



- (51) 国際特許分類：  
C12N 15/09 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
- (21) 国際出願番号： PCT/JP201 1/065737
- (22) 国際出願日： 201 1 年 7 月 8 日 (08.07.201 1)
- (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 2010-156122 2010 年 7 月 8 日 (08.07.2010) JP  
特願 2010-174915 2010 年 8 月 3 日 (03.08.2010) JP  
特願 2010-230808 2010 年 10 月 13 日 (13.10.2010) JP  
特願 2010-230806 2010 年 10 月 13 日 (13.10.2010) JP  
特願 2010-269824 2010 年 12 月 2 日 (02.12.2010) JP  
特願 2010-269823 2010 年 12 月 2 日 (02.12.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について) :株  
式会社ボナック (ONAC CORPORATION) [JP/JP];  
〒8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4  
福岡バイオファクトリー 4 F Fukuoka (JP).
- (72) 発明者 ;および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) :大木 忠明  
(OHGI Tadaaki) [JP/JP]; 〒8390861 福岡県久留米  
市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオファクト  
リー 4 F 株式会社ボナック内 Fukuoka (JP). 林

お岡 (HAYASHI Hirotake) [JP/JP]; 〒8390861 福岡  
県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオ  
ファクトリー 4 F 株式会社ボナック内  
Fukuoka (JP). 白水 久男 (HIROHZU Hisao)  
[JP/JP]; 〒839086 1 福岡県久留米市合川町 1 4 8  
8 - 4 福岡バイオファクトリー 4 F 株式  
会社ボナック内 Fukuoka (JP). 濱崎 智洋  
(HAMAS AKI Tomohiro) [JP/JP]; 〒8390861 福岡県  
久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオ  
ファクトリー 4 F 株式会社ボナック内  
Fukuoka (JP). 伊藤 彰浩 (ITOHI Akihiro) [JP/JP]; 〒  
8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4  
福岡バイオファクトリー 4 F 株式会社ボ  
ナック内 Fukuoka (JP). 鈴木 寛 (SUZUKI Hiroshi)  
[JP/JP]; 〒839086 1 福岡県久留米市合川町 1 4 8  
8 - 4 福岡バイオファクトリー 4 F 株式  
会社ボナック内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人 :辻丸 光一郎, 外 (TSUJIMARU Koichiro  
et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町  
1 3 4 京都リサーチパーク 1 号館 3 0 1 号  
室 Kyoto (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,

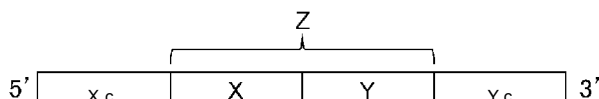
[続葉有]

(54) Title: SINGLE-STRAND NUCLEIC ACID MOLECULE FOR CONTROLLING GENE EXPRESSION

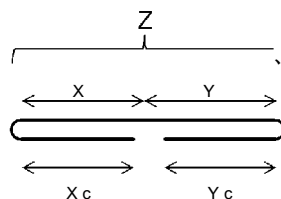
(54) 発明の名称 遺伝子発現制御のための一本鎖核酸分子

[図 1]

(A)



(B)



(57) Abstract: Disclosed is a novel nucleic acid molecule capable of suppressing expression of a gene and capable of easy and efficient manufacture. The single-strand nucleic acid molecule contains an expression suppression sequence that inhibits expression of a target gene, and contains, in order from the 5' end to the 3' end, a 5' end region (Xc), an inner region (Z) and a 3' end region (Yc), wherein the inner region (Z) is constituted by linking an inner 5' end region (X) and an inner 3' end region (Y), the 5' end region (Xc) is complementary to the inner 5' end region (X), the 3' end region (Yc) is complementary to the inner 3' end region (Y), and at least one of the inner region (Z), the 5' end region and the 3' end region includes the aforementioned expression suppression sequence. By means of this single-strand nucleic acid molecule, expression of the target gene can be suppressed.

(57) 要約：

[続葉有]





JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可<sup>△</sup>: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
- － 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))

遺伝子の発現を抑制可能な新たな核酸分子であって、容易かつ効率良く製造することが可能な核酸分子を提供する。標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列を含む一本鎖核酸分子であって、5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、内部領域(Z)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、前記内部領域(Z)が、内部5'側領域(X)および内部3'側領域(Y)が連結して構成され、前記5'側領域(Xc)が、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、前記3'側領域(Yc)が、前記内部3'側領域(Y)と相補的であり、前記内部領域(Z)、前記5'側領域および前記3'側領域の少なくともいずれかが、前記発現抑制配列を含むことを特徴とする分子とする。この一本鎖核酸分子によれば、前記標的遺伝子の発現を抑制できる。

## 明 細 書

発明の名称 : 遺伝子発現制御のための一本鎖核酸分子

### 技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子発現を抑制する一本鎖核酸分子、それを含む組成物およびその用途に関する。

### 背景技術

[0002] 遺伝子の発現を抑制する技術として、例えば、RNA干渉 (RNAi) が知られている (非特許文献1)。RNA干渉による遺伝子の発現抑制は、例えば、短い二本鎖のRNA分子を、細胞等に投与することによって、実施されるのが一般的である。前記二本鎖のRNA分子は、通常、siRNA (small interfering RNA) と呼ばれる。この他に、環状のRNA分子であり、分子内アニールにより、部分的に二重鎖を形成したRNA分子によっても、遺伝子の発現が抑制できることが報告されている (特許文献1)。しかしながら、これらの手法では、遺伝子の発現抑制を誘導するRNA分子は、以下のような問題がある。

[0003] まず、前記siRNAを製造する場合、センス鎖およびアンチセンス鎖を別々に合成した上で、最後にこれらの鎖をハイブリダイズする工程が必要である。このため、製造効率が悪いという問題がある。また、前記siRNAを細胞に投与する際、一本鎖RNAへの解離を抑制した状態で、細胞に投与する必要があるため、その取り扱い条件の設定にも労力を要する。つぎに、環状のRNA分子の場合、その合成が困難という問題がある。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0004] 特許文献1 : 特開2008\_278784

#### 非特許文献

[0005] 非特許文献1 : ファイアら (Fire, et al. に)、Nature 第391巻、p. 806—811、1998年

## 発明の概要

- [0006]     そこで、本発明は、遺伝子の発現を抑制可能な新たな核酸分子であって、容易かつ効率良く製造することが可能な核酸分子の提供することを目的とする。
- [0007]     前記目的を達成するために、本発明の一本鎖核酸分子は、標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列を含む一本鎖核酸分子であって、5'側から3'側にかけて、5'側領域 (X c)、内部領域 (Z) および3'側領域 (Y c) を、前記順序で含み、前記内部領域 (Z) が、内部5'側領域 (X) および内部3'側領域 (Y) が連結して構成され、前記5'側領域 (X c) が、前記内部5'側領域 (X) と相補的であり、前記3'側領域 (Y c) が、前記内部3'側領域 (Y) と相補的であり、前記内部領域 (Z)、前記5'側領域 (X c) および前記3'側領域 (Y c) の少なくとも一つが、前記発現抑制配列を含むことを特徴とする。
- [0008]     本発明の組成物は、標的遺伝子の発現を抑制するための組成物であって、前記本発明の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする。
- [0009]     本発明の組成物は、薬学的組成物であって、前記本発明の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする。
- [001 0]     本発明の発現抑制方法は、標的遺伝子の発現を抑制する方法であって、前記本発明の一本鎖核酸分子を使用することを特徴とする。
- [001 1]     本発明の疾患の治療方法は、前記本発明の一本鎖核酸分子を、患者に投与する工程を含み、前記一本鎖核酸分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする。
- [001 2]     本発明の一本鎖核酸分子によれば、遺伝子の発現抑制が可能であり、かつ、環状ではないため、その合成が容易であり、また、一本鎖であるため、二本鎖のアニール工程が無く、効率良く製造可能である。
- [001 3]     なお、本発明の一本鎖核酸分子の構造が、遺伝子の発現を抑制可能であることを見出したのは、本発明者が初めてである。本発明の一本鎖核酸分子の

遺伝子の発現抑制効果は、RNA干渉と同様の現象によるものと推測されるが、本発明における遺伝子発現抑制は、RNA干渉に制限および限定されない。

## 図面の簡単な説明

- [0014] [図1] 図1は、本発明の一本鎖核酸分子の一例を示す模式図である。
- [図2] 図2は、本発明の一本鎖核酸分子のその他の例を示す模式図である。
- [図3] 図3は、本発明の一本鎖核酸分子のその他の例を示す模式図である。
- [図4] 図4は、本発明の実施例におけるGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。
- [図5] 図5は、本発明の実施例におけるGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。
- [図6] 図6は、本発明の実施例におけるA549細胞のGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。
- [図7] 図7は、本発明の実施例における293細胞のGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。
- [図8] 図8は、本発明の実施例におけるTGF- $\beta$ 1遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。
- [図9] 図9は、本発明の実施例における各投与群における単位重量の肺あたりのTGF- $\beta$ 1遺伝子発現量を示すグラフである。
- [図10] 図10は、本発明の実施例における各投与群におけるBALFサンプル中の細胞数を示すグラフである。
- [図11] 図11は、本発明の実施例における各投与群におけるBALFサンプル中の好中球の細胞数を示すグラフである。
- [図12] 図12は、本発明の実施例におけるBALFサンプル中の細胞のギムザ染色の結果を示す写真であり、(A)は、LPS(+)/RNA(-)の投与群4の結果であり、(B)は、LPS(+)/ネガティブコントロールNK-0035(+ )の投与群6の結果であり、(C)は、LPS(+)/NK-0033(+ )の実施例投与群5の結果を示す。

[図13] 図13は、本発明の実施例における肺組織のHE染色の結果を示す写真であり、(A)は、LPS (+) / RNA (-) の投与群4の結果であり、(B)は、LPS (+) / ネガティブコントロールNK-0035 (+) の投与群6の結果であり、(C)は、LPS (+) / NK-0033 (+) の実施例投与群5の結果を示す。

[図14] 図14 (A) は、本発明の実施例におけるTGF- $\beta$ 1遺伝子の発現量を示す結果であり、図14 (B) は、本発明の実施例におけるIFN- $\alpha$ 遺伝子の発現量を示す結果であり、図14 (C) は、本発明の実施例におけるIFN- $\beta$ 遺伝子の発現量を示す結果である。

[図15] 図15は、本発明の実施例におけるTGF- $\beta$ 1遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。

[図16] 図16は、本発明の実施例におけるTGF- $\beta$ 1遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。

[図17] 図17は、本発明の実施例における各投与群における単位重量の肺あたりのTGF- $\beta$ 1発現量を示すグラフである。

[図18] 図18 (A) は、本発明の実施例における各投与群のBALFサンプル中のTNF- $\alpha$ 量を示すグラフであり、図18 (B) は、本発明の実施例における各投与群のBALFサンプル中のIFN- $\beta$ 量を示すグラフである。

[図19] 図19は、本発明の実施例における293細胞のLAMA遺伝子の発現量の相対値を示すグラフである。

[図20] 図20は、本発明の実施例におけるA549細胞のLMNA遺伝子の発現量の相対値を示すグラフである。

[図21] 図21は、本発明の実施例で使用したssRNAを示す図である。

[図22] 図22は、本発明の実施例におけるGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。

[図23] 図23は、本発明の実施例で使用したssRNAを示す図である。

[図24] 図24は、本発明の実施例におけるGAPDH遺伝子発現量の相対値

を示すグラフである。

[図25] 図25は、本発明の実施例で使用したssRNAを示す図である。

[図26] 図26は、本発明の実施例におけるGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。

[図27] 図27は、本発明の実施例で使用したssRNAを示す図である。

[図28] 図28は、本発明の実施例におけるGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。

[図29] 図29は、本発明の実施例におけるGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。

[図30] 図30は、本発明の実施例におけるHCT116細胞のGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。

[図31] 図31は、本発明の実施例におけるリボヌクレアーゼ耐性を示す電気泳動写真である。

[図32] 図32は、本発明の実施例におけるS7ヌクレアーゼ耐性を示す電気泳動写真である。

## 発明を実施するための形態

[0015] 本明細書で使用する用語は、特に言及しない限り、当該技術分野で通常用いられる意味で用いることができる。

### [0016] 1. ssNc分子

本発明の一本鎖核酸分子は、前述のように、標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列を含む一本鎖核酸分子であって、

5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、内部領域(Z)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、

前記内部領域(Z)が、内部5'側領域(X)および内部3'側領域(Y)が連結して構成され、

前記5'側領域(Xc)が、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、

前記3'側領域(Yc)が、前記内部3'側領域(Y)と相補的であり、

前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)

) の少なくとも一つが、前記発現抑制配列を含むことを特徴とする。

[001 7] 本発明において、「標的遺伝子の発現抑制」は、例えば、前記標的遺伝子の発現を阻害することを意味する。前記抑制のメカニズムは、特に制限されず、例えば、ダウンレギュレーションまたはサイレンシングでもよい。前記標的遺伝子の発現抑制は、例えば、前記標的遺伝子からの転写産物の生成量の減少、前記転写産物の活性の減少、前記標的遺伝子からの翻訳産物の生成量の減少、または前記翻訳産物の活性の減少等によつて確認できる。前記タンパク質は、例えば、成熟タンパク質、または、プロセッシングもしくは翻訳後修飾を受ける前の前駆体タンパク質があげられる。

[001 8] 本発明の一本鎖核酸分子は、以下、本発明の「ssNc分子」ともいう。本発明のssNc分子は、例えば、*in vivo*または*in vitro*において、標的遺伝子の発現抑制に使用できることから、「標的遺伝子の発現抑制用ssNc分子」または「標的遺伝子の発現抑制剤」ともいう。また、本発明のssNc分子は、例えば、RNA干渉により、前記標的遺伝子の発現を抑制できることから、「RNA干渉用ssNc分子」、「RNA干渉誘導分子」、「RNA干渉剤」または「RNA干渉誘導剤」ともいう。また、本発明のssNc分子は、例えば、インターフェロン誘導等の副作用を抑制できる。

[001 9] 本発明のssNc分子は、その5'末端と3'末端とが未連結であり、線状一本鎖核酸分子ということもできる。本発明のssNc分子は、例えば、前記内部領域(Z)において、前記内部5'領域(X)と前記内部3'領域(Y)が、直接的に連結されている。

[0020] 本発明のssNc分子において、前記5'側領域(Xc)は、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、前記3'側領域(Yc)は、前記内部3'側領域(Y)と相補的である。このため、5'側において、前記領域(Xc)が前記領域(X)に向かって折り返し、前記領域(Xc)と前記領域(X)とが、自己アニーリングによって、二重鎖を形成可能であり、また、3'側において、前記領域(Yc)が前記領域(Y)に向かって折り返し、前記



領域 (Y<sub>c</sub>) と前記領域 (Y) とが、自己アニーリングによって、二重鎖を形成可能である。本発明の s s N c 分子は、このように、分子内で二重鎖を形成可能であり、例えば、従来の RNA 干渉に使用する s i R N A のように、分離した 2 本の一本鎖 RNA がアニーリングによって二本鎖 RNA を形成するものとは、明らかに異なる構造である。

[0021] 本発明の s s N c 分子において、前記発現抑制配列は、例えば、本発明の s s N c 分子が、*in vivo* または *in vitro* で細胞内に導入された場合に、前記標的遺伝子の発現を抑制する活性を示す配列である。前記発現抑制配列は、特に制限されず、目的の標的遺伝子の種類に応じて、適宜設定できる。前記発現抑制配列は、例えば、s i R N A による RNA 干渉に関与する配列を適宜適用できる。RNA 干渉は、一般に、長い二本鎖 RNA (d s R N A) が、細胞内において、D i c e r により、3' 末端が突出した 19 ~ 21 塩基対程度の二本鎖 RNA (s i R N A : s m a l l i n t e r f e r i n g R N A) に切断され、その一方の一本鎖 RNA が標的 m R N A に結合して、前記 m R N A を分解することにより、前記 m R N A の翻訳を抑制する現象である。前記標的 m R N A に結合する前記 s i R N A における一本鎖 RNA の配列は、例えば、標的遺伝子の種類に応じて様々な種類が報告されている。本発明は、例えば、前記 s i R N A の一本鎖 RNA の配列を、前記発現抑制配列として使用できる。

[0022] なお、本発明は、前記標的遺伝子に対する前記発現抑制配列の配列情報がポイントではなく、前記発現抑制配列による前記標的遺伝子の発現抑制活性を、例えば、細胞内で機能させるための核酸分子の構造に関する。したがって、本発明においては、例えば、出願時において公知となっている前記 s i R N A の一本鎖 RNA 配列の他、将来的に明らかとなる配列に関しても、前記発現抑制配列として利用できる。

[0023] 前記発現抑制配列は、例えば、前記標的遺伝子の所定領域に対して、90% 以上の相補性を有していることが好ましく、より好ましくは 95% であり、さらに好ましくは 98% であり、特に好ましくは 100% である。このよ

うな相補性を満たすことにより、例えば、オフターゲットを十分に軽減できる。

[0024] 具体例として、標的遺伝子がGAPDH遺伝子の場合、前記発現抑制配列は、例えば、配列番号1に示す19塩基長の配列が使用でき、標的遺伝子がTGF- $\beta$ 1の場合、前記発現抑制配列は、例えば、配列番号16に示す21塩基長の配列が使用でき、標的遺伝子がLAMA1遺伝子の場合、前記発現抑制配列は、例えば、配列番号5に示す19塩基長の配列が使用でき、標的遺伝子がLMNA遺伝子の場合、例えば、配列番号6に示す19塩基長の配列が使用できる。

5' - GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3' (配列番号1)

5' - AAAGUCA AUGUACAGCUGCUU-3' (配列番号16)

5' - AUUGUAACGAGACAAACAC-3' (配列番号5)

5' - UUGCGCUUUUUGGUGACGC-3' (配列番号6)

[0025] 本発明のssNc分子による前記標的遺伝子の発現の抑制は、例えば、前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)の少なくとも一つに前記発現抑制配列を配置した構造をとることで、RNA干渉またはRNA干渉に類似する現象(RNA干渉様の現象)が生じることによると推測される。なお、本発明は、このメカニズムにより限定されない。本発明のssNc分子は、例えば、いわゆるsiRNAのように、二本鎖の一本鎖RNAからなるdsRNAとして、細胞等へ導入するものではなく、また、細胞内において、前記発現抑制配列の切り出しは、必ずしも必須ではない。このため、本発明のssNc分子は、例えば、RNA干渉様の機能を有するということができる。

[0026] 本発明のssNc分子において、前記発現抑制配列は、前述のように、前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)の少なくとも一つに含まれる。本発明のssNc分子は、前記発現抑制配列を、例えば、1つ有してもよいし、2つ以上有してもよい。

[0027] 後者の場合、本発明のssNc分子は、例えば、同じ標的遺伝子に対する

同じ発現抑制配列を2つ以上有してもよいし、同じ標的遺伝子に対する異なる発現抑制配列を2つ以上有してもよいし、異なる標的遺伝子に対する異なる発現抑制配列を2つ以上有してもよい。本発明のssNc分子が、2つ以上の前記発現抑制配列を有する場合、各発現抑制配列の配置箇所は、特に制限されず、前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)のいずれか一領域でもよいし、異なる領域であってもよい。本発明のssNc分子が、異なる標的遺伝子に対する前記発現抑制配列を2つ以上有する場合、例えば、本発明のssNc分子によって、2種類以上の異なる標的遺伝子の発現を抑制可能である。

[0028] 前記内部領域(Z)は、前述のように、前記内部5'領域(X)と前記内部3'領域(Y)が連結されている。前記領域(X)と前記領域(Y)は、例えば、直接的に連結され、その間に介在配列を有していない。前記内部領域(Z)は、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)との配列関係を示すために、「前記内部5'側領域(X)と前記内部3'側領域(Y)が連結して構成される」と表わすものであって、前記内部領域(Z)において、前記5'側領域(Xc)と前記3'側領域(Yc)とが、例えば、前記ssNc分子の使用において、別個の独立した領域であることを限定するものではない。すなわち、例えば、前記内部領域(Z)が、前記発現抑制配列を有する場合、前記内部領域(Z)において、前記領域(X)と前記領域(Y)とにわたって、前記発現抑制配列が配置されてもよい。

[0029] 本発明のssNc分子において、前記5'側領域(Xc)は、前記内部5'側領域(X)に相補的である。ここで、前記領域(Xc)は、前記領域(X)の全領域またはその部分領域に対して相補的な配列を有していればよく、具体的には、例えば、前記領域(X)の全領域またはその部分領域に相補的な配列を含む、または、前記相補的な配列からなることが好ましい。前記領域(Xc)は、前記領域(X)の相補的な前記全領域または相補的な前記部分領域に対して、例えば、完全に相補的でもよいし、1もしくは数塩基が非相補的であってもよいが、完全に相補的であることが好ましい。本発明の

s s N c 分子において、前記 3' 側領域 (Y c) は、前記内部 3' 側領域 (Y) に相補的である。ここで、前記領域 (Y c) は、前記領域 (Y) の全領域またはその部分領域に相補的な配列を有していればよく、具体的には、例えば、前記領域 (Y) の全領域またはその部分領域に対して相補的な配列を含む、または、前記相補的な配列からなることが好ましい。前記領域 (Y c) は、前記領域 (Y) の相補的な前記全領域または相補的な前記部分領域に対して、例えば、完全に相補的でもよいし、1もしくは数塩基が非相補的であってもよいが、完全に相補的であることが好ましい。前記 1塩基若しくは数塩基は、例えば、1~3塩基、好ましくは1塩基または2塩基である。

[0030] 本発明の s s N c 分子において、前記 5' 側領域 (X c) と前記内部 5' 側領域 (X) とは、例えば、直接連結してもよいし、間接的に連結してもよい。前者の場合、直接的な連結は、例えば、ホスホジエステル結合による連結があげられる。後者の場合、例えば、前記領域 (X c) と前記領域 (X) との間に、リンカー領域 (L x) を有し、前記リンカー領域 (L x) を介して、前記領域 (X c) と前記領域 (X) とが連結している形態があげられる。

[0031] 本発明の s s N c 分子において、前記 3' 側領域 (Y c) と前記内部 3' 側領域 (Y) とは、例えば、直接連結してもよいし、間接的に連結してもよい。前者の場合、直接的な連結は、例えば、ホスホジエステル結合による連結があげられる。後者の場合、例えば、前記領域 (Y c) と前記領域 (Y) との間に、リンカー領域 (L y) を有し、前記リンカー領域 (L y) を介して、前記領域 (Y c) と前記領域 (Y) とが連結している形態があげられる。

[0032] 本発明の s s N c 分子は、例えば、前記リンカー領域 (L x) および前記リンカー領域 (L y) の両方を有してもよいし、いずれか一方を有してもよい。後者の場合、例えば、前記 5' 側領域 (X c) と前記内部 5' 側領域 (X) との間に前記リンカー領域 (L x) を有し、前記 3' 側領域 (Y c) と前記内部 3' 側領域 (Y) との間に前記リンカー領域 (L y) を有さない、

つまり、前記領域 (Y c) と前記領域 (Y) とが直接連結された形態があげられる。また、後者の場合、例えば、前記 3' 側領域 (Y c) と前記内部 3' 側領域 (Y) との間に前記リンカー領域 (L y) を有し、前記 5' 側領域 (X c) と前記内部 5' 側領域 (X) との間に前記リンカー領域 (L x) を有さない、つまり、前記領域 (X c) と前記領域 (X) とが直接連結された形態があげられる。

[0033] 前記リンカー領域 (L x) および前記リンカー領域 (L y) は、それぞれ、それ自体の領域内部において、自己アニーリングを生じない構造であることが好ましい。

[0034] 本発明の s s N c 分子について、前記リンカー領域を有さない s s N c 分子の一例を、図 1 の模式図に示す。図 1 (A) は、前記 s s N c 分子について、5' 側から 3' 側に向かって、各領域の順序の概略を示す模式図であり、図 1 (B) は、前記 s s N c 分子が、前記分子内において二重鎖を形成している状態を示す模式図である。図 1 (B) に示すように、前記 s s N c 分子は、前記 5' 側領域 (X c) が折り返し、前記 5' 側領域 (X c) と前記内部 5' 側領域 (X) との間で二重鎖が形成され、前記 3' 側領域 (Y c) が折り返し、前記 3' 側領域 (Y c) と前記内部 3' 側領域 (Y) との間で二重鎖が形成される。図 1 は、あくまでも、各領域の連結順番および二重鎖を形成する各領域の位置関係を示すものであり、例えば、各領域の長さ等は、これに制限されない。

[0035] 本発明の s s N c 分子について、前記リンカー領域を有する s s N c 分子の一例を、図 2 の模式図に示す。図 2 (A) は、一例として、前記 s s N c 分子について、5' 側から 3' 側に向かって、各領域の順序の概略を示す模式図であり、図 2 (B) は、前記 s s N c 分子が、前記分子内において二重鎖を形成している状態を示す模式図である。図 2 (B) に示すように、前記 s s N c 分子は、前記 5' 側領域 (X c) と前記内部 5' 側領域 (X) との間、前記内部 3' 側領域 (Y) と前記 3' 側領域 (Y c) との間で、二重鎖が形成され、前記 L x 領域および前記 L y 領域が、ループ構造をとる。図 2

は、あくまでも、各領域の連結順番および二重鎖を形成する各領域の位置関係を示すものであり、例えば、各領域の長さ等は、これに制限されない。

[0036] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記 5' 側領域 ( $X c$ )、前記内部 5' 側領域 ( $X$ )、前記内部 3' 側領域 ( $Y$ ) および前記 3' 側領域 ( $Y c$ ) の塩基数は、特に制限されず、例えば、以下の通りである。本発明において、「塩基数」は、例えば、「長さ」を意味し、「塩基長」ということもできる。

[0037] 前記 5' 側領域 ( $X c$ ) は、前述のように、例えば、前記内部 5' 側領域 ( $X$ ) の全領域に相補的でもよい。この場合、前記領域 ( $X c$ ) は、例えば、前記領域 ( $X$ ) と同じ塩基長であり、前記領域 ( $X$ ) の 5' 末端から 3' 末端の全領域に相補的な塩基配列からなることが好ましい。前記領域 ( $X c$ ) は、より好ましくは、前記領域 ( $X$ ) と同じ塩基長であり、且つ、前記領域 ( $X c$ ) の全ての塩基が、前記領域 ( $X$ ) の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補的であることが好ましい。なお、これには制限されず、例えば、前述のように、1 もしくは数塩基が非相補的であってもよい。

[0038] また、前記 5' 側領域 ( $X c$ ) は、前述のように、例えば、前記内部 5' 側領域 ( $X$ ) の部分領域に相補的でもよい。この場合、前記領域 ( $X c$ ) は、例えば、前記領域 ( $X$ ) の部分領域と同じ塩基長であり、すなわち、前記領域 ( $X$ ) よりも、1 塩基以上短い塩基長の塩基配列からなることが好ましい。前記領域 ( $X c$ ) は、より好ましくは、前記領域 ( $X$ ) の前記部分領域と同じ塩基長であり、且つ、前記領域 ( $X c$ ) の全ての塩基が、前記領域 ( $X$ ) の前記部分領域の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補的であることが好ましい。前記領域 ( $X$ ) の前記部分領域は、例えば、前記領域 ( $X$ ) における、5' 末端の塩基 (1 番目の塩基) から連続する塩基配列からなる領域 (セグメント) であることが好ましい。

[0039] 前記 3' 側領域 ( $Y c$ ) は、前述のように、例えば、前記内部 3' 側領域 ( $Y$ ) の全領域に相補的でもよい。この場合、前記領域 ( $Y c$ ) は、例えば

、前記領域 (Y) と同じ塩基長であり、前記領域 (Y) の 5' 末端から 3' 末端の全領域に相補的な塩基配列からなることが好ましい。前記領域 (Y<sub>c</sub>) は、より好ましくは、前記領域 (Y) と同じ塩基長であり、且つ、前記領域 (Y<sub>c</sub>) の全ての塩基が、前記領域 (Y) の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補であることが好ましい。なお、これには制限されず、例えば、前述のように、1 もしくは数塩基が非相補的であってもよい。

[0040] また、前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>) は、前述のように、例えば、前記内部 3' 側領域 (Y) の部分領域に相補的でもよい。この場合、前記領域 (Y<sub>c</sub>) は、例えば、前記領域 (Y) の部分領域と同じ塩基長であり、すなわち、前記領域 (Y) よりも、1 塩基以上短い塩基長の塩基配列からなることが好ましい。前記領域 (Y<sub>c</sub>) は、より好ましくは、前記領域 (Y) の前記部分領域と同じ塩基長であり、且つ、前記領域 (Y<sub>c</sub>) の全ての塩基が、前記領域 (Y) の前記部分領域の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補であることが好ましい。前記領域 (Y) の前記部分領域は、例えば、前記領域 (Y) における、3' 末端の塩基 (1 番目の塩基) から連続する塩基配列からなる領域 (セグメント) であることが好ましい。

[0041] 本発明の s s N c 分子において、前記内部領域 (Z) の塩基数 (Z) と、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) および前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) との関係、前記内部領域 (Z) の塩基数 (Z) と、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) および前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>) の塩基数 (X<sub>c</sub>) との関係は、例えば、下記式 (1) および (2) の条件を満たす。

$$Z = X + Y \quad \cdots (1)$$

$$Z \geq X_c + Y_c \quad \cdots (2)$$

[0042] 本発明の s s N c 分子において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) と前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) の長さの関係は、特に制限されず、例えば、下記式のいずれの条件を満たしてもよい。

$$X = Y \quad \cdots (19)$$

$$X < Y \quad \cdots (20)$$

$$X > Y \quad \cdots (21)$$

[0043] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X)、前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>) の塩基数 (X<sub>c</sub>)、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) および前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>) の塩基数 (Y<sub>c</sub>) の関係は、例えば、下記 (a) ~ (d) のいずれかの条件を満たす。

(a) 下記式 (3) および (4) の条件を満たす。

$$X > X_c \quad \cdots (3)$$

$$Y = Y_c \quad \cdots (4)$$

(b) 下記式 (5) および (6) の条件を満たす。

$$X = X_c \quad \cdots (5)$$

$$Y > Y_c \quad \cdots (6)$$

(c) 下記式 (7) および (8) の条件を満たす。

$$X > X_c \quad \cdots (7)$$

$$Y > Y_c \quad \cdots (8)$$

(d) 下記式 (9) および (10) の条件を満たす。

$$X = X_c \quad \cdots (9)$$

$$Y = Y_c \quad \cdots (10)$$

[0044] 前記 (a) ~ (d) において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) と前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>) の塩基数 (X<sub>c</sub>) の差、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) と前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>) の塩基数 (Y<sub>c</sub>) の差は、例えば、下記条件を満たすことが好ましい。

(a) 下記式 (11) および (12) の条件を満たす。

$$X - X_c = 1 \sim 10、好ましくは 1、2、3 または 4、$$

$$\text{より好ましくは } 1、2 \text{ または } 3 \quad \cdots (11)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \cdots (12)$$

(b) 下記式 (13) および (14) の条件を満たす。

$$X - X_c = 0 \quad \cdots (13)$$



$Y - Y_c = 1 \sim 10$ 、好ましくは 1、2、3 または 4、

より好ましくは 1、2 または 3  $\cdots$  (14)

(c) 下記式 (15) および (16) の条件を満たす。

$X - X_c = 1 \sim 10$ 、好ましくは、1、2 または 3、

より好ましくは 1 または 2  $\cdots$  (15)

$Y - Y_c = 1 \sim 10$ 、好ましくは、1、2 または 3、

より好ましくは 1 または 2  $\cdots$  (16)

(d) 下記式 (17) および (18) の条件を満たす。

$X - X_c = 0 \cdots$  (17)

$Y - Y_c = 0 \cdots$  (18)

[0045] 前記 (a) ~ (d) の ssNc 分子について、それぞれの構造の一例を、図 3 の模式図に示す。図 3 は、前記 リンカー領域 ( $L_x$ ) および前記 リンカー領域 ( $L_y$ ) を含む ssNc であり、(A) は、前記 (a) の ssNc 分子、(B) は、前記 (b) の ssNc 分子、(C) は、前記 (c) の ssNc 分子、(D) は、前記 (d) の ssNc 分子の例である。図 3 において、点線は、自己アニーリングにより二重鎖を形成している状態を示す。図 3 の ssNc 分子は、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) と前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) を、前記式 (20) の  $X < Y$  として表わすが、これには制限されず、前述のように、前記式 (19) の  $X = Y$  でも、前記式 (21) の  $X > Y$  でもよい。また、図 3 は、あくまでも、前記内部 5' 側領域 (X) と前記 5' 側領域 ( $X_c$ ) との関係、前記内部 3' 側領域 (Y) と前記 3' 側領域 ( $Y_c$ ) との関係を示す模式図であり、例えば、各領域の長さ、形状等は、これには制限されず、また、リンカー領域 ( $L_x$ ) および リンカー領域 ( $L_y$ ) の有無も、これには制限されない。

[0046] 前記 (a) ~ (c) の ssNc 分子は、例えば、前記 5' 側領域 ( $X_c$ ) と前記内部 5' 側領域 (X)、および、前記 3' 側領域 ( $Y_c$ ) と前記内部 3' 側領域 (Y) が、それぞれ二重鎖を形成することによって、前記内部領域 (Z) において、前記 5' 側領域 ( $X_c$ ) および前記 3' 側領域 ( $Y_c$ )

のいずれともアライメントできない塩基を有する構造であり、二重鎖を形成しない塩基を有する構造ともいえる。前記内部領域 (Z) において、前記アライメントできない塩基 (二重鎖を形成しない塩基ともいう) を、以下、「フリー塩基」という。図3において、前記フリー塩基の領域を、「F」で示す。前記領域 (F) の塩基数は、特に制限されない。前記領域 (F) の塩基数 (F) は、例えば、前記 (a) の s s N c 分子の場合、「X<sub>c</sub> - X<sub>c</sub>」の塩基数であり、前記 (b) の s s N c 分子の場合、「Y<sub>c</sub> - Y<sub>c</sub>」の塩基数であり、前記 (c) の s s N c 分子の場合、「X<sub>c</sub> - X<sub>c</sub>」の塩基数と「Y<sub>c</sub> - Y<sub>c</sub>」の塩基数との合計数である。

[0047] 他方、前記 (d) の s s N c 分子は、例えば、前記内部領域 (Z) の全領域が、前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>) および前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>) とアライメントする構造であり、前記内部領域 (Z) の全領域が二重鎖を形成する構造ともいえる。なお、前記 (d) の s s N c 分子において、前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>) の 5' 末端と前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>) の 3' 末端は、未連結である。

[0048] 本発明の s s N c 分子について、各領域の長さを以下に例示するが、本発明は、これには制限されない。本発明において、例えば、塩基数の数値範囲は、その範囲に属する正の整数を全て開示するものであり、例えば、「1 ~ 4 塩基」との記載は、「1、2、3、4 塩基」の全ての開示を意味する (以下、同様)。

[0049] 前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>)、前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>)、および前記内部領域 (Z) における前記フリー塩基 (F) の塩基数の合計は、例えば、前記内部領域 (Z) の塩基数となる。このため、前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>) および前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>) の長さは、例えば、前記内部領域 (Z) の長さ、前記フリー塩基数 (F) およびその位置に応じて、適宜決定できる。

[0050] 前記内部領域 (Z) の塩基数は、例えば、19 塩基以上である。前記塩基数の下限は、例えば、19 塩基であり、好ましくは20 塩基であり、より好ましくは21 塩基である。前記塩基数の上限は、例えば、50 塩基であり、好ましくは40 塩基であり、より好ましくは30 塩基である。前記内部領域

(Z) の塩基数の具体例は、例えば、19塩基、20塩基、21塩基、22塩基、23塩基、24塩基、25塩基、26塩基、27塩基、28塩基、29塩基、または、30塩基である。

[0051] 前記内部領域 (Z) が前記発現抑制配列を含む場合、前記内部領域 (Z) は、例えば、前記発現抑制配列のみから構成される領域でもよいし、前記発現抑制配列を含む領域でもよい。前記発現抑制配列の塩基数は、例えば、19～30塩基であり、好ましくは、19、20または21塩基である。前記内部領域 (Z) が前記発現抑制配列を含む場合、前記発現抑制配列の5'側および／または3'側に、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列の塩基数は、例えば、1～31塩基であり、好ましくは、1～21塩基であり、より好ましくは、1～11塩基であり、さらに好ましくは、1～7塩基である。

[0052] 前記5'側領域 (Xc) の塩基数は、例えば、1～29塩基であり、好ましくは1～11塩基であり、より好ましくは1～7塩基であり、さらに好ましくは1～4塩基であり、特に好ましくは1塩基、2塩基、3塩基である。前記内部領域 (Z) または前記3'側領域 (Yc) が前記発現抑制配列を含む場合、例えば、このような塩基数が好ましい。具体例として、前記内部領域 (Z) の塩基数が、19～30塩基 (例えば、19塩基) の場合、前記5'側領域 (Xc) の塩基数は、例えば、1～11塩基であり、好ましくは1～7塩基であり、より好ましくは1～4塩基であり、さらに好ましくは1塩基、2塩基、3塩基である。

[0053] 前記5'側領域 (Xc) が前記発現抑制配列を含む場合、前記5'側領域 (Xc) は、例えば、前記発現抑制配列のみから構成される領域でもよいし、前記発現抑制配列を含む領域でもよい。前記発現抑制配列の長さは、例えば、前述の通りである。前記5'側領域 (Xc) が前記発現抑制配列を含む場合、前記発現抑制配列の5'側および／または3'側に、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列の塩基数は、例えば、1～11塩基であり、好ましくは、1～7塩基である。

