

(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11月2日(02.11.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/210767 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/11 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/7084 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) C07H 21/02 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/016716

(22) 国際出願日: 2023年4月27日(27.04.2023)

(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 2022-075009 2022年4月28日(28.04.2022) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1-3-1 Tokyo (JP). 株式会社ジーンデザイン(GENEDESIGN, INC.) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 7 番 2 9 号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 小松 康雄 (KOMATSU, Yasuo); 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 1 7-2-1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Hokkaido (JP). 小島直(KOJIMA, Naoshi);

〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 平野 悠(HIRANO, Yu); 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 1 7-2-1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Hokkaido (JP). 櫻井 葉玲(SAKURAI, Hare); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 7 番 2 9 号 株式会社ジーンデザイン内 Osaka (JP). 斎藤 恵美(SAITO, Emi); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 7 番 2 9 号 株式会社ジーンデザイン内 Osaka (JP). 南海 浩一(NANKAI, Hirokazu); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7 丁目 7 番 2 9 号 株式会社ジーンデザイン内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 鎌田 光宜, 外(KAMADA, Mitsunori et al.); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル 高島国際特許事務所 Osaka (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, CV, 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, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDE CHEMICAL LIGATION REACTION

(54) 発明の名称: オリゴヌクレオチドの化学的連結反応

(57) Abstract: Provided is a new technology for a chemical ligation reaction of oligonucleotides. When 2'-fluoro-5'-amino-nucleic acid (2F-5N nucleic acid) having a fluorine atom at the 2'-position of 5'-amino-nucleic acid (5N nucleic acid) is synthesized, and an oligonucleotide having the same at a terminal or a modified product thereof is used in ligation, it is possible to expect a stable bond with a template nucleic acid by means of a 2'-fluoro modification in the 2F-5N nucleic acid and an improved reactivity of the 5'-amino group. In addition, the fluorine atom, because of having a hydrogen bond similarly to a 2'-hydroxyl group of a nucleic acid, is suitable for interaction with a protein, and enables obtaining of a synergistic effect of combining with an amino group in a ligation reaction because of having resistance against nucleases.

(57) 要約: オリゴヌクレオチドの化学的連結反応の新しい技術を提供すること。5'-アミノ-核酸(5N核酸)の2'位にフッ素原子を有する2'-フルオロ-5'-アミノ-核酸(2F-5N核酸)を合成し、それを末端に有するオリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結に用いることで、2F-5N核酸の2'-フルオロ修飾によるテンプレート核酸との安定な結合と5'-アミノ基の反応性の向上が期待できる。加えて、フッ素原子は核酸の2'水酸基と同じく水素結合を有するため、タンパク質との相互作用にも適しており、核酸分解酵素に対する耐性も高いことから連結反応におけるアミノ基とあわせる相乗効果が得られる。

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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

明 細 書

発明の名称：オリゴヌクレオチドの化学的連結反応

技術分野

[0001] 本開示は、長鎖のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドまたはその改変体の合成のための化学的連結反応およびその応用に関する。

背景技術

[0002] 長鎖のRNA分子は化学合成することは困難なため、RNA合成酵素を用いた転写反応によって作製される場合が多い。しかしながら酵素を用いる転写反応では化学修飾した核酸を部位特異的に導入することは困難である。修飾核酸は、生体内における核酸分解酵素に対する耐性の増強の他、タンパク質と高い親和性を発揮させ、蛍光分子などによる標識など新たな機能をRNAに付与することには不可欠である。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0003] 本開示は、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド（本明細書において、代表して「オリゴヌクレオチド」といい、オリゴヌクレオチドという場合は長さに特に限定はないことが理解される。）またはその改変体の新たな連結方法に関する。限定を意図しない一つの実施形態では、5'-アミノ核酸（5'N核酸）の2'位にフッ素原子を有する2'-フルオロ-5'-アミノ核酸（2'F-5'N核酸）を合成し、それを末端に有するオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドまたはその改変体を連結に用いることで、2'F-5'N核酸の2'-フルオロ修飾による、テンプレート核酸との安定な結合と5'-アミノ基の反応性の向上が期待できる。加えて、フッ素原子は核酸の2'水酸基と同じく水素結合を有するため、タンパク質との相互作用にも適しており、核酸分解酵素に対する耐性も高いことから連結反応におけるアミノ基とあわせる相乗効果が得られる。

[0004] 本開示により、限定を意図しないが、化学修飾したRNA分子を化学的に

高効率で結合させることができ、新たな機能を有した長鎖RNAの作製が可能になる（その代表図として、図1）。またこの反応は、RNAのみならず合成DNAに対しても適用可能なことから、機能性DNAの作製にも有効な技術が提供される。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目1）

第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とを連結させる方法であって、

該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とを、連結が生じる条件下に配置する工程を含み、

該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と、該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端において連結が生じ、第二のオリゴヌクレオチドの5'末端側の末端モノマー部分が少なくとも一つの改変を含む、

方法。

（項目2）

前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端は、リン酸基またはチオリン酸基を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目3）

前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、置換されていてもよいアミノ基を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目4）

前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の5'位に置換されていてもよいアミノ基を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

（項目5）

前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の5'位に置換されていないアミノ基を含む、先行する項目のいずれか一

項に記載の方法。

(項目 6)

前記アミノ基が、 C_{1-6} アルキル基によって置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記アミノ基がメチル基またはエチル基によって置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の 2' 位がハロまたは $-OH$ で置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の 2' 位がハロで置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 10)

前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の 2' 位がフルオロ基で置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 11)

前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の 2' 位が水素基または置換されていてもよいアルコキシ基で置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 12)

前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の 2' 位が置換されていてもよいアルコキシで置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 13)

前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の2'位がメトキシで置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

前記末端モノマー部分の2'位が上向きで置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記末端モノマー部分の2'位が下向きで置換されている、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、リン酸基またはチオリン酸基を介して連結している、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目17)

前記連結が生じる条件は、テンプレート核酸を用いることを包含する、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

前記テンプレート核酸が、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連続して相補的な配列および鎖長を有する、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目19)

前記テンプレート核酸の鎖長が、10残基以上である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

前記テンプレート核酸の鎖長が、20～40残基である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目21)

前記テンプレート核酸が、前記第一のオリゴヌクレオチドもしくはその改

変体および前記第二のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体とは連結していないか、または、いずれか一方のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体、もしくは両方のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体と連結している、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記テンプレート核酸の配列は、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と相補的な配列、あるいは二本鎖の形成を妨げない範囲のミスマッチ塩基対を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

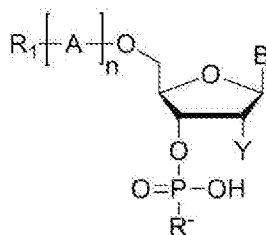
(項目 2 3)

前記連結が生じる条件は、オリゴヌクレオチド連結反応の活性化剤の使用を包含する、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 4)

前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、下記式 (1)

[化1]



(式中、R⁻はS⁻またはO⁻であり、Yは水素基またはアルコキシ基であり、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン(イノシン)、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2,6-ジアミノプリンであり、Aは、各出現において独立してスペーサー、核酸、または核酸誘導体であり、nは1以上の整数であり、R₁は5'-位が水酸基である核酸、または核酸誘導体である)

で示される化合物である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記 Y がメトキシ基である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

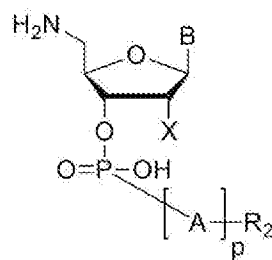
(項目 2 6)

n が 5 から 1 0 0 0 の整数である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 7)

前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、下記式 (11)

[化2]



(式中、Xは、ヒドロキシ基またはハロゲンであり、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン(イノシン)、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2,6-ジアミノプリンであり、Aは、各出現において独立してスペーサー、核酸、または核酸誘導体であり、pは1以上の整数であり、R₂は3'-位が水酸基、リン酸基またはチオリン酸基である核酸、または核酸誘導体である)

で示される化合物である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 8)

前記 X がフルオロ基である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 9)

p が 5 から 1 0 0 0 の整数である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

方法。

(項目 3 0)

前記スペーサーが置換されていてもよい C_{1-10} アルキレンまたは PEG である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記スペーサーが C_3 アルキレンである、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記活性化剤が、カルボジイミド系縮合剤、ホスホニウム系縮合剤、ウロニウム系縮合剤またはトリアジン系縮合剤である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3)

前記カルボジイミド系縮合剤が 1- [3- (ジメチルアミノ) プロピル] -3- エチルカルボジイミド (EDC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCI) またはジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記ホスホニウム系縮合剤がプロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (PyBroP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ピロリジン-1-イル) ホスホニウム・ヘキサフルオロホスファート (PyBOP)、6-トリフルオロメチル-1H-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 (PyFOP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスファート (BOP) または (7-アザ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 (PyAOP) である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 5)

前記ウロニウム系縮合剤が $O-(7\text{-アザベンゾトリアゾール-1-イル})-N,N,N',N'\text{-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (HATU)}$ 、 $O-(\text{ベンゾトリアゾール-1-イル})-N,N,N',N'\text{-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (HBTU)}$ 、 $O-(N\text{-スクシンイミジル})-N,N,N',N'\text{-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (TSTU)}$ または $\{ \{ [(1\text{-シアノー-2-エトキシ-2-オキソエチリデン})\text{アミノ}] \text{オキシ} \} -4\text{-モルホリノメチレン} \} \text{ジメチルアンモニウムヘキサフルオロホスファート (COMU)}$ である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 36)

前記トリアジン系縮合剤が DMT-MM である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 37)

前記活性化剤が、 $1\text{-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (DNFB)}$ 、または $1-[3-(\text{ジメチルアミノ})\text{プロピル}]-3\text{-エチルカルボジイミド (EDC)}$ である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 38)

前記活性化剤が、 $1-[3-(\text{ジメチルアミノ})\text{プロピル}]-3\text{-エチルカルボジイミド (EDC)}$ と $1\text{-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (HOAt)}$ 、 $1\text{-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)}$ または $N\text{-ヒドロキシコハク酸イミド (HOSu)}$ とを組み合わせ使用される、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 39)

前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 5' 末端と前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 3' 末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数と、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とが、2か所以上同時にまたは段階的に連結される、先行する項目のいずれか一項に記載の

方法。

(項目 4 0)

前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 5' 末端および前記テンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結される、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 3' 末端および前記テンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結される、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 2)

前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 5' 末端と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 3' 末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 3' 末端と、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 5' 末端とが、連結される、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

R 2 の 3' 一位がリン酸基またはチオリン酸基である第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数、複数のテンプレート核酸をもちいて、環状に連結される、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

前記テンプレート核酸が前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 5' 末端および前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 3' 末端と連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体において、該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 5' 末端と該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の 3' 末端とが連結される、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

先行する項目のいずれか一項に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体または
先行する項目のいずれか一項に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体
を含む、それぞれ該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体または該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を用いて連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための組成物。

(項目 4 6)

項目 1 に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体もしくは
項目 1 に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体、またはそれらの組み合わせを含む、テンプレート核酸を用いて連結オリゴヌクレオチドを製造するための組成物。

(項目 4 7)

オリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結するためのキットであって、
先行する項目のいずれか一項に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、
先行する項目のいずれか一項に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、
活性化剤と、
テンプレート核酸と
を含むキット。

(項目 4 8)

先行する項目のいずれか一項に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および
先行する項目のいずれか一項に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体
を含む、連結オリゴヌクレオチドを製造するための原料組成物。

(項目 4 9)

前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための原料が、2' 位にフルオロ基、5' 位にアミノ基を有するヌクレオシドを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の原料組成物。

(項目 5 0)

第一および／または第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の原料（モノマーまたは置換基導入試薬等）を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の第一のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体、および／または先行する項目のいずれか一項に記載の第二のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体を製造するための組成物。

(項目 5 1)

前記第一および／または第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の原料が、アミダイド体のまたはデオキシヌクレオシド、または3' 位が水酸基であるまたはデオキシヌクレオシドである、先行する項目のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 2)

A) 合成を所望する核酸配列の情報を得る工程、
B) A) の情報に基づき、合成したい配列の一部を複数合成する工程であって、ここで、各配列は、先行する項目のいずれか一項に記載の特徴を有する、工程、ならびに
C) 必要に応じて連結反応に必要な試薬の存在下で、連結条件に配置する工程
を包含する、所望の核酸配列を有するオリゴヌクレオチドまたはその改変体の製造方法。

(項目 5 3)

A) 合成を所望する核酸配列の情報を得る工程、
B) A) の情報に基づき、合成したい配列の一部を複数合成する工程であって

て、ここで、各配列は、先行する項目のいずれか一項に記載の特徴を有する、工程、ならびに

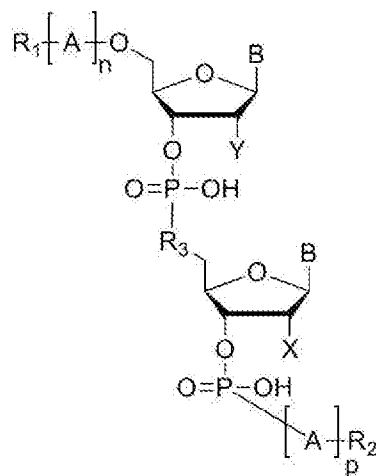
C) 必要に応じて連結反応に必要な試薬と、B) で合成された部分配列を含む核酸とをパッケージとする工程

を包含する、所望のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の製造キットの製造方法。

(項目 5 4)

以下の式

[化3]



(式中、Yは、水素基またはアルコキシ基であり、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン(イノシン)、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュドウラシル、1-メチルシュドウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨドウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2,6-ジアミノプリンであり、Xは、ヒドロキシ基、またはハロゲンであり、Aは、各出現において独立してスペーサー、核酸、または核酸誘導体であり、nは1以上の整数であり、pは1以上の整数であり、R₁は5'-一位が水酸基である核酸、もしくは核酸誘導体、またはR₁は2'-一位が水素基またはアルコキシ基であり、5'-一位がアミノ基である核酸、もしくは核酸誘導体であり、R₂は3'-一位

が水酸基、リン酸基もしくはチオリン酸基である核酸、もしくは核酸誘導体、または R_2 は2' -位がヒドロキシ基、またはハロゲンであり、3' -位がリン酸基もしくはチオリン酸基である核酸、もしくは核酸誘導体であるか、 R_1 および R_2 は、一緒になって単結合を形成してもよく、 R_1 および R_2 は、異なる化合物の R_1 および R_2 と結合してもよく、 R_3 が置換されていてもよいアミノ基である)で示される化合物。

(項目55)

前記Yは、メトキシ基であり、前記Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン(イノシン)、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2, 6-ジアミノプリンであり、前記Xは、フルオロ基であり、 R_1 および R_2 は、一緒になって単結合を形成している、先行する項目のいずれか一項に記載の化合物。

(項目56)

n が5から1000の整数であり、 p が5から1000の整数である、先行する項目のいずれか一項に記載の化合物。

(項目57)

前記 R_3 が、置換されていないアミノ基である、先行する項目のいずれか一項に記載の化合物。

(項目58)

前記 R_3 が、 C_{1-6} アルキル基によって置換されたアミノ基である、先行する項目のいずれか一項に記載の化合物。

(項目59)

前記 R_3 がメチル基またはエチル基によって置換されたアミノ基である、先行する項目のいずれか一項に記載の化合物。

(項目60)

前記Bが、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、またはウラシルである、先行する項目のいずれか一項に記載の化合物。

(項目61)

前記 R_1 および前記 R_2 が、一緒になって単結合を形成している、先行する項目のいずれか一項に記載の化合物。

(項目62)

先行する項目のいずれか一項に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と先行する項目のいずれか一項に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数と、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とが、連結されている、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体。

(項目63)

先行する項目のいずれか一項に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端および先行する項目のいずれか一項に記載のテンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、先行する項目のいずれか一項に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結されている、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体。

(項目64)

先行する項目のいずれか一項に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端および先行する項目のいずれか一項に記載のテンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、先行する項目のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結されている、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体。

(項目65)

先行する項目のいずれか一項に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と先行する項目のいずれか一項に記載の第二のオリゴヌ

クレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端とが、連結されている、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体。

(項目66)

先行する項目のいずれか一項に記載のテンプレート核酸が先行する項目のいずれか一項に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端および先行する項目のいずれか一項に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体において、該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結されている、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体。

(項目67)

先行する項目のいずれか一項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

[0005] 本開示において、上記1または複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供されうることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

発明の効果

[0006] 長鎖のオリゴヌクレオチドを合成することができるオリゴヌクレオチドの化学的連結反応を提供する。本連結反応を用いることにより、これまでの化学的連結反応よりも収率が向上することができる。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]図1は、オリゴヌクレオチド連結反応の概略図を示す。5' o l i g o の3'末端のMと3' o l i g o の5'末端のQを結合させ、2本のo l i g o鎖を連結する。O l i g oはRNA、DNAまたはその混合物、いずれでも良い。Mは3'ーリン酸から誘導される基(R=S, O)を有し、Qは5'ーアミノ基を有する。

[図2]図2は、オリゴヌクレオチド連結反応の反応スキームを示す。5' o l i g o として、Mのヌクレオチド残基中の2'位としてY=メトキシ基、水素、フルオロ基の o l i g o を、3' o l i g o として、Qのヌクレオチド残基中の2'位としてX=水酸基、フルオロ基のオリゴヌクレオチド鎖を用いる。

[図3]図3は、オリゴヌクレオチド連結反応に用いたオリゴヌクレオチドまたは核酸の配列を示す。

[図4]図4は、Qに2' F-5' -NH_2 -ウリジンを導入するための試薬（5' -アミノ-2' -フルオロ-2' ,5' -ジデオキシウリジン アミダイト試薬）の合成スキームを示す。

[図5]図5は、Qに2' OH-5' -NH_2 -ウリジンを導入するための試薬（5' -アミノ-5' -デオキシウリジン アミダイト試薬）の構造を示す。

[図6]図6は、2FpsとDNFBとの反応のHPLCによる分析を示す。

[図7]図7は、DNFB修飾した5' -o l i g o と3' -o l i g o の反応のPAGEによる分析を示す。（A）RNAをテンプレートとしてDNFB修飾した5' -o l i g o と3' -o l i g o を反応し、10, 30, 60, 120分後のサンプルを分析（B）2Meps-DNFBと2OH5Nおよび2F5Nの反応率の経時変化（C）2Fps-DNFBと2OH5Nおよび2F5Nの反応率の経時変化を示す。

[図8]図8は、DNFB修飾した5' -o l i g o と3' -o l i g o の120minの反応における反応率の比較を示す。

[図9]図9は、5' -o l i g o と3' -o l i g o のDNFB存在下、6時間反応のPAGEによる分析を示す。（A）RNAテンプレートを利用した反応の2Mepsと2Fpsの比較、（B）RNAおよびDNAテンプレートを利用した反応の2OH5Nと2F5Nの比較を示す。

[図10]図10は、5' -o l i g o と3' -o l i g o のEDC存在下での反応を示す。（A）5' o l i g o と3' o l i g o の60minの反応における反応率の比較、（B）2OH5Nと2Mepoの連結体のHPLCに

よる分析、(C) 2 F 5 N と 2 M e p o の連結体の H P L C による分析を示す。

[図11]図 1 1 は、テンプレートの D N A を用いずに、お互いの鎖がテンプレートになるように作製する連結反応の模式図を示す。

[図12]図 1 2 は、Q に 2' - F - 5' - N H ₂ シチジンを導入するための試薬 (5' - アミノ - 2' - フルオロ - 2' , 5' - ジデオキシウリジン アミダイト試薬、化合物 5) の合成スキームを示す。

[図13]図 1 3 は、Q に 2' - O H - 5' - N H ₂ シチジンを導入するための試薬 (5' - アミノ - 5' - デオキシシチジン アミダイト試薬、化合物 1 1) の構造を示す。

[図14]図 1 4 は、5' - o l i g o と 3' - o l i g o の D N F B 存在下、6 時間反応の P A G E による分析を示す。RNA および DNA テンプレートを利用した反応の 2 O H 5 N _ C と 2 F 5 N _ C の比較を示す。

[図15]図 1 5 は、5' - o l i g o と 3' - o l i g o の E D C 存在下での 3 0 m i n の反応における反応率の比較を示す。

発明を実施するための形態

[0008] 以下に、本開示をさらに詳細に説明する。

本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞 (例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」等) は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書 (定義を含めて) が優先する。

[0009] (定義)

本明細書において「基」とは、別途指定されない限り、一価基を意味する

。一価基でない例としては、アルキレン基（2価）等が挙げられる。また、下記の置換基等の説明において、「基」なる用語を省略する場合もある。

[0010] 本明細書において、「必要に応じて置換された」もしくは「置換されている」で定義される場合における置換基の数は、特に限定がない場合、置換可能であれば特に制限はなく、1または複数である。また、特に指示した場合を除き、各々の置換基の説明はその置換基が他の置換基の一部分または置換基である場合にも該当する。

[0011] 本明細書において「上向きで置換」とは、結合される環に対して上方向に結合が出るように置換されていることをいう。核酸（ヌクレオシド）の場合、糖部のフラノース環（5員環）を平面とした時に、核酸塩基と同じ側に置換されていることをいう。

[0012] 本明細書において「下向きで置換」とは、結合される環に対して下方向に結合が出るように置換されていることをいう。核酸（ヌクレオシド）の場合、糖部のフラノース環（5員環）を平面とした時に、核酸塩基と逆側に置換されていることをいう。

[0013] 本明細書において「必要に応じて置換された」もしくは「置換されている」で修飾されている基において、該基のいずれの部分が置換されていてもよい。例えば、「必要に応じて置換されたアリールアルキル」および「置換されているアリールアルキル」は、アリール部分が置換されていても、アルキル部分が置換されていてもよく、アリール部分およびアルキル部分の両方が置換されていてもよい。

