

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2023年1月5日(05.01.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/277168 A1

(51) 国際特許分類:

*C12N 15/11* (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01) *C07H 21/02* (2006.01)  
*A61K 31/7115* (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)  
*A61K 31/712* (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)  
*A61K 31/7125* (2006.01) *C12N 15/67* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/026411

(22) 国際出願日: 2022年6月30日(30.06.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2021-109239 2021年6月30日(30.06.2021) JP  
特願 2021-169846 2021年10月15日(15.10.2021) JP

(71) 出願人: 協和キリン株式会社 (**KYOWA KIRIN CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1000004 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 Tokyo (JP). 国立大学法人東海国立大学機構 (**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKAI NATIONAL HIGHER EDUCATION AND RESEARCH SYSTEM**) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).

(72) 発明者: 岩井 宏徒 (**IWAI, Hiroto**); 〒1000004 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 本間 正一 (**HOMMA, Masakazu**); 〒1000004 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 愛宕 孝之 (**ATAGO, Takayuki**); 〒1000004 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 山本 潤一郎 (**YAMAMOTO, Junichiro**); 〒1000004 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 阿部 洋 (**ABE, Hiroshi**); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP). 木村 康明 (**KIMURA, Yasuaki**);

〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (**INABA, Yoshiyuki et al.**); 〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タワー23階 T M I 総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE AND MEDICINAL COMPOSITION

(54) 発明の名称: ポリヌクレオチド及び医薬組成物

(57) Abstract: The present invention relates to a polynucleotide including a translation region from a start codon to a stop codon, a 5' untranslated region, and a poly-A tail, 65% or more of the nucleotides that constitute the poly-A tail being sugar-modified nucleotides.

(57) 要約: 本発明は、開始コドンから終止コドンまでの翻訳領域、5'側非翻訳領域、及びポリA鎖を含み、前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾ヌクレオチドである、ポリヌクレオチドに関する。



WO 2023/277168 A1

## 明 細 書

発明の名称：ポリヌクレオチド及び医薬組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、ポリヌクレオチド及び前記ポリヌクレオチドを含む医薬組成物に関する。

### 背景技術

[0002] 細胞における遺伝情報は、DNAを鋳型としてRNA合成酵素によって伝令RNA（以下、「mRNA」という）が転写されること、転写された一本鎖mRNAにリボソームが結合し翻訳によってタンパク質が合成されることで、伝達されている。この伝達形式は分子生物学において「セントラルドグマ」と呼ばれ、原核生物及び真核生物の両方に共通する基本原理である。

遺伝情報伝達の間接物質であるmRNAは、リボソームに直接認識されタンパク質に翻訳されるための塩基配列情報と構造を有している。

[0003] 核酸医薬は次世代医薬としての期待が近年高まっている。mRNAとしての人工ポリヌクレオチド（以下、背景技術の欄において、「人工mRNA」という）は、発現増強又は発現亢進により所望のペプチド及びタンパク質を産生し、タンパク質補充療法型の核酸医薬又はワクチン療法型の核酸医薬として用いることができる。

しかしながら、天然塩基のみから構成される人工mRNAを外から細胞内に導入すると、細胞内のToll様レセプター（TLR3、TLR7、TLR8、RIG-I等）に結合することで速やかに免疫応答が惹起され、炎症反応及びタンパク質の翻訳量の低下が引き起こされることが知られている（非特許文献1）。細胞内でタンパク質を発現させるためには、何らかの形で人工mRNA自体の免疫反応性を低減し、かつ翻訳量を低下させない工夫が必要となる。また、天然塩基のみから構成されるRNAは核酸分解酵素に対して脆弱であることから、安定性付与の観点からも修飾ヌクレオチドの導入が必要とされている（非特許文献2）。修飾ヌクレオチドの中でも、2'-O

ーメチル修飾RNA、2'-F化RNA、2'-O-メトキシエチル修飾RNAやLNA等の架橋型核酸などの糖修飾ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、核酸医薬の免疫反応性の低減や核酸分解酵素に対する耐性の付与のいずれにも有効であることが示されている（非特許文献3）。

[0004] 近年、*in vitro*転写法（*in vitro* transcription、以下、「IVT」という）によって作製された人工mRNAを医薬品として利用する動きが盛んに進められている（非特許文献4）。

例えば、非特許文献5に、メラノーマ患者を対象とした人工mRNAがんワクチンの臨床試験では、がんワクチンの投与が開始されてから転移発症率が大幅に減少することが報告されているように、人工mRNAを医薬品とする上での、一定の成果も報告されつつある。

しかしながら、これらの臨床応用されている人工mRNAはIVTによって作製されたものである。IVTで作製される人工mRNAは以下の2つの課題を持つ。第1に、免疫反応性の低減や核酸分解酵素に対する安定性付与を目的として導入される修飾ヌクレオチドの導入位置は、制御ができない。2'-F化RNAをIVTにより導入した人工mRNAでは、ペプチド翻訳能が減弱・消失する事例が特許文献1に開示されている。第2に、IVTで用いられるRNA合成酵素に基質として認識される修飾ヌクレオチド以外は導入不可能である。また、特許文献1には、2'-O-メチル修飾RNAを含む人工mRNAは、一般的なRNAポリメラーゼを用いたIVT反応では調製が困難であることが開示されている。

したがって、IVTにより修飾ヌクレオチドを導入して作製された人工mRNAでは、修飾ヌクレオチドの位置及び種類に関して、十分な検討がなされているとは言い難い。

[0005] 複数のRNAを化学的に連結する技術を用いてmRNAを人工的に合成する方法が報告されている（非特許文献6及び7）。この方法を用いると、翻訳領域及び非翻訳領域を含む人工mRNAの任意の位置に糖修飾ヌクレチドを導入することが可能である。また、特許文献2及び3には、複数のRNA

を化学的に連結する技術を用いて人工mRNAを合成する方法によって、mRNAの非翻訳領域に糖修飾ヌクレオチドを導入して安定化する概念が開示されている。非特許文献6及び7には、mRNAの翻訳領域中の1か所に2'-O-メチル修飾RNAを導入した人工mRNAのペプチド翻訳能が確認されたことが開示されている。その一方、糖修飾ヌクレオチドの導入位置によってはペプチド翻訳能が著しく減弱することも開示されている（非特許文献6及び7）。

以上より、人工mRNA核酸医薬として十分に低い免疫反応性や高い安定性と優れた翻訳能を実現するためには、修飾ヌクレオチドの修飾率、位置及び種類に関するさらなる知見が必要である。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開第2014/093574号  
特許文献2：国際公開第1999/014346号  
特許文献3：国際公開第2016/022914号

### 非特許文献

- [0007] 非特許文献1：ネイチャー・レビューズ・ドラッグディスカバリー (Nature Reviews Drug Discovery)、第13巻、759-780頁 (2014)  
非特許文献2：ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology)、第35巻、第3号、238-248頁 (2017)  
非特許文献3：ドラッグ・ディスカバリー・トゥデイ (Drug Discovery Today)、第13巻、第19/20号、842-855頁 (2008)  
非特許文献4：ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology)、第35巻、第3号、193-197頁 (2017)  
非特許文献5：ネイチャー (Nature)、第547巻、第7662号、222-226頁 (2017)  
非特許文献6：ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Research)、第44巻、第2号、852-862頁 (2015)

非特許文献7：ジーンズ (Genes)、第10巻、第2号、84頁 (2019)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、優れた翻訳能を有するポリヌクレオチドを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者等が鋭意検討した結果、3'-非翻訳領域中のポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾ヌクレオチドである場合、優れた翻訳能を示すことを見出した。

[0010] 本発明は以下の実施形態を含む。

[1]

開始コドンから終止コドンまでの翻訳領域、

5'側非翻訳領域、及び

ポリA鎖

を含み、前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾ヌクレオチドである、ポリヌクレオチド。

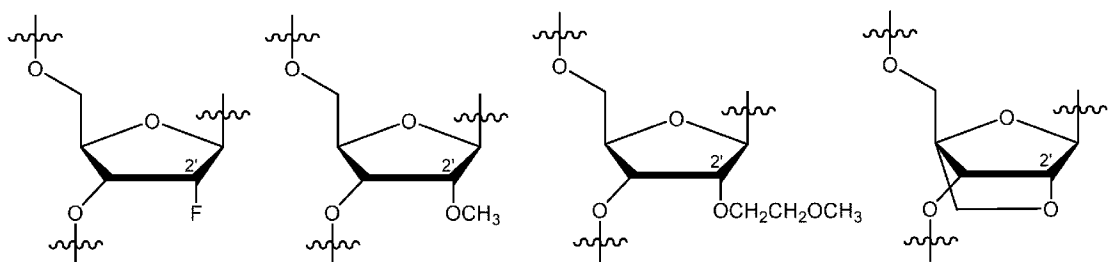
[2]

前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの全てが糖修飾ヌクレオチドである、[1]に記載のポリヌクレオチド

[3]

前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される、

[化1]

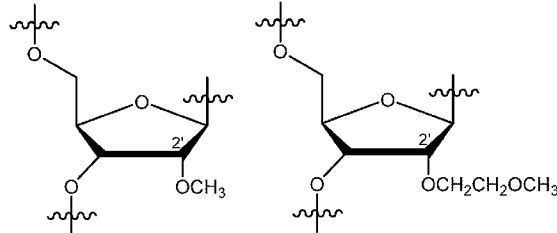


[1] 又は [2] に記載のポリヌクレオチド

[4]

前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される、

[化2]



[1] ~ [3] のいずれかに記載のポリヌクレオチド

[5]

前記ポリ A 鎖は、リン酸修飾ヌクレオチドを少なくとも 1 つ含む、 [1] ~ [4] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[6]

前記ポリ A 鎖の 3' 末端から 1 番目 ~ 2 番目のヌクレオチド、 1 番目 ~ 3 番目のヌクレオチド、 1 番目 ~ 4 番目のヌクレオチド、又は 1 番目 ~ 5 番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、 [1] ~ [5] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[7]

前記ポリ A 鎖を構成する全てのヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、 [1] ~ [6] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[8]

前記ポリ A 鎖が 2 ~ 40 塩基長である、 [1] ~ [7] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[9]

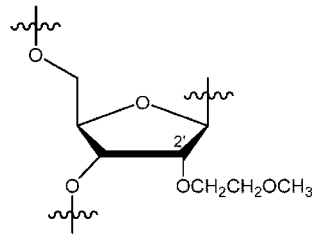
前記 5' 側非翻訳領域のヌクレオチドが、それぞれ独立して、 2' -デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドから選択され

る、[1]～[8]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[10]

前記5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～6番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり、前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が以下の構造である、

[化3]



[1]～[9]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[11]

前記5'側非翻訳領域の5'末端の5'側に、1～10個の糖非修飾ヌクレオチドからなる部分をさらに含む、[10]に記載のポリヌクレオチド。

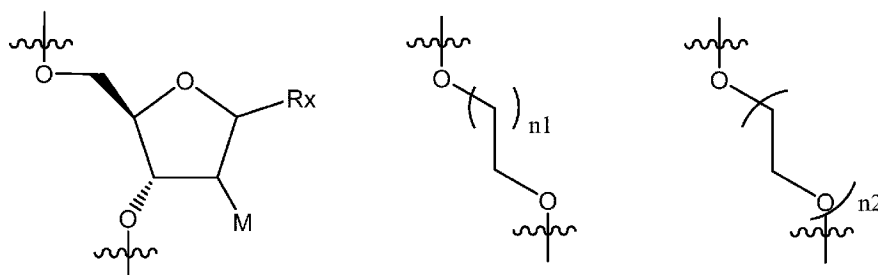
[12]

前記5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～6番目のヌクレオチドを除くヌクレオチドが、2'-デオキシリボヌクレオチド及び/又はスペーサー修飾を含む、[1]～[11]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[13]

前記5'側非翻訳領域及び/又は3'側非翻訳領域がスペーサー修飾を含む、好ましくは、前記5'側非翻訳領域及び/又は3'側非翻訳領域がスペーサー修飾を含み、前記スペーサー修飾が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される、

[化4]



[式中、

R x はエチニル、水素原子又はOHであり、

Mは、水素原子又はOHであり、

n 1 は 1、2 又は 5 であり、

n 2 は 1、2 又は 3 である。]

[1] ~ [12] のいずれかには記載のポリヌクレオチド。

なお、[13] におけるスペーサー修飾として、一番左の構造中、5員環の酸素原子が、NHで置換されていてもよい。

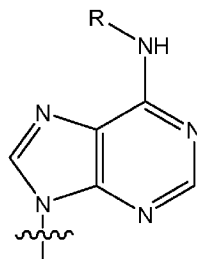
[14]

前記5'側非翻訳領域の5'末端からから1番目~2番目のヌクレオチド、1番目~3番目のヌクレオチド、1番目~4番目のヌクレオチド、又は1番目~5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、[1] ~ [13] のいずれかには記載のポリヌクレオチド。

[15]

前記5'側非翻訳領域が塩基修飾ヌクレオチドを含み、前記塩基修飾ヌクレオチドの修飾塩基が、以下の構造である、

[化5]



[式中、Rは炭素数1~6のアルキル基である。]

[1] ~ [14] のいずれかには記載のポリヌクレオチド。

[16]

前記翻訳領域が、1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであるコドンを含み、[1] ~ [15] のいずれかには記載のポリヌクレオチド。

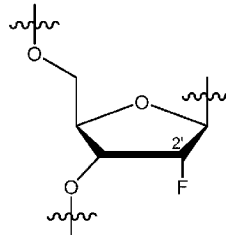
[17]

前記翻訳領域が、4以上のコドンを含み、全てのコドンの1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、[1]～[16]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[18]

前記翻訳領域が、終始コドンを除いた全てのコドンの1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり、前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が以下の構造である、

[化6]



[1]～[17]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[19]

前記翻訳領域が、2000以下のコドンを含む、[1]～[18]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[19-1]

前記翻訳領域が、4以上2000以下(4～2000)のコドンを含む、[1]～[19]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

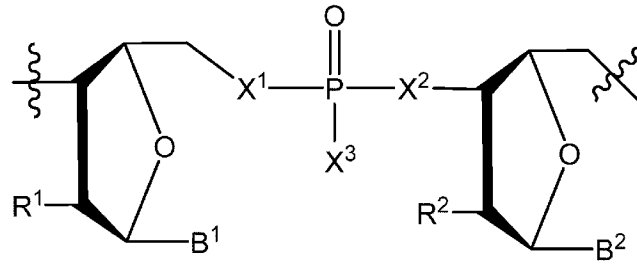
[20]

前記終止コドンの全てのヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、[1]～[19-1]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[21]

以下の構造を含む、

[化7]



[式中、

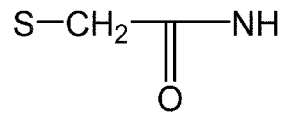
R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、H、OH、F、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>又はOCH<sub>3</sub>であり、

B<sup>1</sup>及びB<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、塩基部であり、

X<sup>1</sup>は、O、S又はNHであり、

X<sup>2</sup>は、O、S、NH又は以下の構造であり、

[化8]



X<sup>3</sup>は、OH、SH又はそれらの塩である、

ただし、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、同時にOではない]

[1] ~ [20] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[22]

[1] ~ [21] のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、医薬組成物。

[0011] 本発明は、以下の実施形態を更に含む。

[101]

開始コドンから終止コドンまでの翻訳領域、

5'側非翻訳領域、及び

ポリA鎖

を含み、前記5'側非翻訳領域のヌクレオチドが、それぞれ独立して、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドから選択される、ポリヌクレオチド。

## [101-1]

前記5'側非翻訳領域のヌクレオチドが少なくとも1以上の糖修飾ヌクレオチドを含む、[101]に記載のポリヌクレオチド。

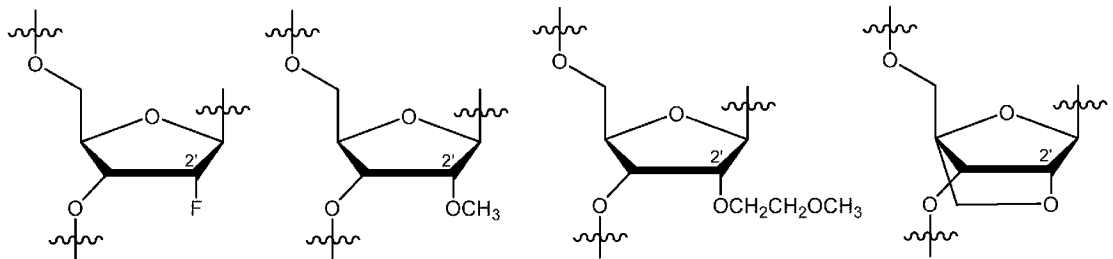
## [102]

前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾ヌクレオチドである、好ましくは、前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの全てが糖修飾ヌクレオチドである、[101]又は[101-1]に記載のポリヌクレオチド。

## [103]

前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される、

## [化9]

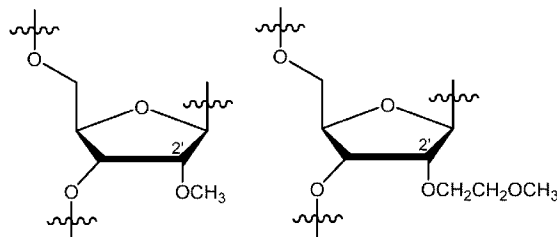


[101] ~ [102] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

## [104]

前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される、

## [化10]



[101] ~ [103] のいずれかに記載のポリヌクレオチド

## [105]

前記ポリ A 鎖は、リン酸修飾ヌクレオチドを少なくとも 1 つ含む、[101] ~ [104] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[106]

前記ポリ A 鎖の 3' 末端から 1 番目 ~ 2 番目のヌクレオチド、1 番目 ~ 3 番目のヌクレオチド、1 番目 ~ 4 番目のヌクレオチド、又は 1 番目 ~ 5 番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、[101] ~ [105] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[107]

前記ポリ A 鎖を構成する全てのヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、[101] ~ [106] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

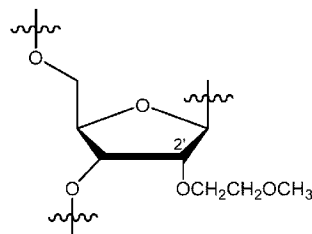
[108]

前記ポリ A 鎖が 2 ~ 40 塩基長である、[101] ~ [107] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[109]

前記 5' 側非翻訳領域の 5' 末端から 1 番目 ~ 6 番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり、前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が以下の構造である、

[化11]



[101] ~ [108] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[110]

前記 5' 側非翻訳領域の 5' 末端の 5' 側に、1 ~ 10 個の糖非修飾ヌクレオチドからなる部分をさらに含む、[109] に記載のポリヌクレオチド。

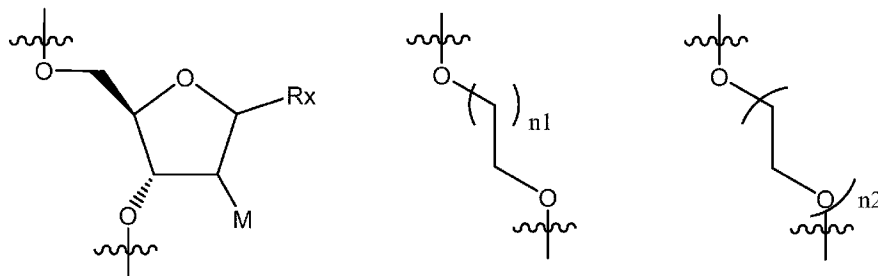
[111]

前記5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～6番目のヌクレオチドを除くヌクレオチドが、2'-デオキシリボヌクレオチド及び/又はスペーサー修飾を含む、[101]～[110]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[112]

前記5'側非翻訳領域及び/又は3'側非翻訳領域がスペーサー修飾を含む、好ましくは、前記5'側非翻訳領域及び/又は3'側非翻訳領域がスペーサー修飾を含み、前記スペーサー修飾が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される、

[化12]



[式中、

Rxはエチニル、水素原子又はOHであり、

Mは、水素原子又はOHであり、

n1は1、2又は5であり、

n2は1、2又は3である。]

[101]～[111]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

なお、[112]におけるスペーサー修飾として、一番左の構造中、5員環の酸素原子が、NHで置換されていてもよい。

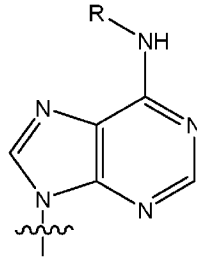
[113]

前記5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～2番目のヌクレオチド、1番目～3番目のヌクレオチド、1番目～4番目のヌクレオチド、又は1番目～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、[101]～[112]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[114]

前記5'側非翻訳領域が塩基修飾ヌクレオチドを含み、前記塩基修飾ヌクレオチドの修飾塩基部が、以下の構造である、

[化13]



[式中、Rは炭素数1～6のアルキル基である。]

[101]～[113]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[115]

前記翻訳領域が、1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであるコドンを含み、[101]～[114]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[116]

前記翻訳領域が、4以上のコドンを含み、全てのコドンの1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、[101]～[115]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

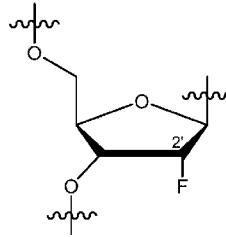
[116-1]

前記翻訳領域が、4以上2000以下(4～2000)のコドンを含み、[101]～[116]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[117]

前記翻訳領域が、終始コドンを除いた全てのコドンの1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり、前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が以下の構造である、

[化14]



[101] ~ [116-1] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[118]

前記翻訳領域が、2000以下のコドンを含む、[101] ~ [117] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[118-1]

前記翻訳領域が、4~2000のコドンを含む、[101] ~ [118] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

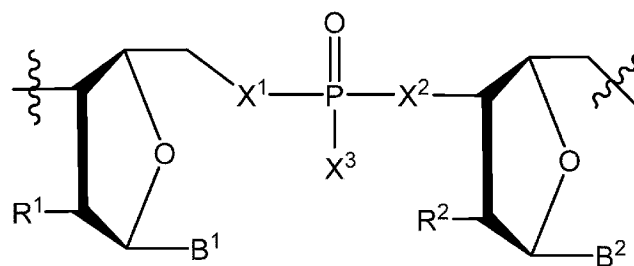
[119]

前記終止コドンの全てのヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、[101] ~ [118-1] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[120]

以下の構造を含む、

[化15]



[式中、

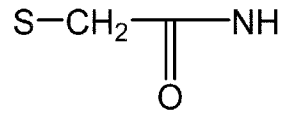
$R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して、H、OH、F、 $OCH_2CH_2OCH_3$ 又は $OCH_3$ であり、

$B^1$ 及び $B^2$ は、それぞれ独立して、塩基部であり、

$X^1$ は、O、S又はNHであり、

X<sup>2</sup>は、O、S、NH又は以下の構造であり、

[化16]



X<sup>3</sup>は、OH、SH又はそれらの塩である、

ただし、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、同時にOではない]

[101] ~ [119] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[121]

[101] ~ [120] のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、医薬組成物。

[0012] 本発明は、上記 [1] ~ [22] とは別の態様として、以下の実施形態を更に含む。

[201]

開始コドンから終止コドンまでの翻訳領域、

5'側非翻訳領域、及び

ポリA鎖

を含み、前記ポリAを構成するヌクレオチドが、それぞれ独立して、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドから選択される、ポリヌクレオチド。

[201-1]

前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドが少なくとも1以上の糖修飾ヌクレオチドを含む、[201]に記載のポリヌクレオチド。

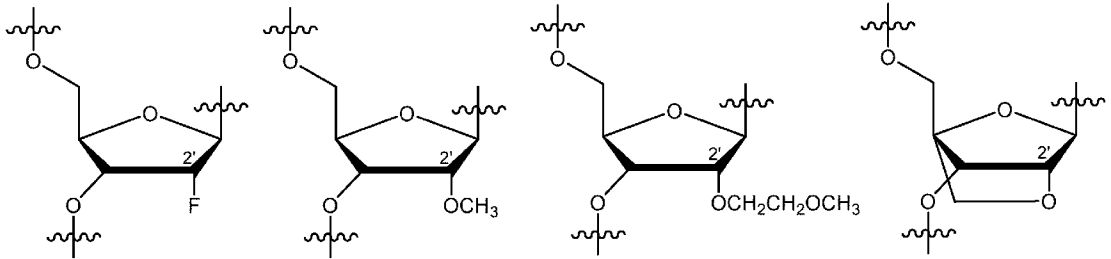
[202]

前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾ヌクレオチドである、好ましくは、前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの全てが糖修飾ヌクレオチドである、[201]又は[202-1]に記載のポリヌクレオチド。

[203]

前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される、

[化17]

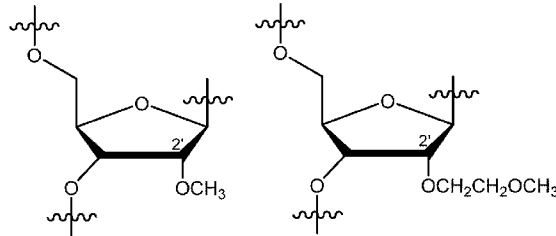


[201] ~ [202] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[204]

前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される、

[化18]



[201] ~ [203] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[205]

前記ポリA鎖は、リン酸修飾ヌクレオチドを少なくとも1つ含む、[201] ~ [204] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[206]

前記ポリA鎖の3'末端から1番目~2番目のヌクレオチド、1番目~3番目のヌクレオチド、1番目~4番目のヌクレオチド、又は1番目~5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、[201] ~ [205] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[207]

前記ポリA鎖を構成する全てのヌクレオチドが、ホスホロチオエートによ

って連結されている、[201]～[206]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

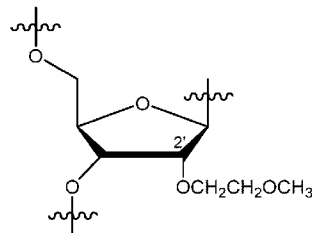
[208]

前記ポリA鎖が2～40塩基長である、[201]～[207]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[209]

前記5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～6番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり、前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が以下の構造である、

[化19]



[201]～[208]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[210]

前記5'側非翻訳領域の5'末端の5'側に、1～10個の糖非修飾ヌクレオチドからなる部分をさらに含む、[209]に記載のポリヌクレオチド。

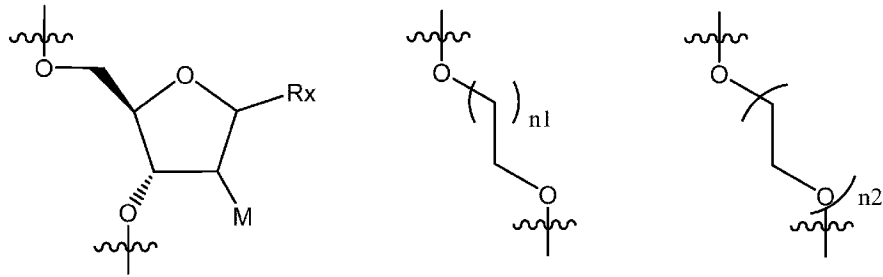
[211]

前記5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～6番目のヌクレオチドを除くヌクレオチドが、2'-デオキシリボヌクレオチド及び/又はスペーサー修飾を含む、[201]～[210]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[212]

前記5'側非翻訳領域及び/又は3'側非翻訳領域がスペーサー修飾を含む、好ましくは、前記5'側非翻訳領域及び/又は3'側非翻訳領域がスペーサー修飾を含み、前記スペーサー修飾が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される、

[化20]



[式中、

Rxはエチニル、水素原子又はOHであり、

Mは、水素原子又はOHであり、

n1は1、2又は5であり、

n2は1、2又は3である。]

[201]～[211]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

なお、[212]におけるスペーサー修飾として、一番左の構造中、5員環の酸素原子が、NHで置換されていてもよい。

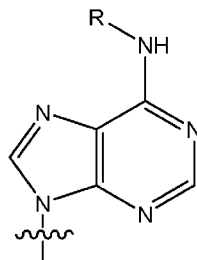
[213]

前記5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～2番目のヌクレオチド、1番目～3番目のヌクレオチド、1番目～4番目のヌクレオチド、又は1番目～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、[201]～[212]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[214]

前記5'側非翻訳領域が塩基修飾ヌクレオチドを含み、前記塩基修飾ヌクレオチドの修飾塩基部が、以下の構造である、

[化21]



[式中、Rは炭素数1～6のアルキル基である。]

[201] ~ [213] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[215]

前記翻訳領域が、1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであるコドンを含み、[201] ~ [214] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[216]

前記翻訳領域が、4以上のコドンを含み、全てのコドンの1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、[201] ~ [215] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

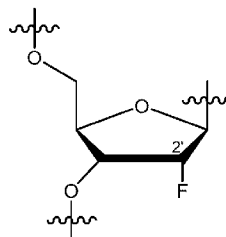
[216-1]

前記翻訳領域が、4以上2000以下(4~2000)のコドンを含み、[201] ~ [216] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[217]

前記翻訳領域が、終始コドンを除いた全てのコドンの1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり、前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が以下の構造である、

[化22]



[201] ~ [216-1] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[218]

前記翻訳領域が、2000以下のコドンを含み、[201] ~ [217] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[218-1]

前記翻訳領域が、4~2000のコドンを含み、[201] ~ [218] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

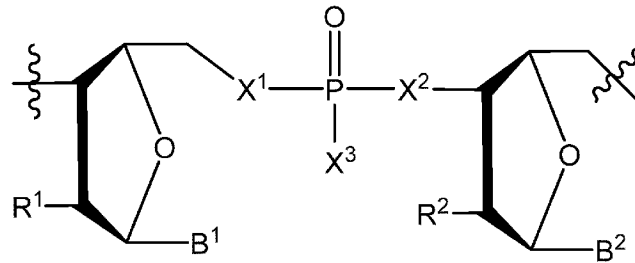
[219]

前記終止コドンの全てのヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、[201]～[218-1]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[220]

以下の構造を含む、

[化23]



[式中、

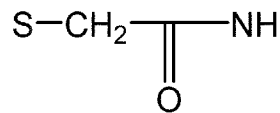
R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、H、OH、F、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>又はOCH<sub>3</sub>であり、

B<sup>1</sup>及びB<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、塩基部であり、

X<sup>1</sup>は、O、S又はNHであり、

X<sup>2</sup>は、O、S、NH又は以下の構造であり、

[化24]



X<sup>3</sup>は、OH、SH又はそれらの塩である、

ただし、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、同時にOではない]

[201]～[219]のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[221]

[201]～[220]のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、医薬組成物。

[0013] 本発明は、以下の実施形態を更に含む。

[1A]

疾患の治療に使用するための、[1]～[21]、[101]～[120]

] 及び [201] ~ [220] のいずれかに記載のポリヌクレオチド又は [22]、[121] 及び [221] のいずれかに記載の医薬組成物。

[1B]

疾患を治療する方法であって、その必要のある患者に治療有効量の [1] ~ [21]、[101] ~ [120] 及び [201] ~ [220] のいずれかに記載のポリヌクレオチド又は [22]、[121] 及び [221] のいずれかに記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

[1C]

疾患を治療するための、[1] ~ [21]、[101] ~ [120] 及び [201] ~ [220] のいずれかに記載のポリヌクレオチド又は [22]、[121] 及び [221] のいずれかに記載の医薬組成物の使用。

[1D]

疾患を治療するための医薬の製造における、[1] ~ [21]、[101] ~ [120] 及び [201] ~ [220] のいずれかに記載のポリヌクレオチドの使用。

[1E]

疾患を治療するための医薬の製造に使用するための、[1] ~ [21]、[101] ~ [120] 及び [201] ~ [220] のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[1F]

[1] ~ [21]、[101] ~ [120] 及び [201] ~ [220] のいずれかに記載のポリヌクレオチド又は [22]、[121] 及び [221] のいずれかに記載の医薬組成物及び使用説明書を含む、疾患の治療に使用するためのキット。

### 発明を実施するための形態

[0014] <ポリヌクレオチド>

本発明の一実施形態は、ポリヌクレオチドが、開始コドンから終止コドンまでの翻訳領域、

5'側非翻訳領域、及び

ポリA鎖

を含み、前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾ヌクレオチドである。

本発明においては、ポリヌクレオチドにおいて、ポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾ヌクレオチドであることで、優れた翻訳能を示す。

[0015] 本実施形態のポリヌクレオチドは、翻訳領域、及びポリA鎖を含むが、ポリヌクレオチドの5'側から3'側に、5'側非翻訳領域、翻訳領域、ポリA鎖と配列していることが好ましく、翻訳領域とポリA鎖とは、直接連結していてもよく、その間に別の領域やポリA鎖には含まれない配列が存在していてもよい。翻訳領域とポリA鎖とが直接連結しているとは、翻訳領域の終始コドンに続いて、ポリA鎖が結合している場合を意味し、この場合、3'側非翻訳領域がポリA鎖である。

ポリA鎖は、3'側非翻訳領域内に存在し、ポリヌクレオチドは、5'側非翻訳領域、翻訳領域、3'側非翻訳領域を含む。この場合、ポリA鎖は、3'側非翻訳領域の3'末端に存在する。

[0016] 本実施形態のポリヌクレオチドは、翻訳領域がポリペプチド（本明細書における「ポリペプチド」はタンパク質を包含する）に翻訳されるという点で、例えば、mRNA、small open reading frame (smORF)、non-canonical open reading frame、long noncoding RNA (lncRNA)、pri-microRNA (pri-miRNA) と同等の機能を有するポリヌクレオチドと理解される。

ポリヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチドであってもよく、ポリヌクレオチドの末端が互いに連結した環状のポリヌクレオチドであってもよい。

[0017] 本実施形態のポリヌクレオチドは、ヌクレオチドが複数結合したものであり、ポリヌクレオチドを構成する各ヌクレオチドは、通常、糖部、塩基部及

びリン酸部を含む。糖部は、ヌクレオチドに含まれる、糖に対応する部分であり、塩基部は、ヌクレオチドに含まれる、塩基に対応する部分であり、リン酸部は、ヌクレオチドに含まれる、リン酸に対応する部分である。

一般的には、ヌクレオチドは、塩基部は、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、ウラシル（U）又はチミン（T）から選択され、糖部は、リボース又は2'-デオキシリボースから選択される。リボースと2'-デオキシリボースは、それぞれD体であることが好ましい。

ヌクレオチドは、上記塩基部と上記糖部の組み合わせからなるが、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）又はウラシル（U）を塩基部として有し、D-リボースを糖部として有するリボヌクレオチドであることが好ましい。

[0018] 本実施形態のポリヌクレオチドを構成するヌクレオチドは、非修飾ヌクレオチドであるリボヌクレオチド（AUGC）であってもよく、非修飾ヌクレオチドであるデオキシリボヌクレオチド（ATGC）であってもよく、糖部、塩基部及びリン酸部の少なくとも一部において非修飾ヌクレオチドに由来しない構造を有する修飾ヌクレオチドであってもよい。

[0019] 本明細書において、糖部を修飾したヌクレオチドを「糖修飾ヌクレオチド」と称し、塩基部を修飾したヌクレオチドを「塩基修飾ヌクレオチド」と称し、リン酸部を修飾したヌクレオチドを「リン酸修飾ヌクレオチド」と称する。本明細書において「修飾」とは、糖部、塩基部又はリン酸部の構造を変化させることを意味する。修飾による構造の変化は特に限定されない。修飾として、例えば、任意の置換基による任意の部位の置換が挙げられる。

修飾糖部、修飾塩基部又は修飾リン酸部のいずれかを有するヌクレオチドを、修飾ヌクレオチドといい、糖部、塩基部又はリン酸部のいずれにも修飾を有さないヌクレオチドが、非修飾ヌクレオチドである。

修飾ヌクレオチドは、修飾糖部、修飾塩基部又は修飾リン酸部のうち、1つの修飾部を有していてもよく、任意の組み合わせの2種の修飾部を有していてもよく、3種の修飾部を有していてもよい。

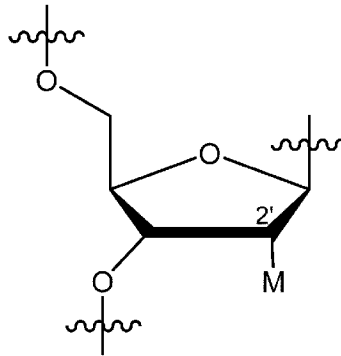
[0020] 非修飾糖部は、リボース又は2'-デオキシリボースに対応する糖部であり、リボースに対応する糖部であることがより好ましい。すなわち、本実施形態のポリヌクレオチドにおいて、糖修飾ヌクレオチド以外のヌクレオチドは、リボース又は2'-デオキシリボースに対応する糖部を含むことが好ましく、リボースに対応する糖部を含むことがより好ましい。

[0021] (糖修飾ヌクレオチド)

糖修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドの糖部が修飾されたものであれば特に限定されないが、少なくとも2'位が修飾された糖部を含むことが好ましい。2'位が修飾されることにより、酵素に対する安定性を向上させることができる。少なくとも2'位が修飾された糖部は、2'位と4'位とが架橋した糖部であってもよい。

[0022] 修飾糖部としては、例えば、以下のものが挙げられる。

[化25]



[式中、

Mは、 $R^1$ 、 $OR^1$ 、 $R^2OR^1$ 、 $OR^2OR^1$ 、SH、 $SR^1$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^1$ 、 $N$   
 $R^1_2$ 、

$N_3$ 、CN、F、Cl、Br又はIであり、

$R^1$ は、それぞれ独立して、アルキル又はアリールであり、好ましくは炭素数1～6のアルキルであり、より好ましくは炭素数1～3のアルキルであり、

$R^2$ は、アルキレンであり、好ましくは炭素数1～6のアルキレンである]

なお、Mが、Hであるか、OHである場合が、非修飾糖部であり、MがH

である非修飾糖部を有するヌクレオチドが、2'-デオキシリボヌクレオチドであり、MがOHである非修飾糖部を有するヌクレオチドが、リボヌクレオチドである。

[0023] 本明細書において、炭素数1～6のアルキルとしては、例えば、炭素数1～6の直鎖又は分岐鎖のアルキルが挙げられる。炭素数1～6の直鎖のアルキルとしては、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル及びヘキシルが挙げられる。炭素数1～6の分岐鎖のアルキルとしては、例えば、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、及びメチルで置換されたペンチルが挙げられる。

炭素数1～3のアルキルとしては、例えば、メチル、エチル、プロピル及びイソプロピルが挙げられる。

[0024] 本明細書において、アリールとしては、例えば、置換されていてもよいフェニル、及び置換されていてもよいナフチルが挙げられる。

[0025] 本明細書において、炭素数1～6のアルキレンは、炭素数1～6のアルキルの炭素原子に結合する水素原子を1つ除いた基である。

[0026] 本明細書において、修飾糖部とは糖修飾ヌクレオチドに含まれる修飾された糖構造を示す。修飾糖部のMとして、更に、2-(メトキシ)エトキシ、3-アミノプロポキシ、2-[(N,N-ジメチルアミノ)オキシ]エトキシ、3-(N,N-ジメチルアミノ)プロポキシ、2-[2-(N,N-ジメチルアミノ)エトキシ]エトキシ、2-(メチルアミノ)-2-オキソエトキシ、2-(N-メチルカルバモイル)エトキシ)、及び2-シアノエトキシを挙げることができる。

[0027] 修飾糖部として、更に、以下の核酸の糖部が挙げられる：

・ Locked Nucleic Acid (LNA) [Tetrahedron Letters, 38, 8735 (1997)及びTetrahedron, 54, 3607 (1998)]；

・ Ethylene bridged nucleic acid (ENA) [Nucleic Acids Research, 32, e175 (2004)]；

・ Constrained Ethyl (cEt) [The Journal of Organic Chemistry 75, 1569

(2010)];

・ Amido-Bridged Nucleic Acid (AmNA) [Chem Bio Chem 13, 2513 (2012)];

・ 2'-O,4'-c-Spirocyclopropylene bridged nucleic acid (scpBNA) [Chem. Commun., 51, 9737 (2015)];

・ tricycloDNA (tcDNA) [Nat. Biotechnol., 35, 238 (2017)];

・ Unlocked Nucleic Acid (UNA) [Mol. Ther. Nucleic Acids 2, e103 (2013)];

・ 3'-フルオロヘキシトール核酸 (FHNA) [Nat. Biotechnol., 35, 238 (2017)];

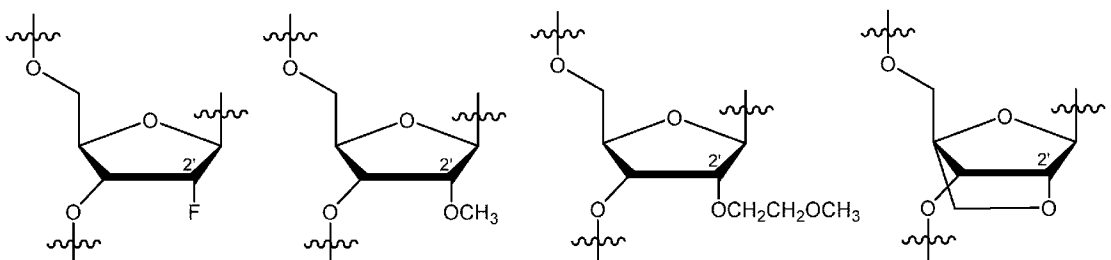
・ ペプチド核酸 (PNA) [Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)];

・ オキシペプチド核酸 (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)];

・ ペプチドリボ核酸 (PRNA) [J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)].