- [0054] 前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数は、例えば、1 ~ 29 塩基であり、好ましくは 1 ~ 11 塩基であり、より好ましくは 1 ~ 7 塩基であり、さらに好ましくは 1 ~ 4 塩基であり、特に好ましくは 1 塩基、2 塩基、3 塩基である。前記内部領域 (Z) または前記 5' 側領域 (X c) が前記発現抑制配列を含む場合、例えば、このような塩基数が好ましい。具体例として、前記内部領域 (Z) の塩基数が、19 ~ 30 塩基 (例えば、19 塩基) の場合、前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数は、例えば、1 ~ 11 塩基であり、好ましくは 1 ~ 7 塩基であり、より好ましくは 1 ~ 4 塩基であり、さらに好ましくは 1 塩基、2 塩基、3 塩基である。
- [0055] 前記 3' 側領域 (Y c) が前記発現抑制配列を含む場合、前記 3' 側領域 (Y c) は、例えば、前記発現抑制配列のみから構成される領域でもよいし、前記発現抑制配列を含む領域でもよい。前記発現抑制配列の長さは、例えば、前述の通りである。前記 3' 側領域 (Y c) が前記発現抑制配列を含む場合、前記発現抑制配列の 5' 側および/または 3' 側に、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列の塩基数は、例えば、1 ~ 11 塩基であり、好ましくは、1 ~ 7 塩基である。
- [0056] 前述のように、前記内部領域 (Z)、前記 5' 側領域 (X c) および前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数は、例えば、前記式 (2) の  $|Z| \geq |X c| + |Y c|$  で表わすことができる。具体例として、 $|X c| + |Y c|$  の塩基数は、例えば、前記内部領域 (Z) と同じ、または、前記内部領域 (Z) より小さい。後者の場合、 $|Z| - (|X c| + |Y c|)$  は、例えば、1 ~ 10、好ましくは 1 ~ 4、より好ましくは 1、2 または 3 である。前記  $|Z| - (|X c| + |Y c|)$  は、例えば、前記内部領域 (Z) における前記フリー塩基の領域 (F) の塩基数 (F) に相当する。
- [0057] 本発明の ssNc 分子において、前記リンカー領域 (L x) および前記リンカー領域 (L y) の長さは、特に制限されない。前記リンカー領域 (L x) は、例えば、前記内部 5' 側領域 (X) と前記 5' 側領域 (X c) とが二重鎖を形成可能な長さであることが好ましく、前記リンカー領域 (L y) は

、例えば、前記内部 3' 側領域 (Y) と前記 3' 側領域 (Yc) とが二重鎖を形成可能な長さであることが好ましい。前記 リンカー領域 (Lx) および前記 リンカー領域 (Ly) の構成単位が塩基を含む場合、前記 リンカー領域 (Lx) および前記 リンカー領域 (Ly) のそれぞれの塩基数は、同じであっても異なってもよく、また、その塩基配列も、同じであっても異なってもよい。前記 リンカー領域 (Lx) および前記 リンカー領域 (Ly) の塩基数は、その下限が、例えば、1 塩基であり、好ましくは 2 塩基であり、より好ましくは 3 塩基であり、その上限が、例えば、100 塩基であり、好ましくは 80 塩基であり、より好ましくは 50 塩基である。前記各 リンカー領域の塩基数は、具体例として、例えば、1~50 塩基、1~30 塩基、1~20 塩基、1~10 塩基、1~7 塩基、1~4 塩基等が例示できるが、これには制限されない。

[0058] 本発明の ssNc 分子の全長は、特に制限されない。本発明の ssNc 分子において、前記塩基数の合計 (全長の塩基数) は、下限が、例えば、38 塩基であり、好ましくは 42 塩基であり、より好ましくは 50 塩基であり、さらに好ましくは 51 塩基であり、特に好ましくは 52 塩基であり、その上限は、例えば、300 塩基であり、好ましくは 200 塩基であり、より好ましくは 150 塩基であり、さらに好ましくは 100 塩基であり、特に好ましくは 80 塩基である。本発明の ssNc 分子において、前記 リンカー領域 (Lx) および リンカー領域 (Ly) を除く塩基数の合計は、下限が、例えば、38 塩基であり、好ましくは 42 塩基であり、より好ましくは 50 塩基であり、さらに好ましくは 51 塩基であり、特に好ましくは 52 塩基であり、上限が、例えば、300 塩基であり、好ましくは 200 塩基であり、より好ましくは 150 塩基であり、さらに好ましくは 100 塩基であり、特に好ましくは 80 塩基である。

[0059] 本発明の ssNc 分子の構成単位は、特に制限されず、例えば、ヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基およびデオキシリボヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチ

ド残基は、例えば、修飾されていない非修飾ヌクレオチド残基および修飾された修飾ヌクレオチド残基があげられる。本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、前記修飾ヌクレオチド残基を含むことによって、ヌクレアーゼ耐性を向上し、安定性を向上可能である。また、本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基の他に、さらに、非ヌクレオチド残基を含んでもよい。前記ヌクレオチド残基および前記非ヌクレオチド残基の詳細は、後述する。

[0060] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記内部領域 ( $Z$ )、前記 5' 側領域 ( $X c$ ) および前記 3' 側領域 ( $Y c$ ) の構成単位は、それぞれ、前記ヌクレオチド残基が好ましい。前記各領域は、例えば、下記 (1) ~ (3) の残基で構成される。

(1) 非修飾ヌクレオチド残基

(2) 修飾ヌクレオチド残基

(3) 非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

[0061] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記リンカー領域 ( $L x$ ) および前記リンカー領域 ( $L y$ ) の構成単位は、特に制限されず、例えば、前記ヌクレオチド残基および前記非ヌクレオチド残基があげられる。前記リンカー領域は、例えば、前記ヌクレオチド残基のみから構成されてもよいし、前記非ヌクレオチド残基のみから構成されてもよいし、前記ヌクレオチド残基と前記非ヌクレオチド残基から構成されてもよい。前記リンカー領域は、例えば、下記 (1) ~ (7) の残基で構成される。

(1) 非修飾ヌクレオチド残基

(2) 修飾ヌクレオチド残基

(3) 非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

(4) 非ヌクレオチド残基

(5) 非ヌクレオチド残基および非修飾ヌクレオチド残基

(6) 非ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

(7) 非ヌクレオチド残基、非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

[0062] 本発明の  $s s N c$  分子が、前記 リンカー領域 ( $L x$ ) および前記 リンカー領域 ( $L y$ ) の両方を有する場合、例えば、両方の構成単位が同じでもよいし、異なってもよい。具体例として、例えば、両方のリンカー領域の構成単位が前記ヌクレオチド残基である形態、両方のリンカー領域の構成単位が前記非ヌクレオチド残基である形態、一方の領域の構成単位が前記ヌクレオチド残基であり、他方のリンカー領域の構成単位が非ヌクレオチド残基である形態等があげられる。

[0063] 本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基のみから構成される分子、前記ヌクレオチド残基の他に前記非ヌクレオチド残基を含む分子等があげられる。本発明の  $s s N c$  分子において、前記ヌクレオチド残基は、前述のように、例えば、前記非修飾ヌクレオチド残基のみでもよいし、前記修飾ヌクレオチド残基のみでもよいし、前記非修飾ヌクレオチド残基および前記修飾ヌクレオチド残基の両方であってもよい。前記  $s s N c$  分子が、前記非修飾ヌクレオチド残基と前記修飾ヌクレオチド残基を含む場合、前記修飾ヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～5個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、最も好ましくは1または2個である。本発明の  $s s N c$  分子が、前記非ヌクレオチド残基を含む場合、前記非ヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～8個、1～6個、1～4個、1、2または3個である。

[0064] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基が好ましい。この場合、本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、「RNA分子」または「 $s s RNA$ 分子」ともいう。前記  $s s RNA$  分子は、例えば、前記リボヌクレオチド残基のみから構成される分子、前記リボヌクレオチド残基の他に前記非ヌクレオチド残基を含む分子があげられる。前記  $s s RNA$  分子において、前記リボヌクレオチド残基は、前述のように、例えば、前記非修飾リボヌクレオチド残基のみでもよいし、前記修飾リボヌクレオチド残基のみでもよいし、前記非修飾リボヌクレオチド残基および

前記修飾 リボヌクレオチド残基の両方を含んでもよい。

[0065] 前記 ssRNA 分子が、例えば、前記非修飾 リボヌクレオチド残基の他に前記修飾 リボヌクレオチド残基を含む場合、前記修飾 リボヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1 もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～5 個、好ましくは 1～4 個、より好ましくは 1～3 個、最も好ましくは 1 または 2 個である。前記非修飾 リボヌクレオチド残基に対する前記修飾 リボヌクレオチド残基は、例えば、リボース残基がデオキシリボース残基に置換された前記デオキシリボヌクレオチド残基であってもよい。前記 ssRNA 分子が、例えば、前記非修飾 リボヌクレオチド残基の他に前記デオキシリボヌクレオチド残基を含む場合、前記デオキシリボヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1 もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～5 個、好ましくは 1～4 個、より好ましくは 1～3 個、最も好ましくは 1 または 2 個である。

[0066] 本発明の ssNc 分子は、例えば、標識物質を含み、前記標識物質で標識化されてもよい。前記標識物質は、特に制限されず、例えば、蛍光物質、色素、同位体等があげられる。前記標識物質は、例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3 色素、Cy5 色素等の蛍光団があげられ、前記色素は、例えば、Alexa488 等の Alexa 色素等があげられる。前記同位体は、例えば、安定同位体および放射性同位体があげられ、好ましくは安定同位体である。前記安定同位体は、例えば、被ばくの危険性が少なく、専用の施設も不要であることから取り扱い性に優れ、また、コストも低減できる。また、前記安定同位体は、例えば、標識した化合物の物性変化がなく、トレーサーとしての性質にも優れる。前記安定同位体は、特に制限されず、例えば、 $^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{33}\text{S}$ 、 $^{34}\text{S}$  および  $^{36}\text{S}$  があげられる。

[0067] 本発明の ssNc 分子は、前述のように、前記標的遺伝子の発現抑制ができる。このため、本発明の ssNc 分子は、例えば、遺伝子が原因となる疾患の治療剤として使用できる。本発明の ssNc 分子が、例えば、前記発現



抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を含む場合、例えば、前記標的遺伝子の発現抑制により、前記疾患を治療できる。本発明において、「治療」は、例えば、前記疾患の予防、疾患の改善、予後の改善の意味を含み、いずれでもよい。

[0068] 本発明の s s N c 分子の使用方法は、特に制限されず、例えば、前記標的遺伝子を有する投与対象に、前記 s s N c 分子を投与すればよい。

[0069] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、*in vivo*でも*in vitro*でもよい。前記細胞は、特に制限されず、例えば、HeLa細胞、293細胞、NIH 3T3細胞、COS細胞等の各種培養細胞、ES細胞、造血幹細胞等の幹細胞、初代培養細胞等の生体から単離した細胞等があげられる。

[0070] 本発明において、発現抑制の対象となる前記標的遺伝子は、特に制限されず、所望の遺伝子を設定できる。そして、前述のように、前記標的遺伝子の種類に応じて、前記発現抑制配列を適宜設計すればよい。

[0071] 本発明の s s N c 分子の具体例を以下に示すが、本発明は、これには何ら制限されない。前記 s s N c 分子の塩基配列は、例えば、配列番号 2、7、8、13、14、29—35、37、43、44、47、48 および 51—80 の塩基配列が例示でき、また、前記塩基配列において、例えば、1もしくは数個の欠失、置換および/または付加された塩基配列でもよい。前記標的遺伝子が GAPDH 遺伝子の場合、例えば、配列番号 2、7、8、13、37 および 51—80 の塩基配列があげられ、標的遺伝子が TGF- $\beta$  1 の場合、例えば、配列番号 14 および 29—35 の塩基配列があげられ、前記標的遺伝子が LAMA1 遺伝子の場合、例えば、配列番号 43 および 44 の塩基配列があげられ、前記標的遺伝子が LMNA 遺伝子の場合、例えば、配列番号 47 および 48 の塩基配列があげられる。

[0072] 本発明の s s N c 分子の使用に関しては、後述する本発明の組成物、発現抑制方法および治療方法等の記載を参照できる。

[0073] 本発明の ssNc 分子は、前述のように、標的遺伝子の発現を抑制可能であることから、例えば、医薬品、診断薬および農薬、ならびに、農薬、医学、生命科学等の研究ツールとして有用である。

[0074] 2.  $\alpha$ ヌクレオチド残基

前記  $\alpha$ ヌクレオチド残基は、例えば、構成要素として、糖、塩基およびリン酸を含む。前記  $\alpha$ ヌクレオチド残基は、前述のように、例えば、リボヌクレオチド残基およびデオキシリボヌクレオチド残基があげられる。前記 リボヌクレオチド残基は、例えば、糖としてリボース残基を有し、塩基として、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) および U (ウラシル) を有し、前記デオキシリボース残基は、例えば、糖としてデオキシリボース残基を有し、塩基として、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) およびチミン (T) を有する。

[0075] 前記  $\alpha$ ヌクレオチド残基は、未修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基および修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基があげられる。前記未修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基は、前記各構成要素が、例えば、天然に存在するものと同一または実質的に同一であり、好ましくは、人体において天然に存在するものと同一または実質的に同一である。

[0076] 前記修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基は、例えば、前記未修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基を修飾した  $\alpha$ ヌクレオチド残基である。前記修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基は、例えば、前記未修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基の構成要素のいずれが修飾されてもよい。本発明において、「修飾」は、例えば、前記構成要素の置換、付加および/または欠失、前記構成要素における原子および/または官能基の置換、付加および/または欠失であり、「改変」ということができる。前記修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基は、例えば、天然に存在する  $\alpha$ ヌクレオチド残基、人工的に修飾した  $\alpha$ ヌクレオチド残基等があげられる。前記天然由来の修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基は、例えば、リンバックら (Limbach et al. に、1994、Summary: the modified nucleosides of RNA、Nucleic Acids Res. 22:2183~2196) を参照できる。また、前記修飾  $\alpha$ ヌクレオチド残基は、例えば、前記  $\alpha$ ヌクレオチド残基

ドの代替物の残基であつてもよい

[0077] 前記ヌクレオチド残基の修飾は、例えば、リボース—リン酸骨格（以下、リボリン酸骨格）の修飾があげられる。

[0078] 前記リボリン酸骨格において、例えば、リボース残基を修飾できる。前記リボース残基は、例えば、2'位炭素を修飾でき、具体的には、例えば、2'位炭素に結合する水酸基を、水素またはフルオロ等のハロゲンに置換できる。前記2'位炭素の水酸基を水素に置換することで、リボース残基をデオキシリボースに置換できる。前記リボース残基は、例えば、立体異性体に置換でき、例えば、アラビノース残基に置換してもよい。

[0079] 前記リボリン酸骨格は、例えば、非リボース残基および/または非リン酸を有する非リボリン酸骨格に置換してもよい。前記非リボリン酸骨格は、例えば、前記リボリン酸骨格の非荷電体があげられる。前記非リボリン酸骨格に置換された、前記ヌクレオチドの代替物は、例えば、モルホリノ、シクロプチル、ピロリジン等があげられる。前記代替物は、この他に、例えば、人工核酸モノマー残基があげられる。具体例として、例えば、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）、ENA（2'-O, 4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acid）等があげられ、好ましくはPNAである。

[0080] 前記リボリン酸骨格において、例えば、リン酸基を修飾できる。前記リボリン酸骨格において、糖残基に最も隣接するリン酸基は、 $\alpha$ リン酸基と呼ばれる。前記 $\alpha$ リン酸基は、負に荷電し、その電荷は、糖残基に非結合の2つの酸素原子にわたって、均一に分布している。前記 $\alpha$ リン酸基における4つの酸素原子のうち、ヌクレオチド残基間のホスホジエステル結合において、糖残基と非結合である2つの酸素原子は、以下、非結合（non-linking）酸素」ともいう。他方、前記ヌクレオチド残基間のホスホジエステル結合において、糖残基と結合している2つの酸素原子は、以下、結合（linking）酸素」という。前記 $\alpha$ リン酸基は、例えば、非荷電となる修飾、または、前記非結合酸素における電荷分布が非対称型となる修飾を

行うことが好ましい。

[0081] 前記リン酸基は、例えば、前記非結合酸素を置換してもよい。前記酸素は、例えば、S（硫黄）、Se（セレン）、B（ホウ素）、C（炭素）、H（水素）、N（窒素）およびOR（Rは、アルキル基またはアリール基）のいずれかの原子で置換でき、好ましくは、Sで置換される。前記非結合酸素は、例えば、両方が置換されていることが好ましく、より好ましくは、両方がSで置換される。前記修飾リン酸基は、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフエート、ボラノホスフエートエステル、ホスホネート水素、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステル等があげられ、中でも、前記2つの非結合酸素が両方ともSで置換されているホスホロジチオエートが好ましい。

[0082] 前記リン酸基は、例えば、前記結合酸素を置換してもよい。前記酸素は、例えば、S（硫黄）、C（炭素）およびN（窒素）のいずれかの原子で置換でき。前記修飾リン酸基は、例えば、Nで置換した架橋ホスホロアミデート、Sで置換した架橋ホスホロチオエート、およびCで置換した架橋メチレンホスホネート等があげられる。前記結合酸素の置換は、例えば、本発明のssNc分子の5'末端ヌクレオチド残基および3'末端ヌクレオチド残基の少なくとも一方において行うことが好ましく、5'側の場合、Cによる置換が好ましく、3'側の場合、Nによる置換が好ましい。

[0083] 前記リン酸基は、例えば、前記リン非含有のリンカーに置換してもよい。前記リンカーは、例えば、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキサイドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノ等を含み、好ましくは、メチレンカルボニルアミノ基およびメチレンメチルイミノ基を含む。

- [0084] 本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、3' 末端および5' 末端の少なくとも一方のヌクレオチド残基が修飾されてもよい。前記修飾は、例えば、3' 末端および5' 末端のいずれか一方でもよいし、両方でもよい。前記修飾は、例えば、前述の通りであり、好ましくは、末端のリン酸基に行うことが好ましい。前記リン酸基は、例えば、全体を修飾してもよいし、前記リン酸基における1つ以上の原子を修飾してもよい。前者の場合、例えば、リン酸基全体の置換でもよいし、欠失でもよい。
- [0085] 前記末端のヌクレオチド残基の修飾は、例えば、他の分子の付加があげられる。前記他の分子は、例えば、前述のような標識物質、保護基等の機能性分子があげられる。前記保護基は、例えば、S（硫黄）、Si（ケイ素）、B（ホウ素）、エステル含有基等があげられる。前記標識物質等の機能性分子は、例えば、本発明の  $s s N c$  分子の検出等に利用できる。
- [0086] 前記他の分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基のリン酸基に付加してもよいし、スペーサーを介して、前記リン酸基または前記糖残基に付加してもよい。前記スペーサーの末端原子は、例えば、前記リン酸基の前記結合酸素、または、糖残基のO、N、SもしくはCに、付加または置換できる。前記糖残基の結合部位は、例えば、3' 位のCもしくは5' 位のC、またはこれらに結合する原子が好ましい。前記スペーサーは、例えば、前記PNA等のヌクレオチド代替物の末端原子に、付加または置換することもできる。
- [0087] 前記スペーサーは、特に制限されず、例えば、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ 、無塩基糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、およびモルホリノ等、ならびに、ビオチン試薬およびフルオレセイン試薬等を含んでもよい。前記式において、 $n$  は、正の整数であり、 $n = 3$  または6 が好ましい。
- [0088] 前記末端に付加する分子は、これらの他に、例えば、色素、インターカラー剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ソラレン、マイトマイシ

ンC)、ポルフィリン(TPPC4、テキサフィリン、サッフイリン)、多環式芳香族炭化水素(例えば、フエナジン、ジヒドロフエナジン)、人エエンドヌクレアーゼ(例えば、EDTA)、親油性担体(例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-0(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、03-(オレオイル)リトコール酸、03-(オレオイル)コール酸、ジメトキシトリチル、またはフエノキサジン)およびペプチド複合体(例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド)、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、PEG(例えば、PEG-40K)、MPEG、[MPEG]<sub>2</sub>、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射線標識マーカ、酵素、ハプテン(例えば、ビオチン)、輸送/吸収促進剤(例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ(例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール複合体、テトラアザマクロ環のEu<sup>3+</sup>複合体)等があげられる。

[0089] 本発明のssNc分子は、前記5'末端が、例えば、リン酸基またはリン酸基アナログで修飾されてもよい。前記リン酸基は、例えば、5'-リン酸((H0)<sub>2</sub>(0)P-0-5')、5'-二リン酸((H0)<sub>2</sub>(0)P-0-P(H0)(0)-0-5')、5'-三リン酸((H0)<sub>2</sub>(0)P-0-(H0)(0)P-0-P(H0)(0)-0-5')、5'-グアノシンキヤップ(7-メチル化または非メチル化、7m-G-0-5'-(H0)(0)P-O-(H0)(0)P-0-P(H0)(0)-0-5')、5'-アデノシンキヤップ(Appp)、任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキヤップ構造(N-0-5'-(H0)(0)P-0-(H0)(0)P-0-P(H0)(0)-0-5')、5'-チオリン酸(ホスホロチオエート:(H0)<sub>2</sub>(S)P-0-5',)、5'-ジチオリン酸(ホスホロジチオエート:(H0)(HS)(S)P-0-5',)、5'-ホスホロチオール酸((H0)<sub>2</sub>(0)P-S-5')、硫黄置換の-リン酸、二リン酸および三リン酸(例えば、5'-α-チオ三リン酸、5'-アーチオ三リン酸等)、5'-ホスホルアミデート((H0)<sub>2</sub>(0)P-NH-5'、(H0)(NH<sub>2</sub>)(0)P-

0-5' )、5' —アルキルホスホン酸 (例えば、 $\text{RP(OH)(O)-O-5'}$ 、 $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P-5'}$ 、 $\text{-CH}_2$ 、Rはアルキル (例えば、メチル、エチル、イソプロピル、プロピル等))、5' —アルキルエーテルホスホン酸 (例えば、 $\text{RP(OH)(O)-O-5'}$ 、Rはアルキルエーテル (例えば、メトキシメチル、エトキシメチル等))等があげられる。

[0090] 前記ヌクレオチド残基において、前記塩基は、特に制限されない。前記塩基は、例えば、天然の塩基でもよいし、非天然の塩基でもよい。前記塩基は、例えば、天然由来でもよいし、合成品でもよい。前記塩基は、例えば、一般的な塩基、その修飾アナログ等が使用できる。

[0091] 前記塩基は、例えば、アデニンおよびグアニン等のプリン塩基、シトシン、ウラシルおよびチミン等のピリミジン塩基があげられる。前記塩基は、この他に、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌバラリン (nubularine)、イソグアニシン (isoguanisine)、ツベルシジン (tubercidine) 等があげられる。前記塩基は、例えば、2 \_ アミノアデニン、6 \_ メチル化プリン等のアルキル誘導体 ; 2 \_ プロピル化プリン等のアルキル誘導体 ; 5 \_ ハロウラシルおよび 5 \_ ハロシトシン ; 5 \_ プロピニルウラシルおよび 5 \_ プロピニルシトシン ; 6 \_ アゾウラシル、6 \_ アゾシトシンおよび 6 \_ アゾチミン ; 5 \_ ウラシル (プソイドウラシル)、4 \_ チオウラシル、5 \_ ハロウラシル、5 \_ (2 \_ アミノプロピル)ウラシル、5 \_ アミノアリルウラシル ; 8 \_ ハロ化、アミノ化、チオール化、チオアルキル化、ヒドロキシル化および他の 8 \_ 置換プリン ; 5 \_ トリフルオロメチル化および他の 5 \_ 置換ピリミジン ; 7 \_ メチルデアニン ; 5 \_ 置換ピリミジン ; 6 \_ アザピリミジン ; N \_ 2、N \_ 6、および 0 \_ 6 置換プリン (2 \_ アミノプロピルアデニンを含む) ; 5 \_ プロピニルウラシルおよび 5 \_ プロピニルシトシン ; ジヒドロウラシル ; 3 \_ デアザ \_ 5 \_ アザシトシン ; 2 \_ アミノプリン ; 5 \_ アルキルウラシル ; 7 \_ アルキルグアニン ; 5 \_ アルキルシトシン ; 7 \_ デアザアデニン ; N 6、N 6 \_ ジメチルアデニン ; 2、6 \_ ジアミノプリン ; 5 \_ アミノアリル \_ ウラシル ; N

3 —メチル ウラシル ; 置換 1 , 2 , 4 \_ トリアゾール ; 2 \_ ピリジノン ; 5 —ニトロインドル ; 3 —ニトロピロール ; 5 —メトキシウラシル ; ウラシル — 5 —オキシ酢酸 ; 5 —メトキシカルボニルメチルウラシル ; 5 \_ メチル - 2 —チオウラシル ; 5 —メトキシカルボニルメチル - 2 —チオウラシル ; 5 \_ メチルアミノメチル - 2 \_ チオウラシル ; 3 \_ ( 3 —アミノ - 3 \_ カルボキシプロピル ) ウラシル ; 3 —メチルシトシン ; 5 —メチルシトシン ; N 4 —アセチルシトシン ; 2 —チオシトシン ; N 6 \_ メチルアデニン ; N 6 \_ イソペンチルアデニン ; 2 —メチルチオ \_ N 6 \_ イソペンテニルアデニン ; N —メチルデアニン ; 0 \_ アルキル化塩基等があげられる。また、プリンおよびピリミジンは、例えば、米国特許第 3 , 6 8 7 , 8 0 8 号、*Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*、858~859 頁、クロシュビツジェーアイ (Kroschwitz J. に) 編、John Wiley & Sons、1990、およびイングリツシュら (Englis ch ら)、*Angewandte Chemie, International Edition*、1991、30 巻、p. 613 に開示されるものが含まれる。

[0092] 前記修飾ヌクレオチド残基は、これらの他に、例えば、塩基を欠失する残基、すなわち、無塩基のリボリン酸骨格を含んでもよい。また、前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、米国仮出願第 60 / 4 6 5 , 6 6 5 号 (出願日 : 2003 年 4 月 25 日)、および国際出願第 PCT / US 04 / 07070 号 (出願日 : 2004 年 3 月 8 日) に記載される残基が使用でき、本発明は、これらの文献を援用できる。

### [0093] 3. 非ヌクレオチド残基

前記非ヌクレオチド残基は、特に制限されない。本発明の ssNc 分子は、例えば、前記非ヌクレオチド残基として、ピロリジン骨格またはピペリジン骨格を含む非ヌクレオチド構造を有してもよい。前記非ヌクレオチド残基は、例えば、前記リンカー領域 (Lx) および前記リンカー領域 (Ly) の



少なくとも一方に有することが好ましい。前記非ヌクレオチド残基は、例えば、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) に有してもよいし、前記リンカー領域 ( $L_y$ ) に有してもよいし、両方の前記リンカー領域に有してもよい。前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) は、例えば、同じでもよいし、異なってもよい。

[0094] 前記ピロリジン骨格は、例えば、ピロリジンの5員環を構成する炭素が、1個以上、置換されたピペリジン誘導体の骨格でもよく、置換される場合、例えば、C-2の炭素以外の炭素原子であることが好ましい。前記炭素は、例えば、窒素、酸素、または硫黄で置換されてもよい。前記ピロリジン骨格は、例えば、ピロリジンの5員環内に、例えば、炭素—炭素二重結合、または、炭素—窒素二重結合を含んでもよい。前記ピロリジン骨格において、ピロリジンの5員環を構成する炭素および窒素は、例えば、水素基が結合してもよいし、後述するような置換基が結合してもよい。前記リンカー領域 ( $L_x$ ) は、例えば、前記ピロリジン骨格のいずれの基を介して、前記領域 ( $X$ ) および前記領域 ( $X_c$ ) と結合してもよく、好ましくは、前記5員環のいずれか一つの炭素原子と窒素であり、好ましくは、前記5員環の2位の炭素 (C-2) と窒素である。前記ピロリジン骨格としては、例えば、プロリン骨格、プロリノール骨格等があげられる。前記プロリン骨格およびプロリノール骨格等は、例えば、生体内物質およびその還元体であるため、安全性にも優れる。

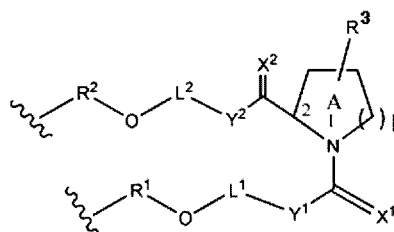
[0095] 前記ピペリジン骨格は、例えば、ピペリジンの6員環を構成する炭素が、1個以上、置換されたピペリジン誘導体の骨格でもよく、置換される場合、例えば、C-2の炭素以外の炭素原子であることが好ましい。前記炭素は、例えば、窒素、酸素、または硫黄で置換されてもよい。前記ピペリジン骨格は、例えば、ピペリジンの6員環内に、例えば、炭素—炭素二重結合、または、炭素—窒素二重結合を含んでもよい。前記ピペリジン骨格において、ピペリジンの6員環を構成する炭素および窒素は、例えば、水素基が結合してもよいし、後述するような置換基が結合してもよい。前記リンカー領域 ( $L$

x) は、例えば、前記ピペリジン骨格のいずれの基を介して、前記領域 (x) および前記領域 (xc) と結合してもよく、好ましくは、前記6員環のいずれか一つの炭素原子と窒素であり、好ましくは、前記6員環の2位の炭素 (C-2) と窒素である。前記リンカー領域 (Ly) についても同様である。

[0096] 前記リンカー領域は、例えば、前記非ヌクレオチド構造からなる非ヌクレオチド残基のみでもよいし、前記非ヌクレオチド構造からなる非ヌクレオチド残基と、ヌクレオチド残基とを含んでもよい。

[0097] 前記リンカー領域は、例えば、下記式 (I) で表わされる。

[化1]



... (I)

[0098] 前記式 (I) 中、

X<sup>1</sup> および X<sup>2</sup> は、それぞれ独立して、H<sub>2</sub>、O、S または NH であり；

Y<sub>1</sub> および Y<sub>2</sub> は、それぞれ独立して、単結合、CH<sub>2</sub>、NH、O または S であり；

R<sup>3</sup> は、環 A 上の C-3、C-4、C-5 または C-6 に結合する水素原子または置換基であり、

前記置換基は、OH、OR<sup>4</sup>、NH<sub>2</sub>、NHR<sup>4</sup>、NR<sup>4</sup>Rs、SH、SR<sup>4</sup> またはオキシ基 (=O) であり；

R<sup>3</sup> が前記置換基の場合、置換基 R<sup>3</sup> は、1 でも複数でも、存在しなくてもよく、複数の場合、同一でも異なってもよく；

R<sup>4</sup> および R<sup>5</sup> は、置換基または保護基であり、同一でも異なってもよく；

L<sub>1</sub> は、n 個の原子からなるアルキレン鎖であり、ここで、アルキレン炭素原子上の水素原子は、OH、OR<sup>a</sup>、NH<sub>2</sub>、NHR<sup>a</sup>、NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>、SH もしくは

S R<sup>a</sup>で置換されても置換されていなくてもよく、または、

L<sup>1</sup>は、前記アルキレン鎖の一つ以上の炭素原子が、酸素原子で置換されたポリエーテル鎖であり、

ただし、Y<sup>1</sup>が、NH、O またはS の場合、Y<sup>1</sup>に結合するL<sup>1</sup>の原子は炭素であり、OR<sup>i</sup>に結合するL<sup>i</sup>の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接せず；

L<sup>2</sup>は、m個の原子からなるアルキレン鎖であり、ここで、アルキレン炭素原子上の水素原子は、OH、OR<sup>c</sup>、NH<sub>2</sub>、NHR<sup>c</sup>、NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>、SHもしくはSR<sup>c</sup>で置換されても置換されていなくてもよく、または、

L<sup>2</sup>は、前記アルキレン鎖の一つ以上の炭素原子が、酸素原子で置換されたポリエーテル鎖であり、

ただし、Y<sup>2</sup>が、NH、O またはS の場合、Y<sup>2</sup>に結合するL<sup>2</sup>の原子は炭素であり、OR<sup>2</sup>に結合するL<sup>2</sup>の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接せず；

R<sup>a</sup>、R<sup>b</sup>、R<sup>c</sup>およびR<sup>d</sup>は、それぞれ独立して、置換基または保護基であり；

l は、1 または2 であり；

m は、0 ~ 30 の範囲の整数であり；

n は、0 ~ 30 の範囲の整数であり；

環A は、前記環A 上のC<sub>2</sub>以外の1個の炭素原子が、窒素、酸素、または硫黄で置換されてもよく、

前記環A 内に、炭素—炭素二重結合、または、炭素—窒素二重結合を含んでもよい。前記リンカー領域 (L<sub>x</sub>) が前記式 (1) で表わされる場合、前記領域 (X<sub>c</sub>) および前記領域 (X) は、それぞれ、—O—F<sub>1/2</sub>— または —O—R<sub>2</sub>—を介して、前記リンカー領域 (L<sub>x</sub>) に結合する。また、前記リンカー領域 (L<sub>y</sub>) が前記式 (1) で表わされる場合、前記領域 (Y<sub>c</sub>) および前記領域 (Y) は、それぞれ、—O—R<sub>1</sub>— または —O—R<sub>2</sub>—を介して、前記リンカー領域 (L<sub>y</sub>) に結合する。ここで、F<sub>1/2</sub> および F<sub>2</sub> は、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記構造 (I) である。

- [0099] 前記式 (I) 中、 $X^1$  および  $X^2$  は、例えば、それぞれ独立して、 $H_2$ 、 $O$ 、 $S$  または  $NH$  である。前記式 (I) 中において、 $X^1$  が  $H_2$  であるとは、 $X^1$  が、 $X^1$  の結合する炭素原子とともに、 $CH_2$  (メチレン基) を形成することを意味する。 $X^2$  についても同様である。
- [0100] 前記式 (I) 中、環 A において、 $l$  は、1 または 2 である。 $l = 1$  の場合、環 A は、5 員環であり、例えば、前記ピロリジン骨格である。前記ピロリジン骨格は、例えば、プロリン骨格、プロリノール骨格等があげられ、これらの二価の構造が例示できる。 $l = 2$  の場合、環 A は、6 員環であり、例えば、前記ピペリジン骨格である。環 A は、環 A 上の C—2 以外の 1 個の炭素原子が、窒素、酸素または硫黄で置換されてもよい。また、環 A は、環 A 内に、炭素—炭素二重結合または炭素—窒素二重結合を含んでもよい。環 A は、例えば、L 型および D 型のいずれでもよい。
- [0101] 前記式 (I) 中、 $Y$  および  $Y^2$  は、それぞれ独立して、単結合、 $CH_2$ 、 $NH$ 、 $O$  または  $S$  である。
- [0102] 前記式 (I) 中、 $R^3$  は、環 A 上の C—3、C—4、C—5 または C—6 に結合する水素原子または置換基である。前記置換基は、 $OH$ 、 $OR^4$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^4$ 、 $NR^4R^5$ 、 $SH$ 、 $SR^4$  またはオキソ基 ( $=O$ ) である。 $R^3$  が前記置換基の場合、置換基  $R^3$  は、1 でも複数でも、存在しなくてもよく、複数の場合、同一でも異なってもよい。 $R^4$  および  $R^5$  は、置換基または保護基であり、同一でも異なってもよい。
- [0103] 前記置換基は、例えば、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキルアルキル、シクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アミノアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリールアルキル、シリル、シリルオキシアルキル等があげられる。以下、同様である。
- [0104] 前記保護基は、例えば、反応性の高い官能基を不活性に変換する官能基であり、公知の保護基等があげられる。前記保護基は、例えば、文献 (L F

W. McOmie, *Protecting Groups in Organic Chemistry* (Penguin Press, London and New York, 1973) の記載を援用できる。前記保護基は、特に制限されず、例えば、tert-ブチルジメチルシリル (TBDMs) 基、ビス (2-アセトキシエチルオキシ) メチル (ACE) 基、トリイソプロピルシリルオキシメチル (TOM) 基、1-(2-シアノエトキシ) エチル (CEE) 基、2-シアノエトキシメチル (CEM) 基およびトリルスルフォニルエトキシメチル (TEM) 基、ジメトキシトリチル (DMTr) 等があげられる。R<sup>3</sup>がOR<sup>4</sup>の場合、前記保護基は、特に制限されず、例えば、TBDMs基、ACE基、TOM基、CEE基、CEM基およびTEM基等があげられる。この他にも、後述するシリル含有基等もあげられる。以下、同様である。

[0105] 前記式 (I) 中、L<sup>1</sup>は、n個の原子からなるアルキレン鎖である。前記アルキレン炭素原子上の水素原子は、例えば、OH、OR<sup>a</sup>、NH<sub>2</sub>、NHR<sup>a</sup>、NRR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>、SHもしくはSR<sup>a</sup>で置換されてもよいし、置換されていなくてもよい。または、L<sup>1</sup>は、前記アルキレン鎖の一つ以上の炭素原子が酸素原子で置換されたポリエーテル鎖でもよい。前記ポリエーテル鎖は、例えば、ポリエチレングリコールである。なお、Y<sup>1</sup>が、NH、OまたはSの場合、Y<sup>1</sup>に結合するL<sup>1</sup>の原子は炭素であり、OR<sup>1</sup>に結合するL<sup>1</sup>の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接しない。つまり、例えば、Y<sup>1</sup>がOの場合、その酸素原子とL<sup>1</sup>の酸素原子は隣接せず、OR<sup>1</sup>の酸素原子とL<sup>1</sup>の酸素原子は隣接しない。