[0014] 本明細書において「C₁₋₆」とは、炭素原子数が1～6であることを意味する。他の数字の場合も同様であり、例えば、「C₁₋₄」とは炭素原子数が1～4であること、「C₁₋₃」とは炭素原子数が1～3であることを意味する。本明細書において炭素数の限定がある記載はあくまで好ましい数値範囲であり、本開示は規定される炭素数以外の炭素数の置換基を有する基も本開示の範囲内であることが意図される。

[0015] 本明細書において「ハロゲン原子」は、ハロゲン族に属する原子であって

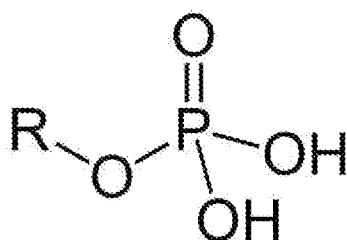
、フッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子等を意味する。好ましくはフッ素原子、又は塩素原子である。さらに好ましくは、フッ素原子である。「ハロゲン原子」を「ハロゲン」、「ハロ」と称する場合もある。

[0016] 本明細書において「水酸基」は、 $-OH$ の一価基である。この基は、「ヒドロキシ基」、「ヒドロキシ」と呼ばれる場合もある。

[0017] 本明細書において「アミノ」は $-NH_2$ 基を指す。

[0018] 本明細書において「リン酸基」は

[化4]



を指す。リン酸基の酸素原子は硫黄原子と置き換えられてもよく、酸素原子が硫黄原子と置き換えられたリン酸基を、本明細書において「チオリン酸基」という。置換される酸素原子は1～4個であり得るが、好ましくは1個である。

[0019] 本明細書において「アルキル」は、直鎖または分枝鎖状の飽和脂肪族炭化水素基を意味する。「 C_{1-12} アルキル」は、炭素原子数1～12のアルキル基であり、例としては、 C_{1-6} アルキル、ヘプチル、イソヘプチル、オクチル、イソオクチル、ノニル、イソノニル、デシル、イソデシル、ウンデシル、イソウンデシル、ドデシル、イソドデシル等が挙げられるが、これらに限定されない。「 C_{1-6} アルキル」は、炭素原子数1～6のアルキル基であり、好ましい例としては、「 C_{1-4} アルキル」が挙げられ、より好ましくは「 C_{1-3} アルキル」であり、さらに好ましくは「 C_{1-2} アルキル」である。「 C_{1-4} アルキル」の具体例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、*sec*-ブチル等が挙げられる。「 C_{1-6} アルキル」の具体例としては、 C_{1-4} アルキル、*n*-ペンチル、イ

ソペンチル、ネオペンチル、*tert*-ペンチル、1, 2-ジメチルプロピル、*n*-ヘキシル等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0020] 本明細書において「アルコキシ」は、 —O— アルキルの一価基である。アルコキシの好ましい例としては、 C_{1-6} アルコキシ（即ち、 C_{1-6} アルキル —O— ）、 C_{1-4} アルコキシ（即ち、 C_{1-4} アルキル —O— ）等が挙げられる。 C_{1-4} アルコキシの具体例としては、メトキシ（ $\text{CH}_3\text{O—}$ ）、エトキシ（ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O—}$ ）、*n*-プロポキシ（ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{O—}$ ）、イソプロポキシ（ $(\text{CH}_3)_2\text{CHO—}$ ）、*n*-ブトキシ（ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{O—}$ ）、イソブトキシ（ $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{O—}$ ）、*tert*-ブトキシ（ $(\text{CH}_3)_3\text{CO—}$ ）、*sec*-ブトキシ（ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O—}$ ）等が挙げられる。 C_{1-6} アルコキシの具体例としては、 C_{1-4} アルコキシ、*n*-ペンチルオキシ（ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{O—}$ ）、イソペンチルオキシ（ $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{O—}$ ）、ネオペンチルオキシ（ $(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{O—}$ ）、*tert*-ペンチルオキシ（ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{O—}$ ）、1, 2-ジメチルプロポキシ（ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O—}$ ）等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0021] 本明細書において「ヌクレオチド」および「ヌクレオチド分子」とは、糖部分がリン酸エステルになっているヌクレオシドをいう。本明細書において「ヌクレオシド」とは、塩基と糖とがN-グリコシド結合をした化合物をいう。糖部分がD-リボースのものをリボヌクレオチドといい、RNAの加水分解によって得られる。糖部分がD-2'-デオキシリボースのものをデオキシリボヌクレオチドといい、DNAの酵素分解によって得られる。本明細書において、ヌクレオチドは、天然のものでも非天然のものでもよく、人工的に合成された物でもよい。「ヌクレオチド」は改変されてもよく、改変は、塩基、糖部分およびリン酸基部分のいずれかあるいはその組み合わせにおいて施され得、好ましくはヌクレオチドの糖部分、リン酸基部分が修飾され得る、および／またはヌクレオチドの3'位がリン酸基で修飾され得る。ヌクレオチドの改変体において、ヌクレオチドの3'位がリン酸基で修飾され

、リン酸基の少なくとも一つの酸素原子が硫黄原子に置換され得る。ヌクレオチドの改変体の代表例は式（１）に示される化合物のモノマー部分であり得るがこれに限定されない。

[0022] 本明細書において「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、交換可能に使用され、ヌクレオチドのポリマーまたはオリゴマーを指す。

「オリゴヌクレオチド」を「oligo」、「核酸」または「核酸鎖」と称する場合もある。「オリゴヌクレオチド」は改変されてもよく、改変は、塩基、糖部分およびリン酸基部分のいずれかあるいはその組み合わせにおいて施され得、好ましくはオリゴヌクレオチドの糖部分、リン酸基部分が修飾され得る、および／またはオリゴヌクレオチドの3'末端の3'位がリン酸基で修飾され得る。オリゴヌクレオチドの改変体において、オリゴヌクレオチドの3'末端の3'位がリン酸基で修飾され、リン酸基の少なくとも一つの酸素原子が硫黄原子に置換され得る。本明細書において「オリゴヌクレオチドの改変体」および「ポリヌクレオチドの改変体」は、交換可能に使用され、ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドの改変体のポリマーまたはオリゴマーを指す。オリゴヌクレオチドの改変体の代表例は式（１）に示される化合物であるがこれに限定されない。本明細書の文脈において、当該ポリマーまたはオリゴマーにおいて、１つでもヌクレオチドの改変体を含む場合オリゴヌクレオチドの改変体またはポリヌクレオチドの改変体という。本明細書においてオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドの改変体は、２以上のヌクレオチドまたはその改変体が重合している限りその長さには限定はなく、その他の文脈で制限があると解されない限り、限定されない。なお、この数は、本明細書においては塩基の数として計数されることもある。

[0023] 本明細書において、「デオキシリボ核酸（DNA）」は少なくとも１つのデオキシリボヌクレオチドモノマー部分を含む分子を意味する。

[0024] 本明細書において、「リボ核酸（RNA）」は少なくとも１つのリボヌクレオチドモノマー部分を含む分子を意味する。「リボヌクレオチド」とは、β-D-リボフラノース部分の2'位においてヒドロキシル基を有するヌ

クレオチドを意味する。

[0025] 本明細書において、核酸の文脈において使用される「改変」（「修飾」ともいい英語ではいずでもmodification/modify、substitution、substitute、displacement、displace、replacement、replaceという。）とは、核酸の構成単位またはその末端の一部または全部が他の原子団と置換されること、または官能基が付加されている状態を指す。そのような「改変」が含まれるものを（DNA、RNA、核酸またはオリゴヌクレオチドなどの）「改変体」という。オリゴヌクレオチドの改変体としては、メチル化等のアルキル化が可能なものはすべて列挙することができ、本明細書において開示される任意の改変（種々の置換基による改変）を含むものが挙げられ、このほか、当該分野では例えば、BNA（Bridged Nucleic Acid）、LNA（Locked Nucleic Acid）等を挙げることができ、このような人工核酸などの改変体についてはWengel et al., Eur. J. Org. Chem. 2297-2321 (2005)を参照されたい。この文献は、本明細書において参考として援用される。

[0026] 本明細書において「核酸塩基」または「塩基」とは、核酸を構成する塩基成分をいい、たとえば、これに限定されるわけではないがアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）、ウラシル（U）、ヒポキサンチン（イノシン）、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン等が挙げられる。

[0027] 本明細書において「末端モノマー部分」とは、オリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端にある部分（代表的には、ヌクレオシド部分）をいう。末端モノマー部分は、改変されていてもよく、例えば、2'位がフルオロ基で置換されていてもよい。

- [0028] 本明細書において「テンプレート核酸」とは、オリゴヌクレオチドまたはその改変体と相補的な配列を有する核酸をいう。
- [0029] 本明細書において「オリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端」とは、オリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'側に結合している末端モノマー部分をいう。
- [0030] 本明細書において「オリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端」とは、オリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'側に結合している末端モノマー部分をいう。
- [0031] 本明細書において「連結」とは、任意の化学的結合やリンカーなどを介して結びついていることを意味し、該化学的結合としては、これに限定するものではないが、例えば共有結合、イオン結合、水素結合などを含む。好ましくは本開示の連結は、共有結合である。
- [0032] 本明細書において「連結が生じる条件」とはオリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結することができる条件をいう。本開示において「連結が生じる条件」はリガーゼなどの核酸連結活性を有する酵素を使用しない条件が想定される。したがって、連結が生じる条件は、温度、pH、溶媒、塩濃度（バッファー、塩化ナトリウム等）などが挙げられ適宜当業者によって調整され得る。
- [0033] 本明細書において「連続して相補的な配列および鎖長」とは、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端とが、連結が生じた際できるオリゴヌクレオチドまたはその改変体の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体部分の一部から連結部分を含んで第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体部分の一部の配列と相補的な配列およびオリゴヌクレオチドまたはその改変体部分の一部から連結部分を含んで第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体部分の一部の配列の配列を含めるような相補的な配列を形成できる鎖長をいう。鎖長は、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドと連続して二本鎖を形成できる範囲であれば、長くても短くてもよく。好ましくは1

0 残基以上であり、より好ましくは 20～40 残基である。

[0034] 本明細書において「二本鎖の形成を妨げない範囲」とは、連結反応を行う条件（反応の温度等）においてオリゴヌクレオチドまたはその改変体とテンプレート核酸が二本鎖を形成することができる範囲をいう。

[0035] 本明細書において「二本鎖の形成を妨げない範囲のミスマッチ塩基対」とは、相補的な配列でないミスマッチ塩基対が、オリゴヌクレオチドまたはその改変体とテンプレート核酸が二本鎖を形成することができる範囲にあるミスマッチ塩基対をいう。

[0036] 本明細書において「活性化剤」とは、化合物を活性化して、反応を活性化し、反応速度および反応収率を向上することができるものをいい、特に3' 末端のリン酸から誘導される基を活性化して、オリゴヌクレオチドまたはその改変体のモノマー部分との間でホスホロアミデート結合を形成させることができるものをいう。例えば、カルボジイミド系縮合剤、ホスホニウム系縮合剤、ウロニウム系縮合剤またはトリアジン系縮合剤が挙げられる。

[0037] 本明細書において「オリゴヌクレオチド連結反応の活性化剤」とは、オリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結する際に用いることができる活性化剤をいう。例えば、カルボジイミド系縮合剤、ホスホニウム系縮合剤、ウロニウム系縮合剤またはトリアジン系縮合剤が挙げられる。

[0038] 本明細書において「核酸誘導體」とは、天然に存在する核酸とは異なるがもとの核酸と同様の機能を有するものをいう。核酸の塩基、糖、リン酸ジエステル部に化学修飾を加えたものも含む。例えば、ホスホロチオエート核酸、LNA 修飾核酸、2' -OMe 修飾核酸、2' -F 修飾核酸、2' -MOE 修飾核酸、PMO 核酸、PNA 核酸等が挙げられる。

[0039] 本明細書において「カルボジイミド系縮合剤」とは分子内にカルボジイミドを含む縮合剤をいう。例えば、1 - [3 - (ジメチルアミノ) プロピル] - 3 - エチルカルボジイミド (EDC (水溶性カルボジイミド (water soluble carbodiimide (WSC、WSCD) と呼ばれる))、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCI) またはジシクロヘキシルカルボジイミド (D

CC)等が挙げられる。

[0040] 本明細書において「ホスホニウム系縮合剤」とは分子内にホスホニウムを含む縮合剤をいう。例えば、ブロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (PyBroP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ピロリジン-1-イル)ホスホニウム・ヘキサフルオロホスファート (PyBOP)、6-トリフルオロメチル-1H-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 (PyFOP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート (BOP) または (7-アザ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 (PyAOP)等が挙げられる。

[0041] 本明細書において「ウロニウム系縮合剤」とは分子内にウロニウムを含む縮合剤をいう。例えば、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)、O- (N-スクシンイミジル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロほう酸塩 (TSTU) または { { [(1-シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチリデン)アミノ]オキシ} -4-モルホリノメチレン}ジメチルアンモニウムヘキサフルオロホスファート (COMU)等が挙げられる。

[0042] 本明細書において「トリアジン系縮合剤」とは分子内にトリアジンを含む縮合剤をいう。例えば、DMT-MM等が挙げられる。

[0043] 本明細書において「アミダイド体のヌクレオシドまたはデオキシヌクレオシド」とはヌクレオシドまたはデオキシヌクレオシドの3'位がリン酸エステルの構造を有する化合物をいう。

[0044] 本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分が提供されるユニットをいう。安定性等のため、混合されて提

供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。

[0045] 本明細書において「原料」とは、オリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結させる際に用いる物質をいう。例えば、モノマーまたは置換基導入試薬等が挙げられ、好ましくはアミダイド体のまたはデオキシヌクレオシド、または3'位が水酸基であるまたはデオキシヌクレオシドである。

[0046] 本明細書において用いられる場合、「疾患」(disease)、「障害」(disorder)および「状態」もしくは「症状」(いずれもcondition)は交換可能に用いられる。

[0047] (好ましい実施形態)

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

(オリゴヌクレオチドまたはその改変体の連結)

[0048] 1つの局面において、本開示は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とを連結させる方法であって、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とを、連結が生じる条件下に配置する工程を含み、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端において連結が生じ、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端側の末端モノマー部分が少なくとも一つの改変を含む方法を提供する。

[0049] 本開示の技術に従って、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とを連結させる技術を用いることで、オリゴヌクレオチドまたはその改変体間の反応性の向上、高い反応収

率を達成することができる。また、本開示の技術を用いることによって、新たな機能を有した長鎖RNAの作製が可能になり、RNAのみならず合成DNAに対しても適用可能なことから、機能性DNAの作製も行うことができる。

[0050] 一実施形態において、本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、置換されていてもよいアミノ基を含み、好ましくはその末端モノマー部分の5'位に置換されていてもよいアミノ基を含む。理論に束縛されることを望まないが、アミノ基または置換アミノ基を有するオリゴヌクレオチドまたはその改変体を用いることで、オリゴヌクレオチドまたはその改変体間の反応性の向上、高い反応収率を達成することができる。

[0051] 一実施形態において、本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体に含まれるアミノ基は、置換されていないアミノ基である。

[0052] 一実施形態において、本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体に含まれるアミノ基は、C₁₋₆アルキル基によって置換されており、例示的には、本開示において用いられるアミノ基は、メチル基またはエチル基によって置換されている。

[0053] 一実施形態において、本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の2'位がハロまたは-OHで置換されていて、好ましくは、その末端残基の2'位がハロで置換されている。より好ましくは、その末端モノマー部分の2'位がフルオロ基で置換されている。理論に束縛されることを望まないが、末端モノマー部分の2'位が置換されることで、オリゴヌクレオチドまたはその改変体間の反応性の向上、高い反応収率を達成することができる。

[0054] 一実施形態において、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の2'位が水素基または置換されていてもよいアルコキシ基で置換されていて、好ましくは、その末端モノマー部分の2'位が置換されていてもよいアルコキシで置換されている。

より好ましくは、その末端モノマー部分の2'位がメトキシで置換されている。理論に束縛されることを望まないが、末端モノマー部分の2'位が置換されることで、オリゴヌクレオチドまたはその改変体間の反応性の向上、高い反応収率を達成することができる。

[0055] 一実施形態において、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の末端モノマー部分の2'位は上向きまたは下向きで置換されている。好ましくは第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の末端モノマー部分の2'位は下向きで置換されている。

[0056] 一実施形態において、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の少なくとも1つにおけるリン酸基は、S⁻またはO⁻を含む。

[0057] 一実施形態において、本開示において用いられる前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端は、リン酸基またはチオリン酸基を含む。

[0058] 一実施形態において、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、リン酸基またはチオリン酸基を介して連結している。

[0059] 一実施形態において、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数が連結される。複数の本開示のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を用いることで、オリゴヌクレオチドまたはその改変体の鎖長が数百あるいは1000以上のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結することができる。

[0060] 一実施形態において、本開示において用いられる連結が生じる条件は、テンプレート核酸を用いることを包含する。好ましくはテンプレート核酸は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連続して相補的な配列および鎖長を有する。ここで第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が5'から3'末端に向かってG C U G A A G G G Cの塩基配列を有し、第二のオリゴヌクレオチドまたはそ

の改変体が5' から3' 末端に向かってUUUUGAACUCUGCの塩基配列を有する場合、テンプレート核酸の連続して相補的な配列は5' から3' 末端に向かってUCAAAAGCCCUUとなる。

[0061] 一実施形態において、本開示において用いられるテンプレート核酸は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とは連結していないか、または、いずれか一方のオリゴヌクレオチドまたはその改変体、もしくは両方のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結している。好ましくは、本開示において用いられるテンプレート核酸は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とは連結していない。

[0062] 一実施形態において、本開示において用いられるテンプレート核酸の配列は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と相補的な配列、あるいは二本鎖の形成を妨げない範囲のミスマッチ塩基対を含む。

[0063] 一実施形態において、本開示において用いられる連結が生じる条件は、提供されるオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、テンプレート核酸などと共存したときに連結が進む条件であれば、どのような条件であってもよく、他の薬剤の存在、温度、pH、溶媒、塩濃度（バッファー、塩化ナトリウム等）などを適宜当業者は決定することができる。好ましくは、オリゴヌクレオチドまたはその改変体連結反応の活性化剤が用いられる。

[0064] 一実施形態において、本開示において用いられる活性化剤は、カルボジイミド系縮合剤、ホスホニウム系縮合剤、ウロニウム系縮合剤またはトリアジン系縮合剤であり、好ましくは、カルボジイミド系縮合剤としては1-〔3-（ジメチルアミノ）プロピル〕-3-エチルカルボジイミド（EDC）、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPCI）を挙げることができ、ホスホニウム系縮合剤としては、プロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート（PyBroP）、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ピロリジン-1-イル）ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフ

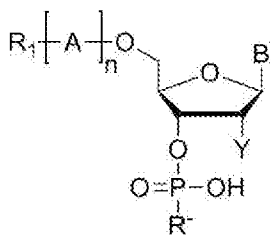
アート (PyBOP)、6-トリフルオロメチル-1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (PyFOP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスファート (BOP) または (7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシ) トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート (PyAOP) を挙げることができる。また、ウロニウム系縮合剤としては O- (7-アザベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (HATU)、O- (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)、O- (N-スクシンイミジル) -N, N, N', N'-テトラメチルウロニウム テトラフルオロほう酸塩 (TSTU) または { { [(1-シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチリデン) アミノ] オキシ } -4-モルホリノメチレン } ジメチルアンモニウム ヘキサフルオロホスファート (COMU) を挙げることができ、また、トリアジン系縮合剤としては DM T-MM を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0065] 一実施形態において、本開示において用いられる活性化剤は、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン (DNFB)、または 1- [3- (ジメチルアミノ) プロピル] -3-エチルカルボジイミド (EDC) である。水中での連結反応に用いることができる、水中で使用可能な活性化剤が好ましい。

[0066] 一実施形態において、本開示において用いられる活性化剤は、1- [3- (ジメチルアミノ) プロピル] -3-エチルカルボジイミド (EDC) と 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (HOAt)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) または N-ヒドロキシコハク酸イミド (HOSu) とを組み合わせ使用される。

[0067] 一実施形態において、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、下記式 (I)

[化5]



(式中、 R^- はS-またはO-であり、Yは水素基またはアルコキシ基であり、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン（イノシン）、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2,6-ジアミノプリンであり、Aは、各出現において独立してスペーサー、核酸、または核酸誘導体であり、nは1以上の整数であり、 R_1 は5'-位が水酸基である核酸、または核酸誘導体である）で示される化合物である。

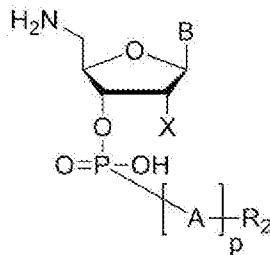
理論に束縛されることを望まないが、このような特定の構造を用いることで、新たな機能を有した長鎖RNAの作製が可能になり、RNAのみならず合成DNAに対しても適用可能なことから、機能性DNAの作製することができる。理論に束縛されることを望まないが、末端モノマー部分の2'位が置換されることで、オリゴヌクレオチドまたはその改変体間の反応性の向上、高い反応収率を達成することができる。

[0068] 一実施形態において、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体におけるYはメトキシ基である。

[0069] 一実施形態において、nは5から1000の整数である。好ましくはnは5から900の整数、nは5から800の整数、nは5から700の整数、nは5から600の整数、nは5から500の整数、nは5から400の整数、nは5から300の整数、nは5から200の整数、nは5から100の整数であり、より好ましくは5から200の整数である。特により好ましくは10から100の整数である。