[0028] 修飾糖部は、特に限定するものではないが、以下から選択されることが好ましい。

[化26]



[0029] 糖修飾ヌクレオチドは、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) 及びウラシル (U) からなる群から選択される塩基に対応する塩基部を含むことが好ましく、前記塩基の種類は少なくとも2種類であることが好ましい。ここで、「塩基の種類は少なくとも2種類」とは、例えば、1個の糖修飾ヌクレオチドがアデニンに対応する塩基部を含み、別の糖修飾ヌクレオチドがグアニンに対応する塩基部を含むことを意味する。

[0030] 糖修飾ヌクレオチドは、塩基修飾ヌクレオチド及び／又はリン酸修飾ヌクレオチドであってもよい（言い換えると、糖修飾ヌクレオチドは修飾塩基部及び／又は修飾リン酸部を更に含んでもよい。）。糖修飾ヌクレオチド

の少なくとも1個が、修飾塩基部を含んでいてもよい。

[0031] (塩基修飾ヌクレオチド)

塩基修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドの塩基部が修飾されたものであれば特に限定されない。非修飾塩基部としては、例えば、アデニン、グアニン、シトシン及びウラシルに対応する塩基部が挙げられる。修飾塩基部としては、例えば、非修飾塩基部の酸素原子が硫黄原子で置換された塩基部、非修飾塩基部の水素原子が炭素数1～6のアルキル、ハロゲン等で置換された塩基部、非修飾塩基部のメチルが水素原子、ヒドロキシメチル、炭素数2～6のアルキル等で置換された塩基部、非修飾塩基部のアミノが炭素数1～6のアルキル、炭素数1～6のアルカノイル、オキソ、ヒドロキシ等で置換された塩基部が挙げられる。

[0032] 塩基修飾ヌクレオチドの有する修飾塩基部の具体例として、例えば、5-メチルシトシン (5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、2-プロピルアデニン、2-プロピルグアニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、5-シュードウラシル、4-チオウラシル、8-ハロアデニン、8-ハログアニン、8-アミノアデニン、8-アミノグアニン、8-メルカプトアデニン、8-メルカプトグアニン、8-アルキルチオアデニン、8-アルキルチオグアニン、8-ヒドロキシアデニン、8-ヒドロキシグアニン、5-ブロモウラシル、5-ブロモシトシン、5-トリフルオロメチルウラシル、5-トリフルオロメチルシトシン、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、8-アザグアニン、8-アザアデニン、7-デアザグアニン、3-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザアデニン、ピラゾロ [3, 4-d] ピリミジン、イミダゾ [1, 5-a] 1, 3, 5-トリアジノン、9-デアザプリン、イミダゾ [4, 5-d] ピラジン、チアゾロ [4, 5-d] ピリミジン、ピラジン-2-オン、1, 2, 4-トリアジン、ピリダジン

、及び1, 3, 5-トリアジンが挙げられる。

[0033] 塩基修飾ヌクレオチドは、糖修飾ヌクレオチド及び／又はリン酸修飾ヌクレオチドであってもよい（言い換えると、塩基修飾ヌクレオチドは修飾糖部及び／又は修飾リン酸部を更に含んでもよい。）。

[0034] (リン酸修飾ヌクレオチド)

リン酸修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドのリン酸部（リン酸ジエステル結合）が修飾されたものであれば特に限定されない。修飾リン酸部としては、例えば、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、及びホスホロアミデート結合が挙げられる。

[0035] 翻訳領域は修飾リン酸部が光学異性体 (Rp, Sp) であるリン酸修飾ヌクレオチドを含んでもよい。ホスホロチオエート結合の光学異性体を選択的に合成する方法は、例えば、J. Am. Chem. Soc., 124, 4962 (2002)、Nucleic Acids Research, 42, 13546 (2014)、及びScience 361, 1234 (2018) に開示されている。

[0036] リン酸修飾ヌクレオチドは、糖修飾ヌクレオチド及び／又は塩基修飾ヌクレオチドであってもよい（言い換えると、リン酸修飾ヌクレオチドは修飾糖部及び／又は修飾塩基部を更に含んでもよい。）。

[0037] <翻訳領域>

本実施形態のポリヌクレオチドは、翻訳領域を含む。翻訳領域はコード配列 (CDS) とも称される。翻訳領域は、開始コドンから終止コドン（又は終結コドンという）までの複数のコドンで構成され、かつ翻訳されてポリペプチドが合成される領域である。コドンは、ポリペプチドを構成する各アミノ酸をコードする単位であり、前記単位は3個のヌクレオチドから構成される。

本実施形態のポリヌクレオチドは、一つのポリヌクレオチドが複数の翻訳領域を含んでもよく、複数の翻訳領域を含むポリヌクレオチドにおいては、一つの翻訳領域を含むポリヌクレオチドにおける翻訳領域部分が、複数の翻訳領域を含んでもよい。

[0038] 天然のコドン表に限定されるものではないが、天然のコドン表に基づくと、開始コドンとしては、例えば、メチオニンをコードするAUGが挙げられる。AUG以外の非正規の開始コドンとして、CUG、GUG、UUG、ACG、AUC、AUU、AAG、AUA、AGGを挙げることができる。終止コドンとしては、例えば、UAA、UAG及びUGAが挙げられる。翻訳領域を構成するコドンの種類は特に限定されず、目的とするポリペプチドに応じて適宜選択することができる。

[0039] 翻訳領域を構成するコドンの数 ( $n$ ) は、好ましくは2~2000の整数であり、より好ましくは2~1500の整数であり、更に好ましくは2~1000の整数であり、最も好ましくは2~500の整数である。また、前記数値範囲の下限を、5、10、50、100、200等に変更してもよい。下限が変更された場合の翻訳領域を構成するコドンの数 ( $n$ ) は、好ましくは5~2000、10~2000、50~2000、100~2000又は200~2000の整数であり、より好ましくは5~1500、10~1500、50~1500、100~1500又は200~1500の整数であり、更に好ましくは5~1000、10~1000、50~1000、100~1000又は200~1000の整数であり、最も好ましくは5~500、10~500、50~500、100~500又は200~500の整数である。

翻訳領域を構成するヌクレオチドの数は、コドンの数 ( $n$ ) の3倍の数となる。

[0040] 各コドンは、1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドを含む。例えば、開始コドン (AUG) の場合、1番目のヌクレオチドはAであり、2番目のヌクレオチドはUであり、3番目のヌクレオチドはGである。

[0041] 翻訳領域は、 $n$ 個のコドンを含み、前記 $n$ が2以上の正の整数であり、前記 $n$ 個のコドンが、それぞれ、1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドを含むとした場合、前記 $n$ 個のコドンのうちの少なくとも2個のコドンにおける1番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであることが好ましい。

言い換えると、翻訳領域が、コドンのうち1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであるコドンを少なくとも2個含むことが好ましく、コドンにおける1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである少なくとも2個のコドンは、翻訳領域の任意の位置のコドンであってよい。

[0042] 翻訳領域を構成する複数のコドンにおける1番目のヌクレオチドの糖部を修飾しても翻訳活性が維持されるため、本実施形態のポリヌクレオチドは、翻訳領域に修飾部位を有しながらも翻訳活性を維持している。本明細書において「翻訳活性」とは、mRNAが翻訳されてポリペプチドが合成される活性を意味する。また、本実施形態のポリヌクレオチドは、酵素（例えば核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)）に対する優れた安定性も有する。

本実施形態のポリヌクレオチドは、翻訳領域が翻訳活性を維持している限り、ポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾ヌクレオチドであることで、優れた翻訳能を示すこととなる。

[0043] 本明細書で、「翻訳活性が維持される」とは、複数のコドンにおける1番目のヌクレオチドの糖部を修飾したポリヌクレオチドが修飾していないポリヌクレオチドと比較して、60%以上の翻訳活性があることを指す。修飾ポリヌクレオチドの翻訳活性が、未修飾ポリヌクレオチドと比較して、70%以上、80%以上、90%以上又は100%以上であることが好ましい。

[0044] 本実施形態のポリヌクレオチドでは、翻訳領域を構成するコドンに含まれる1番目のヌクレオチドの少なくとも2個が、糖修飾ヌクレオチドであってよい。糖修飾ヌクレオチドを含むコドンの位置は特に限定されない。1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである割合は、5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上又は100%であることが好ましい。前記割合が100%とは、1番目のヌクレオチドの全てが糖修飾ヌクレオチドであることを意味する。前記割合が大きいほど、酵素に対する安定性に優れる傾向にある。1番目のヌクレオチ

ドの全てが糖修飾ヌクレオチドである翻訳領域であってよい。特に限定するものではないが、1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである場合、1番目のヌクレオチドの糖部の2'位の置換基はフッ素であることが好ましい。

[0045] 本実施形態のポリヌクレオチドでは、翻訳領域を構成するコドンに含まれる2番目のヌクレオチドの少なくとも1個が、糖修飾ヌクレオチドであってもよいが、2番目のヌクレオチドの糖部が修飾されていなくてもよい。2番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである割合は、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、又は0%であってもよい。前記割合が0%とは、2番目のヌクレオチドの全てが糖修飾ヌクレオチドでないことを意味する。特に限定するものではないが、2番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである場合、2番目のヌクレオチドの糖部の2'位の置換基はフッ素であることが好ましい。

[0046] 本実施形態のポリヌクレオチドでは、翻訳領域を構成するコドンに含まれる3番目のヌクレオチドの少なくとも1個が、糖修飾ヌクレオチドであってもよい。3番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである割合は、100%、90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、又は0%であってもよい。

[0047] 本実施形態のポリヌクレオチドでは、翻訳活性を向上させる観点から、終止コドンの1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであってもよい。1番目のヌクレオチドの全て、及び終止コドンのヌクレオチドの全てが糖修飾ヌクレオチドである翻訳領域であってよい。

[0048] 本実施形態のポリヌクレオチドでは、核酸分解酵素に対する安定性を向上する観点から、開始コドンの1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであってもよい。特に限定するものではないが、開始コドンの1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドの糖部の2'位の置換基がい

ずれもフッ素であることが好ましい。

[0049] 本実施形態のポリヌクレオチドでは、終始コドンを除いた残りのコドン全てにおける1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであってもよい。特に限定するものではないが、終始コドンを除いた全てのコドンの1番目のヌクレオチドの糖部の2'位の置換基がいずれもフッ素であることが好ましい。

[0050] 翻訳領域は塩基修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。翻訳領域において塩基修飾ヌクレオチドが存在する位置は、特に限定されない。

翻訳領域はリン酸修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。翻訳領域においてリン酸修飾ヌクレオチドが存在する位置は、特に限定されないが、コドンの1番目のヌクレオチドと2番目のヌクレオチドを連結するリン酸基がホスホロチオエート結合であることが好ましい。

[0051] <5'側非翻訳領域>

本実施形態のポリヌクレオチドは、5'側非翻訳領域(5'UTR)を含む。5'側非翻訳領域は、翻訳領域の上流(5'末端側)に存在し、ポリペプチド合成のための翻訳が行われない領域である。5'側非翻訳領域を構成するヌクレオチドの数は、好ましくは、1以上であり、6以上であってよい。また、5'側非翻訳領域を構成するヌクレオチドの数は、好ましくは、1000以下であり、500以下、250以下、100以下であってよい。

5'側非翻訳領域を構成するヌクレオチドの数は、上記上限と下限とから選択される任意の範囲の数であってよいが、好ましくは1~1000の整数であり、より好ましくは1~500の整数であり、更に好ましくは6~250の整数であり、特に好ましくは6~100の整数である。

本実施形態のポリヌクレオチドは、5'側非翻訳領域、翻訳領域の順で連結される。

[0052] 5'側非翻訳領域は、2'-デオキシリボヌクレオチド、スパーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

これらのヌクレオチドの位置は5'側非翻訳領域内で特に限定されない。

翻訳活性を向上させる観点から、5'末端から1番目、2番目及び3番目の

ヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであってもよく、5'末端から1番目～6番目のヌクレオチドが全て糖修飾ヌクレオチドであることが好ましい。

また、5'側非翻訳領域の全てのヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであってもよい。糖修飾ヌクレオチドにおいて、糖部の2'位の置換基はメトキシエトキシ基 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ) 又はフッ素 (F) であることが好ましい。

[0053] 本発明の一実施形態は、ポリヌクレオチドが、  
開始コドンから終止コドンまでの翻訳領域、  
5'側非翻訳領域、及び  
ポリA鎖

を含み、前記5'側非翻訳領域のヌクレオチドが、それぞれ独立して、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドから選択される、ポリヌクレオチドである。

本発明においては、ポリヌクレオチドにおいて、5'側非翻訳領域のヌクレオチドが、それぞれ独立して、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドから選択されることで、優れた翻訳能を示す。

[0054] 5'側非翻訳領域のヌクレオチドが2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドで構成される場合、糖修飾ヌクレオチドが含まれることが好ましい。

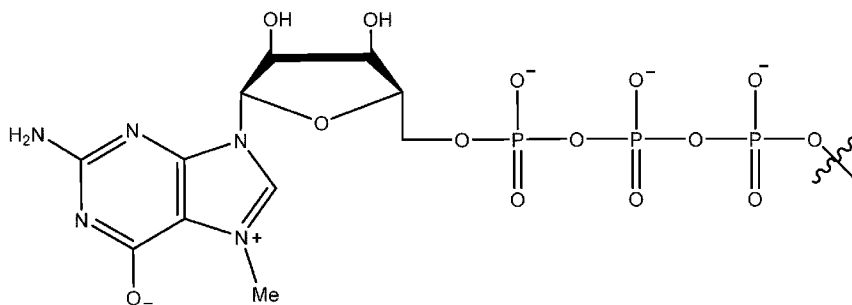
[0055] 本実施形態のポリヌクレオチドには、本来の5'側末端に1～10塩基長の適当な非糖修飾ヌクレオチドを付加したものも含まれる。

[0056] (5'キャップ構造)

本実施形態のポリヌクレオチドは、本来の5'側末端に5'キャップ構造を更に含んでもよい。5'キャップ構造は5'側非翻訳領域に付加される形で存在していてもよい。5'キャップ構造を含むことによって、翻訳活性が向上する傾向にある。

[0057] 本願における5'キャップ構造は7-メチルグアニル酸(m7G)にトリリン構造が付与された、以下の構造を指す。

[化27]



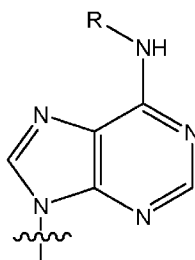
[0058] 5' キャップ構造には、上記 7-メチルグアニル酸(m7G)キャップの他に、以下の論文に開示されるような 5' キャップアナログも用いることができる。

- ・ A R C A : アールエヌエー(RNA)、第7巻、1486-1495頁(2001)、セル・サイクル (Cell Cycle)、第17巻、第13号、1624-1636頁 (2018) ;
- ・ L N A : ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ (Journal of American Chemical Society)、第131巻、第18号、6364-6365頁(2009) ;
- ・ S 化 C a p : アールエヌエー(RNA)、第14巻、1119-1131頁 (2008) ;
- ・ ネイチャー・レビューズ・ドラッグディスカバリー (Nature Reviews Drug Discovery) 、第13巻、759-780頁 (2014) 。

[0059] 5' 側非翻訳領域は、塩基修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。5' 側非翻訳領域において塩基修飾ヌクレオチドが存在する位置は、特に限定されない。塩基修飾ヌクレオチドは、糖修飾ヌクレオチド及び／又はリン酸修飾ヌクレオチドであってもよい（言い換えると、塩基修飾ヌクレオチドは修飾糖部及び／又は修飾リン酸部を更に含んでいてもよい。）。

[0060] 特に限定するものでないが、翻訳活性を向上させる観点から、5' 側非翻訳領域は、以下の修飾塩基部を含むことが好ましい。

[化28]



[式中、Rは炭素数1～6のアルキル基である]

修飾塩基部のアルキル基Rは、メチル又はエチルであることが好ましい。

[0061] 5'側非翻訳領域は、リン酸修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。5'側非翻訳領域においてリン酸修飾ヌクレオチドが存在する位置は、特に限定されない。リン酸修飾ヌクレオチドは、糖修飾ヌクレオチド及び／又は塩基修飾ヌクレオチドであってもよい（言い換えると、リン酸修飾ヌクレオチドは修飾糖部及び／又は修飾塩基部を更に含んでいてもよい。）。

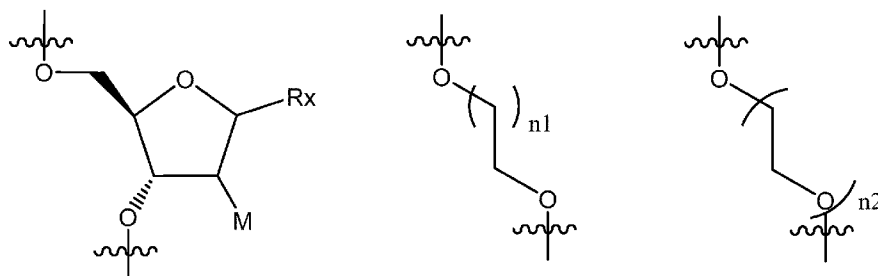
[0062] 5'側非翻訳領域は、2'-デオキシリボヌクレオチド又はスペーサー修飾を含んでいてもよい。5'側非翻訳領域において2'-デオキシリボヌクレオチド又はスペーサー修飾が存在する位置は特に限定されないが、5'末端から1番目～6番目を除く任意の位置のヌクレオチドが2'-デオキシリボヌクレオチド又はスペーサー修飾を含むことが好ましい。

本実施形態において、スペーサー修飾は翻訳領域には含まないことが好ましい実施態様である。

[0063] (スペーサー修飾)

5'側非翻訳領域に含まれるスペーサー修飾は、塩基部を含まない、ヌクレオチドの代替として用いられる構造であれば特に限定されないが、例えば以下の構造が挙げられる。

[化29]



[式中、

R<sub>x</sub>は、炭素数1～6のアルキル、炭素数1～6のアルケニル、炭素数1～6のアルキニル、水素原子又はOHであり、

Mは、R<sup>1</sup>、OR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>OR<sup>1</sup>、OR<sup>2</sup>OR<sup>1</sup>、SH、SR<sup>1</sup>、NH<sub>2</sub>、NHR<sup>1</sup>、NR<sup>1</sup><sub>2</sub>、

N<sub>3</sub>、水素原子、OH、CN、F、Cl、Br又はIであり、

Xは、O、S又はNR<sup>1</sup>であり、

R<sup>1</sup>は、それぞれ独立して、アルキル又はアリールであり、好ましくは炭素数1～6のアルキルであり、より好ましくは炭素数1～3のアルキルであり

、

R<sup>2</sup>は、アルキレンであり、好ましくは炭素数1～6のアルキレンであり、

n<sub>1</sub>及びn<sub>2</sub>は、それぞれ1から10の整数である]

なお、スペーサー修飾として、一番左の構造中、5員環の酸素原子が、NHで置換されていてもよい。

[0064] スペーサー修飾として用いられる構造については、以下の論文に開示がある。

・ M. Takeshita, C.N. Chang, F. Johnson, S. Will, and A.P. Grollman, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 10171-10179.

・ M.W. Kalnik, C.N. Chang, A.P. Grollman, and D.J. Patel, *Biochemistry*, 1988, 27, 924-931.

・ I.G. Shishkina and F. Johnson, *Chem Res Toxicol*, 2000, 13, 907-912.

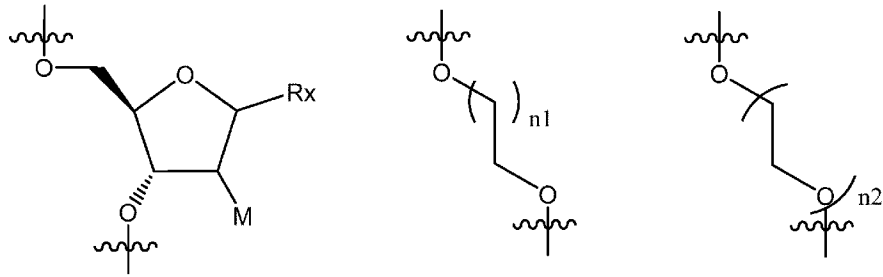
・ K. Groebke, and C.J. Leumann, *Helv Chim Acta*, 1990, 73, 608-617.

・ T. Kuboyama, M. Nakahara, M. Yoshino, Y. Cui, T. Sako, Y. Wada, T. Imanishi, S. Obika, Y. Watanabe, M. Suzuki, H. Doi, *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 249-255.

・ M. Salunkhe, T.F. Wu, and R.L. Letsinger, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1992, 114, 8768-8772.

[0065] スペーサー修飾は特に限定されるものではないが、以下の構造が好ましい。

[化30]



[式中、

Rxはエチニル、水素原子又はOHであり、

Mは、水素原子又はOHであり、

n1は1、2又は5であり、

n2は1、2又は3である。]

[0066] &lt;ポリA鎖&gt;

本実施形態のポリヌクレオチドは、ポリA鎖を含む。

本実施形態の一の態様におけるポリA鎖は、構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾ヌクレオチドである。ポリA鎖は、3'側非翻訳領域に含まれる。

本実施形態におけるポリA鎖は、3'側非翻訳領域に少なくとも1つ以上含まれる。

ポリA鎖は、2以上のAMPから構成されるポリアデニル酸である。

本願におけるAMPはAMPに相当するヌクレオチド（例えば、AMPの糖修飾ヌクレオチド、AMPの2'-デオキシリボヌクレオチド、AMPのリン酸修飾ヌクレオチド及びAMPの塩基修飾ヌクレオチドを含む）を含む。以後、本願においては、AMPまたはAMPに相当するヌクレオチドをまとめてAMPと記載する。

ポリA鎖は、2以上のAMPを含むポリアデニル酸構造を有していれば、AMP以外のリボヌクレオチド（例えば、CMP、GMP、UMPまたはそれぞれに相当するヌクレオチド）を含んでいてもよい。ポリA鎖が、AMP以外のリボヌクレオチドを含む場合、ポリA鎖の5'末端のヌクレオチドは、

2以上のAMPが連続する配列の始点となるAMPと理解される。

ポリA鎖が、AMP以外のリボヌクレオチドを含む場合、ポリA鎖を構成するヌクレオチドの内、AMP以外のリボヌクレオチドの割合は40%以下、30%以下、20%以下または10%以下であり、30%以下が好ましく、20%以下がより好ましく、10%以下がさらに好ましい。

本実施形態のポリヌクレオチドは、ポリA鎖のヌクレオチドのうち、65%以上のヌクレオチドが、リボヌクレオチドでもなく、2'-デオキシリボヌクレオチドでもない。

[0067] ポリA鎖が、AMP以外のリボヌクレオチドを含む事例としては、例えばネイチャー・メディシン(Nature Medicine)、第23巻、第7号、815-817頁(2017)、サイエンス(Science)、第361巻、701-704頁(2018)、アールエヌエー(RNA)、第25巻、507-518頁(2019)に開示がある。

[0068] 本明細書では、ポリA鎖としては、2か所以上に存在する2以上のAMPが連続する領域を任意のリンカーで連結した配列もポリA鎖を意味する。リンカーとしては例えば、ポリエチレングリコール、ポリペプチド、アルキル鎖などが挙げられるが、特に限定されるものではない。例えば、国際公開第2016/011306号には、特定のリンカーでヌクレオチド間を連結する方法について開示がある。

[0069] 本実施形態の一の態様におけるポリA鎖は、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

これらのヌクレオチドの位置は3'側非翻訳領域内で特に限定されない。

本態様のポリA鎖は、AMPを含まない場合もあり得るが、上記態様として記載するポリA鎖に関する記載も適用可能である。

ポリA鎖は、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドを65%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、100%含んでいてもよく、ポリA鎖は、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドから構成されることが好ましい。

ポリA鎖のヌクレオチドが2'-デオキシリボヌクレオチド、スパーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドで構成される場合、糖修飾ヌクレオチドが含まれることが好ましい。ポリA鎖が、2'-デオキシリボヌクレオチド、スパーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドで構成される場合、糖修飾ヌクレオチドは、ポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上であり得る。

[0070] (3'側非翻訳領域)

3'側非翻訳領域(3'UTR)は、翻訳領域の下流(3'末端側)に存在し、ポリペプチド合成のための翻訳が行われない領域である。3'側非翻訳領域を構成するヌクレオチドの数は、好ましくは2~6000の整数であり、より好ましくは2~3000の整数であり、更に好ましくは2~1000の整数であり、特に好ましくは2~500の整数である。

3'側非翻訳領域におけるポリA鎖以外の領域は、任意のヌクレオチドであってよく、3'側非翻訳領域のポリA鎖以外の領域の各ヌクレオチドは、非修飾ヌクレオチドであってもよく、修飾ヌクレオチドであってもよい。

本実施形態のポリヌクレオチドは、翻訳領域、3'側非翻訳領域の順で連結される。

[0071] ポリA鎖の長さは、好ましくは2~500塩基長であり、より好ましくは2~200塩基長であり、更に好ましくは2~80塩基長であり、更に好ましくは2~40塩基長であり、更に好ましくは3~40塩基長であり、更に好ましくは5~40塩基長であり、更に好ましくは10~40塩基長であり、特に好ましくは20~40塩基長である。

[0072] ポリA鎖は、構成するヌクレオチドの65%以上のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドである。糖修飾ヌクレオチドの位置はポリA鎖内で特に限定されない。

ポリA鎖内で、糖修飾ヌクレオチドである割合は、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上又は100%であることが好ましい。前記割合が100%とは、ポリA鎖のヌクレオチドの全てが糖修飾ヌクレオチドであることを意味する。

[0073] ポリA鎖が、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドで構成される場合、糖修飾ヌクレオチドが含まれていることが好ましい。

[0074] ポリA鎖が、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾及び糖修飾ヌクレオチドで構成される場合、ポリA鎖を構成するヌクレオチドの内、糖修飾ヌクレオチドは50%以上、2'-デオキシリボヌクレオチドは30%以下、スペーサー修飾は20%以下であることが好ましい。

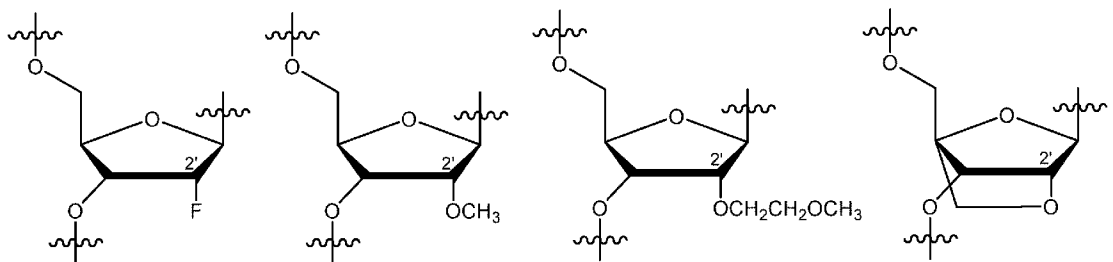
[0075] ポリA鎖が、2'-デオキシリボヌクレオチド及び糖修飾ヌクレオチドで構成される場合、ポリA鎖を構成するヌクレオチドの内、糖修飾ヌクレオチドは50%以上、2'-デオキシリボヌクレオチドは50%以下であることが好ましい。

[0076] ポリA鎖が、スペーサー修飾及び糖修飾ヌクレオチドで構成される場合、ポリA鎖を構成するヌクレオチドの内、糖修飾ヌクレオチドは80%以上、スペーサー修飾は20%以下であることが好ましい。

[0077] 翻訳活性を向上させる観点から、3'側非翻訳領域の3'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであってもよい。特に限定するものではないが、3'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドの糖部の2'位の置換基はメトキシエトキシ基 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ) であることが好ましい。

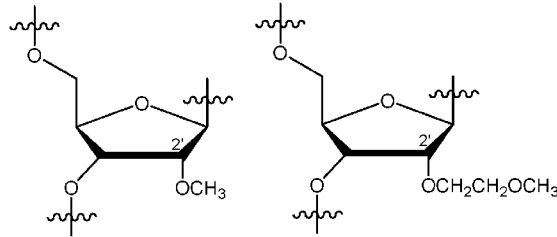
[0078] 糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部の具体例としては、例えば、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択されることが好ましく、

[化31]



それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択されることが好ましい。

[化32]



[0079] ポリA鎖は、塩基修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。ポリA鎖において塩基修飾ヌクレオチドが存在する位置は、特に限定されない。塩基修飾ヌクレオチドは、糖修飾ヌクレオチド及び／又はリン酸修飾ヌクレオチドであってもよい（言い換えると、塩基修飾ヌクレオチドは修飾糖部及び／又は修飾リン酸部を更に含んでいてもよい。）。

[0080] 3'側非翻訳領域は、好ましくは、ポリA鎖以外の3'側非翻訳領域において、2'-デオキシリボヌクレオチド又はスペーサー修飾を含んでいてもよい。スペーサー修飾の具体構造としては、例えば、上記（5'側非翻訳領域）の（スペーサー修飾）の項目において記載したものが挙げられる。

本実施形態のポリヌクレオチドには、本来の3'側末端に1～10塩基長の適当な非糖修飾ヌクレオチドを付加したものも含まれる。

[0081] ポリA鎖は、リン酸修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。ポリA鎖においてリン酸修飾ヌクレオチドが存在する位置は、特に限定されない。リン酸修飾ヌクレオチドは、糖修飾ヌクレオチド及び／又は塩基修飾ヌクレオチドであってもよい（言い換えると、リン酸修飾ヌクレオチドは修飾糖部及び／又は修飾塩基部を含んでいてもよい。）。

[0082] ポリA鎖に含まれる修飾リン酸部はホスホロチオエートが好ましい。ポリA鎖においてホスホロチオエートで連結されるヌクレオチドが存在する位置は、3'側末端側から連続していることが望ましい。

[0083] ポリA鎖中のリン酸結合の内、ホスホロチオエートで連結されるヌクレオチドの割合は10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は100%以上であり、50%以上であることが好ましく、80%以上がより好ましく、10

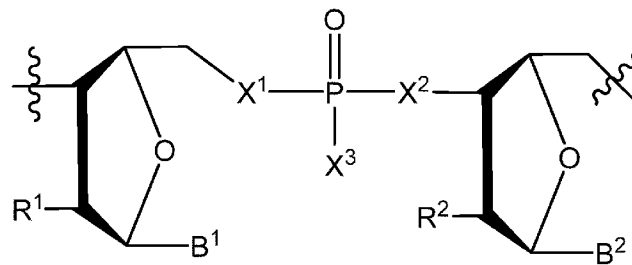
0%であることが特に好ましい。前記割合が100%とは、ポリA鎖のヌクレオチドの全てがホスホロチオエートで連結していることを意味する。

[0084] リン酸修飾ヌクレオチドは、核酸分解酵素の1つであるエンドヌクレアーゼに対する安定性を付与することができるため、本発明のポリヌクレオチドの5'末端及び／又は3'末端から2連続以上含まれることが好ましい。

[0085] (連結部)

本実施形態のポリヌクレオチドは、以下の連結部を含んでいてもよい。

[化33]



[式中、

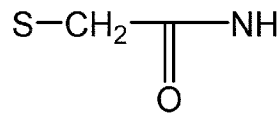
R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、H、OH、F、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>又はOCH<sub>3</sub>であり、

B<sup>1</sup>及びB<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、塩基部であり、

X<sup>1</sup>は、O、S又はNHであり、

X<sup>2</sup>は、O、S、NH又は以下の構造であり、

[化34]



X<sup>3</sup>は、OH、SH又はそれらの塩であり（X<sup>3</sup>のOH及びSHは、それぞれ、O<sup>-</sup>及びS<sup>-</sup>と表記されてもよい）、

ただし、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、同時にOではない。]

塩基部は、非修飾塩基部であっても、修飾塩基部であってもよい。

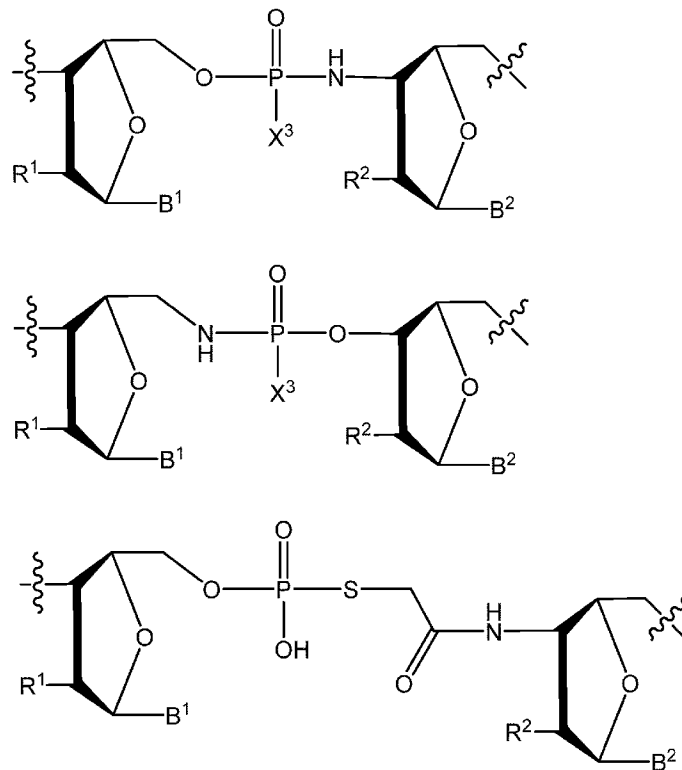
[0086] 前記連結部における左側及び右側のヌクレオチドは、本実施形態のポリヌクレオチドを構成する2個のヌクレオチドである。前記連結部を含んでいても、翻訳活性を維持することができる。前記連結部における右側（5'末端側

) のヌクレオチドA及び左側（3'末端側）のヌクレオチドB、並びに前記ヌクレオチドBに隣接する3'末端側のヌクレオチドC、及び前記ヌクレオチドCに隣接する3'末端側のヌクレオチドDは、修飾されていなくてもよい。

[0087] 前記連結部のX<sup>3</sup>のOH及びSHの塩としては、例えば、製薬学的に許容可能な塩が挙げられる。製薬学的に許容可能な塩としては、例えば、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、有機アミン塩、及びアミノ酸塩が挙げられる。アルカリ金属塩としては、例えば、ナトリウム塩、リチウム塩、及びカリウム塩が挙げられる。アルカリ土類金属塩としては、例えば、カルシウム塩、及びマグネシウム塩が挙げられる。

[0088] 前記連結部の具体例としては、例えば、以下のものが挙げられる。

[化35]



[式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、B<sup>1</sup>、B<sup>2</sup>、及びX<sup>3</sup>は前記のとおりである]

[0089] 前記連結部が存在する位置は特に限定されない。連結部は、翻訳領域、5'側非翻訳領域、及び3'側非翻訳領域（ポリA鎖を含む）のいずれに存在していてもよいが、連結部が存在する場合には、連結部は少なくとも翻訳領域に存在していることが好ましい。

- [0090] 前記連結部の数は特に限定されず、ポリヌクレオチドの長さに応じて、適宜選択することができる。連結部の数としては、例えば、1～200個、1～100個、1～50個、1～20個、1～10個、1～8個、1～6個、1～4個、1～3個、又は1若しくは2個が挙げられる。
- [0091] 本実施形態のポリヌクレオチドでは、翻訳領域を構成する複数のコドンのうちの少なくとも1個のコドンにおける1番目のヌクレオチドと2番目のヌクレオチドとが、ホスホロチオエートによって連結されていてもよい。ホスホロチオエート結合の数は特に限定されず、ポリヌクレオチドの長さに応じて、適宜選択することができる。ホスホロチオエート結合の数としては、例えば、1～200個、1～100個、1～50個、1～20個、1～10個、1～8個、1～6個、1～4個、1～3個、又は1若しくは2個が挙げられる。
- [0092] 翻訳活性を向上させる観点から、5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～2番目のヌクレオチド、1番目～3番目のヌクレオチド、1番目～4番目のヌクレオチド、又は1番目～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されていてもよい。なお、5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～2番目のヌクレオチドがホスホロチオエートによって連結されているとは、5'側非翻訳領域の5'末端から1番目のヌクレオチドと2番目のヌクレオチドとが、ホスホロチオエートによって連結されていることと同義であり、例えば1番目～3番目のヌクレオチドがホスホロチオエートによって連結されているとは、1番目のヌクレオチドと2番目のヌクレオチドとがホスホロチオエートによって連結され、かつ、2番目のヌクレオチドと3番目のヌクレオチドとがホスホロチオエートによって連結されていることを意味する。1番目～3番目のヌクレオチドがホスホロチオエートによって連結されている場合、1番目のヌクレオチドの5'側及び3番目のヌクレオチドの3'側の構造は、任意であってよい。
- [0093] 翻訳活性を向上させる観点から、3'側非翻訳領域の3'末端から1～2番目のヌクレオチド、1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド

、又は1～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されていてもよい。

翻訳活性を向上させる観点から、ポリA鎖の3'末端から1～2番目のヌクレオチド、1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド、又は1～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されていてもよい。また、ポリA鎖の全てのヌクレオチドがホスホロチオエートによって連結されていてもよい。

[0094] 本発明の別の実施形態は、5'側非翻訳領域の5'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドである、ポリヌクレオチドに関する。

[0095] 本発明の別の実施形態は、ポリA鎖の3'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドである、ポリヌクレオチドに関する。

[0096] 本発明の別の実施形態は、5'側非翻訳領域の5'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであり、

ポリA鎖の3'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドである、ポリヌクレオチドに関する。

[0097] 本発明の別の実施形態は、5'側非翻訳領域の5'末端から1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド、又は1～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、ポリヌクレオチドに関する。

[0098] 本発明の別の実施形態は、ポリA鎖の3'末端から1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド、又は1～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、ポリヌクレオチドに関する。

[0099] 本発明の別の実施形態は、5'側非翻訳領域の5'末端から1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド、又は1～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されており、ポリA鎖の3'末端から1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド、又は1～5番目のヌク

レオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、ポリヌクレオチドに関する。

[0100] 本発明の別の実施形態は、5'側非翻訳領域の5'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであり、5'側非翻訳領域の5'末端から1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド、又は1～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、ポリヌクレオチドに関する。

[0101] 本発明の別の実施形態は、ポリA鎖の3'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであり、ポリA鎖の3'末端から1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド、又は1～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、ポリヌクレオチドに関する。

[0102] 本発明の別の実施形態は、5'側非翻訳領域の5'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであり、5'側非翻訳領域の5'末端から1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド、又は1～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されており、

ポリA鎖の3'末端から1番目、2番目及び3番目のヌクレオチドが、糖修飾ヌクレオチドであり、ポリA鎖の3'末端から1～3番目のヌクレオチド、1～4番目のヌクレオチド、又は1～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、ポリヌクレオチドに関する。

[0103] 本発明において、5'側非翻訳領域、翻訳領域及びポリA鎖として記載する各説明において、例示の態様と好適な態様とが記載されているが、各態様の任意の組み合わせで5'側非翻訳領域、翻訳領域及びポリA鎖が存在してもよく、5'側非翻訳領域、翻訳領域及びポリA鎖のいずれか一つ又は二つにおいて好適な態様の任意の組み合わせであってもよい。また、5'側非翻訳領域、翻訳領域及びポリA鎖として記載する以外の領域も適宜、例示の態様及び好適な態様から組み合わせてもよい。

すなわち、本明細書において、5'側非翻訳領域、翻訳領域及びポリA鎖として記載する各説明における、例示の態様と好適な態様とのあらゆる組み合わせが本明細書における態様として記載され、例示される。

[0104] (その他配列)

本実施形態のポリヌクレオチドは、Kozak配列及び／又はRibosome Binding sequence (RBS)を更に含んでいてもよい。

[0105] <ポリヌクレオチドの製造方法>

本実施形態のポリヌクレオチドは、例えば、化学合成によって製造することができる。具体的には、公知の化学合成法を用いて、ポリヌクレオチド鎖を伸長させながら、所定の位置で所定の糖修飾ヌクレオチドを導入することによって、本実施形態のポリヌクレオチドを製造することができる。公知の化学合成法としては、例えば、ホスホロアミダイト法、ホスホロチオエート法、ホスホトリエステル法、及びCEM法 (Nucleic Acids Research, 35, 3287 (2007)を参照)が挙げられる。また、ABI3900ハイスループット核酸合成機 (アプライドバイオシステムズ社製)を利用することもできる。

[0106] 公知の化学合成法として、より具体的には、以下の文献等に記載の方法が挙げられる：

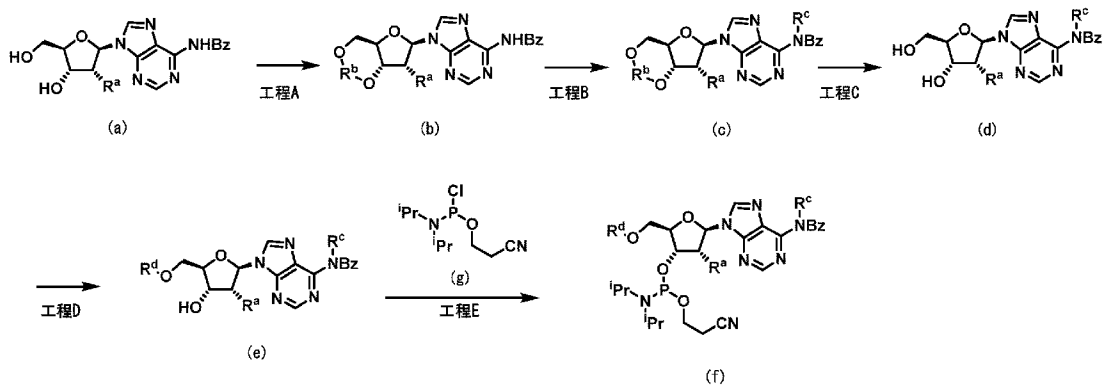
- ・テトラヘドロン(Tetrahedron)、第48巻、第12号、2223-2311頁(1992年)；
- ・カレント・プロトコールズ・イン・ヌクレイック・アシッズ・ケミストリー(Current Protocols in Nucleic Acids Chemistry)、John Wiley & Sons(2000年)；
- ・プロトコールズ・フォー・オリゴヌクレオチズ・アンド・アナログズ(Protocols for Oligonucleotides and Analogs)、Human Press(1993年)；
- ・ケミストリー・アンド・バイオロジー・オブ・アーティフィシャル・ヌクレイック・アシッズ(Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids)、Wiley-VCH(2012年)；
- ・ゲノムケミストリー 人工核酸を活用する科学的アプローチ、講談社(2003年)；

・核酸化学のニュートレンド、化学同人(2011年)。

[0107] 市販されていないホスホロアミダイトを化学合成し、それを原材料に用いて本実施形態のポリヌクレオチドを製造することができる。

塩基修飾ヌクレオチドの原材料となるホスホロアミダイト(f)の合成方法について以下に示す。

[化36]



[合成スキーム中、R<sup>a</sup>は、水素原子、F、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>又はOCH<sub>3</sub>であり、R<sup>b</sup>は、例えばジ-tert-ブチルシリル等のフッ化物イオンで除去できる保護基であり、R<sup>c</sup>は炭素数1～6のアルキルであり、R<sup>d</sup>は核酸固相合成において用いられる保護基であり、例えば、p, p'-ジメトキシトリチル基である。]

[0108] (工程A)

化合物(b)は、溶媒中、塩基存在下、化合物(a)と、例えば相当するシリル化剤を、0℃と80℃の間の温度で、10分から3日間反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えばDMF、DMA、NMP等が挙げられ、これらは単独で又は混合して用いられる。

塩基としては、例えばイミダゾール、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン等が挙げられる。

シリル化剤としては、例えば、ビス(トリフルオロメタンスルホン酸)ジ-tert-ブチルシリル等が挙げられる。

[0109] (工程B)

化合物(c)は、溶媒中、塩基存在下、化合物(b)と、相当するアルキル化剤を、0 °Cと150 °Cの間の温度で、10分間から3日間反応させることにより製造することができる。適当な添加剤により、反応を促進させることもできる。

溶媒としては、例えばDMF、ピリジン、ジクロロメタン、THF、酢酸エチル、1,4-ジオキサン、NMP等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いられる。

塩基としては、例えば、水酸化ナトリウム水溶液、炭酸カリウム、ピリジン、トリエチルアミン、N-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン等が挙げられる。