[0106] 前記式 (I) 中、L<sup>2</sup>は、m個の原子からなるアルキレン鎖である。前記アルキレン炭素原子上の水素原子は、例えば、OH、OR<sup>c</sup>、NH<sub>2</sub>、NHR<sup>c</sup>、NRR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>、SHもしくはSR<sup>c</sup>で置換されてもよいし、置換されていなくてもよい。または、L<sup>2</sup>は、前記アルキレン鎖の一つ以上の炭素原子が酸素原子で置換されたポリエーテル鎖でもよい。なお、Y<sup>2</sup>が、NH、OまたはSの場合、Y<sup>2</sup>に結合するL<sup>2</sup>の原子は炭素であり、OR<sup>2</sup>に結合するL<sup>2</sup>の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接しない。つまり、例えば、Y<sup>2</sup>がOの場合、その

酸素原子と $L^2$ の酸素原子は隣接せず、 $O^R$ の酸素原子と $L^2$ の酸素原子は隣接しない。

- [01 07]  $L^1$ の $n$ および $L^2$ の $m$ は、特に制限されず、それぞれ、下限は、例えば、0であり、上限も、特に制限されない。 $n$ および $m$ は、例えば、前記リンカー領域 ( $L^x$ ) の所望の長さに応じて、適宜設定できる。 $n$ および $m$ は、例えば、製造コストおよび収率等の点から、それぞれ、0～30が好ましく、より好ましくは0～20であり、さらに好ましくは0～15である。 $n$ と $m$ は、同じでもよいし ( $n = m$ )、異なってもよい。 $n + m$ は、例えば、0～30であり、好ましくは0～20であり、より好ましくは0～15である。
- [01 08]  $R^a$ 、 $R^b$ 、 $f_{\frac{1}{2}}$ および $f_{\frac{3}{2}}$ は、それぞれ独立して、置換基または保護基が与えられる。前記置換基および前記保護基は、例えば、前述と同様である。
- [01 09] 前記式 (I) において、水素原子は、例えば、それぞれ独立して、C、Si、Br、FおよびI等のハロゲンに置換されてもよい。
- [01 10] 前記リンカー領域 ( $L^x$ ) が、前記式 (I) で表わされる場合、前記領域 ( $X^c$ ) および前記領域 ( $X$ ) は、例えば、それぞれ、 $-O-R^1-$  または  $-O-R^2-$  を介して、前記リンカー領域 ( $L^x$ ) に結合する。ここで、 $R^1$ および $R^2$ は、存在しても存在しなくてもよい。 $R^1$ および $R^2$ が存在する場合、 $R^1$ および $R^2$ は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記式 (I) の構造である。 $R^1$ および/または $R^2$ が前記ヌクレオチド残基の場合、前記リンカー領域 ( $L^x$ ) は、例えば、ヌクレオチド残基 $R^1$ および/または $R^2$ を除く前記式 (I) の構造からなる前記非ヌクレオチド残基と、前記ヌクレオチド残基とから形成される。 $R^1$ および/または $R^2$ が前記式 (I) の構造の場合、前記リンカー領域 ( $L^x$ ) は、例えば、前記式 (I) の構造からなる前記非ヌクレオチド残基が、2つ以上連結された構造となる。前記式 (I) の構造は、例えば、1個、2個、3個または4個含んでもよい。このように、前記構造を複数含む場合、前記 (I) の構造は、例えば、直接連結されてもよいし、前記ヌクレオチド残基を介して結合してもよい。他方、 $R^1$ および $R^2$ が存在しない場合、前記リンカー領域 ( $L^x$ ) は、例えば、前記式 (I) の

構造からなる前記非ヌクレオチド残基のみから形成される。また、前記リンカー領域 ( $L_y$ ) が、前記式 (I) で表わされる場合、例えば、前記領域 ( $Y_c$ )、前記領域 ( $Y$ ) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) について、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) の説明を援用できる。

[01 11] 前記領域 ( $X_c$ ) および前記領域 ( $X$ )、ならびに、前記領域 ( $Y_c$ ) および前記領域 ( $Y$ ) と、前記  $-OR^1-$  および  $-OR^2-$  との結合の組合せは、特に制限されず、例えば、以下のいずれかの条件があげられる。

条件 (1)

前記領域 ( $X_c$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記領域 ( $X$ ) は、 $-OR^1-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合し、

前記領域 ( $Y_c$ ) は、 $-OR^1-$  を介して、前記領域 ( $Y$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合する。

条件 (2)

前記領域 ( $X_c$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記領域 ( $X$ ) は、 $-OR^1-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合し、

前記領域 ( $Y_c$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記領域 ( $Y$ ) は、 $-OR^1-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合する。

条件 (3)

前記領域 ( $X_c$ ) は、 $-OR^1-$  を介して、前記領域 ( $X$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合し、

前記領域 ( $Y_c$ ) は、 $-OR^1-$  を介して、前記領域 ( $Y$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合する。

条件 (4)

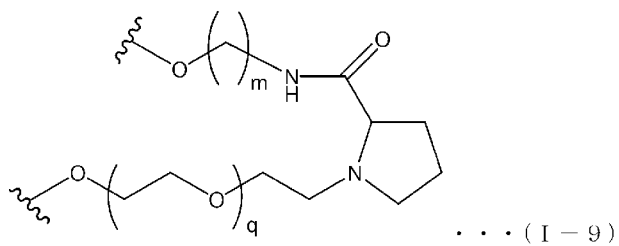
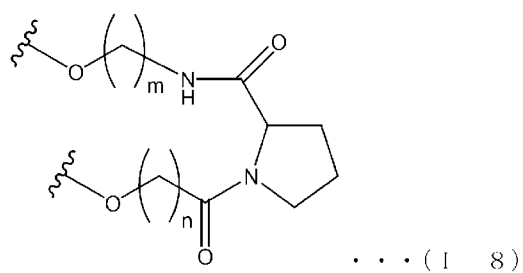
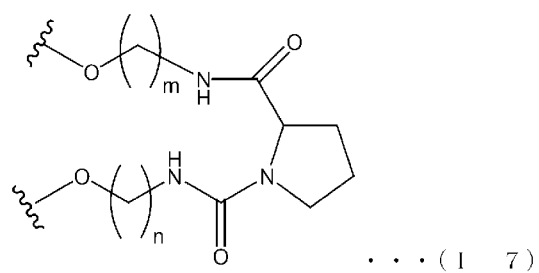
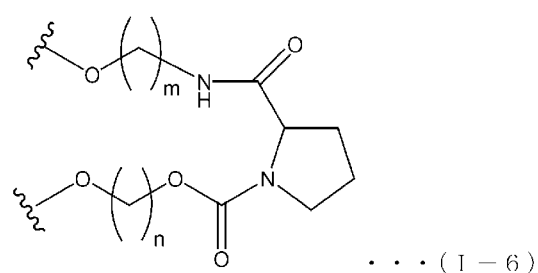
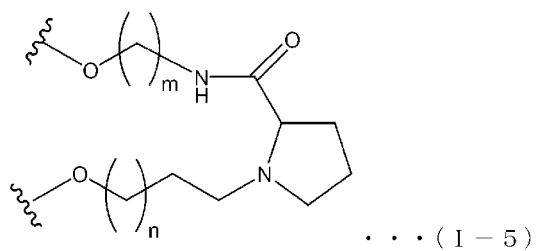
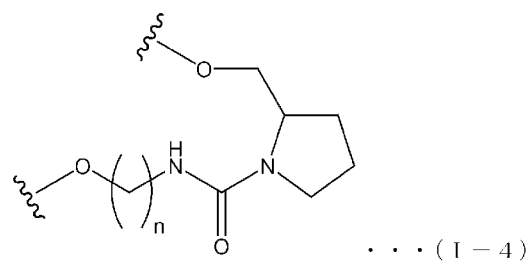
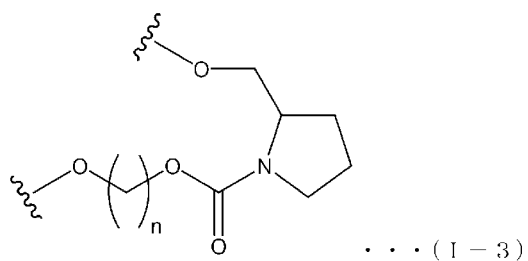
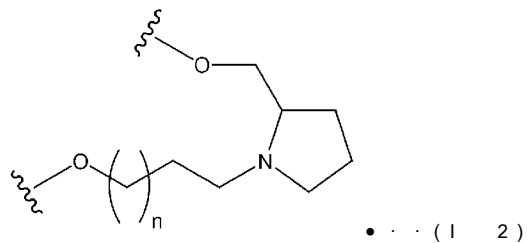
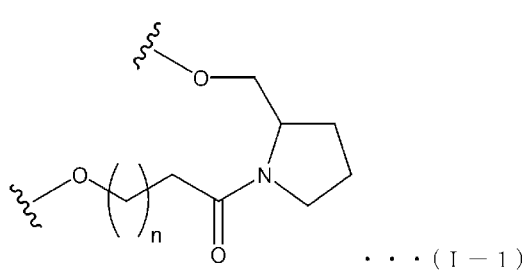
前記領域 ( $X_c$ ) は、 $-OR^1-$  を介して、前記領域 ( $X$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合し、

前記領域 ( $Y_c$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記領域 ( $Y$ ) は、 $-OR^i-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合する。

[01 12] 前記式 (I) の構造は、例えば、下記式 (I\_1) ~ 式 (I\_9) が例示

でき、下記式において、 $n$  および  $m$  は、前記式 (I) と同じである。下記式において、 $q$  は、0 ~ 10 の整数である。

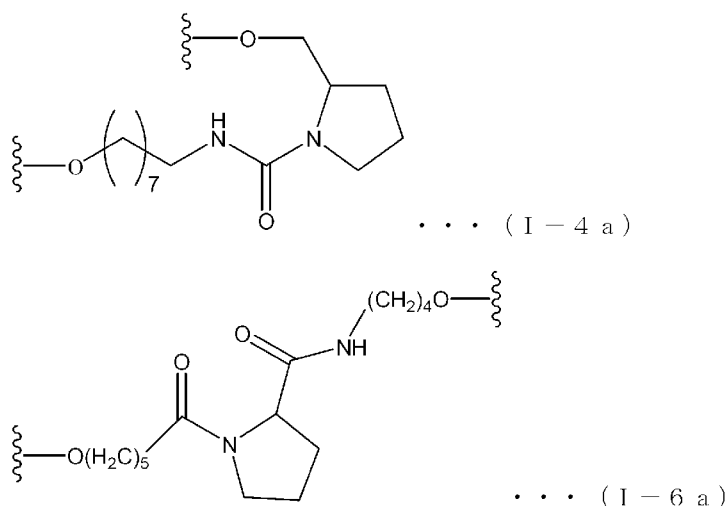
[化2]





[01 13] 前記式 (1—1) ~ (I—9) において、 $n$ 、 $m$  および  $q$  は、特に制限されず、前述の通りである。具体例として、前記式 (I—1) において、 $n = 8$ 、前記 (I—2) において、 $n = 3$ 、前記式 (I—3) において、 $n = 4$  または 8、前記 (I—4) において、 $n = 7$  または 8、前記式 (I—5) において、 $n = 3$  および  $m = 4$ 、前記 (I—6) において、 $n = 8$  および  $m = 4$ 、前記式 (I—7) において、 $n = 8$  および  $m = 4$ 、前記 (I—8) において、 $n = 5$  および  $m = 4$ 、前記式 (I—9) において、 $q = 1$  および  $m = 4$  があげられる。前記式 (I—4) の一例 ( $n = 8$ ) を、下記式 (I—4 a) に、前記式 (I—6) の一例 ( $n = 5$ 、 $m = 4$ ) を、下記式 (I—6 a) に示す。

[化3]



[01 14] 本発明において、「アルキル」は、例えば、直鎖状または分枝状のアルキル基を含む。前記アルキルの炭素数は、特に制限されず、例えば、1~30であり、好ましくは、1~6または1~4である。前記アルキル基は、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチル、イソブチル、 $sec$ -ブチル、 $tert$ -ブチル、 $n$ -ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、 $n$ -ヘキシル、イソヘキシル、 $n$ -ヘプチル、 $n$ -オクチル、 $n$ -ノニル、 $n$ -デシル等があげられる。好ましくは、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチル、イソブチル、 $sec$ -ブチル、

チル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、イソヘキシル等があげられる。

[01 15] 本発明において、「アルケニル」は、例えば、直鎖状または分枝状のアルケニルを含む。前記アルケニルは、前記アルキルにおいて、1個または複数の二重結合を有するもの等があげられる。前記アルケニルの炭素数は、特に制限されず、例えば、前記アルキルと同様であり、好ましくは2～8である。前記アルケニルは、例えば、ビニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1,3-ブタジエニル、3-メチル-2-ブテニル等があげられる。

[01 16] 本発明において、「アルキニル」は、例えば、直鎖状または分枝状のアルキニルを含む。前記アルキニルは、前記アルキルにおいて、1個または複数の三重結合を有するもの等があげられる。前記アルキニルの炭素数は、特に制限されず、例えば、前記アルキルと同様であり、好ましくは2～8である。前記アルキニルは、例えば、エチニル、プロピニル、ブチニル等があげられる。前記アルキニルは、例えば、さらに、1個または複数の二重結合を有してもよい。

[01 17] 本発明において、「アリール」は、例えば、単環芳香族炭化水素基および多環芳香族炭化水素基を含む。前記単環芳香族炭化水素基は、例えば、フェニル等があげられる。前記多環芳香族炭化水素基は、例えば、1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントリル、2-アントリル、9-アントリル、1-フエナントリル、2-フエナントリル、3-フエナントリル、4-フエナントリル、9-フエナントリル等があげられる。好ましくは、例えば、フェニル、1-ナフチルおよび2-ナフチル等のナフチル等があげられる。

[01 18] 本発明において、「ヘテロアリール」は、例えば、単環芳香族複素環式基および縮合芳香族複素環式基を含む。前記ヘテロアリールは、例えば、フリル（例：2-フリル、3-フリル）、チエニル（例：2-チエニル、3-チエニル）、ピロリル（例：1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル）、イミダゾリル（例：1-イミダゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル）

ル)、ピラゾリル(例:1—ピラゾリル、3—ピラゾリル、4—ピラゾリル)、トリアゾリル(例:1,2,4—トリアゾール—1—イル、1,2,4—トリアゾール—3—イル、1,2,4—トリアゾール—4—イル)、テトラゾリル(例:1—テトラゾリル、2—テトラゾリル、5—テトラゾリル)、オキサゾリル(例:2—オキサゾリル、4—オキサゾリル、5—オキサゾリル)、イソキサゾリル(例:3—イソキサゾリル、4—イソキサゾリル、5—イソキサゾリル)、チアゾリル(例:2—チアゾリル、4—チアゾリル、5—チアゾリル)、チアジアゾリル、イソチアゾリル(例:3—イソチアゾリル、4—イソチアゾリル、5—イソチアゾリル)、ピリジル(例:2—ピリジル、3—ピリジル、4—ピリジル)、ピリダジニル(例:3—ピリダジニル、4—ピリダジニル)、ピリミジニル(例:2—ピリミジニル、4—ピリミジニル、5—ピリミジニル)、フラザニル(例:3—フラザニル)、ピラジニル(例:2—ピラジニル)、オキサジアゾリル(例:1,3,4—オキサジアゾール—2—イル)、ベンゾフリル(例:2—ベンゾ[b]フリル、—ベンゾ[b]フリル、4—ベンゾ[b]フリル、5—ベンゾ[o]フリル、6—ベンゾ[b]フリル、7—ベンゾ[b]フリル)、ベンゾチエニル(例:2—ベンゾ[b]チエニル、3—ベンゾ[b]チエニル、4—ベンゾ[b]チエニル、5—ベンゾ[b]チエニル、6—ベンゾ[b]チエニル、7—ベンゾ[b]チエニル)、ベンズイミダゾリル(例:1—ベンズイミダゾリル、2—ベンズイミダゾリル、4—ベンズイミダゾリル、5—ベンズイミダゾリル)、ジベンゾフリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、キノキサリル(例:2—キノキサリニル、5—キノキサリニル、6—キノキサリニル)、シンノリニル(例:3—シンノリニル、4—シンノリニル、5—シンノリニル、6—シンノリニル、7—シンノリニル、8—シンノリニル)、キナゾリル(例:2—キナゾリニル、4—キナゾリニル、5—キナゾリニル、6—キナゾリニル、7—キナゾリニル、8—キナゾリニル)、キノリル(例:2—キノリル、3—キノリル、4—キノリル、5—キノリル、6—キノリル、7—キノリル、8—キノリル)、フタラジニル(例:1—フタ

ラジニル、5 \_ フタラジニル、6 \_ フタラジニル)、イソキノリル(例:1—イソキノリル、3 \_ イソキノリル、4 \_ イソキノリル、5 \_ イソキノリル、6 \_ イソキノリル、7 \_ イソキノリル、8 \_ イソキノリル)、プリル、プテリジニル(例:2—プテリジニル、4 - プテリジニル、6 - プテリジニル、7—プテリジニル)、カルバゾリル、フエナントリジニル、アクリジニル(例:1 \_ アクリジニル、2 \_ アクリジニル、3 \_ アクリジニル、4—アクリジニル、9 \_ アクリジニル)、インドリル(例:1 \_ インドリル、2—インドリル、3 \_ インドリル、4 \_ インドリル、5 \_ インドリル、6 \_ インドリル、7 \_ インドリル)、イソインドリル、フエナジニル(例:1 \_ フエナジニル、2 \_ フエナジニル)またはフエノチアジニル(例:1—フエノチアジニル、2 \_ フエノチアジニル、3 \_ フエノチアジニル、4 \_ フエノチアジニル)等があげられる。

[01 19] 本発明において、「シクロアルキル」は、例えば、環状飽和炭化水素基であり、炭素数は、例えば、3 ~ 15 である。前記シクロアルキルは、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、橋かけ環式炭化水素基、スピロ炭化水素基等があげられ、好ましくは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、橋かけ環式炭化水素基等があげられる。

[01 20] 本発明において、「橋かけ環式炭化水素基」は、例えば、ビスクロ[2. 1. 0]ペンチル、ビスクロ[2. 2. 1]ヘプチル、ビスクロ[2. 2. 2]オクチルおよびビスクロ[3. 2. 1]オクチル、トリシクロ[2. 2. 1. 0]ヘプチル、ビスクロ[3. 3. 1]ノナン、1—アダマンチル、2—アダマンチル等があげられる。

[01 21] 本発明において、「スピロ炭化水素基」は、例えば、スピロ[3. 4]オクチル等があげられる。

[01 22] 本発明において、「シクロアルケニル」は、例えば、環状の不飽和脂肪族炭化水素基を包み、炭素数は、例えば、3 ~ 7 個である。前記基は、例えば、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニ

ル、シクロヘプテニル等があげられ、好ましくは、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル等である。前記シクロアルケニルは、例えば、環中に不飽和結合を有する橋かけ環式炭化水素基およびスピロ炭化水素基も含む。

[01 23] 本発明において、「アリアルアルキル」は、例えば、ベンジル、2-フェネチル、およびナフタレニルメチル等があげられ、「シクロアルキルアルキル」または「シクリルアルキル」は、例えば、シクロヘキシルメチル、アダマンチルメチル等があげられ、「ヒドロキシアルキル」は、例えば、ヒドロキシメチルおよび2-ヒドロキシエチル等があげられる。

[01 24] 本発明において、「アルコキシ」は、前記アルキル<sub>0</sub>基を含み、例えば、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、およびn-ブトキシ等があげられ、「アルコキシアルキル」は、例えば、メトキシメチル等があげられ、「アミノアルキル」は、例えば、2-アミノエチル等があげられる。

[01 25] 本発明において、「ヘテロシクリル」は、例えば、1-ピロリニル、2-ピロリニル、3-ピロリニル、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、ピロリジノン、1-イミダゾリニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、1-イミダゾリジニル、2-イミダゾリジニル、4-イミダゾリジニル、イミダゾリジノン、1-ビラゾリニル、3-ビラゾリニル、4-ビラゾリニル、1-ビラゾリジニル、3-ビラゾリジニル、4-ビラゾリジニル、ピペリジノン、ピペリジノ、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-ピペリジニル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、ピペラジノン、2-モルホリニル、3-モルホリニル、モルホリノ、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル等があげられる。

[01 26] 本発明において、「ヘテロシクリルアルキル」は、例えば、ピペリジニルメチル、ピペラジニルメチル等があげられ、「ヘテロシクリルアルケニル」は、例えば、2-ピペリジニルエテニル等があげられ、「ヘテロアリアルアルキル」は、例えば、ピリジルメチルおよびキノリン-3-イルメチル等が

あげられる。

- [01 27] 本発明において、「シリル」は、式 $R_3Si-$ で表される基を含み、Rは独立して、前記アルキル、アリールおよびシクロアルキルから選択でき、例えば、トリメチルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基等があげられ、「シリルオキシ」は、例えば、トリメチルシリルオキシ基等があげられ、「シリルオキシアルキル」は、例えば、トリメチルシリルオキシメチル等があげられる。
- [01 28] 本発明において、「アルキレン」は、例えば、メチレン、エチレン、およびプロピレン等があげられる。
- [01 29] 本発明において、前述した各種基は、置換されてもよい。前記置換基は、例えば、ヒドロキシ、カルボキシ、ハロゲン、ハロゲン化アルキル（例：CF<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>）、ニトロ、ニトロソ、シアノ、アルキル（例：メチル、エチル、イソプロピル、tert-ブチル）、アルケニル（例：ビニル）、アルキニル（例：エチニル）、シクロアルキル（例：シクロプロピル、アダマンチル）、シクロアルキルアルキル（例：シクロヘキシルメチル、アダマンチルメチル）、シクロアルケニル（例：シクロプロペンニル）、アリール（例：フェニル、ナフチル）、アリールアルキル（例：ベンジル、フェネチル）、ヘテロアリール（例：ピリジル、フリル）、ヘテロアリールアルキル（例：ピリジルメチル）、ヘテロシクリル（例：ピペリジル）、ヘテロシクリルアルキル（例：モルホリルメチル）、アルコキシ（例：メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ）、ハロゲン化アルコキシ（例：OCF<sub>3</sub>）、アルケニルオキシ（例：ビニルオキシ、アリルオキシ）、アリールオキシ（例：フェニルオキシ）、アルキルオキシカルボニル（例：メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル）、アリールアルキルオキシ（例：ベンジルオキシ）、アミノ〔アルキルアミノ（例：メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ）、アシルアミノ（例：アセチルアミノ、ベンゾイルアミノ）、アリールアルキルアミノ（例：ベンジルアミノ、トリチルアミノ）、ヒドロキシアミノ〕、アルキルアミノアルキ

ル (例 : ジエチル アミノ メチル )、スルファモイル、オキソ等があげられる。

[0130] 4. 本発明の s s N c 分子の合成方法

本発明の s s N c 分子の合成方法は、特に制限されず、従来公知の方法が採用できる。前記合成方法は、例えば、遺伝子工学的手法による合成法、化学合成法等があげられる。遺伝子工学的手法は、例えば、インビトロ転写合成法、ベクターを用いる方法、PCRカセットによる方法があげられる。前記ベクターは、特に制限されず、プラスミド等の非ウィルスベクター、ウィルスベクター等があげられる。前記化学合成法は、特に制限されず、例えば、ホスホロアミダイト法およびH—ホスホネート法等があげられる。前記化学合成法は、例えば、市販の自動核酸合成機を使用可能である。前記化学合成法は、一般に、アミダイトが使用される。前記アミダイトは、特に制限されず、市販のアミダイトとして、例えば、RNA Phosphoramidites (2' - O - T B D M S i、商品名、三千里製薬)、ACEアミダイトおよびTOMアミダイト、CEEアミダイト、CEMアミダイト、TEMアミダイト等があげられる。

[0131] 5. 組成物

本発明の発現抑制用組成物は、前述のように、標的遺伝子の発現を抑制するための組成物であり、前記本発明の s s N c 分子を含むことを特徴とする。本発明の組成物は、前記本発明の s s N c 分子を含むことが特徴であり、その他の構成は、何ら制限されない。本発明の発現抑制用組成物は、例えば、発現抑制用試薬ということもできる。

[0132] 本発明によれば、例えば、前記標的遺伝子が存在する対象に投与することで、前記標的遺伝子の発現抑制を行うことができる。

[0133] また、本発明の薬学的組成物は、前述のように、前記本発明の s s N c 分子を含むことを特徴とする。本発明の組成物は、前記本発明の s s N c 分子を含むことが特徴であり、その他の構成は何ら制限されない。本発明の薬学的組成物は、例えば、医薬品ということもできる。

- [01 34] 本発明によれば、例えば、遺伝子が原因となる疾患の患者に投与することで、前記遺伝子の発現を抑制し、前記疾患を治療することができる。本発明において、「治療」は、前述のように、例えば、前記疾患の予防、疾患の改善、予後の改善の意味を含み、いずれでもよい。
- [01 35] 本発明において、治療の対象となる疾患は、特に制限されず、例えば、遺伝子の発現が原因となる疾患があげられる。前記疾患の種類に応じて、その疾患の原因となる遺伝子を前記標的遺伝子に設定し、さらに、前記標的遺伝子に応じて、前記発現抑制配列を適宜設定すればよい。
- [01 36] 具体例として、前記標的遺伝子を前記 TGF- $\beta$  1 遺伝子に設定し、前記遺伝子に対する発現抑制配列を前記 ssNc 分子に配置すれば、例えば、炎症性疾患、具体的には、急性肺傷害等の治療に使用できる。
- [01 37] 本発明の発現抑制用組成物および薬学的組成物（以下、組成物という）は、その使用方法は、特に制限されず、例えば、前記標的遺伝子を有する投与対象に、前記 ssNc 分子を投与すればよい。
- [01 38] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、*in vivo* でも *in vitro* でもよい。前記細胞は、特に制限されず、例えば、HeLa 細胞、293 細胞、NIH 3T3 細胞、COS 細胞等の各種培養細胞、ES 細胞、造血幹細胞等の幹細胞、初代培養細胞等の生体から単離した細胞等があげられる。
- [01 39] 前記投与方法は、特に制限されず、例えば、投与対象に応じて適宜決定できる。前記投与対象が培養細胞の場合、例えば、トランスフェクション試薬を使用する方法、エレクトロポレーション法等があげられる。
- [0140] 本発明の組成物は、例えば、本発明の ssNc 分子のみを含んでもよいし、さらにその他の添加物を含んでもよい。前記添加物は、特に制限されず、例えば、薬学的に許容された添加物が好ましい。前記添加物の種類は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類に応じて適宜選択できる。
- [0141] 本発明の組成物において、前記 ssNc 分子は、例えば、前記添加物と複



合体を形成してもよい。前記添加物は、例えば、複合化剤ということもできる。前記複合体形成により、例えば、前記  $s s N c$  分子を効率よくデリバリーすることができる。前記  $s s N c$  分子と前記複合化剤との結合は、特に制限されず、例えば、非共有結合があげられる。前記複合体は、例えば、包接複合体があげられる。

[0142] 前記複合化剤は、特に制限されず、ポリマー、シクロデキストリン、アダマンチン等があげられる。前記シクロデキストリンは、例えば、線状シクロデキストリンコポリマー、線状酸化シクロデキストリンコポリマー等があげられる。

[0143] 前記添加剤は、この他に、例えば、担体、標的細胞への結合物質、縮合剤、融合剤、賦形剤等があげられる。

[0144] 前記担体は、例えば、高分子が好ましく、より好ましくは、生体高分子である。前記担体は、例えば、生分解性が好ましい。前記担体は、例えば、ヒト血清アルブミン (HSA)、低密度リポタンパク質 (LDL)、グロブリン等のタンパク質 ; 例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、ヒアルロン酸等の糖質 ; 脂質等があげられる。前記担体は、例えば、合成ポリアミノ酸等の合成ポリマーも使用できる。前記ポリアミノ酸は、例えば、ポリリシン (PLL)、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物コポリマー、ポリ(L-ラクチド-コ-グリコリド)コポリマー、ジビニルエーテル-マレイン酸無水物コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコポリマー (HMPA)、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、又はポリホスファジン (polyphosphazene) 等があげられる。

[0145] 前記結合物質は、例えば、甲状腺刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントプロテインA、ムチン糖質、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-

アセチルダルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸塩、ビタミンB12、ビオチン、ネプロキシン (Neproxin)、RGDペプチド、RDGペプチド擬似体等があげられる。

[0146] 前記融合剤および縮合剤は、例えば、ポリエチレンイミン (PEI) 等のポリアミノ鎖等があげられる。PEIは、例えば、直鎖状および分岐状のいずれでもよく、また、合成物および天然物のいずれでもよい。前記PEIは、例えば、アルキル置換されてもよいし、脂質置換されてもよい。また、前記融合剤は、この他に、例えば、ポリヒスチジン、ポリイミダゾール、ポリピリジン、ポリプロピレンイミン、メリチン、ポリアセタール物質 (例えば、カチオン性ポリアセタール等) 等が使用できる。前記融合剤は、例えば、 $\alpha$ らせん構造を有してもよい。前記融合剤は、例えば、メリチン等の膜崩壊剤でもよい。

[0147] 本発明の組成物は、例えば、前記複合体の形成等について、米国特許第6,509,323号、米国特許公報第2003/0008818号、PCT/US04/07070号等を援用できる。

[0148] 前記添加剤は、この他に、例えば、両親媒性分子があげられる。前記両親媒性分子は、例えば、疎水性領域および親水性領域を有する分子である。前記分子は、例えば、ポリマーが好ましい。前記ポリマーは、例えば、二次構造を有するポリマーであり、反復性の二次構造を有するポリマーが好ましい。具体例としては、例えば、ポリペプチドが好ましく、より好ましくは、 $\alpha$ らせん状ポリペプチド等である。

[0149] 前記両親媒性ポリマーは、例えば、2つ以上の両親媒性サブユニットを有するポリマーでもよい。前記サブユニットは、例えば、少なくとも1つの親水性基および1つの疎水性基を有する環状構造を有するサブユニットがあげられる。前記サブユニットは、例えば、コール酸等のステロイド、芳香族構造等を有してもよい。前記ポリマーは、例えば、芳香族サブユニット等の環

状構造サブユニットとアミノ酸の両方を有してもよい。

[01 50] 6. 應 纏 お 去

本発明の発現抑制方法は、前述のように、標的遺伝子の発現を抑制する方法であって、前記本発明の s s N c 分子を使用することを特徴とする。本発明の発現抑制方法は、前記本発明の s s N c 分子を使用することが特徴であって、その他の工程および条件は、何ら制限されない。

[01 51] 本発明の発現抑制方法において、前記遺伝子の発現抑制のメカニズムは、特に制限されず、例えば、RNA 干渉または RNA 干渉様の現象による発現抑制があげられる。ここで、本発明の発現抑制方法は、例えば、前記標的遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉を誘導する方法であり、前記本発明の s s N c 分子を使用することを特徴とする発現誘導方法ともいえる。

[01 52] 本発明の発現抑制方法は、例えば、前記標的遺伝子が存在する対象に、前記 s s N c 分子を投与する工程を含む。前記投与工程により、例えば、前記投与対象に前記 s s N c 分子を接触させる。前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、*i n v i v o* でも *i n v i t r o* でもよい。

[01 53] 本発明の発現抑制方法は、例えば、前記 s s N c 分子を単独で投与してもよいし、前記 s s N c 分子を含む前記本発明の組成物を投与してもよい。前記投与方法は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類に応じて適宜選択できる。

[01 54] 7. 治 療 方 法

本発明の疾患の治療方法は、前述のように、前記本発明の s s N c 分子を、患者に投与する工程を含み、前記 s s N c 分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする。本発明の治療方法は、前記本発明の s s N c 分子を使用することが特徴であって、その他の工程および条件は、何ら制限されない。

[01 55] 本発明の治療方法は、例えば、前記本発明の発現抑制方法等を援用できる

。前記投与方法は、特に制限されず、例えば、経口投与および非経口投与のいずれでもよい。

[01 56] 8 . s s N c 分子の使用

本発明の使用は、前記標的遺伝子の発現抑制のための、前記本発明の s s N c 分子の使用である。また、本発明の使用は、R N A 干渉の誘導のための、前記本発明の s s N c 分子の使用である。

[01 57] 本発明の核酸分子は、疾患の治療に使用するための核酸分子であって、前記核酸分子は、前記本発明の ssNc 分子であり、前記 ssNc 分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする。

[0158] 以下、実施例等により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 实施例

[01 59] (実施例 A 1) RNA の合成

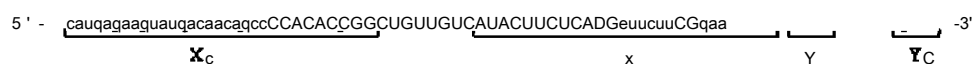
実施例のRNA (Ex) として、以下に示すssRNA (NK-0016) を合成した。前記NK-0016は、GAPDH遺伝子の発現を抑制する19塩基長の発現抑制配列 (配列番号1) を有する。NK-0016の配列において、領域(Xc)と領域(X)との間が、リンカー領域(Lx)であり、領域(Y)と領域(Yc)との間が、リンカー領域(Ly)である (以下、同様)。配列において、5'領域(Xc)および3'領域(Yc)は、それぞれ小文字で表わす (以下、同様)。

G A P D H 遺伝子発現抑制配列 (配列番号 1)

5' - G U U G U C A U A C U U C U C A U G G -3'

[化4]

E  $\chi$  : N K - 0 0 1 6 (配列番号 2)



[01 60] 比較例の RNA として、以下に示す、RNA i ポジティブコントロール (

P c) の d s R N A ( N 1 - 0 0 1 1 ) を合成した。N 1 — 0 0 1 1 は、各一本鎖の 3' 末端に 2 塩基のオバーハングを有し、配列番号 4 の一本鎖が、前記 N K — 0 0 1 6 と同様に、前記 1 9 塩基長の発現抑制配列を有している。

[01 61] [化 5]

P c : N 1 - 0 0 1 1

S' - CCAUGAGAAGUAUGACAACAG - 3' (ほぼ番号 3)  
3' - UUGGUACUCUUCUAUACUGUUG - 5' (配列番号 4)

[01 62] 前記 R N A は、ホスホロアミダイト法に基づき、核酸合成機 (商品名 A B I Expedite (登録商標) 8909 Nucleic Acid Synthesis System、アプライドバイオシステムス) により合成した。前記合成には、RNA アミダイトとして、RNA Phosphoramidites (2' - O - T B D M S i、商品名、三千里製薬) を用いた (以下、同様)。前記アミダイトの脱保護は、定法に従った。合成した R N A は、H P L C により精製した。精製後の R N A は、それぞれ凍結乾燥した。以下の実施例において、R N A の合成は、特に示さない限り、本実施例と同様に行った。

[01 63] 凍結乾燥した R N A は、注射用蒸留水 (大塚製薬、以下同様) を用いて、所望の濃度となるよう溶解した。

[01 64] (実施例 A 2) H C T 1 1 6 細胞における G A P D H 遺伝子の発現抑制効果  
本発明の s s R N A を用いて、i n v i t r o における G A P D H 遺伝子の発現抑制を確認した。

[01 65] (1) 材料および方法

実施例の R N A (E x) として、前記実施例 A 1 の s s R N A (N K - 0 0 1 6) を使用した。

[化 6]

E x : N K - 0 0 1 6 (配列番号 1)

5' - caugagaaquauqacaacagccCCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCADGGUUCUUCGcaa - 3'  
X<sub>c</sub> X Y Y<sub>c</sub>

[01 66] 前記 RNA を、所望の濃度となるように、注射用蒸留水に溶解し、RNA 溶液を調製した。細胞は、HCT 116 細胞 (DS ファーマバイオメディカル) を使用し、培地は、10% FBS を含む McCoy's 5A (Invitrogen) 培地を使用し、培養条件は、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下とした。

[01 67] まず、HCT 116 細胞を、前記培地中で培養し、その培養液を、24 穴プレートに、400 从<sub>μ</sub>ずつ、2 × 10<sup>4</sup> 細胞/ ウエルとなるように分注した。さらに、前記ウエル中の細胞を24 時間培養した後、前記 RNA を、トランスフェクション試薬 Lipofectamine 2000 (商品名、Invitrogen) を用い、添付プロトコールに従って、トランスフェクションした。具体的には、前記ウエルあたりの組成を以下のように設定し、トランスフェクションを行った。なお、前記ウエルにおいて、前記 RNA の最終濃度は、5 nmol/L、10 nmol/L、20 nmol/L、40 nmol/L とした。

[01 68] [表 1]

(ウエルあたりの組成 : μL)

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| 培養液                       | 400 |
| (A) Lipofectamine 2000    | 1.5 |
| (B) Opti-MEM (Invitrogen) | 98  |
| (C) RNA 溶液                | 0.5 |
| 合計                        | 500 |

[01 69] トランスフェクション後、前記ウエル中の細胞を48 時間培養した後、RNeasy Mini Kit (商品名、Qiagen) を用い、添付のプロトコールに従って、RNA を回収した。次に、逆転写酵素 (商品名 SuperScript II し Invitrogen) を用い、添付のプロトコールに従って、前記 RNA から cDNA を合成した。そして、合成した前記 cDNA を鋳型として PCR を行い、GAPDH 遺伝子の発現量および内部標準である β-アクトチン遺伝子の発現量を測定した。前記 GAPDH 遺伝子の発現量は、前記 β-アクトチン遺伝子の発現量により補正した。