[0070] 一実施形態において、本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、下記式（ⅠⅠ）

[化6]



（式中、Xは、ヒドロキシ基またはハロゲンであり、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン（イノシン）、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2, 6-ジアミノプリンであり、Aは、各出現において独立してスペーサー、核酸、または核酸誘導体であり、pは1以上の整数であり、R2は3'-位が水酸基またはリン酸基またはチオリン酸基である核酸、または核酸誘導体である）

で示される化合物である。

[0071] 一実施形態において、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体におけるXはフルオロ基である。理論に束縛されることを望まないが、Xとしてフルオロ基を採用することにより、オリゴヌクレオチドまたはその改変体間の反応性の向上、高い反応収率の改善がみられ得る。

[0072] 一実施形態において、pは5から1000の整数である。好ましくはpは5から900の整数、pは5から800の整数、pは5から700の整数、pは5から600の整数、pは5から500の整数、pは5から400の整数、pは5から300の整数、pは5から200の整数、pは5から100の整数であり、より好ましくは10から100の整数である。

[0073] 一実施形態において、本開示において用いられるスペーサーは、C_{1-k}アルキ

レンまたはPEGであり、好ましく置換されていてもよい C_{1-10} アルキレンである。いくつかの実施形態においてスペーサーは置換されていてもよい C_{1-10} アルキレンである。いくつかの実施形態においてスペーサーは $-(CH_2)_g-$ であり、 g は1~10の整数である。いくつかの実施形態において g は1である。いくつかの実施形態において g は2である。いくつかの実施形態において g は3である。いくつかの実施形態において g は4である。いくつかの実施形態において g は5である。いくつかの実施形態において g は6である。いくつかの実施形態において g は7である。いくつかの実施形態において g は8である。いくつかの実施形態において g は9である。いくつかの実施形態において g は10である。好ましくは、 g は3であり、二本鎖形成における構造および不安定化への影響が最小になる。

[0074] 一実施形態において、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数と、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とは、2か所以上同時にまたは段階的に連結される。この場合、同時とは一度の反応条件において連結させることをいい、段階的とは同時ではなく、順次なされることをいう。3つ以上の分子が利用される場合は、各々同時であっても段階的であってもよく、それらの組み合わせであってもよい。

[0075] 一実施形態において、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端および本開示において用いられるテンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結される。テンプレート核酸と第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が連結していることにより、別途テンプレート核酸を加えることなく連結反応を行うことができる。

[0076] 一実施形態において、本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチ

ドまたはその改変体の3'末端および本開示において用いられるテンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体分子が、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結される。テンプレート核酸と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が連結していることにより、別途テンプレート核酸を加えることなく連結反応を行うことができる。

[0077] 一実施形態において、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、本開示において用いられる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と、本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端とが、連結される。第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とテンプレート核酸と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が連結していることにより、環状オリゴヌクレオチドまたはその改変体を合成することができる。

[0078] 一実施形態において、 R_2 の3'一位がリン酸基またはチオリン酸基である第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数が、複数のテンプレート核酸をもちいて、環状に連結される。この結果、得られるオリゴヌクレオチドまたはその改変体は環状となり、環状オリゴヌクレオチドまたはその改変体を生成することができる。

[0079] 一実施形態において、本開示において用いられるテンプレート核酸が前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端および本開示において用いられる第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体において、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結される。

[0080] 1つの局面において、本開示は、テンプレート核酸の存在下、3'末端にリン酸から誘導される基を有する第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変

体と、5'末端に5'-アミノ-5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とを、3'末端のリン酸から誘導される基を活性化して、5'-アミノ-5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分との間でホスホロアミデート結合を形成させることで2つのオリゴヌクレオチド断片を連結させるオリゴヌクレオチドの連結反応において、2'-位にフルオロ基を導入した5'-アミノ-2'-フルオロ-2' , 5'-ジデオキシヌクレオチドモノマー部分を用いて行うオリゴヌクレオチドの連結反応を提供する。

[0081] 一実施形態において、3'末端にリン酸から誘導される基を有する第一のオリゴヌクレオチドの3'-末端のオリゴヌクレオチドモノマー部分は、天然型のリボヌクレオチド、天然型の2'-デオキシヌクレオチド、または2'-位水酸基がメチル化された2'-O-メチルヌクレオチド、あるいは2'-位にフルオロ基などの置換基が導入された2'-置換-2'-デオキシヌクレオチド誘導體である。

[0082] 一実施形態において、テンプレート核酸は、3'末端にリン酸から誘導される基を有する第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および5'末端に5'-アミノ-5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の両方のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が連続して相補的な配列、あるいは安定な二本鎖を形成できる配列および鎖長を有するものである。また、テンプレート核酸は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とは独立した核酸だけでなく、どちらか一方の断片、あるいは両方の断片と繋がったものも含む。

[0083] 一実施形態において、各オリゴヌクレオチドまたはその改変体の鎖長は5~1000塩基である。好ましくは5~200塩基であり、あるいは10~100塩基であり得る。

[0084] 一実施形態において、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の各オリゴヌクレオチドまたは

その改変体は、それぞれ独立した配列でもよく、また1本に繋がったものでも良い。後者の場合、3'末端にリン酸から誘導される基を有し、5'末端に5'-アミノ-5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有するオリゴヌクレオチドとなり、連結反応により環状のオリゴヌクレオチドを与える。

[0085] 一実施形態において、テンプレート核酸の鎖長は、連結させる第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が連続して結合可能な配列を有しており、各オリゴヌクレオチドまたはその改変体に相補的な配列全てを含む、あるいは一部の配列を含むものである。またテンプレート核酸の配列は、各オリゴヌクレオチドまたはその改変体と完全に相補的な配列、あるいは二本鎖の形成を妨げない範囲のミスマッチ塩基対を含む配列でもよい。

[0086] 一実施形態において、本開示において用いられる連結反応は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端にチオリン酸基を有しており、これを1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(DNFB)等の活性化剤により活性化して第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と反応させ、ホスホロアミデート結合を形成させることで2つのオリゴヌクレオチドまたはその改変体を結合させるオリゴヌクレオチドの連結反応を含む。活性化剤はチオリン酸の硫黄原子と反応してリン酸基を活性化できる化合物であれば、1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(DNFB)に限定されない。本開示の活性化剤を用いることで、副反応が起こらず、収率よく連結反応を行うことが可能となる。

[0087] 一実施形態において、本開示において用いられる連結反応は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端にリン酸基またはチオリン酸基を有しており、これをカルボジイミド系の活性化剤(EDC、DCC等)により活性化して第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と反応させ、ホスホロアミデート結合を形成させることで2つのオリゴヌクレオチドまたはその改変体を結合させるオリゴヌクレオチドの連結反応を含む。

[0088] 一実施形態において、本開示において用いられる連結反応は、3'末端に

リン酸から誘導される基を導入した第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を、あらかじめ活性化剤により処理して活性な中間体（活性化第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体）に変換した後に、5'末端に5'-アミノ-2'-フルオロ-2', 5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とテンプレート核酸の混合物に加えて行われる。

[0089] 一実施形態において、本開示において用いられる連結反応は、3'末端にリン酸から誘導される基を導入した第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、5'末端に5'-アミノ-2'-フルオロ-2', 5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体、およびテンプレート核酸の3種を混合させたのちに、活性化剤を加えて行われる。

[0090] 一実施形態において、本開示において用いられる連結反応は、3'末端にリン酸から誘導される基を導入した第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、5'末端に5'-アミノ-2'-フルオロ-2', 5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体、およびテンプレート核酸の3種のオリゴヌクレオチドが、いずれもRNA配列およびその誘導体である連結反応を含む。

[0091] 一実施形態において、本開示において用いられる連結反応は、3'末端にリン酸から誘導される基を導入した第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、5'末端に5'-アミノ-2'-フルオロ-2', 5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が共にRNA配列およびその誘導体であり、テンプレート核酸が、DNA配列およびその誘導体である連結反応を含む。

[0092] 一実施形態において、本開示において用いられる連結反応は、3'末端にリン酸から誘導される基を導入した第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、5'末端に5'-アミノ-2'-フルオロ-2', 5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改

変体、およびテンプレート核酸の3種のオリゴヌクレオチドが、いずれもDNA配列およびその誘導体である連結反応を含む。

[0093] 一実施形態において、本開示において用いられる連結反応は、3'末端にリン酸から誘導される基を導入した第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、5'末端に5'-アミノ-2'-フルオロ-2', 5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が共にDNA配列およびその誘導体であり、テンプレート核酸が、RNA配列およびその誘導体である連結反応を含む。

[0094] 一実施形態において、本開示において用いられる連結反応は、3'末端にリン酸から誘導される基を導入した第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体、5'末端に5'-アミノ-2'-フルオロ-2', 5'-デオキシヌクレオチドモノマー部分を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体、およびテンプレート核酸の全て、あるいは一部の配列が、RNA配列およびその誘導体とDNA配列およびその誘導体からなる複合配列である連結反応を含む。

(製造に使うツール、試薬)

[0095] 別の局面において、本開示は、本明細書に記載される第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体または第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を含む、それぞれ第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体または第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を用いて連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための組成物を提供する。ここで記載される各種実施形態は、(オリゴヌクレオチドまたはその改変体の連結)に記載される任意の形態を適宜組み合わせ適用することができることが理解される。

[0096] 1つの実施形態では、本明細書に記載される第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を含む、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を用いて連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための組成物を提供する。

[0097] 1つの実施形態では、本明細書に記載される第二のオリゴヌクレオチドまた

はその改変体を含む、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を用いて連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための組成物を提供する。

[0098] 1つの実施形態では、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための組成物はアミダイド体のまたはデオキシヌクレオシド、または3'位が水酸基であるまたはデオキシヌクレオシドを含む。

[0099] 他の局面において、本開示は第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体もしくは第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体、またはそれらの組み合わせを含む、テンプレート核酸を用いて連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための組成物を提供する。ここで記載される各種実施形態は、（オリゴヌクレオチドまたはその改変体の連結）に記載される任意の形態を適宜組み合わせて適用することができることが理解される。

[0100] 別の局面において、本開示はオリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結するためのキットであって、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、活性化剤と、テンプレート核酸とを含むキットを提供する。

[0101] 一実施形態において、本開示は第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を含む、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための原料組成物を提供する。ここで記載される各種実施形態は、（オリゴヌクレオチドまたはその改変体の連結）に記載される任意の形態を適宜組み合わせて適用することができることが理解される。

[0102] 一局面において、本開示は前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための原料が、2'位にフルオロ基、5'位にアミノ基を有するヌクレオシドを含む、原料組成物を提供する。ここで記載される各種実施形態は、（オリゴヌクレオチドまたはその改変体の連結）に記載される任意の形態を適宜組み合わせて適用することができることが理解される。

ここでは、原料として、例えば、ヌクレオシド、モノマーまたは置換基導

入試薬などが例示される。

[0103] 別の局面において、本開示は第一／第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の原料（モノマーまたは置換基導入試薬等）を含む、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体、および／または第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための組成物を提供する。ここで記載される各種実施形態は、（オリゴヌクレオチドまたはその改変体の連結）に記載される任意の形態を適宜組み合わせて適用することができることが理解される。

[0104] 一実施形態において、第一／第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の原料が、アミダイド体のヌクレオシド、または3'位が水酸基であるヌクレオシドである。

[0105] 別の局面において、本開示はA) 合成を所望する核酸配列の情報を得る工程、B) A)の情報に基づき、合成したい配列の一部を複数合成する工程であって、ここで、各配列は、第一および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の特徴を有する、工程、ならびにC) 必要に応じて連結反応に必要な試薬の存在下で、連結条件に配置する工程を包含する、所望の核酸配列を有するオリゴヌクレオチドまたはその改変体の製造方法を提供する。ここで記載される各種実施形態は、（オリゴヌクレオチドまたはその改変体の連結）に記載される任意の形態を適宜組み合わせて適用することができることが理解される。

[0106] 別の局面において、本開示は、A) 合成を所望する核酸配列の情報を得る工程、B) A)の情報に基づき、合成したい配列の一部を複数合成する工程であって、ここで、各配列は、第一および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の特徴を有する、工程、ならびにC) 必要に応じて連結反応に必要な試薬と、B)で合成された部分配列を含む核酸とをパッケージとする工程を包含する、所望のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の製造キットの製造方法を提供する。ここで記載される各種実施形態は、（オリゴヌクレオチドまたはその改変体の連結）に記載される任意の形態を適宜組み合わせて適用することができることが理解される。

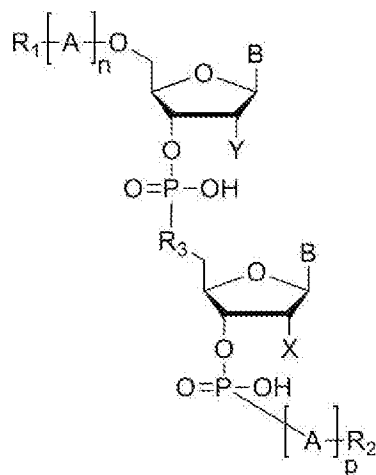
[0107] 一実施形態において、A) 合成を所望する核酸配列の情報を得る工程は、シーケンス解析等を行って、核酸の配列情報を読み取る工程を含む。

[0108] 一実施形態において、連結反応に必要な試薬が、テンプレート核酸、活性化剤を含む。

(新規オリゴヌクレオチドまたはその改変体)

[0109] 一局面において、本開示は以下の式

[化7]



(式中、Yは、水素基またはアルコキシ基であり、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン(イノシン)、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2,6-ジアミノプリンであり、Xは、ヒドロキシ基、またはハロゲンであり、Aは、各出現において独立して核酸、または核酸誘導体であり、nは1以上の整数であり、pは1以上の整数であり、R₁は5'一位が水酸基である核酸、または核酸誘導体、R₂は3'一位が水酸基またはリン酸基またはチオリン酸基である核酸、または核酸誘導体であるか、R₁およびR₂は、一緒になって単結合を形成してもよく、R₃が置換されていてもよいアミノ基である)で示される化合物を提供する。ここで記載される各種実施形態は、(オリゴヌクレオチドまたはそ

の改変体の連結)等に記載される任意の形態を適宜組み合わせて適用することができることが理解される。理論に束縛されることを望まないが、ヌクレアーゼ耐性が高いオリゴヌクレオチドまたはその改変体を達成することができる。

[0110] 一実施形態において、Yは、メトキシ基であり、前記Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン（イノシン）、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2, 6-ジアミノプリンであり、前記Xは、フルオロ基であり、R₁は水素であり、R₂はヒドロキシ基である。

[0111] 一実施形態において、Yは、メトキシ基であり、前記Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン（イノシン）、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2, 6-ジアミノプリンであり、前記Xは、フルオロ基であり、R₁およびR₂は、一緒になって単結合を形成している。

[0112] 一実施形態において、Yは、メトキシ基である。

[0113] 一実施形態において、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン（イノシン）、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2, 6-ジアミノプリンであり、好ましくはアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、またはウラシルである。

- 。
- [0114] 一実施形態において、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、またはウラシルである。
- [0115] 一実施形態において、nは5から1000の整数である。好ましくはnは5から900の整数、nは5から800の整数、nは5から700の整数、nは5から600の整数、nは5から500の整数、nは5から400の整数、nは5から300の整数、nは5から200の整数、nは5から100の整数であり、より好ましくは10から100の整数である。
- [0116] 一実施形態において、pは5から1000の整数である。好ましくはpは5から900の整数、pは5から800の整数、pは5から700の整数、pは5から600の整数、pは5から500の整数、pは5から400の整数、pは5から300の整数、pは5から200の整数、pは5から100の整数であり、より好ましくは10から100の整数である。
- [0117] 一実施形態において、Xは、ヒドロキシ基、またはハロゲンであり、好ましくはXはハロゲンであり、より好ましくはフルオロ基である。Xがフルオロ基であるオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、核酸分解酵素に耐性を有する（分解され難い）、二本鎖形成を安定化する等の利点を有する。
- [0118] 一実施形態において、Aは、各出現において独立してスペーサー、核酸、または核酸誘導体であり、好ましくは、Aは核酸である。より好ましくはAはDNAまたはRNAである。ここで核酸誘導体はホスホロチオエート核酸、LNA修飾核酸、2'-OMe修飾核酸、2'-F修飾核酸、2'-MOE修飾核酸、PMO核酸、またはPNA核酸である。
- [0119] 一実施形態において、R₁は5'-一位が水酸基である核酸、または核酸誘導体、R₂は3'-一位が水酸基またはリン酸基またはチオリン酸基である核酸、または核酸誘導体であるか、R₁およびR₂は、一緒になって単結合を形成してもよい。
- [0120] 一実施形態において、R₃は置換されていてもよいアミノ基である。
- [0121] 一実施形態において、R₃は置換されていないアミノ基である。

[0122] 一実施形態において、 R_3 はアミノ基は C_{1-6} アルキル基によって置換されており、好ましくは、メチル基またはエチル基によって置換されている。

[0123] 一実施形態において、本開示は第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数と、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、連結されている化合物を含む。

[0124] 一実施形態において、本開示は R_1 および R_2 が、一緒になって単結合を形成しており、それにより、環状オリゴヌクレオチドまたはその改変体が形成している化合物を含む。

[0125] 一実施形態において、本開示は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端に、テンプレート核酸が結合している化合物を含む。

[0126] 一実施形態において、本開示は、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端に、テンプレート核酸が結合している化合物を含む。

[0127] 一実施形態において、本開示は、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが、テンプレート核酸を介して結合している化合物を含む。

[0128] (医薬他応用)

本開示は、医薬として応用することができる。

例えば、本開示の組成物および方法は、それを必要とする個体を処置するために利用することができる。特定の実施形態では、個体は、哺乳動物、例えばヒトなど、または非ヒト哺乳動物である。動物、例えばヒトなどに投与された場合、組成物または化合物は、好ましくは、例えば、本開示の化合物と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物として投与される。薬学的に許容される担体は、当技術分野で周知であり、例えば、水溶液、例えば、水もしくは緩衝生理食塩水など、または他の溶媒もしくはビヒクル、例えば、グリコール、グリセロール、油、例えば、オリーブ油など、または注射用の有機エステルが挙げられる。好ましい実施形態では、このような医薬組成

物がヒトへの投与、特に侵襲経路の投与のためである場合（すなわち、例えば、上皮バリアを介した輸送または拡散を回避する注射またはインプランテーションなどの経路）、水溶液はパイロジェンを含まない、またはパイロジェンを実質的に含まない。賦形剤は、例えば、剤の遅延放出を実行するように、または1つもしくは複数の細胞、組織または器官を選択的にターゲットとするよう選択することができる。医薬組成物は、単位剤形、例えば、錠剤、カプセル剤（スプリンクルカプセル剤およびゼラチンカプセル剤を含む）、顆粒剤、再構成用に凍結乾燥されたもの、散剤、液剤、シロップ剤、坐剤、または注射などであり得る。組成物はまた、経皮的送達システム、例えば、皮膚パッチ中に存在することもできる。組成物はまた、局所的投与に対して適切な液剤、例えば点眼剤などの中に存在することもできる。

[0129] 本開示はまた、ゲノム編集技術において広く利用することができる。限定するものではないが、例えば、ゲノム編集で用いられている sgRNA に応用することができる（J. Filippova et al., *Biochimie* 167 2019 49-60、Ayal Hendel et al., *nature biotechnology* 33 2015 985-989）。理論に束縛されることを望まないが、本開示の改変（修飾）塩基を含むオリゴヌクレオチドまたはその改変体（オリゴ核酸）を用いることにより活性が上がるようであることから、本開示の技術を用いて合成した修飾塩基を含むオリゴ核酸のフラグメントをつなげて作製することが応用として想定され得る。別の実施形態としては、T. Seya et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 147 2019 37-43に掲載されているような比較的長めの2本鎖を、テンプレートのDNAを用いずに、お互いの鎖がテンプレートになるように作製することも想定され得る（図11）。

[0130] 別の実施形態としては、例えば、長鎖非翻訳RNA（long non-coding RNA； lncRNA）やmRNAについても対象とされ得る。

[0131] 投与が考えられる「対象」は、ヒト（すなわち、いずれかの年齢群の男性または女性、例えば、小児科の対象（例えば、幼児、児童、思春期）または

成人の対象（例えば、若年成人、中年成人、または高齢成人））および／または他の非ヒト動物、例えば哺乳動物（例えば霊長類（例えばカニクイザル、アカゲザル）、商業的に関係する哺乳動物、例えば牛、ブタ、馬、羊、ヤギ、猫、および／または犬）および鳥類（例えば、商業的に関係する鳥類、例えば鶏、鴨類、ガチョウ、および／または七面鳥）、爬虫類、両生類、および魚類を含むが、それらに限定されない。ある実施形態において、非ヒト動物は哺乳動物である。非ヒト動物は発生のいずれかの時期にある雄または雌であり得る。非ヒト動物はトランスジェニック動物であり得る。

[0132] 本明細書において用いられる場合、特に限定して言及しない限り、用語「治療する」、「治療すること」、および「治療」（英語では、*treat*、*treating*、*treatment*）は、対象が疾患、障害または状態に罹患している間に起こり、疾患、障害または状態の深刻さを減少させるかまたは疾患、障害または状態の進行を遅延もしくは減速させる行為（狭義の「治療」（*therapy*））であるか、対象が障害に罹患し始める前において、疾患、障害または状態になるのを阻害するかまたは実際に疾患、障害または状態になってしまった場合の深刻さを減少させる行為（「予防」）もまた包含される。

[0133] 一般的に、化合物の「有効量」は所望の生物学的応答を惹起し、例えば、疾患、障害または状態を治療するのに十分な量を指す。当業者には当然のことながら、本開示の化合物の有効量は、所望の生物学的エンドポイント、化合物の薬物動態、治療されようとする疾患、障害または状態、投与の様式、ならびに年齢、健康、および対象などの因子に依存して変わり得る。有効量は治療および予防の治療を包含する。