アルキル化剤としては、例えば、ヨウ化メチル、ヨウ化エチル、臭化メチル等が挙げられる。

添加化剤としては、例えば、テトラブチルアンモニウムブロミドが挙げられる。

#### [0110] (工程C)

化合物(d)は、溶媒中、化合物(c)とフッ素試薬を-80 °Cと200 °Cの間の温度で、10秒間から72時間反応させることにより製造することができる。このとき、塩基を加えることもできる。

フッ素試薬としては、例えばフッ化水素、フッ化水素酸トリエチルアミン塩、フッ化テトラブチルアンモニウム(TBAF)等が挙げられる。

塩基としては、例えば、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン等が挙げられる。

溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、NMP、ジメチルスルホキシド(DMSO)等が挙げられる。

#### [0111] (工程D)

化合物(e)は、溶媒中、塩基存在下、化合物(d)と、相当するアルキル化剤を、0 °Cと150 °Cの間の温度で、10分間から3日間反応させることにより製造することができる。適当な活性化剤により、反応を促進させることもできる

。

溶媒としては、例えばDMF、ピリジン、ジクロロメタン、THF、酢酸エチル、1,4-ジオキサン、NMP等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いられる。

塩基としては、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン、2,6-ルチジン等が挙げられる。

アルキル化剤としては、例えば、トリチルクロリド、p,p'-ジメトキシトリチルクロリド等が挙げられる。

活性化剤としては、例えば、4-ジメチルアミノピリジン等が挙げられる。

[0112] (工程E)

化合物(f)は、溶媒中、化合物(e)と化合物(g)を、塩基存在下、0 °Cと100 °Cの間の温度で、10秒間から24時間反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えばジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、NMP等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いられる。

塩基としては、例えば、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いられる。

[0113] 5' キャップ構造は、公知の方法（例えば、酵素法及び化学合成法）を用いて導入することができる。公知の方法としては、例えば、Top. Curr. Chem. (Z) (2017) 375:16、及びBeilstein J. Org. Chem. 2017, 13, 2819-2832に記載の方法を挙げることができる。

[0114] 本実施形態のポリヌクレオチドの塩基長が長い場合、複数のポリヌクレオチド単位を連結してもよい。連結方法は特に限定されず、例えば、酵素法及び化学合成法が挙げられる。

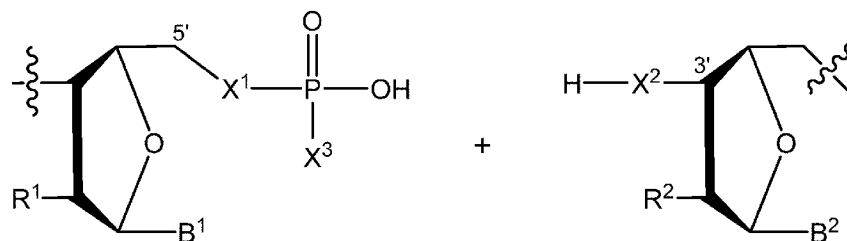
[0115] 酵素法による連結としては、例えば、リガーゼを用いた連結が挙げられる。リガーゼとしては、例えば、T4 DNA Ligase、T4 RNA Ligase1、T4 RNA Ligase2、T4 RNA Ligase2、truncated T4 RNA Ligase2、truncated KQ、E. Coli

DNA Ligase、Taq. DNA Ligase等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。酵素法では、一般的に、ポリヌクレオチドの5'末端側を構成するポリヌクレオチド単位（以下「5'末端側ポリヌクレオチド単位」と称する。）の3'末端のヌクレオチドAと、ポリヌクレオチドの3'末端側を構成するポリヌクレオチド単位（以下「3'末端側ポリヌクレオチド単位」と称する。）の5'末端のヌクレオチドBと（連結したポリポリヌクレオチドにおいてヌクレオチドA及びBは互いに隣接する。）、前記ヌクレオチドBに隣接するヌクレオチドCと、前記ヌクレオチドCに隣接するヌクレオチドDと、が修飾されていないことが好ましい。一方で、Molecular Cell, Vol. 16, 211-221, October 22, 2004に記載のT4 RNA Ligase 2等を使用する場合には、前記ヌクレオチドA～Dは修飾されていてもよい。

[0116] 酵素法による連結では、分子クラウディング効果により連結反応を促進するために、多分散polyethylene glycol (PEG)を用いてもよい。多分散PEGとしては、例えば、PEG4000、PEG6000、PEG8000、PEG10000等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

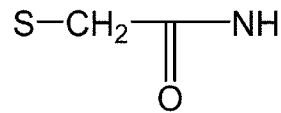
[0117] 化学合成法による連結（「ケミカルライゲーション」ともいう）としては、例えば、下記に示すように、5'末端側ポリヌクレオチド単位の3'末端（下記の右側）と、3'末端側ポリヌクレオチド単位の5'末端（下記の左側）とを、縮合剤の存在下で縮合する方法が挙げられる。

[化37]



[式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、B<sup>1</sup>、B<sup>2</sup>及びX<sup>3</sup>は前記のとおりであり、  
X<sup>1</sup>は、O、S又はNHであり、  
X<sup>2</sup>は、O、S、NH又は以下の構造である。]

[化38]



[0118] 縮合剤としては、例えば、1, 3-ジシクロヘキサンカルボジイミド (DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩 (EDC)、カルボニルジイミダゾール、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ホロホスファート、(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート、O-(7-アザ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ヘキサフルオロホスファート (HATU)、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ヘキサフルオロホスファート (HBTU)、ヨウ化 2-クロロ-1-メチルピリジニウム、1H-イミダゾール-1-カルボニトリル、1-シアノ-1H-ベンゾイミダゾール、1-シアノ-1H-ベンゾトリアゾールが挙げられる。

[0119] 前記縮合反応は、5'末端側ポリヌクレオチド単位の3'末端側のヌクレオチド鎖及び3'末端側ポリヌクレオチド単位の5'末端側のヌクレオチド鎖と相補的なヌクレオチド鎖を含むテンプレートDNAの存在下で実施することが好ましい。テンプレートDNAは、5'末端側ポリヌクレオチド単位の3'末端から、好ましくは2~50塩基長、より好ましくは5~40塩基長のヌクレオチド鎖、及び3'末端側ポリヌクレオチド単位の5'末端から、好ましくは2~50塩基長、より好ましくは5~40塩基長のヌクレオチド鎖と相補的なヌクレオチド鎖であることが好ましい。ここで「相補的」とは、塩基配列の同一性が、例えば、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、又は100%であることを意味する。

[0120] 前記縮合反応において、添加剤を加えてもよい。添加剤としては、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT)、及び4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) が挙げられる。

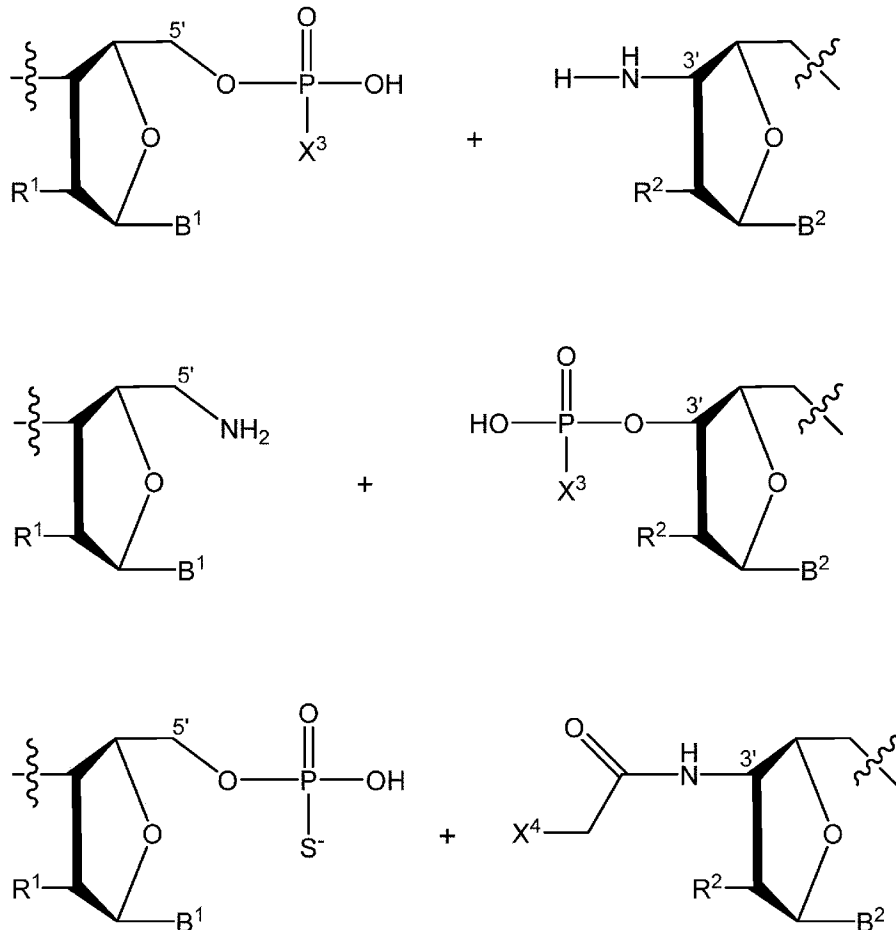
[0121] 前記縮合反応において、金属塩を加えてもよい。金属塩としては、例えば、塩化亜鉛 (II)、臭化亜鉛 (II)、酢酸亜鉛 (II)、塩化ニッケル (II)、塩化マンガン (II) などが挙げられる。

[0122] 前記縮合反応は、緩衝液の存在下で実施してもよい。緩衝液としては、例えば、酢酸緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、及び水が挙げられる。

[0123] 前記縮合反応の温度は特に限定されないが、例えば、室温～200℃としてもよい。前記縮合反応の時間は特に限定されないが、例えば、5分間～100時間としてもよい。

[0124] 5'末端側ポリヌクレオチド単位の3'末端（下記の右側）と、3'末端側ポリヌクレオチド単位の5'末端（下記の左側）との縮合反応の具体例としては、例えば、以下のものが挙げられる。

[化39]



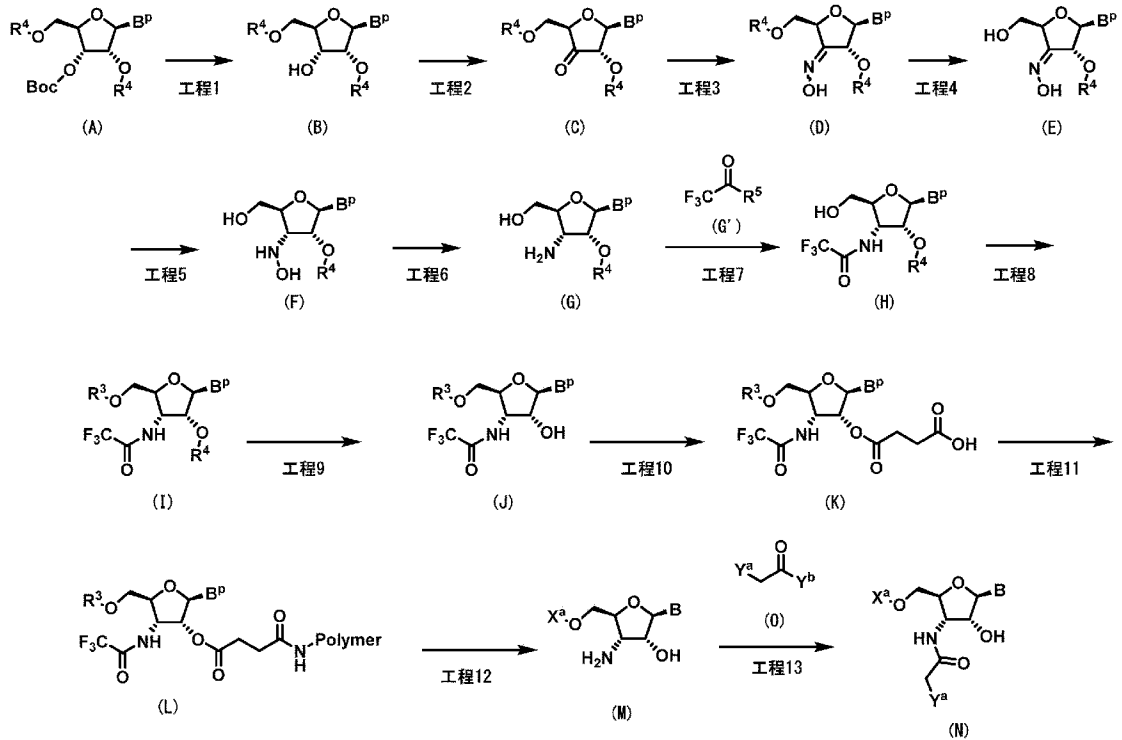
[式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $B^1$ 、 $B^2$ 及び $X^3$ は前記のとおりであり、 $X^4$ は脱離基である。]

[0125] 脱離基の具体例としては、例えば、クロロ基、ブロモ基、ヨード基、メタンサルホニル基、*p*-トルエンサルホニル基、トリフルオロメタンサルホニル基が挙げられる。脱離基は特に限定されるものではないが、クロロ基、ブロモ基であることが好ましい。

[0126] ポリヌクレオチド単位の連結は、目的とするポリヌクレオチドの長さに応じて、複数回繰り返してもよい。連結の回数は特に限定されず、例えば、1~200回、1~100回、1~50回、1~20回、1~10回、1~8回、1~6回、1~4回、1~3回、又は1若しくは2回としてもよい。

[0127] 連結に用いる5'末端側ポリヌクレオチド単位である、化合物(M)及び化合物(N)の製造法を以下に示す。

#### [化40]



[式中、 $B^p$ は保護基で保護されていてもよい塩基であり、 $B$ は塩基であり、 $Polymer$ は固相支持体である。 $R^4$ は選択的に脱保護可能な保護基であり、例えば、*tert*-ブチルジメチルシリル基、トリエチルシリル基であり

、 $R^3$ は核酸固相合成において用いられる保護基であり、例えば、 $p$ 、 $p'$ –ジメトキシトリチル基であり、 $X^a$ は核酸配列であり、 $Y^a$ 及び $Y^b$ はそれぞれ独立して脱離基であり、例えばハロゲンであり、好ましくは塩素原子又は臭素原子である。本明細書において、核酸配列とは、それぞれ結合する化合物と一緒になって核酸を形成する、核酸における部分構造である。なお、分子中に $B$ が複数存在する場合、それぞれの $B$ は同一であってもよく、異なってもよい。]

[0128] (工程1)

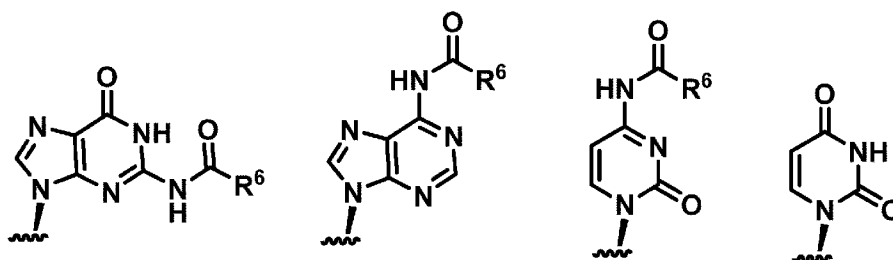
化合物(B)は、化合物(A)を溶媒中、 $60^{\circ}\text{C}$ と、用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から3日間、反応させることで製造することができる。

溶媒としては、例えば、トルエン、キシレン、1,2–ジクロロエタン、1,4–ジオキサン、 $N,N$ –ジメチルホルムアミド(DMF)、 $N$ –メチルピロリドン(NMP)、1,2–ジクロロベンゼン、水等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

化合物(A)は、例えば、*J. Am. Chem. Soc.* (1999), 121, 5661–5665.に記載の方法等により製造することができる。

[0129] 化合物(A)における $B^a$ は特に限定されるものではないが、下記構造のいずれかであることが好ましい。

[0130] [化41]



$R^6$ は、塩基の保護基の一部を構成する基であり、例えば、メチル基、イソプロピル基、置換基を有してもよいフェニル基等を表す。置換基を有してもよいフェニル基における置換基としては、例えば、メチル基、イソプロピル

基又は *t e r t* -ブチル基を表す。

[0131] (工程 2)

化合物 (C) は、化合物 (B) を溶媒中、1~100 当量の酸化剤の存在下、0℃と、用いる溶媒の沸点との間の温度で、10 秒間から3 日間、好ましくは1~100 当量の添加剤と反応させることで製造することができる。

溶媒としては、例えば、クロロホルムやジクロロメタン等の非プロトン性溶媒等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

酸化剤としては、例えば、ジョーンズ試薬、クロム酸、ニクロム酸ピリジニウム、四酸化ルテニウム、亜塩素酸ナトリウム、デスマーチン (*D e s s - M a r t i n*) 試薬等の有機系酸化剤又はクロロクロム酸ピリジニウム等の無機系酸化剤等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

添加剤として、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N, N-ジイソプロピルエチルアミン等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

[0132] (工程 3)

化合物 (D) は、化合物 (C) をピリジン等の溶媒中、ヒドロキシルアミン塩酸塩の存在下、0℃と、用いる溶媒の沸点との間の温度で、10 秒間から3 日間、反応させることで製造することができる。

[0133] (工程 4)

化合物 (E) は、化合物 (D) を溶媒中、1~100000 当量の脱保護剤の存在下、0℃と、用いる溶媒の沸点との間の温度で、10 秒間から3 日間、反応させることで製造することができる。

溶媒としては、例えば、トルエン、キシレン、水等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

脱保護剤としては、例えば、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、酢酸、塩酸等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

[0134] (工程 5)

化合物（F）は、化合物（E）を溶媒中、還元剤の存在下、0℃と、用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から3日間、反応させることで製造することができる。

溶媒は、例えば、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、酢酸、塩酸、トルエン、キシレン、トルエン、キシレン、テトラヒドロフラン、メタノール、エタノール、1,4-ジオキサン、水等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

還元剤は、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化シアノホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム等が挙げられる。

[0135]（工程6）

化合物（G）は、化合物（F）を溶媒中、触媒の存在下、水素雰囲気下、0℃と、用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から3日間、反応させることで製造することができる。

溶媒は、例えば、トリフルオロ酢酸、酢酸、希塩酸、メタノール、エタノール、イソプロパノール、水等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

触媒は、例えば、パラジウム炭素、ルテニウム炭素等が挙げられる。

化合物（G）は、例えば、国際公開第2017/123669号に記載の方法等でも製造することができる。

[0136]（工程7）

化合物（H）は、化合物（G）を溶媒中、1～100当量の化合物（G'）及び塩基の存在下、0℃と、用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から3日間、好ましくは1～1000当量の塩基と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、テトラヒドロフラン（THF）、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド（DM

F)、N-メチルピロリドン(NMP)、水等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

塩基としては、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン、2,6-ルチジン等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

化合物(G')は、市販品を用いることができる。

[0137] (工程8)

化合物(I)は、化合物(H)とp, p'-ジメトキシトリチルクロリドを、ピリジン等の溶媒中、必要に応じて共溶媒の存在下、0℃と100℃の間の温度で、5分間~100時間、反応させることで製造することができる。

共溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、水等が挙げられ、これらは単独で又は混合して用いることができる。

[0138] (工程9)

化合物(J)は、化合物(I)を溶媒中、0℃と、用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から10日間、1~10当量の添加剤と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、DMA、NMP等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

添加剤としては、例えば、テトラブチルアンモニウムフルオリド、トリエチルアミン三フッ化水素酸塩等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

[0139] (工程10)

化合物（K）は、化合物（J）とコハク酸無水物を、溶媒中、1～30当量の塩基存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間～100時間、反応させることで製造することができる。

溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、ピリジン、水等があげられ、これらは単独で又は混合して用いることができる。

塩基としては、例えば、炭酸セシウム、炭酸カリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム tert-ブトキシド、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン（DBU）、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン（DMA P）等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

[0140]（工程11）

化合物（L）は、化合物（K）と、末端がアミノ化された固相支持体とを、無溶媒で又は溶媒中、1～30当量の塩基、縮合剤及び必要に応じて0.01～30当量の添加剤の存在下、室温と200℃の間の温度で、5分間～100時間反応した後、無水酢酸／ピリジン溶液中、室温と200℃の間の温度で5分間～100時間反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、工程4で例示したものが挙げられる。

塩基としては、例えば、炭酸セシウム、炭酸カリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム tert-ブトキシド、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン（DBU）、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン（DMA P）等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

縮合剤としては、例えば、1, 3-ジシクロヘキサンカルボジイミド (DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩 (EDC)、カルボニルジイミダゾール、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ホロホスファート、(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート、O-(7-アザ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ヘキサフルオロホスファート (HATU)、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ヘキサフルオロホスファート (HBTU)、ヨウ化 2-クロロ-1-メチルピリジニウム等が挙げられる。

添加剤としては、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT)、4-ジメチルアミノピリジン (DMAPI) 等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

固相支持体としては、固相合成を行う上で公知のアミノ化された固相支持体がいられる限り特に限定されるものではないが、例えば、長鎖アルキルアミノ基で修飾されたCPG (controlled pore glass) やPS (polystyrene resin) 等の固相支持体が挙げられる。

例えば、長鎖アルキルアミン細孔性ガラス (LCAA-CPG) は、市販品を用いることができる。

#### [0141] (工程12)

化合物 (M) は、化合物 (L) を用い、公知のオリゴヌクレオチド化学合成法で、対応するヌクレオチド鎖を伸長した後に、固相からの脱離、保護基の脱保護及び精製を行うことで製造することができる。

固相からの脱離、脱保護は、オリゴヌクレオチド化学合成後、溶媒又は無溶媒中、-80℃から200℃の間の温度で、10秒間から72時間塩基で処理することにより製造することができる。

塩基としては、例えば、アンモニア、メチルアミン、ジメチルアミン、エ

チルアミン、ジエチルアミン、イソプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、ピペリジン、トリエチルアミン、エチレンジアミン、1, 8-ジアザビシクロ[5. 4. 0]-7-ウンデセン (DBU)、炭酸カリウム等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、THF等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

オリゴヌクレオチドの精製は、C18逆相カラムあるいは陰イオン交換カラム、好ましくは前述2つの手法を組み合わせにより可能である。

精製後の核酸複合体純度は、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上である。

#### [0142] (工程13)

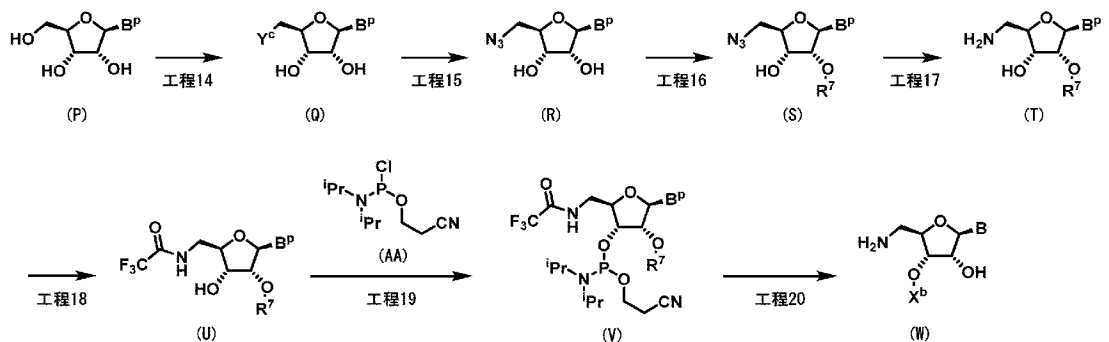
化合物(N)は、化合物(M)を用い、緩衝液中、1~1000当量の化合物(O)の存在下、室温と100℃の間の温度で、5分間~100時間、反応させることで製造することができる。

緩衝液としては、例えば、酢酸緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、水等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

化合物(O)は、市販品を用いることができる。

[0143] 連結に用いる3'末端側ポリヌクレオチド単位である、化合物(W)の製造方法について以下に示す。

#### [化42]



[式中、B<sup>p</sup>は保護基で保護されていてもよい塩基であり、Bは塩基であり、R

7は保護基であり、例えばtert-ブチルジメチルシリル基、トリエチルシリル基であり、Ycは例えば塩素原子、臭素原子、トシラート基であり、X<sup>b</sup>は核酸配列である。なお、分子中にBが複数存在する場合、それぞれのBは同一であってもよく、異なってもよい。]

[0144] (工程14)

化合物(Q)は、化合物(P)を溶媒中、添加剤及び塩基の存在下、0℃と、用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から3日間、反応させることで製造することができる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、DMA、NMP等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

添加剤としては、例えば、トシル酸無水物、トシルクロリド、チオニルクロリド、オキサリルクロリド等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

塩基としては、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン、炭酸カリウム等が挙げられ、これらを単独又は混合して用いることができる。

化合物(P)は市販品を用いることができる。

[0145] (工程15)

化合物(R)は、化合物(Q)を溶媒中、アジド化剤と必要に応じて塩基の存在下、室温と、用いる溶媒の沸点の間の温度で、10秒間から3日間、反応させることで製造することができる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、DMA、NMP等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

アジド化剤としては、例えば、アジ化ナトリウム等が挙げられる。

塩基としては、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン、炭酸カリウム等が挙げられ、これらを単独又は

混合して用いることができる。

[0146] (工程 16)

化合物 (S) は、化合物 (R) を溶媒中、シリル化剤と塩基の存在下、室温と、用いる溶媒の沸点の間の温度で、10 秒間から 3 日間、反応させることで製造することができる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、DMA、NMP 等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

シリル化剤としては、例えば、tert-ブチルジメチルシリルクロリド、tert-ブチルジメチルシリルトリフラート、トリエチルシリルクロリド等が挙げられる。

塩基としては、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン、炭酸カリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム tert-ブトキシド、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン、1,8-ジアザビシクロ [5.4.0] -7-ウンデセン (DBU)、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMA P) 等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

[0147] (工程 17)

化合物 (T) は、化合物 (S) を溶媒中、還元剤を加え、室温と、用いる溶媒の沸点の間の温度で、10 秒間から 3 日間、反応させることで製造することができる。

溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,2-ジメトキシエタン、ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、酢酸、水等が挙げられ、これらは単独で又は混合し

て用いることができる。

還元剤としては、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化シアノホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、水素雰囲気下におけるパラジウム炭素等が挙げられる。

[0148] (工程 18)

化合物 (U) は、化合物 (T) を用いて、工程 7 と同様にして製造することができる。

[0149] (工程 19)

化合物 (V) は、溶媒中、化合物 (U) と化合物 (AA) を、塩基存在下、0℃と100℃の間の温度で、10秒間から24時間、反応させることで製造することができる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、NMP等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

塩基としては、例えば、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。

化合物 (AA) は、市販品を用いることができる。

[0150] (工程 20)

化合物 (W) は、化合物 (V) を用いて、工程 12 と同様にして製造することができる。

[0151] 本実施形態のポリヌクレオチドを複数のポリヌクレオチド単位を連結して製造する場合、I V Tで製造したポリヌクレオチド単位を一部含んでもよい。I V Tで製造したポリヌクレオチドを連結する方法は特に限定されず、例えば、上述の酵素法及び化学合成法が挙げられる。I V Tを用いてポリヌクレオチド単位を製造する方法としては、プロモーター配列を有する鋳型DNAからRNAポリメラーゼを用いてRNAを転写する方法が挙げられる。公知のI V Tとして、より具体的には、以下の文献等に記載の方法が挙げられる。

- ・アールエヌエー・メソッズ・イン・モレキュラーバイオロジー・メソッズ・アンド・プロトコルズ(RNA, Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols))、第703巻、第3章(2011年)；
- ・カルジアック・ジーン・セラピー・メソッズ・イン・モレキュラーバイオロジー・メソッズ・アンド・プロトコルズ(Cardiac Gene Therapy: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols))、第1521巻、第8章(2016年)；
- ・ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology)、第249巻、398ページ~408ページ(1995)。

[0152] I V T に用いる鋳型DNAとしては、例えば化学合成によって製造されたもの、ポリメラーゼ連鎖反応によって製造されたもの、プラスミドDNA、プラスミドDNAを制限酵素によって線状化して製造されたもの等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。RNAポリメラーゼとしてはT3RNAポリメラーゼ、T7RNAポリメラーゼ、SP6RNAポリメラーゼ等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いることができる。転写の際に用いるリボヌクレオシド三リン酸は修飾されていてもよく、複数種類のリボヌクレオシド三リン酸を混合して用いることもできる。Cardiac Gene Therapy: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)、第1521巻、第8章(2016年)に記載のように、 $m^7G(5')ppp(5')G$  (トリリンク社製、カタログ番号S1404)やAnti Reverse Cap Analog,  $3' -O-Me-m^7G(5')ppp(5')G$  (トリリンク社製、カタログ番号N-7003)等の化合物を用いて5' Cap構造を付与することができる。Journal of Molecular Biology、第249巻、398ページ~408ページ(1995)に記載のように、鋳型DNAにHepatitis delta virus(HDV)リボザイム等の配列を挿入しておくことで、転写後にRNAの5'末端や3'末端を切断することができる。

[0153] <医薬組成物>

本発明の一実施形態は、前記ポリヌクレオチドを含む医薬組成物に関する。本実施形態の医薬組成物を、疾患を有する患者に投与することにより、ポリヌクレオチドが翻訳され、前記ポリヌクレオチドがコードするポリペプチ

ドが合成され、前記疾患が治療される。

[0154] 特に限定するものではないが、特定のタンパク質の機能又は活性が失われているか異常であることを特徴とする疾患に対して、前記ポリヌクレオチドから翻訳されるポリペプチドによってその機能や活性を補うことにより治療する方法が提供される。あるいは、外来の抗原ペプチド及びその類縁体を前記ポリヌクレオチドから翻訳されるポリペプチドによって生体内に発現させることにより、免疫応答を人工的に制御する治療方法も提供される。また、転写因子等の生体中の特定のタンパク質又は生体中に本来存在しないポリペプチドを、前記ポリヌクレオチドから翻訳されるポリペプチドによって生体に発現させることにより、細胞の機能、分化、増殖等を人為的に制御、改変することも可能であり、これによって、組織や細胞が損傷しているか、その機能や活性が低下しているか異常となっていることを特徴とする疾患に対して、組織や細胞の機能を回復させる治療方法も提供される。

[0155] 疾患としては、特に限定するものではないが、例えば、癌及び増殖性疾患、感染症及び寄生虫症、血液及び造血器の疾患、自己免疫疾患、内分泌、栄養及び代謝疾患（先天性代謝異常症を含む）、精神、神経系疾患、皮膚及び皮下組織の疾患、眼疾患、耳疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、腎尿路生殖器系の疾患、心血管疾患、脳血管疾患、筋骨格系及び結合組織の疾患、流産、周産期疾患、先天奇形、後天的な損傷、及び中毒等が挙げられる。

[0156] 医薬組成物は所定の製剤の形態で投与してもよい。製剤としては、例えば、経口投与又は非経口投与のための液体剤形が挙げられ、液体剤形としては、例えば、薬学的に許容可能な乳剤、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ剤、及びエリキシル剤が挙げられる。液体剤形は、活性成分に加えて、当技術分野で一般に使用される不活性の希釈剤（例えば、水又は他の溶媒）、可溶化剤及び乳化剤（例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1, 3 - ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、オイル（特に、綿実、落花生類、トウモロコシ、胚芽、オリーブ、

トウゴマ及びゴマのオイル)、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、並びにこれらの混合物)を含んでいてもよい。経口投与用の製剤は、アジュバント(例えば、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤)、甘味料、香味料、及び着香剤のうち少なくともいずれかを含んでいてもよい。非経口投与用の製剤は、可溶化剤(例えば、Cremophor(登録商標)、アルコール、オイル、変性油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー、及びこれらの組み合わせ)を含んでいてもよい。

[0157] 医薬組成物の投与方法としては、例えば、リンパ節局所投与、腫瘍内局所投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、気管内投与、髄腔内投与、脳室内投与、眼内投与、鼓室内投与、冠動脈へのカテーテル投与、肝門脈へのカテーテル投与、心筋へのカテーテル投与、経尿道的カテーテル投与及び静脈内投与が挙げられる。

[0158] 医薬組成物は、前記ポリヌクレオチドに加えて、任意成分を含んでいてもよい。任意成分としては、例えば、溶媒、水性溶媒、非水性溶媒、分散媒、希釈剤、分散物、懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤、乳化剤、防腐剤、脂質、リポイド、リポソーム、脂質ナノ粒子、コア・シェル型ナノ粒子、ポリマー、リポプレックス(lipoplexe)、ペプチド、タンパク質、細胞、ヒアルロニダーゼ、及びこれらの混合物から選択された1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が挙げられる。

## 実施例

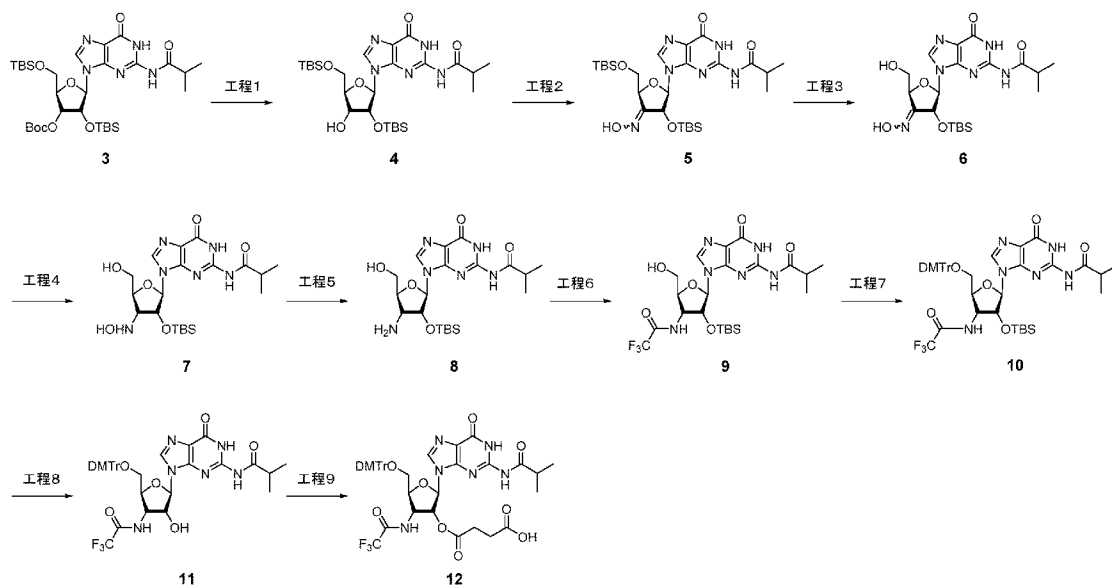
[0159] 以下、実施例及び参考例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれに限定されるものではない。

[0160] 化合物の合成で用いた試薬はシグマアルドリッチ社、東京化成工業株式会社、和光純薬工業株式会社、関東化学株式会社から購入したものを精製せずに使用した。無水溶媒は活性化したモレキュラーシーブ4A上で12時間乾燥させることで調製したか、市販の無水グレードの溶媒を使用した。反応の追跡は薄層シリカゲルクロマトグラフィー(シリカゲル70F254 TLCプレート-ワコ

一、和光純薬工業株式会社)により行った。化合物の精製にはフラッシュクロマトグラフィー用シリカゲル60N (球状、中性、粒子径40~50  $\mu\text{m}$ ) (関東化学株式会社)を使用した。NMRは重水素化溶媒 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ) (関東化学株式会社)を測定溶媒とし、JEOL ECS 400MHz (日本電子株式会社)を用いて測定した。取得したNMRのデータ解析はソフトウェアとしてJEOL Delta (日本電子株式会社)を用いて行い、化学シフト値は重水素化溶媒中の残留シグナル ( $\text{CDCl}_3$  : 7.26,  $\text{CD}_3\text{OD}$  : 3.31,  $\text{DMSO-d}_6$  : 2.50) (Organometallics 2010, 29, 2176-2179)を用いて補正を行った。 $^1\text{H}$  NMRのデータは化学シフト値 ( $\delta$ )、積分値 (H)、シグナルの分裂様式、カップリング定数 (Hz)として記載した (s : Singlet, d : Doublet, t : Triplet, sept. : Septet, m : Multiplet, br. : Broad)。高分解能質量分析はmicrOTOF-QII ESI (Bruker Daltonics社)を用いて測定し、ESI TUNING MIX (Agilent Technologies社)を内部標準として精密質量の補正を行った。

[0161] ポリヌクレオチドの原料となる、化合物12の合成は下記スキームにて合成を行った。

#### [化43]



[0162] 工程1 化合物4の合成

N-(9-((2R, 3S, 4S, 5R)-3-(tert-butyl dimethylsilyloxy)-5-((tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl)-4-hydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6, 9-dihydr

## o-1H-purin-2-yl)isobutyramide

文献記載の方法 (J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 5661-5665) 等により得られる化合物3を用い、1,2-ジクロロベンゼン (2.0 mL) に溶解させ、油浴上 (160°C) にて4時間攪拌した。反応液を室温まで戻した後、濃縮せずにフラッシュカラムクロマトグラフィー (中性シリカゲル、ジクロロメタン/メタノール = 40 : 1) にて精製し、化合物4を白色固体として得た (0.31 g, 収率53%)。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.01 (1H, s), 8.50 (1H, s), 8.07 (1H, s), 5.86 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz), 4.47 (1H, s), 4.24 - 4.23 (1H, m), 4.22 - 4.21 (1H, m), 3.93 (1H, dd,  $J = 11.6, 2.0$  Hz), 3.82 (1H, dd,  $J = 11.6, 2.0$  Hz), 2.66 (1H, sept.,  $J = 6.8$  Hz), 1.27 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz), 1.25 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz), 0.93 (9H, s), 0.82 (9H, s), 0.13 (3H, s), 0.12 (3H, s), -0.07 (3H, s), -0.20 (3H, s)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.0, 155.7, 148.5, 148.7, 147.8, 136.8, 121.0, 87.4, 85.4, 77.6, 71.8, 63.6, 36.2, 25.9, 25.4, 19.1, 18.7, 18.3, 17.8, -5.3, -5.4, -5.5, -5.6

ESI-HRMS : calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_6\text{Si}_2$  582.31[M+H]<sup>+</sup>, found : 582.31[M+H]<sup>+</sup>

## [0163] 工程2 化合物5の合成

N-(9-((2R, 3S, 5S)-3-(tert-butyl dimethylsilyloxy)-5-((tert-butyl dimethylsilyloxy) methyl)-4-(hydroxyimino)-tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl) isobutyramide

クロム酸 (129 mg, 1.29 mmol) の無水ジクロロメタン (2.0 mL) 溶液にモレキュラーシーブ3A (粉末状) (258 mg) を加えて氷浴上にて冷却した。この溶液に攪拌下、無水ピリジン (207  $\mu\text{L}$ , 1.29 mmol) を滴下し、氷浴上にて攪拌した。30分後、無水酢酸 (122  $\mu\text{L}$ , 1.29 mmol) を滴下して氷浴上にて攪拌した。30分後、化合物4 (250 mg, 0.43 mmol) のジクロロメタン (1.3 mL) 溶液を滴下して室温にて2時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後、反応液を酢酸エチルで希釈しシリカパッド (2 cm厚) にてろ過、濾液

を減圧濃縮して無色固体が得られた。この粗生成物4'はこのまま次の反応に用いた。

粗生成物4' (0.43 mmolとして)のピリジン (4 mL)溶液にヒドロキシルアミン塩酸塩 (299 mg, 4.30 mmol)を加えて室温にて攪拌した。24時間後、反応液を減圧濃縮し残渣に水を加えて酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上にて乾燥させた。有機層を減圧濃縮し、残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (中性シリカゲル、ジクロロメタン/メタノール = 40 : 1)にて精製し、化合物5を白色固体として得た (255 mg, 収率68% for 2 steps)。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.14 (1H, s), 9.27 (1H, s), 8.78 (1H, s), 8.11 (1H, s), 5.78 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 5.09 (1H, s), 4.92 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz), 4.14 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz), 3.92 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz), 2.79 - 2.74 (1H, m), 1.27 - 1.21 (6H, m), 0.91 (9H, s), 0.71 (9H, s), 0.10 (3H, s), 0.07 (3H, s), -0.10 (3H, s), -0.23 (3H, s)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.9, 157.8, 155.6, 148.7, 147.8, 136.8, 120.8, 87.5, 86.5, 62.2, 36.3, 25.9, 25.5, 25.2, 19.1, 18.8, 18.3, 18.0, -5.0, -5.5, -5.6, -5.7

ESI-HRMS : calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{47}\text{N}_6\text{O}_6\text{Si}_2$  595.31[M+H]<sup>+</sup>, found : 595.31[M+H]<sup>+</sup>

#### [0164] 工程3 化合物6の合成

N-(9-((2R, 3S, 5S)-3-(tert-butyl dimethylsilyloxy)-4-(hydroxyimino)-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl) isobutyramide

化合物5 (129 mg, 0.22 mmol)に氷冷した90%トリフルオロ酢酸水溶液 (1.0 mL)を加えて氷浴上にて30分間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をトルエンと水 (1 : 1, v/v)にて減圧下にて3回共沸させた。得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (中性シリカゲル、ジクロロメタン/メタノール = 50 : 1から40 : 1)にて精製し、化合物6を白色固体として得た (96 mg, 収率92%)。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.36 (1H, s), 5.87 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz), 5.18 (1H, dd,  $J = 7.6, 2.0$  Hz), 5.02 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 4.11 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.0$  Hz), 3.92 (1H, d,  $J = 12.0, 2.0$  Hz), 2.71 (1H, sept.,  $J = 7.2$  Hz), 1.21 (6H, d,  $J = 7.2$  Hz), 0.72 (9H, s), 0.00 (3H, s), -0.16 (3H, s)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  181.8, 157.4, 156.8, 151.0, 150.0, 139.8, 121.3, 88.4, 79.7, 76.5, 61.6, 36.9, 25.9, 19.4, 19.2, -4.5, -5.5

ESI-HRMS : calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{NaO}_6\text{Si}$  503.21[M+Na] $^+$ , found : 503.20[M+Na] $^+$

[0165] 工程4 化合物7の合成

N-(9-((2R, 3S, 4S, 5S)-4-amino-3-(tert-butyl dimethylsilyloxy)-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl)isobutyramide

化合物6 (93 mg, 0.19 mmol)の酢酸 (1.9 mL)溶液に水素化ホウ素ナトリウム (15 mg, 0.38 mmol)を加えて室温にて1時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後、反応液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチルに溶解させ、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウム上にて乾燥させた。有機層を減圧濃縮し、得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー(中性シリカゲル、ジクロロメタン/メタノール = 20 : 1)にて精製し、化合物7を白色固体として得た(51 mg, 収率55%)。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.34 (1H, s), 6.06 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz), 4.75 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz), 4.27 (1H, d,  $J = 2.8$  Hz), 3.86 (1H, dd,  $J = 12.4, 2.0$  Hz), 3.73 (1H, d,  $J = 12.4, 2.0$  Hz), 3.62 - 3.60 (1H, m), 2.71 (1H, sept.,  $J = 6.8$  Hz), 1.21 (6H, d,  $J = 6.8$  Hz), 0.82 (9H, s), -0.02 (3H, s), -0.23 (3H, s)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  181.8, 157.4, 150.8, 149.8, 139.6, 139.4, 121.1, 89.7, 84.5, 77.7, 65.4, 65.2, 36.9, 26.0, -5.2, -5.3

