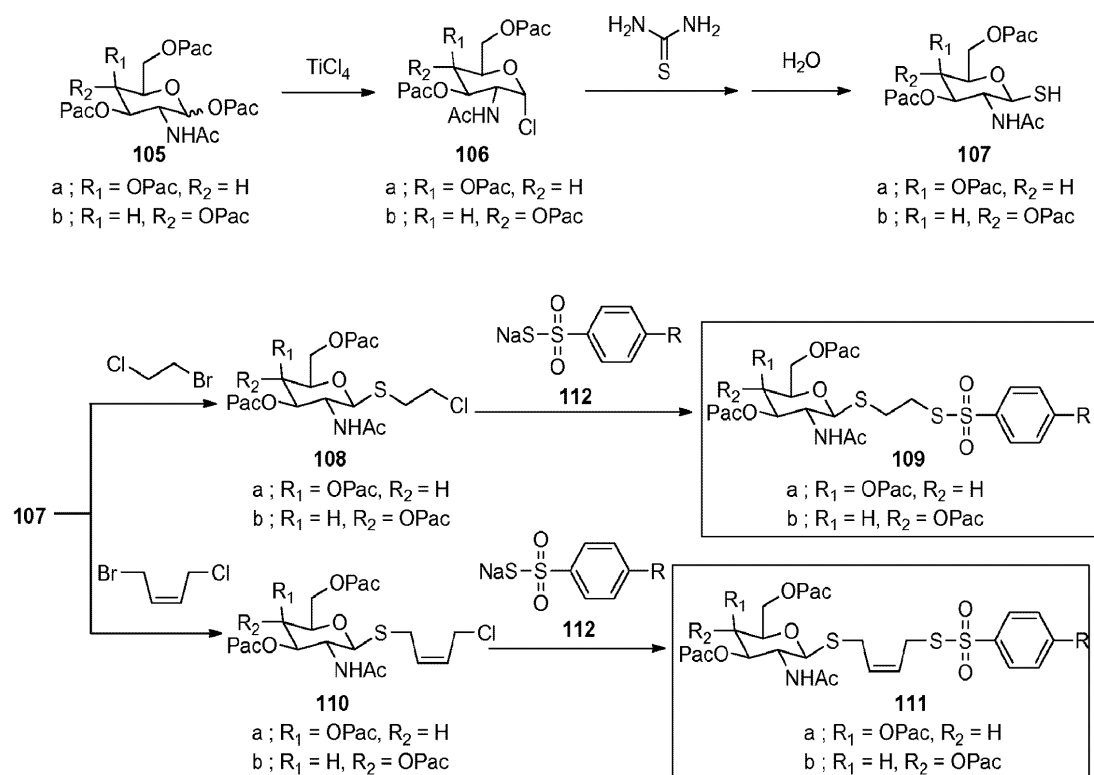
30



10

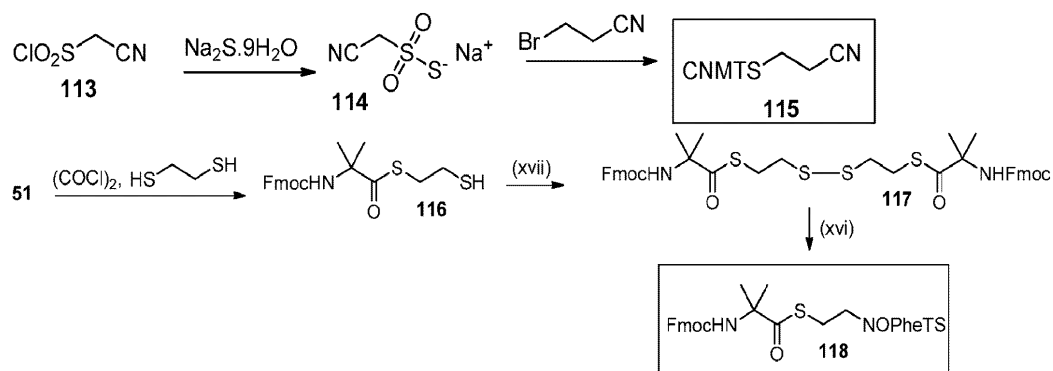
20

30

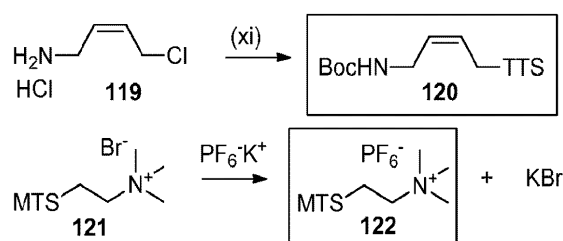


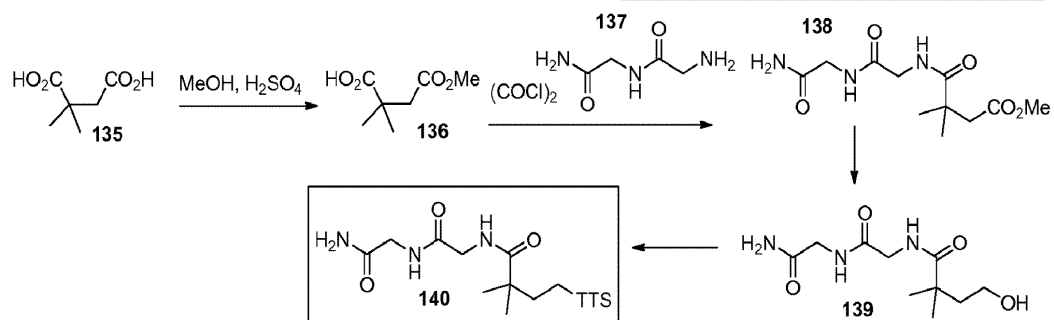
10

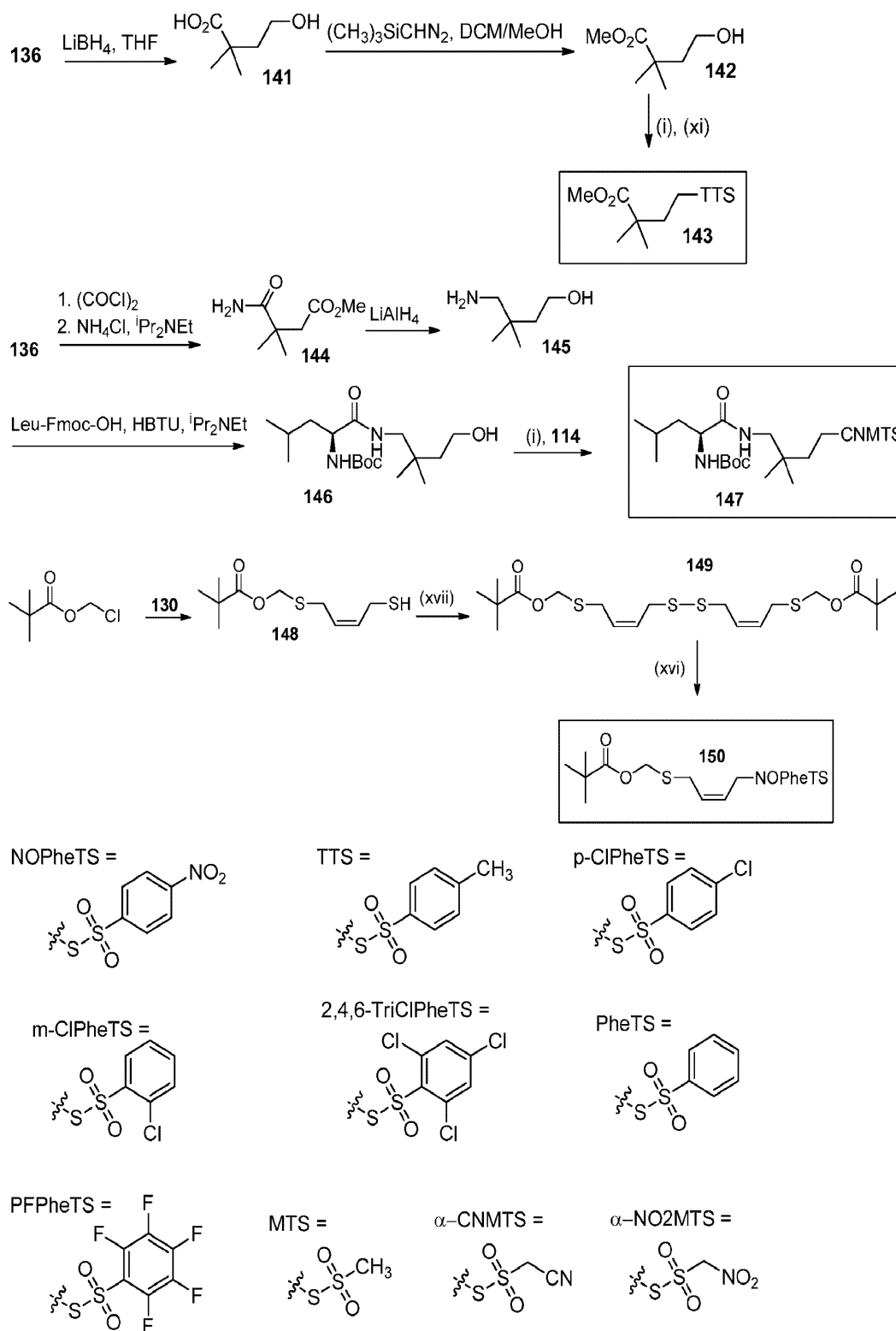
20



30







10

20

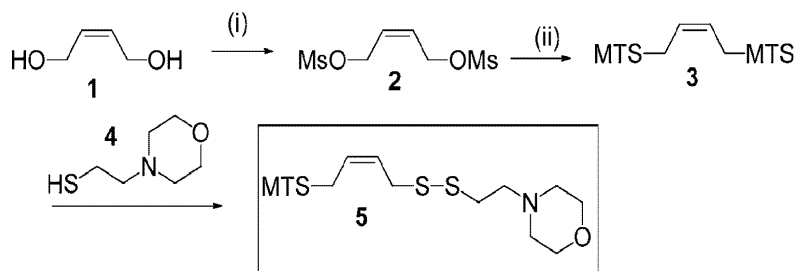
30

40

(i) MsCl 、 NEt_3 ; (ii) NaMTS ; (iii) PivCl 、 NEt_3 ; (iv) NaMTS 、 NaI ; (v) 化合物 4 ; (vi) TMSCl 、 NEt_3 ; (vii) 化合物 35、 DEAD 、 PPh_3 ; (viii) TBAF ; (ix) TsCl 、ピリジン ; (x) Ac_2O 、ピリジン ; (xi) KTTS ; (xii) $(\text{COCl})_2$; (xiii) Fmoc-OSu 、 Py ; (xiv) NaOH(aq) ; (xv) Na-p-ClPheTS ; 4-ニトロベンゼンスルフィン酸ナトリウム、 Br_2 ; (xvii) H_2O_2 、 NaI

化合物 5 の合成

【化 3 5 3】



【1 2 9 5】

10

化合物 2：(Z) - ブタ - 2 - エン - 1, 4 - ジオール (0.93 ml、11.3 mmol) およびトリエチルアミン (3.3 ml、24 mmol) のジクロロメタン (DCM、50 mL) 溶液を、氷冷したメタンスルホニルクロリド (1.9 ml、24 mmol) の DCM (50 mL) 溶液に攪拌しながら滴下した。室温で 0.5 時間攪拌後、混合物を氷上に注ぎ、抽出した。有機層を回収し、乾燥して (MgSO₄) をろ過した。溶媒除去後、2.66 g の化合物 2 を得た (96%)。化合物が反応の次の段階において直接使用するのに十分高純度であることを、NMR により判断した。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 5.94 (ddd、J = 5.4、4.1、1.3 Hz、2H)、4.83 (dd、J = 4.1、1.3 Hz、4H)、3.04 (s、6H)；¹³C NMR 128.34、64.38、38.27；MS (ESI + ve)：計算値 (M + NH₄)⁺ : 262.04、実測値：262.05；R_f = 0.3 (1:1 EtOAc / ヘキサン)。

20

【1 2 9 6】

化合物 3：メタンスルホノチオ酸ナトリウム (1.51 g、11.3 mmol) の MeOH (20 mL) 溶液を、希釈していないジメタンスルホン酸 (Z) - ブタ - 2 - エン - 1, 4 - ジオール (1.25 g、5.12 mmol) で、室温にて処理した。5 分後、沈殿物が生じるのを観察した。36 時間後、混合物を水および DCM 間で分割した。有機層を分離し、乾燥して (MgSO₄) をろ過した。溶媒を除去して、無色油状物質を得た。カラムクロマトグラフィー (ISCO) により純粋な化合物 3 を無色油状物質として得た (0.89 g、63%)。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 5.84 (ddd、J = 6.6、5.1、1.5 Hz、2H)、3.92 (dd、J = 5.1、1.5 Hz、4H)、3.33 (s、6H)；¹³C NMR 128.1、51.47、33.13；MS (ESI + ve)：計算値 (M + NH₄)⁺ : 294.00、実測値：294.04；R_f = 0.4 (1:1 EtOAc / ヘキサン)。

30

【1 2 9 7】

化合物 4：アルゴン雰囲気下、丸底フラスコ内でモルホリン (10 g、115 mmol) をエチレンスルフィド (15 g、250 mmol) に加えた。この反応物を 7 時間攪拌し、シリカゲルカラムに直接充填した。カラムをまず DCM で洗浄し、次に 2% MeOH / DCM を使用して、化合物 4 を無色油状物質として得た (15.3 g、91%)。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 3.67 - 3.59 (m、4H)、2.63 - 2.52 (m、2H)、2.51 - 2.45 (m、2H)、2.44 - 2.34 (m、4H)；MS (ESI + ve)：計算値 (M + H)⁺ = 148.07、実測値：148.1。

40

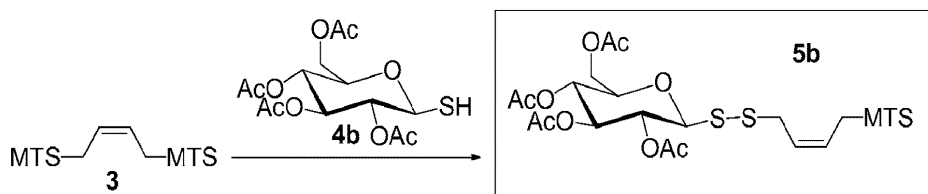
【1 2 9 8】

化合物 5：2 - モルホリノエタンチオール (0.21 g、1.44 mmol) の DCM (1 mL) 溶液を、化合物 3 (0.40 g、1.44 mmol) の DCM (10 mL) 溶液に、攪拌しながら、室温でシリンジを使用して滴下した。添加後ただちに反応を TLC により確認し、生成物およびいくらかの 2 量体の急速な形成を示した。0.5 時間後、混合物を水の添加により分割した。抽出して有機層を分離し、乾燥して (MgSO₄) をろ過した。真空下で溶媒を除去後、カラムクロマトグラフィーにより化合物 5 を無色油状物

50

質として得た (0.29 g、58%)。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 5.78 (m、2H)、3.92 (d、 $J=7.3$ Hz、2H)、3.70 (t、 $J=4.7$ Hz、4H)、3.46 (d、 $J=5.5$ Hz、2H)、3.31 (s、3H)、2.84 (dd、 $J=7.8$ 、6.7 Hz、2H)、2.66 (dd、 $J=7.8$ 、6.7、2H)、2.48 (t、 $J=4.6$ Hz、4H)； ^{13}C NMR 130.35、126.27、66.97、58.20、53.67、51.52、36.22、35.16、33.67；MS (ESI+ve)：計算値 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ ：344.05、実測値：344.06； $R_f=0.3$ (EtOAc)。

【化354】



10

【1299】

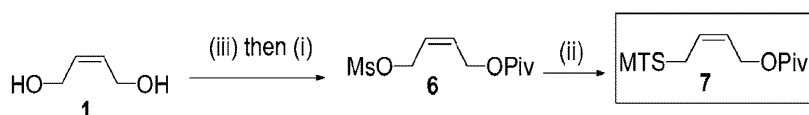
化合物 5b：化合物 4b (395 mg、1.085 mmol) の DCM (1 mL) 溶液を、化合物 3 (300 mg、1.085 mmol) の DCM (15 mL) 溶液に、撹拌しながら、室温でシリンジを使用して滴下した。1 時間後、生成した溶液を水の添加により分割した。抽出して有機層を分離し、乾燥して (MgSO_4)、ろ過した。真空下で溶媒を除去後、カラムクロマトグラフィーにより化合物 5b を無色油状物質として得た (0.35 g、58%)。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 5.83 - 5.70 (m、2H)、5.35 - 5.21 (dt、 $J=26.0$ 、9.3 Hz、2H)、5.16 - 5.07 (m、1H)、4.59 - 4.54 (d、 $J=9.5$ Hz、1H)、4.29 - 4.23 (m、1H)、4.23 - 4.18 (m、1H)、3.99 - 3.88 (dd、 $J=6.7$ 、1.2 Hz、2H)、3.80 - 3.72 (ddd、 $J=10.1$ 、4.6、2.6 Hz、1H)、3.64 - 3.56 (m、1H)、3.50 - 3.43 (m、1H)、3.31 (s、3H)、2.09 (s、3H)、2.03 (s、6H)、2.00 (s、3H)； ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 170.68、170.30、169.51、169.30、129.43、127.14、87.73、76.49、73.89、69.16、67.99、61.99、51.64、35.89、33.58、20.95、20.80、20.74、20.71；MS (ESI+ve)：計算値 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$ ：578.07、実測値：577.96； $R_f=0.5$ (1 : 1 EtOAc / ヘキサン)。

20

30

化合物 7 の合成

【化355】



40

【1300】

化合物 6：氷冷した (Z)-ブタ-2-エン-1,4-ジオール (0.93 mL、11.3 mmol) およびトリエチルアミン (1.6 mL、11.5 mmol) の DCM (50 mL) 溶液を、塩化ピバロイル (1.4 mL、11.4 mmol) と 2 分以上かけてシリンジを使用して滴下しながら処理した。1 時間後、TLC は良好な反応結果を示した。生成した混合物を水の添加により分割した。抽出して有機層を分離し、乾燥して (MgSO_4)、真空下で濃縮した。TLC ($R_f=0.6$ 、1 : 1 EtOAc / ヘキサン) に

50

より、この粗製化合物は出発原料であるジオールを含有しないことがわかり、粗製のまま使用してメシラートを調製した。その粗製物質を、トリエチルアミン（1.7 mL、12 mmol）を含有するDCM（50 mL）に入れ、氷浴上で冷却した。メタンスルホニルクロリド（0.98 mL、12.66 mmol）を、シリンジを使用して2分以上かけて滴下した。添加直後のTLCは、出発物質が完全に消費されたことを示した。生成した混合物を水の添加により分割した。抽出して有機層を分離し、乾燥して（ MgSO_4 ）、真空下で濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより純粋な化合物6を無色油状物質として得た（1.48 g、52%）。 ^1H NMR（399 MHz、 CDCl_3 ） δ 5.89 - 5.75（m、2H）、4.89 - 4.84（d、 $J = 5.7$ Hz、2H）、4.68 - 4.63（d、 $J = 5.9$ Hz、2H）、3.03（s、3H）、1.19（s、9H）； ^{13}C NMR（100 MHz、 CDCl_3 ） δ 178.28、130.61、126.11、65.08、59.65、38.84、38.21、27.25；MS（ESI +ve）：計算値（ $\text{M} + \text{NH}_4$ ） $^+$ ：268.12、実測値：268.20； $R_f = 0.3$ （20% EtOAc／ヘキサン）。

10

【1301】

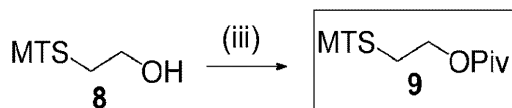
化合物7：メタンスルホノチオ酸ナトリウム（0.63 g、4.70 mmol）およびピバル酸（Z）-4-（メチルスルホニルオキシ）ブタ-2-エニル（1.00 g、4.00 mmol）のMeOH（10 mL）溶液を室温で18時間攪拌し、白色沈殿が形成した（10分後）。生成した混合物を水およびDCMの添加により分割した。DCMで抽出して有機層を分離し、乾燥し（ MgSO_4 ）、ろ過して、真空下で濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより化合物7を無色油状物質として得た（0.83 g、78%）。 ^1H NMR（399 MHz、 CDCl_3 ） δ 5.82 - 5.73（m、2H）、4.73 - 4.66（m、2H）、3.95 - 3.87（m、2H）、3.32（s、3H）、1.19（s、9H）； ^{13}C NMR（100 MHz、 CDCl_3 ） δ 178.35、129.37、127.32、59.50、51.44、38.84、33.61、27.28；MS（ESI +ve）：計算値（ $\text{M} + \text{NH}_4$ ） $^+$ ：284.10、実測値：284.19； $R_f = 0.4$ （20% EtOAc／ヘキサン）。

20

化合物9の合成

【化356】

30



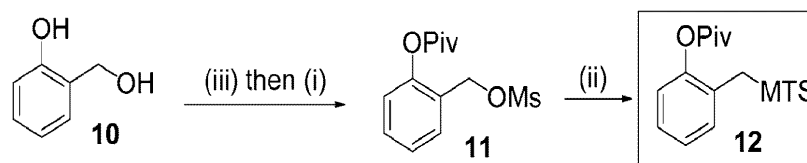
【1302】

化合物9：塩化ピバロイル（0.60 g、5.0 mmol）を、メタンスルホノチオ酸S-2-ヒドロキシエチル（0.65 g、4.16 mmol）のDCM（20 mL）溶液に、攪拌しながら滴下した。室温で2時間後、白色沈殿を有する生成した混合物を水で分割した。有機層を分離し、乾燥し（ Na_2SO_4 ）、ろ過し、濃縮して油状物質を得た。カラムクロマトグラフィーにより化合物9を無色油状物質として得た（0.45 g、45%）。 ^1H NMR（399 MHz、 CDCl_3 ） δ 4.39 - 4.34（t、 $J = 6.3$ Hz、2H）、3.44 - 3.39（t、 $J = 6.3$ Hz、2H）、3.36（s、3H）、1.20（s、9H）； ^{13}C NMR（100 MHz、 CDCl_3 ） δ 62.10、51.11、38.96、35.19、27.24；MS（ESI +ve）：計算値（ $\text{M} + \text{NH}_4$ ） $^+$ ：158.08、実測値：158.04； $R_f = 0.3$ （20% EtOAc／ヘキサン）。

40

化合物12の合成

【化 3 5 7】



【1 3 0 3】

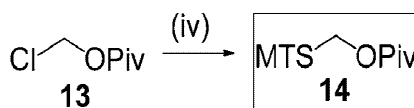
化合物 1 1：塩化ピバロイル（4.96 ml、40.3 mmol）を、氷冷した 2 - ヒドロキシメチルフェノール（5 g、40.3 mmol）およびトリエチルアミン（5.61 ml、40.3 mmol）の DCM（50 mL）溶液に、シリンジを使用して滴下した。氷冷した粗製のピバル酸エステル溶液を、トリエチルアミン（6.74 ml、48.4 mmol）および 50 mL の DCM で処理した。次にメタンスルホニルクロリド（3.43 ml、44.3 mmol）を、シリンジを使用してゆっくり加え（5 分）、生成した混合物を室温まで温めた。混合物を氷上に注ぎ、有機層を分離し、次に飽和 NaHCO₃（aq）で洗浄し、乾燥し（MgSO₄）、ろ過し、濃縮して 10.5 g の淡黄色の粗製油状物質を得た。カラムクロマトグラフィー（ISCO）により純粋な化合物 1 1 を得た（5.45 g、47%）。¹H NMR（399 MHz、CDCl₃）δ 7.53 - 7.46（dd、7.7、1.8 Hz、1H）、7.46 - 7.40（dt、7.7、1.8 Hz、1H）、7.32 - 7.24（t、7.7 Hz、1H）、7.13 - 7.06（d、7.7 Hz、1H）、5.21（s、2H）、2.79（s、3H）、1.40（s、9H）；¹³C NMR（100 MHz、CDCl₃）δ 177.05、150.06、131.18、131.07、126.35、125.94、123.21、66.88、39.48、38.82、27.30、27.26；MS（ESI+ve）：計算値（M+NH₄）⁺：304.12、実測値：303.99；R_f = 0.4（20% EtOAc / ヘキサン）。

【1 3 0 4】

化合物 1 2：メタンスルホノチオ酸ナトリウム（0.825 g、6.15 mmol）の MeOH（20 mL）溶液を、ピバル酸 2 - （（メチルスルホニルオキシ）メチル）フェニル（1.76 g、6.15 mmol）で室温にて処理し、18 時間攪拌した。混合物を水と DCM 間で分割した。有機層を分離し、乾燥して（MgSO₄）、ろ過し、濃縮して無色油状物質を得た。カラムクロマトグラフィーにより純粋な化合物 1 2 を薄い無色油状物質として得た（0.754 g、41%）。¹H NMR（399 MHz、CDCl₃）δ 7.48 - 7.44（dd、J = 7.7、1.7 Hz、1H）、7.39 - 7.34（td、J = 7.8、1.7 Hz、1H）、7.25 - 7.20（td、J = 7.6、1.2 Hz、1H）、7.10 - 7.06（dd、J = 8.2、1.2 Hz、1H）、4.29（s、2H）、2.90（s、3H）、1.39（s、9H）；¹³C NMR（100 MHz、CDCl₃）δ 176.69、149.59、131.17、129.85、127.41、126.18、123.40、51.43、39.47、36.01、27.30；MS（ESI+ve）：計算値（M+NH₄）⁺：320.10、実測値：320.09；R_f = 0.4（20% EtOAc / ヘキサン）。

化合物 1 4 の合成

【化 3 5 8】



【1 3 0 5】

10

20

30

40

50

化合物 14 : ピバル酸クロロメチル (0.478 ml、3.32 mmol) を、アセトン (7 ml) 中のヨウ化ナトリウム (0.050 g、0.33 mmol) およびメタンスルホノチオ酸ナトリウム (0.445 g、3.32 mmol) の混合物に、攪拌しながら室温で加えた。24 時間後、TLC は生成物への良好な変換を示した。溶媒を除去し、残渣を水および DCM 間で分割した。有機層を分離し、乾燥し (MgSO_4)、ろ過し、濃縮して無色油状物質を得た。カラムクロマトグラフィーにより純粋な化合物 14 をわずかにピンク色の固体として得た (0.41 g、55%)。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 5.67 (s、2H)、3.39 (s、3H)、1.24 (s、9H) ; ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 177.35、67.84、52.20、38.93、27.05 ; $R_f = 0.5$ (20% EtOAc / ヘキサン)。

10

化合物 16 の合成

【化 359】



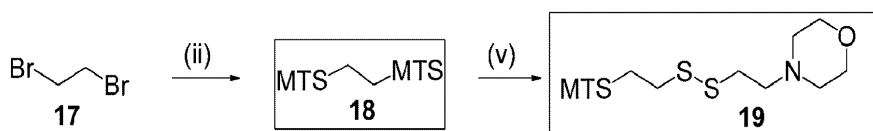
【1306】

化合物 16 : 米国特許第 3,484,473 号において以前に記載の通り、化合物 15 および NaMTS より調製した。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 4.86 (s、2H)、3.45 (s、6H) ; ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 52.15、41.50。

20

化合物 18 および 19 の合成

【化 360】



30

【1307】

化合物 18 : 以前に記載の通り、化合物 17 および NaMTS より調製した : Chem. Pharm. Bull. Vol. 12(11) p. 1271, 1964. ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 3.55 (s、4H)、3.40 (s、6H) ; ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 50.67、35.96。

【1308】

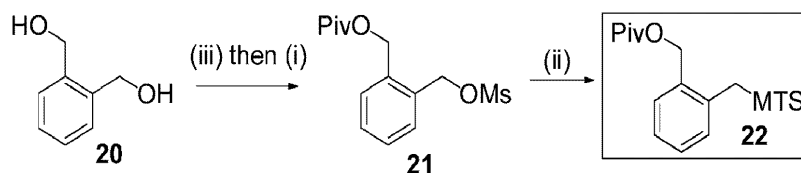
化合物 19 : 2-モルホリノエタントール (0.17 g、1.2 mmol) の DCM (1 mL) 溶液を、化合物 18 (300 mg、1.2 mmol) の DCM (10 mL) 溶液に、攪拌しながら、室温でシリンジを使用して滴下した。添加直後、TLC は生成物およびいくらかの 2 量体の急速な形成を示した。0.5 時間後、混合物を NaHCO_3 溶液の添加により分割した。抽出して有機層を分離し、乾燥し (MgSO_4)、ろ過し、真空中で濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより純粋な化合物 19 を無色油状物質として得た (0.20 g、53%)。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 3.73 - 3.67 (t、 $J = 4.7$ Hz、4H)、3.51 - 3.46 (m、2H)、3.35 (s、3H)、3.07 - 3.01 (m、2H)、2.88 - 2.83 (m、2H)、2.69 - 2.63 (m、2H)、2.52 - 2.43 (t、 $J = 4.6$ Hz、4H) ; ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 66.96、57.91、53.58、50.79、37.66、36.10、35.52 ; MS (ESI+ve) : 計算値 ($M+H$)⁺ : 318.03、実測値 : 318.04 ; $R_f = 0.3$ (EtOAc)。

40

50

化合物 22 の合成

【化 3 6 1】



【1309】

10

化合物 21：化合物 11 について記載した手順と類似の手順により、化合物 20 を化合物 21 に変換した。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 7.45 - 7.36 (m、4H)、5.37 (s、2H)、5.21 (s、2H)、2.93 (s、3H)、1.21 (s、9H)； ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 178.20、135.65、131.92、130.48、129.98、129.78、128.88、69.05、63.39、38.94、38.36、27.27；MS (ESI+ve)：計算値 ($\text{M} + \text{NH}_4$)⁺：318.24、実測値：318.14； $R_f = 0.4$ (20% EtOAc / ヘキサン)。

【1310】

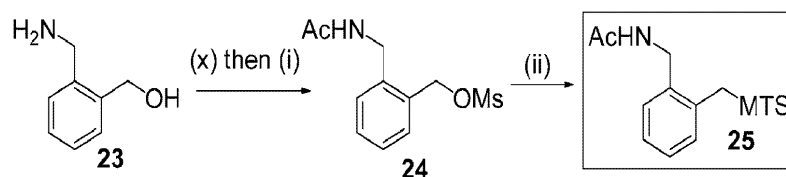
20

化合物 22：化合物 12 について記載した手順と類似の手順により、化合物 21 を化合物 22 に変換した。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 7.46 - 7.32 (m、4H)、5.21 (s、2H)、4.50 (s、2H)、3.03 (s、3H)、1.21 (s、9H)； ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 178.24、135.10、133.15、130.93、130.32、129.05、129.00、63.61、51.07、38.97、38.03、27.30；MS (ESI+ve)：計算値 ($\text{M} + \text{NH}_4$)⁺：334.11、実測値：334.13； $R_f = 0.4$ (20% EtOAc / ヘキサン)。

化合物 25 の合成

【化 3 6 2】

30



【1311】

40

化合物 23：化合物 23 は、文献の方法 (Journal of Medicinal Chemistry、50(23)、5568-5570、2007) に従って調製する。

【1312】

化合物 24：氷冷した化合物 23 (1 mmol) のピリジン (10 mL) 溶液を塩化アセチル (1 mmol) と滴下しながら処理し、次に 5 分後、続いて MsCl (1.1 mmol) と滴下しながら処理する。溶液を室温まで温め、次に溶媒を除去する。残渣を EtOAc に溶解し、水で洗浄し、乾燥し (MgSO_4)、ろ過して、真空下で濃縮する。カラムクロマトグラフィーにより精製して、純粋な化合物 24 を得る。

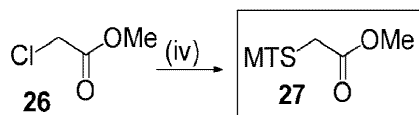
【1313】

化合物 25：化合物 12 について記載した手順と類似の手順により、化合物 24 を化合物 25 に変換する。

50

化合物 27 の合成

【化 3 6 3】



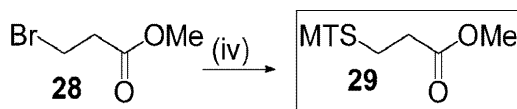
【1 3 1 4】

化合物 27：化合物 14 について記載した手順と類似の手順により、化合物 26 を化合物 27 に変換した。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 3.97 (s、2H)、3.79 (s、3H)、3.48 (s、3H)； ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 168.84、53.35、51.53、37.83；MS (ESI+ve)：計算値 ($\text{M} + \text{NH}_4$) $^+$ ：202.02、実測値：201.96； $R_f = 0.2$ (20% EtOAc / ヘキサン)。

10

化合物 29 の合成

【化 3 6 4】



20

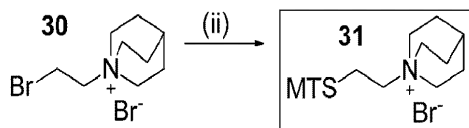
【1 3 1 5】

化合物 29：化合物 14 について記載した手順と類似の手順により、化合物 28 を化合物 29 に変換した。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 3.72 (s、3H)、3.39 (t、 $J = 6.8$ Hz、2H)、3.34 (s、3H)、2.85 (t、 $J = 6.8$ Hz、2H)； ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 171.53、52.29、50.66、34.51、31.20；MS (ESI+ve)：計算値 ($\text{M} + \text{NH}_4$) $^+$ ：216.10、実測値：216.04； $R_f = 0.2$ (20% EtOAc / ヘキサン)。

30

化合物 31 の合成

【化 3 6 5】



【1 3 1 6】

化合物 30：化合物 30 は、文献の方法 (Tetrahedron、42(2)、601-607；1986) に従って調製する。

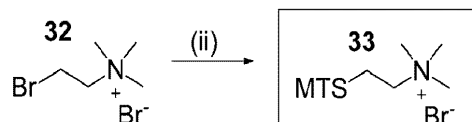
【1 3 1 7】

化合物 31：化合物 31 は、特許の手順 (米国特許第 20090181444 号) に従って、化合物 30 より調製する。

40

化合物 33 の合成

【化 3 6 6】



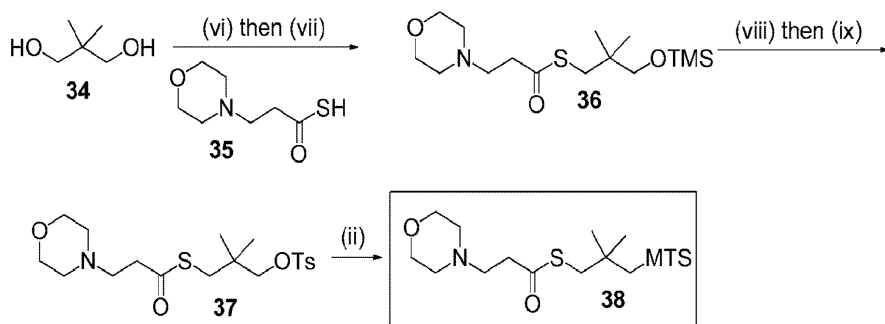
【1 3 1 8】

化合物 3 3：化合物 3 3 は、特許の 手 順（米 国 特 許 第 2 0 0 9 0 1 8 1 4 4 4 号）に 従 っ て、化 合 物 3 2 より 調 製 す る。

10

化 合 物 3 8 の 合 成

【化 3 6 7】



20

【1 3 1 9】

化 合 物 3 6：氷 冷 し た 化 合 物 3 4（1 mmol）の DCM（20 mL）溶 液 を NEt₃（1 mmol）で 処 理 し、そ の 後 TMS-Cl（1.1 mmol）を 滴 下 す る。1 時 間 後、こ の 溶 液 を 水 で 洗 浄 し、乾 燥 し（MgSO₄）、ろ 過 し て、真 空 下 で 濃 縮 す る。TMS で 保 護 し た こ の 粗 製 物 質 を THF（10 mL）に 再 溶 解 し、そ こ へ PPh₃（1.2 mmol）、化 合 物 3 5（1.2 mmol）、次 に DEAD（1.2 mmol、滴 下 し な が ら）を 続 け て 加 え る。室 温 で 18 時 間 攪 拌 後、溶 媒 を 真 空 下 で 除 去 し、残 渣 を DCM に 再 溶 解 し、そ の 溶 液 を 水 で 洗 浄 し、乾 燥 し（MgSO₄）、ろ 過 し て、真 空 下 で 濃 縮 す る。カ ラ ム ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー に よ る 精 製 に よ り、純 粋 な 化 合 物 3 6 を 得 る。

30

【1 3 2 0】

化 合 物 3 7：化 合 物 3 6（0.5 mmol）の THF（10 mL）溶 液 を、TLC に よ り モ ニ タ ー し な が ら、TBAF（1 M の THF 溶 液 の 1 mmol）で 処 理 す る。TMS 開 裂 が 完 了 し た ら 溶 媒 を 真 空 下 で 除 去 し、残 渣 を DCM に 再 溶 解 し、そ の 溶 液 を 水 で 洗 浄 し、乾 燥 し（MgSO₄）、ろ 過 し て、真 空 下 で 濃 縮 す る。粗 製 ア ル コ ー ル を ピ リ ジ ン（5 mL）に 再 溶 解 し、TsCl（0.55 mmol）を 加 え る。室 温 で 18 時 間 後、溶 媒 を 除 去 し、残 渣 を DCM に 再 溶 解 し、そ の 溶 液 を 水 で 洗 浄 し、乾 燥 し（MgSO₄）、ろ 過 し て、真 空 下 で 濃 縮 す る。カ ラ ム ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー に よ る 精 製 に よ り 化 合 物 3 7 を 得 る。

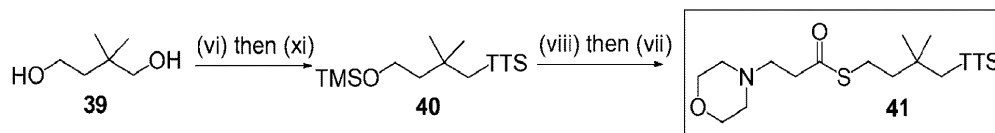
40

【1 3 2 1】

化 合 物 3 8：化 合 物 1 2 に つ い て 記 載 し た 手 順 と 類 似 の 手 順 に よ り、化 合 物 3 7 を 化 合 物 3 8 に 変 換 す る。

化 合 物 4 1 の 合 成

【化 3 6 8】



【1 3 2 2】

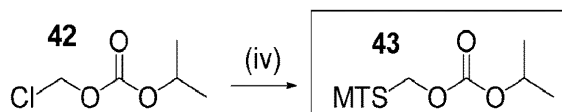
化合物 40：氷冷した化合物 39（1 mmol）の DCM（20 mL）溶液を NEt₃（1 mmol）で処理し、その後 TMS-Cl（1.1 mmol）を滴下する。1 時間後、この溶液を水で洗浄し、乾燥し（MgSO₄）、ろ過して、真空中で濃縮する。TMS で保護したこの粗製物質を THF（10 mL）に再溶解し、そこへ PPh₃（1.2 mmol）、p-トルエンチオスルホン酸カリウム（KTTS、1.2 mmol）、無水 ZnCl₂（1 mmol）、次に DEAD（1.2 mmol、滴下しながら）を続けて加える。室温で 18 時間攪拌後、溶媒を真空中で除去し、残渣を DCM に再溶解し、その溶液を水で洗浄し、乾燥し（MgSO₄）、ろ過して、真空中で濃縮する。カラムクロマトグラフィーによる精製により、純粋な化合物 40 を得る。

【1 3 2 3】

化合物 41：化合物 40（0.5 mmol）の THF（10 mL）溶液を、TLC によりモニターしながら、TBAF（1 M の THF 溶液の 1 mmol）で処理する。TMS 開裂が完了したら溶媒を真空中で除去し、残渣を DCM に再溶解し、その溶液を水で洗浄し、乾燥し（MgSO₄）、ろ過して、真空中で濃縮する。粗製アルコールを THF（10 mL）に再溶解し、そこへ PPh₃（1.2 mmol）、化合物 35（1.2 mmol）、次に DEAD（1.2 mmol、滴下しながら）を続けて加える。室温で 18 時間攪拌後、溶媒を真空中で除去し、残渣を DCM に再溶解し、その溶液を水で洗浄し、乾燥し（MgSO₄）、ろ過して、真空中で濃縮する。カラムクロマトグラフィーによる精製により化合物 41 を得る。

化合物 43 の合成

【化 3 6 9】

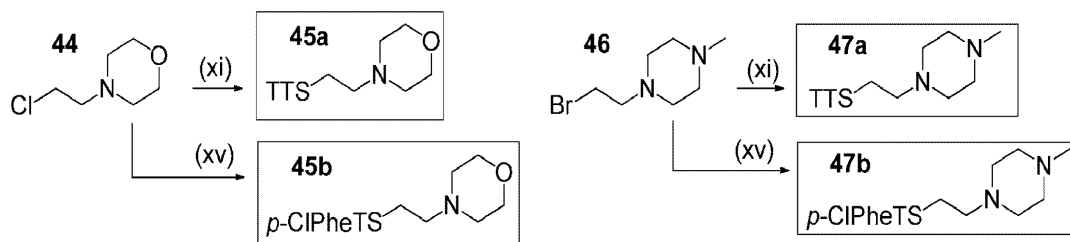


【1 3 2 4】

化合物 43：化合物 14 について記載した手順と類似の手順により、化合物 42 を化合物 43 に変換する。

化合物 45a、45b、47a および 47b の合成

【化 3 7 0】



【1 3 2 5】

化合物 45 a : 4 - (2 - クロロエチル) モルホリン塩酸塩 (化合物 44) (50 g 、 269 mmol) 、 ヨウ化ナトリウム (4.03 g 、 26.9 mmol) および 4 - メチルベンゼンスルホノチオ酸カリウム (73.0 g 、 322 mmol) の混合物を MeOH (200 mL) 中で攪拌し、60℃で72時間にわたり加熱した。淡黄色の混合物を冷却し、200 mL の水で希釈し、0.5 時間攪拌後、次に白色固体をろ過により回収し、水 (100 mL) 、 IPA (200 mL) 、 EtOAc (200 mL) およびエーテル (200 mL) で洗浄した。乾燥質量 = 68 g であった。この微結晶性粉末を 90℃ の水 (200 mL) から再結晶し、室温で一晩静置後、この結晶塊をろ過により回収した (64 g 、 71%) 。 ^1H NMR (500 MHz 、 CDCl_3) δ 7.83 (d 、 $J = 8.4$ Hz 、 2 H) 、 7.36 (d 、 $J = 8.4$ Hz 、 2 H) 、 3.67 (t 、 $J = 4.7$ Hz 、 4 H) 、 3.16 (t 、 $J = 6.9$ Hz 、 2 H) 、 2.64 (t 、 $J = 6.9$ Hz 、 2 H) 、 2.47 (s 、 3 H) 、 2.41 (t 、 $J = 4.4$ Hz 、 4 H) ; ^{13}C NMR (100 MHz 、 CDCl_3) δ 144.82 、 141.99 、 129.95 、 127.14 、 66.85 、 56.54 、 53.18 、 33.44 、 21.78 ; MS (ESI +ve) : 計算値 (M + H) $^+$: 302.08 、 実測値 : 302.22 。

【1326】

化合物 45 b : 化合物 45 a について記載の方法と類似の方法で、4 - メチルベンゼンスルホノチオ酸カリウムを 4 - クロロベンゼンスルホノチオ酸カリウムに置き換えて化合物 45 b を合成した。 (ESI +ve) : 計算値 (M + H) $^+$: 324.03 、 322.04 、 実測値 : 324.22 、 322.20 (^{37}Cl 、 ^{35}Cl 同位元素パターン) 。

【1327】

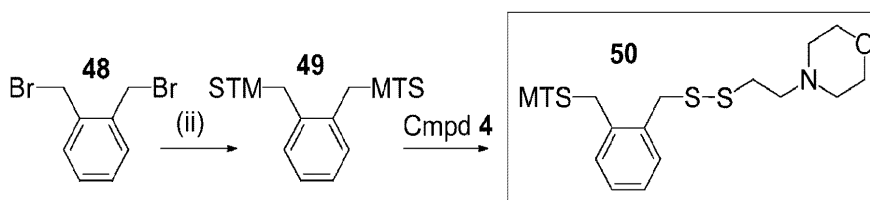
化合物 47 a : 化合物 45 a について記載の方法と類似の方法で、4 - (2 - クロロエチル) モルホリン塩酸塩を 4 - (2 - プロモエチル) - N - メチルピペラジン臭化水素酸塩 (化合物 46) に置き換えて化合物 47 a を合成した。MS (ESI +ve) : 計算値 (M + H) $^+$: 315.12 、 実測値 : 315.07 。

【1328】

化合物 47 b : 化合物 45 a について記載の方法と類似の方法で、4 - (2 - クロロエチル) モルホリン塩酸塩を 4 - (2 - プロモエチル) - N - メチルピペラジン臭化水素酸塩で置き換え、かつ 4 - メチルベンゼンスルホノチオ酸カリウムを 4 - クロロベンゼンスルホノチオ酸カリウムに置き換えて化合物 47 b を合成する。

化合物 50 の合成

【化371】



【1329】

化合物 49 : 化合物 48 (500 mg 、 1.894 mmol) およびメタンスルホノチオ酸ナトリウム (534 mg 、 3.98 mmol) の混合物をアセトン (10 mL) に溶解し、室温で4時間攪拌した。TLCは、完全に反応したことを示した。溶媒を除去し、次に混合物を水およびDCMの添加により分割した。抽出して有機層を分離し、乾燥し (MgSO_4) 、ろ過して、真空下で濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより純粋な生成物を無色固体として得た (0.60 g 、 97%) 。 ^1H NMR (399 MHz 、 CDCl_3) δ 7.47 (dd 、 $J = 5.5$ 、 3.5 Hz 、 2 H) 、 7.38 (dd 、 $J = 5.5$ 、 3.5 Hz 、 2 H) 、 4.55 (s 、 4 H) 、 3.13 (s 、 6 H) ; ^{13}C NMR (100 MHz 、 CDCl_3) δ 133.41 、 131.75 、 129.51 、 51

. 02、37.09; MS (ESI+ve): 計算値 (M+NH₄)⁺: 344.01、
実測値: 344.01; R_f = 0.5 (1:1 EtOAc/ヘキサン)。

【1330】

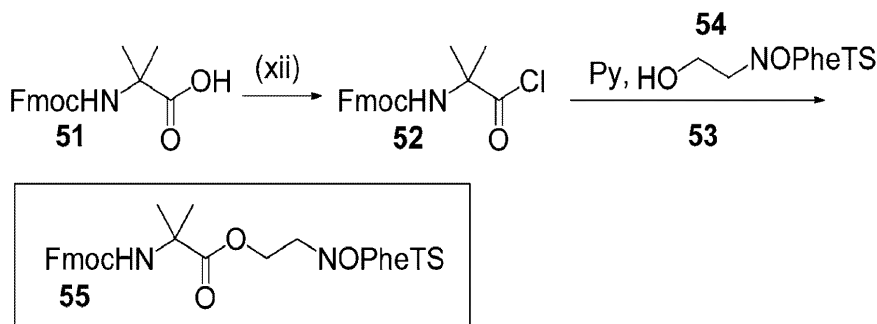
化合物50: 化合物4 (180 mg、1.225 mmol) のDCM (2 mL) 溶液を、
化合物49 (400 mg、1.225 mmol) のDCM (20 mL) 溶液に、攪拌し
ながら、室温でシリンジを使用して滴下した。0.5時間後、混合物をNaHCO₃の添
加により分割した。抽出して有機層を分離し、次に乾燥し (MgSO₄)、ろ過して、真
空下で濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより生成物を無色油状物質として得た (1
70 mg、35%)。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 7.43 - 7.39
(m、1H)、7.35 - 7.27 (m、3H)、4.54 (s、2H)、4.03 (s
、2H)、3.67 (t、J = 4.6 Hz、4H)、3.05 (s、3H)、2.58 -
2.50 (m、4H)、2.38 (t、J = 4.6 Hz、4H); ¹³C NMR (100
MHz、CDCl₃) δ 136.09、133.20、131.87、131.21、
128.86、128.54、66.95、57.95、53.52、51.04、40
.81、38.18、35.82; MS (ESI+ve): 計算値 (M+H): 394.
06、実測値: 394.23; R_f = 0.5 (EtOAc)。

10

化合物55の合成

【化372】

20



【1331】

30

化合物54: DCM (50 mL) 中の臭素 (0.246 mL、4.78 mmol) を、
DCM (50 mL) 中の4-ニトロベンゼンスルフィン酸ナトリウム (2 g、9.56 m
mol) および2-ヒドロキシエチルジスルフィド (0.585 mL、4.78 mmol)
の混合物に、攪拌しながら、室温で0.5時間かけて滴下した。室温で2時間後、混
合物をろ過して塩を除去した。溶媒を除去し、その後カラムクロマトグラフィーによるカ
ラム精製により、生成物を無色油状物質として得た (2.1 g、83%)。R_f = 0.4 (1:1
EA/ヘキサン)。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 8.41 (d、
J = 8.8 Hz、2H)、8.13 (d、J = 8.8 Hz、2H)、3.89 (t、J =
5.8 Hz、2H)、3.23 (t、J = 5.8 Hz、2H)、2.02 - 1.94 (s
、br、1H); ¹³C NMR (100 MHz、CDCl₃) δ 149.73、128
.40、124.82、60.94、39.28。

40

【1332】

化合物55: DCM (50 mL) 中の化合物51 (1 g、3.07 mmol) を、二塩
化オキサリル (0.527 mL、6.15 mmol) と滴下しながら処理し、室温で攪拌
した。反応中、均一な無色液体が形成した。室温で1時間後、溶媒を真空下で除去した。
白色残渣 (粗製の酸塩化物、化合物52) をDCM (20 mL) に再溶解し、化合物54
(0.48 g、3.1 mmol) のピリジン (20 mL) 溶液に、攪拌しながら加えた。
18時間後、反応が完了したと判断した。溶媒を除去した。残渣をトルエンに再溶解し、
水で分割した。トルエン抽出物を回収し、飽和食塩水で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、
ろ過して、濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより純粋な化合物55を無色固体とし

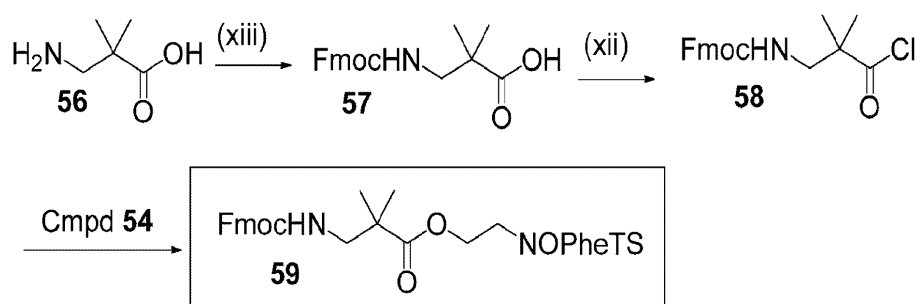
50

て得た (0.86 g、60%)。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 8.31 (d、 $J=8.9$ Hz、2H)、8.03 (d、 $J=8.9$ Hz、2H)、7.7 (d、 $J=7.5$ Hz、2H)、7.58 (d、 $J=7.5$ Hz、2H)、7.42 (t、 $J=7.5$ Hz、2H)、7.32 (dt、 $J=7.5$ 、1.2 Hz、2H)、5.22 (s、br、1H)、4.34 (s、br、4H)、4.19 (t、 $J=6.8$ Hz、1H)、3.23 (t、 $J=6.0$ Hz、2H)、4.17 (s、br、6H)； ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 173.91、155.10、150.60、149.53、143.85、141.42、128.27、128.20、127.91、127.22、127.18、125.12、124.84、120.17、66.81、62.60、56.40、47.25、34.76、25.37；MS (ESI+ve)：計算値 (M+H) $^+$ ：571.11、実測値：571.00； $R_f=0.5$ (EtOAc)。

10

化合物 59 の合成

【化 373】



20

【1333】

化合物 57：化合物 57 は、ピリジン中の 1.5 当量の Fmoc-OSu と室温で 18 時間反応させることにより、化合物 56 (1 mmol) から調製する。水で分離し、次にカラムクロマトグラフィーにより純粋な化合物 57 を得る。

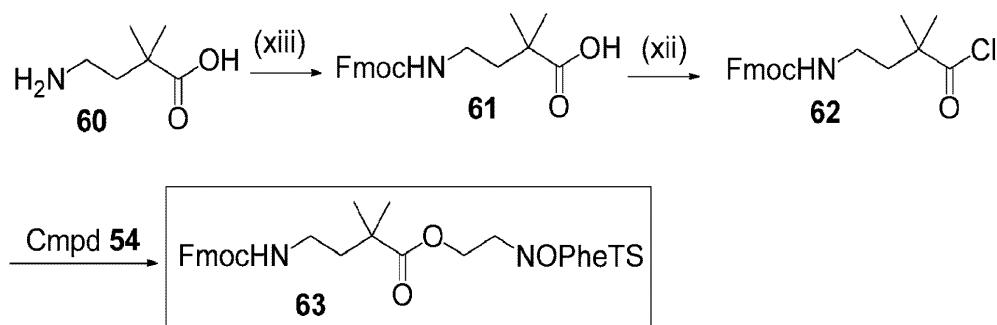
【1334】

化合物 59：化合物 55 について記載した手順と類似の手順により、化合物 59 を化合物 57 から調製する。

30

化合物 63 の合成

【化 374】



40

【1335】

化合物 61：化合物 57 について記載した手順と類似の手順により、化合物 61 を化合物 60 から調製する。

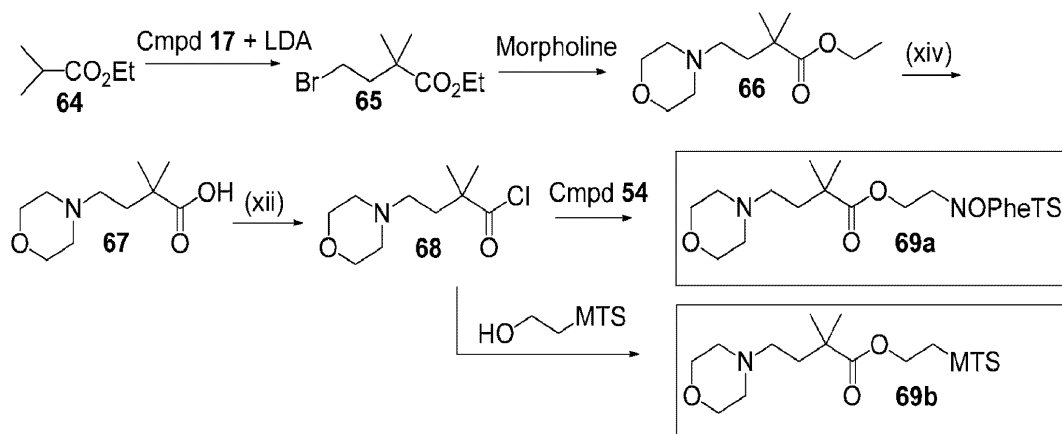
【1336】

50

化合物 6 3 : 化合物 5 5 について記載した手順と類似の手順により、化合物 6 3 を化合物 6 1 から調製する。

化合物 6 9 の合成

【化 3 7 5】



10

【1 3 3 7】

20

化合物 6 5 : イソ酪酸エチル (11.6 g、100 mmol) を、冷却した (-78°C) LDA の THF 溶液 (53 mL、2 M) に 0.5 時間かけて加えた。次にオレンジ色の混合物を 0°C まで短時間温め、 -78°C に再冷却した。次に 1, 2 - ジブロモエタン (20 g、106 mmol) を 0.5 時間かけて加え、この溶液をゆっくり室温まで温め、一晚攪拌した。生成した混合物を水および EA の添加により分割した。EA に抽出し、飽和食塩水で洗浄し、オレンジ色の層を分離し、乾燥し (MgSO_4)、ろ過して、真空下で濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより純粋な生成物を無色油状物質として得た (6.0 g、25%)。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 4.15 (q、 $J=7.1$ Hz、2 H)、3.35 (t、 $J=8.4$ Hz、2 H)、2.16 (t、 $J=8.4$ Hz、2 H)、1.27 (t、 $J=7.1$ Hz、3 H)、1.22 (s、6 H)； ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 176.78、60.83、43.83、42.89、28.45、25.20、14.32； $R_f=0.5$ (5% EtOAc / ヘキサン)。

30

【1 3 3 8】

化合物 6 6 : THF (20 mL) 中の化合物 6 5 (3.4 g、15.24 mmol) およびモルホリン (13.28 g、152 mmol) の混合物を、ガラス圧力容器内で、 50°C で 72 時間にわたり加熱した。白色沈殿の形成を観察した。混合物を水および EA 間で分割した。EA 抽出物を乾燥し (MgSO_4)、ろ過して、濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより生成物を無色液体として得た (3.5 g、100%)。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 4.11 (q、 $J=7.1$ Hz、2 H)、3.67 (t、 $J=4.7$ Hz、4 H)、2.41 (t、br、 $J=4.0$ Hz、4 H)、2.30 - 2.26 (m、2 H)、1.74 - 1.70 (m、2 H)、1.23 (t、 $J=7.1$ Hz、3 H)、1.17 (s、6 H)； ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 177.69、67.11、55.15、54.02、41.10、37.04、25.49、14.35；MS (ESI +ve) : 計算値 ($M+H$)⁺ : 230.18、実測値 : 230.33； $R_f=0.5$ (5% EtOAc / ヘキサン)。

40

【1 3 3 9】

化合物 6 7 : 化合物 6 6 (120 mg、0.523 mmol) および水酸化ナトリウム (120 mg、3.00 mmol) を、1 : 1 の EtOH / H_2O (10 mL) 中で一緒に攪拌した。36 時間後、濃 HCl の添加により溶液の pH を約 2 に調整し、次に pH が

50

約10になるまでNEt₃を加えた。SiO₂ (2 g)を加え、溶媒／水を蒸発させた。乾式充填 (DCM中の2%NEt₃を有するMeOH／DCM) したカラムクロマトグラフィーにより、生成物を部分 (約1/3 mol 当量) HNEt₃ 塩として得た。調整収量は103 mg、84%であった。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃ および3滴のDMSO-d₆) δ 3.62 (t、J=4.7 Hz、4H)、2.51 - 2.46 (br、4H)、2.40 (t、J=7.1 Hz、2H)、1.62 (J=7.1 Hz、2H)、1.08 (s、6H)；¹³C NMR (100 MHz、CDCl₃) δ 179.91、65.91、54.29、52.87、45.44、41.37、35.09、25.93、8.56；MS (ESI - ve)：計算値 (M-H)⁻：200.13、実測値：200.16；R_f = 0.5 (2%NEt₃ / 10%MeOH / DCM)。

10

【1340】

化合物69a：DCM (200 mL) 中の化合物67 (11 g、54.9 mmol) の懸濁液を、塩化オキサリル (9.42 mL、110 mmol) で処理し、室温で攪拌した。反応中、均一な無色溶液が形成した。室温で1時間後、溶媒を減圧下で除去した。黄色残渣を、DCM (200 mL) およびPy (100 mL) の混合物中で懸濁させ、次にS-2-ヒドロキシエチル化合物54 (15.91 g、60.4 mmol) (DB-7-5) を全て一度に加え、反応をHPLC / MSによりモニターした。18時間後、MSおよびTLCにより反応が実質的に完了したと判断した。溶媒を除去し、次に残渣をDCM / 炭酸水素塩に再溶解した。ひとつにまとめた有機物を乾燥し (MgSO₄)、ろ過して、濃縮した。カラムクロマトグラフィーによる精製により、12.5 g、51%の化合物69aを黄色油状物質として得た。この油状物質は静置して結晶化した。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 8.41 (d、J=8.5 Hz、2H)、8.13 (d、J=8.5 Hz、2H)、4.27 (t、J=6.3 Hz、2H)、3.65 (t、J=4.6 Hz、4H)、3.28 (t、J=6.3 Hz、2H)、2.40 (s、br、4H)、2.27 (t、J=7.7 Hz、2H)、1.71 (t、J=7.7 Hz、2H)、1.14 (s、6H)；¹³C NMR (100 MHz、CDCl₃) δ 177.11、150.71、149.69、128.34、124.92、66.96、61.66、54.95、53.92、41.25、46.81、35.11、25.36；MS (ESI + ve)：計算値 (M+H)⁺：447.12、実測値：446.98。

20

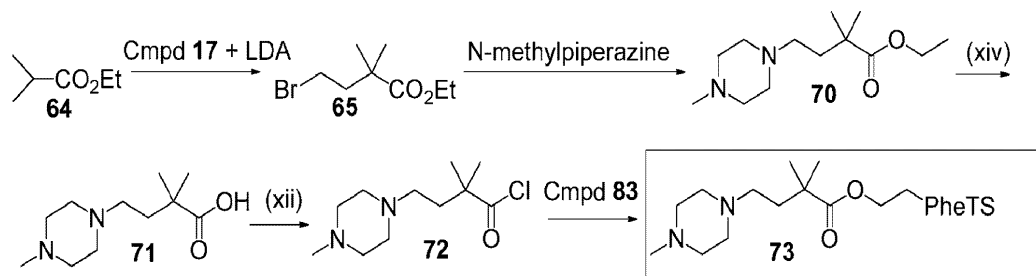
【1341】

化合物69b：DCM (12 mL) 中の化合物67 (128 mg、0.636 mmol) の懸濁液を、塩化オキサリル (545 μL、6.36 mmol) と滴下しながら処理し、室温で攪拌した。反応中、均一な無色溶液が形成し、この溶液はすぐに無色沈殿を析出した。N-プロピルアミドへの変換により示されるように、HPLC / MSは酸塩化物 (化合物68) への良好な変換を示した。溶媒を減圧下で除去した。白色残渣を氷浴上で冷却し、メタンスルホノチオ酸S-2-ヒドロキシエチル (化合物54) (99 mg、0.636 mmol) のDCM (12 mL) 溶液で処理し、その後攪拌しながらヒューニッヒ塩基 (0.34 g、2.6 mmol、4 eq) を滴下した。1.5時間後、溶液を希釈したNaHCO₃ (aq) で洗浄した。ひとつにまとめた抽出物を乾燥し (MgSO₄)、ろ過して、濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより、生成物を無色油状物質として得た (84 mg、39%)。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 4.40 (t、J=6.2 Hz、2H)、3.70 (t、J=4.6 Hz、4H)、3.44 (t、J=6.2 Hz、2H)、3.39 (s、3H)、2.47 - 2.43 (br、4H)、2.32 (t、J=7.7 Hz、2H)、1.77 (t、J=7.7 Hz、2H)、1.64 - 1.58 (br、4H)、1.22 (s、6H)；¹³C NMR (100 MHz、CDCl₃) δ 177.30、67.08、62.27、55.03、54.01、51.07、41.32、36.99、35.14、25.44；MS (ESI + ve)：計算値 (M+H)⁺：340.13、実測値：340.27；R_f = 0.2 (EtOAc)。

30

40

【化 3 7 6】



10

【1 3 4 2】

化合物 70：化合物 70 は、化合物 66 について記載した手順と類似の手順により、N-メチルピペラジンと化合物 65 の反応により調製した。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 4.10 (q、 $J=7.1$ Hz、2H)、2.3 - 2.6 (br、8H)、2.28 (t、 $J=8.0$ Hz、2H)、2.26 (s、3H)、1.72 (t、 $J=8.0$ Hz、2H)、1.23 (t、 $J=7.1$ Hz、3H)、1.15 (s、6H)； ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 177.71、60.44、55.27、54.64、53.50、46.18、41.15、37.36、25.47、14.34；MS (ESI +ve)：計算値 ($M+H$) $^+$ ：243.20、実測値：243.31。

20

【1 3 4 3】

化合物 71：化合物 71 は、化合物 67 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 70 の加水分解により調製した。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 12.10 (vbr、1H)、3.2 - 2.2 (vbr、8H)、2.44 (t、 $J=8.0$ Hz、2H)、2.36 (s、3H)、1.71 (t、 $J=8.0$ Hz、2H)、1.17 (s、6H)、 ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 181.36、55.18、53.51、52.18、44.31、41.57、37.19、26.28；MS (ESI +ve)：計算値 ($M+H$) $^+$ ：215.17、実測値：215.19。

【1 3 4 4】

化合物 83：DCM (50 mL) 中の臭素 (2.58 mL、50.0 mmol) を、DCM (50 mL) 中のベンゼンスルフィン酸ナトリウム (16.4 g、100 mmol) および 2-ヒドロキシエチルジスルフィド (6.11 mL、49.9 mmol) の混合物に、攪拌しながら、室温で 0.5 時間かけて滴下した。室温で 2 時間後、TLC が良好な反応 ($R_f=0.4$ (1:1 EA/ヘキサン)) を示したので、混合物をろ過して塩を除去した。溶媒を除去し、その後カラムクロマトグラフィーにより、生成物を無色油状物質として得た (17.4 g、80%)。

30

【1 3 4 5】

化合物 73：DCM (20 mL) 中の化合物 71 (1.342 g、6.29 mmol) を、塩化オキサリル (1.079 mL、12.58 mmol) で処理し、室温で攪拌した。反応中、淡黄色沈殿の形成を観察した。室温で 0.5 時間後、溶媒を減圧下で除去した。淡黄色残渣を、DCM (20 mL) および Py (20 mL) の混合物中で懸濁させ、次に化合物 83 (2.060 g、9.44 mmol) を全て一度に加えた。18 時間後、TLC により反応が完了したと判断した。溶媒を除去し、次に残渣を水に再溶解し、エーテルで洗浄した。水層を濃縮して茶色固体を得た。沸騰した EtOH (10 mL) から再結晶して、わずかに不純物を含む HCl 塩を得た。これを遊離塩基 (DCM 中の NEt_3) にして、シリカゲルに直接充填した。カラムクロマトグラフィーにより、0.95 g、36% の純粋な化合物 73 を得た。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 7.96 (d、 $J=8.0$ Hz、2H)、7.68 (t、 $J=7.2$ Hz、1H)、7.59 (t、 $J=7.7$ Hz、2H)、4.25 (t、 $J=6.3$ Hz、2H)、3.25 (t、 $J=6.3$ Hz、2H)、2.8 - 2.3 (vbr、8H)、2.36 (s、3H)、2.

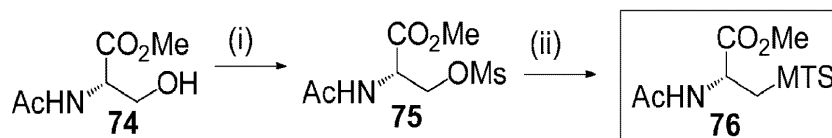
40

50

3.3 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.74 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.16 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 177.13, 144.68, 134.09, 129.59, 127.09, 61.99, 54.86, 54.35, 52.84, 45.95, 45.71, 41.26, 37.05, 34.66, 25.39; MS (ESI+ve): 計算値 (M+H) $^+$: 415.17、実測値: 415.09。

化合物 76 の合成

【化 377】



10

【1346】

化合物 75: 化合物 2 について記載した手順と類似の手順により、化合物 74 を化合物 75 に変換した。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.49 - 6.41 (br, d, J = 6.3 Hz, 1H), 4.91 (dt, J = 6.3, 2.7 Hz, 1H), 4.59 (ddd, J = 31.4, 10.6, 3.0 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 2.09 (s, 3H); 170.27, 169.05, 68.90, 53.33, 52.03, 37.63, 23.16; MS (ESI+ve): 計算値 (M+H) $^+$: 240.06、実測値: 240.24。

20

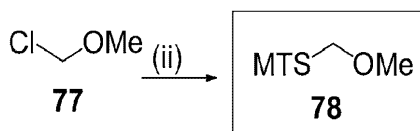
【1347】

化合物 76: 化合物 3 について記載した手順と類似の手順により、化合物 75 を化合物 76 に変換した。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6.56 - 6.40 (br, d, J = 6.2 Hz, 1H), 4.93 (q, J = 5.9 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.3.74 (dd, J = 14.6, 4.8 Hz, 1H), 3.57 (dd, J = 14.6, 5.6 Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.07 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 170.44, 170.19, 53.23, 52.02, 50.73, 37.77, 23.12; MS (ESI+ve): 計算値 (M+H) $^+$: 256.03、実測値: 256.21。

30

化合物 78 の合成

【化 378】



40

【1348】

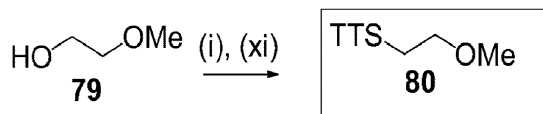
化合物 77 (2.49 ml, 32.8 mmol) およびメタンスルホノチオ酸ナトリウム (4.4 g, 32.8 mmol) の混合物をアセトン (80 ml) 中で 6 時間にわたり攪拌した。アセトンをロータリーエバポレーションにより除去し、混合物を DCM で破碎した。ろ過後、DCM を蒸発により除去し (粗収量 5 g)、混合物をカラムクロマトグラフィーによる精製に付した。純粋な化合物 78 の収量は 2.8 g、55% であり、無色油状物質で、Rf = 0.3 (20% EA/ヘキサン) であった。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5.30 (s, 2H), 3.48 (s, 3H), 3.38 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 80.07, 57.40, 22.7

50

1。

化合物 80 の合成

【化 3 7 9】



【1 3 4 9】

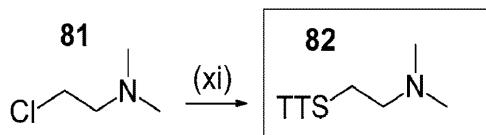
10

氷冷した化合物 79 (5 g、65.7 mmol) およびトリエチルアミン (11 ml、79 mmol) の DCM (150 mL) 溶液を、メタンスルホニルクロリド (5.59 ml、72.3 mmol) で 2 分かけて処理した。1 時間後、TLC により反応が完了したと判断した。水を加え、有機抽出物を希 HCl、飽和炭酸水素ナトリウム、飽和食塩水で順次洗浄し、次に乾燥し (MgSO₄)、ろ過して、濃縮した。生成物のメシラート (9.4 g、61 mmol、96%) をアセトンに入れ (200 ml)、次にトルエンチオスルフィン酸カリウム塩 (61 mmol) を加え、溶液を 50 °C で 18 時間にわたって攪拌した。粘稠な白色沈殿の形成を観察した。混合物をろ過し、濃縮して油状物質とし、次に DCM/水に抽出した。有機抽出物を乾燥し (MgSO₄)、ろ過して、濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより、純粋な化合物 80 を無色油状物質として得た。この油状物質は静置して、結晶化した。R_f = 0.3 (20% EA/ヘキサン)。

20

化合物 82 の合成

【化 3 8 0】



30

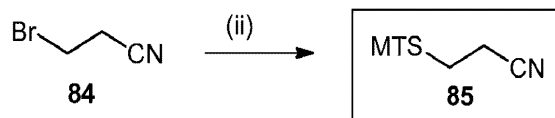
【1 3 5 0】

2-クロロ-N,N-ジメチルエタンアミン塩酸塩 (10 g、69.4 mmol)、ヨウ化ナトリウム (1.041 g、6.94 mmol) および 4-メチルベンゼンスルホノチオ酸カリウム (18.86 g、83 mmol) の混合物を MeOH (50 ml) 中で攪拌し、60 °C で 72 時間にわたり加熱した。水での後処理、その後カラムクロマトグラフィーにより、純粋な化合物 82 を無色油状物質として得た (8.5 g、47%)。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 7.81 (d、J = 8.4 Hz、2H)、7.33 (dd、J = 8.4、0.6 Hz、2H)、3.09 (t、J = 6.8 Hz、2H)、2.53 (t、J = 6.8 Hz、2H)、2.44 (s、3H)、2.17 (s、6H)；¹³C NMR (100 MHz、CDCl₃) δ 144.76、142.03、129.92、127.18、57.51、45.14、34.29、21.77；MS (ESI +ve)：計算値 (M+H)⁺：260.07、実測値：260.16。

40

化合物 85 の合成

【化 3 8 1】

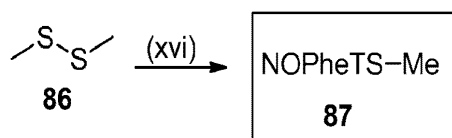


【1 3 5 1】

メタンスルホン酸ナトリウム（11.5 g、86 mmol）を、乾燥した50 mLの1口フラスコに入れた。乾燥したガラスシリンジを使用して、30 mLの無水DMF（アルドリッチ（Aldrich））を加えた。乾燥したガラスシリンジを使用して、5 mLの3-ブロモプロピオニトリル（化合物84）（8.2 g、61.2 mmol）を加えた。反応フラスコをアルゴン下で閉じて密閉し、50℃で24時間攪拌した。TLC（系：ヘキサン／酢酸エチル - 5：5 - v／v）を使用して、反応をモニターした。反応混合物を100 mLの酢酸エチルで希釈し、水で5回洗浄した（5×100 mL）。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、乾燥するまで蒸発させた。残渣を5 mLのジクロロメタンに溶解し、ヘキサン中の酢酸エチルの直線勾配を使用してシリカゲルクロマトグラフィー（Combiflash）により精製した。純粋な化合物85を無色油状物質として得た（7.2 g、52%）。¹H-NMR（CDCl₃、399 MHz）δ 3.43（s、3H）、3.41（t、2H、J = 2.5 Hz）、2.93（t、2H、J = 2.5 Hz）；¹³C-NMR（CDCl₃、100 MHz）δ 117.7、51.2、31.7、19.6。

化合物87の合成

【化 3 8 2】

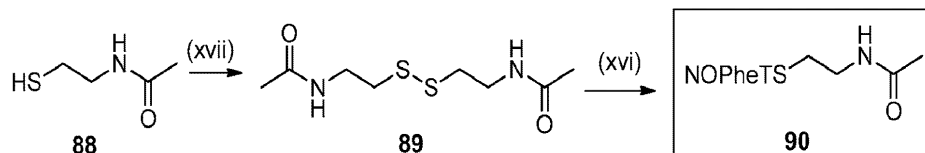


【1 3 5 2】

化合物87：化合物86（1.11 mL、12.5 mmol）および4-ニトロベンゼンスルフィン酸ナトリウム（5.23 g、25.0 mmol）をDCM（12.5 mL）に加えて、白色懸濁液を得た。臭素（0.64 mL、12.5 mmol）を攪拌しながら溶液に加えた。溶液を室温で30分間攪拌し、ろ過して塩を除去し、次にろ液を減圧下で蒸発させた。粗製生成物をシリカゲルカラムに入れ、ヘキサン - EtOAcで溶出させて、純粋な化合物87を得た（4.80 g、20.6 mmol、収率82%）。¹H-NMR（399 MHz、CDCl₃）δ 8.44 - 8.40（m、2H）、8.15 - 8.10（m、2H）、2.58（s、3H）；¹³C-NMR（100 MHz、CDCl₃）δ 149.00、128.54、124.87、94.61、18.55；R_f = 0.60（1：1 EtOAc／ヘキサン）。

化合物90の合成

【化 3 8 3】



【1 3 5 3】

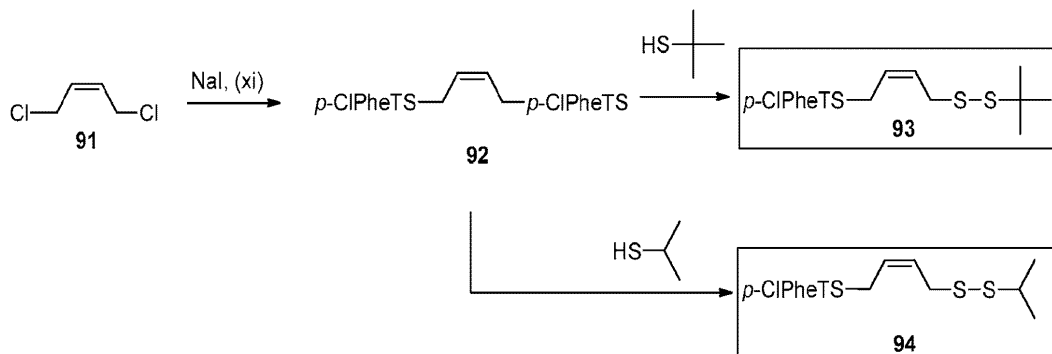
化合物 89：化合物 88 の N - (2 - メルカプトエチル) アセトアミド (11.92 g、100 mmol) を、1 L の丸底フラスコ内で EtOAc (300 mL) に溶解して、無色溶液を得た。ヨウ化ナトリウム (0.150 g、1.000 mmol) および水 (11.3 mL) 中の 30% 過酸化水素 (3.40 g、100 mmol) を溶液に加え、この溶液を室温で 45 分間攪拌した。飽和 Na₂S₂O₃ を溶液に加えた。水層を EtOAc で抽出した (3 × 300 mL)。ひとつにまとめた有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過して、ロータリーエバポレーションにより濃縮した。粗製生成物をカラムクロマトグラフィーに付し、MeOH / DCM 勾配で溶出させて、純粋な化合物 89 を得た (4.94 g、20.90 mmol、収率 41.8%)。この化合物 89 は、反応の次の段階で直接使用するのに十分高純度であると TLC により判定した。R_f = 0.35 (9 : 1 DCM / メタノール)。

【1 3 5 4】

化合物 90：化合物 89 (2.364 g、10.00 mmol) および 4 - ニトロベンゼンスルフィニ酸ナトリウム (4.18 g、20 mmol) を、100 mL 丸底フラスコ内で CH₂Cl₂ (20 mL) に溶解して、白色懸濁液を得た。臭素 (0.516 mL、10.00 mmol) を攪拌しながら溶液に加えた。溶液を室温で 30 分間攪拌し、ろ過して塩を除去し、次にろ液を減圧下で蒸発させた。粗製生成物をシリカゲルカラムに入れ、ヘキサン - EtOAc で溶出させて、純粋な化合物 90 を得た (2.37 g、7.79 mmol、収率 39%)。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 8.45 - 8.40 (m、2 H)、8.17 - 8.12 (m、2 H)、3.60 - 3.54 (dt、2 H)、3.21 - 3.16 (t、2 H)、2.00 (s、3 H)；¹³C NMR (100 MHz、CDCl₃) δ 130.35、126.27、66.97、58.20、53.67、51.52、36.22、35.16、33.67；R_f = 0.40 (EtOAc)。

化合物 93 および 94 の合成

【化 3 8 4】



【1 3 5 5】

化合物 92：4 - クロロベンゼンスルホノチオ酸ナトリウム (14.5 g、63.0 mmol) を、250 mL 丸底フラスコ内で MeOH に溶解した。化合物 91 の cis - 1, 4 - ジクロロ - 2 - ブテン (3.16 g、30.0 mmol) およびヨウ化ナトリウム

(450 mg、3.0 mmol)を撹拌しながら溶液に加えた。溶液を室温で3時間撹拌し、次に50℃に加熱した。50℃で18時間撹拌後、溶媒を減圧下で除去した。生成した粗製物質をDCM(300 mL)で希釈し、水で洗浄した(1×100 mL)。水層をDCMで抽出した(1×100 mL)。ひとつにまとめた有機層をNa₂SO₄で乾燥し、ろ過して濃縮した。粗製生成物をカラムクロマトグラフィーに付し、EtOAc/ヘキサン勾配で溶出させて、化合物92を得た(5.99 g、12.8 mmol、収率43%)。¹H NMR(399 MHz、CDCl₃) δ 7.87–7.84 (m、4H)、7.56–7.51 (m、4H)、5.56–5.50 (m、2H)、3.72–3.68 (m、4H)；¹³C NMR(100 MHz、CDCl₃) 130.35、126.27、66.97、58.20、53.67、51.52、36.22、35.16、33.67；R_f = 0.35 (1:3 EtOAc/ヘキサン)。

10

【1356】

化合物93：化合物92(3.09 g、6.58 mmol)を100 mL丸底フラスコ内で、0℃でTHFに溶解した。トリエチルアミン(459 μL、3.29 mmol)および2-メチル-2-プロパンチオール(742 μL、6.58 mmol)を、0℃で撹拌しながら溶液に加えた。溶液を0℃で20分間撹拌し、次にトリエチルアミン(230 μL、1.65 mmol)を、0℃で撹拌しながら溶液に加えた。0℃で40分間撹拌後、溶媒を減圧下で除去した。生成物をカラムクロマトグラフィーに付し、EtOAc/ヘキサン勾配で溶出させて、化合物93を得た(1.77 g、4.62 mmol、収率70%)。¹H NMR(399 MHz、CDCl₃) δ 7.90–7.85 (m、2H)、7.56–7.52 (m、2H)、5.73–5.65 (m、1H)、5.55–5.48 (m、1H)、3.78–3.75 (d、2H)、3.36–3.32 (d、2H)、1.32 (s、9H)；¹³C NMR(100 MHz、CDCl₃) δ 143.54、140.60、130.90、129.83、128.66、124.56、48.29、37.05、33.35、30.16；R_f = 0.60 (1:3 EtOAc/ヘキサン)。

20

【1357】

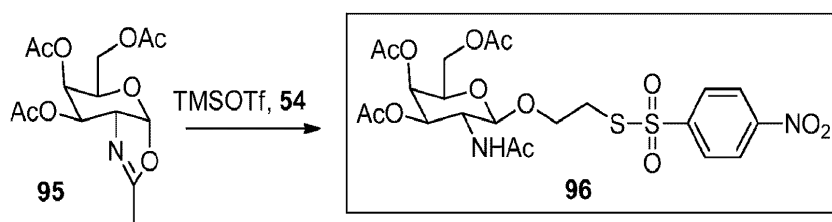
化合物94：化合物93について記載した手順と類似の手順を使用して、2-メチル-2-プロパンチオールの代わりに2-プロパンチオールを使用して、純粋な化合物94を得た(1.13 g、3.06 mmol、収率72%)。¹H NMR(399 MHz、CDCl₃) δ 7.90–7.82 (m、2H)、7.56–7.48 (m、2H)、5.72–5.64 (m、1H)、5.57–5.47 (m、1H)、3.79–3.72 (d、2H)、3.33–3.26 (d、2H)、3.61–2.92 (m、1H)、1.27 (d、6H)；¹³C NMR(100 MHz、CDCl₃) δ 143.28、140.36、131.37、125.63、124.55、124.56、41.32、38.02、35.81、33.08、22.54；R_f = 0.55 (1:3 EtOAc/ヘキサン)。

30

化合物96の合成

【化385】

40



【1358】

化合物96：化合物9(1.81 g、5.50 mmol)および化合物54(2.17

50

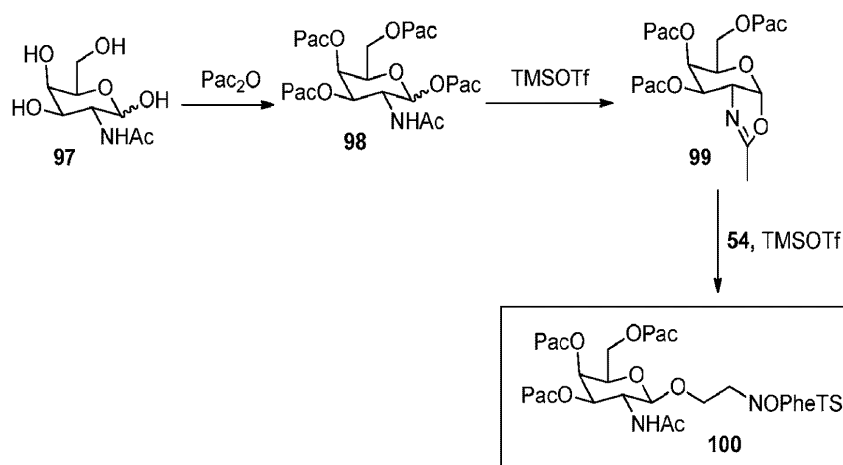
g、8.25 mmol)を混合し、無水トルエンとの同時蒸発により脱水した(3×2 mL)。混合物を脱水1,2-ジクロロエタン(16.5 mL)に溶解した。溶液に4 Åの分子ふるいを加え、室温で30分間攪拌した。トリメチルシリルトリフラート(497 μL、2.75 mmol)を攪拌しながら溶液に加えた。溶液を室温で9時間攪拌し、次にさらなる化合物54(0.723 g、2.75 mmol)を攪拌しながら溶液に加えた。室温で16時間攪拌後、溶液をDCM(100 mL)で希釈し、飽和NaHCO₃で洗浄した(1×100 mL)。水層をDCMで抽出した(1×50 mL)。ひとつにまとめた有機層をNa₂SO₄で乾燥し、ろ過して、ロータリーエバポレーションにより濃縮した。粗製生成物をカラムクロマトグラフィーに付し、EtOAc/ヘキサン勾配で溶出させて、化合物96を得た(2.21 g、3.73 mmol、収率68%)。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 8.42 - 8.36 (d、2H)、8.12 - 8.06 (d、2H)、6.07 - 6.00 (d、1H)、5.33 - 5.30 (d、1H)、5.23 - 5.15 (dd、1H)、4.69 - 4.63 (d、1H)、4.15 - 4.04 (m、3H)、4.04 - 3.87 (m、2H)、3.84 - 3.73 (m、1H)、3.22 - 3.12 (t、2H)、2.12 - 1.92 (m、12H)；¹³C NMR (100 MHz、CDCl₃) 179.95、170.74、170.48、150.77、149.59、128.47、125.03、101.40、71.08、70.02、67.39、66.92、61.76、51.12、36.51、23.72、20.92；R_f = 0.25 (1:9 MeOH/DCM)。

10

20

化合物100の合成

【化386】



30

【1359】

化合物98：氷冷した化合物97(4.87 g、22.0 mmol)の脱水ピリジン(70 mL)溶液を、フェノキシ酢酸無水物(37.8 g、132.0 mmol)および4-ジメチルアミノピリジン(26.9 mg、220 μmol)で処理した。室温で12時間攪拌後、混合物を真空下で濃縮し、トルエンと同時蒸発させた。生成物をDCM(400 mL)により希釈し、飽和NaHCO₃で洗浄した(1×400 mL)。抽出して有機層を分離し、Na₂SO₄で乾燥し、ろ過して、真空下で濃縮した。生成物をカラムクロマトグラフィーに付し、EtOAc/ヘキサン勾配で溶出させて、純粋な化合物98を得た(16.7 g、22.0 mmol、収率100%)。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 7.36 - 6.75 (m、20H)、6.27 - 6.20 (d、1H)、5.43 - 5.36 (m、1H)、5.22 - 5.06 (m、2H)、4.81 - 4.65 (m、3H)、4.60 - 4.52 (m、2H)、4.45 - 4.29 (m、2H)、4.17 - 4.02 (m、2H)、3.97 - 3.87 (m、1H)、1.85および1.

40

50

74 (d、3H、回転異性体) ; ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 170.20、168.78、168.70、168.36、167.52、157.56、157.48、157.40、130.09、129.70、129.66、129.60、122.32、122.01、121.94、114.61、114.58、114.58、114.39、91.93、68.37、68.25、67.30、64.54、61.25、46.43、22.95 ; $R_f = 0.35$ (1:1 EtOAc/ヘキサン)。

【1360】

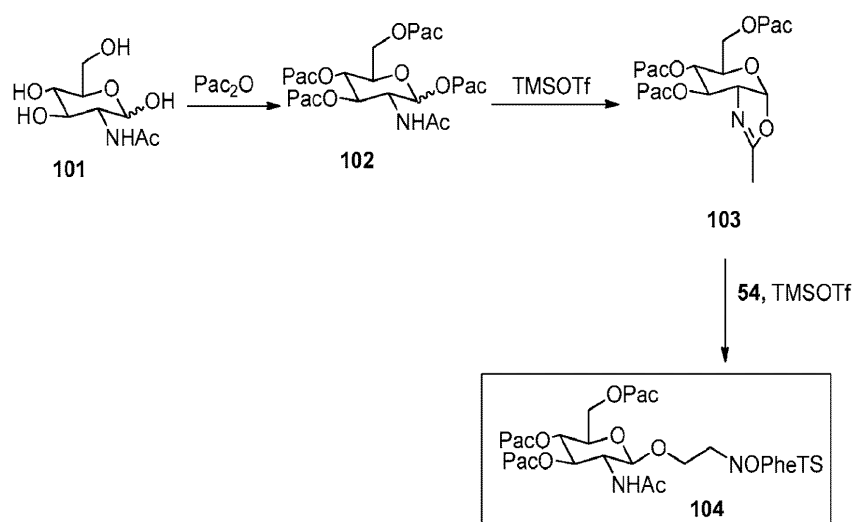
化合物99 : 化合物98 (15.15 g、20.0 mmol) を $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (40 mL) に溶解し、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (5.43 mL、30.0 mmol) を、室温で攪拌しながら溶液に加えた。溶液を50℃で24時間攪拌し、トリエチルアミン (12.6 mL、90.0 mmol) を加え、混合物を真空下で濃縮した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc (2.5% Et₃N) - ヘキサン) により精製し、微量のフェノキシ酢酸を含有する、わずかに不純物を含む化合物99を得た。この物質をさらなる精製なしで、反応スキームの次の段階において使用した。

【1361】

化合物100 : 化合物99 (3.63 g、6 mmol) および化合物54のS-2-ヒドロキシエチル-4-ニトロベンゼンスルホノチオアート (2.76 g、10.5 mmol) を $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (18 mL) に溶解して無色溶液を得た。溶液に、攪拌しながら室温で4 Åの分子ふるいを加えた。溶液を室温で30分間攪拌し、次にトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (0.543 mL、3.00 mmol) を加えた。混合物を室温で24時間攪拌し、TLCは反応が約90%完了したことを示した。さらなる化合物54 (237.0 mg、0.90 mmol) を混合物に加え、さらに36時間攪拌して反応を完了させた。混合物をDCM (100 mL) で希釈し、飽和 NaHCO_3 で洗浄した (1×100 mL)。水層を CH_2Cl_2 で逆抽出した (1×50 mL)。ひとつにまとめた有機層を Na_2SO_4 で乾燥し、ろ過し、濃縮して、120 mLの Ac_2O -ピリジン (1:9、v/v) に溶解した。混合物を12時間攪拌し、次に減圧下で濃縮した。生成物を CH_2Cl_2 (100 mL) で希釈し、飽和 NaHCO_3 で洗浄した (1×100 mL)。水層を CH_2Cl_2 で逆抽出した (1×50 mL)。ひとつにまとめた有機層を Na_2SO_4 で乾燥し、ろ過し、濃縮した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc - ヘキサン勾配) により精製し、純粋な化合物100を得た (2.56 g、2.94 mmol、収率49.0%)。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 8.70 - 8.62 (d、2H)、8.41 - 8.33 (d、2H)、7.65 - 7.03 (m、15H)、6.35 - 6.27 (d、1H)、5.81 - 5.72 (m、2H)、5.06 - 4.97 (m、3H)、4.92 - 4.85 (m、2H)、4.83 - 4.62 (m、2H)、4.58 - 4.44 (m、2H)、4.34 - 4.26 (m、2H)、4.26 - 4.15 (m、1H)、4.06 - 3.95 (m、1H)、3.51 - 3.40 (m、2H)、2.22および2.18 (d、3H、回転異性体) ; ^{13}C NMR (100 MHz、 CDCl_3) δ 171.17、169.13、169.05、168.92、157.86、157.80、157.76、150.82、149.63、130.01、129.96、128.47、125.06、122.27、122.23、114.93、114.74、100.86、70.64、70.54、65.36、64.90、62.21、51.30、36.54、23.74 ; $R_f = 0.60$ (1:1 EtOAc/ヘキサン)。

化合物104の合成

【化 3 8 7】



10

【1 3 6 2】

化合物 102：化合物 98 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 97 の代わりに化合物 101 を使用して、純粋な化合物 102 を得る。 20

【1 3 6 3】

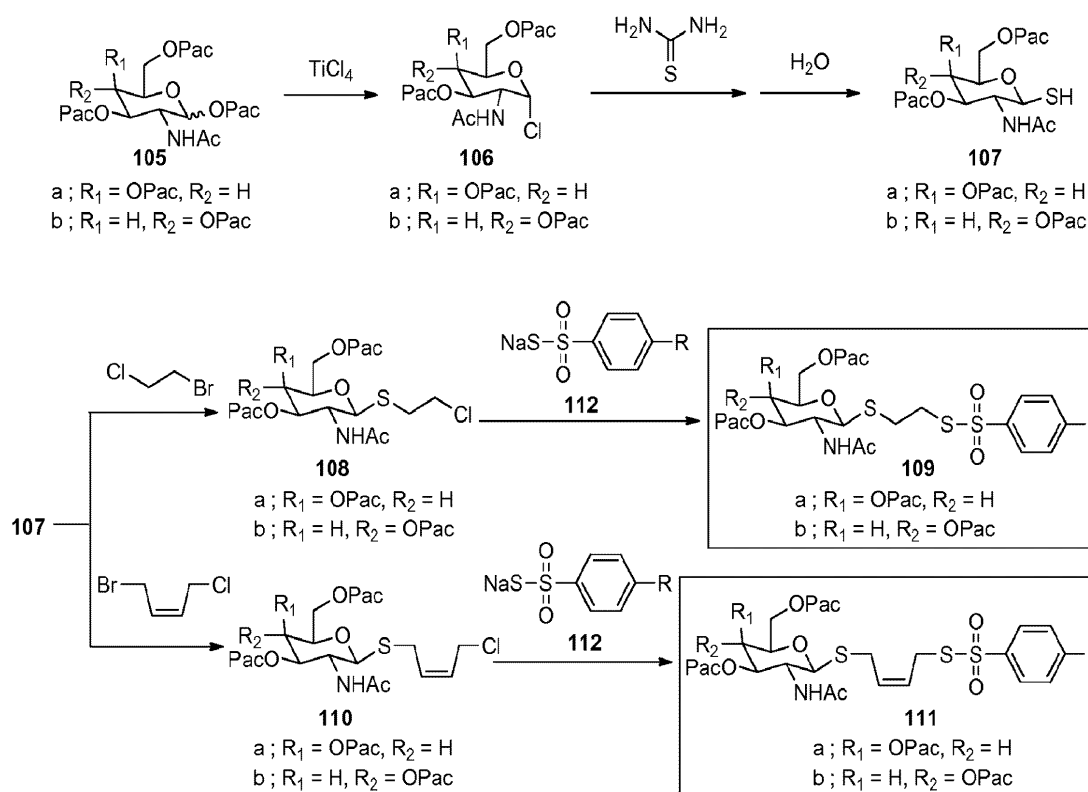
化合物 103：化合物 99 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 98 の代わりに化合物 102 を使用して、純粋な化合物 103 を得る。

【1 3 6 4】

化合物 104：化合物 100 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 99 の代わりに化合物 103 を使用して、純粋な化合物 103 を得る。

化合物 109 および 111 の合成

【化 3 8 8】



10

20

【1 3 6 5】

化合物 106 : 化合物 105 (100 mmol) の脱水 1, 2 - ジクロロエタン (300 mL) 溶液を、TiCl₄ (110 mmol) と、シリンジを使用して滴下しながら 2 分かけて処理する。16 時間還流後、TLC が反応の完了を示す。粗製物を DCM で希釈し、飽和 NaHCO₃ で洗浄する。ひとつにまとめた有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過し、濃縮して、さらなる精製なしで次の反応において使用する。

30

【1 3 6 6】

化合物 107 : チオ尿素 (150 mmol) および化合物 106 (100 mmol) を、アルゴン下でアセトン (200 mL) に溶解する。反応混合物を 60 °C に加熱し、攪拌する。2 時間後、ろ過により白色沈殿を除去する。沈殿を再結晶する。ろ過した結晶および Na₂S₂O₅ (140 mmol) を、攪拌しながら DCM (500 mL) および H₂O (250 mL) の混合物に加える。反応混合物を、Ar 下で加熱還流する。3 時間後、反応混合物を室温まで冷却し、相を分離させる。水層を DCM で逆抽出する。ひとつにまとめた有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過し、濃縮して化合物 107 を得る。

40

【1 3 6 7】

化合物 108 : 1 - ブロモ - 2 - クロロエタン (100 mmol)、トリエチルアミン (200 mmol)、および化合物 107 (100 mmol) を、Ar 下でアセトニトリル (200 mL) に溶解する。反応混合物を 60 °C に加熱し、攪拌する。TLC が反応完了を示す。混合物を DCM (500 mL) で希釈し、NaHCO₃ (250 mL) で洗浄する。有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過し、濃縮し、精製して化合物 108 を得る。

【1 3 6 8】

化合物 109 : 化合物 112 (120 mmol)、ヨウ化ナトリウム (10.0 mmol)、および化合物 108 (100 mmol) を、Ar 下で MeOH (200 mL) に溶解する。反応混合物を 60 °C に加熱し、攪拌する。TLC が反応完了を示す。混合物を DCM (500 mL) で希釈し、NaHCO₃ (250 mL) で洗浄する。有機層を Na₂

50

SO₄で乾燥し、ろ過し、濃縮し、精製して化合物109を得る。

【1369】

化合物110：1-ブロモ-4-クロロ-2,3-*cis*-ブテン(100mmol)、トリエチルアミン(200mmol)、および化合物107(100mmol)を、Ar下でアセトニトリル(200mL)に溶解する。反応混合物を60℃に加熱する。TLCが反応完了を示す。混合物をDCM(500mL)で希釈し、NaHCO₃(250mL)で洗浄する。有機層をNa₂SO₄で乾燥し、ろ過し、濃縮し、精製して化合物110を得る。

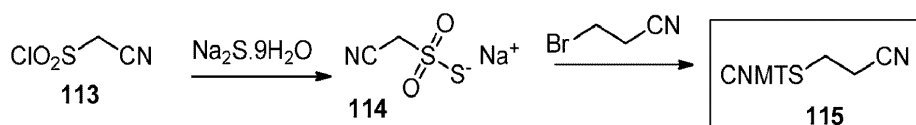
【1370】

化合物111：化合物112(120mmol)、ヨウ化ナトリウム(10.0mmol)、および化合物110(100mmol)を、Ar下でMeOH(200mL)に溶解する。反応混合物を60℃に加熱する。TLCが反応完了を示す。混合物をDCM(500mL)で希釈し、NaHCO₃(250mL)で洗浄する。有機層をNa₂SO₄で乾燥し、ろ過し、濃縮し、精製して化合物111を得る。

10

化合物115の合成

【化389】



20

【1371】

化合物113：2-クロロスルホニルアセトニトリル(化合物113)は、Sammesの手順(特許GB1252903において記載のとおり)に従って調製する。

【1372】

化合物114：硫化ナトリウム九水和物(65mmol)を100mLの水に入れる。フラスコを水浴中で保持する。水浴を穏やかに温めながら、化合物113(50mmol)を、攪拌しながら溶液に滴下する。フラスコ内で、硫黄の出現を観測し、その後硫黄は消失する。溶媒を真空下で蒸発させ、残渣をエタノールから再結晶する。このようにして、シアノメタンスルホノチオ酸ナトリウム(化合物114)を無色結晶性固体として得る。

30

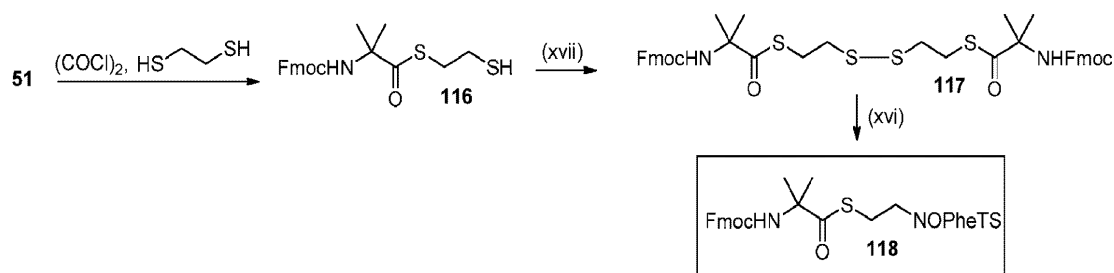
【1373】

化合物115：100mL丸底フラスコ内で、化合物114(13.69g、86mmol)を無水DMF(30mL)に攪拌しながら入れる。次に、3-ブロモプロピオニトリル(5mL、8.2g、61.2mmol)を加え、TLCによりモニターしながら生成する混合物を50℃で18時間攪拌する。反応が完了したら(3-ブロモプロピオニトリルが完全に消費されたら)、反応混合物をEtOAc(100mL)で希釈し、有機層を5×20mLのH₂Oで洗浄する。次に分離した有機層を乾燥して(MgSO₄)、ろ過し、ロータリーエバポレーションにより濃縮して油状物質を得る。粗製油状物質を、EtOAc/ヘキサン勾配を使用してカラムクロマトグラフィーにより精製し、高純度物質を含有する留分を回収し、ロータリーエバポレーションにより溶媒を除去し、次に真空下でさらに乾燥して、純粋な化合物115を無色油状物質として得る。

40

化合物118の合成

【化 3 9 0】



10

【1 3 7 4】

化合物 1 1 6 : D C M (5 0 m L) 中の化合物 5 1 (2 . 9 g 、 8 . 9 1 m m o l) を、二塩化オキサリル (0 . 5 3 m l 、 6 . 1 5 m m o l) で滴下しながら処理し、次に D M F (1 0 μ L) と滴下しながら処理し、室温で攪拌した。反応中、均一な無色溶液が形成した。室温で 2 時間後、溶媒を減圧下で除去した。白色残渣を D C M (2 0 m L) に再溶解し、次に U P L C / M S によりモニターしながら、エタン - 1 , 2 - ジチオール (8 . 4 0 g 、 8 9 m m o l) のピリジン (1 0 m L) 溶液に攪拌しながら滴下した。1 8 時間後、反応が完了したと判断した。溶媒を除去し、残留するエタンチオールをトラップからトラップへの蒸留により除去し、次に残渣を、D C M を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製し、純粋な化合物 1 1 6 を無色固体として得た。収量は 1 . 8 2 g 、 5 1 % であった。MS (E S I +) : 計算値 (M + N a) ⁺ : 4 2 4 . 1 0 、実測値 : 4 2 4 . 0 6 ; ¹ H N M R (5 0 0 M H z 、 C D C l ₃) δ 7 . 7 9 (d 、 J = 7 . 5 H z 、 2 H) 、 7 . 6 3 (d 、 J = 5 . 7 H z 、 2 H) 、 7 . 4 3 (t 、 J = 7 . 5 H z 、 2 H) 、 7 . 3 4 (t 、 J = 7 . 4 H z 、 2 H) 、 5 . 4 0 - 5 . 1 5 (b r 、 1 H) 、 4 . 6 0 - 4 . 3 5 (b r 、 2 H) 、 4 . 3 1 - 4 . 1 9 (m 、 1 H) 、 3 . 1 5 - 3 . 0 4 (b r 、 2 H) 、 2 . 9 5 - 2 . 8 0 (m 、 1 H) 、 2 . 7 5 - 2 . 6 0 (b r 、 2 H) 、 1 . 7 2 - 1 . 4 3 (m 、 6 H) ; ¹³ C N M R (1 2 6 M H z 、 C D C l ₃) δ 2 0 3 . 1 4 、 1 5 4 . 7 5 、 1 4 3 . 9 2 、 1 4 1 . 4 9 、 1 2 7 . 8 4 、 1 2 7 . 1 9 、 1 2 5 . 1 7 、 1 2 0 . 1 3 、 6 6 . 8 1 、 6 2 . 6 9 、 4 7 . 4 1 、 3 3 . 0 1 、 2 5 . 7 8 、 2 4 . 6 0 。

20

30

【1 3 7 5】

化合物 1 1 7 : 化合物 1 1 6 (1 . 7 g 、 4 . 2 3 m m o l) の E t O A c (1 2 m L) 溶液に、ヨウ化ナトリウム (6 . 3 5 m g 、 0 . 0 4 2 m m o l) および過酸化水素 (0 . 1 4 4 g 、 4 . 2 3 m m o l) (3 0 % 水溶液の 0 . 4 5 m L) を加え、混合物を室温で 1 5 分攪拌した。T L C は出発物質が完全に消費されたことを示した。溶液が無色になるまで含水チオ硫酸ナトリウムを加えた。溶液を水で洗浄し、乾燥して (M g S O ₄) 、その後カラムクロマトグラフィー (E t O A c / ヘキサン) により、純粋な化合物 1 1 7 を無色固体泡状物質として得た (1 . 4 5 g 、 8 6 %) 。MS (E S I +) : 計算値 (M + H) ⁺ : 8 0 2 . 0 7 、実測値 : 8 0 2 . 0 8 ; ¹ H N M R (5 0 0 M H z 、 C D C l ₃) δ 7 . 7 8 (d 、 J = 7 . 6 H z 、 4 H) 、 7 . 6 3 (d 、 J = 5 . 8 H z 、 4 H) 、 7 . 4 2 (t 、 J = 7 . 5 H z 、 4 H) 、 7 . 3 3 (t 、 J = 7 . 5 H z 、 4 H) 、 5 . 4 2 - 5 . 2 5 (b r 、 2 H) 、 4 . 5 5 - 4 . 3 5 (b r 、 4 H) 、 4 . 3 0 - 4 . 1 8 (b r 、 2 H) 、 3 . 2 5 - 3 . 1 0 (b r 、 4 H) 、 2 . 9 5 - 2 . 7 0 (b r 、 4 H) 、 1 . 6 5 - 1 . 4 5 (b r 、 1 2 H) ; ¹³ C N M R (1 2 6 M H z 、 C D C l ₃) δ 2 0 3 . 1 9 、 1 5 4 . 7 1 、 1 4 3 . 9 0 、 1 4 1 . 4 5 、 1 2 7 . 8 0 、 1 2 7 . 1 7 、 1 2 5 . 1 6 、 1 2 0 . 1 0 、 6 6 . 7 6 、 6 2 . 6 5 、 4 7 . 3 7 、 3 7 . 9 0 、 2 8 . 5 6 、 2 5 . 7 3 。

40

【1 3 7 6】

化合物 1 1 8 : 臭素 (0 . 0 9 1 m l 、 1 . 7 7 m m o l) を、D C M (1 0 m L) 中

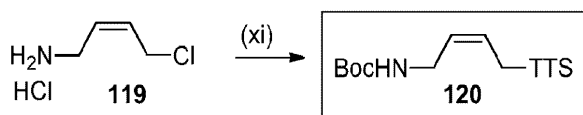
50

の 4 - ニトロベンゼンスルフィン酸ナトリウム (0.742 g、3.55 mmol) およ
 び化合物 117 (1.42 g、1.773 mmol) の混合物に、攪拌しながら、室温で
 2 分かけて滴下した。室温で 30 分攪拌後、混合物をろ過し、ろ液を真空下で濃縮してオ
 レンジ色の固体泡状物質を得た。カラムクロマトグラフィー (DCM/ヘキサン) により
 、純粋な化合物 118 を淡黄色固体泡状物質として得た (1.26 g、60%)。MS (ESI+)
 : 計算値 (M+H)⁺: 587.71、実測値: 802.08; ¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) δ 8.36 (d、J=8.2 Hz、2H)、8.14 (d
 、J=7.3 Hz、2H)、7.79 (d、J=7.0 Hz、2H)、7.63 (s、2H)、7.43 (t、J=6.7 Hz、2H)、7.35 (d、J=6.8 Hz、2H)
 、5.35 - 5.15 (br、1H)、4.55 - 4.35 (br、2H)、4.30 - 4.20 (br、1H)、3.30 - 3.00 (br、4H)、1.70 - 1.25 (br、6H); ¹³C NMR (126 MHz、CDCl₃) δ 202.71、154.66、150.60、149.63、143.78、141.46、128.40、127.91、127.21、125.12、124.81、120.18、66.86、62.59、47.35、35.84、28.42、25.61。

10

化合物 120 の合成

【化 391】



20

【1377】

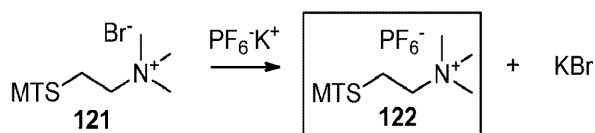
化合物 120: 市販の化合物 119 (1 g、7.04 mmol) および 4 - メチルベン
 ゼンスルホノチオ酸カリウム (1.753 g、7.75 mmol) を MeOH (10 mL)
) 中、室温で 5 日間にわたり攪拌し、次に 40 °C で 24 時間にわたり攪拌した。TLC は
 、生成物への良好な変換を示した。MeOH を蒸発させ、残渣を DCM (30 mL) に入
 れ、Boc₂O (1.54 g、7.04 mmol) を加えた。溶液が実質的に均一になる
 まで、混合物をトリエチルアミン (1.030 mL、7.39 mmol) と室温で 10 分
 かけて、滴下しながら処理した。水 (50 mL) で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、ろ過
 し、蒸発させて粗製生成物を得て、これをさらにカラムクロマトグラフィーにより精製し
 て純粋な化合物 120 を無色固体として得た (1.64 g、65%)。MS (ESI+)
 : 計算値 (M+Na)⁺: 380.10、実測値: 380.11; ¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 7.80 (d、J=8.2 Hz、2H)、7.34 (dd、J=8.5、0.8 Hz、2H)、5.54 (ddt、J=24.7、16.6、7.9 Hz、2H)、4.65 (s、1H)、3.77 - 3.66 (m、4H)、2.45 (s、3H)、1.43 (s、9H); ¹³C NMR (100 MHz、CDCl₃) δ 155.83、145.05、142.06、131.80、130.01、127.15、124.55、79.72、37.29、32.75、28.51、21.79。

30

40

化合物 122 の合成

【化 392】



50

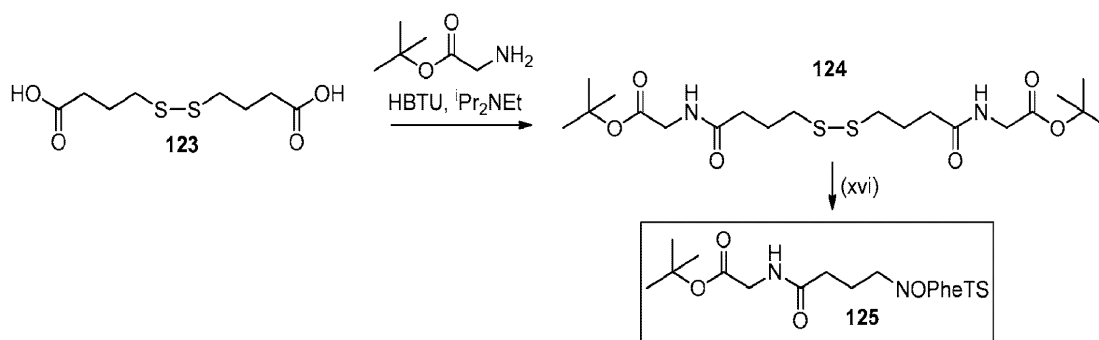
【1378】

化合物122：市販の化合物121（1 g、3.59 mmol）の水（1 mL）溶液を、ヘキサフルオロリン酸カリウム（0.662 g、3.59 mmol）の水（10 mL）溶液と全て一度に処理し、室温で5分間振とうすることにより撹拌した。生成した固体をろ過により回収し、2×3 mLの水で洗浄し、真空下、KOHで乾燥して純粋な化合物122を無色固体として得た（1.01 g、82%）。¹H NMR（300 MHz、CD₃CN）δ 3.67 - 3.60（m、2H）、3.49（s、3H）、3.53 - 3.45（m、2H）、3.10（s、9H）；¹³C NMR（126 MHz、CD₃CN）δ 65.98、54.05（q、J = 4.1 Hz）、51.11、28.99；¹⁹F NMR（376 MHz、CD₃CN）δ -73.15（d、J = 706.5 Hz）；³¹P NMR（162 MHz、CD₃CN）δ -143.50（hept、J = 706.6 Hz）。

10

化合物125の合成

【化393】



20

【1379】

化合物124：市販の化合物123（10 mmol）のDMF（50 mL）溶液を、tert-ブチル-2-アミノアセタート（22 mmol）、ジイソプロピルエチルアミン（50 mmol）およびHBTU（24 mmol）で続いて処理する。室温で1時間撹拌後、水（100 mL）を加え、生成した溶液をEtOAc（2×50 mL）で抽出し、5% NaHCO₃（2×25 mL）で洗浄し、次に希釈した飽和食塩水（2×25 mL）で洗浄し、乾燥し（MgSO₄）、ろ過して、ロータリーエバポレーションにより濃縮する。カラムクロマトグラフィーによる精製により、純粋な化合物124を得る。

30

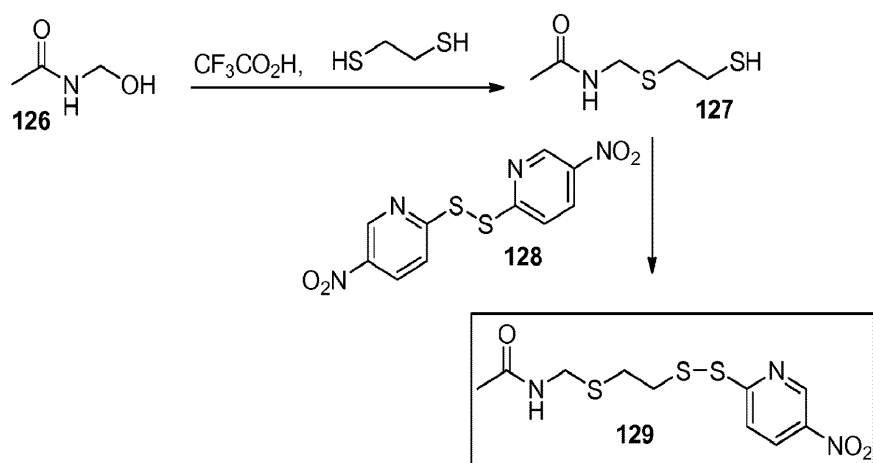
【1380】

化合物125：臭素（0.091 mL、1.77 mmol）を、DCM（10 mL）中の4-ニトロベンゼンスルフィン酸ナトリウム（0.742 g、3.55 mmol）およびジ-tert-ブチル-2,2'-（（4,4'-ジスルファンジイル-ビス（ブタノイル））ビス（アザンジイル））ジアセタート（824 mg、1.77 mmol）の混合物に、撹拌しながら、室温で2分かけて滴下する。室温で30分撹拌後、混合物をろ過し、ろ液を真空下で濃縮して固体泡状物質を得る。カラムクロマトグラフィーにより、純粋な生成物を固体泡状物質として得る。