[0134] 本明細書において用いられる場合、特に限定して言及しない限り、化合物の「治療有効量」は、疾患、障害または状態の治療に際して治療効果を提供するか、または疾患、障害または状態と結びついた1つまたは2つ以上の症状を遅延させるもしくは最小化するのに十分な量を指す。化合物の治療有効量は、単独でまたは他の療法との組み合わせで、疾患、障害または状態の治

療に際して治療効果を提供する治療剤の量を意味する。用語「治療有効量」は、全般的な療法を改善する、疾患、障害または状態の症状もしくは原因を減少させるもしくは防ぐ、または別の治療剤の治療有効性を増強する量を包含し得る。

[0135] 本明細書において用いられる場合、特に限定して言及しない限り、化合物の「予防有効量」は、疾患、障害または状態または疾患、障害または状態と結びついた1つもしくは2つ以上の症状を予防、あるいはその再発を予防するのに十分な量である。化合物の予防有効量は、単独でまたは他の剤との組み合わせで、疾患、障害または状態の予防に際して予防効果を提供する治療剤の量を意味する。用語「予防有効量」は、全般的な予防を改善するまたは別の予防剤の予防有効性を増強する量を包含し得る。

[0136] 例示的な疾患、障害または状態は、増殖性、神経系、免疫系、内分泌系、心血管系、血液系、炎症性、および細胞死によって特徴づけられる障害を含むが、それらに限定されない。

[0137] 本明細書において用いられる場合、増殖性の疾患、障害または状態は、癌、造血系の腫瘍、増殖性乳部疾患、肺の増殖性障害、結腸の増殖性障害、肝臓の増殖性障害、および卵巣の増殖性障害を含むが、それらに限定されない。

[0138] 本明細書に記載のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は核酸医薬に用いることができる。

(合成例)

[0139] (本開示の化合物の製造法)

以下に、本開示の化合物の製造法について、実施例に具体的な合成例を挙げているが、これに限定されるものではなく、以下に代表的なスキームを挙げて説明するが、本開示はもとよりこれらに限定されるものではない。

[0140] 本開示の化合物は、これらに限定されないが、例えば、下記に記した製造法によって製造することができる。これらの製造法は、有機合成化学を習熟している者の知識に基づき、適宜改良することができる。下記製造法におい

て、原料として用いられる化合物は、反応に支障をきたさない限り、それらの塩を用いてもよい。

論文記載 (Ueno, Y., Hirai, M., Yoshikawa, K., Kitamura, Y., Hirata, Y., Kiuchi, K., Kitade, Y. Tetrahedron, 2008, 64, 11328-11334., Hideto Maruyama et al., Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, No. 12, 7042-7048) の方法を参考にして、5' 位にアミノ基、および2' 位にハロまたは-OHが置換されているヌクレオチドまたはその改変体のアミダイド化合物を合成する。この化合物をオリゴヌクレオチドまたはその改変体と反応させ、5' 末端に5' 位にアミノ基、および2' 位にハロまたは-OHが置換されているヌクレオチド末端を有する第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を合成する。第一のヌクレオチドまたはその改変体を活性剤と反応させ、活性化第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を合成する。活性化第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と必要に応じてテンプレート核酸の存在下で反応させて、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結し、オリゴヌクレオチドまたはその改変体を生じさせることができる。

[0141] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0142] 本実施例では、本開示の化合物の製造、用途に関する実施例を説明する。

[0143] (実施例1) 5'-アミノ-5'-デオキシヌクレオシドのアミダイト試薬の合成

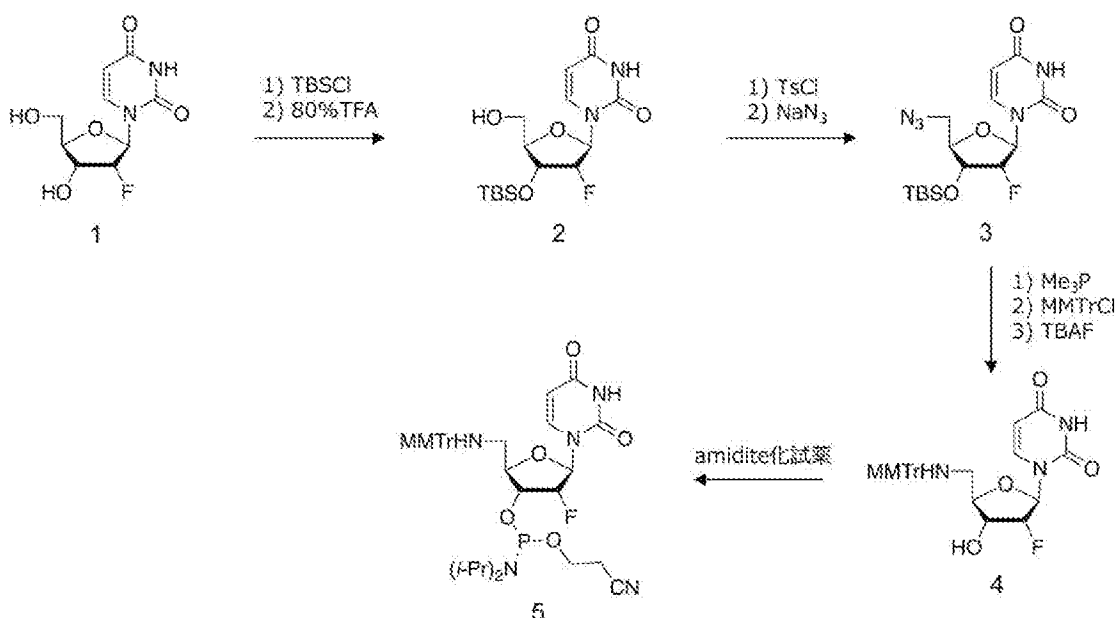
薄層クロマトグラフィーはSilicagel 70 TLC Plate (富士フィルム和

光純薬工業)を用いた。カラムクロマトグラフィーにはWakogel C-200 (富士フィルム和光純薬工業) およびSilica Gel 60 (ナカライテスク)を用いた。 ^1H NMRおよび ^{13}C NMRはテトラメチルシランを内部標準とし、Bruker Avance III 500 MHzを用いて測定した。質量分析は北海道大学グローバルファシリティセンター設置のThermo Scientific Exactiveを用いて測定した。

[0144] 5' - (4-モノメトキシトリチルアミノ) -2' -フルオロ-2'、5' -ジデオキシウリジン 3' -ホスホロアミダイト (化合物5) の合成

論文記載 (Ueno, Y., Hirai, M., Yoshikawa, K., Kitamura, Y., Hirata, Y., Kiuchi, K., Kitade, Y. Tetrahedron, 2008, 64, 11328-11334.) の方法を参考にして、本化合物5を以下に示す合成スキーム、方法により合成した。

[化8]



スキーム1.Qに2' F-5' - NH_2 -ウリジンを導入するための試薬 (5' -アミノ-2' -フルオロ-2'、5' -ジデオキシウリジン アミダイト試薬、化合物5) の合成スキーム

[0145] 3' -O-tert-ブチルジメチルシリル-2' -フルオロ-2' -デオキシウリジン (化合物2)

アルゴン雰囲気下、2'-フルオロ-2'-デオキシウリジン（化合物1）1.23 g（5.00 mmol）をジメチルホルムアミド（50 mL）に溶解し、tert-ブチルジメチルクロロシラン2.26 g（15.0 mmol）およびイミダゾール2.04 g（30.0 mmol）を加え、室温で22時間攪拌した。反応液にエタノール（5.0 mL）を加えて室温で30分攪拌した後、酢酸エチル（240 mL）を加え、水（70 mL）で4回、飽和食塩水（70 mL）で1回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮して白色泡状物質を得た。本物質を氷冷下、テトラヒドロフランートリフルオロ酢酸－水（4 : 1 : 1）の混合溶液（60 mL）に溶解し、氷冷下で2.5時間、さらに室温で2時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（100 mL）を加えた後、酢酸エチル（200 mL）により抽出した。さらに有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（70 mL）、水（70 mL）、飽和食塩水（70 mL）で各1回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：エタノール－クロロホルム）により精製して標記化合物（化合物2）1.24 g（収率69%）を白色固体状物質として得た。

ESI-MS 計算値：383.14090 ($C_{15}H_{25}O_5N_2FSiNa$ $[M+Na]^+$), 実測値：383.14060

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.40 (br s, 1 H, NH), 7.89 (d, 1 H, ArH, J = 8.1 Hz), 5.90 (d, 1 H, CH, J = 17.8 Hz), 5.64 (d, 1 H, ArH, J = 8.1 Hz), 5.23 (br s, 1 H, OH), 5.11 (d, 1 H, CH, J = 53.4 Hz), 4.33 (m, 1 H, CH), 3.87 (m, 1 H, CH), 3.76 (m, 1 H, CH_2a), 3.54 (m, 1 H, CH_2b), 0.88 (s, 9 H, $(CH_3)_3$), 0.10 (s, 6 H, $(CH_3)_2$).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.69 (C), 150.79 (C), 141.03 (CH), 102.15 (CH), 93.01 (CH, J = 187.7 Hz), 87.92 (CH, J = 34.4 Hz), 83.92 (CH), 69.19 (CH, J = 15.5 Hz), 59.56 (CH_2), 26.03 (CH_3), 18.23 (C), -4.45 (CH_3), -4.71 (CH_3).

[0146] 5'-アジド-3'-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-フルオロ-2'-
、5'-ジデオキシウリジン (化合物3)

アルゴン雰囲気下、3'-0-tert-ブチルジメチルシリル-2'-フルオロ-2'-
-デオキシウリジン (化合物2) 1.24 g (3.44 mmol) をピリジン (40 mL) に溶解し、p-トルエンスルホンクロリド 1.31 g (6.88 mmol) を加え、室温で3日間攪拌した。反応液に水 (5.0 mL) を加えて室温で1時間攪拌した後、減圧下濃縮した。残渣に酢酸エチル (160 mL) を加えて溶解し、水 (60 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (60 mL)、水 (60 mL)、飽和食塩水 (60 mL) で各1回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮した後、残渣をトルエンで共沸して黄色泡状物質を得た。アルゴン雰囲気下、本物質をジメチルホルムアミド (35 mL) に溶解し、アジ化ナトリウム 610 mg (9.39 mmol) および塩化アンモニウム 670 mg (12.5 mmol) を加え、80℃で1時間加熱攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、酢酸エチル (200 mL) を加え、水 (60 mL) で4回、飽和食塩水 (60 mL) で1回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物3) 1.03 g (収率78%) を白色固体状物質として得た。

ESI-MS 計算値: 408.14738 ($C_{15}H_{25}O_4N_5FSiNa$ $[M+Na]^+$), 実測値: 408.14709

^1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 11.46 (br s, 1 H, NH), 7.70 (d, 1 H, ArH, $J = 8.0$ Hz), 5.83 (d, 1 H, CH, $J = 22.4$ Hz), 5.67 (d, 1 H, ArH, $J = 8.0$ Hz), 5.29 (dd, 1 H, CH, $J = 53.6, 3.8$ Hz), 4.50 (m, 1 H, CH), 3.95 (m, 1 H, CH), 3.76 (d, 1 H, CH_2a , $J = 13.8$ Hz), 3.45 (dd, 1 H, CH_2b , $J = 13.8, 4.6$ Hz), 0.88 (s, 9 H, $(CH_3)_3$), 0.12 (s, 3 H, CH_3), 0.11 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 163.68 (C), 150.65 (C), 142.87

(CH), 102.49 (CH), 92.48 (CH, $J = 186.1$ Hz), 90.50 (CH, $J = 36.4$ Hz), 81.02 (CH), 70.29 (CH, $J = 15.8$ Hz), 50.48 (CH₂), 26.02 (CH₃), 18.20 (C), -4.49 (CH₃), -4.75 (CH₃).

[0147] 5' - (4-モノメトキシトリチルアミノ) - 2' -フルオロ-2'、5' -ジデオキシウリジン (化合物4)

5' -アジド-3' -0- (tert-ブチルジメチルシリル) - 2' -フルオロ-2'、5' -ジデオキシウリジン (化合物3) 1.03 g (2.67 mmol) をテトラヒドロフラン-水 (9 : 1) の混合溶液 (40 mL) に溶解し、トリメチルホスフィン (3 mol/L テトラヒドロフラン溶液) 1.78 mL (5.34 mmol) を加え、室温で16時間攪拌した。反応液に1N水酸化ナトリウム溶液 (2.7 mL) を加えて室温で1時間攪拌した後、減圧下濃縮した。反応液に水 (75 mL) および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (75 mL) を加えた後、酢酸エチル (60 mL) で3回抽出した。さらに有機層を飽和食塩水 (60 mL) で1回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮して白色固体状物質を得た。アルゴン雰囲気下、本物質をピリジン (35 mL) に溶解し、4-モノメトキシトリチルクロリド 1.65 g (5.34 mmol) を加え、室温で18時間攪拌した。反応液にエタノール (3.0 mL) を加えて室温で30分攪拌した後、減圧下濃縮した。残渣に酢酸エチル (150 mL) を加えて溶解し、水 (50 mL) で1回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) で2回、飽和食塩水 (60 mL) で1回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮した後、残渣をトルエンで共沸して黄色泡状物質を得た。アルゴン雰囲気下、本物質をテトラヒドロフラン (35 mL) に溶解し、氷冷下でテトラブチルアンモニウムフルオリド (1 mol/L テトラヒドロフラン溶液) 3.74 mL (3.74 mmol) を加えて、氷冷下1時間攪拌した。反応液に酢酸 (0.21 mL) を加えた後、減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: エタノール-クロロホルム、0.1%ピリジンを含む) により精製して標記化合物 (化合物4) 996 mg (収率

72%)を白色泡状物質として得た。

ESI-MS 計算値: 540.19052 ($C_{29}H_{28}O_5N_3FNa$ $[M+Na]^+$), 実測値: 540.19032. ^1H

NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.43 (br s, 1 H, NH), 7.71 (d, 1 H, ArH, J = 8.1 Hz), 7.41 (d, 4 H, ArH, J = 7.7 Hz), 7.30-7.27 (m, 6 H, ArH), 7.18 (t, 2 H, ArH, J = 7.3 Hz), 6.85 (d, 2 H, ArH, J = 8.7 Hz), 5.85 (d, 1 H, CH, J = 20.9 Hz), 5.57 (d, 1 H, ArH, J = 8.1 Hz), 5.51 (d, 1 H, OH, J = 6.7 Hz), 5.11 (dd, 1 H, CH, J = 53.5, 3.9 Hz), 4.18 (m, 1 H, CH), 3.95 (m, 1 H, CH), 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 2.70 (t, 1 H, NH, J = 8.0 Hz), 2.40 (m, 1 H, CH_{2a}), 2.27 (m, 1 H, CH_{2b}).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.65 (C), 157.89 (C), 150.61 (C), 146.63 (C), 142.12 (CH), 138.16 (C), 130.09 (CH), 129.37 (CH), 128.77 (CH), 128.68 (CH), 128.22 (CH), 126.56 (CH), 113.56 (CH), 102.14 (CH), 93.81 (CH, J = 183.8 Hz), 89.57 (CH, J = 35.6 Hz), 82.03 (CH), 70.18 (C), 69.98 (CH, J = 16.2 Hz), 55.44 (CH₃), 45.37 (CH₂).

[0148] 5'-(4-モノメトキシトリチルアミノ)-2'-フルオロ-2'、5'-ジデオキシウリジン 3'-ホスホロアミダイト (化合物5) アルゴン雰囲気下、5'-(4-モノメトキシトリチルアミノ)-2'-フルオロ-2'、5'-ジデオキシウリジン (化合物4) 500 mg (0.97 mmol) を塩化メチレン (20 mL) に溶解し、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 0.54 mL (1.94 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン 0.66 mL (3.88 mmol) を加え、室温で50分攪拌した。反応液にクロロホルム (80 mL) を加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (30 mL)、水 (30 mL)、飽和食塩水 (30 mL) で各1回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン、0.1%ピリジンを含む) により精製し

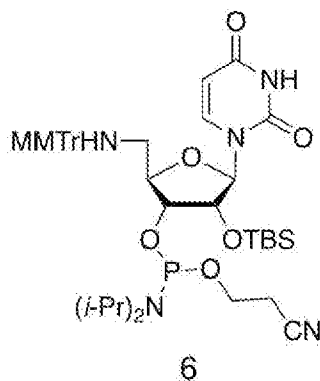
て標記化合物（化合物5）520mg（収率75%）を白色泡状物質として得た。

ESI-MS 計算値：740.29837 ($C_{38}H_{45}O_6N_5FPNa$ $[M+Na]^+$), 実測値：740.29836.

^{31}P NMR (202 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 149.45 (d, $J = 6.9$ Hz), 149.23 (d, $J = 11.9$ Hz).

[0149] 2'-O-(tert-ブチルジメチルシリル)-5'-(4-モノメトキシトリチルアミノ)-5'-デオキシウリジン 3'-ホスホロアミダイト（化合物6）の合成

[化9]



スキーム2. Qに2'-OH-5'-NH₂-ウリジンを導入するための試薬（5'-アミノ-5'-デオキシヌクレオシド アミダイト試薬、化合物6）の構造

本化合物6は、論文記載（Kojima, N. and Bruice, T. C. Org. Lett., 2000, 2, 81-84.; Kojima, N., Szabo, I. E., Bruice, T. C. Tetrahedron, 2002, 58, 867-879.; Maruyama, H., Oikawa, R., Hayakawa, M., Takamori, S., Kimura, Y., Abe, N., Tsuji, G., Matsuda, A., Shuto, S., Ito, Y., Abe, H. Nucleic Acids Res., 2017, 45, 7042-7048.）の方法に従い合成した。

[0150] 合成したオリゴヌクレオチド（DNA、及びRNA）は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって精製した。HPLCは、Gilson社の装置にWaters μ -Bondasphere C18 300A（内径3.9mm×長さ150mm、Waters社）を接続して行った。移

動相として、逆相の場合には0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液 (TEAA、pH 7.0) 中アセトニトリルの濃度勾配を用いた。合成したオリゴヌクレオチドの種類と逆相HPLCの条件を下記に示す。

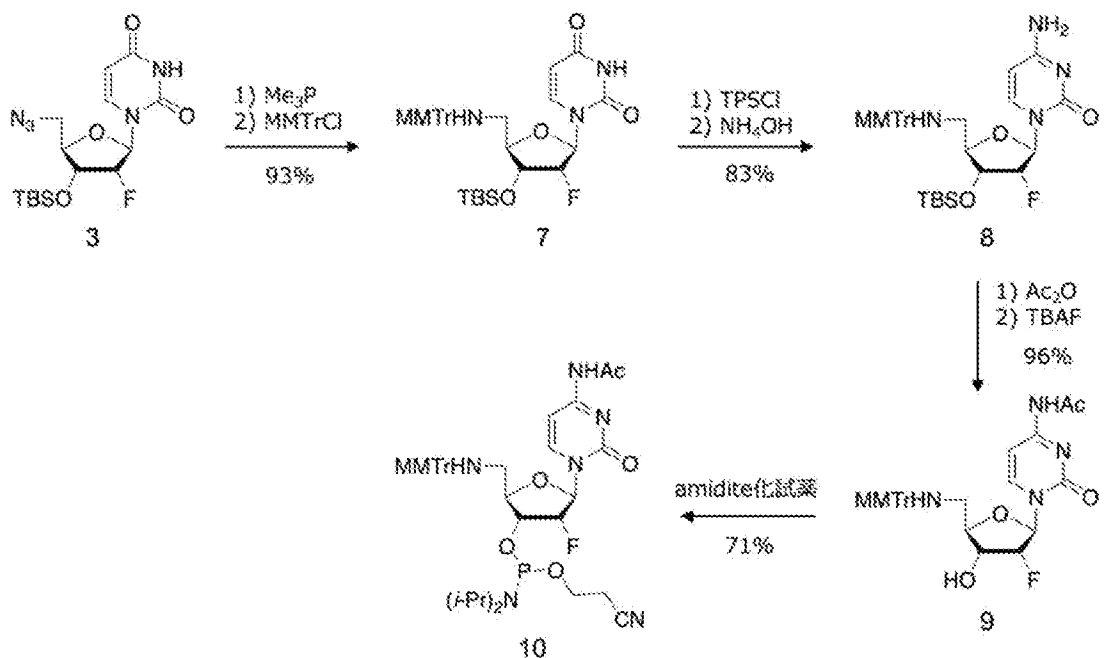
A溶液：5%アセトニトリル／0.1 M TEAA (pH 7.0)

B溶液：25%アセトニトリル／0.1 M TEAA (pH 7.0)

[0151] 5' - (4-モノメトキシトリチルアミノ) - 2' -フルオロ-2', 5' -ジデオキシシチジン 3' -ホスホロアミダイト (化合物10) の合成

論文記載 (Hideto Maruyama et al., Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, No. 12, 7042-7048) の方法を参考にして、本化合物10を以下に示す合成スキーム、方法により合成した。

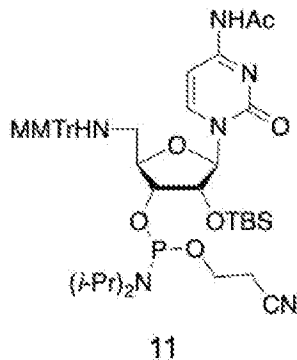
[化17]



スキーム3. Qに2' F-5' -NH₂-シチジンを導入するための試薬 (5' -アミノ-2' -フルオロ-2', 5' -ジデオキシシチジン アミダイト試薬、化合物10) の合成スキーム