ESI-HRMS : calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_6\text{Si}$  483.24[M+H] $^+$ , found : 483.23[M+H] $^+$

[0166] 工程5 化合物8の合成

N-(9-((2R, 3S, 4S, 5S)-4-amino-3-(tert-butyl dimethyl silyloxy)-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6, 9-dihydro-1H-purin-2-yl) isobutyramide

化合物7 (50 mg, 0.10 mmol)の90%酢酸水溶液 (1.5 mL)溶液に10%パラジウム炭素 (20 mg)を加え、水素雰囲気下、室温にて18時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後、反応液をメタノールにて希釈しパラジウム炭素をセライト濾過にて除去した。濾液を減圧濃縮し、得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (中性シリカゲル、ジクロロメタン/メタノール = 15 : 1から10 : 1)にて精製し、化合物8を白色固体として得た (酢酸塩として41 mg, 収率75%)。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.32 (1H, s), 5.99 (1H, s), 4.60 (1H, s), 3.95 - 3.68 (4H, m), 2.73 (1H, br. s), 1.22 (6H, br. s), 0.05 (3H, s), -0.06 (3H, s)

ESI-HRMS : calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{NaO}_5\text{Si}$  489.2258[M+Na] $^+$ , found : 489.2231[M+Na] $^+$

[0167] 工程6 化合物9の合成

N-(9-((2R, 3S, 4R, 5S)-3-(tert-butyl dimethyl silyloxy)-5-(hydroxymethyl)-4-(2, 2, 2-trifluoroacetamido)-tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6, 9-dihydro-1H-purin-2-yl) isobutyramide

文献既知 (W02017/123669) の化合物8 (40 mg, 0.076 mmol)とトリエチルアミン(45 L, 0.38 mmol)のメタノール溶液 (0.76 mL)溶液にトリフルオロ酢酸エチル (0.76 mL)を加え、室温にて24時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (中性シリカゲル、ジクロロメタン/メタノール = 20 : 1から12 : 1)にて精製し、化合物9を白色固体として得た (12 mg, 収率28%)。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.26 (1H, s), 10.11 (1H, s), 7.76 (1H, s), 7.26 (1H, d, J = 3.6 Hz), 5.71 (1H, d, J = 3.6 Hz), 4.98 (1H, dd

, J = 6.8 Hz), 4.78 (1H, dd, J = 6.8, 3.6 Hz), 4.21 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.03 (1H, dd, J = 11.2 Hz), 3.82 (1H, dd, J = 11.2 Hz), 2.79 (1H, sept., J = 6.8 Hz), 1.26 (3H, d, J = 6.8 Hz), 1.24 (3H, d, J = 6.8 Hz), 0.85 (9H, s), -0.01 (3H, s), -0.11 (3H, s)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.8, 158.0, 157.7, 157.3, 156.9, 155.2, 148.3, 147.3, 138.6, 122.0, 120.0, 117.1, 114.2, 111.3, 91.6, 83.7, 74.5, 61.3, 51.0, 36.1, 25.2, 18.9, 17.7, -5.0, -5.4

ESI-HRMS : calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_6\text{NaO}_6\text{Si}$  585.21[M+Na] $^+$ , found : 585.21[M+Na] $^+$

[0168] 工程7 化合物10の合成

N-(9-((2R, 3S, 4R, 5S)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3-(tert-butyl dimethylsilyloxy)-4-(2, 2, 2-trifluoroacetamido)-tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6, 9-dihydro-1H-purin-2-yl)isobutyramide

化合物9 (10 mg, 0.017 mmol)の無水ピリジン (1 mL)溶液にジメトキシトリチルクロライド (18 mg, 0.053 mmol)を加え、室温にて1.5時間攪拌した。その後ジメトキシトリチルクロライド (18 mg, 0.053 mmol)を追加し、室温にて30分間攪拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後、反応液にメタノール (1 mL)を加えた後、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルに溶解させ、水、次いで飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上にて乾燥させ、減圧濃縮して得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー(中性シリカゲル、ヘキサン/酢酸エチル = 5 : 1から2 : 1)にて精製し、化合物10を白色固体として得た (15.2 mg, 収率99%)。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.99 (1H, s), 10.11 (1H, s), 8.07 (1H, s), 7.81 (1H, s), 7.45 (2H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz), 7.32 (4H, dd, J = 9.2, 3.6 Hz), 7.24 - 7.29 (3H, m), 7.01 (1H, d, J = 7.2 Hz), 6.76 (4H, J = 9.2, 3.6 Hz), 5.71 (1H, d, J = 4.2 Hz), 5.16 (1H, dd, J = 6.4, 4.2 Hz), 4.20 - 4.17 (1H, m), 3.76 (3H, s), 3.75 (3H, s), 3.56 (1H, dd, J = 11.2, 2.8 Hz), 3.22 (1H, dd, J = 11.2, 2.8 Hz), 1.82 (1H, d, J = 6

.8 Hz), 0.97 (3H, d, J = 6.8 Hz), 0.68 (9H, s), 0.79 (3H, d, J = 6.8 Hz), 0.04 (3H, s), -0.06 (3H, s)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.2, 158.7, 158.0, 157.6, 157.2, 156.8, 155.4, 147.6, 147.2, 144.8, 139.2, 135.9, 135.4, 130.0, 127.9, 127.1, 122.6, 120.0, 117.0, 114.1, 111.2, 90.1, 86.3, 81.7, 73.4, 62.4, 60.4, 55.2, 51.4, 36.1, 25.4, 18.4, 17.8, -5.0, -5.3

ESI-HRMS : calcd for  $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_8\text{Si}$  865.36[M+H]<sup>+</sup>, found : 865.35[M+H]<sup>+</sup>

[0169] 工程8 化合物11の合成

N-(9-((2R, 3S, 4S, 5S)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3-hydroxy-4-(2,2,2-trifluoroacetamido)-tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl)isobutyramide

化合物10 (14 mg, 0.016 mmol)のテトラヒドロフラン (1 mL)溶液にテトラブチルアンモニウムフルオリド (1Mテトラヒドロフラン溶液、19  $\mu\text{L}$ , 0.019 mmol)を加え、室温にて1時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後、反応液を減圧濃縮した。得られた残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (中性シリカゲル、ジクロロメタン/メタノール = 30 : 1 から15 : 1)にて精製し、化合物11を白色固体として得た (10.8 mg, 収率83%)。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12.12 (1H, br. s), 8.76 (1H, br. s), 7.74 (1H, s), 7.81 (1H, s), 7.68 (1H, d, J = 5.4 Hz), 7.48 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.37 (2H, d, J = 9.2 Hz), 7.34 (2H, d, J = 9.2 Hz), 7.25 - 7.21 (2H, m), 7.17 (1H, t, J = 7.2 Hz), 6.81 (2H, d, J = 9.2 Hz), 6.78 (2H, d, J = 9.2 Hz), 5.80 (1H, d, J = 4.0 Hz), 5.35 (1H, br. s), 5.08 (1H, dd, J = 12.4, 6.4 Hz), 4.30 - 4.29 (1H, m), 3.76 (3H, s), 3.74 (3H, s), 3.57 - 3.53 (1H, m), 3.29 - 3.26 (1H, m), 1.84 - 1.57 (1H, m), 0.94 (3H, d, J = 6.8 Hz), 0.68 (3H, d, J = 6.8 Hz)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.4, 158.6, 158.4, 158.0, 157.6, 157.3, 147.8, 147.2, 144.8, 139.4, 136.3, 135.7, 130.1, 129.9, 128.1, 128.0,

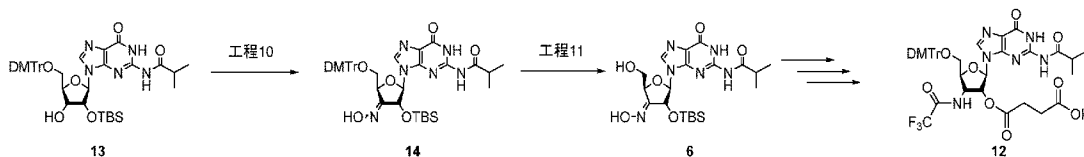
127.0, 121.0, 120.0, 117.1, 114.2, 111.3, 91.2, 86.1, 82.5, 71.5, 62.7, 55.1, 51.2, 35.9, 18.5, 18.2 ESI-HRMS : calcd for  $C_{37}H_{38}F_3N_6O_8$  751.27 [M+H]<sup>+</sup>, found : 751.27[M+H]<sup>+</sup>

[0170] 工程9 化合物12の合成

化合物11 (0.90 g, 1.20 mmol)、トリエチルアミン (0.42 mL, 3.0 mmol) のアセトニトリル (12 mL) 溶液にコハク酸無水物 (0.24 g, 2.40 mmol)、ジメチルアミノピリジン (29 mg, 0.24 mmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認後、反応液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルに溶解させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、次いで飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上にて乾燥させ、減圧濃縮した。残渣に対してジクロロメタン/メタノール溶液 (1 : 1, v/v) にて減圧濃縮による共沸操作を行うことで、白色泡状固体 (トリエチルアミン塩として1.11 g, 97%) を得た。この化合物12はこのまま次の反応に用いた。

[0171] 化合物12は、下記出発原料13から中間体6を得て、合成することも可能である。

[化44]



[0172] 工程10 化合物14の合成

N-(9-((2R, 3R, 5S)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-4-(hydroxyimino)tetrahydrofuran-2-yl)-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl)isobutyramide

アルゴン雰囲気下、化合物 13 (ChemGenes社製, 5.0 g, 6.5 mmol) を脱水ジクロロメタン (50 mL) に溶解させ、氷浴で冷却しながら攪拌した。反応液を冷却しつつ炭酸水素ナトリウム (8.2 g, 97.3 mmol)、nor-AZADO (36 mg, 0.260 mmol) を加え、ヨードベンゼンジアセタート (3.14 g, 9.73 mmol) を内温上昇に注意しながら分割して加え、室温に昇温しながら21 時間10 分間

攪拌した。原料の消失を確認後、イソプロピルアルコール (7.5 mL) を反応液へ加え4 時間攪拌した (過剰酸化剤のクエンチ)。反応液を氷水に加え、更にクロロホルムを加えて分液し、水層を再度クロロホルムで抽出した。有機層を合一後、水で1 回、飽和食塩水で1 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。乾燥剤をろ別後、ろ液を濃縮することで粗生成物 (9.01 g, 一部DMTr 基が脱保護された化合物を含む) を橙色固体として得た。

アルゴン雰囲気下、粗生成物 (9.01 g) を脱水ピリジン (40 mL) に溶解し、氷浴で冷却しながら攪拌した。反応液を冷却しつつヒドロキシルアミン塩酸塩 (4.06 g, 58.7 mmol) を加え、室温に昇温しながら17 時間25 分間攪拌した。原料の消失を確認後、反応液をナスフラスコにクロロホルム (1%トリエチルアミン含有) で洗い込みながら移し、濃縮した。残渣を飽和重曹水に加え15 分間攪拌した後、クロロホルムで2 回抽出した。有機層を合一後、飽和食塩水で1 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。乾燥剤をろ別後、ろ液を濃縮することで化合物 14 (4.13 g, ジアステレオマー混合物、2 段階収率81%) を橙色泡状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 12.04 (1H, d,  $J = 23.3$  Hz), 9.23 (1H, s), 8.49 (1H, s), 7.89 (1H, s), 7.79 (1H, s), 7.66–7.58 (2H, m), 7.49–7.39 (4H, m), 7.31–7.14 (5H, m), 6.81–6.76 (2H, m), 6.73–6.68 (2H, m), 5.92 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz), 5.83 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz), 5.64 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 5.54 (1H, dd,  $J = 3.9, 1.1$  Hz), 5.01 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz), 3.80–3.73 (6H, m), 3.54–3.46 (2H, m), 1.28 (1H, m), 1.08 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz), 0.99 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz), 0.86–0.76 (9H, m), 0.47 (2H, m), 0.11 (1H, s), 0.02–0.02 (3H, m), -0.07 (2H, s) [ジアステレオマー混合物]

ESI-HRMS : calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_8\text{Si}$  781.97[M-H] $^-$ , found : 781.84[M-H] $^-$

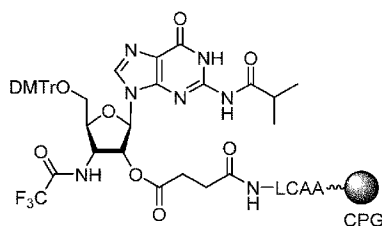
#### [0173] 工程 1 1 化合物14から化合物6の合成

工程10で得られた化合物14 (3.80 g) を用いて、工程3と同様にして、化合物6 (2.12 g, 4.41 mmol, 収率91%) を得た。

なお、化合物6の詳細データについては、工程3に記載の通りである。

[0174] 化合物15の合成

[化45]



15

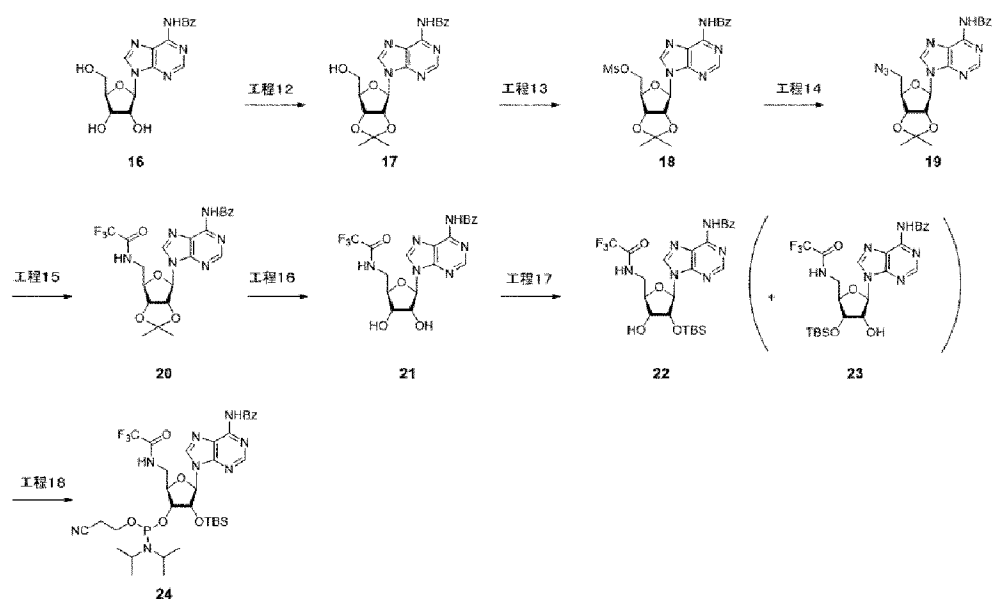
化合物12 (380 mg, 0.50 mmol)のN,N-ジメチルアミホルムアミド (2.5 mL) 溶液にNative amino lcaa CPG (1000A, ChemGenes社)(84  $\mu\text{mol/g}$ , 1.20 g, 0.10 mmol)、次いでHOBt (136 mg, 1.01 mmol)、EDC-HCl (193 mg, 1.01 mmol)のDMF (2.5 mL)溶液を加えて室温で振とうした。20時間後、反応液を捨て、固相担体をN,N-ジメチルアミホルムアミド (5 mL、4回)、次いでジクロロメタン (5 mL、4回)で洗浄した。固相担体上の未反応のアミノ基は10%無水酢酸/ピリジン溶液 (5 mL)によってキャッピングした (室温、16時間振とう)。反応液を捨て、固相担体をピリジン (5 mL、1回)、次いでジクロロメタン (5 mL、4回)で洗浄した後、真空下にて乾燥させることにより、化合物12を固相担体へ担持した化合物15を得た (1.20 g)。

化合物12の固相上への担持量は以下に示す方法によって算出した。得られた固相担体を規定量とり、デブロッキング試薬 (3 w/v%トリクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液)の添加により生じた4,4'-ジメトキシトリチルカチオンの発色を紫外可視吸光度測定 (石英セル、セル長 : 10 mm)によって測定した。504 nmにおける吸光度と4,4'-ジメトキシトリチルカチオンのモル吸光係数 (波長504 nm : 76,000)から固相上への化合物12の担持量をLambert-Beer式により算出した。すなわち、得られた固相担体 (2.0 mg)を2 mLメスフラスコに量りとり、デブロッキング試薬を加えて全量を2 mLとして転倒混和したものを測定サンプルとした。3 w/v%トリクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液を用いてブランク測定を行った後、測定サンプルを用いて測定を行った。504 nmにお

ける吸光度：0.377より、担持量：24.8  $\mu\text{mol/g}$ )

[0175] 化合物24の合成は下記スキームにて行った。

[化46]



[0176] 工程12 化合物17の合成

N-(9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-9H-purin-6-yl)benzamide

アルゴン雰囲気下、10Lの4口フラスコに市販のN6-Benzyladenosine (化合物16) (100 g, 269 mmol, 1.0 eq.)、アセトン (2.70 L)、ジメトキシプロパン (166 mL, 1.35 mol, 5.0 eq.) を順次加えた。反応溶液に、濃硫酸 (1.44 mL, 26.9 mmol, 0.10 eq.) を加え、室温で15時間攪拌した。原料の残存を確認したので、濃硫酸 (1.44 mL, 26.9 mmol, 0.10 eq.) を追加し、24時間攪拌した。原料の残存を確認したので、濃硫酸 (1.44 mL, 26.9 mmol, 0.10 eq.) を添加し1時間30分攪拌した後、濃硫酸 (2.87 mL, 53.8 mmol, 0.20 eq.) を添加し、4時間攪拌した。

LC/MSで反応の進行を確認後、反応液を氷浴で冷却し、内温が3~5°Cとなるように飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (400 mL) を5分間かけて滴下し、溶液を中性にした。減圧下、反応液を濃縮し、残渣に蒸留水 (2.0 L) を加えた。溶液をクロロホルム (1.0 L) で3回抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで

脱水した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、化合物 17 (222 g) を得た。得られた化合物 17 は更なる精製操作を実施せず、次工程に用いた。

[0177] 工程 13 化合物 18 の合成

((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(6-benzamido-9H-purin-9-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl methanesulfonate

アルゴン雰囲気下、2 L の 4 口フラスコに、工程 12 で得られた化合物 17 (222 g)、ピリジン (520 mL) を加え、反応液を氷浴で冷却し、内温が 4°C ~ 9°C となるようにメタンスルホニルクロリド (25.0 mL, 321 mmol, 1.2 eq.) を 15 分間かけて滴下し、2 時間攪拌した。

LC/MS で反応の進行を確認後、反応液に蒸留水 (500 mL) を加え、溶液を酢酸エチル (1.0 L) で 3 回抽出した後、有機層を 1N 塩酸 (1.0 L × 1, 500 mL × 2)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (500 mL × 2)、飽和食塩水 (500 mL × 2) で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をトルエンで共沸することで化合物 18 (150 g, 17.6 wt %トルエン含有) を得た。得られた化合物 18 は更なる精製操作を実施せず、次工程に用いた。

[0178] 工程 14 化合物 19 の合成

N-(9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(azidomethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-9H-purin-6-yl)benzamide

アルゴン雰囲気下、3 L の 4 口フラスコに、工程 13 で得られた化合物 18 (150 g) と脱水 DMF (1.26 L) を加えた。反応液にアジ化ナトリウム (82.8 g, 1.26 mol, 5.0 eq.) を添加し、30 分間かけて 60°C まで昇温し、60°C で 3 時間 30 分間攪拌した。

LC/MS で反応の進行を確認後、反応液を室温まで徐冷し、蒸留水 (1.0 L) と酢酸エチル (600 mL) を加えた。得られた溶液に蒸留水 (3.0 L) を加え、水層を酢酸エチル (500 mL) で 6 回抽出した。有機層を蒸留水 (800 mL) で 2 回、飽和食塩水 (800 mL) で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ

ィー (SiO<sub>2</sub> 700 g, 酢酸エチル) で精製することで、化合物 19 (55.7 g, 128 mmol, 収率48% (3 steps from 化合物 16)) を得た。

[0179] 工程 15 化合物 20 の合成

N-(9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-2, 2-dimethyl-6-((2, 2, 2-trifluoroacetamido)methyl) tetrahydrofuro[3, 4-d][1, 3]dioxol-4-yl)-9H-purin-6-yl)benzamide

アルゴン雰囲気下、3 Lの4口フラスコに、工程 14 で得られた化合物 19 (55.7 g, 128 mmol, 1.0 eq.)、メタノール (1.28 L) を加えた。反応液に、10% Pd/C (76.8 g, 21.2 mmol, 0.17 eq.) を添加し、反応液中を水素で置換し、室温で16時間攪拌した。

LC/MSで反応の進行を確認後、反応液中をアルゴンガスで置換し、反応液をセライトろ過した。ろ液を減圧濃縮した後、得られた残渣をメタノール (985 mL) に溶解し、3 Lの4口フラスコに移した。溶液を氷浴で冷却し、内温が2~4°Cとなるように1-(トリフルオロアセチル)イミダゾール (17.0 mL, 149 mmol, 1.2 eq.) を15分間かけて滴下し、4°Cで2時間攪拌した。LC/MSで反応の進行を確認後、反応液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> 800 g, ヘプタン/酢酸エチル=1:4) で精製することで、化合物 20 (21.4 g, 42.2 mmol, 収率33%) を得た。

[0180] 工程 16 化合物 21 の合成

N-(9-((2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-dihydroxy-5-((2, 2, 2-trifluoroacetamido)methyl) tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)benzamide

1 Lのナスフラスコに、工程 15 で得られた化合物 20 (10.0 g, 19.8 mmol, 10 eq.)、蒸留水 (50.0 mL) を加え、溶液を氷浴で冷却した。氷冷下、トリフルオロ酢酸 (50.0 mL, 640 mmol, 32.4 eq.) を5分間かけて滴下し、反応液を室温まで昇温し、4時間30分間攪拌した。

LC/MSで反応の進行を確認後、反応液を減圧濃縮し、残渣をトルエン共沸した。得られた残渣にイソプロピルエーテルを加えて、固体を析出させ、ろ取した。得られた固体を減圧下室温にて乾燥し、化合物 21 (8.86 g, 19.0 mmol, 収率96%) を得た。

## [0181] 工程 17 化合物 22 の合成

N-(9-((2R, 3R, 4R, 5R)-3-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-4-hydroxy-5-((2, 2, 2-trifluoroacetamido)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)benzamide

アルゴン雰囲気下、500 mLのナスフラスコに、工程 16 で得られた化合物 21 (15.6 g, 33.6 mmol, 1.0 eq.)、脱水DMF (111 mL) を加え、溶液を氷浴で冷却した。氷冷下、内温が6°C未満となるように、イミダゾール (9.16 g, 134 mmol, 4.0eq.)、t-ブチルジメチルシリルクロリド (15.2 g, 101 mmol, 3.0 eq.) を添加し、同温度で30分間攪拌した。

LC/MSで反応の進行を確認後、反応液に氷水を加えた。水層を酢酸エチルで3回抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。ろ過後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub> 800 g, クロロホルム/2-ブタノン=100 : 0から85 : 15) で精製することで、化合物 22 と化合物 23 の混合物 (10.9 g) を得た。得られた化合物 22 と化合物 23 の混合物は更なる精製操作を実施せず、次工程に用いた。

## [0182] 工程 18 化合物 24 の合成

(2R, 3R, 4R, 5R)-5-(6-benzamido-9H-purin-9-yl)-4-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-2-((2, 2, 2-trifluoroacetamido)methyl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite

アルゴン雰囲気下、200 mLのナスフラスコに、工程 17 で得られた化合物 22 と化合物 23 の混合物 (1.19 g, 2.05 mmol, 化合物 22 : 化合物 23 = 9 : 1)、脱水ジクロロメタン (6.83 mL) を加え、溶液を氷浴で冷却した。氷冷下、ジイソプロピルエチルアミン (0.537 mL, 3.07 mmol, 1.5 eq.)、3-((クロロ(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル)オキシ)プロパンニトリル (0.857 mL, 3.07 mmol, 1.5 eq.) のジクロロメタン混合溶液を滴下した後、反応液を室温まで昇温し、室温で2時間攪拌した。

TLCで原料の消失を確認後、反応液に蒸留水を加え、クロロホルム (50 mL) で2回抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。ろ過後、溶媒を減

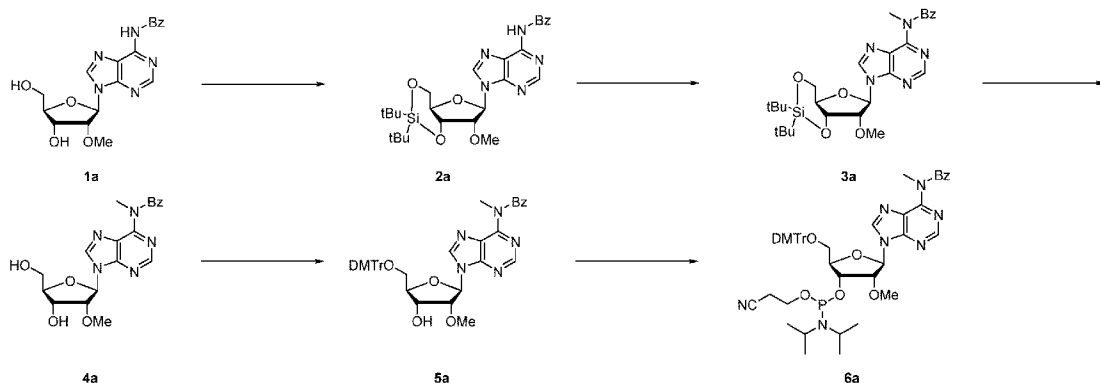
圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘプタン/酢酸エチル=50：50から30：70、0.5%トリエチルアミン含有）で複数回精製することで、目的とする化合物24（608 mg, 0.779 mmol, 収率38%）を淡黄色アモルファス状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.82 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz), 9.07 (1H, s), 8.83–8.80 (1H, m), 8.06–8.01 (3H, m), 7.66–7.52 (3H, m), 5.86 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz), 4.88 (1H, dd,  $J = 7.8, 5.2$  Hz), 4.50 (1H, br s), 4.39–4.29 (1H, m), 4.21–3.88 (3H, m), 3.74–3.63 (1H, m), 3.48–3.35 (1H, m), 2.73–2.66 (2H, m), 1.28–1.23 (12H, m), 1.08–1.04 (1H, m), 0.72–0.68 (9H, m), -0.17 (3H, s), -0.45 (3H, s).

$^{31}\text{P NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149.95

[0183] ポリヌクレオチドの原料となる、化合物6aの合成は下記スキームにて合成を行った。

[化47]



[0184] 工程1 化合物2aの合成

N-(9-((3aR, 5R, 6R, 6aS)-2,2-di-tert-butyl-6-methoxytetrahydrofuro[2,3-d][1,3,2]dioxasilol-5-yl)-9H-purin-6-yl)benzamide

市販の化合物1a（30.0 g, 78.0 mmol）のDMF（300 mL）溶液に、氷冷下、ジ-*t*-ブチルシリルピス（トリフルオロメタンスルホナード）（68.6 g, 156 mmol）をゆっくり加えた。氷冷下、1時間攪拌後、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に加え、ヘプタン/酢酸エチルの混合溶媒を加え、2回抽出した。有機層を水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。

ろ過後、濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘプタン/酢酸エチル = 7/3 → 3/7）で精製し、化合物2a（38.7 g, 73.7 mmol）を無色固体として得た（収率95%）。

ESI-MS: 計算値: 524.23 [M-H]<sup>-</sup>, 実測値: 524.5 [M-H]<sup>-</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 9.32 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.03 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 7.60 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.51 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 6.01 (s, 1H), 4.66 (dd, J = 9.6, 5.0 Hz, 1H), 4.48 (dd, J = 8.9, 4.8 Hz, 1H), 4.31 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.20 (ddd, J = 10.1, 5.0, 5.0 Hz, 1H), 4.03 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 1.10 (s, 9H), 1.06 (s, 9H).

[0185] 工程2 化合物3aの合成N-(9-((3aR, 5R, 6R, 6aS)-2,2-di-tert-butyl-6-methoxytetrahydrofuro[2,3-d][1,3,2]dioxasilol-5-yl)-9H-purin-6-yl)-N-methylbenzamide

化合物 2a (10.0 g, 19.0 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、テトラブチルアンモニウムブロミド (9.20 g, 28.5 mmol)、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (50 mL) を加えた。ヨウ化メチル(4.76 mL, 76.0 mmol) をゆっくりと滴下した。その後、室温で1 時間10 分間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した水/クロロホルム = 1/1 に加えクエンチした。有機層を水で2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、乾燥剤をろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘプタン/酢酸エチル = 90/10 → 50/50）にて精製することで化合物 3a (6.25 g, 11.6 mmol) を無色アモスファスとして得た。（収率61%）

ESI-MS: 計算値: 540.26 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 540.4 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.56 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.49-7.46 (m, 2H), 7.34-7.29 (m, 1H), 7.21 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 5.94 (s, 1H), 4.61 (dd, J = 9.6, 5.0 Hz, 1H), 4.46 (dd, J = 9.2, 5.0 Hz, 1H), 4.22 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.17 (ddd, J = 10.0, 5.2, 5.0 Hz, 1H), 4.00 (dd, J = 10.5, 9.2 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 1.08 (s, 9H), 1.05 (s,

9H).

[0186] 工程3 化合物4aの合成

N-(9-((2R, 3R, 4S, 5S)-4, 5-dihydroxy-3-methoxytetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)-N-methylbenzamide

化合物3a (6.25 g, 11.6 mmol) をテトラヒドロフラン(63 mL) に溶解し、氷浴で冷却した。トリエチルアミン (8.07 mL, 57.9 mmol)、トリエチルアミン三フッ化水素酸塩 (1.89 mL, 11.6 mmol) を加え、氷浴で冷却しながら1時間5分間攪拌した。原料消失を確認後、トリエチルアミン (10 mL, 76.0 mmol) を加えてクエンチし、クロロホルムで希釈した後に、反応液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 100/0 → 90/10) にて精製することで化合物4a (4.25 g, 10.6 mmol) を無色アモルファスとして得た。(収率quant.)

ESI-MS: 計算値: 400.16 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 400.3 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.56 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.50-7.48 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 1H), 7.22 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 5.87 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.86 (dd, J = 11.4, 2.3 Hz, 1H), 4.63 (dd, J = 7.3, 4.6 Hz, 1H), 4.57-4.56 (m, 1H), 4.36-4.34 (m, 1H), 3.99-3.94 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.77 (td, J = 12.3, 1.7 Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 2.77 (d, J = 1.4 Hz, 1H).

[0187] 工程4 化合物5aの合成

N-(9-((2R, 3R, 4S, 5S)-5-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-4-hydroxy-3-methoxytetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)-N-methylbenzamide

化合物4a (4.25 g, 10.6 mmol) をピリジン (43 mL) に溶解し氷浴で攪拌した。反応液に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (5.41 g, 20.0 mmol) を加え、室温で2時間25分間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した重曹水に加えクエンチし、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル (1%トリエチルアミン)) にて精製することで化合物5a (4.25 g, 10.6 mmol) を無色アモルファスとして得た。(収率quant.)

ルアミン含有) = 70/30 → 50/50 ) にて精製することで化合物5a (5.35 g, 7.62 mmol) を無色アモルファスとして得た。(収率71%)

ESI-MS: 計算値: 702.29 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 702.6 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.50 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.45–7.40 (m, 4H), 7.33–7.22 (m, 8H), 7.16 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 6.81 (dd, J = 8.9, 1.1 Hz, 4H), 6.15 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.48 (dd, J = 11.9, 5.0 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 5.3, 3.9 Hz, 1H), 4.21–4.19 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 6H), 3.53 (s, 3H), 3.50 (dd, J = 10.8, 3.0 Hz, 1H), 3.40 (dd, J = 10.8, 4.4 Hz, 1H), 2.66 (d, J = 6.4 Hz, 1H).

[0188] 工程5 アミダイト6aの合成

(2S, 3S, 4R, 5R)-2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-4-methoxy-5-(6-(N-methylbenzamido)-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite

化合物5a (5.30 g, 7.55 mmol) をジクロロメタン (48 mL) に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン (2.64 mL, 15.1 mmol) を加え、氷浴で冷却した。ジクロロメタン (5 mL) に溶解した 2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミジト (2.68 g, 11.3 mmol) を5分間かけて滴下した。その後、室温まで昇温しながら1時間10分間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した飽和重曹水に加えクエンチした。酢酸エチルを加え抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、乾燥剤をろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル (1%トリエチルアミン含有) = 70/30 → 50/50) にて精製することで アミダイト6a (6.22 g, 6.90 mmol) を無色アモルファスとして得た。(収率91%)

ESI-MS: 計算値: 902.40 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 902.5 [M+H]<sup>+</sup>

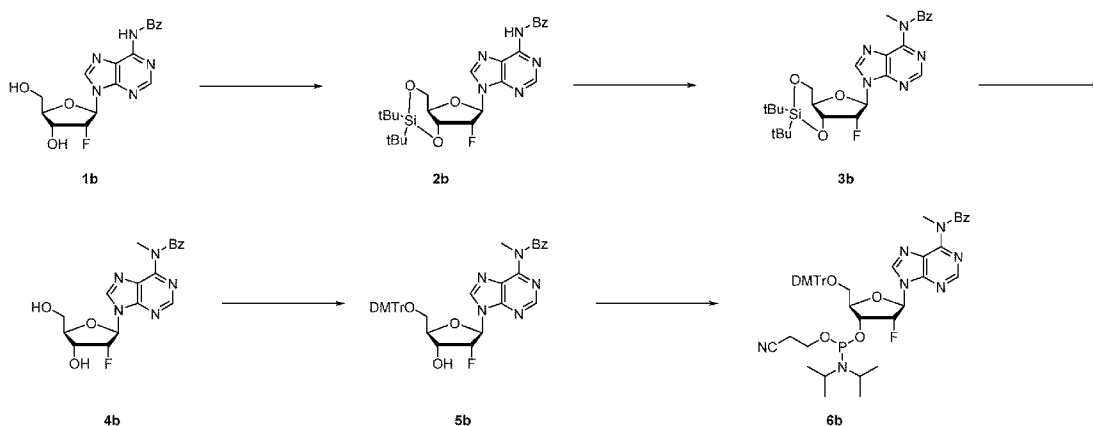
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.47 (s, 0.35H), 8.47 (s, 0.65H), 8.14 (s, 0.35H), 8.09 (s, 0.65H), 7.44–7.39 (m, 4H), 7.33–7.21 (m, 8H), 7.16–7.12 (m, 2H), 6.93–6.78 (m, 4H), 6.12 (d, J = 5.5, 0.65H), 6.10 (d, J

= 5.0, 0.35H), 4.66–4.53 (m, 2H), 4.41–4.38 (m, 0.35H), 4.34–4.32 (m, 0.65H), 3.97–3.78 (m, 10H), 3.70–3.44 (m, 7H), 3.36–3.30 (m, 1H), 2.64 (t, J = 6.2 Hz, 1.3H), 2.38 (t, J = 6.4 Hz, 0.70H), 1.22–1.17 (m, 8H), 1.06 (d, J = 6.9 Hz, 4H).

$^{31}\text{P}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ , 162 MHz)  $\delta$ : 150.70, 150.94.

[0189] ポリヌクレオチドの原料となる、化合物6bの合成は下記スキームにて合成を行った。

[化48]



[0190] 工程1 化合物2bの合成

N-(9-((4aR, 6R, 7R, 7aS)-2,2-di-tert-butyl-7-fluorotetrahydro-4H-furo[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-6-yl)-9H-purin-6-yl)benzamide

市販の化合物1b (30.0 g, 80.4 mmol)のDMF (300 mL)溶液に、氷冷下、ジ-tert-ブチルシリルピス (トリフルオロメタンスルホナード) (70.8 g, 161 mmol)をゆっくり加えた。氷冷下、1時間攪拌後、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に加え、ヘプタン/酢酸エチルの混合溶媒を加え、2回抽出した。有機層を水で2回、飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、濃縮残渣をヘプタン/酢酸エチル = 9/1にてスラリー精製し、化合物2b (38.7 g, 75.4 mmol)を無色固体として得た (収率94%)。

ESI-MS: 計算値: 514.23  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 実測値: 514.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz)  $\delta$ : 11.27 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.04 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.65 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.55 (t, J = 7

.5 Hz, 2H), 6.45 (d, J = 23 Hz, 1H), 5.71 (dd, J = 54.5, 4.1 Hz, 1H), 5.03 (m, 1H), 4.44 (q, J = 3.7 Hz, 1H), 4.09 (m, 2H), 1.11 (s, 9H), 1.02 (s, 9H).

[0191] 工程2 化合物3bの合成

N-(9-((4aR, 6R, 7R, 7aS)-2,2-di-tert-butyl-7-fluorotetrahydro-4H-furo[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-6-yl)-9H-purin-6-yl)-N-methylbenzamide

化合物2b (10.0 g, 19.5 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、テトラブチルアンモニウムブロミド (9.41 g, 29.2 mmol)、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (50 mL) を加えた。ヨウ化メチル (1.83 mL, 29.2 mmol) をゆっくりと滴下した。その後、室温で1時間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した水/クロロホルム = 1/1 に加えクエンチした。有機層を水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、乾燥剤をろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル = 90/10 → 50/50) にて精製することで化合物3b (6.86 g, 12.8 mmol) を無色アモスファスとして得た。(収率65%)

ESI-MS: 計算値: 528.24 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 538.6 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.54 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.21 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 6.10 (d, J = 22.0 Hz, 1H), 5.46 (dd, J = 54.5, 4.1 Hz, 1H), 4.86 (ddd, J = 27.2, 9.8, 4.1 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 9.2, 5.0 Hz, 1H), 4.14 (m, 1H), 4.03 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 1.11 (s, 9H), 1.05 (s, 9H).

[0192] 工程3 化合物4bの合成

N-(9-((2R, 3R, 4R, 5R)-3-fluoro-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)-N-methylbenzamide

化合物3b (6.67 g, 12.6 mmol) をテトラヒドロフラン (66 mL) に溶解し、氷浴で冷却した。トリエチルアミン (8.81 mL, 63.2 mmol)、トリエチルアミン三フッ化水素酸塩 (2.05 mL, 12.6 mmol) を加え、氷浴で冷却しながら1時間5分間攪拌した。原料消失を確認後、トリエチルアミン (10.6 mL, 76.0

mmol) を加えてクエンチし、クロロホルムで希釈した後に、反応液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 100/0 → 90/10) にて精製することで化合物4b (4.98 g, 12.9 mmol) を無色アモルファスとして得た。(収率quant.)

ESI-MS: 計算値: 388.14 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 388.4 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ: 8.70 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.30 (m, 5H), 6.31 (dd J = 16.9, 2.3 Hz, 1H), 5.75 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.41 (m, 1H), 5.15 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.75 (dq, J = 12.4, 2.6 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.61 - 3.56 (m, 1H).

#### [0193] 工程4 化合物5bの合成

N-(9-((2R, 3R, 4R, 5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3-fluoro-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)-N-methylbenzamide

化合物4b (4.93 g, 12.7 mmol) をピリジン (49 mL) に溶解し氷浴で攪拌した。反応液に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (6.47 g, 29.2 mmol) を加え、室温で1時間20 分間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した重曹水に加えクエンチし、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル (1%トリエチルアミン含有) = 70/30 → 50/50 ) にて精製することで化合物5b (8.34 g, 12.1 mmol) を無色アモルファスとして得た。(収率95%)

ESI-MS: 計算値: 690.27 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 690.7 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.51 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.43 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 2H), 7.37 (dd, 8.2, 1.4 Hz, 2H), 7.28-7.20 (m, 8H), 7.12 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 6.79 (d, J = 8.7 Hz), 6.23 (dd, J = 17.1, 2.5 Hz, 1H), 5.58 (dq, J = 52.9, 2.3 Hz, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.47 (ddd, J = 57.9, 10.6, 3.5 Hz, 2H), 2.44 (dd, J = 7.5, 2.5 Hz, 1H).

## [0194] 工程5 アミダイト6bの合成

(2R, 3R, 4R, 5R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-fluoro-5-(6-(N-methylbenzamido)-9H-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite

化合物5b (10.0 g, 14.6 mmol) をジクロロメタン (80 mL) に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン (5.08 mL, 29.1 mmol) を加え、氷浴で冷却した。ジクロロメタン (15 mL) に溶解した 2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミジト (4.18 g, 21.8 mmol) を5分間かけて滴下した。その後、室温まで昇温しながら1時間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した飽和重曹水に加えクエンチした。酢酸エチルを加え抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、乾燥剤をろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル (1%トリエチルアミン含有) = 70/30 → 50/50) にて精製することで アミダイト6b (12.1 g, 13.6 mmol) を無色アモルファスとして得た。(収率93%)

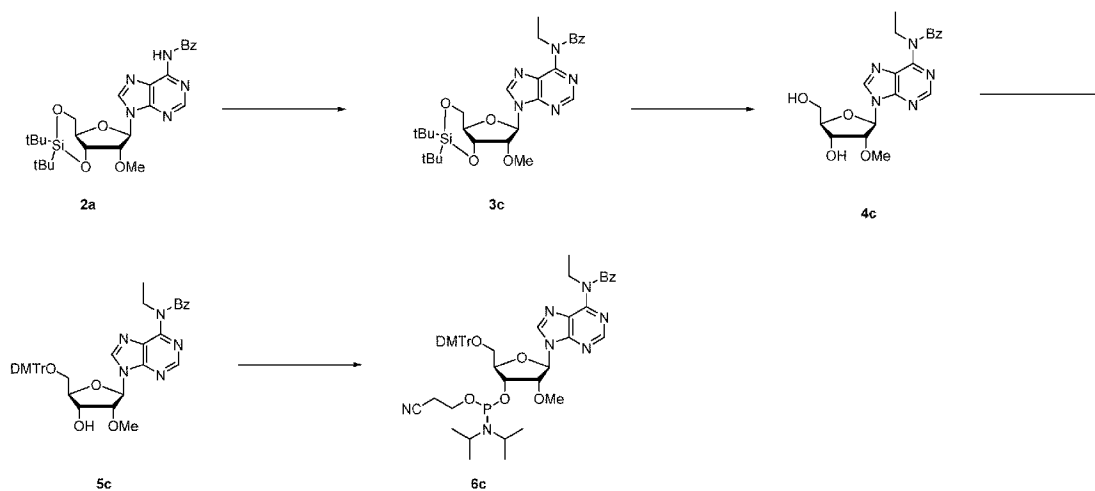
ESI-MS: 計算値: 890.38 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 890.8 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.53 (s, 0.49H), 8.50 (s, 0.51H), 8.14 (s, 1H), 7.43-7.39 (m, 2H), 7.37-7.33 (m, 2H), 7.27-7.20 (m, 8H), 7.09-7.04 (m, 2H), 6.77 (t, J = 9.1 Hz, 4H), 6.28-6.19 (m, 1H), 5.74 (dq, J = 18.5, 2.2 Hz, 0.50H), 5.61 (dq, J = 19.2, 2.3 Hz, 0.50H), 5.10-5.00 (m, 0.47H), 4.94-4.85 (m, 0.53H), 4.31 (m, 1H), 3.97-3.82 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.63-3.53 (m, 4H), 3.31-3.27 (m, 1H), 2.59 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 2.41 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 1.20-1.15 (m, 9H), 1.04 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

<sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz) δ: 151.97, 151.92, 151.19, 151.11.