[01 70] 前記 PCR は、試薬として LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (商品名、Roche

)、機器として *Light Cycler DX 400* (商品名、*Roche*) を用いた (以下、同様。)。前記 *GAPDH* 遺伝子および  $\beta$ -*アクチン* 遺伝子の増幅には、それぞれ、以下のプライマーセットを使用した。

*GAPDH* 遺伝子用プライマーセット

5' -GGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGC-3' (配列番号 9)

5' -TGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTG-3' (配列番号 10)

$\beta$ -*アクチン* 遺伝子用プライマーセット

5' -GCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3' (配列番号 11)

5' -AGGTCTTTGCGGATGTCCACGTCAC-3' (配列番号 12)

[0171] なお、コントロール 1 として、前記 (B) 100  $\mu$ L のみを添加した細胞についても、遺伝子発現量を測定した (−)。また、コントロール 2 として、トランスフェクションにおいて、前記 RNA 溶液を未添加とし、前記 (A) 1.5  $\mu$ L と前記 (B) とを合計 100  $\mu$ L 添加した以外は、同様にして処理した細胞についても、遺伝子発現量を測定した (mock)。

[0172] 補正後の *GAPDH* 遺伝子発現量について、コントロール (−) の発現量を 1 として、各 RNA を導入した細胞の発現量の相対値を求めた。

[0173] (2) 結果

これらの結果を、図 4 に示す。図 4 は、*GAPDH* 遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。図 4 に示すように、前記 NK-0016 は、RNA 未添加のコントロール (−) よりも低い発現量であり、*GAPDH* 遺伝子の発現を抑制したことがわかった。また、図 4 に示すように、投与量依存的に遺伝子発現抑制効果を示すことがわかった。

[0174] (実施例 A3) HCT 116 細胞における *GAPDH* 遺伝子の発現抑制効果  
本発明の ssRNA を用いて、*in vitro* における *GAPDH* 遺伝子の発現抑制を確認した。

[0175] (1) 材料および方法

実施例の RNA (Ex) として、前記実施例 A1 の ssRNA (NK-0016) を使用した。比較例の RNA として、RNA i ポジティブコントロール

ール (Pc) の前記 dsRNA (NI-0011) を使用した。前記 RNA を、 $40 \mu\text{mol/L}$  となるように、注射用蒸留水に溶解し、RNA 溶液を調製した。

[0176] 前記 RNA 溶液を使用した以外は、前記実施例 A2 と同様にして、HCT 116 細胞における GAPDH 遺伝子の発現量を確認した。トランスフェクション時の RNA 濃度は、 $40 \text{ nmol/L}$  とした。

[0177] (2) 結果

これらの結果を、図 5 に示す。図 5 は、GAPDH 遺伝子発現量の相対値を示すグラフであり、縦軸は、相対遺伝子発現量である。図 5 に示すように、前記実施例の NK-0016 は、比較例の NI-0011 と比較して、極めて強い遺伝子発現抑制活性を示した。

[0178] (実施例 A4) A549 細胞および 293 細胞における GAPDH 遺伝子の発現抑制効果

本発明の ssRNA を用いて、*in vitro* における GAPDH 遺伝子の発現抑制を確認した。

[0179] (1) 材料および方法

実施例の RNA (Ex) として、前記実施例 A1 の NK-0016 および以下の Ex-ssRNA (PK-0004) を使用した。前記 PK-0004 において、リンカー領域 (Lx) およびリンカー領域 (Ly) は、Xc と X との間、Yc と Y との間を、実施例 B に示すスキーム 3 の化合物 10 (ループロリンジアミドアミダイト) を用いて結合させた。前記両リンカーの化学式を以下に示す。前記 NK-0016 と前記 PK-0004 は、父。と父との間のリンカー領域 (Lx)、および Yc と Y との間のリンカー領域 (Ly) が異なる以外は、同じ配列とした。

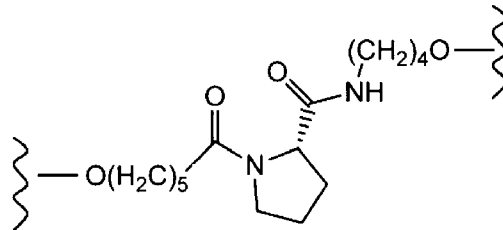


[化7]

Ex : NK - 0016 (配列番号2)



Ex : PK - 0004 (配列番号13)



[0180] 前記RNAを、 $20 \mu\text{mol/L}$ となるように、注射用蒸留水に溶解し、RNA溶液を調製した。細胞は、A549細胞および293細胞 (DSファーマバイオメディカル) を使用した。前者の培地は、10% FBSを含むDMEM (Invitrogen)、後者の培地は、10% FBSを含むMEM (Invitrogen) 培地を使用した。培養条件は、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 下とした。

[0181] まず、細胞を、前記培地中で培養し、その培養液を、24穴プレートに、400  $\mu\text{L}$ ずつ、 $5 \times 10^4$ 細胞/ウエルとなるように分注した。さらに、前記ウエル中の細胞を24時間培養した後、前記RNAをトランスフェクション試薬Lipofectamine 2000 (商品名、Invitrogen) を用い、添付プロトコールに従って、トランスフェクションした。具体的には、A549細胞および293細胞に対して、それぞれ、前記ウエルあたりの組成を以下のように設定し、トランスフェクションを行った。下記組成において、(B)は、Opti-MEM (商品名、Invitrogen)、(C)は、 $20 \mu\text{mol/L}$  前記RNA溶液であり、両者をあわせて $98.5 \mu\text{L}$ または $99 \mu\text{L}$ 添加した。なお、前記ウエルにおいて、前記RNAの最終濃度は、 $1 \text{ nmol/L}$ 、 $3 \text{ nmol/L}$ 、 $10 \text{ nmol/L}$ と

した。

[表 2]

(ウエルあたりの組成 :  $\mu$ L)

|                        | A 5 4 9 細胞 | 2 9 3 細胞 |
|------------------------|------------|----------|
| 培養液                    | 4 0 0      | 4 0 0    |
| (A) lipofectamine 2000 | 1.5        | 1        |
| (B) + (C)              | 98.5       | 99       |
| 合計                     | 500        | 500      |

[01 82]      トランスフェクション後、前記細胞を48時間培養し、前記実施例 A 2 と同様に、RNA 回収、cDNA 合成および PCR を行い、GAPDH 遺伝子の相対的発現量を測定した。

[01 83]      (2) 結果

これらの結果を、図 6 および 7 に示す。図 6 は、A 5 4 9 細胞の結果であり、図 7 は、2 9 3 細胞の結果である。図 6 および 7 は、GAPDH 遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。図 6 および 7 に示すように、実施例の NK—0016 および PK—0004 は、強い遺伝子発現抑制活性を示し、濃度依存的に効果を示すことがわかった。

[01 84]      (実施例 A 5) Hepa 1\_6 細胞における TGF— $\beta$  1 遺伝子の発現抑制効果

本発明の ssRNA について、*in vitro* での TGF— $\beta$  1 遺伝子の発現抑制効果を確認した。

[01 85]      (1) 材料および方法

実施例の RNA (Ex) として、以下に示す ssRNA (NK—0033) を使用した。前記 NK—0033 は、TGF— $\beta$  1 遺伝子の発現を抑制する 21 塩基長の下記配列を有している。この配列は、Cheng らが用いた siRNA (Mol. Pharm., 2009, 6, 772-779) に基づいて、設計した。

TGF— $\beta$  1 遺伝子発現抑制配列 (配列番号 16)

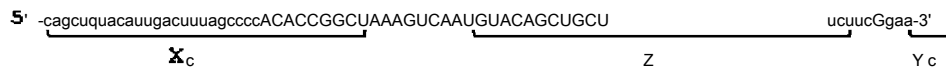
5' - AAAGUCA AUGUACAGCUGCUU - 3'

[01 86]      比較例の RNA として、以下に示す、RNA i ネガティブコントロール (

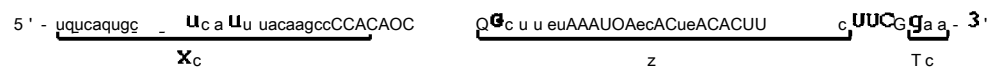
N c) の s s R N A ( N K - 0 0 3 5 ) を使用した。NK—0 0 3 5 は、前記発現抑制配列ではなく、発現抑制に関与しないスクランブル配列を組み込んだ。

[化8]

E  $\chi$  : N K - 0 0 3 3 (配列番号 8 0)



N c : N K - 0 0 3 5 (配列番号 1 5)



[0187] 前記 R N A を、注射用蒸留水に溶解し、R N A 溶液を調製した。細胞は、H e p a 1 \_ 6 細胞 (理化学研究所バイオリソースセンター) を使用し、培地は、1 0 % F B S を含む D M E M ( I n v i t r o g e n ) 培地を使用し、培養条件は、3 7 ℃、5 % C O <sub>2</sub> とした。

[0188] まず、H e p a 1 \_ 6 細胞を前記培地中で培養し、その培養液を、2 4 穴プレートに、4 0 0 从 <sub>1</sub> ずつ、3 × 1 0 <sup>4</sup> 細胞 / ウエルとなるように分注した。さらに、前記ウエル中の細胞を、2 4 時間培養した後、前記 s s R N A をトランスフェクション試薬 L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 (商品名、I n v i t r o g e n ) を用い、添付プロトコールに従って、トランスフェクションした。具体的には、前記ウエルあたりの組成を以下のように設定し、トランスフェクションを行った。下記組成において、( B ) は、0 p t i - M E M (商品名、I n v i t r o g e n ) 、( C ) は、2 0 μ m o l / L 前記 R N A 溶液であり、両者をあわせて 9 8 . 5 μ L 添加した。なお、前記ウエルにおいて、前記 R N A の最終濃度は、1 0 n m o l / L 、2 5 n m o l / L 、5 0 n m o l / L および 1 0 0 n m o l / L とした。

[表3]

(ウエルあたりの組成 : μ L)

|   |         |
|---|---------|
| 培養液                                     | 4 0 0   |
| ( A ) L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 | 1 . 5   |
| ( B ) + ( C )                           | 9 8 . 5 |
| 合計                                      | 5 0 0   |

[0189]        トランスフェクション後、前記ウエル中の細胞を48時間培養した後、R  
N e a s y   M i n i   K i t (商品名、Q i a g e n) を用い、添付のプ  
ロトコールに従って、RNAを回収した。次に、逆転写酵素 (商品名 S u p  
e r S c r i p t   I I I (I n v i t r o g e n) を用い、添付のプロト  
コールに従って、前記RNAからcDNAを合成した。そして、下記TGF  
-  $\beta$  1 遺伝子用PCRプライマーセットおよび $\beta$ -アクチン遺伝子用プライ  
マーセットを使用した以外は、前記実施例A2と同様に、PCRを行い  
、TGF- $\beta$  1 遺伝子の発現量および内部標準である $\beta$ -アクチン遺伝子の  
発現量を測定した。前記TGF- $\beta$  1 遺伝子の発現量は、前記 $\beta$ -アクチン  
遺伝子の発現量により補正した。

TGF- $\beta$  1 遺伝子用プライマーセット

5' -CCATTGCTGTCCCGTGCAGAGCTG-3'        (配列番号 17)

5' -ATGGTAGCCCTTGGGCTCGTGGATC-3'        (配列番号 18)

$\beta$ -アクチン遺伝子増幅用プライマーセット

5' -GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3'        (配列番号 19)

5' -GCAATGCCTGGGTACATGGTGG-3'        (配列番号 20)

[0190]        また、前記実施例A2と同様に、コントロール (-) およびコントロ  
ール (m o c k) について、遺伝子発現量を測定した。そして、補正後のT  
G F -  $\beta$  1 遺伝子発現量について、コントロール (-) の細胞の発現量を1  
として、各RNAを導入した細胞の発現量の相対値を求めた。

[0191]        (2) 結果

これらの結果を、図8に示す。図8は、TGF- $\beta$  1 遺伝子発現量の相対  
値を示すグラフである。図8に示すように、前記実施例のNK-0033は  
、i n   v i t r o において、TGF- $\beta$  1 遺伝子の発現を抑制した。他方  
、ネガティブコントロールのNK-0035は、TGF- $\beta$  1 遺伝子の発現  
を抑制しなかった。

[0192]        (実施例A6) i n   v i v o でのTGF- $\beta$  1 遺伝子の発現抑制効果およ  
び急性肺傷害抑制効果

本発明の s s RNA について、i n v i v o での遺伝子発現抑制および急性肺傷害抑制の効果を確認した。前記効果の確認は、T a k a g i ら ( J . T h r o m b H e m o s t 2 0 0 9 ; 7 : 2 0 5 3 - 2 0 6 3 ) に記載の方法に従って行った。

[0193] (1) 材料および方法

(1. 1) 急性肺傷害マウスへの s s RNA の投与

実施例の RNA ( E x ) は、前記実施例 A 5 の s s RNA ( N K — 0 0 3 3 ) を使用した。比較例の RNA は、前記実施例 A 5 に示す、RNA i ネガティブコントロール ( N c ) の s s RNA ( N K — 0 0 3 5 ) を使用した。

[0194] 前記 RNA 1 0 0 μ g を滅菌生理食塩水 (日本化薬、以下、同様) 8 0 μ L に溶解して、RNA 溶液を調製した。他方、1 0 0 μ g のリポ多糖 ( L P S ) を、滅菌生理食塩水 5 0 μ L に溶解して、L P S 溶液を調製した。

[0195] まず、前記 RNA 溶液 8 0 μ L を、マウスの気管内に滴下した。滴下から 1 時間後に、前記マウスの気管内に、前記 L P S 溶液 5 0 μ L を滴下して、肺傷害を誘発した。

[0196] 前記 L P S に対するネガティブコントロールとして、前記 L P S 溶液に代えて、L P S 未添加の滅菌生理食塩水 5 0 μ L を用いた。また、前記 RNA 溶液に対するネガティブコントロールとして、滅菌生理食塩水 8 0 μ L を用いた。

[0197] 以下に、各投与群を示す。各投与群において、4 ~ 6 匹のマウスを使用した。

・投与群 1

滅菌生理食塩水 8 0 μ L の投与から 1 時間後、滅菌生理食塩水 5 0 μ L を投与

・投与群 2

RNA 溶液 ( N K — 0 0 3 3 ) 8 0 μ L の投与から 1 時間後、滅菌生理食塩水 5 0 μ L を投与

・投与群 3

RNA 溶液 (NK—0035) 80  $\mu$ L の投与から1時間後、滅菌生理食塩水 50  $\mu$ L を投与

・投与群 4

滅菌生理食塩水 80  $\mu$ L の投与から1時間後、前記 LPS 溶液 50  $\mu$ L を投与

・投与群 5

RNA 溶液 (NK—0033) 80  $\mu$ L の投与から1時間後、前記 LPS 溶液 50  $\mu$ L を投与

・投与群 6

RNA 溶液 (NK—0035) 80  $\mu$ L の投与から1時間後、前記 LPS 溶液 50  $\mu$ L を投与

[0198] (1. 2) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) のサンプリング

前記 LPS 溶液を滴下してから24時間後、前記マウスの腹腔に、過剰量のペントバルビタールを投与して安楽死させ、生化学的解析および組織学的解析のサンプルとした。ネガティブコントロールは、前記 LPS 溶液に代えて、滅菌生理食塩水を添加した。

[0199] 前記マウスの心臓に穿刺して、血液サンプルを回収し、3.8% クエン酸ナトリウム水溶液を含む試験管に添加した。前記 クエン酸ナトリウム水溶液の量 (体積) は、前記血液サンプルの 1/10 とした。この混合液から、Yasuiら (Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 1660-8) の記載にしたがって、BALF サンプルを回収した。そして、前記 BALF サンプル中の総細胞数を、NucleoCounter (商品名、Chemometed社) を用いて測定した。

[0200] また、前記 BALF サンプルを遠心分離に供して、前記 BALF サンプルの上清を回収し、生化学的分析を行うまで、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また、前記 BALF サンプルに含まれる異なる種類の細胞を計数するために、前記 BALF サンプルを、サイトスピンを用いて遠心分離し、分離した細胞を、May-Grunwald-Giemsa (商品名、Merck) を用いてギ

ムザ染色した。また、前記マウスから肺組織を採取して、H E 染色を行った。

[0201] (2) 結果

(2. 1) 肺におけるTGF- $\beta$ 1遺伝子発現の抑制

前記マウスの肺サンプルについて、TGF- $\beta$ 1 Quantikine Colorimetric Sandwich ELISA (商品名、R & D Systems社)を用いて、単位重量の肺あたりのTGF- $\beta$ 1発現量を測定した。

[0202] その結果を、図9に示す。図9は、各投与群における単位重量の肺あたりのTGF- $\beta$ 1遺伝子発現量を示すグラフである。LPS (+) / RNA (-) の投与群4は、LPS (-) / RNA (-) の投与群1と比較して、LPS処理の結果、前記遺伝子の発現量が増加した。そして、LPS (+) / NK-0033 (+) の実施例投与群5は、LPS (+) / RNA (-) の投与群4と比較して、前記遺伝子の発現量の上昇が抑制された。この抑制効果は、LPS (+) / ネガティブコントロールNK-0035 (+) の投与群6では観察されなかった。この結果から、前記実施例のNK-0033により、効果的にTGF- $\beta$ 1遺伝子の発現を抑制できることがわかった。

[0203] (2. 2) 急性肺傷害抑制効果

急性肺傷害における炎症は、好中球等の細胞が肺に浸潤することによって生じる。このため、肺に対する好中球等の細胞の浸潤を抑制する薬物は、急性肺傷害における炎症の治療薬となる。そこで、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の細胞数を、肺へ浸潤した細胞数の指標として、本発明のssRNAの薬理効果を確認した。

[0204] 前記BALFサンプル中の細胞数の測定結果を、図10に示す。図10は、各投与群におけるBALFサンプル中の細胞数を示すグラフである。LPS (+) / RNA (-) の投与群4は、LPS (-) / RNA (-) の投与群1と比較して、LPS処理の結果、前記BALFサンプル中の細胞数が増加した。これは、LPSによって炎症作用が誘導され、その結果、細胞が肺

に浸潤したことを示す。そして、L P S ( + ) / N K — 0 0 3 3 ( + ) の実施例投与群 5 は、L P S ( + ) / R N A ( - ) の投与群 4 と比較して、細胞数の上昇が抑制された。これは、前記 N K \_ 0 0 3 3 によって、急性肺傷害における炎症が抑制されたことを示す。この抑制効果は、L P S ( + ) / ネガティブコントロール N K — 0 0 3 5 ( + ) の投与群 6 では観察されなかった。この結果から、前記実施例の N K — 0 0 3 3 により、効果的に急性肺傷害における炎症を抑制できることがわかった。

[0205] 前記 B A L F サンプル中の好中球数の測定結果を、図 1 1 に示す。図 1 1 は、各投与群における B A L F サンプル中の好中球の細胞数を示すグラフである。L P S ( + ) / R N A ( - ) の投与群 4 は、L P S ( \_ ) / R N A ( - ) の投与群 1 と比較して、L P S 処理の結果、前記 B A L F サンプル中の好中球数が増加した。これは、L P S によって炎症作用が誘導され、その結果、好中球が肺に浸潤したことを示す。そして、L P S ( + ) / N K — 0 0 3 3 ( + ) の実施例投与群 5 は、L P S ( + ) / s s R N A ( - ) の投与群 4 と比較して、前記 B A L F サンプル中の好中球数の上昇が抑制された。これは、前記 N K — 0 0 3 3 によって、急性肺傷害における炎症が抑制されたことを示す。この抑制効果は、L P S ( + ) / ネガティブコントロール N K \_ 0 0 3 5 ( + ) の投与群 6 では観察されなかった。この結果から、前記実施例の N K \_ 0 0 3 3 により、効果的に急性肺傷害における炎症が抑制できることがわかった。

[0206] ( 2 . 3 ) 組織学的観察 : ギムザ染色

ギムザ染色の結果を、図 1 2 に示す。図 1 2 は、前記 B A L F サンプル中の細胞のギムザ染色の結果を示す写真である ( 倍率 1 0 0 倍 ) 。図 1 2 において、( A ) は、L P S ( + ) / R N A ( - ) の投与群 4 の結果であり、( B ) は、L P S ( + ) / ネガティブコントロール N K — 0 0 3 5 ( + ) の投与群 6 の結果であり、( C ) は、L P S ( + ) / N K — 0 0 3 3 ( + ) の実施例投与群 5 の結果を示す。

[0207] 図 1 2 に示すように、L P S ( + ) / N K — 0 0 3 3 ( + ) の実施例投与



群 5 (C) は、L P S (+) / R N A (-) の投与群 4 (A) および L P S (+) / ネガティブコントロール N K \_ 0 0 3 5 (+) の投与群 6 (B) と比較して、肺に浸潤した細胞数が顕著に少なかった。この組織学的観察は、前述した B A L F サンプル中の細胞数の結果と一致する。

[0208] (2. 4) 組織学的観察 : H E 染色

H E 染色の結果を、図 1 3 に示す。図 1 3 は、前記肺組織の H E 染色の結果を示す写真である (倍率 1 0 倍)。図 1 3 において、(A) は、L P S (+) / R N A (-) の投与群 4 の結果であり、(B) は、L P S (+) / ネガティブコントロール N K — 0 0 3 5 (+) の投与群 6 の結果であり、(C) は、L P S (+) / N K - 0 0 3 3 (+) の実施例投与群 5 の結果を示す。図 1 3 から、血管周囲、肺胞腔内、肺胞壁および気管支周辺への、好中球等の細胞の浸潤が減少し、肺組織の傷害性が低減していることがわかった。

[0209] (実施例 A 7) インターフェロン誘導を指標とする副作用の評価

従来法の i R N A 剤は、副作用としてインターフェロンを配列非依存的に誘導することが知られており、この副作用が問題視されている。そこで、本発明の s s R N A について、インターフェロン誘導の副作用を評価した。

[021 0] (1) 材料および方法

前記実施例 A 6 と同じ方法および条件により、急性肺傷害マウスへの s s R N A の投与を行った。そして、前記実施例 A 6 と同様にして、前記 L P S 溶液または滅菌生理食塩水 (L P S に対するネガティブコントロール) を滴下してから 2 4 時間後、マウスを安楽死させ、肺組織を採取した。

[021 1] [表 4]

| 投与群 | RNA         | LPS |
|-----|-------------|-----|
| 1   | —           | —   |
| 2   | Ex: NK-0033 | —   |
| 4   | —           | +   |
| 5   | Ex: NK-0033 | +   |

EX : 実施例の RNA

[021 2] 前記肺組織から、各遺伝子の発現量測定のために、R N A を、T R I Z O

L (商品名、Invitrogen) を用いて単離した。次に、逆転写酵素 (商品名 Superscript II、Invitrogen) を用い、添付のプロトコールに従って、前記 RNA から cDNA を合成した。そして、合成した前記 cDNA を鋳型として PCR を行い、TGF- $\beta$  1 遺伝子、IFN- $\alpha$  遺伝子、IFN- $\beta$  遺伝子の発現量を測定した。

[021 3] 前記 PCR は、試薬として Gold Amplicon (商品名、Applied Biosystem、米国)、測定機器として ABI Applied Biosystem 7600 (商品名、Applied Biosystem) を用いた。TGF- $\beta$  1 遺伝子、IFN- $\alpha$  遺伝子、IFN- $\beta$  遺伝子の増幅には、それぞれ、以下のプライマーセットを使用した。

GAPDH 遺伝子用プライマーセット

5' -CCCTTATTGACCTCAACTACATGGT-3' (配列番号 2 1)

5' -GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3' (配列番号 2 2)

TGF- $\beta$  1 遺伝子用プライマーセット

5' -ACTCCACGTGGAAATCAACGG-3' (配列番号 2 3)

5' -TAGTAGACGATGGGCAGTGG-3' (配列番号 2 4)

IFN- $\alpha$  遺伝子用プライマーセット

5' -ATGGCTAGRCTCTGTGCTTCCT-3' (配列番号 2 5)

5' -AGGGCTCTCCAGAYTTCTGCTCTG-3' (配列番号 2 6)

IFN- $\beta$  遺伝子用プライマーセット

5' -CATCAACTATAAGCAGCTCCA-3' (配列番号 2 7)

5' -TTCAAGTGGAGAGCAGTTCAG-3' (配列番号 2 8)

[0214] そして、得られた PCR 産物をアガロース電気泳動した。また、電気泳動後のアガロースについて、NIH imaging system を用いて密度解析を行い、各遺伝子の発現量を確認した。前記 TGF- $\beta$  1 遺伝子、前記 IFN- $\alpha$  遺伝子および前記 IFN- $\beta$  遺伝子の発現量は、それぞれ、前記 GAPDH 遺伝子の発現量を標準とし、相対的に評価した。具体的には、前記 GAPDH 遺伝子用プライマーセットを用いた PCR 産物の測定強度

を標準 1 として、各遺伝子用プライマーセットを用いた PCR 産物の測定強度の相対値を求め、評価した。

[0215] (2) 結果および考察

前記 TGF- $\beta$  1 遺伝子、IFN- $\alpha$  遺伝子および IFN- $\beta$  遺伝子の発現量に関する定量的解析結果を、それぞれ、図 14 (A) ~ (C) のグラフに示す。各投与群は、前記実施例 A 6 と同様に以下の通りである。

[0216] 図 14 (A) は、TGF- $\beta$  1 遺伝子の発現量の結果である。図 14 (A) に示すように、前記 NK-0033 を投与した実施例投与群 5 は、RNA (-) の投与群 4 と比較して、LPS で誘導される TGF- $\beta$  1 遺伝子発現の上昇を抑制した。この結果は、前記実施例 A 5 の図 8 で示した TGF- $\beta$  1 発現量の測定結果と相関する。

[0217] 図 14 (B) は、IFN- $\alpha$  遺伝子の発現量、図 14 (C) は、IFN- $\beta$  遺伝子の発現量を示す結果である。図 14 (B) および図 14 (C) に示すように、LPS 未添加の場合、RNA (-) の投与群 1 と、RNA (+) の投与群 2 とを比較した結果、ssRNA 添加による、I 型インターフェロンである IFN- $\alpha$  遺伝子および IFN- $\beta$  遺伝子の発現誘導は生じなかった。また、図 14 (B) および図 14 (C) に示すように、LPS 添加の場合、RNA (-) の投与群 4 と、NK-0033 (+) の投与群 5 とを比較した結果、同様に、ssRNA の添加による、IFN- $\alpha$  遺伝子および IFN- $\beta$  遺伝子の発現誘導は生じなかった。

[0218] この結果は、I 型インターフェロンの誘導という副作用が生じるという従来の siRNA の結果とは、対照的である。すなわち、本発明の ssRNA は、予想外にも、従来法の siRNA で問題となっていたインターフェロン誘導という副作用を生じないことが実証された。

[0219] (実施例 A 8) Hepa1-6 細胞における TGF- $\beta$  1 遺伝子の発現抑制効果

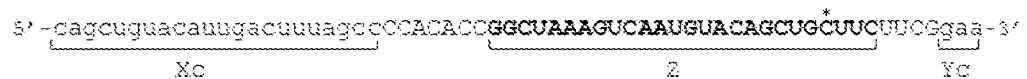
本発明の ssRNA について、*in vitro* での TGF- $\beta$  1 遺伝子の発現抑制効果を確認した。

## [0220] (1) 材料および方法

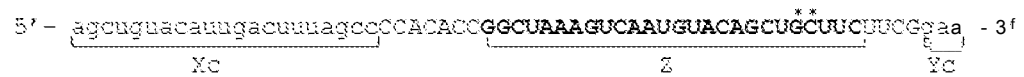
実施例のRNA (Ex) として、前記実施例A5のNK—0033、以下に示すNK—0061、NK—0055、NK—0062を使用した。下記配列において、「<sup>\*</sup>」は、フリー塩基を示す。

## [化9]

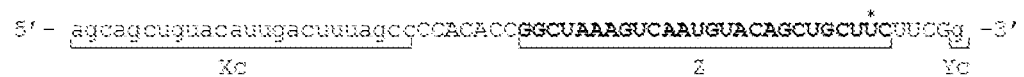
Ex : NK—0033 (配列番号80)



Ex : NK—0061 (配列番号29)



Ex : NK—0055 (配列番号30)



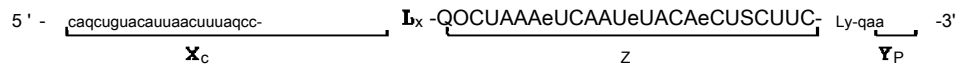
Ex : NK—0062 (配列番号31)



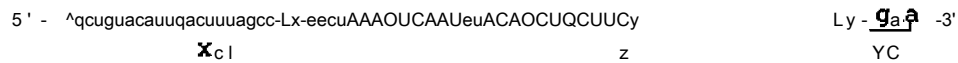
[0221] また、実施例のRNA (Ex) として、下記PK—0007、PK—0026、PK—0027、PK—0028を使用した。これらのssRNAにおいて、リンカー領域 (Lx) およびリンカー領域 (Ly) は、 $\alpha_0$  と  $\alpha_1$  との間、Yc と Y との間を、実施例Bに示すスキーム3の化合物10 (ロープリンジアミドアミダイト) を用いて結合させた。

## [化10]

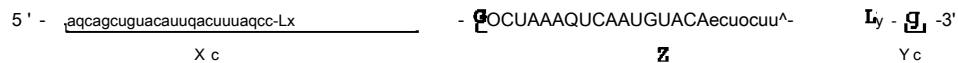
E x : P K — 0 0 0 7 (配列番号 3 2)



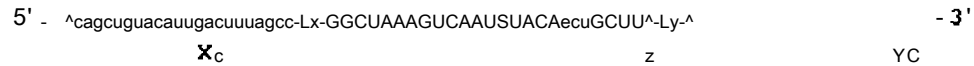
E x : P K — 0 0 2 6 (配列番号 3 3)



E x : P K - 0 0 2 7 (配列番号 3 4)



E x : P K - 0 0 2 8 (配列番号 3 5)



[0222] NK\_0033、NK\_0061、NK\_0055およびNK\_0062と、PK\_0007、PK\_0026、PK\_0027およびPK\_0028とは、前記第1リンカー(L1)および第2リンカー(L2)が異なる以外は、同じ配列であり、いずれもTGF- $\beta$ 1遺伝子の発現を抑制する配列(配列番号16)を有する。

[0223] (1.2) 遺伝子の発現抑制

凍結保存した前記RNAを、20  $\mu\text{mol/L}$ となるように、注射用蒸留水に溶解し、RNA溶液を調製した。そして、前記RNA溶液を使用した以外は、前記実施例A5と同様に、Hepa1\_6細胞への前記ssRNAのトランスフェクション、RNA回収、cDNA合成およびPCRを行い、TGF- $\beta$ 1遺伝子の相対的発現量を測定した。トランスフェクション時のRNA濃度は、1  $\text{nmol/L}$ とした。

[0224] (2) 結果

これらの結果を、図15および16に示す。図15および図16は、それぞれ、TGF- $\beta$ 1遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。図15は、NK\_0033、NK\_0061、NK\_0055およびNK\_0062を使用した結果であり、図16は、PK\_0007、PK\_0026、PK\_0027およびPK\_0028を使用した結果である。図15および図16

に示すように、いずれの s s R N A も、強い遺伝子発現抑制活性を示した。

[0225] (実施例 A 9)

i n v i v o での T G F —  $\beta$  1 遺伝子発現抑制効果および急性肺傷害抑制効果

[0226] (A 9 - 1) i n v i v o での T G F —  $\beta$  1 遺伝子の発現抑制効果

本発明の s s R N A を用いて、i n v i v o での T G F —  $\beta$  1 遺伝子の発現抑制効果を確認した。

[0227] (1) 材料および方法

急性肺傷害マウスへの R N A の投与は、特に示さない限り、前記実施例 A 6 と同様に行った。

[0228] 実施例の R N A (E x) として、前記実施例 A 8 における P K — 0 0 0 7 および N K 0 0 3 3 を使用した。また、比較例の R N A として、以下に示す、R N A i ネガティブコントロール (N c) の P K — 0 0 0 8 および N K — 0 0 3 5、R N A i ポジティブコントロール (P c) の d s R N A (N I — 0 0 3 0) および R N A i ネガティブコントロール (N c) の d s R N A (N 1 - 0 0 3 1) を使用した。ネガティブコントロールの P K — 0 0 0 8 は、P K — 0 0 0 7 と同じ、前記アミダイト (スキーム 3 の前記化合物 10 : L — プロリンジアミドアミダイト) 由来のリンカー L<sub>x</sub> および L<sub>y</sub> を有する。

[0229]

[化 11]

E x : P K - 0 0 0 7 (配列番 き 3 2)

5' - cagcuguacauugacuuuagcc- Lx- GGCUAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUC- Ly-gaa - 3'

Xc Z Yc

N c : P K - 0 0 0 8 (配列番号 3 6)

5' - ^iqu caqug cucauuuacaagcc- Lx - pecuuuUAAAUeAeCACVeACACUVC - Ly-gaa -3'

E x : N K - 0 0 3 3 (fid 列番号 8 ü)

5' -cagcuguacauuqacuuuaqcccCACACCGGCUAAAGUCAAUGUACAGCUGCU0CUUCGqaa-3'

N c : N K - 0 0 3 5 (fid 列番号 1 5)

5' - ugucagugucuuuuacaagccCCACAOCQSCUUEUAAAUEA3CACUEACACUUCUUCGc|aa-3

**X<sub>C</sub>** **Z** **Y<sub>C</sub>**

P c : N l - 0 0 3 0

5' - GCAGCUGUACAUUGACUUUAG —3' (配列番号 39)  
3' - UUCGUCGACAUGAACUGAAA -5' (配列番号 40)

N c : N l - 0 0 3 1

5' - GUGUCAGUGCUAUUACAAG -3' (番号4)

3' - UUCACAGUCACGAGUAAAUGU -5' (番号42)

[0230] 前記RNA 100 $\mu$ gを滅菌生理食塩水75 $\mu$ Lに溶解して、RNA溶液を調製した。他方、100 $\mu$ gのリポ多糖(LPS)を、滅菌生理食塩水50 $\mu$ Lに溶解して、LPS溶液を調製した。

[0231] 以下に、各投与群を示す。特に示さない限りは、前記実施例 A 6 と同様に投与を行った。各投与群において、4 ~ 6 匹のマウスを使用した。

· 投与群 1

滅菌生理食塩水 75  $\mu$ L の投与から5分後、滅菌生理食塩水 50  $\mu$ L を投与

· 投与群 2

滅菌生理食塩水 75  $\mu$ L の投与から5分後、LPS溶液 50  $\mu$ L を投与

・ 投与群 3

RNA 溶液 (PK-0007) 75  $\mu$ L の投与から5分後、LPS 溶液 50  $\mu$ L を投与

・投与群 4

RNA 溶液 (PK—0008) 75  $\mu$ L の投与から5分後、LPS 溶液 50  $\mu$ L を投与

・投与群 5

RNA 溶液 (NK—0033) 75  $\mu$ L の投与から5分後、LPS 溶液 50  $\mu$ L を投与

・投与群 6

RNA 溶液 (NK—0035) 75  $\mu$ L の投与から5分後、LPS 溶液 50  $\mu$ L を投与

・投与群 7

RNA 溶液 (NI—0030) 75  $\mu$ L の投与から5分後、LPS 溶液 50  $\mu$ L を投与

・投与群 8

RNA 溶液 (NI—0031) 50  $\mu$ L の投与から5分後、LPS 溶液 50  $\mu$ L を投与

[0232] そして、前記実施例 A 6 と同様にして、肺サンプルを調製し、単位重量の肺あたりの TGF- $\beta$  1 発現量を測定した。

[0233] その結果を、図 17 に示す。図 17 は、各投与群における単位重量の肺あたりの TGF- $\beta$  1 発現量を示すグラフである。LPS (+) / PK-0007 (+) の投与群 3 および LPS (+) / NK—0033 (+) の投与群 5 は、それぞれ、LPS (+) / ssRNA (-) の投与群 2 と比較して、TGF- $\beta$  1 遺伝子の発現量が抑制された。この抑制効果は、LPS (+) / ポジティブコントロール NI—0030 の投与群 7 よりも、強いことが明らかとなった。特に、LPS (+) / PK—0007 (+) の投与群 3 は、著しい抑制効果を示した。なお、ネガティブコントロールの RNA を投与した投与群 4 (PK-0008)、投与群 6 (NK-0035)、投与群 8 (NI—0031) では、抑制効果は確認されなかった。

[0234] (A9-2) *in vivo* でのオフターゲット効果



本発明の ssRNA を用いて、*in vivo*でのオフターゲット効果を確認し、副作用を評価した。

[0235] 実施例の RNA は、前記実施例 A 8 の ssRNA (PK-0007) を使用した。比較例の RNA は、前記実施例 A 9-1 に示す、RNA i ネガティブコントロール (Nc) の ssRNA (PK\_0008)、RNA i ポジティブコントロール (Pc) の dsRNA (NI\_0030) および RNA i ネガティブコントロールの dsRNA (N1-0031) を使用した。そして、前記 RNA 100  $\mu$ g を滅菌生理食塩水 75 从 L に溶解して、RNA 溶液を調製した。