[0152] 2' -O- (tert-ブチルジメチルシリル) - 5' - (4-モノメトキシトリチルアミノ) - 5' -デオキシシチジン 3' -ホスホロアミダイト (化合物11) の合成

[化18]



スキーム4. Qに2'-OH-5'-NH₂-シチジンを導入するための試薬(5'-アミノ-5'-デオキシシチジン アミダイト試薬、化合物11)の構造

本化合物11は、論文記載(Afaf H. El-Sagheer et al., Chem. Commun., 2017, 53, 10700-10702、Afaf H. El-Sagheer et al., PNAS 2010 107 15329-15334、Afaf H. El-Sagheer et al., PNAS, 2011, 108, 11338-11343)の方法を参考にして合成した。

[0153] (DNFB修飾体(2Fps-DNFB))(実施例2)の作製)

2FpsのDNFB修飾体(実施例2)は以下の方法で作製した。3'-ホスホロチオエート修飾を含む核酸鎖2Fps(図3)(1.0nmol)を10mM 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(DNFB)、10% dimethyl sulfoxide(DMSO)、及び20mM ほう酸ナトリウム(pH8.5)に溶解した。室温で2時間反応を行った後、ゲルろ過カラム(GE Healthcare、NAP-5)を行って粗精製した。その後、逆相カラムを用いたHPLCを用いて精製し、2FpsのDNFB修飾体(2Fps-DNFB)を得た。精製には下記の溶液を用いた。

A溶液: 5%アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

B溶液: 50%アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)

より具体的には図6に示すように、実施例2の2FpsのDNFB修飾体は、原料である2Fpsよりも遅れてピークが観察されることが確認された。

[0154] 2MepsのDNFB修飾体は3'-ホスホロチオエート修飾を含む核酸鎖2Meps(図3)を用い、上記2Fps-DNFB(実施例2)と同様の

方法で反応を行い、作製した。

[0155] (RNAの連結体(2Me-2OH5N)(実施例3)の作製)

連結体の2Me-2OH5N(10-13)は以下の方法で作製した。5'アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5N(図3)(2.5 pmol)とテンプレートとなる核酸鎖tmr27(図3)(5 pmol)とを20 mMリン酸ナトリウム、10 mM塩化マグネシウム(pH8)を含む溶液(総量12.5 μL)に溶解させた。反応液を90℃で1分加熱し氷冷して3分間放置した(反応液1)。DNFB修飾を含む核酸鎖2Meps-DNFB(25 pmol)を20 mMリン酸ナトリウム、10 mM塩化マグネシウム(pH8)を含む溶液(総量12.5 μL)に溶解し、反応液1に加え、総量25 μLで27℃、10、30、60、及び120分間反応を行った後、5 μLをloading buffer(80%ホルムアミド、10 mM EDTA)5 μLと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、15%アクリルアミド、25%ホルムアミド、5.6 M 尿素、1×TBEを含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、蛍光イメージングを用いて分析した。より具体的には、図6に示すように、実施例3の連結体は、原料である蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5Nの核酸鎖よりも遅れて移動することが確認された。また反応時間の経過に伴い、観察される連結体の量は増加した。ゲルの分析は電気泳動後にTyphoon FLA9000(GE Health.)によって解析した。

[0156] (RNAの連結体(2Me-2F5N)(実施例4)の作製)

連結体の2Me-2F5N(10-13)(実施例4、図3)は以下の方法で作製した。5'アミノ修飾を含み含蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5N(図3)(2.5 pmol)とテンプレートとなる核酸鎖tmr27(図3)(5 pmol)とを20 mMリン酸ナトリウム、10 mM塩化マグネシウム(pH8)を含む溶液(総量12.5 μL)に溶解させた。反応液を90℃で1分加熱し氷冷して3分間放置した(反応液1)。DNFB修飾を含む核酸鎖2Meps-DNFB(25 pmol)を20 mMリン酸ナトリ

ウム、10 mM塩化マグネシウム (pH 8) を含む溶液 (総量 12.5 μ L) に溶解し、反応液 1 に加え、総量 25 μ L で 27°C、10、30、60、及び 120 分間反応を行った後、5 μ L を loading buffer (80%ホルムアミド、10 mM EDTA) 5 μ L と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、15%アクリルアミド、25%ホルムアミド、5.6 M 尿素、1x TBE を含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、上記 2 Me-2 OH 5 N (実施例 4) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。より具体的には、図 6 A に示すように、実施例 4 の連結体は、原料である蛍光分子で修飾された核酸鎖 2 F 5 N の核酸鎖よりも遅れて移動することが確認された。また図 6 B に示すように、反応時間の経過に伴い、観察される連結体の反応収量は増加し、いずれの時間においても上記 2 Me-2 OH 5 N よりも高い反応収量を示したことから、2 F 5 N は D N F B 修飾核酸との連結反応において 2 OH 5 N よりも有効であることを確認した。

[0157] (RNA の連結体 (2 F-2 OH 5 N) (実施例 5) の作製)

連結体の 2 F-2 OH 5 N は以下の方法で作製した。5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 2 OH 5 N (図 3) (2.5 pmol) とテンプレートとなる核酸鎖 t m r 2 7 (図 3) (5 pmol) とを 20 mM リン酸ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム (pH 8) を含む溶液 (総量 12.5 μ L) に溶解させた。反応液を 90°C で 1 分加熱し氷冷して 3 分間放置した (反応液 1)。D N F B 修飾を含む核酸鎖 2 F p s-D N F B (2.5 pmol) を 20 mM リン酸ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム (pH 8) を含む溶液 (総量 12.5 μ L) に溶解し、反応液 1 に加え、総量 25 μ L で 27°C、10、30、60、及び 120 分間反応を行った後、5 μ L を loading buffer (80%ホルムアミド、10 mM EDTA) 5 μ L と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、15%アクリルアミド、25%ホルムアミド、5.6 M 尿素、1x TBE を含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、上記 2 Me-2 OH 5 N (実

施例5)と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。より具体的には、図6Aに示すように、実施例5の連結体は、原料である蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5Nの核酸鎖よりも遅れて移動することが確認された。

[0158] (RNAの連結体(2F-2F5N))(実施例6)の作製)

連結体の2F-2F5N(実施例6、図3)は以下の方法で作製した。5'アミノ修飾を含み含蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5N(図3)(2.5 pmol)とテンプレートとなる核酸鎖tmr27(図3)(5 pmol)とを20 mMリン酸ナトリウム、10 mM塩化マグネシウム(pH8)を含む溶液(総量12.5 μL)に溶解させた。反応液を90℃で1分加熱し氷冷して3分間放置した(反応液1)。DNFB修飾を含む核酸鎖2Fps-DNFB(25 pmol)を20 mMリン酸ナトリウム、10 mM塩化マグネシウム(pH8)を含む溶液(総量12.5 μL)に溶解し、反応液1に加え、総量25 μLで27℃、10、30、60、及び120分間反応を行った後、5 μLをloading buffer(80%ホルムアミド、10 mM EDTA)5 μLと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、15%アクリルアミド、25%ホルムアミド、5.6 M 尿素、1×TBEを含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、上記2Me-2OH5N(実施例3)と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。より具体的には、図6Aに示すように、実施例6の連結体は、原料である蛍光分子で修飾された核酸鎖2F5Nの核酸鎖よりも遅れて移動することが確認された。また図6Bに示すように、反応時間の経過に伴い、観察される連結体の量は増加し、いずれの時間においても上記2F-2OH5Nよりも高い反応収量を示したことから、2F5NはDNFB修飾核酸との連結反応において2OH5Nよりも有効であることを確認した。

[0159] (DNAテンプレートを利用したRNAの連結体(実施例7)の作製)

上記2Me-2OH5N、2M-2F5N、2F-2OH5N、2F-2F5NをRNAテンプレートtmr27の代わりに、DNAテンプレートtmd27を添加して同様に作製した。図8に示すように、RNAテンプレート

と同様に 2Me-2OH5N と比較して 2Me-2F5N は高い反応収量を示し、また、2F-2OH5N と比較して 2F-2F5N は高い反応収量を示したことから、2F5N はDNFB 修飾核酸との連結反応において 2OH5N よりも有効であることを確認した。

[0160] (活性化剤(DNFB)を利用したRNAの連結体(2Me-2OH5N) (実施例8)の作製)

DNFBを利用して連結体の2Me-2OH5N(実施例8、図3)を以下の方法で作製した。3'-ホスホロチオエート修飾を含む核酸鎖2Meps(図3)(50pmol)、5'アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5N(図3)(10pmol)とテンプレートとなる核酸鎖tmr27(20pmol)とを50mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウム(pH8)を含む溶液(総量18μL)に溶解させた。反応液を90℃で1分加熱し氷冷して3分間放置した(反応液1)。100mM DNFBを含むDMSO溶液を2μL反応液1に加え、総量20μLで27℃、6、及び24時間反応を行った後、3μLをloading buffer(80%ホルムアミド、10mM EDTA)12μLと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、15%アクリルアミド、25%ホルムアミド、5.6M 尿素、1×TBEを含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、上記2Me-2OH5N(実施例3)と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。より具体的には、図9Aに示すように、反応時間の経過に伴い観察される連結体の反応量は増加した。

[0161] (活性化剤(DNFB)を利用したRNAの連結体(2Me-2F5N) (実施例9)の作製)

DNFBを利用して連結体の2Me-2F5N(実施例9、図3)を以下の方法で作製した。3'-ホスホロチオエート修飾を含む核酸鎖2Meps(図3)(50pmol)、5'アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖2F5N(図3)(10pmol)とテンプレートとなる核酸鎖tmr27(20pmol)とを50mMリン酸ナトリウム、100mM塩化

ナトリウム (pH 8) を含む溶液 (総量 18 μ L) に溶解させた。反応液を 90°C で 1 分加熱し氷冷して 3 分間放置した (反応液 1)。100 mM DNFB を含む DMSO 溶液を 2 μ L 反応液 1 に加え、総量 20 μ L で 27°C、6、及び 24 時間反応を行った後、3 μ L を loading buffer (80%ホルムアミド、10 mM EDTA) 12 μ L と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、15%アクリルアミド、25%ホルムアミド、5.6 M 尿素、1×TBE を含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、上記 2Me-2OH5N (実施例 3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。より具体的には、図 9A に示すように、反応時間の経過に伴い観察される連結体の反応量は増加した。

[0162] (DNA テンプレート及び活性化剤 (DNFB) を利用した RNA の連結体 (実施例 10) の作製)

DNFB を活性化剤として利用して、上記 2Me-2OH5N、および 2Me-2F5N を、DNA テンプレート tmd27 を用いて同様に作製した。図 9B に示すように、RNA テンプレートと同様に 2Me-2OH5N と比較して 2Me-2F5N は高い反応収量を示し、また、2F-2OH5N と比較して 2F-2F5N は高い反応収量を示したことから、2F5N は DNFB を用いた連結反応において 2OH5N よりも有効であることを確認した。

[0163] (活性化剤 (DNFB) を利用した RNA の連結体 (2Me-2OH5N__C) (実施例 11) の作製)

DNFB を利用して連結体の 2Me-2OH5N__C (実施例 11、図 3) を以下の方法で作製した。3'-ホスホロチオエート修飾を含む核酸鎖 2Meps (図 3) (50 pmol)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 2OH5N__C (図 3) (10 pmol) とテンプレートとなる核酸鎖 tmr27-11 (図 3) (20 pmol) とを 50 mM リン酸ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム (pH 8) を含む溶液 (総量 18 μ L) に溶解させた。反応液を 90°C で 1 分加熱し氷冷して 3 分間放置した (反応液 1)。100 mM DNFB を含む DMSO 溶液を 2 μ L 反応液 1 に加

え、総量 $20\mu\text{L}$ で 27°C 、6時間反応を行った後、 $3\mu\text{L}$ を loading buffer (80%ホルムアミド、10mM EDTA) $12\mu\text{L}$ と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、15%アクリルアミド、25%ホルムアミド、5.6M 尿素、1xTBEを含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、上記 2Me-2OH5N (実施例3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。

[0164] (活性化剤 (DNFB) を利用したRNAの連結体 (2Me-2F5N__C) (実施例12) の作製)

DNFBを利用して連結体の2Me-2F5N__C (実施例12、図3) を以下の方法で作製した。3'-ホスホロチオエート修飾を含む核酸鎖 2Meps (図3) (50pmol)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 2F5N__C (図3) (10pmol) とテンプレートとなる核酸鎖 tmr27-11 (20pmol) とを50mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウム (pH8) を含む溶液 (総量 $18\mu\text{L}$) に溶解させた。反応液を 90°C で1分加熱し氷冷して3分間放置した (反応液1)。100mM DNFBを含むDMSO溶液を $2\mu\text{L}$ 反応液1に加え、総量 $20\mu\text{L}$ で 27°C 、6時間反応を行った後、 $3\mu\text{L}$ を loading buffer (80%ホルムアミド、10mM EDTA) $12\mu\text{L}$ と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、15%アクリルアミド、25%ホルムアミド、5.6M 尿素、1xTBEを含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、上記 2Me-2OH5N (実施例3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。

[0165] (DNAテンプレート及び活性化剤 (DNFB) を利用したRNAの連結体 (実施例13) の作製)

DNFBを活性化剤として利用して、上記 2Me-2OH5N__C、および 2Me-2F5N__Cを、DNAテンプレート tmd27-11を用いて同様に作製した。図14に示すように、RNAテンプレートと同様に 2Me-2OH5N__Cと比較して 2Me-2F5N__Cは高い反応収量を示したこ

とから、2 F 5 N__CはDNFBを用いた連結反応において2 O H 5 N__Cよりも有効であることを確認した。

[0166] (5' oligoとテンプレートDNA及びRNAのT_m測定)

3' -ホスホロチオエート修飾を含む核酸鎖2 M e p sおよび2 F p s (図3)、についてテンプレート核酸との融解曲線を測定した。標的となる核酸として、DNAのt m r 2 7 (図3) 及びRNAのt m d 2 7 (図3) を選択した。

[0167] (3' oligoとテンプレートDNA及びRNAのT_m測定)

5' アミノ修飾を含む核酸鎖2 O H 5 N、および2 F 5 Nについて、テンプレート核酸との融解曲線を測定した。標的となる核酸として、DNAのt m r 2 7 (図3) 及びRNAのt m d 2 7 (図3) を選択した。

[0168] 表1に示すように、3' -ホスホロチオエート修飾を含む核酸鎖2 F p sでは、RNAテンプレートおよびDNAテンプレートどちらにおいても2 M e p sに比して、高いT_m値をしめした。また、5' アミノ修飾を含む2 F 5 Nでは、RNAテンプレートおよびDNAテンプレートどちらにおいても2 O H 5 Nに比して高いT_m値をしめした。

表1. 5' -oligo、または3' -oligoのテンプレート核酸とのT_m解析

[表1]

テンプレート核酸	5' oligo または 3' oligo	T _m (°C)
t m r 2 7	2 M e p s	49.27
	2 F p s	53.06
	2 O H 5 N	42.28
	2 F 5 N	44.99
t m d 2 7	2 M e p s	44.18
	2 F p s	45.27
	2 O H 5 N	24.95
	2 F 5 N	29.52

[0169] (カルボジイミド系の活性化剤(EDC)を利用したRNAの連結体(2

Me-2OH5N) (実施例14) の作製)

EDCを利用して連結体の2Me-2OH5N (実施例14、図3) を以下の方法で作製した。核酸鎖2Mepo (図3) (20 pmol)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5N (図3) (20 pmol) とテンプレートとなる核酸鎖tmr12 (図3) (20 pmol) とを250 mM HEPES、1 M塩化ナトリウム (pH 7.3) を含む溶液 (総量18 μ L) に溶解させた。反応液を90°Cで1分加熱し氷冷して3分間放置した (反応液1)。6 M EDC、HClを含む溶液を2 μ L反応液1に加え、総量20 μ Lで27°C、60分間反応を行った後、3 μ Lをloading buffer (80%ホルムアミド、10 mM EDTA) 12 μ Lと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、15%アクリルアミド、25%ホルムアミド、5.6 M 尿素、1x TBEを含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、蛍光イメージングを用いて分析した。より具体的には、実施例14の連結体は、原料である蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5Nの核酸鎖よりも遅れて移動することが確認された。ゲルの分析は電気泳動後にTyphoon FLA9000 (GE Health.) によって解析した。

[0170] (カルボジイミド系の活性化剤 (EDC) を利用したRNAの連結体 (2Me-2F5N) (実施例15) の作製)

EDCを利用して連結体の2Me-2F5N (実施例15、図3) を以下の方法で作製した。核酸鎖2Mepo (図3) (20 pmol)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖2F5N (図3) (20 pmol) とテンプレートとなる核酸鎖tmr12 (図3) (20 pmol) とを250 mM HEPES、1 M塩化ナトリウム (pH 7.3) を含む溶液 (総量18 μ L) に溶解させた。反応液を90°Cで1分加熱し氷冷して3分間放置した (反応液1)。6 M EDC、HClを含む溶液を2 μ L反応液1に加え、総量20 μ Lで27°C、60分間反応を行った後、3 μ Lをloading buffer (80%ホルムアミド、10 mM EDTA) 12

μL と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、上記 $2\text{Me}-2\text{OH}5\text{N}$ (実施例3)と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。図10Aに示すように、 $2\text{Me}-2\text{OH}5\text{N}$ と比較して $2\text{Me}-2\text{F}5\text{N}$ は高い反応収量を示したことから、 $2\text{F}5\text{N}$ はカルボジイミドを用いた核酸鎖 2Me po との連結反応でも $2\text{OH}5\text{N}$ よりも有効であることを確認した。

[0171] (カルボジイミド系の活性化剤(EDC)を利用したRNAの連結体($2\text{F}-2\text{OH}5\text{N}$)(実施例16)の作製)

EDCを利用して連結体の $2\text{F}-2\text{OH}5\text{N}$ (実施例16、図3)を以下の方法で作製した。核酸鎖 2F po (図3)(20 pmol)、5'アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 $2\text{OH}5\text{N}$ (図3)(20 pmol)とテンプレートとなる核酸鎖 $\text{tmr}12$ (図3)(20 pmol)とを 250 mM HEPES、 1 M 塩化ナトリウム($\text{pH}7.3$)を含む溶液(総量 $18\text{ }\mu\text{L}$)に溶解させた。反応液を 90°C で1分加熱し氷冷して3分間放置した(反応液1)。 6 M EDC、 HCl を含む溶液を $2\text{ }\mu\text{L}$ 反応液1に加え、総量 $20\text{ }\mu\text{L}$ で 27°C 、60分間反応を行った後、 $3\text{ }\mu\text{L}$ をloading buffer(80%ホルムアミド、 10 mM EDTA) $12\text{ }\mu\text{L}$ と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、その後、上記 $2\text{Me}-2\text{OH}5\text{N}$ (実施例3)と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。

[0172] (カルボジイミド系の活性化剤(EDC)を利用したRNAの連結体($2\text{F}-2\text{F}5\text{N}$)(実施例17)の作製)

EDCを利用して連結体の $2\text{F}-2\text{F}5\text{N}$ (実施例17、図3)を以下の方法で作製した。核酸鎖 2F po (図3)(20 pmol)、5'アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 $2\text{F}5\text{N}$ (図3)(20 pmol)とテンプレートとなる核酸鎖 $\text{tmr}12$ (図3)(20 pmol)とを 250 mM HEPES、 1 M 塩化ナトリウム($\text{pH}7.3$)を含む溶液(総量 $18\text{ }\mu\text{L}$)に溶解させた。反応液を 90°C で1分加熱し氷冷して3分間放置した(反応液1)。 6 M EDC、 HCl を含む溶液を $2\text{ }\mu\text{L}$ 反応液1に加え、総量 $20\text{ }\mu\text{L}$ で 27°C 、60分間反応を行った後、 $3\text{ }\mu\text{L}$ をloading

g b u f f e r (80%ホルムアミド、10mM EDTA) 12 μ Lと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、上記 2Me-2OH5N (実施例3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。図10Aに示すように、2F-2OH5Nと比較して2F-2F5Nは高い反応収量を示したことから、2F5Nはカルボジイミドを用いた核酸鎖 2Fpoとの連結反応でも2OH5Nよりも有効であることを確認した。

[0173] (カルボジイミド系の活性化剤(EDC)を利用したRNAの連結体(2H-2OH5N) (実施例18) の作製)

EDCを利用して連結体の2H-2OH5N (実施例18、図3) を以下の方法で作製した。核酸鎖 2Hpo (図3) (20pmol)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 2OH5N (図3) (20pmol) とテンプレートとなる核酸鎖 tmr12 (図3) (20pmol) とを250mM HEPES、1M塩化ナトリウム(pH7.3)を含む溶液(総量18 μ L)に溶解させた。反応液を90℃で1分加熱し氷冷して3分間放置した(反応液1)。6M EDC、HClを含む溶液を2 μ L反応液1に加え、総量20 μ Lで27℃、60分間反応を行った後、3 μ Lをloading buffer (80%ホルムアミド、10mM EDTA) 12 μ Lと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、その後、上記 2Me-2OH5N (実施例3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。

[0174] (カルボジイミド系の活性化剤(EDC)を利用したRNAの連結体(2H-2F5N) (実施例19) の作製)

EDCを利用して連結体の2H-2F5N (実施例19、図3) を以下の方法で作製した。核酸鎖 2Hpo (図3) (20pmol)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 2F5N (図3) (20pmol) とテンプレートとなる核酸鎖 tmr12 (図3) (20pmol) とを250mM HEPES、1M塩化ナトリウム(pH7.3)を含む溶液(総量18 μ L)に溶解させた。反応液を90℃で1分加熱し氷冷して3分間放置した(反応液1)。6M EDC、HClを含む溶液を2 μ L反応液1に加え