[0195] ポリヌクレオチドの原料となる、化合物6cの合成は下記スキームにて合成を行った。

## [化49]



## [0196] 工程1 化合物3cの合成

N-(9-((4aR, 6R, 7R, 7aS)-2, 2-di-tert-butyl-7-methoxytetrahydro-4H-furo[3, 2-d][1, 3, 2]dioxasilin-6-yl)-9H-purin-6-yl)-N-ethylbenzamide

化合物 2a (11.7 g, 22.3 mmol) をジクロロメタン (58.5 mL) に溶解し、テトラブチルアンモニウムブロミド (10.8 g, 33.4 mmol)、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (58.5 mL) を加えた。ヨウ化エチル (10.8 mL, 134 mmol) をゆっくりと滴下した。その後、室温で2 時間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した水/クロロホルム = 1/1 に加えクエンチした。有機層を水で2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をトルエンによりスラリー精製し、再度ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル = 90/10 → 70/30) にて精製することで化合物 3c (6.14 g, 11.1 mmol) を無色アモスファスとして得た。(収率49%)

ESI-MS: 計算値: 554.28 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 554.6 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.56 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.47-7.45 (m, 2H), 7.31-7.27 (m, 1H), 7.19 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 5.94 (s, 1H), 4.61 (dd, J = 9.6, 4.6 Hz, 1H), 4.46 (dd, J = 9.1, 5.0 Hz, 1H), 4.40 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 4.22 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.16 (ddd, J = 10.1, 4.9, 4.8 Hz, 1H), 4.00 (dd, J = 10.5, 9.6 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 1.34 (t, J

= 7.1 Hz, 3H), 1.09 (s, 9H), 1.05 (s, 9H).

[0197] 工程2 化合物4cの合成

N-ethyl-N-(9-((2R, 3R, 4R, 5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-methoxytetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)benzamide

化合物3c (6.14 g, 11.1 mmol) をテトラヒドロフラン(61.4 mL) に溶解し、氷浴で冷却した。トリエチルアミン (7.73 mL, 55.4 mmol)、トリエチルアミン三フッ化水素酸塩 (1.81 mL, 11.1 mmol) を加え、氷浴で冷却しながら2時間攪拌した。原料消失を確認後、トリエチルアミン (10 mL, 76.0 mmol) を加えてクエンチし、クロロホルムで希釈した後に、反応液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=100/0 → 90/10) にて精製することで化合物4c (4.60 g, 11.1 mmol) を無色アモルファスとして得た。(収率quant.)

ESI-MS: 計算値: 414.18 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 414.3 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.56 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.50-7.46 (m, 2H), 7.32-7.28 (m, 1H), 7.20 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 5.89 (dd, J = 11.6, 2.1 Hz, 1H), 5.85 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.62 (dd, J = 7.3, 4.6 Hz, 1H), 4.57-4.56 (m, 1H), 4.45-4.39 (m, 2H), 4.36-4.34 (m, 1H), 3.96 (dt, J = 12.9, 1.9, 1H), 3.80-3.73 (m, 1H), 3.29 (s, 3H), 2.70 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 1.37 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

[0198] 工程3 化合物5cの合成

N-(9-((2R, 3R, 4R, 5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxy-3-methoxytetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)-N-ethylbenzamide

化合物4c (4.58 g, 11.1 mmol) をピリジン (46 mL) に溶解し氷浴で攪拌した。反応液に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (5.63 g, 16.6 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した重曹水に加えクエンチし、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリ

カゲルカラムクロマトグラフィー（ヘプタン/酢酸エチル（1%トリエチルアミン含有） = 70/30 → 50/50）にて精製することで化合物5c（7.55 g, 10.6 mmol）を無色アモルファスとして得た。（収率95%）

ESI-MS: 計算値: 716.31 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 716.2 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.51 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.43–7.40 (m, 4H), 7.32–7.22 (m, 8H), 7.13 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 6.81 (dd, J = 9.1, 1.4 Hz, 4H), 6.14 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 5.7, 5.6 Hz, 1H), 4.41 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 4.34 (dd, J = 8.4, 4.1 Hz, 1H), 4.21–4.17 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.53 (s, 3H), 3.50 (dd, J = 10.5, 3.2 Hz, 1H), 3.39 (dd, J = 10.7, 4.3 Hz, 1H), 2.64 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

#### [0199] 工程4 アミダイト6cの合成

(2R, 3R, 4R, 5R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(6-(N-ethylbenzamido)-9H-purin-9-yl)-4-methoxytetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite

化合物5c（8.83 g, 12.3 mmol）をジクロロメタン（74 mL）に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン（4.31 mL, 24.7 mmol）を加え、氷浴で冷却した。脱水ジクロロメタン（14 mL）に溶解した 2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミジト（4.40 g, 18.6 mmol）を9分間かけて滴下した。その後、室温まで昇温しながら1時間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した飽和重曹水に加えクエンチした。酢酸エチルを加え抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘプタン/酢酸エチル（1%トリエチルアミン含有） = 70/30 → 50/50）にて精製することでアミダイト6c（10.4 g, 11.3 mmol）を無色アモルファスとして得た。（収率92%）

ESI-MS: 計算値: 916.42 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 917.3 [M+H]<sup>+</sup>

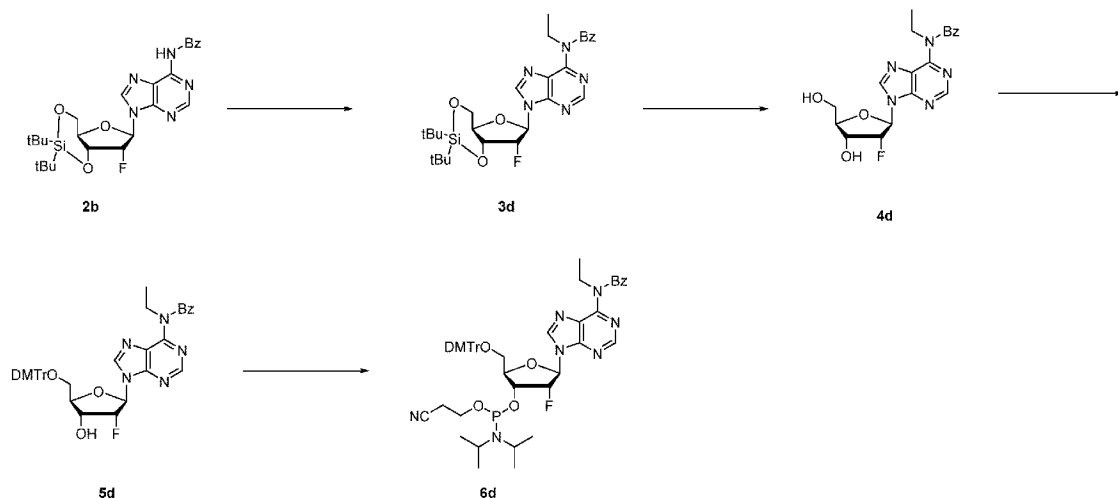
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.49 (s, 0.37H), 8.48 (s, 0.63H), 8.11 (s,

0.34H), 8.05 (s, 0.66H), 7.43–7.38 (m, 4H), 7.32–7.21 (m, 8H), 7.11 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 6.80 (m, 4H), 6.10 (m, 1H), 4.64–4.52 (m, 2H), 4.43–4.32 (m, 3H), 3.94–3.83 (m, 1H), 3.79–3.78 (m, 6H), 3.67–3.46 (m, 4H), 3.35–3.29 (m, 1H), 2.64 (t, J = 6.4 Hz, 1.3H), 2.37 (t, J = 6.4 Hz, 0.70H), 1.33 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.18 (m, 8H), 1.06 (d, J = 6.9 Hz, 4H).

$^{31}\text{P}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ , 162 MHz)  $\delta$ : 151.67, 150.92.

[0200] ポリヌクレオチドの原料となる、化合物6dの合成は下記スキームにて合成を行った。

[化50]



[0201] 工程1 化合物3dの合成

N-(9-((4aR, 6R, 7R, 7aS)-2,2-di-tert-butyl-7-fluorotetrahydro-4H-furo[3,2-d][1,3,2]dioxasilin-6-yl)-9H-purin-6-yl)-N-ethylbenzamide

化合物2b (1.00 g, 1.95 mmol) をジクロロメタン (5.0 mL) に溶解し、テトラブチルアンモニウムブロミド (0.942 g, 2.92 mmol)、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (5.0 mL) を加えた。ヨウ化メチル (0.942 mL, 11.7 mmol) をゆっくりと滴下した。その後、室温で2時間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した水/クロロホルム = 1/1 に加えクエンチした。有機層を水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、乾燥剤をろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチ

ル = 80/20 → 70/30) にて精製することで化合物3d (629 mg, 1.16 mmol) を無色アモスファスとして得た。(収率60%)

ESI-MS: 計算値: 542.26 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 542.6 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.55 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.46 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.30 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.19 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 6.09 (d, J = 22.4 Hz, 1H), 5.45 (dd, J = 54.1, 3.9 Hz, 1H), 4.86 (ddd, J = 27.2, 9.8, 4.1 Hz, 1H), 4.48 (dd, J = 9.1, 5.0, 1H), 4.40 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.04 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.11 (s, 9H), 1.05 (s, 9H).

#### [0202] 工程2 化合物4dの合成

N-ethyl-N-(9-((2R, 3R, 4R, 5R)-3-fluoro-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)benzamide

化合物4cを得る工程と同様に、化合物4dを得た。

ESI-MS: 計算値: 401.40 [M+H]<sup>+</sup>, 実測値: 402.1 [M+H]<sup>+</sup>

#### [0203] 工程3 化合物5dの合成

N-(9-((2R, 3R, 4R, 5R)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3-fluoro-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)-N-ethylbenzamide

化合物5cを得る工程と同様にして化合物5dを得た。

ESI-MS: 計算値: 738.25 [M+Cl]<sup>-</sup>, 実測値: 738.7 [M+Cl]<sup>-</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.52 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.43-7.41 (m, 2H), 7.38-7.35 (m, 2H), 7.30-7.20 (m, 8H), 7.10 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 6.79 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 6.22 (dd, J = 17.4, 2.3 Hz, 1H), 5.58 (ddd, J = 53.0, 2.4, 1.2 Hz, 1H), 4.93-4.74 (m, 1H), 4.40 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.19-4.16 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.54 (dd, J = 11.0, 3.2 Hz, 1H), 3.40 (dd, J = 10.5, 3.1 Hz, 1H), 2.23 (dd, J = 6.9, 2.3 Hz, 1H), 1.33 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

#### [0204] 工程4 アミダイト6dの合成

(2R, 3R, 4R, 5R)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(6-(N-ethylbenzamido)-9H-purin-9-yl)-4-fluorotetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite

化合物5d(1.93 g, 2.74 mmol) をジクロロメタン (16 mL) に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン (0.958 mL, 5.48 mmol) を加え、氷浴で冷却した。脱水ジクロロメタン (3.8 mL) に溶解した 2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミジト (970 mg, 4.11 mmol) を滴下した。その後、室温まで昇温しながら1 時間攪拌した。原料消失を確認後、反応液を氷冷した飽和重曹水に加えクエンチした。酢酸エチルを加え抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ別後、ろ液を濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル(1% トリエチルアミン含有) = 90/10 → 60/40) にて精製することでアミダイト6d (2.29 g, 2.53 mmol) を無色アモルファスとして得た。(収率92%)ESI-MS: 計算値: 938.36 [M+Cl]<sup>-</sup>, 実測値: 938.7 [M+Cl]<sup>-</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 8.53 (s, 0.5H), 8.51 (s, 0.5H), 8.11 (s, 1 H), 7.41-7.33 (m, 4H), 7.27-7.16 (m, 8H), 7.03 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 6.79-6.75 (m, 4H), 6.27-6.18 (m, 1H), 5.78-5.58 (m, 1H), 5.10-4.85 (m, 1H), 4.42-4.38 (m, 2H), 4.31-4.30 (m, 1H), 3.96-3.72 (m, 7H), 3.68-3.51 (m, 4H), 3.29-3.27 (m, 1H), 2.59 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 2.40 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 1.33-1.31 (m, 3H), 1.19-1.15 (m, 9H), 1.04 (d, J = 6.9 Hz, 3H).

<sup>31</sup>P-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz) δ: 151.94, 151.89, 151.20, 151.11.

[0205] RNAオリゴヌクレオチドは2'-TOM (トリイソプロピルシリルオキシメチル) 保護β-シアノエチルホスホロアミダイト (DMT-2'-O-TOM-rA(Ac)、DMT-2'-O-TOM-rG(Ac)、DMT-2'-O-TOM-rC(Ac)、DMT-2'-O-TOM-rU)(それぞれGlen Research社もしくはChemGenes社)を用い、DNAオリゴヌクレオチドはβ-シアノエチルホスホロアミダイト (DMT-dA(Bz)、DMT-dG(iBu)、DMT-dC(Ac)、DMT-T)を用いた。それぞれのホスホロアミダイトモノマーは0.05 mol/Lアセトニトリル

溶液となるように調製し、固相担体を0.2  $\mu\text{mol}$ もしくは0.8  $\mu\text{mol}$ 用いてDNA/RNA固相合成装置 (NTS M-2-MX, 日本テクノサービス社)により合成した。

DNAオリゴヌクレオチドは固相担体としてCPG 1000A (dA-CPG, dG-CPG, Ac-dC-CPG, dT-CPG)(Glen Research社)を用い、縮合時間は2分間とした。

5'末端にリン酸基を有するRNA (5'-モノリン酸RNA)は固相担体としてUniversal UnyLinker Support 2000A (ChemGenes社)を用い、1塩基目の縮合時間は15分間、それ以降は各3分間とした。5'末端の水酸基のリン酸化は化学リン酸化試薬 (0.05 mol/Lアセトニトリル溶液)(Glen Research社もしくはChemGenes社)を用いて行った。

3'-アミノグアノシンモノマーが3'末端に導入されたRNAオリゴヌクレオチドの固相合成は化合物15を用いて行った。1塩基目の縮合時間は15分間、それ以降は各3分間とした。

[0206] 固相合成装置で使用した試薬に関しては以下のものを使用した。5'末端の水酸基のジメトキシトリチル基の除去は市販のデブロッキング試薬 (Deblocking Solution-1, 3 w/v%トリクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液) (和光純薬株式会社)を用い、10秒間反応させることで行った。ホスホロアミダイトのアクチベーターとして市販のアクチベーター溶液 (アクチベーター溶液3)(和光純薬株式会社)を用いた。未反応の5'末端の水酸基のキャッピングは市販のキャッピング溶液 (キャップA溶液-2及びキャップB溶液-2)(和光純薬株式会社)を用い、10秒間反応させることで行った。リン酸エステルを製造する際の酸化剤としては、ピリジン、THF、水及びヨウ素を含有する溶液 (Oxidizer, 0.01 Mヨウ素, 29.2%水, 6.3% ピリジン, 64.5% アセトニトリル)、Honeywell社)を用い、10秒間反応させた。固相合成後、RNAオリゴヌクレオチドの5'末端の水酸基のジメトキシトリチル基は固相担体上にて脱保護した。合成したDNA及びRNAオリゴヌクレオチドは全て定法に従い脱樹脂・脱保護を行った (濃アンモニア水, 55°C, 12時間)。DNAオリゴヌクレオチドはカートリッジカラム (MicroPure II Column, LGC Biosearch Technology社)を用い製品プロトコールに従って精製した。RNAオリゴヌクレオチドは脱樹脂によって得られた溶液を

遠心エバポレーターによる濃縮により完全に乾固した後、テトラブチルアンモニウムフルオリド (1Mテトラヒドロフラン溶液)(1 mL)を用いて2' 水酸基のTOM保護基を除去した (50°C, 10分間、次いで室温にて12時間。もしくは50°C, 10分間、次いで35°Cにて6時間)。溶液にトリス塩酸緩衝液 (以下、Tris-HCl) (1M, pH7.4)(1 mL)を加えて混和した後、遠心エバポレーターによる濃縮によりテトラヒドロフランを除去した。得られた溶液を超純水によって平衡化したゲルろ過カラム (NAP-25, GE Healthcare社)を用い、製品プロトコールによって処理した。得られたRNAオリゴヌクレオチドを含む画分を遠心エバポレーターによって濃縮後、変性ポリアクリルアミドゲル (以下、dPAGE)を用いて精製した。

[0207] (dPAGEを用いたRNA断片の精製)

アクリルアミドゲル溶液 (変性剤として7M尿素を含む)に過硫酸アンモニウム (以下、APS)の水溶液とN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(以下、TEMED)を重合剤として添加し、固形化 (室温、6~12時間)させることでゲルを作製した。RNAサンプルはゲルローディングバッファー (80%ホルムアミド、TBE)と混合し、90°Cにて3分間加熱後、ゲルにロードした。電気泳動後、RNAのバンドはUV光照射 (254 nm)によって検出し、カミソリの刃を用いてゲルから切り出した。切り出したゲル片は細かく破碎した後、超純水にてゲルから抽出した (室温にて6~12時間振とう)。RNAの抽出液はAmicon Ultra 10K (Millipore社)を用いて脱塩・濃縮し、エタノール沈殿 (0.3M酢酸ナトリウム(pH5.2)/70%エタノール)を行うことでRNAのペレットを得た。RNAペレットは80%エタノールでリンス後、室温にて1時間風乾させた。得られたRNAペレットは超純水に溶解させ、適切な濃度に希釈後、紫外可視吸光度測定 (NanoDrop, Thermo scientific社)によって260 nmの吸光度を測定し、各RNA配列のモル吸光係数から濃度を決定した (各塩基のモル吸光係数として以下の数値を使用した。A = 15300, G = 11800, C = 7400, T = 9300, U = 9900)。

精製したオリゴヌクレオチドの構造決定はMALDI-TOF MS (Ultraflex III, Bruker Daltonics社)(マトリクス: 3-ヒドロキシピコリン酸)を用いた質量分

析法もしくは変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析により行った。

[0208] (dPAGEを用いたケミカルライゲーション反応の分析)

ケミカルライゲーション反応の分析においては、反応液を超純水にて適切に希釈したものをサンプルとして使用した。希釈したサンプルはゲルローディングバッファー (80%ホルムアミド/TBE)と混合し、90℃にて3分間加熱後、ゲルにロードした。電気泳動後、超純水にて10,000倍希釈したSYBR (登録商標) Green II Nucleic Acid Stain (Lonza社)を用いてゲル染色 (室温、15分間)することでRNAのバンドを検出した (使用機器 : ChemiDoc, BIORAD社)。

ケミカルライゲーション反応の収率は、RNA連結産物のバンド強度をdPAGEにて単離精製した連結産物を基準物質として比較することで算出した。

[0209] (dPAGEを用いたケミカルライゲーション産物の精製)

ケミカルライゲーション反応によって得られたRNA連結産物は、反応液からエタノール沈殿 (0.3M酢酸ナトリウム (pH5.2)/70%エタノール)によってRNAペレットとして回収後、dPAGEによって精製を行った。

[0210] 以下表1～表27-5中の各ヌクレオチドN (大文字) はRNAを、各ヌクレオチドn (小文字) はDNAを、N(M)は2'-O-メチル修飾RNAを、N(F)は2'-F化修飾RNAを、N(L)はLNAを、N(MOE)は2'-O-メトキシエチル修飾RNAを表す。Am6は塩基部がN6-メチルアデニンであることを表す。なお、DNAは、dNとして記載する場合もある。pは3'末端又は5'末端がリン酸化されていることを表す。^は糖部間をつなぐリン酸基がホスホロチオエートであることを表す。下線が引かれた「AUG」は開始コドン、下線が引かれた「UGA」又は「TGA」は終止コドンを表す。

[0211] 以下表1に、実施例1及び実施例2で用いた化合物 (ポリヌクレオチド) の配列情報を示す。

[0212] 表1 :

[表1]

化合物名	配列 (5'⇒3')	配列 番号
E1	GG(F)GAG(F)AAU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F) CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)A CG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F) AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)A CG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(F)GA	1
E1-1	GG(F)GAG(F)AAU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F) CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)AC G(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	2
E1-2	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F) ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC (F)ACU(F)GA	3
テンプレート DNA 1	cccttatcgtcgtcgtctttatagtcgatg	4
E2	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^U(M)^A (F)^C(M)^A(F)^A(M)^G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M) )C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F) )AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)U CA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F) )GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AA C(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE) )^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	5
E2-1	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^U(M)^A (F)^C(M)^A(F)^A(M)^G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M) )C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F) )AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)U CA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	6
E2-2	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG (F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)AC C(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) )^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	7

## [0213] 実施例 1 (酵素による連結)

固相合成により得られたRNA断片E1-1 (10 nmol)及び5'リン酸RNA断片E1-2 (10 nmol)、テンプレートDNA 1 (10 nmol)の超純水溶液 (200 µL、核酸終濃度; 50 µM) を3バッチ調製した。各々の調製溶液にT4 RNA Ligase 2 Reaction Buffer (10X) (New England BioLabs社製) を100 µLならびに超純水440 µLを加え90°Cにて5分間加熱後、30分間以上かけて室温に戻した。この各々の溶液に60% PEG6000水溶液を終濃度15%となるように加えた。この溶液にT4 RNA Ligase 2 (New England BioLabs社製) (10 units/µL)(10 µL)を加えて

混合した後、温度制御されたヒートブロック上に静置した(37 °C、16時間)。反応液に同体積のクロロホルムを加えてボルテックスにより混合、遠心分離後、上層をとりアルコール沈殿(0.3M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH 5.2)/70%エタノール)によってRNAのペレットを得た。各々のバッチで得られたRNAをまとめ、7.5%変性ポリアクリルアミドゲルによって精製することでRNA連結産物 E 1(9.7 nmol, 収率32%)を得た。

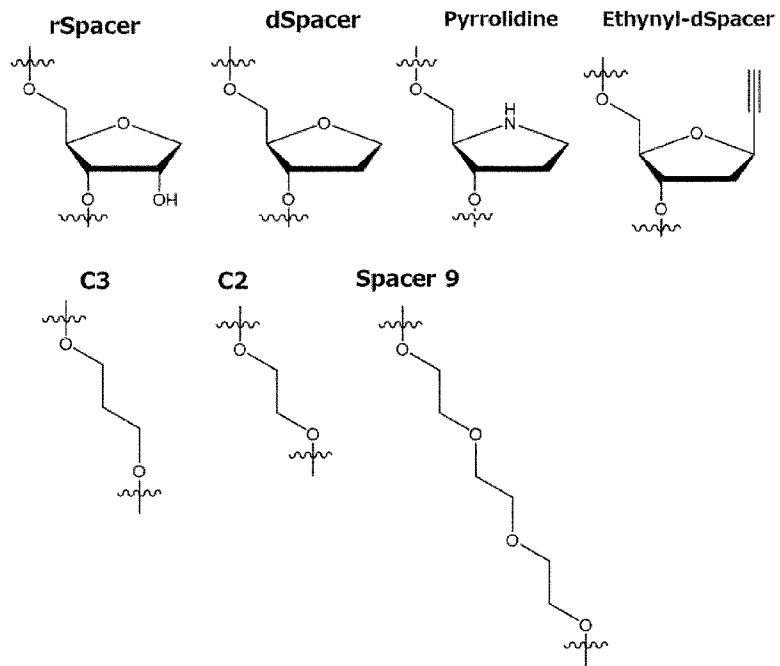
[0214] 実施例 2 (化学反応による連結)

固相合成により得られた3' リン酸RNA断片E2-1 (10 nmol) ならびに配列 7 として得られたRNA断片E2-2 (10 nmol)、テンプレートDNA 1 (20 nmol) の核酸混合溶液に、1M塩化ナトリウム水溶液と超純水を加えて、100mM 塩化ナトリウム水溶液 (180  $\mu$ L) を調製した。調製溶液を90°Cにて5分間加熱後、30分間以上かけて室温に戻した。この溶液に100mM 塩化亜鉛 (II) 水溶液を終濃度5mMとなるように加えた。この溶液に100mM 1H-イミダゾール-1-カルボニトリル (Apollo Scientific社製) /DMSO溶液を終濃度5mMとなるように加えて混合した後、温度制御されたヒートブロック上に静置した(30 °C、20時間)。反応液に2Mトリエチルアミン・酢酸 (TEAA) 溶液を50  $\mu$ L加えて、NAP-10 Columns (cytiva社製)を用いて簡易精製を行い、A260の吸収波長のあるフラクション画分を遠心濃縮あるいは凍結乾燥した。簡易精製にて得られた粗生成物RNAをまとめ、7.5%変性ポリアクリルアミドゲルによって精製することでRNA連結産物E2 (2.5 nmol, 収率25%)を得た。

[0215] 実施例 3

以下表 2 - 1 ~ 2 - 6 0 中のrSpacer、dSpacer、Pyrrolidine、Ethynyl-dSpacer、C3、C2及びSpacer9はヌクレオチドの糖部の代替りのスペーサー修飾は下図構造である。

[化51]



[0216] 以下表 2-1 ~ 表 2-60 に、実施例 3 で用いた化合物（ポリヌクレオチド）の配列情報及びその合成法を示す。以下表 3-1 ~ 3-14 に、実施例 3 の化合物（ポリヌクレオチド）の収率(%)及びMS(実測値)を示す。

なお、MS(実測値)は、Agilent Technologies社のLC (1260 Infinity II) / MSD XT (G6135B)を用いて測定した。

表 2-1 ~ 表 2-60 :

[0217]

[表2-1]

化合物名	合成法	配列(5'⇒3')	配列番号
E3	実施例 1 と同様	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGACUACAAGGACGACGA CGACAAGAUCAUCGACUAAAAGACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGA CGACGACAAACACCACCACCACCACUGA	8
E3-1	固相合成	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGACUACAAGGACGACGA CGACAAGAUCAUCGACUAAAAG	9
E3-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACC ACCACUGA	10
E4	実施例 1 と同様	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGACUACAAGGACGACGA CGACAAGAUCAUCGACUAAAAGACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGA CGACGACAAACACCACCACCACCACUGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	11
E4-1	固相合成	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGACUACAAGGACGACGA CGACAAGAUCAUCGACUAAAAG	12
E4-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACC ACCACUGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	13
E5	実施例 1 と同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGG( F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F) AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F) ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G( M)A(M)	14
E5-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGG( F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F) AUA(F)AAG	15
E5-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	16
E6	実施例 1 と同様	G(F)G(M)G(F)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U( M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F) C(M)C(F)AUGGACUACAAGGACGACGACGACAAAGAUCAUCGACUUAAGGACGACGAC GAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACCACUGA	17
E6-1	固相合成	G(F)G(M)G(F)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U( M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F) C(M)C(F)AUGGACUACAAGGACGACGACGACAAAGAUCAUCGACUUAAG	18

[表2-2]

E6-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUAUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACC ACCACUGA	19
E7	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCGACUAUAAAGACGACGACGAUAAAGGUGG CGACUAUAAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACCACCACU(M)G(M)A(M)AAAA AAAAAAAAAAAAAAAA	20
E7-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCGACUAUAAAG	21
E7-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUAUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACC ACCACU(M)G(M)A(M)AAAAAAAAAAAAAAAA	22
E8	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCGACUAUAAAGACGACGACGAUAAAGGUGG CGACUAUAAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACCACCACU(M)G(M)A(M)A(M)A (M)AA(M)A(M)AA(M)AA(M)A(F)AA(M)AAA(F)AA(M)AAA(F)	23
E8-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCGACUAUAAAG	24
E8-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUAUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACC ACCACU(M)G(M)A(M)A(M)A(M)AA(M)A(M)AA(M)AA(M)A(F)AA(M)AAA(F)AA(M)AA A(F)	25
E9	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCGACUAUAAAGACGACGACGAUAAAGGUGG CGACUAUAAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACCACCACU(M)G(M)A(M)AAA(M )AA(F)A(F)AAA(M)A(F)A(F)A(F)A(M)AA(F)A(M)A(M)A(F)A(F)A(M)	26
E9-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCGACUAUAAAG	27
E9-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUAUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACC ACCACU(M)G(M)A(M)AAA(M)AA(F)A(F)AAA(M)A(F)A(F)A(F)A(M)AA(F)A(M)A(M)A (F)A(F)A(M)	28
E10	実施例 1 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGC AGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA (F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU (F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F) ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A(MOE)	29

[表2-3]

E10-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGC AGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA( F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	30
E10-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A (MOE)	31
E11	実施例 1と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGC AGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA( F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU( F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F) ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A(MOE)AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	32
E11-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGC AGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA( F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	33
E11-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A (MOE)AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	34
E12	実施例 1と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)AC U(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC( F)ACC(F)ACU(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA (MOE)^A(MOE)^A(MOE)	35
E12-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	36
E12-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)^G(MOE) ^A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	37
E13	実施例 1と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGG( F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F) AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F) ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G( M)A(M)AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	38



[表2-5]

E16	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGG( F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F) AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F) ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G( M)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M) A(F)A(M)A(F)A(M)	47
E16-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGG( F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F) AUA(F)AAG	48
E16-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)A( F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M)A(F)A(M) A(F)A(M)	49
E17	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGG( F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F) AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F) ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G( M)A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) )^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)	50
E17-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGG( F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F) AUA(F)AAG	51
E17-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)^ A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^ A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)	52
E18	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)C( M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCACCA UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)A CU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)A GG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU (M)G(M)A(M)	53

[表2-6]

E18-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	54
E18-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	55
E19	実施例 1 と同様	G(M)G(M)G(M)Am6(M)G(M)Am6(M)Am6(M)U(M)Am6(M)C(M)Am6(M)Am6(M)G(M)C(M)U(M)Am6(M)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)Am6(M)GCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	56
E19-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)Am6(M)G(M)Am6(M)Am6(M)U(M)Am6(M)C(M)Am6(M)Am6(M)G(M)C(M)U(M)Am6(M)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)Am6(M)GCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	57
E19-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	58
E20	実施例 1 と同様	G(M)G(M)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(F)U(M)Am6(F)C(M)Am6(F)Am6(F)G(M)C(M)U(M)Am6(F)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)Am6(F)GCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	59
E20-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(F)U(M)Am6(F)C(M)Am6(F)Am6(F)G(M)C(M)U(M)Am6(F)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)Am6(F)GCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	60
E20-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	61

[表2-7]

E21	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(F)UAm6(F)CAm6(F)Am6(F)GCUAm6(F)C UUGUUCUUUUUGCAm6(F)GCCAm6(F)CCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AU A(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC( F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	62
E21-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(F)UAm6(F)CAm6(F)Am6(F)GCUAm6(F)C UUGUUCUUUUUGCAm6(F)GCCAm6(F)CCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	63
E21-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	64
E22	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(F)U(F)Am6(F)CAm6(F)Am6(F)GC(F)UAm 6(F)C(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAm6(F)G(F)CCAm6(F)CCAUGG(F)ACU(F) ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)A AGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	65
E22-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(F)U(F)Am6(F)CAm6(F)Am6(F)GC(F)UAm 6(F)C(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAm6(F)G(F)CCAm6(F)CCAUGG(F)ACU(F) ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)A AG	66
E22-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	67
E23	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)C( M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)G(M)C(M) C(M)A(M)C(M)C(M)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AG A(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GC G(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC( F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	68
E23-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)C( M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)G(M)C(M) C(M)A(M)C(M)C(M)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AG A(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	69
E23-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	70

[表2-8]

E24	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)Am6(M)G(M)Am6(M)Am6(M)U(M)Am6(M)C(M)Am6(M)Am6(M)G(M)C(M)U(M)Am6(M)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)Am6(M)G(M)C(M)C(M)Am6(M)C(M)C(M)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)A(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	71
E24-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)Am6(M)G(M)Am6(M)Am6(M)U(M)Am6(M)C(M)Am6(M)Am6(M)G(M)C(M)U(M)Am6(M)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)Am6(M)G(M)C(M)C(M)Am6(M)C(M)C(M)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	72
E24-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	73
E25	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(F)U(M)Am6(F)C(M)Am6(F)Am6(F)G(M)C(M)U(M)Am6(F)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)Am6(F)G(M)C(M)C(M)Am6(F)C(M)C(M)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	74
E25-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(F)U(M)Am6(F)C(M)Am6(F)Am6(F)G(M)C(M)U(M)Am6(F)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)Am6(F)G(M)C(M)C(M)Am6(F)C(M)C(M)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	75
E25-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	76
E26	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCGACUAUAAAAGACGACGACGAUAAAAGGUGG CGACUAUAAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACCACCU(M)G(M)A(M)A(F)A(M)AA(F)AA(F)A(F)A(M)AA(F)AA(M)AAA(M)A(M)A(M)A(F)A(F)A	77
E26-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCGACUAUAAAAG	78
E26-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAAGGUGGCGACUAUAAAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACC ACCACU(M)G(M)A(M)A(F)A(M)AA(F)AA(F)A(F)A(M)AA(F)AA(M)AAA(M)A(M)A(M)A(F)A(F)A	79

[表2-9]

E27	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCUAGCUCUAAAGACGACGACGUAUAAAGGUGG CGACUUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACCACCACU(M)G(M)A(M)AA(M) A(M)A(F)A(F)AA(F)A(F)AA(F)A(F)A(M)A(F)A(F)AA(F)AAA(M)A(M)	80
E27-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCUAGCUCUAAAG	81
E27-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGACGACGACAACACCACCACCACC ACCACU(M)G(M)A(M)AA(M)A(M)A(F)A(F)AA(F)A(F)AA(F)A(F)A(M)A(F)A(F)AA(F) AAA(M)A(M)	82
E28	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCUAGCUCUAAAGACGACGACGUAUAAAGGUGG CGACUUAAGGACGACGACGACAACACCACCACCACCACCACU(M)G(M)A(M)A(F)A( F)A(F)A(F)AA(F)A(M)A(M)AAA(F)A(F)AA(F)AA(M)A(F)AA(M)	83
E28-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCUAGCUCUAAAG	84
E28-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGACGACGACAACACCACCACCACC ACCACU(M)G(M)A(M)A(F)A(F)A(F)A(F)AA(F)A(M)A(M)AAA(F)A(F)AA(F)AA(M )A(F)AA(M)	85
E29	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCUAGCUCUAAAGACGACGACGUAUAAAGGUGG CGACUUAAGGACGACGACGACAACACCACCACCACCACCACU(M)G(M)A(M)AAA(M) A(M)A(M)AA(F)A(M)AA(F)A(M)AA(M)AAAA(M)A(M)A	86
E29-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGA CUACAAGGACGACGACGACAAGAUCUAGCUCUAAAG	87
E29-2	固相合成	pACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGACGACGACAACACCACCACCACC ACCACU(M)G(M)A(M)AAA(M)A(M)A(M)AA(F)A(M)AA(F)A(M)AA(M)AAAA(M)A(M) A	88
E30	固相合成	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGACUUAAGGACGACGA CGACAAGGUGGCCACCACCACCACCACCACUGA	89
E31	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGC AGCCACCAUGGACUUAAGGACGACGACGACAAGGUGGCCACCACCACCACCACCAC U(MOE)G(MOE)A(MOE)	90

[表2-10]

E32	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U (M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F )C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA( F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU( F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F) ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	91
E32-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U (M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F )C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA( F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	92
E32-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	93
E33	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F) )U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M) A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)U CA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)A CU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC (F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	94
E33-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F) )U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M) A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)U CA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	95
E33-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	96
E34	実施例 1 と 同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)C( M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C( M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F )UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F )ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)A CC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	97
E34-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)C( M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C( M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F )UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	98

[表2-11]

E34-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	99
E35	実施例 1 と同様	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AG(A)(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	100
E35-1	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M)C(M)U(M)A(M)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AG(A)(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	101
E35-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	102
E36	実施例 1 と同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(MOE)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AG(A)(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A(MOE)	103
E36-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(MOE)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AG(A)(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	104
E36-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A(MOE)	105
E37	実施例 1 と同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(MOE)U(MOE)A(MOE)C(MOE)A(MOE)A(MOE)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AG(A)(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A(MOE)	106



[表2-13]

E39-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A(MOE)	114
E40	実施例 1 と同様	G(F)G(MOE)G(F)A(MOE)G(F)A(MOE)A(F)U(MOE)A(F)C(MOE)A(F)A(MOE)G(F)C(MOE)U(F)A(MOE)C(F)U(MOE)U(F)G(MOE)U(F)U(MOE)C(F)U(MOE)U(F)U(MOE)U(F)U(MOE)G(F)C(MOE)A(F)G(MOE)C(F)C(MOE)A(F)C(MOE)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	115
E40-1	固相合成	G(F)G(MOE)G(F)A(MOE)G(F)A(MOE)A(F)U(MOE)A(F)C(MOE)A(F)A(MOE)G(F)C(MOE)U(F)A(MOE)C(F)U(MOE)U(F)G(MOE)U(F)U(MOE)C(F)U(MOE)U(F)U(MOE)U(F)U(MOE)G(F)C(MOE)A(F)G(MOE)C(F)C(MOE)A(F)C(MOE)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	116
E40-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	117
E41	実施例 1 と同様	G(MOE)G(M)G(MOE)A(M)G(MOE)A(M)A(MOE)U(M)A(MOE)C(M)A(MOE)A(M)G(MOE)C(M)U(MOE)A(M)C(MOE)U(M)U(MOE)G(M)U(MOE)U(M)C(MOE)U(M)U(MOE)U(M)U(MOE)U(M)G(MOE)C(M)A(MOE)G(M)C(MOE)C(M)A(MOE)C(M)C(MOE)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	118
E41-1	固相合成	G(MOE)G(M)G(MOE)A(M)G(MOE)A(M)A(MOE)U(M)A(MOE)C(M)A(MOE)A(M)G(MOE)C(M)U(MOE)A(M)C(MOE)U(M)U(MOE)G(M)U(MOE)U(M)C(MOE)U(M)U(MOE)U(M)U(MOE)U(M)G(MOE)C(M)A(MOE)G(M)C(MOE)C(M)A(MOE)C(M)C(MOE)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	119
E41-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	120

[表2-14]

E42	実施例 1 と 同様	G(F)G(M)G(F)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	121
E42-1	固相合成	G(F)G(M)G(F)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	122
E42-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	123
E43	実施例 1 と 同様	G(F)^G(M)^G(F)^A(M)^G(F)^A(M)^A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	124
E43-1	固相合成	G(F)^G(M)^G(F)^A(M)^G(F)^A(M)^A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	125
E43-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	126
E44	実施例 1 と 同様	G(F)^G(M)^G(F)^A(M)^G(F)^A(M)^A(F)^U(M)^A(F)^C(M)^A(F)^A(M)^G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(M)G(M)A(M)	127
E44-1	固相合成	G(F)^G(M)^G(F)^A(M)^G(F)^A(M)^A(F)^U(M)^A(F)^C(M)^A(F)^A(M)^G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	128



[表2-16]

E48	GeneDesi gn社より 購入	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)UUGUUCUUU(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)G(F)C(M)C(F)A(M)C( F)C(M)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F) UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F) AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)AC C(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	137
E49	GeneDesi gn社より 購入	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)U(M)G(F)U(M)U(F)C(M)U(F)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M) )A(M)GCCA(M)CCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA (F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG (F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F) ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	138
E50	GeneDesi gn社より 購入	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)U(M)G(F)U(M)U(F)C(M)U(F)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C(M) )A(M)G(F)C(M)C(F)A(M)C(F)C(M)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)AC G(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AA G(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC( F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	139
E51	実施例 1 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)U(rSpacer)G(F)U(rSpacer)U(F)C(rSpacer)U(F)U(rSpacer) U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M)CCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)A UA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AA C(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	140
E51-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)U(rSpacer)G(F)U(rSpacer)U(F)C(rSpacer)U(F)U(rSpacer) U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M)CCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	141
E51-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A( MOE)	142

[表2-17]

E52	実施例 1 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)UUGUUCUUU(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)G(MOE)C(MOE)C(M OE)A(M)C(MOE)C(MOE)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA( F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG( F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	143
E52-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)UUGUUCUUU(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)G(MOE)C(MOE)C(M OE)A(M)C(MOE)C(MOE)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA( F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	144
E52-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A( MOE)	145
E53	実施例 1 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)AC U(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC( F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(M OE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A (MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	146
E53-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	147
E53-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE) ^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MO E)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A( MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	148

[表2-18]

E54	実施例 1 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)AC U(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC( F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A( M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A( MOE)^A(MOE)^A(MOE)	149
E54-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	150
E54-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE) ^A(MOE)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M) ^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M) ^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)	151
E55	実施例 1 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)AC U(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC( F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	152
E55-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	153
E55-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE) ^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)	154

[表2-19]

E56	実施例 1 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F) )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M) A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG (F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG (F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) )^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) )^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	155
E56-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F) )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M) A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG (F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	156
E56-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE) ^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	157
E57	実施例 1 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(M)^U(M)^A(M)^C(M) ^A(M)^A(M)^G(M)^C(M)^U(M)^A(M)^C(M)UUGUUCUUU(M)^U(M)^U(M)^G(M) )^C(M)^A(M)GCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F) AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F) GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)AC C(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE) ^A(MOE)^A(MOE)	158
E57-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(M)^U(M)^A(M)^C(M) ^A(M)^A(M)^G(M)^C(M)^U(M)^A(M)^C(M)UUGUUCUUU(M)^U(M)^U(M)^G(M) )^C(M)^A(M)GCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F) AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	159
E57-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE) ^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	160

[表2-20]

E58	実施例 1 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGC AGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA( F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU( F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F) ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAA	161
E58-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGC AGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA( F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	162
E58-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A( MOE)AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	163
E59	実施例 1 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)AC U(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC( F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	164
E59-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UC A(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	165
E59-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE) ^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	166









[表2-25]

E68-2	固相合成	ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^A GG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^AC C(F)^ACC(F)^ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(MOE)^A( MOE)^A(MOE)	191
E69	実施例 1 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C( M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F )G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F) ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F) GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)A CC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A(MOE)AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	192
E69-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C( M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F )G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F) ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	193
E69-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)G(MOE)A (MOE)AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	194
E70	実施例 1 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M) A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG (F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG( F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA( F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	195
E70-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M) A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG (F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	196
E70-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACU(MOE)^G(MOE) ^A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	197