40

化合物129の合成

【化 3 9 4】



10

【1 3 8 1】

化合物 127：エタン - 1, 2 - ジチオール (1.130 g、12 mmol) の TFA (10 mL) 溶液を、市販の化合物 126 (0.89 g、9.99 mmol) で全て一度に処理した。溶液は温かくなった。室温で 1 時間攪拌後、揮発性物質を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーに付して、純粋な化合物 127 を無色油状物質として得た (0.95 g、48%)。 $R_f = 0.6$ (5% MeOH / DCM)； ^1H NMR (500 MHz、 CDCl_3) δ 6.09 - 5.93 (br、1H)、4.41 (d、 $J = 6.4$ Hz、2H)、2.87 - 2.83 (m、2H)、2.79 (ddd、 $J = 9.7$ 、7.3、3.5 Hz、2H)、2.04 (s、3H)、1.71 (t、 $J = 8.0$ Hz、1H)； ^{13}C NMR (126 MHz、 CDCl_3) δ 170.25、40.89、35.22、24.91、23.44。

20

【1 3 8 2】

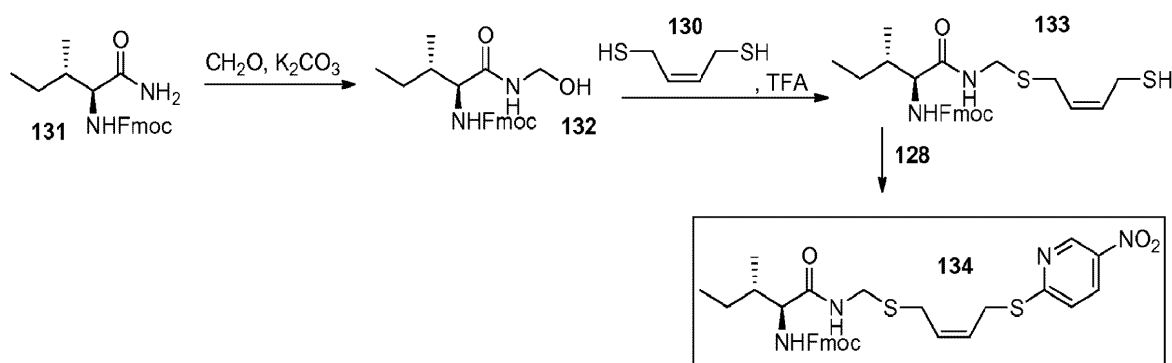
化合物 129：温かい (35 °C) 市販の化合物 128 (939 mg、3.0 mmol) の DMF (10 mL) 溶液を、化合物 127 (250 mg、1.513 mmol) の DCM (5 mL) 溶液で、5 分かけて滴下しながら処理した。TLC で確認後、高真空下でロータリーエバポレーションにより溶媒を除去し、次に残渣を DCM (50 mL) で破碎し、ろ過し、ろ液を 5 × 5% NaHCO_3 で洗浄し、その後乾燥し (MgSO_4)、ろ過し、濃縮して淡黄色固体を得た。カラムクロマトグラフィーにより、純粋な化合物 129 を淡黄色固体として得た。MS (ESI+)：計算値 ($M+H$)⁺：320.02、実測値：320.34； ^1H NMR (500 MHz、 CDCl_3) δ 9.28 (dd、 $J = 2.7$ 、0.7 Hz、1H)、8.43 (dd、 $J = 8.9$ 、2.6 Hz、1H)、7.93 (dd、 $J = 8.9$ 、0.7 Hz、1H)、6.10 - 5.90 (br、1H)、4.41 (d、 $J = 6.5$ Hz、2H)、3.13 (dd、 $J = 8.6$ 、6.3 Hz、2H)、2.93 (dd、 $J = 8.6$ 、6.4 Hz、2H)、2.00 (s、3H)； ^{13}C NMR (126 MHz、 CDCl_3) δ 170.18、168.57、145.22、142.22、131.81、119.59、40.65、38.59、30.07、23.39。

30

40

化合物 134 の合成

【化 3 9 5】



10

【1 3 8 3】

化合物 1 3 0：化合物 1 3 0 は、以前に記載された方法により調製する (Heterocycles、Vol 54、p 139、2001)。

【1 3 8 4】

化合物 1 3 2：化合物 1 2 6 の合成について以前に記載された手順 (Organic Syntheses、Coll. Vol. 6、p.5 (1988)) と類似の手順を使用して、 K_2CO_3 を含有するホルムアルデヒド水溶液の存在下で穏やかに加熱することにより、化合物 1 3 1 (Tetrahedron Letters、48(39)、7038-7041；2007) を化合物 1 3 2 に変換する。

20

【1 3 8 5】

化合物 1 3 3：化合物 1 2 7 の合成について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 1 2 6 の代わりに化合物 1 3 2 を使用して、かつエタン - 1, 2 - ジチオール の代わりに化合物 1 3 0 を使用して、このようにして純粋な化合物 1 3 3 を得る。

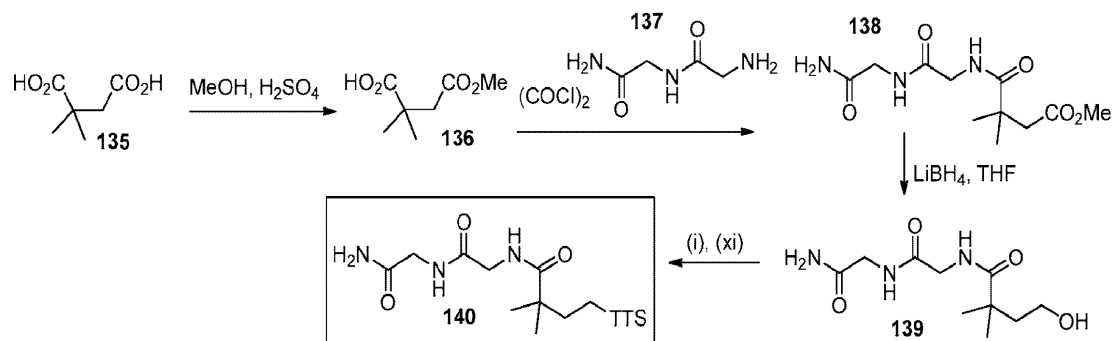
【1 3 8 6】

化合物 1 3 4：化合物 1 2 9 の合成について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 1 2 7 の代わりに化合物 1 3 3 を使用して、このようにして純粋な化合物 1 3 4 を得る。

30

化合物 1 4 0 の合成

【化 3 9 6】



40

【1 3 8 7】

化合物 1 3 6：市販の化合物 1 3 5 (50 g、342 mmol) の氷冷した溶液およびメタノール (277 mL) を、硫酸 (3.36 g、34.2 mmol) で 10 分かけて滴下しながら処理し、次に一晩かけてゆっくり室温に温めた。ロータリーエバポレーションにより大半の溶媒を除去し、次に飽和 NaHCO_3 水溶液を注意深く加えた。1 M の HCl を添加することにより溶液の pH を 1.9 に調整し、次に EtOAc (200 mL) で抽出し、希釈した飽和食塩水 (50 mL) で洗浄し、乾燥し (MgSO_4)、ろ過し、濃

50

縮して 29 g の無色油状物質を得た。カラムクロマトグラフィーにより、純粋な化合物 136 を無色固体として得た (12.5 g、23%)。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) δ 12.5 - 10.5 (vbr、1H)、3.69 (s、3H)、2.63 (s、2H)、1.32 (s、6H)；¹³C NMR (126 MHz、CDCl₃) δ 183.32、171.76、51.72、43.88、40.60、25.34。

【1388】

化合物 138：DCM (50 mL) 中の化合物 136 (10 mmol) を、二塩化オキサリル (10 mmol) で滴下しながら処理し、次に DMF (10 μL) で滴下しながら処理し、室温で攪拌する。反応中、均一な無色溶液が形成する。室温で 2 時間後、溶媒を減圧下で除去する。白色残渣を DCM (20 mL) に再溶解し、次に TLC によりモニターしながら、化合物 137 (10 mmol) のピリジン (10 mL) 溶液に攪拌しながら滴下する。18 時間後、溶媒を除去し、残渣を、DCM を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製し、純粋な化合物 137 を得る。

【1389】

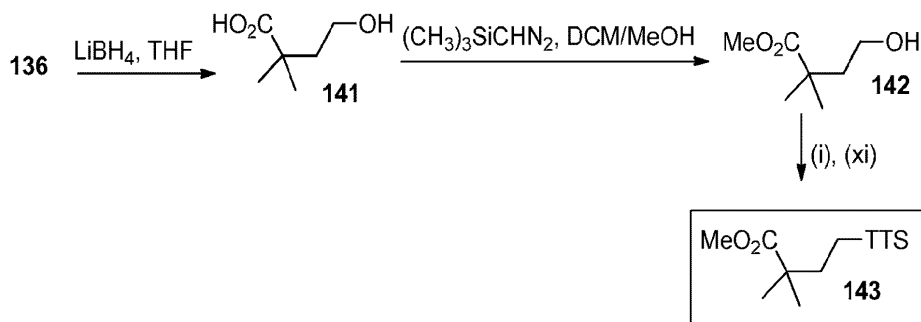
化合物 139：化合物 138 (5 mmol) の THF (20 mL) 溶液を、氷冷した LiBH₄ (5 mmol) の THF (20 mL) 溶液に加える。TLC により、室温における反応の進行を判断する。反応完了後 (出発物質が完全に消費された後)、氷冷した溶液に水 (100 mL) を注意深く加え、この溶液を続いて EtOAc (2 × 100 mL) で抽出する。ひとつにまとめた有機抽出物を乾燥し (MgSO₄)、ろ過し、溶媒をロータリーエバポレーションにより除去する。残渣をカラムクロマトグラフィーに付し、このようにして純粋な化合物 139 を得る。

【1390】

化合物 140：化合物 80 の合成について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 79 の代わりに化合物 139 を使用して、このようにして純粋な化合物 140 を得る。

化合物 143 の合成

【化 397】



【1391】

化合物 139：化合物 139 の合成について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 138 の代わりに化合物 136 を使用して、このようにして純粋な化合物 141 を得る。

【1392】

化合物 142：化合物 141 (8.39 mmol) の DCM/MeOH (12/3 mL) 溶液を、2 M の (ジアゾメチル) トリメチルシラン (1.05 g、9.23 mmol) のエーテル溶液で、0 °C で 30 分かけて滴下しながら処理する。AcOH で過剰の試薬を失活させた後、水 (2 × 5 mL) で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、ろ過し、ロータリーエバポレーションにより溶媒を除去し、次にカラムクロマトグラフィーにより純粋な化合物 142 を得る。

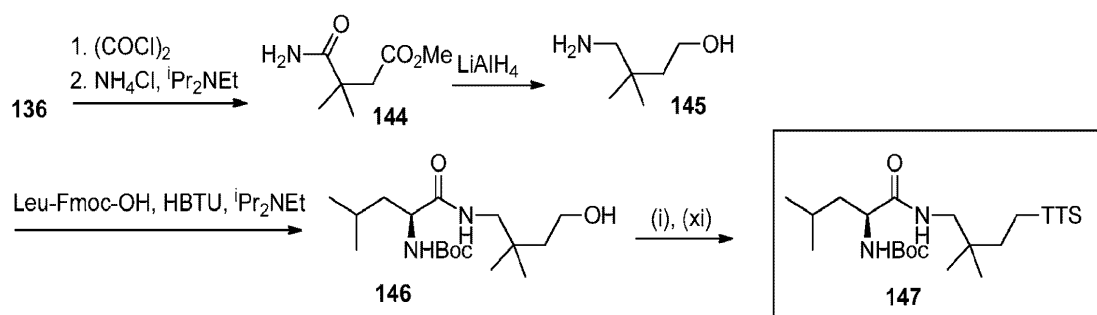
【1393】

化合物 143：化合物 80 の合成について記載した手順と類似の手順を使用して、化合

物 7 9 の代わりに化合物 1 4 2 を使用して、このようにして純粋な化合物 1 4 3 を得る。

化合物 1 4 7 の合成

【化 3 9 8】



10

【1 3 9 4】

化合物 1 4 4：化合物 6 9 a の合成について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 6 7 の代わりに化合物 1 3 6 を使用して、かつ NH₄Cl と *i*Pr₂NEt の代わりに化合物 5 4 を使用して、このようにして純粋な化合物 1 4 4 を得る。

【1 3 9 5】

20

化合物 1 4 5：LiAlH₄（2 M の THF 溶液の 100 mL）を氷冷した化合物 1 4 4（86 mmol）の THF（500 mL）溶液に滴下する。混合物を室温に温め、次に 0.5 時間還流する。氷冷した溶液へ、顆粒状沈殿が形成するまで飽和 Na₂SO₄ を注意深く添加することにより、残留の LiAlH₄ を壊す。混合物をろ過し、濃縮して、次に EtOAc に再溶解し、乾燥し（MgSO₄）、ろ過し、真空下で濃縮して、化合物 1 4 5 を得る。この化合物 1 4 5 は反応の次の段階において直接使用するのに十分高純度である。

【1 3 9 6】

化合物 1 4 6：化合物 1 2 4 の合成について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 1 2 3 の代わりに化合物 1 4 5 を使用して、かつ 2 - アミノ酢酸 *tert* - ブチルの代わりに Leu - Fmoc - OH を使用して、このようにして純粋な化合物 1 4 6 を得る。

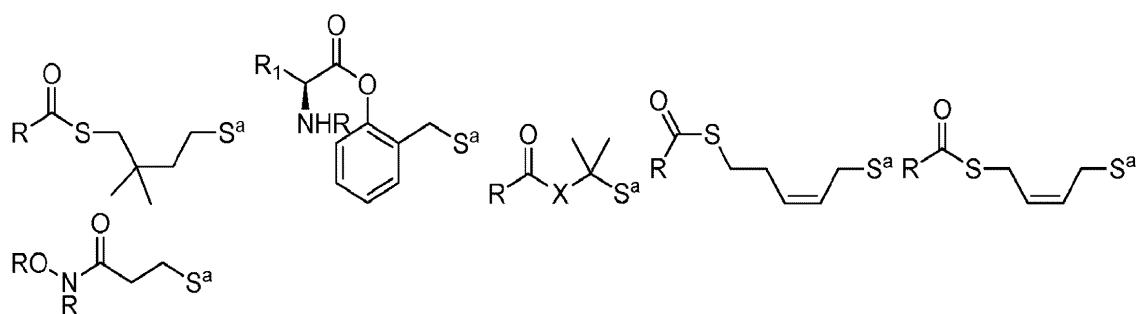
30

【1 3 9 7】

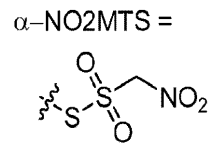
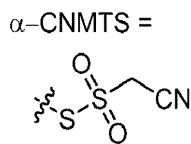
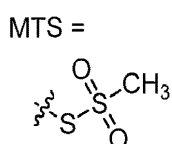
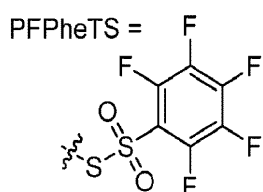
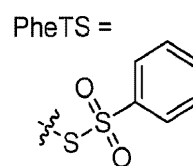
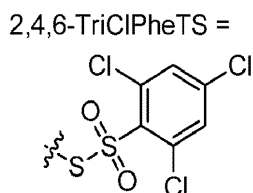
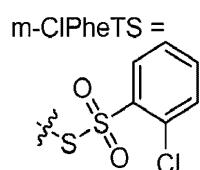
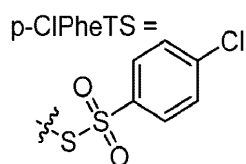
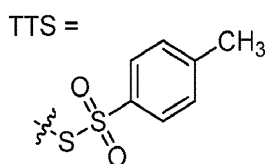
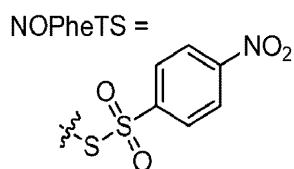
化合物 1 4 7：化合物 8 0 の合成について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 7 9 の代わりに化合物 1 4 6 を使用して、かつ 4 - メチルベンゼンスルホノチオ酸カリウムの代わりに化合物 1 1 4 を使用して、このようにして純粋な化合物 1 4 7 を得る。

化合物 1 5 0 の合成

【化 4 0 0】



40



10

20

【1402】

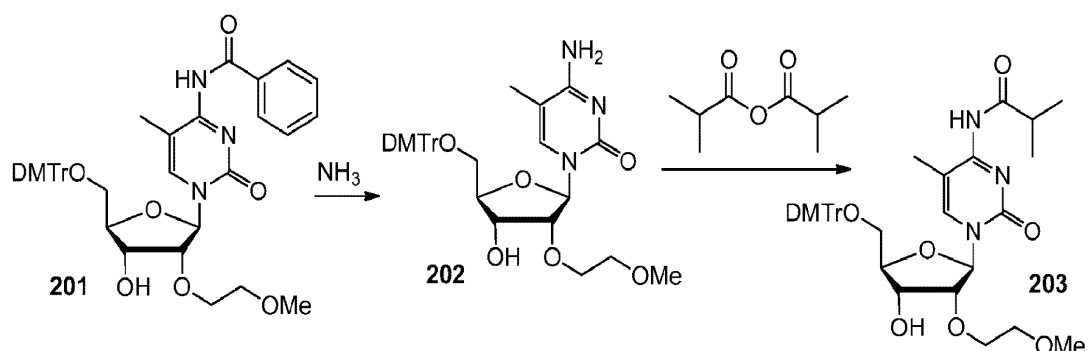
ホスホラミダイトの合成

いくつかの実施形態においては、本発明はホスホラミダイト、およびその作製方法を提供する。いくつかの実施形態においては、提供するホスホラミダイトは、本願において記載されるオリゴヌクレオチドの合成において使用した。例示的なホスホラミダイトおよびそれらの合成を以下に記載する。

化合物203の合成

【化401】

30



40

【1403】

化合物202：TLCおよびUPLC/MSでモニターしながら、 N^4 -Bz-5'-O-DMTr-2'-O-MOE-5-メチルシチジン（化合物201）（2.00g、2.77mmol）を、2-プロパノール（アルドリッチ（Aldrich）、無水、45mL）中の2Mのアンモニアおよびピリジン（22.5mL）と60℃で5時間処理し、次に室温で一晩処理した。溶媒を除去し（3×トルエンとの共沸混合物）、次にカラムクロマトグラフィー（0-10% MeOH/DCM）により純粋な化合物202を無色固体として得た（1.62g、95%）。TLCおよびHPLCより、この化合物202は均一であった。（ESI⁺）：計算値（M+H）⁺：618.28、実測値：618.5

50

3 ; ^1H NMR (399 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (d, $J=1.3$ Hz, 1H)、7.47 - 7.40 (m, 2H)、7.37 - 7.18 (m, 8H)、6.83 (dd, $J=8.9, 1.7$ Hz, 4H)、5.93 (d, $J=1.1$ Hz, 1H)、4.43 (td, $J=8.3, 4.9$ Hz, 1H)、4.24 (ddd, $J=11.7, 5.1, 3.0$ Hz, 1H)、4.07 (dt, $J=8.6, 2.4$ Hz, 1H)、4.03 - 3.98 (m, 1H)、3.90 (ddd, $J=11.7, 6.3, 3.3$ Hz, 1H)、3.79 (d, $J=1.0$ Hz, 6H)、3.63 - 3.52 (m, 3H)、3.44 (dd, $J=11.0, 3.0$ Hz, 1H)、3.37 (s, 3H)、3.32 (d, $J=9.4$ Hz, 1H)、1.80 - 1.64 (s, br, 1H)、1.13 (s, 3H)。

10

【1404】

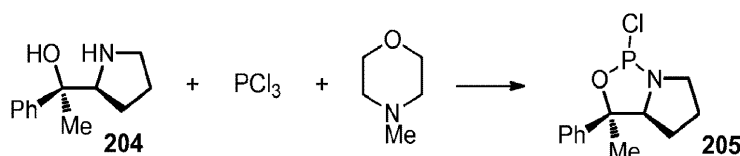
化合物203：イソ酪酸無水物(0.48 ml, 2.9 mmol)を、化合物202(1.61 g, 2.61 mmol)のDMF(13 ml)溶液に室温で滴下した。溶液を室温で24時間にわたり攪拌し、次に溶媒を真空下、35℃で除去した。エーテル/炭酸水素塩へ抽出し、次に乾燥し(MgSO_4)、ろ過し、溶媒を除去して、粗製生成物を無色固体泡状物質として得た。カラムクロマトグラフィー(0-4% MeOH/DCM)により、純粋な生成物を無色固体泡状物質として得た(1.75 g, 98%)。TLCおよびHPLCより、この生成物は均一であった。(ESI+)：計算値($\text{M}+\text{H}$) $^+$ ：688.32、実測値：688.56； ^1H NMR(399 MHz, CDCl_3) δ 8.00 - 7.75 (br, 1H)、7.45 - 7.39 (m, 2H)、7.34 - 7.20 (m, 8H)、6.84 (dd, $J=9.0, 1.2$ Hz, 4H)、5.97 (s, 1H)、4.43 (d, $J=6.1$ Hz, 1H)、4.20 - 4.04 (m, 3H)、3.79 (d, $J=0.9$ Hz, 6H)、3.64 - 3.58 (m, 1H)、3.64 - 3.52 (m, 2H)、3.47 - 3.40 (m, 2H)、3.38 (s, 3H)、1.70 - 1.55 (br, 1H)、1.39 (d, $J=1.0$ Hz, 3H)、1.18 (d, $J=6.9$ Hz, 6H)。

20

化合物205の合成

【化402】

30



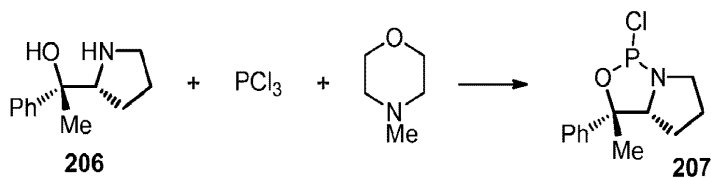
【1405】

化合物205：(R)-1-フェニル-1-((S)-ピロリジン-2-イル)エタノール(化合物4)をトルエン(3×3 mL)との共沸蒸留により乾燥した。乾燥した化合物4(0.725 g, 3.79 mmol)および4-メチルモルホリン(0.833 mL, 7.58 mmol)のトルエン(5 mL)溶液を、氷冷した三塩化リン(0.331 mL, 3.79 mmol)のトルエン(5 mL)溶液に加え、次にこれを1時間室温に温め、その後Ar下でろ過し、濃縮して油状物質を得た。この油状物質は、さらなる精製なしで反応の次の段階において使用した。

40

化合物207の合成

【化 4 0 3】



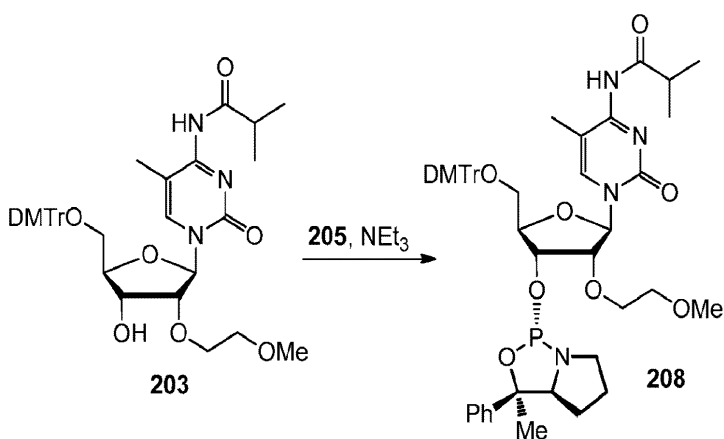
【1 4 0 6】

化合物 207：化合物 205 の合成について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 204 の代わりに化合物 206 を使用して、化合物 207 を粗製の茶色油状物質として得た。この油状物質は、さらなる精製なしで反応の次の段階において使用した。

10

化合物 208 の合成

【化 4 0 4】



20

【1 4 0 7】

化合物 208：化合物 203 (1.74 g、2.53 mmol) をピリジン (3 × 5 mL) と、次にトルエン (5 × 5 mL) との同時蒸発により脱水した。生成した、脱水した化合物 203 を THF (15 mL) に溶解し、次にトリエチルアミン (2.47 mL、17.7 mmol) を加え、 CO_2 / アセトン冷却浴法により溶液を -78°C に冷却した。粗製の化合物 205 (3.79 mmol) の THF 溶液 (15 mL) を 0.5 時間かけて滴下し、次にゆっくり室温まで温めた。室温で 1 時間後、TLC は化合物 203 が生成物に完全に変換したことを示した。混合物をクロロホルム (100 mL) で洗浄して分液漏斗に入れ、次に NaHCO_3 (飽和、水溶液、50 mL 次に 2 × 25 mL) で抽出した。各抽出で、水性抽出物をさらなる 1 × 10 mL のクロロホルムで洗浄した。ひとつに合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し (MgSO_4)、ろ過し、 32°C でロータリーエバポレーションにより濃縮した。このようにして粗製固体を得て、トリエチルアミンを数滴含有する DCM に再溶解し、次に 2% の定常濃度のトリエチルアミンを含有するヘキサン / EtOAc 勾配でのカラムクロマトグラフィーに付し、純粋な化合物 208 を白色固体泡状物質として得た。 ^1H NMR (399 MHz、 CD_3CN) δ 7.92 - 7.80 (s、1 H)、7.52 - 7.47 (m、2 H)、7.40 - 7.24 (m、12 H)、6.88 (dd、 $J = 9.0, 1.1$ Hz、4 H)、5.94 (d、 $J = 3.9$ Hz、1 H)、4.79 (dt、 $J = 9.6, 5.6$ Hz、1 H)、4.31 - 4.27 (m、1 H)、4.27 - 4.22 (m、1 H)、3.87 (t、 $J = 4.7$ Hz、2 H)、3.75 (d、 $J = 2.0$ Hz、6 H)、3.66 (td、 $J = 5.9, 5.5, 2.2$ Hz、1 H)、3.58 - 3.53 (m、2 H)、3.50 (dd、 $J = 11.1, 2.4$ Hz、

30

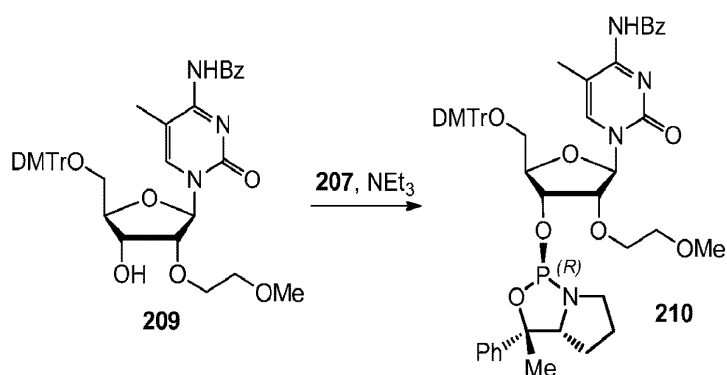
40

50

1 H)、3.38 (dd、 $J=11.0$ 、3.3 Hz、1 H)、3.31 (s、3 H)、2.85 (dq、 $J=10.5$ 、7.4、6.9 Hz、2 H)、1.73 (s、3 H)、1.52 (d、 $J=1.0$ Hz、3 H)、1.47 - 1.32 (m、2 H)、1.17 (dd、 $J=6.9$ 、0.7 Hz、6 H)、1.05 - 0.90 (m、2 H)； ^{31}P NMR (162 MHz、 CD_3CN) δ 155.35。

化合物 210 の合成

【化 405】



10

20

【1408】

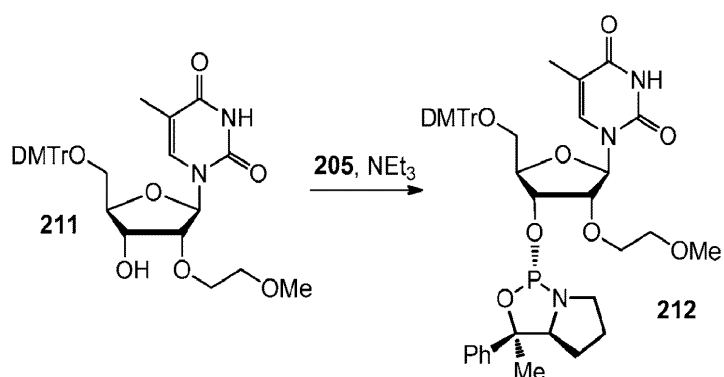
化合物 210：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 209 を使用して、かつ化合物 205 の代わりに化合物 207 を使用して、純粋な化合物 210 を無色固体泡状物質として得た。 ^1H NMR (399 MHz、 CD_3CN) δ 8.31 - 8.27 (m、2 H)、7.86 (d、 $J=1.2$ Hz、1 H)、7.62 - 7.55 (m、1 H)、7.55 - 7.45 (m、5 H)、7.44 - 7.24 (m、12 H)、6.94 - 6.90 (m、4 H)、5.96 (d、 $J=3.7$ Hz、1 H)、4.86 - 4.76 (m、1 H)、4.29 (dd、 $J=5.0$ 、3.8 Hz、1 H)、4.23 (dt、 $J=5.8$ 、2.8 Hz、1 H)、3.92 - 3.80 (m、2 H)、3.78 (s、6 H)、3.74 (ddd、 $J=7.1$ 、5.3、2.1 Hz、1 H)、3.55 (t、 $J=4.7$ Hz、2 H)、3.51 (d、 $J=2.3$ Hz、1 H)、3.41 (dd、 $J=11.1$ 、3.4 Hz、1 H)、3.30 (s、3 H)、3.26 (ddd、 $J=10.3$ 、6.1、2.2 Hz、1 H)、2.86 (ddt、 $J=10.1$ 、8.2、7.2 Hz、1 H)、1.72 (d、 $J=0.7$ Hz、3 H)、1.62 (d、 $J=1.1$ Hz、3 H)、1.56 - 1.41 (m、2 H)、1.09 - 0.87 (m、2 H)； ^{31}P NMR (162 MHz、 CD_3CN) δ 155.22。

30

化合物 212 の合成

40

【化 4 0 6】



10

【1 4 0 9】

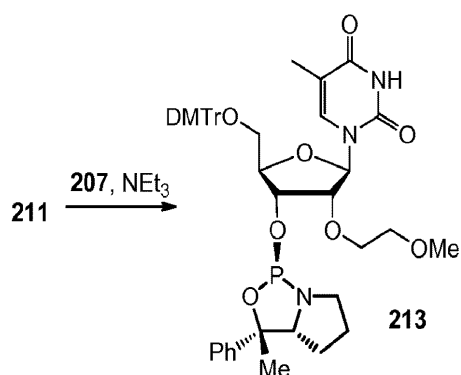
化合物 212：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 211 を使用して、純粋な化合物 212 を無色固体泡状物質として得た。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 9.25 - 8.70 (br、1 H)、7.69 (d、J = 1.3 Hz、1 H)、7.46 - 7.40 (m、2 H)、7.40 - 7.17 (m、12 H)、6.81 (dd、J = 9.0、2.5 Hz、4 H)、6.09 (d、J = 4.3 Hz、1 H)、4.78 (dt、J = 9.6、5.2 Hz、1 H)、4.36 - 4.26 (m、2 H)、3.94 - 3.88 (m、2 H)、3.74 (dd、J = 4.0、0.9 Hz、6 H)、3.69 (td、J = 6.4、2.9 Hz、1 H)、3.64 - 3.56 (m、3 H)、3.44 - 3.37 (m、2 H)、3.36 (d、J = 0.9 Hz、3 H)、3.00 (ddd、J = 10.3、7.9、6.4 Hz、1 H)、1.72 (s、3 H)、1.54 - 1.44 (m、1 H)、1.38 (dd、J = 6.8、5.4 Hz、1 H)、1.34 (d、J = 1.2 Hz、3 H)、1.23 - 1.13 (m、1 H)、0.97 - 0.87 (m、1 H)；³¹P NMR (162 MHz、CDCl₃) δ 158.18。

20

化合物 213 の合成

30

【化 4 0 7】



40

【1 4 1 0】

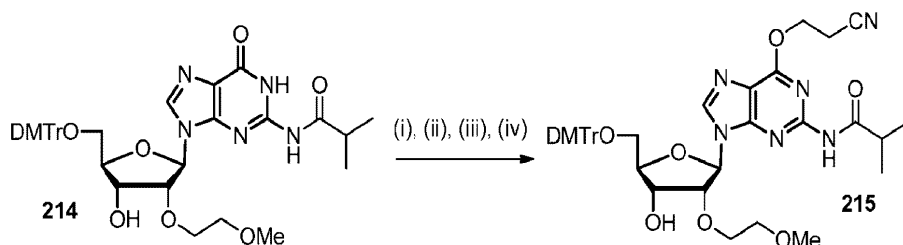
化合物 213：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 211 を使用して、純粋な化合物 213 を無色固体泡状物質として得た。¹H NMR (399 MHz、CDCl₃) δ 9.55 - 9.10 (br、1 H)、8.09 (d、J = 1.5 Hz、1 H)、7.80 - 7.71 (m、2 H)、7.69 - 7.47 (m、12 H)、7.20 - 7.08 (m、4 H)、6.32 (d、J = 2.9 Hz、1 H)、5.20 - 5.11 (m、1 H)、4.66 - 4.59 (m、1 H)、

50

4. 49 - 4. 39 (m, 1H)、4. 33 - 4. 24 (m, 1H)、4. 16 - 4. 02 (m, 8H)、4. 00 - 3. 93 (m, 1H)、3. 91 - 3. 84 (m, 2H)、3. 73 (dd, $J = 11.0, 2.5$ Hz, 1H)、3. 65 - 3. 52 (m, 4H)、3. 27 - 3. 16 (m, 1H)、2. 15 (s, 3H)、1. 88 - 1. 76 (m, 1H)、1. 76 - 1. 65 (m, 1H)、1. 63 - 1. 49 (m, 4H)、1. 29 - 1. 18 (m, 1H) ; ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 160. 08。

化合物 215 の合成

【化 408】



(i) TMSCl 、 NEt_3 、 0°C ; (ii) 2, 4, 6 - トリメチルベンゼン - 1 - スルホニルクロリド、 DMAP ; (iii) 1 - メチルピロリジン、3 - ヒドロキシプロパンニトリル、 DBU 、 0°C ; (iv) $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 、4 d、室温

【1411】

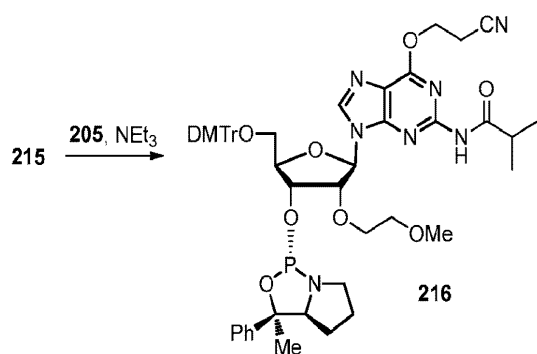
化合物 215 : (i) 一時的な TMS 保護 : N^2 - イソブチリル - 5' - O - DMTro - 2' - O - MOE - グアノシン (化合物 214) (15. 04 g, 21. 1 mmol) およびトリエチルアミン (11. 8 ml, 85 mmol) の溶液を ACN (200 mL) に入れ、次にクロロトリメチルシラン (10. 4 ml, 82 mmol) を氷冷したこの溶液に滴下し、この溶液を TLC でモニターしながら室温で 1 時間攪拌した。ろ過し、溶媒を除去し、次に抽出 ($\text{DCM}/\text{NaHCO}_3$ 500 mL / 200 mL) し、乾燥 (MgSO_4)、ろ過し、そして溶媒を除去して、粗製化合物を得た。この化合物はさらなる精製なしで、反応の次の段階において使用した。TLC ($R_f = 0. 6$ 、(5% MeOH/DCM)) より、化合物は均一であった。(ii) シアノエチル保護に向けた O^6 部位の活性化 : 残渣を DCM (500 mL) に再溶解し、次にトリエチルアミン (13. 1 ml, 94 mmol) を加え、その後 2, 4, 6 - トリメチルベンゼン - 1 - スルホニルクロリド (6. 15 g, 28. 1 mmol) および DMAP (0. 14 g, 1. 146 mmol) を加えた。出発物質が完全に消失するまで、かつ TLC ($R_f = 0. 9$ 、(5% MeOH/DCM)) で新たなスポットが出現するまで、TLC によりモニターしながら混合物を室温で 3 時間攪拌した。(iii) シアノエチル保護 : 1 - メチルピロリジン (22. 43 ml, 211 mmol) を氷冷した溶液にゆっくり滴下し、TLC (新たなスポット、 $R_f = 0. 2$ 、ストリーク、(5% MeOH/DCM)) によりモニターしながら、 0°C で 1 時間にわたりさらに反応させた。まだ氷冷した溶液に、3 - ヒドロキシプロパンニトリル (14. 40 ml, 211. 0 mmol) を滴下し、その後続いて DBU (6. 32 mL, 42. 1 mmol) を滴下し、TLC (新たなスポット、 $R_f = 0. 6$ 、(5% MeOH/DCM)) によりモニターしながら、さらに 90 分間攪拌を続けた。強制して反応をほぼ完了させるため、TLC により注意深くモニターしながら、さらに 1. 6 mL の DBU を滴下した。混合物を NaH_2PO_4 (400 mL の水中に 50 g) に注ぎ、有機物を分離し、希釈した NaH_2PO_4 (200 mL の水中に 10 g) で洗浄し、乾燥 (MgSO_4)、ろ過し、ロータリーエバポレーションにより濃縮した。(iv) TMS 脱保護 : 前ステップにおいてこのようにして得た残渣を MeOH (250 mL) に再

溶解し、次に沈殿が生じないように注意しながら水を滴下した。TLCによりモニターしながら、4日にわたり滴下を続けた。大半の溶媒を除去し、残渣を抽出し(DCM/NaHCO₃(500/200mL))、ろ過して濃縮した。残渣をカラム精製(0-5%MeOH/DCM)に付し、純粋な化合物215を白色泡状物質として得た。TLCおよびHPLCより、この泡状物質は均一であった。(ESI⁺):計算値(M+H)⁺:767.34、実測値:767.03; ¹H NMR(300MHz、CD₃CN) δ 8.63(s、1H)、8.07(s、1H)、7.44-7.36(m、2H)、7.33-7.18(m、7H)、6.84-6.72(m、4H)、6.02(d、J=3.2Hz、1H)、4.74(td、J=6.2、0.9Hz、2H)、4.71-4.64(m、2H)、4.14-4.06(m、1H)、3.88-3.73(m、8H)、3.57-3.41(m、4H)、3.32-3.23(m、3H)、3.08(t、J=6.2Hz、2H)、2.77(dt、J=13.7、6.9Hz、1H)、1.14(dd、J=6.9、1.2Hz、6H)。

10

化合物216の合成

【化409】



20

【1412】

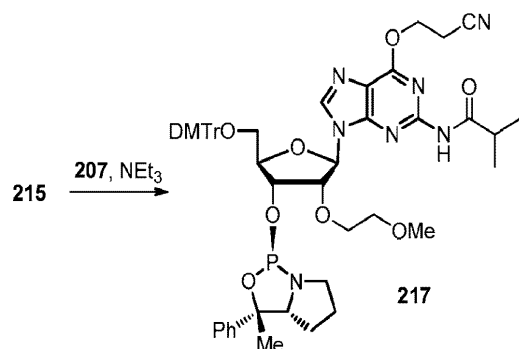
化合物216:化合物208について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物203の代わりに化合物215を使用して、純粋な化合物216を無色固体泡状物質として得た。¹H NMR(399MHz、CD₃CN) δ 8.41(s、1H)、8.12(s、1H)、7.50-7.44(m、2H)、7.40-7.19(m、12H)、6.80(dd、J=8.9、5.2Hz、4H)、6.04(d、J=5.7Hz、1H)、4.99(t、J=5.5Hz、1H)、4.94(dd、J=9.9、5.2、3.7Hz、1H)、4.75(t、J=6.2Hz、2H)、4.29(q、J=3.8Hz、1H)、3.89-3.82(m、1H)、3.76-3.68(m、7H)、3.64(dd、J=6.8、5.5、2.3Hz、1H)、3.50-3.46(m、2H)、3.42(s、2H)、3.38-3.28(m、1H)、3.21(s、3H)、3.09(t、J=6.2Hz、2H)、2.84(dq、J=10.2、7.3Hz、1H)、2.70-2.58(m、1H)、1.76(s、3H)、1.46-1.27(m、2H)、1.12(d、J=6.8Hz、3H)、1.07(d、J=6.8Hz、3H)、1.04-0.89(m、2H); ³¹P NMR(162MHz、CD₃CN) δ 154.40。

30

40

化合物217の合成

【化 4 1 0】



10

【1 4 1 3】

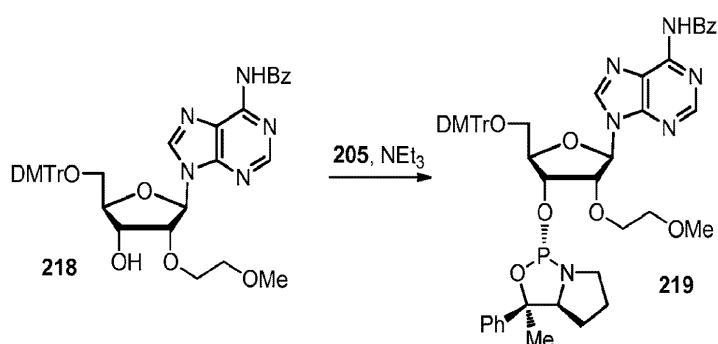
化合物 217：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 215 を使用して、純粋な化合物 217 を無色固体泡状物質として得た。 ^1H NMR (399 MHz、 CD_3CN) δ 8.56 (s、1H)、8.13 (s、1H)、7.44 (dd、 $J=8.2$ 、 1.5 Hz、2H)、7.39 - 7.19 (m、12H)、6.81 (dd、 $J=10.4$ 、 8.9 Hz、4H)、6.06 (d、 $J=4.5$ Hz、1H)、4.96 - 4.86 (m、2H)、4.75 (t、 $J=6.2$ Hz、2H)、4.30 (td、 $J=5.1$ 、 4.7 、 2.4 Hz、1H)、3.83 (dt、 $J=11.2$ 、 4.3 Hz、1H)、3.79 - 3.70 (m、7H)、3.67 (ddd、 $J=7.1$ 、 5.2 、 2.0 Hz、1H)、3.52 - 3.45 (m、3H)、3.41 (dd、 $J=10.8$ 、 2.7 Hz、1H)、3.34 - 3.24 (m、1H)、3.21 (s、3H)、3.08 (t、 $J=6.1$ Hz、2H)、2.89 - 2.72 (m、2H)、1.68 (s、3H)、1.54 - 1.38 (m、2H)、1.14 (dd、 $J=6.8$ 、 5.4 Hz、6H)、1.09 - 1.00 (m、1H)、0.95 - 0.83 (m、1H)； ^3P NMR (162 MHz、 CD_3CN) δ 154.93。

20

化合物 219 の合成

30

【化 4 1 1】



40

【1 4 1 4】

化合物 219：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 218 を使用して、純粋な化合物 219 を無色固体泡状物質として得た。 ^1H NMR (399 MHz、 CDCl_3) δ 9.31 (s、1H)、8.72 (s、1H)、8.26 (s、1H)、8.07 - 7.98 (m、2H)、7.60 - 7.53 (m、1H)、7.52 - 7.43 (m、4H)、7.38 - 7.15 (m、12H)、6.83 - 6.74 (m、4H)、6.24 (d、 $J=5.2$ Hz、1H)、5.03 - 4.92 (m、2H)、4.45 (q、 $J=3.8$ Hz、1H)、3.93 (dt、

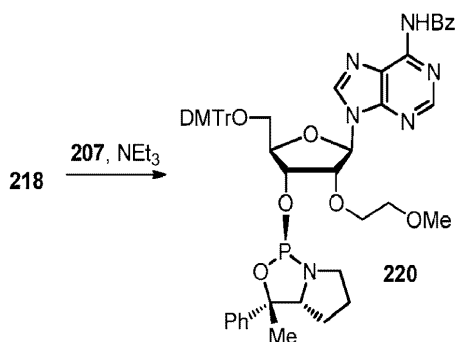
50

$J = 11.4, 4.2 \text{ Hz}$ 、 1 H ）、 3.77 (ddd、 $J = 7.5, 5.8, 3.2 \text{ Hz}$ 、 2 H)、 3.73 (s、 6 H)、 $3.60 - 3.49$ (m、 3 H)、 $3.47 - 3.37$ (m、 2 H)、 3.26 (s、 3 H)、 $3.02 - 2.92$ (m、 1 H)、 1.81 (s、 3 H)、 $1.56 - 1.43$ (m、 1 H)、 1.37 (dq、 $J = 13.2, 6.5 \text{ Hz}$ 、 1 H)、 $1.22 - 1.09$ (m、 1 H)、 0.96 (ddt、 $J = 13.1, 7.9, 6.8 \text{ Hz}$ 、 1 H)； ^{31}P NMR (162 MHz 、 CDCl_3) $\delta 157.73$ 。

化合物 220 の合成

【化 412】

10



20

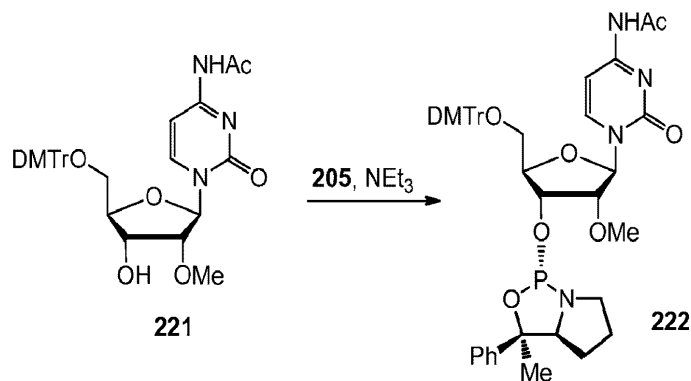
【1415】

化合物 220：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 218 を使用して、純粋な化合物 220 を無色固体泡状物質として得た。 ^1H NMR (399 MHz 、 CDCl_3) $\delta 9.26$ (s、 1 H)、 8.73 (s、 1 H)、 8.31 (s、 1 H)、 8.02 (d、 $J = 7.6 \text{ Hz}$ 、 2 H)、 $7.60 - 7.53$ (m、 1 H)、 $7.52 - 7.40$ (m、 4 H)、 $7.39 - 7.13$ (m、 12 H)、 $6.84 - 6.76$ (m、 4 H)、 6.24 (d、 $J = 4.5 \text{ Hz}$ 、 1 H)、 4.99 (dt、 $J = 10.0, 5.0 \text{ Hz}$ 、 1 H)、 4.84 (t、 $J = 4.7 \text{ Hz}$ 、 1 H)、 4.46 (q、 $J = 4.0 \text{ Hz}$ 、 1 H)、 3.91 (dt、 $J = 11.1, 4.2 \text{ Hz}$ 、 1 H)、 $3.85 - 3.69$ (m、 8 H)、 $3.63 - 3.50$ (m、 3 H)、 3.42 (dd、 $J = 10.7, 4.0 \text{ Hz}$ 、 1 H)、 $3.40 - 3.31$ (m、 1 H)、 3.27 (s、 3 H)、 $3.00 - 2.89$ (m、 1 H)、 1.82 (s、 3 H)、 $1.58 - 1.38$ (m、 2 H)、 $1.20 - 1.09$ (m、 1 H)、 1.00 (ddt、 $J = 12.3, 8.8, 5.9 \text{ Hz}$ 、 1 H)； ^{31}P NMR (162 MHz 、 CDCl_3) $\delta 158.98$ 。

30

化合物 222 の合成

【化 4 1 3】



10

【1 4 1 6】

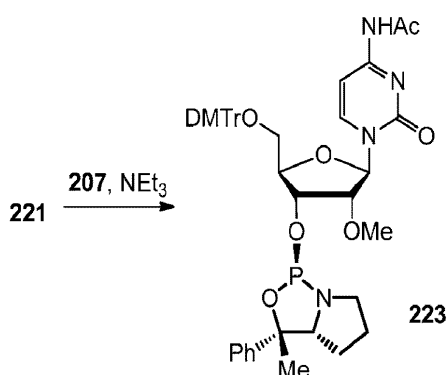
化合物 222：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 221 を使用して、純粋な化合物 222 を無色固体泡状物質として得た。¹H NMR (499 MHz、CDCl₃) δ 10.46 (s、br、1H)、8.62 (d、J = 7.5 Hz、1H)、7.42 (d、J = 7.1 Hz、2H)、7.36 - 7.21 (m、12H)、7.00 (d、J = 7.5 Hz、1H)、6.82 (dd、J = 9.0、7.1 Hz、4H)、6.03 (s、1H)、4.77 (td、J = 8.7、4.8 Hz、1H)、4.34 (dt、J = 9.4、2.3 Hz、1H)、3.97 (d、J = 4.8 Hz、1H)、3.78 (dd、J = 6.7、3.4 Hz、1H)、3.74 (s、3H)、3.71 (s、6H)、3.68 - 3.58 (m、2H)、3.48 - 3.38 (m、1H)、3.01 (p、J = 7.8 Hz、1H)、2.27 (s、3H)、1.72 (s、3H)、1.49 (tt、J = 12.3、7.0 Hz、1H)、1.40 (dq、J = 13.2、6.6 Hz、1H)、1.18 (dq、J = 13.9、7.0 Hz、1H)、1.02 - 0.90 (m、1H)；³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 158.71。

20

化合物 223 の合成

30

【化 4 1 4】



40

【1 4 1 7】

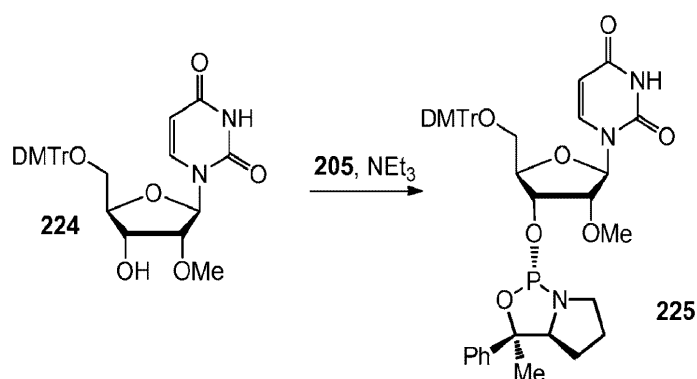
化合物 223：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 221 を使用して、純粋な化合物 223 を無色固体泡状物質として得た。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) δ 9.76 (s、1H)、8.70 (d、J = 7.4 Hz、1H)、7.48 - 7.41 (m、2H)、7.41 - 7.18 (m、12H)、7.06 (d、J = 7.4 Hz、1H)、6.87 (dd、J = 8.9、1.9 Hz、4H)、6.00 (s、1H)、4.80 (td、J = 9.2、4.7 Hz

50

、1 H)、4.33 (d、J=9.5 Hz、1 H)、3.84 (d、J=4.7 Hz、1 H)、3.81 (s、3 H)、3.80 (s、3 H)、3.72 (td、J=6.6、3.4 Hz、1 H)、3.70-3.62 (m、4 H)、3.53 (dd、J=11.3、2.2 Hz、1 H)、3.34 (tdd、J=10.7、7.8、4.9 Hz、1 H)、2.96 (dq、J=10.3、7.6 Hz、1 H)、2.25 (s、3 H)、1.83 (s、3 H)、1.56-1.48 (m、1 H)、1.43 (dq、J=13.1、6.4 Hz、1 H)、1.24-1.16 (m、1 H)、1.00-0.91 (m、1 H)；³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 157.17。

化合物 225 の合成
【化 415】

10



20

【1418】

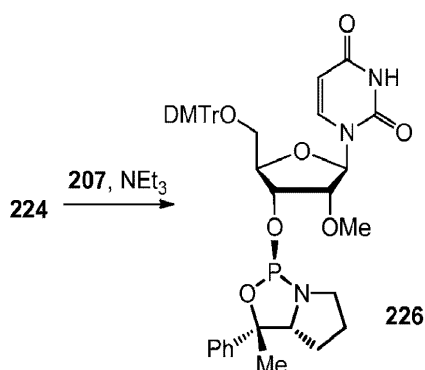
化合物 225：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 224 を使用して、純粋な化合物 225 を無色固体泡状物質として得た。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) δ 9.76 (s、br、1 H)、8.70 (d、J=7.4 Hz、1 H)、7.48-7.41 (m、2 H)、7.41-7.18 (m、12 H)、7.06 (d、J=7.4 Hz、1 H)、6.87 (dd、J=8.9、1.9 Hz、4 H)、6.00 (s、1 H)、4.80 (td、J=9.2、4.7 Hz、1 H)、4.33 (d、J=9.5 Hz、1 H)、3.84 (d、J=4.7 Hz、1 H)、3.81 (s、3 H)、3.80 (s、3 H)、3.72 (td、J=6.6、3.4 Hz、1 H)、3.69-3.62 (m、4 H)、3.53 (dd、J=11.3、2.2 Hz、1 H)、3.34 (tdd、J=10.7、7.8、4.9 Hz、1 H)、2.96 (dq、J=10.3、7.6 Hz、1 H)、2.25 (s、3 H)、1.83 (s、3 H)、1.56-1.48 (m、1 H)、1.43 (dq、J=13.1、6.4 Hz、1 H)、1.24-1.16 (m、1 H)、1.00-0.91 (m、1 H)；³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 158.97。

30

40

化合物 226 の合成

【化 4 1 6】



10

【1 4 1 9】

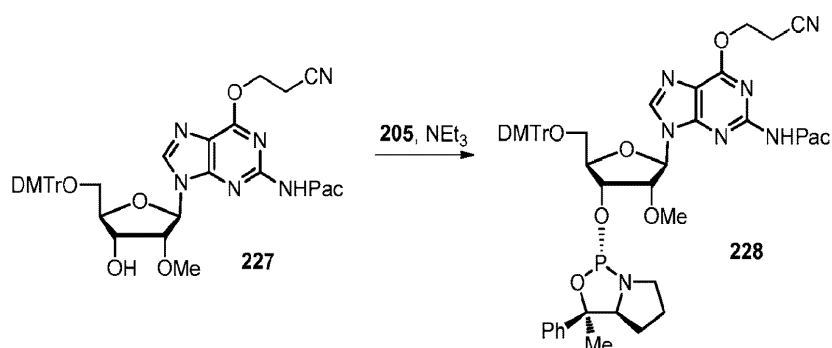
化合物 226：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 224 を使用して、純粋な化合物 226 を無色固体泡状物質として得た。¹H NMR (499 MHz、CDCl₃) δ 9.8 - 9.0 (br、1 H)、8.09 (d、J = 8.2 Hz、1 H)、7.40 (d、J = 7.4 Hz、2 H)、7.36 - 7.19 (m、12 H)、6.80 (dd、J = 11.4、8.8 Hz、4 H)、6.02 (d、J = 2.2 Hz、1 H)、5.22 (d、J = 8.1 Hz、1 H)、4.82 (td、J = 8.1、4.9 Hz、1 H)、4.27 (d、J = 7.4 Hz、1 H)、3.96 (dd、J = 5.0、2.2 Hz、1 H)、3.81 - 3.76 (m、1 H)、3.74 (s、3 H)、3.70 (s、3 H)、3.62 (s、3 H)、3.61 - 3.54 (m、2 H)、3.50 - 3.41 (m、1 H)、3.04 (dtd、J = 10.2、8.0、6.3 Hz、1 H)、1.75 (s、3 H)、1.56 - 1.47 (m、1 H)、1.44 - 1.35 (m、1 H)、1.26 - 1.18 (m、1 H)、0.95 (dq、J = 12.3、7.5 Hz、1 H)；³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 158.96。

20

化合物 228 の合成

30

【化 4 1 7】



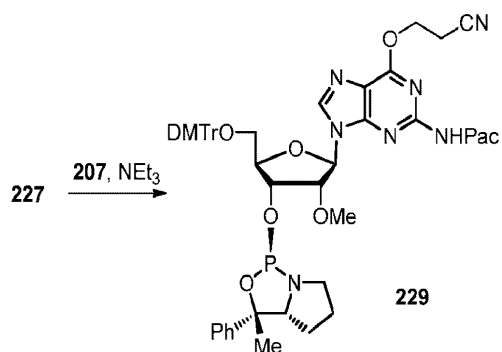
40

【1 4 2 0】

化合物 228：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 227 を使用して、純粋な化合物 228 を無色固体泡状物質として得た。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 158.16。

化合物 229 の合成

【化 4 1 8】



10

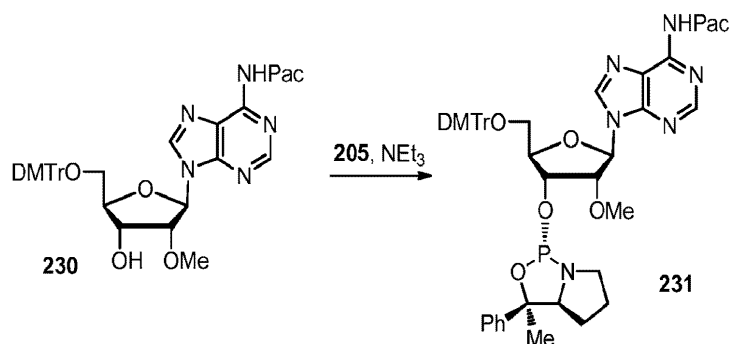
【1 4 2 1】

化合物 229：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 227 を使用して、純粋な化合物 229 を無色固体泡状物質として得た。 ^3P NMR (202 MHz、 CDCl_3) δ 158.84。

化合物 231 の合成

【化 4 1 9】

20



30

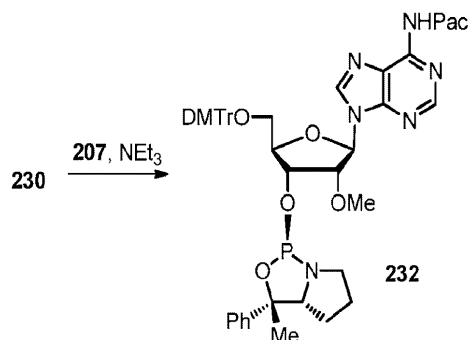
【1 4 2 2】

化合物 231：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 230 を使用して、純粋な化合物 231 を無色固体泡状物質として得た。 ^1H NMR (499 MHz、 CDCl_3) δ 9.6 - 9.3 (s、1H)、8.73 (s、1H)、8.32 (s、1H)、7.50 - 7.41 (m、2H)、7.39 - 7.16 (m、14H)、7.10 - 7.01 (m、3H)、6.82 (d、 J = 8.8 Hz、4H)、6.21 (d、 J = 4.1 Hz、1H)、4.96 (dt、 J = 10.1、5.1 Hz、1H)、4.86 (s、2H)、4.54 (t、 J = 4.5 Hz、1H)、4.43 (q、 J = 3.9 Hz、1H)、3.81 - 3.75 (m、7H)、3.62 (dd、 J = 10.8、3.3 Hz、1H)、3.54 (s、3H)、3.46 - 3.42 (m、1H)、3.41 - 3.33 (m、1H)、3.01 - 2.93 (m、1H)、1.82 (s、3H)、1.56 - 1.47 (m、1H)、1.44 (dq、 J = 13.2、6.5 Hz、1H)、1.22 - 1.11 (m、1H)、1.03 - 0.94 (m、1H)； ^3P NMR (202 MHz、 CDCl_3) δ 158.11。

40

化合物 232 の合成

【化 4 2 0】



10

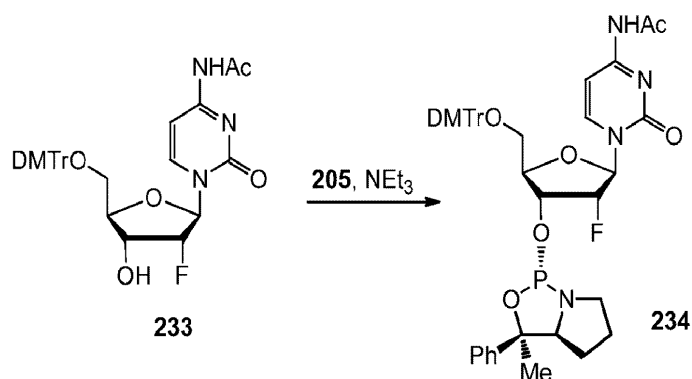
【1 4 2 3】

化合物 232：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 230 を使用して、純粋な化合物 232 を無色固体泡状物質として得た。 ^1H NMR (499 MHz, CDCl_3) δ 9.8 - 9.2 (br, 1H)、8.71 (s, 1H)、8.23 (s, 1H)、7.49 - 7.43 (m, 2H)、7.40 - 7.15 (m, 14H)、7.09 - 7.02 (m, 3H)、6.79 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H)、6.20 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H)、4.93 (dddd, $J = 9.3, 5.0, 3.8$ Hz, 1H)、4.86 (s, 2H)、4.73 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H)、4.43 (q, $J = 3.9$ Hz, 1H)、3.79 - 3.75 (m, 1H)、3.74 (s, 3H)、3.74 (s, 3H)、3.57 (dt, $J = 6.8, 3.8$ Hz, 1H)、3.52 (s, 3H)、3.46 - 3.36 (m, 2H)、2.99 (ddd, $J = 10.1, 7.9, 6.5$ Hz, 1H)、1.80 (s, 3H)、1.54 - 1.45 (m, 1H)、1.39 - 1.31 (m, 1H)、1.23 - 1.13 (m, 1H)、0.99 - 0.90 (m, 1H)； ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 158.13。

20

化合物 234 の合成

【化 4 2 1】



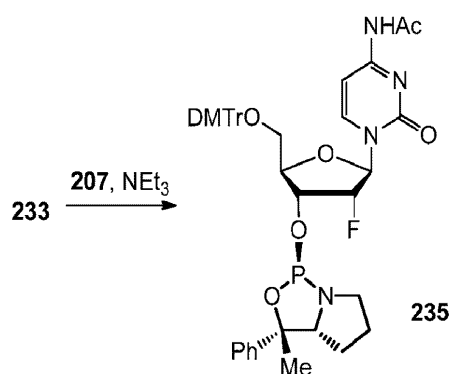
40

【1 4 2 4】

化合物 234：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 233 を使用して、純粋な化合物 234 を無色固体泡状物質として得た。

化合物 235 の合成

【化 4 2 2】



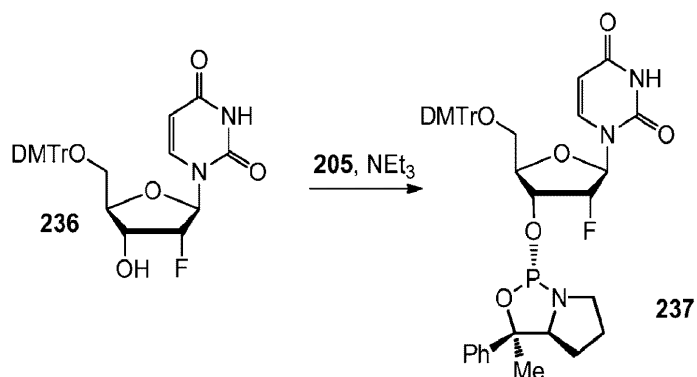
10

【1 4 2 5】

化合物 235：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 233 を使用して、純粋な化合物 235 を無色固体泡状物質として得た。 ^3P NMR (202 MHz、 CDCl_3) δ 158.75。

化合物 237 の合成

【化 4 2 3】



20

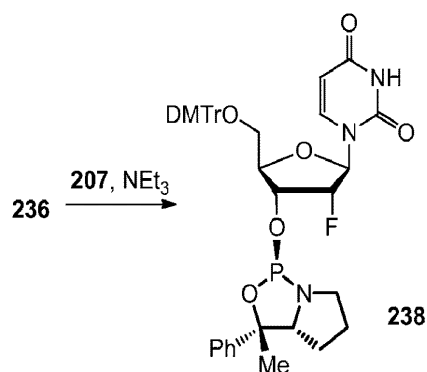
30

【1 4 2 6】

化合物 237：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 236 を使用して、純粋な化合物 237 を無色固体泡状物質として得た。 ^3P NMR (202 MHz、クロロホルム-d) δ 159.51 (d、 $J_{\text{P-F}} = 9.5 \text{ Hz}$)。

化合物 238 の合成

【化 4 2 4】



10

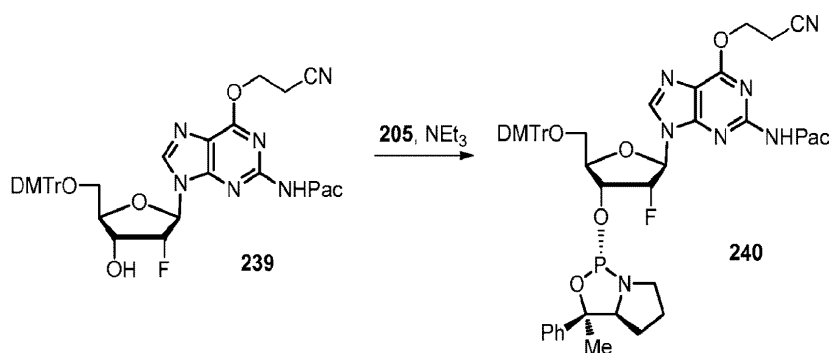
【1 4 2 7】

化合物 238：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 236 を使用して、純粋な化合物 238 を無色固体泡状物質として得た。 ^{31}P NMR (202 MHz、クロロホルム - d) δ 159.48。

化合物 240 の合成

【化 4 2 5】

20



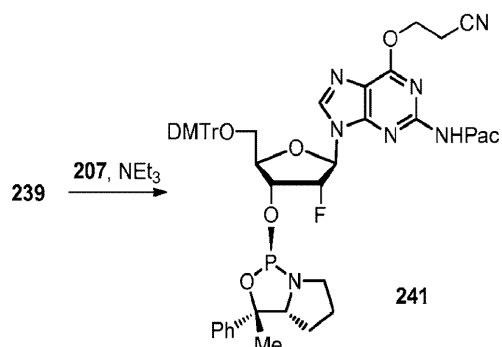
30

【1 4 2 8】

化合物 240：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 239 を使用して、純粋な化合物 240 を無色固体泡状物質として得た。 ^{31}P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 160.20 (d、 $J_{\text{P}-\text{F}} = 11.0$ Hz)。

化合物 241 の合成

【化 4 2 6】



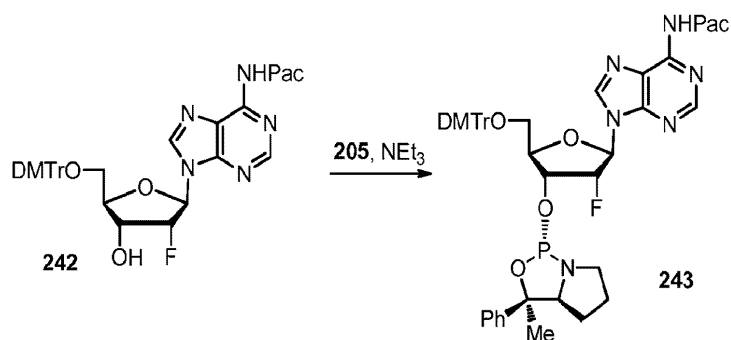
10

【1 4 2 9】

化合物 2 4 1：化合物 2 1 0 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 2 0 9 の代わりに化合物 2 3 9 を使用して、純粋な化合物 2 4 1 を無色固体泡状物質として得た。 $^3\text{ }^1\text{P}$ NMR (202 MHz、 CDCl_3) δ 159.66 (d、 $J_{\text{P}-\text{F}} = 8.4$ Hz)。

化合物 2 4 3 の合成

【化 4 2 7】



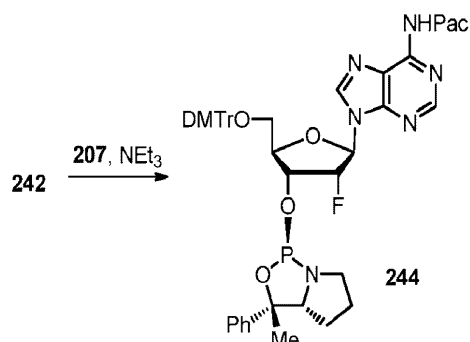
30

【1 4 3 0】

化合物 2 4 3：化合物 2 0 8 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 2 0 3 の代わりに化合物 2 4 2 を使用して、純粋な化合物 2 4 3 を無色固体泡状物質として得た。 $^3\text{ }^1\text{P}$ NMR (202 MHz、 CDCl_3) δ 160.20 (d、 $J = 11.0$ Hz)。

化合物 2 4 4 の合成

【化 4 2 8】



40

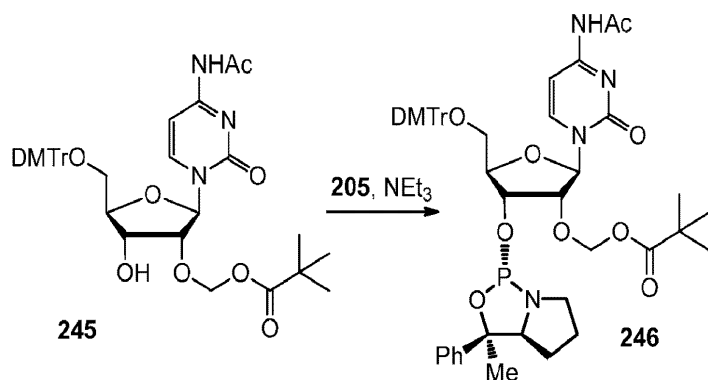
50

【1431】

化合物244：化合物210について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物209の代わりに化合物242を使用して、純粋な化合物244を無色固体泡状物質として得た。 $^3\text{1P}$ NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 156.52 (d, $J_{\text{P}-\text{F}} = 8.5\text{ Hz}$)。

化合物246の合成

【化429】



10

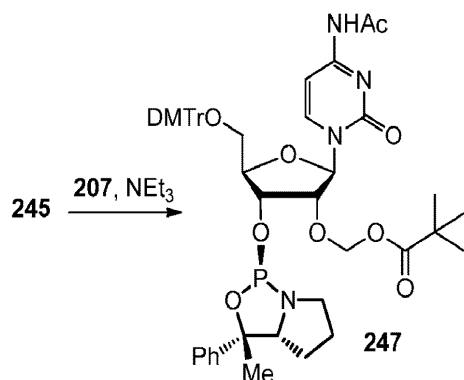
20

【1432】

化合物246：化合物208について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物203の代わりに化合物245を使用して、純粋な化合物246を無色固体泡状物質として得る。

化合物247の合成

【化430】



30

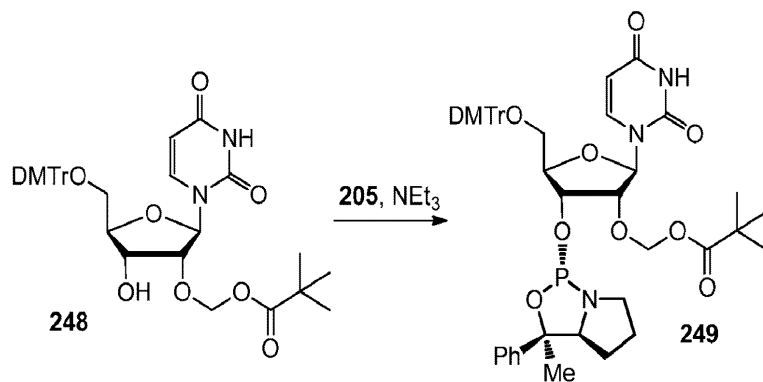
40

【1433】

化合物247：化合物210について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物209の代わりに化合物245を使用して、純粋な化合物247を無色固体泡状物質として得る。

化合物249の合成

【化 4 3 1】



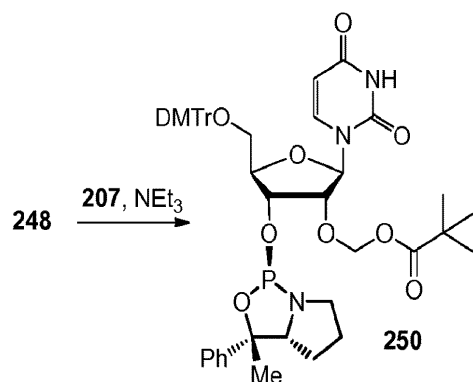
10

【1 4 3 4】

化合物 249：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 248 を使用して、純粋な化合物 249 を無色固体泡状物質として得る。

化合物 250 の合成

【化 4 3 2】



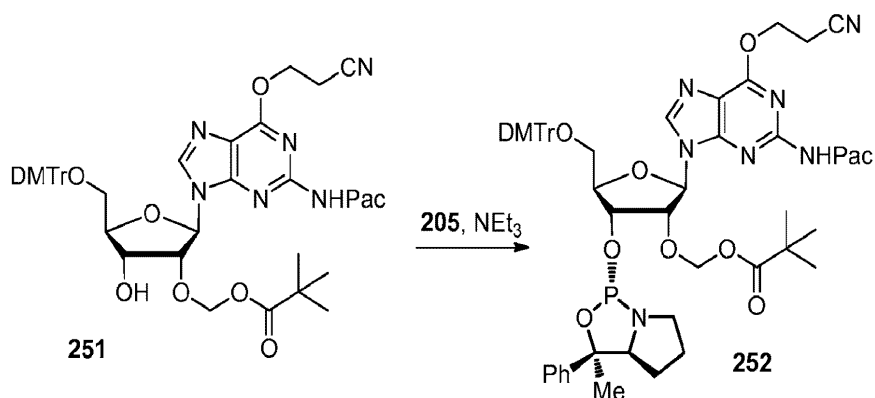
30

【1 4 3 5】

化合物 250：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 248 を使用して、純粋な化合物 250 を無色固体泡状物質として得る。

化合物 252 の合成

【化 4 3 3】



10

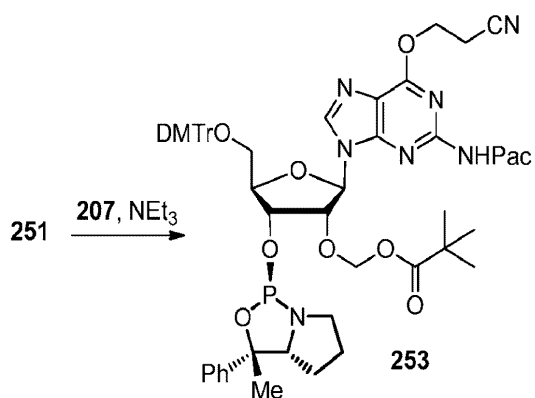
【 1 4 3 6】

化合物 2 5 2：化合物 2 0 8 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 2 0 3 の代わりに化合物 2 5 1 を使用して、純粋な化合物 2 5 2 を無色固体泡状物質として得る。

化合物 2 5 3 の合成

20

【化 4 3 4】



30

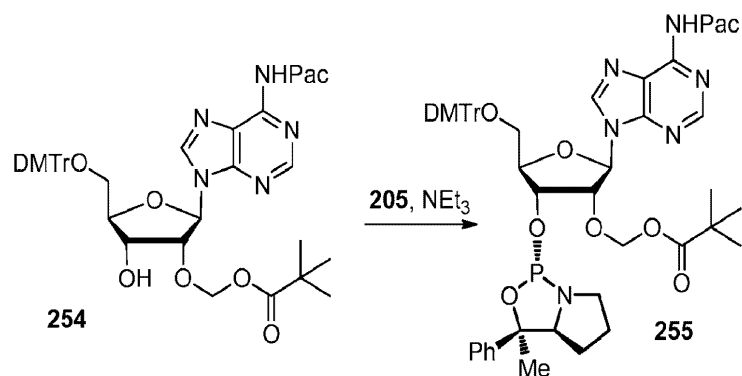
【 1 4 3 7】

化合物 2 5 3：化合物 2 1 0 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 2 0 9 の代わりに化合物 2 5 1 を使用して、純粋な化合物 2 5 3 を無色固体泡状物質として得る。

化合物 2 5 5 の合成

40

【化 4 3 5】



10

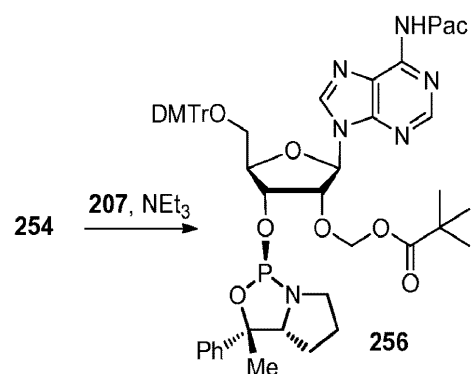
【1 4 3 8】

化合物 255：化合物 208 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 203 の代わりに化合物 254 を使用して、純粋な化合物 255 を無色固体泡状物質として得る。

化合物 256 の合成

【化 4 3 6】

20



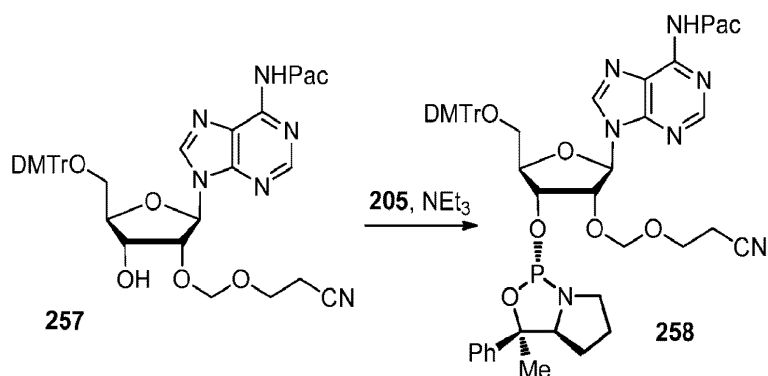
30

【1 4 3 9】

化合物 256：化合物 210 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 209 の代わりに化合物 254 を使用して、純粋な化合物 256 を無色固体泡状物質として得る。

化合物 258 の合成

【化 4 3 7】



10

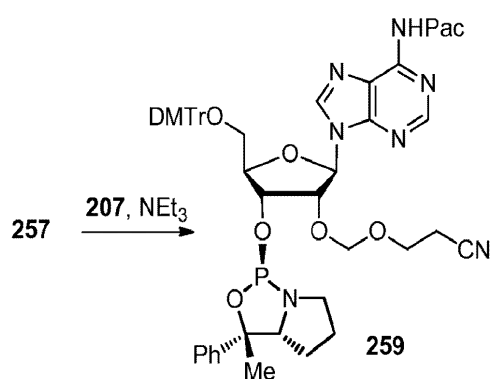
【1 4 4 0】

化合物 2 5 8：化合物 2 0 8 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 2 0 3 の代わりに化合物 2 5 7 を使用して、純粋な化合物 2 5 8 を無色固体泡状物質として得る。

化合物 2 5 9 の合成

【化 4 3 8】

20



30

【1 4 4 1】

化合物 2 5 9：化合物 2 1 0 について記載した手順と類似の手順を使用して、化合物 2 0 9 の代わりに化合物 2 5 7 を使用して、純粋な化合物 2 5 9 を無色固体泡状物質として得る。

【1 4 4 2】

実施例 2 - 1 6

DNA/RNA 合成装置 ABI - 3 9 4 における実施例 2 - 1 6 の合成手順を、以下の表 E - 1 においてまとめる。

40

表 E - 1 実施例 2 - 1 6 の合成に使用される DNA/RNA 合成装置 ABI - 3 9 4 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 8】

ステップ	反応	処理	処理時間(秒)		待ち時間(秒)	
			1 μmol	10 μmol	1 μmol	10 μmol
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	3 + 90 + 10	N.A.	N.A.
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	10 + 6	30 + 600	30 + 600
3	キャッピング1	5% Pac_2O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	30	60	60
4	キャッピング2	5% Pac_2O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	30	60	60
5	硫化	0.3 M S-シアノエチル メチルチオスルホネート $\text{NC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{Me}$ -ACN/BSTFA溶液	10 + 4 $\times$ 2	15 + 4 $\times$ 4	300 + 3 $\times$ 150 + 600	300 + 3 $\times$ 150 + 600

【1443】

実施例 2 - 9 : 表 E - 1 にまとめたサイクルに従って、立体的に規定されたホスホロチオエートジエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、10 μmol 合成カラムと、CPGにサクシニルで結合した 6.5 μmol の dC を使用して、ABI - 394 DNA/RNA 合成装置で合成した。合成サイクルは、末端 5' - O - DMT r 基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水 ACN で洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。次に乾燥した固体担体を、脱水 ACN - 塩化トリメチルシリル - 16 : 1 (v/v) 中の 1, 8 - ジアザビシクロウンデカ - 7 - エン (DBU) の無水 1 M 溶液 5 mL で、室温で 10 分間処理した。その間、カラム出口に固定したプラスチックルアーシリンジにより、カラムを通して、溶液をゆっくり押し出した。次に担体を脱水 ACN で洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥した CPG をプラスチックバイアルに入れ、次に 3 mL の 28% アンモニア水と室温で 18 時間処理した。溶媒を蒸発させて乾燥し、残渣を 10% DMSO 水溶液に再懸濁させ、そして固体担体をろ過して除去した。粗製生成物を陰イオン交換分取 HPLC (20 mM NaOH 中の NaCl の 0.25 ~ 1.75 M 勾配) により精製した。95% より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 HPLC (ACN の 0 ~ 80% 勾配) により脱塩した。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥した。

【1444】

実施例 10 - 16 : 表 E - 1 にまとめたサイクルに従って、立体的に規定されたホスホロチオエートジエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、1 μmol 合成カラムと、CPGにサクシニルで結合した 3 μmol の dC を使用して、ABI - 394 DNA/RNA 合成装置で合成した。合成サイクルは、末端 5' - O - DMT r

基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水ACNで洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。次に乾燥した固体担体を、脱水ACN - 塩化トリメチルシリル - 16 : 1 (v/v) 中の1, 5 - ジアザビシクロ (4, 3, 0) ノナ - 5 - エン (DBN) の無水1 M溶液5 mLで、室温で10分間処理した。DBN溶液を、カラム出口に固定したプラスチックルアーシリンジにより、カラムを通して、溶液をゆっくり押し出した。次に担体を脱水ACNで洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥したCPGをプラスチックバイアルに入れ、次に2 mLの28%アンモニア水と室温で18時間処理した。溶媒を蒸発させて乾燥し、残渣を10% DMSO水溶液に再懸濁させ、そして固体担体をろ過して除去した。

【1445】

実施例2 - 16の精製および脱塩

2487 2波長検出器ならびにFCOおよびFlexインジェクトを備えたWaters 2525 BGM HPLCシステムにより、粗製生成物を精製した。ウォーターズ (Waters) 製AP - 1ガラスカラム (10×200 mm) に、Source 15Q Support (GEヘルスケア (GE Healthcare)、品番17-0947-01) を充填し、流速4 mL/分で使用した。精製中は全て、75℃に設定したTL600移動相ヒーターおよびTL150温度コントローラ (Timberline Instruments) を使用してカラムを加熱した。緩衝液A : 20 mM NaOHおよび緩衝液B : 20 mM NaOH、2.5 M NaClを、30%Bから始まり70%Bまでの段階勾配で使用した。95%より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、水から80% ACNの勾配、および4 mL/分の流速を用いた逆相カラム (XBridge Semi Prep、250×10 mm、C₁₈、5 μm) により、同じHPLCシステムで脱塩した。最終脱塩生成物をSpeecvacで濃縮し、その後水から凍結乾燥した。

【1446】

精製したオリゴヌクレオチドのHPLC分析：オリゴヌクレオチドの性質を、DNA Pac 100 (10×250 mm) を使用して、以下の条件を使用して決定した：

緩衝液A : 10 mM トリスHCl、50% HCl、pH = 8.0

緩衝液B : A + 0.8 M NaClO₄、pH = 8.0

カラム温度 : 60℃

勾配法：

【表9】

	時間	流量	%A	%B	カーブ
1	0.01	1.00	85.0	15.0	
2	3.00	1.00	85.0	15.0	1
3	23.00	1.00	40.0	60.0	6
4	25.00	1.00	5.0	95.0	6
5	25.50	1.00	85.0	15.0	6
6	30.00	1.00	85.0	15.0	1

LCMS分析法：

溶出剤A : 15 mM TEA、400 mM HFIP、水

溶出剤B : 50 : 50 緩衝液A / メタノール

カラム : UPLC@OST C₁₈ 1.7 μm、2.1×500 mm

カラム温度 = 50℃

勾配法：

【表 10】

時間	流量	%A	%B	カーブ
0	0.2	95	5	
10	0.2	35	65	6
12	0.2	5	95	6
12.5	0.2	95	5	6
15	0.2	95	5	1

10

【1447】

実施例 2 オリゴヌクレオチド 101 (All - (Rp) - d [GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]) の合成

【1448】

オリゴヌクレオチド 101 を上記のとおり合成した。IEX-HPLC における RT : 14.70 分。UPLC/ESI-MS : C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉ に対する計算値 : 6310.2 ; 実測値 : 6310.4。

【1449】

実施例 3 オリゴヌクレオチド 102 (All - (Sp) - d [GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]) の合成

20

【1450】

オリゴヌクレオチド 102 を上記のとおり合成した。IEX-HPLC における RT : 15.49 分。UPLC/ESI-MS : C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉ に対する計算値 : 6310.2 ; 実測値 : 6310.2。

【1451】

実施例 4 オリゴヌクレオチド 103 ((Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp) - d [GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC] (5R-9S-5R)) の合成

30

オリゴヌクレオチド 103 を上記のとおり合成した。IEX-HPLC における RT : 15.10 分。UPLC/ESI-MS : C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉ に対する計算値 : 6310.2 ; 実測値 : 6310.3。

【1452】

実施例 5 オリゴヌクレオチド 104 ((Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp) - d [GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC] (5S-9R-5S)) の合成

【1453】

オリゴヌクレオチド 104 を上記のとおり合成した。IEX-HPLC における RT : 15.04 分。UPLC/ESI-MS : C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉ に対する計算値 : 6310.2 ; 実測値 : 6307.2。

40

【1454】

実施例 6 オリゴヌクレオチド 105 ((Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp) - d [GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC] (1S-17R-1S)) の合成

【1455】

オリゴヌクレオチド 105 を上記のとおり合成した。IEX-HPLC における RT : 14.75 分。UPLC/ESI-MS : C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉

50

に対する計算値：6310.2；実測値：6310.2。

【1456】

実施例7 オリゴヌクレオチド106（（Rp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Rp）-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（1R-17S-1R））の合成

【1457】

オリゴヌクレオチド106を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：15.43分。UPLC/ESI-MS：C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉に対する計算値：6310.2；実測値：6309.6。

10

【1458】

実施例8 オリゴヌクレオチド107（（Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp）-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（（R/S）₉R））の合成

【1459】

オリゴヌクレオチド107を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：15.02分。UPLC/ESI-MS：C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉に対する計算値：6310.2；実測値：6310.7。

20

【1460】

実施例9 オリゴヌクレオチド108（（Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp）-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（（S/R）₉S））の合成

【1461】

オリゴヌクレオチド108を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：15.10分。UPLC/ESI-MS：C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉に対する計算値：6310.2；実測値：6307.9。

【1462】

実施例10 オリゴヌクレオチド109（（Sp、Sp、Sp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Sp、Sp、Sp）-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（3S-13R-3S））の合成

30

【1463】

オリゴヌクレオチド109を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：14.91分。UPLC/ESI-MS：C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉に対する計算値：6310.2；実測値：6309.5。

【1464】

実施例11 オリゴヌクレオチド110（（Rp、Rp、Rp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Rp、Rp、Rp）-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（3R-13S-3R））の合成

40

【1465】

オリゴヌクレオチド110を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：15.24分。UPLC/ESI-MS：C₁₉H₂₄N₆O₁₀P₁₉S₁₉に対する計算値：6310.2；実測値：6309.3。

【1466】

実施例12 オリゴヌクレオチド111（（Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Rp）-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（3R-13S-3R））の合成

50

】（（ $18S/R^{19}$ ））の合成

【1467】

オリゴヌクレオチド111を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：15.69分。UPLC/ESI-MS： $C_{19}H_{24}N_6O_{10}P_1S_1$ に対する計算値：6310.2；実測値：6309.4。

【1468】

実施例13 オリゴヌクレオチド113（（Sp、Rp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp）-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（ $18S/R^2$ ））の合成

【1469】

オリゴヌクレオチド113を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：15.72分。UPLC/ESI-MS： $C_{19}H_{24}N_6O_{10}P_1S_1$ に対する計算値：6310.2；実測値：6311.0。

【1470】

実施例14 オリゴヌクレオチド114（（Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp）-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（（RRS）₆-R））の合成

【1471】

オリゴヌクレオチド114を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：14.14分。UPLC/ESI-MS： $C_{19}H_{24}N_6O_{10}P_1S_1$ に対する計算値：6310.2；実測値：6313.7。

【1472】

実施例15 オリゴヌクレオチド115（（Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp）-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（S-（RRS）₆））の合成

【1473】

オリゴヌクレオチド115を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：14.30分。UPLC/ESI-MS： $C_{19}H_{24}N_6O_{10}P_1S_1$ に対する計算値：6310.2；実測値：6313.7。

【1474】

実施例16 オリゴヌクレオチド116（（Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp）d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC]（RS-（RRS）₅-RR））の合成

【1475】

オリゴヌクレオチド116を上記のとおり合成した。IEX-HPLCにおけるRT：14.17分。UPLC/ESI-MS： $C_{19}H_{24}N_6O_{10}P_1S_1$ に対する計算値：6310.2；実測値：6312.4。

【1476】

実施例2-16の結果を、以下の表E-2にまとめる：

表E-2 実施例2-16の概要

10

20

30

40

【表 1 1】

オリゴ ヌクレオチド	5'- 配列 -3'	立体化学の 詳細	RT - IEX (分)
101	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	All-(Rp)	14.70
102	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	All-(Sp)	15.49
103	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	5R-9S-5R	15.10
104	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	5S-9R-5S	15.04
105	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	1S-17R- 1S	14.75
106	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	1R-17S- 1R	15.43
107	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	(R/S) ₉ R	15.02
108	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	(S/R) ₉ S	15.10
109	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	3S-13R- 3S	14.91
110	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	3R-13S- 3R	15.24
111	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	18S/R ¹⁹	15.69
113	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	18S/R ²	15.72
114	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	(RRS) ₆ -R	14.14
115	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	S-(RRS) ₆	14.30
116	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAs CsC]	RS- (RRS) ₅ - RR	14.17

【1 4 7 7】

実施例 1 7 対照オリゴヌクレオチドの合成

【1 4 7 8】

対照オリゴヌクレオチド（表 E - 3 参照）を、自動化固相オリゴヌクレオチド合成の標準的な化学的方法を使用して合成した（Beaucage, S.L. および Iyer, R.P., Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311）。より詳細には、標準的な DNA ホスホラミダイト（Chem Genes Co.）、活性化剤としてエチルチオテトラゾール（ETT、Muangら、Tetra

10

20

30

40

50

hedron Lett., 2004, 45, 6497-6499) (Glen Research)、および硫化剤としてN, N - ジメチル - N' - (3 - チオキソ - 3H - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 5 - イル) メタンイミドアミド (DDTT, AM Chemicals) を使用して、立体的にランダムなDNAを合成した (Guzaev, A.; Tetrahedron Lett., 2011, 52, 434-437)。ホスホラミダイトカップリング時間は2分であり、硫化時間は10分であった。標準方法を使用して、オリゴヌクレオチドを脱保護し、精製した。標準的なDNAホスホラミダイト、活性剤としてETT、および酸化剤としてのヨウ素／ピリジン／水を使用して、DNAリン酸ジエステルを合成した。社内で調製した2' - O - メトキシエチル (MOE) ホスホラミダイト (Martin, P.; Helv. Chim. Acta. 1995, 78, 486-504; Ross, B.; Song, Q.; 2004年米国特許公報第20040082775号)、活性剤としてETT、および硫化剤としてDDTTを使用して、2' - O - メトキシエチル (MOE) DNAを合成した。カップリング時間は10分であり、硫化時間は10分であった。標準的なRNAホスホラミダイト (ChemGenes Co.)、活性剤としてETT、酸化剤としてヨウ素／ピリジン／水を使用して、RNAを合成した。カップリング時間は10分であった。

10

【1479】

全てのオリゴヌクレオチドは、標準方法を使用して脱保護し、精製した。

【1480】

RNA (オリゴヌクレオチド117) の精製：

Waters 2525 BGM、FCOおよびFlex注入器を備えた2487 2波長検出器

20

緩衝液A：20mM リン酸ナトリウム pH=8.5

緩衝液B：20mM リン酸ナトリウム、1M NaBr pH=8.5

カラム：東ソー (TOSOH) 製Super Q-5PW (20)、TSK Gel (陰イオン交換) を充填した、ウォーターズ (Waters) 製AP-1ガラスカラム、10×200mm

カラム温度：70℃ (Timberline Instruments、TL600移動相ヒーターおよびTL150温度コントローラ)

使用した勾配：

【表12】

30

時間	流量(mL/分)	% A	% B	カーブ
初期		100	0	
10	4	100	0	1
25	4	80	20	6
115	4	55	45	6
125	4	0	100	6
130	4	100	0	6
140	4	100	0	1

40

【1481】

図1に示すように、キラル制御したホスホロチオエートジエステル20量体オリゴヌクレオチド (A11-(Rp)、オリゴヌクレオチド101、図1、A) は、ホスホロチオエートジエステル20量体の立体的にランダムな標準的オリゴヌクレオチド (オリゴヌクレオチド118、図1、C) と異なる保持時間を有し、より鋭いピークを有する。立体的にランダムなオリゴヌクレオチド108を精製する間、A11-(Rp) オリゴヌクレオチド (101、立体的にランダムなオリゴヌクレオチド108混合物の約1/2¹⁹分画で存在) のほとんどがおそらく失われるであろうことは、当業者が理解する。

50

【 1 4 8 2 】

実施例 1 7 の結果を、以下の表 E - 3 にまとめる。

表 E - 3 実施例 1 7 の概要

【表 1 3】

オリゴ ヌクレオチド	5'- 配列 -3'	詳細	RT (分)
117	GGUGCGAAGCAGACUGAGGC	RNA	5.10
118	d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCs AsCsC]	任意の立体化学	15.04
119	d[GCCTCAGTC TGC TTC GCACC]	DNA	6.90
120	<u>(Gs5mCs5mCsTs5mCs)</u> _{MOE} d[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs](<u>Gs5mCs</u> <u>As 5mCs5mC</u>) _{MOE}	任意の立体化学	15.49
121	d[GsAsTsGsCsCsTsCsTsCsCsTsAsCsGsCsGs CsCsT]	組み換え	15.09

10

20

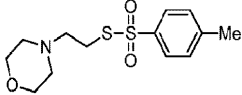
【 1 4 8 3 】

実施例 1 8 - 2 1 の手順：表 E - 4 にまとめたサイクルに従って、立体的に規定された
 モルホリノエチルホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴ
 ヌクレオチドを、1 μmol 合成カラムと、HCP にオキサリルで結合した 0.8 μmol
 の dC を使用して、ABI - 394 DNA/RNA 合成装置で合成した。合成サイク
 ルは、末端 5' - O - DMT r 基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水
 ACN で洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。乾燥した HCP をプラスチックバイアルに入れ、
 脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率 1 : 4) 1 mL と、室温で 18 時間処理
 した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を pH 約 1.5 の 10% DMSO 含有水溶液で再懸濁さ
 せ、HCP 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 HPLC により精製した。9
 5% より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 HPLC (ACN の 0 ~ 80% 勾配
) により脱塩した。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥した。

30

表 E - 4 実施例 1 8 - 2 1 の合成に使用される DNA/RNA 合成装置 ABI - 394
 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 1 4】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60
5	硫化	0.3 M S-シアノエチル メチルチオスルホネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600

【1 4 8 4】

実施例 1 8 - 2 1 の一般的な精製方法：

緩衝液 A：2 0 m M ホスファート p H = 6 . 0 (リン酸で調節した)

緩衝液 B：A C N

カラム：X B r i d g e P r e p C _{1 8}、5 μ m、C _{1 8}、2 5 0 × 1 0 m m、品
番 # 1 8 6 0 0 3 2 5 6

緩衝液ヒーター設定温度 = 5 0 °C

2 5 4 および 2 8 0 n m で信号をモニター

使用した勾配：

30

【表 1 5】

時間 初期	流量(mL/分)	% A 99	% B 1	カーブ
5	4	99	1	1
10	4	77	23	6
60	4	70	30	6
65	4	20	80	6
70	4	20	80	6
71	4	99	1	6
80	4	99	1	1

10

【1 4 8 5】

オリゴヌクレオチドの分析HPLC方法

HPLC方法1:

緩衝液A: 20 mM ホスファート pH = 6.0 (リン酸で調節した)

緩衝液B: ACN

カラム: XBridge C₁₈、3.5 μm、C₁₈、4.6 × 50 mm、品番 # 1 20
86003034

緩衝液ヒーター設定温度 = 35 °C

254および280 nmで信号をモニター

使用した勾配:

【表 1 6】

時間 初期	流量(mL/分)	% A 95	% B 5	カーブ
3	1	95	5	1
23	1	60	40	6
25	1	40	60	6
25.5	1	95	5	6
30	1	95	5	1

30

【1 4 8 6】

HPLC方法2:

緩衝液A: 50 mM TEAA、pH = 7.8

緩衝液B: ACN

カラム: XBridge C₁₈、3.5 μm、C₁₈、4.6 × 50 mm、品番 # 1 40
86003034

緩衝液ヒーター設定温度 = 60 °C

254および280 nmで信号をモニター

使用した勾配:

【表 17】

時間 初期	流量(mL/分)	% A 99	% B 1	カーブ
2	1	99	1	1
22	1	65	35	6
25	1	5	95	6
25.5	1	5	95	6
30	1	99	1	1

10

HPLC 方法 3 :

【表 18】

時間 初期	流量(mL/分)	% A 85	% B 15	カーブ
2	1	85	15	1
20	1	60	40	6
22	1	5	95	6
25	1	5	95	6
25.5	1	85	15	6
30	1	85	15	1

20

HPLC 方法 4 :

【表 19】

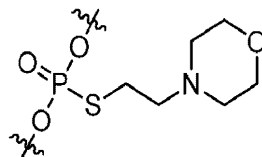
時間 初期	流量(mL/分)	% A 85	% B 15	カーブ
2	1	85	15	1
20	1	40	60	6
22	1	5	95	6
25	1	5	95	6
25.5	1	85	15	6
30	1	85	15	1

30

【1487】

実施例 18 オリゴヌクレオチド 122 (A11 - (Rp) - d [Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C] (s1 は以下に示すとおり) の合成

【化 439】



【1488】

オリゴヌクレオチド 122 を上記のとおり合成した。RP-HPLC における RT (HPLC 方法 1) : 15.2 分。UPLC/ESI-MS : C₃₀H₄₅N₈O₁₂

50

$1P_{19}S_{19}$ に対する計算値：8460.25；実測値：8462.0。

【1489】

実施例19 オリゴヌクレオチド123 ((Sp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Sp) - d [Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]) ((1S - 17R - 1S) の合成

【1490】

オリゴヌクレオチド123を上記のとおり合成した。RP - HPLCにおけるRT (HPLC方法1)：16.2分。UPLC/ESI-MS： $C_{305}H_{455}N_{86}O_{12}$
 $1P_{19}S_{19}$ に対する計算値：8460.3；実測値：8461.5。

【1491】

実施例20 オリゴヌクレオチド124 (All - (Sp) - d [Gs1Cs1Cs1Ts1Cs1As1Gs1Ts1Cs1Ts1Gs1Cs1Ts1Ts1Cs1Gs1Cs1As1Cs1C]) の合成

【1492】

オリゴヌクレオチド124を上記のとおり合成した。RP - HPLCにおけるRT (HPLC方法1)：18.3分。UPLC/ESI-MS： $C_{305}H_{455}N_{86}O_{12}$
 $1P_{19}S_{19}$ に対する計算値：8460.3；実測値：8461.8。

【1493】

実施例21 オリゴヌクレオチド125 (All - (Rp) - d [5mCs1As1Ts1G]) の合成

【1494】

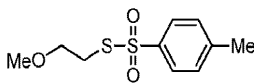
オリゴヌクレオチド125を上記のとおり合成した。RP - HPLCにおけるRT (HPLC方法2)：16.32分。UPLC/ESI-MS： $C_{58}H_{85}N_{18}O_{22}P_3S_3$ に対する計算値：1575.5；実測値：1575.2。

【1495】

実施例22および42においては、表E-5にまとめたサイクルに従って、立体的に規定されたメトキシエチルホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、 $1\mu\text{mol}$ 合成カラムと、HCPにオキサリルで結合した $0.8\mu\text{mol}$ のdCを使用して、ABI-394 DNA/RNA合成装置で合成した。合成サイクルは、末端5'-O-DMTr基を除去(DMT Off)して行った。固体担体を脱水ACNで洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。乾燥したHCPをプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン(比率1:4)1mLと、室温で18時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣をpH約1.5の10%DMSO含有水溶液で再懸濁させ、HCP担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取HPLC(20mMリン酸ナトリウム緩衝液中のACNの5~65%勾配、pH=6.0)により精製する。95%より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相HPLC(ACNの0~80%勾配)により脱塩する。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥する。

表E-5 実施例22および42の合成に使用されるDNA/RNA合成装置ABI-394におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 20】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60
5	硫化	0.3 M S-MOE トリイルチオスルホネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600

10

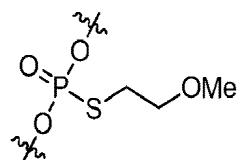
20

【1496】

実施例 22 オリゴヌクレオチド 126 (A11-(Rp)-d[C s 2 A s 2 G s 2 T]) (s 2 は以下に示すとおり) の合成

30

【化 440】



【1497】

オリゴヌクレオチド 126 を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法2) : 16.23分。UPLC/ESI-MS : C₄₈H₆₈N₁₅O₂₂P₃S₃に対する計算値 : 1396.2 ; 実測値 : 1395.2。

40

【1498】

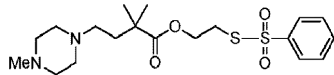
実施例 23 : 表 E-6 にまとめたサイクルに従って、立体的に規定された嵩高い N-メチルピペラジノエステルのホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、1 μmol 合成カラムと、HCP にオキサリルで結合した 1.5 μmol の dT を使用して、ABI-394 DNA/RNA 合成装置で合成した。合成サイクルは、末端 5'-O-DMTr 基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水 ACN で洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。乾燥した HCP をプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率 1 : 4) 1 mL と、室温で 18 時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を pH 約 1.5 の 10% DMSO 含有水溶液で再懸濁させ、HCP 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 HPLC (20 mM

50

リン酸ナトリウム緩衝液中の A C N の 5 ～ 6 5 % 勾配、p H = 6 . 0) により精製した。
9 5 % より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 H P L C (A C N の 0 ～ 8 0 % 勾配) により脱塩した。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥した。

表 E - 6 実施例 2 3 の合成に使用される D N A / R N A 合成装置 A B I - 3 9 4 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

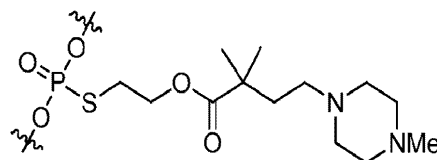
【表 2 1】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)	
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.	10
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600	
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60	20
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60	
5	硫化	0.3 M N-メチルピペラジノエステル フェニルチオスルフォネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600	30

【1 4 9 9】

実施例 2 3 オリゴヌクレオチド 1 2 7 (A 1 1 - (R p) - d [C s 3 A s 3 G s 3 T] (s 3 は以下に示すとおり) の合成

【化 4 4 1】



40

【1 5 0 0】

オリゴヌクレオチド 1 2 7 を上記のとおり合成した。R P - H P L C における R T (H P L C 方法 2) : 2 0 . 2 4 分。U P L C / E S I - M S : C _{7 8} H _{1 2 2} N _{2 1} O _{2 5} P ₃ S ₃ に対する計算値 : 1 9 4 3 . 1 ; 実測値 : 1 9 4 1 . 0 。

【1 5 0 1】

実施例 2 4 および 4 3 : 表 E - 7 にまとめたサイクルに従って、立体的に規定された嵩高いモルホリノエステルのホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、1 μ m o l 合成カラムと、H C P にオキサリルで結合した 1 .