、総量 $20\ \mu\text{L}$ で 27°C 、 60 分間反応を行った後、 $3\ \mu\text{L}$ を *loading buffer* (80% ホルムアミド、 $10\ \text{mM}$ EDTA) $12\ \mu\text{L}$ と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、上記 $2\text{Me}-2\text{OH}5\text{N}$ (実施例 3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。図 10A に示すように、 $2\text{H}-2\text{OH}5\text{N}$ と比較して $2\text{H}-2\text{F}5\text{N}$ は高い反応収量を示したことから、 $2\text{F}5\text{N}$ はカルボジイミドを用いた核酸鎖 $2\text{Hp}o$ との連結反応でも $2\text{OH}5\text{N}$ よりも有効であることを確認した。

[0175] (カルボジイミド系の活性化剤 (EDC) を利用した RNA の連結体 ($2\text{Me}-2\text{OH}5\text{N}$) (実施例 20) の作製)

カルボジイミド系の活性化剤 (EDC) を利用して連結体の $2\text{Me}-2\text{OH}5\text{N}$ (実施例 20、図 3) を以下の方法で作製した。核酸鎖 $2\text{Me}po$ (図 3) ($500\ \text{pmol}$)、 $5'$ アミノ修飾を含む核酸鎖 $2\text{OH}5\text{N}$ (図 3) ($500\ \text{pmol}$) とテンプレートとなる核酸鎖 $tmr12$ (図 3) ($500\ \text{pmol}$) とを $250\ \text{mM}$ HEPES、 $1\ \text{M}$ 塩化ナトリウム ($\text{pH} 7.3$) を含む溶液 (総量 $90\ \mu\text{L}$) に溶解させた。反応液を 90°C で 1 分加熱し氷冷して 3 分間放置した (反応液 1)。 $6\ \text{M}$ EDC、 HCl を含む溶液を $10\ \mu\text{L}$ 反応液 1 に加え、総量 $100\ \mu\text{L}$ で 17°C 、 6 時間反応を行った後、ゲルろ過カラム (GE Healthcare、NAP-5) を行って粗精製した。その後、逆相カラムを用いた HPLC を用いて精製し、 $2\text{Me}-2\text{OH}5\text{N}$ を得た。精製には下記の溶液を用いた。

A 溶液: 5% アセトニトリル / $0.1\ \text{M}$ TEAA ($\text{pH} 7.0$)

B 溶液: 25% アセトニトリル / $0.1\ \text{M}$ TEAA ($\text{pH} 7.0$)

より具体的には図 10V に示すように、実施例 20 の RNA の連結体 $2\text{Me}-2\text{OH}5\text{N}$ は、原料である $2\text{Me}po$ および $2\text{OH}5\text{N}$ よりも遅れてピークが観察されることが確認された。

[0176] (カルボジイミド系の活性化剤 (EDC) を利用した RNA の連結体 ($2\text{Me}-2\text{F}5\text{N}$) (実施例 21) の作製)

カルボジイミド系の活性化剤 (EDC) を利用して連結体の $2\text{Me}-2\text{F}$

5 N（実施例 2 1、図 3）を上記 2 M e－2 O H 5 Nと同様の方法で作製した。より具体的には図 1 0 Cに示すように、実施例 2 1のRNAの連結体 2 M e－2 F 5 Nは、原料である 2 M e p oおよび 2 F 5 Nよりも遅れてピークが観察されることが確認された。

[0177] （カルボジイミド系の活性化剤（E D C）を利用したRNAの連結体（2 M e－2 O H 5 N_C）（実施例 2 2）の作製）

E D Cを利用して連結体の 2 M e－2 O H 5 N_C（実施例 2 2、図 3）を以下の方法で作製した。核酸鎖 2 M e p o（図 3）（3 p m o l）、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 2 O H 5 N_C（図 3）（3 p m o l）とテンプレートとなる核酸鎖 t m d 2 7－l l（図 3）（3 p m o l）とを 5 0 m M H E P E S、1 0 m M塩化ナトリウム（p H 7. 3）を含む溶液（総量 2 7 μ L）に溶解させた。反応液を 9 0℃で 1 分加熱し氷冷して 3 分間放置した（反応液 1）。6 M E D C、H C lを含む溶液を 3 μ L 反応液 1に加え、総量 3 0 μ Lで 3 7℃、3 0 分間反応を行った後、5 μ Lを l o a d i n g b u f f e r（8 0%ホルムアミド、1 0 m M E D T A）1 5 μ Lと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、1 5%アクリルアミド、2 5%ホルムアミド、5. 6 M 尿素、1 x T B Eを含むポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動し、蛍光イメージングを用いて分析した。より具体的には、実施例 2 2の連結体は、原料である蛍光分子で修飾された核酸鎖 2 O H 5 N_Cの核酸鎖よりも遅れて移動することが確認された。ゲルの分析は電気泳動後に T y p h o o n F L A 9 0 0 0（G E H e a l t h.）によって解析した。

[0178] （カルボジイミド系の活性化剤（E D C）を利用したRNAの連結体（2 M e－2 F 5 N_C）（実施例 2 3）の作製）

E D Cを利用して連結体の 2 M e－2 F 5 N_C（実施例 2 3、図 3）を以下の方法で作製した。核酸鎖 2 M e p o（図 3）（3 p m o l）、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 2 O H 5 N_C（図 3）（3 p m o l）とテンプレートとなる核酸鎖 t m d 2 7－l l（図 3）（3 p m o l）

とを50 mM HEPES、10 mM塩化ナトリウム (pH 7.3) を含む溶液 (総量27 μ L) に溶解させた。反応液を90°Cで1分加熱し氷冷して3分間放置した (反応液1)。6 M EDC, HClを含む溶液を3 μ L反応液1に加え、総量30 μ Lで37°C、30分間反応を行った後、5 μ Lをloading buffer (80%ホルムアミド、10 mM EDTA) 15 μ Lと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、上記2Me-2OH5N (実施例3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。図15に示すように、2Me-2OH5N_Cと比較して2Me-2F5N_Cは高い反応収量を示したことから、2F5N_Cはカルボジイミドを用いた核酸鎖2Mepoとの連結反応でも2OH5N_Cよりも有効であることを確認した。

[0179] (カルボジイミド系の活性化剤 (EDC) を利用したRNAの連結体 (2F-2OH5N_C) (実施例24) の作製)

EDCを利用して連結体の2F-2OH5N_C (実施例24、図3) を以下の方法で作製した。核酸鎖2Fpo (図3) (3 pmol)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5N_C (図3) (3 pmol) とテンプレートとなる核酸鎖tmd27-11 (図3) (3 pmol) とを50 mM HEPES、10 mM塩化ナトリウム (pH 7.3) を含む溶液 (総量27 μ L) に溶解させた。反応液を90°Cで1分加熱し氷冷して3分間放置した (反応液1)。6 M EDC, HClを含む溶液を3 μ L反応液1に加え、総量30 μ Lで37°C、30分間反応を行った後、5 μ Lをloading buffer (80%ホルムアミド、10 mM EDTA) 15 μ Lと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、その後、上記2Me-2OH5N (実施例3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。

[0180] (カルボジイミド系の活性化剤 (EDC) を利用したRNAの連結体 (2F-2F5N_C) (実施例25) の作製)

EDCを利用して連結体の2F-2F5N_C (実施例25、図3) を

以下の方法で作製した。核酸鎖 2 F p o (図 3) (3 p m o l)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 2 O H 5 N _ C (図 3) (3 p m o l) とテンプレートとなる核酸鎖 t m d 2 7 - l l (図 3) (3 p m o l) とを 5 0 m M H E P E S、1 0 m M 塩化ナトリウム (p H 7. 3) を含む溶液 (総量 2 7 μ L) に溶解させた。反応液を 9 0 ° C で 1 分加熱し氷冷して 3 分間放置した (反応液 1)。6 M E D C、H C l を含む溶液を 3 μ L 反応液 1 に加え、総量 3 0 μ L で 3 7 ° C、3 0 分間反応を行った後、5 μ L を l o a d i n g b u f f e r (8 0 % ホルムアミド、1 0 m M E D T A) 1 5 μ L と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、その後、上記 2 M e - 2 O H 5 N (実施例 3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。図 1 5 に示すように、2 F - 2 O H 5 N _ C と比較して 2 F - 2 F 5 N _ C は高い反応収量を示したことから、2 F 5 N _ C はカルボジイミドを用いた核酸鎖 2 F p o との連結反応でも 2 O H 5 N _ C よりも有効であることを確認した。

[0181] (カルボジイミド系の活性化剤 (E D C) を利用した R N A の連結体 (2 H - 2 O H 5 N _ C) (実施例 2 6) の作製)

E D C を利用して連結体の 2 H - 2 O H 5 N _ C (実施例 2 6、図 3) を以下の方法で作製した。核酸鎖 2 H p o (図 3) (3 p m o l)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖 2 O H 5 N _ C (図 3) (3 p m o l) とテンプレートとなる核酸鎖 t m d 2 7 - l l (図 3) (3 p m o l) とを 5 0 m M H E P E S、1 0 m M 塩化ナトリウム (p H 7. 3) を含む溶液 (総量 2 7 μ L) に溶解させた。反応液を 9 0 ° C で 1 分加熱し氷冷して 3 分間放置した (反応液 1)。6 M E D C、H C l を含む溶液を 3 μ L 反応液 1 に加え、総量 3 0 μ L で 3 7 ° C、3 0 分間反応を行った後、5 μ L を l o a d i n g b u f f e r (8 0 % ホルムアミド、1 0 m M E D T A) 1 5 μ L と混合して連結体を含む溶液を得た。その後、その後、上記 2 M e - 2 O H 5 N (実施例 3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。

[0182] (カルボジイミド系の活性化剤 (EDC) を利用したRNAの連結体 (2F-2F5N_C) (実施例27) の作製)

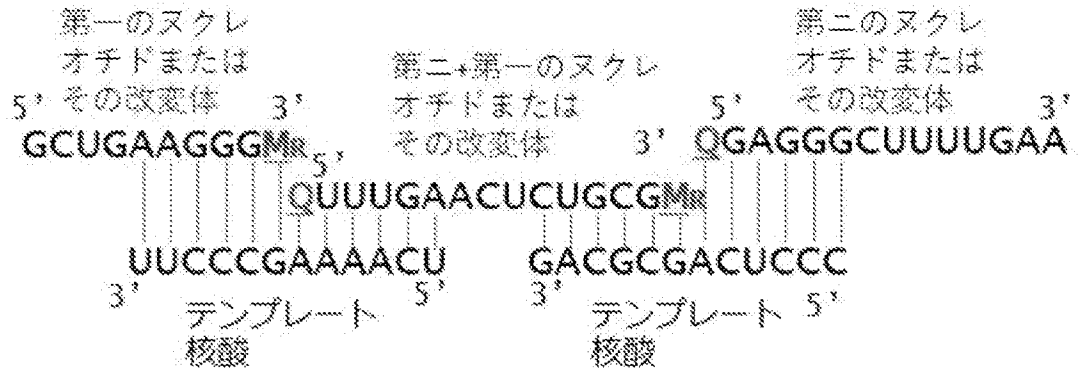
EDCを利用して連結体の2F-2F5N_C (実施例27、図3) を以下の方法で作製した。核酸鎖2HpO (図3) (3 pmol)、5' アミノ修飾を含み蛍光分子で修飾された核酸鎖2OH5N_C (図3) (3 pmol) とテンプレートとなる核酸鎖tmd27-11 (図3) (3 pmol) とを50 mM HEPES、10 mM塩化ナトリウム (pH 7.3) を含む溶液 (総量27 μ L) に溶解させた。反応液を90°Cで1分加熱し氷冷して3分間放置した (反応液1)。6 M EDC、HClを含む溶液を3 μ L反応液1に加え、総量30 μ Lで37°C、30分間反応を行った後、5 μ Lをloading buffer (80%ホルムアミド、10 mM EDTA) 15 μ Lと混合して連結体を含む溶液を得た。その後、その後、上記2Me-2OH5N (実施例3) と同様の方法で蛍光イメージングを用いて解析した。図15に示すように、2H-2OH5N_Cと比較して2H-2F5N_Cは高い反応収量を示したことから、2F5N_Cはカルボジイミドを用いた核酸鎖2HpOとの連結反応でも2OH5N_Cよりも有効であることを確認した。

[0183] (実施例28)

3' 位がリン酸基修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体 (第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体) の5' 末端と、5' 位にアミノ修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体 (第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体) の3' 末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数と、3' 位がリン酸基修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体 (第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体) と、5' 位にアミノ修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体 (第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体) とを、活性化剤の存在下で反応させて、2か所以上同時にまたは段階的に連結し、複数のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体を作製する

。

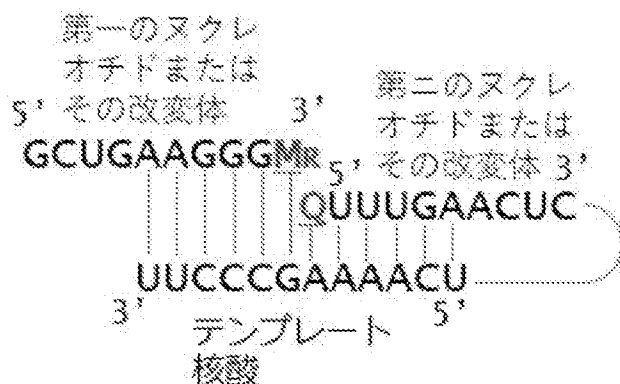
[化10]



[0184] (実施例 29)

テンプレート核酸が5' 位にアミノ修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体（第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体）の3' 末端に連結しているオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、3' 位がリン酸基修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体（第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体）を、活性化剤の存在下で反応させて、連結されたオリゴヌクレオチドまたはその改変体を作製する。

[化11]

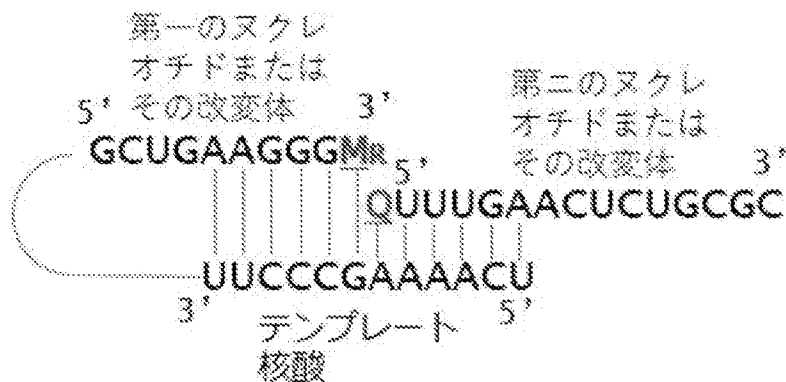


[0185] (実施例 30)

テンプレート核酸が、3' 位がリン酸基修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体（第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体）の5' 末端に連結しているオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、5' 位にアミ

ノ修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体（第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体）とを、活性化剤の存在下で反応させて、連結されたオリゴヌクレオチドまたはその改変体を作製する。

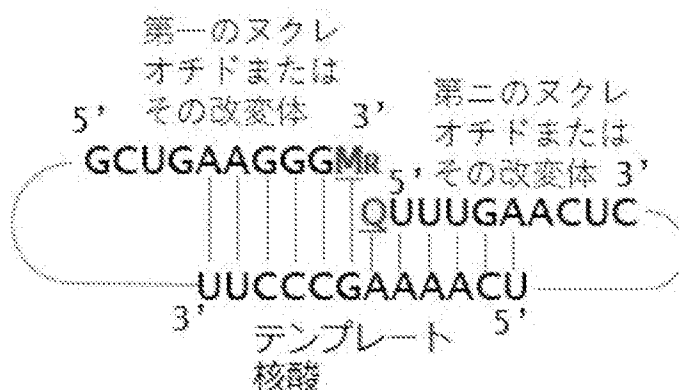
[化12]



[0186] (実施例 3 1)

テンプレート核酸の両端が、3' 位がリン酸基修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体（第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体）の5' 末端に連結し、5' 位にアミノ修飾されているオリゴヌクレオチドまたはその改変体（第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体）の3' 末端に連結している、オリゴヌクレオチドまたはその改変体を、活性化剤の存在下で反応させて、オリゴヌクレオチドまたはその改変体の3' 末端と5' 末端とが連結した環状オリゴヌクレオチドまたはその改変体を作製する。

[化13]



[0187] (実施例 3 2 : 製剤例)

本開示の化合物は、適宜の剤形にて提供され得る。以下にその例を示す。

錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤、懸濁剤、注射剤、貼付剤、パップ剤等が挙げられる。また、これらの製剤は、通常の医薬品添加物として使用されている添加剤を用いて、これらを適宜混合などを行うことを含む公知の方法で製造することができる。

[0188] (実施例 3 3 : 動物実験)

疾患を有するマウス（例えば、担癌マウス）を用い、本開示のオリゴヌクレオチドまたは偽薬を腹腔内に投与する。

その後、偽薬とオリゴヌクレオチドとの比較を行い、本開示のオリゴヌクレオチドのマウス体内における疾患に対する有効性を評価することができる。

[0189] (実施例 3 4)

T. Seya et al. Advanced Drug Delivery Reviews 147 2019 37-43 に掲載されているような比較的長めの 2 本鎖を、テンプレートの DNA を用いずに、お互いの鎖がテンプレートになるように作製することも想定され得る（図 1 1）。実施例 3 と同様の方法で、第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を用いて、活性化剤の存在下で反応させて、連結されたオリゴヌクレオチドまたはその改変体を作製する。

[0190] (注記)

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

[0191] 本開示で提供される技術は、オリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結

させる技術を利用するあらゆる分野において利用することができる。

配列表フリーテキスト

[0192] 配列番号 1 : RNA template (tmr27)

配列番号 2 : DNA template (tmd27)

配列番号 3 : RNA template (tmr12)

配列番号 4 : 第一のオリゴヌクレオチド : 5' oligo (cytidine)

配列番号 5 : 第一のオリゴヌクレオチド : 5' oligo (2' 0-methyl-cytidine)

配列番号 6 : 第二のオリゴヌクレオチド : 3' oligo (2' H- Uridine)

配列番号 7 : 第一のオリゴヌクレオチド+テンプレート核酸、tmr12+5' oligo (cytidine)

配列番号 8 : テンプレート核酸+第一のオリゴヌクレオチド、tmr12+5' oligo (2' 0-methyl-cytidine)

配列番号 9 : 第二のオリゴヌクレオチド+テンプレート核酸、3' oligo (2' H-Uridine) +tmr12

配列番号 10 : 第二のオリゴヌクレオチド+テンプレート核酸+第一のオリゴヌクレオチド : 3' oligo (2' H-Uridine) +tmr12+5' oligo (cytidine)

配列番号 11 : 第二のオリゴヌクレオチド+第一のオリゴヌクレオチド : 3' oligo (2' H-Uridine) +5' oligo (2' 0-methyl-cytidine)

配列番号 12 : RNA template(実施例28)

配列番号 13 : 第二のオリゴヌクレオチド+第一のオリゴヌクレオチド、3' oligo (2' H-Uridine) +5' oligo (cytidine) (実施例28)

配列番号 14 : 第二のオリゴヌクレオチド+第一のオリゴヌクレオチド、3' oligo (2' H-Uridine) +5' oligo (2' 0-methyl-cytidine) (実施例28)

配列番号 15 : 第二のオリゴヌクレオチド、3' oligo (2' H-Uridine) (実施例28)

配列番号 16 : RNA template (tmr27-II)

配列番号 17 : DNA template (tmd27-II)

請求の範囲

- [請求項1] 第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とを連結させる方法であって、
該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とを、連結が生じる条件下に配置する工程を含み、
該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と、該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端において連結が生じ、第二のオリゴヌクレオチドの5'末端側の末端モノマー部分が少なくとも一つの改変を含む、
方法。
- [請求項2] 前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端は、リン酸基またはチオリン酸基を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、置換されていてもよいアミノ基を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の5'位に置換されていてもよいアミノ基を含む、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の5'位に置換されていないアミノ基を含む、請求項3および4に記載の方法。
- [請求項6] 前記アミノ基が、 C_{1-6} アルキル基によって置換されている、請求項3および4に記載の方法。
- [請求項7] 前記アミノ基がメチル基またはエチル基によって置換されている、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の2'位がハロまたは-OHで置換されている、請求項1に記載の方法。

- [請求項9] 前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の2'位がハロで置換されている、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の2'位がフルオロ基で置換されている、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の2'位が水素基または置換されていてもよいアルコキシ基で置換されている、請求項1に記載の方法。
- [請求項12] 前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の2'位が置換されていてもよいアルコキシで置換されている、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体は、その末端モノマー部分の2'位がメトキシで置換されている、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] 前記末端モノマー部分の2'位が上向きで置換されている、請求項8から13に記載の方法。
- [請求項15] 前記末端モノマー部分の2'位が下向きで置換されている、請求項8から13に記載の方法。
- [請求項16] 前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、リン酸基またはチオリン酸基を介して連結している、請求項1に記載の方法。
- [請求項17] 前記連結が生じる条件は、テンプレート核酸を用いることを包含する、請求項1に記載の方法。
- [請求項18] 前記テンプレート核酸が、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連続して相補的な配列および鎖長を有する、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 前記テンプレート核酸の鎖長が、10残基以上である、請求項18に記載の方法。

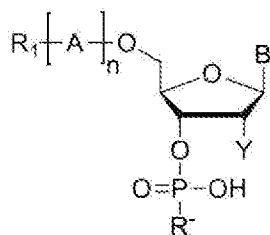
[請求項20] 前記テンプレート核酸の鎖長が、20～40残基である、請求項19に記載の方法。