[表2-26]

E71	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F) )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M) A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)A CG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE) G(MOE)A(MOE)	198
E72	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F) )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)(rSpacer)G(M)(rSpacer)U(M)(rSpacer)U(M)(rSpacer)U(M) )U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AG G(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC( F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	199
E73	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F) )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)(dSpacer)G(M)(dSpacer)U(M)(dSpacer)U(M) (dSpacer)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU (F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F) )ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	200
E74	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F) )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)(C3)G(M) (C3)U(M)(C3)U(M)(C3)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A( F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	201
E75	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F) )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)(Pyrrolidine)G(M) (Pyrrolidine)U(M)(Pyrrolidine)U(M)(Pyrrolidine)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M) C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AC A(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A (MOE)	202
E76	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F) )C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)(Ethynyl-dSpacer)G(M)(Ethynyl-dSpacer)U(M)(Ethynyl- dSpacer)U(M)(Ethynyl- dSpacer)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU( F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	203







[表2-30]

E84-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	223
E85	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUAACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F )GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	224
E86	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)(rSpacer)G(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer)U(M)U (M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG( F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MO E)G(MOE)A(MOE)	225
E87	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)UG(F)UU(F)CU(F)UU(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M )CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F) GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	226
E88	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F )C(M)U(F)A(M)C(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer)C(F)(rSpacer)U(F)U(M)U (F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG( F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F) ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	227
E89	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)(rSpacer)C(M)(rSpace r)A(M)(rSpacer)C(M)(rSpacer)A(M)C(F)U(M)(rSpacer)G(M)(rSpacer)U(M)(rSpacer )U(M)(rSpacer)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG( F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	228
E90	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F )C(M)U(F)A(M)C(F)(rSpacer)(rSpacer)(rSpacer)(rSpacer)(rSpacer)(rSpa cer)(rSpacer)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F) ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)A CC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	229



[表2-32]

E95-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	236
E96	固相合成	GGG(MOE)^AG(MOE)^A(MOE)^AU(M)^A(F)^C(M)^A(F)^AG(F)^CU(F)^A(M)^CUUGUU(M)^CUUUUG(F)^C(M)^AG(M)^C(F)^C(M)^A(F)^C(M)^CAUGGACUUAAGGACGACGACGACAAAGGUGGCCACCACCACCACCACUGA	237
E97	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGACUUAAGGACGACGACGACAAAGGUGGCCACCACCACCACCACCACUGA	238
E98	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)UG(M)UU(M)CU(M)UU(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	239
E99	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)	240
E100	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)	241
E101	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^U(M)^A(F)^C(M)^A(F)^A(M)^G(F)^C(M)^U(F)^A(M)^C(F)^U(M)^U(F)^G(M)^U(F)^U(M)^C(F)^U(M)^U(F)^U(M)^G(F)^C(M)^U(M)^U(F)^U(M)^G(F)^C(M)^A(F)^G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)	242

[表2-33]

E102	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^U(M)^A(F)^C(M)^A(F)^A(M)^G(F)^C(M)^U(F)^A(M)^C(F)^U(M)^U(F)^G(M)^U(F)^U(M)^C(F)^U(M)^U(F)^U(M)^U(F)^U(M)^G(F)^C(M)^A(F)^G(M)^C(F)^C(M)^A(F)^C(M)^C(F)^A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)	243
E103	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)^C(F)^C(M)^A(F)^C(M)^C(F)^A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)	244
E104	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(rSpacer)AC(rSpacer)AG(rSpacer)UA(rSpacer)UU(rSpacer)UU(rSpacer)UU(rSpacer)UUGCAGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	245
E105	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUGC A(rSpacer)CC(rSpacer)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	246
E106	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(dSpacer)AC(dSpacer)AG(dSpacer)UA(dSpacer)UU(dSpacer)UU(dSpacer)UU(dSpacer)UUGCAGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	247
E107	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUGC A(dSpacer)CC(dSpacer)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	248
E108	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(C3)AC(C3)AG(C3)UA(C3)UU(C3)UU(C3)UU(C3)UUGCAGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	249
E109	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUGC A(C3)CC(C3)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	250

[表2-34]

E110	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	251
E111	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUA(F)CAA(F)GCU(F)ACU(F)UGU(F)UCU(F)UUU(F)UGC(F)AGC(F)CAC(F)CA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	252
E112	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)UAC(F)AAG(F)CUA(F)CUU(F)GUUU(F)CUU(F)UUU(F)GCA(F)GCC(F)ACC(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	253
E113	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(M)ACA(M)AGC(M)UAC(M)UUG(M)UUC(M)UUU(M)UUG(M)CAG(M)CCA(M)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	254
E114	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUA(M)CAA(M)GCU(M)ACU(M)UGU(M)UCU(M)UUU(M)UGC(M)AGC(M)CAC(M)CA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	255
E115	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)UAC(M)AAG(M)CUA(M)CUU(M)GUU(M)CUU(M)UUU(M)GCA(M)GCC(M)ACC(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	256
E116	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AtAcCaAgcUAcUUGUcUUtUUGcAgCCaCCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	257
E117	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUaCaGctActUGtUctUUtUGcAgcCAcCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	258
E118	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)aUAcAagCUaCUtGUtCUtUUtGCaGcAcCa(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	259

[表2-35]

E119	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AT(MOE)ACA(MOE)AGC(MOE)UAC(MOE)UUG(MOE)UUC(MOE)UUT(MOE)UUG(MOE)CAG(MOE)CCA(MOE)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	260
E120	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AT(L)ACA(L)AGC(L)UAC(L)UUG(L)UUC(L)UUT(L)UUG(L)CAG(L)CCA(L)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	261
E121	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(rSpacer)AC(rSpacer)AG(rSpacer)UA(rSpacer)UU(rSpacer)UU(rSpacer)UU(rSpacer)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	262
E122	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CA(rSpacer)CC(rSpacer)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	263
E123	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(dSpacer)AC(dSpacer)AG(dSpacer)UA(dSpacer)UU(dSpacer)UU(dSpacer)UU(dSpacer)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	264
E124	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(C3)AC(C3)AG(C3)UA(C3)UU(C3)UU(C3)UU(C3)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	265
E125	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)A(F)CA(F)A(F)GC(F)U(F)AC(F)U(F)UG(F)U(F)UC(F)U(F)UU(F)U(F)UG(F)C(F)AG(F)C(F)CA(F)C(F)CA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	266
E126	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)A(M)CA(F)A(M)GC(F)U(M)AC(F)U(M)UG(F)U(M)UC(F)U(M)UU(F)U(M)UG(F)C(M)AG(F)C(M)CA(F)C(M)CA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	267

[表2-36]

E127	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(F)AC(F)A(F)AG(F)C(F)UA(F) C(F)UU(F)G(F)UU(F)C(F)UU(F)U(F)UU(F)G(F)CA(F)G(F)CC(F)A(F)CC(F)A(F)UGG( F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	268
E128	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(F)AC(M)A(F)AG(M)C(F)UA( M)C(F)UU(M)G(F)UU(M)C(F)UU(M)U(F)UU(M)G(F)CA(M)G(F)CC(M)A(F)CC(M)A(F )UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	269
E129	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(F)A(M)C(F)A(F)A(M)G(F)C(F) )U(M)A(F)C(F)U(M)U(F)G(F)U(M)U(F)C(F)U(M)U(F)U(F)U(M)U(F)G(F)C(M)A(F)G( F)C(M)C(F)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)A CA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE) A(MOE)	270
E130	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(F)A(M)C(M)A(F)A(M)G(M)C (F)U(M)A(M)C(F)U(M)U(M)G(F)U(M)U(M)C(F)U(M)U(M)U(F)U(M)U(M)G(F)C(M)A( M)G(F)C(M)C(M)A(F)C(M)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)AC G(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G( MOE)A(MOE)	271
E131	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(F)A(F)C(M)A(F)A(F)G(M)C( F)U(F)A(M)C(F)U(F)U(M)G(F)U(F)U(M)C(F)U(F)U(M)U(F)U(F)U(M)G(F)C(F)A(M)G (F)C(F)C(M)A(F)C(F)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F) ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE )A(MOE)	272
E132	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(F)A(F)C(F)A(F)A(F)G(F)C(F) U(F)A(F)C(F)U(F)U(F)G(F)U(F)U(F)C(F)U(F)U(F)U(F)U(F)U(F)G(F)C(F)A(F)G(F)C( F)C(F)A(F)C(F)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F) AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MO E)	273
E133	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(M)A(F)CA(M)A(F)GC(M)U(F)AC (M)U(F)UG(M)U(F)UC(M)U(F)UU(M)U(F)UG(M)C(F)AG(M)C(F)CA(M)C(F)CA(F)UG G(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC( F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	274

[表2-37]

E134	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(M)A(M)CA(M)A(M)GC(M)U(M)A C(M)U(M)UG(M)U(M)UC(M)U(M)UU(M)U(M)UG(M)C(M)AG(M)C(M)CA(M)C(M)CA( F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	275
E135	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)AC(F)A(M)AG(F)C(M)UA( F)C(M)UU(F)G(M)UU(F)C(M)UU(F)U(M)UU(F)G(M)CA(F)G(M)CC(F)A(M)CC(F)A(F) UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)A CC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	276
E136	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)AC(M)A(M)AG(M)C(M)UA (M)C(M)UU(M)G(M)UU(M)C(M)UU(M)U(M)UU(M)G(M)CA(M)G(M)CC(M)A(M)CC(M )A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GC C(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	277
E137	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(M)C(F)A(M)A(M)G(F)C( M)U(M)A(F)C(M)U(M)U(F)G(M)U(M)U(F)C(M)U(M)U(F)U(M)U(M)U(F)G(M)C(M)A( F)G(M)C(M)C(F)A(M)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)AC G(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G( MOE)A(MOE)	278
E138	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)U(M)U(M)G(M)U(M)U(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)G(M)C( M)A(M)G(M)C(M)C(M)A(M)C(M)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG (F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(M OE)G(MOE)A(MOE)	279
E139	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(F)C(M)A(M)A(F)G(M)C (M)U(F)A(M)C(M)U(F)U(M)G(M)U(F)U(M)C(M)U(F)U(M)U(M)U(F)U(M)G(M)C(F)A( M)G(M)C(F)C(M)A(M)C(F)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)AC G(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G( MOE)A(MOE)	280
E140	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(F)A(M)A(F)G(F)C( M)U(F)A(F)C(M)U(F)U(F)G(M)U(F)U(F)C(M)U(F)U(F)U(M)U(F)U(F)G(M)C(F)A(F)G (M)C(F)C(F)A(M)C(F)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F) ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE )A(MOE)	281

[表2-38]

E141	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)(rSpacer)A(M)C(M)(rSpacer)A(M)G(M)(rSpacer)U(M)A(M)(rSpacer)U(M)U(M)(rSpacer)U(M)U(M)(rSpacer)U(M)U(M)(rSpacer)U(M)U(M)G(F)C(M)A(M)G(F)C(M)C(M)A(F)C(M)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	282
E142	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)(rSpacer)A(F)C(M)(rSpacer)A(F)G(M)(rSpacer)U(F)A(M)(rSpacer)U(F)U(M)(rSpacer)U(F)U(M)(rSpacer)U(F)U(M)(rSpacer)U(F)U(M)G(F)C(F)A(M)G(F)C(F)C(M)A(F)C(F)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	283
E143	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)(dSpacer)A(F)C(M)(dSpacer)A(F)G(M)(dSpacer)U(F)A(M)(dSpacer)U(F)U(M)(dSpacer)U(F)U(M)(dSpacer)U(F)U(M)(dSpacer)U(F)U(M)G(F)C(F)A(M)G(F)C(F)C(M)A(F)C(F)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	284
E144	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)(C3)A(F)C(M)(C3)A(F)G(M)(C3)U(F)A(M)(C3)U(F)U(M)(C3)U(F)U(M)(C3)U(F)U(M)(C3)U(F)U(M)G(F)C(F)A(M)G(F)C(F)C(M)A(F)C(F)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	285
E145	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(F)A(M)C(M)A(F)A(M)G(M)C(F)U(M)A(M)C(F)U(M)U(M)G(F)U(M)U(M)C(F)U(M)U(M)U(F)U(M)U(M)G(F)C(M)A(M)G(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	286
E146	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(F)A(F)C(M)A(F)A(F)G(M)C(F)U(F)A(M)C(F)U(F)U(M)G(F)U(F)U(M)C(F)U(F)U(M)U(F)U(F)U(M)G(F)C(F)A(M)G(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	287
E147	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)C(M)C(M)A(F)C(M)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	288

[表2-39]

E148	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)C(F)C(M)A(F)C(F)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	289
E149	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(F)A(M)C(M)A(F)A(M)G(M)C(F)U(M)A(M)C(F)U(M)U(M)G(F)U(M)U(M)C(F)U(M)U(M)U(F)U(M)U(M)G(F)C(M)A(M)GC(F)CAC(F)CA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	290
E150	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(F)A(F)C(M)A(F)A(F)G(M)C(F)U(F)A(M)C(F)U(F)U(M)G(F)U(F)U(M)C(F)U(F)U(M)U(F)U(F)U(M)G(F)C(F)A(M)GC(F)CAC(F)CA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	291
E151	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(F)A(M)C(M)A(F)A(M)G(M)C(F)U(M)A(M)C(F)U(M)U(M)G(F)U(M)U(M)C(F)U(M)U(M)U(F)U(M)U(M)G(F)C(M)A(M)GCC(F)ACC(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	292
E152	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(F)A(F)C(M)A(F)A(F)G(M)C(F)U(F)A(M)C(F)U(F)U(M)G(F)U(F)U(M)C(F)U(F)U(M)U(F)U(F)U(M)G(F)C(F)A(M)GCC(F)ACC(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	293
E153	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)atA(M)caA(M)gcU(M)acU(M)tgU(M)tcU(M)ttU(M)tgC(M)agC(M)caC(M)ca(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	294
E154	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)ta(M)C(M)aA(M)G(M)cU(M)A(M)cU(M)U(M)gU(M)U(M)cU(M)U(M)tu(M)U(M)gC(M)A(M)gC(M)C(M)aC(M)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	295
E155	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)taC(M)aaG(M)ctA(M)ctU(M)gtU(M)ctU(M)ttU(M)gcA(M)gcC(M)acC(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	296

[表2-40]

E156	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)atacaagctactgttcttttgcagccaccA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	297
E157	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)aU(M)A(M)cA(M)A(M)gC(M)U(M)aC(M)U(M)tG(M)U(M)tC(M)U(M)tU(M)U(M)tG(M)C(M)aG(M)C(M)cA(M)C(M)cA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	298
E158	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)aC(M)A(M)aG(M)C(M)tA(M)C(M)tU(M)G(M)tU(M)C(M)tU(M)U(M)tU(M)G(M)cA(M)G(M)cC(M)A(M)cC(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	299
E159	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)aU(M)acA(M)agC(M)taC(M)ttG(M)ttC(M)ttU(M)ttG(M)caG(M)ccA(M)ccA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	300
E160	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)ta(M)C(M)aA(M)G(M)cU(M)A(M)cU(M)U(M)gU(M)U(M)cU(M)U(M)tU(M)U(M)gC(M)A(M)G(F)C(M)C(M)A(F)C(M)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	301
E161	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)taC(M)aaG(M)ctA(M)ctU(M)gtU(M)ctU(M)ttU(M)gcA(M)G(F)C(F)C(M)A(F)C(F)C(M)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	302
E162	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)ta(M)C(M)aA(M)G(M)cU(M)A(M)cU(M)U(M)gU(M)U(M)cU(M)U(M)gU(M)U(M)gC(M)A(M)G(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	303
E163	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)taC(M)aaG(M)ctA(M)ctU(M)gtU(M)ctU(M)ttU(M)gcA(M)G(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	304

[表2-41]

E164	実施例 1 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)U(rSpacer)G(F)U(rSpacer)U(F)C(rSpacer)U(F)U(rSpacer) U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M)CCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAGACGACG(F)ACG(F)A UA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AA C(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)AAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	305
E164-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)G(M) C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)U(rSpacer)G(F)U(rSpacer)U(F)C(rSpacer)U(F)U(rSpacer) U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M)CCAUGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG	306
E164-2	固相合成	pACGACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A( MOE)AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	307
E165	実施例 2 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCU UUUUGCAGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F) AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)G UG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)AC C(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^ A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^ A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	308
E165-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCU UUUUGCAGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F) AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	309
E165-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	310

[表2-42]

E166	実施例 2 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCU UUUUGCAGCCACCA(F)^UGG(F)^ACU(F)^ACA(F)^AGG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AC G(F)^ACA(F)^AGA(F)^UCA(F)^UCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^AAG(F)ACG(F)^ACG(F) )^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^AGG(F)^ACG(F) ^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^A CT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A( F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	311
E166-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCU UUUUGCAGCCACCA(F)^UGG(F)^ACU(F)^ACA(F)^AGG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AC G(F)^ACA(F)^AGA(F)^UCA(F)^UCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^AAG(F)p-	312
E166-2	固相合成	ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^A GG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^AC C(F)^ACC(F)^ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A( MOE)^A(MOE)	313
E167	実施例 2 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M )G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C (M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG( F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F) AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)A AC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A( M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A( F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	314
E167-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M )G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C (M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG( F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	315
E167-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A( M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	316

[表2-43]

E168	実施例 2 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M) )G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C (M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)^UGG(F)^ACU(F)^ACA(F)^AGG(F)^ACG (F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AGA(F)^UCA(F)^UCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^AAG(F )ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^ AGG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^A CC(F)^ACC(F)^ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) )^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A (MOE)^A(MOE)	317
E168-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M) )G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C (M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)^UGG(F)^ACU(F)^ACA(F)^AGG(F)^ACG (F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AGA(F)^UCA(F)^UCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^AAG(F )p-	318
E168-2	固相合成	ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^A GG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^AC C(F)^ACC(F)^ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A( MOE)^A(MOE)	319
E169	実施例 2 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A( M)G(M)C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)(rSpacer)G(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer )U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG( F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F) ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)A CA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A( F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A( M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	320
E169-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A( M)G(M)C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)(rSpacer)G(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer )U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG( F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	321

[表2-44]

E169-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	322
E170	実施例 2と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M) )G(M)C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)(rSpacer)G(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer )U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M)CCA(F)^UGG(F)^ACU(F)^ACA(F)^AGG(F )^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AGA(F)^UCA(F)^UCG(F)^ACU(F)^AUA(F) ^AAG(F)ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ACU(F)^A UA(F)^AGG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^ACC(F)^AC C(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) MOE)^A(MOE)^A(MOE)	323
E170-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M) )G(M)C(M)U(M)A(M)C(M)U(F)(rSpacer)G(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer)U(F)(rSpacer )U(M)U(M)U(M)G(M)C(M)A(M)GCCA(M)CCA(F)^UGG(F)^ACU(F)^ACA(F)^AGG(F )^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AGA(F)^UCA(F)^UCG(F)^ACU(F)^AUA(F) ^AAG(F)p	324
E170-2	固相合成	ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^A GG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^AC C(F)^ACC(F)^ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) MOE)^A(MOE)^A(MOE)	325
E171	実施例 2と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M )G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C (M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)^UGG(F)^ACU(F)^ACA(F)^AGG(F)^ACG (F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AGA(F)^UCA(F)^UCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^AAG(F )ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^ AGG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^A CC(F)^ACC(F)^ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M) MOE)^A(MOE)^A(MOE)	326

[表2-45]

E171-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M) )G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C (M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)^UGG(F)^ACU(F)^ACA(F)^AGG(F)^ACG (F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AGA(F)^UCA(F)^UCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^AAG(F )p-	327
E171-2	固相合成	ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ACU(F)^AUA(F)^A GG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^AC C(F)^ACC(F)^ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M)^A(M) E)^A(MOE)^A(MOE)	328
E172	実施例 2 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(U)A(C)A(G)C(U)A(U)G(U)U(U)U(G) AGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)U CA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GC G(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC( F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A( M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE) ^A(MOE)^A(MOE)	329
E172-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(U)A(C)A(G)C(U)A(U)G(U)U(U)U(G) AGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)U CA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	330
E172-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	331
E173	実施例 2 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C( M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F )G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG( F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F) AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)A CC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	332



[表2-47]

E177	GeneDesi gn社より 購入	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUUGCAGCCACCAUGGACUACAAGGACGACGA CGACAAGAUCAUCGACUUAUAAAGACGACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGGA CGACGACAAACACCACCACCACCACCACUGAA(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^ A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(M OE)^A(MOE)	340
E178	GeneDesi gn社より 購入	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCU UUUUGCAGCCACCAUGGACUACAAGGACGACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACG CGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACCAC CACUGAA(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	341
E179	GeneDesi gn社より 購入	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M )G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C (M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)AUGGACUACAAGGACGACGACGACAAGAUCAU CGACUUAAGGACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGACGACGACAAACA CCACCACCACCACCACUGAA(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) ^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	342
E180	実施例 2 と 同様	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUUGCAGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)A GG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)AC G(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG (F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^ A(MOE)^AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	343
E180-1	固相合成	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUUGCAGCCACCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)A GG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	344
E180-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	345
E181	実施例 2 と 同様	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUUGCAGCCACCA(F)^UGG(F)^ACU(F)^ACA (F)^AGG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AGA(F)^UCA(F)^UCG(F)^ACU(F) )^AUA(F)^AAG(F)ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^AUA(F)^AAG(F)^GUG(F)^GCG(F)^ ACU(F)^AUA(F)^AGG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACG(F)^ACA(F)^AAC(F)^ACC(F)^A CC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACC(F)^ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^AAAAAAAAAAAA AAAAAAAA	346



[表2-49]

E184-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M) )A(F)G(M)A(F)A(M)A(F)A(M)G(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)A (M)G(F)A(M)A(F)A(M)U(F)A(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F )A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG (F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	354
E184-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	355
E185	実施例 2 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)A(MOE)A(MOE)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M) )A(F)A(M)A(F)A(M)G(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)A(M)G(F) A(M)A(F)A(M)U(F)A(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UG G(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU( F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F) AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)AC T(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F) )^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	356
E185-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)A(MOE)A(MOE)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M) )A(F)A(M)A(F)A(M)G(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)A(M)G(F) A(M)A(F)A(M)U(F)A(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UG G(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU( F)AUA(F)AAG(F)p	357
E185-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	358
E186	GeneDesi gn社より 購入	GGGAGACCUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCACCGGCCACCAUGGACU ACAAGGACGACGACGACAAGAUAUCGACUAUAAAGACGACGACGAUAAAGGUGGCG ACUAUAAGGACGACGACGACAACACCACCACCACCACCACUGAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA	359

[表2-50]

E187	実施例 2 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)C(M)C(F)U(M)C(F)U(M)U(F) )C(M)U(F)G(M)G(F)U(M)C(F)C(M)C(F)C(M)A(F)C(M)A(F)G(M)A(F)C(M)U(F)C(M)A (F)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)A(M)C(F)C(M)C(F)A(M)C(F)C(M)G(F)G(M)C(F)C(M) )A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA( F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F) GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)AC C(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE) ^A(MOE)^A(MOE)	360
E187-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^G(MOE)^A(MOE)C(M)C(F)U(M)C(F)U(M)U(F) )C(M)U(F)G(M)G(F)U(M)C(F)C(M)C(F)C(M)A(F)C(M)A(F)G(M)A(F)C(M)U(F)C(M)A (F)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)A(M)C(F)C(M)C(F)A(M)C(F)C(M)G(F)G(M)C(F)C(M) )A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA( F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	361
E187-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE) )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	362
E188	実施例 2 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)C(M)C(F)U(M)C(F)U(M)U(F)C(M)U( F)G(M)G(F)U(M)C(F)C(M)C(F)C(M)A(F)C(M)A(F)G(M)A(F)C(M)U(F)C(M)A(F)G(M) A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)A(M)C(F)C(M)C(F)A(M)C(F)C(M)G(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C( M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA( F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F) ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)AC C(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A (F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(M OE)^A(MOE)	363
E188-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)C(M)C(F)U(M)C(F)U(M)U(F)C(M)U( F)G(M)G(F)U(M)C(F)C(M)C(F)C(M)A(F)C(M)A(F)G(M)A(F)C(M)U(F)C(M)A(F)G(M) A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)A(M)C(F)C(M)C(F)A(M)C(F)C(M)G(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C( M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA( F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	364

[表2-51]

E188-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	365
E189	GeneDesi gn社より 購入	GGGAGCCACCAUGGACUACAAGGACGACGACGACAAGAUCAUUCGACUUAUAAAGACGA CGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACCACCAC UGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	366
E190	実施例 2 と 同様	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA (F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F )ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F) ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MO E)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^ A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	367
E190-1	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA (F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F )p	368
E190-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	369
E191	実施例 2 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F) AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)A CG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)AC G(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE) ^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	370
E191-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F) AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	371
E191-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE )^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	372

[表2-52]

E192	GeneDesign社より購入	GGGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUUGCAGCCACCAUGGACUACAAGGACGACGA CGACAAGAUCAUCGACUUAUAAAGACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUUAAGGACGA CGACGACAAACACCACCACCACCACCACUGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAA	373
E193	実施例 2 と同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F) UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)AC G(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA (F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)AAA( F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	374
E193-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F) UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	375
E193-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE) A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	376
E194	実施例 2 と同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(rSpacer)AC(rSpacer)AG(rSpacer) UA(rSpacer)UU(rSpacer)UU(rSpacer)UU(rSpacer)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UG G(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU( F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F) AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)AC T(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A (MOE)	377
E194-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(rSpacer)AC(rSpacer)AG(rSpacer) UA(rSpacer)UU(rSpacer)UU(rSpacer)UU(rSpacer)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UG G(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU( F)AUA(F)AAG(F)p	378
E194-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE) A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	379

[表2-53]

E195	実施例 2 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F) UUC(F)UUU(F)UUG(F)CA(rSpacer)CC(rSpacer)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F) )ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)AC G(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)A (F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	380
E195-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F) UUC(F)UUU(F)UUG(F)CA(rSpacer)CC(rSpacer)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F) )ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	381
E195-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE) A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	382
E196	実施例 2 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F) UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CC(rSpacer)UG(rSpacer)ACU(F)ACA(F)AGG(F) )ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)AC G(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)A (F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	383
E196-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F) UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CC(rSpacer)UG(rSpacer)ACU(F)ACA(F)AGG(F) )ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	384
E196-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE) A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	385
E197	実施例 2 と 同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F) UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)AC G(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AG(rSpacer)AC(rSpacer)ACG(F)A CG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE) A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	386
E197-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F) UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)A CG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	387

[表2-54]

E197-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AG(rSpacer)AC(rSpacer)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(MOE)A(MOE)A(MOE))	388
E198	実施例 2 と同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	389
E198-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	390
E198-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)AAA(F)AAA(F)AAA(F)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(MOE)A(MOE)A(MOE))	391
E199	実施例 2 と同様	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)(rSpacer)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	392
E199-1	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AU(F)ACA(F)AGC(F)UAC(F)UUG(F)UUC(F)UUU(F)UUG(F)CAG(F)CCA(F)CCA(F)UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)p	393
E199-2	固相合成	ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)(rSpacer)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(rSpacer)AA(MOE)A(MOE)A(MOE)	394

[表2-55]

E200	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)(C2)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	395
E201	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)(C2)G(M)U(F)U(M)(C2)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	396
E202	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)(Spacer9)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	397
E203	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)(Spacer9)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	398
E204	固相合成	GG(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	399
E205	固相合成	GGGA(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	400
E206	固相合成	G^G^G^A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	401

[表2-56]

E207	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)A CG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACUGA	402
E208	固相合成	GGGA(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(M)A(F)C(M)A(F)A(M)G(F)C(M)U(F)A(M)C(F)U(M)U(F)G(M)U(F)U(M)C(F)U(M)U(F)U(M)U(F)U(M)G(F)C(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GU G(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACUGA	403
E209	固相合成	GG(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(F)AC(F)A(F)AG(F)C(F)UA(F)C(F)U U(F)G(F)UU(F)C(F)UU(F)U(F)UU(F)G(F)CA(F)G(F)CC(F)A(F)CC(F)A(F)UGG(F)AC U(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC( F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	404
E210	固相合成	GGGA(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(F)AC(F)A(F)AG(F)C(F)UA(F)C(F)UU(F)G(F)UU( F)C(F)UU(F)U(F)UU(F)G(F)CA(F)G(F)CC(F)A(F)CC(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)A GG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)AC C(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	405
E211	固相合成	G^G^G^A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(F)AC(F)A(F)AG(F)C(F)UA(F)C(F)UU(F)G(F) )UU(F)C(F)UU(F)U(F)UU(F)G(F)CA(F)G(F)CC(F)A(F)CC(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA (F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F )ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)	406
E212	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(F)AC(F)A(F)AG(F)C(F)UA(F) C(F)UU(F)G(F)UU(F)C(F)UU(F)U(F)UU(F)G(F)CA(F)G(F)CC(F)A(F)CC(F)A(F)UGG( F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F) ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACUGA	407
E213	固相合成	GGGA(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(F)AC(F)A(F)AG(F)C(F)UA(F)C(F)UU(F)G(F)UU( F)C(F)UU(F)U(F)UU(F)G(F)CA(F)G(F)CC(F)A(F)CC(F)A(F)UGG(F)ACU(F)AUA(F)A GG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)AC C(F)ACC(F)ACUGA	408
E214	固相合成	GGG(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)A(F)U(F)AC(F)A(F)AG(F)C(F)UA (F)C(F)UU(F)G(F)UU(F)C(F)UU(F)U(F)UU(F)G(F)CA(F)G(F)CC(F)A(F)CC(F)A(F)U GG(F)ACU(F)AUA(F)AGG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAG(F)GUG(F)GCC(F)AC C(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)G(MOE)A(MOE)AA	409







[表2-60]

E233	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUG(F)GAC(F)UUAU(F)AAG(F)GAC(F)GAC(F)GAC(F)GAC(F)AAA(F)GGU(F)GGC(F)CAC(F)CAC(F)CAC(F)CAC(F)CAC(F)U(M)G(M)A(M)	473
E234	固相合成	G(M)G(M)G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCaUGgA CtAUaAGgACgACgACgACaAAgGUgGCcACcACcACcACcACcACU(M)G(M)A(M)	474
E235	固相合成	G(MOE)G(MOE)G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGC AGCCACCAUGGACUAUAAGGACGACGACGACAAAGGUGGCCACCACCACCACCACCAC T(MOE)G(MOE)A(MOE)	475
E236	固相合成	G(F)G(F)G(F)A(F)G(F)A(F)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGACU AUAAGGACGACGACGACAAAGGUGGCCACCACCACCACCACCACU(F)G(F)A(F)	476
E237	固相合成	gggagaAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGACUAUAAGGACGACGAC GACAAAGGUGGCCACCACCACCACCACCActga	477
E238	固相合成	G(M)^G(M)^G(M)A(M)G(M)A(M)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUG GACUAUAAGGACGACGACGACAAAGGUGGCCACCACCACCACCACCACU(M)^G(M)^ A(M)	478
E239	固相合成	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)A(MOE)G(MOE)A(MOE)AUACAAGCUACUUGUUCUUUUU GCAGCCACCAUGGACUAUAAGGACGACGACGACAAAGGUGGCCACCACCACCACCACC ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)	479
E240	固相合成	g^g^gagaAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGGACUAUAAGGACGAC GACGACAAAGGUGGCCACCACCACCACCACCAct^g^a	480

[0218] 表3-1 ~ 表3-14 :

[0219]

[表3-1]

化合物名	配列 番号	収率(%)	MS(実測値)	MS(計算値)
E3	8	42		
E3-1	9		25741.90	25738.44
E3-2	10		21023.11	21020.70
E4	11	35		
E4-1	12		25742.31	25738.44
E4-2	13		27607.82	27604.90
E5	14	35		
E5-1	15		25851.38	25848.62
E5-2	16		21104.22	21100.79
E6	17	38		
E6-1	18		26032.49	26028.98
E6-2	19		21023.19	21020.70
E7	20	34		
E7-1	21		25826.35	25822.62
E7-2	22		27650.91	27646.99
E8	23	39		
E8-1	24		25826.58	25822.62
E8-2	25		27769.59	27765.23
E9	26	35		
E9-1	27		25826.44	25822.62
E9-2	28		27752.63	27747.17
E10	29	34		
E10-1	30		26116.33	26112.92
E10-2	31		21249.39	21246.97
E11	32	31		
E11-1	33		26116.06	26112.92
E11-2	34		27834.62	27831.17
E12	35	31		
E12-1	36		26148.32	26145.06
E12-2	37		28088.14	28081.69

[表3-2]

E13	38	34		
E13-1	39		25851.92	25848.62
E13-2	40		27688.31	27684.99
E14	41	34		
E14-1	42		25851.92	25848.62
E14-2	43		27728.18	27724.99
E15	44	34		
E15-1	45		25851.99	25848.62
E15-2	46		27968.93	27965.59
E16	47	26		
E16-1	48		25852.02	25848.62
E16-2	49		27848.67	27845.29
E17	50	27		
E17-1	51		25851.88	25848.62
E17-2	52		28169.48	28166.69
E18	53	36		
E18-1	54		26203.38	26199.37
E18-2	55		21103.36	21100.79
E19	56	40		
E19-1	57		26315.40	26311.53
E19-2	58		21103.32	21100.79
E20	59	42		
E20-1	60		26218.93	26215.29
E20-2	61		21103.24	21100.79
E21	62	40		
E21-1	63		25968.41	25964.74
E21-2	64		21103.18	21100.79
E22	65	37		
E22-1	66		25985.36	25980.74
E22-2	67		21103.28	21100.79
E23	68	17		
E23-1	69		26287.55	26283.55
E23-2	70		21103.34	21100.79

[表3-3]

E24	71	27		
E24-1	72		26413.24	26409.73
E24-2	73		21103.10	21100.79
E25	74	42		
E25-1	75		26304.89	26301.46
E25-2	76		21103.24	21100.79
E26	77	36		
E26-1	78		25822.79	25822.62
E26-2	79		27745.91	27745.17
E27	80	35		
E27-1	81		25823.15	25822.62
E27-2	82		27735.83	27735.14
E28	83	33		
E28-1	84		25822.86	25822.62
E28-2	85		27723.52	27723.11
E29	86	24		
E29-1	87		25822.85	25822.62
E29-2	88		27763.43	27763.23
E30	89		29201.49	29198.50
E31	90			29375.25
E32	91	23		
E32-1	92		26092.95	26091.07
E32-2	93		21101.35	21100.79
E33	94	38		
E33-1	95		26128.89	26127.16
E33-2	96		21101.26	21100.79
E34	97	32		
E34-1	98			26199.34
E34-2	99			21100.79
E35	100	40		
E35-1	101			26247.46
E35-2	102			21100.79

[表3-4]

E36	103	41		
E36-1	104		26357.11	26355.37
E36-2	105		21248.01	21246.97
E37	106	38		
E37-1	107			26683.82
E37-2	108			21246.97
E38	109	38		
E38-1	110			27410.87
E38-2	111			21246.97
E39	112	37		
E39-1	113			27837.49
E39-2	114			21246.97
E40	115	38		
E40-1	116			27002.21
E40-2	117			21100.79
E41	118	41		
E41-1	119			27246.77
E41-2	120			21100.79
E42	121	37		
E42-1	122		26060.05	26054.98
E42-2	123		21101.34	21100.79
E43	124	30		
E43-1	125		26151.59	26151.40
E43-2	126		21101.31	21100.79
E44	127	20		
E44-1	128		26247.81	26247.82
E44-2	129		21101.31	21100.79
E45	130	34		
E45-1	131			25848.62
E45-2	132			27756.99
E46	133	32		
E46-1	134		25849.38	25848.62
E46-2	135		28847.69	28846.59

[表3-5]

E47	136			47580.38
E48	137			47628.47
E49	138			47658.53
E50	139			47692.59
E51	140	35		
E51-1	141			25934.17
E51-2	142			21246.97
E52	143	22		
E52-1	144			26711.98
E52-2	145			21246.97
E53	146	13		
E53-1	147		26150.66	26145.06
E53-2	148		29341.39	29346.31
E54	149	25		
E54-1	150		26145.49	26145.06
E54-2	151		28582.21	28597.46
E55	152	25		
E55-1	153		26145.43	26145.06
E55-2	154		28491.66	28489.19
E56	155	24		
E56-1	156		26390.31	26387.51
E56-2	157		28490.44	28489.19
E57	158	24		
E57-1	159			26688.90
E57-2	160			28489.19
E58	161	29		
E58-1	162		26113.95	26112.92
E58-2	163		34417.04	34415.37
E59	164	17		
E59-1	165			26145.06
E59-2	166			35555.09

[表3-6]

E60	167	23		
E60-1	168			26592.48
E60-2	169			28794.52
E61	170		29760.87	29769.25
E62	171	34		
E62-1	172			26329.37
E62-2	173			28097.65
E63	174	33		
E63-1	175			26522.21
E63-2	176			28451.19
E64	177	19		
E64-1	178		26438.71	26437.35
E64-2	179		28059.72	28057.67
E65	180	17		
E65-1	181		26438.81	26439.35
E65-2	182		28059.00	28057.67
E66	183	34		
E66-1	184		26482.87	26481.44
E66-2	185		28115.38	28113.79
E67	186	35		
E67-1	187		26633.16	26632.19
E67-2	188		28413.40	28411.21
E68	189	28		
E68-1	190		26858.18	26857.17
E68-2	191		28731.35	28732.61
E69	192	35		
E69-1	193		26357.11	26355.37
E69-2	194		27834.62	27831.17
E70	195	28		
E70-1	196		26390.31	26387.51
E70-2	197		28088.14	28081.69
E71	198		30044.72	30043.84
E72	199		28597.28	29596.55

[表3-7]

E73	200		29533.43	29532.55
E74	201		29365.19	29364.39
E75	202		29529.48	29524.55
E76	203		29629.31	29628.63
E77	204			29510.45
E78	205			29510.39
E79	206	41		
E79-1	207		26473.07	26469.49
E79-2	208		28413.80	28411.21
E80	209	39		
E80-1	210		26473.07	26469.49
E80-2	211		27468.04	27465.33
E81	212	35		
E81-1	213		26473.07	26469.49
E81-2	214		27788.89	27786.73
E82	215	39		
E82-1	216		26473.07	26469.49
E82-2	217		28251.61	28249.21
E83	218	36		
E83-1	219		26473.07	26469.49
E83-2	220		28162.29	28159.12
E84	221	34		
E84-1	222		26551.48	26549.47
E84-2	223		28413.80	28411.21
E85	224			29801.39
E86	225			29590.50
E87	226			30029.79
E88	227			29508.41
E89	228			29063.16
E90	229			29061.12
E91	230			28553.80
E92	231			28472.50
E93	232			30011.70

[表3-8]

E94	233			30606.29
E95	234	37		
E95-1	235		26473.07	26469.49
E95-2	236		29271.38	29268.33
E96	237		29789.00	29788.24
E97	238		29644.33	29643.40
E98	239		30036.67	30035.84
E99	240			29833.53
E100	241			30075.98
E101	242			30638.43
E102	243			30542.01
E103	244			30172.40
E104	245		28940.81	28939.66
E105	246			29487.04
E106	247		28829.04	28827.66
E107	248			29455.04
E108	249		28534.84	28533.38
E109	250			29370.96
E110	251			29789.25
E111	252			29789.25
E112	253			29791.25
E113	254			29909.55
E114	255			29909.55
E115	256			29923.58
E116	257			29637.34
E117	258			29679.40
E118	259			29649.38
E119	260			30420.20
E120	261			29959.40
E121	262			28945.66
E122	263			29503.04
E123	264			28833.66
E124	265			28539.38

[表3-9]

E125	266			29809.25
E126	267			29929.55
E127	268		29812.73	29811.25
E128	269			29943.58
E129	270			29951.55
E130	271		30081.52	30083.88
E131	272		29964.62	29963.58
E132	273			29831.25
E133	274			29929.55
E134	275			30049.85
E135	276			29931.55
E136	277			30063.88
E137	278			30071.85
E138	279			30204.18
E139	280			30083.88
E140	281			29951.55
E141	282		29241.57	29240.29
E142	283		29121.04	29119.99
E143	284		29008.69	29007.99
E144	285		28714.90	28713.71
E145	286			30027.76
E146	287			29931.52
E147	288			29845.37
E148	289			29821.31
E149	290			30027.76
E150	291			29931.52
E151	292			30027.76
E152	293			29931.52
E153	294			29657.77
E154	295		29933.20	29931.97
E155	296		29702.81	29701.82
E156	297			29427.62
E157	298			29929.98

[表3-10]

E158	299			29974.03
E159	300			29699.83
E160	301			29967.96
E161	302			29773.81
E162	303			29936.85
E163	304			29741.75
E164	305	29		
E164-1	306		25935.53	25934.17
E164-2	307		34415.78	34415.37
E165	308	38		
E165-1	309		26277.38	26277.25
E165-2	310		28410.45	28411.21
E166	311	22		
E166-1	312		26502.04	26502.23
E166-2	313		28732.35	28732.61
E167	314	25		
E167-1	315		26519.56	26519.70
E167-2	316		28410.62	28411.21
E168	317	30		
E168-1	318		26744.10	26744.68
E168-2	319		28732.31	28732.61
E169	320	9		
E169-1	321		26098.47	26098.50
E169-2	322		28411.47	28411.21
E170	323	11		
E170-1	324		26324.51	26323.48
E170-2	325		28733.32	28732.61
E171	326	18		
E171-1	327		26745.90	26744.68
E171-2	328		28841.81	28840.88
E172	329	14		
E172-1	330		26197.62	26196.90
E172-2	331		28412.69	28411.21

[表3-11]

E173	332	13		
E173-1	333		26439.77	28439.35
E173-2	334		28411.59	28411.21
E174	335	10		
E174-1	336		26018.71	26018.15
E174-2	337		28410.90	28411.21
E175	338			
E176	339			
E177	340			
E178	341			
E179	342			
E180	343	39		
E180-1	344		25848.81	25848.42
E180-2	345		27801.90	27801.40
E181	346	38		
E181-1	347		26072.74	26073.40
E181-2	348		28122.75	28122.80
E182	349			
E183	350	28		
E183-1	351		29930.55	29930.73
E183-2	352		28410.81	28411.21
E184	353	38		
E184-1	354		30252.99	30253.33
E184-2	355		28410.44	28411.21
E185	356	37		
E185-1	357		30172.51	30172.98
E185-2	358		28410.83	28411.21
E186	359			
E187	360	26		
E187-1	361		30824.36	30824.47
E187-2	362		28410.35	28411.21

[表3-12]