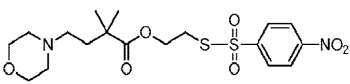
50

5 μmol の d T を使用して、A B I - 3 9 4 DNA/RNA 合成装置で合成した。合成サイクルは、末端 5' - O - DMT r 基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水 A C N で洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。乾燥した H C P をプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率 1 : 4) 1 mL と、室温で 1 8 時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を pH 約 1. 5 の 1 0 % D M S O 含有水溶液で再懸濁させ、H C P 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 H P L C (2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液中の A C N の 5 ~ 6 5 % 勾配、p H = 6. 0) により精製する。9 5 % より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 H P L C (A C N の 0 ~ 8 0 % 勾配) により脱塩する。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥する。

10

表 E - 7 実施例 2 4 および 4 3 の合成に使用される DNA/RNA 合成装置 A B I - 3 9 4 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 2 2】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60
5	硫化	0.3 M N-メチルピペラジノエステル ニトロフェニルチオスルフォネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600

20

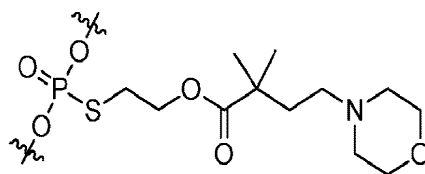
30

【1 5 0 2】

実施例 2 4 オリゴヌクレオチド 1 2 8 (A l l - (S p) - d [C s 4 A s 4 G s 4 T] (s 4 は以下に示すとおり) の合成

40

【化 4 4 2】



【1 5 0 3】

オリゴヌクレオチド 1 2 8 を上記のとおり合成した。R P - H P L C における R T (H P L C 方法 3) : 1 9. 7 5 分。U P L C / E S I - M S : C_{7 5} H_{1 1 3} N_{1 8} O_{2 8}

50

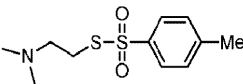
P₃S₃に対する計算値：1902.9；実測値：1904.0。

【1504】

実施例25：表E-8にまとめたサイクルに従って、立体的に規定されたジメチルアミノエチルホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、1 μmol 合成カラムと、HCPにオキサリルで結合した1.5 μmol のdTを使用して、ABI-394 DNA/RNA合成装置で合成した。合成サイクルは、末端5'-O-DMTr基を除去(DMT Off)して行った。固体担体を脱水ACNで洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。乾燥したHCPをプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン(比率1：4)1 mLと、室温で18時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣をpH約1.5の10% DMSO含有水溶液で再懸濁させ、HCP担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取HPLC(20 mMリン酸ナトリウム緩衝液中のACNの5～65%勾配、pH=6.0)により精製した。95%より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相HPLC(ACNの0～80%勾配)により脱塩した。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥した。

表E-8 実施例25の合成に使用されるDNA/RNA合成装置ABI-394におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

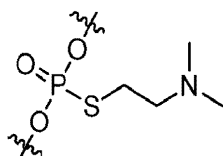
【表23】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60
5	硫化	0.3 M ジメチルアミノエチル トリイルチオスルフォネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	900 + 3×600 + 900

【1505】

実施例25 オリゴヌクレオチド129 (All - (Sp) - d [Cs5As5Gs5T]) (s5は以下に示すとおり)の合成

【化 4 4 3】



【1506】

オリゴヌクレオチド 129 を上記のとおり合成した。RP-HPLC における RT (HPLC 方法 2) : 17.25 分。UPLC/ESI-MS : $C_{51}H_{77}N_{18}O_{19}P_3S_3$ に対する計算値 : 1435.4 ; 実測値 : 1435.0。

10

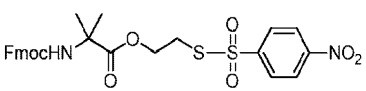
【1507】

実施例 26 : 表 E-9 にまとめたサイクルに従って、立体的に規定されたジメチルアミンエステルホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、 $1\ \mu\text{mol}$ 合成カラムと、HCP にオキサリルで結合した $1.5\ \mu\text{mol}$ の dT を使用して、ABI-394 DNA/RNA 合成装置で合成した。合成サイクルは、末端 5'-O-DMTr 基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水 ACN で洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。乾燥した HCP をプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率 1 : 4) $1\ \text{mL}$ と、室温で 18 時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を pH 約 1.5 の 10% DMSO 含有水溶液で再懸濁させ、HCP 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 HPLC (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中の ACN の 5~65% 勾配、pH = 6.0) により精製する。95% より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 HPLC (ACN の 0~80% 勾配) により脱塩する。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥する。

20

表 E-9 実施例 26 の合成に使用される DNA/RNA 合成装置 ABI-394 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

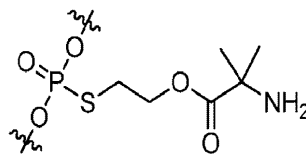
【表 2 4】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60
5	硫化	0.3 M ジメチルアラニン-Fmocエステル ニトロフェニルチオスルフェート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	900 + 3×600 + 900

【1508】

実施例 26 オリゴヌクレオチド 130 (A11 - (Sp) - d [Cs6As6Gs6T]) (s6 は以下に示すとおり) の合成

【化 4 4 4】



【1509】

オリゴヌクレオチド 130 を上記のとおり合成した。RP-HPLC における RT (HPLC 方法 2) : 16.45 分。UPLC/ESI-MS : C₅₇H₈₃N₁₈O₂₅P₃S₃ に対する計算値 : 1609.5 ; 実測値 : 1609.6。

【1510】

実施例 27 および 28 : 表 E-10 にまとめたサイクルに従って、立体的に規定された S-メチルホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、1 μmol 合成カラムと、HCP にオキサリルで結合した 0.8 μmol の dC を使用して、ABI-394 DNA/RNA 合成装置で合成した。合成サイクルは、末端 5'-O-DMTr 基を除去 (DMTr Off) して行った。固体担体を脱水 ACN で洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。乾燥した HCP をプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率 1 : 4) 1 mL と、室温で 18 時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を pH 約 1.5 の 10% DMSO 含有水溶液で再懸濁させ、HCP 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 HPLC (20 mM リン酸ナトリウ

10

20

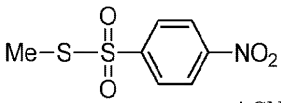
30

40

50

ム緩衝液中の A C N の 5 ～ 6 5 % 勾配、p H = 6 . 0) により精製する。9 5 % より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 H P L C (A C N の 0 ～ 8 0 % 勾配) により脱塩する。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥する。

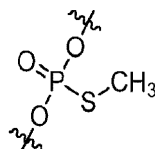
表 E - 1 0 実施例 2 7 および 2 8 の合成に使用される D N A / R N A 合成装置 A B I - 3 9 4 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要
【表 2 5】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)	
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.	10
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600	
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60	20
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60	
5	硫化	0.3 M S-メチルニトロフェニル チオスルフォネート  -ACN溶液	10 + 4×2	900 + 3×600 + 900	30

【1511】

実施例 2 7 オリゴヌクレオチド 1 3 1 (A 1 1 - (R p) - d [G s 7 C s 7 C s 7 T s 7 C s 7 A s 7 G s 7 T s 7 C s 7 T s 7 G s 7 C s 7 T s 7 T s 7 C s 7 G s 7 C s 7 A s 7 C s 7 C] (s 7 は以下に示すとおり) の合成

【化 4 4 5】



40

【1512】

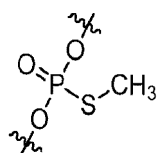
オリゴヌクレオチド 1 3 1 を上記のとおり合成した。R P - H P L C における R T : 2 7 . 6 5 分。U P L C / E S I - M S : C ₂₁₀ H ₂₈₄ N ₆₇ O ₁₀₂ P ₁₉ S ₁₉ に対する計算値 : 6 5 7 6 . 7 1 ; 実測値 : 6 5 7 5 . 6 。

【1513】

実施例 2 8 オリゴヌクレオチド 1 3 2 (A 1 1 - (S p) - d [G s 7 C s 7 C s 7 T s 7 C s 7 A s 7 G s 7 T s 7 C s 7 T s 7 G s 7 C s 7 T s 7 T s 7 C s 7 G s 7 C

50

s 7 A s 7 C s 7 C] (s 7 は以下に示すとおり) の合成
【化 4 4 6】



【1514】

オリゴヌクレオチド 132 を上記のとおり合成した。RP-HPLC における RT : 32.65 分。UPLC/ESI-MS : $C_{210}H_{284}N_{67}O_{102}P_{19}S_{19}$ に対する計算値 : 6576.71 ; 実測値 : 6574.8。

10

【1515】

修飾核酸塩基を含むキラル制御したオリゴヌクレオチドの合成

一般的に前記のとおり、および一般的にここに記載するとおり、いくつかの実施形態においては、本発明は A、T、C および G 以外のオリゴヌクレオチドを含むキラル制御したオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態においては、このようなキラル制御したオリゴヌクレオチドは、5-メチルシトシン (5mC) を含む。実施例 21 および以下に、非限定的な実施例を示す。

【1516】

実施例 29-41 を、ABI-394 DNA/RNA 合成装置における自動化合成を使用して、表 E-11 にまとめた合成サイクルに従って、 $1\mu\text{mol}$ 合成カラムと、HCP にオキサリルで結合した $1.75\mu\text{mol}$ の dG を使用して合成した。合成サイクルは、末端 5'-O-DMTr 基を除去 (DMTr Off) して行った。自動化オリゴヌクレオチド合成の完了後、HCP 担体を脱水 ACN で洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥した HCP をプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率 1 : 4) 1mL と、室温で 18 時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を pH 約 1.5 の 10% DMSO 含有水溶液で再懸濁させ、HCP 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 HPLC (下記の手順に従う) により精製する。95% より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 HPLC (ACN の 0 ~ 30% 勾配) により脱塩する。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥する。

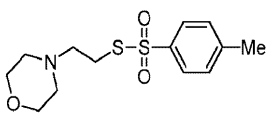
20

30

【1517】

表 E-11 実施例 29-41 の合成に使用される DNA/RNA 合成装置 ABI-394 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 2 6】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)	
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.	
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600	10
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60	
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60	
5	硫化	0.3 M S-モルホリノエチル トリイルチオスルフォネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	900 + 3×600 + 900	20

【1 5 1 8】

実施例 2 9 - 4 1 の一般的な精製方法：

緩衝液 A：2 0 m M ホスファート p H = 6 . 0 （リン酸で調節した）

緩衝液 B：A C N

カラム：X B r i d g e P r e p C _{1 8}、5 μ m、C _{1 8}、2 5 0 × 1 0 m m、品
番 # 1 8 6 0 0 3 2 5 6

緩衝液ヒーター設定温度 = 5 0 ° C

2 5 4 および 2 8 0 n m で信号をモニター

使用した勾配：

【表 2 7】

時間	流量(mL/分)	% A	% B	カーブ
初期		99	1	
5	4	99	1	1
10	4	77	23	6
60	4	70	30	6
65	4	20	80	6
70	4	20	80	6
71	4	99	1	6
80	4	99	1	1

【1519】

実施例29 オリゴヌクレオチド135 (A11 - (Rp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]) の合成

【1520】

オリゴヌクレオチド135を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 17.50分。UPLC/ESI-MS : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_{11}S_{11}$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5091.9。

【1521】

実施例30 オリゴヌクレオチド136 (A11 - (Sp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]) の合成

10

【1522】

オリゴヌクレオチド136を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 19.25分。UPLC/ESI-MS : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_{11}S_{11}$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5090.8。

【1523】

実施例31 オリゴヌクレオチド137 ((Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] (1S-9R-1S)) の合成

【1524】

オリゴヌクレオチド137を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 17.85分。UPLC/ESI-MS : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_{11}S_{11}$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5091.9。

20

【1525】

実施例32 オリゴヌクレオチド138 ((Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] (2S-7R-2S)) の合成

【1526】

オリゴヌクレオチド138を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 18.10分。UPLC/ESI-MS : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_{11}S_{11}$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5091.9。

30

【1527】

実施例33 オリゴヌクレオチド139 ((Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] (1R-9S-1R)) の合成

【1528】

オリゴヌクレオチド139を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 18.75分。UPLC/ESI-MS : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_{11}S_{11}$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5088.9。

【1529】

実施例34 オリゴヌクレオチド140 ((Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] (2R-7S-2R)) の合成

40

【1530】

オリゴヌクレオチド140を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 18.72分。UPLC/ESI-MS : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_{11}S_{11}$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5091.3。

【1531】

実施例35 オリゴヌクレオチド141 ((Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] (3S-5R-3S)) の合成

50

【1532】

オリゴヌクレオチド141を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 18.09分。UPLC/ESI-MS : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_3S_1$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5090.9。

【1533】

実施例36 オリゴヌクレオチド142 ((Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] (3R-5S-3R)) の合成

【1534】

オリゴヌクレオチド142を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT : 18.35分。UPLC/ESI-MS (HPLC方法1) : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_3S_1$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5088.9。 10

【1535】

実施例37 オリゴヌクレオチド143 ((Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] ((SSR)₃-SS)) の合成

【1536】

オリゴヌクレオチド143を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 18.48分。UPLC/ESI-MS : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_3S_1$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5092.0。 20

【1537】

実施例38 オリゴヌクレオチド144 ((Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp) - d [5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G] ((RRS)₃-RR)) の合成

【1538】

オリゴヌクレオチド144を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 18.02分。UPLC/ESI-MS : $C_{18}H_{27}N_5O_7P_3S_1$ に対する計算値 : 5090.0 ; 実測値 : 5091.4。

【1539】

実施例39 オリゴヌクレオチド145 (All - (Rp) - d [5mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1Gs15mC]) の合成 30

【1540】

オリゴヌクレオチド145を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法1) : 17.30分。UPLC/ESI-MS : $C_{23}H_{35}N_6O_9P_2S_4$ に対する計算値 : 6388.3 ; 実測値 : 6390.6。

【1541】

実施例40 オリゴヌクレオチド146 (All - (Rp) - d [Gs15mCs1Ts1G]) の合成

【1542】

オリゴヌクレオチド146を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法2) : 15.89分。UPLC/ESI-MS : $C_{58}H_{85}N_{18}O_{23}P_3S_3$ に対する計算値 : 1591.5 ; 実測値 : 1590.8。 40

【1543】

実施例41 オリゴヌクレオチド147 (All - (Rp) - d [5mCs1As1Gs1T]) の合成

【1544】

オリゴヌクレオチド147を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法2) : 16.30分。UPLC/ESI-MS : $C_{58}H_{85}N_{18}O_{22}P_3S_3$ に対する計算値 : 1575.5 ; 実測値 : 1575.2。 50

【1545】

実施例42 オリゴヌクレオチド148 (All - (Rp) - d [5mCs 2As 2Gs 2Ts 25mCs 2Ts 2Gs 25mCs 2Ts 2Ts 25mCs 2G]) の合成

【1546】

オリゴヌクレオチド148を、実施例22における硫化剤を使用して、上記のとおり合成した。RP - HPLCにおけるRT (HPLC方法3) : 16. 51分。UPLC /ESI - MS : C₁₅₃H₂₂₃N₄₀O₇₃P₁₁S₁₁に対する計算値 : 4484. 1 ; 実測値 : 4483. 0。

【1547】

実施例43 オリゴヌクレオチド149 (All - (Rp) - d [5mCs 4As 4Gs 4Ts 45mCs 4Ts 4Gs 45mCs 4Ts 4Ts 45mCs 4G]) の合成

10

【1548】

オリゴヌクレオチド149を、実施例24における硫化剤を使用して、上記のとおり合成した。RP - HPLCにおけるRT (HPLC方法4) : 17. 87分。UPLC /ESI - MS : C₂₅₂H₃₈₈N₅₁O₉₅P₁₁S₁₁に対する計算値 : 6345. 6 ; 実測値 : 6346. 5。

【1549】

異なるヌクレオチド間結合を含む、キラル制御したキメラオリゴヌクレオチドの合成

一般的に前記のとおり、および一般的にここに記載するとおり、いくつかの実施形態においては、本発明は異なるヌクレオチド間結合を含む、キラル制御したオリゴヌクレオチドを提供する。以下の非限定的な実施例は、このようなキラル制御したオリゴヌクレオチドおよびその合成方法を示す。

20

【1550】

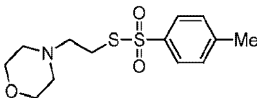
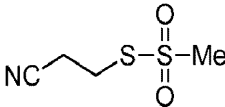
実施例44 - 45は、異なるヌクレオチド間結合を含む、キラル制御したキメラオリゴヌクレオチドの合成を示す。ジアステレオマーとして純粋なモルホリノエチルホスホロチオエートトリエステル / ホスホロチオエートジエステルが混合したヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、ABI - 394 DNA / RNA合成装置で、表E - 12にまとめたサイクルに従って、1 μmol合成カラムと、HCPにオキサリルで結合した1. 5 μmolのdTを使用して合成した。各反復サイクルでは、異なる硫化剤を反応させることができるので、2つの異なるチオスルホネートを使用した。合成は、末端5' - O - DMT r基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水ACNで洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。次に乾燥した固体担体を、脱水ACN - 塩化トリメチルシリル - 16 : 1 (v / v) 中の1, 5 - ジアザビシクロ (4. 3. 0) ノナ - 5 - エン (DBN) の無水1 M溶液5 mLと、室温で10分間処理した。DBN溶液を、カラム出口に固定したプラスチックルアーシリンジにより、カラムを通してゆっくり押し出した。次に担体を脱水ACNで洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥したHCPをプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率1 : 4) 1 mLと、室温で18時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣をpH約1. 5の10% DMSO含有水溶液で再懸濁させ、HCP担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取HPLC (20 mMリン酸ナトリウム緩衝液中のACNの5 ~ 65% 勾配、pH = 6. 0) により精製する。95%より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相HPLC (ACNの0 ~ 80% 勾配) により脱塩する。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥する。

30

40

表E - 12 実施例44 - 45の合成に使用されるDNA / RNA合成装置ABI - 394におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 28】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)	
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.	
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600	10
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60	
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60	
5	硫化1	0.3 M S-モルホリノエチル トリイルチオスルフォネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600	20
6	硫化2	0.3 M S-シアノエチル メチルチオスルフォネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600	30

【1551】

実施例 44 オリゴヌクレオチド 150 (All - (Rp) - d [TsCs1AsT]) の合成

【1552】

オリゴヌクレオチド 150 を上記のとおり合成した。RP - HPLC における RT (HPLC 方法 2) : 12.72 分。UPLC / ESI - MS : C₄₅H₆₂N₁₃O₂₁P₃S₃ に対する計算値 : 1310.2 ; 実測値 : 1309.2。 40

【1553】

実施例 45 オリゴヌクレオチド 151 (All - (Sp) - d [Cs1AsGs1T]) の合成

【1554】

オリゴヌクレオチド 151 を上記のとおり合成した。RP - HPLC における RT (HPLC 方法 2) : 14.71 分。UPLC / ESI - MS : C₅₁H₇₂N₁₇O₂₁P₃S₃ に対する計算値 : 1448.4 ; 実測値 : 1446.9。 50

【1555】

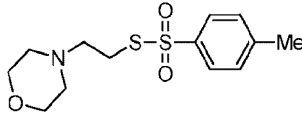
実施例 46 は、リン酸ジエステルヌクレオチド間結合および変形ヌクレオチド間結合の両方を含む、キラル制御したキメラオリゴヌクレオチドの合成を記載する。モルホリノエチルホスホロチオエートトリエステル／リン酸ジエステルが混合したヌクレオチド間結合を含有する例示的なオリゴヌクレオチドを、ABI-394 DNA/RNA 合成装置で、表 E-13 にまとめたサイクルに従って、1 μmol 合成カラムと、HCP にオキサリルで結合した 1.5 μmol の dT を使用して合成した。各反復サイクルでは、異なる硫化剤または酸化剤を反応させることができるので、1 つのチオスルホネート試薬を 1 サイクルの硫化に使用し、ヨウ素促進酸化をもう一方のサイクルで使用した。合成は、末端 5' - O - DMT r 基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水 ACN で洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。乾燥した HCP をプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率 1 : 4) 1 mL と、室温で 18 時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を pH 約 1.5 の 10% DMSO 含有水溶液で再懸濁させ、HCP 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 HPLC (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中の ACN の 5 ~ 65% 勾配、pH = 6.0) により精製した。95% より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 HPLC (ACN の 0 ~ 80% 勾配) により脱塩した。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥した。

10

表 E-13 実施例 46 の合成に使用される DNA/RNA 合成装置 ABI-394 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

20

【表 29】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM 溶液	3 + 60 + 10	N.A.
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN 溶液 + 1.2 M CMPT-ACN 溶液	5 + 4	30 + 600
3	キャッピング1	5% Pac_2O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60
4	キャッピング2	5% Pac_2O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF 溶液	20	60
5	硫化	0.3 M S-モルホリノエチル トリイルチオスルホネート  -ACN/BSTFA 溶液	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600
6	酸化	0.02 M I_2 , ピリジン/水	10	300

30

40

【1556】

50

実施例 46 オリゴヌクレオチド 152 (All - (Sp) - d [Cs1AGs1T]) の合成

【1557】

オリゴヌクレオチド 152 を上記のとおり合成した。RP - HPLC における RT (HPLC 方法 2) : 13.42 分。UPLC /ESI - MS : $C_{51}H_{72}N_{17}O_{22}P_3S_2$ に対する計算値 : 1432.3 ; 実測値 : 1431.7。

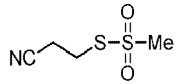
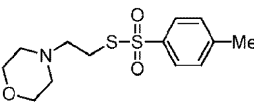
【1558】

実施例 47 は、リン酸ジエステルヌクレオチド間結合、ならびにキラルとして純粋な変形のリン酸トリエステルおよびリン酸ジエステルヌクレオチド間結合の両方を含む、キラル制御したキメラオリゴヌクレオチドの合成を記載する。混合したモルホリノエチルホスホロチオエートトリエステル / リン酸ジエステル / ホスホロチオエートジエステルが混合した結合を含有する、キラル制御したオリゴヌクレオチドを、ABI - 394 DNA / RNA 合成装置で、表 E - 14 にまとめたサイクルに従って、1 μ mol 合成カラムと、HCP にオキサリルで結合した 1.5 μ mol の dT を使用して合成した。各反復サイクルでは、異なる硫化剤または酸化剤を反応させることができるので、2 つの異なるチオスルホネート試薬を 2 つの異なる硫化サイクルに使用し、ヨウ素促進酸化をもう一方のサイクルで使用した。合成は、末端 5' - O - DMT r 基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水 ACN で洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。次に乾燥した固体担体を、脱水 ACN - 塩化トリメチルシリル - 16 : 1 (v / v) 中の 1, 5 - ジアザビシクロ (4.3.0) ノナ - 5 - エン (DBN) の無水 1 M 溶液 5 mL と、室温で 10 分間処理した。DBN 溶液を、カラム出口に固定したプラスチックルアーシリンジにより、カラムを通してゆっくり押し出した。次に担体を脱水 ACN で洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥した HCP をプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率 1 : 4) 1 mL と、室温で 18 時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を pH 約 1.5 の 10 % DMSO 含有水溶液で再懸濁させ、HCP 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 HPLC (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中の ACN の 5 ~ 65 % 勾配、pH = 6.0) により精製した。95 % より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 HPLC (ACN の 0 ~ 80 % 勾配) により脱塩した。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥した。

【1559】

表 E - 14 実施例 47 の合成に使用される DNA / RNA 合成装置 ABI - 394 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 3 0】

ステップ	反応	試薬	処理時間(秒)	待ち時間(秒)	
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 + 60 + 10	N.A.	
2	カップリング	0.15 M ホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	5 + 4	30 + 600	10
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	20	60	
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	20	60	
5	硫化1	0.3 M S-シアノエチル メチルチオスルホネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600	20
6	硫化2	0.3 M S-モルホリノエチル メチルチオスルホネート  -ACN/BSTFA溶液	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600	30
7	酸化	0.02 M I ₂ , ピリジン/水	10	300	

【1560】

実施例 47 オリゴヌクレオチド 153 (All - (Sp) - d [CAs1GsT]) の合成

オリゴヌクレオチド 153 を上記のとおり合成した。RP - HPLC における RT (HPLC 方法 2) : 11.48 分。UPLC / ESI - MS : C₄₅H₆₁N₁₆O₂₁P₃S₂ に対する計算値 : 1318.1 ; 実測値 : 1318.1。

【1561】

当業者に理解されたとおり、実施例 46 および 47、ならびに本明細書において記載される他の実施例および方法に従って、より長いキメラのキラル制御したオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【1562】

キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドは、非立体特異的合成によるジアステレオマーの

40

50

混合物とは異なる特性を有する

上記のとおりおよびここに記載するとおり、いくつかの実施形態においては、同一の塩基配列を有するが非立体特異的オリゴヌクレオチド合成により合成されるジアステレオマーの混合物とは異なる化学的特性および生物学的特性を有する、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドを本願は提供する。

【1563】

実施例48 キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドおよび非立体特異的合成によるジアステレオマーの混合物のHPLC特性

【1564】

キラルとして純粋なホスホロチオエートジエステルオリゴヌクレオチドA（全R_p、オリゴヌクレオチド101）およびB（全S_p、オリゴヌクレオチド102）、ならびに標準的な非立体特異的オリゴヌクレオチド合成により作製された非立体特異的C（立体的にランダムなホスホロチオエートジエステルヌクレオチド間結合）を、同一のRP-HPLC条件により分析し、対応するHPLCトレースを図2に示す。

【1565】

図2において明らかに示されるとおり、ホスホロチオエートジエステル20量体オリゴヌクレオチドの立体化学は、RP-HPLCおよびIEX-HPLCにより決定されるそれらの挙動に影響を及ぼす。理論により拘束されることを意図するものではないが、保持時間（RT）傾向は保存されるので、RP-HPLCおよびIEX-HPLCの保持時間（RT）に相関が観測される。全R_p立体異性体（A）は、全S_p立体異性体（B）よりも短い保持を有し、また、全2¹⁹立体異性体の混合物である立体的にランダムなホスホロチオエートジエステルオリゴヌクレオチド（C）は幅広いHPLCピークを有し、極限全R_pおよび全S_pジアステレオマー間に溶出する。

【1566】

当業者に理解されるとおり、同一の配列を有する異なるキラル制御またはキラル非制御の（例えば、立体的にランダムな）オリゴヌクレオチド組成物を比較して示す解析が、例示的なキラル非制御オリゴヌクレオチド組成物（すなわち、非キラル制御オリゴヌクレオチド合成により調製されたもの）は全R_pまたはS_p型等の特定のオリゴヌクレオチド型を非常に低いレベルでのみ含むことを示すことを、共に示されたデータが確証している。

【1567】

実施例49 熱的変性実験（T_m）

【1568】

各DNA鎖を、1×PBS中で、0.5 μMの等モル濃度で相補RNAと混合した。全量2.5 mLの溶液を各2本鎖用に調製し、混合物を90℃で2分間加熱し、数時間にわたり放冷した。次に、混合物を4℃で2時間保管した。ペルチェユニットを備えたパーキンエルマー（Perkin Elmer）製UV分光光度計を使用して、0.5分間隔で、15℃から開始して90℃までの温度勾配で0.5℃/分で上昇させ、254 nmにおける吸光度を記録した。254 nmの吸光度を温度に対してプロットし、T_m値を各曲線のそれぞれの1次導関数から算出した。

【1569】

図3は、2つの立体的に純粋なジアステレオ異性体ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（全R_p20量体Aおよび全S_p20量体B）ならびに立体的にランダムなホスホロチオエートオリゴヌクレオチドC間のT_mの差を示す。全R_pホスホロチオエートDNAは、反対の全S_pジアステレオ異性体および立体的にランダムな20量体の両方と比較すると、相補RNAに対するより高い親和性を示す。

【1570】

以下の表E-15に、キラル制御したオリゴヌクレオチドと立体的にランダムなオリゴヌクレオチド間の差をまとめる。

表E-15 キラル制御したオリゴヌクレオチドと立体的にランダムなオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド間の差

【表 3 1】

オリゴヌクレオチド	RT-IEX(分)	Tm (°C) ±0.5	IC ₅₀ (nM) (整数に切り上げ)
101	14.70	68.3	4
102	15.49	60.5	6
103	15.10	63.4	6
104	15.04	63.5	4
105	14.75	66.5	3

106	15.43	61.8	4
107	15.02	64.5	4
108	15.10	64.8	3
109	14.91	65.8	2
110	15.24	62.9	7
111	15.69	NA	NA
113	15.72	NA	NA
114	14.14	65.2	5
115	14.30	65.2	3
116	14.17	64.8	2
118	15.04	64.5	3
119	6.90	73.4	未検出
120	15.49	65.3	4

10

20

30

【1571】

実施例50 キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドの生物学的活性

【1572】

OD確認後、全オリゴヌクレオチド候補分子を20 μMの開始濃度に希釈した。多投与フォワードトランスフェクション実験を、Hep3B細胞（ATCC（登録商標）、カタログHB-8604（商標））を使用して、Lipofectamine 2000（Life Technologies、カタログ11668-019）トランスフェクション試薬を使用して、96ウェルプレートに設定した。

40

【1573】

トランスフェクションプロトコル：

【1574】

1ウェルあたり 2×10^4 個のHep3Bを播種し、37℃で24時間、CO₂インキュベータ内で、10% FBSおよび1% Glutamax I（Life Technologies、カタログ35050061）を含有する100 μlの抗菌剤を含まないMEM培地（Life Technologies、カタログ11095098）でインキ

50

ュベートした。ヌクレアーゼを含まない水中で、12個の希釈を設定した（表E-16）。

表E-16 オリゴヌクレオチドトランスフェクションストックプレートの濃度
【表32】

希釈率	1	2	3	4	5	6
In μ M	20	10	3.33333	1.11111	0.37037	0.12346
希釈率	7	8	9	10	11	12
In μ M	0.04115	0.01372	0.00457	0.00152	0.00051	0.00017

10

【1575】

各ウェルで、0.5 μ LのLipofectamine 2000を9.5 μ LのOpti-MEM I還元型血清培地（Life Technologies、カタログ31985062）と混合し、5分間インキュベートした。インキュベーション後、穏やかなピペット操作により、報告された濃度の10 μ Lの各候補を希釈したLipofectamine 2000と混合した。次に混合物を室温で20分間インキュベートし、複合体を形成させた。この間、細胞成長培地を、新しい前述の抗菌剤を含まないMEM 80 μ Lと置き換えた。20 μ Lの脂質-オリゴ複合体を各ウェルに穏やかに混合し、全体積を100 μ Lにした。次に細胞を37℃で24時間、CO₂インキュベータ内でインキュベートした。

20

【1576】

RNA抽出：

【1577】

24時間のインキュベーション後、細胞成長培地を除去し、Dynabeads mRNA Directキット（Life Technologies、カタログ61012）を使用して、キットマニュアルで提供される手順に修正なしに従って、RNAを抽出した。この磁性Oligo(dT)²⁵ビードシステムは、対費用効果の高く、丈夫なハイスループットポリ(A) RNA抽出を可能にし、DNase処理を回避できる。ヌクレアーゼを含まない水でRNAを溶出し、-80℃で保管した。

30

【1578】

cDNA合成：

【1579】

高容量cDNA逆転写キット（Life Technologies、カタログ4374967）を使用し、RNase阻害剤とキットプロトコルを使用した20 μ LのcDNA合成反応において、10 μ LのRNAを使用した。逆転写を、C1000 Touchサーマルサイクラー（Bio-rad、カタログ185-1196EDU）で、96ウェルフォーマットにおいて行った。

【1580】

遺伝子発現解析：

【1581】

遺伝子発現を、LightCycler（登録商標）480 SYBR Green I Master（Roche、カタログ04707516001）を使用して、LightCycler 480リアルタイムPCR装置で、定量PCRにより測定した。標的アポリタンパク質B（Apo B）（NM_000384）のヒト配列のプライマーおよび内在性コントロールグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素（GAPDH）（NM_002046）を設計し、IDTから順序付けした（表E-17）。

【1582】

表E-17 遺伝子発現定量化に使用したHPLC精製プライマーの配列

40

50

【表 3 3】

プライマー	標的	配列	場所
Apo B フォワード プライマー	<i>H.sapiens</i> Apo B	AGCCTTGGTGGATACCCTGAAGTT	3209-3232
Apo B リバー プライマー	<i>H.sapiens</i> Apo B	TGGACAAGGTCATACTCTGCCGAT	3289-3312
GAPDH フォワード プライマー	<i>H.sapiens</i> GAPDH	CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC	30-49
GAPDH リバー プライマー	<i>H.sapiens</i> GAPDH	ACGACCAAATCCGTTGACTC	122-141

10

20

【1 5 8 3】

標的および内因性コントロールの測定を、別個のウェルで、同一の c D N A 鋳型からの物質を使用して行った。S Y B R 緑色アッセイ P C R 条件を、S Y B R Green I Master プロトコルにおいて記載のとおり設定した（表 E - 1 8）。

表 E - 1 8 S Y B R 緑色アッセイのリアルタイム P C R 条件

【表 3 4】

手順	繰り返し回数
プレインキュベーション	1
増幅	45
溶融曲線分析	1
冷却	1

30

温度(°C)	時間	Acquisition Mode	Ramp rate °C/s	Acquisition per °C
プレインキュベーション				
95	5分	なし	4.4	None
増幅				
95	10秒	なし	4.4	None
60	10秒	なし	2.2	None
72	10秒	Single	4.4	None
溶融曲線				
95	5秒	なし	4.4	None
65	1分	なし	2.2	None
97		連続	0.11	5
冷却				
40	30秒	なし	2.2	None

10

20

【1584】

融解曲線解析は、各プライマー対に対し、単一単位複製配列ピークを示している（図4）。

【1585】

データは3個の生物学的複製の結果である。全試料を未処置の非トランスフェクト対照と比較した。以下の結果を、SYBR緑色を使用して、リアルタイムPCRにより遺伝子発現を評価した際に観察した（表E-19、図5）。

30

表E-19 SYBR緑色により評価した完全IC₅₀データ

【表35】

オリゴヌクレオチド	IC ₅₀ (nM)
101 All-R	4.368
102 All-S	6.345
103 5R-9S-5R	5.727
104 5S-9R-5S	4.291
105 1S-17R-1S	2.877
106 1R-17S-1R	~ 3.855
107 (R/S) ₉ R	~ 4.180

40

108 (S/R) ₉ S	3.189
118 Stereorandom	3.087
109 3S-13R-3S	1.722
110 3R-13S-3R	7.437
114 3R-13S-3R	5.234
115 S-(RRS) ₆	2.689
116 RS-(RRS) ₅ -RR	1.919
120 Mipomersen	4.386

10

【1586】

いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、8 nM未満の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、7 nM未満の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、6 nM未満の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、5 nM未満の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、4 nM未満の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、3 nM未満の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、2 nM未満の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、0.5～8 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、1～4 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、1.5～3 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、1.5～2 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、0.5～2 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、1～2.5 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、1.5～3 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、2.5～5 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、3～6 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、5～8 nMの範囲内の IC_{50} を示す。いくつかの実施形態においては、提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、上方境界および下方境界間の範囲内の IC_{50} を示す。いくつかのこのような実施形態においては、上方境界は、8, 5, 4、または3 nMである。いくつかのこのような実施形態においては、下方境界は、1, 1.5, 2、または2.5 nMである。実施例の参照により見られるとおり、本開示は、このような代表的な IC_{50} 値を示す多様なキラル制御したオリゴヌクレオチド、またはキラル制御したオリゴヌクレオチド組成物を詳細に例証する。

20

30

40

【1587】

表 E - 19 は、キラル制御形態における試験の際、特定のキラル制御したオリゴヌクレ

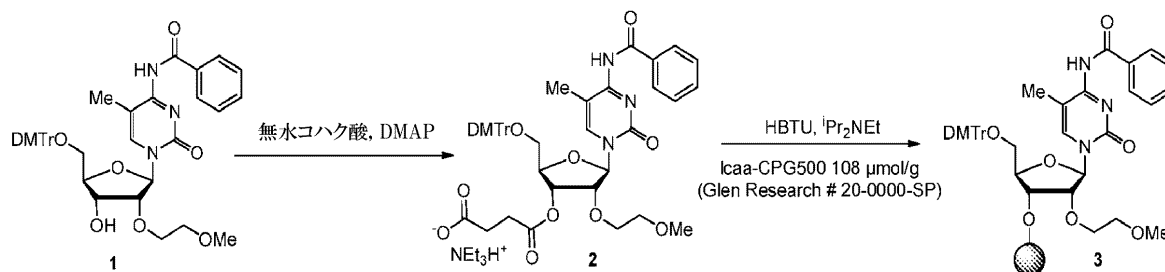
50

オチド／オリゴヌクレオチド組成物は、対応する立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物より有効であることを示し（オリゴヌクレオチド118と比較して、オリゴヌクレオチド105、109、115および116）；それらは立体的にランダムなオリゴヌクレオチド混合物であるミボメルセンよりも活性であることも示している（オリゴヌクレオチド120と比較して、オリゴヌクレオチド104、105、106、107、109、115および116）。

さらなるキラル制御した製剤

実施例51 キラル制御したオリゴヌクレオチド製剤の調製

【化447】



【1588】

本実施例は、本明細書において記載される特定のオリゴヌクレオチドの、多様な特定のキラル制御した組成物の調製を記載する。特に、本実施例は、積載されたlcaa-CPG-500を使用したオリゴヌクレオチド調製を記載する。

【1589】

N⁴-Bz-5'-O-DMTr-2'-O-MOE-5mC(1)(4.0g、5.5mmol)を無水DCM(20mL)に溶解し、2当量の無水コハク酸(1.1g、11.1mmol)、および3当量の4-N,N-ジメチルアミノピリジン(2.0g、16.6mmol)と混合した。反応物をアルゴン下、室温で攪拌した。TLCにより決定されるように、出発物質が完全に消費された後(1時間)、溶媒を蒸発させて乾燥し、粗製残渣を1%のトリエチルアミンを含有するDCMに溶解し、次に2%のトリエチルアミンを含有するDCM中のMeOHの0~2%勾配を使用して、フラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。エバポレーション後の高純度化合物(2)の収量は4.5g、88%であった。生成した3'-O-コハク酸エステル(2)(0.92g、1.0mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.82mL、5.0mmol)およびCPG-500(10g)をDMF(50mL)に入れ、次にHBTU(0.42g、1.1mmol)を加えた。混合物を2時間振とうし、その後ろ過した。担体をDMF、MeOH、そして最後にDCMで洗浄し、次に真空下で乾燥した。トリチル陽イオン分析(504nmでモニター)は、担体(3)へのヌクレオチドの積載量は63μmol/gであることを示した。

【1590】

立体的に規定されたキメラデオキシおよび2'-O-MOEホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド結合を含有する、キラル制御したオリゴヌクレオチド組成物を、MerMade-12 DNA/RNA合成装置(BioAutomation)で、表E-20にまとめたサイクルに従って、2.0g(126μmol)のサクシニルで結合した非キャップのN⁴-Bz-5'-O-DMTr-2'-O-MOE-5mC(63μmol/g、Glen Research製lcaa-CPG-500)を充填したMM-6-200合成カラム(BioAutomation)を使用して合成した。オリゴヌクレオチド合成サイクルは、予備キャッピングステップ(キャッピング2)で行い、最終末端5'-O-DMTrオリゴヌクレオチド基の除去なしで行った(DMT On)。立体特異的硫化ステップは、0.3M メチルチオスルホン酸S-(2-シアノエチル)試薬を使用して、対応するキラルホスホラミドのカップリングおよび2ステップのキャッピング

10

20

30

40

50

ステップ後に行った（表 E - 20）。

【1591】

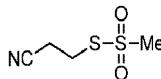
最終 5' - O - DMT r 基が付いたまま、自動化オリゴヌクレオチド合成サイクルが完了したら、合成カラムを DNA/RNA 合成装置から外し、真空下で乾燥した。乾燥した担体を空のガラスマニュアルペプチド合成装置に移し、40 mL 溶液の 0.5 M 1, 5 - ジアザビシクロ (4. 3. 0) ノナ - 5 - エン (DBN)、ACN 中の 0.25 M N, O - ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセタミド (BSTFA) を 5 分間、流れを止めずに連続的に、マニュアルペプチド合成装置内で担体に通した。担体を 50% Py/ACN で洗浄し、アルゴン流下で 1 秒間乾燥した。次に、担体を空のスクリー蓋プラスチックバイアルへ移し、5% EtOH/濃 NH₃ (20 mL) と 60℃ で 6 時間処理し、室温で 12 時間放置した。担体をろ過により除去し、濃 NH₃ で洗浄した。ろ液を真空下で乾燥し、次に生成物を 50 mM TEAA (120 mL) に溶解した。溶液中に浮遊物があった場合、さらなるろ過を行った。溶液を Sep - Pak カートリッジ (ウォーターズ (Waters)、Sep - Pak Vac 35 cc (10 g) C₁₈ カートリッジ) に充填した。カートリッジを 20% ACN/50 mM TEAA (70 mL) で洗浄し、キャップされた全切断型配列を除去し、0.5% 濃 NH₃ を含有する 50% ACN/水 (50 mL) で全長 DMT On オリゴヌクレオチドを溶出させた。DMT On オリゴヌクレオチドを含有する溶液を真空下で乾燥し、次に 50 mM TEAA (120 mL) で希釈し、他の Sep - Pak カートリッジ (ウォーターズ (Waters)、Sep - Pak Vac 35 cc (10 g) C₁₈ カートリッジ) に充填した。カートリッジをミリ Q 水 (50 mL)、2% TFA/水 (50 mL)、次に水 (50 mL) で洗浄した。DMT Off オリゴヌクレオチドを、0.5% 濃 NH₃ を含有する 50% ACN/水 (50 mL) で溶出させた。

表 E - 20 キラル制御した合成に使用する DNA/RNA 合成装置 MerMade - 12 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

10

20

【表 3 6】

ステップ	反応	試薬	吐出容積(ml)	待ち時間(秒)
1	脱トリチル化	3% TCA-DCM溶液	3 × 10	3 × 24
2	カップリング	0.15 M キラルホスホロアミド-ACN溶液 + 1.2 M CMPT-ACN溶液	2 × 3.4	2 x 450 (MOE) 2 x 300 (DNA)
3	キャッピング1	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液	8	60
4	キャッピング2	5% Pac ₂ O -THF/2,6-ルチジン溶液 + 16% NMI-THF溶液	6.8	60
5	硫化	0.3 M S-(2-シアノエチル) メタンチオスルホネート  -ACN/BSTFA溶液	9	600

10

20

【1592】

オリゴヌクレオチドONT - 75 (All (Rp)) - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C の合成

30

【1593】

オリゴヌクレオチドONT - 80 (All (Sp)) - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C の合成

【1594】

オリゴヌクレオチドONT - 77 (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp) - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C (5R - 10S - 4R) の合成

40

【1595】

オリゴヌクレオチドONT - 81 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp) - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C (5S - 10R - 4S) の合成

【1596】

オリゴヌクレオチドONT - 87 (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp) - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C (5R - (SSR)₃ - 5R) の合成

50

【1597】

オリゴヌクレオチドONT-88 (Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Rp、Rp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp) - Gs 5mCs 5mCs Ts 5mCs As Gs Ts 5mCs Ts Gs 5mCs Ts Ts 5mCs Gs 5mCs As 5mCs 5mC (5S - (RRS)₃ - 5S)

【1598】

オリゴヌクレオチドONT-89 (Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp、Rp、Sp) - Gs 5mCs 5mCs Ts 5mCs As Gs Ts 5mCs Ts Gs 5mCs Ts Ts 5mCs Gs 5mCs As 5mCs 5mC ((SR)₉S) の合成

10

【1599】

オリゴヌクレオチドONT-82 (All (Rp)) - Gs Ts 5mCs 5mCs 5mCs Ts Gs As As Gs As Ts Gs Ts 5mCs As As Ts Gs 5mC の合成

【1600】

オリゴヌクレオチドONT-84 (All (Sp)) - Gs Ts 5mCs 5mCs 5mCs Ts Gs As As Gs As Ts Gs Ts 5mCs As As Ts Gs 5mC の合成

【1601】

オリゴヌクレオチドONT-85 (Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Rp、Rp、Rp、Rp) - Gs Ts 5mCs 5mCs 5mCs Ts Gs As As Gs As Ts Gs Ts 5mCs As As Ts Gs 5mC (5R - 10S - 4R) の合成

20

【1602】

オリゴヌクレオチドONT-86 (Sp、Sp、Sp、Sp、Sp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Rp、Sp、Sp、Sp、Sp) - Gs Ts 5mCs 5mCs 5mCs Ts Gs As As Gs As Ts Gs Ts 5mCs As As Ts Gs 5mC (5S - 10R - 4S) の合成

【1603】

実施例52 粗製DMT Onオリゴヌクレオチドおよび精製したDMT Offオリゴヌクレオチドの分析用の一般的なRP-HPLC方法

本実施例は、本明細書において記載されるキラル制御した合成により調製される粗製および精製したオリゴヌクレオチド組成物のRP-HPLC分析を記載する。

30

緩衝液A: 50mM TEAA、pH=7.0

緩衝液B: ACN

カラム: XBridge C₁₈、3.5μm、C₁₈、4.6×50mm、品番#186003034

カラム温度=50℃

254および280nmで信号をモニター

使用した勾配:

【表37】

Time(min)	Flow (mL/min)	% A	% B	Curve
Initial		99	1	
2	1	99	1	6
52	1	50	50	6
55	1	5	95	6
55.5	1	5	95	6
56	1	99	1	6
60	1	99	1	1

40

【表 3 8】

RP-HPLC of Crude DMT on:	Figure 35:
ONT-75 (All (Rp))-Gs5mCs5mCsTs5mCsAs GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC	(Panel A)
ONT-80 (All (Sp))-Gs5mCs5mCsTs5mCsAs GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC	(Panel B)
ONT-77: (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAs GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC (5R-10S-4R)	(Panel C)
ONT-81 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAs GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC (5S-10R-4S)	(Panel D)
ONT-87 (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAs GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC (5R-(SSR) ₃ -5R)	(Panel E)
ONT-88 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAs GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC (5S-(RRS) ₃ -5S)	(Panel F)
ONT-89 (Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp)-Gs5mCs5mCsTs5mCsAs GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC ((SR) ₉ S)	(Panel G)
ONT-82 (All (Rp))-GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC	(Panel H)
ONT-84 (All (Sp))-GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC	(Panel I)
ONT-85 (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp,	(Panel J)
10S-4R)	
ONT-86 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)-GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC (5S-10R-4S)	(Panel K)

10

20

30

【1604】

実施例 53 粗製 DMT On オリゴヌクレオチドおよび精製した DMT Off オリゴヌクレオチドの分析用の一般的な IEX-HPLC 方法

本実施例は、本明細書において記載されるキラル制御した合成により調製される粗製および精製したオリゴヌクレオチド組成物の IEX-HPLC 分析を記載する。

緩衝液 A : 10 mM トリス HCl、50% ACN、pH = 8.0

緩衝液 B : 10 mM トリス HCl、800 mM NaClO₄、pH = 8.0

カラム : DIONEX、DNAPac、PA-100、分析用、4.0 × 250 mm、品番 # 063000

カラム温度 = 60 °C

254 および 280 nm で信号をモニター

使用した勾配 :

40

【表 3 9】

Time (min)	Flow (mL/min)	% A	% B	Curve
Initial		85	15	
3	1	85	15	1
23	1	60	40	6
25	1	5	95	6
25.5	1	85	15	6
30	1	85	15	1

【1605】

実施例 5 4 精製した DMT Off オリゴヌクレオチドの分析用の一般的な UPLC - LCM S 方法 10

本実施例は、本明細書において記載されるキラル制御した合成により調製される精製したオリゴヌクレオチド組成物の UPLC - LCM S 分析を記載する。

緩衝液 A：15 mM TEA、400 mM HFIP、水

緩衝液 B：50：50 緩衝液 A / メタノール

カラム：UPLC@OST C₁₈ 1.7 μm、2.1 × 500 mm

カラム温度 = 50 °C

使用した勾配：

【表 4 0】

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.2	80	20	
2	0.2	80	20	1
22	0.2	30	70	6
25	0.2	5	95	6
25.5	0.2	80	20	6
30	0.2	80	20	1

20

【1606】

実施例 5 5 粗製 DMT Off オリゴヌクレオチドの精製用の一般的な IEX - HPLC 方法

【1607】

30

本実施例は、本明細書において記載されるキラル制御した合成により調製される粗製オリゴヌクレオチド組成物の IEX - HPLC 精製を記載する。

緩衝液 A：20 mM NaOH、pH = 11.0

緩衝液 B：20 mM NaOH、2.5 M NaCl、pH = 11.0

カラム：空のカラム Waters AP - 2 (ウォーターズ (Waters))、Source 15 Q 担体 (GEヘルスケア (GE Healthcare)) をカスタム社内充填した。個々の精製カラムを充填し、異なる立体的に純粋なオリゴヌクレオチドに使用した。

装置：P - 900 ポンプ、UPC - 900 検出器、および 50 mL 注入 Super Loop (GEヘルスケア (GE Healthcare)) を備えた AKTA 精製機 40

緩衝液ヒーター温度設定 = 70 °C

254 nm で信号をモニター

分画容量：5 mL

使用した勾配：

【表 4 1】

Time (min)	Flow (mL/min)	% A	% B	Curve
Initial		100	0	
25	10	100	0	1
40	10	85	15	6
60	10	85	15	1
80	10	70	30	6
100	10	70	30	1
140	10	60	40	6
180	10	60	40	1
200	10	45	55	6
210	10	45	55	1
211	10	100	0	6
235	10	100	0	1

10

【1608】

回収した分画を、上記の分析条件および勾配を使用して分析用 I E X - H P L C により個々に分析した。254nmのUV吸収プロファイルにより決定される95%以上の純度の精製物質を提供するため、高純度分画を集めた。

【表 4 2】

RP-HPLC of Purified DMT Off	Figure 36:
ONT-75 (All (Rp))- <u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAs</u> <u>GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC</u>	(Panel A)
ONT-80 (All (Sp))- <u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAs</u> <u>GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs 5mCs5mC</u>	(Panel B)
ONT-77 (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp)- <u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAs</u> <u>GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs</u> <u>5mCs5mC</u> (5R-10S-4R)	(Panel C)
ONT-81 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- <u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAs</u> <u>GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs</u> <u>5mCs5mC</u> (5S-10R-4S)	(Panel D)
ONT-87 (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)- <u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAs</u> <u>GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs</u> <u>5mCs5mC</u> (5R-(SSR) ₃ -5R)	(Panel E)
ONT-88 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)- <u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAs</u> <u>GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs</u> <u>5mCs5mC</u> (5S-(RRS) ₃ -5S)	(Panel F)
ONT-89 (Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)- <u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAs</u> <u>GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs</u> <u>5mCs5mC</u> ((SR) ₉ S)	(Panel G)
ONT-82 (All (Rp))- <u>GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC</u>	(Panel H)
ONT-84 (All (Sp))- <u>GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC</u>	(Panel I)
ONT-85 (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp)- <u>GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC</u> (5R- 10S-4R)	(Panel J)
ONT-86 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)- <u>GsTs5mCs5mCs5mCsTsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCsAsAsTsGs5mC</u> (5S- 10R-4S)	(Panel K)

【1609】

表 E - 2 1 実施例 X X において記載のとおり合成した立体的に純粋なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの物理化学特性の集計

【1610】

配列 A : ヒト A p o B 配列 5' - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C - 3' 。

10

20

30

40

50

【1611】

配列 B : マウス A p o B 配列 5' - G s T s 5 m C s 5 m C s 5 m C s T s G s A s A s G s A s T s G s T s 5 m C s A s A s T s G s 5 m C - 3' 。

【1612】

下線のヌクレオチドは 2' - O - M O E を示す。s = ホスホロチオエート結合である。5 m c = 5 - メチル - 2' - デオキシシチジンである。5 m c = 5 - メチル - 2' - O - M O E - シチジンである。立体構造は、オリゴヌクレオチドの所定のホスホロチオエート結合における各リン原子の立体異性体性質 (R_p / S_p) を記載する。I E X - H P L C の保持時間 (t_R) および実測分子量 (MW) 値を、精製した化合物 (上記) の対応する分析方法を使用して得た。

10

【表 4 3】

sequence ID	sequence	stereo architecture	t_R IEX-HPLC (min)	Calc MW	Found MW
ONT-41	A	Stereorandom diastereomixture	17.34	7177.2	7175.7
ONT-75	A	All R_p	16.44	7177.2	7177.0
ONT-77	A	5R-10S-4R	17.44	7177.2	7177.5
ONT-80	A	All S_p	18.13	7177.2	7175.5
ONT-81	A	5S-10R-4S	17.67	7177.2	7175.8
ONT-87	A	5R-(SSR) ₃ -5R	13.64	7177.2	-
ONT-88	A	5S-(RRS) ₃ -5S	14.88	7177.2	7177.0
ONT-89	A	(SR) ₉ S	14.25	7177.2	-

20

ONT-83	B	Stereorandom diastereomixture	17.02	7233.2	7231.8
ONT-82	B	All R_p	16.43	7233.2	7231.6
ONT-84	B	All S_p	19.51	7233.2	7232.1
ONT-85	B	5R-10S-4R	18.76	7233.2	7231.1
ONT-86	B	5S-10R-4S	18.75	7233.2	7230.9

30

【1613】

実施例 5 6 精製した D M T O f f オリゴヌクレオチドの重ね合せ分析用の一般的な R P - H P L C 方法

本実施例は、本明細書において記載されるキラル制御した合成により調製される精製したオリゴヌクレオチド組成物の R P - H P L C 分析を記載する。

40

緩衝液

A : 5 0 m M T E A A 、 p H = 7 . 0

緩衝液 B : A C N

カラム : X B r i d g e C ₁₈ 、 3 . 5 μ m 、 C ₁₈ 、 4 . 6 × 5 0 m m

カラム温度 = 5 0 ° C

2 5 4 および 2 8 0 n m で信号をモニター

50

使用した勾配：

【表 4 4】

Time(min)	Flow (mL/min)	% A	% B	Curve
Initial		95	5	
2	1	95	5	1
52	1	70	30	6
54	1	5	95	6
54.5	1	5	95	1
55	1	99	1	6
60	1	99	1	1

10

【1 6 1 4】

図 3 7 のパネル A は、精製した DMT Off オリゴヌクレオチド ONT - 7 5、ONT - 7 7、ONT - 8 0、ONT - 8 1、ONT - 8 7、ONT - 8 8、ONT - 8 9、および ONT - 4 1（ジアステレオ混合物） - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C の RP - HPLC トレースの重ね合せである。

【1 6 1 5】

図 3 7 のパネル B は、パネル A の拡大図を示し、各曲線を以下のように標識している。

【表 4 5】

Curve #	Oligonucleotide
1	diastereomixture (ONT-41)
2	all-Rp (ONT-75)
3	5R-(SSR) ₃ -5R (ONT-87)
4	(SR) ₉ -S (ONT-89)
5	5R-10S-4R (ONT-77)
6	5S-10R-4S (ONT-81)
7	5S-(RRS) ₃ -5S (ONT-88)
8	all-Sp (ONT-80)

20

30

【1 6 1 6】

図 3 8 のパネル A は、精製した DMT Off オリゴヌクレオチド ONT - 8 2、ONT - 8 4、ONT - 8 5、ONT - 8 6、および ONT - 8 3（ジアステレオ混合物） - G s T s 5 m C s 5 m C s 5 m C s T s G s A s A s G s A s T s G s T s 5 m C s A s A s T s G s 5 m C の RP - HPLC の重ね合せである。

40

【1 6 1 7】

図 3 8 のパネル B は、パネル A の拡大図を示し、各曲線を以下のように標識している。

【表 4 6】

Curve #	Oligonucleotide
1	diastereomixture (ONT-83)
2	all-Rp (ONT-82)
3	5S-10R-4S (ONT-86)
4	5R-10S-4R (ONT-85)
5	all-Sp (ONT-84)

10

【1 6 1 8】

実施例 5 7 : 熱変性実験 (T_m)

【1 6 1 9】

本実施例は、熱変性を使用して、キラル制御したオリゴヌクレオチド組成物の特性を記載している。

【1 6 2 0】

各 DNA 鎖を、1 × P B S 中で、1 μ M の等モル濃度で相補 RNA と混合した。全量 3 m L の溶液を各 2 本鎖用に調製し、混合物を 9 0 ° C で 2 分間加熱し、数時間にわたり放冷した。次に、混合物を 4 ° C で 2 時間保管した。C a r y 1 0 0 シリーズ (アジレント・テクノロジー (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s)) を使用して、0 . 5 分間隔で、1 5 . 0 ° C から開始して 9 5 . 0 ° C までの温度勾配で 0 . 5 ° C / 分で上昇させ、2 5 4 n m における吸光度を記録した。2 5 4 n m の吸光度を温度に対してプロットし、T_m 値を各曲線のそれぞれの 1 次導関数から算出した。

20

【1 6 2 1】

図 3 9 は、キラル制御したオリゴヌクレオチドおよび立体的にランダムなオリゴヌクレオチドの T_m 重ね合せを示す。

【1 6 2 2】

図 3 9 は、4 つの立体的に純粋なジアステレオ異性体ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド (a l l - R_p 2 0 量体、a l l - S_p 2 0 量体、5 R - 1 0 S - 4 R および 5 S - 1 0 R - 4 S ギャップマー (g a p m e r s)) ならびに立体的にランダムなホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間の T_m の差を示す。全 R_p ホスホロチオエート DNA は、1 番低い親和性を有する全 S_p 2 0 量体 (T_m = 7 5 . 1 ° C) と比較すると、1 番高い相補 RNA に対する親和性 (T_m = 8 5 . 1 ° C) を示す。5 R - 1 0 S - 4 R および 5 S - 1 0 R - 4 S ギャップマー (g a p m e r s)、および立体的にランダムなホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、全て中間の値 (T_m 範囲 = 8 0 . 1 ~ 8 1 . 2 ° C) を示した。

30

【1 6 2 3】

以下の表 E - 2 2 に、ヒト A p o B 配列 5 ' - G s 5 m C s 5 m C s T s 5 m C s A s G s T s 5 m C s T s G s 5 m C s T s T s 5 m C s G s 5 m C s A s 5 m C s 5 m C - 3 ' を有する、調査した立体的に純粋なホスホロチオエートオリゴヌクレオチドおよび立体的にランダムなホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの T_m 値と、ホスホロチオエートバックボーン上の様々な立体化学構造を示す。

40

表 E - 2 2

【表 4 7】

sequence ID	stereo architecture	Tm (°C)
ONT-41	Stereorandom diastereomixture	81.0
ONT-75	All Rp	85.1
ONT-77	5R-10S-4R	80.1
ONT-80	All Sp	75.1
ONT-81	5S-10R-4S	81.2

10

【1624】

実施例 58 例示的なキラル制御した S i R N A オリゴヌクレオチド標的 P C S K 9 の調製

プロタンパク質コンバーターゼサブチリシン／ケキシシ 9 型（P C S K 9）は、コレステロール代謝に関わる酵素である。P C S K 9 は低密度リボタンパク（L D L）の受容体に結合し、その破壊を誘引する。受容体が破壊される場合、受容体に随伴する L D L も除去されるが、結合している P C S K 9 の正味の影響は、実際 L D L レベルを増加させ、これは受容体がそうでなければ細胞表面へサイクルに戻り、より多くのコレステロールを除去するであろうからである。

20

【1625】

いくつかの会社は P C S K 9 を標的にする治療薬を開発している。本開示に特に関連するのは、I s i s P h a r m a c e u t i c a l s、S a n t a r i s P h a r m a および A l n y l a m P h a r m a c e u t i c a l s が P C S K 9 を阻害する核酸薬剤を開発していることである。アンチセンスオリゴヌクレオチドである I s i s P h a r m a c e u t i c a l s 製品は、マウスにおいて L D L R の発現を増加させ、循環全コレステロールレベルを減少させることを示している（G r a h a m ら "A n t i s e n s e i n h i b i t i o n o f p r o p r o t e i n c o n v e r t a s e s u b t i l i s i n / k e x i n t y p e 9 r e d u c e s s e r u m L D L i n h y p e r l i p i d e m i c m i c e". J. L i p i d R e s. 48 (4): 763-7, April 2007)。A l n y l a m P h a r m a c e u t i c a l s 製品の A L N - P C S での初期臨床試験では、RNA 干渉が P C S K 9 を阻害する効果的な機構を与えることを明らかにしている（F r a n k - K a m e n e t s k y ら "T h e r a p e u t i c R N A i t a r g e t i n g P C S K 9 a c u t e l y l o w e r s p l a s m a c h o l e s t e r o l i n r o d e n t s a n d L D L c h o l e s t e r o l i n n o n h u m a n p r i m a t e s". P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. 105 (33): 11915-20, August 2008)。

30

40

【1626】

本実施例は、キラル制御したまたは立体的にランダムな、P C S K 9 を対象とする様々な s i R N A 薬剤を記載する。詳細には、この実施例は、以下の表 E - 23 に示すとおり、以下の各オリゴヌクレオチド組成物の調製を記載する。

表 E - 23

【表 4 8】

ONT #	Sequence	Type
ONT-106	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sense
ONT-107	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sense
ONT-108	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-109	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-110	(Rp, Rp)- asAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-111	(Sp, Rp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-112	(Sp, Sp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense
ONT-113	(Rp, Sp)- asGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisense

10

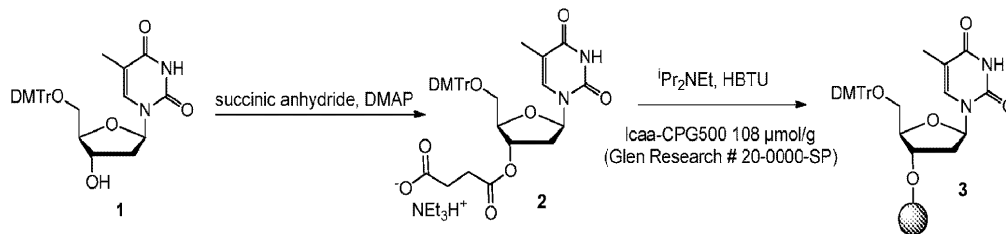
注記：小文字は 2' OMe RNA 残基を表し；大文字は 2' OH RNA 残基を表し；太字および斜体の「s」はホスホロチオエート部を示す。

【1627】

これらのオリゴヌクレオチドの調製において使用した Lcaa-CPG-500 は、以下の反応に従って調製した。

20

【化 4 4 8】



【1628】

30

具体的には、5'-O-DMTr-2'-デオキシチミジン（1）（4.28 g、7.86 mmol）を無水DCM（50 mL）に溶解し、2当量の無水コハク酸（1.57 g、15.7 mmol）、および3当量の4-N,N-ジメチルアミノピリジン（2.88 g、23.6 mmol）と混合した。反応物をアルゴン下、室温で攪拌した。TLCにより決定されるように、出発物質が完全に消費された後（1時間）、溶媒を蒸発させて乾燥し、粗製残渣を1%のトリエチルアミンを含有するDCMに溶解し、次に2%のトリエチルアミンを含有するDCM中のMeOHの0~2%勾配を使用して、フラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。エバポレーション後の高純度化合物（2）の収量は5.5 g、94%であった。生成した5'-O-DMTr-2'-デオキシチミジン-3'-O-コハク酸エステル（2）（0.60 g、0.81 mmol）、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.71 mL、4.02 mmol）およびCPG-500（10 g）をDMF（50 mL）に入れ、次にHBTU（0.37 g、0.97 mmol）を加えた。混合物を2時間振とうし、その後ろ過した。担体をDMF、MeOH、そして最後にDCMで洗浄し、次に真空下で乾燥した。トリチル陽イオン分析（504 nmでモニター）は、担体（3）へのヌクレオシドの積載量は38 μmol/gであることを示した。

40

【1629】

上記表E-23に示されるとおり、2'-OHおよび2'-OMeホスホジエステルならびに立体的に規定された2'-デオキシおよび2'-OMeホスホロチオエートジエステルヌクレオチド間結合を含有する各ヌクレオチドを、ABI394 DNA/RNA合成装置で、表E-24および表E-25にそれぞれまとめたサイクルに従って、130 m

50

g (4.9 μmol) のサクシニルで結合した 5' - O - DMTr - 2' - デオキシチミジン (38 $\mu\text{mol/g}$) を充填した 10 μmol 容量の合成カラムを使用して合成した。合成前に、予備キャッピングステップ (キャッピング 2) を行い、末端 5' - O - DMTr 基を除去して合成を終了した。酸化ステップは、市販の *tert* - ブチルヒドロペルオキシド (TBHP) の 5 ~ 6 M デカン溶液を使用して行い、次にこれを 4 部のジクロロメタンで希釈した。立体特異的硫化ステップは、0.3 M メチルチオスルホン酸 S - シアノエチル試薬を使用して、対応するキラルホスホラミドのカップリングおよび 2 ステップのキャッピングステップ後に行った (表 E - 25)。

【1630】

自動化オリゴヌクレオチド合成サイクルが完了し、最終 5' - O - DMTr 基を除去したら、合成カラムを DNA/RNA 合成装置から外し、真空下で乾燥した。10 mL 溶液の 0.5 M 1, 5 - ジアザビシクロ (4.3.0) ノナ - 5 - エン (DBN)、ACN 中の 0.25 M N, O - ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセタミド (BSTFA) を 1 分間、流れを止めずに、合成カラムの一端に取り付けられたシリンジを使用して、合成カラムを通して連続的に担体に加えた。次に担体を無水 ACN で洗浄し、真空下で乾燥した。次に、乾燥した担体を空のスクリー蓋プラスチックバイアルへ移し、40 %

MeNH₂ 水溶液 (0.5 mL) と 60 °C で 10 分間処理した。その後、バイアルをただちに冷却し、DMSO (0.5 mL) で希釈後、担体をろ過により除去し、DMSO (1 mL) で再度洗浄し、ろ過した。ろ液を冷却し、次にただちに 3 HF · Et₃N (0.75 mL) と 60 °C で 10 分間処理し、次にただちに冷凍し、精製前に 4 °C で保管した。

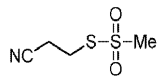
表 E - 24 DNA/RNA 合成装置 ABI 394 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要 (2' - O - TBDMS および 2' - OMe 置換 RNA サイクル)

【表 49】

step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	detritylation	3% TCA in DCM	3 + 120 + 10	N. A.
0.15 M				
2	coupling	phosphoramidite in ACN + 2 M CMPT in ACN	7 + 6	30 + 600
5% Pac ₂ O in THF/2,6-				
3	capping	lutidine + 16% NMI in THF	10	20
1.1 M <i>tert</i> -butyl				
4	oxidation	hydroperoxide in 4:1 dichloromethane:decane	20	110

表 E - 25 DNA/RNA 合成装置 ABI 394 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要 (立体的に規定されたホスホロチオエート 2' - デオキシおよび 2' - OMe RNA サイクル)

【表 5 0】

step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	deprotection	3% TCA in DCM	3 + 120 + 10	N. A.
2	coupling	0.15 M chiral phosphoramidite in ACN + 2 M CMPT in ACN	8 + 6	30 + 900 (2'-OMe RNA) 30 + 600 (DNA)
3	capping 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine	30	60
4	capping 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine + 16% NMI in THF	30	60
5	sulfurization	0.3 M S-(2-cyanoethyl) methylthiosulfonate  in ACN/BSTFA	15 + 3×4	120 + 3×60 + 300

10

20

【1 6 3 1】

実施例 5 9 粗製および生成した DMT Off RNA オリゴヌクレオチドの分析用の一般的な IEX - HPLC 方法

緩衝液 A : 20 mM リン酸ナトリウム、pH = 11.0

緩衝液 B : 20 mM リン酸ナトリウム、1 M NaBr、pH = 11.0

カラム : DIONEX、DNA Pac、PA-100、分析用、4.0 × 250 mm

カラム温度 : 60 °C

254 nm および 280 nm で信号をモニター

使用した勾配 :

【表 5 1】

Time (min)	Flow (mL/min)	% A	% B	Curve
Initial		95	5	
3	1	95	5	1
23	1	20	80	6
25	1	5	95	6
25.5	1	95	5	6
30	1	95	5	1

40

【1 6 3 2】

実施例 6 0 精製した DMT Off RNA オリゴヌクレオチドの分析用の一般的な UPLC - LCMS 方法

緩衝液 A : 15 mM TEA、400 mM HFIP、水

緩衝液 B : 50 : 50 緩衝液 A / メタノール

カラム : UPLC@OST C₁₈ 1.7 μm、2.1 × 500 mm

カラム温度 = 50 °C

使用した勾配 :

【表 5 2】

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.2	95	5	
10	0.2	35	65	6
12	0.2	5	95	6
12.5	0.2	95	5	6
15	0.2	95	5	1

【1 6 3 3】

実施例 6 1 粗製 D M T r O f f R N A オリゴヌクレオチドの精製用の一般的な I E X - H P L C 方法

緩衝液 A : 2 0 m M N a O H、p H = 8 . 5

緩衝液 B : 2 0 m M N a O H、1 M N a B r、p H = 8 . 5

カラム : 空のカラム W a t e r s A P - 2 (ウォーターズ (W a t e r s))、S o u r c e 1 5 Q 担体 (G E ヘルスケア (G E H e a l t h c a r e)) をカスタム自家充填した。同一の精製カラムを異なる立体的に純粋なオリゴヌクレオチドに使用した。

装置 : 2 5 2 5 2 成分勾配モジュール、2 4 8 7 2 波長吸光度検出器、および 2 0 m L F l e x 注入器を備えた W a t e r s H P L C ユニット (ウォーターズ (W a t e r s))。

緩衝液ヒーター温度設定 = 7 0 °C

2 5 4 n m および 2 8 0 n m で信号をモニター

分画容量 : 4 . 5 m L

使用した勾配 :

【表 5 3】

Initial		100	0	
10	10	100	0	1
25	10	80	20	6
85	10	67.5	32.5	6
95	10	67.5	32.5	1
155	10	55	45	6
165	10	0	100	6
170	10	100	0	6
180	10	100	0	1

【1 6 3 4】

回収した分画を、上記の分析条件および勾配を使用して分析用 I E X - H P L C により個々に分析した。2 5 4 n m の U V 吸収プロファイルにより決定される 9 5 % 以上の純度の精製物質を提供するため、高純度分画を集めた。

【1 6 3 5】

実施例 6 2 精製した R N A オリゴヌクレオチドの脱塩用の一般的な R P - S e p - P a k 方法

【1 6 3 6】

保存した純粋な分画の溶液を、水で前調整した S e p - P a k カートリッジ (ウォーターズ (W a t e r s))、S e p - P a k V a c 3 5 c c (1 0 g) C _{1 8} カートリッジ) に充填した。試料 (1 0 0 m L) を充填後、カートリッジをミリ Q 水 (5 0 m L) で洗浄し、全ての塩を除去し、次に 5 0 % A C N / 水で洗浄して、全長脱塩 R N A オリゴヌクレオチドを溶出させた。回収した溶液を真空下で 5 m L の体積になるまで濃縮し、水から凍結乾燥した。

【1 6 3 7】

実施例 6 3 キラル制御したオリゴヌクレオチド鎖を使用した、2 本鎖 s i R N A 薬剤の調製

【1 6 3 8】

10

20

30

40

50

本実施例は、上記のキラル制御したオリゴヌクレオチド鎖の熱アニーリングによる 2 本鎖 s i R N A 薬剤の調製を記載する。

【 1 6 3 9 】

各 R N A 鎖を、1 × P B S 中で、1 0 μ M の等モル濃度で相補 R N A 鎖と混合した。全量 0 . 5 m L の溶液を各 2 本鎖用に調製し、混合物を 9 0 ° C で 2 分間加熱し、数時間にわたり放冷した。次に、混合物を 4 ° C で保管した。使用した R N A 鎖の物理化学特性を表 E - 2 6 に示す。

表 E - 2 6

【表 5 4 】

duplex ID	sequence	sequence ID	stereo architecture	Calc MW	Found MW

ONT D-1	S	ONT-116	Stereorandom diastereomixture	6735.4	6734.9
	AS1	ONT-114	Stereorandom diastereomixture	6805.4	6805.2
ONT D-2	S	ONT-107	Sp	6735.4	6736.6
	AS1	ONT-109	Sp	6805.4	6801.6
ONT D-3	S	ONT-106	Rp	6735.4	6731.8
	AS1	ONT-109	Sp	6805.4	6801.6
ONT D-4	S	ONT-107	Sp	6735.4	6736.6
	AS1	ONT-108	Rp	6805.4	6799.2
ONT D-5	S	ONT-106	Rp	6735.4	6731.8
	AS1	ONT-108	Rp	6805.4	6799.2
ONT D-7	S	ONT-116	Stereorandom diastereomixture	6735.4	6734.9
	AS2	ONT-115	Stereorandom diastereomixture	6835.5	6835.2
ONT D-8	S	ONT-106	Rp	6735.4	6731.8
	AS2	ONT-110	Rp, Rp	6835.5	6832.3
ONT D-9	S	ONT-107	Sp	6735.4	6736.6
	AS2	ONT-110	Rp, Rp	6835.5	6832.2
ONT D-10	S	ONT-106	Rp	6735.4	6731.8
	AS2	ONT-111	Sp, Rp	6835.5	6832.4
ONT D-11	S	ONT-107	Sp	6735.4	6736.6
	AS2	ONT-111	Sp, Rp	6835.5	6832.4
ONT D-12	S	ONT-106	Rp	6735.4	6731.8
	AS2	ONT-112	Sp, Sp	6835.5	6836.2
ONT D-13	S	ONT-107	Sp	6735.4	6736.6
	AS2	ONT-112	Sp, Sp	6835.5	6836.2
ONT D-14	S	ONT-106	Rp	6735.4	6731.8
	AS2	ONT-113	Rp, Sp	6835.5	6834.6

ONT D-15	S	ONT-107	Sp	6735.4	6736.6
	AS2	ONT-113	Rp, Sp	6835.5	6834.6

【1640】

使用したオリゴヌクレオチド配列、ヒトPCSK9 siRNA：センス鎖（S）5' - uuc uAGAccuGuuuuGcuudTs dT - 3'；アンチセンス鎖1（AS1）5' - AAGcAAAAcAGGUCuAGAA dTs dT - 3'；アンチセンス鎖2（AS2）5' - asAGcAAAAcAGGUCuAGAA dTs dT - 3'。大文

10

20

30

40

50

字ヌクレオチド：RNA、小文字ヌクレオチド 2' - OMe、d = 2' - デオキシ、s = ホスホロチオエート。立体構造は、オリゴヌクレオチドの所定のホスホロチオエート結合における各リン原子の立体異性体性質（R_p / S_p 絶対配置）を記載する。実測分子量（MW）値を、精製した化合物（上記）の対応する分析方法を使用して得た。

【1641】

図51は、IEX-HPLCプロファイルの重ね合わせを示し、立体的に純粋なRNAオリゴヌクレオチド間の保持時間の違いを示す。

【表55】

Curve #	Oligonucleotide
1	ONT-109 (Sp)
2	ONT-114 (diastereomixture)
3	ONT-108 (Rp)

10

【1642】

図52は、IEX-HPLCプロファイルの重ね合わせを示し、立体的に純粋なRNAオリゴヌクレオチド間の保持時間の違いを示す。

【表56】

Curve #	Oligonucleotide
1	ONT-109 (Rp)
2	ONT-114 (diastereomixture)
3	ONT-107 (Sp)

20

【1643】

上記に詳細に例示した、調製したキラル制御 siRNA オリゴヌクレオチドに加え、本発明は、いくつかのキラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および全キラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する siRNA 鎖の調製も提供する。

30

【1644】

例えば、本発明に従って、2' - O - PivOM (Debartら、Chem. Eur. J., 2008, 14, 9135)、2' - O - CEM (Ohgiら、Org. Lett., 2005, 7, 7913; Wadara、J. Org. Chem., 2012, 77, 7913)、2' - O - TOM (Pitschら、Helv. Chim. Acta, 2001, 84, 3773)、または2' - O - TC (Dellingerら、J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 11540)等の適切な2' - OH保護基を有する適切なキラルRNA 3' - ホスホラミダイトを使用して、複数のキラルホスホロチオエート結合をRNAオリゴヌクレオチド内に導入する。いくつかのキラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および全キラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する以下のヒトPCSK9 siRNA センス鎖のそれぞれを、本発明に従って調製することができる。

40

【表 5 7】

	PCSK9 siRNA Sense Strands
PCSK9 (1)	(All (Sp))- ususcusAsGsAscscsusGsusususGsuscusdTsdT
PCSK9 (2)	(All (Rp))- ususcusAsGsAscscsusGsusususGsuscusdTsdT
PCSK9 (3)	(All (Sp))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuudTsdT
PCSK9 (4)	(All (Rp))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuudTsdT
PCSK9 (5)	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-ususcusAsGsAscscsusGsusususGsuscusdTsdT
PCSK9 (6)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-ususcusAsGsAscscsusGsusususGsuscusdTsdT

10

注記：小文字は 2' - OMe RNA 残基を表し；大文字は RNA 残基を表し；d = 2' - デオキシ残基であり；「s」はホスホロチオエート部を示す。

【1645】

いくつかのキラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および全キラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有するヒト PCSK9 siRNA アンチセンス鎖の合成例。

20

【表 5 8】

	Human PCSK9 siRNA Antisense Strands
PCSK9 (7)	(All (Rp))- AsAsGscsAsAsAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (8)	(All (Sp))- AsAsGscsAsAsAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (9)	(All (Rp))- AsAGcAAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (10)	(All (Sp))- AsAGcAAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (11)	(All (Rp))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAAdTsdT
PCSK9 (12)	(All (Sp))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAAdTsdT
PCSK9 (13)	(All (Rp))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (14)	(All (Sp))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (15)	(All (Rp))- AsAGcAAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (16)	(All (Sp))- AsAGcAAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (17)	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)-AsAGcAAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT
PCSK9 (18)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-AsAGcAAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT

30

40

注記：小文字は 2' - OMe RNA 残基を表し；大文字は RNA 残基を表し；d = 2' - デオキシ残基であり；「s」はホスホロチオエート部を示す。

【1646】

代替的にまたは追加的に、本発明は、いくつかのキラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および全キラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合、ならびに全修飾リボース部を有する siRNA 2 本鎖の調製を提供する。

50

【 1 6 4 7 】

例えば、特定の実施形態においては、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'-F)または2'-O-メチル(2'-OMe)等の対応する所望のリボース2'-化学修飾を有する適切なキラルRNA 3'-ホスホラミダイトを使用して、複数のキラルホスホロチオエート結合を、全リボース修飾RNAオリゴヌクレオチド内に導入する。2、3個の例を挙げれば、いくつかのキラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および全キラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する、以下のヒトPCSK9 siRNA全修飾2'-F/2'-OMeセンス鎖のそれぞれを調製することができる。

【表 5 9】

[illegible]

10

	Sp)- UfsusCfsusAfsGsAfsCsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT
PCSK9 (24)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)- UfsusCfsusAfsGsAfsCsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT

20

注記：小文字は 2' - OMe RNA 残基を表し；大文字は 2' - F RNA 残基を表し；d = 2' - デオキシ残基であり；「s」はホスホロチオエート部を示す。

【 1 6 4 8 】

いくつかのキラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および全キラルホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有するヒトPCSK9 siRNA全修飾2'-F/2'-OMeアンチセンス鎖の合成例。

【表 6 0】

	Human PCSK9 siRNA fully modified 2'-F/2'-OMe Antisense Strands
PCSK9 (25)	(All (Rp))- asAfsgsCfsasAfsasAfscsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (26)	(All (Sp))- asAfsgsCfsasAfsasAfscsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (27)	(All (Rp))- asAfgCfaAfaAfcsAfsgsGfsusCfsusA fsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (28)	(All (Sp))- asAfgCfaAfaAfcsAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (29)	(All (Rp))- asAfsgCfsaAfsaAfcAfgGfsuCfsuAfgsAfsadTsdT
PCSK9 (30)	(All (Sp))- asAfsgCfsaAfsaAfcAfgGfsuCfsuAfgsAfsadTsdT
PCSK9 (31)	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)- asAfgCfaAfasAfscAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT
PCSK9 (32)	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)- asAfgCfaAfasAfscAfsgsGfsusCfsusAfsgsAfsasdTsdT

30

40

注記：小文字は 2' - OMe RNA 残基を表し；大文字は 2' - F RNA 残基を表し；d = 2' - デオキシ残基であり；「s」はホスホロチオエート部を示す。

【 1 6 4 9 】

2本鎖を構築するため、RNA鎖熱アニーリングおよびsiRNA 2本鎖の調製を行う。詳細には、各RNA鎖を、1×PBS中で、10 μMの等モル濃度で相補RNA鎖と混

50

合する。全量 0.5 mL の溶液を各 2 本鎖用に調製し、混合物を 90 °C で 2 分間加熱し、数時間にわたり放冷する。その後、混合物を 4 °C で保管する。

【1650】

熱 RNA 鎖アニーリングステップ後、全ての可能な siRNA 2 本鎖の組合せを、アンチセンス鎖の任意の可能な相補鎖と、任意のセンス鎖をアニーリングすることにより調製することができる。

【1651】

HeLa 細胞または Hep3B 細胞（例えば、本明細書において記載されるとおり）におけるトランスフェクション後、調製した全ての siRNA 2 本鎖を、その PCSK9 遺伝子サイレンシング特性について生体外で評価することができる。本発明に従って、異なる 2 本鎖に対し、異なる有効性を観測してもよく、例えばキラルホスホロチオエートバックボーン結合の数、位置および／または立体構造において異なり、任意に 1 以上の他の化学修飾の存在、レベルおよび／または型において異なる。

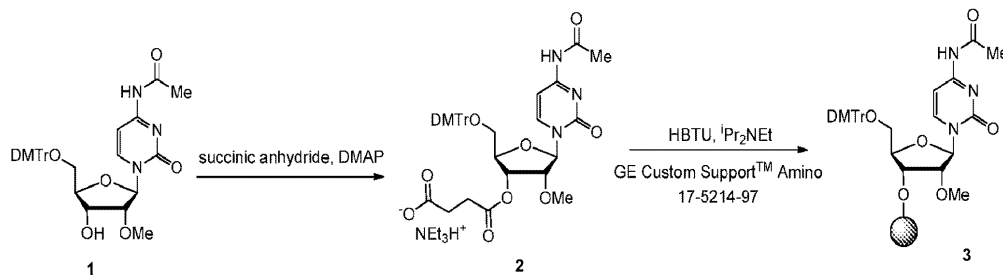
【1652】

例えばヌクレアーゼ抵抗性、細胞浸透、エンドソームエスケープ、2 本鎖熱力学安定性、2 本鎖の 3 次元構造、様々な酵素相互作用の機構ステップに対する親和性、標的 mRNA に対する親和性、特異的オフターゲット効果、免疫刺激、作用持続時間、薬物動態等の、任意のまたは全ての siRNA 特性を、上記のキラルホスホロチオエートバックボーン結合の立体化学により調節してもよく、影響されてもよい。

【1653】

実施例 64 キラル制御したオリゴヌクレオチド製剤の調製

【化 449】



【1654】

本実施例は、本明細書において記載される特定のオリゴヌクレオチドの、多様な特定のキラル制御した組成物の調製を記載する。

【1655】

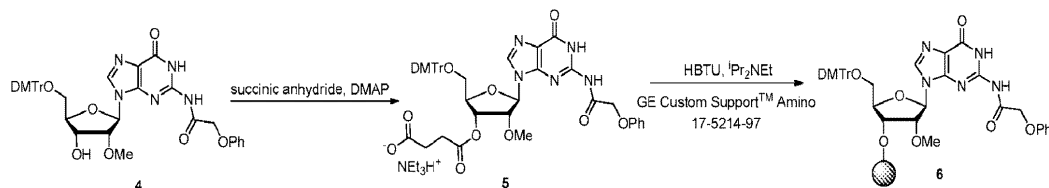
N⁴-アセチル-5'-O-DMTr-2'-O-メチルシチジン (1) (1.15 g、1.91 mmol) を無水 DCM (20 mL) に溶解し、2 当量の無水コハク酸 (0.383 g、3.82 mmol)、および 3 当量の 4-N, N-ジメチルアミノピリジン (0.701 g、5.73 mmol) と混合した。反応物をアルゴン下、室温で攪拌した。TLC により決定されるように、出発物質が完全に消費された後 (1 時間)、溶媒を蒸発させて乾燥し、粗製残渣を 1 % のトリエチルアミンを含有する DCM に溶解し、次に 2 % のトリエチルアミンを含有する DCM 中の MeOH の 0 ~ 2 % 勾配を使用して、フラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。蒸発後の高純度化合物 (2) の収量は 1.50 g、98 % であった。MS (ESI +ve) : 計算値 (M+H)⁺ : 702.27、実測値 : 702.34。生成した N⁴-アセチル-5'-O-DMTr-3'-O-サクシニル-2'-O-メチルシチジン (2) (0.18 g、0.22 mmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、0.79 mmol) および GE Custom Support (商標) Amino (1 g) を DMF (5 mL) に入れ、次に HBTU (0.10 g、0.26 mmol) を加えた。混合物を 2 時間振とうし、その後ろ過した。担体を DMF、MeOH、そして最後に DCM で洗浄し、次に真空下で乾燥した。トリチル陽イオン分析 (504 nm でモニター) は、担体 (3) へのヌクレオシドの

積載量は $180 \mu\text{mol/g}$ であることを示した。

【1656】

実施例 65 キラル制御したオリゴヌクレオチド製剤の調製

【化 450】



【1657】

実施例 64 において記載の手順と類似の手順を使用して、 N^4 -フェノキシアセチル-5'-O-DMTr-3'-O-サクシニル-2'-O-メチルグアノシン (4、MS (ESI+ve) : 計算値 $(M+H)^+$: 834.30、実測値 : 834.32) を GE Custom Support (商標) Amino に充填した。トリチル陽イオン分析 (504 nm でモニター) は、担体 (6) へのヌクレオシドの積載量は $140 \mu\text{mol/g}$ であることを示した。

【1658】

いくつかの実施例においては、立体的に規定された 2'-OMe ホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有するヌクレオチドを、ABI 394 DNA/RNA 合成装置で、表 E-27 にまとめたサイクルに従って、60 mg (それぞれ 10.8 および 8.4 μmol) の未キャップのサクシニルで結合した 5'-O-DMTr-2'-O-メチル-G^{Pac} (6、 $140 \mu\text{mol/g}$) または 5'-O-DMTr-2'-O-メチル-C^{Ac} (3、 $180 \mu\text{mol/g}$) のいずれかを充填した $10 \mu\text{mol}$ 容量の合成カラムを使用して合成した。合成サイクルは、予備キャッピングステップ (キャッピング 2) と、末端 5'-O-DMTr 基の除去とともに行った。立体特異的硫化ステップは、BSTFA を含有する ACN 中の 0.3 M メチルチオスルホン酸 S-(2-シアノエチル) 試薬を使用して、対応するキラルホスホラミドのカップリングおよび 2 ステップのキャッピングステップ後に行った (表 E-27)。

【1659】

自動化オリゴヌクレオチド合成サイクルが完了し、最 5'-O-DMTr 基を除去したら、合成カラムを DNA/RNA 合成装置から外し、真空下で乾燥した。乾燥した担体を空のガラスマニュアルペプチド合成装置に移し、10 mL 溶液の 0.5 M 1, 5-ジアザビシクロ (4.3.0) ノナ-5-エン (DBN)、ACN 中の 0.25 M N, O-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセタミド (BSTFA) を 5 分間、流れを止めずに連続的に、マニュアルペプチド合成装置内で担体に加えた。担体を ACN で洗浄し、真空下で乾燥した。次に担体を 5% EtOH/濃 NH_3 (20 mL) と 60 °C で 6 時間処理し、室温で 12 時間放置した。担体をろ過により除去し、濃 NH_3 で洗浄した。ろ液を真空下で濃縮し、その後 IEX により精製した。

表 E-27 オリゴヌクレオチド合成の概要

【表 6 1】

step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	detritylation	3% TCA in DCM	3 + 120 + 10	N. A.
2	coupling	0.15 M phosphoramidite in ACN + 2 M CMPT in ACN	8 + 6	30 + 900
3	capping 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6-lutidine	30	60
4	capping 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6-lutidine + 16% NMI in THF	30	60
5	sulfurization	0.3 M (S-cyanoethyl)-methylthiosulfonate <chem>NCSC(=O)(=O)C</chem> in ACN/BSTFA	15 + 3×4	120 + 3×60 + 300

10

20

【1660】

オリゴヌクレオチド ONT - 94 の合成：(A l l (S p)) - g s g s u s g s g s a s a s g s g s c。t_R (I E X - H P L C)：18. 26 分。計算値の MW：3563. 9；実測値の MW：3562. 6。

【1661】

オリゴヌクレオチド ONT - 96 の合成：(A l l (R p)) - g s g s u s g s g s a s a s g s g s c。t_R (I E X - H P L C)：18. 16 分。計算値の MW：3563. 9；実測値の MW：3561. 7。

30

【1662】

オリゴヌクレオチド ONT - 98 の合成：(R p、S p、R p、S p、R p、S p、R p、S p、R p) - g s g s u s g s g s a s a s g s g s c。t_R (I E X - H P L C)：18. 05 分。計算値の MW：3563. 9；実測値の MW：3562. 5。

【1663】

オリゴヌクレオチド ONT - 100 の合成：(S p、R p、S p、R p、S p、R p、S p、R p、S p) - g s g s u s g s g s a s a s g s g s c。t_R (I E X - H P L C)：17. 86 分。計算値の MW：3563. 9；実測値の MW：3561. 1。

40

【1664】

オリゴヌクレオチド ONT - 102 の合成：(R p、R p、S p、S p、S p、S p、S p、R p、R p) - g s g s u s g s g s a s a s g s g s c。t_R (I E X - H P L C)：18. 30 分。計算値の MW：3563. 9；実測値の MW：3561. 3。

【1665】

オリゴヌクレオチド ONT - 104 の合成：(S p、S p、R p、R p、R p、R p、R p、S p、S p) - g s g s u s g s g s a s a s g s g s c。t_R (I E X - H P L C)：17. 95 分。計算値の MW 3563. 9；実測値の MW：3562. 7。

【1666】

オリゴヌクレオチド ONT - 95 の合成：(A l l (S p)) - g s c s c s u s c s

50

c s a s g。t_R (I E X - H P L C) : 1 4 . 7 8 分。計算値のMW : 2 7 0 9 . 2 ;
実測値のMW : 2 7 0 7 . 4。

【1667】

オリゴヌクレオチドONT - 97の合成 : (A l l (R p)) - g s c s c s u s c s c s a s g。t_R (I E X - H P L C) : 1 5 . 6 0 分。計算値のMW : 2 7 0 9 . 2 ;
実測値のMW : 2 7 0 8 . 3。

【1668】

オリゴヌクレオチドONT - 99の合成 : (R p、S p、R p、S p、R p、S p、R p) - g s c s c s u s c s c s a s g。t_R (I E X - H P L C) : 1 6 . 1 0 分。計算値のMW : 2 7 0 9 . 2 ; 実測値のMW : 2 7 0 8 . 0。

10

【1669】

オリゴヌクレオチドONT - 101の合成 : (S p、R p、S p、R p、S p、R p、S p) - g s c s c s u s c s c s a s g。t_R (I E X - H P L C) : 1 6 . 2 3 分。計算値のMW : 2 7 0 9 . 2 ; 実測値のMW : 2 7 0 8 . 2。

【1670】

オリゴヌクレオチドONT - 103の合成 : (R p、R p、S p、S p、S p、R p、R p) - g s c s c s u s c s c s a s g。t_R (I E X - H P L C) : 1 6 . 2 6 分。計算値のMW : 2 7 0 9 . 2 ; 実測値のMW : 2 7 0 7 . 8。

【1671】

オリゴヌクレオチドONT - 105の合成 : (S p、S p、R p、R p、R p、S p、S p) - g s c s c s u s c s c s a s g。t_R (I E X - H P L C) : 1 6 . 2 2 分。計算値のMW : 2 7 0 9 . 2 ; 実測値のMW : 2 7 1 0 . 0。

20

【1672】

立体的に規定されたキメラ2' - OMeホスホロチオエートトリエステルおよび2' - O - MOEホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを、ABI 394 DNA/RNAで、本明細書の実施例において記載される手法と類似の手法で合成した。

【1673】

オリゴヌクレオチドONT - 90の合成 : (A l l (R p)) - G_{MOES} G_{MOES} u s G_{MOES} G_{MOES} a s a s G_{MOES} G_{MOES} c。t_R (I E X - H P L C) : 1 5 . 3 5 分。計算値のMW : 3 8 2 8 . 2 ; 実測値のMW : 3 8 2 6 . 5。

30

【1674】

オリゴヌクレオチドONT - 119の合成 : (A l l (S p)) - G_{MOES} G_{MOES} s u s G_{MOES} G_{MOES} a s a s G_{MOES} G_{MOES} c。t_R (I E X - H P L C) : 1 6 . 4 2 分。計算値のMW : 3 8 2 8 . 2 ; 実測値のMW : 3 8 2 7 . 2。

【1675】

オリゴヌクレオチドONT - 91の合成 : (A l l (R p)) - G_{MOES} c s c s u s c s c s a s g。t_R (I E X - H P L C) : 1 5 . 6 9 分。計算値のMW : 2 7 5 3 . 3 ; 実測値のMW : 2 7 5 1 . 5。

【1676】

オリゴヌクレオチドONT - 120の合成 : (A l l (S p)) - G_{MOES} c s c s u s c s c s a s g。t_R (I E X - H P L C) : 1 4 . 7 1 分。計算値のMW : 2 7 5 3 . 3 ; 実測値のMW : 2 7 5 1 . 4。

40

【1677】

実施例66 粗製および精製したDMT Off R I P t i d eオリゴヌクレオチドの分析用の一般的なIEX - HPLC方法 :

緩衝液A : 10mM トリスHCl、50% ACN、pH = 8.0

緩衝液B : 10mM トリスHCl、800mM NaClO₄、50% ACN、pH = 8.0

カラム : D I O N E X、D N A P a c、P A - 100、分析用、4.0 × 250mm

50

カラム温度 = 60 °C

254 および 280 nm で信号をモニター

使用した勾配：

【表 6 2】

Time (min)	Flow (mL/min)	% A	% B	Curve
Initial		95	5	
2	1	95	5	1
22	1	70	30	6
25	1	5	95	6
25.5	1	95	5	6
30	1	95	5	1

10

【1678】

実施例 67 精製した DMT Off R I P t i d e オリゴヌクレオチドの分析用の一般的な U P L C - L C M S 方法：

緩衝液 A：15 mM T E A、400 mM H F I P、水

緩衝液 B：50：50 緩衝液 A / メタノール

カラム：U P L C @ O S T C₁₈ 1.7 μm、2.1 × 500 mm

カラム温度 = 50 °C

使用した勾配：

【表 6 3】

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.2	80	20	
2	0.2	80	20	1
22	0.2	30	70	6
25	0.2	5	95	6
25.5	0.2	80	20	6
30	0.2	80	20	1

20

【1679】

実施例 68 粗製 DMT Off R I P t i d e オリゴヌクレオチドの精製用の一般的な I E X - H P L C 方法

30

緩衝液 A：20 mM N a O H、pH = 11.0

緩衝液 B：20 mM N a O H、2.5 M N a C l、pH = 11.0

カラム：空のカラム W a t e r s A P - 2 (ウォーターズ (W a t e r s))、S o u r c e 1 5 Q 担体 (G E ヘルスケア (G E H e a l t h c a r e)) をカスタム社内充填した。同一の精製カラムを異なる立体的に純粋な R I P t i d e オリゴヌクレオチドに使用した。

装置：P - 900 ポンプ、U P C - 900 検出器、および 50 mL 注入 S u p e r L o o p (G E ヘルスケア (G E H e a l t h c a r e)) を備えた A K T A 精製機

緩衝液ヒーター温度設定 = 70 °C

カラムヒーターテープ設定 = 70 °C

40

254 nm で信号をモニター

分画容量：5 mL

使用した勾配：

【表 6 4】

Time (min)	Flow (mL/min)	% A	% B	Curve
Initial		100	0	
15	4	100	0	1
25	4	90	10	6
35	4	90	10	1
45	4	80	20	6
60	4	80	20	1
80	4	65	35	6
95	4	65	35	1
120	4	45	55	6
125	4	45	55	1
126	4	100	0	6
140	4	100	0	1

10

【1680】

回収した分画を、上記の分析条件および勾配を使用して分析用 I E X - H P L C により個々に分析した。254nmのUV吸収プロファイルにより決定される95%以上の純度の精製物質を提供するため、高純度分画を集めた。

【1681】

精製したR I P t i d e オリゴヌクレオチドの脱塩用の一般的なR P - S e p - P a k 方法。保存した純粋な分画の溶液を、水で前調整したS e p - P a k カートリッジ（ウォーターズ（W a t e r s）、S e p - P a k V a c 35cc（10g）C₁₈カートリッジ）に充填した。試料（100mL）を充填後、カートリッジをミリQ水（50mL）で洗浄し、全ての塩を除去し、次に50% A C N / 水で洗浄して、全長脱塩R N A オリゴヌクレオチドを溶出させた。回収した溶液を真空下で5mLの体積になるまで濃縮し、水から凍結乾燥した。

20

【1682】

むき出しのh T Rに結合する立体制御した全ホスホロチオエート修飾R I P t i d e（8量体または10量体）のパネルを、テロメラゼR N P複合体の活性の生体外阻害について調べる。C y 5 - T R A P アッセイ（Shayら、Nat. Protoc., 2006, 1, 1583）、T R A Pの変形（Shayら、Science, 1994, 266, 2011）を使用して、H e L a細胞抽出物を使用して、以前に報告されたプロトコルに従って（Verdineら、J. Biol. Chem., 2012, 287, 18843）、立体制御したホスホロチオエートR I P t i d eのI C₅₀値を決定する。

30

【1683】

定量系として蛍光を使用する以前に報告されたプロトコルに従って、いくつか修正して、T R A P アッセイを行う。簡単に言うと、テロメラゼによる蛍光性人工基質の伸長を30℃で30分行い、その後30PCRサイクルで増幅する（34℃ 30秒、59℃ 30秒、72℃ 1分）。複製実験においては、R I P t i d eの阻害活性は、最初はH e L a細胞抽出物において評価し、600pM～60μMの濃度範囲を使用する。選択したR I P t i d eでの実験をH e L a、D U 1 4 5（前立腺がん）およびH E K 2 9 3細胞抽出物において0.06pM～60μMの濃度範囲で繰り返す。これらのアッセイにおいてはいくつかのコントロールを使用する：正の対照を（未処理の細胞可溶化物）、負の対照（緩衝液のみ、熱失活し、R N a s e 処理した細胞抽出物）およびPCR増幅コントロール（テロメラゼ伸長後、PCR前に添加する60μMのR I P t i d e）。特定の実施形態においては、キラル制御したR I P t i d e薬剤は、正の対照と比較してh T Rの阻害の増大を示し、かつ／または、負の対照と比較してh T Rの阻害の増大を示し；いくつかの実施形態においては、いくつかの、ただし任意に全部ではない、所定の配列のR I P t i d eがこのような特性を示す。いくつかの実施形態においては、この文脈において「増大する」とは、約5倍～約10倍に増大することを意味する。いくつかの実施形態においては、「増大する」とは、約1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、

40

50

4. 5、5. 0、5. 5、6. 0、6. 5、7. 0、7. 5、8. 0、8. 5、9. 0、9. 5、または10. 0倍以上を意味する。

【1684】

細胞培養条件。形質転換した胚性腎臓株化細胞HEK293および前立腺がん株化細胞DU145を、5%CO₂中、37℃で、10%ウシ胎仔血清で補充したDMEM中で維持する。製造業者の指示書に記載のとおり、TRAPアッセイ用可溶性細胞抽出物を、200μLの1×CHAPS Lysis緩衝液（Chemicon）との106細胞の洗剤溶解により調製する。

【1685】

本発明に従って、様々な立体構造の全立体制御ホスホロチオエートRIPtideに対し、異なる有効性および／または異なる他の特性を観察してもよい。例えば、ヌクレアーゼ抵抗性、組織蓄積、細胞浸透、エンドソームエスケープ、RIPtideの3次元構造、標的折畳みhTR RNAに対する親和性、免疫刺激、作用持続時間、薬物動態等の、RIPtide特性は、同一の配列を共有するが1以上のキラルホスホロチオエートバックボーン結合の異なる位置および／または立体科学に関して互いに異なるキラル制御したRIPtide薬剤で異なってもよい。

【1686】

実施例69：キラル制御したオリゴヌクレオチド組成物は、同一の配列を有するキラル非制御の組成物と比較して、生体内において異なる活性を示す

【1687】

本実施例は、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドの生体内薬理学活性を、「もとの」立体的にランダムな混合物（すなわち、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドと同一の配列であるがキラルとして純粋ではない、例えば立体的にランダムな過程により調製された結果のオリゴヌクレオチドを含有する組成物）で観察される活性と比較する。特定の標的転写物または関心のあるタンパク質をコードする遺伝子の配列と相補的な配列をそれぞれが有する4つのキラルとして純粋なオリゴヌクレオチドを合成し、調剤し、それぞれ2つの投与レベルで1週間に2度、5週間、標的遺伝子を発現している動物に投与した。コードされたタンパク質のレベルを定量化した。本実施例においては、ヒトアポリポタンパク質-B（ApoB）にアンチセンスの配列を有する、（従ってヒトアポリポタンパク質-B（ApoB）を標的にする）オリゴヌクレオチドを、遺伝子導入マウス発現ヒトApoBにおける概念証明に使用した。

【1688】

被験品

被験品はPBS単独（すなわち、オリゴヌクレオチドコントロールなし）または関連オリゴヌクレオチド組成物（すなわち、ミボメルセン（ONT-41）、ONT-75、ONT-77、ONT-80またはONT-81オリゴヌクレオチド（構造については実施例52を参照のこと））を、1×PBS（ヌクレアーゼを含まない水（Qiagen、129115））を使用して10×PBS（Life Technologies、AM9624）から希釈した）中で、5および10mg/kgでの投与に対しそれぞれ0.5および1mg/mLで製剤した。調合は活性物質の調節なしで、絶対質量に基づいた。オリゴヌクレオチド濃度を、Carry-100 UV-Vis（アジレント・テクノロジー（Agilent Technologies））での測定により確かめた。全被験品の試料を、動力学Pyrochrome色素生産性エンドトキシンアッセイ（Associates of Cape Cod、1500-5、E005-5）を使用して、エンドトキシンレベルについて調べた。全被験試料は0.5EU/mLの許容限界よりも低い量のエンドトキシンを有することがわかった。

【1689】

動物および生体内手順

高血漿中濃度のヒトアポリポタンパク質B100およびリポタンパク（a）（J. Clin. Invest. 92: 3029-3037）を発現している雌の遺伝子導入マウス（huApoBマウス）

10

20

30

40

50

を T a c o n i c (系 統 B 6 . S J L - T g (A P O B) 1 1 0 2 S g y N 2 0 + ? 、モデル # 1 0 0 4 - F) から得た。全動物は納品前に遺伝子決定された。

【1690】

マウスが納品され、そのマウスを調査開始前に7日間以上順応させた。全マウスは、通常の固形飼料および水を自由に与え、化合物投与前に絶食させなかった。マウスを調査グループにランダム割り当てし、各投与前に投与前に測定した個体マウスの体重に基づき、 10 ml/kg で、第1、4、8、11、15、18、22、25、29および32日に、腹腔内投与 (I P) した。第0 (最初の投与前日) 、17、24、31、38、45、52および60日の調査中に、顎下 (頬) 出血により血液を回収し、第66日に心穿刺により屠殺し、その後血清に処理した。

10

【1691】

アポリポタンパク質Bタンパク質アッセイ

血清中のA p o Bタンパク質レベルを、A p o BヒトE L I S Aキット (A b c a m 、 a b 1 0 8 8 0 7) を使用して測定した。血清試料を1 : 2 0 , 0 0 0 に希釈し、キット推奨プロトコルに従って修正なしでアッセイした。自動化洗浄を、A q u a m a x 4 0 0 0 (M o l e c u l a r D e v i c e s) を使用して、30秒浸漬周期で行った。色素源基質と12分インキュベーション後反応を停止し、S p e c t r a m a x M 5 (M o l e c u l a r D e v i c e s) で測定を行った。

【1692】

標準濃度をx軸に、対応する平均450nm吸光度をy軸にプロットすることにより標準曲線を作成した。log - log 曲線フィッティングを使用して、回帰分析により最適合線を決した。各アッセイプレートはネガティブ (P B S 処理) およびポジティブ (ミポメルセン処理) コントロールを含み、各マウス血清試料を4技法複製でアッセイした。

20

【1693】

各試料で、A p o B の平均絶対レベルを、P B S 処理グループの平均値に正規化して、A p o B タンパク質発現の相対レベルを得た。一例においては、測定が2標準偏差でコホート平均から逸脱したため、動物を解析から除外した。A p o B タンパク質発現の相対レベルを、二元配置A N O V A とその後のN e w m a n - K e u l s 事後試験による統計解析 (G r a p h p a d P r i s m) に使用した。

【1694】

結果

30

結果を表E - 2 8 a および図40に示す。P B S と比較して、 5 mg/kg I P O N T - 7 5 では、調査第24日における血清A p o B タンパク質レベルが、87% ($p < 0.05$) へ有意に減少する結果となった。P B S と比較して、 5 mg/kg I P O N T - 7 7 では、調査第24日および31日における血清A p o B タンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの72% ($p < 0.0001$) 、81% ($p < 0.05$) のへ有意に減少する結果となった。P B S と比較して、 5 mg/kg I P O N T - 8 0 では、調査第24日および31日における血清A p o B タンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの83% ($p < 0.05$) 、80% ($p < 0.05$) へ有意に減少する結果となった。P B S と比較して、 5 mg/kg I P O N T - 8 1 では、調査第17日および24日における血清A p o B タンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの85% ($p < 0.05$) 、70% ($p < 0.0001$) へ有意に減少する結果となった。

40

表E - 2 8 a : h u A p o B マウス ($N = 4 - 5$) における 5 mg/kg の立体異性体またはミポメルセンの複数I P 投与後のP B S に関する血清ヒトアポリポタンパク質Bレベル

【表 6 5】

	Day				
Sample	17	24	31	38	45
PBS	100 ± 9	100 ± 9	100 ± 9	100 ± 11	100 ± 9
ONT-41	54 ± 11	49 ± 7	54 ± 9	64 ± 10	80 ± 9
ONT-75	103 ^d ± 11	87 ^{dw} ± 10	94 ^d ± 10	97 ^d ± 10	98 ^a ± 9
ONT-77	83 ^d ± 15	72 ^{cz} ± 10	81 ^{dw} ± 9	91 ^d ± 13	95 ^a ± 12
ONT-80	89 ^d ± 9	83 ^{dw} ± 8	80 ^{dw} ± 3	95 ^d ± 7	87 ± 11
ONT-81	85 ^{dw} ± 12	70 ^{cz} ± 5	88 ^d ± 15	101 ^d ± 10	102 ^b ± 7

a : ミボメルセン対照群 (ONT - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.05$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

b : ミボメルセン対照群 (ONT - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.01$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

c : ミボメルセン対照群 (ONT - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

d : ミボメルセン対照群 (ONT - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.0001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

w : PBS対照群 (ONT - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.5$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

x : PBS対照群 (ONT - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.01$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

y : PBS対照群 (ONT - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

z : PBS対照群 (ONT - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.0001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

【1695】

5 mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-75では、調査第17、24、31および38日 ($p < 0.0001$) ならびに24日 ($p < 0.05$) における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に少ない減少となった。5 mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-77では、調査第17、31および38日 ($p < 0.0001$) 24日 ($p < 0.001$) ならびに45日 ($p < 0.05$) における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に少ない減少となった。5 mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-80では、調査第17、24、31および38日 ($p < 0.0001$) における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に少ない減少となったが、第45日 ($p > 0.05$) では違いはなかった。5 mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-81では、調査第17、31および38日 ($p < 0.0001$) ならびに24日 ($p < 0.001$) ならびに45日 ($p < 0.01$) における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に少ない減少となった。図40は、hApoBマウスにおける5 mg/kgの立体異性体またはミボメルセンのIP投与後のPBSに関する血清ヒトアポリポタンパク質Bレベルの時間経過を示す。下へ向かう矢印は、投与日数を示す。PBS対照群に正規化したグループ平均を示し、各グループは4～5の動物からなる。エラーバーは標準偏差を表わす。

【1696】

10 mg/kg 投与パラダイムの結果を表E-28bおよび図53に示す。PBSに関して、10 mg/kg IP ONT-75では、調査第17、24および38日にお

10

20

30

40

50

る血清A p o Bタンパク質レベルが、それぞれ78% ($p < 0.0001$)、76% ($p < 0.0001$) および82% ($p < 0.001$) へ有意に減少する結果となった。PBSと比較して、10mg/kg I P O N T - 77では、調査第17、24、31、38、45および52日における血清A p o Bタンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの62% ($p < 0.0001$)、61% ($p < 0.0001$)、54% ($p < 0.0001$)、59% ($p < 0.0001$)、72% ($p < 0.0001$) および73% ($p < 0.0001$) へ有意に減少する結果となった。PBSと比較して、10mg/kg I P O N T - 80では、調査第17、24、31、38、45、52および66日における血清A p o Bタンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの55% ($p < 0.0001$)、59% ($p < 0.0001$)、73% ($p < 0.0001$)、67% ($p < 0.0001$)、76% ($p < 0.0001$)、76% ($p < 0.0001$) および80% ($p < 0.001$) へ有意に減少する結果となった。PBSと比較して、10mg/kg I P O N T - 81では、調査第17、24、31、38および45日における血清A p o Bタンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの49% ($p < 0.0001$)、62% ($p < 0.0001$)、71% ($p < 0.0001$)、74% ($p < 0.0001$) および79% ($p < 0.001$) へ有意に減少する結果となった。

【1697】

表E - 28b : h u A p o Bマウス (N = 4 - 5) における10mg/kgの立体異性体 (O N T - 75、- 77、- 80もしくは- 81) またはミボメルセンの複数I P投与後のPBSに関する血清ヒトアポリポタンパク質Bレベル

【表66】

	Day							
Sample	17	24	31	38	45	52	60	66
PBS	100±11	100±9	100±17	100±11	100±7	100±7	100±9	100±7
ONT-41	31±13	24±24	23±6	29±10	46±10	64±8	77±8	64±7
ONT-75	78 ^{dz} ±5	76 ^{dz} ±4	82 ^{dy} ±7	95 ^d ±9	97 ^d ±3	94 ^d ±13	108 ^d ±6	87 ^c ±12
ONT-77	62 ^{dz} ±9	61 ^{dz} ±4	54 ^{dz} ±6	59 ^{dz} ±10	72 ^{dz} ±7	73 ^z ±7	95 ^a ±5	87 ^b ±11
ONT-80	55 ^{cz} ±4	59 ^{dz} ±3	73 ^{dz} ±4	67 ^{dz} ±10	76 ^{dz} ±10	76 ^z ±11	87±10	80 ^{bx} ±7
ONT-81	49 ^{bz} ±7	62 ^{dz} ±19	71 ^{dz} ±7	74 ^{dz} ±7	79 ^{dy} ±11	88 ^c ±5	90±6	89 ^c ±8

a : ミボメルセン対照群 (O N T - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.05$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

b : ミボメルセン対照群 (O N T - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.01$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

c : ミボメルセン対照群 (O N T - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

d : ミボメルセン対照群 (O N T - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.0001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

w : PBS対照群 (O N T - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.05$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

x : PBS対照群 (O N T - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.01$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

y : PBS対照群 (O N T - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

z : PBS対照群 (O N T - 41) と統計的に異なる、 $p < 0.0001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

【1698】

10mg/kg I P ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したO N T - 75では、調査第17、24、31、38、45、52、60日 ($p < 0.0001$) および66日 ($p < 0.001$) における血清A p o Bタンパク質レベルは、有意に

低い減少（ノックダウン）を示した。10 mg/kg I P ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-77では、調査第17、24、31、38および45日（ $p < 0.0001$ ）、60日（ $p < 0.05$ ）ならびに66日（ $p < 0.01$ ）における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に低い減少（ノックダウン）を示した。10 mg/kg I P ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-80では、調査第24、31、38および45日（ $p < 0.0001$ ）、17日（ $p < 0.001$ ）ならびに66日（ $p < 0.01$ ）における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に低い減少（ノックダウン）を示した。10 mg/kg I P ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-81では、調査第24、31、38および45日（ $p < 0.0001$ ）、17日（ $p < 0.01$ ）、52および66日（ $p < 0.001$ ）における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に少ない減少（ノックダウン）を示した。

10

【1699】

第38日（すなわち最終投与後6日）までに、血清ApoBタンパク質レベルはONT-75後のベースラインに戻った。開始時の血清ApoBタンパク質レベル減少を考慮すると、血清ApoBタンパク質レベルのベースラインへの回復速度は、ONT-77およびONT-80後より遅く、血清ApoBタンパク質レベルは第52日までのミボメルセンレベルと類似であった。

【1700】

さらなる立体的に純粋な構造の5 mg/kg 投与パラダイムの結果を表E-28cおよび図54に示す。PBSと比較して、5 mg/kg I P ONT-87では、調査第17、24、31および38日における血清ApoBタンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの27%（ $p < 0.0001$ ）、40%（ $p < 0.0001$ ）、55%（ $p < 0.0001$ ）および71%（ $p < 0.0001$ ）へ有意に減少する結果となった。PBSと比較して、5 mg/kg I P ONT-88では、調査第17、24、31および38日における血清ApoBタンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの47%（ $p < 0.0001$ ）、34%（ $p < 0.0001$ ）、69%（ $p < 0.0001$ ）および85%（ $p < 0.0001$ ）へ有意に減少する結果となった。PBSと比較して、5 mg/kg I P ONT-89では、調査第17、24および31日における血清ApoBタンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの43%（ $p < 0.0001$ ）、48%（ $p < 0.0001$ ）および85%（ $p < 0.05$ ）へ有意に減少する結果となった。

20

30

【1701】

表E-28c：huApoBマウス（N=3-4）における5 mg/kgの立体異性体（ONT-87、-88、もしくは-89）またはミボメルセンの複数I P投与後のPBSに関する血清ヒトアポリポタンパク質Bレベル

【表67】

SAMPLES	Day			
	17	24	31	38
PBS	100±5	100±12	100±4	100±8
ONT-41	33 ^z ±3	44 ^z ±2	75 ^y ±11	76 ^y ±8
ONT-87	27 ^z ±11	40 ^z ±5	55 ^{bz} ±8	71 ^z ±7
ONT-88	47 ^{az} ±5	34 ^z ±8	69 ^z ±13	85 ^z ±7
ONT-89	43 ^z ±9	48 ^z ±6	85 ^w ±12	93 ^a ±7

40

a：ミボメルセン対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.05$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

b：ミボメルセン対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.01$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

c：ミボメルセン対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.001$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

50

d：ミボメルセン対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.0001$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

w：PBS対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.05$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

x：PBS対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.01$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

y：PBS対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.001$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

z：PBS対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.0001$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

【1702】

5mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-87では、調査第31日（ $p < 0.01$ ）における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に高い減少（ノックダウン）を示した。5mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-88では、調査第17日（調査の $p < 0.05$ ）における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に低い減少（ノックダウン）を示した。5mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-89では、調査第38日（ $p < 0.05$ ）における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に低い減少（ノックダウン）を示した。

【1703】

さらなる立体的に純粋な構造の10mg/kg投与パラダイムの結果を表E-28dならびに図55および56に示す。PBSと比較して、10mg/kg IP ONT-87では、調査第17および24日における血清ApoBタンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの27%（ $p < 0.0001$ ）、14%（ $p < 0.0001$ ）へ有意に減少する結果となった。PBSと比較して、10mg/kg IP ONT-88では、調査第17および24日における血清ApoBタンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの23%（ $p < 0.0001$ ）、および17%（ $p < 0.0001$ ）へ有意に減少する結果となった。PBSと比較して、10mg/kg IP ONT-89では、調査第17および24日における血清ApoBタンパク質レベルが、それぞれ対照レベルの29%（ $p < 0.0001$ ）、および23%（ $p < 0.0001$ ）へ有意に減少する結果となった。

表E-28d：huApoBマウス（N=3-4）における10mg/kgの立体異性体（ONT-87、-88、もしくは-89）またはミボメルセンの複数IP投与後のPBSに関する血清ヒトアポリポタンパク質Bレベル

【表68】

	Day	
Sample	17	24
PBS	100±5	100±8
ONT-41	44 ^z ±17	27 ^z ±9
ONT-87	27 ^{sz} ±10	14 ^z ±3
ONT-88	23 ^{sz} ±6	17 ^z ±5
ONT-89	29 ^{sz} ±12	23 ^z ±8

a：ミボメルセン対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.05$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

b：ミボメルセン対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.01$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

c：ミボメルセン対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.001$ （二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験）

d：ミボメルセン対照群（ONT-41）と統計的に異なる、 $p < 0.0001$ （二元配

置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

w: PBS対照群(ONT-41)と統計的に異なる、 $p < 0.05$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

x: PBS対照群(ONT-41)と統計的に異なる、 $p < 0.01$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

y: PBS対照群(ONT-41)と統計的に異なる、 $p < 0.001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

z: PBS対照群(ONT-41)と統計的に異なる、 $p < 0.0001$ (二元配置ANOVAとNewman-Keuls事後試験)

【1704】

10mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-87では、調査第17日($p < 0.05$)における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に高い減少(ノックダウン)を示した。10mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-88では、調査第17日($p < 0.05$)における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に高い減少(ノックダウン)を示した。10mg/kg IP ミボメルセンと比較して、同一の投与パラダイムで投与したONT-89では、調査第17日($p < 0.05$)における血清ApoBタンパク質レベルは、有意に高い減少(ノックダウン)を示した。

【1705】

このようにして、少なくともいくつかの実施形態においては、本発明は、生物学的活性を示し、適切な参照(例えば、特に立体的にランダムな薬剤を含む、同一配列であるが異なるキラル特異性のオリゴヌクレオチドの薬剤)と比較して、長時間にわたる持続および/または時間経過に伴うその活性の減衰速度が遅くなることによって特徴づけられる、キラル制御したオリゴヌクレオチド組成物を提供する。そのような長時間にわたる持続および/または遅い減衰速度が観察されるいくつかの実施形態においては、提供するキラル制御した組成物を、より少ない全量の投与でおよび/またはより長い期間で、「もとの」立体的にランダムな組成物とともに使用される2以上の投与の間で、投与計画に従って投与してもよく、匹敵する生物学的および/または薬理学的効果を達成する。例えば、本実施例において実証したように、ミボメルセンと比較して、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドでの治療後の血清ApoBタンパク質のベースラインへの遅い回復は、キラルとして純粋なApoBオリゴヌクレオチドがもとの立体的にランダムな混合物より(例えば、ミボメルセンより)より少ない頻度で投与され得ることを示唆している。

【1706】

本実施例において示される結果は、例えば、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチド組成物は、適切な参照(例えば、特に立体的にランダムな薬剤を含む、同一配列であるが異なるキラル特異性のオリゴヌクレオチドの薬剤)と比較して、詳細には「もとの」立体的にランダムな薬剤と比較して、有意に異なる薬理活性を有し得ることを実証する。当業者は、この実証を考慮すると、本開示により提供するキラル制御したオリゴヌクレオチド組成物が予想外の活性および特性を有することを理解するであろう。当業者は、本開示を考慮すると、非キラル制御組成物(例えば、同一のヌクレオチド配列を有するもの)に使用する投与計画とは異なる投与計画を使用した治療的方法を含む様々な手法が提供されることをさらに理解するであろう。いくつかの実施形態においては、対照(例えば、立体的にランダムなコントロール)と比較して、比較的多いキラル制御(例えば、キラルとして純粋な)オリゴヌクレオチドの個々の投与を使用してもよい。いくつかの実施形態においては、対照(例えば、立体的にランダムなコントロール)と比較して、比較的少ないキラル制御(例えば、キラルとして純粋な)オリゴヌクレオチドの個々の投与を使用してもよい。いくつかの実施形態においては、コントロール(例えば、立体的にランダムなコントロール)と比較して、所定の期間内で、比較的回数が少ないキラル制御(例えば、キラルとして純粋な)オリゴヌクレオチドの投与を使用してもよい。

【1707】

実施例 70：キラル制御オリゴヌクレオチドを含む s i R N A 薬剤は P C S K - 9 を阻害する

【1708】

本実施例は、本明細書において記載されるキラル制御したオリゴヌクレオチドからなる s i R N A 薬剤を使用した標的遺伝子発現の阻害の成功を実証する。詳細には、この実施例は、本明細書において記載されるキラル制御した合成により調製される個々のオリゴヌクレオチド鎖のハイブリダイゼーションを記載し、2本鎖キラル制御 s i R N A オリゴヌクレオチド組成物を提供する。本実施例は、この薬剤での細胞のトランスフェクションの成功をさらに実証し、さらには、標的遺伝子発現の阻害の成功を実証する。

【1709】

キラル s i R N A 分子の s i R N A トランスフェクション

H e p 3 B または H e L a 細胞を、96 - ウェルプレートにおいて 2.0×10^4 細胞 / ウェルの密度で逆トランスフェクトした。s i R N A のトランスフェクションを、リポフェクタミン R N A i M a x (L i f e T e c h n o l o g i e s 、カタログ番号 13778 - 150) と、製造業者のプロトコルを使用し、リポフェクタミン R N A i M a x の量を1ウェルあたり $0.2 \mu\text{l}$ に減らして行った。 $1 \mu\text{M}$ から開始して12個の1 : 3 s i R N A 2本鎖希釈液を作成した。次に $10 \mu\text{l}$ の $10 \times$ s i R N A 2本鎖を、 $9.8 \mu\text{l}$ の血清を含まない培地および1ウェルあたり $0.2 \mu\text{l}$ のリポフェクタミン R N A i M a x の調製混合物とリポプレックスにした。10 ~ 15 分のインキュベーション後、 $80 \mu\text{l}$ の E M E M 細胞成長培地 (A T C C 、 30 - 2003) 中の 2.0×10^4 細胞 / ウェルを加え、1ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ の最終体積にした。2つの別のトランスフェクションイベントを各投与に対し行った。

【1710】

トランスフェクションの24時間後、H e p 3 B または H e L a 細胞を溶解し、M a g M A X (商標) - 96 全 R N A 単離キット (L i f e T e c h n o l o g i e s 、 A M 1830) を使用して、P C S K 9 m R N A を精製し ; R N a s e 阻害剤を有する高容量 c D N A 逆転写キット (L i f e T e c h n o l o g i e s 、 4374967) で $15 \mu\text{l}$ の c D N A を合成した。P r o b e s M a s t e r M i x (R o c h e 、 04707494001) を使用して製造業者のプロトコルに従って、P C S K 9 用 F A M - 標識 T a q m a n プローブセット (L i f e T e c h n o l o g i e s 、 H s 03037355__m1) および V I C - 標識 G A P D H プライマー限定内在性コントロール (L i f e T e c h n o l o g i e s 、 N M _ 002046.3) を使用して、L i g h t c y c l e r 480 (R o c h e) で遺伝子発現をリアルタイム P C R により評価した。

【1711】

I C 50 およびデータ解析

デルタデルタ C t 法を使用して、値を計算した。試料は h G A P D H に正規化し、偽のトランスフェクトおよび未処理試料に較正した。立体的にランダムな分子を正の対照として使用した。G r a p h p a d プリズムを使用して、2つの生物学的複製の平均値としてデータを表した。相対的な I C 50 を計算するため、4パラメータの直線回帰曲線をデータにフィッティングし、最下部および最上部をそれぞれ0および100の定数に束縛した。

表 E - 29 相対 I C 50 値 [H e p 3 B トランスフェクション]