[請求項21] 前記テンプレート核酸が、前記第一のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体および前記第二のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体とは連結していないか、または、いずれか一方のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体、もしくは両方のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体と連結している、請求項17～20に記載の方法。

[請求項22] 前記テンプレート核酸の配列は、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と相補的な配列、あるいは二本鎖の形成を妨げない範囲のミスマッチ塩基対を含む、請求項21に記載の方法。

[請求項23] 前記連結が生じる条件は、オリゴヌクレオチド連結反応の活性化剤の使用を包含する、請求項1に記載の方法。

[請求項24] 前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、下記式(1)
[化14]



(式中、R⁻はS⁻またはO⁻であり、Yは水素基またはアルコキシ基であり、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン(イノシン)、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2,6-ジアミノプリンであり、Aは、各出現において独立してスペーサー、核酸、または核酸誘導体であり、nは1以上の整数であり、R₁は5'-一位が水酸基で

ある核酸、または核酸誘導体である)

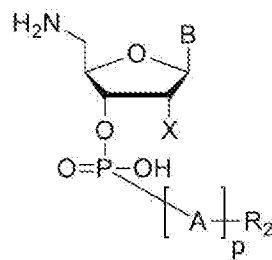
で示される化合物である、請求項 1 に記載の方法。

[請求項25] 前記 Y がメトキシ基である、請求項 24 に記載の方法。

[請求項26] n が 5 から 1000 の整数である、請求項 24 に記載の方法。

[請求項27] 前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、下記式 (11)

[化15]



(式中、Xは、ヒドロキシ基またはハロゲンであり、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン(イノシン)、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2,6-ジアミノプリンであり、Aは、各出現において独立してスペーサー、核酸、または核酸誘導体であり、pは1以上の整数であり、R₂は3'-位が水酸基、リン酸基またはチオリン酸基である核酸、または核酸誘導体である)

で示される化合物である、請求項 1 に記載の方法。

[請求項28] 前記 X がフルオロ基である、請求項 27 に記載の方法。

[請求項29] p が 5 から 1000 の整数である、請求項 27 に記載の方法。

[請求項30] 前記スペーサーが置換されていてもよい C₁₋₁₀アルキレンまたは PEG である、請求項 24 または 27 に記載の方法。

[請求項31] 前記スペーサーが C₃アルキレンである、請求項 30 に記載の方法

。

[請求項32] 前記活性化剤が、カルボジイミド系縮合剤、ホスホニウム系縮合剤、ウロニウム系縮合剤またはトリアジン系縮合剤である、請求項23に記載の方法。

[請求項33] 前記カルボジイミド系縮合剤が1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド(EDC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)またはジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)である、請求項32に記載の方法。

[請求項34] 前記ホスホニウム系縮合剤がブロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート(PyBroP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ピロリジン-1-イル)ホスホニウム・ヘキサフルオロホスファート(PyBOP)、6-トリフルオロメチル-1H-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(PyFOP)、1H-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスファート(BOP)または(7-アザ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(PyAOP)である、請求項32に記載の方法。

[請求項35] 前記ウロニウム系縮合剤が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)、O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム テトラフルオロほう酸塩(TSTU)または{ { [(1-シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチリデン)アミノ]オキシ} -4-モルホリノメチレン} ジメチルアンモニウム ヘキサフルオロホスファート(COMU)である、請求

項 3 2 に記載の方法。

[請求項36] 前記トリアジン系縮合剤がDMT-MMである、請求項 3 2 に記載の方法。

[請求項37] 前記活性化剤が、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン(DNFB)、または1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド(EDC)である、請求項 2 1 に記載の方法。

[請求項38] 前記活性化剤が、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド(EDC)と1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール(HOAt)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)またはN-ヒドロキシコハク酸イミド(HOSu)とを組み合わせ使用される、請求項 3 2 ~ 3 7 に記載の方法。

[請求項39] 前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数と、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とが、2か所以上同時にまたは段階的に連結される、請求項 1 に記載の方法。

[請求項40] 前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端および前記テンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結される、請求項 1 に記載の方法。

[請求項41] 前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端および前記テンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結される、請求項 1 に記載の方法。

[請求項42] 前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第一のオリゴヌクレオチド

またはその改変体の3'末端と、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端とが、連結される、請求項1に記載の方法。

[請求項43] R2の3'一位がリン酸基またはチオリン酸基である第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数、複数のテンプレート核酸をもちいて、環状に連結される、請求項27に記載の方法。

[請求項44] 前記テンプレート核酸が前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端および前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体において、該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結される、請求項1に記載の方法。

[請求項45] 請求項1に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体または請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を含む、それぞれ該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体または該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を用いて連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための組成物。

[請求項46] 請求項1に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体もしくは請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体、またはそれらの組み合わせを含む、テンプレート核酸を用いて連結オリゴヌクレオチドを製造するための組成物。

[請求項47] オリゴヌクレオチドまたはその改変体を連結するためのキットであって、
請求項1に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、
請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、
活性化剤と、
テンプレート核酸と
を含むキット。

- [請求項48] 請求項1に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体および
請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体
を含む、連結オリゴヌクレオチドを製造するための原料組成物。
- [請求項49] 前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体を製造するための
原料が、2'位にフルオロ基、5'位にアミノ基を有するヌクレオシ
ドを含む、請求項48に記載の原料組成物。
- [請求項50] 第一および／または第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の
原料（モノマーまたは置換基導入試薬等）を含む、
請求項1に記載の第一のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体、お
よび／または
請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドもしくはその改変体を製
造するための組成物。
- [請求項51] 前記第一および／または第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変
体の原料が、アミダイド体のまたはデオキシヌクレオシド、または3
'位が水酸基であるまたはデオキシヌクレオシドである、請求項50
に記載の組成物。
- [請求項52] A) 合成を所望する核酸配列の情報を得る工程、
B) A)の情報に基づき、合成したい配列の一部を複数合成する工程
であって、ここで、各配列は、請求項1に記載の特徴を有する、工程
、ならびに
C) 必要に応じて連結反応に必要な試薬の存在下で、連結条件に配置
する工程
を包含する、所望の核酸配列を有するオリゴヌクレオチドまたはその
改変体の製造方法。
- [請求項53] A) 合成を所望する核酸配列の情報を得る工程、
B) A)の情報に基づき、合成したい配列の一部を複数合成する工程
であって、ここで、各配列は、請求項1に記載の特徴を有する、工程

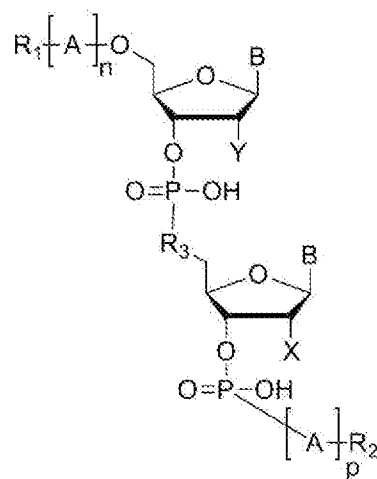
、ならびに

C) 必要に応じて連結反応に必要な試薬と、B) で合成された部分配列を含む核酸とをパッケージとする工程

を包含する、所望のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の製造キットの製造方法。

[請求項54] 以下の式

[化16]



(式中、Yは、水素基またはアルコキシ基であり、Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン(イノシン)、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2,6-ジアミノプリンであり、Xは、ヒドロキシ基、またはハロゲンであり、Aは、各出現において独立してスペーサー、核酸、または核酸誘導体であり、nは1以上の整数であり、pは1以上の整数であり、R₁は5'-一位が水酸基である核酸、もしくは核酸誘導体、またはR₁は2'-一位が水素基またはアルコキシ基であり、5'-一位がアミノ基である核酸、もしくは核酸誘導体であり、R₂は3'-一位が水酸基、リン酸基もしくはチオリン酸基である核酸、も

しくは核酸誘導体、または R_2 は2' 一位がヒドロキシ基、またはハロゲンであり、3' 一位がリン酸基もしくはチオリン酸基である核酸、もしくは核酸誘導体であるか、 R_1 および R_2 は、一緒になって単結合を形成してもよく、 R_1 および R_2 は、異なる化合物の R_1 および R_2 と結合してもよく、 R_3 が置換されていてもよいアミノ基である) で示される化合物。

[請求項55] 前記Yは、メトキシ基であり、前記Bは、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン（イノシン）、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、1-メチルアデニン、シュードウラシル、1-メチルシュードウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、6-チオアデニン、6-チオグアニン、4-チオウラシル、2-アミノプリン、または2, 6-ジアミノプリンであり、前記Xは、フルオロ基であり、 R_1 および R_2 は、一緒になって単結合を形成している、請求項54に記載の化合物。

[請求項56] n が5から1000の整数であり、 p が5から1000の整数である、請求項54に記載の化合物。

[請求項57] 前記 R_3 が、置換されていないアミノ基である、請求項54に記載の化合物。

[請求項58] 前記 R_3 が、 C_{1-6} アルキル基によって置換されたアミノ基である、請求項54に記載の化合物。

[請求項59] 前記 R_3 がメチル基またはエチル基によって置換されたアミノ基である、請求項58に記載の化合物。

[請求項60] 前記Bが、それぞれ独立してアデニン、シトシン、メチルシトシン、グアニン、チミン、またはウラシルである、請求項54に記載の化合物。

[請求項61] 前記 R_1 および前記 R_2 が、一緒になって単結合を形成している、請求項54に記載の化合物。

- [請求項62] 請求項1に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体の複数と、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体とが、連結されている、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体。
- [請求項63] 請求項1に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端および請求項1に記載のテンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結されている、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体。
- [請求項64] 請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端および請求項1に記載のテンプレート核酸が連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体が、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドまたはその改変体と連結されている、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体。
- [請求項65] 請求項1に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体と、前記第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と、第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端とが、連結されている、連結オリゴヌクレオチドまたはその改変体。
- [請求項66] 請求項1に記載のテンプレート核酸が請求項1に記載の第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端および請求項1に記載の第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端と連結したオリゴヌクレオチドまたはその改変体において、該第一のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の5'末端と該第二のオリゴヌクレオチドまたはその改変体の3'末端とが連結されている、連結オリゴヌクレオ

チドまたはその改変体。

[請求項67] 請求項 5 4 から 6 1 のいずれか一項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

[図1]

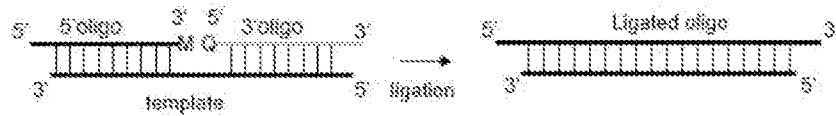


図 1

反応の概要。5'oligoの3'末端のMと3'oligoの5'末端のQを結合させ、2本のoligo鎖を連結する。OligoはRNA、DNAまたはその混合物、いずれでも良い

[図2]

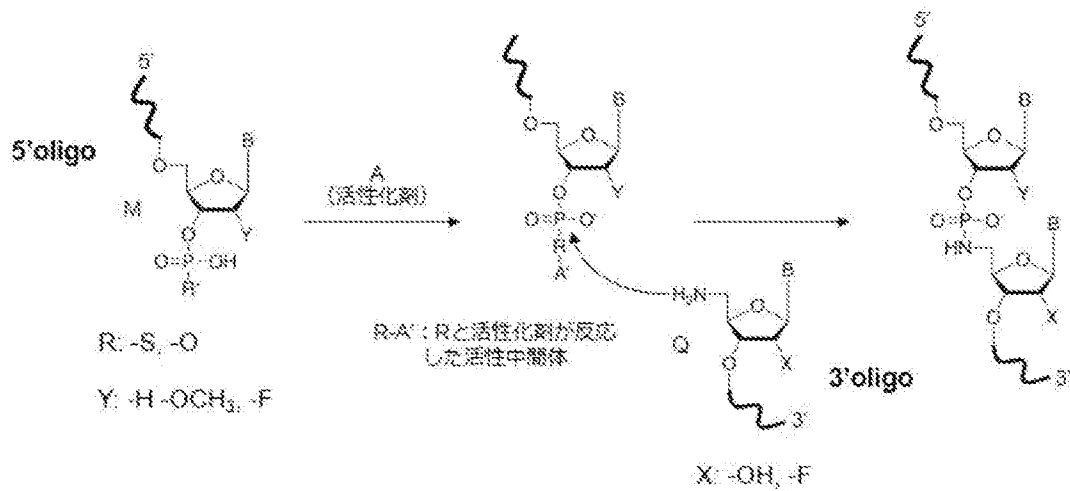
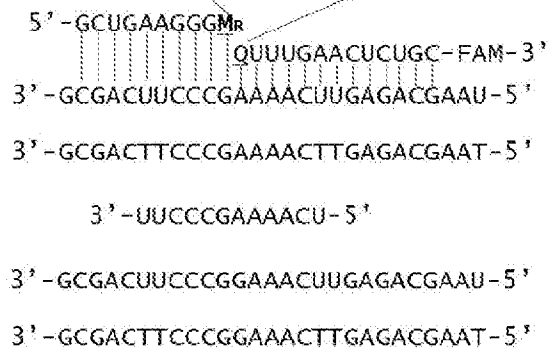


図2. ヌクレオチド連結反応の反応スキーム

[図3]

5'oligo			3'oligo	
M	R		Q	
2'F-cytidine	s	2Fps	2'F-5'-NH ₂ -uridine	2F5N
2'O-methyl-cytidine	s	2Meps	2'OH-5'-NH ₂ -uridine	2OH5N
2'F-cytidine	o	2Fpo	Uridine	2OH5OH
2'O-methyl-cytidine	o	2Mepo	2'F-5'-NH ₂ -Cytidine	2F5N_C
2'H-cytidine	o	2Hpo	2'OH-5'-NH ₂ -Cytidine	2OH5N_C

s: phosphorothioate
o: phosphate



RNA template (tmr27)

DNA template (tmd27)

RNA template (tmr12)

RNA template (tmr27-II)

DNA template (tmd27-II)

図3

反応に用いた配列。

[図4]

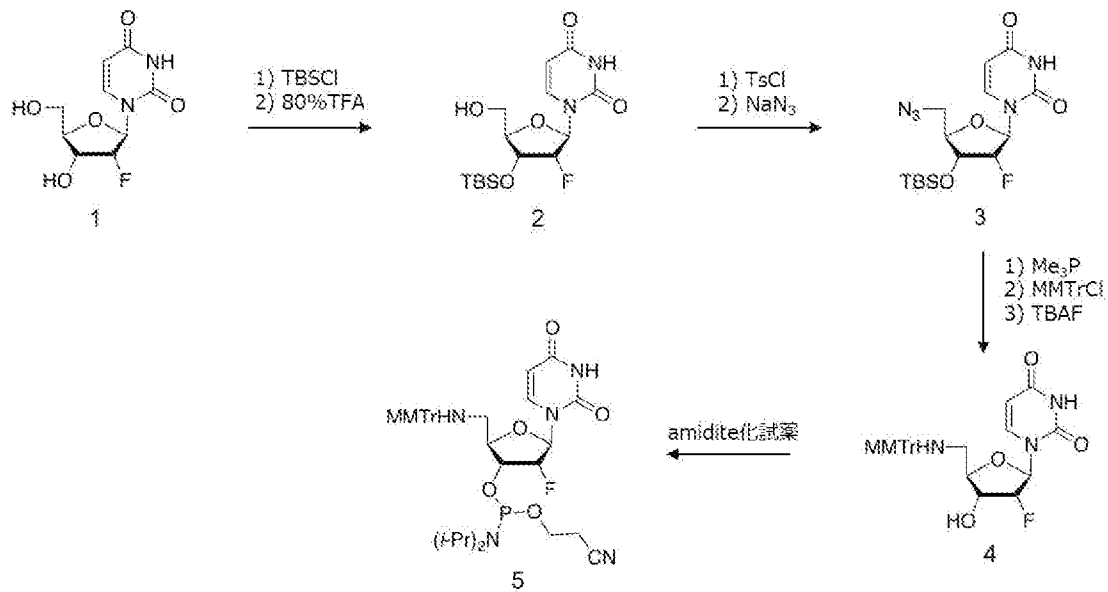


図4 スキーム1. Qに2'-F-5'-NH₂ ウリジンを導入するための試薬(5'-アミノ-2'-フルオロ-2',5'-ジデオキシウリジン アミダイト試薬、化合物5)の合成スキーム

[図5]

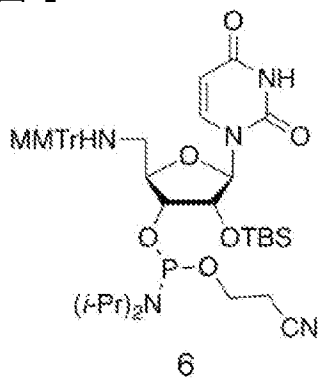


図5 スキーム2. Qに2'-OH-5'-NH₂ ウリジンを導入するための試薬(5'-アミノ-5'-デオキシウリジン アミダイト試薬、化合物6)の構造

[図6]



図6

2FpsとDNFBとの反応のHPLCによる分析。

[図7]

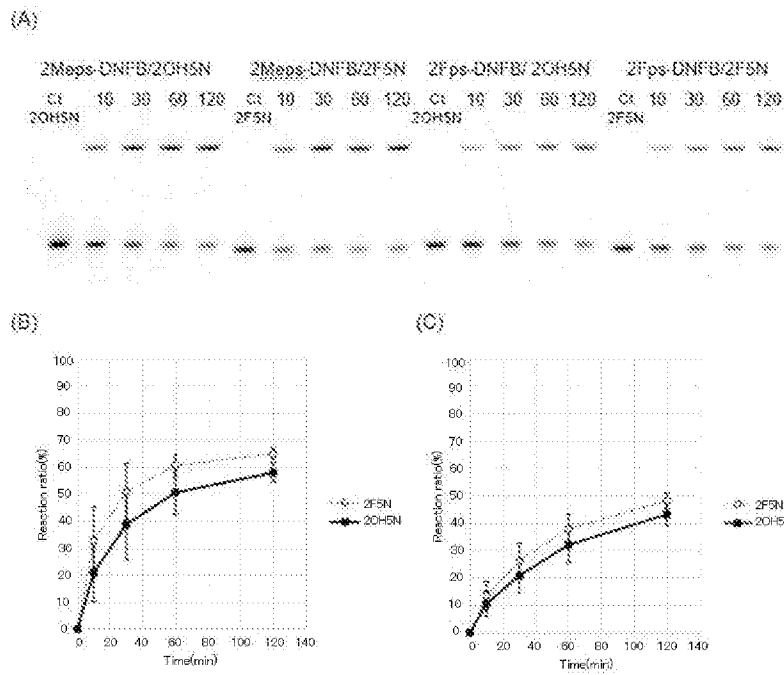


図7

DNFB修飾した5'-oligoと3'-oligoの反応のPAGEによる分析

(A) RNAをテンプレートとしてDNFB修飾した5'-oligoと3'-oligoを反応し、10、30、60、120分後のサンプルを分析 (B) 2Meps-DNFBと2OH5Nおよび2F5Nの反応率の経時変化 (C) 2Fps-DNFBと2OH5Nおよび2F5Nの反応率の経時変化

[図8]

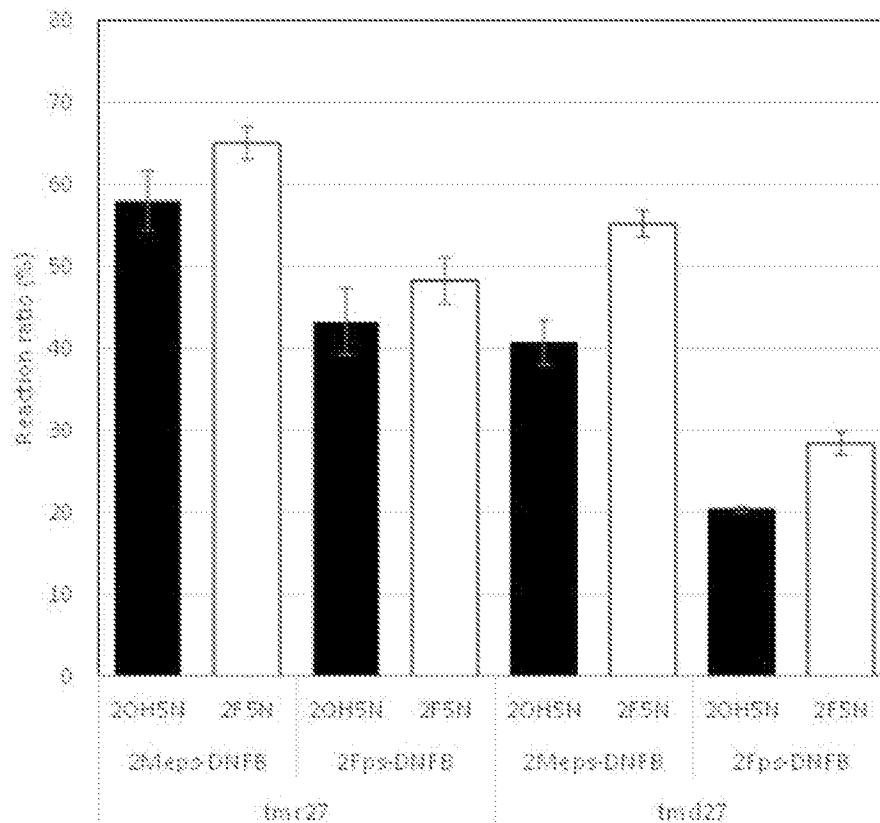


図8

DNFB修飾した5'-oligoと3'-oligoの120 minの反応における反応率の比較

[図9]