E188	363	33		
E188-1	364		30743.93	30744.12
E188-2	365		28410.48	28411.21
E189	366			
E190	367	25		
E190-1	368		17525.61	17525.85
E190-2	369		28410.36	28411.21
E191	370	26		
E191-1	371		17493.47	17493.71
E191-2	372		28410.96	28411.21
E192	373			
E193	374	20		
E193-1	375		26216.77	26216.90
E193-2	376		27940.07	27939.43
E194	377	32		
E194-1	378		25373.27	25373.31
E194-2	379		27940.10	27939.43
E195	380	32		
E195-1	381		25930.83	25930.69
E195-2	382		27940.27	27939.43
E196	383	30		
E196-1	384		25930.59	25930.69
E196-2	385		27940.25	27939.43
E197	386	32		
E197-1	387		26216.56	26216.90
E197-2	388		27637.91	27637.23
E198	389	37		
E198-1	390		26216.96	26216.90
E198-2	391		27669.13	27669.21
E199	392	44		
E199-1	393		26216.79	26216.90
E199-2	394		27129.39	27128.77
E200	395		29860.16	29859.70

[表3-13]

E201	396		29677.75	29676.50
E202	397		29589.55	29588.58
E203	398		29629.67	29628.60
E204	399			29969.69
E205	400			29837.46
E206	401			29885.67
E207	402			29855.57
E208	403			29649.19
E209	404			29753.17
E210	405		29637.84	29637.01
E211	406		29685.10	29685.22
E212	407		29623.80	29622.98
E213	408		29450.09	29448.74
E214	409		31162.10	31160.07
E215	410			
E215-1	411			
E215-2	412			
E216	413			
E216-1	414			
E216-2	415			

[表3-14]

E220	448	51		
E220-1	449		25738.08	25738.44
E220-2	450		22666.65	22666.75
E221	451	42		
E221-1	452		25738.02	25738.44
E221-2	453		24312.63	24312.80
E222	454	35		
E222-1	455		26438.06	26439.35
E222-2	456		23128.13	23129.83
E223	457	32		
E223-1	458		26438.10	26439.35
E223-2	459		24925.92	24926.38
E224	460	31		
E224-1	461		26438.89	26439.35
E224-2	462		28409.93	28411.21
E225	463	34		
E225-1	464		26354.29	26355.37
E225-2	465		28583.28	28597.46
E226	466		21600.06	21599.05
E227	467		21684.46	21683.23
E228	468		21720.56	21719.23
E229	469		21719.88	21719.23
E230	470		29325.79	29324.77
E231	471		29360.60	29358.77
E232	472		29359.83	29358.77
E233	473		29359.41	29358.77
E234	474		29067.47	29066.87
E235	475		29736.14	29735.25
E236	476		29217.34	29216.50
E237	477		29069.55	29068.58
E238	478		29389.66	29389.05
E239	479		29800.31	29799.53
E240	480		29133.00	29132.86

[0220] 以下4-1～表4-3に、実施例4で用いた化合物（ポリヌクレオチド）の配列情報を示す。

[0221] 表4-1～表4-3：

[表4-1]

化合物名	配列 (5'⇒3')	配列番号
E217	CAUAAACCCUGGCGCGCUCGCGGGCCGGCACUCUUCUGGUCCCCACAG ACUCAGAGAGAACCCACCAUGGACUACAAGGACGACGACGACAAGAUC AUCGACUAUAAAGACGACGACGACGAUAAAGGUGGCGACUAUAAGGACGAC GACGACAAACACCACCACCACCACCACUGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA A	416
E217-1	CAUAAACCCUGGCGCGCUCGCGGGCCGGCACUCUUCUGGUCCCCACAG ACUCAGAGAGAACCCACCAUGGACUACAAGGAC	417
E217-2	pGACGACGACAAGAUCAUCGACUAUAAAGACGACGACGUAUAAAGGUGG CGACUAUAAG	418
E217-3	pGACGACGACGACAAAACACCACCACCACCACCACUGAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	419
テンプレート DNA 2	gatcctgtcgtcgtcgtcctttagtccat	420
テンプレート DNA 3	tttgcgtcgtcgtccttatagtcgccacc	421

[0222] [表4-2]

E218	C(MOE)^A(MOE)^T(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)C(M)C(F)C(M) U(F)G(M)G(F)C(M)G(F)C(M)G(F)C(M)U(F)C(M)G(F)C(M)G(F)G(M)G( F)C(M)C(F)G(M)G(F)C(M)A(F)C(M)U(F)C(M)U(F)U(M)C(F)U(M)G(F) G(M)U(F)C(M)C(F)C(M)C(F)A(M)C(F)A(M)G(F)A(M)C(F)U(M)C(F)A( M)G(F)A(M)G(F)A(M)G(F)A(M)A(F)C(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F) UGG(F)ACU(F)ACA(F)AGGACGACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)U CG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F)ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG (F)GCG(F)ACU(F)AUAAGGACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F) )ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^ A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^ A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	422
E218-1	C(MOE)^A(MOE)^T(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)C(M)C(F)C(M) U(F)G(M)G(F)C(M)G(F)C(M)G(F)C(M)U(F)C(M)G(F)C(M)G(F)G(M)G( F)C(M)C(F)G(M)G(F)C(M)A(F)C(M)U(F)C(M)U(F)U(M)C(F)U(M)G(F) G(M)U(F)C(M)C(F)C(M)C(F)A(M)C(F)A(M)G(F)A(M)C(F)U(M)C(F)A( M)G(F)A(M)G(F)A(M)G(F)A(M)A(F)C(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)U GG(F)ACU(F)ACA(F)AGGAC	423
E218-2	pGACG(F)ACG(F)ACA(F)AGA(F)UCA(F)UCG(F)ACU(F)AUA(F)AAG(F) ACG(F)ACG(F)ACG(F)AUA(F)AAG(F)GUG(F)GCG(F)ACU(F)AUAAG	424
E218-3	pGACG(F)ACG(F)ACG(F)ACA(F)AAC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)ACC(F)A CC(F)ACT(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A (M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M)^A(F)^A(M) ^A(F)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)	425

[0223]



882) を用いてヒト細胞系における翻訳活性を評価した。まず、各mRNAの終濃度が0.3  $\mu\text{M}$ となるようTHE RNA storage solution (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、カタログ番号AM7001) で希釈した各mRNAを、96 well PCRプレート(アズワン社製)に1  $\mu\text{L}$ ずつ分注した。続いて、1反応あたり5.0  $\mu\text{L}$ のHela Lysate、1反応あたり1.0  $\mu\text{L}$ のAccessory Proteins、1反応あたり2.0  $\mu\text{L}$ のReaction Mix、1反応あたり0.2  $\mu\text{L}$ のRNase Inhibitor, Murine (ニューイングランドバイオラボ社製、カタログ番号M0314) 及び1反応あたり0.8  $\mu\text{L}$ の精製水を混合してマスターミックスを調製し、mRNAサンプルを添加したPCRプレートに9  $\mu\text{L}$ ずつ分注し、添加、混合の後、37°Cで45分間静置することにより翻訳反応を行った。

翻訳反応後の反応溶液中の翻訳産物は、以下に記載のサンドイッチELISA法により検出した。まず、6\*His, His-Tag 抗体 (プロテインテック社、カタログ番号66005-1-Ig) を0.1M Carbonate buffer(pH9.4)にて3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、96 Well ELISA用プレート(ヌンク社製)に1ウェルあたり50  $\mu\text{L}$ ずつ分注し、4°Cで一晩静置することにより、抗体の固定化を行ったプレートを作製した。続いて、プレートを精製水で1倍濃度に希釈したTris Buffered Saline with Tween 20 (サンタクルツ社、カタログ番号sc-24953) (以下、洗浄溶液と記載する) で洗浄した後、ウシ血清アルブミン(和光純薬社、カタログ番号017-22231)を終濃度3%となるように希釈した洗浄溶液 (以下、ブロッキング溶液と記載する) を1ウェルあたり200  $\mu\text{L}$ ずつ分注し、室温で1時間静置した。プレートを洗浄溶液で洗浄した後、ブロッキング溶液で希釈した翻訳反応溶液を、1ウェルあたり50  $\mu\text{L}$ ずつ分注し、室温で1時間静置した。その際、以下に示す翻訳産物ポリペプチド標品(コスモバイオ社製)を同様にブロッキング溶液で各濃度に希釈してプレートに分注した。プレートを洗浄溶液で洗浄した後、ブロッキング溶液で10,000倍に希釈したMonoclonal ANTI-FLAG M2-Peroxidase (HRP) Ab produced in mouse (SIGMA社製、カタログ抗体A8592-1MG) を、1ウェルあたり50  $\mu\text{L}$ ずつ分注し、室温で1時間静置した。プレートを洗浄溶液で洗浄した後、1-Step Ultra TMB-ELISA (サーモフィッシャーサイエ

ンティフィック社製、カタログ番号34028)を、1ウェルあたり50  $\mu$ Lずつ分注し、室温で数分静置した。その後、0.5M硫酸（和光純薬工業社製）を、1ウェルあたり50  $\mu$ Lずつ分注し反応を停止させた後、吸光度計(バイオラッド社製)を用いて、測定波長450 nm、参照波長570 nmの吸光度を測定した。ポリペプチド標品の吸光度をもとに作成した検量線を用いて定量した各翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度(nM)、及び糖修飾を持たない化合物E3を1とした時の相対翻訳産物量を、下記表5に記載した。

翻訳産物ポリペプチド標品：NH<sub>2</sub>-MDYKDDDDKIIDYKDDDDKGGDYKDDDDKHHHHHH-COOH（配列番号430）

[0226] 表5-1～表5-25：

[0227] [表5-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E5	14	2.047	1.84
E13	38	7.100	6.38
E14	41	7.700	6.92
E15	44	6.713	6.03
E16	47	7.420	6.66
E17	50	11.187	10.05
E3	8	1.113	1.00

[0228] [表5-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E5	14	2.420	2.16
E18	53	0.860	0.77
E19	56	1.693	1.51
E20	59	1.613	1.44
E3	8	1.120	1.00

[0229] [表5-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E5	14	0.867	8.67
E21	62	2.653	26.53
E22	65	3.293	32.93
E3	8	0.100	1.00

## [0230] [表5-4]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E5	14	0.980	8.17
E18	53	0.333	2.78
E20	59	0.727	6.06
E23	68	0.133	1.11
E24	71	0.420	3.50
E25	74	0.407	3.39
E3	8	0.120	1.00

## [0231] [表5-5]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.973	1.48
E7	20	3.807	2.86
E26	77	4.607	3.46
E27	80	7.433	5.58
E28	83	3.727	2.80
E29	86	7.140	5.36
E3	8	1.333	1.00

## [0232] [表5-6]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E5	14	3.740	3.17
E23	68	0.687	0.58
E32	91	1.240	1.05
E33	94	1.800	1.53
E34	97	0.960	0.81
E35	100	0.767	0.65
E3	8	1.180	1.00

## [0233]

[表5-7]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E10	29	2.813	1.91
E32	91	1.040	0.71
E36	103	0.953	0.65
E37	106	0.313	0.21
E38	109	0.027	0.02
E39	112	0.020	0.01
E3	8	1.473	1.00

[0234] [表5-8]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E6	17	0.720	0.96
E40	115	0.287	0.38
E41	118	0.073	0.10
E42	121	1.487	1.99
E43	124	3.467	4.64
E44	127	3.800	5.09
E3	8	0.747	1.00

[0235] [表5-9]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E10	29	3.087	2.91
E36	103	0.993	0.94
E47	136	0.373	0.35
E48	137	0.227	0.21
E49	138	0.953	0.90
E50	139	0.620	0.58
E3	8	1.060	1.00

[0236] [表5-10]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	3.133	15.67
E15	44	67.533	337.67
E45	130	35.400	177.00
E46	133	77.333	386.67
E3	8	0.200	1.00

## [0237] [表5-11]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	0.933	4.67
E12	35	119.467	597.33
E55	152	84.067	420.33
E56	155	34.800	174.00
E57	158	76.200	381.00
E60	167	51.800	259.00
E3	8	0.200	1.00

## [0238] [表5-12]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E11	32	40.667	203.33
E55	152	73.600	368.00
E58	161	41.933	209.67
E59	164	72.867	364.33
E3	8	0.200	1.00

## [0239] [表5-13]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E10	29	6.333	12.67
E36	103	0.667	1.33
E47	136	0.333	0.67
E49	138	0.500	1.00
E51	140	16.667	33.33
E52	143	0.833	1.67
E3	8	0.500	1.00

## [0240] [表5-14]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E10	29	5.500	11.00
E11	32	39.000	78.00
E12	35	118.167	236.33
E53	146	78.000	156.00
E54	149	104.167	208.33
E55	152	83.167	166.33
E3	8	0.500	1.00

## [0241] [表5-15]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.833	3.67
E12	35	228.167	456.33
E55	152	87.000	174.00
E56	155	49.333	98.67
E70	195	72.333	144.67
E3	8	0.500	1.00

## [0242] [表5-16]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.833	2.75
E11	32	75.000	112.50
E69	192	15.167	22.75
E3	8	0.667	1.00

## [0243] [表5-17]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	111	1.167	2.33
E56	155	51.500	103.00
E62	171	99.333	198.67
E63	174	98.333	196.67
E64	177	43.833	87.67
E65	180	48.833	97.67
E3	8	0.500	1.00

## [0244] [表5-18]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.333	2.67
E10	29	6.167	12.33
E47	136	0.500	1.00
E51	140	19.667	39.33
E58	161	59.000	118.00
E164	305	109.000	218.00
E3	8	0.500	1.00

## [0245]

[表5-19]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.500	3.00
E64	177	25.833	51.67
E65	180	23.333	46.67
E66	183	14.833	29.67
E67	186	25.000	50.00
E68	189	10.667	21.33
E3	8	0.500	1.00

[0246] [表5-20]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.500	3.00
E56	155	32.500	65.00
E2	5	22.000	44.00
E67	188	21.333	42.67
E79	206	16.833	33.67
E95	234	20.833	41.67
E3	8	0.500	1.00

[0247] [表5-21]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.500	3.00
E79	206	22.500	45.00
E80	209	12.667	25.33
E81	212	19.500	39.00
E82	215	21.833	43.67
E83	218	23.167	46.33
E3	8	0.500	1.00

[0248]

[表5-22]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.000	-
E165	308	42.000	-
E166	311	29.667	-
E167	314	19.167	-
E169	320	37.167	-
E172	329	28.833	-
E3	8	0.000	-

[0249] [表5-23]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.167	-
E166	311	35.833	-
E167	314	22.000	-
E168	317	8.833	-
E171	326	9.667	-
E173	332	7.333	-
E3	8	0.000	-

[0250] [表5-24]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.667	5.00
E165	308	63.667	191.00
E167	314	21.833	65.50
E169	320	55.500	166.50
E170	323	35.833	107.50
E174	335	38.167	114.50
E3	8	0.333	1.00

[0251] [表5-25]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E4	11	1.000	2.00
E84	221	11.167	22.33
E3	8	0.500	1.00

[0252] 上記表 5-1～表 5-25 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を

有する各mRNAはHeLa細胞ライセートに添加後、真核細胞の翻訳系によって遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生した。

[0253] 試験例 2

(mRNAサンプルのHeLa細胞株を用いたin vitro翻訳反応試験)

以下6-1～表6-9に記載の各mRNAについて、HeLa細胞株を用いてin vitroでの翻訳活性を評価した。まず、10%ウシ胎仔血清を含むRPMI培地(ナカライテスク社製)で懸濁したHeLa細胞を1ウェルあたり細胞数10,000 cells/100  $\mu$ Lとなるように、96ウェル接着細胞用培養プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で一晩培養した。一晩培養後の細胞から培養上清を除去し、1ウェルあたり40  $\mu$ Lの10%ウシ胎仔血清を含むRPMI培地を添加した後、各mRNAの終濃度が3 nM、10 nM及び30 nMとなるよう、各mRNAと終濃度0.3%のLipofectamin MessengerMAX Transfection Reagent(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、カタログ番号:LMRNA008)とをオプティメム(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、カタログ番号:31985-070)で希釈して混合し、混合液を1ウェルあたり10  $\mu$ Lとなるよう各々の培養プレートに添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で5時間培養した。5時間培養後の細胞から培養上清を除去し、氷冷したD-PBS(-)(ナカライテスク社製)で1度洗浄した後、2%のプロテアーゼ阻害剤カクテル(動物細胞抽出物用、ナカライテスク社製)を含むiScript RT-qPCR Sample Preparation Reagent (バイオラッド社、1708898)を1ウェルあたり20  $\mu$ L加え、30秒間激しく浸透して細胞を溶解した。

得られた細胞溶解液中の翻訳産物は、試験例1に記載のサンドイッチELISA法と同様の方法で実施した。測定の結果、ポリペプチド標品の吸光度をもとに作成した検量線を用いて定量した各翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度(nM)を、以下表6に記載した。

[0254] 表6-1～表6-9：

[0255]

[表6-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.010	0.020
E13	38	0.010	0.083	0.317
E15	44	0.120	0.717	1.173
E46	133	0.127	0.550	0.857

[0256] [表6-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E12	35	0.077	1.030	1.367
E55	152	0.183	0.893	1.697
E56	155	0.233	1.113	1.847
E70	195	0.053	0.580	1.123
E4	11			0.010

[0257] [表6-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E62	171	0.073	0.453	0.780
E63	174	0.033	0.410	0.960
E65	180	0.063	0.757	0.823
E66	183	0.030	0.273	0.593

[0258] [表6-4]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E10	29	0.000	0.010	0.010
E51	140	0.000	0.010	0.013
E58	161	0.010	0.180	0.347
E164	305	0.010	0.160	0.343
E4	11			0.010

[0259]

[表6-5]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E79	206	0.140	0.780	1.483
E80	209	0.010	0.040	0.073
E81	212	0.107	0.787	1.243
E95	234	0.053	0.710	1.313
E4	11			0.020

[0260] [表6-6]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E79	206	0.117	0.803	1.503
E81	212	0.100	0.787	1.223
E82	215	0.120	0.757	1.350
E83	218	0.130	0.780	1.377
E4	11			0.020

[0261] [表6-7]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E63	174	0.107	0.757	1.673
E65	180	0.067	0.430	0.733
E67	186	0.050	0.577	1.047
E68	189	0.010	0.190	0.397
E4	11	0.000	0.000	0.010

[0262] [表6-8]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E56	155	0.143	0.947	1.610
E64	177	0.117	0.553	0.670
E2	5	0.063	0.483	0.920
E79	206	0.063	0.300	0.903
E4	11	0.000	0.000	0.010

[0263]

[表6-9]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度 (nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E47	136	0.000	0.000	0.000
E51	140	0.000	0.000	0.010
E58	161	0.023	0.327	0.447
E164	305	0.020	0.300	0.353
E4	11	0.000	0.000	0.010

[0264] 上記表 6-1 ~ 表 6-9 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する各 mRNA は HeLa 細胞に添加後、遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生し、その翻訳量は糖修飾を有さない mRNA に対し優れていた。

## [0265] 試験例 3

(mRNA サンプルの HeLa 細胞株を用いた *in vitro* 翻訳反応試験)

下記表 7-1 ~ 表 7-4 に記載の各 mRNA について、HeLa 細胞株を用いて *in vitro* での翻訳活性の持続性を評価した。細胞の培養と mRNA の導入は、各 mRNA の終濃度が 30 nM となるように調製した以外は試験例 2 と同様の方法で実施した。各 mRNA を添加し 4 時間培養後の細胞から培養上清を除去し、10% ウシ胎仔血清を含む RPMI 培地 (ナカライテスク社製) を 1 ウェルあたり 50  $\mu$ L 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を継続した。各 mRNA の添加時点から 5 時間後、8 時間後、及び 24 時間後にそれぞれ、培養後の細胞から培養上清を除去し、試験例 2 と同様の方法で細胞を溶解した。

得られた細胞溶解液中の翻訳産物は、試験例 1 に記載のサンドイッチ ELISA 法と同様の方法で実施した。測定の結果、ポリペプチド標品の吸光度をもとに作成した検量線を用いて定量した各翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度 (nM) を、以下表 7 に記載した。

[0266] 表 7-1 ~ 表 7-4 :

[0267]

[表7-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E4	11	0.013	0.010	0.010
E13	38	0.263	0.117	0.003
E15	44	1.347	1.037	0.150
E16	47	1.133	0.683	0.040
E17	50	2.713	2.570	0.970
E46	133	1.217	0.927	0.153

[0268] [表7-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E4	11	0.013	0.010	0.010
E12	35	2.553	2.523	1.130
E53	146	2.267	2.557	1.747
E54	149	3.263	3.187	2.627
E55	152	2.723	2.847	2.087
E56	155	2.383	2.663	2.093
E4	11	0.013	0.010	0.010

[0269] [表7-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E4	11	0.010	0.003	0.000
E79	206	0.843	1.020	0.597
E95	234	0.813	1.017	0.670

[0270] [表7-4]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E4	11	0.010	0.000	0.000
E58	161	0.373	0.490	0.043
E67	186	0.817	0.983	0.547
E68	189	0.333	0.473	0.283
E164	305	0.367	0.517	0.200

[0271] 上記表 7-1～表 7-4 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する各 mRNA は HeLa 細胞に添加後、遺伝子配列にコードされたポリペプチドを

産生し、その翻訳量は糖修飾を有さないmRNAに対し優れていた。

#### [0272] 試験例 4

(mRNAサンプルのHeLa細胞株を用いたin vitro翻訳反応試験)

下記表 8 - 1 ~ 表 8 - 8 に記載の各mRNAについて、HeLa細胞株を用いてin vitroでの翻訳活性を評価した。

まず、各mRNAを19  $\mu$ MとなるようにTHE RNA Storage Solution (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、カタログ番号AM7000)で希釈した。HeLa細胞株は終濃度1%のウシ血清アルブミン(和光純薬社、カタログ番号017-22231)を含むOpti-MEM I Reduced Serum Media(ThermoFisher Scientific社製、カタログ番号31985070)に懸濁した後、90 xg、室温にて10分間遠心し、上清を注意深く取り除いた後、1%SE Cell Line 96-well Nucleofector Kit (Lonza社製、カタログ番号V4SC-1096)付属のSE Cell Line Nucleofector Solution及びSupplement 1の混合液で200,000 cells/19  $\mu$ Lとなるように懸濁した。調製したmRNA溶液とHeLa細胞懸濁液を体積比1:19で混合したのち、Nucleofector™ 96-well Shuttleシステム (Lonza社製) を用い、パルス条件FF-150でエレクトロポレーションを実施した。エレクトロポレーション10分後の細胞を10%ウシ胎仔血清を含むRPMI培地(ナカライテスク社製)に懸濁し、1ウェルあたり細胞数50,000 cells/145  $\mu$ Lとなるように、96ウェル接着細胞用培養プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で培養した。培養後3時間、8時間、24時間後の細胞それぞれについて、培養上清を除去し、氷冷したD-PBS(-)(ナカライテスク社製)で1度洗浄した後、2%のプロテアーゼ阻害剤カクテル(動物細胞抽出物用、ナカライテスク社製)を含むiScript RT-qPCR Sample Preparation Reagent (バイオラッド社、1708898)を1ウェルあたり20  $\mu$ L加え、30秒間激しく浸透して細胞を溶解した。

得られた細胞溶解液中の翻訳産物は、試験例1に記載のサンドイッチELISA法と同様の方法で実施した。測定の結果、ポリペプチド標品の吸光度をもとに作成した検量線を用いて定量した各翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度(nM)を、以下表 8 に記載した。

[0273] 表 8 - 1 ~ 表 8 - 8 :

[0274] [表8-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E12	35	0.627	0.318	0.020
E55	180	0.633	0.577	0.370
E56	183	0.730	0.733	0.663
E70	195	0.403	0.240	0.037

[0275] [表8-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.010	0.000	0.010
E62	171	1.270	0.997	0.203
E63	174	1.027	0.873	0.453
E64	177	0.840	0.747	0.283
E67	186	1.017	0.890	0.597
E68	189	0.460	0.477	0.237

[0276] [表8-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.010	0.000	0.007
E79	206	0.543	0.540	0.300
E80	209	0.047	0.027	0.010
E81	212	0.620	0.500	0.280
E82	215	0.507	0.507	0.273
E95	234	0.640	0.567	0.297

[0277] [表8-4]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.010	0.010	0.010
E13	38	0.037	0.010	0.007
E14	41	0.010	0.010	0.007
E15	44	0.517	0.183	0.020
E16	47	0.050	0.010	0.000
E17	50	0.670	0.380	0.037

[0278]

[表8-5]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E7	20	0.043	0.000	0.000
E26	77	0.537	0.183	0.000
E27	80	0.317	0.050	0.000
E28	83	0.183	0.040	0.000
E29	86	0.093	0.017	0.000

[0279] [表8-6]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E7	20	0.023	0.000	0.000
E9	26	0.413	0.123	0.000
E26	77	0.397	0.117	0.000
E27	80	0.230	0.037	0.000
E28	83	0.137	0.030	0.000

[0280] [表8-7]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E56	155	0.613	0.537	0.343
E79	206	0.360	0.373	0.190
E95	234	0.407	0.447	0.203

[0281] [表8-8]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E58	161	0.130	0.100	0.000
E164	305	0.143	0.147	0.010

[0282] 上記 8-1 ~ 表 8-8 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する mRNA は HeLa 細胞にエレクトロポレーション後、遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生し、その活性は糖修飾を有さない mRNA に比べて優れていた。中でも、表 8-5 に示す試験結果から、ポリ A 鎖を構成するヌクレオチドの 50% が糖修飾されている E29 よりも、ポリ A 鎖を構成するヌクレオチドの 65% 以上が糖修飾されている E26、E27 及び E28 の方が優れ

た翻訳活性を示すことが明らかとなった。

[0283] 試験例 5

(mRNAサンプルのヒト大動脈平滑筋細胞を用いたin vitro翻訳反応試験)

表9-1～表9-3に記載の各mRNAについて、ヒト大動脈平滑筋細胞(Human Aortic Smooth Muscle Cells、Lonza社製、CC-2571。以降、hAoSMCと記載することもある)を用いてin vitroでの翻訳活性を評価した。まず、SmGM-2 BulletKit培地(Lonza社製、CC-3182)を用いて製造者のマニュアル記載の通り培養したhAoSMCを用い、SmGM-2 BulletKit培地で懸濁したhAoSMCを1ウェルあたり細胞数10,000 cells/100  $\mu$ Lとなるように、96ウェル接着細胞用培養プレートに播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下で一晩培養した。一晩培養後の細胞から培養上清を除去し、1ウェルあたり40  $\mu$ LのSmGM-2 BulletKit培地を添加した後、各mRNAの終濃度が3 nM、10 nM及び30 nMとなるよう、各mRNAと終濃度0.3%のLipofectamin MessengerMAX Transfection Reagent(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、カタログ番号:LMRNA008)とをオプティメム(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、カタログ番号:31985-070)で希釈して混合し、混合液を1ウェルあたり10  $\mu$ Lとなるよう各々の培養プレートに添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下で5時間培養した。5時間培養後の細胞から培養上清を除去し、氷冷したD-PBS(-)(ナカライテスク社製)で1度洗浄した後、2%のプロテアーゼ阻害剤カクテル(動物細胞抽出物用、ナカライテスク社製)を含むiScript RT-qPCR Sample Preparation Reagent (バイオラッド社、1708898)を1ウェルあたり20  $\mu$ L加え、30秒間激しく浸透して細胞を溶解した。

得られた細胞溶解液中の翻訳産物は、試験例1に記載のサンドイッチELISA法と同様の方法で実施した。測定の結果、ポリペプチド標品の吸光度をもとに作成した検量線を用いて定量した各翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度(nM)を、以下表9に記載した。

[0284] 表9-1～表9-3：

[0285]

[表9-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.000	0.010
E12	35	0.023	0.333	0.247
E55	152	0.047	0.347	0.437
E56	155	0.030	0.327	0.517

[0286] [表9-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.007	0.010
E79	206	0.017	0.233	0.350
E81	212	0.013	0.157	0.367
E95	234	0.023	0.243	0.457

[0287] [表9-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.010	0.010
E65	180	0.010	0.110	0.177
E67	186	0.020	0.243	0.210
E68	189	0.007	0.043	0.060

[0288] 上記表 9-1～表 9-3 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する各 mRNA は hAoSMC に添加後、遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生し、その翻訳量は糖修飾を有さない mRNA に対し優れていた。

## [0289] 試験例 6

(mRNA サンプルのヒト大動脈平滑筋細胞を用いた *in vitro* 翻訳反応試験)

下記表 10-1～表 10-5 に記載の各 mRNA について、ヒト大動脈平滑筋細胞を用いて *in vitro* での翻訳活性を評価した。

まず、各 mRNA を 19  $\mu$ M となるように THE RNA Storage Solution (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、カタログ番号 AM7000) で希釈した。hAoSMC は終濃度 1% のウシ血清アルブミン (和光純薬社、カタログ番号 017-22231) を含む Opti-MEM I Reduced Serum Media (ThermoFisher Scientific 社製、カ

タログ番号31985070)に懸濁した後、90 xg、室温にて10分間遠心し、上清を注意深く取り除いた後、P1 Primary Cell 96-well Nucleofector Kit (Lonza社製、カタログ番号V4SP-1096)付属のP1 Primary Cell Nucleofector Solution及びSupplement 1の混合液で100,000 cells/19 μLとなるように懸濁した。調製したmRNA溶液とhAoSMC懸濁液を体積比1:19で混合したのち、Nucleofector™ 96-well Shuttleシステム (Lonza社製) を用い、パルス条件FF-130でエレクトロポレーションを実施した。エレクトロポレーション10分後の細胞をSmGM-2 BulletKit培地(Lonza社製、CC-3182)に懸濁し、1ウェルあたり細胞数20,000 cells/145 μLとなるように、96ウェル接着細胞用培養プレートに播種し、37℃、5% CO2条件下で培養した。培養後4時間、8時間、24時間後の細胞それぞれについて、培養上清を除去し、氷冷したD-PBS(-)(ナカライテスク社製)で1度洗浄した後、2%のプロテアーゼ阻害剤カクテル(動物細胞抽出物用、ナカライテスク社製)を含むiScript RT-qPCR Sample Preparation Reagent (バイオラッド社、1708898)を1ウェルあたり20 μL加え、30秒間激しく浸透して細胞を溶解した。

得られた細胞溶解液中の翻訳産物は、試験例1に記載のサンドイッチELISA法と同様の方法で実施した。測定の結果、ポリペプチド標品の吸光度をもとに作成した検量線を用いて定量した各翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度(nM)を、以下表10に記載した。

[0290] 表10-1～表10-5：

[0291] [表10-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 4 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.003	0.000	0.000
E13	38	0.007	0.003	0.000
E14	41	0.003	0.000	0.000
E15	44	0.023	0.027	0.010
E16	47	0.023	0.023	0.003
E17	50	0.017	0.017	0.007

[0292]

[表10-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 4 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E12	35	0.027	0.033	0.010
E55	152	0.033	0.050	0.027
E56	155	0.027	0.043	0.043
E70	195	0.023	0.033	0.013

[0293] [表10-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 4 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E65	180	0.043	0.077	0.047
E66	183	0.040	0.083	0.060
E68	189	0.010	0.010	0.010
E67	186	0.020	0.030	0.023

[0294] [表10-4]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 4 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.003	0.003	0.000
E79	206	0.124	0.122	0.079
E80	209	0.030	0.023	0.007
E81	212	0.127	0.142	0.085
E95	234	0.139	0.170	0.094

[0295] [表10-5]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 4 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E56	155	0.197	0.220	0.163
E79	206	0.103	0.120	0.093

[0296] 上記表 10-1 ~ 表 10-5 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する mRNA は hAoSMC にエレクトロポレーション後、遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生し、その活性は翻訳領域に糖修飾を有さない mRNA に比べて優れていた。

[0297] 試験例7

(mRNA サンプルの血清中安定性試験)

下記表 1 1 に記載の各mRNAについて、市販マウス血清（コージンバイオ、カタログ番号12081001）を用いて血清中核酸安定性を評価した。まず、マウス血清をUltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (DW)（invitrogen、カタログ番号10977-015）で50倍希釈し、希釈血清溶液を調製した。各mRNAは5  $\mu$ MとなるようTHE RNA storage solution（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、カタログ番号AM7001）で希釈した。

酵素未反応（0 min）用として別の96 well PCRプレートに希釈血清溶液8  $\mu$ L、6 U/ $\mu$ L Ribonuclease Inhibitor（タカラバイオ、カタログ番号2311B）2.5  $\mu$ Lの混合溶液10.5  $\mu$ L、及び5  $\mu$ M mRNA 2  $\mu$ Lを添加して-30  $^{\circ}$ Cで保存した。酵素反応用として、また別の96 well PCRプレートに希釈血清溶液8  $\mu$ Lと5  $\mu$ M mRNA 2  $\mu$ Lを添加してよく混合した。PCRプレートを所定の時間（15 min、30 min、60 min）37  $^{\circ}$ Cで反応させた後、6 U/ $\mu$ L Rnase inhibitorを2.5  $\mu$ L添加して測定まで-30  $^{\circ}$ Cで保存した。

酵素反応後の反応溶液中の残存mRNA量は、以下に記載のRT-qPCR法により検出した。検量線は評価したmRNAごとにそれぞれ作成し、各mRNAをTHE RNA storage solution によって4  $\mu$ Mから4倍希釈で11点濃度を取り、希釈系列を作製した。検量線及び酵素反応後のサンプル2.5  $\mu$ LはRibonuclease Inhibitorを終濃度0.2 U/mLで加えたDWを用いて1071倍希釈した。この希釈した試料5  $\mu$ L及び2  $\mu$ M RT primer(シグマアルドリッチ社) 1  $\mu$ Lを用いてTaqMan Micro RNA RT kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック、カタログ番号4366597）により逆転写産物cDNAを作製した。反応温度は16  $^{\circ}$ C 30 min  $\rightarrow$  42  $^{\circ}$ C 30 min  $\rightarrow$  85  $^{\circ}$ C 5 minで実施した。cDNA 5  $\mu$ L、TaqMan Gene Expression Master Mix 10  $\mu$ L、Fw primer(シグマアルドリッチ社) 0.28  $\mu$ L、Rv primer(シグマアルドリッチ社) 0.33  $\mu$ L、TaqMan MGB Probe(サーモフィッシャーサイエンティフィック社、カタログ番号4316033) 0.38  $\mu$ L及びDistilled water 4.01  $\mu$ Lを混合し、qPCR測定を行った。機器はQuantstudio12K Flex(Apply Biosystems)を使用した。また、使用したPrimer及びTaqman MGB ProbeのDNA配列は以下である。測定の結果、標品のCT値をもとに検量線を用いて、



[0302] 表 1 2 - 1 ~ 表 1 2 - 7 :

[0303] [表12-1]

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E31	90	25.993	4.71
E71	198	10.892	1.97
E72	199	19.436	3.52
E73	200	20.622	3.73
E74	201	19.338	3.50
E75	202	8.980	1.63
E76	203	15.411	2.79
E77	204	15.536	2.81
E78	205	10.471	1.90
E85	224	19.894	3.60
E86	225	13.435	2.43
E87	226	11.132	2.02
E88	227	12.522	2.27
E89	228	18.310	3.32
E90	229	11.413	2.07
E91	230	14.883	2.69
E92	231	21.319	3.86
E30	89	5.523	1.00
E61	170	16.168	2.93

[0304]

[表12-2]

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E93	232	3.464	0.61
E94	233	6.309	1.11
E96	237	14.861	2.60
E97	238	22.251	3.90
E98	239	9.450	1.66
E99	240	14.573	2.55
E100	241	8.723	1.53
E101	242	13.510	2.37
E102	243	11.197	1.96
E103	244	4.959	0.87
E104	245	25.710	4.50
E105	246	12.564	2.20
E106	247	16.057	2.81
E107	248	13.531	2.37
E108	249	20.671	3.62
E30	89	5.709	1.00
E61	170	11.057	1.94

[0305]

[表12-3]

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E019	250	18.672	4.04
E110	251	12.976	2.81
E111	252	13.883	3.00
E112	253	11.138	2.41
E113	254	13.333	2.88
E114	255	11.570	2.50
E115	256	13.348	2.89
E116	257	20.125	4.35
E117	258	14.713	3.18
E118	259	19.148	4.14
E119	260	7.051	1.52
E120	261	1.294	0.28
E121	262	22.516	4.87
E122	263	16.092	3.48
E123	264	22.733	4.92
E124	265	23.290	5.04
E125	266	10.663	2.31
E30	89	4.625	1.00
E61	170	13.887	3.00

[0306]

[表12-4]

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E126	267	7.770	1.84
E127	268	7.617	1.81
E128	269	6.520	1.55
E129	270	4.105	0.97
E130	271	4.843	1.15
E131	272	3.846	0.91
E132	273	2.425	0.58
E133	274	6.694	1.59
E134	275	8.231	1.95
E135	276	6.688	1.59
E136	277	7.887	1.87
E137	278	6.767	1.61
E138	279	4.118	0.98
E139	280	2.913	0.69
E140	281	6.503	1.54
E141	282	17.884	4.24
E142	283	18.111	4.30
E30	89	4.216	1.00
E61	170	9.462	2.24

[0307]

[表12-5]

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E143	284	11.167	3.13
E144	285	15.514	4.34
E145	286	5.484	1.53
E146	287	5.053	1.41
E147	288	13.516	3.78
E148	289	12.278	3.44
E149	290	4.911	1.37
E150	291	4.017	1.12
E151	293	3.751	1.05
E152	293	3.476	0.97
E153	294	16.010	4.48
E154	295	12.791	3.58
E155	296	14.127	3.95
E156	297	15.781	4.42
E157	298	10.380	2.90
E158	299	10.570	2.96
E159	300	16.523	4.62
E30	89	3.574	1.00
E61	170	10.746	3.01

[0308] [表12-6]

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E160	301	9.461	3.65
E161	302	10.070	3.88
E162	303	8.835	3.41
E163	304	13.862	5.35
E30	89	2.593	1.00
E61	170	7.277	2.81

[0309]

[表12-7]

mRNA名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E71	198	11.680	2.31
E72	199	20.707	4.10
E74	201	22.307	4.41
E85	224	24.987	4.94
E98	239	10.253	2.03
E200	395	19.160	3.79
E201	396	19.480	3.85
E202	397	16.533	3.27
E203	394	15.347	3.04
E30	89	5.053	1.00

[0310] 上記表12-1～12-7に示す試験結果から明らかなように、各mRNAはHela細胞ライセートに添加後、真核細胞の翻訳系によって遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生した。

[0311] 実施例5

(VEGFを翻訳するmRNAの合成)

VEGFタンパク質に翻訳されるmRNAの合成に用いた材料（ポリヌクレオチド）の配列情報を示す。

[0312] 表13：

[0313]

[表13]

化合物名	配列 (5'⇒3')	配列番号
5'末端ポリヌクレオチド配列 N1	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGAACUUUCUGCUGUCUU	436
5'末端ポリヌクレオチド配列 N2	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(F)A(M)G(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)A(M)G(F)A(M)A(F)A(M)U(F)A(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGA(F)ACU(F)UUC(F)UGC(F)UGU(F)CUU	437
5'末端ポリヌクレオチド配列 N3	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)U(F)Am6(M)Am6(F)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(M)Am6(F)Am6(M)G(F)Am6(M)Am6(F)G(M)Am6(F)G(M)U(F)Am6(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(M)G(F)Am6(M)Am6(F)Am6(M)U(F)Am6(M)U(F)Am6(M)Am6(F)G(M)Am6(F)G(M)C(F)C(M)Am6(F)C(M)C(F)A(F)UGA(F)ACU(F)UUC(F)UGC(F)UGU(F)CUU	438
人工合成遺伝子配列 GN	AATTCAGTACTTAATACGACTCACTATAGGGTGCATTGGAGCCTTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGCACCCATGGCAGAA GGAGGAGGGCAGAATCATCACGAAGTGGTGAAGTTCATGGATGTCTATCAGCGCAGCTACTGCCATCCAATCGAGACCCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGTACATCTTCAAGCCATCCTGTGTGCCCTGATGCCGATGCGGGGGCTGCTGCAATGACGAGGGCCTGGAGTGTGTGCCACTGAGGAGTCCAACATCACCATGCAGATTATGCGGATCAAACCTCACCAAGGCCAGCATAGGAGAGATGAGCTTCTACAGCACAACAAATGTGAATGCAGACCAAA GAAAGATAGAGCAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGCCTTGCTCAGAGCGGA GAAAGCATTGTGTTGTACAAGATCCGCAGACGTGTAATGTTCTGCAAAA ACACAGACTCGCGTTGCAAGGCGAGGCAGCTTGAGTTAAACGAACGTA ACTTGCAGATGTGACAAGCCGAGGCGGTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCC ATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCTGCACC CGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGCAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAT	439
テンプレート DNA-4	dGdGdCdTdCdCdAdAdTdGdCdAdCdCdCdAdAdGdAdCdAdGdCdAdGdAdAdAdGdT	440

[0314] 以下の一連の操作によりmRNA(VEGF-1, VEGF-2, VEGF-3)を得た。

(工程1：線状化プラスミドDNAの調製とIn vitro transcriptionによるRNA断片の調製)

プラスミドDNAは市販のpUC19ベクターのEcoRVサイト及びXbaIサイトに、表13に示す人工合成遺伝子配列GNを挿入したものをを用いた(株式会社ジーンウィズ製)。プラスミドDNAを制限酵素XbaIを用い直鎖化を行った。反応液の終濃度は、プラスミドDNA 20 ng/μL, 0.01% BSA, Xba I 0.15 U/μL (Takara

1093A), 1 x 添付バッファーとした。37度で2時間インキュベートした後、フェノールクロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿を行い、直鎖化プラスミドの粗生成物を得た。得られた鋳型DNAとT7 RNAポリメラーゼを用いて転写反応を行った。反応液の終濃度は以下の通りである。鋳型DNA 10 ng/ $\mu$ L, DT T 5mM, ATP 2 mM, CTP 2 mM, UTP 2mM, GMP 2 mM, GTP 0.5 mM, Murine RNase inhibitor 0.2 U/ $\mu$ L (NEB, M0314), T7 RNAポリメラーゼ 2.5 U/ $\mu$ L (Takara, 2540A), 1 x 添付バッファー。37度で2時間インキュベートした後、DNase 終濃度0.1 U/ $\mu$ L分 (Takara, 2270A)添加して、同温度で30分インキュベートした。フェノールクロロホルム抽出、アミコン10K処理(Merck Millipore)、イソプロパノール沈殿を行い、転写産物の粗生成物を得た。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で泳動後、該当バンドを切り出し、MQ水で抽出、アミコン精製及びイソプロパノール沈殿により精製RNAを得た。続いてRNA 5' P yrophosphohydrolase (RppH)処理により末端トリリン酸体のモノリン酸体への変換を行った。反応溶液の終濃度は以下の通り ; RNA 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L, RppH 0.1 U/ $\mu$ L, Murine RNase inhibitor 1 U/ $\mu$ L (NEB, M0314), 1x NEBuffer 2 (NEB, B7992S)。37度で30分インキュベートした後、フェノールクロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿を行い、目的の3'末端側ポリヌクレオチド断片であるポリヌクレオチドの粗生成物を得た。