【表 6 9】

	Bottom	Top	LogIC50		HillSlope		IC50 [nM]
			Mean	SEM	Mean	SEM	
ONT-D1	0	100	-0.39	0.12	-0.27	0.02	0.41
ONT-D2	0	100	-0.85	0.14	-0.24	0.03	0.14
ONT-D3	0	100	-0.62	0.14	-0.24	0.02	0.24
ONT-D4	0	100	-0.49	0.09	-0.28	0.02	0.33
ONT-D5	0	100	-0.32	0.09	-0.31	0.02	0.48

表 E - 3 0 相対 I C 5 0 値 [H e L a トランスフェクション]

10

【表 7 0】

	Bottom	Top	LogIC50		HillSlope		IC50
			Mean	SEM	Mean	SEM	
ONT-D1	0	100	-1.73	0.07	-0.61	0.05	0.02
ONT-D2	0	100	-1.94	0.07	-0.66	0.07	0.01
ONT-D3	0	100	-1.72	0.08	-0.62	0.07	0.02
ONT-D4	0	100	-1.26	0.06	-0.74	0.06	0.06
ONT-D5	0	100	-1.03	0.08	-0.86	0.12	0.09

表 E - 3 1 3 ホスホロチオエート立体中心を有する s i R N A の相対 I C 5 0 値 [H e L a トランスフェクション]

20

【表 7 1】

	Bottom	Top	LogIC50		HillSlope		IC50
			Mean	SEM	Mean	SEM	
ONT-D7	0	100	0.75	0.15	-0.24	0.02	5.60
ONT-D8	0	100	0.39	0.09	-0.32	0.02	2.45
ONT-D9	0	100	0.43	0.13	-0.22	0.02	2.68
ONT-D10	0	100	1.57	0.20	-0.27	0.03	36.86
ONT-D11	0	100	2.92	0.33	-0.12	0.01	839.42
ONT-D12	0	100	-0.17	0.10	-0.38	0.03	0.68
ONT-D13	0	100	1.20	0.21	-0.39	0.08	15.97
ONT-D14	0	100	-0.22	0.18	-0.43	0.07	0.60
ONT-D15	0	100	-0.25	0.16	-0.41	0.06	0.57

30

【1 7 1 2】

図 4 5 ～ 5 0 はこれらの調査結果を表わす。図 4 5 は、s i R N A 2 本鎖との H e p 3 B 処理後の残留する % P C S K - 9 m R N A を示す。図 4 6 は、s i R N A 2 本鎖との H e p 3 B 処理後の残留する % P C S K - 9 m R N A 曲線フィッティングを示す。図 4 7 は、s i R N A 2 本鎖との H e L a 処理後の残留する % P C S K - 9 m R N A を示す。図 4 8 は、s i R N A 2 本鎖との H e L a 処理後の残留する % P C S K - 9 m R N A 曲線フィッティングを示す。図 4 9 は、3 ホスホロチオエート立体中心を含有する s i R N A 2 本鎖との H e L a 処理後の残留する % P C S K - 9 m R N A を示す。図 5 0 は、3 ホスホロチオエート立体中心を含有する s i R N A 2 本鎖との H e L a 処理後の残留する % P C S K - 9 m R N A 曲線フィッティングを示す。

40

【1 7 1 3】

わかるとおり、各鎖に単一の立体化学的に規定されたホスホロチオエートを有する分子においては、センスおよびアンチセンス鎖両方においてホスホロチオエートで S_p 立体化学を有する分子でわずかに有効性が増加することが観察された。詳細に例証した s i R N A 薬剤は、1 鎖あたり 1 つのキラル中心のみを含有するが、本開示を読んでいる当業者は、キラルの存在が活性に影響を及ぼすという原理の証明として、実証した差異の効果の重

50

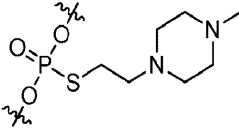
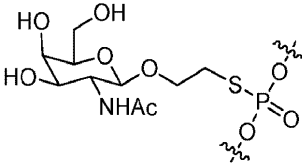
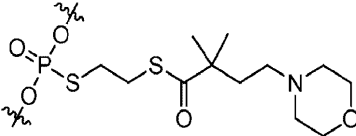
要性を認識するであろう。

【1714】

キラルの影響は2より多い立体中心を有する siRNAにおいてより明白である。3キラルホスホロチオエート（1つはセンス鎖に、2つはアンチセンス鎖にある）を有する siRNAにおいては、アンチセンス鎖の3'末端（ヌクレオチド n20 および n21 間）での R_p 立体化学と組み合わせた5'末端（ヌクレオチド n1 および n2 間）での S_p 立体化学が有効性に有害な効果を有した。しかしながら、アンチセンス鎖の3'末端（ヌクレオチド n20 および n21 間）での S_p 立体化学と組み合わせた5'末端（ヌクレオチド n1 および n2 間）での R_p 立体化学は、立体的にランダムな対照 siRNA に対し、有意な PCSK-9 mRNA ノックダウンの改良を示した。この結果は、両方の鎖がホスホロチオエートの立体化学により影響されることを示唆している。観察された有効性の差異は、より多いキラル中心を有する薬剤で増加するように思われ、さらに、キラル中心の場所および型が、例えば、安定性、有効性、および／またはその両方を通して活性に影響を与えることができるように思われる。したがって本開示を読んでいる当業者は、1本鎖および2本鎖両方のキラル制御したオリゴヌクレオチド組成物の教示、ならびに少なくともいくつかの実施例においてはこのようなキラル制御したオリゴヌクレオチドおよび薬剤を同一の配列を有する立体的にランダムな薬剤と識別するその用途を、本開示が提供することを理解するであろう。

実施例71 さらに例示的オリゴヌクレオチドおよびその合成

【表72】

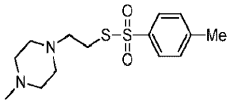
s16	
s17	
s18	

【1715】

オリゴヌクレオチド N101 - N104 を、ABI-394 DNA/RNA 合成装置における自動化合成を使用して、表 E-32 にまとめた合成サイクルに従って、1 μmol 合成カラムと、HCP にオキサリルで結合した 1.7 μmol の dG^{CE}, Pac を使用して合成した。合成サイクルは、末端 5'-O-DMTr 基を除去 (DMT Off) して行った。自動化オリゴヌクレオチド合成の完了後、HCP 担体を脱水 ACN で洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥した HCP をプラスチックバイアルに入れ、1 mL の飽和 NH₃/Py と、55°C で 1 時間処理し、次に脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン（比率 1:4）1 mL と、室温で 18 時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を、pH 約 1.5 の 10% DMSO を含有する HCl 水溶液で再懸濁させ、HCP 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 HPLC（下記の手順に従う）により精製した。95% より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 HPLC（下記の手順に従う）により脱塩した。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥した。

表 E-32 オリゴヌクレオチド N101 - N102 の合成に使用される DNA/RNA 合成装置 ABI-394 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 7 3】

step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	detritylation	3% TCA in DCM	3 + 60 + 10	N.A.
2	coupling	0.15 M phosphoramidite in ACN + 1.2 M CMPT in ACN	5 + 4	30 + 600
3	capping 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine	20	60
4	capping 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine + 16% NMI in THF	20	60
5	sulfurization	0.3 M S-(N- methylpiperazinoethyl- Toluy)ThioSulfonate  in ACN/BSTFA	7 + 1.5×4	360 + 3×180 + 900

10

20

【1 7 1 6】

実施例 7 2 N 1 0 1 および N 1 0 2 の H P L C 方法：

緩衝液 A：5 0 m M T E A A、p H = 9 . 6 (T E A で 調 節 し た)

緩衝液 B：A C N

30

カラム：X B r i d g e C₈、3 . 5 μ m、4 . 6 × 5 0 m m、品 番 # 1 8 6 0 0 3
0 3 4

緩衝液ヒーター設定温度 = 3 5 °C

2 5 4 および 2 8 0 n m で 信 号 を モ ニ タ ー

使用した勾配：

【表 7 4】

Time	Flow (ml/min)	% A	% B	Curve
Initial		99	1	
2	1	99	1	1
22	1	70	30	6
25	1	5	95	6
25.5	1	5	95	6
30	1	99	1	1

40

【1 7 1 7】

実施例 7 3 N 1 0 1 および N 1 0 2 の 一 般 的 な U P L C - L C M S 方 法：

緩衝液 A：1 0 m M ギ酸アンモニウム、p H 9 . 5 (N H₃ a q . で 調 節 し た)

緩衝液 B：A C N

カラム：U P L C @ O S T C₁₈ 1 . 7 μ m、2 . 1 × 5 0 0 m m

50

カラム温度 = 35 °C

使用した勾配：

【表 7 5】

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.5	99	1	
2	0.5	99	1	1
12	0.5	60	40	6
13	0.5	5	95	6
13.5	0.5	5	95	6
15	0.5	99	1	1

10

【1718】

実施例 7 4 N 1 0 1 および N 1 0 2 の一般的な精製方法：

緩衝液 A：50 mM TEA A、pH = 9.6 (TEA で調節した)

緩衝液 B：ACN

カラム：X Bridge Prep C₁₈、5 μm、C₁₈、250 × 10 mm、品番 186003256

緩衝液ヒーター設定温度 = 室温

254 および 280 nm で信号をモニター

使用した勾配：

【表 7 6】

Time	Flow (ml/min)	% A	% B	Curve
Initial		99	1	
5	4	99	1	1
10	4	95	5	6
30	4	74	26	6
35	4	5	95	6
36	4	5	95	6
38	4	99	1	6
45	4	99	1	1

20

30

100 μL の 49 ~ 51 % リン酸を各分画 (pH 3) に加え、HPLC により確認し、次に凍るまで -80 °C で保管した。分画を 1 / 2 の体積になるまで凍結乾燥機で 2 ~ 3 時間保管し、その後 -80 °C で保管した。

【1719】

実施例 7 5 N 1 0 1 および N 1 0 2 の一般的な脱塩方法：

緩衝液 A：10 mM ギ酸

緩衝液 B：ACN

カラム：X Bridge Prep C₁₈、5 μm、250 × 10 mm、品番 # 186003256

緩衝液ヒーター設定温度 = 室温

254 および 280 nm で信号をモニター

使用した勾配：

40

【表 77】

Time	Flow (ml/min)	% A	% B	Curve
Initial		100	0	
12	4	100	0	1
13	4	65	35	6
21	4	65	35	1
21.5	4	100	0	6
30	4	100	0	1

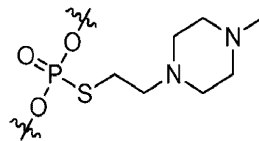
10

回収した分画を凍るまで -80°C で保管し、乾燥するまで凍結乾燥機で保管し、HPLCにより確認した。

【1720】

実施例76 オリゴヌクレオチドN101（（All - (Rp) - d [5mCs16As16Gs16T]）（s16は以下に示すとおり）の合成

【化451】



20

【1721】

オリゴヌクレオチドN101を上記のとおり合成し、精製した。RP-HPLCにおけるRT（HPLC方法N1）：15.9分。UPLC/ESI-MS：計算値：1614.64；実測値[+H]：1615.06。

【1722】

実施例77 オリゴヌクレオチドN102（All - (Sp) - d [5mCs16As16Gs16T]）の合成

【1723】

オリゴヌクレオチドN102を上記のとおり合成し、精製した。RP-HPLCにおけるRT（HPLC方法N1）：16.4分。UPLC/ESI-MS：計算値：1614.64；実測値[+H]：1614.97。

30

【1724】

実施例78 オリゴヌクレオチドN103（All - (Rp) - d [5mCs16As16Gs16Ts165mCs16Ts16Gs165mCs16Ts16Ts165mCs16G]）の合成

【1725】

オリゴヌクレオチドN103を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT（HPLC方法N1）：18.4分。UPLC/ESI-MS：C₁₉₇H₃₁₁N₆₂O₆₂P₁₁S₁₁に対する計算値：5233.38；実測値：5234.7。

【1726】

40

実施例79 オリゴヌクレオチドN104（All - (Sp) - d [5mCs16As16Gs16Ts165mCs16Ts16Gs165mCs16Ts16Ts165mCs16G]）の合成

【1727】

オリゴヌクレオチドN104を上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT（HPLC方法N1）：18.7分。UPLC/ESI-MS：計算値：5233.38；実測値：5232.9。

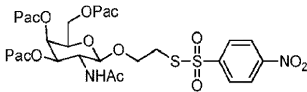
【1728】

オリゴヌクレオチドN105 - N106を、ABI-394 DNA/RNA合成装置における自動化合成を使用して、表E-33にまとめた合成サイクルに従って、1 μmo

50

1 合成カラムと、HCPにオキサリルで結合した1.7 μmol のdG^{C E}, Pacを使用
して合成した。合成サイクルは、末端5'-O-DMTr基を除去(DMT Off)
して行った。自動化オリゴヌクレオチド合成の完了後、HCP担体を脱水ACNで洗浄し
、真空下で乾燥した。乾燥したHCPをプラスチックバイアルに入れ、1 mLの飽和NH₃
/ i-PrOHと、55℃で16時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を、pH 7
．0の10% DMSO含有水溶液で再懸濁させ、HCP担体をろ過して除去した。粗製生
成物を逆相分取HPLCにより精製する。95%より高い純度を有する分画を集め、濃縮
し、逆相HPLCにより脱塩する。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥する。

表 E - 3 3 オリゴヌクレオチド N 1 0 5 - N 1 0 6 の合成に使用される DNA / RNA 10
合成装置 A B I - 3 9 4 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要
【表 7 8】

step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	detritylation	3% TCA in DCM	3 + 60 + 10	N.A.
2	coupling	0.15 M phosphoramidite in ACN + 1.2 M CMPT in ACN	5 + 4	30 + 600
3	capping 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine	20	60
4	capping 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine + 16% NMI in THF	20	60
5	sulfurization	0.3 M  in ACN/BSTFA	7 + 1.5×4	360 + 3×180 + 900

【 1 7 2 9 】

実施例 8 0 N 1 0 1 および N 1 0 2 の H P L C 方法

緩衝液 A : 5 0 m M T E A A 、 p H = 7 . 0

緩衝液 B : A C N

カラム : X B r i d g e C ₈ 、 3 . 5 μm 、 4 . 6 × 1 5 0 m m 、 品 番 # 1 8 6 0 0 40
3 0 3 4

緩衝液ヒーター設定温度 = 3 5 °C

2 5 4 および 2 8 0 n m で 信号 を モ ニ タ ー

使用した勾配 :

【表 7 9】

Time	Flow (ml/min)	% A	% B	Curve
Initial		99	1	
2	1	99	1	1
22	1	80	20	6
25	1	5	95	6
25.5	1	5	95	6
30	1	99	1	1

10

【1 7 3 0】

実施例 8 1 N 1 0 1 および N 1 0 2 の一般的な U P L C - L C M S 方法：

緩衝液 A：1 0 m M ギ酸アンモニウム、p H 7 . 0

緩衝液 B：A C N

カラム：U P L C @ O S T C ₁₈ 1 . 7 μ m、2 . 1 × 5 0 0 m m

カラム温度 = 3 5 °C

使用した勾配：

【表 8 0】

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.5	99	1	
2	0.5	99	1	1
12	0.5	70	30	6
13	0.5	5	95	6
13.5	0.5	5	95	6
15	0.5	99	1	1

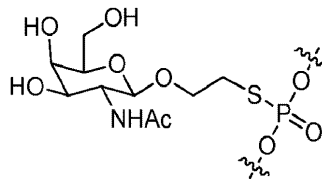
20

【1 7 3 1】

実施例 8 2 オリゴヌクレオチド N 1 0 5 (A 1 1 - (R p) - d [5 m C s 9 A s 9 G s 9 T] (s 9 は以下に示すとおり)) の合成

【化 4 5 2】

30



【1 7 3 2】

オリゴヌクレオチド N 1 0 5 を上記のとおり合成した。R P - H P L C における R T (H P L C 方法 N 2)：1 4 . 1 分。U P L C / E S I - M S：計算値：1 9 7 7 . 7 8；実測値 [- H]：1 9 7 8 . 8。

【1 7 3 3】

40

実施例 8 3 オリゴヌクレオチド N 1 0 6 (A 1 1 - (S p) - d [5 m C s 9 A s 9 G s 9 T]) の合成

【1 7 3 4】

オリゴヌクレオチド N 1 0 6 を上記のとおり合成して精製した。R P - H P L C における R T (H P L C 方法 N 2)：1 4 . 7 分。U P L C / E S I - M S：計算値：1 9 7 7 . 7 8；実測値 [- H]：1 9 7 7 . 3 7。

【1 7 3 5】

オリゴヌクレオチド x x x を、A B I - 3 9 4 D N A / R N A 合成装置における自動化合成を使用して、表 E - 3 3 にまとめた合成サイクルに従って、1 μ m o l 合成カラムと、H C P にオキサリルで結合した 1 . 7 μ m o l の d G ^{C E}, P a c を使用して合成し

50

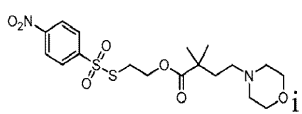
た。合成サイクルは、末端 5' - O - DMT r 基を除去 (DMT Off) して行った。自動化オリゴヌクレオチド合成の完了後、HCP担体を脱水ACNで洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥したHCPをプラスチックバイアルに入れ、1 mLの飽和NH₃ / i - Pr OHと、55℃で16時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を、pH 7.0の10% DMSO含有水溶液で再懸濁させ、HCP担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取HPLCにより精製する。95%より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相HPLCにより脱塩する。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥する。

【1736】

表 E - 34 DNA / RNA 合成装置 ABI - 394 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

10

【表 81】

step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	detritylation	3% TCA in DCM	3 + 60 + 10	N.A.
2	coupling	0.15 M phosphoramidite in ACN + 1.2 M CMPT in ACN	5 + 4	30 + 600
3	capping 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine	20	60
4	capping 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine + 16% NMI in THF	20	60
5	sulfurization	0.3 M  n ACN/BSTFA	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600

20

30

【1737】

実施例 84 一般的な精製方法：

緩衝液 A：50 mM TEAA、pH = 9.6 (TEAで調節した)

緩衝液 B：ACN

カラム：XBridge Prep C₁₈、5 μm、C₁₈、250 × 10 mm、品番 186003256

40

緩衝液ヒーター設定温度 = 室温

254および280 nmで信号をモニター

使用した勾配：

【表 8 2】

Time	Flow (ml/min)	% A	% B	Curve
Initial		99	1	
5	4	99	1	1
10	4	95	5	6
30	4	74	26	6
35	4	5	95	6
36	4	5	95	6
38	4	99	1	6
45	4	99	1	1

10

H P L C 方法 5 :

【表 8 3】

Time	Flow (ml/min)	% A	% B	Curve
Initial		80	20	
2	1	80	20	1
22	1	45	55	6
25	1	5	95	6
25.5	1	5	95	6
26	1	85	20	6
30	1	85	20	1

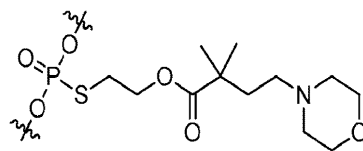
20

【1 7 3 8】

ONT - 6 0 : オリゴヌクレオチド 1 4 9 A l l - (R p) - d [5 m C s 8 A s 8 G s 8 T s 8 5 m C s 8 T s 8 G s 8 5 m C s 8 T s 8 T s 8 5 m C s 8 G] (s 8 は以下に示すとおり))

30

【化 4 5 3】



【1 7 3 9】

オリゴヌクレオチドを上記のとおり合成した。R P - H P L C における R T (H P L C 方法 5) : 1 5 . 8 0 分。U P L C / E S I - M S : 計算値 : 6 3 4 5 . 6 ; 実測値 : 6 3 4 0 . 7 。

40

【1 7 4 0】

ONT - 6 9 : A l l - (S p) - d [5 m C s 1 6 A s 8 G s 8 T s 8 5 m C s 8 T s 8 G s 8 5 m C s 8 T s 8 T s 8 5 m C s 8 G]

【1 7 4 1】

オリゴヌクレオチドを上記のとおり合成した。R P - H P L C における R T (H P L C 方法 5) : 1 8 . 6 1 分。U P L C / E S I - M S : 計算値 : 6 3 4 5 . 6 ; 実測値 : 6 3 4 0 . 6 。

【1 7 4 2】

実施例 8 5

【1 7 4 3】

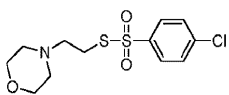
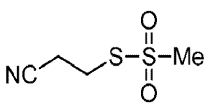
50

立体的に規定されたホスホロチオエートジエステルおよび立体的に規定されたモルホリノエチルホスホロチオエートトリエステルヌクレオチド間結合を含有する P - 修飾ブロックマー (blockmer) およびアルトマー (altmer) オリゴヌクレオチドを、ABI - 394 DNA/RNA 合成装置で、表 E - 4 にまとめた合成サイクルに従って、1 μ mol 合成カラムと、HCP にオキサリルで結合した 1.7 μ mol の dG^CE, Pac を使用して合成した。立体的に規定された P - 修飾ホスホロチオエート結合をどちらも、硫化ステップ (1) または (2) のいずれかを行うことにより、配列内の所定の位置に導入した。合成サイクルは、末端 5' - O - DMT r 基を除去 (DMT Off) して行った。固体担体を脱水 ACN で洗浄し、アルゴン流下で乾燥した。乾燥した HCP をプラスチックバイアルに入れ、脱水ピリジン中の脱水プロピルアミン (比率 1 : 4) 1 mL と、室温で 18 時間処理した。次に溶媒を蒸発させ、残渣を DMSO 中で再懸濁させ、HCP 担体をろ過して除去した。粗製生成物を逆相分取 HPLC により精製した。95% より高い純度を有する分画を集め、濃縮し、逆相 HPLC (ACN の 0 ~ 80% の勾配) により脱塩した。最終脱塩生成物を水から凍結乾燥した。

10

表 E - 4 実施例 85 の合成に使用する DNA/RNA 合成装置 ABI - 394 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 84】

step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	detritylation	3% TCA in DCM	3 + 60 + 10	N.A.
2	coupling	0.15 M phosphoramidite in ACN + 1.2 M CMPT in ACN	5 + 4	30 + 600
3	capping 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6-lutidine	20	60
4	capping 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6-lutidine + 16% NMI in THF	20	60
5	sulfurization 1	0.3 M S-Morpholinoethyl <i>p</i> -Chlorophenyl thiosulfonate  in ACN/BSTFA	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600
6	sulfurization 2	0.3 M S-cyanoethyl Methylthiosulfonate  in ACN/BSTFA	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600

20

30

40

【1744】

実施例 86 実施例 85 の一般的な精製方法

50

緩衝液 A : 20 mM ホスファート pH = 6.0 (リン酸で調節した)

緩衝液 B : ACN

カラム : XBridge Prep C₁₈、5 μm、C₁₈、250 × 10 mm、品番 # 186003256

緩衝液ヒーター設定温度 = 50 °C

254 および 280 nm で信号をモニター

使用した勾配 :

【表 85】

Time	Flow (ml/min)	% A	% B	Curve
Initial		99	1	
5	4	99	1	1
10	4	77	23	6
60	4	70	30	6
65	4	20	80	6
70	4	20	80	6
71	4	99	1	6
80	4	99	1	1

10

20

【1745】

HPLC 方法 6

緩衝液 A : 20 mM 酢酸アンモニウム、pH = 6.0

緩衝液 B : ACN

カラム : XBridge C₈、3.5 μm、4.6 × 150 mm、品番 # 186003034

緩衝液ヒーター設定温度 = 60 °C

254 および 280 nm で信号をモニター

使用した勾配 :

【表 86】

Time	Flow (ml/min)	% A	% B	Curve
Initial		90	10	
2	1	90	10	1
22	1	75	25	6
25	1	5	95	6
25	1	5	95	6
25.5	1	90	10	6
30	1	90	10	1

30

40

【1746】

ONT-71 : All - (Rp) - d [5mCs1As1GsTs5mCsTsGs5mCsTsTs15mCs1G]

【1747】

オリゴヌクレオチドを上記のとおり合成した。RP-HPLC における RT (HPLC 方法 6) : 9.39 分。UPLC/ESI-MS : 計算値 : 4297.9 ; 実測値 : 4295.3。

【1748】

ONT-72 : All - (Sp) - d [5mCs1As1GsTs5mCsTsGs5

50

m C s T s T s 1 5 m C s 1 G]

【1749】

オリゴヌクレオチドを上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法6): 10.84分。UPLC/ESI-MS: 計算値: 4297.9; 実測値: 4295.7。

【1750】

ONT-73: A l l - (R p) - d [5 m C s 1 A s G s 1 T s 5 m C s 1 T s G s 1 5 m C s T s 1 T s 5 m C s 1 G]

【1751】

オリゴヌクレオチドを上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法6): 13.54分。UPLC/ESI-MS: 計算値: 4524.2; 実測値: 4522.6。

【1752】

ONT-74: A l l - (S p) - d [5 m C s 1 A s G s 1 T s 5 m C s 1 T s G s 1 5 m C s T s 1 T s 5 m C s 1 G]

【1753】

オリゴヌクレオチドを上記のとおり合成した。RP-HPLCにおけるRT (HPLC方法6): 15.52分。UPLC/ESI-MS: 計算値: 4524.2; 実測値: 4521.2。

【1754】

例えばヌクレアーゼ抵抗性、組織蓄積、細胞浸透、エンドソームエスケープ、免疫刺激、作用持続時間、薬物動態等のプロドラッグオリゴヌクレオチド特性は、全てキラルホスホロチオエートバックボーン結合の立体化学により調節され、影響される。

【1755】

2'-OH、2'-OMe、2'-F、2'-デオキシ、ヌクレオチド間ホスホジエステルまたは立体的に規定されたヌクレオチド間ホスホロチオエートジエステルまたは立体的に規定されたヌクレオチド間ホスホロチオエートトリエステル(プロドラッグ)(ヌクレオチド間ホスホジエステル(PO)または立体的に規定されたヌクレオチド間ホスホロチオエートジエステル(PS)のいずれかを放出)結合を含有するRNAオリゴヌクレオチドを、ABI394 DNA/RNA合成装置で、表E-35、表E-36、表E-37および表E-38にまとめたサイクルに従って、前記のとおり調製した130mg(4.9μmol)のオキサリルで結合した5'-O-DMTr-2'-デオキシチミジンを含む10μmol容量の合成カラムを使用して合成する。合成前に、予備カップリングステップ(カップリング2)を行い、末端5'-O-DMTr基を除去して合成を終了する。酸化ステップは、市販のtert-ブチルヒドロペルオキシド(TBHP)の5~6Mデカン溶液を使用して行い、次にこれを4部のジクロロメタンで希釈する。立体的に規定されたヌクレオチド間ホスホロチオエートジエステル結合への立体特異的硫化ステップは、0.3Mメチルチオスルホン酸S-シアノエチル試薬を使用して、対応するキラルホスホラミドのカップリングおよび2ステップのカップリングステップ後に行う(表E-36)。立体的に規定されたヌクレオチド間ホスホジエステル(PS)結合を放出する立体的に規定されたヌクレオチド間ホスホロチオエートトリエステルへの立体特異的硫化ステップは、0.3M S-(N-モルホリノエチルチオエステル-エチル)-パラ-ニトロ-トルイルチオスルホネート試薬を使用して、対応するキラルホスホラミドのカップリングおよび2ステップのカップリングステップ後に行う(表E-37)。ヌクレオチド間ホスホジエステル(PO)結合を放出する立体的に規定されたヌクレオチド間ホスホロチオエートトリエステルへの立体特異的硫化ステップは、0.3Mトルイルチオスルホン酸S-(N-モルホリノエチル)試薬を使用して、対応するキラルホスホラミドのカップリングおよび2ステップのカップリングステップ後に行う(表E-38)。2'-OH RNAヌクレオチドには、2'-O-PivOM(Debartら、Chem. Eur. J., 2008, 14, 9135)、または2'-O-TC(Dellingerら、J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 11

10

20

30

40

50

540) 等の、2' - O - 塩基保護基を使用する。超穏和 (C - A c、G - P a c、A - P a c) 保護基を全ての核酸塩基に使用する。

【1756】

自動化オリゴヌクレオチド合成サイクルが完了し、最終5' - O - D M T r 基を除去したら、合成カラムをDNA/RNA合成装置から外し、真空下で乾燥する。10 mL 溶液の0.5 M 1, 5 - ジアザビシクロ (4. 3. 0) ノナ - 5 - エン (D B N)、A C N 中の0.25 M N, O - ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセタミド (B S T F A) を1分間、流れを止めずに、合成カラムの一端に取り付けられたシリンジを使用して、合成カラムを通して連続的に担体に加えた。次に担体を無水A C Nで洗浄し、真空下で乾燥する。次に、乾燥した担体を空のスクリー蓋プラスチックバイアルへ移し、無水ピリジン (1.5 mL) 中の10% n - P r N H ₂ 溶液 (0.5 mL) と室温で12時間処理する。その後、溶媒を蒸発させて乾燥し、固体担体を含む残渣を2 mL の水/D M S O (50/50) にp H 5で溶解し、担体をろ過により除去し、その後ろ液を回収し、ただちに冷凍し、精製前に-80℃で保管する。

10

表 E - 3 5 DNA/RNA合成装置A B I 3 9 4におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表87】

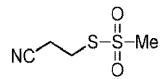
step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	detritylation	3% TCA in DCM	3 + 120 + 10	N. A.
2	coupling	0.15 M phosphoramidite in ACN + 2 M CMPT in ACN	7 + 6	30 + 600
3	capping	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine + 16% NMI in THF	10	20
4	oxidation	1.1 M <i>tert</i> -butyl hydroperoxide in 4:1 dichloromethane:decane	20	110

20

30

表 E - 3 6 DNA/RNA合成装置A B I 3 9 4におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 8 8】

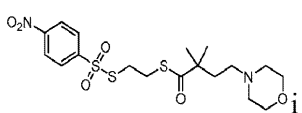
step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	detritylation	3% TCA in DCM	3 + 120 + 10	N. A.
2	coupling	0.15 M chiral phosphoramidite in ACN + 2 M CMPT in ACN	8 + 6	30 + 900 (2'-OMe RNA) 30 + 600 (DNA)
3	capping 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine	30	60
4	capping 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine + 16% NMI in THF	30	60
5	sulfurization	0.3 M <i>S</i> -(2-cyanoethyl) methylthiosulfonate  in ACN/BSTFA	15 + 3×4	120 + 3×60 + 300

10

20

表 E - 3 7 DNA / RNA 合成装置 A B I 3 9 4 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 8 9】

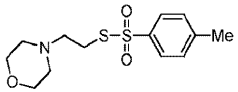
step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	detritylation	3% TCA in DCM	3 + 60 + 10	N.A.
2	coupling	0.15 M phosphoramidite in ACN + 1.2 M CMPT in ACN	5 + 4	30 + 600
3	capping 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine	20	60
4	capping 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6- lutidine + 16% NMI in THF	20	60
5	sulfurization	0.3 M <i>S</i> -(<i>N</i> - morpholinothioester-ethyl- <i>p</i> -nitro-toluythiosulfonate 	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600
		n ACN/BSTFA		

10

20

表 E - 3 8 DNA / RNA 合成装置 A B I 3 9 4 におけるオリゴヌクレオチド合成の概要

【表 9 0】

step	reaction	reagent	delivery time (sec)	wait time (sec)
1	deprotection	3% TCA in DCM	3 + 60 + 10	N.A.
2	coupling	0.15 M phosphoramidite in ACN + 1.2 M CMPT in ACN	5 + 4	30 + 600
3	capping 1	5% Pac ₂ O in THF/2,6-lutidine	20	60
4	capping 2	5% Pac ₂ O in THF/2,6-lutidine + 16% NMI in THF	20	60
5	sulfurization	0.3 M S-Morpholinoethyl Tolylthiosulfonate  in ACN/BSTFA	10 + 4×2	300 + 3×150 + 600

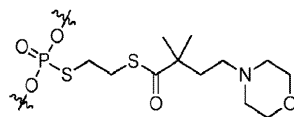
10

20

【1757】

s 10 は以下のとおりである。

【化 4 5 4】



30

【1758】

オリゴヌクレオチドの合成：(Rp) - u u c u A G A c c u G u u u u G c u u d T s 10 d T

【1759】

オリゴヌクレオチドONT - 107の合成：(Sp) - u u c u A G A c c u G u u u u G c u u d T s 10 d T

【1760】

オリゴヌクレオチドONT - 108の合成：(Rp) - A A G c A A A A c A G G U C u A G A A d T s 10 d T

【1761】

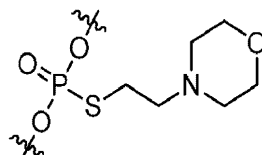
オリゴヌクレオチドONT - 109の合成：(Sp) - A A G c A A A A c A G G U C u A G A A d T s 10 d T

40

【1762】

s 1 は以下のとおりである。

【化 4 5 5】



50

【1763】

オリゴヌクレオチドの合成：(Rp, Rp) - as1AGcAAAAcAGGUcUA
GAAdTs dT

【1764】

オリゴヌクレオチドの合成：(Sp, Rp) - as1GcAAAAcAGGUcUAG
AAAdTs dT

【1765】

オリゴヌクレオチドの合成：(Sp, Sp) - as1GcAAAAcAGGUcUAG
AAAdTs dT

【1766】

オリゴヌクレオチドの合成：(Rp, Sp) - as1GcAAAAcAGGUcUAG
AAAdTs dT

【1767】

オリゴヌクレオチドの合成：(All (Sp)) - us1ucus1AGAccs1u
Gus1uus1uGcuudTs10dT

【1768】

オリゴヌクレオチドの合成：(All (Rp)) - As10AGcAAAAcAGGs
1UCuAs1GAs1AdTs10dT

【1769】

RNA鎖熱アニーリングおよびsiRNA2本鎖の調製。各RNA鎖を、1×PBS中
で、10μMの等モル濃度で相補RNA鎖と混合する。全量0.5mLの溶液を各2本鎖
用に調製し、混合物を90℃で2分間加熱し、数時間にわたり放冷する。次に、混合物を
4℃で保管する。

【1770】

熱RNA鎖アニーリングステップ後、全ての可能なsiRNA2本鎖の組合せを、アン
チセンス鎖の任意の可能な相補鎖と、任意のセンス鎖をアニーリングすることにより調製
する。

【1771】

HeLa細胞またはHep3B細胞におけるトランスフェクション後、調製した全ての
siRNA2本鎖を、そのPCSK9遺伝子サイレンシング特性について生体外で評価す
る。

【1772】

Hep3B細胞、Huh-7細胞またはヒト初代培養肝細胞における自由取込み後、調
製した全てのプロドラッグ基を有するsiRNA2本鎖を、そのPCSK9遺伝子サイレ
ンシング特性について生体外で評価する。

【1773】

さらなる化学修飾および調査するプロドラッグ基の層と合わせて、キラルホスホロチオ
エートバックボーン結合の数位置、および立体構造により調節される、異なる有効性を観
察する。

【1774】

例えばヌクレアーゼ抵抗性、細胞浸透、エンドソームエスケープ、2本鎖熱力学安定性
、2本鎖の3次元構造、様々な酵素相互作用の機構ステップに対する親和性、標的mRNA
に対する親和性、特異的オフターゲット効果、免疫刺激、作用持続時間、薬物動態等の
、siRNA特性が全て、キラルホスホロチオエートバックボーン結合の立体化学および
プロドラッグ基の存在または非存在により調節され、影響される。

【1775】

プロドラッグ基をsiRNA2本鎖に放出するPOおよびPSの付加により、トランス
フェクション試薬または標的リガンド非存在下での、その細胞内輸送および自由取込みが
増加する。

【1776】

10

20

30

40

50

実施例 87：ジアステレオマーとして純粋なオリゴヌクレオチドの安定性調査

【1777】

本実施例は、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドの生体外安定性と、「もとの」立体的にランダムな混合物（すなわち、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドと同一の配列であるがキラルとして純粋ではない、例えば立体的にランダムな過程により調製された結果のオリゴヌクレオチドを含有する組成物）で観測される生体外安定性を比較する。特定の標的転写物または関心のあるタンパク質をコードする遺伝子の配列と相補的な配列をそれぞれが有する 7 つのキラルとして純粋なオリゴヌクレオチドを合成し、調剤し、3 つの異なる生物学的マトリクス（ヘビ毒ホスホジエステラーゼ（s v P D E）、ヌクレアーゼ P 1（P 1）およびラット全肝臓ホモジネート）を使用して代謝安定性を評価した。異なるインキュベーション時間後、全長オリゴヌクレオチドのレベルを I E X - H P L C により定量化した。本実施例において示される結果は、例えば、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチド組成物は、適切な参照（例えば、特に立体的にランダムな薬剤を含む、同一配列であるが異なるキラル特異性のオリゴヌクレオチドの薬剤）と比較して、詳細には「もとの」立体的にランダムな薬剤と比較して、有意に異なる代謝安定性を有し得ることを実証する。本実施例においては、ヒトアポリポタンパク質 - B（A p o B）にアンチセンスの配列を有する、（従ってヒトアポリポタンパク質 - B（A p o B）を標的にする）オリゴヌクレオチドを、代謝安定性調査における概念証明に使用した。

10

【1778】

オリゴヌクレオチド O N T - 7 5、O N T - 7 7、O N T - 8 0、O N T - 8 1、O N T - 8 7、O N T - 8 8、O N T - 8 9 および O N T - 4 1 のヘビ毒ホスホジエステラーゼ（s v P D E）消化調査

20

【1779】

Okaらにより報告されたプロトコル（J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 16031-16037）を少し修正して使用した。水（50 μ L）中の精製したオリゴヌクレオチド（10 nmol）を、s v P D E（ 4×10^{-3} 単位）、100 mM トリス H C l および 15 mM M g C l ₂ を含有する水溶液（450 μ L、p H 8. 6）に加えた。混合物を 400 r p m で振とうしながら、37℃でインキュベートした。50 μ L の一定分量を各時間ポイント（0 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d および 7 d）で取り、25 μ L の 150 mM E D T A、2 μ L のプロテイナーゼ K（20 mg / mL）および 30 μ L の溶解緩衝液（Q i a g e n、# 129115）で失活させ、混合物を 60℃で 20 分加熱した。5 μ L の内部標準（5' - G C G T T T G C T C T T C T T C T T G C G T T T T T T - 3'、27 量体オリゴヌクレオチド（下線のヌクレオチドは 2' - M O E 修飾）、（200 μ M）を上記の一定分量に加えた。定量分析を I E X - H P L C により行い、代謝産物特定を U P L C / M S により行った。結果を図 59 に示した。

30

【1780】

I E X - H P L C 分析は、s v P D E とのインキュベーション中のホスホロチオエート 20 量体の分解を示し、立体異性体間で有意な差は示さなかった。代謝産物の L C M S 分析は、分解生成物の多数は脱硫の結果として形成されたことを明らかにした。Prakashら（Biochemistry 2002, 41, 11642-11648）、Prhavcら（Org.Lett., 2003, 5, 2017-2020）等により以前に報告されたとおり、5' および 3' - 末端における 2' - M O E 修飾は、3' から 5' 方向のエキソヌクレアーゼである s v P D E 代謝からこれらのオリゴマーを保護することを我々も観察した。

40

【1781】

オリゴヌクレオチド O N T - 7 5、O N T - 7 7、O N T - 8 0、O N T - 8 1、O N T - 8 7、O N T - 8 8、O N T - 8 9 および O N T - 4 1 のヌクレアーゼ P 1（P 1）消化調査

【1782】

Okaらにより報告されたプロトコル（J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 16031-16037）を少し修正して使用した。水（50 μ L）中の精製したオリゴヌクレオチド（10 nmol

50

）を、 $nP1$ （20単位）、100mMトリスHClおよび1mM $ZnCl_2$ を含有する水溶液（500 μ L、pH7.2）に加えた。混合物を400rpmで振とうしながら、37℃でインキュベートした。50 μ Lの一定分量を各時間ポイント（0h、1h、2h、4h、8h、12h、1d、2d）で取り、25 μ Lの停止緩衝液（150mM EDTA、2 μ LのプロテイナーゼK溶液（20mg/mL）および30 μ Lの溶解緩衝液（Qiagen、#129115））で失活させ、混合物を60℃で20分加熱した。5 μ Lの内部標準（5'-GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTT-3'）、27量体オリゴヌクレオチド（下線のヌクレオチドは2'-MOE修飾）（200 μ M）を上記の一定分量に加えた。定量分析をIEX-HPLCにより行い、代謝産物特定をUPLC/MSにより行った。結果を図60～67に示した。

10

【1783】

ヌクレアーゼ $nP1$ は、リン原子で（ S_p ）絶対配置を有するDNAホスホロチオエート結合を特異的に開裂することが、以前報告されている（Porterら、Biochemistry, 1983, 22, 1369-1377; Okaら、J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 16031-16037）。調査した5'-10-5' 2'-MOEギャップマーホスホロチオエートオリゴヌクレオチドで類似の開裂パターンを観察し、 $nP1$ が2'-MOE翼に影響を及ぼさずに、（ S_p ）ホスホロチオエート中心でギャップマーオリゴヌクレオチドのDNA核を効率的に消化することが明らかとなり、2'-MOE翼は立体化学に依存せず安定であった。立体的にランダムなジアステレオ混合物オリゴヌクレオチドONT-41、ならびにDNA核に（ S_p ）-ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含有する立体的に純粋なオリゴヌクレオチド（ONT-77、ONT-80、ONT-87、ONT-88およびONT-89）で、1時間以内でのDNA核の完全な消化を観察した。開裂の全生成物をUPLC/MSにより明白に特定した。文献にて以前報告されているとおり、明らかに（ R_p ）ホスホロチオエートDNAは $nP1$ の基質でないことを見出した。（ R_p ）ホスホロチオエートDNA核を有する2つのキラルとして純粋なオリゴヌクレオチド（ONT-75およびONT-81）は、37℃で1時間のインキュベーションの間、 $nP1$ に対し完全に安定であった。ONT-75およびONT-81は、数日間にわたるインキュベーションの間、約10～15%の全長生成物の損失を示した。本実施例において示される結果は、例えば、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチド組成物は、適切な参照（例えば、特に立体的にランダムな薬剤を含む、同一配列であるが異なるキラル特異性のオリゴヌクレオチドの薬剤）と比較して、詳細には「もとの」立体的にランダムな薬剤と比較して、 $nP1$ アッセイにおいて有意に異なる代謝安定性を有し得ることを実証する。

20

30

【1784】

酵素消化生成物の分析用の一般的なIEX-HPLC方法

緩衝液A：10mM トリスHCl、50%ACN、pH8.0

緩衝液B：10mM トリスHCl、800mM $NaClO_4$ 、50%ACN、pH=8.0

カラム：DIONEX、DNAPac、PA-100、4.0×250mm、品番#063000

カラム温度=60℃

254および280nmで信号をモニター

使用した勾配：

40

【表 9 1】

Time (min)	Flow (mL/min)	% A	% B	Curve
Initial		95	5	
2	1	95	5	1
3	1	75	25	6
10	1	35	65	6
10.1	1	95	5	6
12.5	1	95	5	1

【1 7 8 5】

10

酵素消化生成物の分析用の一般的な U P L C - L C M S 方法

緩衝液 A : 1 5 m M T E A、4 0 0 m M H F I P、水

緩衝液 B : 5 0 : 5 0 緩衝液 A / メタノール

カラム : U P L C @ O S T C ₁₈ 1 . 7 μ m、2 . 1 × 5 0 0 m m

カラム温度 = 6 0 ° C

使用した勾配 :

【表 9 2】

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.2	70	30	
2	0.2	70	30	1
27	0.2	35	65	6
27.5	0.2	5	95	6
28.5	0.2	5	95	6
29	0.2	70	30	6
30	0.2	70	30	1

20

【1 7 8 6】

プレインキュベートしたラット全肝臓ホモジネートにおけるジアステレオマーとして純粋なヒトオリゴヌクレオチドの生体外代謝安定性

【1 7 8 7】

生体外でのラット全肝臓ホモジネートにおけるキラルとして純粋なオリゴヌクレオチドの代謝安定性を測定した。ここで使用したプロトコルは、以前に報告されており、オリゴヌクレオチド薬剤の安定性を評価するのに使用されている。

30

【1 7 8 8】

プロトコル : 本調査においては、Gearyらにより報告されているプロトコルを少し修正して使用した (Oligonucleotides, 2010, 20, 309)。

【1 7 8 9】

試験系 : 2 匹の雄 S p r a g u e - D a w l e y ラット (R a t t u s n o r v e g i c u s) が C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s , I n c . (カリフォルニア州ホリスター (H o l l i s t e r , C A)) により供給された。

【1 7 9 0】

40

組織採取 : 組織採取前に 2 日間、動物を実験室に順化させた。組織採取時、ペントバルビタールナトリウム溶液を腹腔内 (I P) 注射して動物を麻酔した。肝門脈から投与した 5 0 0 m L の冷却した飽和食塩水 / 動物を使用して、肝かん流を行った。かん流後、肝臓を解剖し、氷上で維持した。肝臓を小片に刻み、秤量した。

【1 7 9 1】

肝臓ホモジネート調製 : 肝臓組織の刻んだ小片を、風袋を量った 5 0 m L 遠心管に移し、秤量した。冷却した均質化緩衝液 (1 0 0 m L トリス p H 8 . 0、1 m M 酢酸マグネシウム、および抗菌 - 抗真菌剤) を各管に加え、管が 1 g の組織あたり 5 m L の緩衝液を含有するようにした。Q I A G E N T i s s u e R u p t o r 組織ホモジナイザを使用して、肝臓 / 緩衝液混合物をホモジナイズし、その間、管を氷上で維持した。肝臓ホモ

50

ジネートのタンパク質濃度は、Pierce BCAタンパク質アッセイを使用して決定した。肝臓ホモジネートを1 mLの一定分量に分割し、Cryovialに移し、-60℃で保管した。

【1792】

インキュベーション条件：冷凍した肝臓ホモジネート（タンパク質濃度=31.9 mg/mL）の1 mLの一定分量を解凍し、37℃で24時間インキュベートした。6個のエッペンドルフ管（2 mL）をとり、450 μLのホモジネートを各管に加えた。50 μLの試験オリゴヌクレオチド（200 μL）を各管に加えた。混合後ただちに、125 μLの（5×）停止緩衝液（2.5% IGEPAL、0.5 M NaCl、5 mM EDTA、50 mM トリス、pH=8.0）および12.5 μLの20 mg/mLプロテイナーゼK（Ambion、#2546）を、0 hの時間ポイントとして、1つの管に加えた。次に混合物を60℃で1時間加熱した。残る反応混合物を、VWRインキュベーターマイクログプレート振とう機で、400 rpmで振とうしながら、37℃でインキュベートした。所定の期間（1、2、3、4および5日）のインキュベーション後、各混合物を125 μLの（5×）停止緩衝液（2.5% IGEPAL、0.5 M NaCl、5 mM EDTA、50 mM トリス、pH=8.0）および12.5 μLの20 mg/mLプロテイナーゼK（Ambion、#2546）で処理した。

【1793】

後処理および生物分析：（5'-GC GTTT GCTCTTCTTGC GTTTT TTT-3'）、27量体オリゴヌクレオチド（下線のヌクレオチドは2'-MOE修飾）を、ジアステレオマーとして純粋なオリゴヌクレオチドの定量に、内部標準として使用した。50 μLの内部標準（200 μM）を各管に加え、その後、250 μLの30%水酸化アンモニウム、800 μLのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1）を加えた。混合し、600 rpmで遠心分離後、水層をSpeed Vacで蒸発させて100 μLにし、Sep Pakカラム（C18、1 g、WAT036905）に充填した。Sep Pakカラムの全ての水性洗液を急速IEX-HPLC法で試験し、そこで生成物が見られないことを確かめた。アセトニトリル溶出物を濃縮して乾燥し、100 μLの水に溶解し、RP-HPLCを使用して分析した。

溶出剤A：10 mM 酢酸トリブチルアンモニウム、pH=7.0

溶出剤B：ACN

カラム：XTerra MS C₁₈、3.5 μm、4.6×150 mm、品番：186000432

カラム温度=60℃

HPLC勾配：

【表93】

	Time	Flow	%A	%B	Curve
1		1.0	65	35	
2	5.0	1.0	65	35	1
3	30.0	1.0	40	60	6
4	35.0	1.0	5	90	6
5	36.0	1.0	65	35	6
6	40.0	1.0	65	35	1

【1794】

図68は、異なるキラリティとして純粋なオリゴヌクレオチドが、ラット全肝臓ホモジネートにおいて異なる代謝安定性プロファイルを示すことを示す。実験により、同一の配列および化学組成を有するジアステレオマーとして純粋な立体的に規定されたオリゴヌクレオチド（例としてここではONT-75およびONT-77を使用するが、当業者にとって理解されるように、この観察はこの分子の他の可能なジアステレオマーとして純粋な立体的に規定されたホスホロチオエートジアステレオ異性体で推測され得る）と比較して、

ジアステレオ異性体混合物 ONT - 41 が異なる代謝安定性プロファイルを有することも実証している。

【1795】

全リン原子において全 R_p 絶対配置を有する立体制御されたホスホロチオエートバックボーンを有するオリゴヌクレオチド ONT - 75 は、37℃でブレインキュベートしたラット全肝臓ホモジネートにおいて1日で完全に分解され、本調査において使用された3つのうちで最も低い代謝安定性を示した。

【1796】

他のジアステレオマーとして純粋な立体的に規定されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチド ONT - 77 (絶対配置: 5R - 10S - 4R を有する) は、立体的にランダムな ONT - 41 (ミボメルセン) と比較して、2倍よりもより安定であった。5日間のインキュベーション後、ジアステレオマーとして純粋な ONT - 77 においては40%の全長オリゴヌクレオチドが残ったが、立体的にランダムな ONT - 41 (ミボメルセン) では約15%の全長オリゴヌクレオチドが残った。ONT - 77 および ONT - 41 を直接比較すると、立体制御された異性体 5R - 10S - 4R (ONT - 77) は全ての分析時間ポイントを通して、有意に高い代謝安定性を明白に示した。ジアステレオマーとして純粋な異性体 ONT - 77 の立体的に規定された構造は、このオリゴヌクレオチドの分解速度および全体の代謝安定性に影響を及ぼす。理論により束縛されることを意図するものではないが、5 - 10 - 5 ギャップマーオリゴヌクレオチドの DNA 核に適用した S_p 立体化学は、立体的にランダムなジアステレオ混合物と比較して、エンドヌクレアーゼ抵抗性の増加を提供し、ゆえに代謝安定性を増加させるという結論をこれらの観測が導く。この配列の、他のジアステレオマーとして純粋な立体制御ホスホロチオエート異性体のいくつかの他の立体構造が、本実験においてさらにより高い代謝安定性を示すことが予想されるであろう。

【1797】

理論により束縛されることを意図するものではないが、本実施例において示される結果は、例えばホスホロチオエート結合での R_p 立体化学 (ONT - 75) は、ラット肝臓ホモジネートにおいて、 S_p DNA 核を含有する ONT - 77 よりも代謝安定性が低いことを実証する。本実施例において示される結果は、例えば、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチド組成物は、適切な参照 (例えば、特に立体的にランダムな薬剤を含む、同一配列であるが異なるキラル特異性のオリゴヌクレオチドの薬剤) と比較して、詳細には「もとの」立体的にランダムな薬剤と比較して、ラット肝臓ホモジネートにおいて有意に異なる代謝安定性を有し得ることも実証する。本実施例においては、本実施例においては、ヒトアポリポタンパク質 - B (ApoB) にアンチセンスの配列を有する、(従ってヒトアポリポタンパク質 - B (ApoB) を標的にする) オリゴヌクレオチドを、代謝安定性調査における概念証明に使用した。提供するキラル制御したオリゴヌクレオチドは、内因性酵素に対して、安定性の増加または安定性の減少を有し得る。キラル制御したオリゴヌクレオチドおよび組成物ならびにそれら方法を提供することにより、本発明は、公知のキラル制御されていないオリゴヌクレオチドおよびそれらの組成物よりも薬理学的特性が増加したオリゴヌクレオチドおよび組成物を提供した。

【1798】

ヒト血清における立体制御ホスホロチオエートジエステル結合を有するヒト PCSK9 siRNA 2本鎖の生体外代謝安定性

【1799】

以前に報告された手順 (Okaら、J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 16031-16037) と類似のプロトコルを使用する。水 (50 μ L) 中の siRNA 2本鎖 (2.5 μ mol) を、ヒト血清 (450 μ L) に加える。混合物を 400 rpm で振とうしながら、37℃でインキュベートする。50 μ L の一定分量を各時間ポイント (0h、0.5h、1h、2h、4h、6h、8h および 24h) で取り、25 μ L の 150 mM EDTA、2 μ L のプロテイナーゼ K 溶液 (20 mg/mL) および 30 μ L の溶解緩衝液 (Qiagen、

10

20

30

40

50

1 2 9 1 1 5) で失活させ、混合物を 6 0 °C で 2 0 分加熱する。5 μ L の内部標準 (5 ' - G C G T T T G C T C T T C T T C T T G C G T T T T T T - 3 ' 、 2 7 量体オリゴヌクレオチド (下線のヌクレオチドは 2 ' - M O E 修飾)) (2 0 0 μ M) を上記の一定分量に加える。定量分析を I E X - H P L C により行い、代謝産物同定を U P L C / M S により行う。

【 1 8 0 0 】

いくつかの実施形態においては、S_p配置を有する 3 ' 末端のジアステレオマーとして純粋なホスホロチオエートを有する s i R N A 2 本鎖は、同じ位置で R_p配置を有するホスホロチオエートまたは立体的にランダムなジアステレオ混合物を有する s i R N A と比較して、ヒト血清において高い代謝安定性を示す。他の実施形態においては、S_p配置を有する 5 ' 末端のジアステレオマーとして純粋なホスホロチオエートを有する s i R N A 2 本鎖は、同じ位置で R_p配置を有するホスホロチオエートまたは立体的にランダムなジアステレオ混合物を有する s i R N A と比較して、ヒト血清において高い代謝安定性を示す。他の実施形態においては、3 ' および 5 ' 末端の両方で S_p配置を有するジアステレオマーとして純粋なホスホロチオエートを有する s i R N A 2 本鎖は、同じ位置で R_p配置を有するホスホロチオエートまたは立体的にランダムなジアステレオ混合物を有する s i R N A と比較して、ヒト血清において高い代謝安定性を示す。他の実施形態においては、S_p配置を有する複数のジアステレオマーとして純粋なホスホロチオエートを有する s i R N A 2 本鎖は、R_p配置を有する複数のホスホロチオエートまたは立体的にランダムなジアステレオ混合物を有する s i R N A と比較して、ヒト血清において高い代謝安定性を示す。他の実施形態においては、S_p配置を有するジアステレオマーとして純粋なホスホロチオエートの全バックボーンを有する s i R N A 2 本鎖は、R_p配置を有するホスホロチオエートの全バックボーンまたは立体的にランダムなジアステレオ混合物を有する s i R N A と比較して、ヒト血清において高い代謝安定性を示す。

【 1 8 0 1 】

実施例 8 8 キラル制御したオリゴヌクレオチド組成物は、同一の配列を有するキラル制御していない組成物と比較して、生体外で異なる有効性を示す

【 1 8 0 2 】

本実施例は、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドの生体外薬理学活性を、「もとの」立体的にランダムな混合物 (すなわち、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドと同一の配列であるがキラルとして純粋ではない、例えば立体的にランダムな過程により調製された結果のオリゴヌクレオチドを含有する組成物) で観察される活性と比較する。特定の標的転写物または関心のあるタンパク質をコードする遺伝子の配列と相補的な配列をそれぞれが有する 4 つのキラルとして純粋なオリゴヌクレオチドを合成し、調剤し、初代マウス肝細胞にトランスフェクトした。m R N A レベルを定量化して、抑制レベルを評価した。本実施例においては、ヒトアポリポタンパク質 - B (A p o B) にアンチセンスの配列を有する、(従ってヒトアポリポタンパク質 - B (A p o B) を標的にする) オリゴヌクレオチドを、遺伝子導入マウス発現ヒト A p o B における概念証明に使用した。

【 1 8 0 3 】

オリゴヌクレオチドを用いたマウス初代肝細胞のトランスフェクション

7 週齢の C 5 7 B L 6 雄マウスを使用して、マウス初代肝細胞を抽出し、9 6 - ウェルプレートに蒔いた (重ね合せなし) (C e l s i s / B i o r e c l a m a t i o n I V T) 。初代肝細胞のトランスフェクションを、リポフェクチン (L i f e T e c h n o l o g i e s 、品番 1 8 2 9 2 - 0 3 7) と、製造業者のプロトコルを使用して、9 6 - プレートウェルあたり 0 . 5 μ l のリポフェクチンを使用して行った。6 μ M から開始して 1 2 個の 1 : 3 s i R N A 2 本鎖希釈液を作成した。次に 1 0 μ l の 1 0 × オリゴを、9 . 5 μ l の生体外 G r o H I M e d i u m (C e l s i s 、品番 Z 9 9 0 0 9) の血清を含まない培地および 1 ウェルあたり 0 . 5 μ l のリポフェクチンの調製混合物とリポプレックスにした。1 0 ~ 1 5 分のインキュベーション後、2 0 μ l のリポプレックスしたオリゴを、8 0 μ l の生体外 G r o H I M e d i u m 中の初代肝細胞に加え、

1 ウェルあたり 100 μ l の最終体積にした。トランスフェクション後 24 時間で、細胞を溶解させた。

【1804】

アポリポタンパク質 B mRNA アッセイ

MagMAX (商標) - 96 全 RNA 単離キット (Life Technologies、AM1830) を使用して、全 mRNA を細胞可溶化物から精製し；RNase 阻害剤を有する高容量 cDNA 逆転写キット (Life Technologies、4374967) で 15 μ l の cDNA を合成した。Probes Master Mix (Roche、04707494001) を使用して製造業者のプロトコルに従って、以下のプライマーを使用して、Lightcycler 480 (Roche) で遺伝子発現をリアルタイム PCR により評価した。

10

マウスアポリポタンパク質 B プライマー：

[テンプレート：(GenBank 目録番号 M35186)]

・フォワードプライマー：CGTGGGCTCCAGCATTTCTA

・リバープライマー：AGTCATTTCTGCTTTTGCCTC

・PCR プローブ：FAM - CCAATGGTCGGGCACCTGCTCAA - TAM

RA

マウス GAPDH プライマー

・フォワードプライマー：GGCAAATTC AACGGCACAGT

・リバープライマー：GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT

・PCR プローブ：5' JOE - AAGGCCGAGAAATGGGAAGCTTGTCAATC - TAMRA 3'

20

【1805】

データ解析

デルタデルタ Ct 法を使用して、値を計算した。各試料で、平均 ApoB 信号を平均 GAPDH 信号に正規化し、次に偽のトランスフェクトおよび未処理試料の対応する平均比に正規化し、ApoB タンパク質発現の相対レベルを得た。「もとの」立体的にランダムな混合物を参照として使用した。Graphpad プリズムを使用して相対的な IC50 を計算するため、4 パラメータの直線回帰曲線をデータにフィッティングし、最下部および最上部をそれぞれ 0 および 100 の定数に束縛した。

30

【1806】

生体外投与反応 (図 71 および 72) は、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチドが有意に異なる有効性を有することを示し、ONT-83 がもっとも有効性があり、ONT-84 および ONT-85 がもっとも有効性が少なく、IC50 において 8.6 倍の差があることを示している (表 E-39)。

表 E-39 初代マウス肝細胞におけるマウスアポリポタンパク質 B / GAPDH mRNA レベルの抑制に対する立体異性体 (ONT-83、-84、-85 または -86) の IC50 値

【表 94】

40

				Hill Slope	IC50
	Bottom	Top	LogIC50		
ONT-83	0	100	1.6	-0.4	35.8
ONT-82	0	100	1.8	-0.3	64.4
ONT-85	0	100	2.5	-0.3	308.0
ONT-84	0	100	2.5	-0.8	307.8
ONT-86	0	100	1.7	-0.6	51.2

【1807】

本実施例において示される結果は、例えば、キラルとして純粋なオリゴヌクレオチド組

50

成物は、適切な参照（例えば、特に立体的にランダムな薬剤を含む、同一配列であるが異なるキラル特異性のオリゴヌクレオチドの薬剤）と比較して、詳細には「もとの」立体的にランダムな薬剤と比較して、生体外で有意に異なる薬理学活性を有し得ることを実証する。当業者は、この実証を考慮すると、本開示により提供するキラル制御したオリゴヌクレオチド組成物が予想外の活性および特性を有することを理解するであろう。

【1808】

均等論

【1809】

本発明のいくつかの例示的实施形態が記載されているが、前述のものは、単に例示したものであり、制限するものでなく、例としてのみ表されたものであることは、当業者には明白であろう。多くの修正および他の例示的实施形態は、当業者の及び範囲内であり、本発明の範囲内であると意図される。特に、本明細書中に表された多くの実施例は、方法行為の特定の組み合わせまたはシステム要素を含むが、これらの行為およびこれらの要素が、同じ目的を達成するための他の方法で併用され得ることを理解すべきである。1つの実施形態に関してのみ議論される行為、要素、および特徴は、他の実施形態で同様な役割から除外されることを意図されない。さらに、次の請求の範囲中に引用される1つ以上の手段＋機能限定（means-plus-function limitations）のため、該手段は、引用された機能を実施するために、本明細書に開示の手段を限定することを意図せず、該引用機能の実施のため、今既知であるまたは後に開発されるいずれの手段も範囲に含むことを意図される。

【1810】

本請求範囲の要素を修正するために、本請求の範囲中の「1番目」、「2番目」、「3番目」、他などの通常の語の使用は、それ自体、いずれの優先度も、または1つの請求の範囲の要素の別のものに対する順も含意するものではなく、または方法のその行為の該時間的順序が実施されるが、特定の名前を有する1つの請求の範囲の要素を、該請求の範囲の要素を識別するため、同じ名前（しかし、通常の語の使用のため）を有する別の要素と識別するための標識としてのみ使用される。同様に、a）、b）、他、またはi）、ii）、他の使用は、それ自体、本請求の範囲内のいずれの優先度も、先行も、ステップ順も含意しない。同様に、本明細書中のこれらの語の使用は、それ自体、いずれの必要な優先度も、先行も、順も含意しない。

【1811】

先に記載された明細書は、当業者が、本発明の実施を可能にするのに十分であるように考慮されている。本実施例が、本発明の1つ態様の1つの例示として意図されているので、本発明は、提供される実施例による範囲に限定されず、他の機能的に均等な実施形態は、本発明の範囲内である。本明細書中で示され、記載されたものに加えて、本発明の様々な修正は、先の明細書から、当業者に明白であり、本添付の請求の範囲の範囲内であろう。本発明の利益および目的は、本発明の各実施形態により、必ずしも包含されない。

添付資料 (A)

Accession #	Unigene #	Gene Symbol	Name	Sequence
NM_003467	Hs.421986	CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	5'-UAAAAUCUUCUCCUGCCCCACCCdTdT-3'
NM_003467	Hs.421986	CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	5'-GGAAGCUGUUGGCGUGAAAAAdTdT-3'
NM_006799.2	Hs.72026	PRSS21	Protease, serine, 21 (testisin)	5'-CACAUCCAGCCCAUCUGUC(dTdT)-3'
NM_000117.1	Hs.522823	EMD	Emerin	5'-CCGUGUCCUGGGGUGGG(dTdT)-3'
NM_001350.3	Hs.336916	DAXX	Death-associated protein 6	5'-GGAGUUGGAUCUCUCAGAA(dTdT)-3'
NM_003014.2	Hs.105700	SFRP4	Secreted frizzled-related protein 4	5'-AAGTCCCGCTCATTACAAATT-3'
NM_015062.3	Hs.533551	PPRC1	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator-related 1	5'-AAGACCAGCCUCUUUGCCCCAG-3'
NM_001005360.1	Hs.211463	DNM2	Dynamitin 2	5'-GGACCAGGCAGAAAAACGAG-3'
NM_001904.2	Hs.476018	CTNBNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	5'-CUAUACAGGAUGACGCGG-3'
NM_153831.2	Hs.395482	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	5'-AACCACCUGGGCCAGAUUUAU-dTT-3'
NM_001429.2	Hs.517517	EP300	E1A binding protein p300	5'-UGACACAGGCAGGCUUGACUU-3'
NM_005904.2	Hs.465087	SMAD7	SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)	5' AA GCU CAA UUC GGA CAA CAA G 3'
NM_001904.2	Hs.476018	CTNBNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	5' AAG UCC UGU AUG AGU GGG AAC 3'
NM_175847.1	Hs.172550	PTBP1	Polypyrimidine tract binding protein 1	5'-TCG ACG AAC ATC TAC AAC GCC TGC TTC AAG AGA GCA GGC GTT GTA GAT GTT CTT TTT TT-3'
NM_175847.1	Hs.172550	PTBP1	Polypyrimidine tract binding protein 1	5'-TCG ACC AAT GAC AAG AGC CGT GAC TTC AAG AGA GTC ACG GCT CTT GTC ATT GTT TTT TT-3'

10

20

30

40

NM_002659.2	Hs.466871	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	5'-GGTGAAGAAAGGGCGTCCAA-3'
NM_033360.2	Hs.505033	KRAS2	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog	5'-GATCCGTTGGAGCTGTTGGCGTAG TTCAAGAGAGACTACGCCA ACAGCTCCAACTTTTGGAAA-3'
NM_002959.4	Hs.485195	SORT1	Sortilin 1	5'-AGGTGGTGTAAACAGCAGAG-3'
NM_002959.4	Hs.485195	SORT1	Sortilin 1	5'-AATGTTCCAAATGCCCACTC-3'
NM_000743.2	Hs.89605	CHRNA3	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	5'-AACUGCCAGUGGCCAGGGCCU-3'
NM_004859.2	Hs.491351	CLTC	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)	5'-AACCCUGCGGUCUGGAGUCAAC-3'
NM_004859.2	Hs.491351	CLTC	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)	5'-UAAUCCAAUUCGAAAGACCAAU-3'
NM_000038.3	Hs.158932	APC	Adenomatosis polyposis coli	5'-AGGGGCAGCAACTGATGAAAA-3'
NM_004850.3	Hs.58617	ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	5'-AAGGCATCGCAGAAAGGTTTAT-3'
NM_001274.2	Hs.24529	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	5'-UCGAAAGUACUCAGCGUAAAG-3'
NM_007194.3	Hs.291363	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	5'-GAACCUGAGGACCAAGAAC-3'
NM_001901.1	Hs.410037	CTGF	Connective tissue growth factor	5'-AATGTTCTCTTCCAGGTCAGCCCTGTCTC-3'
NM_001619.2	Hs.83636	ADRBK1	Adrenergic, beta, receptor kinase 1	5'-AAGAAGUACGAGAAAGCUGGAG-3'
NM_005160.2	Hs.517493	ADRBK2	Adrenergic, beta, receptor kinase 2	5'-AAGCAAGCUGUAGAACACGUA-3'
NM_005308.2	Hs.524625	GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5	5'-AAGCCGUGCAAAAGAACUCUUU-3'
NM_001004106.1	Hs.235116	GRK6	G protein-coupled receptor kinase 6	5'-AACAGUAGUUUUGUAGUGAGC-3'
NM_017556.1	Hs.530101	FBLP-1	Filamin-binding LIM protein-1	5'-AAAGGGGCAUCCACAGACAUC-3'

10

20

30

40

NM_005857.2	Hs.132642	ZMPSTE24	Zinc metalloproteinase (STE24 homolog, yeast)	5'- TTAT TCTTCTCTTT GGAGGA -3'
NM_005572	Hs.491359	LMNA	Lamin A/C	5'- ACTGGACTTC CAGAGAAG -3'
NM_015878.3	Hs.459106	OAZIN	Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor	5'-AATTGCACGTAATCACCACAAA-3'
NM_015878.3	Hs.459106	OAZIN	Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor	5'-AAGAAATACAAAGGAAGATGAG-3'
NM_001664.2	Hs.247077	RHOA	Ras homolog gene family, member A	5'-GACAUGCUUUGCUCAUAGUCTT-3'
NM_175744.3	Hs.502659	RHOC	Ras homolog gene family, member C	5'-GACCUGCCUCCUCAUCGUCTT-3'
NM_000041.2	Hs.515465	APOE	Apolipoprotein E	5'- AAGGTGGAGCAAGCGGTGGAG -3'
NM_000041.2	Hs.515465	APOE	Apolipoprotein E	5'-AAGGAGTTGAAGGCTACAAA-3'
AF520590.1	Hs.536600	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	5'-UGCCUACGAACUCUACCCdTdT-3'
NM_138761.2	Hs.159428	BAX	BCL2-associated X protein	5'-UAUGGAGCUCAGAGGAUGdTdT-3'
NM_005733.1	Hs.73625	KIF20A	Kinesin family member 20A	5'-TTGGCCAAAGCCACACACAG-3'
NM_005733.1	Hs.73625	KIF20A	Kinesin family member 20A	5'-GTTCTCAGCCATTGCTAGC-3'
NM_005733.1	Hs.73625	KIF20A	Kinesin family member 20A	5'-GGCAGCATGTATTGCTGAG-3'
NM_014034.1	Hs.292316	ASF1A	ASF1 anti-silencing function 1 homolog A (S. cerevisiae)	5'-AAUC CAGGACUCAUCCAGAU-3'
NM_014034.1	Hs.292316	ASF1A	ASF1 anti-silencing function 1 homolog A (S. cerevisiae)	5'-AAGUGAAGAAUACGAUCAAGU-3'
NM_018154.1	Hs.26516	ASF1B	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (S. cerevisiae)	5'-AACAAACGAGUACCUCACCCCU-3'
NM_022110.3	Hs.520042	WISp39	FK506 binding protein like	5'-AACGCUUGAGCUGGAAGUAAG 3'
NM_022110.3	Hs.520042	WISp39	FK506 binding protein like	5'-CCUCAAAGCUUCUGAUCUC-3'
NM_000389.2	Hs.370771	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	5'-AACUUCGACUUUGUCACCGAG-3'
NM_004064.2	Hs.238990	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	5'-AAGCACUGCAGAGACAUGGAAG-3'

10

20

30

40

NM_033084.2	Hs.208388	FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2	5'- AACAGCCATGGATACACTTGA -3'
NM_001641.2	Hs.73722	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	5'-AATGACAAAAGAGGCAGCAGG-3-
NM_001641.2	Hs.73722	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	5'-AACCTGCCACACTCAAGATC-3'
NM_001641.2	Hs.73722	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	5'-AGCTGAACCTTCAGGAGCTGCC-3'
NM_001641.2	Hs.73722	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	5'-AAGCCTTTCGCAAGTTCCTGA-3'
NM_001641.2	Hs.73722	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	5'-ACGGCATAGGCGATGAGGAG-3'
NM_001641.2	Hs.73722	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	5'-AGGAAGGCCGGGTGATTGTG-3'
NM_001641.2	Hs.73722	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	5'-GTCTGGTACGACTGGAGTA-3'
NM_001641.2	Hs.73722	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	5'-GACAGCTTTAGGCACCTCTA-3'
NM_015641.2	Hs.533391	TES	Testis derived transcript (3 LIM domains)	5'-GGAUUCGAACUGCACUUCU-3'
NM_015641.2	Hs.533391	TES	Testis derived transcript (3 LIM domains)	5'-ACUGUGGCACCCAGCUUGU-3'
NM_003461.3	Hs.490415	ZYX	Zyxin	5'-GCCCAAAGUGAAUCCCUUC-3'

10

20

30

40

NM_002880.2	Hs.159130	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	5'-TTTGAATATCTGTGCTGAGAACACA GTTCTCAGCACAGATATCTTTT-3'
NM_002880.2	Hs.159130	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	5'-TTTGTCAATTAGCTGGAACATCACAG ATGTTCCAGCTAATTGACTTTT-3'
NM_004506.2	Hs.158195	HSF2	Heat shock transcription factor 2	5'-AATGAGAAAAGCAAAAAGGTGCCCCGTGTCTC-3'
NM_005356.2	Hs.470627	LCK	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	5'-CAUCGAUGUGUGAGAACUCGC-3'
NM_005546.3	Hs.483938	ITK	IL2-inducible T-cell kinase	5'-CUGUUCUCAGCUGGAGAGGCUU-3'
NM_005546.3	Hs.483938	ITK	IL2-inducible T-cell kinase	5'-GGAGCCUUC AUGGUAAGGGAUU-3'
NM_002133.1	Hs.517581	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	5'-GGCACCATGAAGGCG-3'
NM_000639.1	Hs.2007	FASLG	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	5'-CUGGGCU GUACU UUGUA UATT-3'
NM_018417.2	Hs.320892	SAC	Testicular soluble adenylyl cyclase	5'-AUGUAGCCUGGAGAUCCAUUU-3'
NM_003743.3	Hs.412293	NCOA1	Nuclear receptor coactivator 1	5'-CCUCAGGGCAGAGAACCAUCdTdT-3'
NM_005572.2	Hs.491359	LMNA	Lamin A/C	5'-CUGGACUUC CAGAGAACAUUCdTdT-3'
NM_176871.2	Hs.521444	PDLIM2	PDZ and LIM domain 2 (mystique)	5'-AAGAUCCGCCAGAGCCCCUCG-3'
NM_014188.2	Hs.30026	HSPC182	HSPC182 protein	5'-AACAGGGACTCACGTGAAGCT-3'
NM_014188.2	Hs.30026	HSPC182	HSPC182 protein	5'-AAGACCTGTTTGATCTGATCC-3'
AF263744.1	Hs.519346	ERBB2IP	ErbB2 interacting protein	5'-UAGACUGACCCAGCUGGAAdTdT-3'
NM_002583.2	Hs.406074	PAWR	PRKC, apoptosis, WTI, regulator	5'-GAUGCAAUACACAACAGAdTdT-3'
NM_003766.2	Hs.12272	BECN1	Beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein)	5'-CUCAGGAGGAGGCCAUUU-3'
NM_003766.2	Hs.12272	BECN1	Beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein)	5'-GAUUGAAGACACAGGAGGC-3'
NM_004849.1	Hs.486063	APG5L	APG5 autophagy 5-like (S.	5'-GCAACUCUCUGGAUGGGAUUG-3'

10

20

30

40

NM_031482.3	Hs.527193	APG10L	cerevisiae)	APG10 autophagy 10-like (S. cerevisiae)	5'-GGAGUUAUGAGUGCUAUA-3'
NM_004707.2	Hs.264482	APG12L	cerevisiae)	APG12 autophagy 12-like (S. cerevisiae)	5'-CAGAGGAACCCUGCUGGCGA-3'
NM_002613.2	Hs.459691	PDPK1		3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	5'-AACTGGCAACCTCCAGAGAAAT-3'
NM_002613.2	Hs.459691	PDPK1		3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	5'-AAGAGACCTCGTGGAGAAAAT-3'
NM_000314.2	Hs.500466	PTEN		Phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	5'-AACAGTAGAGGAGCCGTCAAA-3'
NM_006092.1	Hs.405153	CARD4		Caspase recruitment domain family, member 4	5'-GGGUGAGACCAUUCUUAUCTT-3'
NM_006092.1	Hs.405153	CARD4		Caspase recruitment domain family, member 4	5'-GGCCAAAAGUCUAUGAAGAATT-3'
NM_000598.3	Hs.450230	IGFBP3		Insulin-like growth factor binding protein 3	5'-AAUCAUCAAGAAAGGGCA-3'
NM_006839.1	Hs.148559	IMMT		Inner membrane protein, mitochondrial (mitofilin)	5'-AAUUGCUGGAGCUGGCCUUTT-3'
NM_016485.3	Hs.431367	C6ORF55		Chromosome 6 open reading frame 55	5'-GAATGAAGATCGATAGTAA-3'
NM_016485.3	Hs.431367	C6ORF55		Chromosome 6 open reading frame 55	5'-GCACAGGTGTAGCAAGTAA-3'
NM_016485.3	Hs.431367	C6ORF55		Chromosome 6 open reading frame 55	5'-GGAGAAATTATGCTTTGAAA-3'
NM_016485.3	Hs.431367	C6ORF55		Chromosome 6 open reading frame 55	5'-GCAGTGCTTTGCAGTATGA-3'
NM_016410.2	Hs.415534	SNF7DC2		SNF7 domain containing 2	5'-CAGAAAGCCTTGCGAGTTT-3'
NM_016410.2	Hs.415534	SNF7DC2		SNF7 domain containing 2	5'-GAATTGGATTGCCACAGA-3'
NM_016410.2	Hs.415534	SNF7DC2		SNF7 domain containing 2	5'-GAAGGTGTTCCCACTGATA-3'

10

20

30

40

NM_016410.2	Hs.415534	SNF7DC2	SNF7 domain containing 2	5'-GAGAGGGTCTCTGCAAAAGAA-3'
NM_199185.1	Hs.519452	NPM1	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	5'-UGAUGAAAAAUGAGCACCAG-3'
NM_003118.2	Hs.1111779	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	5'-AAAATCCCTGCCAGAACCAACC-3'
NM_003118.2	Hs.1111779	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	5'-AACAAAGACCTTCGACTCTTCC-3'
NM_003183.3	Hs.404914	ADAM17	A disintegrin and metalloproteinase domain 17	5'-AAACGAAAGCGAGTACACT-3'
NM_012164.2	Hs.494985	FBXW2	(tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	5'-AGATGGACTTCTCTGTACAGG-3'
NM_012164.2	Hs.494985	FBXW2	F-box and WD-40 domain protein 2	5'-GACATTGTCTGTCTCTGAGGA-3'
NM_175940.1	Hs.272813	DUOX1	Dual oxidase 1	5'-GGACUUAUCCUGGCUAGAGtt-3'
NM_004503.2	Hs.820	HOXC6	Homeo box C6	5'-CCGGAUCUACUCGACUCCCTT-3'
NM_004503.2	Hs.820	HOXC6	Homeo box C6	5'-CCUAAUCACACACUCUGUATT-3'
NM_004503.2	Hs.820	HOXC6	Homeo box C6	5'-ACUGCAGACAAAACACCUUTT-3'
NM_004503.2	Hs.820	HOXC6	Homeo box C6	5'-UCCAACCCUCUGGGUCCGUUTT-3'
NM_004503.2	Hs.820	HOXC6	Homeo box C6	5'-ACUGAGACCGUUUCUGUGUTT-3'
NM_004503.2	Hs.820	HOXC6	Homeo box C6	5'-CUCAGACUCUACAGAUUGCTT-3'
NM_182965.1	Hs.68061	SPHK1	Sphingosine kinase 1	5'-GGG CAA GGC CUU GCA GCU C-3'
NM_003329.2	Hs.435136	TXN	Thioredoxin	5'-AUGACUGUCAGGAUGUUGCdTT-3'
NM_003329.2	Hs.435136	TXN	Thioredoxin	5'-GCAACAUCCUGACAGUCAUdCC-3'
NM_203500.1	Hs.465870	KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1	5'-UGAACGGUGUCUGUCAUGUAdTdT-3'
NM_005239.4	Hs.517296	ETS2	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	5'-GCAGAGGUUCGGCAUGAAUdTdT-3'

10

20

30

40

NM_002067.1	Hs.515056	GNAI1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	5'-AAGATGTTTCGTGGACCTGAAC-3'
NM_004827.1	Hs.480218	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	5'-AAGATGATTGTTCTGTCCTGCTAT AGTGAGTCGTATTA-3'
NM_000610.3	Hs.502328	CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	5'-GAACGAAUCCUGAAGACAUCU-3'
NM_003489.1	Hs.155017	NRIP1	Nuclear receptor interacting protein 1	5'-GAAGGAAGCUUUUCUAGCU-3'
NM_004995.2	Hs.2399	MMP14	Matrix metalloproteinase 14	5'-AAGCCTGGCTACAGCAATATGCCGTGCTC-3'
NM_022045.2	Hs.546363	MTBP	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse) binding protein, 104kDa	5' GGCUCAUUUGCACUCAAUU 3'
NM_002392.2	Hs.369849	MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	5' GCCACAAAUCUGAUAGUAU 3'
NM_170707.1	Hs.491359	LMNA	Lamin A/C	5' CUGGACUUC CAGAGAACA 3'
NM_004759.3	Hs.519276	MAPKAPK2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	5'-UGACCAUACCCGAGUUUAUdTdT-3'
NM_001948.2	Hs.527980	DUT	DUTP pyrophosphatase	5'-GATTATAGGAAATGTTG-3'
NM_016022.1	Hs.108408	APH-1A	Likely ortholog of C. elegans anterior pharynx defective 1A	5'-AAGAAAGGCAGATGAGGGGTTA-3'
NM_031301.2	Hs.511703	PSFL	Anterior pharynx defective 1B-like	5'-AACAAAAGATGGACCAACACAG-3'
BC007496.1	Hs.36915	SMAD3	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)	5'-GGACGAGGUCUGCGUGAAUdTdT-3'
NM_182763.1	Hs.532826	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	5'-AAGAAACGCGGUAAUCCGGACU-3'

10

20

30

40

NM_001022.3	Hs.438429	RPS19	Ribosomal protein S19	5'-GCACAAAGAGCTTGCTCCCTcaagaga GGGAGCAAGCTCTTTGTGC-3'
NM_001022.3	Hs.438429	RPS19	Ribosomal protein S19	5'-GTCCGGGAAGCTGAAAAGTCTcaagaga GACTTTCAGCTTCCCGGAC-3'
NM_001022.3	Hs.438429	RPS19	Ribosomal protein S19	5'-GAGATCTGGACAGAATCGCtcaagaga GCGATTCTGTCCAGATCTC-3'
NM_001400.2	Hs.154210	EDG1	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	5'-GGAGAACAGCATTAAACTG-3'
NM_001001938.1	Hs.546252	C9orf47	Chromosome 9 open reading frame 47	5'-GGTCAACATTCTGATGTCT-3'
NM_021972.2	Hs.68061	SPHK1	Sphingosine kinase 1	5'-GGGCAAGGCCTTGCAGCTC-3'
NM_016068.1	Hs.423968	TTC11	Tetratricopeptide repeat domain 11	5'-GTACAAATGATGACATCCGTAA-3'
NM_016068.1	Hs.423968	TTC11	Tetratricopeptide repeat domain 11	5'-GTACGTCCCGGGTTGCTGCA-3'
NM_153831.2	Hs.395482	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	5'-AAGCAUGUGGCCUGCUAUGGA-3'
NM_003749.2	Hs.442344	IRS2	Insulin receptor substrate 2	5'- GATCCCGCCTCAACAACAACAACAACACTTCAAG AGAGTTGTTGTTGTTGTTGAGGGTTTTTGGAAA - 3'
NM_000691.3	Hs.531682	ALDH3A1	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	5'-AAG AAG AGC UUC GAG ACU UUC-3'
NM_000689.3	Hs.76392	ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	5'-AAC TGG GAG AGT ACG GTT TCC-3'
NM_000604.2	Hs.549034	FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	5'-AAGTCGGACGCAACAGAGAAA-3'

10

20

30

40

NM_006006.3	Hs.171299	ZBTB16	Zinc finger and BTB domain containing 16	5'-GGCCAACCAAGAUCCGGCUGUU-3'
NM_006006.3	Hs.171299	ZBTB16	Zinc finger and BTB domain containing 16	5'-GAUGUUUGACAUCCUUCUU-3'
NM_004348.1	Hs.122116	RUNX2	Runx-related transcription factor 2	5'-GGCUGCAAGCAGUAUUUACUU-3'
NM_004348.1	Hs.122116	RUNX2	Runx-related transcription factor 2	5'-GGACAGAGUCAGAUUACAGUU-3'
NM_014382.2	Hs.546361	ATP2C1	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 1	5'-AGCCACTGTGTGGAAGAGTATATT-3'
NM_002083.2	Hs.2704	GPX2	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	5'-CCUCUGGUUGGUAUUCAdTdT-3'
NM_002083.2	Hs.2704	GPX2	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	5'-GGAUGAUGGCACCUUCCUAdTdT-3'
NM_000942.4	Hs.434937	PPIB	Peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	5'-AATTGGAGATGAAGATGTAGG-3'
NM_003153.3	Hs.524518	STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	5'-CAGUUCGGCCACUUGCCAAAdTdT-3'
NM_003153.3	Hs.524518	STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	5'-AGCCUGGUGGACAUUUAUAdTdT-3'
NM_003153.3	Hs.524518	STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	5'-GAUGUGUGAAACUCUGAACdTdT-3'
NM_003153.3	Hs.524518	STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	5'-CAGAUGGGUAAAGGAUGGCAdTdT-3'
NM_002945.2	Hs.461925	RPA1	Replication protein A1, 70kDa	5'-AAGCACUAUCAUUGCGAAUCC-3'
NM_003169.2	Hs.437056	SUPT5H	Suppressor of Ty 5 homolog	5'-AACTGGGCGAGTATTACATGA-3'
NM_003318.3	Hs.169840	TTK	TTK protein kinase	5'-TGAACAAAGTGAGAGACAT-3'
NM_007194.3	Hs.291363	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S)	5'-AATGTGTGAATGACAACTACT-3'

10

20

30

40

NM_002358.2	Hs.533185	MAD2L1	pombe)	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	5'-AATACGGACTCACCTTGCTTG-3'
NM_001401.3	Hs.126667	EDG2		Endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	5'-r(CCGCCGCUUCCAUUUUUUCCU)d(TT)-3'
NM_001401.3	Hs.126667	EDG2		Endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	5'-r(AGGAAAAAUGGAAGCGCGGG)d(TT)-3')
NM_004448.2	Hs.446352	ERBB2		V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	5'-CCUGGAACUCACCUACCUUGdTdT-3'
NM_004448.2	Hs.446352	ERBB2		V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	5'-CUACCUUUUACGGACGUGdTdT-3'
NM_004448.2	Hs.446352	ERBB2		V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	5'-GAUCCGGAAGUACACGAUGdTdT-3'
NM_014812.1	Hs.533635	KAB		KARP-1-binding protein	5'-GAAAGGAUCCUCCAAAGUCA-3'
NM_002737.2	Hs.531704	PRKCA		Protein kinase C, alpha	5'-AAGCTCCATGTCACAGTACGA-3'
NM_212535.1	Hs.460355	PRKCB1		Protein kinase C, beta 1	5'-AAGCGCTGCGTCATGAATGTT-3'
NM_138578.1	Hs.516966	BCL2L1		BCL2-like 1	5'-CTG CCT AAG GCG GAT TTG AAT-3'
NM_138578.1	Hs.516966	BCL2L1		BCL2-like 1	5'-GGC AGG CGA CGA GTT TGA ACT-3'
NM_138578.1	Hs.516966	BCL2L1		BCL2-like 1	5'-GTG CGT GGA AAG CGT AGA CAA-3'
NM_004050.2	Hs.410026	BCL2L2		BCL2-like 2	5'-GGC GGA GTT CAC AGC TCT ATA-3'
NM_004050.2	Hs.410026	BCL2L2		BCL2-like 2	5'-GTG GGC ATA AGT GCT GAT CTA-3'
NM_004050.2	Hs.410026	BCL2L2		BCL2-like 2	5'-CTC GGT CCT GCG ATT ATT AAT-3'
NM_003443.1	Hs.433764	ZBTB17		Zinc finger and BTB domain containing 17	5'-AAGGCCGAGATCAGCAAAGTTCAAGAGACT
NM_003345.3	Hs.302903	UBE2I		Ubiquitin-conjugating enzyme	TTGCTGATCTCGGCCTTTTTTTT -3'
					5'-GGC CAG CCA UCA CAA UCA ATT-3'

10

20

30

40

NM_003345.3	Hs.302903	UBE2I	E2I (UBC9 homolog, yeast)	5'-GGA ACU UCU AAA UGA ACC ATT-3'
NM_016166.1	Hs.162458	PIAS1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog, yeast)	5'-GGU CCA GUU AAG GUU UUG UTT-3'
NM_016166.1	Hs.162458	PIAS1	Protein inhibitor of activated STAT, 1	5'-GGU UAC CUU CCA CCU ACA ATT-3'
NM_004068.2	Hs.518460	AP2M1	Protein inhibitor of activated STAT, 1	5'-AAGUGGAUGCCUUUCGGGUCA-3'
NM_004068.2	Hs.518460	AP2M1	Adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	5'-AAGGAGAACAGUUCUUGCGGGC-3'
NM_004068.2	Hs.518460	AP2M1	Adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	5'-AAGGUCCAGU-CAUUCCAAUUG-3'
NM_001278.2	Hs.198998	CHUK	Adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	5'-AGGAAGGACCUGUUGACCUUTT-3'
NM_001556.1	Hs.413513	IKBKB	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	5'-UGGUGAGCUUAAUGAAUGATT-3'
NM_021975.2	Hs.502875	RELA	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	5'-AGAGGACAUGAGGUGUAUTT-3'
NM_000963.1	Hs.196384	PTGS2	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	5'-AACTGCTCAACACCGGAATTTT-3'
NM_005427.1	Hs.192132	TP73	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5'-CCAUCCUGUACAAUUCUUG-3'
NM_005157.2	Hs.431048	ABL1	Tumor protein p73	5'-CAAUAAAGGAAGAGCCCUUTT-3'
NM_005157.2	Hs.431048	ABL1	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	5'-TTAUUCCUUCUUCGGGAAGUC-3'
NM_001168.1	Hs.514527	BIRC5	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	5'-GGCUGGCUUCAUCCACUGCTT-3'

10

20

30

40

NM_002940.1	Hs.12013	ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	5'-CGAAGATGTTGACCTGGTC-3'
NM_002940.1	Hs.12013	ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	5'-AGAGTTGTCTCTGTAGTTCCG-3'
NM_004208.2	Hs.424932	PDCD8	Programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)	5'-GGAAAUUUGGAAAGAUCCdTdT
NM_000115.1	Hs.82002	EDNRB	Endothelin receptor type B	5'-GGAGACUUUCAAUACAUCTTtt-3'
NM_001712.2	Hs.512682	CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	5'-AACCTTCTGGAAACCCGCCAC-3'
NM_001712.2	Hs.512682	CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	5'-AATGTTGCAGAGGGGAGGAG-3'
NM_033284.1	Hs.436900	TBL1Y	Transducin (beta)-like 1Y-linked	5'-AAGAGATGGAGCACATGAAA-3'
NM_033284.1	Hs.436900	TBL1Y	Transducin (beta)-like 1Y-linked	5'-AAGATGAGCATAAACCAGTGAC-3'
NM_024665.3	Hs.438970	TBL1XRI	Transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	5'-AAGGCCCTATATTGCAATTA-3'
NM_173174.1	Hs.491322	PTK2B	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	5'-GTTGGCTGAGTGCTATGGGCTGA-3'
NM_006311.2	Hs.462323	NCOR1	Nuclear receptor co-repressor 1	5'-GGGCTTATGGAGGACCCCTATGA-3'
NM_002211.2	Hs.429052	ITGB1	Integrin, beta 1	5'-GGAACAGCAGAGAAAGCTCATTCAGAG
NM_139176.2	Hs.351118	NALP7	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 7	ATGAGCTTCTCTGCTGTTCCCTTTT-3'
NM_139176.2	Hs.351118	NALP7	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 7	5'-CACCGAAGCAGCAGACGACTTCTTCTTCAAG
NM_004422.2	Hs.118640	DVL2	Dishevelled, dsh homolog 2 (Drosophila)	AGAGAAAGAGTCGTGCTGCTTC-3'
NM_001228.2	Hs.369736	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	5'-AGGUUCAGCAGCUCCACGGAdTdT-3'
NM_001228.2	Hs.369736	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	5'-gatccccCTCGGGGATACTGTCTGAttaagagaTCAGACAGTATCCCCGAGGgttttgaaa-3'

10

20

30

40

NM_001769.2	Hs.114286	CD9	CD9 antigen (p24)	5'-GAGCATCTTCGAGCAAGAA-3'
NM_004357.3	Hs.512857	CD151	CD151 antigen	5'-CATGTGGCACCGTTTGCCT-3'
NM_003188.2	Hs.485968	MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase 7	5'-UGGCUUAUCUUACACUGGA-3'
NM_006116.2	Hs.507681	MAP3K7IP1	Mitogen-activated protein kinase kinase 7 interacting protein 1	5'-GGCUCAAGUUCAGGAGUGAGAACAA-3'
NM_015093.2	Hs.269775	MAP3K7IP2	Mitogen-activated protein kinase kinase 7 interacting protein 2	5'-GGAACGACUUCAAAGAGAACUUGAG-3'
NM_001315.1	Hs.485233	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	5'-GCAUUACAACAGACAGUUGAUUU-3'
NM_006502.1	Hs.439153	POLH	Polymerase (DNA directed), eta	5'-GUG GAG CAG CGG CAA AAU CTT-3'
NM_006502.1	Hs.439153	POLH	Polymerase (DNA directed), eta	5'-UCC UCA UUU GAG GAA UAA ATT-3'
NM_006502.1	Hs.439153	POLH	Polymerase (DNA directed), eta	5'-GGA AUA AAC CUU GUG CAG UTT-3'
NM_006502.1	Hs.439153	POLH	Polymerase (DNA directed), eta	5'-UAA ACC UUG UGC AGU UGU ATT-3'
NM_006502.1	Hs.439153	POLH	Polymerase (DNA directed), eta	5'-CCU UGU GCA GUU GUA CAG UTT-3'
NM_015321.1	Hs.371096	MECT1	Mucoepidermoid carcinoma translocated 1	5'-CCGGCAACCUUGCGGCCAAUU-3'
NM_181715.1	Hs.406392	TORC2	Transducer of regulated cAMP response element-binding protein (CREB) 2	5'-CGACUACCAUCUGCACUUAUU-3'
NM_001079.3	Hs.234569	ZAP70	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa	5'-AACCGGCTCTCCATTGGCATT-3'
NM_004834.3	Hs.431550	MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	5'-GTGGTTGGAAATGGCACCTTT-3'
NM_006191.1	Hs.524498	PA2G4	Proliferation-associated 2G4,	5'-AAGCAGCCAGGAUUAUUCU-3'

10

20

30

40

			38kDa	
NM_006191.1	Hs.524498	PA2G4	Proliferation-associated 2G4, 38kDa	5'-AAGUGAGGUGGAAAAGGCGUUU-3'
NM_005940.3	Hs.143751	MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	5'-TCCCATGTCCACTTCGACTATGATGTCA
NM_005940.3	Hs.143751	MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	AGAGCATCATAGTCGAAGTGACATTT-3'
NM_005940.3	Hs.143751	MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	5'-TCCCAGATCTACTTCTTCCGAGGTCAAG
NM_005940.3	Hs.143751	MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	AGCCTCGGAAGAAGTAGATCTTT-3'
NM_005940.3	Hs.143751	MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	5'-TCCCAGGATGCTGATGGCTATGCCTTCA
NM_003684.3	Hs.371594	MKNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	AGAGAGGCATAGCCATCAGCATCCTTT-3'
NM_003668.2	Hs.413901	MAPKAPK5	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5	5'-AATGCCCCATCTCTATAGGTTT-3'
NM_004604.3	Hs.83734	STX4A	Syntaxin 4A (placental)	5'- GGAUAUGCGAAGAAAGAUAUCTT -3'
NM_004177.3	Hs.530733	STX3A	Syntaxin 3A	5'-AAGGAGGAAGCTGATGAGAAC-3'
NM_001009567.1	Hs.461247	MRC1L1	Mannose receptor, C type 1-like 1	5'-AACGTCCGGAACAACTGAAG-3'
NM_002576.3	Hs.435714	PAK1	P21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1	5'-AAGTGGTACGCAGATTGCACG-3'
NM_001664.2	Hs.247077	RHOA	Ras homolog gene family, member A	5'-AAGGAGAAAGAAAAAGAGGAC-3'
NM_175744.3	Hs.502659	RHOC	Ras homolog gene family, member C	5'-GCAGGTAGAGTTGGCTTTG-3'
NM_080491.1	Hs.429434	GAB2	GRB2-associated binding protein 2	5'-GACTATGATCGACTGCGGC-3'
NM_080491.1	Hs.429434	GAB2	GRB2-associated binding protein 2	5'-GTGAGAACGATGAGAAAATA-3'
NM_005225.1	Hs.96055	E2F1	E2F transcription factor 1	5'-GTTGGTGCCCTAATCACTTA-3'
				5'-GACGTGTCAGGACCTTCGT-3'

10

20

30

40

NM_005225.1	Hs.96055	E2F1	E2F transcription factor 1	5'-CTTAACTGGTGTACATTAA-3'
NM_006392.2	Hs.376064	NOL5A	Nucleolar protein 5A (56kDa with KKE/D repeat)	5'-CAAUAUGAUCAUCCAGUCCAUA-3'
NM_015934	Hs.471104	NOP5/NOP58	Nucleolar protein NOP5/NOP58	5'-CAAGCAUGCAGCUUCUACCGUUC-3'
NM_001436	Hs.299002	FBL	Fibrillarin	5'-CAGUCGAGUUCUCCACCGUCU-3'
NM_006666	Hs.515846	RUVBL2	RuvB-like 2 (E. coli)	5'-GAGACCAUCUACGACCUGGGCAC-3'
NM_006666	Hs.515846	RUVBL2	RuvB-like 2 (E. coli)	5'-GAGAGUGACAUGGCGCCUGUCCU-3'
NM_003707.1	Hs.272822	RUVBL1	RuvB-like 1 (E. coli)	5'-AAGGAACCAACAGUUGAAACUG-3'
NM_003707.1	Hs.272822	RUVBL1	RuvB-like 1 (E. coli)	5'-GAGUCUUCUAUCGCUCCAUCCGU-3'
NM_004741	Hs.523238	NOLC1	Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	5'-AAAUUGAGGUGGAUUCACGAGUU-3'
NM_032177	Hs.546453	PHAX	RNA U, small nuclear RNA export adaptor (phosphorylation regulated)	5'-UAGUAUCAGCGAGGAAACAAUA-3'
NM_032177	Hs.546453	PHAX	RNA U, small nuclear RNA export adaptor (phosphorylation regulated)	5'-AAGAGUAUAUAGCACAGGAUUUA-3'
NM_024831	Hs.335068	NCOA6IP	Nuclear receptor coactivator 6 interacting protein	5'-AAGAUUGCCCUUGCUCGCAAAUA-3'
NM_024831	Hs.335068	NCOA6IP	Nuclear receptor coactivator 6 interacting protein	5'-UAUCACCGUAUGAAAUGGAAACU-3'
NM_022874.1	Hs.202179	SMN2	Survival of motor neuron 1, telomeric	5'-AAGUGGAAUGGGUAAACUCUUCUU-3'
NM_012321.2	Hs.515255	LSM4	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated	5'-AACGGCCGUCCCCAAAGCUGGCUG-3'
NM_016200.2	Hs.446179	LSM8	LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated	5'-AAGAAACAGAUUUCUGCGCUUGAU-3'
NM_003142	Hs.546301	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	5'-GAUUUAGGUCCACUUCUCAAUGUCC-3'
NM_003142	Hs.546301	SSB	Sjogren syndrome antigen B	5'-AAGAUUCUUCUCCAUUAAAUUGCCU-3'

10

20

30

40

NM_001228	Hs.369736	CASP8	(autoantigen La) Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	5'-AACTACCAGAAAGGTATACCT-3'
NM_003842.3	Hs.521456	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	5'-AAGACCCTTGTGCTCGTTGTC-3'
NM_017672.2	Hs.512894	TRPM7	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	5'-AAGCAGAGTGACCTGGTAGAT-3'
NM_007294.1	Hs.194143	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	5'-UCACAGUGUCCUUUAUGUAdTdT-3'
NM_033238.1	Hs.526464	PML	Promyelocytic leukemia	5'-AUGGCUUCGACGAGUUCAAATT-3'
NM_000546.2	Hs.408312	TP53	Tumor protein p53 (Li- Fraumeni syndrome)	5'-GCAUGAAACCGGAGGCCCAUTT-3'
NM_002198.1	Hs.436061	IRF1	Interferon regulatory factor 1	5'-AGACCAGAGCAGGAACAAGTT-3'
NM_024790.3	Hs.370147	FLJ22490	Hypothetical protein FLJ22490	5'-GAAGATTTCGCGAGTGGAC-3'
NM_000546.2	Hs.408312	TP53	Tumor protein p53 (Li- Fraumeni syndrome)	5'-UGGUUCACUGAAGACCCAGUUU-3'
NM_002880.2	Hs.159130	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	5'-AUUCCUGCUCAAUGGAUUUdTdT-3'
NM_198400.1	Hs.1565	NEDD4	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	5'-TAGAGCCTGGCTGGGTGTTTGTG-3'
NM_015277.2	Hs.185677	NEDD4L	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	5'-AACCAACAACAAGTCACAG-3'
NM_016931.2	Hs.371036	NOX4	NADPH oxidase 4	5'-AAACCGGCAGGAGUUUACCCAG-3'
NM_005975.2	Hs.51133	PTK6	PTK6 protein tyrosine kinase 6	5'-AAGGUGGCCAUUAAAGGUGAUU-3'
NM_005531.1	Hs.380250	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16	5'-UCAGAAAGACCAAAUUCUAC-3'
NM_000633.1	Hs.150749	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	5'-GUGAAGUCAACAUGCCUGC-dTdT-3'
NM_182981.1	Hs.528383	OKL38	Pregnancy-induced growth inhibitor	5'-CACCCUACACGAAAGCCAGATT-3'

10

20

30

40

NM_002961.2	Hs.81256	S100A4	S100 calcium binding protein A4	5'-GGA CAG AUG AAG CUG CUU UTT-3'
NM_014585.3	Hs.529285	SLC40A1	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	5'-GGTGGACAAGAATGCTAGAC-3'
NM_014585.3	Hs.529285	SLC40A1	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	5'-GAAAGGATTGACCAGTTAACC-3'
NM_014585.3	Hs.529285	SLC40A1	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	5'-GCTTGAACATGAGCAAGAGC-3'
NM_021127.1	Hs.96	PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	5'-AACTTCCGGCAGAAACTTCTG-3'
NM_002467.2	Hs.202453	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	5'-GCCACAGCAUACAUCCUGUdTdT-3'
NM_002187.2	Hs.674	IL12B	Interleukin 12B	5'-CGCACGCUAAUUGCUGGCAUdTdT-3'
NM_019887.3	Hs.169611	DIABLO	Diablo homolog (Drosophila)	5'-AGCGGUGUUUCAGAAATTGtt-3'
NM_017563	Hs.150725	IL17RD	Interleukin 17 receptor D	5'-GUCGG AGGGA AGACA GUGCT T-3'
NM_017563	Hs.150725	IL17RD	Interleukin 17 receptor D	5'-GCAUG UGAUU GCUGA CGCCT T-3'
NM_003142.2	Hs.546301	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	5'-AAGGCTTCCC AACTGATGC AA-3'
NM_003142.2	Hs.546301	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	5'-AAGCCAAAG GAAGCAT TGGGTA-3'
NM_003142.2	Hs.546301	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	5'-AAGTACTAGAA GGAGAGGTGG-3'
NM_006101	Hs.414407	KNTC2	Kinctochore associated 2	5'-GTTCAAAAGCTGGATGATCTT-3'
NM_145697	Hs.234545	CDCA1	Cell division cycle associated 1	5'-AAGATACGGTCCAGAAAGCTTA -3'
NM_003550	Hs.209128	MAD1L1	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1	5'-CCAGCGGCTCAAGGAGGTTTT -3'
NM_002358	Hs.533185	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1	5'-GAGTCGGGACCACAGTTTATT -3'

10

20

30

40

NM_004336	Hs.469649	BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	5'-TAGGCTAATTGTAAGTCTCTT-3'
NM_001211.4	Hs.36708	BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	5'-GGAGATCCTCTACAAAAGGGTT-3'
NM_016343.3	Hs.497741	CENPF	Centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	5'-AAGAGATGCTAATAGCAGTTT-3'
NM_001813	Hs.75573	CENPE	Centromere protein E, 312kDa	5'-ACTCTTACTGCTCTCCAGTTT-3'
NM_004217	Hs.442658	AURKB	Aurora kinase B	5'-CGAGACCTATCGCCGCATCGT-3'
NM_005030	Hs.329989	PLK1	Polo-like kinase 1	5'-GGCGGCTTTGCCAAGTGCTT-3'
NM_004104	Hs.83190	FASN	Fatty acid synthase	5'-CCCUGAGAUCCACGCGUGdTdT-3'
NM_021975.2	Hs.502875	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	5'-GATCAATGGCTACACAGGA-3'
NM_033256	Hs.348037	PPP1R14A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	5'-ACCUGUCGAGGACUUAUCdTdT-3'
NM_177966.3	Hs.151293	2'-PDE	2'-phosphodiesterase	5'-GUACAAAGGUGGAGCGCAACdTdT-3'
NM_015355	Hs.462732	SUZ12	Suppressor of zeste 12 homolog	5'-CCCCGAAATTCCCCGTCCC-3'
NM_015355	Hs.462732	SUZ12	Suppressor of zeste 12 homolog	5'-GAGATGACCTGCATTGCCCC-3'
NM_016179.1	Hs.262960	TRPC4	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	5'-ACUCUUGGUUCAGAAAGGATT-3'
NM_000249	Hs.195364	MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolar type 2	5'-GGTTCACTACTAGTAAACT-3'
NM_000534	Hs.111749	PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1	5'-GGAATCTACTCGTTTGTAT-3'
NM_002198	Hs.436061	IRF1	Interferon regulatory factor 1	5'-CCAAGAACCAGAGAAAAGATT-3'
NM_002199.2	Hs.374097	IRF2	Interferon regulatory factor 2	5'-CUCUUUAGAAAACUGGGCAATT-3'
NM_000546.2	Hs.408312	TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	5'-AAGACTCCAGTGGTAATCTAC-3'

10

20

30

40

NM_000051	Hs.435561	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	5'-TAGAGCTACAGAACGAAAG-3'
NM_000051	Hs.435561	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	5'-GAATGTGAACACACCACAAA-3'
NM_000051	Hs.435561	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	5'-CTACACAAAATATTGAGGAT-3'
NM_000051	Hs.435561	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	5'-CTGTACTTCCATACTTGAT-3'
NM_001184	Hs.271791	ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	5'-AAGCCAAAGACAAATTCTGTGT-3'
NM_001184	Hs.271791	ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	5'-AACCTCCGTGATGTTGCTTGA-3'
NM_001798.2	Hs.19192	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	5'-CAAAGCCAGAAACAAGTTG-3'
NM_001798.2	Hs.19192	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	5'-AAATAAACTCTACCTGGTT-3'
NM_001798.2	Hs.19192	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	5'-AAACCTCAGAAATCTGCTTA-3'
NM_001798.2	Hs.19192	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	5'-GTTACTTCTATGCCTGATT-3'
NM_207003	Hs.469658	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	5'-(GACCCGAGAAAGGUAGACAAUUG)d(TT)-3'
NM_000166	Hs.333303	GJB1	Gap junction protein, beta 1, 32kDa	5'-AAGAGGCACAAAGGTCCACATCdTdT-3'
NM_000359	Hs.508950	TGM1	Transglutaminase 1	5'-AUGCAGCUGGAGAUAGGCACdTTdT-3'
NM_024596	Hs.550532	MCPH1	Microcephaly, primary autosomal recessive 1	5'-AGGAAGUUGGAAGGAUCCAdTTdT-3'
NM_024596	Hs.550532	MCPH1	Microcephaly, primary autosomal recessive 1	5'-GAACACUUUAUCAAGCCUAAUU-3'
NM_024596	Hs.550532	MCPH1	Microcephaly, primary autosomal recessive 1	5'-GGAGAGAACAAAGCAUAUUUUU-3'

10

20

30

40

NM_024596	Hs.550532	MCPH1	Microcephaly, primary autosomal recessive 1	5'-UGAUGUACCUAUUCUCUUAUU-3'
NM_024596	Hs.550532	MCPH1	Microcephaly, primary autosomal recessive 1	5'-GAUAAGAGAUUUCAGAAGAUU-3'
NM_024596	Hs.550532	MCPH1	Microcephaly, primary autosomal recessive 1	5'-GUCACCACAGCGCAATGGAdTdT-3'
NM_000245	Hs.132966	MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	5'-ACUCUAGAUGCUCAGACUUTT-3'
NM_205860.1	Hs.33446	NR5A2	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	5'-AGGATCCATCTTCTCGTTAC-3'
NM_182763.1	Hs.532826	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	5'-UAACACCAGTACGGACGGGdTdT-3'
NM_008765	Hs.444870	ORC2L	Origin recognition complex, subunit 2-like	5'-UGCUCUCUCUUGUGGGGAU-3'
NM_006190	Hs.444870	ORC2L	Origin recognition complex, subunit 2-like	5'-UCAUUGGUCAGUUGUCAUC-3'
NM_181837	Hs.410228	ORC3L	Origin recognition complex, subunit 3-like	5'-GAGACUUGGGGGUCAAUAU-3'
NM_002592.2	Hs.147433	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	5'-CGGUGACACUCAGUAUGUC-3'
NM_016526	Hs.414418	BET1L	Blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae) like	5'-AAGCAUGACCAGCCUUGCUUAC-3'
NM_001569	Hs.522819	IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	5'-GGUUGUCCUUGAGUAAUAAtt-3'
NM_080649	Hs.73722	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	5'-GUCUGGUACGACUGGAGUACC-3'
NM_002658	Hs.77274	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	5'-AACATTCACTGGTGCAACTGC-3'
NM_001654	Hs.446641	ARAF	V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	5'-AACAAACATCTTCTTACATGAG-3'

10

20

30

40

NM_004333	Hs.490366	BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	5'-AAAGAAATTGGATCTGGATCAT-3'
NM_002880	Hs.159130	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	5'-AAUAGUUUCAGCAGUUUGGCUA-3'
NM_014314	Hs.190622	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	5'-GAATTATAAAACCAGAAATTATC-3'
NM_000927.3	Hs.489033	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	5'-AAGCGAAGCAGTGGTTCAGGT-3'
NM_001753.3	Hs.74034	CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	5'-AGACGAGCUGAGCGAGAAAGCA-3'
NM_001753.3	Hs.74034	CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	5'-CAUCUACAAAGCCCCAACAACTT-3'
NM_000389.2	Hs.370771	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	5'-CUUCGACUUUGUCACCCGAG-3'
NM_007294.1	Hs.194143	BRCAl	Breast cancer 1, early onset	5'-AACCTGTCTCCACAAAGTGTG-3'
NM_002105	Hs.477879	H2AFX	H2A histone family, member X	5'-CAA CAA GAA GAC GCG AAU CcTdT-3'
NM_020382	Hs.443735	SET8	PR/SET domain containing protein 8	5'-AAUCGCCUAGGAAGACUGAUC-3'
NM_012331	Hs.490981	MSRA	Methionine sulfoxide reductase A	5'-CCCCUGUAGCGGCCCAACAUAU-3'
NM_012331	Hs.490981	MSRA	Methionine sulfoxide reductase A	5'-CAAAGUACAAAAGGAUUUAUU-3'
NM_012331	Hs.490981	MSRA	Methionine sulfoxide reductase A	5'-CGGGAGGGACAGACUUUCUUU-3'
NM_014554	Hs.371957	SENPI	SUMO1/sentrin specific protease 1	5'-GTGAACCCACAACCTCCGTATTC-3'
NM_002945	Hs.461925	RPA1	Replication protein A1, 70kDa	5'-AACUGGUUGACGAAAGUGGUG-3'
NM_001184	Hs.271791	ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	5'-AACCCGCGUUGGCGUGGUUGA-3'
NM_001430.3	Hs.468410	EPAS1	Endothelial PAS domain	5'-ACCAAUCCAGCACCCCAUCCcTdT-3'

10

20

30

40

				protein 1	
NM_001530.2	Hs.509554	HIF1A		Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	5'-CUGAUGACCAGCAACUUGAdTdT-3'
NM_021972	Hs.68061	SPHK1		Sphingosine kinase 1	5'-GAGCUGCAAGGCCUUGCCCCdTdT-3
NM_002502	Hs.73090	NFKB2		Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	5'-CTCCTCCATTGTGTGGAACCCAAAGGAGC-3'
NM_016829	Hs.380271	OGG1		8-oxoguanine DNA glycosylase	5'-GUAUGGACACUGACUCAGAUU-3'
NM_016829	Hs.380271	OGG1		8-oxoguanine DNA glycosylase	5'-GUACUUCAGCUAGAUGUUUU-3'
NM_006142	Hs.523718	SFN		Stratfin	5'-GAGCGAAACCCUGCUCACAG-3'
NM_006142	Hs.523718	SFN		Stratfin	5'-GGGUGACUACUACCGCUAC-3'
NM_006142	Hs.523718	SFN		Stratfin	5'-AGACAGCACCCUCAUG-3'
NM_00615	Hs.477693	NCK1		NCK adaptor protein 1	5'-GUCCUGGUGGCGAGUUCGATT-3'
NM_00615	Hs.477693	NCK1		NCK adaptor protein 1	5'-CGUCUCUAUGACCUCUACATT-3'
NM_002422	Hs.375129	MMP3		Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	5'-AUGAAGAGUCUUUCCAAUCCUU-3'
NM_000021.2	Hs.3260	PSEN1		Presenilin 1 (Alzheimer disease 3)	5'-AAGGTCCACTTCGTATGCTGG-3'
NM_015331	Hs.517249	NCSTN		Nicastrin	5'-AAGGGCAAGTTTCCCGTGCAG-3'
NM_016022	Hs.108408	APH-1A		Anterior pharynx defective 1 homolog A (C. elegans)	5'-AAGAAAGGCAGATGAGGGGTTA-3'
NM_172341	Hs.534465	PEN2		Presenilin enhancer 2 homolog (C. elegans)	5'-AAUCAAAAGGCUAUGUCUGGCG-3'
NM_020673	Hs.529044	RAB22A		RAB22A, member RAS oncogene family	5'-AAGGACUACGCCGACUCUAUU-3'
NM_001002814	Hs.191179	RAB11FIP1		RAB11 family interacting protein 1 (class I)	5'-CGCCTCTTTTCCCAGTCCATGT-3'
NM_015470	Hs.24557	RAB11FIP5		RAB11 family interacting	5'-GAGCTGAGTGCTCAGGCTAAA-3'