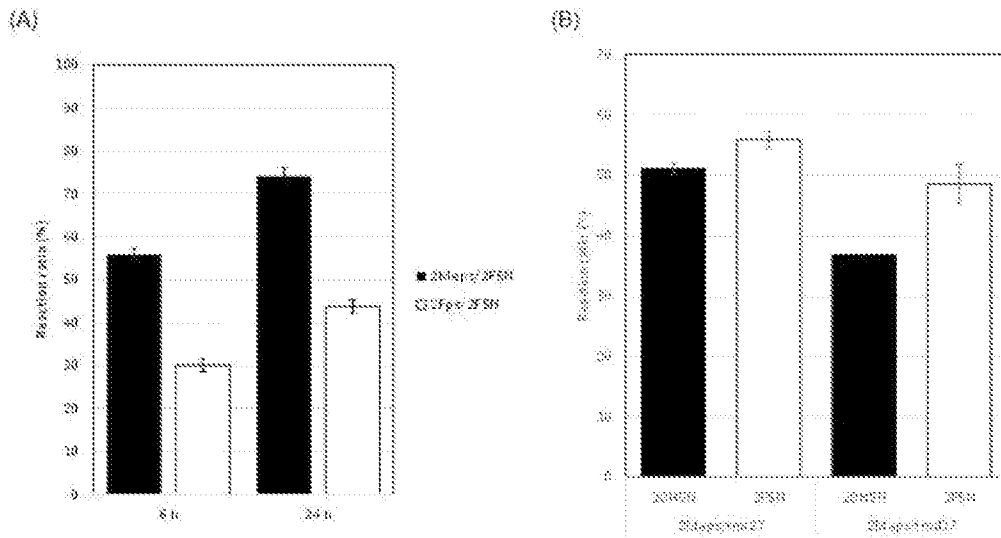


図9

5'-oligoと3'-oligoのDNFB存在下、6時間反応のPAGEによる分析

(A) RNAテンプレートを利用した反応の2Mepoと2Fpsの比較。(B) RNAおよびDNAテンプレートを利用した反応の2OH5Nと2F5Nの比較

[図10]

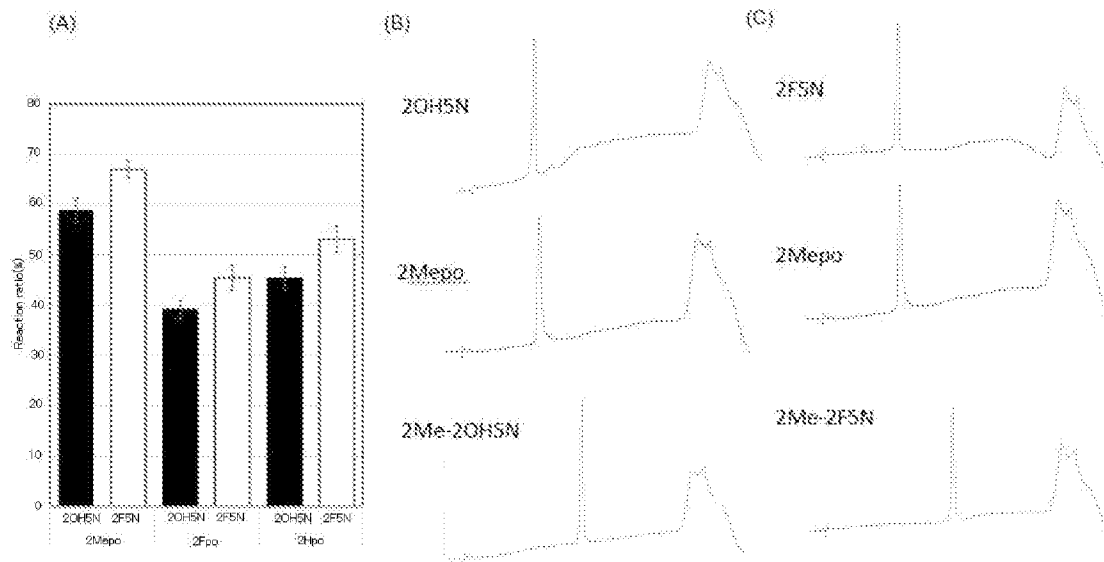


図10

5'-oligoと3'-oligoのEDC存在下での反応

(A) 5'-oligoと3'-oligoの60 minの反応における反応率の比較。(B) 2OH5Nと2Mepoの連結体のHPLCによる分析。(C) 2F5Nと2Mepoの連結体のHPLCによる分析

[図11]

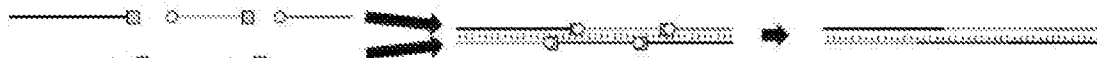


図11

[図12]

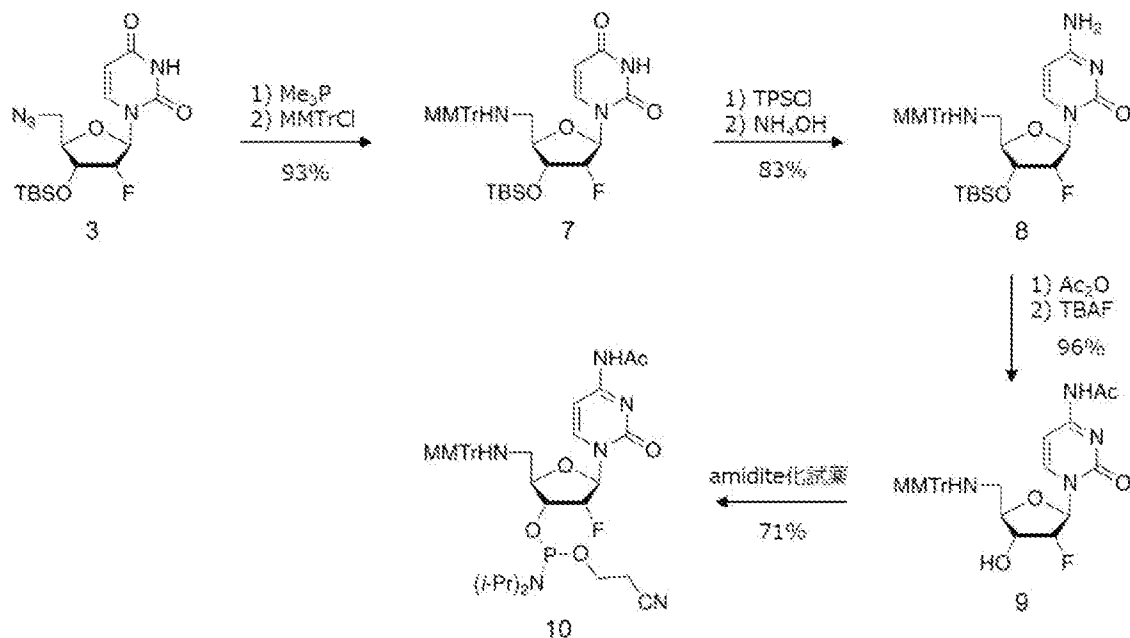


図12 スキーム3. Qに2'-F-5'- NH_2 シチジンを導入するための試薬 (5'-アミノ-2'-フルオロ-2', 5'-ジデオキシウリジン アミダイト試薬、化合物5) の合成スキーム

[図13]

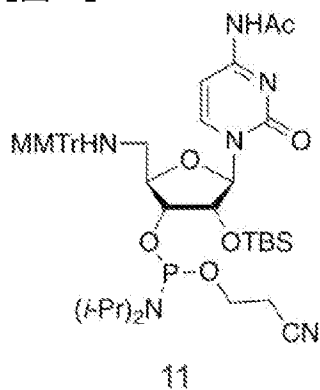


図13 スキーム4. Qに2'-OH-5'- NH_2 シチジンを導入するための試薬 (5'-アミノ-5'-デオキシシチジン アミダイト試薬、化合物11) の構造

[図14]

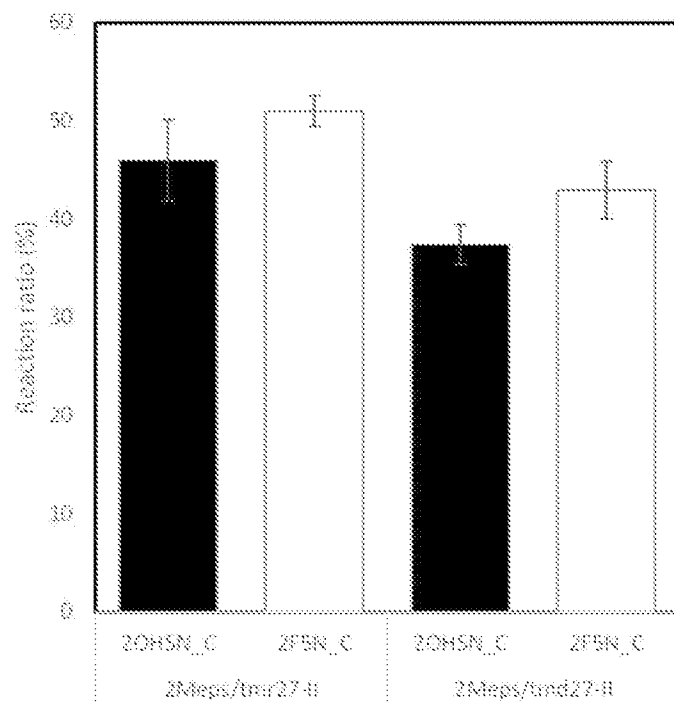


図14

5'-oligoと3'-oligoのDNFB存在下、6時間反応のPAGEによる分析。RNAおよびDNAテンプレートを利用した反応の2OH5N_Cと2F5N_Cの比較

[図15]

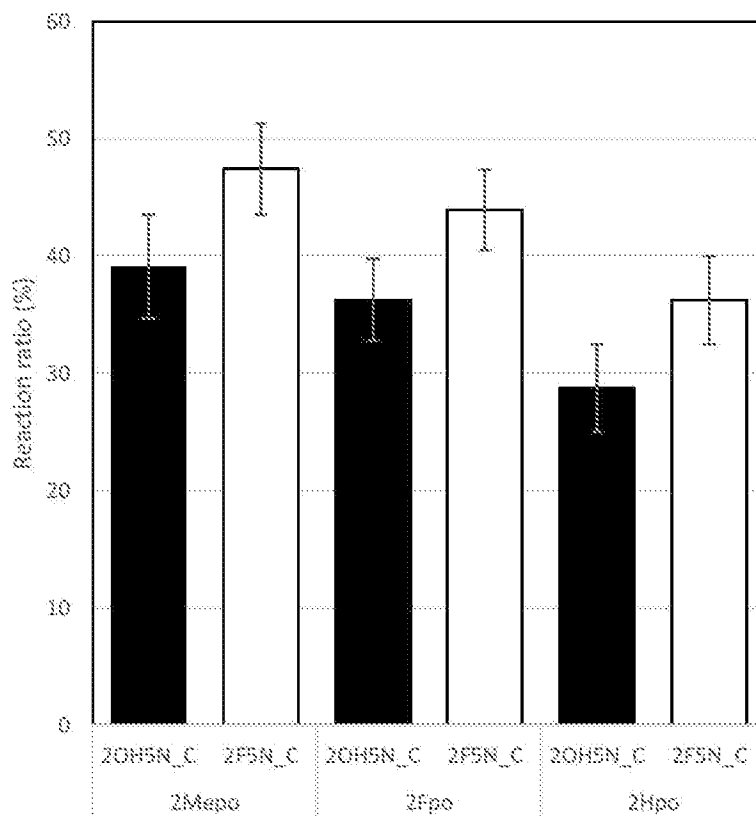


図15

5'-oligoと3'-oligoのEDC存在下での30 minの反応における反応率の比較

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/016716

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/11</i> (2006.01)i; <i>A61K 31/7084</i> (2006.01)i; <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)i; <i>A61P 5/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 7/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 9/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 25/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 29/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 35/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 37/02</i> (2006.01)i; <i>C07H 21/02</i> (2006.01)i; <i>C07H 21/04</i> (2006.01)i FI: C12N15/11 Z ZNA; C07H21/02; C07H21/04 Z; A61K31/7084; A61K31/7088; A61P35/00; A61P25/00; A61P37/02; A61P5/00; A61P9/00; A61P7/00; A61P29/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/11; A61K31/7084; A61K31/7088; A61P5/00; A61P7/00; A61P9/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P35/00; A61P37/02; C07H21/02; C07H21/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/REGISTRY (STN); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>MARUYAMA H. et al. Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester. Nucleic Acids Research, 2017, vol. 45, no. 12, pp. 7042-7048 in particular, abstract, p. 7042, left column, 1st paragraph to p. 7043, left column, 1st paragraph, p. 7045, left column, 1st paragraph to p. 7047, left column, 4th paragraph, fig. 4</td> <td>1-8, 11-23, 27, 29-48, 50-67</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>in particular, abstract, p. 7042, left column, 1st paragraph to p. 7043, left column, 1st paragraph, p. 7045, left column, 1st paragraph to p. 7047, left column, 4th paragraph, fig. 4</td> <td>9, 10, 28, 49</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>in particular, abstract, p. 7042, left column, 1st paragraph to p. 7043, left column, 1st paragraph, p. 7045, left column, 1st paragraph to p. 7047, left column, 4th paragraph, fig. 4</td> <td>24-26</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2019/048882 A1 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LTD.) 14 March 2019 (2019-03-14) in particular, claims 1-36, fig. 1, 13-16</td> <td>1-8, 11-27, 29-48, 50-67</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>in particular, claims 1-36, fig. 1, 13-16</td> <td>9, 10, 28, 49</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	MARUYAMA H. et al. Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester. Nucleic Acids Research, 2017, vol. 45, no. 12, pp. 7042-7048 in particular, abstract, p. 7042, left column, 1st paragraph to p. 7043, left column, 1st paragraph, p. 7045, left column, 1st paragraph to p. 7047, left column, 4th paragraph, fig. 4	1-8, 11-23, 27, 29-48, 50-67	Y	in particular, abstract, p. 7042, left column, 1st paragraph to p. 7043, left column, 1st paragraph, p. 7045, left column, 1st paragraph to p. 7047, left column, 4th paragraph, fig. 4	9, 10, 28, 49	A	in particular, abstract, p. 7042, left column, 1st paragraph to p. 7043, left column, 1st paragraph, p. 7045, left column, 1st paragraph to p. 7047, left column, 4th paragraph, fig. 4	24-26	X	WO 2019/048882 A1 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LTD.) 14 March 2019 (2019-03-14) in particular, claims 1-36, fig. 1, 13-16	1-8, 11-27, 29-48, 50-67	Y	in particular, claims 1-36, fig. 1, 13-16	9, 10, 28, 49
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	MARUYAMA H. et al. Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester. Nucleic Acids Research, 2017, vol. 45, no. 12, pp. 7042-7048 in particular, abstract, p. 7042, left column, 1st paragraph to p. 7043, left column, 1st paragraph, p. 7045, left column, 1st paragraph to p. 7047, left column, 4th paragraph, fig. 4	1-8, 11-23, 27, 29-48, 50-67																		
Y	in particular, abstract, p. 7042, left column, 1st paragraph to p. 7043, left column, 1st paragraph, p. 7045, left column, 1st paragraph to p. 7047, left column, 4th paragraph, fig. 4	9, 10, 28, 49																		
A	in particular, abstract, p. 7042, left column, 1st paragraph to p. 7043, left column, 1st paragraph, p. 7045, left column, 1st paragraph to p. 7047, left column, 4th paragraph, fig. 4	24-26																		
X	WO 2019/048882 A1 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LTD.) 14 March 2019 (2019-03-14) in particular, claims 1-36, fig. 1, 13-16	1-8, 11-27, 29-48, 50-67																		
Y	in particular, claims 1-36, fig. 1, 13-16	9, 10, 28, 49																		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.																				
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 08 June 2023		Date of mailing of the international search report 18 July 2023																		
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/016716

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BENNETT, C. F. et al. RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2010, vol. 50, no. 1, pp. 259-293 in particular, abstract, p. 271, 4th paragraph to p. 277, 1st paragraph, fig. 3	9, 10, 28, 49
Y	SHEN, W. et al. 2'-Fluoro-modified phosphorothioate oligonucleotide can cause rapid degradation of P54nrb and PSF. Nucleic Acids Research, 2015, vol. 43, no. 9, pp. 4569-4578 in particular, abstract, p. 4571, left column, 5th paragraph to p. 4573, right column, 1st paragraph, fig. 1, 2	9, 10, 28, 49
A	EPPLÉ, S. et al. Artificial nucleic acid backbones and their applications in therapeutics, synthetic biology and biotechnology. Emerging Topics in Life Sciences, 2021, vol. 5, no. 5, pp. 691-697 entire text	1-67

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/016716

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

“Annex C/ST.25 text file format” should be read as ‘ST.26 format’

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/016716

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2019/048882	A1	14 March 2019	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/11(2006.01)i; A61K 31/7084(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 5/00(2006.01)i; A61P 7/00(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; C07H 21/02(2006.01)i; C07H 21/04(2006.01)i FI: C12N15/11 Z ZNA; C07H21/02; C07H21/04 Z; A61K31/7084; A61K31/7088; A61P35/00; A61P25/00; A61P37/02; A61P5/00; A61P9/00; A61P7/00; A61P29/00																				
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/11; A61K31/7084; A61K31/7088; A61P5/00; A61P7/00; A61P9/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P35/00; A61P37/02; C07H21/02; C07H21/04 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 <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>1971-2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2023年</td> </tr> </table> 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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY (STN); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2023年	日本国実用新案登録公報	1996-2023年	日本国登録実用新案公報	1994-2023年										
日本国実用新案公報	1922-1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971-2023年																			
日本国実用新案登録公報	1996-2023年																			
日本国登録実用新案公報	1994-2023年																			
C. 関連すると認められる文献 <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>MARUYAMA H. et al., Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester, Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, No. 12, p.7042-7048 特に、要約、第7042頁左欄第1段落-第7043頁左欄第1段落、第7045頁左欄第1段落-第7047頁左欄第4段落、図4</td> <td>1-8、11-23、27、29-48、50-67</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>特に、要約、第7042頁左欄第1段落-第7043頁左欄第1段落、第7045頁左欄第1段落-第7047頁左欄第4段落、図4</td> <td>9、10、28、49</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>特に、要約、第7042頁左欄第1段落-第7043頁左欄第1段落、第7045頁左欄第1段落-第7047頁左欄第4段落、図4</td> <td>24-26</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2019/048882 A1 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) 14.03.2019 (2019-03-14) 特に、請求項1-36、図1、図13-16</td> <td>1-8、11-27、29-48、50-67</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>特に、請求項1-36、図1、図13-16</td> <td>9、10、28、49</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	MARUYAMA H. et al., Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester, Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, No. 12, p.7042-7048 特に、要約、第7042頁左欄第1段落-第7043頁左欄第1段落、第7045頁左欄第1段落-第7047頁左欄第4段落、図4	1-8、11-23、27、29-48、50-67	Y	特に、要約、第7042頁左欄第1段落-第7043頁左欄第1段落、第7045頁左欄第1段落-第7047頁左欄第4段落、図4	9、10、28、49	A	特に、要約、第7042頁左欄第1段落-第7043頁左欄第1段落、第7045頁左欄第1段落-第7047頁左欄第4段落、図4	24-26	X	WO 2019/048882 A1 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) 14.03.2019 (2019-03-14) 特に、請求項1-36、図1、図13-16	1-8、11-27、29-48、50-67	Y	特に、請求項1-36、図1、図13-16	9、10、28、49
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	MARUYAMA H. et al., Chemical ligation of oligonucleotides using an electrophilic phosphorothioester, Nucleic Acids Research, 2017, Vol. 45, No. 12, p.7042-7048 特に、要約、第7042頁左欄第1段落-第7043頁左欄第1段落、第7045頁左欄第1段落-第7047頁左欄第4段落、図4	1-8、11-23、27、29-48、50-67																		
Y	特に、要約、第7042頁左欄第1段落-第7043頁左欄第1段落、第7045頁左欄第1段落-第7047頁左欄第4段落、図4	9、10、28、49																		
A	特に、要約、第7042頁左欄第1段落-第7043頁左欄第1段落、第7045頁左欄第1段落-第7047頁左欄第4段落、図4	24-26																		
X	WO 2019/048882 A1 (OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED) 14.03.2019 (2019-03-14) 特に、請求項1-36、図1、図13-16	1-8、11-27、29-48、50-67																		
Y	特に、請求項1-36、図1、図13-16	9、10、28、49																		
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																				
* 引用文献のカテゴリー “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 “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 “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） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “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 “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 “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 “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 “&” 同一パテントファミリー文献																				
国際調査を完了した日 08.06.2023		国際調査報告の発送日 18.07.2023																		
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 伊達 利奈 4B 3960 電話番号 03-3581-1101 内線 3448																		

C. 関連すると認められる文献		
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
Y	BENNETT C.F. et al., RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2010, Vol. 50, No. 1, p.259-293 特に、要約、第 2 7 1 頁第 4 段落－第 2 7 7 頁第 1 段落、図 3	9、10、 28、49
Y	SHEN W. et al., 2' -Fluoro-modified phosphorothioate oligonucleotide can cause rapid degradation of P54nrb and PSF, Nucleic Acids Research, 2015, Vol. 43, No. 9, p.4569-4578 特に、要約、第 4 5 7 1 頁左欄第 5 段落－第 4 5 7 3 頁右欄第 1 段落、図 1、図 2	9、10、 28、49
A	EPPLER S. et al., Artificial nucleic acid backbones and their applications in therapeutics, synthetic biology and biotechnology, Emerging Topics in Life Sciences, 2021, Vol. 5, No. 5, p.691-697 全文	1－67

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:

上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

PCT/JP2023/016716

様式 PCT/ISA/210 (パテントファミリー用別紙) (2015年1月)