[0236] 以下に、各投与群を示す。各投与群において、2~4 匹のマウスを使用した。

・投与群 1

滅菌生理食塩水 75  $\mu$ L を投与

・投与群 2

RNA 溶液 (PK-0007) 75  $\mu$ L を投与

・投与群 3

RNA 溶液 (PK-0008) 75  $\mu$ L を投与

[0237] そして、投与から 24 時間後、前記実施例 A 6 と同様にして、マウスから BALF サンプルを回収し、前記 BALF サンプルの上清を得た。前記上清について、TNF- $\alpha$  量および IFN- $\beta$  量を測定した。前記 TNF- $\alpha$  量は、商品名 Mouse TNF set II (Beckton Dickinson and Company) を用いて、その使用説明書に従って定量した。また、前記 IFN- $\beta$  量は、商品名 Rabbit Anti-Mouse Interferon  $\beta$  (PBL Interferon Source) および商品名 Biotin Labeling Kit-NH2 (同仁化学研究所) を用いて作製した ELISA プレートを用いて、それらの使用説明書にしたがって定量した。

[0238] これらの結果を、図 18 に示す。図 18 (A) は、各投与群の BALF サ

ンプル中の T N F \_  $\alpha$  量を示すグラフであり、図 18 ( B ) は、各投与群の B A L F サンプル中の I F N \_  $\beta$  量を示すグラフである。図 18 において、横軸は、それぞれの量を示す。前記 P K — 0 0 0 7 ( + ) の投与群 2 は、R N A ( - ) の投与群 1 と比較して、T N F —  $\alpha$  および I F N \_  $\beta$  の発現が惹起されなかった。

[0239] (実施例 A 1 0 ) 2 9 3 細胞における L A M A 1 遺伝子の発現抑制効果

本発明の s s R N A を用いて、i n v i t r o における L A M A 1 遺伝子の発現抑制を確認した。

[0240] ( 1 ) 材料および方法

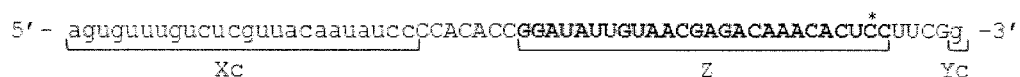
実施例の R N A ( E x ) として、以下に示す N K — 0 0 4 3 、 N K — 0 0 6 4 を使用した。下記配列において、<sup>\*</sup> は、フリー塩基を示す (以下、同様)。

[化 12]

E  $\chi$  : N K — 0 0 4 3 (配列番号 4 3)



E  $\chi$  : N K — 0 0 6 4 (配列番号 4 4)



[0241] 前記 R N A を使用した以外は、前記実施例 A 4 と同様にして、2 9 3 細胞へのトランスフェクションを行い、前記細胞を 4 8 時間培養した。トランスフェクション時の R N A 濃度は、1 0 n m o l / L とした。そして、プライマーとして、以下の L A M A 1 遺伝子用プライマーセットを使用した以外は、前記実施例 A 2 と同様にして、R N A 回収、c D N A 合成および P C R を行い、L A M A 1 遺伝子の発現量および内部標準である  $\beta$  — アクチン遺伝子の発現量を測定した。前記 L A M A 1 遺伝子の発現量は、内部標準である  $\beta$  — アクチン遺伝子の発現量により補正した。

L A M A 1 遺伝子用プライマーセット

5' -AAAGCTGCCAATGCCCCTCGACC-3' (配列番号45)

5' -TAGGTGGGTGGCCCTCGTCTTG-3' (配列番号46)

[0242] また、前記実施例 A 2 と同様にして、コントロール 1 ( - ) およびコントロール 2 ( m o c k ) についても、発現量を測定した。そして、補正後の L A M A 1 遺伝子発現量について、コントロール ( - ) の細胞の発現量を 1 とし、各 R N A を導入した細胞の発現量の相対値を求めた。

[0243] (2) 結果

これらの結果を、図 19 に示す。図 19 は、293 細胞における L A M A 1 遺伝子の発現量の相対値を示すグラフである。図 19 に示すように、実施例の N K \_ 0 0 4 3 および N K \_ 0 0 6 4 は、強い遺伝子発現抑制活性を示すことがわかった。

[0244] (実施例 A 1 1) A 5 4 9 細胞における L M N A 遺伝子の発現抑制効果

本発明の ssRNA を用いて、RNA 干渉効果による、in vitro  
における LMNA 遺伝子の発現抑制を確認した。

[0245] (1) 材料および方法

実施例の RNA (Ex) として、以下に示す NK-0063、NK-0066 を使用した。下記配列において、「<sup>R</sup>」は、フリー塩基を示す。

[ 化 13 ]

E x : N K — 0 0 6 3 (配列番号 4 7)

[illegible]

Ex :NK \_ 0 0 6 6 (配列番号 4 8)

5' - ,agcgucaccaa.aaagcgcaaujccpCacacCGGaAUUC3CGCUUUUirGSUsac<3CU%CUUCGg. -3'

[0246] 前記RNAを使用した以外は、前記実施例A4と同様にして、A549細胞へのトランスフェクションを行い、前記細胞を48時間培養した。トランスフェクション時のRNA濃度は、3 nmol/Lとした。そして、プライマーとして、以下のLMNA遺伝子用プライマーセットを使用した以外は、

前記実施例 A 2 と同様にして、RNA 回収、cDNA 合成および PCR を行い、LMNA 遺伝子の発現量および内部標準である  $\beta$  —アクチン遺伝子の発現量を測定した。前記 LMNA 遺伝子の発現量は、内部標準である  $\beta$  —アクチン遺伝子の発現量により補正した。

LMNA 遺伝子用プライマーセット

5' -CTGGACATCAAGCTGGCCCTGGAC-3' (配列番号 49)

5' -CACCAGCTTGCGCATGGCCACTTC-3' (配列番号 50)

[0247] また、前記実施例 A 2 と同様にして、コントロール 1 (−) およびコントロール 2 (mock) に関しても、発現量を測定した。そして、補正後の LMNA 遺伝子発現量について、コントロール (−) の細胞の発現量を 1 とし、各 RNA を導入した細胞の発現量の相対値を求めた。

[0248] (2) 結果

これらの結果を、図 20 に示す。図 20 は、A549 細胞における LMNA 遺伝子の発現量の相対値を示すグラフである。図 20 に示すように、実施例の NK\_0063 および NK\_0066 は、強い遺伝子発現抑制活性を示すことがわかった。

[0249] (実施例 A 12) Xc と Yc の長さ

本発明の ssRNA について、前記内部 5' 側領域 (X) に相補的な前記 5' 側領域 (Xc) の長さ、および、前記内部 3' 側領域 (Y) に相補的な前記 3' 側領域 (Yc) の長さを変化させ、*in vitro* における GAPDH 遺伝子の発現抑制を確認した。

[0250] (1) 材料および方法

実施例の RNA として、図 21 に示す ssRNA を使用した。図 21 において、右端の番号は、配列番号を示す。図 21 において、5' 側から、小文字下線の領域は、前記領域 (Xc)、大文字下線の領域は、前記内部領域 (Z)、小文字下線の領域は、前記領域 (Yc) を示す。前記 Xc と前記 Z との間が、リンカー領域 (Lx) であり、前記 Z と前記 Yc との間が、リンカー領域 (Ly) である。また、「Xc/Yc」は、前記領域 (Xc) の塩基

長 (X c) と、前記領域 (Y c) の塩基長 (Y c) との比を示す。図 2 1 において、<sup>fr</sup> は、フリー塩基を示す。

[0251] 各 s s R N A は、いずれも、内部領域 (Z) の塩基長を 2 6 塩基、リンカー領域 (L x) の塩基長を 7 塩基、リンカー領域 (L y) の塩基長を 4 塩基とした。また、N K—0 0 3 6 および N K—0 0 4 0 は、前記領域 (X c) と前記領域 (Y c) との合計塩基数 (X c + Y c) を 2 6 塩基とし、それ以外は、前記領域 (X c) と前記領域 (Y c) との合計塩基数 (X c + Y c) を 2 5 塩基とした。そして、この条件の下、前記領域 (X c) および前記領域 (Y c) の塩基長を変化させた。これによつて、N ベ\_ 0 0 3 6 および N K—0 0 4 0 は、フリー塩基を有さない分子とした。また、これら以外の各 s s R N A は、前記内部領域 (Z) における、二重鎖を形成しないフリー塩基を全て 1 塩基とし、且つ、前記内部領域 (Z) における前記フリー塩基の位置を 3' 側から 5' 側に変動させた。

[0252] 前記 R N A を使用した以外は、前記実施例 A 2 と同様にして、H C T 1 1 6 細胞へのトランスフェクション、培養、R N A 回収、c D N A 合成および P C R を行い、G A P D H 遺伝子の相対的発現量を測定した。トランスフェクション時の R N A 濃度は、1 0 n m o l / L とした。

[0253] (2) 結果および考察

これらの結果を、図 2 2 に示す。図 2 2 は、終濃度 1 0 n m o l / L の R N A を使用した場合における G A P D H 遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。図 2 2 に示すように、前記 5' 側領域 (X c) および前記 3' 側領域 (Y c) の長さを変化させたいずれの s s R N A についても、G A P D H 遺伝子の発現抑制が確認できた。

[0254] 特に、前記領域 (X c) の塩基長と前記領域 (Y c) の塩基長の差が大きくなるに従って、相対的に遺伝子の発現量が低下し、発現抑制活性が増加したことが確認された。すなわち、前記内部領域 (Z) におけるフリー塩基の位置を、前記内部領域の中央よりも、5' 側または 3' 側に配置するほど、前記発現抑制活性を向上できることがわかった。

[0255] 前記実施例 A 2 において、NK\_0016 は、極めて強い発現抑制活性が確認されている。本実施例において、NK—0025 および NK—0037 は、前記 NK\_0016 をさらに上回る活性が認められた。

[0256] なお、フリー塩基の位置に関しては、例えば、本実施例とは異なる遺伝子を対象とする実施例 A 8 (TGF- $\beta$ 1 遺伝子)、実施例 A 10 (LAMA1 遺伝子)、実施例 A 11 (LMNA 遺伝子) においても、同様の効果が得られている。

[0257] すなわち、前記実施例 A 8 では、前述の配列に示すように、NK—0033 と NK—0055 は、ともに 1 塩基のフリー塩基を有し、前者は、内部領域 (Z) の 3' 末端から 4 番目に位置し、後者は、内部領域 (Z) の 3' 末端から 2 番目に位置する。そして、前述の図 15 に示すように、フリー塩基が、より 3' 末端側に位置する NK\_0055 が、高い発現抑制を示した。フリー塩基が 2 塩基である NK—0061 と NK—0062 との間においても、同様の結果であった。また、実施例 A 9 および実施例 10 においても、前記実施例 8 と同様の条件で、フリー塩基の位置を変化させたが、同様に、フリー塩基が、より 3' 末端側に位置する ssRNA が、高い発現抑制を示した。

[0258] これらの結果からも、標的遺伝子の種類ならびにそれに対する発現抑制配列にかかわらず、同様の挙動を示すことは明らかである。このため、本発明の ssRNA は、標的遺伝子の種類に関わらず適用可能なツールといえる。

[0259] (実施例 A 13) X、X<sub>c</sub>、Y および Y<sub>c</sub> の長さ

本発明の ssRNA について、前記内部 5' 側領域 (X)、前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>)、前記内部 3' 側領域 (Y) および前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>) の各長さを変化させ、*in vitro* における GAPDH 遺伝子の発現抑制を確認した。

[0260] (1) 材料および方法

実施例の RNA として、図 23 に示す ssRNA を使用した。図 23 において、右端の番号は、配列番号を示す。図 23 において、5' 側から、小文

字下線の領域は、前記領域 ( $X_c$ )、大文字下線の領域は、前記内部領域 ( $Z$ )、小文字下線の領域は、前記領域 ( $Y_c$ ) を示す。また、 $\lceil X_c + Y_c Z X + Y \rceil$  は、前記領域 ( $X_c$ ) と前記領域 ( $Y_c$ ) の塩基長の合計と、前記領域 ( $X$ ) と前記領域 ( $Y$ ) の塩基長の合計との比を示す。図 23 において、 $\lceil \cdot \rceil$  は、フリー塩基を示す。

[0261] 各 ssRNA は、いずれも、リンカー領域 ( $L_x$ ) の塩基長を 7 塩基、リンカー領域 ( $L_y$ ) の塩基長を 4 塩基、前記領域 ( $Y_c$ ) の塩基長を 1 塩基とし、前記内部領域 ( $Z$ ) の 3' 側から 2 番目の塩基を、フリー塩基とした。そして、前記内部領域 ( $Z$ ) の塩基長と前記領域 ( $X_c$ ) の塩基長を変動させた。

[0262] 特に示さない限りは、前記実施例 A2 と同様にして、前記 RNA について、HCT 116 細胞へのトランスフェクション、培養、RNA 回収、cDNA 合成および PCR を行い、GAPDH 遺伝子の発現量を測定した。前記トランスフェクションの条件は、前記ウエルあたりの組成を以下のように設定した。下記組成において、(B) は、0 pt i - MEM (商品名、Invitrogen)、(C) は、 $20 \mu\text{mol/L}$  前記 RNA 溶液であり、両者をあわせて  $98.5 \mu\text{L}$  添加した。前記ウエルにおいて、前記 RNA の最終濃度は、 $1 \text{ nmol/L}$  とした。内部標準による補正、発現量の相対値の算出も、前記実施例 A2 と同様に行った。

[表 5]

(ウエルあたりの組成 : はし)

|                        |      |
|------------------------|------|
| 培養液                    | 400  |
| (A) Lipofectamine 2000 | 1.5  |
| (B) + (C)              | 98.5 |
| 合計                     | 500  |

[0263] (2) 結果および考察

これらの結果を、図 24 に示す。図 24 は、終濃度  $1 \text{ nmol/L}$  の RNA を使用した場合における GAPDH 遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。図 24 に示すように、前記領域 ( $X$ )、前記領域 ( $X_c$ )、前記領域

(Y) および前記領域 (Y c) の長さを変化させたいずれの s s R N A についても、G A P D H 遺伝子の発現抑制が確認できた。また、前記実施例 A 2 において、N K — 0 0 1 6 は、極めて強い発現抑制活性が確認されている。本実施例において、N K — 0 0 1 6 以外の s s R N A は、全て N K \_ 0 0 1 6 をさらに上回る活性が認められた。

[0264] (実施例 A 1 4) X c の長さ

本発明の s s R N A について、前記内部 5' 側領域 (X) に相補的な前記 5' 側領域 (X c) の長さを変化させ、i n v i t r o における G A P D H 遺伝子の発現抑制を確認した。

[0265] (1) 材料および方法

実施例の R N A として、図 2 5 に示す s s R N A を使用した。図 2 5 において、5' 側から、小文字下線の領域は、前記領域 (X c)、大文字下線の領域は、前記内部 5' 領域 (X)、小文字下線の領域は、前記領域 (Y c) を示す。また、「X c / Y c」は、前記領域 (X c) の塩基長 (X c) と、前記領域 (X) の塩基長 (X) との比を示す。図 2 5 において、「<sup>®</sup>」は、フリー塩基を示す。下記 R N A の配列は、配列番号 7 4 ~ 7 6 に示す。

[0266] 各 s s R N A は、いずれも、内部領域 (Z) の塩基長を 2 6 塩基、前記領域 (X) を 2 5 塩基、前記領域 (Y) を 1 塩基、前記領域 (Y c) を 1 塩基、リンカー領域 (L x) の塩基長を 7 塩基、リンカー領域 (L y) の塩基長を 4 塩基とした。そして、この条件の下、前記領域 (X c) の塩基長を変化させた。これによつて、各 s s R N A は、前記内部領域 (Z) における、二重鎖を形成しないフリー塩基の有無および数を変化させた。なお、N K — 0 0 1 は、フリー塩基を有さない。

[0267] 前記 R N A を使用した以外は、前記実施例 A 1 3 と同様にして、H C T 1 1 6 細胞へのトランスフェクション、培養、R N A 回収、c D N A 合成および P C R を行い、G A P D H 遺伝子の発現量を測定した。内部標準による補正、発現量の相対値の算出も、前記実施例 A 1 3 と同様に行った。

[0268] (2) 結果および考察



これらの結果を、図26に示す。図26は、終濃度  $1 \text{ nmol/L}$  の RNA を使用した場合における GAPDH 遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。図26に示すように、前記5'側領域 (Xc) の長さを変化させたいずれの ssRNA についても、GAPDH 遺伝子の発現抑制が確認できた。特に、フリー塩基を有する場合、その数が少ない程、前記発現抑制活性を向上できると考えられる。また、前記実施例A2において、NK-0016は、極めて強い発現抑制活性が確認されている。本実施例において、NK-0016以外の ssRNA は、全て NK-0016 をさらに上回る活性が認められた。

[0269] なお、フリー塩基の個数に関しては、例えば、本実施例とは異なる遺伝子を対象とする実施例A8 (TGF- $\beta$ 1 遺伝子) においても、同様の効果が得られている。すなわち、前記実施例A8では、前述の配列に示すように、NK-0033とNK-0061のフリー塩基は、前者が、1塩基であり、後者が2塩基である。そして、前述した図15に示すように、フリー塩基が少ないNK-0033が、高い発現抑制を示した。また、NK-0055とNK-0062は、前記NK-0033および前記NK-0061よりも、フリー塩基の位置を内部領域 (Z) の3'側に変動させることで、実施例A12で述べたように、高い発現抑制を示した。これらの結果からも、標的遺伝子およびそれに対する発現抑制配列の種類にかかわらず、同様の挙動を示すことは明らかである。このため、本発明の ssRNA は、標的遺伝子の種類に関わらず適用可能なツールといえる。

[0270] (実施例A15) リンカーの互換性

本発明の ssRNA について、前記内部5'側領域 (X) と前記5'側領域 (Xc) との間のリンカー領域 (Lx) および前記内部3'側領域 (Y) と前記3'側領域 (Yc) との間のリンカー領域 (Ly) を変化させ、*in vitro* における GAPDH 遺伝子の発現抑制を確認した。

[0271] (1) 材料および方法

実施例の RNA として、図27に示す ssRNA を使用した。図27にお

いて、5'側から、小文字下線の領域は、前記5'側領域 ( $X_c$ )、大文字下線の領域は、前記内部領域 ( $Z$ )、小文字下線の領域は、前記3'側領域 ( $Y_c$ )を示す。前記 $X$ と前記 $X_c$ との間の配列が、リンカー領域 ( $L_x$ )であり、前記 $Y$ と前記 $Y_c$ との間の配列が、リンカー領域 ( $L_y$ )である。また、各RNAについて、リンカー領域 ( $L_x$ )の塩基長 ( $L_x$ )と、リンカー領域 ( $L_y$ )の塩基長 ( $L_y$ )との比 ( $L_x / L_y$ )を示す。図27において、 $\text{R}$ は、フリー塩基を示す。

[0272] 前記RNAを使用した以外は、前記実施例A13と同様にして、HCT 116細胞へのトランスフェクション、培養、RNA回収、cDNA合成およびPCRを行い、GAPDH遺伝子の発現量を測定した。内部標準による補正、発現量の相対値の算出も、前記実施例A13と同様に行った。

[0273] (2) 結果および考察

これらの結果を、図28に示す。図28は、終濃度1nmol/LのRNAを使用した場合におけるGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。図28に示すように、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および ( $L_y$ ) の条件、すなわち、長さ、両者間の長さの比、配列等を変化させたいずれのssRNAについても、同様に、GAPDH遺伝子の発現抑制が確認できた。この結果から、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および ( $L_y$ ) の条件は、特に制限されず、様々な長さ、配列等に設計可能であることがわかった。

[0274] (実施例A16) HCT 116細胞におけるGAPDH遺伝子の発現抑制効果

プロリンまたはプロリノールを有するリンカーで置換したssRNAを用いて、HCT 116細胞でのGAPDH発現抑制効果を確認した。

[0275] (1) 材料および方法

実施例のRNA ( $E_x$ ) として、以下に示すRNA ( $E_x$  ssRNA) を合成した。また、比較例のRNAとして、以下に示す、RNA iのネガティブコントロール ( $N_c$ ) の $N_c$  ssRNAを合成した。下記式において、リンカー領域 ( $L_x$ ) およびリンカー領域 ( $L_y$ ) は、 $X_c X$ との間、お

よび、Y c Y との間を、プロリンまたはプロリノールを有する下記表のアミ  
 ダイト (実施例 B 参照) を用いて結合させた。

[化 14]

Ex ssRNA (配列番号 13)

5' - cauqaaaagauqacaaacagcc-Lx-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC-Ly-gaa - 3'

Xc                      Z                      Yc

N c s s R N A (配列番号 38)

5' - ccacaacqauaaguaagcc-Lx-GGCUUUACUUAUCGUUGAUGGCUUC-Ly-qaa-3'

[0276] [表6]

| s s RNA |         | L x および L y に使用したアミダイト            |
|---------|---------|-----------------------------------|
| 比較例     | 実施例     |                                   |
| PK-0003 | PK-0004 | レプロリンジアミドアミダイト<br>(スキーム3の化合物10)   |
| PK-0005 | PK-0006 | プロリノールウレタンアミダイト<br>(スキーム7の化合物6)   |
| PK-0009 | PK-0010 | プロリンアミドアミンアミダイト<br>(スキーム3の化合物12)  |
| PK-0011 | PK-0012 | プロリンアミドウレイドアミダイト<br>(スキーム3の化合物17) |
| PK-0015 | PK-0016 | プロリノールウレイドアミダイト<br>(スキーム7の化合物7)   |

[0277] 前記RNAを使用した以外は、前記実施例A 1 3と同様にして、HCT 1 1 6細胞へのトランスフェクション、培養、RNA回収、cDNA合成およびPCRを行い、GAPDH遺伝子の発現量を測定した。内部標準による補正、発現量の相対値の算出も、前記実施例A 1 3と同様に行った。

[0278] (2) 結果

これらの結果を、図 29 に示す。図 29 は、GAPDH 遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。図 29 に示すように、リンカー領域 (L<sub>x</sub>) およびリンカー領域 (L<sub>y</sub>) としてプロリンまたはプロリノールを含む E<sub>x</sub> s s RNA は、いずれも、強い遺伝子発現抑制活性が確認でき、濃度依存的に効果を示すことがわかった。他方、ネガティブコントロールの s s RNA は、抑制効果が観察されなかった。

[0279] (実施例 A 17) HCT 116 細胞における GAPDH 遺伝子の発現抑制効果

プロリンを有するリンカーで置換した ssRNA を用いて、HCT 116 細胞での GAPDH 発現抑制効果を確認した。

[0280] (1) 材料および方法

実施例のRNA (Ex) として、以下に示すRNA (Ex ssRNA) を合成した。また、比較例のRNAとして、以下に示す、RNA iのネガティブコントロール (Nc) のNc ssRNAを合成した。下記式において、リンカー領域 (Lx) およびリンカー領域 (Ly) は、 $\text{X} \circ$ と $\text{X}$ との間、および、 $\text{Y} \circ \text{Y}$ との間を、プロリンまたはプロリノールを有する下記表のアミダイト (実施例B参照) を用いて結合させた。

[化 15]

E x s s R N A (¾ 列番号 1 3)

$$5' - \underbrace{\text{cauqaqaagauagacaacaqcc-Lx}}_{X_C} - \underbrace{\text{-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC-}}_{Z} - \underbrace{\text{LY-gaa}}_{Y_C} - 3'$$

N c s s R N A (¾ 列番号 3 8)

5' - ccaucaacqauaaguqaaaqcc-Lx -GGCUUUC%CUUAUCGUUGAUGGCUUC-Ly -gaa -3'   
 x c z YC

[0281] [表7]

| s s RNA |         | L x および L y に使用したアミダイト             |
|---------|---------|------------------------------------|
| 比較例     | 実施例     |                                    |
| PK-0033 | PK-0034 | D-プロリンジアミドアミダイト<br>(スキーム3の化合物9)    |
| PK-0035 | PK-0036 | プロリンジアミドアミダイトタイプB<br>(スキーム4の化合物22) |
| PK-0003 | PK-0004 | L-プロリンジアミドアミダイト<br>(スキーム3の化合物10)   |

[0282] 前記RNAを使用した以外は、前記実施例A 13と同様にして、HCT 116細胞へのトランスフェクション、培養、RNA回収、cDNA合成およびPCRを行い、GAPDH遺伝子の発現量を測定した。内部標準による補正、発現量の相対値の算出も、前記実施例A 13と同様に行った。

[0283] (2) 結果

これらの結果を、図30に示す。図30は、HCT116細胞のGAPDH遺伝子発現量の相対値を示すグラフである。図30に示すように、リンカー領域 (Lx) およびリンカー領域 (Ly) としてプロリンを含む Ex ss RNA は、強い遺伝子発現抑制活性を示し、濃度依存的に効果を示すことがわかった。他方、ネガティブコントロールの ss RNA は、抑制効果が観察されなかった。

[0284] (実施例A18) リボヌクレアーゼ耐性

本発明の ss RNA について、リボヌクレアーゼ耐性を確認した。

[0285] (1) 材料および方法

実施例の RNA (Ex) として、実施例A5におけるNK-0033および実施例A8におけるPK\_0007を使用した。また、比較例の RNA として、実施例A9におけるポジティブコントロール (Pc) の ds RNA (NI-0030) を使用した。

[0286] まず、20 mmol/L Tris-HCl (pH8) に、60 pmol の前記 RNA、 $5 \times 10^{-5}$  ユニットの RNase A (Roche) および  $5 \times 10^{-5}$  ユニットの RNase T1 (Roche) を混合し、37℃にてインキュベートした。インキュベート開始から10分、20分、30分後に、定法に従って RNase の反応を停止させた。そして、前記反応液を15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、SYBR Green II (Lonza、スイス) で染色し、E-BOX-VX2 (エムエス機器、東京) を用いて分析した。

[0287] (2) 結果

この結果を図31に示す。図31は、リボヌクレアーゼ耐性を示す電気泳動写真である。図31において、レーン「M」は、分子量マーカーであり、min は、インキュベート時間を示す。

[0288] 図31に示すように、比較例の NI\_0030 は、インキュベート10分後において、ほぼ全てが分解された。これに対して、実施例の NK-0033 および PK-0007 は、インキュベート10分後においても、残存し

ていた。この結果から、本発明の s s R N A は、d s R N A よりも リボヌクレアーゼ耐性に優れることがわかった。

[0289] (実施例 A 19) ヌクレアーゼ耐性

本発明の s s R N A について、ヌクレアーゼ耐性を確認した。

[0290] (1) 材料および方法

前記実施例 A 18 と同じ R N A を使用した。まず、5 m m o l / L C a C l<sub>2</sub> を含む 50 m m o l Z L T r i s — H C l (p H 8) に、60 p m o l の前記 R N A、0.5 ユニットの S 7 ヌクレアーゼ (R o c h e) を混合し、37℃にてインキュベートした。インキュベート開始 (O h) から 0.5 時間後に、定法に従って S 7 ヌクレアーゼの反応を停止させた。そして、そして、前記反応液を定法に従い、7 M 尿素 — 15 % ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、S Y B R G r e e n I I (商品名、L o n z a) で染色し、E - B O X - V X 2 (商品名、エムエス機器) を用いて分析した。

[0291] (2) 結果

この結果を図 3 2 に示す。図 3 2 は、S 7 ヌクレアーゼ耐性を示す電気泳動写真である。図 3 2 において、レーン 「M」 は、分子量マーカーである。また、h は、インキュベート時間を示す。

[0292] 図 3 2 に示すように、比較例の N I — 0030 は、インキュベートに 5 時間後において、ほぼ全てが分解された。これに対して、実施例の N K — 0033 および P K — 0007 は、インキュベートに 5 時間後においても、残存していた。この結果から、本発明の s s R N A は、d 5 f<sub>4</sub> N 八よりも 3 7 ヌクレアーゼ耐性に優れることがわかった。

[0293] 前記実施例 A の各結果から、本発明の s s R N A は、例えば、標的遺伝子の種類に依存することなく、構築可能であることがわかった。具体的に、前記 s s R N A は、例えば、前記領域 (X) と前記領域 (X c) により形成される二重鎖の長さおよび前記領域 (Y) と前記領域 (Y c) により形成される二重鎖の長さ、前記内部領域 (Z) において、二重鎖を形成しないフリー

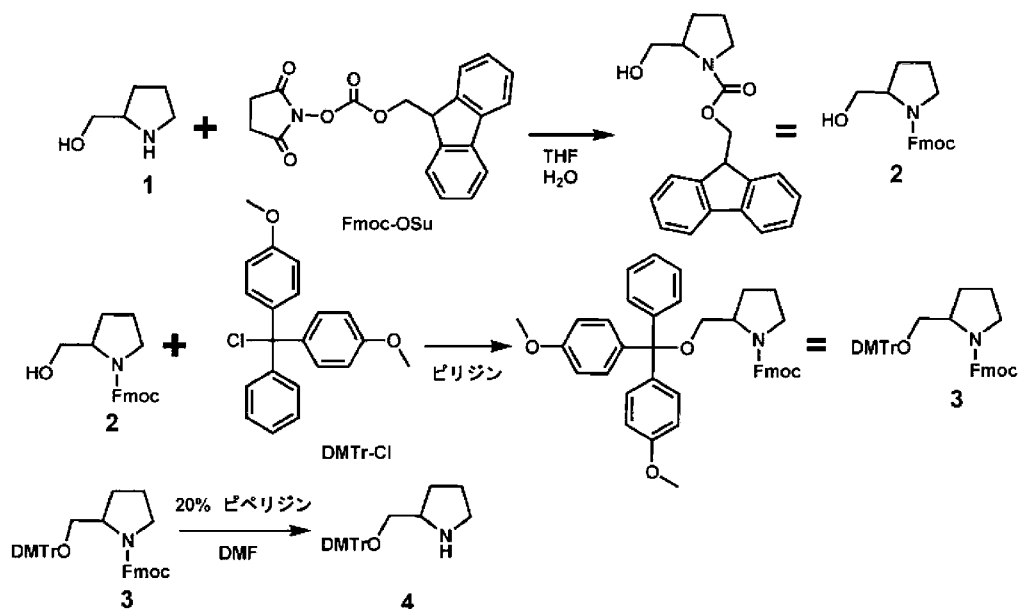
塩基の有無、個数および位置、ならびに、リンカー領域 (L<sub>x</sub>) およびリンカー領域 (L<sub>y</sub>) の有無、種類および長さ等は、改変可能であることがわかった。このことから、本発明の s s RNA は、遺伝子の発現抑制において、標的遺伝子の種類に依存することなく使用できる、汎用性の高い新たなツールであるといえる。

[0294] (実施例 B 1)

#### 1. プロリノールの合成

下記式に示すスキーム 1 に従い、ジメトキシトリチル基で保護されたプロリノールを合成した。

[0295] [化 16]



スキーム 1

[0296] (1) Fmoc-L-プロリノール (化合物 2)

L-プロリノール (化合物 1) (0.61 g、6.0 mmol) を、純水 70 mL に溶解し、L-プロリノール水溶液を調製した。N-(9-フルオレニルメトキシカルボニロキシ)スクシンイミド (Fmoc-OSu) (2.0 g、6.0 mmol) を、THF 10 mL に溶解した。この THF 溶液を、前記 L-プロリノール水溶液に加え、1 時間攪拌して、両者を反応させ

た。この反応液を、液体画分と沈殿画分とに分離し、それぞれの画分を酢酸エチルで抽出し、それぞれ有機層を回収した。そして、それぞれの有機層を合わせた後、無水硫酸ナトリウムを添加して、水分を吸収させた（以下、乾燥という）。前記有機層をろ過して、ろ液を回収し、前記ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1）により精製し、化合物 2 を得た（1.4 g、収率 74 %）。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.77 (2H, d,  $J=7.7$  Hz, Ar-H), 7.60 (2H, d,  $J=7.3$  Hz, Ar-H), 7.40 (2H, t,  $J=7.5$  Hz, Ar-H), 7.31 (2H, t,  $J=7.6$  Hz, Ar-H), 4.40 - 4.50 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 4.22 (1H, t,  $J=6.5$  Hz, Ar-CH), 3.20 - 3.80 (5H, m, H-5, H-6), 1.75 (3H, m, H-3, H-4), 1.40 (1H, m, H-3)。

[0297] (2) Fmoc-L-プロリノール（化合物 3）

前記 Fmoc-L-プロリノール（化合物 2）（1.4 g、4.3 mmol）を、ピリジン 20 mL に溶解して、3 回共沸した。得られた残留物を、ピリジン 20 mL に溶解した。この溶液を、アルゴン下、氷浴中で、撹拌しながら、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド（DMTr-Cl）（1.8 g、5.3 mmol）を添加した。この反応液について、クロロホルム/メタノールの TLC により反応を追跡し、Fmoc-L-プロリノールのスポットが消えるまで、4 時間反応させた。そして、過剰の DMTr-Cl をクエンチするために、前記反応液に、メタノール 3 mL を加えて 10 分撹拌した。前記反応液に、さらに、クロロホルムを加えた後、有機層を回収した。回収した前記有機層に、飽和食塩水による洗浄、5 % 炭酸水素ナトリウム水溶液による洗浄を行い、もう一度、飽和食塩水による洗浄を行った。洗浄後の有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマト



グラフィー（展開溶媒：クロロホルム、1%ピリジン）により精製し、化合物3を得た（2.0g、収率74%）。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.77 (2H, d,  $J = 7.7$  Hz, Ar-H), 7.60 (2H, d,  $J = 7.3$  Hz, Ar-H), 7.40 - 7.18 (13H, m, Ar-H), 6.89 (4H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 4.20 - 4.40 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 4.02 (1H, t,  $J = 6.5$  Hz, Ar-CH), 3.80 - 3.10 (5H, m, H-5, H-6), 3.73 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.84 (3H, m, H-3, H-4), 1.58 (1H, m, H-3).

[0298] (3) DMT r \_ L —プロリノール（化合物4）

前記 Fmoc \_ DMT r \_ L —プロリノール（化合物3）（2.0g、3.2mmol）を、20%ピペリジンを含むDMF溶液25mLに溶解し、12時間撹拌した。この溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール=85：15、1%ピリジン含有）で精製し、化合物4を得た（1.0g、収率78%）。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

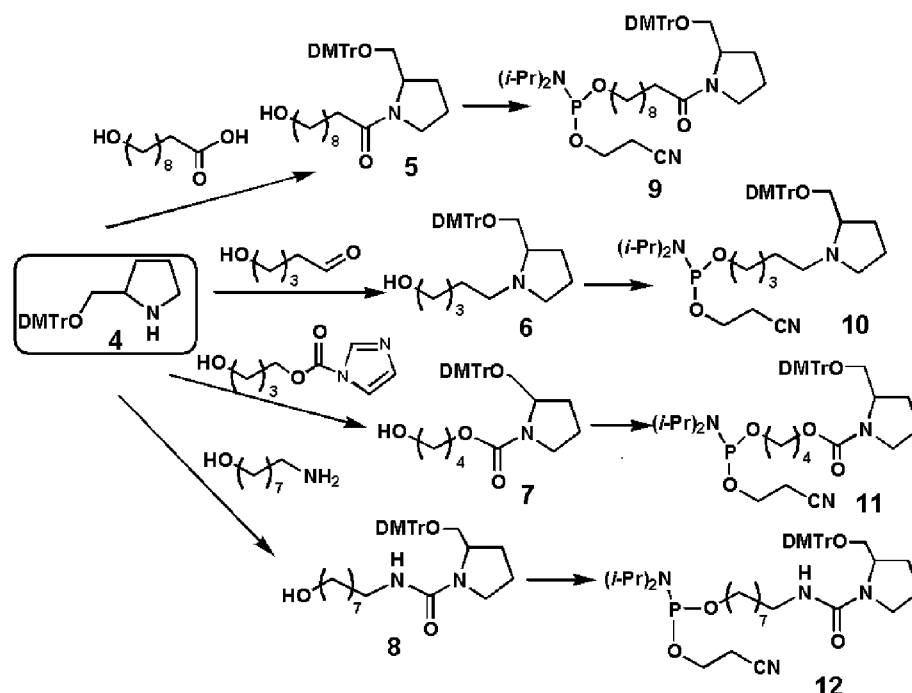
$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 3.78 (6H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.31 (1H, m, H-6), 3.07 (2H, m, H-2, H-6), 2.90 (2H, m, H-5), 1.84 (3H, m, H-3, H-4), 1.40 (1H, m, H-3).

[0299] 2. アミダイト誘導体の合成

つぎに、下記式に示すスキーム2に従い、プロリノールを有するアミダイト誘導体を合成した。以下、1\_エチル\_3\_（3—ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩を、「EDC」、N,N—ジメチルアミノピリジン（4—ジメチルアミノピリジン）を「DMAP」という。

[0300]

[化 17]



スキーム 2

[0301] (1) DMTr-アミド-Loopリノール (化合物 5)

前記 DMTr-Loopリノール (化合物 4) (0.80 g、2.0 mmol)、EDC (0.46 g、2.4 mmol) および DMAP (0.29 g、2.4 mmol) を、ジクロロメタン 20 mL に溶解して撹拌した。この溶液に、10-ヒドロキシデカン酸 (0.45 g、2.4 mmol) を添加し、撹拌した。この反応液について、酢酸エチルの TLC により反応を追跡し、DMTr-Loopリノールのスポットが消えるまで、20 時間反応させた。そして、前記反応液に、ジクロロメタンを加えた後、有機層を回収した。回収した前記有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル、1% ピリジン含有) により精製し、化合物 5 を得た (0.71 g、収率 62%)。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.14 (9 H, m, Ar-H), 6.82 (4 H, d,  $J = 8.6$  Hz, Ar-H), 3.78 (6 H

, s, OCH<sub>3</sub>), 3.68 - 2.93 (7H, m, H-2, H-5, H-6), 2.27 - 1.72 (6H, m, アルキル, H-3, H-4), 1.58 (4H, s, アルキル), 1.30 (10H, s, アルキル).