[0315] (工程2 : RNAライゲーションによるRNA連結産物の調製)

定法に従い化学合成により得られた表13に示す各5'末端側ポリヌクレオチド断片(N1, N2, N3)、工程1のin vitro transcriptionにより得られた3'末端側ポリヌクレオチド断片、及びテンプレートDNA-4を用いて、RNA ligase 2による連結反応を行った。終濃度は以下の通りである。5'末端側 RNA 2  $\mu$ M, 3'末端側RNA 1  $\mu$ M, テンプレートDNA 4  $\mu$ M, PEG8000 10%, T4 RNA ligase 2 1 U/ $\mu$ L (NEB, M0239), 1 x 添付バッファー、Murine RNase inhibitor 1 U/ $\mu$ L (NEB, M0314)。酵素及びPEG添加前の混合物を90度で3分加熱し、徐々に室温に戻し、酵素及びPEGを添加し、45度で1時間インキュベートした。フェノールクロロホルム抽出、アミコン10K処理(Merck Millipore)、イソ

ロパノール沈殿を行い、転写産物の粗生成物を得た。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で泳動後、該当バンドを切り出し、MQ水で抽出、アミコン精製及びイソプロパノール沈殿により精製mRNAを得た。

[0316] 試験例 9

(mRNAサンプルの翻訳反応)

上記実施例 5 で得られたmRNA配列情報を表 1 4 - 1 ~ 表 1 4 - 2 に示す。

[0317] 表 1 4 - 1 ~ 表 1 4 - 2 :

[0318]

[表14-1]

化合物名	配列 (5'⇒3')	配列番号
VEGF-1	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(F)A(M)G(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)A(M)G(F)A(M)A(F)A(M)U(F)A(M)U(F)A(M)A(F)G(M)A(F)G(M)C(F)C(M)A(F)C(M)C(F)A(F)UGA(F)ACU(F)UUC(F)UGC(F)UGU(F)CUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUACCUCCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUGGUGGACAUCUCCAGGAGUACCCUGAUGAGAU CGA GUACAUCUUAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCACUGAGGAGUCCAACAUCACCAUGCAGAUUAUGCGGAUCAAAACCUACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAG AUGAGCUUCCUACAGCACAAACAAAUGUGAAUGCAGACCAAAGAAAGAUAG AGCAAGACAAGAAAAUCCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAGAAAGCAUUGUUUGUACAAGAUCCGCAGACGUGUAAAUGUCCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCUUGAGUUAAACGAACGUACUUGCAGAU GUGACAAGCCGAGGCGGUGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGCAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG	441
VEGF-2	G(MOE)^G(MOE)^G(MOE)^A(MOE)^A(MOE)^A(MOE)U(F)Am6(M)Am6(F)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(M)Am6(F)Am6(M)G(F)Am6(M)Am6(F)G(M)Am6(F)G(M)U(F)Am6(M)Am6(F)G(M)Am6(F)Am6(M)G(F)Am6(M)Am6(F)Am6(M)U(F)Am6(M)U(F)Am6(M)Am6(F)G(M)Am6(F)G(M)C(F)C(M)Am6(F)C(M)C(F)A(F)UGA(F)ACU(F)UUC(F)UGC(F)UGU(F)CUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUACCUCCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUGGUGGACAUCUCCAGGAGUACCCUGAUGAGAU CGA GUACAUCUUAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCACUGAGGAGUCCAACAUCACCAUGCAGAUUAUGCGGAUCAAAACCUACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAG AUGAGCUUCCUACAGCACAAACAAAUGUGAAUGCAGACCAAAGAAAGAUAG AGCAAGACAAGAAAAUCCUGUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAGAAAGCAUUGUUUGUACAAGAUCCGCAGACGUGUAAAUGUCCUGCAAAAACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCUUGAGUUAAACGAACGUACUUGCAGAU GUGACAAGCCGAGGCGGUGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGCAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG	442

[表14-2]

VEGF-3	GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUG AACUUUCUGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUACC UCCACCAUGCCAAGUGGUCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGGAGGAGGG CAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCU ACUGCCAUCCAUCGAGACCCUGGUGGACAUCUCCAGGAGUACCCUGAU GAGAU CGAGUACAUCUUAAGCCAUCUUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCG GGGGUCUGCAUUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUC CAACAUCACCAUGCAGAUUAUGCGGAUCAACCUCACCAAGGCCAGCACA UAGGAGAGAUGAGCUUCCUACAGCACAAACAAUGUGAAUGCAGACCAAAG AAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAUCCCUUGGGCCUUGCUCAGAGCGGAG AAAGCAUUUGUUUGUACAAGAUCCGCAGACGUGUAAAUGUCCUGCAA AACACAGACUCGCGUUGCAAGGCGAGGCAGCUUGAGUUAACGAACGUAC UUGCAGAUGUGACAAGCCGAGGCGGUGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUG GCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCU GCACCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG	443
--------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

[0320] 各mRNAについて、Hela細胞株を用いてin vitroでの翻訳活性を評価した。

まず、10%ウシ胎仔血清を含むRPMI培地(ナカライテスク社製)で懸濁したHela細胞を1ウェルあたり細胞数10,000 cells/100 μLとなるように、96ウェル接着細胞用培養プレートに播種し、37℃、5% CO2条件下で一晩培養した。一晩培養後の細胞から培養上清を除去し、1ウェルあたり40 μLの10%ウシ胎仔血清を含むRPMI培地を添加した後、各化合物の終濃度が0.3、1、3、及び10 nMとなるよう、各化合物と終濃度0.3%のLipofectamin MessengerMAX Transfection Reagent(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、カタログ番号:LMRNA008)とをオプティメム(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、カタログ番号:31985-070)で希釈して混合し、混合液を1ウェルあたり10 μLとなるよう各々の培養プレートに添加し、37℃、5% CO2条件下で24時間培養した。24時間培養後の細胞から培養上清を回収し、得られた培養上清中のVEGFタンパク質量は、Human VEGE Quantikine ELISA(R&D社製、カタログ番号DVE00)を用い、キット付属のマニュアルに従い測定した。測定の結果定量された各培養上清中のVEGFタンパク質濃度(ng/mL)を、以下表15に記載した。

[0321] 表15 :

[0322]



## (工程1：線状化DNAの調製)

プラスミドDNAは市販のpUC57ベクターのBamHIサイト及びPstIサイトに、表16に示す人工合成遺伝子配列G0を挿入したものをを用いた。プラスミドDNAを用いて以下の通りPCR反応を実施した。具体的には、終濃度250 ng/ $\mu$ LのプラスミドDNA、終濃度各250 nMのプライマーP1及びP2、200  $\mu$ LのPrimestar MAX (タカラバイオ社製、カタログ番号R045B)を混合し、Nuclease-free waterで400  $\mu$ Lに調製し、サーマルサイクラーを用いて98°Cで30秒間加熱し、その後98°C10秒間、55°C5秒間、72°C5秒間の加熱を30回繰り返す、その後72°Cで5分間加熱した後、4°Cで冷却した。得られたPCR産物400  $\mu$ Lに対し、10  $\mu$ LのDpn I(New England BioLab社製、カタログ番号R0176L)、50  $\mu$ LのCutSmart Buffer(New England Biolab社製)、40  $\mu$ LのNuclease-free waterを添加して混合し、37°Cで30分間静置した。得られた反応溶液を3.0%アガロース-TAEゲルで電気泳動し、該当バンドを切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Midi (MACHEREY-NAGEL社製、カタログ番号740986.20)でPCR産物を精製した後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行って、PCR DNAを得た。

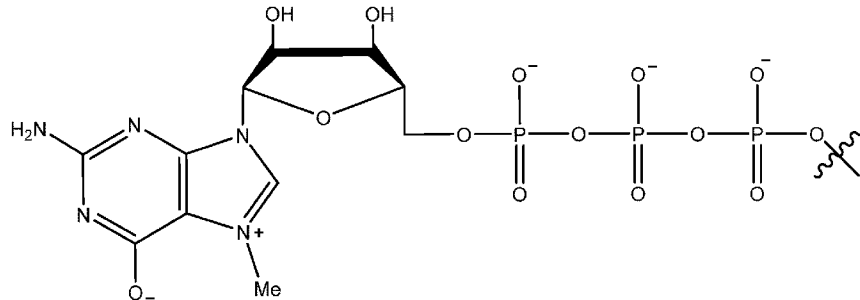
## [0328] (工程2：In vitro transcriptionによるRNA断片の調製)

得られたPCR DNAを用いて転写反応を行った。反応液の終濃度は以下の通り； PCR DNA 4 ng/ $\mu$ L, ATP, CTP, UTP, GTP 各9 mM, MEGAScript T7 Transcription Kit(Invitrogen社製、カタログ番号AMB13345)付属のT7 Enzyme 10%, MEGAScript T7 Transcription Kit付属のT7 Reaction Buffer 10%。反応液量は400  $\mu$ Lとし、37°Cで6時間インキュベートを行った。続いてMEGAScript T7 Transcription Kit付属のTrubo DNaseを反応液量の1/20vol量添加し混合し、37°Cで15分振盪した。フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿により粗精製を行い、RNA断片を得た。得られたRNA断片を用い、Vaccinia Capping System(New England Biolab社製、カタログ番号MB2080S)及びScriptCap 2'-O-Methyltransferase Kit(CELLSCRIPT社製、カタログ番号C-SCMT0625)を用い、以下の通りCap化反応を行った。反応液の終濃度は以下の通り、500 ng/ $\mu$ L RNA断片、10%のCapping Buffer、0.5 mM GTP、0.2 mM SAM、0.5 U/ $\mu$ L

Vaccinia capping enzyme、1 U/ $\mu$ L RNase inhibitor、2.5 U/ $\mu$ L 2'-O-Methyltransferase。反応液量はNuclease-free waterで2000  $\mu$ Lとし、37°Cで1時間静置した。フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製を行い、Cap化RNA断片を得た。その後、得られたCap化RNA断片105  $\mu$ Lに対し、7  $\mu$ LのAntarctic Phosphatase (New England Biolab社製、カタログ番号M0289 S)、14  $\mu$ Lの10x Antarctic Phosphatase Buffer、14  $\mu$ LのNuclease-free waterを添加し混合し、37°Cで1時間静置することにより、アルカリフォスファターゼ反応を実施した。反応サンプルは、実施例1(dPAGEを用いたRNA断片の精製)と同様の方法により精製し、Cap化mRNA IVT-1 3.04 nmolを得た。得られたIVT-1の配列を表17に示す。

[0329] 表17の各ヌクレオチドN(大文字)はRNAを、N(M)は2'-O-メチル修飾RNAを、m7Gpppは下記構造式を表す。

[化52]



[0330] [表17]

化合物名	配列 (5'⇒3')	配列番号
IVT-1	m7GpppG(M)GGAGAAUACAAGCUACUUGUUCUUUUUGCAGCCACCAUGG ACUACAAGGACGACGACGACAAGAUAUCGACUAUAAAGACGACGACGAU AAAGGUGGCGACUAUAAGGACGACGACGACAAACACCACCACCACCA CUGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	447

[0331] 試験例10

(mRNAサンプルのHeLa細胞株ライセートを用いた翻訳反応試験)

以下表18-1~表18-10に記載の各mRNAについて、試験例1と同様の方法によって、ヒト細胞系における翻訳活性を評価した。0.3  $\mu$ Mの各mRNAを添加した翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度(nM)を、下記表18に記載した。

[0332] 表 18-1 ~ 表 18-10 :

[0333] [表18-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E4	11	2.167
E193	374	50.167
E194	377	71.333
E195	380	90.833
E196	383	4.500
E197	386	2.167

[0334] [表18-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E4	11	0.500
E193	374	27.833
E194	377	44.333
E195	380	37.667
E198	389	49.000
E199	392	43.833

[0335] [表18-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E4	11	0.833
E65	180	24.500
E67	186	20.667
E68	189	8.167
E180	343	13.500
E181	346	21.833

[0336]

[表18-4]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E4	11	1.000
E175	338	17.333
E177	340	15.167
E178	341	17.333
E180	343	21.167
E165	308	70.500

[0337] [表18-5]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E4	11	1.000
E176	339	5.500
E177	340	17.333
E179	342	8.167
E180	343	22.000
E167	314	25.667

[0338] [表18-6]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E58	161	61.167
E59	164	66.000
E164	305	108.167
E192	373	1.333

[0339] [表18-7]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E182	349	1.167
E183	350	57.167
E184	353	75.167
E185	356	69.000

[0340]

[表18-8]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E186	359	0.000
E187	360	0.500
E188	363	0.500

[0341] [表18-9]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E189	366	1.667
E190	367	10.000
E191	370	6.333

[0342] [表18-10]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E217	416	0.000
E218	422	1.000
E219	426	1.000

[0343] 上記表 18-1 ~ 表 18-10 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する各 mRNA は HeLa 細胞ライセートに添加後、真核細胞の翻訳系によって遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生した。

## [0344] 試験例 1 1

(mRNA サンプルの HeLa 細胞株を用いた *in vitro* 翻訳反応試験)

以下表 19-1 ~ 表 19-13 に記載の各 mRNA について、試験例 2 と同様の方法によって、ヒト細胞系 HeLa 細胞株を用いて *in vitro* での翻訳活性を評価した。3~30 nM の各 mRNA を添加して 5 時間後の細胞から得られた細胞溶解液中の翻訳産物濃度 (nM) を、以下表 19 に記載した。

[0345] 表 19-1 ~ 表 19-13 :

[0346]

[表19-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.003	0.010
E165	308	0.097	0.667	1.363
E166	311	0.027	0.390	0.920
E167	314	0.070	0.637	1.170
E169	320	0.073	0.527	1.070
E172	329	0.050	0.487	1.087

[0347] [表19-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.010	0.010
E166	311	0.030	0.517	1.100
E167	314	0.070	0.707	1.263
E168	317	0.023	0.390	0.650
E171	326	0.017	0.233	0.570
E173	332	0.040	0.513	0.813

[0348] [表19-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.010	0.010
E165	308	0.090	0.887	2.093
E167	314	0.060	0.667	1.620
E169	320	0.060	0.520	1.123
E170	323	0.030	0.363	0.933
E174	335	0.060	0.513	0.963

[0349]

[表19-4]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.010	0.010
E193	374	0.010	0.073	0.187
E194	377	0.010	0.153	0.227
E195	380	0.010	0.090	0.143
E196	383	0.000	0.000	0.000
E197	386	0.000	0.000	0.000

[0350] [表19-5]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.000	0.003
E193	374	0.010	0.087	0.143
E194	377	0.013	0.123	0.210
E195	380	0.010	0.077	0.123
E198	389	0.060	0.370	0.497
E199	392	0.057	0.353	0.453

[0351] [表19-6]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.010	0.010
E65	180	0.087	0.657	0.940
E67	186	0.057	0.700	0.570
E68	189	0.020	0.337	0.190
E180	343	0.000	0.050	0.207
E181	346	0.000	0.153	0.413

[0352]

[表19-7]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.000	0.010
E175	338	0.000	0.010	0.040
E177	340	0.023	0.133	0.323
E178	341	0.010	0.037	0.130
E180	343	0.000	0.020	0.113
E165	308	0.053	0.327	0.940

[0353] [表19-8]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E4	11	0.000	0.000	0.010
E176	339	0.000	0.000	0.050
E177	340	0.017	0.150	0.360
E179	342	0.000	0.020	0.097
E180	343	0.000	0.020	0.077
E167	314	0.033	0.370	0.957

[0354] [表19-9]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E58	161	0.010	0.153	0.177
E59	164	0.090	0.737	1.147
E164	305	0.010	0.143	0.167
E192	373	0.020	0.117	0.177

[0355]

[表19-10]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E182	349	0.000	0.000	0.010
E183	350	0.013	0.153	0.930
E184	353	0.020	0.163	1.223
E185	356	0.020	0.160	0.983

[0356] [表19-11]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E186	359	0.000	0.000	0.000
E187	360	0.000	0.010	0.037
E188	363	0.000	0.010	0.020

[0357] [表19-12]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E189	366	0.000	0.000	0.010
E190	367	0.040	0.283	1.170
E191	370	0.033	0.300	1.070

[0358] [表19-13]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E217	416	0.000	0.007	0.010
E218	422	0.010	0.073	0.320
E219	426	0.010	0.077	0.287

[0359] 上記表19-1～表19-13に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する各mRNAはHeLa細胞に添加後、遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生し、その翻訳量は糖修飾を有さないmRNAに対し優れていた。

[0360] 試験例12

(mRNAサンプルのHeLa細胞株を用いたin vitro翻訳反応試験)

下記表20-1～表20-8に記載の各mRNAについて、試験例3と同様の方法によって、HeLa細胞株を用いてin vitroでの翻訳活性の持続性を評価した。30 nMの各mRNAを添加した細胞から得られた細胞溶解液中の翻訳産物濃度(nM)を、以下表20に記載した。

[0361] 表20-1～表20-8：

[0362] [表20-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E4	11	0.010	0.010	0.000
E167	314	1.263	1.513	1.047
E169	320	1.270	1.453	0.933
E170	323	1.000	1.127	0.770
E174	335	0.940	1.043	0.717

[0363] [表20-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E172	329	0.983	1.147	0.673
E173	332	0.830	1.010	0.693

[0364] [表20-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E4	11	0.010	0.010	0.003
E175	338	0.070	0.050	0.010
E177	340	0.347	0.477	0.403
E178	341	0.203	0.253	0.130
E180	343	0.300	0.127	0.000
E165	308	1.437	1.440	0.817

[0365]

[表20-4]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E4	11	0.010	0.010	0.010
E176	339	0.060	0.067	0.030
E177	340	0.303	0.307	0.187
E179	342	0.103	0.080	0.030
E180	343	0.233	0.130	0.010
E167	314	1.220	1.357	0.767

[0366] [表20-5]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E182	349	0.010	0.010	0.000
E184	353	1.483	1.663	0.933
E185	356	1.030	1.230	0.790

[0367] [表20-6]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E217	416	0.003	0.007	0.000
E218	422	0.360	0.537	0.317
E219	426	0.307	0.463	0.317

[0368] [表20-7]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E189	366	0.017	0.010	0.010
E190	367	1.717	1.820	1.260
E191	370	1.303	1.390	0.933

[0369]

[表20-8]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E79	206	0.910	1.313	0.873
IVT-1	447	0.010	0.010	0.000

[0370] 上記表 20-1～表 20-8 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する各 mRNA は HeLa 細胞に添加後、遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生し、その翻訳量は糖修飾を有さない mRNA に対し優れていた。

[0371] 試験例 13

(mRNA サンプルの HeLa 細胞株を用いた *in vitro* 翻訳反応試験)

下記表 21-1～表 21-4 に記載の各 mRNA について、試験例 4 と同様の方法によって、HeLa 細胞株を用いて *in vitro* での翻訳活性を評価した。各 mRNA を添加した細胞から得られた細胞溶解液中の翻訳産物濃度 (nM) を、以下表 21 に記載した。

[0372] 表 21-1～表 21-4 :

[0373] [表21-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E165	308	0.323	0.337	0.117
E167	314	0.343	0.403	0.207
E169	320	0.300	0.350	0.130
E173	332	0.220	0.300	0.147
E174	335	0.187	0.223	0.097

[0374]

[表21-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E165	308	0.440	0.447	0.187
E166	311	0.367	0.397	0.150
E172	329	0.317	0.363	0.133
E180	343	0.007	0.000	0.000
E181	346	0.010	0.000	0.000

[0375] [表21-3]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E4	11	0.000	0.000	0.000
E175	338	0.020	0.010	0.000
E177	340	0.113	0.290	0.207
E178	341	0.063	0.097	0.057
E180	343	0.013	0.000	0.000
E165	308	0.460	0.497	0.233
E181	346	0.010	0.000	0.000

[0376] [表21-4]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 導入 3 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E79	206	0.437	0.533	0.343
IVT-1	447	0.000	0.000	0.000

[0377] 上記表 2 1 - 1 ~ 表 2 1 - 4 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する mRNA は HeLa 細胞にエレクトロポレーション後、遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生し、その活性は翻訳領域に糖修飾を有さない mRNA に比べて優れていた。

[0378] 試験例 1 4

(mRNA サンプルの HeLa 細胞株ライセートを用いた翻訳反応試験)

下記表 2 2 - 1 ~ 表 2 2 - 2 に記載の各 mRNA について、試験例 8 と同様の方法によって、ヒト細胞系における翻訳活性を評価した。1  $\mu$ M の各 mRNA を添加した翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度 (nM) を、下記表 2 2 に記載した。

[0379] 表 2 2 - 1 ~ 表 2 2 - 2 :

[0380] [表22-1]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E61	170	24.693	5.02
E71	198	15.920	3.24
E85	224	33.347	6.78
E204	399	15.040	3.06
E205	400	16.013	3.25
E206	401	20.107	4.09
E207	402	14.013	2.85
E208	403	10.827	2.20
E30	89	4.920	1.00

[0381] [表22-2]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E61	170	25.067	5.47
E127	268	25.253	5.51
E209	404	27.840	6.07
E210	405	16.213	3.53
E211	406	36.120	7.88
E212	407	14.000	3.05
E213	408	10.493	2.29
E214	409	14.840	3.24
E30	89	4.587	1.00

[0382] 上記表 2 2 - 1 ~ 表 2 2 - 2 に示す試験結果から明らかなように、各 mRNA は HeLa 細胞ライセートに添加後、真核細胞の翻訳系によって遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生した。

[0383] 試験例 1 5

(mRNA サンプルの HeLa 細胞株を用いた細胞内核酸安定性試験)

下記表 2 3 に記載の各mRNAについて、HeLa細胞株を用いて細胞内での核酸安定性を評価した。細胞の培養とmRNAの導入は、試験例 3 と同様の方法で、各mRNAの終濃度が30 nMとなるように調製して導入した。各mRNAを添加し4時間培養後の細胞から培養上清を除去し、10%ウシ胎仔血清を含むRPMI培地(ナカライテスク社製)を1ウェルあたり50  $\mu$ L加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で培養を継続した。mRNAを添加して4時間後、8時間後、24時間後にそれぞれ、以下の通り細胞の溶解操作を行った。具体的には、細胞から培養上清を除去した後、氷冷したD-PBS(-)(ナカライテスク社製)で1度洗浄した後、2%のプロテアーゼ阻害剤カクテル(動物細胞抽出物用、ナカライテスク社製)を含むiScript RT-qPCR Sample Preparation Reagent (バイオラッド社、1708898)を1ウェルあたり20  $\mu$ L加え、30秒間激しく浸透して細胞を溶解した。

得られた細胞溶解液中の残存mRNA量は、以下に記載のRT-qPCR法により検出した。まず、検体希釈溶液としてRibonuclease Inhibitorを終濃度0.2 U/mLで加えたDWを調製した。検量線は評価したmRNAごとにそれぞれ作成し、各mRNAを核酸未添加細胞から調製した細胞溶解液を検体希釈溶液で10倍希釈した溶液で希釈することによって1  $\mu$ Mから4倍希釈で11点濃度を取り、希釈系列を作製した。測定する各細胞溶解液は検体希釈溶液で10倍希釈した。これらの検量線及び測定する細胞溶解液をRibonuclease Inhibitorを終濃度0.2 U/mLで加えたDWを用いて1071倍希釈した。以降の逆転写反応とRT-qPCR反応は試験例 7 と同様の方法で実施した。測定の結果、標品のCT値をもとに検量線を用いて、各試料中の各mRNAの濃度を定量したものを、以下表 2 3 に記載した。

[0384] 表 2 3 :

[0385] [表23]

各時点における細胞溶解液中の mRNA 残存濃度

mRNA 名	配列番号	mRNA 残存濃度 (nM)		
		mRNA 導入 4 時間後	mRNA 導入 8 時間後	mRNA 導入 24 時間後
E79	206	12.990	22.005	11.253
E95	234	10.980	12.803	9.763
IVT-1	447	60.214	0.433	0.129

[0386] 上記表 2 3 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する mRNA は IVT 法で調整した mRNA と比較して細胞中での分解耐性が向上した。

[0387] 試験例 1 6

(mRNA サンプルの HeLa 細胞株ライセートを用いた翻訳反応試験)

以下表 2 4 に記載の各 mRNA について、試験例 1 と同様の方法によって、ヒト細胞系における翻訳活性を評価した。0.3  $\mu$ M の各 mRNA を添加した翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度 (nM) を、下記表 2 4 に記載した。

[0388] [表24]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E3	8	0.500
E36	103	0.500
E220	448	0.333
E222	454	0.833
E221	451	0.500
E223	457	11.833
E4	11	1.333
E65	180	29.333
E224	460	7.167
E225	463	32.000

[0389] 上記表 2 4 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する各 mRNA は HeLa 細胞ライセートに添加後、真核細胞の翻訳系によって遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生した。

[0390] 試験例 1 7

(mRNA サンプルの HeLa 細胞株を用いた in vitro 翻訳反応試験)

以下表 2 5 に記載の各 mRNA について、試験例 2 と同様の方法によって、ヒト細胞系 HeLa 細胞株を用いて in vitro での翻訳活性を評価した。3~30 nM の各 mRNA を添加して 5 時間後の細胞から得られた細胞溶解液中の翻訳産物濃度 (nM) を、以下表 2 5 に記載した。

[0391]

[表25]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 3 nM	mRNA10 nM	mRNA30 nM
E3	8	0.000	0.000	0.000
E36	103	0.000	0.000	0.000
E220	448	0.000	0.000	0.000
E222	454	0.000	0.000	0.010
E221	451	0.000	0.000	0.000
E223	457	0.010	0.083	0.203
E4	11	0.000	0.000	0.010
E65	180	0.063	0.353	0.450
E224	460	0.020	0.127	0.300
E225	463	0.053	0.400	0.797
E192	373	0.010	0.073	0.103
E59	164	0.080	0.517	0.747

[0392] 糖修飾ポリ A 鎖の鎖長が5であるE222、糖修飾ポリ A 鎖の鎖長が10であるE223、糖修飾ポリ A 鎖の鎖長が20であるE65、E224およびE225、糖修飾ポリ A 鎖の鎖長が40であるE59は、それぞれ同じ長さの無修飾のポリ A 鎖を持つ mRNA と比較して優れた翻訳能を示した。

[0393] 試験例 1 8

(mRNA サンプルの HeLa 細胞株を用いた in vitro 翻訳反応試験)

下記表 2 6 に記載の各 mRNA について、試験例 3 と同様の方法によって、HeLa 細胞株を用いて in vitro での翻訳活性の持続性を評価した。30 nM の各 mRNA を添加した細胞から得られた細胞溶解液中の翻訳産物濃度 (nM) を、以下表 2 6 に記載した。

[0394]

[表26]

各 mRNA から得られた翻訳産物濃度

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)		
		mRNA 添加 5 時間後	mRNA 添加 8 時間後	mRNA 添加 24 時間後
E3	8	0.000	0.000	0.000
E36	103	0.000	0.000	0.000
E220	448	0.000	0.000	0.000
E222	454	0.010	0.010	0.010
E221	451	0.000	0.000	0.000
E223	457	0.310	0.380	0.263
E4	11	0.000	0.000	0.000
E65	180	0.560	0.693	0.460
E224	460	0.370	0.507	0.337
E225	463	0.983	1.307	0.907
E192	373	0.107	0.120	0.050
E59	164	0.803	0.997	0.623

[0395] 上記表 2 6 に示す試験結果から明らかなように、糖修飾を有する各 mRNA は HeLa 細胞に添加後、遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生し、その翻訳量はポリ A 鎖長に応じ、糖修飾を有さない mRNA に対し優れていた。

[0396] 試験例 1 9

(mRNA サンプルの HeLa 細胞株ライセートを用いた翻訳反応試験)

下記表 2 7 - 1 ~ 表 2 7 - 5 に記載の各 mRNA について、試験例 8 と同様の方法によって、ヒト細胞系における翻訳活性を評価した。1 μM の mRNA を添加した翻訳反応溶液中の翻訳産物濃度 (nM)、及び糖修飾を持たない mRNA である E226 または E30 を 1 とした時の相対翻訳産物量を、以下表 2 7 - 1 ~ 2 7 - 5 に記載した。

[0397] 表 2 7 - 1 ~ 表 2 7 - 5 :

[0398] [表27-1]

mRNA 名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E226	466	0.987	1.00
E227	467	1.787	1.81
E228	468	2.560	2.59
E229	469	2.347	2.38

[0399] [表27-2]

mRNA名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E30	89	0.333	1.00
E230	470	1.347	4.04
E231	471	1.520	4.56
E232	472	1.173	3.52
E233	473	0.640	1.92

[0400] [表27-3]

mRNA名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E30	89	0.680	1.00
E230	470	2.347	3.45
E231	471	2.080	3.06
E234	474	1.333	1.96

[0401] [表27-4]

mRNA名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)	相対翻訳産物量
E30	89	0.720	1.00
E230	470	2.307	3.20
E235	475	1.867	2.59
E236	476	1.000	1.39
E237	477	2.107	2.93

[0402] [表27-5]

mRNA名	配列番号	翻訳産物濃度(nM)
E230	470	2.227
E235	475	1.453
E237	477	2.040
E238	478	2.253
E239	479	1.587
E240	480	2.413

[0403] 上記表27-1～27-5に示す試験結果から明らかなように、各mRNAはHela細胞ライセートに添加後、真核細胞の翻訳系によって遺伝子配列にコードされたポリペプチドを産生し、その翻訳量は糖修飾を有さないmRNAに対し優れていた。

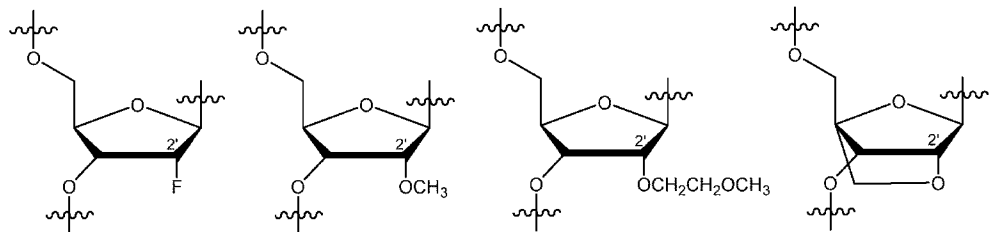
## 請求の範囲

[請求項1] 開始コドンから終止コドンまでの翻訳領域、  
5'側非翻訳領域、及び  
ポリA鎖  
を含み、前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの65%以上が糖修飾  
ヌクレオチドである、ポリヌクレオチド。

[請求項2] 前記ポリA鎖を構成するヌクレオチドの全てが糖修飾ヌクレオチド  
である、請求項1に記載のポリヌクレオチド

[請求項3] 前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が、それぞれ独立して、以下の  
構造のいずれか一つから選択される、

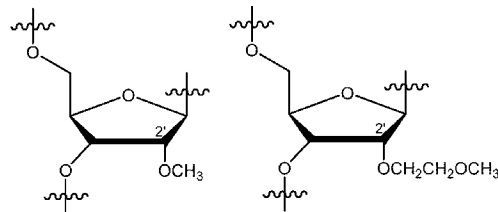
[化1]



請求項1又は2に記載のポリヌクレオチド

[請求項4] 前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が、それぞれ独立して、以下の  
構造のいずれか一つから選択される、

[化2]



請求項1～3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド

[請求項5] 前記ポリA鎖は、リン酸修飾ヌクレオチドを少なくとも1つ含む、  
請求項1～4のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項6] 前記ポリA鎖の3'末端から1番目～2番目のヌクレオチド、1番  
目～3番目のヌクレオチド、1番目～4番目のヌクレオチド、又は1

番目～5番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、請求項1～5のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

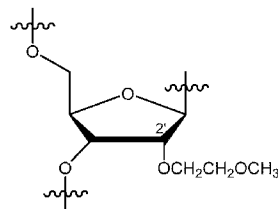
[請求項7] 前記ポリA鎖を構成する全てのヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、請求項1～6のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項8] 前記ポリA鎖が2～40塩基長である、請求項1～7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項9] 前記5'側非翻訳領域のヌクレオチドが、それぞれ独立して、2'-デオキシリボヌクレオチド、スペーサー修飾又は糖修飾ヌクレオチドから選択される、請求項1～8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項10] 前記5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～6番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり、前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が以下の構造である、

[化3]



請求項1～9のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項11] 前記5'側非翻訳領域の5'末端の5'側に、1～10個の糖非修飾ヌクレオチドからなる部分をさらに含む、請求項10に記載のポリヌクレオチド。

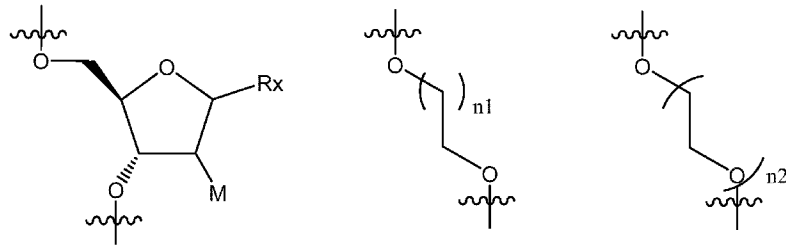
[請求項12] 前記5'側非翻訳領域の5'末端から1番目～6番目のヌクレオチドを除くヌクレオチドが、2'-デオキシリボヌクレオチド及び/又はスペーサー修飾を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項13] 前記5'側非翻訳領域がスペーサー修飾を含み、前記スペーサー修

飾が、それぞれ独立して、以下の構造のいずれか一つから選択される

、

[化4]



[式中、

R x はエチニル、水素原子又はOHであり、

Mは、水素原子又はOHであり、

n 1 は 1、2 又は 5 であり、

n 2 は 1、2 又は 3 である。]

請求項 9 又は 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

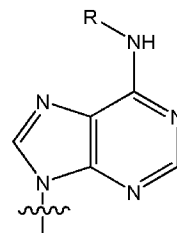
[請求項14]

前記 5' 側非翻訳領域の 5' 末端から 1 番目～2 番目のヌクレオチド、1 番目～3 番目のヌクレオチド、1 番目～4 番目のヌクレオチド、又は 1 番目～5 番目のヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって連結されている、請求項 1～1 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項15]

前記 5' 側非翻訳領域が塩基修飾ヌクレオチドを含み、前記塩基修飾ヌクレオチドの修飾塩基部分が、以下の構造である、

[化5]



[式中、R は炭素数 1～6 のアルキル基である。]

請求項 1～1 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項16]

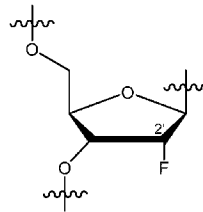
前記翻訳領域が、1 番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであ

るコドンを含み、請求項 1～15 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項17] 前記翻訳領域が、4以上のコドンを含み、全てのコドンの1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、請求項 1～16 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項18] 前記翻訳領域が、終始コドンを除いた全てのコドンの1番目のヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドであり、前記糖修飾ヌクレオチドの修飾糖部が以下の構造である、

[化6]



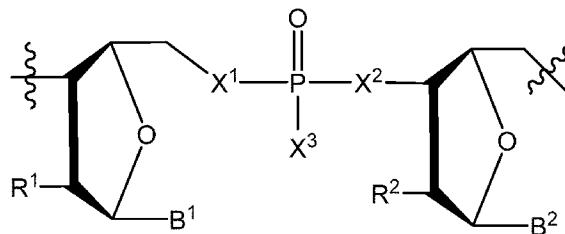
請求項 1～16 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項19] 前記翻訳領域が、2000以下のコドンを含み、請求項 1～18 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項20] 前記終止コドンの全てのヌクレオチドが糖修飾ヌクレオチドである、請求項 1～19 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項21] 以下の構造を含む、

[化7]



[式中、

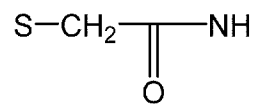
R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、H、OH、F、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>又はOCH<sub>3</sub>であり、

B<sup>1</sup>及びB<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、塩基部であり、

X<sup>1</sup>は、O、S又はNHであり、

X<sup>2</sup>は、O、S、NH又は以下の構造であり、

[化8]



X<sup>3</sup>は、OH、SH又はそれらの塩である、

ただし、X<sup>1</sup>及びX<sup>2</sup>は、同時にOではない]

請求項1～20のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項22]

請求項1～21のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、  
医薬組成物。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/026411

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><i>C12N 15/11</i>(2006.01)i; <i>A61K 31/7088</i>(2006.01)i; <i>A61K 31/7115</i>(2006.01)i; <i>A61K 31/712</i>(2006.01)i;  <i>A61K 31/7125</i>(2006.01)i; <i>A61K 48/00</i>(2006.01)i; <i>A61P 43/00</i>(2006.01)i; <i>C07H 21/02</i>(2006.01)i; <i>C07H 21/04</i>(2006.01)i;  <i>C12N 5/10</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/67</i>(2006.01)i; <i>C12P 21/02</i>(2006.01)i  FI: C12N15/11 Z ZNA; A61K31/7088; A61K31/7115; A61K31/712; A61K31/7125; A61K48/00; A61P43/00 105;  C07H21/02; C07H21/04 Z; C12N5/10; C12N15/67 Z; C12P21/02 C</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N15/11; A61K31/7088; A61K31/7115; A61K31/712; A61K31/7125; A61K48/00; A61P43/00; C07H21/02; C07H21/04; C12N5/10; C12N15/67; C12P21/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996  Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022  Registered utility model specifications of Japan 1996-2022  Published registered utility model applications of Japan 1994-2022</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CApus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-508299 A (SEQUITUR, INC.) 19 March 2002 (2002-03-19) claims, paragraphs [0091], [0101]	1-7, 9-20, 22
Y		1-7, 9-22
X	JP 2011-521625 A (EPICENTRE TECHNOLOGIES CORPORATION) 28 July 2011 (2011-07-28) claims, paragraph [0087]	1-20, 22
Y		1-22
Y	KHVOROVA, A. and WATTS, J. K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology. 2017, vol. 35, no. 3, pp. 238-248 fig. 2	1-20, 22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 August 2022		06 September 2022
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARUYAMA, H. et al. Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester. 2017, Nucleic Acids Research. vol. 45, no. 12, pp. 7042-7048 fig. 3	21
Y	ABE, H. and KIMURA, Y. Chemical Ligation Reactions of Oligonucleotides for Biological and Medicinal Applications. Chem. Pharm. Bull. 2018, vol. 66, no. 2, pp. 117-122 fig. 4	21
P, A	WO 2021/132589 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKAI NATIONAL HIGHER EDUCATION AND RESEARCH SYSTEM) 01 July 2021 (2021-07-01) entire text, all drawings	1-22

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/JP2022/026411</b>
-----------------------------------------------------------

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2002-508299 A	19 March 2002	WO 1999/014346 A2 claims, p. 20, "C. Increased Length of poly A tail"	
		US 2003/0083272 A1	
		EP 1021549 A2	
JP 2011-521625 A	28 July 2011	WO 2009/135212 A2 claims, p. 34	
		US 2010/0159526 A1	
		EP 2283132 A2	
WO 2021/132589 A1	01 July 2021	CA 3165956 A1 whole document	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/11(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/7115(2006.01)i; A61K 31/712(2006.01)i; A61K 31/7125(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07H 21/02(2006.01)i; C07H 21/04(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/67(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i</p> <p>FI: C12N15/11 Z ZNA; A61K31/7088; A61K31/7115; A61K31/712; A61K31/7125; A61K48/00; A61P43/00 105; C07H21/02; C07H21/04 Z; C12N5/10; C12N15/67 Z; C12P21/02 C</p>																				
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N15/11; A61K31/7088; A61K31/7115; A61K31/712; A61K31/7125; A61K48/00; A61P43/00; C07H21/02; C07H21/04; C12N5/10; C12N15/67; C12P21/02</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年										
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年																			
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年																			
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																			
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2002-508299 A (セクイター, インク.) 19.03.2002 (2002 - 03 - 19) 特許請求の範囲, [0091], [0101]</td> <td>1-7, 9-20, 22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-7, 9-22</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2011-521625 A (エビセンター テクノロジーズ コーポレーション) 28.07.2011 (2011 - 07 - 28) 特許請求の範囲, [0087]</td> <td>1-20, 22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KHVOROVA A. and WATTS JK., The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility, Nature Biotechnology, 2017, vol. 35, no. 3, p. 238-248 Figure 2</td> <td>1-20, 22</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	JP 2002-508299 A (セクイター, インク.) 19.03.2002 (2002 - 03 - 19) 特許請求の範囲, [0091], [0101]	1-7, 9-20, 22	Y		1-7, 9-22	X	JP 2011-521625 A (エビセンター テクノロジーズ コーポレーション) 28.07.2011 (2011 - 07 - 28) 特許請求の範囲, [0087]	1-20, 22	Y		1-22	Y	KHVOROVA A. and WATTS JK., The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility, Nature Biotechnology, 2017, vol. 35, no. 3, p. 238-248 Figure 2	1-20, 22
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																		
X	JP 2002-508299 A (セクイター, インク.) 19.03.2002 (2002 - 03 - 19) 特許請求の範囲, [0091], [0101]	1-7, 9-20, 22																		
Y		1-7, 9-22																		
X	JP 2011-521625 A (エビセンター テクノロジーズ コーポレーション) 28.07.2011 (2011 - 07 - 28) 特許請求の範囲, [0087]	1-20, 22																		
Y		1-22																		
Y	KHVOROVA A. and WATTS JK., The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility, Nature Biotechnology, 2017, vol. 35, no. 3, p. 238-248 Figure 2	1-20, 22																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																				
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>																				
<p>国際調査を完了した日</p> <p>23.08.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>06.09.2022</p>																			
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP)</p> <p>〒100-8915</p> <p>日本国</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>福間 信子 4B 3539</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>																			

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	MARUYAMA H. et al., Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester, 2017, Nucleic Acids Research, vol. 45, no. 12, p. 7042-7048 Figure 3	21
Y	ABE H. and KIMURA Y., Chemical Ligation Reactions of Oligonucleotides for Biological and Medicinal Applications, Chem. Pharm. Bull., 2018, vol. 66, no. 2, p. 117-122 Figure 4	21
P, A	WO 2021/132589 A1 (国立大学法人東海国立大学機構) 01.07.2021 (2021 - 07 - 01) 全文, 全図	1-22

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
 PCT/JP2022/026411

引用文献			公表日	パテントファミリー文献		公表日
JP	2002-508299	A	19.03.2002	WO 1999/014346	A2	
				Claims, p. 20 "C. Increased Length of poly A tail"		
				US 2003/0083272	A1	
				EP 1021549	A2	
-----						
JP	2011-521625	A	28.07.2011	WO 2009/135212	A2	
				Claims, p. 34		
				US 2010/0159526	A1	
				EP 2283132	A2	
-----						
WO	2021/132589	A1	01.07.2021	CA 3165956	A1	
				Whole document		
-----						