10

20

30

40

NM_030791	Hs.24678	SGPP1	protein 5 (class I)	5'-AGUGGCCCCUUUCCAGCGGdTT-3'
NM_005406	Hs.306307	ROCK1	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	5'-AAGGTGATTGGTAGAGGTGCA-3'
NM_198437	Hs.250822	STK6	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	5'-AAGCACAAAAGCTTGTCTCCA-3'
NM_006272	Hs.422181	S100B	Serine/threonine kinase 6	5'-GGAAUUC AUGGCCUUUGUU-3'
NM_004219	Hs.350966	PTTG1	S100 calcium binding protein, beta (neural)	5'-GAU CUC AAG UUU CAA CAC Ctt-3'
NM_004219	Hs.350966	PTTG1	Pituitary tumor-transforming 1	5'-GUC UGU AA A GAC CAA GG Gatt-3'
NM_001478.2	Hs.159481	GALGT	Pituitary tumor-transforming 1 UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:(N-acetylneuraminy)-galactosylglucosylceramide N-acetylgalactosaminyltransferase	5'-GGAGCAAGUAGUGGGGCUgTdT-3'
NM_000657	Hs.150749	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	5'-GUACAUCCAUUUAAGCUGTT-3'
NM_032984	Hs.368982	CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease	5'-AACTTCCAGCTGGCATA TAGGdTdT-3'
NM_001228	Hs.369736	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	5'-AAGGGUCAUGCUCUAUCAGAUdTdT-3'
NM_197967	Hs.474150	BID	BH3 interacting domain death agonist	5'-AAGAAAGACAUCAUCCCGGAUAdTdT-3'
NM_001167	Hs.356076	BIRC4	Baculoviral IAP repeat-containing 4	5'-AAGGAGUAACCGUGCGGUCUdTdT-3'
NM_002483	Hs.466814	CEACAM6	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6	5'-CCGGACAGTTCCCATGTATA-3'
NM_001008490	Hs.285313	KLF6	Kruppel-like factor 6	5'-GGAGAAAAAGCCUUACAGAUdTdT-3'
NM_024309	Hs.368551	TNIP2	TNFAIP3 interacting protein 2	5'-GUUUUUGGCCGCCGACGCAd(TT)-3'
NM_001621	Hs.171189	AHR	Aryl hydrocarbon receptor	5'-AAGACTGGAGAAAGTGGCATG-3'

10

20

30

40

NM_001005845	Hs.2442	ADAM9	A disintegrin and metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	5'-AAUCACUGGAGACAUAUUGCdTdT-3'
NM_001110	Hs.172028	ADAM10	A disintegrin and metalloproteinase domain 10	5'-AAUGAAGAGGGACACUUCUCCUdTdT-3'
NM_021641	Hs.386283	ADAM12	A disintegrin and metalloproteinase domain 12	5'-AACCUCGCGCAAAAGAAUGUGdTdT-3'
NM_207196	Hs.312098	ADAM15	A disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin)	5'-AACUCCAUCUGUUCUCCUGACdTdT-3'
NM_021832	Hs.404914	ADAM17	A disintegrin and metalloproteinase domain 17	5'-AAAGUUUGCUUGGCACACCUUdTdT-3'
NM_000927.3	Hs.489033	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	5'-AAG GCC TAA TGC CGA ACA CA-3'
NM_000927.3	Hs.489033	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	5'-AAC TTT GGC TGC CAT CAT CCA-3'
NM_000572	Hs.193717	IL10	Interleukin 10	5'-UAAAGCUCCAAGAGAAAGGCdTdT-3'
NM_021975	Hs.502875	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	5'-GCCCCUAUCCCUUUUACGUCA-3'
NM_001331	Hs.166011	CTNND1	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1	5'-GTGGACCATGCACCTGCATGCCTAT AGTGAGTCGTATTAC-3'
NM_001211	Hs.36708	BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta	5'-AGATCCTGGCTAACTGTTC-3'
NM_002358	Hs.533185	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	5'-TACGGACTCACCTTGCTTG-3'
NM_001530.2	Hs.509554	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	5'-CUGGACACAGUGUGUUUGAdTdT-3'
NM_001530.2	Hs.509554	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	5'-CUGAUGACCAGCAACUUGAdTdT-3'

10

20

30

40

NM_001430	Hs.468410	EPAS1	Endothelial PAS domain protein 1	5'-GCUCUUGCCCAUGGACACAdTdT-3'
NM_001430	Hs.468410	EPAS1	Endothelial PAS domain protein 1	5'-GCGACAGCUGGAGUAUGAAAdTdT-3'
NM_001379	Hs.202672	DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	5'-CCAUGAGCACCGUUCUCCTT-3'
NM_031310	Hs.107125	PLVAP	Plasmalemma vesicle associated protein	5'-CUUGACCAAGGAGCUCAACTT-3'
NM_031310	Hs.107125	PLVAP	Plasmalemma vesicle associated protein	5'-GGAGCUCAACUUCACCACCTT-3'
NM_016734	Hs.126365	PAX5	Paired box gene 5 (B-cell lineage specific activator)	5'-CGGCCACUCGCUUCCGGGCTT-3'
NM_016734	Hs.126365	PAX5	Paired box gene 5 (B-cell lineage specific activator)	5'-GCUCGUCGACUGCGGGCC-3'
NM_006257	Hs.498570	PRKCQ	Protein kinase C, theta	5'-AAACCAACCGTGGAGCTCTACT-3'
NM_006257	Hs.498570	PRKCQ	Protein kinase C, theta	5'-AAGAGCCCCGACCTTCTGTGAA-3'
NM_032430	Hs.182081	BRSK1	BR serine/threonine kinase 1	5'-GUU CUU CCG CCA GAU UGU GdTdT-3'
NM_015045	Hs.203099	KIAA0261	KIAA0261	5'-CGGACUACCCUAGCACAAUU-3'
NM_015045	Hs.203099	KIAA0261	KIAA0261	5'-GAAUAGUCACCAUAUUCACUU-3'
NM_005430	Hs.248164	WNT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1	5'-GGTTCCATCGAATCCTGCA-3'
NM_004421.2	Hs.74375	DVL1	Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	5'-AACAAAGATCACCTTCTCCGAG-3'
NM_004422	Hs.118640	DVL2	Dishevelled, dsh homolog 2 (Drosophila)	5'-AACTTTGAGAACATGAGCAAC-3'
NM_139049	Hs.522924	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	5'-CGTGGATTATGGTCTGTG-3'
NM_003376	Hs.73793	VEGF	Vascular endothelial growth factor	5'-UGGAUGUCUAUCAGCGCAGdTdT-3'
NM_003376	Hs.73793	VEGF	Vascular endothelial growth factor	5'-GCUACUGCCAUCCAAUCCAGdTdT-3'

10

20

30

40

NM_003376	Hs.73793	VEGF	factor	5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUUCdTdT-3'
NM_003376	Hs.73793	VEGF	Vascular endothelial growth factor	5'-CUGAGGAGUCCAAACAUCACdTdT-3'
NM_003376	Hs.73793	VEGF	Vascular endothelial growth factor	5'-CCAAGGCCAGCACAUAGGAdTdT-3'
NM_005123	Hs.282735	NR1H4	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	5'-GTCGTGACTTGGCACAAG-3'
NM_004999	Hs.149387	MYO6	Myosin VI	5'-GCUGGCAGUUCAUAGGAAUdTdT-3'
NM_004999	Hs.149387	MYO6	Myosin VI	5'-CGUGCUCCAAAGUCUGUAdTdT-3'
NM_014865	Hs.5719	CNAP1	Chromosome condensation-related SMC-associated protein 1	5'-UCAGUAUGUUUGUGCAAGAGTT-3'
NM_014865	Hs.5719	CNAP1	Chromosome condensation-related SMC-associated protein 1	5'-GAAGAUACUCUGGAAUUCCTT-3'
NM_015261	Hs.438550	KIAA0056	KIAA0056 protein	5'-CUGGAUUUCACAGAGACUGTT-3'
NM_015261	Hs.438550	KIAA0056	KIAA0056 protein	5'-GCAGAGAUCAUAGAGACUGTT-3'
NM_015341	Hs.308045	BRRN1	Barren homolog (Drosophila)	5'-GACUUUCCUCAGAAUGACGTT-3'
NM_015341	Hs.308045	BRRN1	Barren homolog (Drosophila)	5'-CAUUAACUCCACCUUGAUCAATT-3'
NM_014551	Hs.180903	384D8-2	Hypothetical protein 384D8	5'-GGAUUUUCAGGAUAAACACGTT-3'
NM_014551	Hs.180903	384D8-2	Hypothetical protein 384D8	5'-GCUGCAGGACUCCACCAGTT-3'
NM_006031	Hs.474069	PCNT2	Pericentrin 2 (kendrin)	5'-AAUUGGAACAGCUGCAGCAGA-3'
NM_006031	Hs.474069	PCNT2	Pericentrin 2 (kendrin)	5'-AAGCUCUGAUUUAUCAAAGA-3'
NM_012179.2	Hs.5912	FBXO7	F-box protein 7	5'-CCCACACCAUUCCAUUCUA-3'
NM_002467	Hs.202453	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	5'-AAGAUGAGGAGAAAUUCGAUGUU-3'
NM_002467	Hs.202453	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	5'-AAAAGGUCAGAGUCUGGAUCACC-3'
NM_002467	Hs.202453	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	5'-CACGUCUCCACAUACAGCACAA-3'

10

20

30

40

NM_002467	Hs.202453	MYC	oncogene homolog (avian)	5'-AAAUGAGAUAAAGUGGCUAAUU-3'
NM_002392	Hs.369849	MDM2	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein	5'-UGGUUGCAUUGUCCAUGGC-3'
NM_003121	Hs.437905	SPIB	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	5'-GATCGCTGTGTGTGTGTAA-3'
NM_003120.1	Hs.502511	SPI1	Spleen focus forming virus (SFV) proviral integration oncogene spi1	5'-GTCCGATGTAAATCAGAT-3'
NM_199002	Hs.278186	ARHGEF1	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	5'-CATACCATCTCTACCGACG-3'
NM_014784	Hs.516954	ARHGEF11	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11	5'-ACTGAAAGTCTCGGCCAGCT-3'
NM_015313	Hs.24598	ARHGEF12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	5'-GAAACTCGTCGCATCTTCC-3'
NM_173842	Hs.81134	IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist	5'-AUCUGCAGAGGCCUCCGCA-3'
NM_032726	Hs.549218	PLCD4	Phospholipase C, delta 4	5'-GAGCAGAACCTTCAGATAAdT-3'
NM_032726	Hs.549218	PLCD4	Phospholipase C, delta 4	5'-GAGCAGGGCTTCACCATIGdIdT-3'
NM_032726	Hs.549218	PLCD4	Phospholipase C, delta 4	5'-GGAAAGGAGAAAGAAATTCGTAdT-3'
NM_032726	Hs.549218	PLCD4	Phospholipase C, delta 4	5'-GATATCATCTTTCTCTGAAdT-3'
NM_004104	Hs.83190	FASN	Fatty acid synthase	5'-CAACTACGGCTTGCCAA-3'
NM_004104	Hs.83190	FASN	Fatty acid synthase	5'-GCAACTCACGCTCCGGAAA-3'
NM_004104	Hs.83190	FASN	Fatty acid synthase	5'-GCCCTGAGCTGGACTACTT-3'
NM_004104	Hs.83190	FASN	Fatty acid synthase	5'-GGTATGCGACGGGAAAGTA-3'
NM_002165.2	Hs.504609	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop- helix protein	5'-AACTCGGAATCCGAAGTTGGA-3'
NM_003200.1	Hs.371282	TCF3	Transcription factor 3	5'-AAAGACCTGAGGGACCGGGAG-3'

10

20

30

40

NM_015895	Hs.234896	GMNN	Geminin, DNA replication inhibitor	5'-GAGAAAAATGAGCTGTCCGC-3'
NM_015895	Hs.234896	GMNN	Geminin, DNA replication inhibitor	5'-CTGGCAGAAAGTAGCAGAAC-3'
NM_006704	Hs.281902	SUGT1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)	5'-AAGGCUUUGGAACAGAAACCA-3'
NM_002358	Hs.533185	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1	5'-AAGAGUCGGGACCACAGUUUA-3'
NM_006472	Hs.533977	TXNIP	Thioredoxin interacting protein	5'-ACAGACUUCGGAGUACCUUGdT-3'
NM_001379	Hs.202672	DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	5'-CGGUGCUCAUGCUUACAACCTT-3'
NM_001379	Hs.202672	DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	5'-CGAGUUGCUAGACCGCUUCTT-3'
NM_006838	Hs.444986	METAP2	Methionyl aminopeptidase 2	5'-AAUGCCGGUGACACACAUAUGA-3'
NM_007862.2	Mm.382	Dlgh1	Discs, large homolog 1 (Drosophila)	5'-TACGGGAGCAGATGATGAAA-3'
NM_007862.2	Mm.382	Dlgh1	Discs, large homolog 1 (Drosophila)	5'-AACCCAAAATCCATGGAAAATA-3'
NM_008173.1	Mm.129481	Nr3c1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	5'-GAGCAGTGGAAAGGACAGCATTCAA
NM_008173.1	Mm.129481	Nr3c1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	GAGATGCTGTCTCTCCACTGCTCTTTT-3'
NM_008173.1	Mm.129481	Nr3c1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	5'-GATCCCAGCAGTGGAAAGGACAGCATTCAA
NM_007871.1	Mm.39292	Dnm2	Dynamitin 2	GAGATGCTGTCTCTCTCCACTGCTCTTTTGGAAA-3'
NM_011155.1	Mm.3294	Ppp5c	Protein phosphatase 5, catalytic subunit	5'-GGACCAGGCAGAGAAATGAG-3'
NM_011155.1	Mm.3294	Ppp5c	Protein phosphatase 5, catalytic subunit	5'-AAG ACA CAG GCC AAC GAC UAC-3'
NM_009263.1	Mm.288474	Spp1	Secreted phosphoprotein 1	5'-AAG AUU GUG AAG CAG AAG GCC-3'
NM_009263.1	Mm.288474	Spp1	Secreted phosphoprotein 1	5'-AATCTCTTGGGCCACAGAAT-3'

10

20

30

40

NM_009263.1	Mm.288474	Spp1	Secreted phosphoprotein 1	5'-AAGTCAGCTGGATGAACCAAG-3'
NM_145978.1	Mm.283968	Pdlim2	PDZ and LIM domain 2	5'-AAGAUCGACAGAGCGCCUCA-3'
NM_146386.1	Mm.32257	Myocd	Myocardin	5'-AATGCAACTGCAGAAAGCAGAA-3'
NM_145541.3	Mm.333868	Rap1a	RAS-related protein-1a	5'-AAGCAAGTCGAGGTAGATTGC-3'
NM_010026.1	Mm.277236	Ddef1	RIKEN cDNA 1700010G06 gene	5'-CAGCUAACUGCACUCCGAG-3'
NM_010026.1	Mm.277236	Ddef1	RIKEN cDNA 1700010G06 gene	5'-UGAUUUUUGGAAGCAAAU-3'
NM_007614.2	Mm.291928	Catnb	Catenin beta	5'-AAGGCTTTTCCAGTCCTTCA-3'
NM_007614.2	Mm.291928	Catnb	Catenin beta	5'-AAGATGATGGTGTGCCAAGTG-3'
NM_011952.1	Mm.8385	Mapk3	Mitogen activated protein kinase 3	5'-AATGTTATAGGCATCCGAGAC-3'
NM_011952.1	Mm.8385	Mapk3	Mitogen activated protein kinase 3	5'-AACCCAAAACAAGCGCATCACA-3'
NM_011949.2	Mm.196581	Mapk1	Mitogen activated protein kinase 1	5'-AAAGTTCGAGTTGCTATCAAG-3'
NM_010591.1	Mm.275071	Jun	Jun oncogene	5'-GCGCATGAGGAACCGCATT-3'
NM_008416.1	Mm.1167	Junb	Jun-B oncogene	5'-GACCCAGGAGCGCATCAAAAG-3'
NM_010592.3	Mm.1175	Junb1	Jun proto-oncogene related gene d1	5'-AAGCCAGAACACCCGAGCTG-3'
NM_010234.2	Mm.246513	Fos	FBJ osteosarcoma related oncogene	5'-GCCGAGACAGATCAAACTTG-3'
NM_010235.1	Mm.6215	Fosl1	Fos-like antigen 1	5'-ATTGGAGGATGAGAAAATCG-3'
NM_008037.3	Mm.24684	Fosl2	Fos-like antigen 2	5'-TCAACGCCCATCACCCACAG-3'
NM_009505.2	Mm.282184	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	5'-AACGAUGAAGCCCUUGGAGUGC-3'
NM_015774.2	Mm.264435	Ero1l	ERO1-like (S. cerevisiae)	5'-ACTTCATCAGAATGGCAGGGTTT-3'
NM_021450.1	Mm.244705	Trpm7	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	5'-AACCCGGAGGTCAGGTCGAAAT-3'
NM_021450.1	Mm.244705	Trpm7	Transient receptor potential	5'-AAGCAGAGTGACCTGGTAGAT-3'

10

20

30

40

NM_177407.2	Mm.131530	Camk2a	cation channel, subfamily M, member 7	5'-CACCACCAUUGAGGACGAAAdTdT-3'
NM_010118.1	Mm.290421	Egr2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	5'- GUGACCACCUUACUACUCAdTdT -3'
NM_010118.1	Mm.290421	Egr2	Early growth response 2	5'- GUUUGCCAGGAGUGACGAAAdTdT -3'
NM_015806.2	Mm.18856	Mapk6	Early growth response 2	5'-GGCUUUUCAUGUAUCAGCUTT-3'
NM_015806.2	Mm.18856	Mapk6	Mitogen-activated protein kinase 6	5'- GGCA AUGGCUUGGUUUUUUTT -3'
NM_015806.2	Mm.18856	Mapk6	Mitogen-activated protein kinase 6	5'- GGAGUACAUGGAGACAGACTT -3'
NM_009744.2	Mm.347398	Bcl6	Mitogen-activated protein kinase 6	5'-GTCGAGACATCTTGACTGA-3'
NM_009744.2	Mm.347398	Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6	5'-GACACGGATCTGAGAACTCT-3'
NM_145533.1	Mm.136586	Smox	B-cell leukemia/lymphoma 6	5'-GGACGUGGUUGAGGAAUUC-3'
NM_008778.1	Mm.40035	Pak3	Spermine oxidase	5'-TAGCAGCACATCAGTCGAATA-3'
NM_008778.1	Mm.40035	Pak3	P21 (CDKN1A)-activated kinase 3	5'-CCCCAATATTGTCAATTATTTA-3'
NM_080428.2	Mm.196475	Fbxw7	P21 (CDKN1A)-activated kinase 3	5'-CACAAAAGCTGGTGTGTGCA-3'
NM_021450.1	Mm.244705	Trpm7	F-box and WD-40 domain protein 7, archipelago homolog	5'-AACCCGGAGGTCAGGTCGAAAT-3'
NM_021450.1	Mm.244705	Trpm7	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	5'-AAGCCGTCTGTGTGCCCGCTG-3'
NM_009505.2	Mm.282184	Vegfa	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	5'-AACGATGAAGCCCTGGAGTGC-3'
NM_009505.2	Mm.282184	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	
NM_009505.2	Mm.282184	Vegfa	Vascular endothelial growth	

10

20

30

40

NM_010228.2	Mm.3464	Flt1	factor A	5'-AAGTTAAAAAGTGCCTGAACTG-3'
NM_010228.2	Mm.3464	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	5'-AAGCAGGCCAGACTCTCTTTC-3'
NM_010612.2	Mm.285	Kdr	Kinase insert domain protein receptor	5'-AAGCTCAGCACACAGAAAGAC-3'
NM_010612.2	Mm.285	Kdr	Kinase insert domain protein receptor	5'-AATGCGGGGGTGGTGACAGTA-3'
AK019429.1	Mm.3049	Cks1b	CDC28 protein kinase 1b	5'-GGGACATAGCCAAAGCTGGTCgagtactg GACCAGCTTGGGTATGTCC-3'
NM_008000.1	Mm.280819	Fert2	Fer (fms/fps related) protein kinase, testis specific 2	5'-AAC TAC GGT TGC TGG AGA CAG-3'
NM_009750.1	Mm.90787	Ngfrap1	Nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	5'-CAACAACCAACCAACCAAC-3'
NM_009750.1	Mm.90787	Ngfrap1	Nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	5'-CATAACCACAAACCACCTdTdT-3'
NM_010431.1	Mm.3879	Hif1a	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	5'-TGTGAGCTCACATCTTTGAT-3'
NM_010838	Mm.1287	Mapt	Microtubule-associated protein tau	5'-CCAGGAGTTTGACACAAATG-3'
NM_009045	Mm.249966	Rela	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	5'-GATCAATGGCTACACAGGA-3'
NM_009689	Mm.8552	Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	5'-GAGCCAAGAACAATAATTGC-3'
NM_009689	Mm.8552	Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	5'-GAAAAGTGGCCGTGCCATC-3'
NM_007798.1	Mm.236553	CTSB	Cathepsin B	5'-CCACUGUGGCAUUGAAUACATT-3'
NM_011960	Mm.15962	Parg	Poly (ADP-ribose) glycohydrolase	5'-AACGCCACCTCGTTTGTTC-3'

10

20

30

40

NM_010928.1	Mm.254017	Notch2	Notch gene homolog 2	5'-GAUGUGGACAGUGUCUGUTT-3'
NM_019984	Mm.41964	Tgm1	Transglutaminase 1, K polypeptide	5'-AUGCAGCUGGAGAUAGGCACdTdT-3'
NM_009593	Mm.15691	Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	5'-CGTGGATGAGGTTGAGACA-3'
NM_009593	Mm.15691	Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	5'-GGTGGACAACAACACTTCACA-3'
NM_138955	Mm.101876	Abcg4	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4	5'-GAAAGGTGGAGAACCATATC-3'
NM_138955	Mm.101876	Abcg4	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4	5'-GCACCTTGAACTACTGGTAT-3'
NM_011658	Mm.3280	Twist1	Twist gene homolog 1	5'-AAGCTGAGCAAGATTTCAGACC-3'
NM_011658	Mm.3280	Twist1	Twist gene homolog 1	5'-AGGTACATCGACTTCCTGTAC-3'
NM_011658	Mm.3280	Twist1	Twist gene homolog 1	5'-AGCGGGTCATGGCTAACGTGC-3'
NM_009537	Mm.3868	Yy1	YY1 transcription factor	5'-GGGAGCAGAAAGCAGGUGCAGAU-3'
NM_172689	Mm.86382	Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	5'-GCCCCATTGAAACCAAGAAATT-3'
NM_008500.1	Mm.12881	Lhx6	LIM homeobox protein 6	5'-AGACGCAGAGGCCCTTGTTCAAGAGAC
NM_009308	Mm.233846	Syt4	Synaptotagmin 4	CAAGGCCCTCTGCGTCTGACTTTTTC-3'
NM_009308	Mm.233846	Syt4	Synaptotagmin 4	5'-r(GAAGCACAGAGUGAAGACCA)d(TT)-3'
NM_007615.1	Mm.35738	Catns	Expressed sequence AI225934	5'-r(CGAGCAGGAGA ACAGCGAG)d(T T)-3'
NM_007614.2	Mm.291928	Catnb	Catenin beta	5'-GATGGTTATCCAGGTGGCA-3'
NM_011232	Mm.38376	Rad1	RAD1 homolog (S. pombe)	5'-CUGUUGUGGUUAAACUCCUTT-3'
NM_011232	Mm.38376	Rad1	RAD1 homolog (S. pombe)	5'-GCCTTGACACACGTTAGGAATC-3'
NM_011232	Mm.38376	Rad1	RAD1 homolog (S. pombe)	5'-GCAGGAAAGTCCACCTTGAC-3'
NM_010423	Mm.29581	Hey1	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	5'-GCCTGATGAAGAAGTTC-3'
NM_010133	Mm.2657	En1	Engrailed 1	5'-GCTAGAAAAAGCTGAGATC-3'
NM_010133	Mm.2657	En1	Engrailed 1	5'-CAUCCUAAAGGCCCGGAUUUUCTT-3'
				5'-GUUCCCCGGAACACAACCCUUTT-3'

10

20

30

40

NM_019390	Mm.243014	Lmna	Lamin A	5'-GCAGCUUCAGGAUGAGAUAGTGT-3'
NM_183355.1	Mm.43358	Pbx1	Pre B-cell leukemia transcription factor 1	5'-CAGUUUUUGAGUAUUCGGGGTT-3'
NM_007430	Mm.5180	Nr0b1	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	5'-GAUCACCUUGCACUUCGAGdTdT-3'
NM_007430	Mm.5180	Nr0b1	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	5'-CUGAACAGUGCCCUUUUCCdTdT-3'
NM_172203	Mm.233865	Nox1	NADPH oxidase 1	5'-TTATGAGAAAGTCTGACAAAG-3'
NM_172203	Mm.233865	Nox1	NADPH oxidase 1	5'-GATTCTTGGCTAAATCCCA-3'
NM_172203	Mm.233865	Nox1	NADPH oxidase 1	5'-GGACATTTGAACAACAGCA-3'
NM_080850	Mm.253287	Pask	PAS domain containing serine/threonine kinase	5'-AATTATGGAGTCAACCCACAGCTT-3'
NM_009330	Mm.7226	Tcf2	Transcription factor 2	5'-GCCGGUUUUUCCAUACUCUCtt-3'
NM_009330	Mm.7226	Tcf2	Transcription factor 2	5'-CAAGAAAGAUUGC GCC GCAACtt-3'
NM_009330	Mm.7226	Tcf2	Transcription factor 2	5'-UGGUGGUCACAGA UACCAGtt-3'
NM_024148.1	Rn.5949	Apex1	Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1	5'-GUCUGGUAAGACUGGAGUACC-3'
NM_017059.1	Rn.10668	Bax	Bcl2-associated X protein	5'-UUGGAGAUAAACUGGACAAUU-3'
NM_017059.1	Rn.10668	Bax	Bcl2-associated X protein	5'-CUG GAC AAU AAU AUG GAG CUU-3'
NM_023979.1	Rn.64522	Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1	5'-AGA ACU UUG UGC UUU AAU GUU-3'
NM_023979.1	Rn.64522	Apaf1	Apoptotic protease activating factor 1	5'-UAU AGG CAU AUA CUG GAU GUU-3'
NM_021835.2	Rn.93714	Jun	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	5'-AGU GAA AAC CUU GAA AGC GUU-3'
NM_021835.2	Rn.93714	Jun	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	5'-AGU CAU GAA CCA CGU UAA CUU-3'
NM_012655.1	Rn.44609	Sp1	Sp1 transcription factor	AATGAGAACAGCAACAACCTCC
XM_230974.2	Rn.102138	Sp3	Sp3 transcription factor	AAGTTCTCAGACAATGACTGC
NM_133551.1	Rn.10162	Pla2g4a	Phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	5'-TCGAGACAGTAGTGGTTCTACGTGCCgagtactg

10

20

30

40

					GGCACGTAGAACCACTACTGTGTTTTT-3'
NM_001003959.1	Rn.117353	Dnmt3b		DNA methyltransferase 3B	5'-AGAUGACAGGUGCCCCAGAGUU-3'
NM_019335.1	Rn.10022	Prkr		Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent	5'-GGUAGAUCAAAGCAGGAGGTT-3'
NM_053622.1	Rn.10474	Pom121		Nuclear pore membrane glycoprotein 121 kD	5'-AACGGAGUCCUUGCUGCAUUUdTdT-3'
NM_053622.1	Rn.10474	Pom121		Nuclear pore membrane glycoprotein 121 kD	5'-AACCAUGUCACCAAGUCCAGUUdTdT-3'
NM_053622.1	Rn.10474	Pom121		Nuclear pore membrane glycoprotein 121 kD	5'-AAGCCUGUGUUUGGCUUUGGAdTdT-3'
NM_131907.2	Rn.5805	Atp2c1		ATPase, Ca++-sequestering	5'-AACCAATTATGGAAGAAGTACATT-3'
NM_031337.1	Rn.22706	Siat9		Sialyltransferase 9	5'-GGGUUAUUCUGAACAUUGUttt-3'
NM_031010.2	Rn.11318	Alox15		Arachidonate 12-lipoxygenase	5'-GCAACTGGATTTCCTGTGAAGG-3'
NM_031010.2	Rn.11318	Alox15		Arachidonate 12-lipoxygenase	5'-GAAGCGGATTTCCTCTCTTG-3'
NM_031556.1	Rn.22518	Cav		Caveolin	5'-AAGGAGATCGACCTGGTCAAC-3'
NM_031556.1	Rn.22518	Cav		Caveolin	5'-AAGGGACACACAGTTTGTGACG-3'
					5'-GAACTACACAAAATTCAGCCAGGCGTA
XM_232106.2	Rn.117974	Dok-1		Docking protein 1 (predicted)	TCATCCGGTGTTCGTCTCTTCCACAAAG-3'
NM_133307.1	Rn.98279	Prkcd		Protein kinase C, delta	5'-AAAAGGCATAATTCAAAACAGCCTGTCTC-3'
NM_133307.1	Rn.98279	Prkcd		Protein kinase C, delta	5'-AAGTTCTCCGAAAGTGTGAGAACCTGTCTC-3'
NM_012637.1	Rn.11317	Ptpn1		Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	5'-AAGCTGACACTGATCTCTGAA-3'
NM_017212	Rn.2455	Mapt		Microtubule-associated protein tau	5'-CCAGGAGTTTGACACAAATG-3'
NM_013156	Rn.1294	CTSL		Cathepsin L	5'-GGACAGAUUUUCCUUAAAGATT-3'
NM_012576.1	Rn.90070	Nr3c1		Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	5'-GGCCAAAGGAGGGGGAGCGTA-3'

10

20

30

40

NM_013131.1	Rn.9678	Nr3c2	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	5'-GGCGCTGGAGTCAAGTGTCTC-3'
NM_031659	Rn.10039	Tgm1	Transglutaminase 1	5'-AUGCAGCUGGAGAUGGCACdTdT-3'
NM_019275	Rn.9774	Madh4	MAD homolog 4	5'-AAUACACCGACAAAGCA AUGACdTdT-3'
NM_031132	Rn.9954	Tgfb2	Transforming growth factor, beta receptor II	5'-AAAGUCGGUUAACAGCGAUCUdTdT-3'
NM_144741	Rn.16746	Retn	Resistin	5'-CCTTTTCATTTCTCCTCCTT-3'
NM_144741	Rn.16746	Retn	Resistin	5'-AGCTGCTCCTCTGGCTCTG-3'
NM_144741	Rn.16746	Retn	Resistin	5'-GCCTCCTGCCCCAGAGGCA-3'
NM_012614	Rn.9714	Npy	Neuropeptide Y	5'-UGAGAGAAAGCACACAGAAA-3'
NM_021597	Rn.35512	Eif2c2	GERp95	5'-UGGACAUCCTCCCAAAUUGA-3'
NM_012547	Rn.87299	Drd2	Dopamine receptor 2	5'-CCCCAUCAUACACCCACA-3'

10

20

30

40

TABLE 1

US 6,207,646 B1

<u>Oligonucleotide Stimulation of Mouse B Cells</u>			
		<u>Stimulation Index¹</u>	
QDN	Sequence (5' to 3') ²	³ H Uridine	IgM
1 (SEQ ID NO:13)	GCTAGACCTTAGCCT	6.1 ± 0.8	17.9 ± 3.6
1a (SEQ ID NO:4)	T.....	3.2 ± 0.2	1.7 ± 0.5
1b (SEQ ID NO:14)	Z.....	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.0
1c (SEQ ID NO:15)	A.....Z..	10.3 ± 4.4	9.5 ± 1.8
1d (SEQ ID NO:16)	..AT...GAGC..	13.0 ± 2.3	18.3 ± 7.5
2 (SEQ ID NO:17)	ATGGAAGGTCAGCGTTCTC	2.9 ± 0.2	13.6 ± 2.0
2a (SEQ ID NO:18)	..C...CTC...G.....	7.7 ± 0.8	24.2 ± 3.2
2b (SEQ ID NO:19)	..Z...CTC.ZG..Z.....	1.6 ± 0.3	2.8 ± 2.2
2c (SEQ ID NO:20)	..Z...CTC..G.....	3.1 ± 0.6	7.3 ± 1.4
2d (SEQ ID NO:21)	..C...CTC..G.....Z..	7.4 ± 1.4	27.7 ± 5.4
2e (SEQ ID NO:22)	A.....	5.6 ± 2.0	ND
3D (SEQ ID NO:23)	GAGAACGCTGACCTTCCAT	4.9 ± 0.5	19.9 ± 3.6
3Da (SEQ ID NO:24)	C.....	6.6 ± 1.5	33.9 ± 6.8
3Db (SEQ ID NO:25)	C.....G..	10.1 ± 2.8	25.4 ± 0.8
3Dc (SEQ ID NO:26)	...C.A.....	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.5
3Dd (SEQ ID NO:27)	Z.....	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.4
3De (SEQ ID NO:28)	A.....Z.....	4.4 ± 1.2	18.8 ± 4.4
3Df (SEQ ID NO:29)	A.....	1.6 ± 0.1	7.7 ± 0.4
3Dg (SEQ ID NO:30)	CC.G.ACTG..	6.1 ± 1.8	18.6 ± 1.5
3M (SEQ ID NO:31)	TCCATGTCCGTCCTGATGCT	4.1 ± 0.2	23.2 ± 4.9
3Ma (SEQ ID NO:32)	CT.....	0.9 ± 0.1	1.8 ± 0.5
3Mb (SEQ ID NO:33)	Z.....	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.6
3Mc (SEQ ID NO:34)	Z.....	5.4 ± 1.5	8.5 ± 2.6
3Md (SEQ ID NO:35)	A...T.....	17.2 ± 9.4	ND
3Me (SEQ ID NO:36)	C...A..	3.6 ± 0.2	14.2 ± 5.2
4	TCAACGTT	6.1 ± 1.4	19.2 ± 5.2
4a	GC..	1.1 ± 0.2	1.5 ± 1.1
4b	...GCCC..	4.5 ± 0.2	9.6 ± 3.4
4c	...TCGA..	2.7 ± 1.0	ND

10

20

30

40

TABLE 1-continued

Oligonucleotide Stimulation of Mouse B Cells			
ODN Production	Sequence (5' to 3')†	Stimulation Index‡	
		³ H Uridine	IgM
4d	...TT <u>AA</u> AA	1.3 ± 0.2	ND
4e	... <u>AA</u> ...	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.5
4f	C... <u>AA</u> ...	3.9 ± 1.4	ND
4g	... <u>AA</u> ...CT	1.4 ± 0.3	ND
4h	... <u>AA</u> ...C	1.2 ± 0.2	ND
LPS		7.8 ± 2.8	4.8 ± 1.9

‡Stimulation indexes are the means and std. dev. derived from at least 3 separate experiments, and are compared to wells cultured with no added ODN.

ND = not done.

CpG dinucleotides are underlined.

Dots indicate identity; dashes indicate deletions.

S indicates 5 methyl cytosine.

10

TABLE 2

Identification of the optimal CpG motif for Murine IL-6 production and B cell activation.						
ODN (ng/ml) ^a	SEQUENCE (5'-3')	IL-6 (pg/ml) ^b				IgM
		CH12.LX	SPLenic B CELL	SI ^c		
512 (SEQ ID No:37)	TCGAGTCG <u>GGTCCG</u> ATGCT	1300 ± 106	527 ± 43	5.8 ± 0.3	7315 ± 1324	
1637 (SEQ ID No:38)	C <u>AA</u>	136 ± 27	46 ± 6	1.7 ± 0.2	770 ± 72	
1615 (SEQ ID No:39)	G <u>AA</u>	1201 ± 155	950 ± 262	3.7 ± 0.3	3212 ± 617	
1614 (SEQ ID No:40)	A <u>AA</u>	1533 ± 321	1812 ± 163	10.8 ± 0.6	7538 ± 414	
1636 (SEQ ID No:41)	 <u>AA</u> A.....	1181 ± 76	947 ± 132	5.4 ± 0.4	3983 ± 485	
1634 (SEQ ID No:42)	 <u>AA</u> C.....	1049 ± 223	1671 ± 175	9.2 ± 0.9	6256 ± 261	
1613 (SEQ ID No:43)	 <u>AA</u> T.....	1655 ± 304	2908 ± 129	12.5 ± 1.0	8243 ± 698	
1618 (SEQ ID No:44)	A <u>AA</u> T.....	2109 ± 291	2596 ± 166	12.9 ± 0.7	19425 ± 674	
1639 (SEQ ID No:45)	AA <u>AA</u> T.....	1827 ± 83	2912 ± 132	11.5 ± 0.4	9439 ± 103	
1707 (SEQ ID No:46)	A <u>AA</u> TC.....	ND	1147 ± 175	4.0 ± 0.2	3534 ± 217	
1708 (SEQ ID No:47)	CA <u>AA</u> TG.....	ND	59 ± 3	1.5 ± 0.1	466 ± 109	

Dots indicate identity; CpG dinucleotides are underlined; ND = not done

^aThe experiment was done at least three times with similar results. The level of IL-6 of unstimulated control cultures of both CH12.LX and splenic B cells was 5.10 pg/ml. The IgM level of unstimulated culture was 547 ± 82 ng/ml. CpG dinucleotides are underlined and dots indicate identity.

^b[³H] Uridine uptake was indicated as a fold increase (SI: stimulation index) from unstimulated control (2322.67 ± 213.68 cpm). Cells were stimulated with 20 μM of various CpG O-ODN. Data present the mean ± SD of triplicates

^cMeasured by ELISA.

20

30

40

TABLE 3

Induction of Murine IL-6 secretion by CpG motifs in bacterial DNA or oligonucleotides.		
Treatment	IL-6 (pg/ml)	
calf thymus DNA	≤10	
calf thymus DNA + DNase	≤10	
<i>E. coli</i> DNA	1169.5 ± 94.1	
<i>E. coli</i> DNA + DNase	≤10	
CpG methylated <i>E. coli</i> DNA	≤10	
LPS	280.1 ± 17.1	
Media (no DNA)	≤10	
ODN 5a SEQ. ID. No:1	ATGGACTCTCCAGCGTCTC	1096.4 ± 372.0
5b SEQ. ID. No:2	AGG....A....	1124.5 ± 126.2
5c SEQ. ID. No:3	..C.....G.....	1783.0 ± 189.5
5d SEQ. ID. No:4	AGG..C..T.....	≤10
5e SEQ. ID. No:5	..C.....G..Z.....	851.1 ± 114.4
5f SEQ. ID. No:6	..Z.....ZG..Z.....	≤10
5g SEQ. ID. No:7	..C.....G.....Z..	1862.3 ± 87.26

10

20

30

TABLE 5

Induction of human PBMC cytokine secretion by CpG oligos						
ODN	Sequence (5'-3')	IL-6 ¹	TNF- α ¹	IFN- γ ¹	GM-CSF	IL-12
512 SEQ ID NO:37	TCCATGTCGGTCCTGATGCT	500	140	15.6	70	250
1637 SEQ ID NO:38	C.....	550	16	7.9	15.6	35
1615 SEQ ID NO:39	G.....	600	145	7.8	45	250
1614	A.....	550	31	0	50	250

TABLE 5-continued

Induction of human PBMC cytokine secretion by CpG oligos						
ODN	Sequence (5'-3')	IL-6 ¹	TNF- α ¹	IFN- γ ¹	GM-CSF	IL-12
SEQ ID NO:40						
1636 SEQ ID NO:41	A.....	325	250	35	40	0
1634 SEQ ID NO:42	C.....	300	400	40	85	200
1619 SEQ ID NO:43	T.....	275	450	200	80	>500
1618 SEQ ID NO:44	A..T.....	300	60	15.6	15.6	62
1639 SEQ ID NO:45	AA..T.....	625	220	15.6	40	60
1767 SEQ ID NO:46	A..TC.....	300	70	17	0	0
1769 SEQ ID NO:47	CA..TG.....	270	10	17	0	0

10

20

30

TABLE 9

Induction of NK Activity by DNA Containing CpG Motifs but not by Non-CpG DNA			
DNA or Cytokine Added		LU/10 ⁶	
		Mouse Cells	Human cells
Expt. 1	None	0.00	0.00
	IL-2	16.68	15.82
	<i>E. Coli.</i> DNA	7.23	5.05
	Calf thymus DNA	0.00	0.00
Expt. 2	None	0.00	3.28
	1585 ggGGGGTCAACGTTGAGGGGGGgggg (SEQ ID No.12)	7.38	17.98
	1629 -----gtc----- (SEQ ID No.50)	0.00	4.4
Expt. 3	None	0.00	
	1613 GCTAGACGTTAGTGT (SEQ ID No.51)	5.22	
	1769 -----Z----- (SEQ ID No.52)	0.02	ND
	1619 TCCATGTCGTTCTCTGATGCT (SEQ ID No.15)	3.35	
	1765 -----Z----- (SEQ ID No.53)	0.11	

TABLE 10

Different CpG motifs stimulates optimal murine B cell and NK activation			
ODN	Sequence	B cell activation ¹	NK activation ²
1668	TCCATGACGTTCTCTGATGCT (SEQ.ID.NO:54)	42,849	2.52
1753	TCTCCACGCTGCGCCAT (SEQ.ID.NO.55)	1,747	6.66
NONE		367	0.00

CpG dinucleotides are underlined; oligonucleotides were synthesized with phosphorothioate modified backbones to improve their nuclease resistance.

¹Measured by ³H thymidine incorporation after 48 hr culture with oligodeoxynucleotides at a 200 nM concentration as described in Example 1.

²Measured in lytic units.

US 6,214,806 B1

TABLE 1

ODN Number	cells/ml $\times 10^4$	PMN/ml $\times 10^5$	% PMN
<u>expt 1, C3H/HeJ mice</u>			
1908	61.4 $\pm$ 15.9	59.2 $\pm$ 15.7	95.8 $\pm$ 0.95
1760	27.8 $\pm$ 3.5*	25.8 $\pm$ 3.6*	93.3 $\pm$ 2.3
1631	47.6 $\pm$ 11.1	46.1 $\pm$ 10.7	96.8 $\pm$ 1.11
1835	43.8 $\pm$ 7.1	44.4 $\pm$ 7.1	96.8 $\pm$ 0.75
1759	71.0 $\pm$ 19.8	67.7 $\pm$ 20.4	96.8 $\pm$ 2.6
1826	39.8 $\pm$ 7.8	38.3 $\pm$ 7.9	93.5 $\pm$ 1.4
None (saline)	71.0 $\pm$ 7.4	69.3 $\pm$ 6.9	97.8 $\pm$ 1.3
<u>expt 2, C57 Bl/6 mice</u>			
1908	18.0 $\pm$ 2.6	16.6 $\pm$ 2.7	91.2 $\pm$ 3.7
1760	10.2 $\pm$ 2.3*	8.6 $\pm$ 2.1*	82.0 $\pm$ 3.0
1585	11.0 $\pm$ 2.2*	9.5 $\pm$ 2.2*	84.6 $\pm$ 2.9
2010	14.1 $\pm$ 2.1	11.8 $\pm$ 1.9	83.4 $\pm$ 2.1
None (saline)	17.9 $\pm$ 3.4	16.9 $\pm$ 2.1	
<u>expt 3</u>			
1908	19.0 $\pm$ 2.5	16.9 $\pm$ 2.1	89.4 $\pm$ 1.4
1760	9.1 $\pm$ 0.8*	7.7 $\pm$ 0.7*	84.6 $\pm$ 0.5
1972	15.3 $\pm$ 1.6	13.5 $\pm$ 1.4	84.2 $\pm$ 1.2
2001	13.0 $\pm$ 1.6*	11.8 $\pm$ 1.6	90.4 $\pm$ 2.2

*P>0.05, Mann-Whitney U test

TABLE 2

<u>Induction Of NK Activity By CpG Oligodeoxynucleotides (ODN)</u>				
ODN	% YAC-1 Specific Lysis*		% 2C11 Specific Lysis	
	<u>Effector: Target</u>		<u>Effector: Target</u>	
	50:1	100:1	50:1	100:1
None	-1.1	-1.4	15.3	16.6
1	16.1	24.5	38.7	47.2
3Dd	17.1	27.0	37.0	40.0
non-CpG ODN	-1.6	-1.7	14.8	15.4

10

20

30

TABLE 3

		Induction	
		of NK Activity by DNA Containing CpG Motifs but not by Non-CpG DNA	
DNA or Cytokine Added Human Cells		Mouse	LU/10 ⁵ Cells
Expt. 1	None	0.00	0.00
	IL-2	16.68	15.82
	E. Coli DNA	7.23	5.05
	Calf thymus DNA	0.00	0.00
Expt. 2	None	0.00	3.28
	1585 ggGGTCAACGTTGACgggg (SEQ ID NO:21)	7.38	17.98
	1629 -----gtc----- (SEQ ID NO:22)	0.00	4.4
Expt. 3	None	0.00	
	1613 GCTAGACGTTACTGT (SEQ ID NO:23)	5.22	
	1769 -----X----- (SEQ ID NO:24)	0.02	ND
	1619 TCCATGTCGTTCTCTGATGCT (SEQ ID NO:25)	3.35	
	1768 -----X----- (SEQ ID NO:26)	0.11	

CpG dinucleotides in ODN sequences are indicated by underlining; X indicates methylcytosine. Lower case letters indicate nucleoside resistant phosphorothioate modified internucleotide linkages which, in titration experiments, were more than 20 times as potent as non-modified ODN, depending on the flanking bases. Poly G ends (g) were used in some ODN, because they significantly increase the level of ODN uptake. Dashes indicate some bases are identical to those in the directly preceding sequence, with the exception of changes noted.

10

20

TABLE 4

ODN induction of NK Lytic Activity (LU)		
ODN	Sequence (5'-3')	LU
None		0.01
1754	ACCATGGACGATCTGTTTCCCTC (SEQ ID NO:26)	0.02
1759	TCTCCCAGCGTGCGCCAT (SEQ ID NO:27)	0.05
1761	TACCGCGTCCGACCTCT (SEQ ID NO:28)	0.05
1776	ACCATGGACGAAGTGTTCCTC (SEQ ID NO:29)	0.03
1777	ACCATGGACGAGCTGTTCCTC (SEQ ID NO:30)	0.05
1778	ACCATGGACGACCTGTTCCTC (SEQ ID NO:31)	0.01
1779	ACCATGGACGTACTGTTCCTC (SEQ ID NO:32)	0.02
1780	ACCATGGACGGTCTGTTCCTC (SEQ ID NO:33)	0.29
1781	ACCATGGACGTTCTGTTCCTC (SEQ ID NO:34)	0.38
1823	GCATGACGTTGAGCT (SEQ ID NO:35)	0.08
1824	CACGTGACGGGCAT (SEQ ID NO:36)	0.01
1825	CTGCTGACACTGGAG (SEQ ID NO:37)	0.01
1828	TCAGCGTCCGCC (SEQ ID NO:38)	0.01
1829	ATGACGTTCTGACGTT (SEQ ID NO:39)	0.42
1830 ₂	RANDOM SEQUENCE	0.25
1834	TCTCCCAGCGGGGCAT (SEQ ID NO:40)	0.03
1835	TCTCCCAGCGCGGCAT (SEQ ID NO:41)	0.46
1840	TCCATGTCGTTCTGCTT (SEQ ID NO:42)	2.70
1841	TCCATAGCGTTCTGCTT (SEQ ID NO:43)	1.45
1842	TCGTGCTGTCTCCGCTTCTT (SEQ ID NO:44)	0.06
1851	TCCTGACGTTCTGACGTT (SEQ ID NO:45)	2.32

Lytic units (LU) were measured as described (8).
 Briefly, PBMC were collected from normal donors and
 spun over Ficoll, then cultured with or without the
 indicated ODN (which were added to cultures at 6
 µg/ml) for 24 hr. Then their ability to lyse ⁵¹Cr-
 labeled K562 cells was determined. The results
 shown are typical of those obtained with several
 different normal human donors.
 This oligo mixture contained a random selection of
 all 4 bases at each position.

TABLE 5

Induction of BK LU by Phosphorothioate CpG ODN with Good Motifs					
ODN ₁	sequence (5'-3')		expt. 1	expt. 2	expt. 3
None			0.00	1.26	0.46
1840	TCCATGTCGTTTCCTGTCGTT	(SEQ ID NO:42)	2.33	ND	ND
1960	TCCTGTCGTTTCCTGTCGTT	(SEQ ID NO:46)	ND	0.48	8.99
1961	TCCATGTCGTTTTTTGTCGTT	(SEQ ID NO:47)	4.03	1.23	5.08
1962	TCCTGTCGTTTCCTGTCGTT	(SEQ ID NO:13)	ND	1.60	5.74
1963	TCCTTGTGTCGTTTCCTGTCGTT	(SEQ ID NO:48)	3.42	ND	ND
1965	TCCTGTCGTTTTTTTGTGTCGTT	(SEQ ID NO:14)	0.46	0.42	3.48
1966	TGTCGCTGTCCTCCGCTTCTT	(SEQ ID NO:44)	2.62	ND	ND
1967	TGTCGCTGTCCTCCGCTTCTT	(SEQ ID NO:15)	5.82	1.64	8.32
1968	TGTCGCTGTTTGTGCTTCTT	(SEQ ID NO:16)	3.77	5.26	6.12
1979 ₂	TCCATGTGTCGTTTCCTGTGCTT	(SEQ ID NO:42)	1.32	ND	ND
1982	TCCAGGACTTCTCTCAGGTT	(SEQ ID NO:50)	0.05	ND	0.98
1990	TCCATGCGTTCGTCGCTTTT	(SEQ ID NO:51)	2.10	ND	ND
1991	TCCATGCGTTGCGTTGCGTT	(SEQ ID NO:52)	0.89	ND	ND
2002	TCCACGACGTTTTCGACGTT	(SEQ ID NO:53)	4.02	1.31	9.79
2005	TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT	(SEQ ID NO:7)	ND	4.22	12.75
2006	TCGTCGTTTTTGTGCTTTTGTGCTT	(SEQ ID NO:6)	ND	6.17	12.82
2007	TCGTCGTTGTCGTTTGTGCTT	(SEQ ID NO:8)	ND	2.68	9.66
2008	CGCTGCGTTTGTGCTTGTGCTT	(SEQ ID NO:9)	ND	1.37	8.15
2010	CGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	(SEQ ID NO:54)	ND	0.01	0.05
2012	TGTCGTTTGTGCTTTTGTGCTT	(SEQ ID NO:10)	ND	2.02	11.61
2013	TGTCGTTGTCGTTTGTGCTTGTGCTT	(SEQ ID NO:55)	ND	0.56	5.22
2014	TGTCGTTGTCGTTTGTGCTT	(SEQ ID NO:11)	ND	5.74	10.89
2015	TGTCGTTGTCGTT	(SEQ ID NO:12)	ND	4.53	10.13
2016	TGTCGTTGTCGTT	(SEQ ID NO:56)	ND	6.54	8.06

₁ PBMC essentially as described herein. Results are representative of 6 separate experiments; each experiment represents a different donor.
₂ This is the methylated version of ODN 1840; Z = 5-methyl cytosine LU is lytic units; ND = not done; CpG dinucleotides are underlined for clarity.

10

20

TABLE 6

Induction of human B cell proliferation by Phosphorothioate CpG ODN			Stimulation Index ¹					
DN	sequence (5'-3')		expt. 1	expt. 2	expt. 3	expt. 4	expt. 5	expt. 6
1840	TCCATGTCGTTCCCTAGCGTT	(SEQ ID NO:42)	4	ND	ND	ND	ND	34
1841	TCCATAGCGTTCCCTAGCGTT	(SEQ ID NO:43)	2	ND	ND	ND	ND	ND
1960	TCCGTCGTTCCCTAGCGTT	(SEQ ID NO:46)	ND	2.0	2.0	3.6	ND	ND
1961	TCCATGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:47)	2	3.9	1.9	3.7	ND	37
1962	TCCGTCGTTCCCTAGCGTT	(SEQ ID NO:13)	ND	3.8	1.9	3.9	5.4	35
1963	TCCGTCGTTCCCTAGCGTT	(SEQ ID NO:48)	3	ND	ND	ND	ND	ND
1965	TCCGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:14)	4	3.7	2.4	4.7	6.0	43
1967	TCCGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:15)	ND	4.4	2.0	4.5	5.0	36
1968	TCCGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:16)	ND	4.0	2.0	4.9	6.7	38
1982	TCCAGGACTTCCTCAGGTT	(SEQ ID NO:50)	3	1.8	1.3	3.1	3.2	12
2002	TCCAGGACTTTCCTCAGGTT	(SEQ ID NO:53)	ND	2.7	1.4	4.4	ND	14
2005	TGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:7)	5	3.2	1.2	3.0	7.9	37
2006	TGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:6)	4	4.5	2.2	5.8	6.3	40
2007	TGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:8)	3	4.0	4.2	4.1	ND	22
2008	CGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:9)	ND	3.0	2.4	1.6	ND	12
2010	CGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:10)	ND	1.6	1.9	3.2	ND	ND
2012	TGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:10)	2	2.8	0	3.2	ND	23
2013	TGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:11)	3	2.3	3.1	2.8	ND	7
2014	TGTCGTTTTCGTCGTT	(SEQ ID NO:11)	3	2.5	4.6	3.2	6.7	14
2015	TGTCGTTTTCGTT	(SEQ ID NO:12)	5	1.8	2.6	4.5	9.4	1
2016	TGTCGTTTTCGTT	(SEQ ID NO:12)	ND	1.1	1.7	2.7	7.3	1

¹Cells = human spleen cells stored at -70° C. after surgical harvest or PBMC collected from normal donors and spun over Ficoll. Cells were cultured in 96 well U-bottom microtiter plates with or without the indicated ODN (which were added to cultures at 6 µM). N = 12 experiments. Cells were cultured for 4-7 days, pulsed with 1 µCi of ³H thymidine for 18 hr before harvest and scintillation counting. Stimulation index = the ratio of cpm in wells without ODN to that in wells that had been stimulated throughout the culture period with the indicated ODN (there were no further additions of ODN after the cultures were set up). ND = not done

TABLE 7

Induction of human IL-12 secretion by Phosphorothioate CpG ODN		
ODN ₁	sequence (5'-3')	IL-12 (pg/ml)
		expt. 1 expt. 2
None		0 0
1962	TCCGTCGTTCCCTAGCGTT (SEQ ID NO:13)	19 0
1965	TCCGTCGTTTTCGTCGTT (SEQ ID NO:14)	36 0
1967	TCCGTCGTTTTCGTCGTT (SEQ ID NO:15)	41 0
1968	TCCGTCGTTTTCGTCGTT (SEQ ID NO:16)	24 0
2005	TGTCGTTTTCGTCGTT (SEQ ID NO:7)	25 0
2006	TGTCGTTTTCGTCGTT (SEQ ID NO:6)	29 15
2014	TGTCGTTTTCGTCGTT (SEQ ID NO:11)	28 0
2015	TGTCGTTTTCGTCGTT (SEQ ID NO:12)	14 0
2016	TGTCGTTTTCGTCGTT (SEQ ID NO:12)	3 0

¹PBMC were collected from normal donors and spun over Ficoll, then cultured at 10⁶ cells/well in 96 well microtiter plates with or without the indicated ODN which were added to cultures at 6 µg/ml. Supernatants were collected at 24 hr and tested for IL-12 levels by ELISA as described in methods. A standard curve was run in each experiment, which represents a different donor.

TABLE 8

Different CpG motifs stimulate optimal murine B cell and NK activation			
ODN Sequence		B cell activation ¹	NK activation ²
1668	TCCATGAC <u>CGTTC</u> CTGATGCT (SEQ ID NO:26)	42,849	2.52
1758	TCTCCCAGC <u>CTG</u> CCCAT (SEQ ID NO:27)	1,747	6.66
NONE		367	0.00

CpG dinucleotides are underlined; oligonucleotides were synthesized with phosphorothioate modified backbones to improve their nuclease resistance.

¹Measured by ³H thymidine incorporation after 48 hr culture with oligodeoxynucleotides at a 200 nM concentration as described in Example 1.

²Measured in lytic units.

US 6,218,371

TABLE 1

sequences	
GCTAGACGTTAGCGT	(SEQ ID NO: 1)
GCTAGATGTTAGCGT	(SEQ ID NO: 2)
GCTAGAGGTTAGCGT	(SEQ ID NO: 3)
GCTAGACGTTAGGCT	(SEQ ID NO: 4)
GCATGACGTTGAGCT	(SEQ ID NO: 5)
ATGGAGGGTCCAGCGTTCTC	(SEQ ID NO: 6)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC	(SEQ ID NO: 7)
ATCGACTCTCGAGGTTCTC	(SEQ ID NO: 8)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC	(SEQ ID NO: 9)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC	(SEQ ID NO: 10)
ATCGACTCTCGAACGTTCTC	(SEQ ID NO: 11)
GAGAACGCTGGACCTTCCAT	(SEQ ID NO: 12)
GAGAACGCTGGACCTTCCAT	(SEQ ID NO: 13)
GAGAACGCTGGACCTTCGAT	(SEQ ID NO: 14)
GAGCAAGCTGGACCTTCCAT	(SEQ ID NO: 15)
GAGCAAGCTGGACCTTCCAT	(SEQ ID NO: 16)
GAGAACGCTGGACCTTCCAT	(SEQ ID NO: 17)
GAGAACGATGGACCTTCCAT	(SEQ ID NO: 18)

10

20

30

TABLE 1-continued

sequences	
GAGAACGCTCCAGGACTGAT	(SEQ ID NO: 19)
CCATGTCGGTCTCTGATGCT	(SEQ ID NO: 20)
TCCATGCTGGTCTCTGATGCT	(SEQ ID NO: 21)
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	(SEQ ID NO: 22)
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	(SEQ ID NO: 23)
TCCATGACGTTCTCTGATGCT	(SEQ ID NO: 24)
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	(SEQ ID NO: 25)
TCAACGTT	(SEQ ID NO: 26)
TCAAGCTT	(SEQ ID NO: 27)
TCAAGCTT	(SEQ ID NO: 28)
TCTTCGAT	(SEQ ID NO: 29)
TCTTCGAA	(SEQ ID NO: 30)
CAAGCTT	(SEQ ID NO: 31)
CCAGCTT	(SEQ ID NO: 32)
CAAGCTTCT	(SEQ ID NO: 33)
TCAAGCTC	(SEQ ID NO: 34)
ATGGACTCTCCAGGCTTCTC	(SEQ ID NO: 35)
ATGGAGGTCACAGCTTCTC	(SEQ ID NO: 36)
ATGGACTCTCCAGGCTTCTC	(SEQ ID NO: 37)
ATGGAGGTCACAGCTTCTC	(SEQ ID NO: 38)
ATGGACTCTCCAGGCTTCTC	(SEQ ID NO: 39)
ATGGACTCTCCAGGCTTCTC	(SEQ ID NO: 40)
GCATGACCTTACGCTT3'	(SEQ ID NO: 41)
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 42
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 43
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 44
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 45
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 46
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 47
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 48
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 49
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 50
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	SEQ ID NO: 51
GGGTCACAGTTGACGGGG	(SEQ ID NO: 52)
GGGTCACAGTTGACGGGG	(SEQ ID NO: 53)
GCTAGAGTTTACTGT	(SEQ ID NO: 54)
GCTAGAGTTTACTGT	(SEQ ID NO: 55)
TCCATGTCGGTCTCTGATGCT	(SEQ ID NO: 56)

10

20

30

40

TABLE 1-continued

sequences	
TCCATGTZGTTCCTGATGCT	{SEQ ID NO: 57}
ACCATGGACGATCTGTTTCCCTC	{SEQ ID NO: 58}
TCTCCAGCGTGGCCAT	{SEQ ID NO: 59}
TACCGCGTGCGACCTCT	{SEQ ID NO: 60}
ACCATGGACGAAGTCTTTCCTC	{SEQ ID NO: 61}
ACCATGGACGAGCTGTTTCCCTC	{SEQ ID NO: 62}
ACCATGGACGACCTGTTTCCCTC	{SEQ ID NO: 63}
ACCATGGACGTAAGTCTTTCCTC	{SEQ ID NO: 64}
ACCATGGACGCTCTGTTTCCCTC	{SEQ ID NO: 65}
ACCATGGACGTTCTGTTTCCCTC	{SEQ ID NO: 66}
CACGTTGAGCGCAT	{SEQ ID NO: 67}
CTGCTGAGACTGGAG	{SEQ ID NO: 68}
TCAGGCTGCGC	{SEQ ID NO: 69}
ATGACCTTCTGACGTT	{SEQ ID NO: 70}
TCTCCAGCGGCGCAT	{SEQ ID NO: 71}
TCTCCAGCGCGCCAT	{SEQ ID NO: 72}
TCCATGTCGTTCCTGTCGT	{SEQ ID NO: 73}
TCCATAGCGTTCCTAGCGT	{SEQ ID NO: 74}
TGGTGGCTGTCTCCGCTTCTT	{SEQ ID NO: 75}
TCTGAGGTTCTGACGTT	{SEQ ID NO: 76}
TCTGTGCTTCTGTCGTT	{SEQ ID NO: 77}
TCCATGTCGTTTTCGTCGT	{SEQ ID NO: 78}
TCTGTGCTTCTGTCGTT	{SEQ ID NO: 79}
TCTGTGCTTCTGTCGTT	{SEQ ID NO: 80}
TCTGTGCTTCTGTCGTT	{SEQ ID NO: 81}
TCTGTGCTTCTGTCGTT	{SEQ ID NO: 82}
TCTGTGCTTCTGTCGTT	{SEQ ID NO: 83}
TCCATGTZGTTCCTGTCGT	{SEQ ID NO: 84}
TCCAGGACTTCTCTCAGGT	{SEQ ID NO: 85}
TCCATGCTGCTGCTGCTT	{SEQ ID NO: 86}

10

20

30

40

TABLE 1-continued

sequences	
TCCATGCGTTGCGTTGCGTT	(SEQ ID NO: 87)
TCCACGACGTTTTCGACGTT	(SEQ ID NO: 88)
TGGTCGTTGTGCGTTGTCGTT	(SEQ ID NO: 89)
) TCGTCGTTTTGTGCGTTTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 90)
TGGTCGTTGTGCGTTTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 91)
GCGTCGTTGTGCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 92)
; GCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	(SEQ ID NO: 93)
TGTCGTTTTGTGCGTTTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 94)
TGTGCGTTGTGCGTTGTGCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 95)
) TGTGCGTTGTGCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 96)
TGTGCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 97)
TGTGCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 98)
; TCCATAGCGTTCCCTAGCGTT	(SEQ ID NO: 99)
TCCATGACGTTCCCTGACGTT	(SEQ ID NO: 100)
GTCG(T/C)T	(SEQ ID NO: 101)
TGTCG(T/C)T	(SEQ ID NO: 102)
) TCCATGACGTTCCCTGACGTT	(SEQ ID NO: 103)
TCTCCGACGTTGCGCGCAT	(SEQ ID NO: 104)
; TCCATGACGTTCCCTGACGTT	(SEQ ID NO: 105)

10

20

30

TABLE 2

Induction of human IL-12 secretion by Phosphorothioate CpG oligonucleotide				
ODN, sequence (5'-3')		IL-12 (pg/ml)		
		expt. 1	expt. 2	
None		0	0	
1962	TCCTGTCGTTTCCTTGTCTGTT (SEQ. ID NO:79)	19	0	10
1965	TCCTGTCGTTTCTTGTCTGTT (SEQ. ID NO:81)	36	0	
1967	TCGTCGCTGTCTGCTCCCTTCTT (SEQ. ID NO:82)	41	0	
1968	TCGTCGCTGTCTGCTCTTCTT (SEQ. ID NO:83)	24	0	
2005	TCGTCGTTTGTCTGTTGTCTGTT (SEQ. ID NO:89)	25	0	
2006	TCGTCGTTTGTCTGTTTGTCTGTT (SEQ ID NO: 90)	29	13	
2014	TGTCGTTGTCGTTGTCTGTT (SEQ. ID NO:96)	28	0	20
2015	TCGTCGTCCTCTGTT (SEQ ID NO:97)	14	0	
2016	TGTCGTTGTCGTT (SEQ. ID NO:98)	3	0	

¹PBMC were collected from normal donors and spun over Ficoll, then cultured at 10⁶ cells/well in 96 well microtiter plates with or without the indicated oligonucleotide which were added to cultures at µg/ml. Supernatants were collected at 24 hr and tested for IL-12 levels by ELISA as described in methods. A standard curve was run in each experiment, which represents a different donor.

TABLE 3

Compound	CD86 (5 Exp)	CD40 (4 Exp.)	T cell proliferation
GM-CSF	1.9	2.5	13.3
CpG	3.9	3.5	19.7
CpG + GM-CSF	7.0	8.5	25.6

10

20

30

US 6,239,116 B1

TABLE 1

<u>Oligonucleotide Stimulation of Mouse B Cells</u>			
ODN	Sequence (5' to 3')†	<u>Stimulation Index'</u>	
		³ H Uridine	IgM Production
1 (SEQ ID NO:91)	GCTAGACGTTAGCGT	6.1 ± 0.8	17.9 ± 3.6
1a (SEQ. ID NO:4)	T.....	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.5
1b (SEQ ID NO:13)	Z.....	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.0
1c (SEQ ID NO:14)	Z..	10.3 ± 4.4	9.5 ± 1.8

TABLE 1-continued

<u>Oligonucleotide Stimulation of Mouse B Cells</u>			
ODN	Sequence (5' to 3')	Stimulation Index ^a	
		³ H Uridine	IgM Production
1d (SEQ ID NO:92)	..AT ₁ ...GAGC.	13.0 ± 2.3	18.3 ± 7.5
2 (SEQ ID NO:1)	ATGGAAGGTCACG ₁ GTTC	2.9 ± 0.2	13.6 ± 2.6
2a (SEQ ID NO:13)	..G ₁ ...CTC...G... ₁ ...	7.7 ± 0.8	24.2 ± 3.2
2b (SEQ ID NO:16)	..Z...CTC.ZG...Z.....	1.6 ± 0.5	2.8 ± 2.2
2c (SEQ ID NO:17)	..Z...CTC...G... ₁	3.1 ± 0.6	7.3 ± 1.4
2d (SEQ ID NO:18)	..G ₁ ...CTC...G... ₁ ...Z..	7.4 ± 1.4	27.7 ± 5.4
2e (SEQ ID NO:19)	A ₁	5.6 ± 2.0	ND
3D (SEQ ID NO:20)	GAGAA ₁ CGTCGACCTTCCT	4.9 ± 0.5	19.9 ± 3.6
3Da (SEQ ID NO:21)	G ₁	6.6 ± 1.5	31.9 ± 6.8
3Db (SEQ ID NO:22)	G ₁ G..	10.1 ± 2.0	25.4 ± 0.9
3Dc (SEQ ID NO:23)	...C.A.....	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.5
3Dd (SEQ ID NO:24)	Z.....	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.4
3De (SEQ ID NO:25)	Z.....	4.4 ± 1.2	18.8 ± 4.4
3Df (SEQ ID NO:26)	A.....	1.6 ± 0.1	7.7 ± 0.4
3Dg (SEQ ID NO:27)	CC.G.ACTG..	6.1 ± 1.5	18.6 ± 1.5
3M (SEQ ID NO:28)	TCCATGTCGCTCTGATGCT	4.1 ± 0.2	23.2 ± 4.9
3Ma (SEQ ID NO:29)	CT.....	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.5
3Mb (SEQ ID NO:30)	Z.....	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.6
3Mc (SEQ ID NO:31)	Z.....	5.4 ± 1.5	8.5 ± 2.6
3Md (SEQ ID NO:7)	A ₁ ...T.....	17.2 ± 9.4	ND
3Me (SEQ ID NO:93)	C...A..	3.6 ± 0.2	14.2 ± 5.2
4 (SEQ ID NO:94)	TCAACCTT	6.1 ± 1.4	19.2 ± 5.2
4a (SEQ ID NO:95)	...GC..	1.1 ± 0.2	1.5 ± 1.1
4b (SEQ ID NO:96)	...GGGC.	4.5 ± 0.2	9.6 ± 3.4
4c (SEQ ID NO:97)	...TCGA.	2.7 ± 1.0	ND
4d (SEQ ID NO:98)	..TT...AA	1.3 ± 0.2	ND
4e (Residue 2-8 of -... ₁ ...)		1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.5
SEQ ID NO:94)			
4f (SEQ ID NO:99)	C.....	1.9 ± 1.4	ND
4g (Residue 11-18 of -... ₁ ...CT)		1.4 ± 0.3	ND
SEQ ID NO:19)			
4h (SEQ ID NO:100)	C	1.2 ± 0.2	ND
LFB		7.8 ± 2.5	4.8 ± 1.0

^a Stimulation indexes are the means and std. dev. derived from at least 3 separate experiments, and are compared to wells cultured with no added ODN.
 ND = not done.
 CpG dinucleotides are underlined.
 Dots indicate identity; dashes indicate deletions.
 Z indicates 5 methyl cytosine.

10

20

30

40

TABLE 2

Identification of the optimal CpG motif for Murine IL-6 production and B cell activation						
ODN	SEQUENCE (5'-3')	IL-6 CH12.LX	(pg/ml) ^a SPLENIC B CELL SI ^b	IgM (ng/ml) ^c		
512	(SEQ ID No:28) TCCATGTC <u>CG</u> TCCTGATGCT	1300 ± 106	627 ± 43	5.8 ± 0.3	7315 ± 1324	
1637	(SEQ ID No:29) C <u>AA</u>	136 ± 27	46 ± 6	1.7 ± 0.2	770 ± 72	
1615	(SEQ ID No:101) G <u>AA</u>	1201 ± 155	856 ± 202	3.7 ± 0.3	3212 ± 617	
1614	(SEQ ID No:102) A <u>AA</u>	1533 ± 321	1812 ± 103	10.6 ± 0.6	7558 ± 414	
1636	(SEQ ID No:103) <u>AA</u>	1181 ± 76	947 ± 132	5.4 ± 0.4	3983 ± 485	
1634	(SEQ ID No:104) <u>CC</u>	1049 ± 223	1671 ± 175	9.2 ± 0.9	6256 ± 261	
1619	(SEQ ID No:105) <u>TT</u>	1355 ± 304	2908 ± 129	12.5 ± 1.0	8243 ± 698	
1618	(SEQ ID No:7) A <u>AA</u> T.....	2109 ± 291	2596 ± 166	12.9 ± 0.7	10425 ± 674	
1639	(SEQ ID No:3) AA <u>AT</u>	1827 ± 93	2012 ± 132	11.5 ± 0.4	9489 ± 103	
1707	(SEQ ID No:86) A <u>ATC</u>	ND	1147 ± 175	4.0 ± 0.2	3534 ± 217	
1708	(SEQ ID No:106) CA <u>ATG</u>	ND	59 ± 3	1.5 ± 0.1	466 ± 109	

Dots indicate identity; CpG dinucleotides are underlined; ND = not done

^aThe experiment was done at least three times with similar results. The level of IL-6 of unstimulated control cultures of both CH12.LX and splenic B cells was ≤ 10 pg/ml. The IgM level of unstimulated culture was 547 ± 82 ng/ml. CpG dinucleotides are underlined and dots indicate identity.

^b[³H] Uridine uptake was indicated as a fold increase (SI; stimulation index) from unstimulated control (2322.67 ± 213.68 cpm). Cells were stimulated with 20 μM of various CpG O-ODN. Data present the mean ± SD of triplicates

^cMeasured by ELISA.

10

20

TABLE 3

Induction of Murine IL-6 secretion by CpG motifs in bacterial DNA or oligonucleotides.			
Treatment			IL-6 (pg/ml)
calf thymus DNA			≤10
calf thymus DNA + DNase			≤10
E. coli DNA			1169.5 ± 94.1
E. coli DNA + DNase			≤10
CpG methylated E. coli DNA			≤10
LPS			280.1 ± 17.1
Media (no DNA)			≤10
ODN			
Sa	SEQ. ID. No:1	ATGGACTCTCCAG <u>C</u> GTTCTC	1096.4 ± 372.0
Sb	SEQ. ID. No:2	AGG..... <u>A</u>	1124.5 ± 126.2
Sc	SEQ. ID. No:3	.. <u>C</u> <u>G</u>	1783.0 ± 189.5
Sd	SEQ. ID. No:4	 AGG.. <u>C</u> .. <u>T</u>	≤10
Se	SEQ. ID. No:5	.. <u>C</u> <u>G</u> .. <u>Z</u>	851.1 ± 114.4

10

20

30

TABLE 3-continued

Induction of Murine IL-6 secretion by CpG motifs
in bacterial DNA or oligonucleotides.

5f	SEQ. ID. No:6	..Z.....ZG..Z.....	≤10
5g	SEQ. ID. No:7	.. <u>C</u> <u>G</u> Z..	1862.3 ± 87.26

3 T cell depleted spleen cells from DBA/2 mice were
stimulated with phosphodiester modified oligonucle-
otides (O-ODN) (20 μM), calf thymus DNA (50 μg/ml)
or *E. Coli* DNA (50 μg/ml) with or without enzyme
treatment, or LPS (10 μg/ml) for 24 hr. Data repre-
sents the mean (pg/ml) ± SD of triplicates. CpG
dinucleotides are underlined and dots indicate
identity. Z indicates 5-methylcytosine.

TABLE 4

Secretion of Murine IL-6 induced by CpG DNA stimulation in vivo.

Stimulant	IL-6 (pg/ml)
PBS	<50
<i>E. coli</i> DNA	13858 ± 3143
Calf Thymus DNA	<50
CpG S-ODN	20715 ± 606
non-CpG S-ODN	<50

Mice (2 mice/group) were i.v. injected with 100 μl of PBS, 200 μg of *E. coli* DNA or calf thymus DNA, or 500 μg of CpG S-ODN or non-CpG control S-ODN. Mice were bled 2 hr after injection and 1:10 dilution of each serum was analyzed by IL-6 ELISA. Sensitivity limit of IL-6 ELISA was 5 pg/ml. Sequences of the CpG S-ODN is 5'GCATGACGT-TGAGCT3' (SEQ. ID. No: 6) and of the non-stimulatory S-ODN is 5'GCTAGATGTTAGCGT3' (SEQ. ID. No: 49). Note that although there is a CpG in sequence 48, it is too close to the 3' end to effect stimulation, as explained herein. Data represent mean ± SD of duplicates. The experiment was done at least twice with similar results.

TABLE 5

Induction of human PBMC cytokine secretion by CpG oligos						
ODN	Sequence (5'-3')	IL-6 ₁	TNF- α ₂	IFN- γ ₁	GM-CSF ⁷	IL-12
512	TCCATGTC <u>CGG</u> TCCTGATGCT	500	140	15.6	70	250
SEQ ID NO:28						
1637	C.....	550	16	7.8	15.6	16
SEQ ID NO:29						
1635	G.....	600	145	7.8	45	145
SEQ ID NO:101						

10

TABLE 5-continued

Induction of human PBMC cytokine secretion by CpG oligos						
ODN	Sequence (5'-3')	IL-6 ₁	TNF- α ₂	IFN- γ ₁	GM-CSF	IL-12
1614	A.....	550	31	0	80	31
SEQ ID NO:102						
1636	A.....	325	250	35	40	250
SEQ ID NO:103						
1634	C.....	300	400	40	85	400
SEQ ID NO:104						
1619	T.....	275	450	200	80	450
SEQ ID NO:105						
1618	A...T.....	300	60	15.6	15.6	62
SEQ ID NO:7						
1639	AA...T.....	625	220	15.6	40	220
SEQ ID NO:3						
1707	A...TC.....	300	70	17	0	70
SEQ ID NO:88						
1708	CA...TG.....	270	10	17	ND	10
SEQ ID NO:106						

20

30

dots indicate identity; CpG dinucleotides are underlined

; measured by ELISA using Quantikine kits from R&D Systems (pg/ml) Cells were cultured in 10% autologous serum with the indicated oligodeoxynucleotides (12 μ g/ml) for 4 hr in the case of TNF- α or 24 hr for the other cytokines before supernatant harvest and assay. Data are presented as the level of cytokine above that in wells with no added oligodeoxynucleotide.

TABLE 6

CpG DNA induces cytokine secretion by human PBMC				
DNA	TNF- α (pg/ml) ¹	IL-6 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	RANTES (pg/ml)
EC DNA (50 μ g/ml)	900	12,000	700	1560
EC DNA (5 μ g/ml)	850	11,000	400	750
EC DNA (0.5 μ g/ml)	500	ND	200	0
EC DNA (0.05 μ g/ml)	62.5	10,000	15.6	0
EC DNA (50 μ g/ml) + L-LME ²	0	ND	ND	ND
EC DNA (10 μ g/ml) Methyl. ³	0	5	ND	ND
CT DNA (50 μ g/ml)	0	600	0	0

¹ Levels of all cytokines were determined by ELISA using Quantikine kits from R&D Systems as described in the previous table. Results are representative using PBMC from different donors.

² Cells were pretreated for 15 min. with L-leucyl-L-leucine methyl ester (M-LME) to determine whether the cytokine production under these conditions was from monocytes (or other L-LME-sensitive cells).

³ EC DNA was methylated using 2U/ μ g DNA of CpG methylase (New England Biolabs) according to the manufacturer's directions, and methylation confirmed by digestion with Hpa-II and Msp-I. As a negative control, samples were included containing twice the maximal amount of LPS contained in the highest concentration of EC DNA which failed to induce detectable cytokine production under these experimental conditions. ND = not done.

TABLE 7

CpG DNA induces cytokine expression in purified human macrophages			
	IL-6 (pg/ml)	GM-CSF (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Cells alone	0	0	0
CT DNA (50 μ g/ml)	0	0	0
EC DNA (50 μ g/ml)	2000	15.6	1000

TABLE 8

Induction Of NK Activity By CpG Oligodeoxynucleotides (ODN)				
ODN	% YAC-1 Specific Lysis*		% 2C11 Specific Lysis	
	Effector: Target		Effector: Target	
	50:1	100:1	50:1	100:1
None	-1.1	-1.4	15.3	16.6
1	16.1	24.5	38.7	47.2
3Dd	17.1	27.0	37.0	40.0
non-CpG ODN	-1.6	-1.7	14.8	15.4

10

TABLE 9

Induction of NK Activity by DNA Containing CpG Motifs but not by Non-CpG DNA			
DNA or Cytokine Added		LU/10 ⁶	
		Mouse Cells	Human Cells
Expt. 1	None	0.00	0.00
	IL-2	16.68	15.82
	<i>E. Coli.</i> DNA	7.23	5.05
	Calf thymus DNA	0.00	0.00
Expt. 2	None	0.00	3.28
	1585 ggGGTCAACGTTGACgggg (SEQ ID No.12)	7.38	17.98
	1629 -----gtc----- (SEQ ID No.50)	0.00	4.4
Expt. 3	None	0.00	
	1613 GCTAGACGTTAGTGT (SEQ ID No.42)	5.22	
	1769 -----Z----- (SEQ ID No.52)	0.02	ND
	1619 TCCATGTCGTTCCCTGATGCT (SEQ ID No.38)	3.35	
	1765 -----Z----- (SEQ ID No.53)	0.11	

20

30

40

CpG dinucleotides in ODN sequences are indicated by underlying; Z indicates methylcytosine. Lower case letters indicate nuclease resistant phosphorothioate modified internucleotide linkages which, in titration experiments, were more than 20 times as potent as non-modified ODN, depending on the flanking bases. Poly G ends (g) were used in some ODN, because they significantly increase the level of ODN uptake.

50

TABLE 10

ODN induction of NK Lytic Activity (LU)				
ODN				
cells		LU		
alone	Sequence (5'→3')	0.01		
1754	ACCATGGACGATCTGTTTCCCTC	0.02	SEQ ID NO: 59	
1758	TCTCCAGCGTGCGCCAT	0.05	SEQ ID NO: 45	
1761	TACCGCGTGCGACCTCT	0.05	SEQ ID NO: 60	
1776	ACCATGGACGAACGTTTCCCTC	0.03	SEQ ID NO: 61	
1777	ACCATGGACGAGCTGTTTCCCTC	0.05	SEQ ID NO: 62	
1778	ACCATGGACGACCTGTTTCCCTC	0.01	SEQ ID NO: 63	
1779	ACCATGGACGTACTGTTTCCCTC	0.02	SEQ ID NO: 64	
1780	ACCATGGACGGTCTGTTTCCCTC	0.29	SEQ ID NO: 65	
1781	ACCATGGACGTTCTGTTTCCCTC	0.38	SEQ ID NO: 66	
1823	GCATGACGTGAGCT	0.08	SEQ ID NO: 6	
1824	CACGTGAGGGGCAT	0.01	SEQ ID NO: 67	
1825	CTGCTGAGACTGGAG	0.01	SEQ ID NO: 68	
1828	TCAGCGTGCCGC	0.01	SEQ ID NO: 69	
1829	ATGACGTTCTGACGTT	0.42	SEQ ID NO: 70	
1830 ²	RANDOM SEQUENCE	0.25		
1834	TCTCCAGCGGGCGCAT	0.00	SEQ ID NO: 71	
1836	TCTCCAGCGGGCGCAT	0.46	SEQ ID NO: 72	
1840	TCCATGCTGTTTCTGTCGTT	2.70	SEQ ID NO: 73	
1841	TCCATAGCGTTCTAGCGTT	1.45	SEQ ID NO: 74	
1842	TGTCGCTGTCTCCGCTTCTT	0.06	SEQ ID NO: 75	
1851	TCCTGACGTTCTGACGTT	2.32	SEQ ID NO: 76	

¹Lytic units (LU) were measured as described (8). Briefly, PBMC were collected from normal donors and spun over Ficoll, then cultured with or without the indicated ODN (which were added to cultures at 6 µg/ml) for 24 hr. Then their ability to lyse ⁵¹Cr-labeled K562 cells was determined. The results shown are typical of those obtained with several different normal human donors. ²This oligo mixture contained a random selection of all 4 bases at each position.

10

20

30

40

TABLE 11

Induction of NK LU by Phosphorothioate CpG ODN with Good Motifs					
ODN ¹ cells alone	sequence (5'→3')	SEQ ID NO:	expt. 1 0.00	expt. 2 1.26	expt. 3 0.46
1840	TCCATGTCGTCCTTCCTGTCGTT	73	2.33	ND	ND
1960	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	77	ND	0.48	8.99
1961	TCCATGTCGTTTTTTGTCGTT	78	4.03	1.23	5.08
1962	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	52	ND	1.60	5.74
1963	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	79	3.42	ND	ND
1965	TCCTGTCGTTTTTTGTCGTT	53	0.46	0.42	3.48
1966	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	75	2.62	ND	ND
1967	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	54	5.82	1.64	8.32
1968	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	55	3.77	5.26	6.12
1979 ²	TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT		1.32	ND	ND
1982	TCCAGGACTTCTCTCAAGTT	79	0.05	ND	0.98
1990	TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT	80	2.10	ND	ND
1991	TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT	81	0.89	ND	ND
2002	TCCACGACGTTTTCGACGTT	82	4.02	1.31	9.79
2005	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	47	ND	4.22	12.75
2006	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	56	ND	6.17	12.82
2007	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	49	ND	2.68	9.66
2008	GCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	56	ND	1.37	8.15
2010	CCCGCGCGCGCGCGCGCGCG	83	ND	0.01	0.05
2012	TGTCGTTTGTGCTTGTGCTT	48	ND	2.02	11.61
2013	TGTCGTTTGTGCTTGTGCTT	84	ND	0.56	5.22
2014	TGTCGTTTGTGCTTGTGCTT	60	ND	5.74	10.89
2015	TGTCGTTTGTGCTTGTGCTT	51	ND	4.53	10.13
2016	TGTCGTTTGTGCTTGTGCTT	85	ND	6.54	8.06

¹PEMC essentially as described herein. Results are representative of 6 separate experiments; each experiment represents a different donor.

²This is the methylated version of ODN 1840 (SEQ ID NO:83); Z = 5-methyl cytosine at residues 8 and 17; LU is lytic units; ND = not done; CpG dinucleotides are underlined for clarity

TABLE 12

Induction of human B cell proliferation by Phosphorothioate CpG ODN							
ODN sequence (5' 3')	SEQ ID NO:	Stimulation Index ¹²					
		expt. 1	expt. 2	expt. 3	expt. 4	expt. 5	expt. 6
1840 TCCATGTCGTTCTCTGCGTT	73	4	ND	ND	ND	ND	34
1841 TCCATAGCGTTCTCTAGCGTT	74	3	ND	ND	ND	ND	ND

TABLE 12-continued

Induction of human B cell proliferation by Phosphorothioate CpG ODN							
ODN sequence (5' 3')	SEQ ID NO:	Stimulation Index ¹²					
		expt. 1	expt. 2	expt. 3	expt. 4	expt. 5	expt. 6
1960 TCCGTCGTTCTCTGCGTT	77	ND	2.0	2.0	3.6	ND	ND
1961 TCCATGTCGTTCTCTGCGTT	78	2	3.9	1.9	3.7	ND	37
1962 TCCGTCGTTCTCTGCGTT	82	ND	3.8	1.9	3.9	5.4	35
1963 TCCGTCGTTCTCTGCGTT	79	3	ND	ND	ND	ND	ND
1965 TCCGTCGTTCTCTGCGTT	53	4	3.7	2.4	4.7	6.0	43
1967 TCCGTCGTTCTCTGCGTT	54	ND	4.4	2.0	4.5	5.0	36
1968 TCCGTCGTTCTCTGCGTT	55	ND	6.0	2.0	4.9	8.7	38
1982 TCCAGGACTCTCTCAGGTT	79	3	1.8	1.3	3.1	3.2	12
2002 TCCAGGACTCTCTCAGGTT	86	ND	2.7	1.4	4.4	ND	14
2005 TCCGTCGTTCTCTGCGTT	47	5	3.2	1.2	3.0	7.6	37
2006 TCCGTCGTTCTCTGCGTT	46	4	4.5	2.2	5.8	8.3	40
2007 TCCGTCGTTCTCTGCGTT	49	3	4.0	4.2	4.1	ND	22
2008 GCGTCGTTCTCTGCGTT	56	ND	3.0	2.4	1.6	ND	12
2010 GCGTCGTTCTCTGCGTT	83	ND	1.6	1.9	3.2	ND	ND
2012 TGTGCTGTTCTCTGCGTT	48	2	2.8	0	3.2	ND	33
2013 TGTGCTGTTCTCTGCGTT	84	3	2.3	3.1	2.8	ND	7
2014 TGTGCTGTTCTCTGCGTT	50	3	2.5	4.0	3.2	6.7	14
2015 TGGTCGTTCTCTGCGTT	51	5	1.8	2.6	4.5	9.4	1
2016 TGTGCTGTTCTCTGCGTT	85	ND	1.1	1.7	2.7	7.3	1

¹²Cells = human spleen cells stored at -70° C. after surgical harvest or PBMC collected from normal donors and spun over Ficoll. Cells were cultured in 96 well U-bottom microtiter plates with or without the indicated ODN (which were added to cultures at 5 µM). N = 12 experiments. Cells were cultured for 4-7 days, pulsed with 1 µCi of ³H thymidine for 18 hr before harvest and scintillation counting. Stimulation index = the ratio of cpm in wells without ODN to that in wells that had been stimulated throughout the culture period with the indicated ODN (there were no further additions of ODN after the cultures were set up). ND = not done

TABLE 13

Induction of human IL-12 secretion by Phosphorothioate CpG ODN				
ODN ¹	sequence (5'-3')	SEQ IL-12 (pg/ml)		
		ID NO	expt. 1	expt. 2
cells alone			0	0
1962	TCCTGTCGTTCCCTTGTCGTT	52	19	0
1965	TCCTGTCGTTTCTTGTCGTT	53	36	0
1967	TCGTCGCTGTCGCTTCTT	54	41	0
1968	TCGTCGCTGTTGTCGTTCTT	55	24	0
2005	TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT	47	25	0
2006	TCGTCGTTTCTGTCGTTTCTGTCGTT	46	29	15

10

20

TABLE 13-continued

Induction of human IL-12 secretion by Phosphorothioate CpG ODN				
ODN ¹	sequence (5'-3')	SEQ IL-12 (pg/ml)		
		ID NO	expt. 1	expt. 2
2014	TGTCGTTGTCGTTGTCGTT	50	28	0
2015	TCGTCGTCGTCGTT	51	14	0
2016	TGTCGTTGTCGTT	85	3	0

30

¹PBMC were collected from normal donors and spun over Ficoll, then cultured at 10⁶ cells/well in 96 well microtiter plates with or without the indicated ODN which were added to cultures at 6 µg/ml. Supernatants were collected at 24 hr and tested for IL-12 levels by ELISA as described in methods. A standard curve was run in each experiment, which represents a different donor.

40

TABLE 14

Different CpG motifs stimulate optimal murine B cell and NK activation			
ODN Sequence		B cell activation ¹	NK activation ²
1668	TCCATGACG <u>TCCTGATGCT</u> (SEQ.ID.NO:7)	42,849	2.52
1758	TCTCCCA <u>GCGTCGCCAT</u> (SEQ.ID.NO:45)	1,747	5.56
NONE		367	0.00

CpG dinucleotides are underlined; oligonucleotides were synthesized with phosphorothioate modified backbones to improve their nuclease resistance. ¹Measured by ³H thymidine incorporation after 48 hr culture with oligodeoxynucleotides at a 200 nM concentration as described in Example 1. ²Measured in lytic units.

TABLE 15

Specific blockade of CpG-induced TNF- α and IL-12 expression by inhibitors of endosomal acidification or NF κ B activation												
Medium		Inhibitors: Bafilomycin (350 nM)		Chloroquine (2.5 μ g/ml)		Monensin (10 μ M)		NAC (50 mM)	TPCK (50 μ M)	Glutathione (0.1 μ g/ml)	Bisphosphonate (0.1 μ g/ml)	
activators	TNF- α	IL-12	TNF- α	IL-12	TNF- α	IL-12	TNF- α	IL-12	TNF- α	TNF- α	TNF- α	TNF- α
Medium	37	147	46	102	27	20	22	73	30	24	17	41
CpG	485	17,114	71	116	28	6	49	777	54	23	31	441
ODN												
LPS	901	22,485	1370	4051	1025	12418	491	4796	417	46	178	1120

TABLE 15 legend IL-12 and TNF- α assays: The murine monocyte cell line 3774 (1×10^6 cells/ml for IL-12 or 1×10^6 cells/ml for TNF- α), were cultured with or without the indicated inhibitors at the concentrations shown for 2 hr and then stimulated with the CpG oligodeoxynucleotide (ODN) 1826 (TCCATGACGTCCTGATGCT SEQ ID NO:16) at 2 μ M or LPS (10 μ g/ml) for 4 hr (TNF- α or 24 hr (IL-12) at which time the supernatant was harvested. ELISA for IL-12 or TNF- α (pg/ml) was performed on the supernatants essentially as described (A. K. Krieg, A.-K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, B. Tassabehji, G. Koretzky and D. Klinman, Nature 374, 546 (1995); Yi A.-K., D. M. Klinman, T. J. Martin, S. Matson and A. M. Krieg, J Immunol., 157, 5394-5402 (1996); Krieg, A. M, J Lab. Clin. Med., 128, 128-133 (1996). Cells cultured with ODN that lacked CpG motifs did not induce cytokine secretion. Similar specific inhibition of CpG responses was seen with IL-6 assays, and in experiments using primary spleen cells or the B cell lines CH32.1X and WEHI-231. 2.5 μ g/ml of chloroquine is equivalent to 25 μ M. Other inhibitors of NF- κ B activation including PDTC and calpain inhibitors I and II gave similar results to the inhibitors shown. The results shown are representative of those obtained in ten different experiments.

US 6,339,068 B1

TABLE 3

Plasmids containing immunostimulatory CpG motifs			
Plasmid Backbone	No. CpG Motifs	Species Specificity and ODN Equivalence of CpG-5 Insert	
pHCG-16	pMAS 16	mouse-specific CpG motif	
pHCG-50	pMAS 50	#1826 ¹	
pHCG-100	pMAS 100		
pHCG-200	pMAS 200		
pHCG-30	pMAS 30	human-specific CpG motif -	
pHCG-50	pMAS 50	no ODN equivalent ²	
pHCG-100	pMAS 100		
pHCG-200	pMAS 200		
pHIS-40	pMAS 40	human-specific CpG motif	

TABLE 3-continued

Plasmids containing immunostimulatory CpG motifs			
Plasmid Backbone	No. CpG Motifs	Species Specificity and ODN Equivalence of CpG-5 Insert	
pHIS-64	pMAS 64	#2006 ³	
pHIS-128	pMAS 128		
pHIS-192	pMAS 192		

¹sequence of 1826 is TCCTGACGTTCCCTGACCTT²sequence used as a source of CpG motifs is GACTT

CGTGTGCTTCTCTGCTCTTTAGCGCTTCTCTGCTG

CGTCCCTT (SEQ ID NO:14)

³sequence of 2006 is TCGTCTTTGTCCTTTGCTT (SEQ ID NO:3)

TABLE 4

Plasmids encoding hepatitis B surface antigen (derived from ayw or adw subtypes of HBV)		
Plasmid	Backbone	Insert
pUK-S	pUK21-A2	HBV-S (ayw)
pUKAX-S	pUK21-AX*	HBV-S (ayw)
pMAS-S	pMAS	HBV-S (ayw)
pMCG16-S	pMCG-16	HBV-S (ayw)
pMCG50-S	pMCG-50	HBV-S (ayw)
pMCG100-S	pMCG-100	HBV-S (ayw)
pMCG200-S	pMCG-200	HBV-S (ayw)

TABLE 4-continued

Plasmids encoding hepatitis B surface antigen (derived from ayw or adw subtypes of HBV)		
Plasmid	Backbone	Insert
pHCG30-S	pHCG-30	HBV-S (ayw)
pHCG50-S	pHCG-50	HBV-S (ayw)
pHCG100-S	pHCG-100	HBV-S (ayw)
pHCG200-S	pHCG-200	HBV-S (ayw)
pHIS40-S(ad)	pHIS-40	HBV-S (adw2)
pHIS64-S(ad)	pHIS-64	HBV-S (adw2)
pHIS128-S(ad)	pHIS-128	HBV-S (adw2)
pHIS192-S(ad)	pHIS-192	HBV-S (adw2)

*pUK21-AX was created by deleting fl origin from pUK21-A

TABLE 6

<u>ODN used with plasmid DNA</u>		
Backbone	ODN code number	Sequence
S-ODN		(SEQ ID NO:51)
	1826	TCCATGACGTTCTCTGACGTT
		(SEQ ID NO:52)
	1628	GGGGTCAACGTTGAGGGGGG
		(SEQ ID NO:53)
O-ODN	1911	TCCAGGACTTTCTCTCAGGTT
		(SEQ ID NO:54)
	1982	TCCAGGACTTCTCTCAGGTT
		(SEQ ID NO:55)
	2017	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
O-ODN		(SEQ ID NO:56)
	2061	TCCATGACGTTCTCTGACGTT
SOS-ODN		(SEQ ID NO:57)
	2001	GGCGGGGGGGGGGGGGGGGG
SOS-ODN		(SEQ ID NO:58)
	1980	TCCATGACGTTCTCTGACGTT
		(SEQ ID NO:59)
	1585	GGGTCAACGTTGAGGGGGG
		(SEQ ID NO:60)
	1844	TCTCCAGCGTGGCCATAT
		(SEQ ID NO:61)
	1972	GGGGTCTGTGCTTTTGGGGG
		(SEQ ID NO:62)
	2042	TCAGGGGTGGGGGCAACGTT
		(SEQ ID NO:63)
	1981	GGGGTTSACGTTTGGGGGG
		(SEQ ID NO:64)
	2019	TCTAGCGTTTTTAGCGTTCC
		(SEQ ID NO:65)
	2021	TCGTGCTGTGCTGTTGTCGTT
		(SEQ ID NO:66)
	2022	TCGTGCTTTTGTGCTTTTGTGCT
		(SEQ ID NO:67)
	2023	TCGTGCTTGTGCTTTTGTGCT

Note: (SEQ ID NO: 51~67, respectively)

10

20

30

40

TABLE 10

Inhibitory CpG motifs can block B cell proliferation induced by a stimulatory CpG motif	
Oligonucleotide added	cpm
medium	194
1668 (TCCATGACGTTCCCTGATGCT) (SEQ ID NO:68)	34,669
1668 + 1735 (GCGTTTTTTTTTTGCG) (SEQ ID NO:69)	24,452
1720 (TCCATGAGCTTCCTGATGCT) (SEQ ID NO:70)	601
1720 + 1735	1109

10

TABLE 11

Inhibitory effects of "bad" CpG motifs on the "good" CpG Oligo 1619	
Oligonucleotide added	IL-12 in pg/ml
medium	0
1619 alone	6
1619 + 1949 (TCCATGTCGTTCCCTGATGCG (SEQ ID NO:72))	16
1619 + 1952 (TCCATGTCGTTCCGCGCGCG (SEQ ID NO:73))	0
1619 + 1953 (TCCATGTCGTTCCGCGCGCT (SEQ ID NO:74))	0
1619 + 1955 (GCGGCGGGCGGCGCGCGCC (SEQ ID NO:75))	0

20

Notes:

The sequence of oligo 1619 is TCCATGTCGTTCCCTGATGCT (SEQ ID NO:71)
1949 has only 1 GCG at the 3' end, which has essentially no
inhibitory activity

30

TABLE 13

Identification of neutralizing CpG motifs which reduce the induction of cytokine secretion by a CpG-S motif in the same ODN (cis-neutralization)				
ODN sequence 5'-3'		ODN-induced cytokine expression ²		
		IL-6 ²	IL-12	IFN- γ
None		<5	206	898
1619	TCCATGTCGTCCTCTGATGCT (SEQ ID NO:71)	1405	3130	4628
1952	GCGCGCG (SEQ ID NO:73)	559	1615	2135
1953	CC... (SEQ ID NO:74)	557	1854	2000

¹Dots in the sequence of ODN 1952 and 1953 indicate identity to ODN 1619; CpG dinucleotides are underlined for clarity. ODN without CpG-N or CpG-S motifs had little or no effect on cytokine production. The data shown are representative of 4 experiments.

²All cytokines are given in pg/ml; measured by ELISA on supernatants from DBA/2 spleen cells cultured in 96 well plates at 2×10^7 cells/ml for 24 hr with the indicated ODN at 30 μ g/ml. Std. dev. of the triplicate wells was <7%. None of the ODN induced significant amounts of IL-5.

TABLE 14

Inhibition of CpG-induced cytokine secretion by ODN containing CpG-N motifs			
ODN sequence 5'-3'	IL-12 secretion ¹	CpG-S-induced IL-12 secretion ²	
none	268	5453	
1895 GCGCGCGCGCGCGCGCGCG (SEQ ID NO:76)	123	2719	
1896 CCGCGCGCGCGCGCGCGCG (SEQ ID NO:77)	292	2740	
1955 GCGCGCGCGCGCGCGCGCG (SEQ ID NO:75)	270	2539	
2037 TCCATGTCGTCCTCTGATGCT (SEQ ID NO:78)	423	2847	

¹BALE/c spleen cells were cultured in 96 well plates at 2×10^7 cells/ml with the indicated ODN for 24 hr and then the supernatants were assayed for IL-12 by ELISA (pg/ml).

²Cells were set up the same as in ¹ except that IL-12 secretion was induced by the addition of the CpG ODN 1619 (TCCATGTCGTCCTCTGATGCT) at 30 μ g/ml. The data shown are representative of 5 experiments.