[0302] (2) DMT r\_ アルキル\_ L —プロリノール (化合物6)

前記DMT r\_ L —プロリノール (化合物4) (0.80 g、2.0 mmol) を、メタノール15 mL に溶解し、5 —ヒドロキシペンタナール (0.31 g、3.0 mmol) を加えて攪拌した。この溶液に、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (0.25 g、4.0 mmol) を加え、さらに攪拌した。この反応液について、酢酸エチル/ヘキサンのTLCにより反応を追跡し、DMT r\_ L —プロリノールのスポットが消えるまで、24時間反応させた。そして、前記反応液に、酢酸エチルを加え、有機層を回収した。回収した前記有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1、1% ピリジン含有) により精製し、化合物6を得た (0.62 g、収率63%)。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.40 - 7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H), 3.78 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.70 - 2.86 (4H, m, CH<sub>2</sub>OH, H-6), 2.06 - 1.79 (5H, m, アルキル, H-2, H-5), 1.74 - 1.49 (6H, m, アルキル, H-3, H-4), 1.45 - 1.27 (4H, m, アルキル).

[0303] (3) DMT r\_ ウレタン\_ L —プロリノール (化合物1)

1,4 —ブタンジオール (0.90 g、10 mmol) を、ジクロロメタン30 mL に溶解し、さらに、カルボニルジイミダゾール (1.4 g、8.6 mmol) を加え、3時間攪拌した。この反応液の有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフ

イー（クロロホルム：メタノール＝9：1）により精製した。これによつて、1,4-ブタンジオールの一方の末端がカルボニルジイミダゾールで活性化された化合物を得た（0.25 g, 1.5 mmol）。この化合物をジクロロメタン15 mLに溶解し、前記DMTr-L-プロリノール（化合物4）（0.6 g, 1.5 mmol）を添加し、24時間撹拌した。この混合液に、さらに、酢酸エチルを加え、有機層を回収した。回収した前記有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1、1%ピリジン含有）により精製し、化合物7を得た（0.61 g、収率77%）。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.14 (9 H, m, Ar-H), 6.82 (4 H, d,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , Ar-H), 4.24 - 3.94 (2 H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 3.78 (s, 6 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.72 - 2.96 (7 H, m, アルキル, H-2, H-5, H-6), 2.10 - 1.30 (8 H, m, アルキル, H-3, H-4)。

[0304] (4) DMTr-L-プロリノール（化合物8）

前記DMTr-L-プロリノール（化合物4）（0.50 g, 1.2 mmol）およびトリホスゲン（0.12 g, 0.40 mmol）を、ジクロロメタン8 mLに溶解し、アルゴン下、氷浴中で、撹拌した。そして、前記溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.31 g, 2.4 mmol）を添加し、1時間撹拌した。さらに、前記溶液に、8-アミノ-1-オクタノール（0.17 g, 1.2 mmol）を添加し、同様に氷浴中で30分撹拌した後、室温で20時間撹拌した。前記溶液に、ジクロロメタンを加え、有機層を回収した。回収した前記有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝4：1、1%トリエチルアミン含有）により精製し、化合

物 8 を得た (0.44 g、収率 62%)。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, m, Ar-H), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.68 - 3.25 (9H, m,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ , H-2, H-5, H-6), 1.74 - 1.18 (16H, m, アルキル, H-3, H-4)。

[0305] (5) プロリノールを有するアミダイト誘導体 (化合物 9 ~ 12)

前記修飾プロリノール (化合物 5 ~ 8) を、それぞれ原料として、以下に示す方法により、化合物 9 ~ 12 を合成した。前記修飾プロリノールおよび 5-ベンジルチオ-1H-テトラゾールを、アセトニトリル 3 mL に溶解した。前記修飾プロリノールの使用量は、化合物 5 の場合、0.69 g (1.2 mmol)、化合物 6 の場合、0.60 g (1.2 mmol)、化合物 7 の場合、0.60 g (1.2 mmol)、化合物 8 の場合、0.25 g (0.43 mmol) とした。また、5-ベンジルチオ-1H-テトラゾールの使用量は、化合物 5 ~ 7 に対しては、0.15 g (0.78 mmol)、化合物 8 に対しては、54 mg (0.15 mmol) とした。前記溶液に、アルゴン下、2-シアノエチル N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトを添加し、2 時間攪拌した。前記 2-シアノエチル N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトの添加量は、前記化合物 5 ~ 7 を使用した系では、0.54 g (1.8 mmol) とし、前記化合物 8 を使用した系では、0.19 g (0.64 mmol) とした。そして、前記溶液に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を添加し、さらに、ジクロロメタンで抽出し、有機層を回収した。回収した前記有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1、1% トリエチルアミン含有) により精製し、化合物 9 ~ 12 を得た。以下に、各化合物の NMR の結果を示す。

[0306] DMT r-アミド-L-プロリノールアミダイト (化合物 9、0.60 g、

収率 55%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.74 - 7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , Ar-H), 3.78 (6H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.68 - 2.93 (11H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_3$ , H-2, H-5, H-6), 2.58 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.27 - 1.72 (6H, m, アルキル, H-3, H-4), 1.58 (4H, s, アルキル), 1.30 (22H, s, アルキル,  $\text{CHCH}_3$ ).

[0307] DMT r\_ アルキル\_ L —プロリノールアミダイト (化合物 10、0.71 g、収率 60%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 8.74 - 7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , Ar-H), 3.78 (6H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.70 - 2.86 (8H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_3$ , H-6), 2.58 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.06 - 1.79 (5H, m, アルキル, H-2, H-5), 1.74 - 1.49 (6H, m, アルキル, H-3, H-4), 1.37 - 1.10 (16H, m, アルキル,  $\text{CHCH}_3$ ).

[0308] DMT r\_ ウレタン\_ L \_ プロリノールアミダイト (化合物 11、0.67 g、収率 52%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  8.74 - 7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , Ar-H), 4.24 - 3.94 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.72 - 2.96 (11H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_3$ , H-2, H-5, H-6), 2.58 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.10 - 1.46 (8H, m, アルキル, H-3, H-4), 1.34 - 1.10 (12H, m,  $\text{CHCH}_3$ ).

[0309] DMT r\_ ウレイド\_ L \_ プロリノールアミダイト (化合物 12、0.20 g、収率 61%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  8.74 - 7.14 (9H, m, Ar-H)

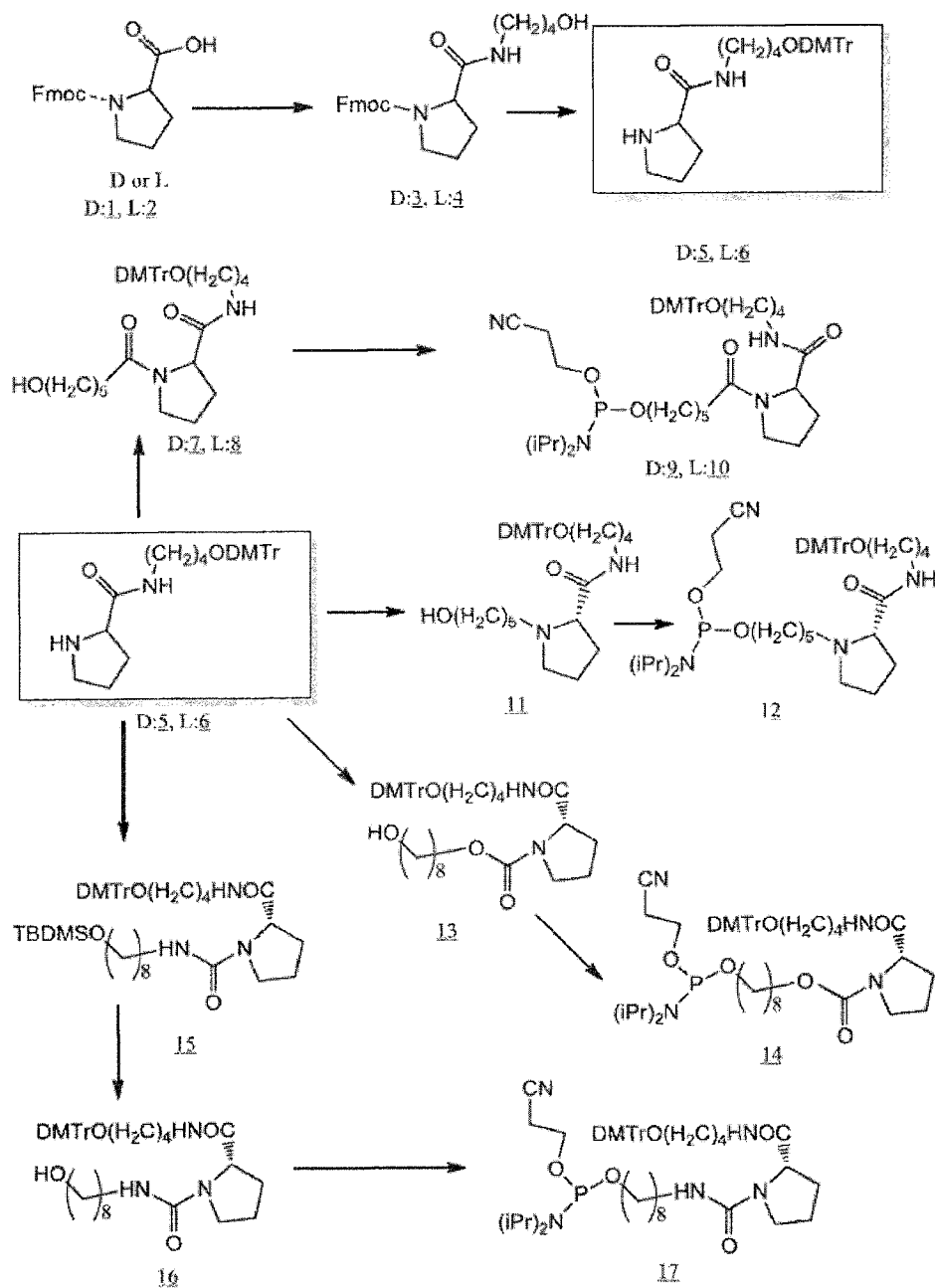
) , 6 . 8 2 ( 4 H , m , A r - H ) , 3 . 7 8 ( s , 6 H , O C H <sub>3</sub> ) , 3  
 . 6 5 - 3 . 2 5 ( 1 3 H , m , C H <sub>2</sub> O , P O C H <sub>2</sub> , C H C H <sub>3</sub> , H - 2 ,  
 C H <sub>2</sub> N H , C H <sub>2</sub> O H , H - 2 , H - 5 , H - 6 ) , 2 . 7 3 ( 2 H , m ,  
 C H <sub>2</sub> C N ) , 2 . 1 0 — 1 . 4 8 ( 1 6 H , m , アルキル , H - 3 , H - 4  
 ) , 1 . 3 5 - 1 . 1 0 ( 1 2 H , m , C H C H <sub>3</sub> ) .

[031 0] (実施例 B 2)

つぎに、下記式に示すスキーム 3 に従い、L-プロリンを有するアミダイ  
 ト誘導体を合成した。

[031 1]

[ 化 18 ]



ス キ - ム 3

[0312] (1) DMT r-ヒドロキシアミドアミノ-L-プロリン (化合物 11)

DMTr-アミド-L-プロリン (化合物6) (1.00 g、2.05 mmol) および 5-ヒドロキシペンタナール (0.33 g、3.07 mmol) を含むエタノール溶液 (7 mL) に、氷冷下、酢酸緩衝液 (7 mL) を加えた。この混合液を、氷冷下、20分攪拌した後、シアノ化ホウ素ナトリ



ウム (0.77 g、12.28 mmol) を加え、さらに、室温下、7 時間攪拌した。前記混合液をジクロロメタンで希釈し、水で洗浄した後、さらに飽和食塩水で洗浄した。そして、前記有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、ろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 98 : 2$ 、0.05% ピリジン含有) に供した。ついで、得られた生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 98 : 2$ 、0.05% ピリジン含有) に供し、さらに、得られた生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ジクロロメタン : アセトン = 7 : 3、0.05% ピリジン含有) に供した。これによって、無色シロップ状の化合物 11 を得た (0.49 g、収率 41%)。

MS (FAB+) : m/z 575 (M+)、303 (DMTr+)

[0313] (2) DMTr-アミドアミノ-L-プロリンアミダイト (化合物 12)

得られた前記 DMTr-ヒドロキシアミドアミノ-L-プロリン (化合物 11) (0.50 g、0.87 mmol) を無水アセトニトリルと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (178 mg、1.04 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (1 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (313 mg、1.04 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で 4 時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で、順次洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られた前記ろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカを用いたカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン : アセトン = 7 : 3、0.05% ピリジン含有) に供し、無色シロップ状の化合物 12 (0.57 g、純

度 93%、収率 19%) を得た。前記純度は、HPLC により測定した (以下、同様)。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.41 - 7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.28 - 7.32 (m, 4H, Ar-H)、7.25 - 7.27 (m, 2H, Ar-H)、7.18 - 7.21 (m, 1H, Ar-H)、6.80 - 6.84 (m, 4H, Ar-H)、3.73 - 3.84 (m, 1H)、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.47 - 3.64 (m, 3H)、3.12 - 3.26 (m, 2H)、3.05 (t,  $J = 6.4 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.98 - 2.02 (m, 2H)、2.61 (t,  $J = 5.8 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.55 - 2.63 (m, 2H)、2.27 - 2.42 (m, 1H, CH)、2.31 (t,  $J = 7.8 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.03 - 2.19 (m, 1H, CH)、1.40 - 1.90 (m, 8H)、1.23 - 1.33 (m, 5H)、1.14 - 1.20 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ) ;

$\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  146.91 ;

$\text{MS}$  ( $\text{FAB}^+$ ) :  $m/z$  774 ( $\text{M}^+$ )、303 ( $\text{DMTr}^+$ )、201 ( $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$ ) .

[0314] (3) DMTr-ヒドロキシアミドカルバモイル-L-プロリン (化合物 13)

DMTr-アミド-L-プロリン (化合物 6) (1.00 g、2.05 mmol) を溶解した無水アセトニトリル溶液 (10 mL) に、1-イミダゾカルボニルオキシ-8-ヒドロキシオクタン (1.12 g、4.92 mmol) を溶解した無水アセトニトリル溶液 (20 mL) を、アルゴン雰囲気下、室温で加えた。この混合液を、40 ~ 50℃で2日間加熱した後、5日間室温で放置した。前記混合液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ジクロロメタン : アセトン = 4 : 1、0.05% ピリジン含有) に供した。これによつて、無色シロップ状の化合物 13 を得た (0.68 g、収率 50%)。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) : 8.14 - 7.42 (m, 2H, Ar-H)、7.27 - 7.31 (m, 6H, Ar-H)、7.17 - 7.21 (m, 1H, Ar-H)、6.79 - 6.82 (m, 4H, Ar-H)、4.23 - 4.30 (m, 1H)、4.05 - 4.10 (m, 2H)、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.60 - 3.65 (m, 2H)、3.32 - 3.55 (m, 2H)、3.16 - 3.29 (m, 2H)、3.01 - 3.07 (m, 2H)、2.38 - 2.40 (m, 1H, CH)、1.83 - 1.90 (m, 2H)、1.57 - 1.69 (m, 8H)、1.26 - 1.36 (m, 2H) ;

MS (FAB+) : m/z 602 ( $\text{M}^+$ )、303 ( $\text{DMTr}^+$ ) .

[0315] (4) DMTr-アミドカルバモイル-L-プロリンアミダイト (化合物 14)

得られた前記DMTr-ヒドロキシアミドカルバモイル-L-プロリン (化合物 13) (0.63 g、1.00 mmol) を無水ピリジンと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (206 mg、1.20 mmol) を加え、減圧下に脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (1 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (282 mg、1.12 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で4時間撹拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカを用いたカラムクロマト (展開溶媒 ヘキサン : アセトン = 7 : 3、0.5% ピリジン含有) に供し、無色シロップ状の化合物 14 (0.74 g、純度 100%、収率 87%) を得た。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  147.19 ;

$M_s (FAB^+) : m/z \quad 860 (M^+), 303 (DMTr^+), 201 (C_8H_{19}N_2OP^+)$ .

[031 6] (5) DMTr-*t*-ブチルジメチルシロキシアミドウレイド-*L*-プロリン (化合物 15)

トリホスゲン (1.22 g、4.10 mmol) に、アルゴン雰囲気および氷冷下、無水テトラヒドロフラン溶液 (10 mL) を加えた。この混合液に、アルゴン雰囲気および氷冷下、DMTr-*A*ミド-*L*-プロリン (化合物 6) (1.00 g、2.05 mmol) および DIEA (9.80 g、75.8 mmol) を溶解した無水テトラヒドロフラン溶液 (10 mL) を、30 分間で滴下し、その後、室温で 1 時間攪拌した。前記混合液に、アルゴン雰囲気および氷冷下、10-*A*ミノ-1-*t*-ブチルジメチルシロキシデカン (2.66 g、10.25 mmol) および DIEA (3.20 g、24.76 mmol) を溶解した無水テトラヒドロフラン溶液 (20 mL) を、45 分間で滴下した。そして、前記混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で一晩攪拌した。この混合液を酢酸エチル (200 mL) で希釈し、有機層を回収した。前記有機層を、飽和重曹水で洗浄した後、さらに、飽和食塩水で洗浄した。そして、有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、ろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ジクロロメタン : アセトン = 4 : 1、0.05% ピリジン含有) に供した。これによつて、無色シロップ状の化合物 15 を得た (0.87 g、収率 55%)。

[031 7] (6) DMTr-*H*ドロキシアミドウレイド-*L*-プロリン (16)

得られた前記 DMTr-*t*-ブチルジメチルシロキシアミドウレイド-*L*-プロリン (15) (0.87 g、1.12 mmol) に、アルゴン雰囲気下、無水テトラヒドロフランジクロロメタン溶液 (10 mL) を室温に加えた。前記混合液に、アルゴン雰囲気下、1 mol/L テトラブチルアンモニウムフルオリド含有テトラヒドロフラン溶液 (4.69 mL、東京化成) を加え、室温で 3 日間攪拌した。前記混合液をジクロロメタン (150 mL) で

希釈し、水で洗浄した後、さらに飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ジクロロメタン：アセトン＝１：１、０．０５％ピリジン含有）に供し、無色シロップ状の化合物１６を得た（０．６８ｇ、収率９２％）。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.41-7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.27-7.31 (m, 4H, Ar-H)、7.19-7.26 (m, 2H, Ar-H)、7.19-7.21 (m, 1H, Ar-H)、6.80-6.83 (m, 4H, Ar-H)、4.34 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.63 (d, 1H,  $J=6.4\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ )、3.61 (d, 1H,  $J=6.4\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ )、3.34-3.37 (m, 1H, CH)、3.16-3.27 (m, 5H)、3.04 (t,  $J=5.9\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.38-2.45 (m, 1H, CH)、1.83-2.05 (m, 3H)、1.45-1.64 (m, 8H)、1.25-1.38 (m, 7H)。

[0318] (7) DMT r-アミドウレイド-L-プロリンアミダイト (化合物１７)

得られた前記DMT r-ヒドロキシアミドウレイド-L-プロリン (化合物１６) (0.62g、0.94 mmol) を無水アセトニトリルと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (192 mg、1.12 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合液に対し、無水アセトニトリル (1 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (282 mg、1.12 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で4時間撹拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で、順次洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られた前記ろ液について、減圧

下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカを用いたカラムクロマト（展開溶媒 ヘキサン：アセトン＝１：１、０．０５％ピリジン含有）に供し、無色シロップ状の化合物１７を得た（０．７７ｇ、純度８８％、収率８４％）。以下に、化合物のＮＭＲの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1.47, 2.7 ;

$\text{MS}$  ( $\text{FAB}^+$ ) :  $m/z$  860 ( $\text{M}^++1$ )、303 ( $\text{DMTr}^+$ )、201 ( $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}^+\text{P}$ ) .

[0319] （実施例Ｂ３）プロリンジアミドアミダイトの合成

プロリン骨格を有するリンカーを含む本発明の核酸分子を生成するため、前記スキーム３により、Ｌ－プロリンジアミドアミダイトおよびＤ－プロリンジアミドアミダイトを合成した。

[0320] （Ｂ３－１）Ｌ－プロリンジアミドアミダイト

（１） $\text{Fmoc}$ －ヒドロキシアミド－Ｌ－プロリン（化合物４）

前記スキーム３の化合物２（ $\text{Fmoc}$ －Ｌ－プロリン）を開始原料とした。前記化合物２（１０．００ｇ、２９．６４ｍｍｏｌ）、４－アミノ－１－プタノール（３．１８ｇ、３５．５６ｍｍｏｌ）および１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１０．９０ｇ、７０．７２ｍｍｏｌ）を混合し、前記混合物に対し、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に、無水アセトニトリル（１４０ｍＬ）を室温に加え、さらに、ジシクロヘキシルカルボジイミド（７．３４ｇ、３５．５６ｍｍｏｌ）の無水アセトニトリル溶液（７０ｍＬ）を添加した後、アルゴン雰囲気下、室温で１５時間撹拌した。反応終了後、生成した沈殿をろ別し、回収したろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣にジクロロメタン（２００ｍＬ）を加え、飽和重曹水（２００ｍＬ）で洗浄した。そして、有機層を回収し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去し、その残渣にジエチルエーテル（２００ｍＬ）を加え、粉末化した。生じた粉末を濾取することにより、無色粉末状の化合物４（１０．３４ｇ、収率８４％）を得た。以下に、前記化合物のＮＭＲの結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) : 8.7 - 7.83 (m, 2H, Ar-H)、7.50 - 7.63 (m, 2H, Ar-H)、7.38 - 7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.28 - 7.33 (m, 2H, Ar-H)、4.40 - 4.46 (m, 1H, CH)、4.15 - 4.31 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.67 - 3.73 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.35 - 3.52 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.18 - 3.30 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.20 - 2.50 (m, 4H)、1.81 - 2.03 (m, 3H)、1.47 - 1.54 (m, 2H) ;

MS (FAB+) : m/z 409 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ) .

[0321] (2) DMT r\_ アミド\_ Lープロリン (化合物6)

Fmoc-ヒドロキシアミド-Lープロリン (化合物4) (7.80 g、19.09 mmol) を無水ピリジン (5 mL) と混合し、室温で2回共沸乾燥した。得られた残留物に、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (8.20 g、24.20 mmol)、DMA P (23 mg、0.19 mmol) および無水ピリジン (39 mL) を加えた。この混合物を、室温で1時間撹拌した後、メタノール (7.8 mL) を加え、室温で30分撹拌した。この混合物を、ジクロロメタン (100 mL) で希釈し、飽和重曹水 (150 mL) で洗浄後、有機層を分離した。前記有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた未精製の残渣に、無水ジメチルホルムアミド (39 mL) およびピペリジン (18.7 mL、189 mmol) を加え、室温で1時間撹拌した。反応終了後、前記混合液について、減圧下、室温で、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (商品名Wako gel C-300、展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ 、0.05% ピリジン含有に供し、淡黄色油状の化合物6 (9.11 g、収率98%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.39 - 7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.30 (d,  $J = 8.8 \text{ Hz}$ , 4H, Ar-H)、7.21 (t t

, 1 H, 4.9, 1.3 Hz, Ar-H)、6.81 (d, J = 8.8 Hz, 4 H, Ar-H)、3.78 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>)、3.71 (dd, H, J = 6.3 Hz, 5.4 Hz, CH)、3.21 (2 H, 12.9, 6.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>)、3.05 (t, J = 6.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>)、2.85 - 2.91 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>)、2.08 - 2.17 (m, 1 H, CH)、1.85 - 2.00 (m, 3 H)、1.55 - 1.65 (m, 5 H) :

Ms (FAB+) ; m/z 489 (M+H<sup>+</sup>)、303 (DMTr+)

[0322] (3) DMTr-ヒドロキシジアミド-L-プロリン (化合物 8)

得られた前記DMTr-アミド-L-プロリン (化合物 6) (6.01 g、12.28 mmol)、EDC (2.83 g、14.74 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (3.98 g、29.47 mmol) およびトリエチルアミン (4.47 g、44.21 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (120 mL) を混合した。この混合液に、さらに、アルゴン雰囲気下、室温で、6-ヒドロキシヘキサン酸 (1.95 g、14.47 mmol) を加え、その後、アルゴン雰囲気下、室温で、1時間攪拌した。前記混合液をジクロロメタン (600 mL) で希釈し、飽和食塩水 (800 mL) で3回洗浄した。有機層を回収し、前記有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。これにより、淡黄色泡状の前記化合物 8 (6.29 g、収率 85%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.41 - 7.43 (m, 2 H, Ar-H)、7.27 - 7.31 (m, 4 H, Ar-H)、7.19 - 7.26 (m, 2 H, Ar-H)、7.17 - 7.21 (m, 1 H, Ar-H)、6.79 - 6.82 (m, 4 H, Ar-H)、4.51 - 4.53 (m, 1 H, CH)、3.79 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>)、3.61 (t, 2 H, J = 6.4 Hz, CH<sub>2</sub>)、3.50 - 3.55 (m, 1 H, CH)、3.36 - 3.4



3 (m, 1H, CH), 3.15 - 3.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.04 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.38 - 2.45 (m, 1H, CH), 2.31 (t, 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.05 - 2.20 (m, 1H, CH), 1.92 - 2.00 (m, 1H, CH), 1.75 - 1.83 (m, 1H, CH), 1.48 - 1.71 (m, 8H), 1.35 - 1.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>);

MS (FAB+) : m/z 602 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>).

[0323] (4) DMTr-ジアミド-L-プロリンアミダイト (化合物 10)

得られた前記DMTr-ヒドロキシジアミド-L-プロリン (化合物 8) (8.55 g、14.18 mmol) を無水アセトニトリルと混合し、室温で3回共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (2.91 g、17.02 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (10 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (5.13 g、17.02 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (7 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で2時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水 (200 mL) で3回洗浄した後、飽和食塩水 (200 mL) で洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られた前記ろ液について、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 3、0.05% ピリジン含有) に供し、無色シロップ状の化合物 10 (10.25 g、純度 92%、収率 83%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.40 - 7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.29 - 7.31 (m, 4H, Ar-H), 7.25 - 7.27 (m, 2H, Ar-H), 7.17 - 7.21 (m, 1H, Ar-H), 6.80 - 6.82 (m, 4H, Ar-H), 4.51 - 4.53 (m, 1H,

C H)、3.75 - 3.93 (m, 4 H)、3.79 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>)、3.45 - 3.60 (m, 4 H)、3.35 - 3.45 (m, 1 H, CH)、3.20 - 3.29 (m, 1 H)、3.04 (t, J = 6.4 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>)、2.62 (t, J = 5.8 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>)、2.40 - 2.44 (m, 1 H, CH)、2.31 (t, 7.8 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>)、2.03 - 2.19 (m, 1 H, CH)、1.92 - 2.02 (m, 1 H, CH)、1.70 - 1.83 (m, 1 H, CH)、1.51 - 1.71 (m, 8 H)、1.35 - 1.44 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>)、1.18 (d, J = 6.8 Hz, 6 H, CH<sub>3</sub>)、1.16 (d, J = 6.8 Hz, 6 H, CH<sub>3</sub>) ;

P—NMR (CDCl<sub>3</sub>) : Ms δ 147.17 ;

Ms (FAB+) : m/z 802 (M+), 303 (DMTr+), 201 (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O P+).

[0324] (B3 - 2) D—プロリンジアミドアミダイト

(1) Fmoc—ヒドロキシアミド—D—プロリン (化合物3)

前記スキーム3の化合物1 (Fmoc—D—プロリン)を開始原料とした。前記化合物1 (1.5 g、4.45 mmol)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (1.1 g、5.34 mmol) および1—ヒドロキシベンゾトリアゾール (1.5 g、10.69 mmol)の混合物に対し、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に、無水アセトニトリル (24 mL)を室温に加え、さらに、4—アミノ—1—ブタノール (0.48 g、5.34 mmol)の無水アセトニトリル溶液 (6 mL)添加した後、アルゴン雰囲気下、室温で15時間撹拌した。反応終了後、生成した沈殿をろ別し、回収したろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣にジクロロメタンを加え、酢酸緩衝液 (pH 4.0)で3回、飽和重曹水で3回洗浄した。そして、有機層を回収し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒留去し、その残渣にジエチルエーテル (50 mL)を加え、粉末化した。生じた粉末を濾取するこ

とにより、白色粉末状の化合物 3 を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.77 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2 H) ; 7.58 (br, 2 H) ; 7.41 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H) ; 7.32 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2 H) ; 4.25 - 4.43 (m, 4 H) ; 3.25 - 3.61 (m, 6 H) ; 1.57 - 1.92 (m, 8 H) .

MS (FAB+) :  $m/z$  409 ( $M + H^+$ ) .

[0325] (2) DMT r\_ アミド\_ D-プロリン (化合物 5)

Fmoc-ヒドロキシアミド-D-プロリン (化合物 3) (1.0 g、2.45 mmol) を無水ピリジン (5 mL) と混合し、室温で 2 回共沸乾燥した。得られた残留物に、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (1.05 g、3.10 mmol)、DMA P (3 mg、0.024 mmol) および無水ピリジン (5 mL) を加えた。この混合物を、室温で 1 時間攪拌した後、メタノール (1 mL) を加え、室温で 30 分攪拌した。この混合物を、ジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で洗浄後、有機層を分離した。前記有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた未精製の残渣に、無水ジメチルホルムアミド (5 mL) およびピペリジン (2.4 mL、24 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、前記混合液について、減圧下、室温で、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (商品名 Wakogel C-300、展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  :  $\text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ 、0.05% ピリジン含有) に供し、淡黄色油状の化合物 5 (1.26 g、収率 96%) を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.62 (br, 1 H) ; 7.41 - 7.44 (m, 2 H) ; 7.26 - 7.33 (m, 6 H) ; 7.17 - 7.22 (m, 1 H) ; 6.80 - 6.84 (m, 4 H) ; 3.7

8 (s, 6 H) ; 3.71 (dd, J = 8.8, 5.4 Hz, 1 H) ; 3.22 (q, 6.5 Hz, 2 H) ; 3.07 (t, J = 6.1 Hz, 2 H) ; 2.97 - 3.03 (m, 1 H) ; 2.85 - 2.91 (m, 1 H) ; 1.85 - 2.15 (m, 3 H) ; 1.55 - 1.73 (m, 6 H) .  
 MS (FAB+) : m/z 489 (M+H+), 303 (DMTr+).

[0326] (3) DMTr-ヒドロキシジアミド-D-プロリン (化合物 7)

得られた前記DMTr-アミド-D-プロリン (化合物 5) (1.2 g、2.45 mmol)、EDC (566 mg、2.95 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (796 mg、5.89 mmol)、およびトリエチルアミン (1.2 mL、8.84 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (24 mL) を混合した。この混合液に、さらに、アルゴン雰囲気下、室温で、6-ヒドロキシヘキサン酸 (390 mg、2.95 mmol) を加え、その後、アルゴン雰囲気下、室温で 1 時間攪拌した。前記混合液をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で 3 回洗浄した。有機層を回収し、前記有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。これにより、淡黄色油状の化合物 7 (1.4 g、収率 95%) を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.43 (m, 2 H) ; 7.25 - 7.32 (m, 6 H) ; 7.17 - 7.22 (m, 1 H) ; 6.79 - 6.83 (m, 4 H) ; 3.79 (s, 6 H) ; 3.58 - 3.63 (m, 2 H) ; 3.49 - 3.55 (m, 1 H) ; 3.15 - 3.26 (m, 2 H) ; 3.02 - 3.07 (m, 2 H) ; 2.30 - 2.33 (m, 2 H) ; 2.11 - 2.20 (m, 1 H) ; 1.50 - 1.99 (m, 13 H) ; 1.36 - 1.43 (m, 2 H) .

MS (FAB+) : m/z 602 (M+), 303 (DMTr+).

[0327] (4) DMTr-ジアミド-D-プロリンアミダイト (化合物 9)

得られた前記DMTr-ヒドロキシジアミド-D-プロリン (化合物 7)

(1.2 g、1.99 mmol) を無水アセトニトリルと混合し、室温で3回共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (410 mg、2.40 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (2.4 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (722 mg、2.40 mmol) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で2時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で3回洗浄後、飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (展開溶媒ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 3) に供し、無色油状の化合物 9 (1.4 g、純度 95%、収率 83%) を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.43 (m, 2H) ; 7.25 - 7.32 (m, 6H) ; 7.14 - 7.21 (m, 1H) ; 6.80 - 6.83 (m, 4H) ; 3.80 - 3.85 (m, 2H) ; 3.79 (s, 6H) ; 3.49 - 3.65 (m, 5H) ; 3.02 - 3.06 (m, 2H) ; 2.60 - 2.63 (m, 2H) ; 2.29 - 2.33 (m, 2H) ; 1.77 - 1.82 (m, 2H) ; 1.56 - 1.68 (m, 8H) ; 1.38 - 1.43 (m, 2H) ; 1.15 - 1.29 (m, 18H) .

$^{31}\text{P}$ -NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  146.94 .

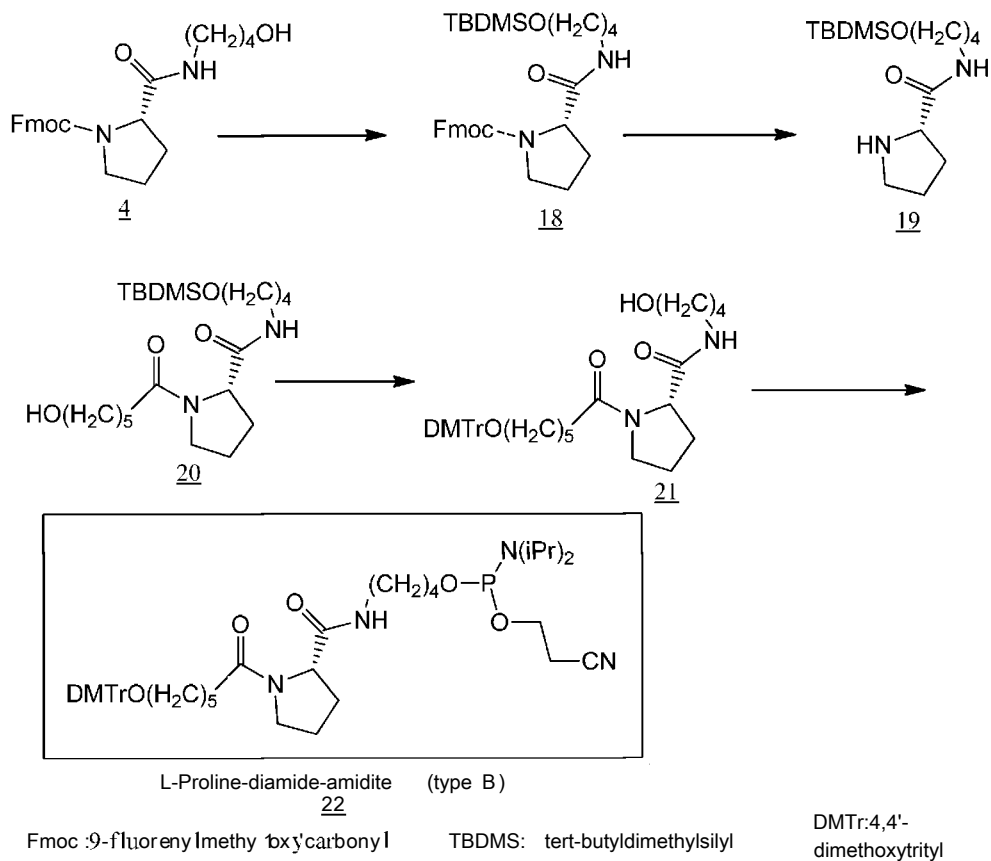
MS (FAB+) : m/z 802 (M<sup>+</sup>) , 303 (DMTr<sup>+</sup>) , 201 ( $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O P}^+$ ) .

[0328] (実施例 B4)

プロリン骨格を有するリンカーを含む本発明の核酸分子を生成するため、下記スキーム4により、L-プロリンジアミドアミダイトタイプBを合成し

た。

[0329] [化 19]



スキーム 4

[0330] (1) Fmoc-*t*-ブチル-ジメチルシロキシアミド-L-プロリン (化合物 18)

Fmoc-ヒドロキシアミド-L-プロリン (化合物 4) (2.00 g、30 mmol)、*t*-ブチル-ジメチルシリルクロリド (1.11 g、35 mmol) およびイミダゾール (10.90 g、71 mmol) を混合した。前記混合物に対し、減圧下に脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に、無水アセトニトリル (20 mL) を室温に加え、アルゴン雰囲気下、室温で終夜撹拌した。反応終了後、前記混合物にジクロロメタン (150 mL) を加え、水で 3 回洗浄し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去し、その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー

- (展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 95 : 5$ ) に供し、無色シロップ状の化合物 18 (2.35 g、収率 92%) を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.76 - 7.78 (m, 2H, Ar-H)、7.50 - 7.63 (m, 2H, Ar-H)、7.38 - 7.42 (m, 2H, Ar-H)、7.29 - 7.34 (m, 2H, Ar-H)、4.1 - 4.6 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ )、3.47 - 3.59 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ )、3.20 - 3.26 (m, 2H, CH)、1.85 - 1.95 (m, 2H)、1.42 - 1.55 (m, 6H)、0.96 (s, 9H, t-Bu)、0.02 (s, 6H, SiCH<sub>3</sub>) ;

MS (FAB+) : m/z 523 (M+H+) .

[0331] (2) t-ブチルジメチルシロキシアミド<sup>+</sup> L-プロリン (化合物 19)

得られた前記 Fmoc-t-ブチルジメチルシロキシアミド-L-プロリン (化合物 18) (1.18 g、2.5 mmol) に対し、無水アセトニトリル (5 mL) およびピペリジン (2.4 mL) を加え、室温で 1 時間撹拌した。反応終了後、前記混合物にアセトニトリル (50 mL) を加え、不溶物をろ別した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ ) に供し、無色シロップ状の化合物 19 (0.61 g、収率 90%) を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  3.71 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, 5.2 Hz, CH)、3.61 - 3.64 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.22 - 3.28 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.98 - 3.04 (m, 1H, CH)、2.86 - 2.91 (m, 1H, CH)、2.08 - 2.17 (m, 1H, CH)、1.86 - 1.93 (m, 1H, CH)、1.66 - 1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、1.52 - 1.57 (m, 4H)、0.89 (s, 9H, t-Bu)、0.05 (s, 6H, SiCH<sub>3</sub>) ;

MS (FAB+) ; m/z 301 (M+H+) .

[0332] (3) t-ブチルジメチルシロキシアミドヒドロキシアミド-L-プロリン (化合物20)

得られた前記t-ブチルジメチルシロキシアミド-L-プロリン (化合物19) (550 mg、1.8 mmol)、6-ヒドロキシヘキサン酸 (300 mg、2.3 mmol)、EDC (434 mg、2.3 mmol)、および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (695 mg、4.5 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (20 mL) を混合した。前記混合物に、アルゴン雰囲気下、室温で、トリエチルアミン (689 mg、6.8 mmol) を加え、その後、アルゴン雰囲気下、室温で、終夜撹拌した。前記混合液を飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、前記を硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  :  $\text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ ) に供し、無色シロップ状の化合物20 (696 mg、収率92%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  4.54 (d, 1H, CH)、3.58 - 3.67 (m, 5H)、3.52 - 3.56 (m, 1H, CH)、3.32 - 3.39 (m, 1H)、3.20 - 3.25 (m, 2H)、2.40 - 2.43 (m, 1H, CH)、2.33 (t,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.05 - 2.25 (m, 2H)、1.93 - 2.03 (m, 1H, CH)、1.75 - 1.85 (m, 1H, CH)、1.50 - 1.73 (m, 8H)、1.37 - 1.46 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、0.87 (s, 9H, t-Bu)、0.04 (s, 6H,  $\text{SiCH}_3$ ) ;

MS (FAB+) :  $m/z$  415 ( $M+1$ ) .

[0333] (4) DMT-ヒドロキシジアミド-L-プロリンタイプB (化合物21)

得られた前記t-ブチルジメチルシロキシアミドヒドロキシアミド-L-プロリン (化合物20) (640 mg、1.54 mmol) を無水ピリジン (1 mL) と混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、4, 4'



—ジメトキシトリチルクロリド (657 mg、1.85 mmol)、DMA P (2 mg) および無水ピリジン (5 mL) を加え、室温で4時間攪拌した後、メタノール (1 mL) を加え、30分室温で攪拌した。前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣に、無水アセトニトリル (5 mL) および 1 mol/l シテトラプチルアンモニウムフルオリド含有テトラヒドロフラン溶液 (1.42 mL、テトラプチルアンモニウムフルオリド 1.42 mmol) を加え、室温で終夜攪拌した。反応終了後、前記混合物に酢酸エチル (100 mL) を加え、水で洗浄した後、飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 95 : 5$ 、0.05% ピリジン含有) に供し、無色シロップ状の化合物 21 (680 mg、収率 73%) を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.41-7.44 (m, 2H, Ar-H)、7.26-7.33 (m, 4H, Ar-H)、7.18-7.21 (m, 2H, Ar-H)、7.17-7.21 (m, 1H, Ar-H)、6.80-6.84 (m, 4H, Ar-H)、4.51-4.53 (d, 6.8 Hz, 1H, CH)、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.61 (dd, 2H,  $J = 11\text{ Hz}, 5.4\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ )、3.50-3.54 (m, 1H, CH)、3.36-3.43 (m, 1H, CH)、3.20-3.26 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.05 (t,  $J = 6.4\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.38-2.45 (m, 1H, CH)、2.30 (t,  $J = 7.8\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.05-2.25 (m, 1H, CH)、1.92-2.00 (m, 1H, CH)、1.75-1.83 (m, 1H, CH)、1.52-1.67 (m, 8H)、1.35-1.45 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ;

MS (FAB+) :  $m/z$  602 ( $\text{M}^+$ )、303 ( $\text{DMTr}^+$ ) .

[0334] (5) DMT- $\alpha$ -ヒドロキシジアミド-L-プロリンアミダイトタイプB (化合物 22)

得られた前記 DMT- $\alpha$ -ヒドロキシジアミド-L-プロリン タイプB (化合物 21) (637 mg、1.06 mmol) を無水アセトニトリルと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (201 mg、1.16 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (1 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (350 mg、1.16 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で4時間攪拌した。前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン : アセトン = 7 : 3) に供し、無色シロップ状の化合物 22 (680 mg、純度 95%、収率 76%) を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.41-7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.25-7.32 (m, 4H, Ar-H)、7.17-7.22 (m, 2H, Ar-H)、6.80-6.83 (m, 4H, Ar-H)、4.53 (d,  $J = 7.8 \text{ Hz}$ , 1H, CH)、3.75-3.93 (m, 3H)、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.46-3.68 (m, 5H)、3.34-3.41 (m, 1H, CH)、3.10-3.31 (m, 1H, CH)、3.05 (t,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.62 (t,  $J = 6.3 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.39-2.46 (m, 1H, CH)、2.29 (t,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.03-2.19 (m, 1H, CH)、1.90-2.00 (m, 1H, CH)、1.70-1.83 (m, 1H, CH)、1.51-1.71 (m, 8H)、1.35-1.45 (m,

2 H, CH<sub>2</sub>)、1.18 (d, J = 6.4 Hz, 6 H, CH<sub>3</sub>)、1.16 (d, J = 6.4 Hz, 6 H, CH<sub>3</sub>) ;

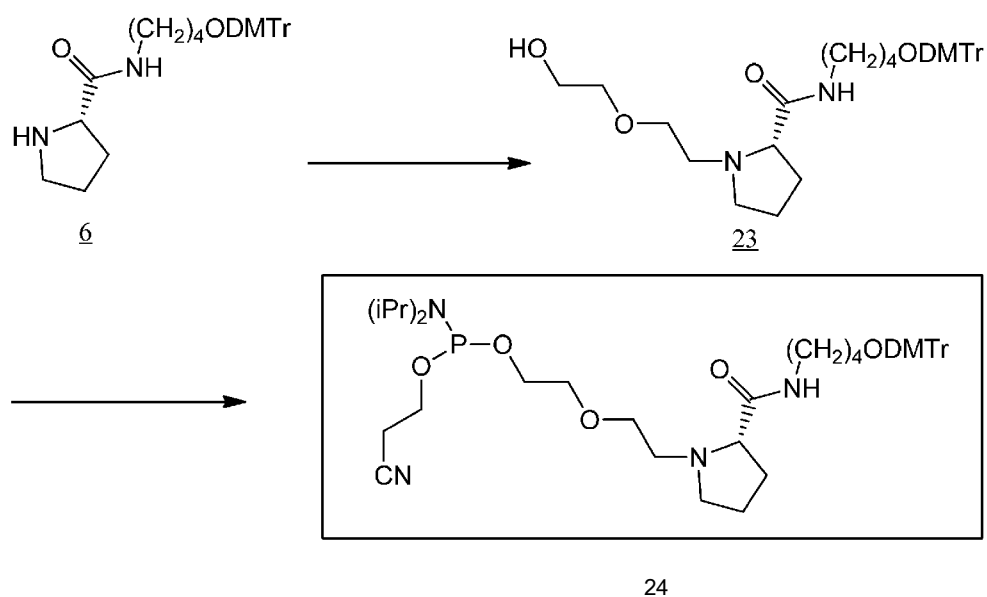
P—NMR (CH<sub>3</sub>CN) : δ 146.90 ;

Ms (FAB+) : m/z 803 (M++1)、303 (DMTr+).

[0335] (実施例 B 5)

プロリン骨格を有するリンカーを含む本発明の核酸分子を生成するため、下記スキーム 5 により、DMTr—アミドエチレンオキシエチルアミノ—L—プロリンアミダイト (以下、PEG スペースタータイプという) を合成した。

[0336] [化20]



[0337] (1) DMTr—アミドヒドロキシエトキシエチルアミノ—L—プロリン (化合物 23)

DMTr—アミド—L—プロリン (化合物 6) (1.00 g、2.05 mmol)、4—トルエンスルホン酸 2—(2—ヒドロキシエトキシ)エチルエステル (3.10 g、12.30 mmol)、および炭酸カリウム (0.85 g、6.15 mmol) の無水ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL) を混合し、アルゴン雰囲気下、室温で 4 日間攪拌した。前記混合物について

、減圧化、室温で溶媒を留去した後、ジクロロメタン (20 mL) を加え、ろ過した。ろ液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。前記シリカゲルカラムクロマトグラフィーの添加溶媒は、まず、0.05% ピリジンを含む酢酸エチルを使用した後、0.05% ピリジンを含む  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  と  $\text{CH}_3\text{OH}$  の混合液 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ ) を使用した。その結果、無色シロップ状の化合物 23 (1.15 g、収率 97%) を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.41-7.45 (m, 2H, Ar-H)、7.27-7.31 (m, 6H, Ar-H)、7.17-7.21 (m, 1H, Ar-H)、6.79-6.82 (m, 4H, Ar-H)、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.60-3.70 (m, 2H)、3.39-3.57 (m, 4H)、3.13—3.27 (m, 3H)、3.07-3.08 (m, 2H)、2.71-2.84 (m, 1H)、2.38-2.46 (m, 1H)、2.14-2.19 (m, 1H)、1.84-1.87 (m, 1H)、1.57-1.76 (m, 8H)。

[0338] (2) DMT r-アミドエチレンオキシエチルアミノ-L-プロリンアミダイト (化合物 24)

得られた前記 DMT r-アミドヒドロキシエトキシエチルアミノ-L-プロリン (化合物 23) (0.63 g、1.00 mmol) を無水ピリジンと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (206 mg、1.20 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (1 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (282 mg、1.12 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で4時間撹拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られた前記ろ液について、減圧

下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：アセトン＝7：3、0.05%ピリジン含有）に供し、無色シロップ状の化合物24（0.749、純度100%、収率87%）を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) :  $\delta$  7.41 - 7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.28 - 7.31 (m, 6H, Ar-H)、7.18 - 7.22 (m, 1H, Ar-H)、6.84 - 6.86 (m, 4H, Ar-H)、3.73 - 3.84 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.47 - 3.64 (m, 7H)、3.15 - 3.23 (m, 1H)、3.11 (t,  $J = 6.4 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.01 (t,  $J = 5.9 \text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.95 - 2.99 (m, 1H)、2.58 - 2.63 (m, 2H)、2.31 - 2.35 (m, 1H, CH)、2.03 - 2.19 (m, 1H, CH)、1.48 - 1.78 (m, 10H)、1.12 - 1.57 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ) ;

$\text{P-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) :  $\delta$  148.00 ;

$\text{Ms}$  (FAB+) :  $m/z$  776 ( $\text{M}^+$ )、303 ( $\text{DMTr}^+$ ) 201 ( $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$ ) .

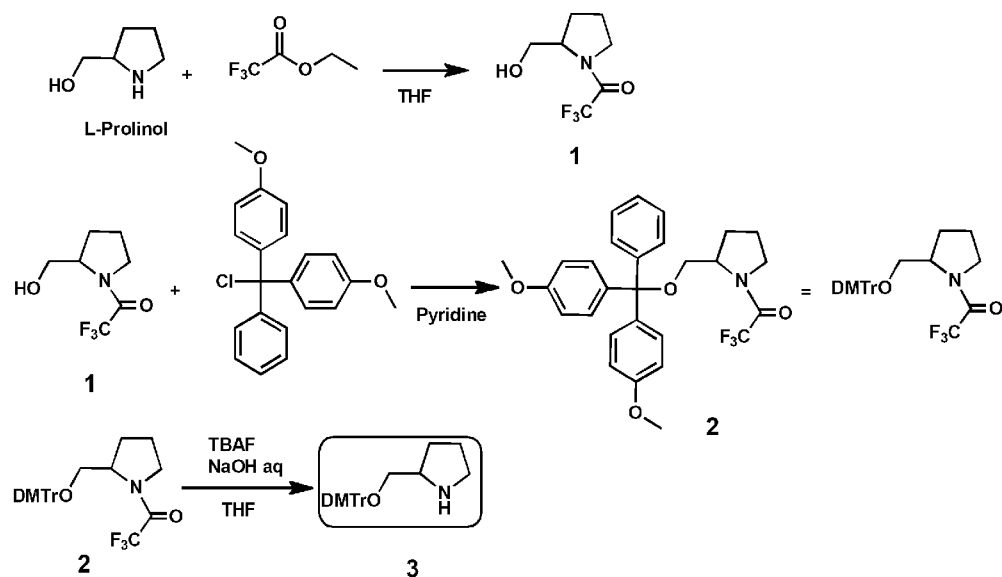
[0339] (実施例B6)

#### 1. 保護プロリノールの合成

以下に示すスキーム6に従い、ジメトキシトリチル基で保護されたプロリノール（化合物3）を合成した。

[0340]

[化21]



スキーム 6

[0341] (1) トリフルオロアセチル\_ L-プロリノール (化合物 1)

L-プロリノール (2.0 g、20 mmol) を THF 20 mL に溶解した。他方、トリフルオロ酢酸エチル (3.0 g、21 mmol) を THF 20 mL に溶解した。そして、後者の THF 溶液を、前者の L-プロリノール含有 THF 溶液に滴下し、12 時間撹拌した。この反応液を減圧濃縮し、化合物 1 を得た (3.7 g、収率 97%)。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  4.28 - 4.23 (1.0 H, m, OH), 3.90 - 3.41 (5 H, H-2, H-5, H-6, m), 2.27 - 1.77 (4 H, H-3, H-4, m)。

[0342] (2) トリフルオロアセチル\_ DMTr\_ L-プロリノール (化合物 2)

得られた前記トリフルオロアセチル\_ L-プロリノール (化合物 1) (3.7 g、19 mmol) をピリジンに溶解して、3 回、室温で共沸乾燥した。得られた残留物をピリジン 15 mL に溶かし、アルゴン下、氷浴中で撹拌しながら、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTr-Cl) (8.1 g、24 mmol) を加え、さらに、室温で 4 時間反応させた。そして

、過剰のDMT r - C I をクエンチするために、前記反応液に、さらに、メタノール 10 mL を加え 10 分撹拌した。その後、前記反応液に、ジクロロメタンを加え飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した。洗浄後の回収した有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 95 : 5$ 、0.1% ピリジン含有）に供し、精製した化合物 2 を得た（8.5 g、収率 89%）。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.39 - 7.18 (9 H, m, Ar-H), 6.82 (4 H, d,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , Ar-H), 3.78 (6 H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.70 - 3.41 (5 H, m, H-2, H-5, H-6), 2.19 - 1.85 (4 H, m, H-3, H-4)。

[0343] (3) DMT r - L - プロリノール（化合物 3）

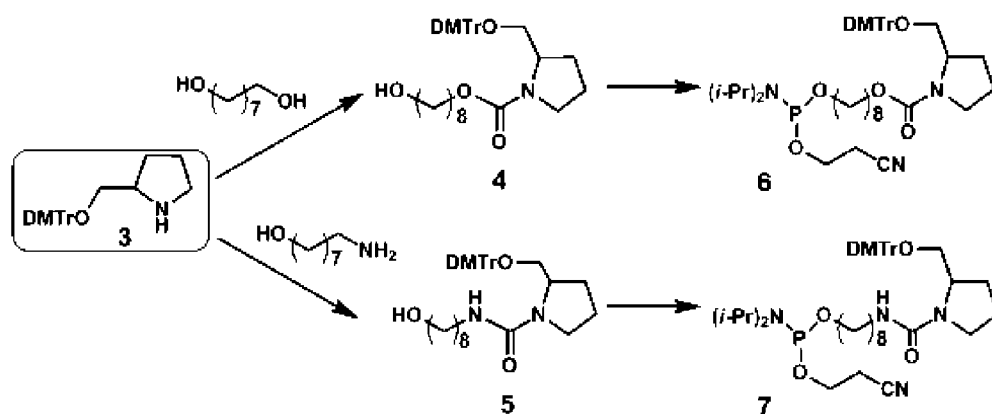
得られた前記トリフルオロアセチル - DMT r - L - プロリノール（化合物 2）（5 g、10 mmol）を THF 100 mL に溶解した。この THF 溶液に 5% 水酸化ナトリウム水溶液 100 mL を加え、撹拌した。この溶液に、1M フッ化テトラ - n - プチルアンモニウム（TBAF）溶液 5 mL を加え、室温で 12 時間撹拌した。この反応液を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した。洗浄後の回収した有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、化合物 3 を得た（3.6 g、収率 90%）。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.14 (9 H, m, Ar-H), 6.82 (4 H, d,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , Ar-H), 3.78 (6 H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.31 (1 H, m, H-6), 3.07 (2 H, m, H-2, H-6), 2.90 (2 H, m, H-5), 1.84 (3 H, m, H-3, H-4), 1.40 (1 H, m, H-3)。

[0344] 2. アミダイト誘導体の合成

前記「1.」で合成した保護プロリノール（化合物3）を用いて、下記スキーム7により、結合形式が異なる、プロリノールを有するアミダイト誘導体を合成した。

[0345] [化22]



スキーム 7

[0346] (1) DMTr-ウレタン-L-プロリノール（化合物4）

1,8-オクタジオール（9.0 g、62 mmol）をTHF 90 mLに溶解し、アルゴン下に置いた。他方、カルボニルジイミダゾール（2.0 g、12 mmol）をTHF 10 mLに溶解した。後者のTHF溶液を、前者のTHF溶液に加え、室温で1時間撹拌した。この反応液を、1,8-オクタジオールのTLCスポットが消えるまで、水で洗浄した。さらに、洗浄後に回収した有機層を、飽和食塩水で洗浄し、回収した有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、得られたろ液を減圧濃縮した。その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH=95:5）に供し、精製した化合物を得た。この化合物は、1,8-オクタジオールの片末端がカルボニルジイミダゾールで活性化された化合物であった（2.3 g、収率77%）。

[0347] 前記化合物0.9 gをアセトニトリル10 mLで溶解し、アルゴン下に置いた。他方、DMTr-L-プロリノール（化合物3）（1.9 g、4.8 mmol）をアセトニトリル20 mLに溶解した。後者のアセトニトリル溶



液を、前記前者のアセトニトリル溶液に加え、室温で24時間撹拌した。そして、この反応液を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、回収した有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、得られたろ液を減圧濃縮した。その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒ジクロロメタン：アセトン＝9：1、0.1%ピリジン含有）に供し、精製した化合物4（プロリノールウレタンアミダイト）を得た（1.5g、収率65%）。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , Ar-H), 4.24 - 3.94 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.72 - 2.96 (7H, m, alky, H-2, H-5, H-6), 2.10 - 1.30 (16H, m, alky, H-3, H-4).

FAB-MS : 576  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

[0348] (2) DMT r\_ ウレイド\_ L —プロリノール（化合物5）

アルゴン下、トリホスゲン（2.0g、6.7mmol）をTHF 10mLに溶解し、0℃で撹拌した。他方、DMT r\_ L —プロリノール（化合物3）（1.3g、3.2mmol）およびN, N\_ ジイソプロピルエチルアミン（16g、124mmol）をTHF 10mLに溶解し、前記トリホスゲンのTHF溶液に滴下した。この反応液を、0℃で1時間、続いて、室温で2時間撹拌した。そして、8—アミノ—1—オクタノール（2.3g、16mmol）およびN, N—ジイソプロピルエチルアミン（5.0g、38mmol）をTHF 30mLに溶解した。このTHF溶液に、前記撹拌後の反応液を滴下し、0℃で1時間、続いて、室温で48時間撹拌した。この反応液を減圧濃縮し、その残渣をジクロロメタンに溶解した。この溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、回収した有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して

、精製した。この際、展開溶媒は、0.1%ピリジンを含むアセトンと水との混合溶媒を使用し、前記アセトンと水との混合割合は、ステップウィズとし、具体的には、アセトン：水のモル比を、2：8、3：7、4：6および5：5の順に変化させた。目的の化合物5を含むフラクションを、ジクロロメタンで抽出し、この有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、得られたろ液を減圧濃縮し、化合物5（プロリノールウレイドアミダイト）を得た（0.9 g、収率49%）。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.14 (9 H, m, Ar-H), 6.82 (4 H, m, Ar-H), 3.78 (s, 6 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.68 - 3.25 (9 H, m,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ , H-2, H-5, H-6), 1.74 - 1.18 (16 H, m, alkyl, H-3, H-4)

.

FAB-MS : 575 [M+H]<sup>+</sup>.

[0349] (3) プロリノールを有するアミダイト誘導体（化合物6および7）

修飾プロリノールとして、得られた前記化合物4（0.80 g、1.4 mmol）をアセトニトリルに溶解し、室温で3回共沸乾燥した。得られた残留物をアセトニトリル1 mLに溶解し、アルゴン下においた。このアセトニトリル溶液に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド（0.24 g、1.4 mmol）を添加し、反応液とした。他方、2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト（0.50 g、1.7 mmol）をアセトニトリル1 mLに溶解した。これを、前記反応液に添加し、室温で4時間撹拌した。前記反応液に、ジクロロメタンを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した。洗浄後の回収した有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮した。その残渣を、アミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒ヘキサン：アセトン=10：1、0.1%ピリジン含有）に供し、精製した化合物6（DMTr-ウレタン-L-プロリノールアミダイト）

(0.90 g、収率83%)を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J = 8.6 \text{ Hz}$ , Ar-H), 4.24 - 3.94 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.72 - 2.96 (11H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_3$ , H-2, H-5, H-6), 2.58 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.10 - 1.46 (16H, m, alkyl, H-3, H-4), 1.34 - 1.10 (12H, m,  $\text{CHCH}_3$ )。  $^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  146.82.

FAB-MS : 776 [M+H]<sup>+</sup>.

[0350] 前記修飾プロリノールとして、前記化合物4に代えて、前記化合物5を使用した以外は、同様に処理を行い、精製した化合物7 (DMTr-ウレイド-L-プロリノールアミダイト) (0.80 g、収率74%)を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40 - 7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, m, Ar-H), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.65 - 3.25 (13H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_3$ , H-2,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ , H-2, H-5, H-6), 2.73 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.10 - 1.48 (16H, m, alkyl, H-3, H-4), 1.35 - 1.10 (12H, m,  $\text{CHCH}_3$ ) .

$^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  146.83.

FAB-MS : 775 [M+H]<sup>+</sup>.

[0351] 以上、実施形態を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明の Scope 内で当業者が理解しうる様々な変更をすることができる。

[0352] この出願は、2010年7月8日出願された日本出願特願2010-56122、2010年10月13日出願された日本出願特願2010-230808、2010年12月2日出願された日本出願特願2010-

2 6 9 8 2 4、2 0 1 0 年 8 月 3 日に出願された日本出願特願 2 0 1 0 - 1 7 4 9 1 5、2 0 1 0 年 1 0 月 1 3 日に出願された日本出願特願 2 0 1 0 - 2 3 0 8 0 6、および 2 0 1 0 年 1 2 月 2 日に出願された日本出願特願 2 0 1 0 - 2 6 9 8 2 3 を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに  
取り込む。

#### 産業上の利用可能性

[0353] 本発明の一本鎖核酸分子によれば、遺伝子の発現抑制が可能であり、かつ、環状ではないため、その合成が容易であり、また、一本鎖であるため、二本鎖のアニール工程が無く、効率良く製造可能である。本発明の s s N c 分子は、前述のように標的遺伝子の発現を抑制可能であることから、例えば、医薬品、診断薬および農薬、ならびに、農薬、医学、生命科学等の研究ツールとして有用である。

## 請求の範囲

- [請求項1] 標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列を含む一本鎖核酸分子であつて、
- 5'側から3'側にかけて、5'側領域 (X c)、内部領域 (Z) および3'側領域 (Y c) を、前記順序で含み、
- 前記内部領域 (Z) が、内部5'側領域 (X) および内部3'側領域 (Y) が連結して構成され、
- 前記5'側領域 (X c) が、前記内部5'側領域 (X) と相補的であり、
- 前記3'側領域 (Y c) が、前記内部3'側領域 (Y) と相補的であり、
- 前記内部領域 (Z)、前記5'側領域 (X c) および前記3'側領域 (Y c) の少なくとも一つが、前記発現抑制配列を含むことを特徴とする一本鎖核酸分子。
- [請求項2] 前記5'側領域 (X c) と前記内部5'側領域 (X) との間に、リンカー領域 (L x) を有し、
- 前記リンカー領域 (L x) を介して、前記5'側領域 (X c) と前記内部5'側領域 (X) とが連結している、請求項1記載の一本鎖核酸分子。
- [請求項3] 前記3'側領域 (Y c) と前記内部3'側領域 (Y) との間に、リンカー領域 (L y) を有し、
- 前記リンカー領域 (L y) を介して、前記3'側領域 (Y c) と前記内部3'側領域 (Y) とが連結している、請求項1または2記載の一本鎖核酸分子。
- [請求項4] 前記5'側領域 (X c) と前記内部5'側領域 (X) との間に、リンカー領域 (L x) を有し、
- 前記リンカー領域 (L x) を介して、前記5'側領域 (X c) と前記内部5'側領域 (X) とが連結し、

前記 3' 側領域 (Y c) と前記内部 3' 側領域 (Y) との間に、リンカー領域 (L y) を有し、

前記リンカー領域 (L y) を介して、前記 3' 側領域 (Y c) と前記内部 3' 側領域 (Y) とが連結している、請求項 1 記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 5] 前記内部領域 (Z) の塩基数 (Z)、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X)、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y)、前記 5' 側領域 (X c) の塩基数 (X c) および前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数 (Y c) が、下記式 (1) および (2) の条件を満たす、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

$$Z = X + Y \quad \cdot \cdot \cdot (1)$$

$$Z \geq X c + Y c \quad \cdot \cdot \cdot (2)$$

[請求項 6] 前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X)、前記 5' 側領域 (X c) の塩基数 (X c)、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) および前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数 (Y c) が、下記 (a) ~ (d) のいずれかの条件を満たす、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

(a) 下記式 (3) および (4) の条件を満たす。

$$X > X c \quad \cdot \cdot \cdot (3)$$

$$Y = Y c \quad \cdot \cdot \cdot (4)$$

(b) 下記式 (5) および (6) の条件を満たす。

$$X = X c \quad \cdot \cdot \cdot (5)$$

$$Y > Y c \quad \cdot \cdot \cdot (6)$$

(c) 下記式 (7) および (8) の条件を満たす。

$$X > X c \quad \cdot \cdot \cdot (7)$$

$$Y > Y c \quad \cdot \cdot \cdot (8)$$

(d) 下記式 (9) および (10) の条件を満たす。

$$X = X c \quad \cdot \cdot \cdot (9)$$

$$Y = Y_c \quad \cdot \cdot \cdot (10)$$

[請求項7] 前記 (a) ～ (d) において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) と前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>) の塩基数 (X<sub>c</sub>) の差、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) と前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>) の塩基数 (Y<sub>c</sub>) の差が、下記条件を満たす、請求項6記載の一本鎖核酸分子。

(a) 下記式 (11) および (12) の条件を満たす。

$$X - X_c = 1, 2 \text{ または } 3 \quad \cdot \cdot \cdot (11)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \cdot \cdot \cdot (12)$$

(b) 下記式 (13) および (14) の条件を満たす。

$$X - X_c = 0 \quad \cdot \cdot \cdot (13)$$

$$Y - Y_c = 1, 2 \text{ または } 3 \quad \cdot \cdot \cdot (14)$$

(c) 下記式 (15) および (16) の条件を満たす。

$$X - X_c = 1, 2 \text{ または } 3 \quad \cdot \cdot \cdot (15)$$

$$Y - Y_c = 1, 2 \text{ または } 3 \quad \cdot \cdot \cdot (16)$$

(d) 下記式 (17) および (18) の条件を満たす。

$$X - X_c = 0 \quad \cdot \cdot \cdot (17)$$

$$Y - Y_c = 0 \quad \cdot \cdot \cdot (18)$$

[請求項8] 前記内部領域 (Z) の塩基数 (Z) が、19塩基以上である、請求項1から7のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項9] 前記内部領域 (Z) の塩基数 (Z) が、19塩基～30塩基である、請求項8記載の一本鎖核酸分子。

[請求項10] 前記5'側領域 (X<sub>c</sub>) の塩基数 (X<sub>c</sub>) が、1～11塩基である、請求項1から9のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項11] 前記5'側領域 (X<sub>c</sub>) の塩基数 (X<sub>c</sub>) が、1～7塩基である、請求項10記載の一本鎖核酸分子。

[請求項12] 前記5'側領域 (X<sub>c</sub>) の塩基数 (X<sub>c</sub>) が、1～3塩基である、請求項10記載の一本鎖核酸分子。

[請求項13] 前記3'側領域 (Y<sub>c</sub>) の塩基数 (Y<sub>c</sub>) が、1～11塩基である、

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 14] 前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数 (Y c) が、1 ~ 7 塩基である、請求項 13 記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 15] 前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数 (Y c) が、1 ~ 3 塩基である、請求項 13 記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 16] 少なくとも 1 つの修飾された残基を含む、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 17] 標識物質を含む、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 18] 安定同位体を含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 19] RNA 分子である、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 20] 前記 リンカー領域 (L<sub>x</sub>) および／または前記 リンカー領域 (L<sub>y</sub>) が、ヌクレオチド残基および非ヌクレオチド残基の少なくとも一つから構成される、請求項 2 から 19 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 21] 前記ヌクレオチド残基が、非修飾ヌクレオチド残基および／または修飾ヌクレオチド残基である、請求項 20 記載の一本鎖核酸分子。

[請求項 22] 前記 リンカー領域 (L<sub>x</sub>) および／または前記 リンカー領域 (L<sub>y</sub>) が、下記 (1) ~ (7) のいずれかの残基で構成される、請求項 20 または 21 記載の一本鎖核酸分子。

(1) 非修飾ヌクレオチド残基

(2) 修飾ヌクレオチド残基

(3) 非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

(4) 非ヌクレオチド残基



(5) 非ヌクレオチド残基および非修飾ヌクレオチド残基

(6) 非ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

(7) 非ヌクレオチド残基、非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

[請求項23] 前記一本鎖核酸分子において、塩基数の合計が、50塩基以上である、請求項1から22のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項24] 前記遺伝子の発現抑制が、RNA干渉による発現抑制である、請求項1から23のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項25] 前記一本鎖核酸分子の塩基配列が、  
配列番号2、7、8、13、14、29—35、37、43、44、  
47、48および51\_80のいずれかの塩基配列である、請求項1  
から24のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項26] 標的遺伝子の発現を抑制するための組成物であって、  
請求項1から25のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を含むこと  
を特徴とする、発現抑制用組成物。

[請求項27] 請求項1から25のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を含むこと  
を特徴とする、薬学的組成物。

[請求項28] 炎症治療用である、請求項27記載の薬学組成物。

[請求項29] 標的遺伝子の発現を抑制する方法であって、  
請求項1から25のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を使用する  
ことを特徴とする発現抑制方法。

[請求項30] 前記一本鎖核酸分子を、細胞、組織または器官に投与する工程を含む  
、請求項29記載の発現抑制方法。

[請求項31] 前記一本鎖核酸分子を、*in vivo*または*in vitro*で投  
与する、請求項30記載の発現抑制方法。

[請求項32] 前記遺伝子の発現抑制が、RNA干渉による発現抑制である、請求項  
29から31のいずれか一項に記載の発現抑制方法。

[請求項33] 標的遺伝子の発現を抑制するRNA干渉を誘導する方法であって、

請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を使用することを特徴とする発現誘導方法。

[請求項 34] 疾患の治療方法であって、  
請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を、患者に投与する工程を含み、  
前記一本鎖核酸分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする治療方法。

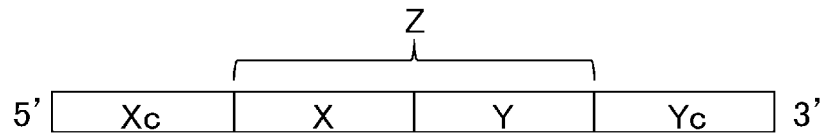
[請求項 35] 標的遺伝子の発現抑制のための、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子の使用。

[請求項 36] RNA 干渉の誘導のための、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子の使用。

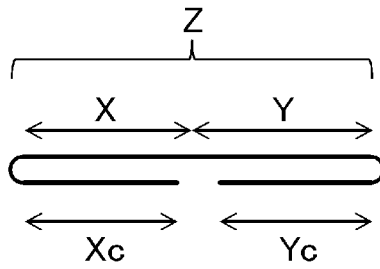
[請求項 37] 疾患の治療に使用するための核酸分子であって、  
前記核酸分子は、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子であり、  
前記一本鎖核酸分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする核酸分子。

[図1]

(A)

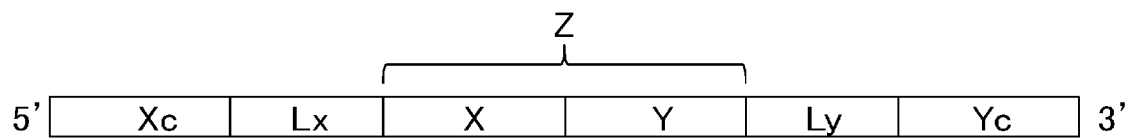


(B)

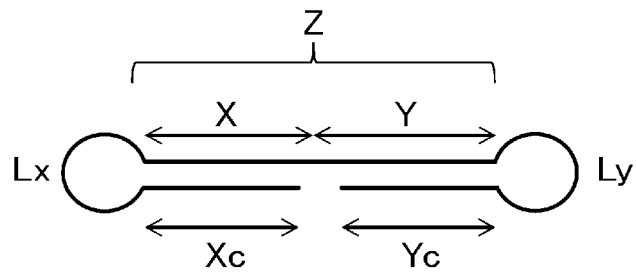


[図2]

(A)

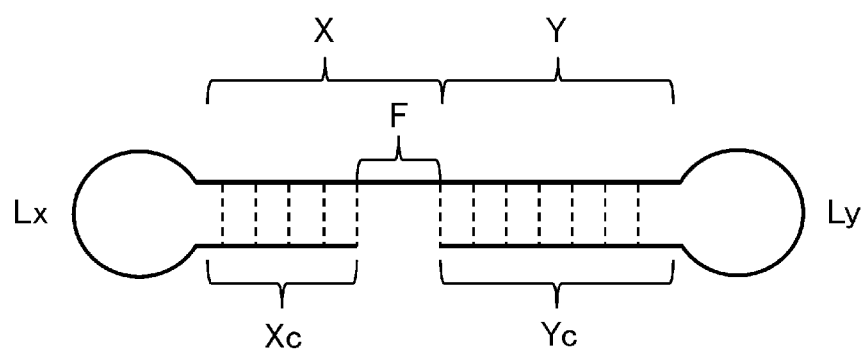


(B)

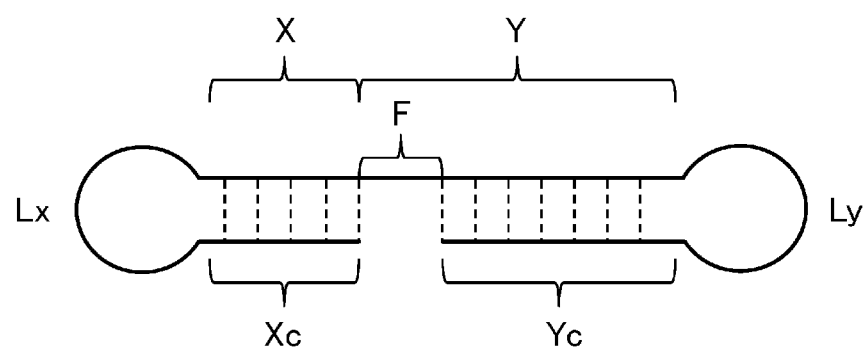


[図3]

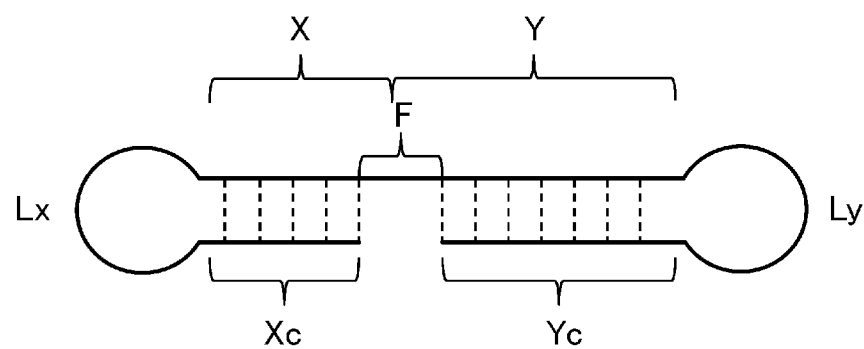
(A)