添付資料 (C)

代表的なヒトmiRNA配列

>hsa-let-7a-1 MI0000060UGGGAUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUUAGGGUCACACCCACCACUGGGAGAUAAU
 UAUACAAUCUACUGUCUUUCCUA>hsa-let-7a-2 MI0000061AGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUUAGAAUUA
 CAUCAAGGGAGAUAAUCUGUACAGCCUCCUAGCUUCCU>hsa-let-7a-3 MI0000062GGGUGAGGUAGUAGGUUGU
 AUAGUUUUGGGGUCUGCCUGCUAUGGGAUAAUACAAUCUACUGUCUUUCCU>hsa-let-7b MI0000063CGGG
 GUGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUUUCAGGGCAGUGAUGUUGCCCCUCGGAAGAUAAUACAAUACUACUGCCUCCCCUG>
 hsa-let-7c MI0000064GCAUCCGGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUAGAGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUA
 CAACCUUCUACGUUCCUUGGAGC>hsa-let-7d MI0000065CCUAGGAAGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUUUUAGGG
 CAGGGAUUUUGCCCACAAGGAGGUAAUACUACGACCUGCUGCCUUCUAGG>hsa-let-7e MI0000066CCCCGGGC

UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUUGAGGAGGACACCCAAGGAGAUACACUAUACGGCCUCCUAGCUUUCCCCAGG>hsa-let-7f-1 MI0000067UCAGAGUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGUGGGGUAGUGAUUUUACCCUGUUCAGGAGAUAAACUAUACAAUCUAUUGCCUCCCCUGA>hsa-let-7f-2 MI0000068UGUGGGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUUUAGGGUCAUACCCCAUCUUGGAGAUAAACUAUACAGUCUACUGUCUUUCCCACG>hsa-let-7g MI0000433AGGCUGAGGUAGUAGUUUGUACAGUUUGAGGGUCUAUGAUACCACCCGGUACAGGAGAUAAACUGUACAGGCCACUGCCUUGCCA>hsa-let-7i MI0000434CUGGCUGAGGUAGUAGUUGUGUCUGUUGGUCGGGUUGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGAUAAACUGCGCAAGCUACUGCCUUGCUA>hsa-mir-1-1 MI0000651UGGGAAACAUAUCUUCUUUAUAUGCCCAUAUGGACCUGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAAGAGUAUGUAUCUCA>hsa-mir-1-2 MI0000437ACCUACUCAGAGUACAUACUUCUUUAUGUACCAUAUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAAGAGUAUGUAUUUUUGGUAGGC>hsa-mir-7-1 MI0000263UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUAGUAGUUUGUUGUUUUUAGAUAAACUAAACGACAACAAUACAGUCUGCCAUAUGGCACAGGCCAUGCCUCUACAG>hsa-mir-7-2 MI0000264CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCCAUCUGGAAGACUAGUAGUUUGUUGUUGUCUACUGCGCUCAACAACAAAUCCCAGUCUACCUAAUGGUGCCAGCCAUCGCA>hsa-mir-7-3 MI0000265AGAUUAGAGUGGCUGUGGUCUAGUGCUGUGUGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUCUGAUGUACUACGACAACAAGUCACAGCCGGCCUCAUAGCGCAGACUCCCUUCGAC>hsa-mir-9-1 MI0000466CGGGUUGGUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGGUGUGGAGUCUUCAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAAAAUAAACCCCA>hsa-mir-9-2 MI0000467GGAAGCGAGUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGUAUUGGUCUUCAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAAAAACUCCUUCU>hsa-mir-9-3 MI0000468GGAGGCCCGUUCUCUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGCCACAGAGCCGUCAUAAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAGAAAUGAUUCUCA>hsa-mir-10a MI0000266GAUCUGUCUGUCUUCUGUAUAUACCCUGUAGAUCCGAAUUGUGUAAGGAAUUGUGGUCACAAAUUCGUUUCUAGGGGAAUAUGUAGUUGACAUAAAACACUCCGCUCU>hsa-mir-10b MI0000267CCAGAGGUUGUAACGUUGUCUAUAUAUACCCUGUAGAACCAGAAUUGUGUGGUAUCCGUUAUGUCACAGAUUCGAUUCUAGGGGAAUAUAUGGUCGAUGCAAAACUUCU>hsa-mir-15a MI0000069CCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAUAGGUUUGUGGAUUUGUAAAAGGUGCAGGCCAUUUGUGCUGCCUCAAAAAUACAAGG>hsa-mir-15b MI0000438UUGAGGCCUUAAGUACUGUAGCAGCACAUAUGGUUUAUCAUGCUACAGUCAAGAUGCGAAUCAUAUUGCUGCUCUAGAAAUUUAGGAAAUUCAU>hsa-mir-16-1 MI0000070GUCAGCAGUGCCUUAAGCAGCAGCUAAAAUAUUGGCGUUAAGAUUCUAAAAUUAUCUCCAGUAUUAACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC>hsa-mir-16-2 MI0000115GUUCCACUCUAGCAGCAGCUAAAAUAUUGGCGUAGUGAAAAUAUAUUAUAAACACCAAUAUACUGUGCUGCUUAGUGUGAC>hsa-mir-17 MI0000071GUCAGAAUAAUGUCAAAAGUGCUACAGUGCAGGUAGUGAUUUGGCAUCUACUGCAGUGAAGGCACUUGUAGCAUUAUGGUGAC>hsa-mir-18a MI0000072UGUUCUAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAGUGAAGUAGAUUAGCAUCUACUGCCCUAAGUGCUCUUCUGGGCA>hsa-mir-18b MI0001518UGUGUUAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAUGUGAAGCAGCUUAGAAUUCUACUGCCCUAAAUGCCCUUCUGGCA>hsa-mir-19a MI0000073GCAGUCCUCUGUUGAUUUUGCAUAGUUGCACUACAAGAAGAAUGUAGUUGUGCAAAUUCUAGCAAAACUGAUUGGUGGCCUGC>hsa-mir-19b-1 MI0000074CACUGUUCUAGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGCUGUGUGAUUUCUGCUGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGACUGUGGUAGUG>hsa-mir-19b-2 MI0000075ACAUUGCUACUUAACAAUAGUUUUGCAGGUUUGCAUUCAGCGUAUAUAUGUAUAUGUGGCUGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGAUUUGUGAUAAUGU>hsa-mir-20a MI0000076GUAGCACUAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAGUUGUUAUCUACUGCAUUAUGAGCACUUAAGUACUGC>hsa-mir-20b MI0001519AGUACCAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAGUUUGGCAUGACUCUACUGUAGUAUUGGCACUUCAGUACU>hsa-mir-21 MI0000077UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA>hsa-mir-22 MI0000078GGCUGAGCCGCAGUAGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUAUGUCCUGACCCAGCUAAAGCUGCCAGUUGAAGAACUGUUGCCUCUGCC>hsa-mir-23a MI0000079GGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUGGGAUUUGCUUCCUGUCACAAAUCACAUUGCCAGGGAUUUCCAACCGACC>hsa-mir-23b MI0000439CUCAGGUGCUCUGGCUGCUUGGUUCCUGGCAUGCUGAUUUGUGACUUAAGAUUAAAAUCACAUUGCCAGGGAUUACCACGCAACCACGACCUUGGC>hsa-mir-23c MI0016010AGUGACUUCUCCAGGUGUCACACAGUGAGUGGCAUAAUCAGAGUACAAUUGAGUCAUGCCCAUAUCAUCAUUUGCCAGUGAUUACCCAAAGGAAAGUGACG>hsa-mir-24-1 MI0000080CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUCAGUUCUACUACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGAG>hsa-mir-24-2 MI0000081CUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAACACAGUUGGUUUGUGUACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGG>hsa-mir-25 MI0000082GGCCAGUGUUGAGAGGGGAGACUUGGGCAAUUGCUGGACGCGUGCCUGGGCAUUGCACUUGUCUCGGUCUGACAGUGCCGGCC>hsa-mir-26a-1 MI0000083GUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCUGUGCAGGUCCCAAUGGCCUUAUUCUUGGUUACUUGCACGGGGACGC>hsa-mir-26a-2 MI0000750GGCUGUGGCUGGAUUAAGUAAUCCAGGAUAGGCUGUUCCAUCUGUGAGGCCUAUUCUUGAUUACUUGUUCUGGAGGCAGCU>hsa-mir-26b MI0000084C

CGGGACCCAGUUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUUGUGUGCUGUCCAGCCUGUUCUCCAUUACUUGGCUCGGGGACCGG>hsa-mir-27a MI0000085CUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCAGGGUCCACACCAAGUCGUGUUCACAGUGGCUAAGUUCGCCCCCAG>hsa-mir-27b MI0000440ACCUCUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAGUGAUUGGUUUCGCUUUGUUCACAGUGGCUAAGUUCUGCACCUGAAGAGAAGGUG>hsa-mir-28 MI0000086GGUCUUGCCCUCAAGGAGCUCACAGUCUAUUGAGUUACCUUUCUGACUUUCCACUAGAUGUGAGCUCCUGGAGGGCAGGCA CU>hsa-mir-29a MI0000087AUGACUGAUUUUUUGGUGUUCAGAGUCAAAUAAUUUUUCUAGCACCAUCUGAAA UCGGUUAU>hsa-mir-29b-1 MI0000105CUUCAGGAAGCUGGUUUCAUAUGGUGGUUUAGAUUUAAAUAGUGAUUG UCUAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUCUUGGGG>hsa-mir-29b-2 MI0000107CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUG GUGGCUUAGAUUUUCCAUCUUUGUAUCUAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUUAGGAG>hsa-mir-29c MI0000735 AUCUCUUACACAGGCUGACCGAUUUCUCCUGGUGUUCAGAGUCUGUUUUUGUCUAGCACCAUUUGAAAUCGGUUAUGAUG 10 UAGGGGA>hsa-mir-30a MI0000088GCGACUGUAAAACAUCCUCGACUGGAAGCUGUGAAGCCACAGAUGGGCUUU CAGUCGGAUGUUUGCAGCUGC>hsa-mir-30b MI0000441ACCAAGUUUCAGUUCUAGUAAAACAUCCUACACUCAGC UGUAAUACAUGGAUUGGCUGGGAGGUGGAUGUUUACUUCAGCUGACUUGGA>hsa-mir-30c-1 MI0000736ACCAU GCUGUAGUGUGUGUAAAACAUCCUACACUCUCAGCUGUGAGCUCUAGGUGGCUGGGAGAGGGUUGUUUACUCCUUCUGCCA UGGA>hsa-mir-30c-2 MI0000254AGAUACUGUAAAACAUCCUACACUCUCAGCUGUGGAAAGUAAAGAAAGCUGGGA GAAGGCUGUUUACUCUUUCU>hsa-mir-30d MI0000255GUUGUUGUAAAACAUCCCCGACUGGAAGCUGUAAAGACAC AGCUAAGCUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGCUAC>hsa-mir-30e MI0000749GGGCAGUCUUUGCUACUGUAAAACAU C UUGACUGGAAGCUGUAAAGGUGUUCAGAGGAGCUUUCAGUCGGAUGUUUACAGCGGCAGGCUGCCA>hsa-mir-31 MI 0000089GGAGAGGAGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGUUGAACUGGGAACCGUCUUAUGCCAACAUAUUGCCAUCUUUCC>h 20 sa-mir-32 MI0000090GGAGAUUUGCACAUUACUAAAGUUGCAUGUUGUCACGGCCUCAAUGCAAUUUAGUGUGUGU GAUAAUUUC>hsa-mir-33a MI0000091CUGUGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCUGGUGGUACCCAUGCAAU GUUUCACAGUGCAUCACAG>hsa-mir-33b MI0003646GCGGGCGGCCCGCGGUGCAUUGCUGUUGCAUUGCAGC UGUGUGAGGCGGGUGCAGUGCCUCGGCAGUGCAGCCCGGAGCCGGCCCCUGGCACCAC>hsa-mir-34a MI0000268 GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGGCAGUGUCUAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACU GCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUGGGGCC>hsa-mir-34b MI0000742GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAUAG CUGAUUGUACUGUGGUGGUUACAAUCACUAAUCUCCACUGCCAUCAAAAACAAGGCAC>hsa-mir-34c MI0000743AG UCUAGUUACUAGGCAGUGUAGUUGCUAAUAGUACCAAUCACUAAACCACACGGCCAGGUAAAAAGAUU>hsa-mir-92a-1 MI0000093CUUUCUACACAGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCUGUGUUUCUGUAUGGUAUUGCACUUGUCC CGGCCUGUUGAGUUUG>hsa-mir-92a-2 MI0000094UCAUCCUGGGUGGGGAUUUGUUGCAUUAUUGUGUUCU AUAUAAAGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUGGAAGA>hsa-mir-92b MI0003560CGGGCCCCGGGCGGGCGGGAGG 30 GACGGGACGCGGUGCAGUGUUGUUUUUCCCCGCCAAUAUUGCACUCGUCCCGGCCUCCGGCCCCCCCCGGCCC>hsa-mir-93 MI0000095CUGGGGGCUCCAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAGUGUGAUUACCAACCUACUGCUGAGCUAGCAC UUCCCGAGCCCCCG>hsa-mir-95 MI0000097AACACAGUGGGCACUCAAUAAAUGUCUGUUGAAUUGAAAUGCGU UACAUUACAACGGGUAAUUAUUGAGCACCCACUCUGUG>hsa-mir-96 MI0000098UGGCCGAUUUUGGCACUAGCAC AUUUUUGCUUGUGUCUCUCCGCUCUGAGCAAUCAUGUGCAGUGCCAAUAUGGGAAA>hsa-mir-98 MI0000100AGG AUUCUGCUCAUGCCAGGGUGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUUGGGGUAGGGAUUAUAGGCCCAAUAGAAGAUAAUUAU ACAACUUAUACUUAUUCUUGGUGUGUGGCAUUAU>hsa-mir-99a MI0000101CCCAUUGGCAUAAACCCGUAGA UCCGAUCUUGUGGUGAAGUGGACCGCACAAAGCUCGCUUCUUAUGGGUCUGUGUCAGUGUG>hsa-mir-99b MI000074 6GGCACCCACCCGUAGAACCGACCUUGCGGGGCCUUCGCCGCACACAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCGUGUC>hsa-mir- 40 100 MI0000102CCUGUUGCCACAAACCCGUAGAUCCGAACUUGUGGUAAUAGUCCGCACAAGCUUGUAUCUAUAGGUA UGUGUCUGUAGG>hsa-mir-101-1 MI0000103UGCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGAUGCUGUCUAUUCUAA AGGUACAGUACUGUGAUAAUCUGAAGGAUGGCA>hsa-mir-101-2 MI0000739ACUGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGG UACCGAUGCUGUAUAUCUGAAAAGGUACAGUACUGUAUAAUCUGAAGAAUGGUGGU>hsa-mir-103a-1 MI0000109 UACUGCCUCGCGCUUUCUUAUCAGUGCUGCCUUGUUGCAUUAUGGAUCAAGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGAAGGCAUUG>h sa-mir-103a-2 MI0000108UUGUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGCUGCCUUGUAGCAUUCAGGUCAAGCAGCAUUG UACAGGGCUAUGAAAAGAACCA>hsa-mir-103b-1 MI0007261UCAUAGCCCUGUACAAUGCUGCUUGAUCCAUAUG CAACAAGGCAGCACUGUAAAAGAGCCGA>hsa-mir-103b-2 MI0007262UCAUAGCCCUGUACAAUGCUGCUUGAC CUGAAUGCUACAAGGCAGCACUGUAAAAGAGCUGA>hsa-mir-105-1 MI0000111UGUGCAUCGUGGUCAAAUGCU CAGACUCCUGUGGUGGCUGCUAUGCACCACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUACGGUGUCUA>hsa-mir-105-2 MI000 0112UGUGCAUCGUGGUCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGUGGCUGCUUAUGCACCACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUAUGGU 50

GUCUA>hsa-mir-106a MI0000113CCUUGGCCAUGUAAAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGCUUUUUGAGAUCUACUG
CAAUGUAAGCACUUCUACAUUACCAUGG>hsa-mir-106b MI0000734CCUGCCGGGGCUAAAGUGCUGACAGUGC
AGAUAGUGGUCCUCUCCGUGCUACCGCACUGUGGGUACUUGCUGCUCCAGCAGG>hsa-mir-107 MI0000114CUCU
CUGCUUUCAGCUUUCUACAGUGUUGCCUUGUGGCAUGGAGUUCAAAGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCAAAGCACAGA>hs
a-mir-122 MI0000442CCUUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUAGGUGUUUGUGUCUAAACUAUCAAACGCCAUUUA
CACACUAAAUAGCUACUGCUAGGC>hsa-mir-124-1 MI0000443AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUU
GAUUUAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAAUGGGGCG>hsa-mir-124-2 MI0000444AUC
AAGAUUAGAGGCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAUGUCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA
GAGCGGAGCCUACGGCUGCACUUGAA>hsa-mir-124-3 MI0000445UGAGGGCCCCUCUGCGUGUUCACAGCGGAC
CUUGAUUUAAUGUCUAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAGAGGCGCCUCC>hsa-mir-125a MI0000469
UGCCAGUCUCUAGGUCCUGAGACCCUUUAACCUUGUGAGGACAUCAGGGUCACAGGUGAGGUUCUUGGAGCCUGGCGU
CUGGCC>hsa-mir-125b-1 MI0000446UGCGCUCUCUCAGUCCUGAGACCCUAACUUGUGAUGUUUACCGUUUA
AAUCCACGGGUUAGGCUCUUGGAGCUGCGAGUCGUGCU>hsa-mir-125b-2 MI0000470ACCAGACUUUCCUAG
UCCUGAGACCCUAACUUGUGAGGUUUUAGUAACAUCACAAGUCAGGCUCUUGGGACCUAGGCGGAGGGGA>hsa-mi
r-126 MI0000471CGCUGGCGACGGGACAUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACUUCAAACUCGUACCGUGAGUA
AUAUUGCGCCGUCCACGGGA>hsa-mir-127 MI0000472UGUGAUCACUGUCUCCAGCCUGCUGAAGCUCAGAGGGC
UCUGAUUCAGAAAGAUCAUCGGAUCCGUCUGAGCUUGGC
UGGUCGGAAGUCUCAUCAUC>hsa-mir-128-1 MI0000447UGAGCUGUUGGAUUCGGGGCCGUAGCACUGUCUGAG
AGGUUUACAUUUCACACAGUGAACCGGUCUCUUUUUACGUCGCUUC>hsa-mir-128-2 MI0000727UGUGCAGUGG
GAAGGGGGCCGAUACACUGUACGAGAGUGAGUAGCAGGUCUCACAGUGAACCGGUCUCUUUCCCUACUGUGUC>hsa-m
ir-129-1 MI0000252GGAUCUUUUUGCGGUCUGGGCUUGCUGUCCUCUCAACAGUAGUCAGGAAGCCCUUACCCCA
AAAAGUAUCU>hsa-mir-129-2 MI0000473UGCCCUUCGCGAAUCUUUUUGCGGUCUGGGCUUGCUGUACAUAACU
CAAUAGCCGGAAGCCCUUACCCCAAAAAGCAUUUGCGGAGGGCG>hsa-mir-130a MI0000448UGCUGCUGGCCAG
AGCUCUUUUCACAUUGUGCUACUGUCUGCACCUGUCACUAGCAGUGCAAUGUAAAAAGGCAUUGGCCGUGUAGUG>hsa
-mir-130b MI0000748GGCCUGCCCGACACUCUUUCCCUUGUUGCACUACUUAUAGGCCGUGGGAAAGCAGUGCAAUGA
UGAAAGGGCAUCGGUCAGGUC>hsa-mir-132 MI0000449CCGCCCCCGCGUCUCCAGGGCAACCGUGGCUUUCGAU
UGUUACUGUGGGAACUGGAGGUAAACAGUCUACAGCCAUGGUCGCCCCGAGCACGCCCACGCGC>hsa-mir-133a-1
MI0000450ACAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUUGGAACCAAAUCGCCUCUUCAAUGGAUUUGGUCCCCUUCACCCAG
CUGUAGCUAUGCAUUGA>hsa-mir-133a-2 MI0000451GGGAGCCAAUUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUUGGAAC
CAAUUGGACUGUCCAAUGGAUUUGGUCCCCUUCACACAGCUGUAGCUGUGCAUUGAUGGCGCCG>hsa-mir-133b MI
0000822CCUCAGAAGAAAGAUCCCCCUGCUCUGGCUGGUCAAACGGAACCAAGUCCGUCUCCUGAGAGGUUUGGUCC
CCUUCACACAGCUACAGCAGGGCUGGCAAUGCCAGUCCUUGGAGA>hsa-mir-134 MI0000474CAGGGUGUGUGA
CUGGUUGACCAGAGGGGCAUGCACUGUGUACCCUGUGGGCCACCUAGUCACCAACCCUC>hsa-mir-135a-1 MI0
000452AGGCCUCGCGUGUUCUUAUGGCUUUUUAUCCUUAUGGAUUCUACUGCUCACUUAUAGGGAUUGGAGCCGUG
GCGCACGGCGGGGACA>hsa-mir-135a-2 MI0000453AGAUAAAUUCACUCUAGUGCUUUUAUGGCUUUUUAUCCU
AUGUGAUAGUAAUAAAAGUCUCAUGUAGGGAUGGAAGCCAUGAAUACAUUGUGAAAAUCA>hsa-mir-135b MI000
0810CACUCUGCUGUGGCCUAUGGCUUUUCAUCCUUAUGUGAUUGCUGUCCCAACUCAUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGG
CUACAGUGAGGGGCGAGCUCC>hsa-mir-136 MI0000475UGAGCCUCGGAGGACUCCAUUUGUUUGAUGAUGGA
UUCUUAUGCUCAUCAUCGUCUCAAUAGAGUCUUCAGAGGGUUCU>hsa-mir-137 MI0000454GGUCCUCUGACUC
UCUUCGGUGACGGGUAAUUCUUGGGUGGAUAAUACGGAUACGUUGUUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAGUCGAGGAGAGUA
CCAGCGGCA>hsa-mir-138-1 MI0000476CCCUUGCAUGGUGUGGUGGGGACGUCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGUU
GCCAAUCAGAGAACGGGCUACUUCACAACACCGAGGGCCACACCACACUACAGG>hsa-mir-138-2 MI0000455CGUU
GCUGCAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGACGAGCAGCGCAUCCUUAACCCGGCUAUUUCACGACACCAGGGUUGCAUCA
>hsa-mir-139 MI0000261GUGUAUUCUACAGUGCACGUGUCUCCAGUGUGGCUCGGAGGCUGGAGACGCGGCCCUUG
UUGGAGUAAC>hsa-mir-140 MI0000456UGUGUCUCUCUCUGUGUCCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUA
CGUCAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCACGGACAGGAUACCGGGGACCC>hsa-mir-141 MI0000457CGGCCG
GCCUUGGUUCCAUUCUCCAGUACAGUGUUGGAUGGUCUAAUUGUGAAGCUCCUAAACACUGUCUGGUAAAAGAUAGGCUCCCG
GGUGGGUUC>hsa-mir-142 MI0000458GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAAAGCACUACUAAACAGCACUGGAG
GGUGUAGUGUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGUACUGUG>hsa-mir-143 MI0000459GCGCAGCGCCCUUGUCUCCCA
GCCUGAGGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGGAAGAGAGAAGUUGUUC

UGCAGC>hsa-mir-144 MI0000460UGGGGCCUGGCUGGGAUAUCAUCAUAUACUGUAAGUUUGCGAUGAGACACU
ACAGUAUAGAUGAUGUACUAGUCCGGGGACCCCC>hsa-mir-145 MI0000461CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUU
UCCAGGAAUCCCUUAGAUGCUAAGAUGGGGAUUCUGGAAUACUGUUCUUGAGGUCUAGGU>hsa-mir-146a MI
0000477CCGAUGUGUAUCCUCAGCUUUGAGAACUGAAUCCAUGGGUUGUGUCAGUGUCAGACCUCUGAAAUUCAGUUC
UUCAGCUGGGGAUAUCUCUGUCAUCGU>hsa-mir-146b MI0003129CCUGGCACUGAGAACUGAAUCCAUAAGGCUG
UGAGCUCUAGCAAUGCCUGUGGACUCAGUUCUGGUGCCCG>hsa-mir-147a MI0000262AAUCUAAAACAACA
UUUCUGCACACACACCAGACUAUGGAAGCCAGUGUGUGGAAUAGCUUCUGCUAGAUAU>hsa-mir-147b MI0005544
UAUAAUUCUAGUGGAAACAUAUUCUGCACAAACUAGAUAUCUGGACACCAGUGUGCGGAAUAGCUUCUGCUACAUAUUUAGG
>hsa-mir-148a MI0000253GAGGCAAAGUUCUGAGACACUCCGACUCUGAGUAUGAUAAGUCAGUGCACUACAG
AACUUUGUCUC>hsa-mir-148b MI0000811CAAGCACGAUAGCAUUGAGGUGAAGUUCUGUUAUACACUCAGGC
UGUGGCUCUCUGAAAGUCAGUGCAUCACAGAACUUUGUCUCGAAAGCUUUCUA>hsa-mir-149 MI0000478GCCGG
CGCCCGAGCUCUGGCUCGGUGUCUUCACUCCCGUGCUUGUCCGAGGAGGGAGGGAGGGACGGGGGCUGUGCUGGGGCAGC
UGGA>hsa-mir-150 MI0000479CUCCCCAUGGCCUGUCUCCCAACCCUUGUACCAGUGCUGGGCUCAGACCCUGG
UACAGGCCUGGGGACAGGGACCUGGGGAC>hsa-mir-151a MI0000809UUUCCUGCCCUCGAGGAGCUCACAGUC
UAGUAUGUCUCAUCCCCUACUAGACUGAAGCUCCUUGAGGACAGGGAUGGUAUACUACCUC>hsa-mir-151b MI0
003772ACCUCUGAUGUGUCAGUCUCUCUUCAGGGCUCGAGACACAGAAACAGACACCUGCCCUCGAGGAGCUCACAG
UCUAGACAAAACAAACCCAGGGU>hsa-mir-152 MI0000462UGUCCCCCGGCCAGGUUCUGUGAUACACUCCGA
CUCGGGCUCUGGAGCAGUCAGUGCAUGACAGAACUUGGGCCCGAAGGACC>hsa-mir-153-1 MI0000463CUCAC
AGCUGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUCUGCAGCUAGUAUUCUACUCCAGUUGCAUAGUCACAAAAGUGAUAUUGGCAGGU
GUGGC>hsa-mir-153-2 MI0000464AGCGGUGGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUGUUGCAGCUAGUAAUAUGAGCCCA
GUUGCAUAGUCACAAAAGUGAUAUUGGAAACUGUG>hsa-mir-154 MI0000480GUGGUACUUGAAGAUAGGUUAU
CCGUGUUGCCUUCGCUUUAUUUGUGACGAAUCAUACCGGUUGACCUAUUUUUCAGUACCAA>hsa-mir-155 MI000
0681CUGUUAUUGCUAAUUCGUGAUAGGGGUUUUUGCCUCCAACUGACUCCUACAUAUUAAGCAUUAACAG>hsa-mir-18
1a-1 MI0000289UGAGUUUUGAGGUUGCUUCAGUGAACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUUGGAAUUAUAAUCAAACCC
AUCGACCGUUGAUUGUACCCUAUUGGCUAACCAUCAUCUACUCCA>hsa-mir-181a-2 MI0000269AGAAGGGCUAU
CAGGCCAGCCUUCAGAGGACUCCAAGGAACAUAUCAAACGCUGUCGGUGAGUUUGGAAUUAUAAAAACCACUGACCGUUGA
CUGUACCUUGGGGUCCUUA>hsa-mir-181b-1 MI0000270CCUGUGCAGAGAUUAUUUUUAAAGGUCACAAUCA
ACAUAUUAUUGCUGUCGGUGGGUUGAACUGUGUGGACAAGCUCACUGAACAAUGAAUGCAACUGUGGCCCCCGCU>hsa-m
ir-181b-2 MI0000683CUGAUGGCUGCACUCAACAUAUUAUUGCUGUCGGUGGGUUGAGUCUGAAUCAACUCACUGA
UCAUUGAAUGCAAACUGCGGACCAACA>hsa-mir-181c MI0000271CGGAAAAUUUGCCAAGGGUUUGGGGGAAC
AUUCAACCUUGUCGGUGAGUUUGGCAGCUCAGGCAAACCAUCGACCGUUGAGUGGACCCUGAGGCCUGGAAUUGCCAUC
U>hsa-mir-181d MI0003139GUCCCCUCCCCUAGGCCACAGCCGAGGUCACAAUACAUAUUGUUGUCGGUGG
GUUGUGAGGACUGAGGCCAGACCCACCGGGGAUGAAUGUCACUGUGGCUGGGCCAGACACGGCUUAAGGGGAAUUGGGGA
C>hsa-mir-182 MI0000272GAGCUGCUUGCCUCCCCCGUUUUUGGCAAUGGUAGAACUCACACUGGUGAGGUAAC
AGGAUCCGGUGGUUCUAGACUUGCCAACUAUGGGGCGAGGACUCAGCCGGCAC>hsa-mir-183 MI0000273CCGCA
GAGUGUGACUCCUGUUCUGUGUAUGGCACUGGUAGAAUUCACUGUGAACAGUCUCAGUCAGUGAAUUAACGAAGGGCCA
AAACAGAGCAGAGACAGAUCCACGA>hsa-mir-184 MI0000481CCAGUCACGUCCCCUUAUCACUUUUCAGCCCCA
GCUUUGUGACUGUAAGUGUUGGACGGAGAACUGAUAAGGGUAGGUGAUUGA>hsa-mir-185 MI0000482AGGGGGC
GAGGGAUUGGAGAGAAAAGGAGUUCUGAUGGUCCCCUCCCCAGGGGCGUGGCUUUCUUGGUCCUCCCUCCCA>hsa-
mir-186 MI0000483UGCUUGUAACUUUCCAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCUUUCUGGUUUUAUUUUAAGCCCAAAGGU
GAAUUUUUGGGAAGUUUGAGCU>hsa-mir-187 MI0000274GGUCGGGCUCACCAUGACACAGUGUGAGACCUCGG
GCUACAACACAGGACCCGGGCGCUGCUCUGACCCUCUGUGUCUUGUGUUGCAGCCGAGGGACGCAGGUCCGCA>hsa-m
ir-188 MI0000484UGCUCUCCUCUCACAUCCUUGCAUGGUGGAGGGUGAGCUUUCUGAAAACCCUCCCAUUGC
AGGGUUUGCAGGAUGGCGAGCC>hsa-mir-190a MI0000486UGCAGGCCUCUGUGUGAUAUGUUUGAUAUAUAGG
UUGUUAUUUAAUCCAACUAUAUAUCAAACAUAUCCUACAGUGUCUUGCC>hsa-mir-190b MI0005545UGCUUCU
GUGUGAUAUGUUUGAUAUUGGGUUGUUAAUUAAGGAACCAACUAAAUGUCAAAACAUAUUCUACAGCAGCAG>hsa-mir
-191 MI0000465CGGCUGGACAGCGGGCAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUUGUUCUCCAGAGCAUUCAGCUGCGCUU
GGAUUUCGUCCCCUGCUCUCCUGCCU>hsa-mir-192 MI0000234GCCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAU
GAAUUGACAGCCAGUGCUCUGCUCUCCUCCUGGCUGCCAAUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUCGCCUCAUUGCCAGC>h
sa-mir-193a MI0000487CGAGGAUGGGAGCUGAGGGCUGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGAGGGUGUCGGAUCAACUG

GCCUACAAAGUCCCAGUUCUCGGCCCCCG>hsa-mir-193b MI0003137GUGGUCUCAGAAUCGGGGUUUUGAGGGC
GAGAUAGAUUUUAGUUUUUUAUCCAACUGGCCCUCAAAGUCCCUCUUUUGGGGUCAU>hsa-mir-194-1 MI0000488A
UGGUGUUAUCAAGUGUAACAGCAACUCCAUGUGGACUGUGUACCAAUUCCAGUGGAGAUUCUGUUACUUUUGAUGGUUA
CCAA>hsa-mir-194-2 MI0000732UGGUUCCCCGCCCCCUGUAAACAGCAACUCCAUGUGGAAGUGCCCACUGGUUCC
AGUGGGGCGUCUGUUUUCUGGGGCGAGGGCCAG>hsa-mir-195 MI0000489AGCUUCCCUGGCUCUAGCAGCACAG
AAUUAUUGGCACAGGGAAGCGAGUCUGCCAAUAUUGGCUGUGCUCUCCAGGCAGGGUGGUG>hsa-mir-196a-1 MI
0000238GUGAAUAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUGGGUUUCUGAACACAACAACAUUAAACCACCCGAUUCAC>hs
a-mir-196a-2 MI0000279UGCUCGCUCAGCUGAUCUGUGGCUUAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGGAUUGAGUUUUGA
ACUCGGCAACAAGAAACUGCCUGAGUUACAUCAGUCGGUUUUCGUCGAGGGC>hsa-mir-196b MI0001150ACUGG
UCGGUGAUUUUAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGGAUCCACCUUUCUCGACAGCACGACACUGCCUUCAUUACUUCAGUUG>
hsa-mir-197 MI0000239GGCUGUGCCGGGUAGAGAGGGCAGUGGGAGGUAAGAGCUCUUCACCCUUCACCACCUUC
UCCACCCAGCAUGGCC>hsa-mir-198 MI0000240UCAUUGGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUCCUGUGAUUUUCCU
CUUCUCUAUAGAAUAAUUGA>hsa-mir-199a-1 MI0000242GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGAGGC
UCUCAUUGUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGGC>hsa-mir-199a-2 MI0000281AGGAAGCUUCUGGAGAUCC
UGCUCGGUCGCCCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGACAAUGCCGUUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGACUGGGC
AAGGGAGAGCA>hsa-mir-199b MI0000282CCAGAGGACACCUCACUCCGUCUACCCAGUGUUUAGACUUAUCUGU
UCAGGACUCCCAAUUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGGCUGGGCUGGGUAGACCCUCGG>hsa-mir-200a MI
0000737CCGGGCCCCUGUGAGCAUCUUAACCGACAGUGCUGGAUUUCCAGCUUAGACUCUAAACACUGUCUGGUAAACGAU
GUUCAAAGGUGACCCGC>hsa-mir-200b MI0000342CCAGCUCGGGCAGCCGUGGCCAUUUACUGGGCAGCAUUG
GAUGGAGUCAGGUCUCUAAUACUGCCUGGUAUUGAUGACGGCGGAGCCUCGACG>hsa-mir-200c MI0000650CC
CUCGUCUUAACCCAGCAGUGUUUGGGUGCGGUUGGGAGUCUCUAAUACUGCCGGUAAUGAUGGAGG>hsa-mir-202 M
I0003130CGCCUCAGAGCCGCCCGCCGUUCCUUUUUCCUAUGCAUUAUCUUCUUGAGGAUCUGGCCUAAAGAGGUUA
GGGAUGGGGAAACGGGGCGGUCGGGUCCUCCCCAGCG>hsa-mir-203 MI0000283GUGUUGGGGACUCGCGCGCU
GGGUCCAGUGGUUCUUAACAGUUAACAGUUCUGUAGCGCAAUUGUGAAAUGUUUAGGACCACUAGACCCGGCGGGCGCG
GCGACAGCGA>hsa-mir-204 MI0000284GGCUACAGUCUUUCUUAUGUGACUCGUGGACUUCUUUUGUCAUCCU
AUGCCUGAGAAUUAUGAAGGAGGCUGGGAAAGGCAAAGGGACGUCAAUUGUCAUCACUGGC>hsa-mir-205 MI000
0285AAAGAUCUCAGACAAUCCAUGUGCUUCUCUUGUCCUUAUUCACCCGAGUCUGUCUUAUACCAACCCAGAUUUC
AGUGGAGUGAAGUUCAGGAGGCAUGGAGCUGACA>hsa-mir-206 MI0000490UGCUCUCCCGAGGCCACAUGCUCU
UUUAUACCCCAUAUGGAUUAUCUUGCUAUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGGUUUCGGCAAGUG>hsa-mir-208a MI00
00251UGACGGGCGAGCUUUUUGGCCCGGUUAUACCUGAUGCUCACGUUAUAGACGAGCAAAAAGCUUGUUGGUCA>hsa
-mir-208b MI0005570CCUCUCAGGGAAGCUUUUUGCUCGAAUUAUGUUCUGAUCCGAAUUAAGACGAACAAAAG
GUUUGUCUGAGGGCAG>hsa-mir-210 MI0000286ACCCGGCAGUGCCUCCAGGCGCAGGGCAGCCCCUGCCACCG
CACACUGCGCUGCCCCAGACCACUGUGCGUGUGACAGCGGCUGAUCUGUGCCUGGGCAGCGCAGCCC>hsa-mir-211
MI0000287UACCCUGGCCAUUGUGACUUGUGGGCUUCCCUUUGUCAUCCUUCGCCUAGGGCUCUGAGCAGGGCAGGGAC
AGCAAAGGGGUGCUCAGUUGUCACUUCCACAGCAGGAG>hsa-mir-212 MI0000288CGGGGCACCCCGCCCGGA
CAGCGCGCCGGCACCUCUGGCUCUAGACUCUUAUCGCCCCGGCCGCCUCAGUAAACAGUCUCCAGUCACGGCCACCGACG
CCUGGCCCGCC>hsa-mir-214 MI0000290GGCCUGGCUGGACAGAGUUGUCAUGUGUCUGCCUGUCUACACUUGC
UGUGCAGAAAUCCGCUCACCUGUACAGCAGGCACAGACAGGCAGUCACAUGACAACCCAGCCU>hsa-mir-215 MI0
000291AUCAUUCAGAAAUGGUUAUACAGGAAAAUGACCUAUGAAUUGACAGACAAUUAAGCUGAGUUUGUCUGCAUUUC
UUUAGGCCAAUUAUCUGUAUGACUGUGCUACUCAA>hsa-mir-216a MI0000292GAUGGCUGUGAGUUGGCUUAA
UCUCAGCUGGCAACUGUGAGAUUGUUAUCAAUCCCUACAGUGGUCUCUGGGAUUAUGCUAAACAGAGCAAUUUCCUAG
CCCUCACGA>hsa-mir-216b MI0005569GCAGACUGGAAAAUCUCUGCAGGCAAAU
GUGAUGUCACUGAGGAAUACACACAUUACCCGUAGAGAUUCUACAGUCUGACA>hsa-mir-217 MI0000293AGUA
UAAUUAUUAUAGUUUUUGAUGUCGCGAGAUACUGCAUCAGGAACUGAUUGGAUAAAGAAUACAGUACCAUCAGUCCUAA
UGCAUUGCCUUCAGCAUCUAAACAAG>hsa-mir-218-1 MI0000294GUGAUAAUGUAGCGAGAUUUUCUGUUGGC
UUGAUCUAAACAUUGGUUGCGAGGUUAUGAGUAAAACAUGGUUCCGUCAAGCACAUGGAACGUCACGCAGCUUUCUACA
>hsa-mir-218-2 MI0000295GACCAGUCGCGUGCGGGGCUUCCUUUGUGCUUGAUCUAAACAUUGUGGUGGAACGAU
GGAAACGGAACAUUGGUUCUGUCAAAGCACCGCGGAAAGCACCGUGCUCUCCUGCA>hsa-mir-219-1 MI0000296CC
GCCCCGGGCGCGGCUCCUGAUUUGUCCAAACGCAAUUCUGAGUCUAUGGCUCGCGGAGAGUUGAGUCUGGACGUCCC
GAGCCGCCGCCCCCAAACCUCGAGCGGG>hsa-mir-219-2 MI0000740ACUCAGGGGCUUCGCCACUGAUUGUCCA

AACGCAAUUCUUGUACGAGUCUGCGGCCAACCGAGAAUUGUGGCUGGACAUCUGUGGCUGAGCUCGCGG>hsa-mir-22
1 MI0000298UGAACAUCCAGGUCUGGGGCAUGAACCGUGGCAUACAAUGUAGAUUUCUGUGUUCGUUAGGCAACAGCUA
CAUUGUCUGCUGGGUUUCAGGGCUACCGUGAAACAUGUUCUC>hsa-mir-222 MI0000299GCUCUGGAAGGUGUAG
GUACCCUCAAUUGGCUCAGUAGCCAGUGUAGAUCUGUCUUUCGUAAUACAGCAGCUACAUCUGGCUCACUGGGUCUCUGAUG
GCAUCUUCUAGCU>hsa-mir-223 MI0000300CCUGGCCUCCUGCAGUGCCACGCUCCGUGUAUUUGACAAGCUGAG
UUGGACACUCCAUGUGGUAGAGUGUCAGUUUGUCAAAUACCCCAAGUGCGGCACAUGC UUACCAG>hsa-mir-224 MI
0000301GGGCUUUCAGUCACUAGUGGUUCCGUUUAGUAGAUGAUUGUGCAUUGUUUCAAUUGGUGCCCUAGUGACUA
CAAAGCCC>hsa-mir-296 MI0000747AGGACCCUUCAGAGGGCCCCCCCCUCAAUCCUGUUGGCCUAAUUCAGAG
GGUUGGGUGGAGGCUCUCCUGAAGGGCUCU>hsa-mir-297 MI0005775UGUAUGUAUGUGUGCAUGUGCAUGUAUG
UGUAUAUACAUAUAUAUGUAUUAUGUACUAUAUAUCA>hsa-mir-298 MI0005523UCAGGUCUUCAGCAGAAGCA
GGGAGGUUCUCCAGUGGUUUUCCUUGACUGUGAGGAACUAGCCUGCUGCUUUGCUCAGGAGUGAGCU>hsa-mir-299
10 MI0000744AAGAAUUGGUUACCGUCCCAUAUACAUUUGAAUAUGUAUGUGGGAUGGUAAACCGCUUCUU>hsa-mi
r-300 MI0005525UGCUACUUGAAGAGAGGUAAUCCUUCACGCAUUGUUCUUAUUGCAAUGAUUAUACAAGGGCAGA
CUCUCUCUGGGGAGCAAA>hsa-mir-301a MI0000745ACUGCUAACGAAUGCUCUGACUUUAUUGCACUACUGUAC
UUUACAGCUAGCAGUGCAAUAGUAUUGUCAAAAGCAUCUGAAAGCAGG>hsa-mir-301b MI0005568GCCGAGGUG
CUCUGACGAGGUUGCACUACUGUGCUCUGAGAAGCAGUGCAAUGAUUUGUCAAAAGCAUCUGGGACCA>hsa-mir-302
a MI0000738CCACCACUAAAACGUGGAUGUACUUGCUUUGAAACUAAAGAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGAUGG
>hsa-mir-302b MI0000772GCUCCCUUCAAUUAACAUGGAAGUGCUUUCUGUGACUUUAAAAGUAAGUGCUUCC
AUGUUUUAGUAGGAGU>hsa-mir-302c MI0000773CCUUGCUUUAACAUGGGGGUACCUGCUGUGUGAAACAAAA
20 GUAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGGAGG>hsa-mir-302d MI0000774CCUCUACUUUAACAUGGAGGCACUUGCUGU
GACAUGACAAAAUAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGUGG>hsa-mir-302e MI0006417UUGGGUAAGUGCUUCCAUG
CUUCAGUUUCCUACUGGUAAGAUGGAUGUAGUAAUAGCACCUCUUAUAGA>hsa-mir-302f MI0006418UCUG
UGUAAACCGUGCAAUUUUCACUUAUUGCUUCCAUGUUUAUAAAAGA>hsa-mir-320a MI0000542GCUUCGCUC
CCUCCGCCUUCUCUUCUCCGGUUCUUCUCCGGAGUCGGGAAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUGAGGU>hsa-mir
-320b-1 MI0003776AAUUAUCCUUCUUCUAGUUCUCCUAGAGUGAGGAAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAAAACA
AAUUAACUAAUUAUU>hsa-mir-320b-2 MI0003839UGUUAUUUUUGUCUUCUACCUAAGAAUUCUGUCUCUUA
GGCUUUCUCUUCUCCAGAUUUCUCCAAAGUUGGGAAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAAAAGGAAAAAAGAAUUCUGUCUCU
GACAUAAUAGAUAGGGAA>hsa-mir-320c-1 MI0003778UUUGCAUUAUAAAUGAGGCCUUCUCUUCUCCAGUUCU
UCCAGAGUCAGGAAAAAGCUGGGUUGAGAGGGUAGAAAAAUAUGAUGUAGG>hsa-mir-320c-2 MI0008191CUU
CUCUUUCCAGUUCUUCUCCAGAAUUGGGAAAAAGCUGGGUUGAGAGGGU>hsa-mir-320d-1 MI0008190UUCUCGUC
30 CCAGUUCUUCUCCAAAGUUGAGAAAAAGCUGGGUUGAGAGGA>hsa-mir-320d-2 MI0008192UUCUCUUCUCCAGUUC
UUCUUGGAGUCAGGAAAAAGCUGGGUUGAGAGGA>hsa-mir-320e MI0014234GCCUUCUCUUCUCCAGUUCUUCUG
GAGUCGGGAAAAAGCUGGGUUGAGAAGGU>hsa-mir-323a MI0000807UUGGUACUUGGAGAGAGGUGGUCCGUGG
CGCGUUCGUUUUAUUUAUGGCGCACAUUACCGGUCGACCUCUUGCAGUAUCUAAUC>hsa-mir-323b MI001420
6UGGUACUCGGAGGGAGGUUGUCCGUGGUGAGUUCGCAUUAUUUAUGAUGCCCAAUACACGGUCGACCUCUUUUCGGUA
UCA>hsa-mir-324 MI0000813CUGACUAUGCCUCCCCGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGUAAAGCUGGAGACCCACU
GCCCCAGGUGCUGCUGGGGGUUGUAGUC>hsa-mir-325 MI0000824AUACAGUGCUUGGUUCCUAGUAGGUGUCCA
GUAAGUGUUUGUACAUAAUUGUUUAUUGAGGACCUCUUAUCAAUACAGCACUGUGCUAGGCUCUGG>hsa-mir-326
MI0000808CUCAUCUGUCUGUUGGGCUGGAGGCAGGGCCUUGUGAAGGCGGGUGGUCUCAGAUCCGCUUGGGCCC
40 UUCUCCAGCCCCGAGGCGGAUUCA>hsa-mir-328 MI0000804UGGAGUGGGGGGCGAGGAGGGGCUCAGGGAGAA
AGUGCAUACAGCCCCUGGCCUCUCUGCCUUCGUGCCCCUG>hsa-mir-329-1 MI0001725GGUACCUGAAGAGA
GGUUUUCUGGGUUUCUGUUUCUUAAUGAGGACGAAACACACCUGGUUAACCUCUUUUCAGUAUC>hsa-mir-329-2
MI0001726GUGGUACCUGAAGAGAGGUUUUCUGGGUUCUGUUUCUUUAUUGAGGACGAAACACACCUGGUUAACCUC
UUUUCAGUAUCA>hsa-mir-330 MI0000803CUUUGGCAUACUGCCUCUCUGGGCCUGUGUCUUAGGCUCUGC
AAGAUCACCGAGCAAAAGCACACGGCCUGCAGAGAGGCAGCGCUCUGCCC>hsa-mir-331 MI0000812GAGUUUGG
UUUUGUUUGGGUUUGUUCUAGGUAUGGUCCCAGGGAUCCAGAUCAAACCAGGCCCCUGGGCCUAUCCUAGAACCAACCU
AAGCUC>hsa-mir-335 MI0000816UGUUUUGAGCGGGGUGCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGUUUGUCAUAAACCGU
UUUUCAUUAUUGCUCCUGACCUCUCUUAUUGCUAUAUUA>hsa-mir-337 MI0000806GUAGUCAGUAGUUGGG
GGGUGGGAACGGCUCAUACAGGAGUUGAUGCACAGUUAUCCAGCUCUUAUUAUGAUGCCUUUCUUAUCCCCUCAA>hs
a-mir-338 MI0000814UCUCCAACAAUAUCCUGGUGCUGAGUGAUGACUCAGGCGACUCCAGCAUCAGUGAUUUUGU

UGAAGA>hsa-mir-339 MI0000815CGGGGCGGCCGCUCUCCUGUCCUCCAGGAGCUCACGUGGCCUGCCUGUGA
GCGCCUCGACGACAGAGCCGGCGCCUGCCCCAGUGUCUGCGC>hsa-mir-340 MI0000802UUGUACCUGGUGUGAU
UAUAAAAGCAAUGAGACUGAUUUGUCAUAUGUCGUUUUGUGGGAUCCGUCUCAGUUACUUUAUAGCCAUACCUGGUAUCUUA>
hsa-mir-342 MI0000805GAAACUGGGCUCAGGUGAGGGGUGCUAUCUGUGAUUUGAGGGACAUGGUUAAUUGGAAUU
GUCUCACACAGAAAUCGCACCCGUCACCUUGGCCUACUUA>hsa-mir-345 MI0000825ACCCAAACCCUAGGUCUG
CUGACUCCUAGUCCAGGGCUCGUGAUGGCUGGUGGGCCCGAACGAGGGGUCUGGAGGCCUGGGUUUUGAAUAUCGACAGC
>hsa-mir-346 MI0000826GGUCUCUGUGUUGGGCGUCUGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCUCUGUUGCUCUGAAGGA
GGCAGGGGUCUGGGCCUGCAGCUGCCUGGGCAGAGCGG>hsa-mir-361 MI0000760GGAGCUUAUCAGAAUCUCCAG
GGGUACUUUAUAAUUUCAAAGUCCCCCAGGUGUGAUUUCUGAUUUGCUUC>hsa-mir-362 MI0000762CUUGAAU
CCUUGGAACCUAGGUGUGAGUGCUAUUUCAGUGCAACACACCUAUUCAAGGAUUCAAA>hsa-mir-363 MI0000764 10
UGUUGUCGGGUGGAUCACGAUGCAAUUUUGAUGAGUAUCAUAGGAGAAAAAUUGCACGGUAUCCAUCUGUAAACC>hsa-
mir-365a MI0000767ACCGCAGGGAAAAUGAGGGACUUUUGGGGGCAGAUGUGUUCCAUCCACUAUCAUAAUGCC
CCUAAAAAUCCUUAUUGCUCUUGCA>hsa-mir-365b MI0000769AGAGUGUUAAGGACAGCAAGAAAAAUAGGGG
ACUUUCAGGGGCAGCUGUGUUUCUGACUCAGUCAUAAUGCCCCUAAAAAUCCUUAUUGUUCUUGCAGUGUGCAUCGGG>
hsa-mir-367 MI0000775CCAUUACUGUUGCUAAUAUGCAACUCUGUUGAAUAUAAAUUGGAAUUGCACUUUAGCAA
UGGUGAUGG>hsa-mir-369 MI0000777UUGAAGGGAGAUCCGACCGUGUUAUUAUUCGUUUUAUUGACUUCGAAUAAU
ACAUGGUUGAUUUUCUCAG>hsa-mir-370 MI0000778AGACAGAGAAGCCAGGUCACGUCUCUGCAGUUACACA
GCUCACGAGUGCCUGCUGGGGUGGAACCUUGGUCUGUCU>hsa-mir-371a MI0000779GUGGCACUCAAAACUGUGGG
GGCACUUUCUGCUCUCUGGUGAAAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGUUAAC>hsa-mir-371b MI0017393GGUAACACU
CAAAAAGAUUGCGGCACUUUCACCAGAGAGCAGAAAAGUGCCCCCACAGUUUGAGUGCC>hsa-mir-372 MI0000780G 20
UGGGCCUCAAAUGUGGAGCACUAUUCUGAUGUCCAAGUGGAAAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGUCAC>hsa-mir-373 M
I0000781GGGAUACUAAAAUGGGGGCGCUUCCUUUUUGUCUGUACUGGGAAGUGCUUCGAUUUUGGGGUGUCCC>hs
a-mir-374a MI0000782UACAUCGGCCAUAUAAUACAACCUGAUAAGUGUUAUAGCACUUAUCAGAUUGUAUUGUA
AUUGUCUGUGUA>hsa-mir-374b MI0005566ACUCGGAUGGAUAUAAUACAACCUGCUAAGUGUCCUAGCACUUAG
CAGGUUGUAUUAUCAUUGUCCGUGUCU>hsa-mir-374c MI0016684ACACGGACAAUGAUAAUACAACCUUCUAAG
UGCUAAGGACACUUAGCAGGUUGUAUUAUUAUCCAUCGAGU>hsa-mir-375 MI0000783CCCCGCGACGAGCCCCUC
GCACAAACCGGACCUGAGCGUUUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGAGGC>hsa-mir-376a-1 MI0000784UAAAAGGUA
GAUUCUCCUUCUAUGAGUACAUAUUAUUGAUUAAUCAUAGAGGAAAAUCCACGUUUUC>hsa-mir-376a-2 MI000
3529GGUAUUUAAAAGGUAGAUUUUCCUUCUAUGGUUACGUGUUUGAUGGUUAAUCAUAGAGGAAAAUCCACGUUUUCAG
UAUC>hsa-mir-376b MI0002466CAGUCCUUCUUUGGUUUUAAAACGUGGAUAUUCUUCUAUGUUUACGUGAUU 30
CCUGGUUAAUCAUAGAGGAAAAUCCAUGUUUCAGUAUCAAAGUCUG>hsa-mir-376c MI0000776AAAAGGUGGA
UAUUCUUCUAUGUUUAUGUUAUUAUUGGUUAAACAUAAGGAAAAUCCACGUUUU>hsa-mir-377 MI0000785UU
GAGCAGAGGUUGCCCUUGGUGAAUUCGCUUUAUUUAUGUUGAAUCACACAAAGGCAACUUUUGUUUG>hsa-mir-378a
MI0000786AGGGCUCCUGACUCCAGGUCCUGUGUGUUAACCUAGAAAUAAGCACUGGACUUGGAGUCAGAAGGCCU>hsa
-mir-378b MI0014154GGUCAUUGAGUCUUAAGGCUAGUGGAAAGAGCACUGGACUUGGAGGCAGAAAGACC>hsa
-mir-378c MI0015825GGAGGCCAUACUUGGACUUGGAGUCAGAAGAGUGGAGUCGGGUCAGACUUC AACUCUGACU
UUGAAGGUGGUGAGUGCCUC>hsa-mir-378d-1 MI0016749ACUGUUUCUGUCCUUGUUCUUGUUGUUAUUACUGG
ACUUGGAGUCAGAAACAGG>hsa-mir-378d-2 MI0003840GAAUGGUUACAAGGAGAGAACACUGGACUUGGAGUC
AGAAAACUUUCAUCCAAGUCAUUCUUGCUCUAAGUCCCAUUUCUGUCCAUGAGAUUGUUU>hsa-mir-378e MI00
16750CUGACUCCAGUGUCCAGGCCAGGGGCAGACAGUGGACAGAGAACAGUGCCCAAGACCACUGGACUUGGAGUCAGG 40
ACAU>hsa-mir-378f MI0016756GUCAGGUCCUGGACUCCCAUAGUUUCAGGCUGCUAAAACAACAGAACGAGCAC
UGGACUUGGAGCCAGAAGUCUUGGG>hsa-mir-378g MI0016761CACUGGGCUUGGAGUCAGAAGACCUGGCUCCA
GCCCAGCUC>hsa-mir-378h MI0016808ACAGGAACACUGGACUUGGUGUCAGAUGGGAUGAGCCUUGGCUCUGUU
UCCUAGCAGCAAUCUGAUCUUGAGCUAGUCACUGG>hsa-mir-378i MI0016902GGGAGCACUGGACUAGGAGUCA
GAAGGUGGAGUUCUGGGUGCUGUUUCCACUCUUGGGCCCUGGGCAUGUUCUG>hsa-mir-379 MI0000787AGAG
AUGGUAGACUAUGGAACGUAGGCGUUAUGAUUUCUGACCUAUGUAACAUGGUCCACUAACUCU>hsa-mir-380 MI00
00788AAGAUUGGUUGACCAUAGAACAUGCGCUAUCUCUGUGUCGUAUGUAAUAUGGUCCACAUCUU>hsa-mir-381 M
I0000789UACUUAAAAGCGAGGUUGCCCUUUUGAUUAUUCGGUUUAUUGACAUGGAAUAUACAAGGGCAAGCUCUCUGUGA
GUA>hsa-mir-382 MI0000790UACUUGAAGAGAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCGCUUUACUUAUGACGAAUACUUA
CGGACAACACUUUUUCAGUA>hsa-mir-383 MI0000791CUCCUCAGAUCAAGGUGAUUUGGCUUUGGGUGGA 50

UAUUAAUCAGCCACAGCACUGCCUGGUCAGAAAAGAG>hsa-mir-384 MI0001145UGUAAAAUCAGGAAUUUUAAC
 AAUCCUAGACAAUAUGUAUAAUGUUAAGUCAUCCUAGAAAUGUUAUAAUGCCUGUAACA>hsa-mir-409 M
 I0001735UGGUACUCGGGGAGAGGUUACCCGAGCAACUUUGCAUCUGGACGACGAAUGUUGCUCGGUGAACCCCUUUUC
 GGUAUCA>hsa-mir-410 MI0002465GGUACCUGAGAAGAGGUUGUCUGUGAUGAGUUCGCUUUUAUAAUGACGAA
 UUAACACAGAUGGCCUGUUUUCAGUACC>hsa-mir-411 MI0003675UGGUACUUGGAGAGAUAGUAGACCGUAUA
 GCGUACGCUUUUUCUGUGACGUAUGUAACACGGUCCACUAAACCCUCAGUAUCAAUCCUCCGAG>hsa-mir-412
 MI0002464CUGGGGUACGGGGAUGGAUGGUCGACCAGUUGGAAAGUAAUUGUUUCUAAUGUACUUCACCUGGUCCACUA
 GCCGUCCGUAUCCGUCGAG>hsa-mir-421 MI0003685GCACAUUGUAGGCCUCAUUAUUGUUUGUUGAAUGAAA
 AAUUGAAUCAUACAAGACAUUAAUUGGGCGCCUGCUCUGUGAUCUC>hsa-mir-422a MI0001444GAGAGAAGCA
 CUGGACUUAGGGUCAGAAGGCCUGAGUCUCUCUGCUGCAGAUAGGGCUCUCUGUCCUAGCCAAAGCUUUGUCCUCCUGG
 >hsa-mir-423 MI0001445AUAAAGGAAGUUAGGCUAGGGGCGAGAGCGAGACUUUUCUAAUUUCCAAAAGCUCG
 GUCUGAGGCCCCUCAGUCUUGCUUCCUAAACCCGCGC>hsa-mir-424 MI0001446CGAGGGGAUACAGCAGCAAUUC
 AUGUUUUGAAGUGUUCUAAAUGGUUCAAACCGUGAGGCGCUGCUAUACCCCCUCGUGGGGAAGGUAGAAGGUGGGG>hsa
 -mir-425 MI0001448GAAAGCGCUUUGGAAUGACACGAUCACUCCCGUUGAGUGGGCACCCGAGAAGCCAUCGGGAA
 UGUCGUGUCCGCCAGUGCUCUUUC>hsa-mir-429 MI0001641CGCCGGCCGAUGGGCGUCUACCAGACAUUGGU
 AGACCUGGGCCUCUGUCUAAUACUGUCUGGUAAAACCGUCCAUCGCGUCG>hsa-mir-431 MI0001721UCCUGCUU
 GUCCUGCGAGGUGUCUUGCAGGCCGUAUGCAG
 GCCACACUGACGGUAACGUUGCAGGUCGUCUUGCAGGGCUUCUCGCAAGACGACAUCUCCAUCACCAACGACG>hsa-mi
 r-432 MI0003133UGACUCCUCCAGGUCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGGAUCCUCUAAUUCUACGUGGGCCACUGG
 AUGGCUCUCCAUUGUCUUGGAGUAGAUA>hsa-mir-433 MI0001723CCGGGGAGAAGUACGGUGAGCCUGUCAU
 AUUCAGAGAGGCUAGAUCUCCUGUGUUGAGAAGGAUCAUGAUGGGCUCUCCGUGUUCUCCAGG>hsa-mir-448 MI0
 001637GCCGGAGGUUGAACAUCCUGCAUAGUGCUGCCAGGAAAUCCCUAAUUAUAAAGAGGGGGCUGGCUGGUUGC
 AUAUGUAGGAUGUCCCAUCUCCAGCCACUUCGUA>hsa-mir-449a MI0001648CUGUGUGUGAUGAGCUGGCA
 GUGUAUUGUAGCUGGUUGAAUAUGUGAAUGGCAUCGGCUAACAUGCAACUGCUGUCUAAUUGCAUAUACA>hsa-mir-
 449b MI0003673UGACCUGAAUCAGGUAGGCAGUGUAUUGUAGCUGGCUGCUUGGGUCAAGUCAGCAGCCACAACUA
 CCCUGCCACUUGCUUCUGGAUAAAUUCUUCU>hsa-mir-449c MI0003823GCUGGGAUGUGUCAGGUAGGCAGUGU
 AUUGCUAGCGGCUGUAAUAGAUUUUAAACAGUUGCUAGUUGCACUCCUCUCUGUUGCAUUCAGAAAGC>hsa-mir-450a-
 1 MI0001652AAACGAUACUAAACUGUUUUUGCGAUGUGUCCUAAUUAUGCACUAUAAAUAUUAUUGGGAACAUUUUGCA
 UGUUAUGUUUUGUAUCAAUAUA>hsa-mir-450a-2 MI0003187CCAAAGAAAGAUGCUAAACUAUUUUUGCGAUGU
 GUUCCUAAUAUGUAAUAUAAAUGUAUUGGGGACAUUUUUGCAUUCUAUGUUUUGUAUCAAUAAUAUGG>hsa-mir-450b
 MI0005531GCAGAAUUAUUUUUGCAAUAUGUCCUGAAUAUGUAAUAUAAGUGUAUUGGGAUCAUUUUUGCAUCCAUA
 UUUUGUAU>hsa-mir-451a MI0001729CUUGGGAAUGGCAAGGAAACCGUUACCAUACUGAGUUUAGUAAUGGUA
 AUGGUUCUCUUGCUAUACCCAGA>hsa-mir-451b MI0017360UGGUUAUAGCAAGAGAACCAUUAACCAUUAUAAA
 CUCAGUAAUGGUAACGGUUUCCUUGCCAUCUCCCA>hsa-mir-452 MI0001733GCUAAGCACUUAACAACUGUUUGCA
 GAGGAAACUGAGACUUUGUAACUAUGUCUCAGUCUCAUCUGCAAAGAAGUAAGUCUUUGC>hsa-mir-454 MI0003
 820UCUGUUUAUACCCAGAUCCUAGAACCCUAUCAAUAUUGUCUCUGCUGUGUAAAUAUUGCUGAGUAGUGCAAUAUUGC
 UUAUAGGGUUUUGGUGUUUGGAAAGAACAAUUGGCAGG>hsa-mir-455 MI0003513UCCCUUGCGUGAGGGUAUGU
 GCCUUUGGACUACAUCGUGGAAGCCAGCACCAUGCAGUCCAUGGGCAUAUACACUUGCCUCAAGGCCUAUGUCAUC>hsa
 -mir-466 MI0014157GUGUGUGUAUAUGUGUGUUGCAUGUGUGUAUAUUGUGUGUAUAUAGUACACAUAACAUACA
 CGCAACACACAUAUAUACAUGC>hsa-mir-483 MI0002467GAGGGGGAAGACGGGAGGAAAGAAGGGAGUGGUUCC
 AUCACGCCUCCUCACUCCUCUCCUCCCGUCUUCUCCUCUC>hsa-mir-484 MI0002468AGCCUCGUCAGGCUCAGU
 CCCCUCGGAUAAACCCUAAAUAGGGACUUUCCCGGGGGUGACCCUGGCUUUUUUGGCG>hsa-mir-485 MI0002
 469ACUUGGAGAGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUCGAUUCAUCAAAGCGAGUCAUACACGGCUCUCCUCUUAUUAGU>hsa
 -mir-486 MI0002470GCAUCCUGUACUGAGCUGCCCCGAGGCCCUUCAUGCUGCCCAGCUCGGGGCAGCUCAGUACA
 GGAUAC>hsa-mir-487a MI0002471GGUACUUGAAGAGUGGUUAUCCCGUCUGUGUUCGCUUAAUUUAUGACGAAU
 CAUACAGGGACAUCAGUUUUUCAGUAUC>hsa-mir-487b MI0003530UUGGUACUUGGAGAGUGGUUAUCCCUGU
 CCUGUUCGUUUUGCUCUAGUCGAAUCGUACAGGGUCAUCCACUUUUUCAGUAUCAA>hsa-mir-488 MI0003123GA
 GAAUCAUCUCUCCAGAUAAUUGGCACUCUCAAACAAGUUUCCAAAUUGUUUGAAAGGCUAUUUUUGGUCAGAUACUCU
 C>hsa-mir-489 MI0003124GUGGCAGCUUGGUGGUCGUAUGUGUGACGCCAUUUACUUGAACCUUUAGGAGUGACA
 UCACAUUAACGGCAGCUAAACUGCUAC>hsa-mir-490 MI0003125UGGAGGCCUUGCUGGUUUGGAAAGUUCAUUG

UUCGACACCAUGGAUCUCCAGGUGGGUCAAGUUUAGAGAUGCACCAACCUGGAGGACUCCAUGCUGUUGAGCUGUUCACA
AGCAGCGGACACUCCA>hsa-mir-491 MI0003126UUGACUUAGCUGGGUAGUGGGGAACCCUCCAUGAGGAGUA
GAACACUCCUUAUGCAAGAUUCCCUUCUACCUGGCUGGGUUGG>hsa-mir-492 MI0003131CAACUACAGCCACUA
CUACAGGACCAUCGAGGACCUUGCGGGACAAGAUUCUUGGUGCCACCAUUGAGAACGCCAGGAUUGUCCUGCAGAUCAACA
AUGCUC AACUGGCUGCAGAU>hsa-mir-493 MI0003132CUGGCCUCCAGGGCUUUGUACAUGGUAGGCUUUCAU
CAUUCGUUUGCACAUCGUGGAAGGUCUACUGUGGCCAGGCCUUGGCCAG>hsa-mir-494 MI0003134GAUACU
CGAAGGAGAGGUUGUCCGUGUUGUCUUCUUAUUUAUGAUGAAACAUACACGGGAAACCUCUUUUUAGUAUC>hsa-
mir-495 MI0003135UGGUACCUGAAAAAGAUUGCCCAUGUUAUUUUCGUUUUAUUGUGACGAAACAAACAUGGUG
CACUUCUUUUUCGGUAUCA>hsa-mir-496 MI0003136CCCAAGUCAGGUACUCGAAUGGAGGUUGUCCAUGGUGUG
UUAUUUUUAUUUAUGAUGAGUAUUACAUGGCCAAUCUCCUUCGGUACUCAAUUCUUCUUGG>hsa-mir-497 MI00
03138CCACCCCGGUCCUGCUCCCGCCCCAGCAGCACACUGUGGUUUUACGGCACUGUGGCCACGUCCAAACCACACUG
UGGUGUUAGAGCGAGGGUGGGGGAGGCACCGCCGAGG>hsa-mir-498 MI0003142AACCCUCCUUGGGAAGUGAAG
CUCAGGCUGUGAUUUCAAGCCAGGGGGCGUUUUUCUAUAACUGGAUGAAAAGCACCUCAGAGCUUGAAGCUCACAGUUU
GAGAGCAAUCGUCUAAGGAAGUU>hsa-mir-499a MI0003183GCCUGUCCCCUGUGCCUUGGGCGGGCGGCUGUU
AAGACUUGCAGUGAUUUAAUCCUCUCCACGUGAACAUACAGCAAGUCUGUGCUGCUUCCCGUCCCUACGCUGCCUG
GGCAGGGU>hsa-mir-499b MI0017396GGAAGCAGCACAGACUUGCUGUGAUGUUCACGUGGAGAGGAGUUAACA
UCACUGCAAGUCUUAACAGCCGCC>hsa-mir-500a MI0003184GCUCCCCUCUCUAAUCCUUGCUACCUGGGUGA
GAGUGCUGUCUGAAUGCAAUGCACCUGGGCAAGGAUUCUGAGAGCGAGAGC>hsa-mir-500b MI0015903CCCCU
CUCUAAUCCUUGCUACCUGGGUGAGAGUGCUUUCUGAAUGCAGUGCACCAGGCAAGGAUUCUGCAAGGGGGGA>hsa-mi
r-501 MI0003185GCUCUCCUCUCUAAUCCUUGUCCUGGGUGAGAGUGCUUUCUGAAUGCAAUGCACC CGGGCAA
GGAUUCUGAGAGGGUGAGC>hsa-mir-502 MI0003186UGCUCUCCCCUCUCUAAUCCUUGCUAUCUGGGUGCUAGUG
CUGGCUCAAUGCAAUGCACCUGGGCAAGGAUUCAGAGAGGGGGAGCU>hsa-mir-503 MI0003188UGCCCUAGCAG
CGGGAACAGUUCUGCAGUGAGCGAUCGGUGCUCUGGGGUAUUGUUUCCGUGCCAGGGUA>hsa-mir-504 MI00031
89GCUGCUGUUGGGAGACCCUGGUCUGCACUCUAUCUGUAUUCUACUGAAGGGAGUGCAGGGCAGGGUUUCCCAUACAG
AGGGC>hsa-mir-505 MI0003190GAUGCACCAGUGGGGGAGCCAGGAAGUAUUGAUGUUUCUGCCAGUUUAGCGU
CAACACUUGCUGGUUCCUCUCUGGAGCAUC>hsa-mir-506 MI0003193GCCACCACCAUCAGCCAUACUAUGUGU
AGUGCCUUAUUCAGGAAGGUGUACUUAUAUGAUUAAUUAUUGUAAGGCACCCUUCUGAGUAGAGUAAUGUGCAACAUGG
ACAACAUUUGUGGUGGC>hsa-mir-507 MI0003194GUGCUGUGUGUAGUGCUUCACUUAAGAAGUGCCAUGCAUG
UGUCUAGAAUAUGUUUUGCACCUUUUGGAGUGAAUAAUGCACAACAGAUAC>hsa-mir-508 MI0003195CCACC
UUCAGCUGAGUGUAGUGCCUACUCCAGAGGGCGUCACUAGUAAAACUAAAAUAGAUUGUAGCCUUUUGGAGUAGAGU
AAUACACAUACAGUAACGCAUAUUUGGUGG>hsa-mir-509-1 MI0003196CAUGCUGUGUGUGGUACCCUACUGCA
GACAGUGGCAAUCAUGUAUAAUUAUUUUUAGAUUGGUACGUCUGUGGGUAGAGUACUGCAUGACACAUG>hsa-mir-509
-2 MI0005530CAUGCUGUGUGUGGUACCCUACUGCAGACAGUGGCAAUCAUGUAUAAUUAUUUUUAGAUUGGUACGUCU
GUGGGUAGAGUACUGCAUGACAC>hsa-mir-509-3 MI0005717GUGGUACCCUACUGCAGACGUGGCAAUCAUGUA
UAAUUAUUUUUAGAUUGGUACGUCUGUGGGUAGAGUACUGCAU>hsa-mir-510 MI0003197GUGGUGUCCUACUCAG
GAGAGUGGCAAUCACAUGUAUUUAGGUGUGAUUGAAACCUCUAAAGAGUGGAGUAACAC>hsa-mir-511-1 MI00031
27CAAUAGACACCCAUCGUGUCUUUUGCUCUGCAGUCAGUAAAUAUUUUUUGUGAAUGUGUAGCAAAAAGACAGAAUGGU
GGUCCAUUG>hsa-mir-511-2 MI0003128CAAUAGACACCCAUCGUGUCUUUUGCUCUGCAGUCAGUAAAUAUUUU
UUUGUGAAUGUGUAGCAAAAAGACAGAAUGGUGGUCCAUG>hsa-mir-512-1 MI0003140UCUCAGUCUGUGGCAC
UCAGCCUUGAGGGCACUUUCUGGUGCCAGAAUGAAAGUGCUGUCAUAGCUGAGGUCCAAUGACUGAGG>hsa-mir-512
-2 MI0003141GGUACUUCUCAGUCUGUGGCACUCAGCCUUGAGGGCACUUUCUGGUGCCAGAAUGAAAGUGCUGUCAU
AGCUGAGGUCCAAUGACUGAGGGCAGCACC>hsa-mir-513a-1 MI0003191GGGAUGCCACAUCAGCCAUUCAGC
GUACAGUGCCUUUCACAGGGAGGUGUCAUUUAUGUGAACUAAAAUAUAAUUAUACCUUUCUGAGAAGGGUAAUGUACAG
CAUGCACUGCAUAUGUGGUGUCCC>hsa-mir-513a-2 MI0003192GGAUGCCACAUCAGCCAUUCAGUGUGCAGU
GCCUUUCACAGGGAGGUGUCAUUUAUGUGAACUAAAAUAUAAUUAUACCUUUCUGAGAAGGGUAAUGUACAGCAUGCAC
UGCAUAUGUGGUGUCC>hsa-mir-513b MI0006648GUGUACAGUGCCUUUCACAAGGAGGUGUCAUUUAUGUGAAC
UAAAAUAUAAUUGUACCCUUUUGAGAGGAGUAAUGUACAGCA>hsa-mir-513c MI0006649GCGUACAGUGCCUU
UCUCAAGGAGGUGUCGUUUAUGUGAACUAAAAUAUAAUUAUACCUUUCUGAGAAGAGUAAUGUACAGCA>hsa-mir-5
14a-1 MI0003198AACAUUGUUGUCUGUGGUACCCUACUCUGGAGAGUGACAAUCAUGUAUAAUUAUUUAGAUUGACA
CUUCUGUGAGUAGAGUAACGCAUGACACGUACG>hsa-mir-514a-2 MI0003199GUUGUCUGUGGUACCCUACUCU

GGAGAGUGACAAUCAUGUAUAACUAAAAUUUGAUUGACACUUCUGUGAGUAGAGUAACGCAUGACAC>hsa-mir-514a-
 3 MI0003200GUUGUCUGUGGUACCCUACUCUGGAGAGUGACAAUCAUGUAUAACUAAAAUUUGAUUGACACUUCUGUGA
 GUAGAGUAACGCAUGACAC>hsa-mir-514b MI0014251CAUGUGGUACUCUUCUCAAGAGGGAGGCAAUCAUGUGU
 AAUUGAUUAUGAUUGACACCUCUGUGAGUGGAGUAACACAUG>hsa-mir-515-1 MI0003144UCUCAUGCAGUCAU
 UCUCAAAAAGAAAGCACUUCUGUUGUCUGAAAGCAGAGUGCCUUCUUUUGGAGCGUUCUGUUUGAGA>hsa-mir-51
 5-2 MI0003147UCUCAUGCAGUCAUUCUCCAAAAAGAAAGCACUUCUGUUGUCUGAAAGCAGAGUGCCUUCUUUUGGA
 GCGUUCUGUUUGAGA>hsa-mir-516a-1 MI0003180UCUCAGGCUGUGACCUUCUCGAGGAAAGAACACUUCU
 GUUGUCUGAAAAAGAAAGUGCUUCCUUCAGAGGGUACGGUUGAGA>hsa-mir-516a-2 MI0003181UCUC
 AGGUUGUGACCUUCUGGAGGAAAGAACACUUCUGUUGUCUGAAAGAAAGAAAGUGCUUCCUUCAGAGGGUACGGU
 UUGAGA>hsa-mir-516b-1 MI0003172UCUCAGGCUGUGACCAUCUGGAGGUAAGAAGCACUUCUGUUUUGUGAA
 AGAAAAAGAAAGUGCUUCCUUCAGAGGGUACUUCUUGAGA>hsa-mir-516b-2 MI0003167UCUCAUGAUGUGAC
 CAUCUGGAGGUAAGAAGCACUUCUGUUUUGUGAAAGAAAGUGCUUCCUUCAGAGGGUACUUCUUGAGA>hsa-mir-
 517a MI0003161UCUCAGGCAGUGACCCUCUAGAUGGAAGCACUGUCUGUUGUAUAAAAAGAAAGAUUGUGCAUCCCU
 UUAGAGUGUACUGUUUGAGA>hsa-mir-517b MI0003165GUGACCCUCUAGAUGGAAGCACUGUCUGUUGUCUAA
 GAAAAAGAUUGUGCAUCCCUUAGAGUGUAC>hsa-mir-517c MI0003174GAAGAUCUCAGGCAGUGACCCUCUAG
 AUGGAAGCACUGUCUGUUGUCUAAAGAAAGAUUGUGCAUCCUUUAGAGUGUACUGUUUGAGAAAAUC>hsa-mir-51
 8a-1 MI0003170UCUCAAGCUGUGACUGCAAAGGGAAGCCUUCUGUUGUCUGAAAGAAAGAGAAAGCGCUUCCCUU
 GCUGGAUUCGGUUGAGA>hsa-mir-518a-2 MI0003173UCUCAAGCUGUGGGUCUGCAAAGGGAAGCCCUUUCU
 GUUGUCUAAAAAGAGAAAGCGCUUCCCUUUGCUGGAUUCGGUUGAGA>hsa-mir-518b MI0003156UCAUGC
 UGUGGCCCUCCAGAGGGAAGCGCUUUCUGUUGUCUGAAAGAAAAACAAAGCGCUCCCUUAGAGGUUACGGUUGA>hs
 a-mir-518c MI0003159GCGAGAAGAUUCUCAUGCUGUGACUCUCUGGAGGGAAGCACUUCUGUUGUCUGAAAGAAA
 ACAAAGCGCUUUCUUCUAGAGUGUACGGUUGAGAAAGC>hsa-mir-518d MI0003171UCCCAUGCUGUGACCC
 UCUAGAGGGAAGCACUUCUGUUGUCUGAAAGAAACCAAAGCGCUUCCCUUUGGAGCGUUCGGUUGAGA>hsa-mir-
 518e MI0003169UCUCAGGCUGUGACCCUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUGUUGGCUAAAAAGAAAGAAAGCGCUUCCCU
 UCAGAGUGUUAACGCUUUGAGA>hsa-mir-518f MI0003154UCUCAUGCUGUGACCCUCUAGAGGGAAGCACUUC
 UCUUGUCUAAAAAGAAAGAAAGCGCUUCUCUUCUAGAGGAUACUCUUGAGA>hsa-mir-519a-1 MI0003178CUC
 AGGCUGUGACACUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUGUUGUCUGAAAGAAAGGAAAGUGCAUCCUUUAGAGUGUACUGUUUG
 AG>hsa-mir-519a-2 MI0003182UCUCAGGCUGUGUCCCUUCACAGGGAAGCGCUUCUGUUGUCUGAAAGAAAGG
 AAAGUGCAUCCUUUAGAGUGUACUGUUUGAGA>hsa-mir-519b MI0003151CAUGCUGUGACCCUCUAGAGGGA
 AGCGCUUUCUGUUGUCUGAAAGAAAAAGAAAGUGCAUCCUUUAGAGGUUACUGUUUG>hsa-mir-519c MI000314
 8UCUCAGCCUGUGACCCUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUGUUGUCUGAAAGAAAAAGAAAGUGCAUCCUUUAGAGGAUACA
 GUUUGAGA>hsa-mir-519d MI0003162UCCCAUGCUGUGACCCUCCAAAGGGAAGCGCUUUCUGUUUGUUUUCUCU
 UAAACAAAGUGCCUCCCUUAGAGUGUACCGUUGGGA>hsa-mir-519e MI0003145UCUCAUGCAGUCAUUCUC
 CAAAAAGGAGCACUUCUGUUUGAAAGAAAAACAAAGUGCCUCCUUUAGAGUGUACUGUUUGAGA>hsa-mir-520a
 MI0003149CUCAGGCUGUGACCCUCCAGAGGGAAGUACUUCUGUUGUCUGAGAGAAAAAGAAAGUGCUUCCCUUUGGAC
 UGUUUCGGUUGAG>hsa-mir-520b MI0003155CCCUUCACAGGGAAGCGCUUUCUGUUGUCUGAAAGAAAAAGAA
 GUGCUUCCUUUAGAGGG>hsa-mir-520c MI0003158UCUCAGGCUGUGCUGCCUCUAGAGGGAAGCACUUCUGUU
 GUCUGAAAGAAAAAGAAAGUGCUUCCUUUAGAGGGUACCGUUGAGA>hsa-mir-520d MI0003164UCUCAAGCU
 GUGAGUCUACAAAGGGAAGCCCUUUCUGUUGUCUAAAAAGAAAAAGAAAGUGCUUCUUCUUGGUGGGUACGGUUGAGA>h
 sa-mir-520e MI0003143UCUCCUGCUGUGACCCUCAAGAUGGAAGCAGUUCUGUUGUCUGAAAGGAAAGAAAGUG
 CUUCCUUUUGAGGGUACUGUUUGAGA>hsa-mir-520f MI0003146UCUCAGGCUGUGACCCUCUAAAGGGAAGC
 GCUUUCUGUGGUCAGAAAGAAAGCAAGUGCUUCCUUUAGAGGGUACCGUUGGG
 A>hsa-mir-520g MI0003166UCCCAUGCUGUGACCCUCUAGAGGAAGCACUUCUGUUUGUUGUCUGAGAAAAAAC
 AAAGUGCUUCCCUUAGAGUGUACCGUUGGGA>hsa-mir-520h MI0003175UCCCAUGCUGUGACCCUCUAGAG
 GAAGCACUUCUGUUUGUUGUCUGAGAAAAACAAAGUGCUUCCCUUAGAGUACUGUUUGGGA>hsa-mir-521-1
 MI0003176UCUCAGGCUGUGACCCUCCAAAGGGAAGAACUUCUGUUGUCUAAAAAGAAAAAGAACGCACUUCCCUUAGA
 GUGUACCGUGUGAGA>hsa-mir-521-2 MI0003163UCUCGGGCGUGACUCUCCAAAGGGAAGAAUUUUCUCUUG
 UCUAAAAAGAAAGAACGCACUUCCCUUAGAGUGUACCGUGUGAGA>hsa-mir-522 MI0003177UCUCAGGCUGU
 GUCCCUUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUGUUGUCUGAAAGAAAAAGAAAGUGGUUCCCUUAGAGUGUACGCUUUGAGA>hsa
 -mir-523 MI0003153UCUCAUGCUGUGACCCUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUGUUGUCUGAAAGAAAAAGAACGCACU

C>hsa-mir-548ar MI0019131AAAAAGUAAUUGCAGUUUUUGCUGUUGAACGUAGUGGUAAAAACUGCAGUUUUUUU
 GC>hsa-mir-548as MI0019132AAAAAGUAAUUGCAGUUUUUGCUGUUGAACGUAGUGGUAAAAACCCACAAUUAUGU
 UUGU>hsa-mir-548at MI0019137AAAAAGUAAUUGCAGUUUUUGCUGUUGAACGUAGUGGUAAAAACCCAGUAAC
 UUUUGU>hsa-mir-548au MI0019145AAAAAGUAAUUGCAGUUUUUGCUGUUGAACGUAGUGGUAAAAACCCAGUAAC
 CCAG>hsa-mir-548av MI0019152AAAAAGUAAUUGCAGUUUUUGCUGUUGAACGUAGUGGUAAAAACCCAGUAAC
 UUAUUUUUGC>hsa-mir-548aw MI0019283UAGGUCGUGCAAAAAGUCAUCACGGUUUUUACCAUUAACCCGCGA
 UGACUUUUUGCAUCAACCUA>hsa-mir-548ax MI0019286GAUUGGUGCAGAAGUAAUUGCAGUUUUUUGCAUGGAAA
 GUAAUUGGCAAAAACCGUAAUUAUUUUGUACCAACC>hsa-mir-548b MI0003596CAGACUAUAUUAUUUAGGUUGG
 CGCAAAAAGUAAUUGGCUUUUUGGCCUUUAUUUCAAUGGCAAGAACCCAGUUGCUUUUUGGCCAACCUAAUACUU>hsa
 -mir-548c MI0003630CAUUGGCAUCUAUUAGGUUGGUGCAAAAAGUAAUUGCAGUUUUUUGCCAUUACUUUCAGUAGC
 AAAAAUCUCAAUUACUUUUGCACCACCUAAUUAUU>hsa-mir-548d-1 MI0003668AAAAAGUAAUUAUUUAGGUU
 GGUGCAAAAAGUAAUUGGCUUUUUGCCUGUAAAAGUAAUUGGCAAAAACCCACAGUUUCUUUUGCACCAGACUAAUAAAG>h
 sa-mir-548d-2 MI0003671GAGAGGGAAGAUUUAGGUUGGUGCAAAAAGUAAUUGGCUUUUUGCCAUUAGAAAGUAA
 UGGCAAAAACCCACAGUUUCUUUUGCACCACCUAAUUAUU>hsa-mir-548e MI0006344UUAUUAGGUUGGUACAA
 AAGCAAUCGCGUUUUUGCUAAUUAUUUAAAGGCAAAAACUGAGACUACUUUUGCACCACCUAGAUAGAA>hsa-mir-
 548f-1 MI0006374AUUAGGUUGGUGCAAAAAGUAAUUCACAGUUUUUGACAUAUUAUUUCAAAGACAAAAACUGUAAUUA
 CUUUUGGACCAACCUAAUAG>hsa-mir-548f-2 MI0006375UAAUAAUUAUUAGGUUGGUGCGAACAUAUUUGCAG
 UUUUUUAUUAUUACUUUUAAUUGGCAAAAACUGUAAUUAUUUUGCACCACCUAAUUAUUUAGU>hsa-mir-548f-3 M
 I0006376AUUAGGUUGGUGCAAAACCUAAUUGCAAUUUUUGCAGUUUUUUUAGUAAUUGCAAAAACUGUAAUUAUUUU
 GCACCAACCUAAUAC>hsa-mir-548f-4 MI0006377GAGUUCUAAACGUAAUAGGUUGGUGCAAAAAGUAAUAGUGGU
 UUUUGCCAUAUUAAAGUAAUGACAAAAACUGUAAUUAUUUUGGAACAAUUAUUUAGAAUUUCAG>hsa-mir-548f-5
 MI0006378UAUUAGGUUGCUGCAAAAAGUAAUCAUGUUUUUUCCAUAUUAAGUAAUUGGAAAAACUGUAAUUAUUUU
 GUACCAACCUAAUAGC>hsa-mir-548g MI0006395AGUUAUUAGAUUAGUGCAAAAAGUAAUUGCAGUUUUUUGCAUU
 ACGUUCUAUUGGCAAAAACUGUAAUUAUUUUGUACCAACAUAUUACUUC>hsa-mir-548h-1 MI0006411UCUGUCC
 AUUAGGUUGGUGCAAAAAGUAAUUCGCGUUUUUGUCAUUACUUUUAAUUGGAAAAACUGGAAUUAUUUUGCACUGACCUA
 AUAUUAAAGCCAGAU>hsa-mir-548h-2 MI0006412GUAUUAGGUUGGUGCAAAAAGUAAUUCGCGUUUUUGUCAUU
 ACUUUCAAUUGGCAAAACACCACAAUUAUUUUGCACCACCUAAUUAUU>hsa-mir-548h-3 MI0006413UCUGAUU
 CUGCAUGUAUUAGGUUGGUGCAAAAAGUAAUUCGCGUUUUUGUCAUUAGAAAGUAAUAGCAAAAACUGCAAUUAUUUUGCA
 CCAACCUAAAGUAGUCACUGUCUUCAGAU>hsa-mir-548h-4 MI0006414GCUAAUAGGUUGGUGCAAAAAGUAA
 UCGCGUUUUUUGUCAUUACUUUAUUACUUUACGUUUAUUUAGCAAAAACCGCAAUUAUUUUGCACCACCUAAUUA
 CUUGCUA>hsa-mir-548h-5 MI0016751ACAAAAGUAAUUCGCGUUUUUGUCAUUACUUUUAACUGUAAAAACCCAC
 GGUUGCUUUUGC>hsa-mir-548i-1 MI0006421CAGAUUGGCUUGAAGUUUGCACCUCUUAUUAGGUUGGUGCAAAAAG
 UAAUUGCGGAUUUUUGCCAUUAAAAGUAAUUGGCAAAAACUAGCAAUUAUUUUUGUACCAAGCCUAGUAUCUUUUCUCCUUCUA
 CCAAACUUUUGUCCUGAGCCAUCUCA>hsa-mir-548i-2 MI0006422UAGAUGGCUCCGAAGUUUGCAUCCUUAUU
 GUUUGGUGCAAAAAGUAAUUGCGGAUUUUUGCCAUUAAAAGUAAUUGGCAAAAACUAGCAAUUAUUUUUGUACCAAGCCUAGUAU
 CUUUUCUCCUUCUAAUUAAGUUGGCUCCUGAUCCAUCUCA>hsa-mir-548i-3 MI0006423CAGAUUGGCUCCGAAG
 UUUACAUCUUAUUAGGUUUUGGCAAAAAGUAAUUGCGGAUUUUUGCCAUUAAAAGUAAUUGGCAAAAACUAGCAAUUAUUUUUG
 UACCAAGCCUAGUAUCUUUUCUCCUUCUACCAAACUUUGUCCUGAGCCAUCUCA>hsa-mir-548i-4 MI0006424A
 GGUUGGUGCAAAAAGUAAUUGCGGAUUUUUGCCAUUUAUUACGGCAAAAACCCACAAUUAUUUUGCACCACCUAAU>hsa
 -mir-548j MI0006345GGGAGCCAGUGAAUAGUAGCUGGUGCAAAAAGUAAUUGCGGUCUUUGGUAAUUAUUUCAG
 UGGCAAAAACUGCAUUACUUUUGCACCAGCCUACUAGAACGCUAGUUCAG>hsa-mir-548k MI0006354CUUUUC
 UCAAGUAUUUGCUGUAGGUUGGUGCAAAAAGUAAUUGCGGAUUUUUGCUUUACUUUUAAUUGGCAAAAACCCGAAUUAUUUU
 GCUUCAACCUAAUUAUGAUGCAAAAACUUGGCU>hsa-mir-548l MI0006361UAUUAGGUUGGUGCAAAAAGUAAUUGCG
 GGUUUUGGUGCAAAAAGUAAUUGGCAAAAACUGCAGUUACUUUGGCAACCAACCAAAUGCU>hsa-mir-548m MI00064
 00AUUAUUAGGUUGGUGCAAAAGGUAUUUGGCUUUUUGUCAUUAAAGUAAUUGCAAAAAGCCACAAUUAUUUUGCACCACCC
 UAAUUAUU>hsa-mir-548n MI0006399AGGUUGGUGCAAAAAGUAAUUGGGAUUUUUGGCUUAAAAUAGCAAAAAC
 CCGCAAUUAUUUUGCACCACCUAA>hsa-mir-548o MI0006402UGGUGAAAAUUGGUUGAUUGUAAUUGGUUCCU
 AUUCUGAUCAAUAAACAUGGUUUGAGCCUAGUUAUUAUUAUUUACCGGUCCAAAACUGCAGUUACUUUUGCACC
 AAC>hsa-mir-548o-2 MI0016746UGGUGCAAAAAGUAAUUGCGUUUUUUGCCAUUAAAAGUAAUUGCGGCCAAAACU
 GCAGUUACUUUUGCACC>hsa-mir-548p MI0006420AUUAGGUUGGUAAUAAAAUUAUUUGCAGUUUUUGUCAUUA

50

[illegible]

UCCUUUGGAAAAACAGAACAGGAAGCAUAUGAAUUAAGAUAUCAAGUAGG>hsa-mir-606 MI0003619UGUAUUCUU
GGUUUUUAGUAGUUUUACUAUGAUGAGGUGGCCAUCCACCCCAUCAUAGUAAAACUACUGAAAAUCAAAAGAUACAAGUGC
CUGACCA>hsa-mir-607 MI0003620UUGCCUAAAAGUCACACAGGUUAUAGAUCUGGAUUGGAACCCAGGGAGCCAG
ACUGCCUGGGUUCAAAUCCAGAUCUAUAACUUGUGUGACUUUGGG>hsa-mir-608 MI0003621GGGCCAAGGUGGG
CCAGGGGUGGUGUUGGGACAGCUCCGUUUAAAAAGGCaucuccaagagcuuccaucaaaaggcugccucuuggugcagcac
AGGUAGA>hsa-mir-609 MI0003622UGCUCGGCUGUCCUAGGGUGUUCUCUCAUCUCUGGUCUAUAAUUGGGUUA
AAUAGUAGAGAUGAGGGCAACACCCUAGGAACAGCAGAGGAACC>hsa-mir-610 MI0003623UCUAUUUGUCUUAG
GUGAGCUAAAUGUGUGCUGGGACAUUUUGAGCCAAAUGUCCCAGCACACAUUUAGCUCACAUAAGAAAAAUGGACUCUA
GU>hsa-mir-611 MI0003624AAAAUGGUGAGAGCGUUGAGGGGAGUUCAGACGGAGAUGCGAGGACCCCCUCGGGG
UCUGACCCACA>hsa-mir-612 MI0003625UCCCAUCUGGACCCUGCUGGGCAGGGCUUCUGAGCUCCUAGCACUA 10
GCAGGAGGGGCUCCAGGGGGCCUCCCUCCAUGGCAGCCAGGACAGGACUCUCA>hsa-mir-613 MI0003626GGUGA
GUGCGUUUCCAAGUGUGAAGGGACCCUCCUGUAGUGUCUUAUUAACAAUACAGUAGGA AUGUCCUUCUUUGCCACUCA
UACACCUUA>hsa-mir-614 MI0003627UCUAAGAAACGCAGUGGUCUCUGAAGCCUGCAGGGGCAGGCCAGCCCU
GCACUGAACGCCUGUUCUUGCCAGGUGGCAGAAGGUUGCUGC>hsa-mir-615 MI0003628CUCGGGAGGGGCGGGA
GGGGGUGCCCCGGUGCUCGGAUCUCGAGGGUGCUUAUUGUUCGGUCCGAGCCUGGGUCUCCCUUCCCCCAAACCCCC
>hsa-mir-616 MI0003629UAGGUAAUCCUCCACUCAAAACCCUUCAGUGACUUCUCCAUUGACAUAGAAUAGGAAGU
CAUUGGAGGGUUUGAGCAGAGGA AUGACCUGUUUAAAA>hsa-mir-617 MI0003631CAUCAUAAGGAGCCUAGAC
UUCCCAUUUGAAGGUGGCCAUUCCUACCACCUUCAAUUGGUAAGUCCAGGCUCUUCUGAUUCAUAAAUGAGGAGC>h
sa-mir-618 MI0003632CUCUUGUUCACAGCCAAACUCUACUUGUCCUUCUGAGUGUAAUUAACGUACAUGCAGUAGC
UCAGGAGACAAGCAGGUUUACCCUGUGGAUGAGUCUGA>hsa-mir-619 MI0003633CGCCCACCUCAGCCUCCCAA 20
AAUGCUGGGAUUACAGGCAUGAGCCACUGCGGUCGACCAUGACCUGGACAUGUUUGUGCCCAGUACUGUCAGUUUGCAG>
hsa-mir-620 MI0003634AUUAUAUCUAUAUCUAGCUC CGUAUAUAUAUAUAUAUAUAUAUAGAU AUCUCCAUAUA
UAUGGAGAUAGAUUAAGAAUAAAACAAGCAAAGAA>hsa-mir-621 MI0003635UAGAUUGAGGAAGGGG CUGAGU
GGUAGGCGGUGCUGCUGUGCUCUGAUGAAGACCCAUGUGGCUAGCAACAGCGCUUACCUUUUGUCUCUGGGUCC>hsa-m
ir-622 MI0003636AGAGAAGCUGGACAAGUACUGGUCUCAGCAGAUUGAGGAGAGCACCACAGUGGUCAUCACACAG
UCUGCUGAGGUUGGAGCUGCUGAGAUGACACU>hsa-mir-623 MI0003637GUACACAGUAGAAGCAUCCCUUGCAG
GGGCUUUGGGUUGCAUCCUAAGCUGUGCUGGAGCUUCCCGAUGUACUCUGUAGAUGUCUUUGCACCUCUG>hsa-mir
-624 MI0003638AAUGCUGUUUCAAGGUAGUACCAGUACCUUGUGUUCAGUGGAACCAAGGUAAAACAAGGU AUUGG
UAUUAACCUUGAGAUAGCAUUAACCUAAGUG>hsa-mir-625 MI0003639AGGGUAGAGGGAUAGAGGGG GAAAGUUC
UAUAGUCCUGUAAUUAAGAUUCUAGGACUAUAGAACUUUCCCCCUCAUCCCUUGGCCU>hsa-mir-626 MI0003640 30
ACUGAUUAUUUGUCUUAUUUGAGAGCUGAGGAGUAUUUUUAUGCAAUCUGAAUGAUCUCAGCUGUCUGAAAAUGUCUUC
AAUUUUAAAGGCUU>hsa-mir-627 MI0003641UACUUAUUACUGGUAGUGAGUCUCUAAGAAAAGAGGAGGUGGU
GUUUUCCUCCUCUUUUCUUUGAGACUCACUACCAUUAUAAGAAAUACUACUA>hsa-mir-628 MI0003642AUAGC
UGUUGUGUCACUUCUCCAUGCUGACAUAUUUAUAGAGGGUAAAAUUAUAACCUUCUAGUAAGAGUGGCAGUCGAAGGG
AAGGGCUCAU>hsa-mir-629 MI0003643UCCCUUCC CAGGGGAGGGGCUGGGUUACGUUGGGAGA CUUUUACG
GUGAAC CAGGAGGUUCUCCCAACGUAAGCCCAGCCCCUCCCUUGCCU>hsa-mir-630 MI0003644AACUUAACA
UCAUGCUACCUCUUUGUAUCAUAUUUUGUUAUUCUGGUCACAGAAUGACCUAGUAUUCUGUACCAGGGAAGGUAGUUCU
AACUAUAU>hsa-mir-631 MI0003645UGUGGGAGCCUGGUUAGACCUGGCCCAGACCUCAGCUACACAAGCUGAUG
GACUGAGUCAGGGGCCACACUCUCC>hsa-mir-632 MI0003647CGCCUCCUACCGCAGUGCUUAGCGGGAGGCGGA
GCGGGGAACGAGGCGGUCGGCCA UUUUGUGUCUGCUUCCUGUGGGACGUGGUGGUAGCCGU>hsa-mir-633 MI0003 40
648AACCUCUCUAGCCUCUGUUUCUUUAUUGCGGUAGAUACUAUUAACCUAAAAUGAGAAGGCUA AUAGUAUCUACCAC
AAUAAAAUUGUUGAGGAUA>hsa-mir-634 MI0003649AAACCCACACCACUGCAUUU
UGGCCAU CGAGGGUUGGGGCUUGGUGUCAUGCCCCAAGAU AAC CAGCACCCCAACUUUGGACAGCAUGGAUUAGUCU>hs
a-mir-635 MI0003650CAGAGAGGAGCUGCCACUUGGGCAGU GAAACAAUGUCCA AUUAGGCUUUGUUAUGGAAACUU
CUCCUGAUCAUUGUUUUGUGUCCA UUGAGCUUCCAAU>hsa-mir-636 MI0003651UGGCGGCCUGGGCGGGAGCGC
GCGGGCGGGGCCGGCCCCGUGCCUGGAAUUAACCCGCGUGUGCUUGCUCUGUCCCGCCCGCAGCCCUAGGCGGCGUCG>h
sa-mir-637 MI0003652UGGCUAAGGUGUUGGCUCGGGCUC CCCACUGCAGUUA CC CUCUCCGCGUUACUGAGC
ACUGGGGGCUUUCGGGCUCUGCGUCUGCACAGAUACUUC>hsa-mir-638 MI0003653GUGAGCGGGCGCGGCAGGG
AUCGCGGGCGGGUGGCGGCCUAGGGCGCGGAGGGCGG ACCGGGAAUGGCGCGCCGUGCGCGCGCGGCUAACUGCGGCGC
U>hsa-mir-639 MI0003654UGGCCGACGGGGCGCGCGCGGCCUGGAGGGGCGGGGCGGACGCAGAGCCGCGUUAG 50

UCUAUCGCGUGCGGUUGCGAGCGCUGUAGGGAGCCUGUGCUG>hsa-mir-640 MI0003655GUGACCCUGGGCAAGUU
CCUGAAGAUCAAGACACAUCAGAUCCCUUAUCUGUAAAAUUGGGCAUGAUCCAGGAACCCUGCCUCUACGGUUGCCUUGGGG>
hsa-mir-641 MI0003656UGGGUGAAAGGAAGGAAAGACAUAGGAUAGAGUACCCUCUGUCCUCUGUCCUCUACCUA
UAGAGGUGACUGUCCUAUGUCUUUCCUUCUCUUAACCCU>hsa-mir-642a MI0003657AUCUGAGUUGGGAGGGU
CCCUCUCCAAAUGUGUCUUGGGGUGGGGGAUCAAGACACAUUUGGAGAGGGAACCCUCCCAACUCGGCCUCUGCCAUAU
>hsa-mir-642b MI0016685GAGUUGGGAGGUUCCUCUCCAAAUGUGUCUUGAUCCCCCACCACCAAGACACAUUUG
GAGAGGGACCCUCCCAACUC>hsa-mir-643 MI0003658ACCAAGUGAUUAUUAUUGUCUACCCUGAGCUAGAAUACA
AGUAGUUGGCGUCUUCAGAGACACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAGAUAUUGAAUGAAAAA>hsa-mir-644a MI00036
59UUUUUUUUUAGUAUUUUUCCAUCAGUGUUAUAAGGAAUGUUGCUCUGUAGUUUUUUAUAGUGUGGCUUUUUAAGAG
CAAAGAUGGUUCCCUA>hsa-mir-644b MI0019134UGGGCUAAGGGAGAUGAUUGGGUAGAAAGUAUUAUUCUAU
CAUUUGCCUCCAGCCUACA>hsa-mir-645 MI0003660CAGUUCCUAACAGGCCUCAGACCAGUACCGGUCUGUGG
CCUGGGGGUUGAGGACCCUCGUCUAGGCUGGUACUGCUGAUGCUUAAAAAGAGAG>hsa-mir-646 MI0003661GA
UCAGGAGUCUGCCAGUGGAGUCAGCACACCUGCUUUUACCCUGUGAUCCAGGAGAGGAAGCAGCUGCCUCUGAGGCCUC
AGGCUCAGUGGC>hsa-mir-647 MI0003662AGGAAGUGUUGGCCUCUGGCUCGACUCACUUCUUCAGCCCCAGGA
AGCCUUGGUCGGGGGAGGAGGGAGGGUCAGGCAGGGCUGGGGGCCUGAC>hsa-mir-648 MI0003663AUCACAGA
CACCUCCAAUGUGCAGGGCACUGGUGGGGGCCGGGGCAGGCCAGCAAAGUGCAGGACCUGGCACUUAGUCGGAAGUG
AGGGUG>hsa-mir-649 MI0003664GGCCUAGCCAAAUACUGUAUUUUUGAUCGACAUUUGGUUAAAAUAUUCUAU
GUAUUAGUAAACCUGUGUUGUUAAGAGUCCACUGUGUUUUGCUG>hsa-mir-650 MI0003665CAGUGCUGGGGUC
UCAGGAGGCAGCGCUCUCAGGACGUCACCACCAUGGCCUGGGCUCUGCUCCUCCUCACCCUCCUCACUCAGGGCACAGGU
GAU>hsa-mir-651 MI0003666AAUCUAUCACUGCUUUUAGGAUAAGCUUGACUUUUUUAUAAAAUAAAAUUGCAAA
AGGAAAGUGUAUCCUAAAAGGCAAUGACAGUUAAUGUGUU>hsa-mir-652 MI0003667ACGAAUGGCUAUGCAC
UGCACAACCCUAGGAGAGGGUGCCAUUCACAUAAGACUAUAAUUGAAUGGCGCCACUAGGGUUGUGCAGUGCACAACCUAC
AC>hsa-mir-653 MI0003674UUAUUCUUCAGUGUUGAAACAAUCUCUACUGAACCCAGCUUCAAACAAGUUCACU
GGAGUUUGUUUCAAUAUUGCAAGAAUGAUAGAUGGAAGC>hsa-mir-654 MI0003676GGGUAAGUGGAAAGAUGG
UGGGCCGCAGAACAUUGUGCUGAGUUCGUGCCAUAUGUCUGCUGACCAUACCCUUUAGAAGCCC>hsa-mir-655 MI00
03677AACUAUGCAAGGAUAUUUGAGGAGAGGUUAUCCGUGUUAUGUUCGCUUCAUUAUCAUGAAUAAUACAUGGUUAA
CCUCUUUUUGAAUAUCAGACUC>hsa-mir-656 MI0003678CUGAAAUAGGUUGCCUGUGAGGUGUUCACUUUCUAU
AUGAUGAAUAUUAUCAGUCAACCUCUUUCCGAUAUCGAAUC>hsa-mir-657 MI0003681GUGUAGUAGAGCUAGG
AGGAGAGGGUCCUGGAGAAGCGUGGACCGGUCCGGUGGGUUCGCGCAGGUUCUACCCUCUCUAGGCCCAUUCUCCUC
UG>hsa-mir-658 MI0003682GCUCGGUUGCCGUGGUUGCGGGCCCGCCCGCCCGCCAGCUCGUGACAGCACGAC
UCAGGGCGGAGGGAAGUAGGUCCGUUGGUCGGUCGGGAACGAGG>hsa-mir-659 MI0003683UACCGACCCUCGAU
UUGGUUCAGGACCUUCCCUGAACCAAGGAAGAGUCACAGUCUCUCCUUGGUUCAGGGAGGGUCCCCAACAAUGUCCUCA
UGG>hsa-mir-660 MI0003684CUGCUCCUUCUCCCAUACCCAUUGCAUAUCGGAGUUGUGAAUUCUAAAAACCCU
CCUGUGUGCAUGGAUUAACAGGAGGGUGAGCCUUGUCAUCGUG>hsa-mir-661 MI0003669GGAGAGGCUGUGCUGU
GGGGCAGGCGCAGGCCUGAGCCUGGUUUCGGGCGGCCUGGGUCUCUGGCCUGCGCGUGACUUUGGGGUGGCU>hsa-mi
r-662 MI0003670GCUGUUGAGGCUGCGCAGCCAGGCCUGACGGUGGGGUGGCUGCGGGCCUUCUGAAGGUCUCCCA
CGUUGUGGGCCAGCAGCGCAGUCACGUUGC>hsa-mir-663a MI0003672CCUUCGGCGUCCAGGCGGGGCGCCG
CGGGACCGCCUCGUGUCUGUGGCGGUGGGAUCCCGCGGCCGUGUUUCCUGGUGGCCCGGCCAUG>hsa-mir-663b
MI0006336GGUGCCGAGGGCCGUCCGGCAUCCUAGGCGGGUCGUCGCGUACCUCCUCCUGUCUGUGGCGGUGGGAUC
CCGUGGCCGUGUUUCCUGGUGGCCCGGCCGUGCCUGAGGUUUC>hsa-mir-664 MI0006442GAACAUUGAAACUG
GCUAGGGAAAAUGAUUGGAUAGAAACUAUUAUUCUAUUAUUAUCCCCAGCCUACAAAAUGAAAAA>hsa-mir-665
MI0005563UCUCCUCGAGGGGUCUCUGCCUCUACCCAGGACUCUUUAUGACCAGGAGGCUGAGGCCCCUCACAGGCG
GC>hsa-mir-668 MI0003761GGUAAGUGCGCCUCGGGUGAGCAUGCACUAAUUGGGUGUAUGUCACUCGGCUCG
GCCACUACC>hsa-mir-670 MI0003933GUUUAGGGGUGGACCUGAUUCCUUGAGUGUAUUGUGGUGAACCUGAAU
UUGCCUUGGGUUUCCUCAUAUUAUUCAGGAGUGUCAGUUGCCCCUUCAC>hsa-mir-671 MI0003760GCAGGUGA
ACUGGCAGGCCAGGAAGAGGAGGAAGCCUCGGAGGGGCGUGGAGGUGAUUGGAUUGUUUCCUCCGGUUCUCAGGGCUCCACC
UCUUUCCGGGCCGUAAGCCAGGGCUGGUGC>hsa-mir-675 MI0005416CCCAGGGUCUGGUGCGGAGAGGGCCAC
AGUGGACUUGGUGACGCUUAUGCCUCACCGCUCAGCCCCUGG>hsa-mir-676 MI0016436GAUGACUCUUA
ACCUCAGGACUUGCAGAAUUAUUGGAAUGCUGUCCUAAGGUUGUUGAGUUGUGC>hsa-mir-708 MI0005543AACU
GCCCUCAGGAGCUUACAAUCUAGCUGGGGGUAAAUGACUUGCACAUGAACACAACUAGACUGUGAGCUUCUAGAGGGCA

GGGA>hsa-mir-711 MI0012488ACUGACUUUGAGUCUCUCCUCAGGGUGCUGCAGGCAAAGCUGGGGACCCAGGGA
GAGACGUAAGUGAGGGGAGAUG>hsa-mir-718 MI0012489GGCCGCGGCGCGCAAGAUGGCGGCGGGCCCGGGCAG
CGCCCCUUCGCCCCCGGGGCGUCGCACGAGGC>hsa-mir-720 MI0006654CCGGAUCUCACACGGUGGUGUAA
UAUCUCGCUGGGGCCUCCAAAAUUGUUGCCAGGGGUGUAGAGAAAAACACACACUUUGAGAUGAAUUAAGAGUCCUU
UAUUAG>hsa-mir-744 MI0005559UUGGGCAAGGUGCGGGGCUAGGGCUAACAGCAGUCUUACUGAAGGUUUCCUG
GAAACCACGCACAUGCUGUUGCCACUAACCUCUACUCGGUC>hsa-mir-758 MI0003757GCCUGGAUACAU
GAGAUGGUUGACCAGAGAGCACACGCUUUAUUUGGCCGUUUGUGACCUUGGUCCACUAACCCUCAGUAUCUAAUGC>hsa
-mir-759 MI0004065UAAUAAAAUAAAUUGCCUAAACUGGCAGAGUGCAAACAAUUUUGACUCAGAUCAAAUGUUUG
CACUGGCUGUUUAAACAUUUAAUUUGUUA>hsa-mir-760 MI0005567GGCGCGUCGCCCCCUCAGUCCACCAGAG
CCCGGAUACCUCAGAAAUCGGGCUCUGGGUCUGUGGGGAGCGAAAUGCAAC>hsa-mir-761 MI0003941GGAGGAG 10
CAGCAGGGUGAAAACUGACACAGUUCUGGUGAGUUUACAUUUGCUGCUCUCCUC>hsa-mir-762 MI0003892GGCCCG
GCUCCGGGUCUCGGCCCCGUACAGUCCGGCCGGCCAUGCUGGCGGGGCUGGGGCCGGGGCCGAGCCCGCGGCGGGGCC>hs
a-mir-764 MI0003944AAUCUAGGAGGCAGGUGCUCACUUGUCCUCCUCCAUGCUUGGAAAAUUGCAGGGAGGAGGCC
AUAGUGGCAACUGUUACCAUGAUU>hsa-mir-765 MI0005116UUUAGGCGCUGAUGAAAGUGGAGUUCAGUAGACA
GCCCCUUUCAAGCCCUACGAGAAACUGGGGUUUCUGGAGGAGAAGGAAGGUGAUGAAGGAUCUGUUCUCGUGAGCCUGAA
>hsa-mir-766 MI0003836GCAUCCUCAGGACCUGGGCUUGGGUGGUAGGAGGAAUUGGUGCUGGUCUUUCAUUUUG
GAUUUGACUCCAGCCCCACAGCCUCAGCCACCCAGCCAAUUGUCAUAGGAGC>hsa-mir-767 MI0003763GCUUU
UAUAUUGUAGGUUUUUGCUCUAGCACC AUGGUUGUCUGAGCAUGCAGCAUGCUUGUCUGCUCAUACCCCAUGGUUUUCUGA
GCAGGAACCUUCAUUGUCUACUGC>hsa-mir-769 MI0003834GCCUUGGUGCUGAUUCCUGGGCUCUGACCUGAGA 20
CCUCUGGGUUCUGAGCUGUGAUGUUGCUCUCGAGCUGGGAUCUCCGGGGUCUUGGUUCAGGGCCGGGGCCUCUGGGUUC
AAGC>hsa-mir-770 MI0005118AGGAGCCACCUUCCGAGCCUCCAGUACCACGUGUCAGGGCCACAUGAGCUGGGC
CUCGUGGGCCUGAUGUGGUGCUGGGGCCUCAGGGGUCUGCUCUU>hsa-mir-802 MI0003906GUUCUGUUUUUGC
AGUCAGUAACAAAGAUUCAUCCUUGUGUCCAUCAUGCAACAAGGAGAAUCUUUGUCACUUAGUGUAAUUAUAGCUGGAC
>hsa-mir-873 MI0005564GUGUGCAUUUGCAGGAACUUGUGAGUCUCCUUAUUGAAAAUGAACAGGAGACUGAUGAG
UCCCCGGGAACACCCACAA>hsa-mir-874 MI0005532UUAGCCUUGCGGCCCCACGCACCAGGGUAAAGAGAGACUC
UCGCUUCCUGCCCUGGCCCCGAGGGACCGACUGGCUGGGC>hsa-mir-875 MI0005541UUAGUGGUACUAUACCUCU
GUUUUAUCAGGUGUUCUAAAAUACCCUGGAAACACUGAGGUUGUGUCUCACUGAAC>hsa-mir-876 MI0005542U
GAAGUGCUGUGGAUUUCUUUGUGAAUCACCAUAUCUAAAGCUAAUGUGGUGGUGGUUACAAAGUAAUUCAUAGUGCUUCA
>hsa-mir-877 MI0005561GUAGAGGAGAUUGCGCAGGGGACACGGGCAAAGACUUGGGGUUCCUGGGACCCUCAG 30
ACGUGUGUCCUCUUCUCCUCCUCCAG>hsa-mir-885 MI0005560CCGCACUCUCUCCAUAUACAUACCCUGCCU
CUUCUCCAUGAGAGGCAGCGGGGUGUAGUGGAUAGAGCACGGGU>hsa-mir-887 MI0005562GUGCAGAUCCUUGG
GAGCCCGUUAAGACUCUGGAUUUUACAUUGGAGUGAACGGGCGCCAUCCCGAGGCUUUGCACAG>hsa-mir-888 MI
0005537GGCAGUGCUCUACUAAAAAGCUGUCAGUCACUUAGAUAUACAUGUGACUGACACCUCUUUGGGUGAAGGAAGG
CUCA>hsa-mir-889 MI0005540GUGCUUAAAGAAUGGCUGUCCGUAGUAUGGUCUCUAUAUUUAUGAUGAUUAAUA
UCGGACAACCAUUGUUUAGUAUCC>hsa-mir-890 MI0005533GGAAGUGCCCUACUUGGAAAGGCAUCAGUUGCU
UAGAUAUACAUGUAAACUAUUCUUUCUGAGUAGAGUAAAGUCUUA>hsa-mir-891a MI0005524CCUUAUCCUUGC
AACGAACCUAGGCCACUGAUUCAGUAAAAUACUCAGUGGCACAUGUUUGUUGAGGGUCAAAGA>hsa-mir-891b
MI0005534CCUUAUCCUUGCAACUUAACUGAGUCAUUGAUUCAGUAAAAACAUAUAAUGGCACAUGUUUGUUGUAGGG
UCAAAAGA>hsa-mir-892a MI0005528GCAGUGCCUUAUCUCAGAAAGGUGCCAGUCACUUAACUACAUGUCACUG
UGUCCUUUCUGCGUAGAGUAAAGGCUC>hsa-mir-892b MI0005538UGCAAUGCCCUACUCAGAAAGGUGCCAUUUA 40
UGUAGAUUUUAUGUCACUGGCUCUUUCUGGGUAGAGCAAGGCUCA>hsa-mir-920 MI0005712GUAGUUGUUCUA
CAGAAGACCUGGAUGUGUAGGAGCUAAGACACAUCCAGGGGAGCUGUGGAAGCAGUAACACG>hsa-mir-921 MI00
05713ACUAGUGAGGGACAGAACCAGGAUUCAGACUCAGGUCCAUGGGCCUGGAUCACUGG>hsa-mir-922 MI0005
714AUGGCGUUUCCUCUCCUUGUCCUGGACUGGGGUCAGACUGUGCCCCGAGGAGAAGCAGCAGAGAAUAGGACUACG
UCAU>hsa-mir-924 MI0005716AAUAGAGUCUUGUGAUGUCUUGCUUAAGGGCCAUCCAACCUAGAGUCUACAAC>
hsa-mir-933 MI0005755ACUUGGGUCAGUUCAGAGGUCCUCGGGGCGCGUCGAGUCAGCCGUGUGCGCAGGGAG
ACCUCUCCACCCACAGU>hsa-mir-934 MI0005756AGAAUAAAGGCUUCUGUCUACUACUGGAGACACUGGUAGU
AUAAAACCCAGAGUCUCCAGUAAUGGACGGGAGCCUUAUUUCU>hsa-mir-935 MI0005757GGCGGGGCGCGGGC
GGCAGUGGCGGGAGCGCCCCUCGGCCAUCUCCGUCUGCCAGUUAACGCUUCCGCUACCGCCGCCGCUCCCGCU>hsa
-mir-936 MI0005758UCAAGGCCACUGGGACAGUAGAGGGAGGAAUCGCAGAAUACAUCCAGGAGCAACUGAGAGA 50

CCUUGCUUCUACUUUACCAGGUCCUGCUGGCCCCAGA>hsa-mir-937 MI0005759AGCACUGCCCCCGGUGAGUCAG
GGUGGGGCUGGCCCCCUGCUUCGUGCCCAUCCGCGCUCUGACUCUCUGCCCACCUGCAGGAGCU>hsa-mir-938 MI0
005760GAAGGUGUACCAUGUGCCCUUAAAGGUGAAGCCAGUGCACCUCUAUGAACCGUGGUACACCUUUAAGAACUUGG
UAUGCCUUC>hsa-mir-939 MI0005761UGUGGGCAGGGCCCCUGGGGAGCUGAGGCUCUGGGGGUGGCCGGGGCUGA
CCCUGGGCCUCUGCUCUCCCAUGUGUCUGACCGCG>hsa-mir-940 MI0005762GUGAGGUGUGGGCCCCGGCCCCAGGA
GCGGGGCCUGGGCAGCCCCGUGUGUUGAGGAAGGAAGGCAGGGCCCCCGCUCUCCCGGGCCUGACCCCAC>hsa-mir-94
1-1 MI0005763CACGGAAGAGGACACACCCGGCUGUGUGGACAUGUGCCCAGGGCCCCGGGACAGCGCCACGGAAGAGG
ACGCACCCGGCUGUGUGCACAUGUGCCCAGGGCCCCGGGACAGCGCCACGG>hsa-mir-941-2 MI0005764CACGGA
AGAGGACGCACCCGGCUGUGUGCACAUGUGCCCAGGGCCCCGGGACAGCGCCACGGAAGAGGACGCACCCGGCUGUGUGCA
CAUGUGCCCAGGGCCCCGGGACAGCGCCACGG>hsa-mir-941-3 MI0005765CACGGAAGAGGACGCACCCGGCUGUGUGGACAUGUGCCCAGGGCCCCGGG
ACAGCGCCAUGG>hsa-mir-941-4 MI0005766CAUGGAAGAGGACGCACCCGGCUGUGUGCACAUGUGCCCAGGGC
CCGGGACAGCGCCACGGAAGAGGACGCACCCGGCUGUGUGCACAUGUGCCCAGGGCCCCGGGACAGCGCCACGG>hsa-mi
r-942 MI0005767AUUAGGAGAGUAUCUUCUCUGUUUUGGCCAUGUGUGUACUCACAGCCCCUCACACAUGGCCGAAA
CAGAGAAGUUACUUUCCUAAU>hsa-mir-943 MI0005768GGGACGUUCUGAGCUCGGGGUGGGGACGUUUGCCGG
UCACUGCUGCUGGCGCCUGACUGUUGCCGUCCUCCAGCCCCACUCAAAAGCAUCCC>hsa-mir-944 MI0005769G
UUCAGACACAUCUCAUCUGAUUAUACAAUAAUUCUAAAAUUGUAUAAAGAGAA
AUUAUUGUACAUCGGAUGAGCUGUGUCUGGGAU>hsa-mir-1178 MI0006271GCGUUGGCUGGCAGAGGAAGGGAA
GGGUCCAGGGUCAGCUGAGCAUGCCUCAGGUUGCUCACUGUUCUCCCCUAGAAUGUCAGGUGAUGU>hsa-mir-1179
MI0006272GGCUGGAAAAGGAAGAAGCAUUCUUAUUGGUUGGUGUAUUGCCUUGUCAACCAAUAAGAGGAUGCCA
UUUAUCCUUUUCUGACUAGCU>hsa-mir-1180 MI0006273GCUUGCUGGACCCACCCGGCCGGGAAUAGUCUCCUG
GUUGUUUCCGGCUCGCGUGGGUGUGUCGGCGGC>hsa-mir-1181 MI0006274UCCACUGCUGCCGCCGUCGCCGCC
ACCCGAGCCGGAGCGGGCUGGGCCGCCAAGGCAAGAUUGGUGACUACAGCGUGUGGG>hsa-mir-1182 MI0006275
GGGACUUGUCACUGCCUGUCUCCUCCUCUCCAGCAGCGACUGGAUUCUGGAGUCCAUCUAGAGGGUCUUGGGAGGGAUG
UGACUGUUGGGAAGCCC>hsa-mir-1183 MI0006276AUUAUCAAUUGCUCGGAGACACAGAACAUAAGAGAAGAC
AGGAGUUCACUGUAGGUGAUGGUGAGAGUGGGCAUGGAGCAGGAGUGCC>hsa-mir-1184-1 MI0006277CUUGCA
GAACGAGGUGAAGGAGGUGGUUCUGCUCAGCAGUCAACAGUGGCCACAUCUCCACCUGCAGCGACUUGAUGGUUCCGUG
UCCUUUUCGUGGG>hsa-mir-1184-2 MI0015971CUUGCAGAACGAGGUGAAGGAGGUGGUUCUGCUCAGCAGUCA
ACAGUGGCCACAUCUCCACCUGCAGCGACUUGAUGGUUCCGUGUCCUUUUCGUGGG>hsa-mir-1184-3 MI00159
72CUUGCAGAACGAGGUGAAGGAGGUGGUUCUGCUCAGCAGUCAACAGUGGCCACAUCUCCACCUGCAGCGACUUGAUGG
CUUCCGUGUCCUUUUCGUGGG>hsa-mir-1185-1 MI0003844UUUGGUACUUGAAGAGAGGAUACCCUUUGUAUGU
UCACUUGAUUAAUUGGCGAAUUAACAGGGGGAGACUCUUAUUUGCGUAUCAA>hsa-mir-1185-2 MI0003821UUU
GGUACUAAAAGAGAGGAUACCCUUUGUAUGUUCACUUGAUUAAUGGCGAAUUAACAGGGGGAGACUCUCAUUUGCGUAUC
AAA>hsa-mir-1193 MI0014205GUAGCUGAGGGGAUGGUAGACCGGUGACGUGCACUUAUUACGAUGUAGGUCA
CCCGUUUGACUAUCCACCAGCGCC>hsa-mir-1197 MI0006656ACUCCUGGUAUUUGAAGAUUGCGGUUGACCAUG
GUGUGUACGCUUUAUUUGAGCGUAGGACACAUGGUCUACUUCUCAAUAUCA>hsa-mir-1200 MI0006332UG
CUACUUCUCCUGAGCCAUCUUGAGCCUCAACUUGCCAGAGAGAUUGGUUCAGGAAUUUGUCAGGGGAUAGCC>hsa-m
ir-1202 MI0006334CCUGCUGCAGAGGUGCCAGCUGCAGUGGGGGAGGCACUGCCAGGGCUGCCCACUCUGCUUAGC
CAGCAGGUGCCAAAGAACAGG>hsa-mir-1203 MI0006335UCCUCCCCGGAGCCAGGAUGCAGCUCAAGCCACAGCA
GGGUGUUUAGCGCUCUUCAGUGGCUCAGAUUGUGGCGCUGGUGCAGG>hsa-mir-1204 MI0006337ACCUCGUGG
CCUGGUCUCCAUUAUUUGAGAUAGAUUAUCUUGGAGGUGAGGACGUGCCUCGUGGU>hsa-mir-1205 MI000633
8GAAGGCCUCUGCAGGGUUUGCUUUGAGGUACUUCUUCUGUCAACCCUGUUCUGGAGUCUGU>hsa-mir-1206 MI
0006339CAGUGUACAUGAUGAUUUAAAGCUCUUGCAGUAGGUUUUUGCAAGCUAGUGAACGUG>hsa-mir-1207
MI0006340GCAGGGCUGGCAGGGAGGCUGGGAGGGGCGUGGUGGUCUGGUAGUGGGCAUCAGCUGGCCCUCAUUUCUU
AAGACAGCACUUCUGU>hsa-mir-1208 MI0006341CACCGGCAGAAUCACUGUUCAGACAGGCGGAGACGGGUCUU
UCUCGCCCUCUGAUGAGUACCCACUGUGGUGG>hsa-mir-1224 MI0003764GUGAGGACUCGGGAGGUGGAGGGUG
GUGCCGCCGGGGCCGGGCGCUGUUACAGCUCGCUUCUCCCCCACCUCUUCUCCUCAG>hsa-mir-1225 MI0006
311GUGGGUACGGCCCAGUGGGGGGAGAGGGACAGCCUUGGCUCUGCCAGGGUGCAGCCGACUGACUGAGCCCCU
GUGCCGCCCCAG>hsa-mir-1226 MI0006313GUGAGGGCAUGCAGGCCUGGAUGGGGCAGCUGGGAUGGUCCAAA
AGGGUGGCCUCACCAGCCCUGUGUCCCUAG>hsa-mir-1227 MI0006316GUGGGGCCAGGCGGUGGUGGGCACUG

CUGGGGUGGGCACAGCAGCCAUGCAGAGCGGGCAUUUGACCCCGUGCCACCCUUUUCCCCAG>hsa-mir-1228 MI0006318UGGGCGGGGCGAGGUGUGUGGGUGGGUGGCCUGCGGUGAGCAGGGCCUCACACCUGCCUCGCCCCCAG>hsa-mir-1229 MI0006319GUGGGUAGGGUUUGGGGAGAGCGUGGGCUGGGGUUCAGGGACACCCUCUCACCACUGCCUCCACAG>hsa-mir-1231 MI0006321GUCAGUGUCUGGGCGGACAGCUGCAGGAAAAGGGAAGACCAAGGCUUGCUGUCUGUCCAGUCUGCCACCCUACCCUGUCUGUUCUUGCCACAG>hsa-mir-1233-1 MI0006323GUGAGUGGGAAGGCCAGGGCACGGCAGGGGAGCUGCAGGGCUAUGGGAGGGGCCCCAGCGUCUGAGCCCUGUCCUCCCGAG>hsa-mir-1233-2 MI0015973GUGAGUGGGAGGCCAGGGCACGGCAGGGGAGCUGCAGGGCUAUGGGAGGGGCCCCAGCGUCUGAGCCCUGUCCUCCCGAG>hsa-mir-1234 MI0006324GUGAGUGUGGGUGGCUGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGACGGCUUGGGCCUGCCUAGUCGGCCUGACCACCCACCCACAG>hsa-mir-1236 MI0006326GUGAGUGACAGGGGAAUUGGGGAUGGACUGGAAGUGGGCAGCAUGGAGCUGACCUUCAUCAUGGCUUGGCCAACAUAAUGCCUCUUCCCCUUGUCUCUCCAG>hsa-mir-1237 MI0006327UGGGAGGGCCAGGCGCGGGCAGGGGUGGGGUGGCAGAGCGCUGUCCCGGGGGCGGGGCCGAAGCGCGGCGACCGUAACUCCUUCUGCUCCGUCCCCCAG>hsa-mir-1238 MI0006328GUGAGUGGGAGCCCCAGUGUGUGGUUGGGGCCAUGGCGGGUGGGCAGCCCAGCCUCUGAGCCUUCUCGUCUGUCUGCCCCAG>hsa-mir-1243 MI0006373CUAAAACUGGAUCAAUUAUAGGAGUGAAAUAAGGUCCAUCUCCUGCCUAUUUAUUAUUUGCUUUGGUAUAAAUCAUUUUUAAAAAGAACC>hsa-mir-1244-1 MI0006379AUCUUAUCCGAGCAUCCAGUAACUUUUUUGUGUAUGUACUUAAGUAGUUGGUUUGUAUGAGAUGGUUAAAAA>hsa-mir-1244-2 MI0015974AUCUUAUCCGAGCAUCCAGUAACUUUUUUGUGUAUGUACUUAAGUAGUUGGUUUGUAUGAGAUGGUUAAAAA>hsa-mir-1244-3 MI0015975AUCUUAUCCGAGCAUCCAGUAACUUUUUUGUGUAUGUACUUAAGUAGUUGGUUUGUAUGAGAUGGUUAAAAA>hsa-mir-1245a MI0006380AUUUUAUGUAUAGGCCUUUAGAUAUCUGAUGUUGAAUACUCUUUAAGUGAUCUAAAGGCCUACAUAUAAA>hsa-mir-1245b MI0017431UUUAUAUGUAGGCCUUUAGAUCACUAAAAGAGUAUUAACAUCAGAUGAUCUAAAGGCCUAUACAUA>hsa-mir-1246 MI0006381UGUAUCCUUGAAUGGAUUUUUGGAGCAGGAGUGGACACCUGACCCAAAGGAAAUCAAUCCAAGGCUAGCAAU>hsa-mir-1247 MI0006382CCGCUUGCCUCGCCCAGCGCAGCCCCGGCCGCUUGGGCGCACCCGUCCCGUUCGUCCCCGGACGUUGCUCUCUACCCCGGAACGUCGAGACUGGAGCGCCGAACUGAGCCACCUUCGCGGACCCGAGAGCGGCG>hsa-mir-1248 MI0006383UUUACCUUCUUGUAUAAGCACUGUGCUAAAAUUGCAGACACUAGGACCAUGUCUUGGUUUUUGCAAUAAUGCUAGCAGAGUACACACAAGAAGAAAAGUAACAGCA>hsa-mir-1249 MI0006384GGGAGGAGGGAGGAGAUGGGCCAAGUCCCUUGGCUUGGAACGCCCUCUCCCCCUUCUUCACCUG>hsa-mir-1250 MI0006385CUGUCCCGCUGGCCUGGCAGGUGACGGUGCUGGAUGUGGCCUUUUUGCCUUUUUCUAAAGGCCACAUUUCCAGCCAUUCAACCUUCCAGAGCCUCUGAAGUGGCCACAGGC>hsa-mir-1251 MI0006386GUGGACUCUAGCUGCCAAAGGCGCUUCUCCUUGAAGCAGAGCGCUUUGCUCAGCCAGUGUAGACAUGGC>hsa-mir-1252 MI0006434AGAAAGAAGGAAAUUGAAUUCAUUUAGAAAAGAGAAUCCAAAUGAGCUUAAUUCUUUUUCU>hsa-mir-1253 MI0006387AGCAGCAAGAGAUAGAAUCCAAAAGAGAAAGAUAGCCUUGCAGAUUGGACUGCUAAAUGCAGGCUGAUCUUCUCCCCUUUGGAUUCUCUUAUGAGAAGCCA>hsa-mir-1254-1 MI0006388GGUGGGAGGAUUGCUUGAGCCUGGAAGCUGGAGCCUGCAGUGAGCUAUGAUCUAGUCCUGUACUCUAGCCUGGCA>hsa-mir-1255a MI0006389AUUGGAAAUCCUUUGAGUUGCUUCUCAAGGAUGAGCAAAGAAAGUAGAUUUUUGAUAUCAAAGAAACUAUCUUCUUUGCUCAUCCUUGAGAAGCAACUCCUUAUCCAUA>hsa-mir-1255b-1 MI0006435UACGGAUGAGCAAAGAAAGUGGUUUCUAAAAUGGAAUCUACUCUUUGUGAAGAUGCUGUGAA>hsa-mir-1255b-2 MI0006436UCUUAACGGAUGAGCAAAGAAAGUGGUUUGCGCCUCAAGAAACCACUUUCUUGCUCAUCCAUAAGGA>hsa-mir-1256 MI0006390AGUCAGCCUGUUGAAGCUUUGAAGCUUUGAUGCCAGGCAUUGACUUCUCACUAGCUGUGAAAUGCCUAGCUAAAAGAGAAGUCAUUGCAUGACAUCUUGUUCAAUAGAUGGCUUGUUA>hsa-mir-1257 MI0006391GCCCUGGGCUUGUGCUUGGGGAGUGAAUGAUGGGUUCUGACCCCCAUGCACCCCUGUGGGCCCCUGGCAUCACUGGCCCCAUCCUACCCCCUGCCAACCACGCUUGCCCUGUGCCU>hsa-mir-1258 MI0006392CUGUGGCUUCCAGACCUAAUCCUAAUCCUGCGAGUCCUGGAGUUAGGAUUAGGUCUGGAAGCCACAGGA>hsa-mir-1260a MI0006394ACCUUCCAGCUCAUCCACCUCUGCCACCAAAACACUCAUCGCGGGGUCAGAGGGAGUGCCAAAAAAGGUAA>hsa-mir-1260b MI0014197UCUCCGUUUAUCCACCACUGCCACCAUUAUUGCUACUGUUCAGCAGGUGCUGCUGGUGUGAUGGUGAUAGUCUGGUGGGGGCGGUGG>hsa-mir-1261 MI0006396UGCUAUGGAUAAGGCUUUGGCUUAUGGGGAUAUUGUGGUUGAUCUGUUCUAUCCAGAUAGACUGAAACUUCUCCAUAAGCAGC>hsa-mir-1262 MI0006397AUCUACAAUGGUGAUGGGUGAAUUUGUAGAAGGAUGAAAGUCAAAAGAAUCCUUCUGGGAACUAAUUUUUGGCCUUAACAAGAAUUGUGAU>hsa-mir-1263 MI0006398CUACCCCAAAAUUGGUACCCUGGCAUACUGAGUAUUUAAUACUG

GCAUACUCAGUAUGCCAUGUUGCCAUAUUUUGGGGUAGCA>hsa-mir-1264 MI0003758AGGUCCUCAUAAGUAU
 UUGUUGAAAGAAUAAAUAACCAACAAGUCUUAUUUGAGCACCUGUUAUGUG>hsa-mir-1265 MI0006401AUGGU
 UUGGGACUCAGGAUGUGGUCAAGUGUUGUUAAGGCAUGUUCAGGAACAAUACUUGACCACAUUUUGAAUUCCAAACCAUA
 U>hsa-mir-1266 MI0006403ACAGGUAGUGUCCUCAGGGCUGUAGAACAGGGCUGGGAAUACUAAAAGCCUCUGUC
 UAUGCCUGAGGGACACUGAGCAUGUCA>hsa-mir-1267 MI0006404CUCCCAAUCUCCUGUUGAAGUGUAAUCC
 CCACCUCAGCAUUGGGGAUUAUUAACAUAUGAGAUUUGGAUGAGGA>hsa-mir-1268a MI0006405UAGCCGG
 GCGUGGUGGUGGGGGCCUGUGGUCCAGCUACUUGGAGGCUGAG>hsa-mir-1268b MI0016748ACCCGGGCGUG
 GUGGUGGGGUGGGUGCCUGUAAUUCAGCUAGUUGGGA>hsa-mir-1269a MI0006406UGGAUUGCCUAGACCAG
 GGAAGCCAGUUGGCAUGGCUCAGUCCAAGUCUGACCACCUGAGGAAUCCUGGACUGAGCCGUGCUACUGGCUUCCUGG
 UCUCACAG>hsa-mir-1269b MI0016888UGAGGUUUCUGGACUGAGCCAUGCUACUGGCUUCUCUGGUUCUCCAGC
 UUAACAGAUUGGCUUAUCAUGGGACCUCU>hsa-mir-1270-1 MI0006407CACAGAGUUAUACUGGAGAUUAUGGAAGA
 GCUGUGUUGGGUAUAAGUAACAGGCUUUUCUUUAUCUUCUAUGUGGCUCUUUGCA>hsa-mir-1270-2 MI0015976
 CACAGAGUUAUACUGGAGAUUAUGGAAGAGCUGUGUUGGGUAUAAGUAACAGGCUUUUUCUUUAUCUUCUAUGUGGCUCUU
 GCA>hsa-mir-1271 MI0003814CACCCAGAUACAGUCUUGGCACCUAGCAAGCACUCAGUAAAUAUUUGUUGAGUG
 CCUGCUAUGUGCCAGGCAUUGUGCUGAGGGCU>hsa-mir-1272 MI0006408CCAGAUACAGAUUCUGGGUGCGAUGAU
 GAUGGCAGCAAAUUCUGAAAACGUGCUCAGUGUCUUUAUAACAGGAAAGCCGUAACUAGAAAUGUAGGCUCGAGCUCG
 UGUGCUCUGUGGUCUGGGCUGGUA>hsa-mir-1273a MI0006409UGAGGCAGGAGAAUUGCUUGAACCCGGGUGGU
 GGAGGUUGCAGUGAGCCAAGAUUGCGCCACUGCACUCCAGCCUGGGCGACAAAGCAAGACUCUUUCUUGGA>hsa-mir-
 1273c MI0014171UGCAGCCUGGGCGACAAAACGAGACCCUGUCUUUUUUUUUUUCUGAGACAGAGUCUCGUUCUGUU
 GCCCAAGCUGGA>hsa-mir-1273d MI0014254GAAUCGCUUGAACCCAUAGAGGUUGAGGCUCGAGUGAGCCAAGAU
 CGUGCCACUGCACUUCAGCCUGGGUGACAAGAGCGAAACUUC>hsa-mir-1273e MI0016059UGAGGCAGGAGAAU
 UGCUUGAACCCAGGAAGUGGAGGCUCGAGUGAGCCGAGAUUCGAGCCACUGUACUCCAGCCUGGGUGACACAGCGAGACUC
 CAGUCUCA>hsa-mir-1273f MI0018002AGGUGGGAGGAUUGCUUGAGCCUGGGAGAUUGGAGGUUGCAGUGAGCUG
 AGAUCACGCAACUGCACCCCCAGCCUGGGCCAUAAGAGUCAGUCCUUGUCUC>hsa-mir-1273g MI0018003GAGGU
 GGGAGGAUUGCUUGAGUCAGGGUGGUUGAGGCUCGAGUAAAGUUGAUAUACCACUGCACUCCAGCCUGAGUGACAGAG
 CAAGACCUUGUCUCA>hsa-mir-1275 MI0006415CCUCUGUGAGAAAGGGUGUGGGGGAGAGGCUCUCUUGUGUCU
 GUAAGUAUGCCAAACUUAUUUCCCCAAGGCAGAGGGA>hsa-mir-1276 MI0006416CCCCAGCUAGGUAAAAGAGC
 CCUGUGGAGACACCUGGAUUCAGAGAACAUGUCUCCACUGAGCACUUGGGCCUUGAUGGCGGCUC>hsa-mir-1277 MI
 0006419ACCUCCTAAAUAUAUAUAUAUAUGUACGUAUGUGUAUAUAAUUGUAUACGUAUAUAUAUGUAUUUUUGGUG
 GGUUU>hsa-mir-1278 MI0006425AUUUGCUCAUAGAUAUAGCAUAGUACUCCAGAACUCAUUAAGUUGGUAG
 UACUGUGCAUAUCAUCUAUGAGCGAAUAG>hsa-mir-1279 MI0006426AUUAUUCACAAAAAUCAUAUUGCUUCUU
 UCUAAUGCCAAAGAAAGAGUAUAAGAACUCC>hsa-mir-1280 MI0006437UCUGUCCACCGCUGCCACCCUC
 CCCUCUGCCUCAGUGUGCCAGGCAUCAGCACUCACUCACAGAGGCAGGCUGGAUGGCGGGUGGGACAACAG>hsa-mir-
 1281 MI0006428AGGGGGCACCGGGAGGAGGUGAGUGUCUCUUGUCGCCUCCUCCUCCCCCUU>hsa-mir-128
 2 MI0006429CCUUCUUCUCGUUUGCCUUUUUCUGCUUCUGCUGCAUGAUCUCCGAGUCCUGGGGGUAGAGAUGAUGG
 GGCACUGGGAGGUACCAGAGGGCAAAAAGGAC>hsa-mir-1283-1 MI0003832CUAAGCUAUGAGUCUACAAAGG
 AAAGCGCUUUCUGUUGUCAGAAAAGAGAAAAGCGCUUCCCUUUUGAGGGUUAACGGUUUGAGAA>hsa-mir-1283-2
 MI0006430CUAAGCUGUGAGUCUACAAAGGAAAGCGCUUUCUGUUGUCUGAAAGAAAAGAAAUCGCUUCCCUUUGGAG
 UGUUACGGUUUGAGAA>hsa-mir-1284 MI0006431AUUUUGAUUAUAAGCCAGUUUAAUGUUUUCUAUACAGACC
 CUGGCUUUUCUAAAAUUUAUAUAUUGGAAAGCCCAUGUUUGUAUUGGAAACUGCUGGUUUUCUUAUACUGAAAAUCU>
 hsa-mir-1285-1 MI0006346UGUAGAGAUAGGAUCUCACUUGUUGCCCAGGCUGGUCUCAAACUCCUGGUCUGGG
 CAACAAAGUGAGACCUUAUCUCUACAAG>hsa-mir-1285-2 M
 I0006347UUUGGGAGGCCGAGGCUGGUGCAUCACUUGAGCCCAGCAAUUUGAGACCAAUCUGGGCAACAAAGUGAGACC
 UCCGUCUCUACAAAGA>hsa-mir-1286 MI0006348UGUCCUCUGGGGACUCAGCUUGCUCUGGCUCUGGAUUGAA
 UUAGCUGCAGGACCAAGAUGAGCCCUUGGUGGAGACA>hsa-mir-1287 MI0006349GUUGUGCUGUCCAGGUGCUG
 GAUCAGUGGUUCGAGUCUGAGCCUUUAAAAGCCACUCUAGCCACAGAUUGCAGUGAUUGGAGCCAUGACAA>hsa-mir-1
 288 MI0006432GAGGGUGUUGAUCAGCAGAUACAGGACUGUAACUCACCAUAGUGGUGGACUGCCCUGAUCUGGAGACC
 ACUGCCUU>hsa-mir-1289-1 MI0006350UUCUCAAUUUUUAGUAGGAAUAAAAACAAAACUGGUAAAUGCAGAC
 UCUUGGUUUCACCCCCAGAGAAUCCCUAAAACGGGGUGGAGUCCAGGAAUCUGCAUUUAGAAAAGUACCCAGGGUGAU
 UCUGAUAAUUGGGAACA>hsa-mir-1289-2 MI0006351CCACGGUCCUAGUUAAAAAGGCACAUUCCUAGACCCUG

0006657CCUGAAGAGGUGCAUGAAGCCUGGUCCUGCCCUCACUGGGAACCCCUUCCCUUGGGUACCAGACAGAAUUC
 UAUGCACUUUCCUGGAGGCUCCA>hsa-mir-1343 MI0017320GCUGGCGUCGGUGCUGGGGAGCGGCCCCCGGGUG
 GGCCUCUGCUCUGGCCCCUCCUGGGGCGGCACUCUCGCUCUGGGCCCGC>hsa-mir-1468 MI0003782GGUGGGU
 GGUUUCUCCGUUUGCCUGUUUCGCGUAUGUGCAUUAACUCAUUCUCAGCAAAUAAGCAAAUUGAAAAUUCGUCCAUC>
 hsa-mir-1469 MI0007074CUCGGCGCGGGGCGCGGGCUCGGGUUGGGGCGAGCCAACGCCGGGG>hsa-mir-14
 70 MI0007075GCCCCUCCGCGCGUGCACCCTGGGGCAGGAGACCCCGCGGGACGCGCCGAGGUAGGGGGGAC>hsa-mi
 r-1471 MI0007076GCCCCGCGUGUGGAGCCAGGUGUAGAGGCGGAGCACAGCUGGCUCUAAUUGAGGGGGC>hsa-mi
 r-1537 MI0007258ACAGCUGUAAUAGUCAGUUUCUGUCCUUGCCACACAGAAAAACCGUCUAGUUACAGUUUG>hs
 a-mir-1538 MI0007259GGGAACAGCAGCAACAUGGGCCUCGCUUCCUGCCGGCGCGGGCCCGGGCUGCUGCUGUCC
 U>hsa-mir-1539 MI0007260GGCUCUGCGGCCUGCAGGUAGCGGAAAGUCCUGCGCGUCCAGAUGCC>hsa-m
 ir-1587 MI0016905UUUGGGCUGGGCUGGGUUGGGCAGUUUUCUGCUGGACUCACCUGUGACCAGC>hsa-mir-1
 825 MI0008193AGAGACUGGGGUGCUGGGCUCUUUAGACUAGGACUCCAGUGCCCUCCUCUCC>hsa-mir-1827
 MI0008195UCAGCAGCACAGCCUUCAGCCUAAAAGCAAUAGAAAGCCUCUGAAAGGCUGAGGCAGUAGAUUGAAU>hsa-
 mir-1908 MI0008329CGGGAUUGCCGCGCGGGGACGGCGAUUGGUCCGUUAGUGUGGUGCCACCGGCCCGCGGCUC
 CGCCCCGGCCCCCGCCCC>hsa-mir-1909 MI0008330CAUCCAGGACAAUGGUGAGUGCCGGUGCCUGCCUGGGG
 CCGUCCUGCGCAGGGGCGGGUGCUCACCGCAUCUGCCCC>hsa-mir-1910 MI0008331UGUCCCUUCAGCCAGU
 CCUGUGCCUGCCGCCUUUGUGCUGUCCUUGGAGGGAGGCAGAAAGCAGGAUGACAAUGAGGGCAA>hsa-mir-1911 MI
 0008332UCGGCAUCUGCUGAGUACCGCAUGUCUGUUGGGCAUCCACAGUCUCCACCAGGCAUUGUGGUCUCCGCUGA
 CGCUUUG>hsa-mir-1912 MI0008333CUCUAGGAUGUGCUCUAGCAUUGGCGUGUGUAUAGUAUUAUCAAUACCC
 AGAGCAUGCAGUGUGAACAUAAUAGAGAUU>hsa-mir-1913 MI0008334ACCUCUACCUCCCGGCAGAGGAGGCUG
 CAGAGGCUGGCUUUCCAAAACUCUGCCCCCUCGCGUCUGCCAAGUGGCUGGU>hsa-mir-1914 MI0008335CGUG
 UGAGCCCGCCUGUGCCCGGCCACUUCUGCUUCCUCUAGCGCAGGAGGGGUCCCGCACUGGGAGGGGGCCUCAC>hsa
 -mir-1915 MI0008336UGAGAGGCCGCACCUUGCCUUGCUGCCCGGGCCGUGCACCCGUGGGCCCCAGGGCGACGCG
 GCGGGGGCGGCCCUAGCGA>hsa-mir-1972-1 MI0009982UAUAGGCAUGUGCCACCACACCUGGCUUAAAUGUGU
 CAUUUAAAAUUCAGGCCAGGCACAGUGGCUCAUGCCUGUA>hsa-mir-1972-2 MI0015977UAUAGGCAUGUGCC
 ACCACACCUGGCUUAAAUGUGUCAUUUAAAAUUCAGGCCAGGCACAGUGGCUCAUGCCUGUA>hsa-mir-1973 MI0
 009983UAUGUUAACGGCCAUGGUAUCCUGACCGUGCAAAGGUAGCAUA>hsa-mir-1976 MI0009986GCAGCAA
 GGAAGGCAGGGUCCUAAGGUGUGUCCUCCUGCCCUCCUUGCUGU>hsa-mir-2052 MI0010486CUGUUUUGAUAA
 CAGUAAUGUCCUUUAGUUCAAAAGUUAACAGCUAUCAAAACAA>hsa-mir-2053 MI0010487CUUGCCAUGUAAU
 ACAGAUUUAAUUAACAUUUGCAACCUGUGAAGAUGCAAAACUUUAAGUGUAAUUAACCUUAUUUACAUAGCAAG>hs
 a-mir-2054 MI0010488CUGUAAUUAUUUUUUUUUUUUUUUUCUCUAUCAUUAAAAAUGUAUUACAG>hsa-mir-21
 10 MI0010629CAGGGGUUUGGGGAAACGGCCGUGAGUGAGGCGUGCGGUGUGUUUCUACCCGCGGUCUUUUCCUCCC
 ACUCUUG>hsa-mir-2113 MI0003939UUUUCAAAGCAAUGUGUGACAGGUACAGGGACAAAUCCCGUUAUAAGUA
 AGAGGAUUUGUGCUUGGCUCUGUCACAUGCCACUUUGAAAA>hsa-mir-2114 MI0010633CCUCCAUGCUCUAGU
 CCCUCCUUGAAGCGGUCGGAUAAUCACAUGACGAGCCUCAAGCAAGGGACUUAAGCUGGUGG>hsa-mir-2115 MI
 0010634ACUGUCAUCCACUGCUUCCAGCUUCCAUGACUCCUGAUGGAGGAAUCACAUGAAUUAUCAGAAUUAUGGA
 GGCUAGAAGCAGUAUGAGGAUCAUUUA>hsa-mir-2116 MI0010635GACCUAGGCUAGGGGUUCUUAAGCAUAGGAG
 GUCUUCUCCAUUGCUAAGAAGUCCUCCUAGCCAAAGACUCCAGACUAGGA>hsa-mir-2117 MI0010636GCUCUGA
 UUUACUUCUGUCCGGCAUGGUGAACAGCAGGAUUGGCUGUAGCUGUUCUUGCCAAGGACAGAUUCUGAUCU>hsa-mi
 r-2276 MI0011282GUGUUCUCCAGUCCGCCCUCUGUCACCUUGCAGACGGCUUUCUCCGAAUGUCUGCAAGUGU
 CAGAGGCGAGGAGUGGCAGCUGCAU>hsa-mir-2277 MI0011284GUGCUUCCUGCGGGCUGAGCGCGGGCUGAGCG
 CUGCCAGUCAGCGCUCACAUUAAGGUGACAGCGCCUGCCUGGCUCGGCCGGCGAAGCUC>hsa-mir-2278 MI001
 1285GUGCUGCAGGUGUUGGAGAGCAGUGUGUUGCCUGGGGACUGUGUGGACUGGUAUACCCAGACAGCUUGCAGUG
 ACUCCAGACCCUGCCGUCAU>hsa-mir-2355 MI0015873CAGACGUGUCAUCCCCAGAUACAAUGGACAAUUAUGCU
 AUUAUAAUCGUUAGGCAUUGUCCUUGCUGUUUGGAGAUAAUACUGCUGAC>hsa-mir-2392 MI0016870AUGGUCC
 CUCCCAAUCCAGCCAUCCUCAGACCAGGUGGCUCUCCGAGCCACCCAGGCUGUAGGAUGGGGGUGAGAGGUGCUAG>hs
 a-mir-2467 MI0017432GGACAGGACCCUGAGGCUCUGUAGCCUUGGCUCUGGGUCCUGCUCCUAGAGCAGAGGC
 AGAGAGGCUCAGGGUCUGUCU>hsa-mir-2681 MI0012062GCCCCCUUUUACGCAUUUGUGUUUUACCACCUCCA
 GGAGACUGCCCAAAGACUCUUCAGUAUCAUGGAGUUGGUAAGCACAGAUUGCAUGAAUUAACAGUG>hsa-mir-26
 82 MI0012063ACCUUCCUGAAAGAGGUUGGGGACGGCAGUGACUGUUCAGACGUCCAAUCUCUUUGGGACGCCUCUUC

AGCGCUGUCUCCCCUGCCUCUGCCUUUAGGACGAGUCUCAA>hsa-mir-2861 MI0013006GGCGCCUCUGCAGCU
CCGGCUCCCCCUGGCCUCUGGGAAACUACAAGUCCCAGGGGGCCUGGCGGUGGGCGGCGGGCGGAAGAGGCGGGG>hsa-
mir-2909 MI0013083GGUGUUAGGGCCAACAUUCUUGGUCUUUCCCCUGUGGUCCCAAGAUGGCUGUUGCAACUUA
ACGCCAU>hsa-mir-2964a MI0017299GGAGCUCAGCCACAGAUUGCCAGCCACAAUUCUCGGUUGGCCCGAGACU
CGUACAAGAAUUGCGUUUGGACAAUCAGUGGCGAAGCCC>hsa-mir-3064 MI0017375GGUCUGGCUGUUGUGGUG
UGCAAAACUCCGUACAUUGCUAUUUUGCCACACUGCAACACCUUACAG>hsa-mir-3065 MI0014228CUGCCUCU
UCAACAAAAUCACUGAUGCUGGAGUCGCCUGAGUCAUCACUCAGCACCAGGAUAUUGUUGGAGAGGACAG>hsa-mir-3
074 MI0014181GCUCGACUCCUGUCCUGCUGAACUGAGCCAGUGUGUAAAAUGAGAACUGAUUACAGCUCAGUAGGC
ACCGGAGGGCGGGU>hsa-mir-3115 MI0014127UCUGAAUAUGGGUUUACUAGUUGGUGGUGAAUUCAGAGUCGC
CAACUAUUAGGCCUUUAUGUCCAGA>hsa-mir-3116-1 MI0014128CUUUAUUGAGUCCCUACUAUGUUCAGGCA
CUGGGUAUCGUAGGUGCCUGGAACAUAUGAGGGACUCAAUAAAG>hsa-mir-3116-2 MI0014129UAUUGAGUCCC
UACUAUGUUCAGGCACCUACGAUACCCAGUGCCUGGAACAUAUGAGGGACUCAAU>hsa-mir-3117 MI0014130
CCCUAAAAGGCCAGACACUAUACGAGUCAUAUAAAGGGAAGGCAUUAUAGGACUCAUAUAGUGCCAGGUGUUUUGUGG>h
sa-mir-3118-1 MI0014131CACACUACAAUAAUUUUAUAAUGCAAUCACACAUAUACUAUGUGACUGCAUUAU
GAAAAUUCUUGUAGUGUG>hsa-mir-3118-2 MI0014132ACACUACAAUAAUUUUAUAAUGCAAUCACACAUAU
CACUAUGUGACUGCAUUAUGAAAAUUCUUGUAGUGU>hsa-mir-3118-3 MI0014133CACACUACAAUAAUUUUA
UAAUGCAAUCACACAUAUACUAUGUGACUGCAUUAUGAAAAUUCUUGUA
GUGUG>hsa-mir-3118-4 MI0014207CAUACUACAAUAAUUUUAUAAUGCAAUCACACACAUAUACCCGUGUGACU
GCAUUAUGAAAAUUCUUCUAGUGUG>hsa-mir-3118-5 MI0014243CACACAUAACAAUAAUUAUUAUAAUGCAAUC
ACACACAUAUACCAUGUGACUGCAUUAUGAAAAUUCUUCUAGUGUG>hsa-mir-3118-6 MI0015981CAUACUACA
AUAAUUUUAUAAUGCAAUCACACACAUAUACCCGUGUGACUGCAUUAUGAAAAUUCUUCUAGUGUG>hsa-mir-3119-
1 MI0014134AUUAAUCUCUGGCUUUUAACUUUGAUGGCAAAGGGGUAGCUAAACAAUCUAUGUCUUUGCCAUCAAAGUU
AAAAGCCAUAGUUAU>hsa-mir-3119-2 MI0014135AUUAAUCUAGGCUUUUAACUUUGAUGGCAAAGACAUAAGA
UUGUUUAGCUACCCCUUUGCCAUCAAAGUUAAAAGCCAGAGUUAU>hsa-mir-3120 MI0014136GUCAUGUGACU
GCCUGUCUGUGCCUGCUGUACAGGUGAGCGGAUGUUCUGCACAGCAAGUGUAGACAGGCAGACACAUGAC>hsa-mir-3
121 MI0014137AAAUGGUUAUGUCCUUUGCCUAUUCUAUUUAAGACACCCUGUACCUUAAAAUAGAGUAGGCAAAGGAC
AGAAACAUAU>hsa-mir-3122 MI0014138ACCAGCUCUGUUGGGACAAGAGGACGGUCUUCUUUGGAAGGAAGAC
CAUCAUCUUGUCCGAAGAGAGCUGGU>hsa-mir-3123 MI0014139AUGGAUUUGAUUGAAUGAUUCUCCCAUUAUCC
ACAUGGAGAGUGGAGCCCAGAGAAUUGUUUAAUCAUGUAUCCA>hsa-mir-3124 MI0014140GCGGGCUUCGCGG
GCGAAGGCAAAGUCGAUUUCCAAAAAGUGACUUUCCUCACUCCCGUGAAGUCGGC>hsa-mir-3125 MI0014142GAG
AAUGGGUAGAGGAAGCUGUGGAGAGAACUCACGGUGCCUGUGGUUCGAGAUCCCCGCCUUCUCCUCCUUUCCUC>hsa-
mir-3126 MI0014143AUGAUUAUAGAGGGACAGAUGCCAGAAGCACUGGUUAUGAUUUGCAUCUGGCAUCCGUCAC
ACAGAUAAUUAU>hsa-mir-3127 MI0014144GGCCAGGCCCAUCAGGGCUUGUGGAAUGGGAAGGAGAAGGGACGC
UUCUUUUCUGCAGGCCUGCUGGGUGUGGCU>hsa-mir-3128 MI0014145UUCUUCUGGCAAGUAAAAAACUCUCA
UUUCCCUAAAAAUGAGAGUUUUUACUUGCAAUAGGAA>hsa-mir-3129 MI0014146GUACUUGGGCAGUAGUG
UAGAGAUUGGUUUGCCUGUAAUUGAAUCAAACUAAUCUCUACACUGCUGCCCAAGAGC>hsa-mir-3130-1 MI001
4147CUUGUCAUGUCUUAUCCAGUCUCCGGUGCAGCCUGUUGUCAAGGUCGACCCGAGACUGGGUAAAGACAUGACAAG>
hsa-mir-3130-2 MI0014148CUUGUCAUGUCUUAUCCAGUCUCCGGUGCAGCCUUGACAACAGGCUGCACC GGAGA
CUGGGUAAAGACAUGACAAG>hsa-mir-3131 MI0014151GAGUCGAGGACUGGUGGAAGGGCCUUUCCCCUCAGACC
AAGGCCCUGGCCCAGCUUCUUCUC>hsa-mir-3132 MI0014152GGUGGGAUGGGUAGAGAAGGAGCUCAGAGGAC
GGUGCGCCUUGUUUCCCUUGAGCCCUCUUCUCAUCCACC>hsa-mir-3133 MI0014153CAGAAAUUGUAAAG
AACUCUUAUAAACCAUAGUAAAAAGACAACCUUGUAGUUUUAAGAGUUCUUUAUUAUUCUG>hsa-mir-3134 MI
0014155UGUAUCCAAUGUGUAGUCUUUAUCCUCACAUUGGAGUAAAAUUAUGAUGGAUAAAGACUACAUAUUGGGUAC
A>hsa-mir-3135a MI0014156UCACUUUGGUGCCUAGGCUGAGACUGCAGUGGUGCAAUCUCAGUUCACUGCAGCC
UUGACCUCUGGGCUCAGGUGA>hsa-mir-3135b MI0016809UGCCCAGGCUGGAGCGAGUGCAGUGGUGCAGUCA
GUCCUAGCUCACUGCAGCCUCGAACUCCUGGGCU>hsa-mir-3136 MI0014158AAUUAUGAAACUGACUGAAUAGGU
AGGGUCAUUUUUCUGUGACUGCACAUGGCCCAACCUAUUCAGUUAGUCCAUAU>hsa-mir-3137 MI0014160UA
CAGGUCUGUAGCCUGGGAGCAAUGGGGUGUAUGGUAUAGGGUAGCCUCGUCUCCUGGGCUACAAACCUUGUA>hsa-mi
r-3138 MI0014161CCUCCUCGGCACUUCUCCCCACCUACUGCCCGGUGCCCAAGACUGUGGACAGUGAGGUAG
AGGGAGUGCCGAGGAGG>hsa-mir-3139 MI0014162GGCUCAGAGUAGGAGCUAACAGAUGCCUGUUGACUGAA

UAAUAAACAGGUAUCGCAGGAGCUUUUGUUAUGUGCC>hsa-mir-3140 MI0014163CCUCUUGAGGUACCUGAAUU
ACCAAAAGCUUUUAUGUAUUCUGAAGUUAUUGAAAAUAAGAGCUUUUGGGAUUCAGGUAGUUCAGGAGUG>hsa-mir-3
141 MI0014165UCACCCGGUGAGGGCGGGUGGAGGAGGGGUCCCCACCAUCAGCCUUCACUGGGACGGGA>hsa-m
ir-3142 MI0014166UUCAGAAAAGCCUUUCUGAACCUUCAGAAAAGCGUCUGAAUCUUCAGAAAAGCCUUUCUGAAC
CUUCAGAAAAGGCGUCUGAA>hsa-mir-3143 MI0014167UAGAUACAUAUUGUAAAAGCGCUUCUUCGCGGUUGGGCU
GGAGCAACUCUUUACAAUGUUUCUA>hsa-mir-3144 MI0014169AACUACACUUUAAAGGGGACCAAGAGAUUAU
AGAUAUCAGCUACCUAUUAUACCGUUCGGUCUCUUUAAAGUGUAGUU>hsa-mir-3145 MI0014170UAUAUGAGUU
CAACUCCAAACACUCAAACUCUAUUGUUGAAUGGAAUGAGAUUUUUGAGUGUUUGGAAUUGAACUCGUUA>hsa-mir
-3146 MI0014172GCUAAGUCCCUUCUUUCUAUCCUAGUAUAACUUGAAGAAUUCAAAUAGUCAUGCUAGGAUAGAAA
GAAUGGGACUUGGC>hsa-mir-3147 MI0014173GUCCGGGUUGGGCAGUGAGGAGGGUGUGACGCCGCGAAGUGCA
CCUCGCCCUUGUCCAACUCGGAC>hsa-mir-3148 MI0014175GAGUUAAGAUGGAAAAAACUGGUGUGUGCUUAUU
GAUGUAGCCAACAAGCAUACAUCAGUUUUUCCAACUUAACUC>hsa-mir-3149 MI0014176AUACAUAUAUGUAC
ACACACAUGUCAUCCACACACAUAUAUAUAUUGUUGUAUGGAUAUGUGUGUGUAUGUGUGUGUAU>hsa-mir-31
50a MI0014177GGGAAGCAGGCCAACCCUCGACGAUCUCCUCAGCACCUGAACGCCAAGGCUGGGGAGAUCCUCGAGGU
UGGCCUGCUUCC>hsa-mir-3150b MI0016426GAGGGAAAGCAGGCCAACCCUCGAGGAUCUCCCGACCCUUGGCG
UUCAGGUGCUGAGGAGAUCCGUCGAGGUUGGCCUGCUUCCCCUC>hsa-mir-3151 MI0014178GGGGUGAUGGGUGG
GGCAAUGGGAUCAGGUGCCUCAAAGGGCAUCCACCCUGAUCCACAGCCCACCUGUCACCCC>hsa-mir-3152 MI00
14179GUGCAGAGUUUAUUGCCUCUGUUCUAAACACAAGACUAGGCUUCCCUUGUGUUAGAAUAGGGGGCAAUAACUCUGCAC>
hsa-mir-3153 MI0014180GACAAAUUUUAAAUGUCCCUUGCCCCUCCCCCAAUUAAGUAGAUUGGGGGAAAGC
GAGUAGGGACAUUUAAAAUUUGUU>hsa-mir-3154 MI0014182GGCCCCUCCUUCUCAGCCCCAGCUCCCGCUCAC
CCCUGCCACGUCAAAGGAGGCAGAAGGGGAGUUGGGAGCAGAGAGGGGACC>hsa-mir-3155a MI0014183UCCGG
GCAUCACCUCCACUCGAGAGCCUGGGGAGCCGGACAGCUCCCUUCCAGGCUCUCGAGUGGGAACUGAUGCCUGGA>hs
a-mir-3155b MI0016839CCACUCGAGAGCCUGGGAAGGGAGCUGUCCGGCUCUCCCGAGGCUCUCGAGUGGGAGU>hs
a-mir-3156-1 MI0014184GCAGAAGAAAGAUUCUGGAAGUGGGAGACACUUUUAUAUAUAUAGUGGCUCCACUUC
CAGAUUUUCUCUCUGU>hsa-mir-3156-2 MI0014230UGCAGAAGAAAGAUUCUGGAAGUGGGAGACACUUUCACU
AUUAUAUAGUGGCUCCACUUCAGAUUUUCUCUCUGUA>hsa-mir-3156-3 MI0014242UGCAGAAGAAAGAUUCU
GGAAGUGGGAGACACUUUCACUAUAUAUAGUGGCUCCACUUCUGAUUUUCUCUCUGUA>hsa-mir-3157 MI001
4185GGGAAGGGCUUCAGCCAGGCUAGUGCAGUCUGCUUUGUGCCAACACUGGGGUGAUGACUGCCCUAGUCUAGCUGAA
GCUUUUCC>hsa-mir-3158-1 MI0014186AUUCAGGCCGGUCCUGCAGAGAGGAAGCCCUUCUGCUUACAGGUUAU
UGGAAGGGCUUCCUCUCUGCAGGACCGGCCUGAAU>hsa-mir-3158-2 MI0014187AUUCAGGCCGGUCCUGCAGA
GAGGAAGCCCUUCCAAUACCUGUAAAGCAGAAGGGCUUCCUCUCUGCAGGACCGGCCUGAAU>hsa-mir-3159 MI001
4188CCAAAGUCCUAGGAUUAACAAGUGUCGGCCACGGGCUUGGGCAGUGGCUCACGCCUGUAAUCCAGCAUUUUG>h
sa-mir-3160-1 MI0014189GGACCUGCCCUGGGCUUUCUAGUCUCAGCUCUCCUCCAGCUCAGCUGGUCAGGAGAG
CUGAGACUAGAAAAGCCAGGGCAGGUUC>hsa-mir-3160-2 MI0014190ACCUGCCCUGGGCUUUCUAGUCUCAGC
UCUCCUGACCAGCUGAGCUGGAGGAGAGCUGAGACUAGAAAAGCCAGGGCAGGU>hsa-mir-3161 MI0014191CCU
CGAGAGCUGAUAAAGACAGAGGCCCAGAUUGAAGUUGAAUAGUGCUGGGCCUUUGUUUUACCAAGUCCCUGG>hsa-m
ir-3162 MI0014192CUGACUUUUUAGGGAGUAGAAGGGUGGGGAGCAUGAACAAUGUUUCACUCCCUACCCCUUC
CACUCCCCAAAAAGUCAG>hsa-mir-3163 MI0014193UUCUCAUCUAUAAAAUAGAGGCAGUAAGACCUUCCUU
CCUUGUCUUACUACCCCAUUUUUAUAGAUGAGGAA>hsa-mir-3164 MI0014194CUUGGAAACUGUGACUUUAAGG
GAAUUGGCGCACAGCAGACCCUGCAAUCAUGCCGUUUGCUUGAAGUCGCAGUUUCCAGG>hsa-mir-3165 MI001
4195CCGGUGGCAAGGUGGAUGCAAUGUGACCUCAACUCUUGGUCCUCUGAGGUCACAUUGUAUCCACCUUACCACUGG>
hsa-mir-3166 MI0014196AAAUUUUUUUGAGGCCAGUAGGCAUUGUCUGCGUUAGGAUUUCUGUAUCAUCCUCCUA
ACGCAGACAAUGCCUACUGGCCUAAGAAAAAUUU>hsa-mir-3167 MI0014198GGCUGUGGAGGCACCAGUAUUUC
UGAAAUUCUUUUUCUGAAAUUCUUCAGGAAGGAUUUCAGAAAUACUGGUGUCCCGACAGCC>hsa-mir-3168 MI00
14199AAGAUCAUGAGUUCUACAGUCAGACAGCCUGAGUUGGAGGCUCAUCUUCACUUCUUGCUGUGUGACCCUGGGCCA
GUGACUU>hsa-mir-3169 MI0014200AUGUGAAAAACAUAGGACUGUGCUUGGCACAUAGCACAAAGUCUUUAUGGUA
CUGUGUGCCAAGCAUAGUCCUGUGUUUUACAU>hsa-mir-3170 MI0014201CUGGUAACACUGGGGUUCUGAGAC
AGACAGUGUUAGCUCCAGAAGCAUUGCCUGUCUUAGAACCCCUAUGUUACCAG>hsa-mir-3171 MI0014202UAUA
UAUAGAGAUGUAUGGAAUCUGUAUAUAUCUAUAUAUAUGUGUAUAUAUAGAUAUCCAUAAAUCUAUAUAUG>hsa-mir-3
173 MI0014204UCCUGCCCUGCCUGUUUCUCCUUUGUGAUUUUAUGAGAACAAAGGAGGAAUAGGCAGGCCAGGG

A>hsa-mir-3174 MI0014208GUUACCUUGGUAGUAGUAGAGAUAGAGAGAGCCCUUGGGCUCCUCAGCAAACCUACUG
 GAUCUGCAUUUUAAUUCACAUGCAUGGUAAU>hsa-mir-3175 MI0014209CCUGGGGGGCGGGGAGAGAACGCAGU
 GACGUCUGGGCCGCGUGCGCAUGUCGGGCGCUUUCUCCUCCCCUACCCAGG>hsa-mir-3176 MI0014210UGGCCU
 CUCCAGUCUGCAGCUCCCGGCAGCCUCGGGCCACACUCCCGGGAUCCCCAGGGACUGGCCUUGGACUACCGGGGGUGGCG
 GCCG>hsa-mir-3177 MI0014211CCACGUGCCAUGUGUACACACGUGCCAGGCGCUGUCUUGAGACAUUCGCGCAG
 UGCACGGCACUGGGGACACGUGGCACUGG>hsa-mir-3178 MI0014212GAGGCUUGGGCGGGGCGCGCCGGAUCGG
 UCGAGAGCGUCCUGGCUGAUGACGGUCUCCCGUGCCACGCCCCAAACGCAGUCUC>hsa-mir-3179-1 MI001421
 3CAGGAUCACAGACGUUUAAAUAACACUCCUUCUGCUGUGCCUUAACAGCAGUAGAAGGGGUGAAAAUUAAACGUCUGUGA
 UCCUG>hsa-mir-3179-2 MI0014216CAGGAUCACAGACGUUUAAAUAACACUCCUUCUGCUGUGCCUUAACAGCAG
 UAGAAGGGGUGAAAAUUAAACGUCUGUGAUCCUG>hsa-mir-3179-3 MI0014221CAGGAUCACAGACGUUUAAAUA
 UACACUCCUUCUGCUGUGCCUUAACAGCAGUAGAAGGGGUGAAAAUUAAACGUCUGUGAUCCUG>hsa-mir-3180-1 M
 I0014214CAGUGCGACGGGCGGAGCUUCCAGACGCUCCGCCCCACGUCGCAUGCGCCCCGGGAAAGCGUGGGGCGGAGC
 UUCCGGAGGCCCCCGCCUGCUG>hsa-mir-3180-2 MI0014215GCGACGGGCGGAGCUUCCAGACGCUCCGCCCCA
 CGUCGCAUGCGCCCCGGGAAAGCGUGGGGCGGAGCUUCCGGAGGCCCCCGCCUGC>hsa-mir-3180-3 MI0014217
 CAGUGCGACGGGCGGAGCUUCCAGACGCUCCGCCCCACGUCGCAUGCGCCCCGGGAAAGCGUGGGGCGGAGCUUCCGGAG
 GCCCCCGCCUGCUG>hsa-mir-3180-4 MI0016408GCUCGCCCCACGUCGCAUGCGCCCCGGGAAAGCGUGGGGC
 GGAGCUUCCGGAGGCCCCCGCUCUGCUGCCGACCCUGUGGAGCGGAGGGUGAAGCCUCCGGAUGCCAGUCCCUCAUCGCUG
 GCCUGGUCGCGCUGUGGCGAAGGGGGCGGAGC>hsa-mir-3180-5 MI0016409GCUCGCCCCACGUCGCAUGCGC
 CCGGGAAAGCGUGGGGCGGAGCUUCCGGAGGCCCCCGCCUGCUGCCGACCCUGUGGAGCGGAGGGUGAAGCCUCCGGAU
 GCCAGUCCCUCAUCGCUGGCCCGGUCGCGCUGUGGCGAAGGGGGCGGAGC>hsa-mir-3181 MI0014223CGGCGAC
 CAUCGGGCCCUCGGCGCCGGCCCCGUAGUUGCCCGGGCCGAGCCGGCCGGGCCCGGGGUUGCCG>hsa-mir-3182
 MI0014224GCUCGUUCUGUAGUGUAGUCCGUGCAUCCGCCCUUCGAUGCUUGGGUUGGAUCAUAGAGCAGU>hsa-mir
 -3183 MI0014225CUCUGCCCUGCCUCUCUCGAGUCGCUCGGAGCAGUCACGUUGACGGAAUCCUCCGGCGCCUCCU
 CGAGGGAGGAGAGGCAGGG>hsa-mir-3184 MI0014226AAGCAAGACUGAGGGGCCUCAGACCCGAGCUUUUGGAAA
 AUAGAAAAGUCUCGCUCUCUGCCCCUCAGCCUAACUU>hsa-mir-3185 MI0014227GAAUGGAAGAAGAAGGCGGU
 CGGUCUGCGGGAGCCAGGCCGAGGCAUCCGCCUUCUGUCCAUGUC>hsa-mir-3186 MI0014229AGCCUGCGG
 UUCAACAGGCGUCUGUCUACGUGGCUUCAACCAAGUUCAAAGUCACGCGGAGAGAUGGCUUUGGAACAGGGGCU>hsa
 -mir-3187 MI0014231GCUUGGCCCUUGGGCAGCGUGUGGCUAAGGUCACCAUGUUCUCCUUGGCCAUGGGGCUGCGC
 GGGGCCAGC>hsa-mir-3188 MI0014232GGCGCCUCCUGCUCUGCUGUGCCGCCAGGGCCUCCCUAGCGGCCUU
 CUGGAGAGGCUUUGUGCGGAUACGGGGCUGGAGGCCU>hsa-mir-3189 MI0014233GCCUCAGUUGCCCCAUUCUGU
 GCCCUGGGUAGGAAUAUCCUGGAUCCCCUUGGGUCUGAUGGGGUAGCCGAUGC>hsa-mir-3190 MI0014235CUGG
 GGUCACCUGUCUGGCCAGCUACGUCCCCACGGCCCUUGUCAGUGUGGAAGGUAGACGGCCAGAGAGGUGACCCCGG>hsa
 -mir-3191 MI0014236GGGGUACCCUCUCUGGCCGUCUACCUUCCACACUGACAAGGGCCGUGGGGACGUAGCUGGC
 CAGACAGGUGACCCC>hsa-mir-3192 MI0014237GGAAGGGAUUCUGGGAGGUUGUAGCAGUGGAAAAAGUUCUUU
 UCUUCCUCUGAUCGCCCUCUCAGCUCUUCUUCU>hsa-mir-3193 MI0014238UCCUGCGUAGGAUCUGAGGAGU
 GGACGAGUCUAUUAACCCAGCUCUUGAGCAGGA>hsa-mir-3194 MI0014239AGGUGGCAGGGCCAGCCACCAGGA
 GGGCUGCGUGCCACCCGGGAGCUCUGCUGCUCACUGGCAGUGUACCU>hsa-mir-3195 MI0014240CCGAGCC
 GCCGCGCCGGGCCGGGUUGGCCGUGACCCCCCGGGGCCCCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGUCCCCCGG>hsa
 -mir-3196 MI0014241GGGUGGGGGCGGGGCGGCAGGGGCCUCCCCCAGUGCCAGGCCCCAUUCUGCUUCUCCCCA
 GCU>hsa-mir-3197 MI0014245GGCGAGGGGAGGCGCAGGCUCGAAAGGCGCGCGAGGCUCAGGCUCUUCUCCG
 AUCCACCGCUCUCCUCGCU>hsa-mir-3198-1 MI0014246GACUGUGCUCACUGUUCACCCAGCACUAGCAGUA
 CCAGACGGUUCUGUGGAGUCCUGGGGAAUG
 GAGAGAGCACAGUC>hsa-mir-3198-2 MI0017335GACUCUGCUCUCACUGUUCACCCAGCACUAGCAGUACCAGA
 UGGUUCUGUGGAGUCCUGGGGAAUGGAGAGAGCACAGUC>hsa-mir-3199-1 MI0014247GGUGACUCCAGGGACU
 GCCUUAAGGAGAAAGUUUCUGGAAGUUCUGACAUUCCAGAAACUUCUCCUAAGGCAGUCCCUUGGAGUCACU>hsa-mir
 -3199-2 MI0014248GUGACUCCAGGGACUGCCUUAAGGAGAAAGUUUCUGGAAUGUCAGAAAUUCCAGAAACUUUCU
 CCUAAGGCAGUCCCUUGGAGUCAC>hsa-mir-3200 MI0014249GGUGGUCGAGGGAAUCUGAGAAGGCGCACAAGGU
 UUGUGUCCAAUACAGUCCACACCUUGCGCUACUCAGGUCUGCUGUGCCCU>hsa-mir-3201 MI0014250GGGAUA
 UGAAGAAAAUAAGAGGCUAGGAUUGCCUCUUAUUUUACAUGCCC>hsa-mir-3202-1 MI0014252UAUUAUAU
 GGAAGGGAGAAGAGCUUAAUGAUUGGAGUCAUUUCAGAGCAUAAAGCUCUUCUCCCUUCCAUAUUAUG>hsa-mir

GGACUCGGACAGCUGCUUGCACUCGUUCAGCUGCUCGAUCCACUGGUCCAGCUCUUGGUGAACACCUU>hsa-mir-36
 62 MI0016063UGUGUUUUCCUCAACGCUCACAGUUACACUUCUACUCUCAAUCCAUAUAUUGAAAAUGAUGAGUA
 GUGACUGAUGAAGCACAAAUCAGCCAA>hsa-mir-3663 MI0016064CCCCGGACCUUGGUCCAGGCGCUGGUCUGC
 GUGGUGCUCGGGUGGAUAAAGUCUGAUCUGAGCACCACACAGGCCGGGCGCCGGGACCAAGGGGGCUC>hsa-mir-3664
 MI0016065CUGUAAACUUGAAGGUAGGGAACUCUGUCUUCACUCAUGAGUACCUUCCAACACGAGCUCUCAGGAGUAA
 AGACAGAGUUCCCUACCUUCAAUGUGGAU>hsa-mir-3665 MI0016066GCGGGCGGCGGCGGCGGCAGCAGCAGCA
 GGUGCGGGGCGGCGGCCGCGCUGGCCGCGCAGCUCUCCGAGCUGCUCGUUCUGCUUCUCCAGCUUGCGCACCAGCUC>hs
 a-mir-3666 MI0016067AGUAAAGGUCCGUCAGUUGUAAUGAGACCCAGUGCAAGUGUAGAUGCCGACUCCGUGGCAG
 AGUUCAGCGUUUCACACUGCCUGGUCUCUGUCACUCUAUUGAAUUAAGAUUG>hsa-mir-3667 MI0016068UGAGGA
 UGAAAGACCAUUGAGGAGAAGGUUCUGCUGGCUGAGAACCUCUCCUCCAUGGGUCUUUCAUCCUCA>hsa-mir-366
 8 MI0016069AUUAUUGAAAAUGUAGAGAUUGAUCAAAAAUAGUUUCUAUAAAAUAGUUUUGAUCAAUCUCUGCAAUUUU
 AUUAU>hsa-mir-3669 MI0016070AUUAUUAUUAACGGAAUUAUUAUACGGAAUUAUUAUUAACGGAAUUAUUAU
 AUACGGAAUUAUGUAUACGGAAUUAUUAUUAU>hsa-mir-3670-1 MI0016071UCUAGACUGGUUAUAGCUGCUUUUGG
 AGCCUCACCUGCUGAGAGCUCACAGCUGUCCUUCUCUAGA>hsa-mir-3670-2 MI0019112UCUAGACUGGUUAUAG
 CUGCUUUUGGAGCCUCACCUGCUGAGAGCUCACAGCUGUCCUUCUCUAGA>hsa-mir-3671 MI0016072AUGUUAU
 UGCUGCUGCUGACAUUUACAUGAAAAUAAAAUGUAAUUAUUUUAUUUCUAUCAAUAAAGGACUAGUCUGCAGUGAU
 U>hsa-mir-3672 MI0016073UCUUUGGAUUAACCAUGAGACUCAUGUAAAACAUCUAGACUAUUACAAGAUGUUU
 UAUGAGUCUCAUGAUAAUCACAAAAG>hsa-mir-3673 MI0016074AUUAUUAUUAUUGGAAUGUAUUAACGGAAU
 UAUAUUAUUAUUGGAAUGUAUUAUACGGAAUUAUUAUUAUUAUUGGAAUGUAUUAACGGAAUUAUUAUUAUUAU>hsa-mir-
 3674 MI0016075ACAUCACUAUUGUAGAACCUAAGAUUGGCCGUUUGAGAUUGCCUUCAAGUUUUUGCAUUUCUGAU
 GU>hsa-mir-3675 MI0016076GGAUGAUAAAGUUAUGGGGCUUCUGUAGAGAUUUCUAUGAGAACAUCUCUAAGGAA
 CUCCCCAAACUGAAUUC>hsa-mir-3676 MI0016077UUGGUUAAAGCGCCUGUCUAGUAAACAGGAGAUCCUGGG
 UUCGAAUCCAGCGGUGCCUCCGUGUUUCCCCACGCUUUUGCCAA>hsa-mir-3677 MI0016078GGCAGUGGCCA
 GAGCCUCGAGUGCUGGGCAUGGGCUUCUGUGGGCUCUGGCCACGGCC>hsa-mir-3678 MI0016079GAAUCCGG
 UCCGUACAAACUCUGCUGUGUUGAAUGAUUGGUGAGUUUGUUUGCUCAUUGAUUGAAUCACUGCAGAGUUUGUACGGACC
 GGAUUC>hsa-mir-3679 MI0016080CGUGGUGAGGAUAUGGCAGGGAAGGGGAGUUUCCCUCAUUAUCCCUUCCCCC
 CAGUAAUCUUAUCAUG>hsa-mir-3680-1 MI0016081AAAUUUAAAGGAGGGACUCACUCACAGGAUUGUGCAAAU
 GCAAAGUUGGCUUUUGCAUGACCCUGGAGUAGGUGCCUCCUAAAAUU>hsa-mir-3680-2 MI0019113AAAUUU
 AAGGAGGGACUCACUCACAGGAUUGUGCAAAUGCAAAGUUGGCUUUUGCAUGACCCUGGAGUAGGUGCCUCCUAAAAU
 U>hsa-mir-3681 MI0016082ACUCCAGUAGUGGAUGAUGCACUCUGUGCAGGGCCAACUGUGCACACAGUGCUUC
 AUCCACUACUGGAAGU>hsa-mir-3682 MI0016083UAAGUUAUAUAUGUCUACUUCUACCUGUGUUAUCAUAAUAA
 AGGUGUCAUGAUGAUACAGGUGGAGGUAGAAAUAUAUAACUUA>hsa-mir-3683 MI0016084GGGUGUACACCCCC
 UGCGACAUUGGAAGUAGUAUCAUCUCUCCCUUGGAUGCUACGAACAAUAUCACAGAAGGUGUACACCC>hsa-mir-368
 4 MI0016085AAUCUAAAAGGACCUGUACUAGGUUUAACAUGUUGAGCAUUAUCUAGUUAAGACCUAGUACACGUCCUU
 AGAUU>hsa-mir-3685 MI0016086GUACAUUCCUACCCUACCUGAAGACUUGAGAUUAUAGUCUUUGGGGGGAUG
 GGCAAAGUAC>hsa-mir-3686 MI0016087CUCACCUCAUUCAUUUACCUUCUCUACAGAUACUUUUUCUGCACUG
 GACAGUGAUCUGUAAGAGAAAAUAAAAUGAAAGAGGUGAG>hsa-mir-3687 MI0016088CGCGCGUGCGCCCGAGCG
 CGGCCCGGUGGUCCUCCCGGACAGGCGUUCGUGCGACGUGUG>hsa-mir-3688-1 MI0016089UCUUCACUUUCA
 AGAGUGGCAAAGUCUUUCCAUAUGUAUGUAUGUAUGUCUGUUAACAUUAUGGAAAGACUUUGCCACUCUUUAAAGUGAAG
 A>hsa-mir-3688-2 MI0017447UCACUUUAAAGAGUGGCAAAGUCUUUCCAUAUGUGUAACAGACAUAACAUA
 CAUAUGGAAAGACUUUGCCACUCUUGAAAGUGA>hsa-mir-3689a MI0016090CCUGGGAGGUGUGAUUAUAGGU
 UCCUGGGAGGUGUGAUCCUGUGCUUCCUGGGAGGUGUGAUUAUCGUGGUUCCUGGG>hsa-mir-3689b MI0016411G
 AUCCUGUGCUCUCCUGGGGGGUCUGAUCCUGUGCUUCCUGGGAGGUGUGAUUAUCAGGUUCCUGGGAGGUGUGAUCCCGUG
 CUUCCUGGGAGGUGUGAUUAUUGGUUCCUGGGAGGUGUGAUUCCUGGUGCUCUCCUGGGAGGUGUGAU>hsa-mir-3689
 c MI0016832GGGAGGUGUGAUUAUCGUGGUUCCUGGGAGGUGUGAUUAUCGUGGUUCCUGGGAGGUGUGAUUAUUGGUU
 CCU>hsa-mir-3689d-1 MI0016834UGGGAGGUGUGAUUCACACUCGCUGGGAGGUGUGCUAUCGUCUUCUCCCGG
 GAGGUGUGAUCCUGUUCUCCUG>hsa-mir-3689d-2 MI0016835ACUGGGAGGUGUGAUUCACACUCGCUGGGA
 GGUGUGCUAUCGUCUUCUCCUGGGAGGUGUGAUCCUGUUCUCCUGAGCG>hsa-mir-3689e MI0016836GGGAGGU
 GUGAUUAUCAGGUUCCUGGGAGGUAUGAUUAUCGUGGUUCCUGGGAGGUGUGAUUCCGUGCUCCCU>hsa-mir-3689f
 MI0016837AGGUGUGAUUAUCGUGCUUCCUGGGACGUGUGAUGCUGUGCUUCCUGGGAGGUGUGAUUCCACACUC>hsa-

mir-3690 MI0016091CCCAUCUCCACCUGGACCCAGCGUAGACAAAAGAGGUGUUUCUACUCCAUAUCUACCUGGACC
 CAGUGUAGAUGGG>hsa-mir-3691 MI0016092UUGAGGCACUGGGUAGUGGAUGAUGGAGACUCGGUACCCACUCG
 UGAGGGUGGGGACCAAGUCUGCGUCAUCCUCUCCUCAGUGCCUCAA>hsa-mir-3692 MI0016093CCAUUCUGCU
 GGUCAGGAGUGGAUACUGGAGCAAUAGAUACAGUUCACACUGACACUGCAGAAGUGG>hsa-mir-3713 MI001613
 4GGUAUCCGUUUUGGGGAUGGUUUCACUAUCCCCAGAUGGAUACCAA>hsa-mir-3714 MI0016135GAAGGCAGCAG
 UGCUCUCCUGUGACGUGCUCCAUCACCGGGCAGGGAAGACACCGCUGCCACCUC>hsa-mir-3907 MI0016410GGG
 UUGGAAAAGCUGUAGGUGUGGAGGGGCAUGGAUACGGGGGCCAUGAGGGUGGGGUCCAGGCUGGACCAGGCCUGCCCUGAG
 UCCCCCAGCAGGUGCUCCAGGCUGGCUCACACCCUCUGCCUCUCUCUUCUUCUUGGCCCAACCC>hsa-mir-390
 8 MI0016412GCCUGAGCAAUGUAGGUAGACUGUUUUAUAAAAAAUAAAAAGUUAAAAAAUUAUGUUAACGUGUAAU
 GUGUUUACUAAUUUUUUUUUUUUUUUUUGGAGACAGAGUCUCCUCUGUCGCCAGGC>hsa-mir-3909 MI0016413 10
 GGUAUGCUGUUGCGCUGUCCUUCUCUGGGGAGCAGGCUCGCGGGGACAGGGAAAAAGCACACAAGGAACUUGUCCUCUAG
 GGCCUGCAGUCUCAUGGGAGAGUGACAUGCACCAGGACC>hsa-mir-3910-1 MI0016414CUUUUGCUGUCAGUUU
 UUCUGUUGCUUGUCUUGGUUUUAUGCCUUUAUAUCAAGGCACAUA AAAAGGCAUAAAACCAAGACAAGCAACAAAAAAG
 GAUUGAUCACAGAAG>hsa-mir-3910-2 MI0016431UUUUUUUGUUGCUUGUCUUGGUUUUAUGCCUUUUUAUGUGC
 CUUGAUUAUAAAAGGCAUAAAACCAAGACAAGCAACAGAAAAA>hsa-mir-3911 MI0016415GGGUGAGGAUGUGUG
 UGGAUCCUGGAGGAGGCAGAGAAGACAGUGAGCUUGCCAGUUCUGGUUUCCAACACUCCUUUCCUGCGCUUCUCGAUUC
 CCAGAUCUGCACCC>hsa-mir-3912 MI0016416AGAGAGGA
 AUGAACAGUUAAAAUUAACAUGUCCAUAUUUUGGGUUAUGUUGGACACAUACUAACGCAUAAUUAUGGACAUGUUUAAA
 UUUAAACUGUUCUUUUUCU>hsa-mir-3913-1 MI0016417UUGUUUAUAAUAAACUGAAAAUUAUUGGGACUGAUCUUG
 AUGUCUGCCAAAACCUUGGCAGACAUAAGAUCAGUCCCAAAUUAUUUAGUUUAUUAUAGACAG>hsa-mir-3913-2 20
 MI0016418UGUCUAUAAUAAACUGAAAAUUAUUGGGACUGAUCUUGAUGUCUGCCAAGGUUUUGGCAGACAUAAGAUA
 GUCCCAAAUUAUUUAGUUUAUUAUAAACA>hsa-mir-3914-1 MI0016419UGGACUUCAGAUUUAAACUUCUCAUU
 UCUGGUUCCUUCUAAUGAGUAUGCUUAAACUUGGUAGAAGGAACCAGAAAAUGAGAAGUUGAGUAGGAACUCUA>hsa-mi
 r-3914-2 MI0016421GAGUCCUACUCAACUUCUCAUUUUCUGGUUCCUUCUACCAAGUUAAGCAUACUCAUUAGAA
 GGAACCAGAAAAUGAGAAGUUAUUAUCUGAAGUC>hsa-mir-3915 MI0016420CAAGUUGGCACUGUAGAAUUAUGA
 GGAAAAAGUUGGUCUUAUUGCAAAGAUUUUCAAUAAGACCAUCCUUCCUCAAUUUCUGUGGUGUCAUCUUUG>hsa-mi
 r-3916 MI0016422AUCCCAGAGAAGAAAGGAAGAGGAAGAAAAUGGCUGGUUCUCAGGUGAAUGUGUCUGGGUUA
 GGGGAUGUGUCUCCUCUUUUCUUCUGGGAU>hsa-mir-3917 MI0016423GGCGCUUUUGUGCGCGCCCGGGUCUGU
 UGGUGCUCAGAGUGUGGUCAGGCGGCUCGGACUGAGCAGGUGGGUGCGGGGCUCGGAGGAGGCGGC>hsa-mir-3918
 MI0016424AGGCGGUUAAGCCAUGGGACAGGGCCGCAGAUUGGAGACUGCUCAAGGUCAAAAGGGGUCUCCAGCUGGGACC 30
 CUGCACCUGGUUCGUAGCCCCU>hsa-mir-3919 MI0016425CCUGAGCACCAUUUACUGAGUCCUUUGUUCUCUAC
 UAGUUUGUAGUAGUUCGUAGCAGAGAACAAAAGGACUCAGUAAAUGGUGCUCAGG>hsa-mir-3920 MI0016427ACU
 GAGUGAGGGAGUCAGAGAGUUAAGAGAAUUAAGUACAGGUGAGAUUGUACUGAUUAUCUUAACUCUCUGACCCCCUCACUC
 AGU>hsa-mir-3921 MI0016428CCUAGCCCAGUACAAGGCAUAUGGUACUCAAGAGACUUAAGAAAUCCCUAAGUCU
 CUGAGUACCAUAUGCCUUGUACUGGGCUAGG>hsa-mir-3922 MI0016429GGAAGAGUCAAGUCAAGGCCAGAGGU
 CCCACAGCAGGGCUGGAAAGCACACCUGUGGGACUUCUGGCCUUGACUUGACUCUUUC>hsa-mir-3923 MI001643
 0GGUAGAGUGAGCUCUAAUCCAAUUAUACUAGCUUCUUUAUAGAAGAGGAAACUAGUAAUUGUUGGAUUAAGGGCUCACUC
 UACU>hsa-mir-3924 MI0016432UAAAUGAAAAAGUAGUAGUCAAUAUAGCAGAUUAUGUCAUAUAUACAGAUUAU
 GUAUAUGUGACUGCUACUUUUUGUUUA>hsa-mir-3925 MI0016433UGGGAAUAGCAAGAGAACUGAAAGUGGA
 GCCUGUCACAUCUCCAGACUCCAGUUUUAGUUCUCUUGCUAUUUCCAC>hsa-mir-3926-1 MI0016434AAAAUGG 40
 AGCUGGCCAAAAAGCAGGCAGAGACUUAAAAAGCGUCUCUGCCUGCUUUUGGCCAGCUCGGUUUU>hsa-mir-3926-
 2 MI0016437GGAGCUGGCCAAAAAGCAGGCAGAGACGCUUUUAAAGUCUCUGCCUGCUUUUUGGCCAGCUC>hsa-m
 ir-3927 MI0016435UGCCAAUGCCUAUCACAUUUCUGCCUGUCCUAUGACAAACAUGGCAGGUAGAUUAUUGAUAGG
 CAUUGGCA>hsa-mir-3928 MI0016438GCUGAAGCUCUAAGGUUCCGCCUGCGGGCAGGAAGCGGAGGAACCUUGG
 AGCUUCGGC>hsa-mir-3929 MI0016439AGUGGCUCACACCAGUAAUCCAGCACUUUGGGAGGCUGAUGUGAGUA
 GACCACU>hsa-mir-3934 MI0016590CACAGCCCUUCCUGUCCCCAGUUUUCAGGUGUGGAAACUGAGGCAGGAGG
 CAGUGAAGUAACUUGCUCAGGUUGCAGCAGCUGGGAAGUGGAGCAGGGAUUUGAAUCC>hsa-mir-3935 MI0016591
 GGAUGUGUCCUGUCCCAGAAAGGAGCUGAUGGUUGUAUCUAUGAAGGUAAAGCAUUUUUGUAGAUACGAGCACCAGCCACC
 CUAAGCAAAGGCAGAGAAUGCUUA>hsa-mir-3936 MI0016592AUGAUUCAGAGCAUCUGUCCAGUGUCUGCUGUA
 GAUCCCUCAAUCCGUGUUUGGACGCUUCUGGUAAAGGGGUGUAUGGCAGAUGCACCCGACAGAUGCACUUGGCAGCA>hs 50

a-mir-3937 MI0016593AGAAGAAUGCCCAACCAGCCCUCAGUUGCUACAGUUCCCUGUUGUUUCAGCUCGACAACA
ACAGGCGGCUGUAGCAAUGGGGGGCGUGAUGGGCAUCUCAUUGUGC>hsa-mir-3938 MI0016594AGGAAUUUUUA
ACCCGAUCACUAGAUUAUCUACAAGGGAAUUUUUUUUUAAUUUAAAAAUUCCCUUGUAGAUAAACCCGUGGUCAGGUUG
GAUGGCUCCAUG>hsa-mir-3939 MI0016596CUGGCUUCCAAAAGGCCUCUGUGUGUUCUGUAUGUGGGCGUGCAC
GUACCUGUCACAUUGUACGCGCAGACCACAGGAUGUCCACACUGGCUUCCAAACACAUCU>hsa-mir-3940 MI001
6597GCUUAUCGAGGAAAAAGAUUCGAGGUGGGUUGGGGCGGGCUCUGGGGAUUUGGUCUCACAGCCCGGAUCCAGCCAC
UUACCUUGGUUACUCUCCUCCUUCU>hsa-mir-3941 MI0016598GAGUCAGAAUUCUCAUCAGGCUGUGAUGCUC
AGUUGUGUGUAGAUUGAAAAGCCUAAUUUUACACACAACUGAGGAUCAUAGCCUGAUGGUUCCUUUUUGUU>hsa-mir
-3942 MI0016599UCUUCAGUAUGACCCUCAAAGAAGCAAUACUGUUAACCUGAAAUAGGCUGCGAAGAUAAACAGUAU
UUCAGAUAAACAGUAUUAUCAUCUUUGAAGUGUCAUAUUCACUGAC>hsa-mir-3943 MI0016600CACACAGACGGCA
GCUGCGGCCUAGCCCCAGGCUUCACUUGGCGUGGACAACUUGCUAAGUAAAUGGGGGGUGGGCCACGGCUGGCUCCUA
CCUGGAC>hsa-mir-3944 MI0016601UCCACCCAGCAGGCGCAGGUCCUGUGCAGCAGGCCAACCGAGAAGCGCCU
GCGUCUCCCAUUUUCGGGCUGGCCUGCUGCUCGCGGACCUGUGCCUGAUCUAAUGCUG>hsa-mir-3945 MI001660
2GAUGUUGAUGCACGUGACGGGGAGGGCAUAGGAGAGGGUUGAUUAUAAAAUGCAAUACAGCCUCUUAUGCUUUCCAAAG
UGGGGAUGAUUCAAUGAU>hsa-mir-3960 MI0016964GGCGCCCCGGCUCGCCGCGCCCCGAUCGGGGCCGCCG
CUAGUAGUGGCGGCGGCGGAGGCGGGGCGAGCGGCGGCGGCGGAGGCGCC>hsa-mir-3972 MI0016990GCCC
AUUUGCCUUGGCUUGGGGUGGCAGUCCUGUGGGAUGAGAGAUGCCAAACUGGACCUGCCAGCCCCGUCCAGGGCACAG
CAU>hsa-mir-3973 MI0016991GCCAGGGUAGCUCUCUGUAUUGCUUGUUAUUAAGAUUGCUUGCCCCUUG
CUCCAAUGGUGCAGGCAGAAGAAAUGCAAACAAAGUACAGCAUUAAGCCUAGC>hsa-mir-3974 MI0016992GUUC
AGGGAAAAGGUCAUUGUAAAGGUAAUUGCACCCAUAAUUUAAUAUCAAACUAUGACAAAUUUGACUACAGCCUUUCGUAC
CCCUGCCAAAAC>hsa-mir-3975 MI0016993CAUGUAGGUGAGUGAUUGCUAUUUCAAAGACUAGAGGUAGGAAA
UGAGGCUAAUGCACUACUUCACAUG>hsa-mir-3976 MI0016994UGAGGGAUUAUAGAGAGCAGGAAGAUUAAUGUC
AUUUGGAGUUGGACUGCAGGGCUUCCUUACACAAUAAUUAUUGUAUGAAGUGCUGAUGUAACCUUUACUGCAGCAUGA
CAUGGGAUUUUGGCUUUUUUAUGGCUC>hsa-mir-3977 MI0016995UUGUGCUUCAUCGUAAUUAACCUUAAGUGG
UUCGGGUAAAUCACUUUAAUUGUUAUGUGUUGGCAGAAU>hsa-mir-3978 MI0016996UCAGUGGAAAAGCAUGCA
UCCAGGGUGUGGAGCCAAAAUAGAAGGGCCAAAAUUCUACCUGGCCCACUACCACAGCAACCUUGGGCAUCGUUUUCU
UUGA>hsa-mir-4251 MI0015861CACGUCCUCCAGCUUUUUUCCUUAUGUGGCCAAUUCUGAGAAAAGGGCCAAACG
UGCUCUCA>hsa-mir-4252 MI0015864UGGGGGGCGUGGAGCUCUACAGUCCAGGCCAUUCUGGCCACUGAGUCAGC
ACCAGCGCCCAAUC>hsa-mir-4253 MI0015860CCAGCCAUCCGCCUUGAGGGGCCCUAGGACUUAUUGUGCAGG
GCAUGUCCAGGGGUGCCAGGUCUGC>hsa-mir-4254 MI0015862CUUGGGAGGAGGGUGGGGUGGCUCCUCUGCAG
UGAGUAGGUCUGCCUGGAGCUACUCCACCAUCUCCCCAGCCCC>hsa-mir-4255 MI0015863GAGCAUCCUUCAG
UGUUCAGAGAUGGAGUCAGUAUUGGUCUGGCCAUUUUUAGGGCAAAGAGGCAGCAUCAU>hsa-mir-4256 MI00158
55UGUUCCAUUAUUCUGACCUGAUGAAGGUCUCCUGGCAUUGAUUAGGUCUGAUGAUCCAUUUCUG>hsa-mir-4257
MI0015856GGCUUAGAAACAGUCCUAGGUAGGAUUUGGGGAGGAGCUAAGAAGCCCCUACAGGGCCCAGAGGUGGGGA
CUGAGCCUAGUUGG>hsa-mir-4258 MI0015857ACGCCCCCGCCCCGCCACCGCCUUGGAGGCUGACCUCUAC
UUUCGGUCGGUCUUCUCCUUGGGCUUGGUUUGGGGGCGGGGAGUGUC>hsa-mir-4259 MI0015858GAUGGGCC
CCUUGUGUCCUGAAUUGGGUGGGGCGUCUGAGUGGGGAAAGUGGGGGCCUAGGGGAGGUCACAGUUGGGUCUAGGGGUA
GGAGGGCCCAGGA>hsa-mir-4260 MI0015859AACAAGGUGACUUGGGGCAUGGAGUCCACUUCUUGGAGCCCAC
ACCCAGCUUGUCACACACCAAC>hsa-mir-4261 MI0015868GGUGGAAGUGGGUUCUCCAGUUCUUGAGACAG
GAAACAGGGACCCAGGAGACCAGC>hsa-mir-4262 MI0015872GAAAGCUGCAGGUGCUGAUGUUGGGGGGACA
CAGACUACCUGCAGCAGAGCC>hsa-mir-4263 MI0015876AUAGUGCUCUUCAGGGUUUUACUUGGGAGAUUGGAG
UGGCCAGUGUCCUAAACAAUUCUAAUGGCCUUGGCCACAACAUAC>hsa-mir-4264 MI0015877AAAGCUGGAU
ACUCAGUCAUGGUCAUUGUAACAUGAUAGUGACAGGUACUGGUAAAGACUGCAUAG>hsa-mir-4265 MI0015869U
GCAGUGGGUUGGAGCUACGCCUACACCUGUAAAAGAAUUGGUCAGCCUGGGGACUGGUGAUCUCUGCAGCUGUGGGCUCA
GCUCUGGGCUGGGCCUGG>hsa-mir-4266 MI0015870CCACUGCUGGCCGGGGCCCCUACUCAAGGCUAGGAGGCC
UUGGCCAAGGACAGUC>hsa-mir-4267 MI0015871CUCAGCAGGCUCAGCUCGGUGGCACUGGGGAAGGCUCCA
GACCCAGCCUCUGUCAUCCUGCAUGGAGCCACAUCUCC>hsa-mir-4268 MI0015874AUGCACAUCAGGUUCU
AGAGGUUUUUGCCUAGCGGCUCCUCCUCACAGGAUGUGAUGUACCUUG>hsa-mir-4269 MI0015875ACAGCGCCC
UGCAGGCACAGACAGCCUUGGCUUCUGCCUUCUUUCUUUGUGGAAGCCACUCUGUCAGGCCUUGGAUGGAGGGGCA>hsa-
mir-4270 MI0015878ACAAAUAGCUUCAGGGAGUCAGGGGAGGGCAGAAAUAGAUGGCCUUCUCCUUGCUGGGAAGAA

AGUGGGUC>hsa-mir-4271 MI0015879AAAUCUCUCUCCAUAUCUUUCCUGCAGCCCCCAGGUGGGGGGGAAGAAA
AGGUGGGGAUUAGAUAUC>hsa-mir-4272 MI0015880UUUUCUGCAGAAAUAUAUCAGUUAUAUGCAUAGAAAGCAU
UCAACUAGUGAUUUGUUAUAAGAG>hsa-mir-4273 MI0015881UCCCCUGUGUGUUCUCUGAUGGACAGUAAG
CCUUGACUUAUUGGCUAAAUGCUUCUUCACAAUGGUCACAUAGGAGCUUU>hsa-mir-4274 MI0015884GGGGC
AUUUAGGUAACUGAGCUGCUGCCGGGGCCUGGCGCUCUACCUUGUCAGGUGACCCAGCAGUCCCUCCCCCUGCAUG
GUGCCC>hsa-mir-4275 MI0015883ACAUUUUUGUCCAAUUAACCACUUCUUUUUGCCACCUGAGCACAGUCAGCAG
UCAGCAUAAAAAGUGAUAAUGGGAAGUUAUGUCU>hsa-mir-4276 MI0015882CACAGUCUGACUCAGUGACUC
AUGUGCUGGCAGUGGCCACGUAAAUAAGAGCUACUGUGUCUGAAAGCAAU>hsa-mir-4277 MI0015886CUGGGUCG
AGGCAGUUCUGAGCACAGUACACUGGGCUGCCCCACUGCCAGUGCCUGCUCAGCUCUAGUCCUUGUGCCCCUC>hsa
-mir-4278 MI0015888AUCUAAACACCAGGAGAAUCCCAUAGAACAUAUGACAUAACACUAGGGGGUUUGCCCUUGUG
GGGAAGAA>hsa-mir-4279 MI0015887UGCUCUGUGGAGCUGAGGAGCAGAUUCUCUCUCUCCUCCCGGCUUCA
CCUCCUGAG>hsa-mir-4280 MI0015889AAUCAGGGUGGAGUGUAGUUCUGAGCAGAGCCUUAAGGAUGAGGUUAU
GUUCAAGACUGAAUGACACCUUUUGAU>hsa-mir-4281 MI0015885GCUGGGGGUCCCCGACAGUGUGGAGCUG
GGGCCGGGUCCCCGGGAGGGGGUUCUGGGCAG>hsa-mir-4282 MI0015890GGUGAAGUUCAGGGGAAGAUUUU
AGUAUGCCACAUUUCUAAAAUUUGCAUCCAGGAACAUAUCCU>hsa-mir-4283-1 MI0015892ACUCUGAUCCUG
GGGCUCAGCGAGUUUGCAAGGGGUGUUUCUGUCCAUGGUCAGGCUUGCCAGCCUUGGUCCUUGGGCCC>hsa-mir-428
3-2 MI0015982ACUCUGAUCCUGGGGCUCAGCGAGUUUGCAAGGGGUGUUUCUGUCCAUGGUCAGGCUUGCCAGCCU
GGUCCUUGGGCCC>hsa-mir-4284 MI0015893GUUCUGUGAGGGGCUACAUCACCCCAUCAAAGUGGGGACUCAU
GGGGAGAGGGGUAGUUAGGAGCUUUGAUAGAGGCGG>hsa-mir-4285 MI0015891AUUAGCUGGGGCGGCGAGUC
CGACUCAUCAUAUUUAAGGAAUGACCCGGCCUUGGGGUGCGGAAUUGCUGCGGGGCGGGGGC>hsa-mir-4286 M
I0015894UACUUAUGGCACCCACUCCUGGUACCAUAGUCAUAAGUUAGGAGAUGUUAGAGCUGUGAGUACCAUGACUU
AAGUGUGGUGGCUAAACAUG>hsa-mir-4287 MI0015895UAGUUCUUUUUCUCCUUGAGGGCACUUUCAGUUC
CUGAGAUCAAUGUGGUCCUACUGGGGAGACCAUAGGAGCCC>hsa-mir-4288 MI0015896AUGGAGGUGGAGAGU
CAUCAGCAGCACUGAGCAGGCAGUGUUGUCUGCUGAGUUUCCACGUCAUUUG>hsa-mir-4289 MI0015898CCUUG
GGAGGGCAUUGUGCAGGGCUAUCAGGCAGUUUCCUGGGCCUGUCUGCAGAGCCUAAACAGAUCA>hsa-mir-4290 M
I0015899GCCACCAAGAAGGUGAAGGGAGGGUCAGUCCCAAUCUGAAUCCACCAAAAAUAGGUGGUAGAGGGUUGCCCU
CCUUUCUCCCCUACCUCUGACC>hsa-mir-4291 MI0015900CGCCGGGGCUUCAGCAGGAACAGCUGGGUGGAG
GCAGAGCUGUUCUGCUGUGGCUGCAGCCCUG>hsa-mir-4292 MI0015897GAGACACCAGAAGGCCACCUGCUUAG
GAGGCCAGAGGUGCCCCUGGGCCGGCCUUGGUGAGGGGCC>hsa-mir-4293 MI0015826AGAGACACCUGUCCU
UGGGAAGCUGGUGACAUAUUGCUAAUUCACACCAGCCUGACAGGAACAGCCUGACUGAA>hsa-mir-4294 MI00
15827CCGAUGCCUCGGGAGUCUACAGCAGGGCCAUGUCUGUGAGGGCCCAAGGGUGCAUGUGUCUCCAGGUUUCGGUG
C>hsa-mir-4295 MI0015822CUUUGUGGAACAGUGCAAUGUUUCCUUGCCUGUGGCAAGACCACUUCGGUUAAG
GCUAAGAAACUAGACUGUCCUACAGAGA>hsa-mir-4296 MI0015823UUGGGCUUUGAUGUGGGCUCAGGCUCAG
AGGGCUGAAGUGGUUGUGGGGAGGGGCUUCUGGGGACUGUGUCCAUGUCUCUGUGUUU>hsa-mir-4297 MI0015
824AGCACGCACGUGCCUCCUGUCUGUGCCUGCCUUCGAAGUGCACGGCAGGGCCAGGACGGGUCGCUUGGGUGGGG>
hsa-mir-4298 MI0015830GGGGAGGUACCUGGGACAGGAGGAGGAGGCCUUGCCUCAGAAACCAAACUGUCA
AAGUGUAGGUUCCAC>hsa-mir-4299 MI0015829GGGUUCUGACCAAUCAUGUUACAGUGUUUUCUCCUUUAGAGA
GAGCUGGUGACAUGAGAGGCAGAAAAAGGA>hsa-mir-4300 MI0015831UGAGUUUAGAAGAGGGCCAGCUAAUUC
AGCAGAGACAUGAGGUGAUCAAAAACCUUUUUCAAAGCAGUGGGAGCUGGACUACUUCUGAACCAAUA>hsa-mir-43
01 MI0015828ACCAGCCACCUCUCCACUACUUCACUUGUGAACAUUGCAUUCGUGGAGGGUGGCAGGUGCAGCUCUG>h
sa-mir-4302 MI0015833UCAGGAGGGACCAGUGUGGCUCAGCGAGGUGGCUGAGUUUACUUAAGGUUAUUGGAAUGA
G>hsa-mir-4303 MI0015834AGAAAAUAGCUUCUG
AGCUGAGGACAGCUUGCUCUGCUUUUCUUUAGCUUAGGAGCUAACCAUGGU>hsa-mir-4304 MI0015832AGAGAA
GUGGCCGGCAUGUCCAGGGCAUCCCCAUUGCUCUGUGACUGCUGCCAUCUUCUCC>hsa-mir-4305 MI0015835C
UGCCUAGACCUAGACACCUCAGUUCUGGGUUCUAGAGGCCUAAUCCUCUACAAACUCAGUUUUCAGACUGUGAGGGA
AAUUCUCUGUCUUAUUGCUUU>hsa-mir-4306 MI0015836AAGCUGCUUAGUGUCCUAGAGUCUCCAGAGGCAUC
CCUAACCCAGAAUCUUUUGACUGUCCUCUGGAGAGAAAGGCAGUAGGUCUGUACC>hsa-mir-4307 MI0015838UC
AGAAGAAAAAACAGGAGAUAAAGUUUGUGAUAAUGUUUGCUAUAUAGUUAUGAAUGUUUUUCCUGUUCCUUCAGGGC
CA>hsa-mir-4308 MI0015839UAUGGGUUCAGAGGGAACUCCAUGGACAGAAAUUCCUUUUGAGGAAAUUUUC
CCUGGAGUUUCUUCUUAACCUUUUCC>hsa-mir-4309 MI0015837UCUGGGGGUUCUGGAGUCUAGGAUUCAGGA

UCUGGGUUUUGAGGUCUUGGGUUGUAGGGUCUGCGGUUUGAAGCCCCUCUUG>hsa-mir-4310 MI0015840UGGCG
UCUGGGGCCUGAGGCUGCAGAACAUUGCAGCAUUAUGUCCACCCCCACCA>hsa-mir-4311 MI0015841UCAGA
GAGGGGAAAAGAGAGCUGAGUGUGACCUUGAGCAGCUCAGGAGGGCUUCCUGGGUGAGGUGGCAGGUUACAGGUUCGAUCU
UUGGGCCUCAGAUUC>hsa-mir-4312 MI0015842GAAAGGUUGGGGGCACAGAGAGCAAGGAGCCUUCUCCCAAGAGG
AGUCAGGCCUUGUUCUGUCCCAUUCUCAGAG>hsa-mir-4313 MI0015843GAUCAGGCCAGCCCCUGGCC
CAAACCCUGCAGCCCCAGCUGGAGGAUGAGGAGAUGCUGGGCUUGGGUGGGGAAUCAGGGGUGUAAAAGGGCCUGCU>h
sa-mir-4314 MI0015846GGCCAUCCUCUCUGGGAAAUGGGACAGGUAGUGGCCACAGUGAGAAAGCUGGCCUGUC
CUUCUGCCCCAGGGCCCAGAGUCUGUGACUGGA>hsa-mir-4315-1 MI0015844UGGGCUUUGCCCGCUUCUGAG
CUGGACCCUCUCUACCUUGGUGCAGAACUACAGCGGAAGGAAUCUCUG>hsa-mir-4315-2 MI0015983UGGG
CUUUGCCCGCUUUCUGAGCUGGACCCUCUCUACCUUGGUGCAGAACUACAGCGGAAGGAAUCUCUG>hsa-mir-43 10
16 MI0015845AGUGGCCAGGGUGAGGCUAGCUGGUGUGGUCACCCACUCUCCAGCCCAGCCCCAAUCCACCACAAC
CAC>hsa-mir-4317 MI0015850AAAAGGCGAGACAUGCCAGGGAGUUUAUUUUGUAGCUCUCUUGAUAAAAUGUU
UUAGCAAACAC>hsa-mir-4318 MI0015847GCUUCUAAUUAUGUCAUAAACCCACUGUGGACAAGGGCCUUGUCU
UAGACAGUCACUGUGGGUACAUGCUAGGUGCUAA>hsa-mir-4319 MI0015848UUGGCUUGAGUCCCUAGACAAA
GCCACUGGGAAUGCUCCUGAGGACGUUAUAUGAGUGCUCAGCUCUAGGGGCUAUGAUGGUC>hsa-mir-4320 MI0
015849GACAUGUGGGGUUUGCUGUAGACAUUUCAGAUAAACUCGGGAUUCUGUAGCUUCCUGGCAACUUUG>hsa-mir-
4321 MI0015852CUGGUCUCCGACAGCCUCUGCCCCUCCGAGACACCCGCUACCUUGGUGUAGCGGUGGACCGCCC
UGCGGGGGCCUGGC>hsa-mir-4322 MI0015851ACCGCGAGUUCGCGCCUGGCCGUGUCGCCCCACGAGGGGGAC
UGUGGGCUCAGCGGUGGGGGCCCGAGCAU>hsa-mir-4323 MI0015853CGGGGCCAGGCGGGCAUGUGGGGUGU
CUGGAGACGCCAGGCAGCCCCACAGCCUCAGACCUCGGGCAC>hsa-mir-4324 MI0015854CGCCCCUUUGUUA 20
GGGUCUCAGCUCCAGGGAACUUUAAAACCCUGAGACCCUAACCUUAAAGGUGCUGCA>hsa-mir-4325 MI0015865
GGGGAAGAUUGUACUUGUCUCAGUGAGAGAUGCUCUAGAUCAGGAGGCAGACCUCAGGAUGGAGAGAAGGCAGAU
CCUUUGAGAU>hsa-mir-4326 MI0015866GCUGCUCUGCUGUCCUCUGUCUCCAGACUCUGGGUGGAUGGAGCA
GGUCGGGGGCCA>hsa-mir-4327 MI0015867GGCCUGGUAGGCUUGCAUGGGGGACUGGGAAGAGACCAUGAACA
GGUUAGUCCAGGGAGUUCUCAUCAAGCCUUUACUCAGUAG>hsa-mir-4328 MI0015904AACAGUUGAGUCCUGAG
AACCAUUGAGAACCAGUUUCCAGGAUUAACUGUCCG>hsa-mir-4329 MI0015901UAGAGAGGAAGGUGUACC
AGGGUUUUGGAGUUUUUUUCCUCCUGAGACCCUAGUCCACAUUCUGGAGC>hsa-mir-4330 MI0015902AAUU
GUCAGCAGGCAAUAUCUGAGGAUGCAGGAGAGGAAGGGGGCUUCUUUUGACGCCUACUUCUACAGCUGCUCCUCAGAU
CAGAGCCUUGCAGGUCAGGCC>hsa-mir-4417 MI0016753GAAACAACAGGUGGGCUUCCCGAGGGCGGAACA
CCCAGCCCCAGCAUCCAGGGCUCACCUACCACGUUUG>hsa-mir-4418 MI0016754UGGUUUUUGCUCUGAGUGAC 30
CGUGGUGGUUGUGGGAGUCACUGCAGGACUCAGCAGGAAUUC>hsa-mir-4419a MI0016755UGGUGGUGUGGCC
UGUAGUCUUAGCUACUCGGGAGGCUGAGGGAGGAGACUCAGUGAGUGGAGGUCACGCCACUG>hsa-mir-4419b MI
0016861CUCAGGCUCAGUGGUGCAUGCUUAUAGUCCAGCCACUCUGGAGGCUGAAGGAAGAUGGCUUGAGCCU>hsa-
mir-4420 MI0016757CUCUUGGUAUGAACAUUCUGUGUGUUAUGUCUCUCUGUGCACAGGGGACGAGAGUCACUGAU
GUCUGUAGCUGAGAC>hsa-mir-4421 MI0016758CUGGGUCUCCUUUCUGCUGAGAGUUGAACACUUGUUGGGACA
ACCUGUCUGUGGAAAGGAGCUACCUAC>hsa-mir-4422 MI0016759AGUUCUUCUGCAGACAAAAGCAUCAGGAAG
UACCCACCAUGUACCAGUGGGCCUUCUUGAUGCUCUUGAUUGCAGAGGAGCC>hsa-mir-4423 MI0016760AUCA
UGUACUGCAGUUGCCUUUUUGUCCCAUGCUGUUUAAGCCUAGCAUAGGCACCAAAAAAGCAACAACAGUAUGUGAA>hsa
-mir-4424 MI0016763CUUACAUCACACACAGAGUUAACUCAAAAUGGACUAAUUUUUCCACUAGUUAGUCCAUUUC
AAGUUAACUCUGUGUGUGAUGUAGU>hsa-mir-4425 MI0016764GUGCUUACAUGAAUGGUCCCAUUGAAUCCCA 40
ACAGCUUUGCGAAGUGUUGUGGGAUUCAGCAGGACCAUUCGUGUAAAGUAA>hsa-mir-4426 MI0016765AGUUG
GAAGAUGGACGUACUUUGUCUGACUACAAUAUUCAAAAGGAGUCUACUCUUCUACUCUUG>hsa-mir-4427 MI001676
6GAAGCCUCUUGGGGCUUAUUUAGACAAUGGUUUAUCAUUAUUCGUCUGAAUAGAGUCUGAAGAGUCUUU>hsa-mir-44
28 MI0016767UUGGCAGGUGCCAUGUUGCCUGCUCCUACUGUACACGUGGCUGGCAAGGAGACGGGAACAUGGAGCC
GCCAU>hsa-mir-4429 MI0016768AGGGAGAAAAGCUGGGCUGAGAGGCGACUGGUGUCUAAUUUGUUUGUCUCUC
CAACUCAGACUGCCUGGCCCA>hsa-mir-4430 MI0016769GUGAGGCUGGAGUGAGCGGAGAUUCGUACCACUGCAC
UCCAACCUGGUGA>hsa-mir-4431 MI0016771UGGUUUGCGACUCUGAAAACUAGAAGGUUUAUGACUGGGCAUUU
CUCACCCAAUGCCCAAUAUUGAACUUUCUAGUUGUCAGAGUCAUUAACCC>hsa-mir-4432 MI0016772GCAUCUU
GCAGAGCCGUUCCAAUGCGACACCUCUAGAGUGUCAUCCCCUAGAAUGUCACCUUGGAAAGACUCUGCAAGAUCCU>hs
a-mir-4433 MI0016773CAUCCUCCUACGUCCCACCCCCACUCCUGUUUCUGGUGAAAUAUUCAAACAGGAGUGG 50

GGGUGGGACAUAAAGGAGGAUA>hsa-mir-4434 MI0016774UCACUUUAGGAGAAGUAAAGUAGAACUUUGGUUUUC
 AACUUUUCCUACAGUGU>hsa-mir-4435-1 MI0016775AGGCAGCAAAUUGGCCAGAGCUCACACAGAGGGAUGAGU
 GCACUUCACCUGCAGUGUGACUCAGCAGGCCAACAGAUAGCU>hsa-mir-4435-2 MI0016777GCAAAUUGGCCAGA
 GCUCACACAGAGGGAUGAGUGCACUUCACCUGCAGUGUGACUCAGCAGGCCAACAGAUAGCU>hsa-mir-4436a MI00
 16776GCCUCACUUUCCACUUAUAGCCUGCCCUGCCCUUGGAAUCUGCUCCACGAUUUGGGCAGGACAGGCAGAAGUGGA
 UAAGUGAGGA>hsa-mir-4436b-1 MI0017425GUGUCCUCACUUGUCCACUUCUGCCUGCCCUGCCCAAAUUGGUGG
 AGCAGAUUCGAGGGGCAGGGCAGGAAGAAGUGGACAAGUGAGGCCAU>hsa-mir-4436b-2 MI0019110GUGUCCU
 CACUUGUCCACUUCUGCCUGCCCUGCCCAAAUUGGUGGAGCAGAUUCGAGGGGCAGGGCAGGAAGAAGUGGACAAGUGAGG
 CCAU>hsa-mir-4437 MI0016778ACUUUGUGCAUUGGUGCCACAAGGAGGGGAUGACCCUUGUGGGGCUCAGGGUAC
 AAAGGUU>hsa-mir-4438 MI0016781UAAGUGUAAACUUAAGGACUGUCUUUUAAGCCUGUGCCUUGCCUUUCC
 UUUUGGCACAGGCUUAGAAAAGACAGUCUUUAAGUUUACACUUC>hsa-mir-4439 MI0016782CCAGUGACUGAUAC
 CUUGGAGGCAUUUUAUCUAAGAUACACACAAAAGCAAAUGCCUCUAAGGUAUCAGUUUACCAGGCCA>hsa-mir-4440
 MI0016783CUCUCACCAAGCAAGUGCAGUGGGGCUUGCUGGCUUGCACCUGACUCCCUUCACCAAGCAAGUGUCGUG
 GGGCUUGCUGGCUUGCACUGUGAAGAU>hsa-mir-4441 MI0016784CAGAGUCUCCUUCGUGUACAGGGAGGAGAC
 UGUACGUGAGAGAUAGUCAGAUCCGCAUGUUAAGAGCAGAGUCUCCUUCGUGUACAGGGAGGAGAUUGUAC>hsa-mir-4
 442 MI0016785GCGCCCUCCCUUCUCCCCGGUGUGCAAAUUGUGUGUGCGGUGUUAUGCCGGACAAGAGGGAGGUG
 >hsa-mir-4443 MI0016786GGUGGGGGUUGGAGGCGUGGGUUUAGAACCUAUCCCUUUCUAGCCCUAGGCA>hsa
 -mir-4444-1 MI0016787GUGACGACUGGCCCCGCCUCUCCUCUCGGUCCCAUAUUGAACUCGAGUUGGAAGAGGC
 GAGUCCGGUCUCAAA>hsa-mir-4444-2 MI0019111GUGACGACUGGCCCCGCCUCUCCUCUCGGUCCCAUAUUG
 AACUCGAGUUGGAAGAGGCGAGUCCGGUCUCAAA>hsa-mir-4445 MI0016788UCCUGCAGAUUGUUUCUUUUGC
 CGUGCAAGUUUAAGUUUUUGCACGGCAAAAGAAACAAUCCAGAGGGU>hsa-mir-4446 MI0016789CUGGUCCA
 UUCUCCUGCCAUUCUUGGCUUCAAUUUACUCCAGGGGCUUGCAGUGACAUGGGUCAA>hsa-mir-4447 MI0016790
 GUUCUAGAGCAUGGUUUCUCAUCAUUGCACUACUGAUACUUGGGGUCAGAUAAUUGUUUGUGGUGGGGGCUGUUGUUUG
 CAUUGUAGGAU>hsa-mir-4448 MI0016791AGGAGUGACCAAAAGACAAGAGUGCGAGCCUUCUAUUAUGCCCAGA
 CAGGGCCACCAGAGGGCUCUUGGCUAGGGGUAAUGCCA>hsa-mir-4449 MI0016792AGCAGCCCUUGCGGGCC
 CGGGGGGCGGGCGGGGUGCCCGUCCCGGGGUGCGCGAGGCACAGGCG>hsa-mir-4450 MI0016795UGUCUGGG
 GAUUUGGAGAAGUGGUGAGCGCAGGUCUUGGCACCAUCUCCCUUGGUCCCUUGGCU>hsa-mir-4451 MI0016797
 UCUGUACCUCAGCUUUGCUCCCAACCAACCACUUCACAUUGUUUGCUGGUAGAGCUGAGGACAGC>hsa-mir-4452
 MI0016798UGGAUCACUUGAGGCCAAGAGUGCAAGGCUAGUGUGCACAGCCUUGAAUUCUUGGCCUUAAGUGAUCCC
 >hsa-mir-4453 MI0016799UGGAGAGCUUGGUCUGUAGCGGUUCCUUCGGGGCAGGUGGGGACUGCUCCUUUGGG
 AGGAAGGAGGAGGCCAGGCCGCGUCUUCAGG>hsa-mir-4454 MI0016800CCGGAUCCGAGUCACGGCACCAAAU
 UUCAUGCGUGUCCGUGUGAAGAGACCACCA>hsa-mir-4455 MI0016801AGAAGGGUGUGUGUGUUUUUCCUGAGA
 AUAAGAGAAGGAAGGACAGCCAAAUUCUUCA>hsa-mir-4456 MI0016802AUGAACCUUGGUGGCUUCCUUUUCUGG
 GAGGAAGUUAGGGUUA>hsa-mir-4457 MI0016803GGAGUACUCCAGUCAAUACCGUGUGAGUUAGAAAAGCUC
 AUUCACAAGGUUUGACUGGCGUAUUA>hsa-mir-4458 MI0016804GAGCGCACAGAGGUAGGUGUGGAAGAAAG
 UGAAACACUAUUUUAGGUUUUAGUUACACUCUGCUGUGGUGUGCUG>hsa-mir-4459 MI0016805ACCCAGGAGGC
 GGAGGAGGUGGAGGUUGCAGUGAGCCAAGAUUGGUCACUGACUCCAGCCUUGGG>hsa-mir-4460 MI0016806GU
 UUUUUGCCCAUAGUGGUUGUGAAUUUACCUUCUCCCUUUGCAGUGAUAAAGGAGGUAAAUUCACAACCACUGUGGGCAG
 AAAC>hsa-mir-4461 MI0016807GAGUAGGCUUAGGUUAUGUACGUAGUCUAGGCCAUACGUGUUGGAGAUUGAGA
 CUAGUAGGGCUAGGCCUACUG>hsa-mir-4462 MI0016810CUUCCAGCUGCCCUAAGUCAGGAGUGGCUUUCUG
 ACACGGAGGGUGGCUUGGGAAA>hsa-mir-4463 MI0016811AAUAGAUUAUUGGUCACCACCUCAGUUUCUGAAU
 UUGUGAGACUGGGGUGGGGCCUGAGAAUUUGC>hsa-mir-4464 MI0016812GGAACCUUAGUAAGGUUUGGAUAGA
 UGCAAUAAAGUAUGUCCACAGCUGAAAAGACAUAUUUAUUGCAUGUAUCCAAACCUUACUAAUUA>hsa-mir-4465
 MI0016816CAUGUGUCCCCUGGCACGCUAUUUAGGGUUUAUUAUGGAACCUCAAGUAGUCUGACCAGGGGACACAUGA
 >hsa-mir-4466 MI0016817ACGCGGGUGCGGGCCGGCGGGGUAGAAGCCACCCGGCCCGGCCCGGCCCGGCGA>hs
 a-mir-4467 MI0016818UGGUGGCGGCGGUAGUUAUGGGCUUCUCUUUCUACACAGCAGCCCCUGGGCCGCCGCCUC
 CCU>hsa-mir-4468 MI0016819AGUCUUCUCCUGGGGCUUUGGUGGCUAUGGUUGACUGGGCCACUCAGAGCAGAA
 GGAUGAGAUG>hsa-mir-4469 MI0016820CCGACGCGGAGAGCGGCUCUAGGUGGGUUUGCGGCGGCGAGGACAC
 CGCCGCUCCCUUAGGGUCGUCGAGCGUGA>hsa-mir-4470 MI0016821CGAGCCUUCUUGGCUUUCAGUUU
 GUCUCGGUCCUUGGAACGUGGCAAACGUGGAAGCCGAGAGGGCUCU>hsa-mir-4471 MI0016822CCAAAUUUA

AACUAAAACCUCUACUAAGUUUCCAUGAAAAAGAACCCAUUGGGAACUUAAGUAGAGGUUUAAAGUUUUAAAAUUUGA>hsa-mi
r-4472-1 MI0016823UGGCAGACCCUUGCUCUCACUCUCCCUAAUGGGGCUGAAGACAGCUCAGGGGCAGGGUGG
GGGGUGUUUUUUUUUU>hsa-mir-4472-2 MI0016824UGGUGGGGGUGGGGGGUGUUUUUUUUUUUUGAGAC
AGAGUCUUGCUCGCGCCAGGCCGAGU>hsa-mir-4473 MI0016825AAGGAACAGGGGACACUUGUAAUUGGAG
AACACUAAGCUAUGGACUGCUAUGGACUGCUAGUGCUCUCCGUUACAAGUAUCCCCUGUUACCU>hsa-mir-4474 MI
0016826UUGCCUACCUUGUAGUCUCAUGAUCAGACACAAAUAUUGGCUCUUUUGGGCUGGUCAGAGGCUAACAAGGUA
GGCAC>hsa-mir-4475 MI0016827AUCUCAAUGAGUGUGUGGUUCUAAAUGACUCAUAGUCAAGGGACCAAGCAUU
CAUUAUGAA>hsa-mir-4476 MI0016828AAAAAGCCUGUCCCUAAGUCCCUCCAGCCUCCAGAGUUGGUGCCAGG
AAGGAUUUAGGGACAGGCUUUG>hsa-mir-4477a MI0016829UCCUCCUCCCAUCAAAUCACAAAUGUCCUUAUUGG
CAUUUAAGGAUUGCUAUUAAGGACAUUUGUAUUCACGGGAGGAGGU>hsa-mir-4477b MI0016830ACCUCCUCC
CGUGAAUCACAAAUGUCCUUAUUAAGCAAUCCUUAUUAUUGCCAUAUAAAGGACAUUUGUAUUGAUGGGAGGAGGA>hsa-mir
-4478 MI0016831GGCCGAGGCUGAGCUGAGGAGCCUCCAAACCUGUAGACAGGGUCAUGCAGUACUAGGGGCGAGCC
UCAUCCCCUGCAGCCUUGGCC>hsa-mir-4479 MI0016838GAAACCAAGUCCGAGCGUGGCUGGCGCGGAAAGUU
CGGGAACGCGCGCGGCCGUGCUCGGAGCAGCGCCA>hsa-mir-4480 MI0016841GCAGAGGUGAGUUGACCUCAC
AGGGCCACCCAGGGAGUAAAGUAGCCAAGUGGAAGUUACUUUACCUCUGU>hsa-mir-4481 MI0016842GGAGUGGG
CUGGUGGUUUUUUAAAGAGGAAGGGAGACCUAAGCUAGCACAUGAGCACGCUC>hsa-mir-4482-1 MI0016843AGU
GAGCAACCCAGUGGGCUA
UGGAAUUGUGUGGAAGAUGGCAUUUCUAUUUCUCAGUGGGGCUCUACC>hsa-mir-4482-2 MI0017872AAUAAA
AAUUGAAUAGUGAGCAACCCAGUGGGCUAUGGAAAUGUGUGGAAGAUGGCAUUUCUAUUUCUCAGUGGGGCUCUACC
UUAUCUCAUCAAC>hsa-mir-4483 MI0016844AAAAACAACAUACUAGUGCAUACCCAUUAUUAUAGGGGUGG
UCUGUUGUUGUUUUUCU>hsa-mir-4484 MI0016845GGGUUCCUCUGCCUUUUUUUCCAAUGAAAAUAACGAAAC
CUGUUAUUUCCCAUUGAGGGGGAAAAAGGCGGGAGAACCCCA>hsa-mir-4485 MI0016846AGAGGCACCGCCUG
CCCAGUGACAUGCGUUUAACGGCCGCGGUACCCUAAUCUGUGCA>hsa-mir-4486 MI0016847GCAUGCUGGGCGAG
GCUGGCAUCUAGCACAGGCGGUAGAUGCUUGCUCUUGCCAUAUGCAAUGA>hsa-mir-4487 MI0016848ACUGUCCU
UCAGCCAGAGCUGGCUGAAGGGCAGAAGGGAACUGUCCUUCAGCCAGAGCUGGCUGAAGGGCAGA>hsa-mir-4488 M
I0016849GGUAGGGGGCGGGCUCGCGGCUGGGACCCACUAGGGUGGCGCCUUGGCCCCGCCCGCCC>hsa-mir-4
489 MI0016850GGGGUGGGGCUAGUGAUGCAGGACGCUGGGGACUGGAGAAGUCCUGCCUGACCCUGUCCCA>hsa-
mir-4490 MI0016852AUAGUUUCUGCAAUGCUCUAAAUCUCUGGCCAAAGACCAGAACUUAUUGGUCUCUGGUAAGAG
AUUUGGGCAUAUUAAGAAACUAA>hsa-mir-4491 MI0016853ACAUUUGGUCACACCAGUCCACAUUAACGUGGACC
AGACAAUUAUUAUUGUGGACUGGUGUGACCAAAA>hsa-mir-4492 MI0016854CUGCAGCGUGCUUCCAGGCCCC
GCGCGCGGACAGACACACGGACAAGUCCCGCCAGGGGCGGGCGCGCCAGCCGG>hsa-mir-4493 MI0016855C
CAGAGAUGGGAAGGCCUUCGCGUGAUUAUCACAGCCAUGCCUUUACCUCAGAAAGGCCUUUCCAUUCUCUGUC>hsa-mir
-4494 MI0016856AGUUUUAGUUACCCUGGUCAUCUGCAGUCUGAAAAUACAAAAUGGAAAAUUCAGACUCUGGCUG
ACCAGAGGUAAACUGAAACC>hsa-mir-4495 MI0016857AAGAAUUGUAAACAGGCUUUUUGCUCAGUGGAGUUAUU
UUGAGCAAAAAGCUUAUUACAUUUCUG>hsa-mir-4496 MI0016858ACAUCAGCUCUAUAAAUCCUCGAAGCUGC
CUUUAAGAAUAGAGAAACUGAAGCUGAGAGGG>hsa-mir-4497 MI0016859ACCUCCGGGACGGCUGGGCGCCGGC
GGCCGGGAGAUCCGCGCUUCCUGAAUCCCGGCCGGCCCGCCGGCGCCCGUCCGCCCGCGGGUC>hsa-mir-4498 MI
0016860AGGGCUGGGCUGGCAGGGCAAGUGCUGCAGAUUUUGUCUAAAGCAGCCCCUGCCUUGGAUCUCCCA>hsa-mi
r-4499 MI0016862AAGACUGAGAGGAGGGAACUGGUGAGUUGUACAUAAGAAUUGCUUUAACUCCUUGUCUCAGUC
UGUUU>hsa-mir-4500 MI0016863CAGGAGAGAAAGUACUGCCCAGAAGCUAAAGUGUAGAUCAAACGCAUAAUGG
CUGAGGUAGUAGUUUCUUGAACUU>hsa-mir-4501 MI0016864UAUGUGACCUCGGAUGAAUCACUGAAAUUAGUC
UGAGCUUCUGUUUCAUCAGAUGUCACAUUUU>hsa-mir-4502 MI0016865AGCCUUUAGCAAGUUGUAAUUCUUUU
GCUGAUGGAGGGUCUUGCCUCCAUGGGGAUGGCUGAUGAUGAUGGUGCUGAAGGC>hsa-mir-4503 MI0016866AC
AAUGUAGAUUUUAAGCAGGAAAUAGAAUUUACAUAUAAAUUUUAUUUUGUUUUAUUUCCUGCUAAAAUAUCUACAUG
C>hsa-mir-4504 MI0016867CUAAGAUAAUGUCCUCCAGGUUCAUCUCUGUUGUCAUUUUGGCAUGGACCAUUUG
UGACAAUAGAGAUGAACAUGGAGGAUAUUAUCUUA>hsa-mir-4505 MI0016868GGAGGCUGGGCUGGGACGGAC
ACCCGGCCUCCACUUUCUGUGGCAGGUACCUCCUCCAUGUCGGCCCGCCUUG>hsa-mir-4506 MI0016869UGGCC
UCUGCCAUCAGACCAUCUGGGUUAAGUUUGGCUCCAUCUUUAUGAAUUGGGUGGUCUGAGGCAAGUGGUCU>hsa-mir
-4507 MI0016871UCUGGGCUGAGCCGAGCUGGGUUAAGCCGAGCUGGGUUGGGCUGGGCUGGGU>hsa-mir-4508
MI0016872AGGACCCAGCGGGGCUGGGCGCGGGAGCAGCGCUGGGUGCAGCGCCUGCGCCGGCAGCUGCAAGGGCCG

>hsa-mir-4509-1 MI0016873CUUUAUACUAUCUCAAAACUAAAGGAUAUAGAAGGUUUUCCCUUUCUCUUGCCCU
GAAACCUUCUGUAUCCUUUAUUUUGAGAUAGUAUUAGAA>hsa-mir-4509-2 MI0016874CUUUAUACUAUCUCA
AACUAAAAGGAUAUAGAAGGUUUUCCCUUUCUCUUGCCCUGAAACCUUCUGUAUCCUUUAUUUUGAGAUAGUAUUAGAA>h
sa-mir-4509-3 MI0016875CUUUAUACUAUCUCAAAACUAAAGGAUAUAGAAGGUUUUCCCUUUCUCUUGCCCU
AACCUUCUGUAUCCUUUAUUUUGAGAUAGUAUUAGAA>hsa-mir-4510 MI0016876GUGUAUGUGAGGGAGUAGGA
UGUAUGGUUGUAGAUAGACAACUACAAUCUUUUCUCACAACAGACAG>hsa-mir-4511 MI0016877AAAAAAAAG
GGAAAGAAGAACUGUUGCAUUUGCCCUGCACUCAGUUUGCACAGGGUAAAUGCAAUAGUUCUUCUUUCCCUUUUUUA>h
sa-mir-4512 MI0016878CUCAGCCCCGGGCAAUAUAGUGAGACCUCGUCUCUACAAAAAUUGAGACAGGGCCUCAC
UGUAUCGCCCAGGCUGGA>hsa-mir-4513 MI0016879AUUCUAGGUGGGGAGACUGACGGCUGGAGGCCCAUAAGC
UGUCUAAAACUUCGGCCCCCAGAUUUCUGGUCUCCCCACUUCAGAAC>hsa-mir-4514 MI0016880GUUGAGACAG 10
GCAGGAUUGGGGAAACAUUUUACCUCGUCUCUUGCCUGUUUAGA>hsa-mir-4515 MI0016881GCGGGAGGUG
UACAGGACUGGACUCCCGGCAGCCCCAGGGCAGGGGCGUGGGGAGCUGGUCCUAGCUCAGCGCUCGCCGA>hsa-mir-
4516 MI0016882AGGGAGAAGGGUCGGGGCAGGGAGGGCAGGGCAGGCUCUGGGGUGGGGGUCUGUGAGUCAGCCAC
GGCUCUGCCCACGUCUCCCC>hsa-mir-4517 MI0016883AGGUAAAUAUGAUGAAACUCACAGCUGAGGAGCUUAG
CAAGUAGCUAAGGCCAGAGCUUGUGUUUGGGUGGUGUGGCUG>hsa-mir-4518 MI0016884UGGGGAAAAAGUGCU
GGGAUUGAUUAGUGAUGUCUGCGUGGGGAACCGGGGCUCAGGGAUGAUACUGUGCUGAGAAGCCCCCU>hsa-mir-451
9 MI0016885AACCUACAGCAGUGCGCAGGGCUGCACUGUCUCCGUCUGCGCCUCGAGUAAGCGGGUA>hsa-mir-45
20a MI0016886GUGUGCCACCUCGCGUGUUUCUGUCCAAAUCAGAAAAAGGAUUUGGACAGAAAAACACGCAGGAAGAAG
GAA>hsa-mir-4520b MI0017358CCUGCGUGUUUCUGUCCAAAUCUUUUUCUGAUUUGGACAGAAAAACACGCAGG
U>hsa-mir-4521 MI0016887UCGGCUAAGGAAGUCCUGUGCUCAGUUUUGUAGCAUCAAACUAGGAUUUCUCUUG 20
UUAC>hsa-mir-4522 MI0016889GCGGGCGUUGCCUGGGGGCCUCGCAGGGGAGAUCCAGCCCAGGCUGGUUCCG
CUGACUCUGCCUGUAGGCCCGUGGGCUCUUCUG>hsa-mir-4523 MI0016890GCGGGGACCGAGAGGGCCUCGG
CUGUGUGAGGACUAGAGGCGGCCGAGGCCCGGGCCGUUCCCCCGA>hsa-mir-4524a MI0016891GAACGAUAGC
AGCAUGAACCUUGUCUCACUCGAGAAUUAUUUGAGACAGGCUUAUGCUGCUAUCCUUA>hsa-mir-4524b MI0019
114UAGCUGGGUGGAUGUGUUCUUUUGAAGGAUAGCAGCAUAAAGCCUGUCUAAAAUAAUUCUGCAGUGAGACAGGUUA
UGCUGCUAUCGUUCCAAAGAGGAAGGGUAAUCACUGUC>hsa-mir-4525 MI0016892GUCAGAGGGGGGAUGUGCA
UGCUGGUUGGGGUGGGCUGCCUGUGGACCAAUCAGCGUGCACUCCCCACCCUGAA>hsa-mir-4526 MI0016893U
GCGGUGACAUCAGGGCCCAGUCCUCUGUCUAGCCCCAGGUGACGUGCUGGGCUGACAGCGGCGUAGCCGCUAACGUC
ACUGUC>hsa-mir-4527 MI0016894CCAGAAGUGGUCUGCAAAGAGAUGACUGUGAAUCCAAGAUCCACAUCAGCU
CUGUGCUGCCUACAUCUGA>hsa-mir-4528 MI0016895UAUUCUACUGAGAGUACAGAUUUUAUAUAUAUGAUCA 30
UUAUAUGUAUGAUGAGAUCAUUAUAUGUAUGAUCUGGACACCCAGUAGAAUC>hsa-mir-4529 MI0016896AUGAC
AGGCCAUACAGCAGUCCAAUGAAGACAUGAAGACCCAAUGUCUUAUUGGACUGCUGAUGGCCCGUCACUGGGA>hsa-mi
r-4530 MI0016897CGACCGCACCCGCCGAAGCUGGGUCAAGGAGCCCAGCAGGACGGGAGCGCGCGC>hsa-mir
-4531 MI0016898GCCUAGGAGUCCUUGGUCAGUGGGGACAUGGAGAAGGCUCUGAGGA>hsa-mir-4532 MI00
16899ACAGACCCCGGGGAGCCCGGGGUGAAGCUCCUGGUAUCCUGGGUGUCUGA>hsa-mir-4533 MI0016900U
GAGAAUGUGGAAGGAGGUUGCCGGACGCGUCUGGCUGCCUCCAGCGUCCACUCCCUUUCUCUCUCC>hsa-mir-4
534 MI0016901UGUGAAUGACCCCUUCCAGAGCCAAAAUCACCAGGGAUGGAGGAGGGGUCUUGGGUACU>hsa-mi
r-4535 MI0016903AACUGGGUCCAGUCUUCACAGUUGGUUUCUGACACGUGGACCUUGGCUGGGACGAUGUG>hsa-
mir-4536-1 MI0016906AUGUGGUAGAUUAUAGCACGAUAUAUAUACUGCCUGCUUUUAUACAUACAUACAUACAU
ACCUAUAUCGUGCAUAUAUCUACCACAU>hsa-mir-4536-2 MI0019149AUGUGGUAGAUUAUAGCACGAUAUAGG 40
UAUGUAUGUAUGUAUGUAUAAAAGCAGGGCAGUAUAUAUAUCGUGCAUAUAUCUACCACAU>hsa-mir-4537 MI001
6908UGAGCCGAGCUGAGCUUAGCUGGGCUGAGCUAACCCAGGGCUGGGCUGAGCUGGGCUGAGCUGAGCUGAGC>hsa-m
ir-4538 MI0016909GAGCUUGGAUGAGCUGGGCUGAACUGGGCUGGGUUGAGCUGGGCUGGGCUGAGUUGAGCCAGG
CUGAUCUGGGCUGAG>hsa-mir-4539 MI0016910UGAGCUGGGCUCUGCUGUGCUGUGCUGAGCAGGGCUGAGCUG
AACUGGGCUGAGCUGGGC>hsa-mir-4540 MI0016911AAGCUGCAUGGACCAGGACUUGGCACCUUUGGCCUAGU
CCUGCCUGUAGGUUA>hsa-mir-4632 MI0017259GAGGGCAGCGUGGGUGUGGGCGAGGCAGGCUGACCGUUUG
CCGCCUCUCGCGUCUCUAG>hsa-mir-4633 MI0017260UGGCAAGUCUCCGCAUAUGCCUGGCUAGCUCCUCCAC
AAAUGCGUGUGGAGGAGCUAGCCAGGCAUAUGCAGAGCGUCA>hsa-mir-4634 MI0017261GGACAAGGGCGGCGC
GACCGGGCCCGGGCUCUUGGGCGGCCGCUUCCCCUCC>hsa-mir-4635 MI0017262CCGGGACUUUGGGGUUC
UGACCCACUUGGAUCACGCCGACAACACUGGUCUUGAAGUCAGAACCCGCAAAGUCCUG>hsa-mir-4636 MI001 50

7263UAGAUUCAGAACUCGUGUCAAAGCCUUUAGCCCAGCAAUGGGAGAGUGCUAAAAGGCUUCAAGCACGAGUUCUGAA
UCUA>hsa-mir-4637 MI0017264CCCUUACUUGGAUCUGCAAUUAGUAUUUUAAUCAUAGAUUGUAUUUAGUUAGU
UUUUAAUACUAAUCUGCAGAUUCAAGUGAGGG>hsa-mir-4638 MI0017265GACUCGGCUGCGGUGGACAAGUCCGG
CUCCAGAACCUGGACACCGCUCAGCCGGCCGCGGCAGGGGUC>hsa-mir-4639 MI0017266UUGCUAAGUAGGCUG
AGAUUGAUGUCAGGUUAUCCCCAAGCAUAACCCUCACUCUACCCUUGC UUUGCAG>hsa-mir-4640 MI0017267CUG
UGGGCUGGGCCAGGGAGCAGCUGGUGGGUGGGAAGUAAGAUCUGACCUGGACUCCAUCCACCCACCCCCUGUUUCCUGG
CCCACAG>hsa-mir-4641 MI0017268GGGGGGCAGGGGGCAGAGGGCAUCAGAGGACAGCCGCCUGGUGCCCAUGC
CAUACUUUUGCCUCAG>hsa-mir-4642 MI0017269CACAACUGCAUUGGAUCGUGCCCCUGGUGGCUGUGGCCUAGG
GCAAGCCACAAAGCCACUCAGUGAUGAUGCCAGCAGUUGUG>hsa-mir-4643 MI0017270GUGUGCCCUAGCAUU
AUAUUAUGUGUUAUUCACAUGAUCAUAAAGUGGACACAUGACCAUAAAUGCUAAAGCACAC>hsa-mir-4644 MI00 10
17271GCGGCGGUGCUCUGCCUCUUUCUCCAUCCACCCUGGUCCAGGUCCACAGCAGUGGAGAGAGAAAAAGAGACAGAAG
GAUGGCCGU>hsa-mir-4645 MI0017272UGAUAGGGAAACCAGGCAAGAAAUAUUGUCUCCUCAAGUUGCGACGAG
ACAGUAGUUCUUGCCUGGUUUCUUAUCA>hsa-mir-4646 MI0017273ACUGGGAAGAGGAGCUGAGGGACA UUGC
GGAGAGGGUCUCACAUUGUCCUCUCCCUUCCAG>hsa-mir-4647 MI0017274CCAGGAGGGUGAAGAUGGUGCU
GUGCUGAGGAAAGGGGAUGCAGAGCCUGCCAGCACCACCACCUCCUAUGCUCCUGG>hsa-mir-4648 MI001727
5UGUGGGACUGCAAAUGGGAGCUCAGCACCUGCCUGCCACCCACGCAGACCAGCCCCUGCUCUGUCCCCACAG>hsa-mi
r-4649 MI0017276UCUGGGCGAGGGGUGGGCUCUCAGAGGGGUGGCAGUACUGCUCUGAGGCCUGCCUCUCCCCAG
>hsa-mir-4650-1 MI0017277UUCUGUAGAGAUUAUCAGGCCUCUUUCUACCUUCCAAGGCUCAGAAGGUAGAAUG
AGGCCUGACAUAUCUGCAGGA>hsa-mir-4650-2 MI0017278UUCUGUAGAGAUUAUCAGGCCUCUUUCUACCUUC
CAAGGCUCAGAAGGUAGAAUGAGGCCUGACAUAUCUGCAGGA>hsa-mir-4651 MI0017279CGGCGACGGCGGGGU 20
GGGUGAGGUCGGGCCCCAAGACUCGGGGUUUGCCGGGCGCCUCAGUUCACCGCGGCCG>hsa-mir-4652 MI001728
0UAUUGGACGAGGGGACUGGUUAAUAGAACUAACUAACCAGAACUAUUUUGUUCUGUUAACCAUCCCCUCAUCUAAUA>
hsa-mir-4653 MI0017281UUGUCCAAUUCUCUGAGCAAGGCUUAAACACCAAAGGGUUAAGGGUUUGCUCUGGAGUU
AAGGGUUGCUUGGAGAAUUGGAGAA>hsa-mir-4654 MI0017282CUGGCUGGUUGUGGGAUCUGGAGGCAUCUGGG
GUUGGAAUGUGACCCAGUCUCCUUUCCCUCAUCAUCUGCCAG>hsa-mir-4655 MI0017283CCAAGGGCACACC
GGGGAUGGCAGAGGGUCGUGGGAAAGUGUUGACCCUCGUCAGGUCCCCGGGGAGCCCCUGG>hsa-mir-4656 MI001
7284AGGCUGGCGUGGGCUGAGGGCAGGAGGCCUGUGGCCGGUCCAGGCCUCCUGCUUCCUGGGCUCAGGCUCGGUUU>
hsa-mir-4657 MI0017285AAUGUGGAAGUGGUCUGAGGCAUAUAGAGUAUAUGCCAAGAACACUACCAUAU>hsa-
mir-4658 MI0017286GUCGCCCUCACUCAGAGCAUCUACCCCACUACCGGUGAGUGUGGAUCCUGGAGGAAUCGU
GGC>hsa-mir-4659a MI0017287GAAACUGCUGAAGCUGCCAUGUCUAAAGAAGAAAACUUUGGAGAAAAAUUUUCU 30
UCUUAGACAUGGCAACGUCACACAGUUUC>hsa-mir-4659b MI0017291CUGUUGACGUUGCCAUGUCUAAAGAAGAA
AAUUUUUCUCCAAAGUUUUCUUCUAGACAUGGCAGCUUCAGCAG>hsa-mir-4660 MI0017288ACUCCUUCUGCA
GCUCUGGUGGAAAAUGGAGAAGACUUUCCUUCCUCCAUCUCCCCAGGGCCUGGUGGAGU>hsa-mir-4661 MI00
17289UUUACUCUGAACUAGCUCUGUGGAUCCUGACAGACAGCCUGAUAGACAGGAUCCACAGAGCUAGUCCAGAGUAAA
>hsa-mir-4662a MI0017290UCUAUUUAGCCAAUUGUCCAUCUUUAGCUAUUCUGAAUGCCUAAAGAUAGACAAUU
GGCUAAAUAGA>hsa-mir-4662b MI0017293CACAAUUCUAUUUAGCCAAUUGUCUAUCUUUAGGCAUUCAGAAU
AGCUAAAGAUGGACAAUUGGCUAAAUAGACACUGUG>hsa-mir-4663 MI0017292CUGUGGUGGAGCUGAGCUCCA
UGGACGUGCAGUGGCAUCUGUCAUUGCUGCCUCCUGGAGCUCAGGCCCUUGCAG>hsa-mir-4664 MI0017294GU
UGGGGGCUGGGUGCCCACUCCGCAAGUUAUCACUGAGCGACUUCGGGUCUGUGAGCCCCGUCCUCCGC>hsa-mir-46
65 MI0017295CUCGAGGUGCUGGGGGACGCGUGAGCGCGAGCCGCUCCUCACGGCUCGGCCGCGGCGCGUAGCCCCC 40
GCCACAUCGGG>hsa-mir-4666a MI0017296AUCACUAAAAUACAUGUCAGAUUGUAUGCCUACAAAAUCCCUCCA
GACUGGCAUACAAUC
UGACAUGUAUUUAGAGAU>hsa-mir-4666b MI0019299UGUCUAAAUUGCAUGUCAGAUUGUAAUUCGAGGCC
UUCUCCAAUACUGGGAAUUAACAAUUGACAUGCAAUUUAGACA>hsa-mir-4667 MI0017297UGACUGGGGAGCA
GAAGGAGAACCCAAAGAAAAGCUGACUUGGAGGUCCCUCCUUCUGUCCCCACAG>hsa-mir-4668 MI0017298AGGG
AAAAAAAAAAGGAUUUGUCUUGUAGCCAGGAUAUUGUUUAAAAGAAAAUCCUUUUUGUUUUUCCAG>hsa-mir-4669
MI0017300GCCUCCCUACUUCUCCUGGCCAUCCAGGCAUCUGUGUCUGUGUCCGGGAAGUGGAGGAGGGC>hsa-mir-
4670 MI0017301CUCUAGGAAGCGACCAUGAUGUAACUUCACAGACUUCUCCAAAAGUCUGAAGUUAUCAUAGGUCGC
UUCUAGAG>hsa-mir-4671 MI0017302UAUUUUUAGACCGAAGACUGUGCGCUAAUCUCUUAAGCACUGAAGAUUA
GUGCAUAGUCUUUGGUCUAAAAUA>hsa-mir-4672 MI0017303GGCUGCUUCUCGCCUCUGUCCAGCUGUGUGGC 50

CUUGGACAAGCCUCUUGGUUACACAGCUGGACAGAGGCACGAAACAGCC>hsa-mir-4673 MI0017304GUCCAGGC
 AGGAGCCGGACUGGACCUCAGGGAAGAGGCUGACCCGGCCCCUCUUGCGGC>hsa-mir-4674 MI0017305CCCAGG
 CGCCCGCUCGCCAGCCACGCCCGCGCCGGGUCCCUCCUCCCGGAGAGGCUGGGCUCGGGACGCGCGGCUCAGCUCGG
 G>hsa-mir-4675 MI0017306CAUGAGAAAAUCCUGCUGGUCAACCAUAGCCCUGGUCAGACUCUCCGGGGCUGUGAU
 UGACCAGCAGGACUUCUCAUG>hsa-mir-4676 MI0017307UGAAUGAAAGAGCCAGUGGUGAGACAGUGAGUUGAU
 UACUUCUCACUGUUUCACCACUGGCUCUUUGGUUCA>hsa-mir-4677 MI0017308GCAAAGCAGCAAUUGUUCUU
 GGUCUUUCAGCCAUGACCUGACCUCUGUCUGUGAGACCAAAGAACUACUUUGCUUGGC>hsa-mir-4678 MI00173
 09GGAAAAAACAAGGUUAUUGUUCAGACUUAUGAUUUUUGGGGUCAAAGAUUCUGAGCAAUAACCUAUUAAAAAAC>hsa
 -mir-4679-1 MI0017310GUCUUUUUUCUGUGAUAGAGAUUCUUUGCUUUUUGAAGAAACAAAAAGCAAAGAAUCUCU
 AUCACAGAAAAAAGAU>hsa-mir-4679-2 MI0017311UAUCUUUUUUCUGUGAUAGAGAUUCUUUGCUUUUUGUUU
 CUAACAAAGCAAAGAAUCUCUAUCACAGAAAAAAGACG>hsa-mir-4680 MI0017312UAUAAGAACUCUUGCAGUC
 UUAGAUGUUUAUAAAAUAUAUAUCUGAAUUGUAAGAGUUGUUAGCAC>hsa-mir-4681 MI0017313GGCAACGGGA
 AUGCAGGCUGUAUCUGCAGGGCAUUGUGCUAACAGGUGCAGGCUCGAGACCUGUCACAGGCC>hsa-mir-4682 MI00
 17314UGCCCCUGGUCUGAGUUCUGGAGCCUGGUCUGUCACUGGGGAAGUCCAGAGCUCCAAGGCUCAGUGCCCAGGGG
 ACGCA>hsa-mir-4683 MI0017315GACACGCAAGACGAGGCGGGCCUGGAGGUGCACCAGUUCUGGCCGCUGGUGG
 AGAUCCAGUGCUCGCCCCGAUCUCAAGUUC>hsa-mir-4684 MI0017316GACCAGGGGUACCUCUCUACUGACUUG
 CAACAUAUAUUUGUCUUGGUGUGUUGCAAGUCGGUGGAGACGUACCCUUGGUGC>hsa-mir-4685 MI0017317UAG
 CCCAGGGCUUGGAGUGGGGCAAGGUUGUUGGUGAUUUGGCUUCCUUCUCCCUUCCUGCCCUUGGCUAG>hsa-mir-4686
 MI0017318GGCUUCCUGUAUCUGCUGGGCUUUCUGGUGUUGGCAGCCCAAGAUGACACCCUGGGCCAGCAGGAGCCAG
 AAGCC>hsa-mir-4687 MI0017319ACCUGAGGAGCCAGCCCUCCUCCCGCACCCAAACUUGGAGCACUUGACCUU
 GGCUGUUGGAGGGGGCAGGCUCGCGGGU>hsa-mir-4688 MI0017321GUCUACUCCAGGGUGCCAAGCUGUUUCG
 UGUUCCCUCCCUAGGGGAUCCAGGUAGGGGCAGCAGAGGACCUGGGCCUGGAC>hsa-mir-4689 MI0017322GGU
 UUCUCCUUGAGGAGACAUGGUGGGGGCCGGUCAGGCAGCCCAUGCCAUGUGUCCUCAUGGAGAGGCC>hsa-mir-4690
 MI0017323GAGCAGGCGAGGCUGGGCUGAACCCGUGGGUGAGGAGUGCAGCCCAGCUGAGGCCUCUGC>hsa-mir-4
 691 MI0017324GGAGCACUCCAGGUCCUCCAGGCCAUGAGCUGCGGCCCUGAUGUCUCUACUCCAGCCACGGACUGA
 GAGUGCAUAGGAGUGUCC>hsa-mir-4692 MI0017325GUUUUACUUGAUACCCACACUGCCUGGGUGGGACACUCA
 GGCAGUGUGGGUAUCAGAUAAAAAC>hsa-mir-4693 MI0017326GUUUAAGAAUACUGUGAAUUCACUGUCACAA
 AUUCAAAUAAAGUGAGAGUGGAAUUCACAGUAUUUAAGGAAU>hsa-mir-4694 MI0017327CAAAUACAUAGGUGU
 UAUCCUAUCCAUUUGCCUCUCUCAGAAAAUAGAGUCAAAUGGACAGGAUAACACCUAUGUAUUUG>hsa-mir-4695 M
 I0017328CCUGCAGGAGGCAGUGGGCGAGCAGGCGGGGCAGCCCAAUGCCAUGGGCCUGAUCUACCCGCUGCCUCCUUC
 CC>hsa-mir-4696 MI0017329CAAAGCCACUGCAAGACGGAUACUGUCAUCUAUCCAGAAGAUGACAAUGUCCA
 UUUUGCAGUGGCUUUG>hsa-mir-4697 MI0017330GGGCCCAGAAGGGGGCGCAGUCACUGACGUGAAGGGACCACA
 UCCCGCUUCAUGUCAGUGACUCCUGCCCCUUGGUCU>hsa-mir-4698 MI0017331UGCUUCUCCUGGGGUCUCCU
 CUACAUUUCCACCUAGACGGGCCUGGGUCAAAAUGUAGAGGAAGACCCCAAGGAGCA>hsa-mir-4699 MI00173
 32AGCAAUUGGAGAAGAUUGCAGAGUAAGUCCUGAUUAAGAAUUGGAAUUAUCUCUGCAAUCUUCUCCAAUUGCU>hsa
 -mir-4700 MI0017333UCAGUGAGGUCUGGGGAUGAGGACAGUGUGUCCUGAAAUUCACAGGACUGACUCCUACCC
 CAGUGCACGAGGA>hsa-mir-4701 MI0017334CCUUGGCCACCACACCUACCCCUUGUGAAUUGUCGGGCAAUGGGU
 GAUGGGUGUGGUGUCCACA>hsa-mir-4703 MI0017336UUAUGCAUAUAGCAAUACAGUACAAAUAUAGUGUGUU
 UGAUUUGCACUGUAGUUGUAUUGUAUUGCCACUCUGUAUAA>hsa-mir-4704 MI0017337CUUAUCCUAGACACUA
 GGCAUGUGAGUGAUUGUCUCCUCACUCAAUCAGUCACAUAUCUAGUGUCUAGAAUGAG>hsa-mir-4705 MI00173
 38CUCACAAGAUAUACUUGGUAAUUGCUGUGAUAAACACUCAGCAAUUAACCAAGUGAUUGGUUUUGUGAG>hsa-mi
 r-4706 MI0017339GCUACGGGGAGCGGGGAGGAAGUGGGCGCUGCUUCUGCGUUAUCUGGAAGGAGCAGCCCACUCC
 UGUCCUGGGCUCUGUGGU>hsa-mir-4707 MI0017340GGUUCGGAGCCCCGGCGGGCGGGUUCUGGGGUGUAG
 ACGCUGCUGGCCAGCCCGCCCCAGCCGAGGUUCUGGCACC>hsa-mir-4708 MI0017341UUUAGGAGAGAGAUGC
 CGCCUUGCUCUUGAACAGGAGGAGCAAGGCGGCAUCUCUCUGAUACUAAA>hsa-mir-4709 MI0017342CUGCUU
 CAACAACAGUGACUUGCUCUCCAAUUGGUUAUCCAGUGAUUCGUUGAAGAGGAGGUGCUCUGUAGCAG>hsa-mir-4710
 MI0017344GACCGAGUGGGGUGAGGGCAGGUGGUUCUCCCGAAGCAGCUCUCGCCUCUUCGUC>hsa-mir-4711 M
 I0017345AAUUGUGCAUCAGGCCAGAAGACAUGAGCCCUUUGGAAAGGUCUCGUGUCUUCUGGCUUGAUGCACAUUU>h
 sa-mir-4712 MI0017346GACAGGAUUCAGUACAGGUCUCUCAUUCCUUAUGAUUAGGAAUACUACUUUGAAAAU
 GAGAGACCUGUACUGUAUCUGUU>hsa-mir-4713 MI0017347GUCCCCAUUUUUCUCCACUACCAGGCUCCCAUA

AGGUGCGAAGGAUCCAGGAAAGGGGACAGUUAGGUAGGUA>hsa-mir-4714 MI0017348AUUUUGGCCAACUC
ACCCC UUAGGUAGAUGCAGAAUGAGGUGUACCAACC UAGGUGGCAGAGUUGGCCAAAAU>**hsa-mir-4715** MI001
7349GGGGAAUGAAA GUUGG CUCAGUUAAGGUGGCUAAUCAGCUGAUGGUGGCC ACCUUAACUGCAGCCA AUUCU AAUUC
CCC>**hsa-mir-4716** MI0017350CAUACU UUGUCUCAUGU UUUCCU UCCCC CUUCUGUAUACAUGUAU ACAGGAGGA
AGGGG GAAGGAA CAUGGAGACAA AGUGUG>**hsa-mir-4717** MI0017352GGCAGUGUUUAGGCCACAGCCACCCAU
GUGUAGGGGUGGCUACACAUGG GUGG CUGUGGCCU AAAACACUGCC>**hsa-mir-4718** MI0017353AGCUGUACCUGA
AACCAAGCACCU GUUUUGUGACUUGGCU UCAGUUACUAGC>**hsa-mir-4719** MI0017354ACAAUGAUGACUUGUAUG
UUAUAGA UUUUGUAUUA CAUUAAA CUUAAAAUUCACAAAUCUAUAAU AUGCAGGUC AUCACUGU>**hsa-mir-4720**
MI0017355AAGCCUGGCAU AUUUGGU AUAA CUUAA GCACCAGGUAAAAUCUGGUGCU UAAGUUGUACCAAGUAUAGCCA
AGUUU>**hsa-mir-4721** MI0017356GGGCCUGGUCAUGGUCAAGCCAGGUUCCAUCAAGCCCCACCAGAAGGUGGAG
GCCCAGGUGAGGGCUCCAGGUGACGUGGGCAGGGUU>**hsa-mir-4722** MI0017357GGCAGGAGGGCUGUGCCAGG
UUGGCU GGGCCAGGCCUGACCUGCCAGCACCU CCCUGCAG>**hsa-mir-4723** MI0017359AGUUGGUGGGGAGCCA
UGAGAU AAGAGCACCU CCUAGAGAAUGUUGAACUAAAGGUGCCCU CUCUGGCCUCCUCCCCAAAG>**hsa-mir-4724** MI
0017361ACGCAAAAUGAACUGAACCAGGAGUGAGCUUCGUGUACA UUAUCUAUUAGAAAAUGAAGUACCUUCUGGUUCA
GCUAGUCCCUGUGCGU>**hsa-mir-4725** MI0017362GUGUCUCUCUGGAGACCCUGCAGCCU UCCCACCCACCAGGG
AGCUUUC CAUGGGCUGUGGGGAAGGCGUCAGUGUCGGGUGAGGGAACAC>**hsa-mir-4726** MI0017363AGGGCCAG
AGGAGCCUGGAGUGGUCGGGUCGACUGAACCAGGUUCCCU CUGGCCGCA>**hsa-mir-4727** MI0017364AAUCUGC
CAGCUUCCACAGUGGCAGAUUUUCCCAUAGUGGGAAGCUGGCAGAUUC>**hsa-mir-4728** MI0017365GUGGGAGGG
GAGAGGCAGCAAGCACACAGGGCCUGGGACUAGCAUGCUGACC UCCCUCUGCCCCAG>**hsa-mir-4729** MI001736
6UCUGUUUCCUCAUUUAUCUGUUGGGAAGCUAACUGUGACCUUAGCGUCC CAGCAGAUAAAUGAGGAAACAGA>**hsa-mi**
r-4730 MI0017367CGCAGGCCUCUGGGCGAGGCCAUUCCAUGCCAGAUUGCUGAGCGAUGGCUGGUGUGUCGUCUCC
ACAGGCCUGGUG>**hsa-mir-4731** MI0017368CCCUGCCAGUGCUGGGGGCCACAUGAGUGUGCAGUCAUCCACACA
CAAGUGGGCCCCCAAACACUGGCAGGG>**hsa-mir-4732** MI0017369GAGGGAGCUGUAGAGCAGGGAGCAGGAAGCUG
UGUGUGUCCAGCCCUGACCUGUCCUGUUCUGCCCCAGCCCCUC>**hsa-mir-4733** MI0017370GGUCGCUUAAAUC
CCAAUGCUAGACCCGGUGGCAAUCAAGGUCUAGCCACCAGGUCUAGCAUUGGGAUUAAGCCC>**hsa-mir-4734** MI0
017371CUCGGGCCCCGACCGCGCCGGCCCCGACCUCCCGGCCCGGAGCUGCGGGCUGCGGUCAGGGCGAUCCCGGG>**hsa-**
-mir-4735 MI0017372UGCAGUGCCUAAUUUGAACACCUUCGGUAUUAUCAAAAAUACCAAAGGUGC UCAAAUAG
ACAUUGCA>**hsa-mir-4736** MI0017373AGGCAGGUUAUCUGGGCUGCCAUCUCCACUGGCUGCUUGCCUGCCU>**h**
sa-mir-4737 MI0017374CUGCACAGGAUGCGAGGAUGCUGACAGUGCCUCACAGCCGCACAGGACCGAGGAUGCUG
ACGGUGCCUCACAGCCACACAG>**hsa-mir-4738** MI0017376GGUCGCAUUCUCCUUCUUAACAGCGGCUUUUCAG
UUUCAUAGGGAAGCCUUUCAUGAAACUGGAGCGCCUGGAGGAGAAGGGGCC>**hsa-mir-4739** MI0017377GGGAG
GAAGAAGGGAGGAGGAGCGGAGGGGCCCUGUCU UCCCAGAGCCUCUCCCUUCCUCCCCUCCCCUCCC>**hsa-mir-47**
40 MI0017378GCCAAGGACUGAUCCUCUGGGCAGGGAGUCAGAGGGGACCGCCCAGAGGAUCCGUCCCUGC>**hsa-**
mir-4741 MI0017379CGGGCGGGGCGGGUCCGGCCGCCUCCGAGCCCGGCCGGCAGCCCCCGGCCUUAAGCGCGGG
CUGUCCGGAGGGGUGGGCUUCCACCG>**hsa-mir-4742** MI0017380UCAGGCAAAGGGAU AUUUACAGAUACUU
UUAAAAUUUGUUUGAGUUGAGGCAGAUAAAUAUCUGUAUUCUCCUUGCCUGCAG>**hsa-mir-4743** MI0017381G
CUGGCCGGAUGGGACAGGAGGCAUGAAUGAGCCAUCU UCCAAUGCCUUCUGUCUUUCUGGUCCAG>**hsa-mir-474**
4 MI0017382GUAAUCACAUCUAAAAGACUAGACUUCGCUAUGACCAGGCCAUAGUA AACAUCAUAGUAUGUCUAGUCUU
UAGGUUUGAUUAC>**hsa-mir-4745** MI0017384GUGAGUGGGGCUCCCGGGACGGCGCCCGCCCUGGCCCU GGCCCG
GCGACGUCUCACGGUCCC>**hsa-mir-4746** MI0017385GUGUCUGUGCCGGUCCAGGAGAACCUGCAGAGGCAUCG
GGUCAGCGGUGCUCCUGCGGGCCGACACUCAC>**hsa-mir-4747** MI0017386AGGGAAGGAGGCUUGGUCUAGCAC
GGGUCUAAGGCCCCGGGCUUCCUCCCAG>**hsa-mir-4748** MI0017387UGGCUGGCUGAGGUUUGGGGAGGAUUUG
CUGGUGCUAGAGAGGAAAGCAGACCCUACCCAACCCACGCCC UACUACAGCCA>**hsa-mir-4749** MI0017388CCU
GCGGGGACAGGCCAGGGCAUCUAGGCUGUGCACAGUGACGCCCCUCCUGCCCCCAG>**hsa-mir-4750** MI001738
9CGCUCGGGCGGAGGUGGUAGUGCCGACUGGCGCCUGACCCACCCCUCCCGCAG>**hsa-mir-4751** MI0017390
CCCGGAGCCAGAGGACCCGUAGCUGCUAGAAGGGCAGGGGUGUGGCUUCUGGGGCGUGGUCUUCAGCUCUGGCG>**hsa-m**
ir-4752 MI0017391AGUGUCUCCUUGUGGAUCUCAAGGAUGUGCUUCCACAUAGCAGCAUGUUCUUCAGAUGGACAA
GGAGACACU>**hsa-mir-4753** MI0017392AUAUCUACACAAGGCCAAAGGAAGAGAACAGAUUAUCCACAGUACAC
UUGGCUGUUCUUCUUUAGCCUUGUGUAGAUAU>**hsa-mir-4754** MI0017394ACGCGCCUGAUGCGGACCUGGG
UUAGCGGAGUGAGGCCAGUGGUCACCGCGCCCUCCG CAGGUCCAGGUUGCCGUGCGCAUGUGCCU>**hsa-mir-4755**

MI0017395AGAUUCAGCUUCCCCUUCAGAGCCUGGCUUUGGCAUCUAUGAAAGCCAGGCUCUGAAGGGAAAGUUGAAU
 CU>hsa-mir-4756 MI0017397GGGAUAAAAUGCAGGGAGGCGCUCACUCUCUGCGCGAUUCUGCACCAGAGAUG
 GUUGCCUUCUAUAUUUUGUGUC>hsa-mir-4757 MI0017398UUCAGCCCCGAGGCCUCUGUGACGUCACGGUGUC
 UGCGGGAGGAGACCAUGACGUCACAGAGGCCUUCGCGCUCUGAG>hsa-mir-4758 MI0017399GGUGAGUGGGAGCC
 GGUGGGGCGUGGAGUAAGGGCACGCCCGGGGCGUGCCCCACCUUGCUGACCACCCUCCCC>hsa-mir-4759 MI0017400
 CAUUUAGGACUAGAUGUUGGAAUAGACAGAAAAAAGUAGACACAAAAAAUUGUGUCUAAUUCACAAUCUAGUCCUAA
 AUG>hsa-mir-4760 MI0017401GCCAUGGUGUUUAGAUAUGAACAUAGAAGUAGAAUUCUUAAGUAUCAAACUAAA
 UUCAUGUCAAUCUAAACCCCAUGGC>hsa-mir-4761 MI0017402GGACAAGGUGUGCAUGCCUGACCCGUUGUCA
 GACCUGGAAAAAGGGCCGGCUGUGGGCAGGGAGGGCAUGCGCACUUUGUCC>hsa-mir-4762 MI0017403CUGAUA
 CCCCCAAUCUUGAUCAGAAAGCCUUGAUCAGAAAGCUAGGAAGGCUUCUGAUCAGAAUUGUGGUGUCAAG>hsa-mir-47
 63 MI0017404CCUGUCCCUCCUGCCCUUGCGCCUGCCCAGCCUCCUGCUCUGGUGACUGAGGACCGCCAGGCAGGGGC
 UGGUGCUGGGCGGGGGCGGGCGG>hsa-mir-4764 MI0017405UCUCCCCAUGGAUGUGGAAGGAGUUAUCUGUC
 ACCAGUCAGAUAAACUGUCACCAGUCAGUUAACUCCUUUCACACCCAUUGGGGAAGA>hsa-mir-4765 MI0017406UG
 GUGAUUUUGAACGUAGCUAUCACCACUCAGCCUGGAAAAAGCUGAGUGAUUGAUAGCUAUGUUCAAAAUCACCA>hsa-
 mir-4766 MI0017407CUGAAGCUCCUUCUGAAAGAGCAGUUGGUGUUUUAUUUUUACUAAUAGCAAUUGCUCUUUU
 GGAAGGAACUUGAG>hsa-mir-4767 MI0017408ACAUGGGCCCGCGGGCGCUCUUGGCCCGCCGCCGACUUCGGGG
 CCAGCCGGGGGCAGA
 GCGCGGGGAGCCCGAGCGU>hsa-mir-4768 MI0017409AAACUUUGAUUCUCUCUGGAUCCCAUGGAUAUGGGAA
 CUGUGAUGUCCAGGAGAUCCAGAGAGAAUCAGAGUUU>hsa-mir-4769 MI0017410GAGGAGAGGUGGGAUGGAGA
 GAAGGUAUGAGCUAAAAUCCCCAAGCUCUGCCAUCUCCCUCCCCUACUUCUCCCC>hsa-mir-4770 MI0017411
 GAGUUAUGGGGUCAUCAUCCUCCCUUGGAAAAUGAUCUGAGAUGACACUGUAGCUC>hsa-mir-4771-1 MI0017
 412GCUCUAGCCUAAUUUAGAUCUGGUCUGCUUCAGUUACACUCCAAGCAGACUUGACCUACAAUAGCCUAGAGC>hs
 a-mir-4771-2 MI0017413GCUCUAGCCUAAUUUAGAUCUGGUCUGCUUCAGUUUACUCCAAGCAGACUUGACCU
 ACAAUUAGCCUAGAGC>hsa-mir-4772 MI0017414GUGAUUGCCUCUGAUCAGGCAAAAAUUGCAGACUGUCUUC
 AAAUAGCCUGCAACUUUGCCUGAUCAGAGGCAGUCAC>hsa-mir-4773-1 MI0017415UGCUCCCAGCCUUUCUA
 UGCUCUUGUUCUGCUUUUAUUUCAUCAAAGCAGAACAGGAGCAUAGAAAGGCUGGGGAGCA>hsa-mir-4773-2 MI00
 17416UGCUCCCCAGCCUUUCUAUGCUCUUGUUCUGCUUUGAUGAAAAUAAAGCAGAACAGGAGCAUAGAAAGGCUGGGGA
 GCA>hsa-mir-4774 MI0017417UAUAUUGUUGUCUGGUAUGUAGUAGGUAUAUACUGACAAACAGACAAUUGCCUA
 ACAUGUGCCAGAAAAACAUA>hsa-mir-4775 MI0017418AUUAAGCUUUUAUUUUUUGUUCGGUCACUCUUG
 AUAGCAGACAUUGACUGAAACAAAAAAUUAAGCUCUUUAU>hsa-mir-4776-1 MI0017419CUAUAUGCAGUGGAC
 CAGGAUGGCAAGGGCUCUCCUGAAAGGACAGUAGAGCCCUUGCCAUCUUGGUCCACUGCAUAUAG>hsa-mir-4776-2
 MI0017420CUAUAUGCAGUGGACCAGGAUGGCAAGGGCUCUACUGUCCUUUCAGGAGAGCCCUUGCCAUCUUGGUCCA
 CUGCAUAUAG>hsa-mir-4777 MI0017421UAGAAUAUUUCGGCAUUCUAGAUGAGAGAUUAUAUAUACCUCAUAU
 GUAUAUGGUAUACCUCAUCUAGAAUGCUGUAUAUUCUA>hsa-mir-4778 MI0017422UCACAUUGCCAAUUCUGU
 AAAGGAAGAAGAGGUAAGAAGAAGUGAAGCCCUUCUCCUUGCAGAGUUGAAUAUGUGG>hsa-mir-4779 MI00
 17423UAAUUGUCUUACUGCUUUUACUGUUCUCCUCCUAGAGUCCAUUCUUUACUCUAGGAGGGAAUAGUAAAAGCAGUAA
 GACAUUA>hsa-mir-4780 MI0017424GGCCAGUGCCAGGGGGUCAGGCUCAAGGACCAGCCCAAAGGCCAGGCCU
 GACCCUUGAGCCUGAUCCCUAGCACUGAUCCC>hsa-mir-4781 MI0017426AGGUGCACGCUCUAGCGGGGAUUC
 AAUAUUGGGCCAAUUCUCCCAAGUUGGAAUCCUCGCUAGAGCGUGCACUU>hsa-mir-4782 MI0017427AUUGCC
 CAGUUCUGGAUAUGAAGACAAUCAAGAAAAGAUUUGGUGUUCUUGAUUGUCUUAUAUCUAGAACUGGGCAGU>hsa-mi
 r-4783 MI0017428GGGAAAGCGGAGGGCGCGCCAGCUCUCCGGGCGUAUUGCGCUAACAGUGGCCCGGUGUUGGG
 CGCGUCUGCCGCGUGCCC>hsa-mir-4784 MI0017429UGACUGGGCUGAGGAGAUUGCUGGGACUGAGAGUGUCAUG
 GUGGAGCCUCCGUCCUGCUCAUCCUCCGCAUGUUG>hsa-mir-4785 MI0017430GUAGGUGGGGACGCGGCGG
 CGCUGCUCCUCCGUGCCGCGGGAGAGUCGGCGACGCCGCCAGCUCGCGCGC>hsa-mir-4786 MI0017433GGG
 CAUGGCCUGAGACCAGGACUGGAUGCACCACUCUCCCUUGAUGAGGUGAAGCCAGCUCUGGUCUGGGCCAUUUCAC>hs
 a-mir-4787 MI0017434CGGUCCAGACGUGGCGGGGGUGGCGGCGGCAUCCCGGACGGCCUGUGAGGGAUUGCGCCGC
 CCACUGCCCCGCGCCGCCUGACCG>hsa-mir-4788 MI0017435AAUGAAGGAUUAACGGACCAGCUAAGGGAGGCAU
 UAGGAUCCUUAUUCUUGCCUCCCUUAGUUGGUCCCUAAUCCUUCGUU>hsa-mir-4789 MI0017436CAUGCUACGU
 AUGUAUACCCUGAUUUGUGUAUGUGUAAAAUACAUAUCCACACACAUAAGCAGGUGUAUAUAUAGGUAGCCUG>hsa-mir
 -4790 MI0017437CAAUGUGACAUCGCUUUAACCAUUCAGUUCACUGAAAGGUAGAUUUUAAAAACAUGAAUGGUAAA

GCGAUGUCACAUUG>hsa-mir-4791 MI0017438UAAGAACUGGAUAUGAUGACUGAAAAUAAGCUCCAUAUCAAUGA
GAAUUCAAUGGGAUUAUGUGCAGUCAAUUGCCAGUAAUUA>hsa-mir-4792 MI0017439GCAGCCCGGUGAGCGC
UCGCUGGCCUGGCAGUGCGUCGGAAGAACAGGGCGGGUGGGGCCGCGCACAUUCUCUGC>hsa-mir-4793 MI001744
0UUUCUCCUCGCGUCCCCGACAUCCUGCUCCACAGGGCAGAGGGAGGCCAAGAAGACCUCUGCACUGUGAGUUUGGCUGGC
UGGAGGAA>hsa-mir-4794 MI0017441UUUUACAUCUGGCUAUCUCACGAGACUGUAUGUCCUAACAGUGCUUGU
AGUCUCAUGAGAUAGCCAGAUUUAAAA>hsa-mir-4795 MI0017442UGAUUUGGAAGAAAAUCCAGAAGUGGCUAA
UAAUAUUGACACUAUAACAAUAAUGUCAUAUUAUAGCCACUUCUGGAUUUAUGAAUCA>hsa-mir-4796 MI0017
443UAAAUUUUGUGUCUAUACUCUGUCACUUUACUUUUGGCCUCAAGUCAUUGCAGUAAAGUGGCAGAGUAUAGACACAAA
UUUA>hsa-mir-4797 MI0017444GACUCAGAAGACAGAGUGCCACUUACUGAAAGUUUUUUCUCUCAGUAAGUGG
CACUCUGUCUUCUGAGUU>hsa-mir-4798 MI0017445AAGUACAACUUCGGUAUACUUUGUGAAUUGGCUUUUACA
AAAGACCAACUCACGAAGUAUACCGAAGUCAUACUU>hsa-mir-4799 MI0017446ACUGCUAAUAUCUAAAUGCAG
CAUGCCAGUCCUGAGAUGCAGGGACUGGCAUGCUGCAUUUAUAUUAUAGCAGU>hsa-mir-4800 MI0017448GGAG
AAAGGAGUGGACCGAGGAAGGAAGGAAGGCAAGGCUGUCUGUCCAUCGUGCCGUCUGUCCACCUACCUUGUCAGUCC>hsa
-mir-4801 MI0017449UUGAGGCUUGGUUUUCUUAUGUGUAAAAUGUAAUAACAUAUUCUUAUGUUUAAAACACUUUA
CACAAGAAAAACCAAGGCUCAA>hsa-mir-4802 MI0017450CUGACUGGCUUGUAUGGAGGUUCUAGACCAUGUUAG
UGUUCAGUCUACAUGGAUGGAAACCUUCAAGCAGGCCAAGCAG>hsa-mir-4803 MI0017451AGUGGGAUUUAAAC
AUAAUAGUGUGGAUUGAAUCACACACACAUUCAAACCCACACUAUGAUGUAAAUCCCAUU>hsa-mir-4804 MI001
7452UCAGUGUAUUUGGACGGUAAGGUUAAGCAAGGUGCGUACUUGCUUAAACCUUGCCCUCGAAAAUACACUGA>hs
a-mir-4999 MI0017865AUAGAAAAUAAAAACACAUACUGCUGUAUUGUCAGGUAGUAUAGGAUUUAUCACUACCUG
ACAAUACAGUAUGUGUUUGUUUUAUAUUAUU>hsa-mir-5000 MI0017866CUGAAGAGUAGAGUGUGUGGCCAG
UUCAGAAGUGUCCUGAGUAACUUGUGCUUAUAACUCAGGACACUUCUGAACUUGGACCAUACAGGUCUCCCUUGCUU>hs
a-mir-5001 MI0017867AGCUCAGGGCGGCUGCGCAGAGGGCUGGACUCAGCGGCGGAGCUGGCUCUGGCCUCAGU
UCUGCCUCUGUCCAGGUCCUUGUGACCCCGCCCGCUCUCCU>hsa-mir-5002 MI0017868UCUCCUCUCUGUCCUC
UGGAAUUUGUUUCUGAGGCACUUAGUAGGUGAUAGCAUGACUGACUGCCUCACUGACCACUUCAGAUAGGGGUUACUC
>hsa-mir-5003 MI0017869AUGAGUUUGCUUUGUGUCAUCCUCACAACAACCUUGCAGGGUAGAGAUGAUUUUCC
UACUUUUCUAGGUUGUUGGGGGCUGGGGCAGGGGGAACAGAG>hsa-mir-5004 MI0017870GGCACUUGCUUGGGG
GUUAGUGAGGACAGGGCAAAUUCACGAGAUUGGGUUGUGCAGAGGCUGACACUUGGAUUUCCUGGGCCUCAGGACUCC
UUUCAGACAUGG>hsa-mir-5006 MI0017873AACCAUUAAGGGGCUGUGGUUUGCCAGGGCAGGAGUGGAAGGGA
GCCCCAUUUACAGUGGUAACUUCUUUCCCUUCCAUCCUGGCAGGCUUCAGAGAACUUUACCAG>hsa-mir-5007 M
I0017874GGUAAACCUUGGUGACUAAUUAAGAGUCUGGCUGAUUUGGUUUGACACAGAGCUAAAUCAUAUGAACCAAAACU
CUAAUUAUGCAAUAAUUCUGUU>hsa-mir-5008 MI0017876GGGCUGACCCCUAGGGUCAGGUGAGGCCCUUGGG
GCACAGUGGUGCAUCUCCCCUGUGCUCCAGGGCCUCGCCUGUCCCUUGAGGUCGGCCC>hsa-mir-5009 MI0017
877GACCAGAAUGUUUUGGAUUUUGGACUUUUUCAGAUUUGGGGAUAUUUGCAUUAUACUUAUCCUAAAUCUGAAAGUC
CAAAACCUGAAAUGACCAUAAG>hsa-mir-5010 MI0017878GAUCCAGGGAACCCUAGAGCAGGGGGAUGGCAGA
GCAAAAUUCAUGGCCUACAGCUGCCCUUGCCAAACUGCACUGGAUUUUGUGUCUCCCAUCCCCAGAGCUGUCUGAGGU
GCUUU>hsa-mir-5011 MI0017879AGAUGGUUAUUGAGUGGAUGCUGUUAUAUAUACAGCCAUGCACUCUGUAGUU
UGGGUACACAGUGCAUGGCUGUAUAUAUAAACACUAUCCAUAUCUUUACAGC>hsa-mir-5047 MI0017932GAAGC
GCUUGCCUAGACGAGACACAGUGCAUAAAAACAACUUUUGGGGACAGGUAUGUUUUCUUGCAGCUGCGGUUGUAAGGUC
UUGGCAAGACAAGCA>hsa-mir-5087 MI0017976AGCUUUCUACGGGUUUGUAGCUUUGCUGGCAUGUUAAGUGUU
GUCCUACAGUCGCAAGCAUAGAAAGAGAAAGUA>hsa-mir-5088 MI0017977UCUCCAGGGUGGCCAGGCGGGGC
CGGGCCUGAGGGAUGGAGGGGAGCCCAUCAGGGCUCAGGGAUUGGAUGGAGGUGAUUGGGG>hsa-mir-5089 MI001
7978AAGGACUUCAGUGGGAUUUCUGAGUAGCAUCCUUGGAAUCUGCACUCAAGGGAUGCUACUCGGAUUCCACUGAA
GUCCUUUU>hsa-mir-5090 MI0017979UCUGAGGUACCCGGGGCAGAUUGGUGUAGGGUGCAAAGCCUGCCCGCCC
CCUAAAGCCUUCUGCCCCCAACUCCAGCCUGUCAGGA>hsa-mir-5091 MI0017980GACUGUGGCGACGGAGACGAC
AAGACUGUGCUGGUCGCGGGUUGUGGGGUUAGGUCACCGGCAGGGGUCUGGAGUCCCUUGAGGUUAGGGCU>hsa-mir
-5092 MI0017981AUCCAGAUACAGAUGCCAAAGCCAGUGGGGACUGGACAACAUGAUAGGCCAAACCAAUCCACGC
UGAGCUUGGCAUCUGAUUUUGGA>hsa-mir-5093 MI0017982CCCGCCAGGUCCACAUGCCAGAGUGUCAACGUGA
CCCAGCCAGCCUCCUCCUGAGCUAGGAGGAUUAAGAAAUGAGGCUGGCUAGGAGCACAGCCAGGG>hsa-mir-5094
MI0017983AAAAAGAAAAAAUACAGUGAAUGCCUUGAACCUAACACACUGCCUUUUUAUGUGGUAGGUACAGUGGGCUCAC
UGAAACAUAUACAACU>hsa-mir-5095 MI0018001CUGGGAUUAACAGGCGUGAACCAACCGCGCCCGGCCUAAUUA

AGAAACGUCGGCCCCGGGAGCGGUGGCUCACGCCUGUAAUCCCAGC>hsa-mir-5096 MI0018004AGUAGAGGUGGG
GUUUCACCAUGUUGGUCAGGCUGGUCUCAAACUCCUGACCUCAGGUGAUCCAUCCACC>hsa-mir-5100 MI001911
6CCAUGAGGAGCUGGCAGUGGGAUUGCCUUGGGGUAGGAGCGUGGCUUCUGGAGCUAGACCACAUGGGUUCAGAUCCCAG
CGGUGCCUCUAACUGGCCACAGGACCUUGGGCAGUCAGCU>hsa-mir-5186 MI0018165UCAGCCAGCUUAUGACU
UGACCCUCUCACCCUGAUUUUCUACCAACCUUUCCUCAGCUGAUUUUCUUCUGGGGAGAGAUUGGUAGAAAUCAGGUGAGAG
GGUCAUGCCAUAAGCUGGCUAAC>hsa-mir-5187 MI0018166GACUAAGGGUGGGAUGAGGGAUUGAAGUGGAGCA
GGAAUGCGCUUUUCUCCACUGAAUCCUCUUUCCUCAGGUGG>hsa-mir-5188 MI0018167GGGAGGCAUGGAAA
UUCUCUGGUUUCAAUUGGUACGAUUAUUGUAAGCAGGAUCCAUAUCAAUAUACGGACCCAUUUAAACCGGAGAUUUAAAA
GACAGGAUAGAAUCCCCA>hsa-mir-5189 MI0018168GGCCCGCCUUUAGGGGCCUCGCUGUCUGGGGCACAGGCG
GAUGGACAGGCUGGCCUCUGGAUGACCUGCCAACCGUCAGAGCCCAGACCCACGUGGCCUCAGUUGGGGACCAGG>hsa- 10
mir-5190 MI0018169GGUCAUACCCUGGCUCACAGCCCUUGUCACAUGGUUAAUGUCCACAGCCAGUGACUGAGCUGG
AGCCAGGGCCACUGCCCC>hsa-mir-5191 MI0018170AGUUGGCCAGGACCCCAAGCCCCCAGCACUUCAUUCUUG
CUGUCCUCUCCUGGUCUGGGAGGAUAGAAGAGAGGAUAGGAAGAAUGAAGUGCUGGGCGCUUAGGGGGAUCCUGGCCAAC
U>hsa-mir-5192 MI0018171UUAGUCCAGCCUCCUGGCUCACCUGGAACCAUUCUCCUGGGAAGCAUGGUAGCC
AGGAGAGUGGAUUCAGGUGGUGAGGGCUUGGUACU>hsa-mir-5193 MI0018172CCUAGGAAAGGCUCUGGUAA
CUGGGAUUGGGGUUGGGGGGAGGUAAGAAGUCUCUGACUCCUCCUCUACCUCAUCCCAGUUCACUACCUGAAGUGGACC
UCUUGGGA>hsa-mir-5194 MI0018173AUUUCUUUGGGUAAACUUAACUCAGCCCUUCUAGGCCCAUUCUUUUA
CUCAGGAUUGGAUAAGCUUUUCUGAGGGGUUUGGAAUGGGAUGGCAGGGAGAGUCACCAGACACCAUGAA>hsa-mir- 20
5195 MI0018174GAGCAAAAACAGAGAACAACAUGGGAGCGUCCUAACCCCUAAGGCAACUGGAUGGGAGACCUGA
CCCAUCCAGUUCUCUGAGGGGGCUCUUGUGUGUUCUACAAGGUUGUUA>hsa-mir-5196 MI0018175UCUGAGGA
GACCUGGGCUGUCAGAGGCCAGGGAAGGGGACGAGGGUUGGGGAACAGGUGGUUAGCACUUCAUCCUCGUCUCCUCCCCA
GGUUAAGAAGGGCCCCCUCUCUGAAGG>hsa-mir-5197 MI0018176UAUGGGAUUCACAGACAAUGAGUAUCAU
GGCACAACUCAUUCUUGAAUUUUUGCCAGUUCAGAAGAGACUGAGUCAUCGAAUGCUCUAAAUGUCACUUCACCUCAU
GU>hsa-mir-5571 MI0019115AUCUGACACAAAAUUGUAACCAAGCAAUUCUCAAAGGAGCCUCCAGGAAAUUA
CUUUAGGAAGUCCUAGGAGGCUCUCCUCUGAGAGUUGCUAAAAACAAACAUUGAGAGUCC>hsa-mir-5572 MI001911
7AGCCAGACAAGAGGGUCAUGGGGAGUCACUGUCAACCCAGAGCAGGCACUGCCCCUGCGACCAGCCUGGGGCAUCGGUU
GGGGUGCAGGGGUCUGCUGGUGAUGCUUCCAUCUCUUGCUUUGUCCUGAUUGUAGC>hsa-mir-5579 MI001913
3UAUGGUACUCCUUAAGCUAACAGGCCCCUGUCACCAUUAAGCUUAAGGAGUACCAGAU>hsa-mir-5580 MI00191
35UGCUGGCUCAUUAUUAUGUGUGCUGAGAAAAUUCACACAUAUGAAGUGAGCCAGCAC>hsa-mir-5581 MI0019
136AGCCUUCAGGAGAAAAUGGAGACCCUAUACAUAACCGUUUCCAUGCCUCCUAGAAGUCC>hsa-mir-5582 MI0 30
019138UAGGCACACUAAAAGUUAUAGCUACAUCAGUUAUAACUAUAUCAGUUAACCUUUAAAGUGUGCCUAGG>hsa-m
ir-5583-1 MI0019139AAACUAAUAUACCCAUUUCUGGCUAGGUGAUCAUCAGAAUAUGGGUAUAUAGUUUGG>h
sa-mir-5583-2 MI0019140AAACUAAUAUACCCAUUUCUGAUGAUACCCUAGCCAGAAUAUGGGUAUAUAGUUU
GG>hsa-mir-5584 MI0019141CAGGGAAAUGGGAAGAACUAGAUUUGAAUCCAGACCUUUAUUCUCCCUUUGCC
CAAUU>hsa-mir-5585 MI0019142UGAAGUACCAGCUACUCGAGAGGUCAGAGGAUUGCUCCUGAAUAGCUGGGAC
UACAGGU>hsa-mir-5586 MI0019143UAUCCAGCUUGUUAUUAUGCUUUUAAAUGGGGCACAGAGUGACAAGC
UGGUUAAAG>hsa-mir-5587 MI0019144AUGGUCACCUCCGGGACUCAGCCCUUGUCUGAGCCCCGGGCAGUGUGA
UCAUC>hsa-mir-5588 MI0019147ACUGGCAUUAUGUGGACUUUUUUUUUUUUUUUUUAAUGUUAAGUCCCA
CUAAUGCCAGC>hsa-mir-5589 MI0019148GGCUGGGUGCUCUUGUGCAGUGAGCAACCUACACAACUGCACAUGG
CAACCUAGCUGCCA>hsa-mir-5590 MI0019150UUGCCAUAUAUAGACUUUAUUGUGUUGAUCAACAAUAAAGUUC 40
AUGUAUGGCAA>hsa-mir-5591 MI0019151UGGGAGCUAAGCUAUGGGUAUACUGAGCUUAUGUAUGCAUCUGCAU
ACCCAUAGCUUAGCUCCCA>hsa-mir-5680 MI0019280
GCAUUGGGUUAAGCAGGUUAGCCCAGCAUUCUCCUCCUGGACACACAGGAGGAGAAAUGCUGGACUAAUCUGCUAAUCCA
AUGC>hsa-mir-5681a MI0019281AGUUUUUGAAGAGUAUUGCCACCCUUUCUAGUCCCUAAUAGACUAGAAAGGG
UGGCAAUACCUCUCCAAAAACU>hsa-mir-5681b MI0019293GAAGAGGUUAUUGCCACCCUUUCUAGUCUAAUAG
GGACUAGAAAGGGUGGCAAUACUCUUC>hsa-mir-5682 MI0019282GGCCCAUGGGUCUUAUCCUGCAAGGUGCUG
CAGAGACGAGGCCUGUAGCACCUUGCAGGAUAAGGUCUACUGGGCC>hsa-mir-5683 MI0019284GGAGCUUGUUA
CAGAUAGCAUUCUCUGACUUCUACUGCACCAGUGAAGUCAGGAUCUGCAUUGAAUAAGACCC>hsa-mir-5684 M
I0019285GCUGAACUCUAGCCUGAGCAACAGAGUGAGAUUGGUCUUGUUUUGUUGCCAGGCUGGAGUCCAGU>hsa-mi 50
r-5685 MI0019287CUCUACAUCACAGCCCAGCAGUUAUCACGGGCCCCUCCCCUAAUGGGCCCCGUGAUAAUCGCAG

GGCUGUGAUGUAGAG>hsa-mir-5686 MI0019290UAUCGUAUCGUAUCGUAUCGUAUUGUAUUGUACUGUAUUGUA
UUGUACUGUAUUGUAUCGUAUCGUAUCGUAUCGUAUCGUAUCGUA>hsa-mir-5687 MI0019291CCUCACUUAUCUGACUC
UGAAAUCUUCUAAAUGGUACCCACUUAUUAUAGAACGUUUUAGGGUCAAAUAAAGUACAGG>hsa-mir-5688 MI0019
292GAAACACUUUUGCCUUUUUACAGGAGUUUAUUAUGUUUUGGACAUAGAAAACAUAAACAAACACCCUGUAAAAACAGCAAAG
UGUUUC>hsa-mir-5689 MI0019294AGCGUGGUAGCAUACCCUGUAGUCCUAGAUAUCUCAGGAGGGUGAGUAUCU
AGGACUACAGGUGUGUGCUACCACGCU>hsa-mir-5690 MI0019295CUUUUAAUUCAGCUACUACCUCUAUUAGG
AUUUGGGAGUUUAUCUAAUAGAGGUAAUAGUUGAAAUAAGAG>hsa-mir-5691 MI0019296GGACAAGCUUGCUC
UGAGCUCCGAGAAAAGCUGACAGACAGCUGCUUGGUGUUCAGAGCUUGUCUGUCC>hsa-mir-5692a-1 MI0019297
GACAGUACAAAUAUACCACAGUGGGUGUACCUCUAUGUGUGUACACCCUGUGAUUAUUAUUUGUAAUAUC>hsa-mir-56
92a-2 MI0019298UACAAAUAUACCACAGUGGGUGUACCUCUAUGUGUGUACACCCUGUGAUUAUUAUUUGUA>hsa-m
ir-5692b MI0019311GAUAUUAUGAAUAAUAUCACAGUAGGUGUUCACACAUAUUGUGUACACCAUGUGUGUACACC
CAUGUGAUUAUUUGAAGUAGUAUGUC>hsa-mir-5692c-1 MI0019288UAUAACAUUGUAUAUACCCACUGUGAUUA
UAGAGUAAUAGCUCUCUAGGUUAUUAUGAAUAAUAUCACAGUAGGUGUACACAAUGUUGUA>hsa-mir-5692c-2 M
I0019289UGUGUACACCAACUGUGAUUAUAGGAGUCCUAUUUAUUUUUAGGAUAUAGGAAUAAUAUCACAGUAGGUGU
ACACA>hsa-mir-5693 MI0019300CUGGGAAGUUAGUUAUUCAGUCUGUGCUGUGAGCUAGCCAGCAGUGGCUC
UGAAAUGAACUCAAAUCUAG>hsa-mir-5694 MI0019301GCCAACUGCAGAUCAUGGGACUGUCUCAGCCCCAU
UGUAUCUGAAGGCUGAGAAGUCCCAUGAUCCGCACUUGGC>hsa-mir-5695 MI0019302CAAGGCCUAUCUAUCUA
GAUUCUUCUUGGCCUCUCUGAGCAUGCAUUCUUGAGACUCCAAGAAGAAUCUAGACAGAUAGGCCUUG>hsa-mir-569
6 MI0019303GUGCUCAUUUAAAGUAGUCUGAUGCCUACUACUGAUGACAUAACAAUGUAAGUGCUCAUUUAGGCGUCAGA
CUACCUAAAUGAGCAC>hsa-mir-5697 MI0019304AGCAUAUUCUCAAGUAGUUCAUGAUAAAGGGUGUAUGAGA
GAUCAACCCUUUAUCAUGAAACGCUUGAGGAUACGCU>hsa-mir-5698 MI0019305CUGUGCACCUGGGGGAGUGC
AGUGAUUGUGGAAUGCAAAGUCCCAUAUCACUGUACUCCCCAGGUGGCACAG>hsa-mir-5699 MI0019306CUGUA
CCCCUGCCCCAACAGGAAGGACAAGAGGUGUGAGCCACACACACGCCUGGCCUCCUGUCUUUCCUUGUUGGAGCAGGGA
UGUAG>hsa-mir-5700 MI0019307UUAUUAAUGCAUUAUUUAUUGAAGGCCCUUGGGCACCCCAGGCCUUCAAU
AAUUUAAUGCAUUAUUGA>hsa-mir-5701-1 MI0019308GAUUGGACUUUAUUGUCACGUUCUGAUUGGUUAGCC
UAAGACUUGUUCUGAUCCAAUCAGAACAUGAAAAUAACGUCCAAUC>hsa-mir-5701-2 MI0019593GAUUGGACU
UUAUUGUCACGUUCUGAUUGGUUAGCCUAAGACUUGUUCUGAUCCAAUCAGAACAUGAAAAUAACGUCCAAUC>hsa-mi
r-5702 MI0019309GCCUCAACUCCUGGGUAUUGUUGCUGAUCCAACCUGAAAUCCUUCUGUAGGUUGAGUCAGCAAC
AUAUCCCAUGACUUUUGGGU>hsa-mir-5703 MI0019310UUGCCGUCCCCUCCUCGUCUUUCCCCUCAGGAGAA
GUCGGGAAGGUGGCGGCGG>hsa-mir-5704 MI0019312UGAUCUUGUUUAGGCCAUCAUCCCAUUAUGCUAAGUCC
AUGGGCAAACAUAACAGGAUGAUGGCCUAAACAAGACCA>hsa-mir-5705 MI0019313UCCCCAUUUACACAGGCC
AUGAGCCCCGAAACACCCAUCCAGGAUUGCUGAUGGGUGUUUCGGGGCUCUAGGCCUGUGUAAAUGGGGA>hsa-mir-
5706 MI0019314AGCUAGGUCUUCUGGAUAACAUGCUGAAGCUUCUACGUCAUUCAGCACUUGCUUCAGCAUGUUUC
CAGAGGAUCUAGCU>hsa-mir-5707 MI0019315UGUAAGAACACGUUUGAAUGCUGUACAAGGCACAUUUGUGAAC
AUUGUACCACAUGUACAGCUUCAAACAUGCUCUUAUA>hsa-mir-5708 MI0019316AUUACAGACAUGAGCGACU
GUGCCUGACCAAAAGUCAACAUAUAAACAACAAAUUCUUGGCCAGGCACAGUGGCUCUAGCCUGUAAU

10

20

30

【 図 1 】

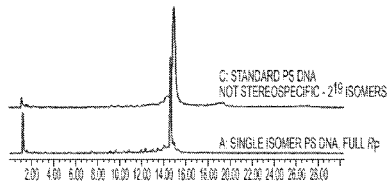


FIG. 1

【 図 2 】

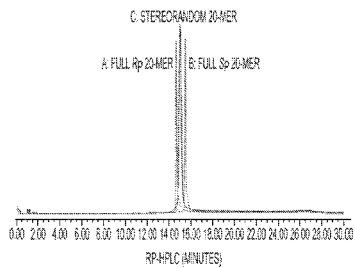


FIG. 2

【 図 3 】

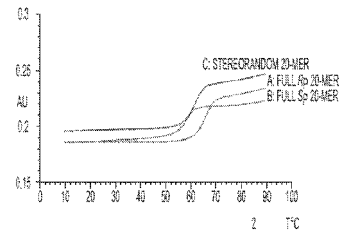


FIG. 3

【 図 4 】

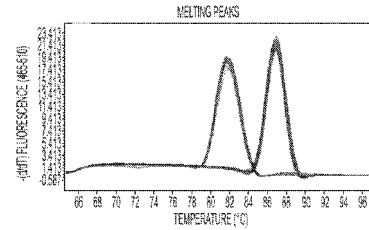


FIG. 4

【 図 5 】

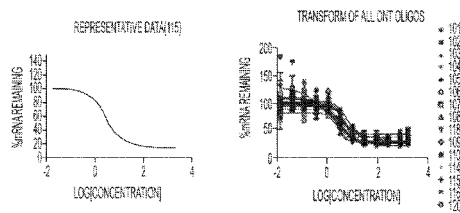


FIG. 5

【 図 7 】

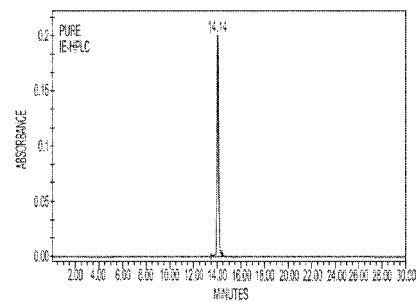


FIG. 7

【 図 6 】

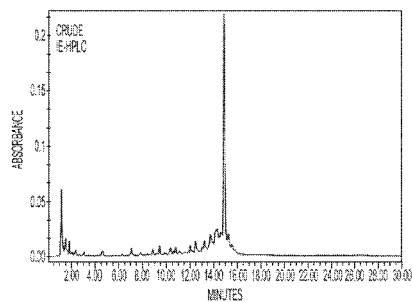


FIG. 6

【 図 8 】

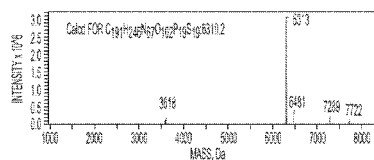
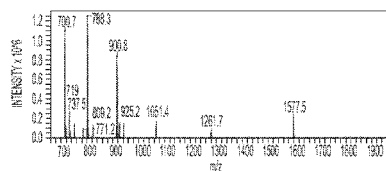


FIG. 8

【 図 9 】

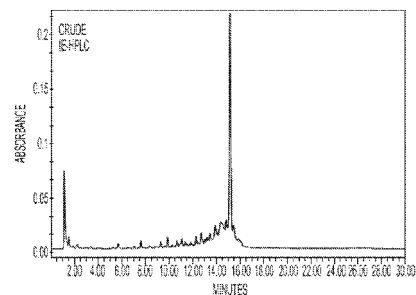


FIG. 9

【 図 10 】

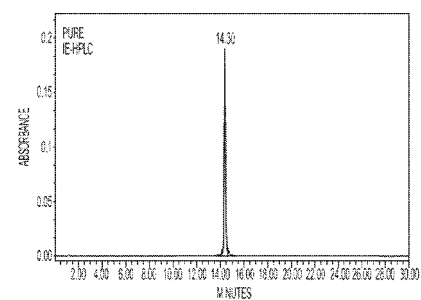


FIG. 10

【 図 11 】

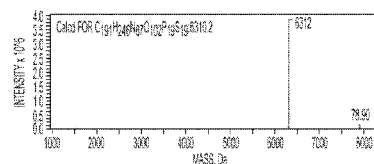
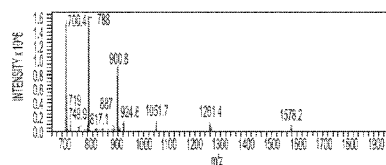


FIG. 11

【 図 12 】

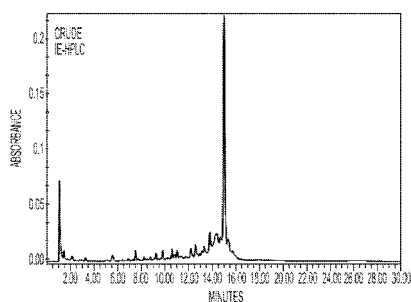


FIG. 12

【 図 13 】

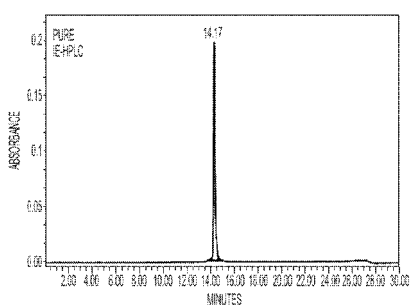


FIG. 13

【図 14】

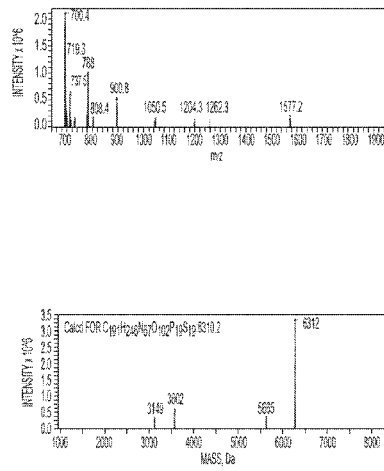


FIG. 14

【図 15】

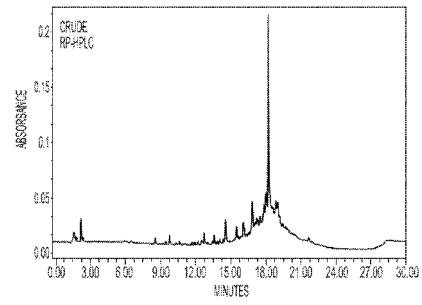


FIG. 15

【図 16】

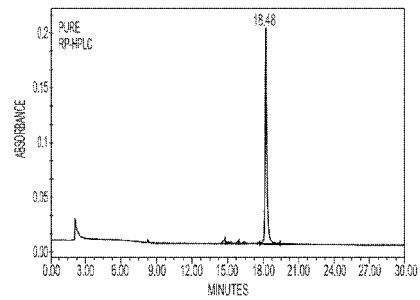


FIG. 16

【図 17】

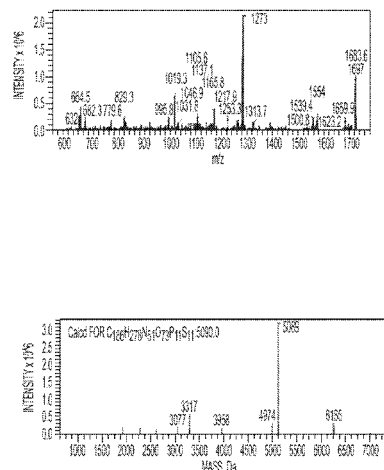


FIG. 17

【図 19】

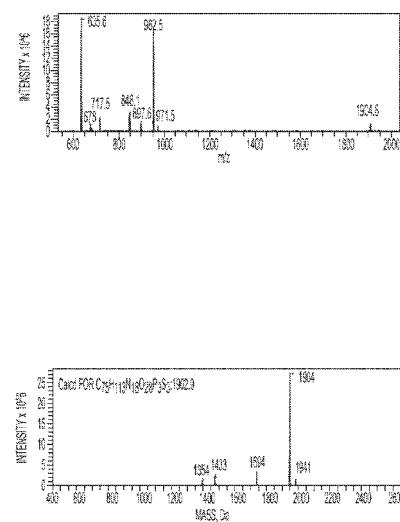


FIG. 19

【図 18】

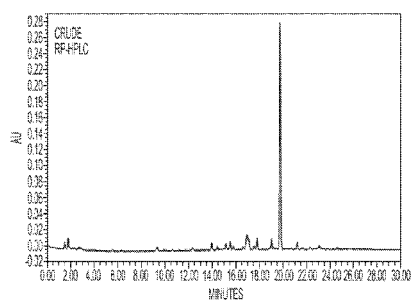


FIG. 18

【図 20】

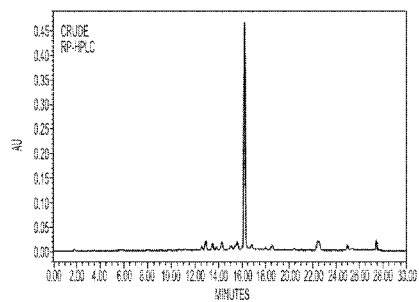


FIG. 20

【図 21】

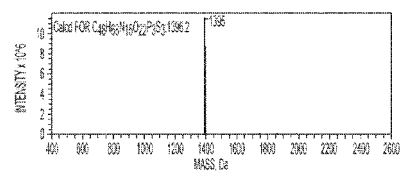
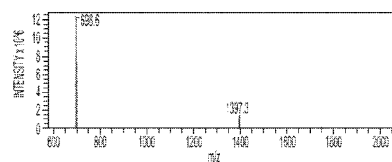


FIG. 21

【図 22】

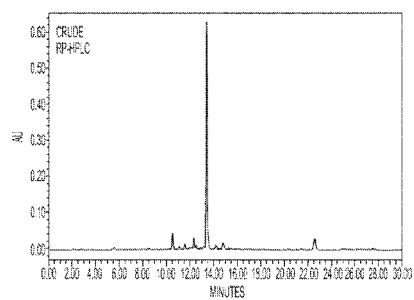


FIG. 22

【図 23】

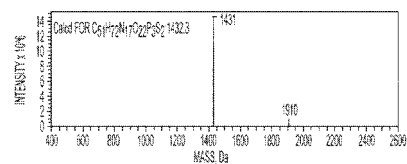
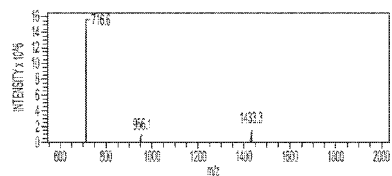


FIG. 23

【図 24】

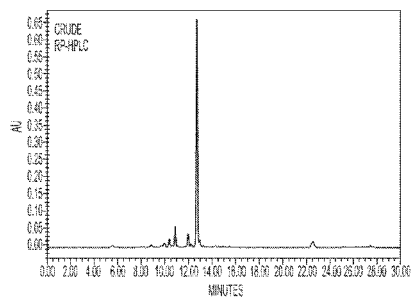


FIG. 24

【図 25】

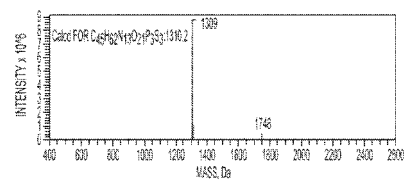
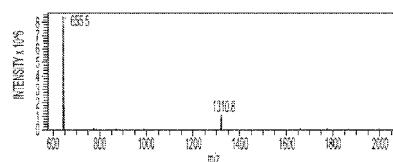


FIG. 25

【図 26】

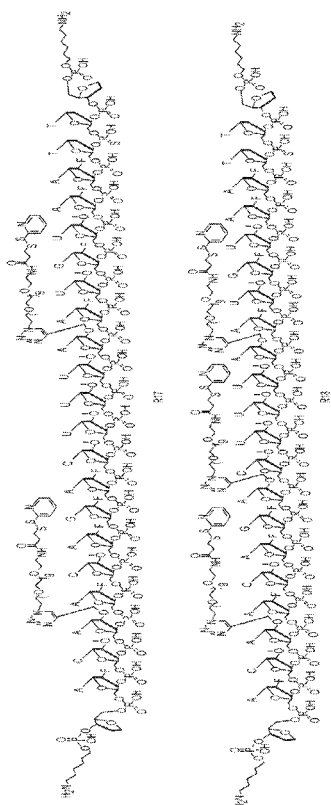


FIG. 26

【図 27】

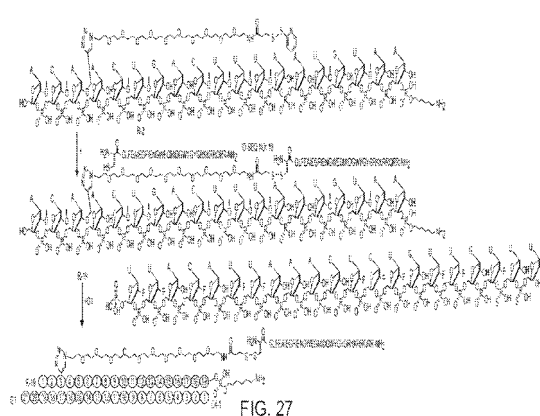


FIG. 27

【 図 3 3 】

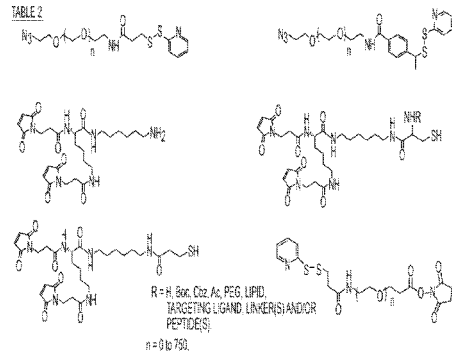


FIG. 33

【 図 3 4 】

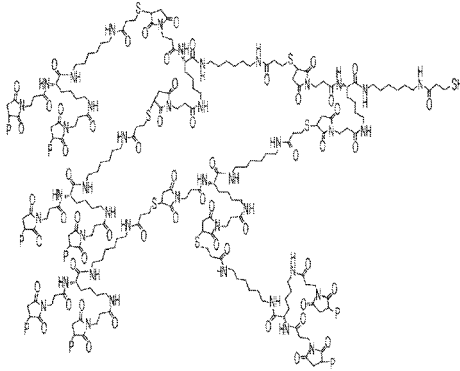


FIG. 34

【 図 3 5 】

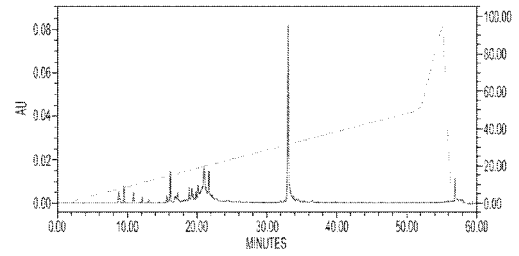
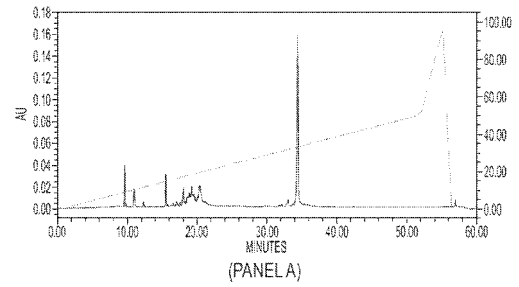
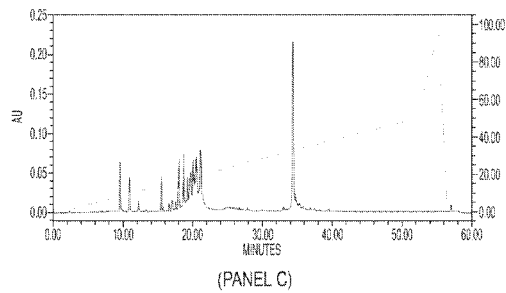


FIG. 35

【 図 3 5 - 2 】



【 図 3 5 - 3 】

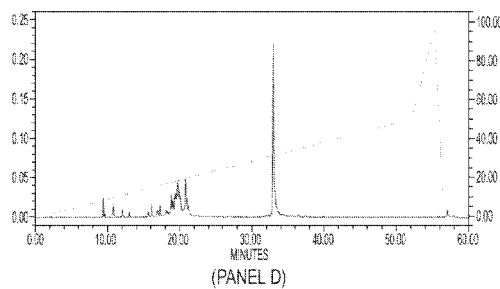
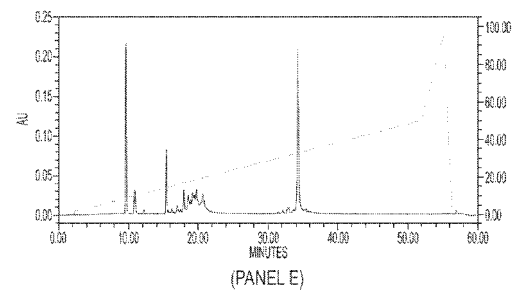


FIG. 35 (CONTINUED)

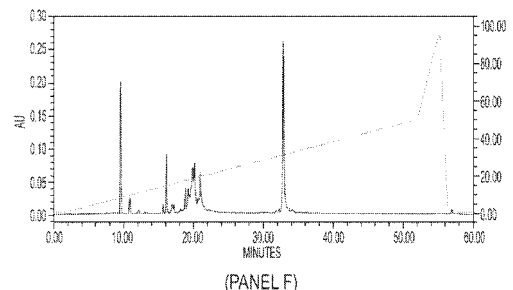
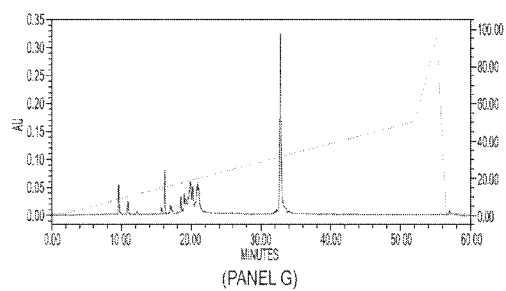


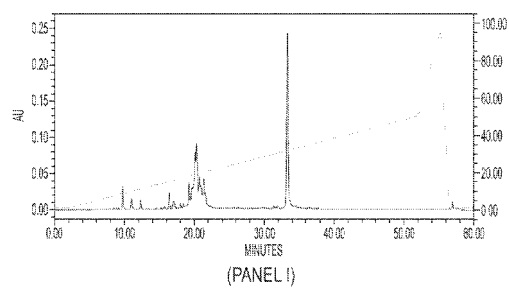
FIG. 35 (CONTINUED)

【図 35 - 4】

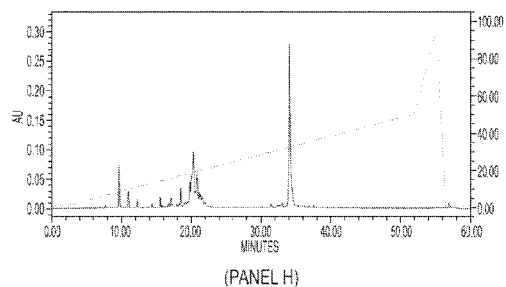


(PANEL G)

【図 35 - 5】

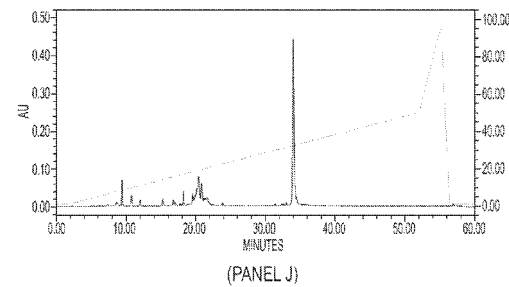


(PANEL I)



(PANEL H)

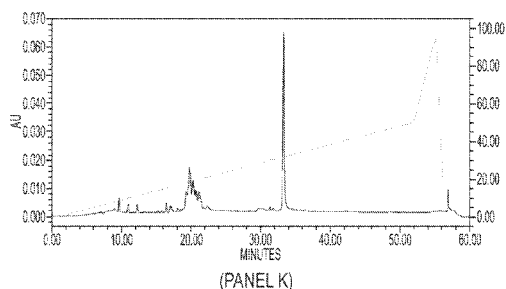
FIG. 35 (CONTINUED)



(PANEL J)

FIG. 35 (CONTINUED)

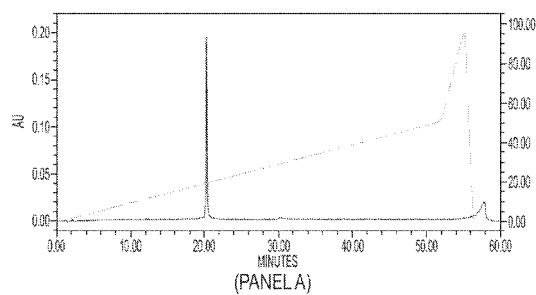
【図 35 - 6】



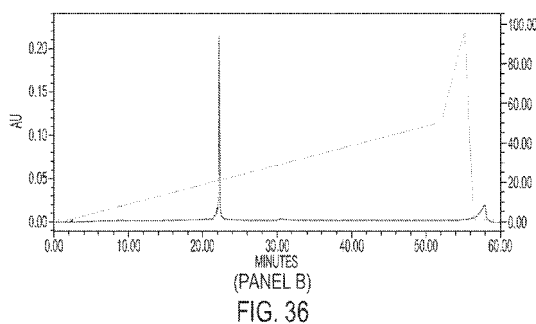
(PANEL K)

FIG. 35 (CONTINUED)

【図 36】



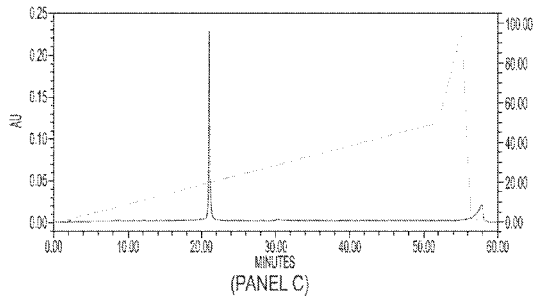
(PANEL A)



(PANEL B)

FIG. 36

【図 36 - 2】



【図 36 - 3】

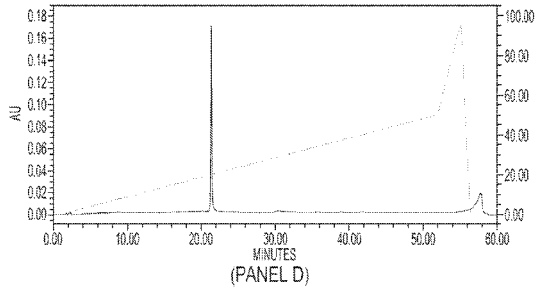
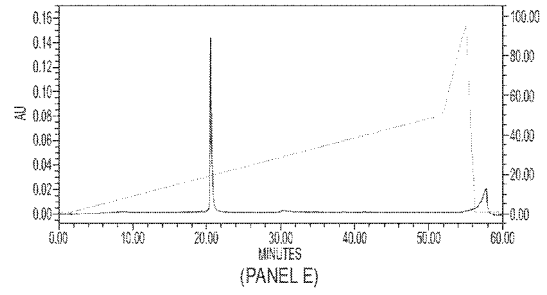


FIG. 36 (CONTINUED)

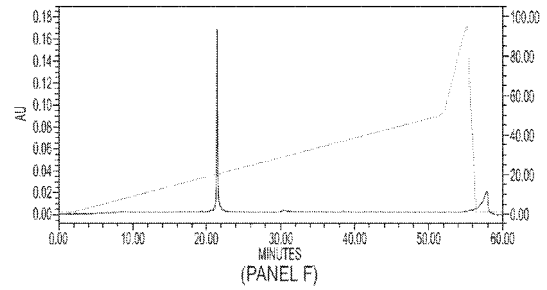


FIG. 36 (CONTINUED)

【図 36 - 4】

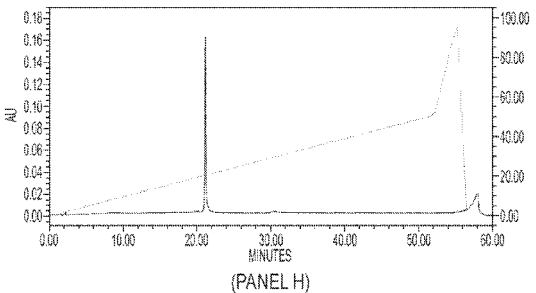
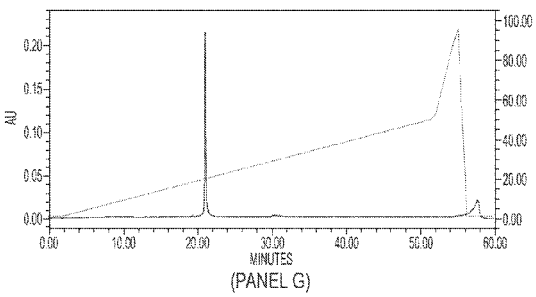


FIG. 36 (CONTINUED)

【図 36 - 5】

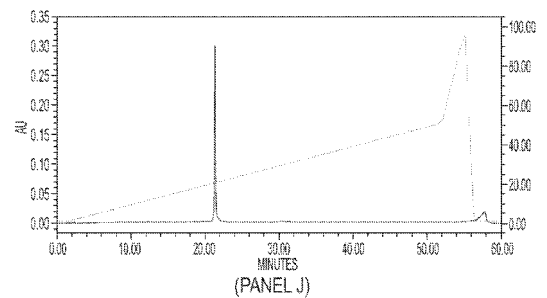
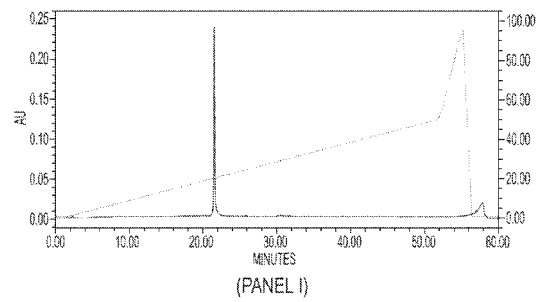


FIG. 36 (CONTINUED)

【図 36-6】

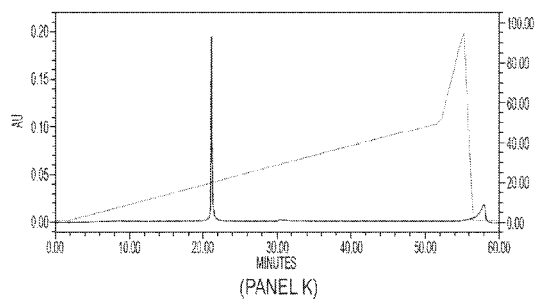


FIG. 36 (CONTINUED)

【図 37】

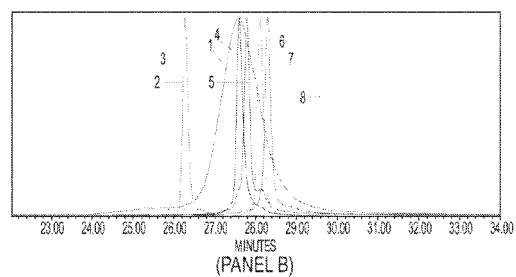
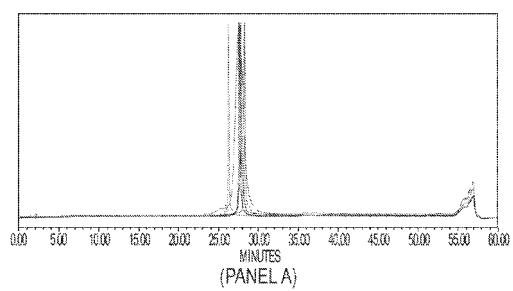


FIG. 37

【図 38】

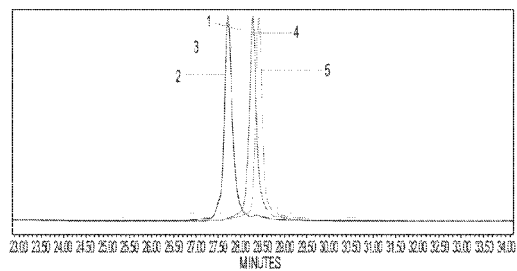
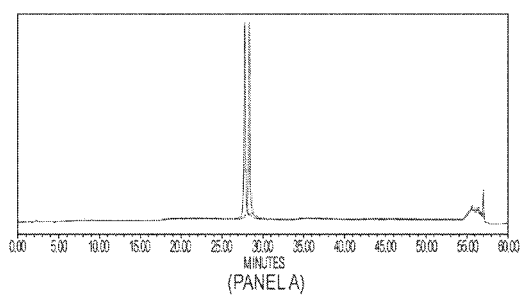


FIG. 38

【図 39】

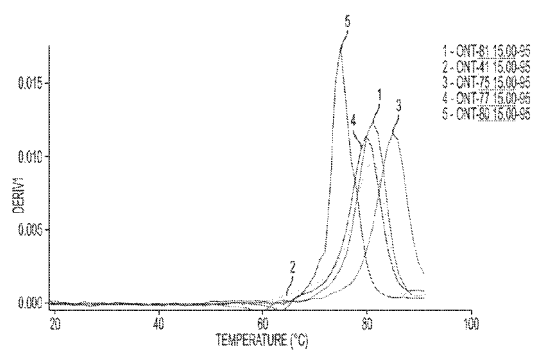


FIG. 39

【図 40】

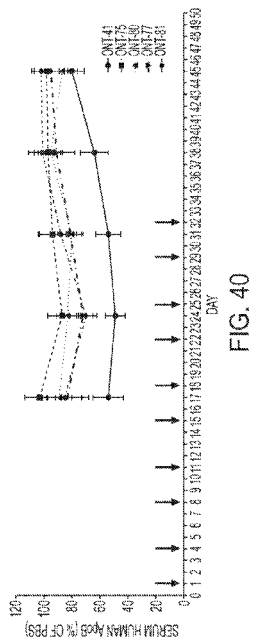


FIG. 40

【図 41】

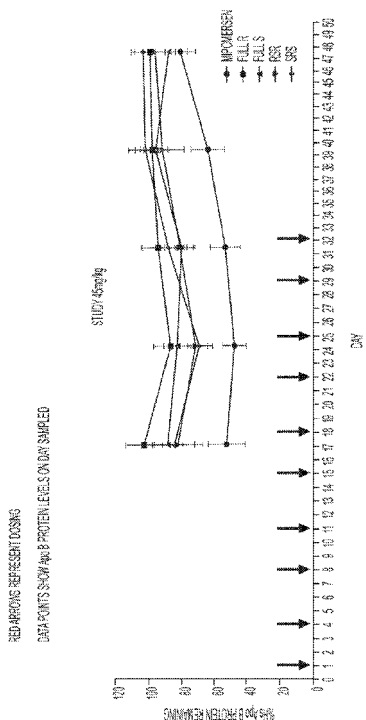


FIG. 41

【図 42】

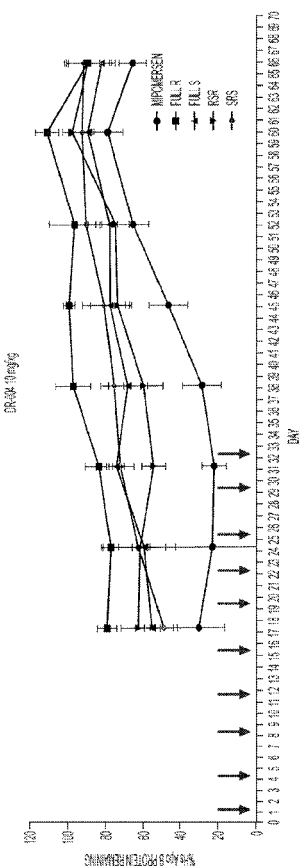


FIG. 42

【図 43】

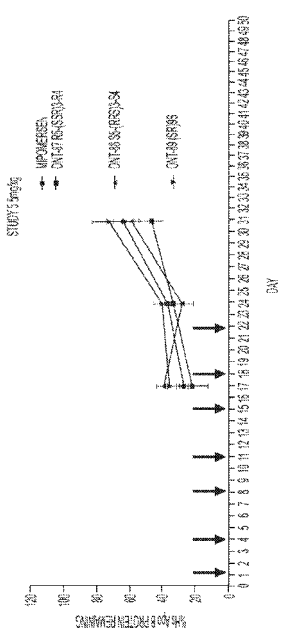


FIG. 43

【図 4 4】

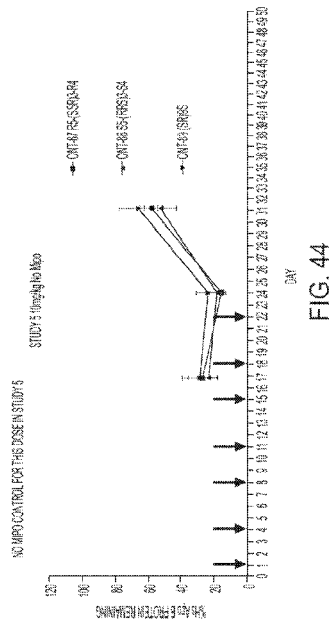


FIG. 44

【図 4 5】

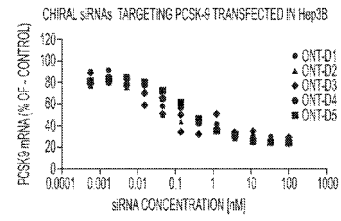


FIG. 45

【図 4 6】

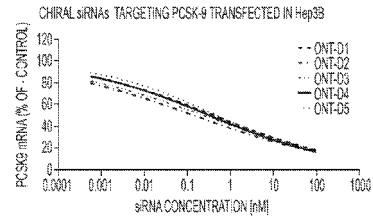


FIG. 46

【図 4 7】

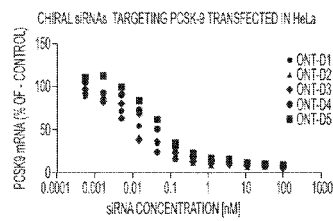


FIG. 47

【図 4 9】

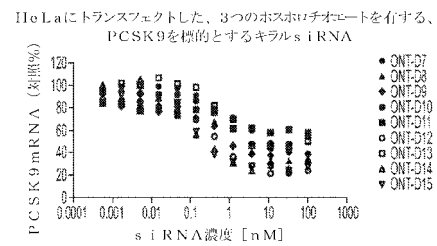


図 4 9

【図 4 8】

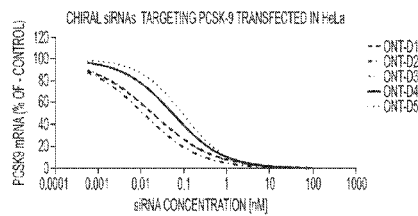


FIG. 48

【図 5 0】

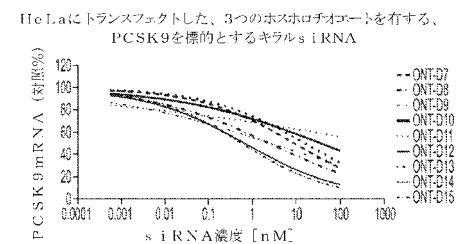


図 5 0

【図 5 1】

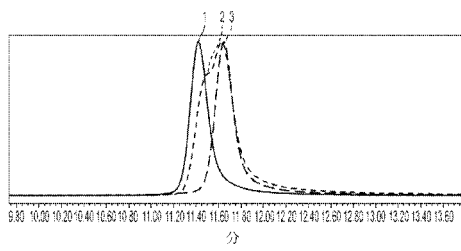


図 5 1

【図 5 2】

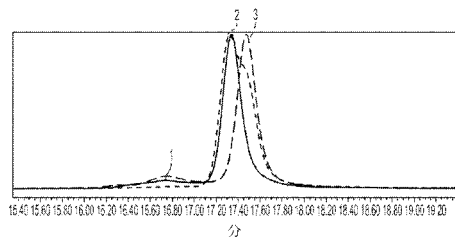


図 5 2

【図 5 3】

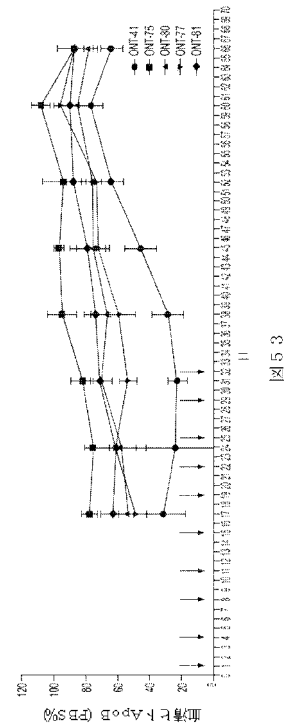


図 5 3

【図 5 4】

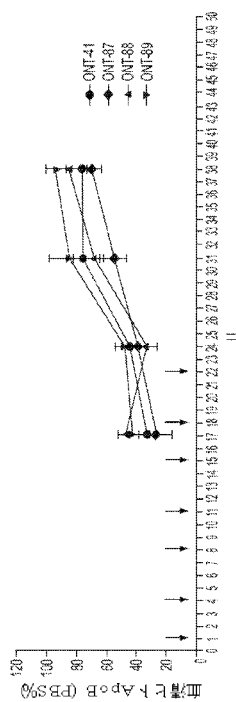


図 5 4

【図 5 5】

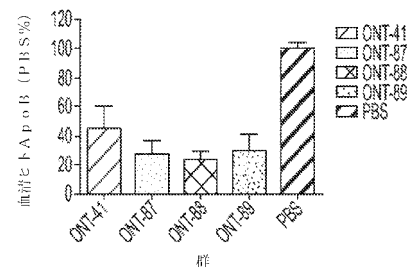


図 5 5

【図 5 6】

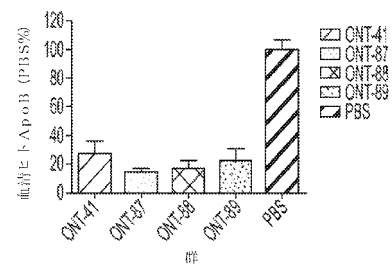


図 5 6

【図 57】

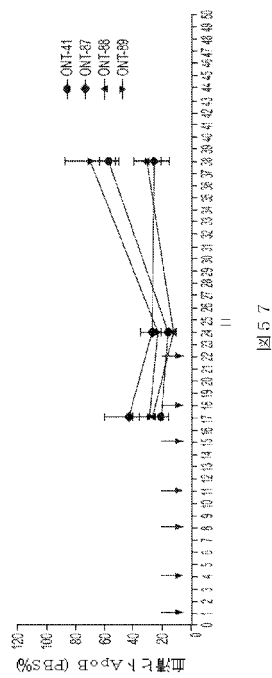


図 57

【図 58】

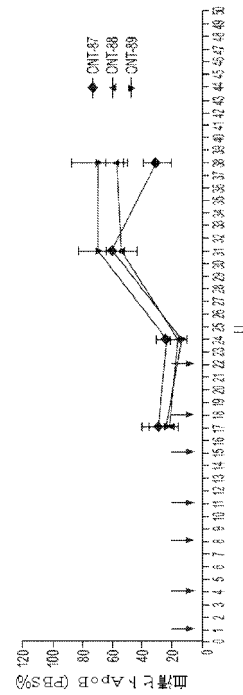


図 58

【図 59】

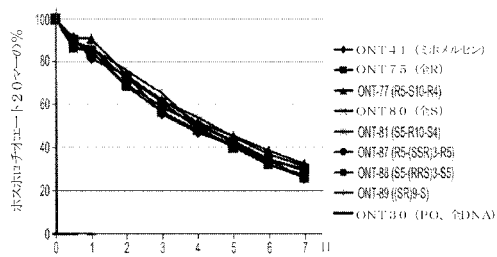


図 59

【図 60】

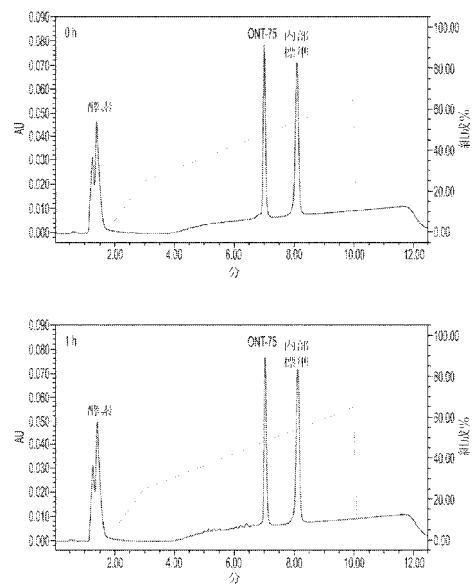


図 60

【図 7 0】

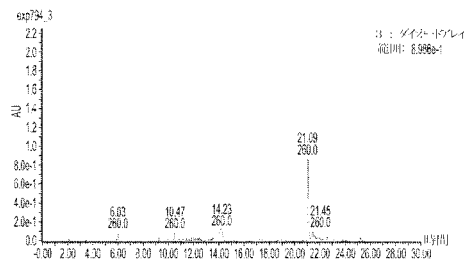


図 7 0

【図 7 2】

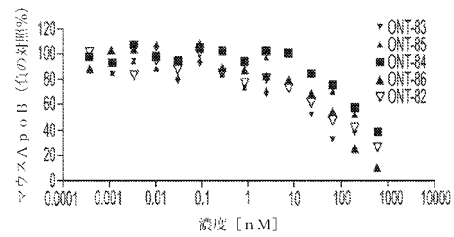


図 7 2

【図 7 1】

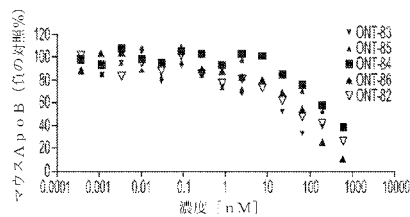


図 7 1

【配列表】

2019069971000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成31年1月10日(2019.1.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

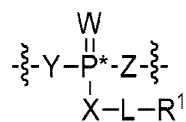
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

独立して、式 I :

【化 1】



(I)

の構造を有する修飾ヌクレオチド間結合を 1 又はそれ以上含み、前記連続した修飾ヌクレオチド間結合の少なくとも 1 つがホスホロチオエートジエステル結合でない、キラル制御されたオリゴヌクレオチドであって、

式中：

P* は、不斉リン原子であり、R_pまたはS_pであり；

Wは、O、SまたはSeであり；

X、YおよびZの各々は、独立して、-O-、-S-、-N(-L-R¹)-、またはL

であり；

Lは、共有結合または置換されていてもよい直鎖もしくは分岐鎖 $C_1 \sim C_{50}$ アルキレンであり、Lの1つ以上のメチレン単位は、任意および独立して、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により置換されており；

R^1 は、ハロゲン、R、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{10}$ 脂肪族であって、1つ以上のメチレン単位は、任意および独立して、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により置換されており；

各 R' は、独立して、 $-R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-CO_2R$ 、もしくは $-SO_2R$ であるか、または：

同じ窒素上の2つの R' は、それらの介在する原子と一緒にあって、置換されていてもよい複素環もしくはヘテロアリアル環を形成するか、または

同じ炭素上の2つの R' は、それらの介在する原子と一緒にあって、置換されていてもよいアリアル、炭素環、複素環、もしくはヘテロアリアル環を形成し；

$-Cy-$ は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい二価環であり；

各Rは、独立して、水素、または $C_1 \sim C_6$ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、もしくはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基であり；および

各

【化2】



は、独立して、ヌクレオシドへの結合を表し、

前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つ以上のリン酸ジエステル結合をさらに含み、

前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも2つの連続した修飾ヌクレオチド間結合を有する

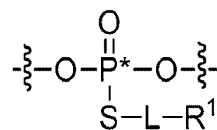
オリゴヌクレオチド。

【請求項2】

請求項1に記載のキラル制御されたオリゴヌクレオチドであって、

独立して、式 I-c：

【化3】



(I-c)

の構造を有する1又はそれ以上の修飾ヌクレオチド間結合を含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチドであって、

式中：

P* は、不斉リン原子であり、R p または S p であり；

L は、共有結合または置換されていてもよい直鎖もしくは分岐鎖 C₁ ~ C₁₀ アルキレンであり、L の 1 つ以上のメチレン単位は、任意および独立して、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキレン、C₁ ~ C₆ アルケニレン、-C≡C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または -C(O)O- により置換されており；

R¹ は、ハロゲン、R、または置換されていてもよい C₁ ~ C₁₀ 脂肪族であって、1 つ以上のメチレン単位は、任意および独立して、置換されていてもよい C₁ ~ C₆ アルキレン、C₁ ~ C₆ アルケニレン、-C≡C-、-C(R')₂-、-Cy-、-O-、-S-、-S-S-、-N(R')-、-C(O)-、-C(S)-、-C(NR')-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-N(R')C(O)O-、-OC(O)N(R')-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂N(R')-、-N(R')S(O)₂-、-SC(O)-、-C(O)S-、-OC(O)-、または -C(O)O- により置換されており；

各 R' は、独立して、-R、-C(O)R、-CO₂R、もしくは -SO₂R であるか、または：

同じ窒素上の 2 つの R' は、それらの介在する原子と一緒にあって、置換されていてもよい複素環もしくはヘテロアリール環を形成するか、または

同じ炭素上の 2 つの R' は、それらの介在する原子と一緒にあって、置換されていてもよいアリール、炭素環、複素環、もしくはヘテロアリール環を形成し；

-Cy- は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクリレンから選択される置換されていてもよい二価環であり；

各 R は、独立して、水素、または C₁ ~ C₆ 脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリール、ヘテロアリール、もしくはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基であり；および

各

【化 4】



は、独立して、ヌクレオシドへの結合を表し、

L が共有結合のときは、R¹ が -H ではない、オリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチドであって、

前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも 15 ヌクレオチド長である、オリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドであって、

前記リボースの 2' -OH 基は、-OMe 基により置換されたものである、オリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドであって、

前記リボースの 2' -OH 基は、-OCH₂CH₂OMe 基により置換されたものである、オリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドであって、

前記オリゴヌクレオチドは、ロックド核酸糖を有する、オリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドが、50%超の純度を有する、オリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項 1～6 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドが、80%超の純度を有する、オリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

請求項 1～6 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドが、90%超の純度を有する、オリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドが、固形担体に結合していない、オリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 1～10 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを含む、キラル制御されたオリゴヌクレオチド組成物。

【請求項 12】

キラル制御されたオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、

(1) カップリング；

(2) キャッピング；

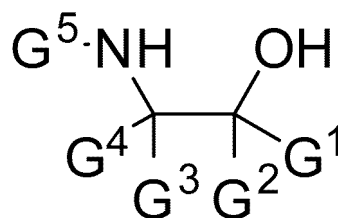
(3) 修飾；

(4) 脱ブロック化；および

(5) 所望の長さを達成するまでステップ (1)～(4) を繰り返す、ステップを含み、

前記方法は、下記式 3-A B で示される構造を有するキラル試薬の使用を含み、

【化 5】



(式 3-A B)

ここで、

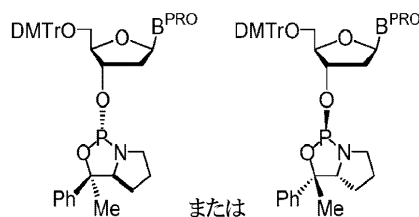
G¹ 及び G² は、独立して、アルキル、アラルキル、シクロアルキル、シクロアラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、およびアリールから選択される任意に置換されている基であり、

G³ 及び G⁴ のうちひとつは、独立して、水素であるか、または、アルキル、アラルキル、シクロアルキル、シクロアラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、およびアリールから選択される任意に置換されている基であり、

G⁵ と G³ 及び G⁴ のうちひとつは、一緒になって置換されていてもよい、飽和、部分的に不飽和もしくは不飽和の炭素環式、または単環式もしくは多環式の最大約 20 の環原子のヘテロ原子を含有する環を形成し、これは、縮合環または非縮合環である。

【請求項 13】

請求項 1 2 に記載の方法であって、前記キラル試薬は、
【化 6】



のいずれかの構造を有するホスホロアミダイト中で用いられ、ここで B^{PRO} は、保護された核酸塩基である。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 に記載の方法であって、

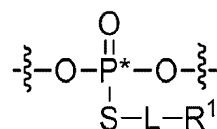
(1) ~ (4) のサイクルの少なくとも一つにおいて、ホスホロチオエートジエステル結合を形成する、方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 に記載の方法であって、

(1) ~ (4) のサイクルの少なくとも一つにおいて、式 I - c の構造を有するヌクレオチド間結合を生成する方法。

【化 7】



(I-c)

式中：

P^* は、不斉リン原子であり、 R_p または S_p であり；

L は、共有結合または置換されていてもよい直鎖もしくは分岐鎖 $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、 L の 1 つ以上のメチレン単位は、任意および独立して、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により置換されており；

R^1 は、ハロゲン、 R 、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{50}$ 脂肪族であって、1 つ以上のメチレン単位は、任意および独立して、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレン、 $C_1 \sim C_6$ アルケニレン、 $-C \equiv C-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-Cy-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-N(R')-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(NR')-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-OC(O)N(R')-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R')-$ 、 $-N(R')S(O)_2-$ 、 $-SC(O)-$ 、 $-C(O)S-$ 、 $-OC(O)-$ 、または $-C(O)O-$ により置換されており；

各 R' は、独立して、 $-R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-CO_2R$ 、もしくは $-SO_2R$ であるか、または：

同じ窒素上の 2 つの R' は、それらの介在する原子と一緒にあって、置換されていてもよい複素環もしくはヘテロアリール環を形成するか、または

同じ炭素上の 2 つの R' は、それらの介在する原子と一緒にあって、置換されていてもよいアリール、炭素環、複素環、もしくはヘテロアリール環を形成し；

$-Cy-$ は、フェニレン、カルボシクリレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、またはヘ

テロシクリレンから選択される置換されていてもよい二価環であり；
各Rは、独立して、水素、またはC₁～C₆脂肪族、フェニル、カルボシクリル、アリー
ル、ヘテロアリール、もしくはヘテロシクリルから選択される置換されていてもよい基で
あり；および

各

【化 9】



は、独立して、ヌクレオシドへの結合を表し、

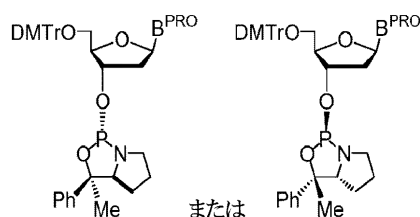
Lが共有結合のときは、R¹が-Hではない。

【請求項 16】

請求項 14 又は請求項 15 に記載の方法であって、

前記カップリングステップが、N-シアノメチルピロリジニウムトリフレートおよび、

【化 10】



(式中、B^{PRO}は、保護された核酸塩基である)

の使用を含む方法。

【請求項 17】

請求項 12～請求項 15 のいずれかに記載の方法であって、

前記カップリングステップが、キラル補充剤中のアミノ基のカップリングステップおよ
び未反応 5' OH のカップリングステップを含む、方法。

【請求項 18】

請求項 12～請求項 17 のいずれかに記載の方法であって、

少なくとも 1 つの修飾ステップが、酸化ステップにより置き換えられる方法。

【請求項 19】

請求項 12～請求項 17 のいずれかに記載の方法であって、

前記所望の長さより短い 1 つのヌクレオチドである全オリゴヌクレオチドが、合わせた
とき、前記粗生成物の 10 % 未満である、方法。

【請求項 20】

請求項 12～請求項 17 のいずれかに記載の方法であって、

前記キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、少なくとも 15 ヌクレオチド長である、
方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 0 7 H 21/02	
	C 1 2 N 15/11	Z

(31)優先権主張番号 61/671,722

(32)優先日 平成24年7月14日(2012.7.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. C o m b i F l a s h

(72)発明者 イワモト, ナオキ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ, ケンブリッジ 7 3 3 コンコード アベニュー
ー ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者 ミーナ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ, ケンブリッジ 7 3 3 コンコード アベニュー
ー ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者 シビルジカパ, ネナド

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ, ケンブリッジ 7 3 3 コンコード アベニュー
ー ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者 ヴァーダイン, グレゴリー, エル

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ, ケンブリッジ 7 3 3 コンコード アベニュー
ー ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド内

(72)発明者 ブラテフ, イヴァン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ, ケンブリッジ, 2 2 0 バンクス ストリート

F ターム(参考) 4C057 BB02 DD03 LL10 LL11 LL14 LL18 LL19 LL28 LL29 LL30

LL32 LL36 LL40 LL41 LL42 MM01 MM02 MM04 MM06 MM09

NN10