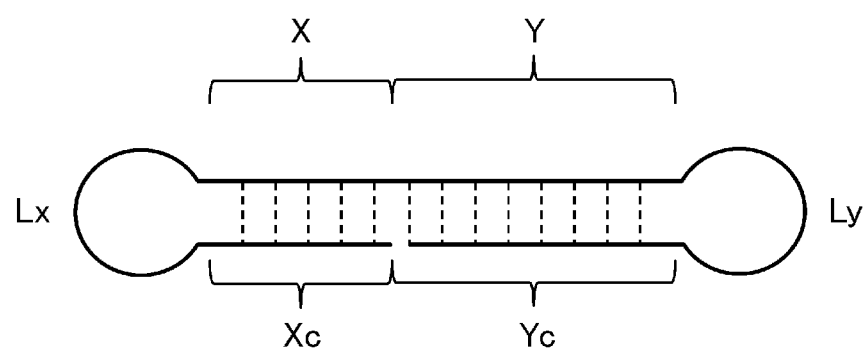
(B)



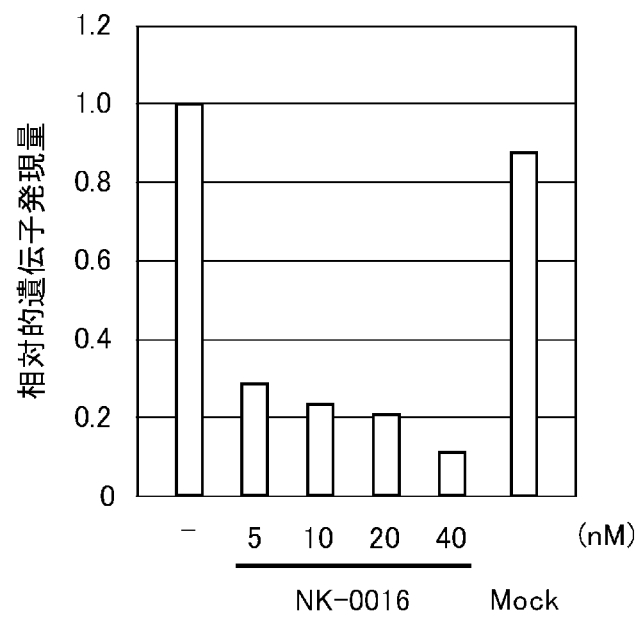
(C)



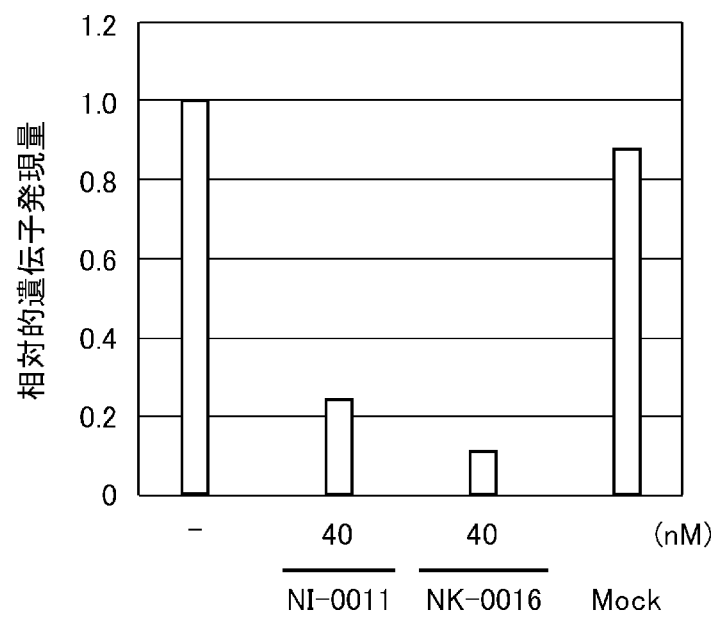
(D)



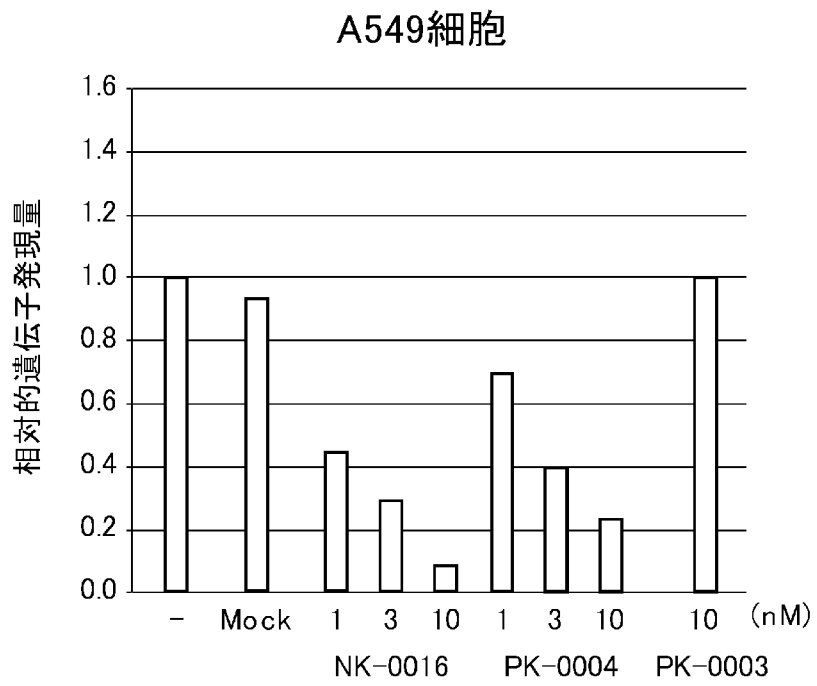
[図4]



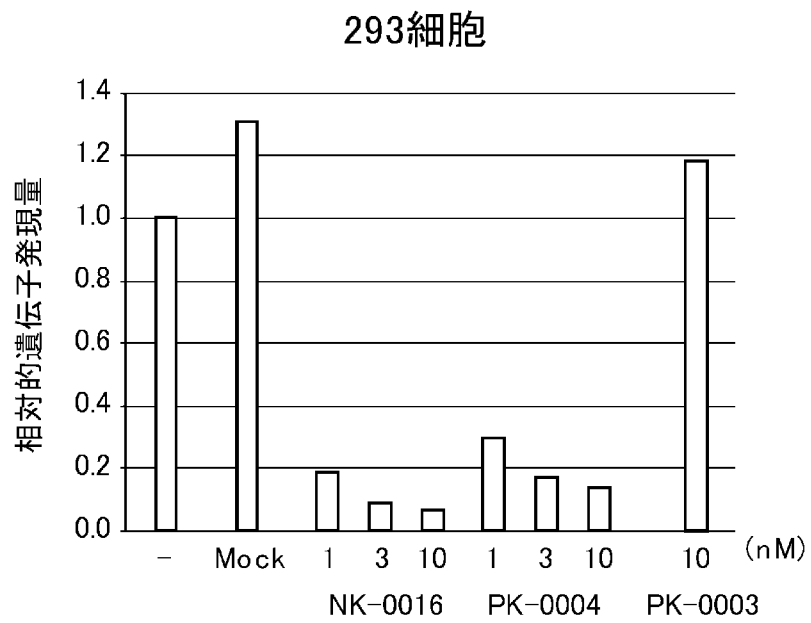
[図5]



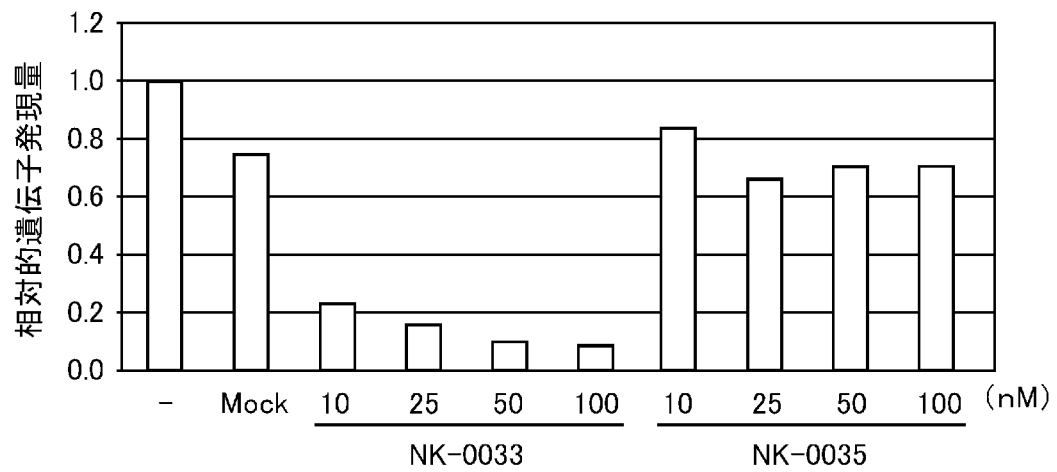
[図6]



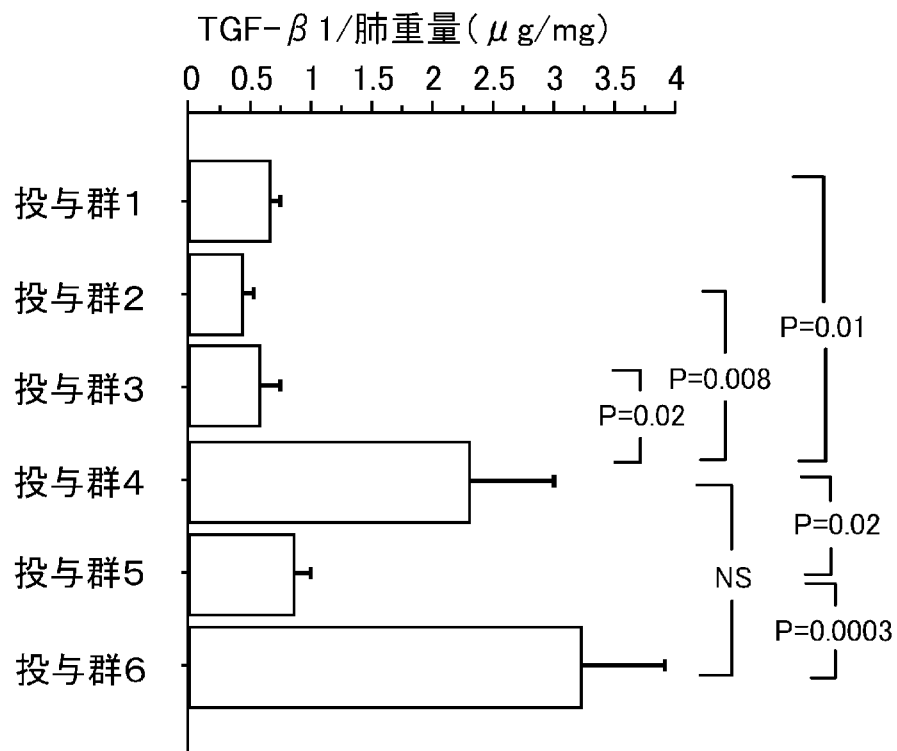
[図7]



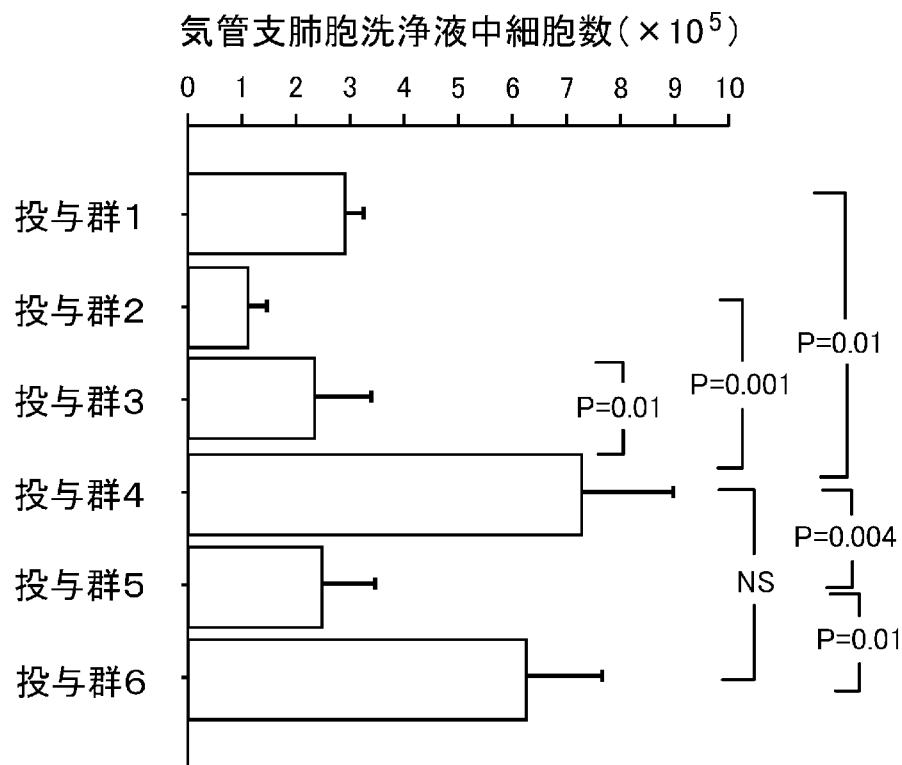
[図8]



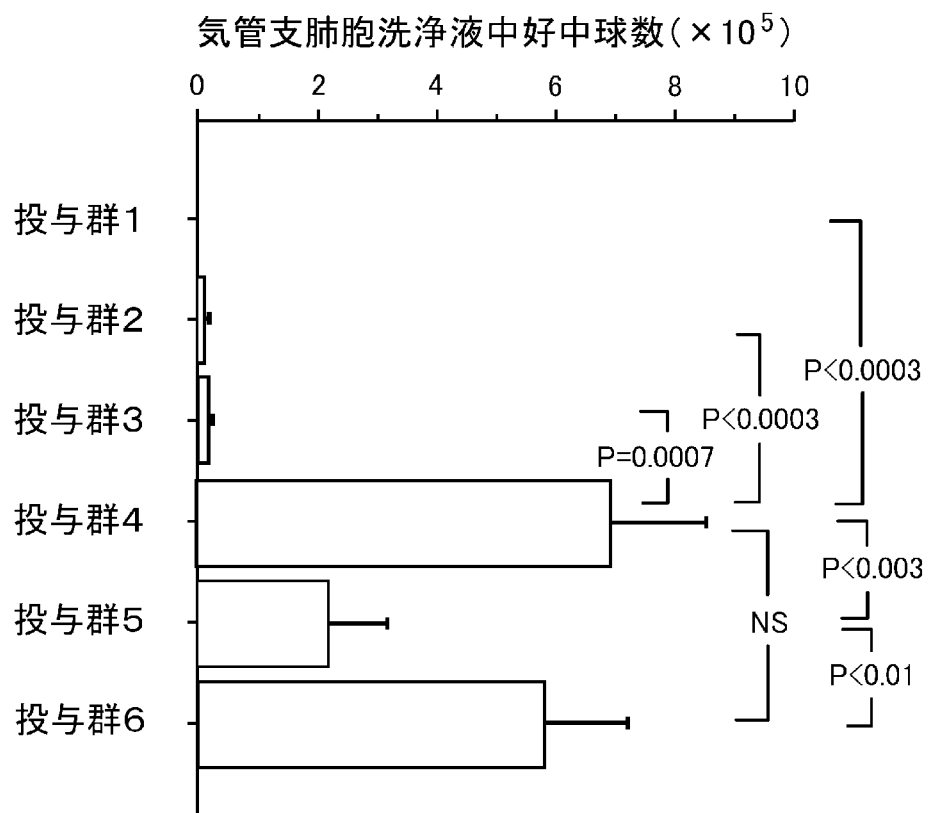
[図9]



[図10]



[図11]

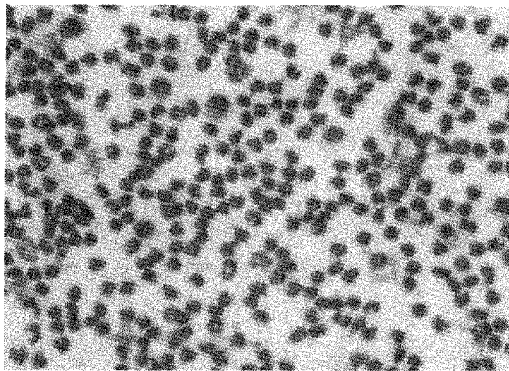




[図12]

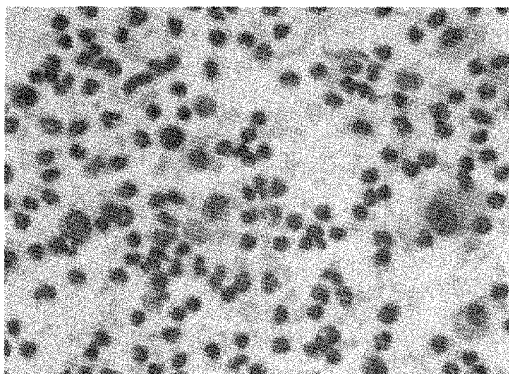
(A)

ssRNA (-)



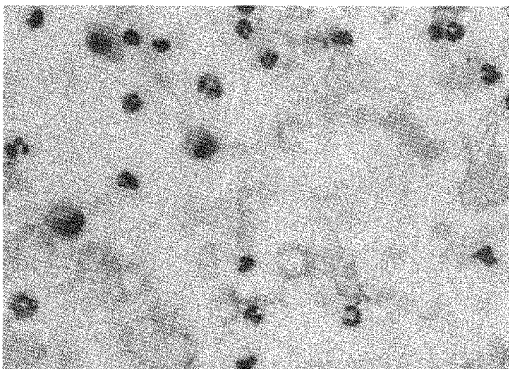
(B)

NK-0035 (+)



(C)

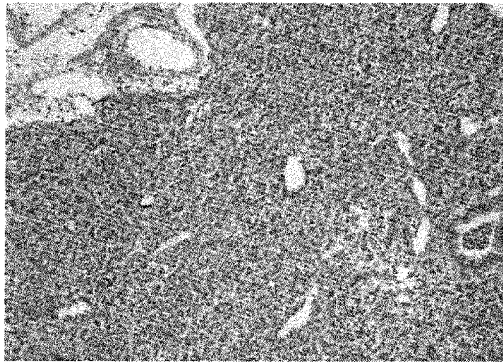
NK-0033 (+)



[図13]

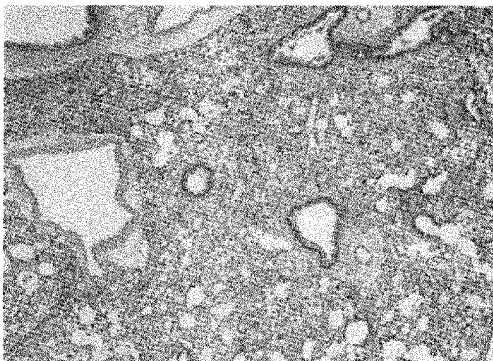
(A)

ssRNA (-)



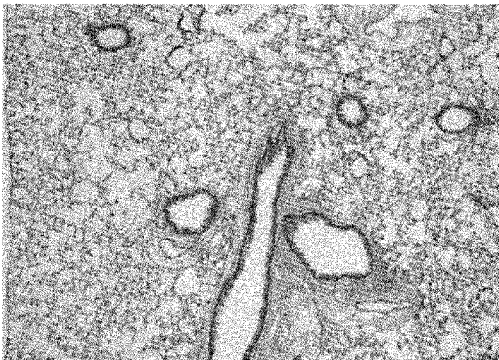
(B)

NK-0035 (+)



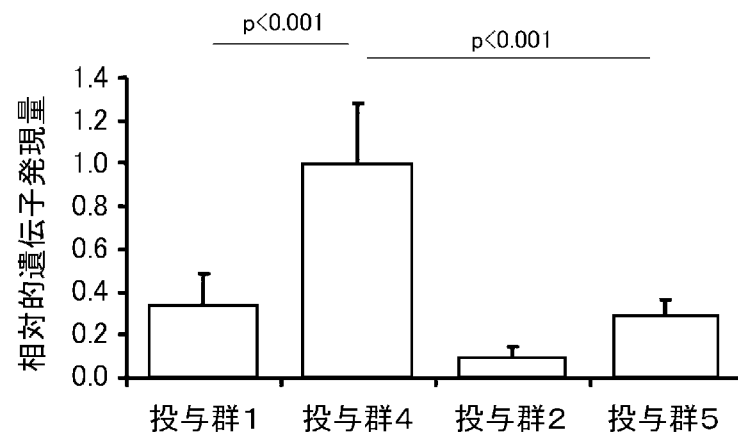
(C)

NK-0033 (+)

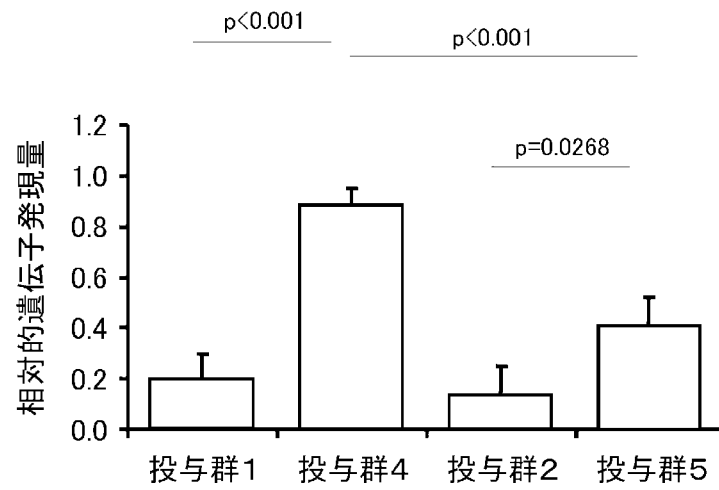


[図14]

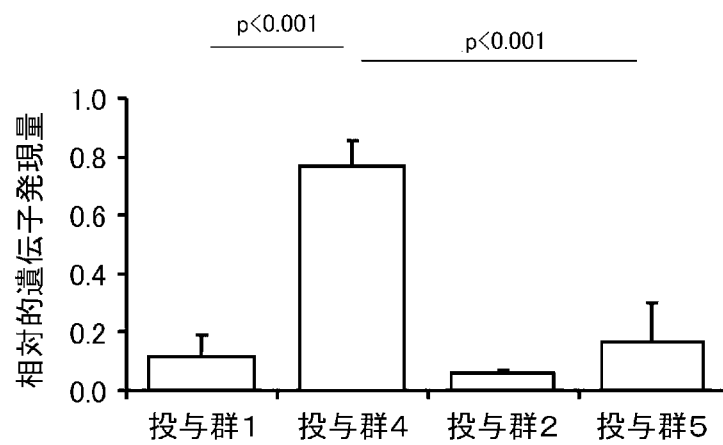
(A)



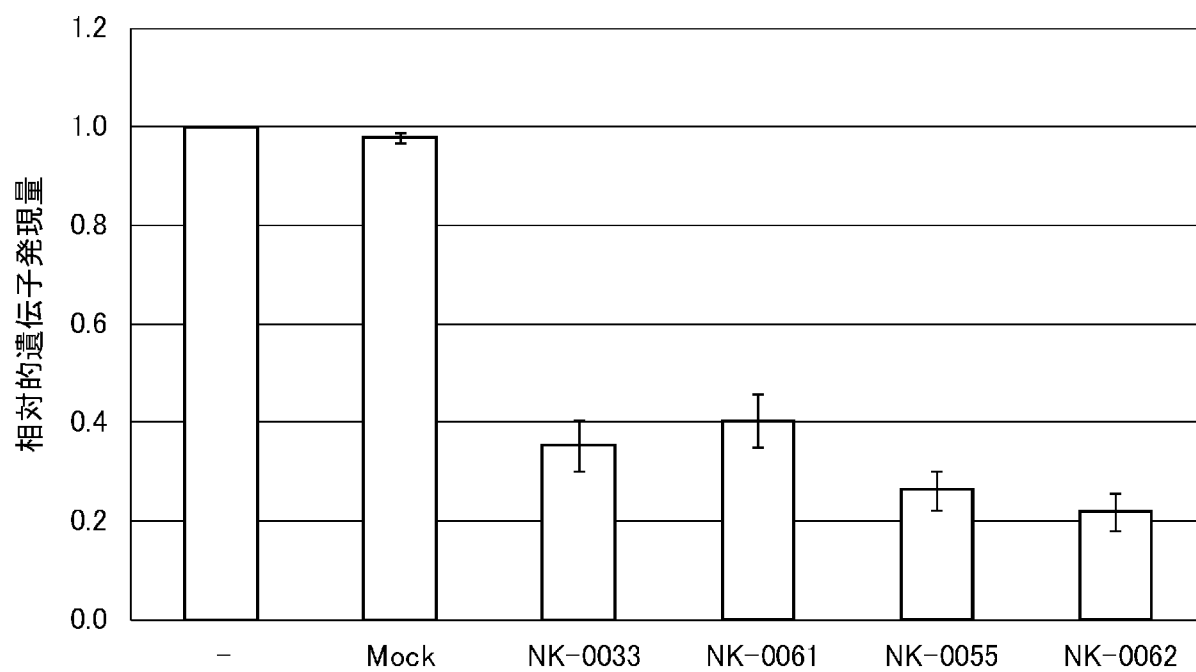
(B)



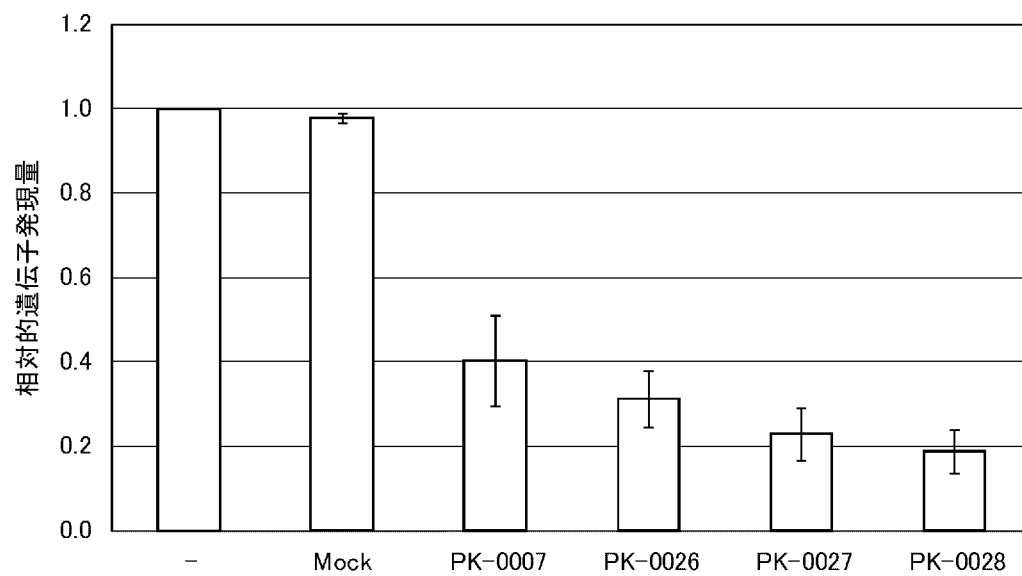
(C)



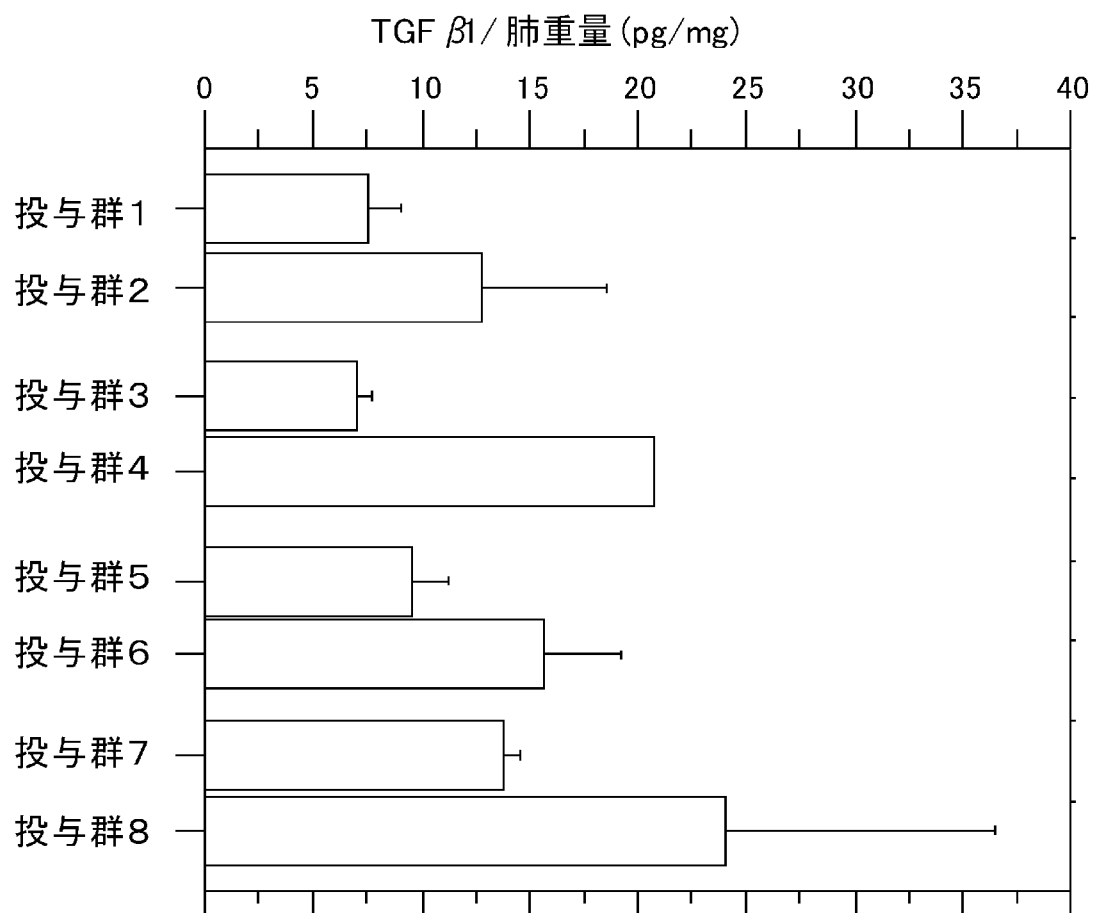
[図15]



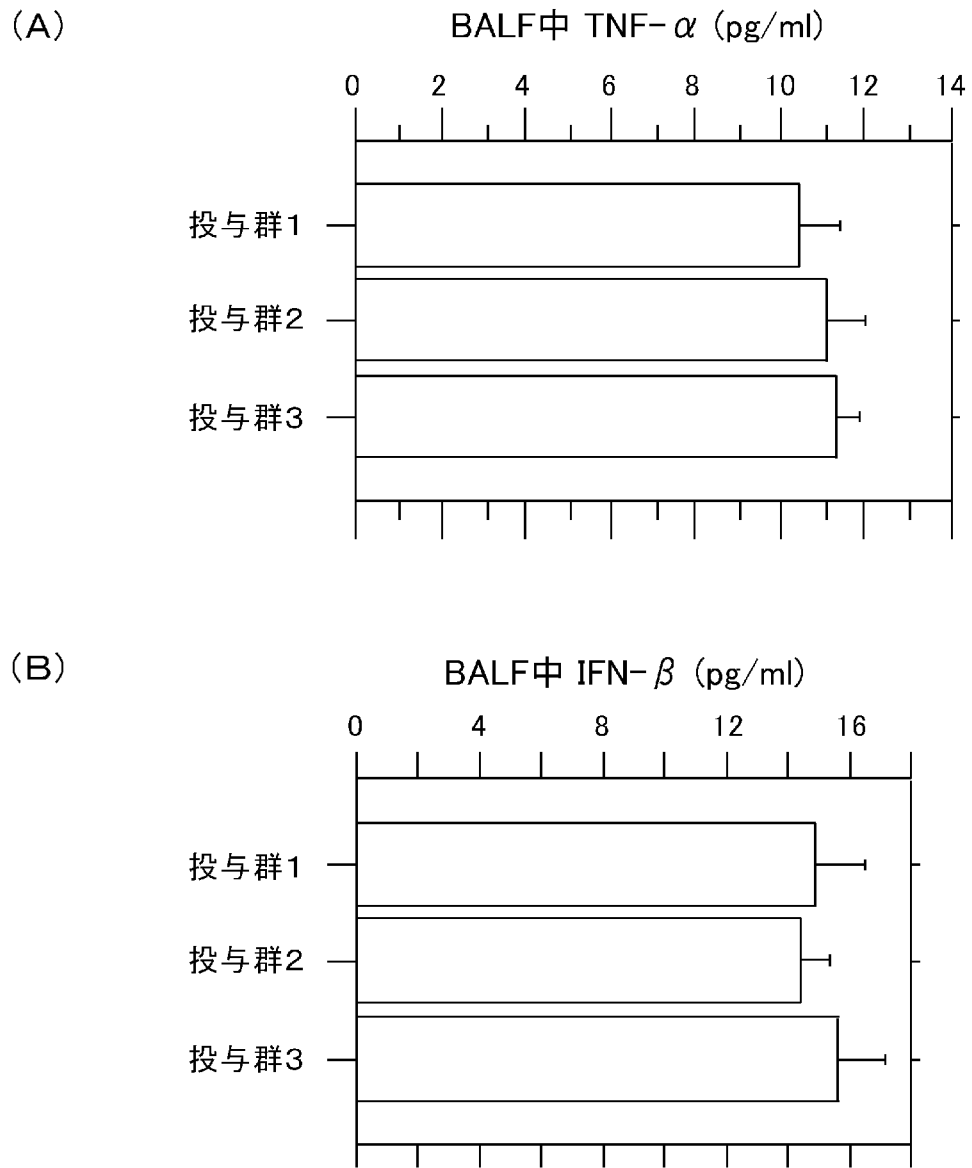
[図16]



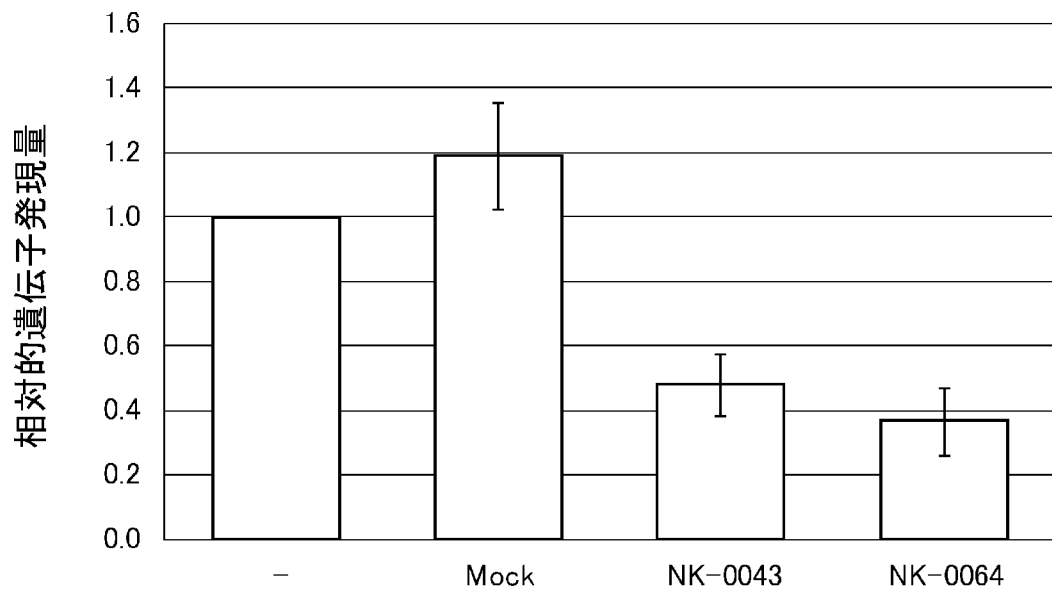
[図17]



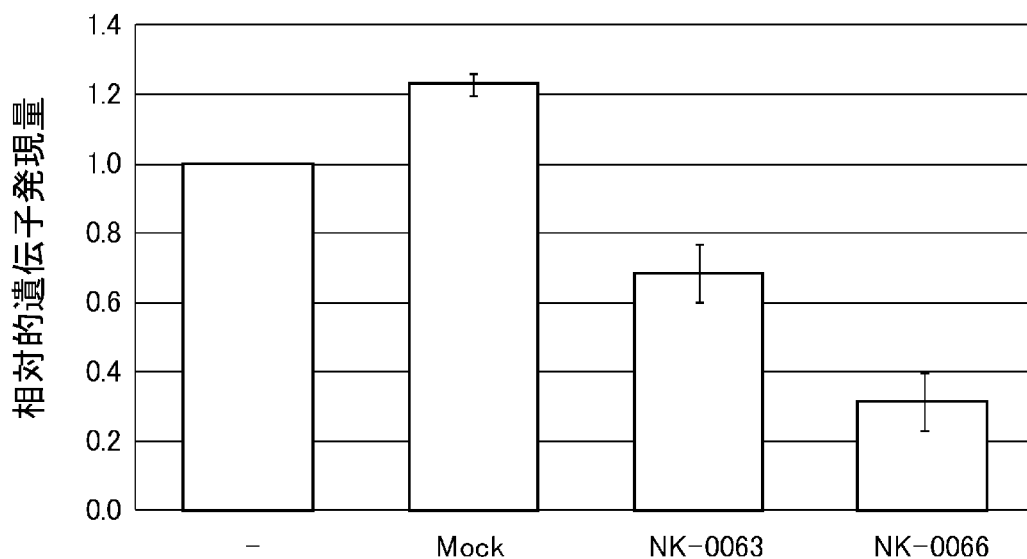
[図18]



[図19]



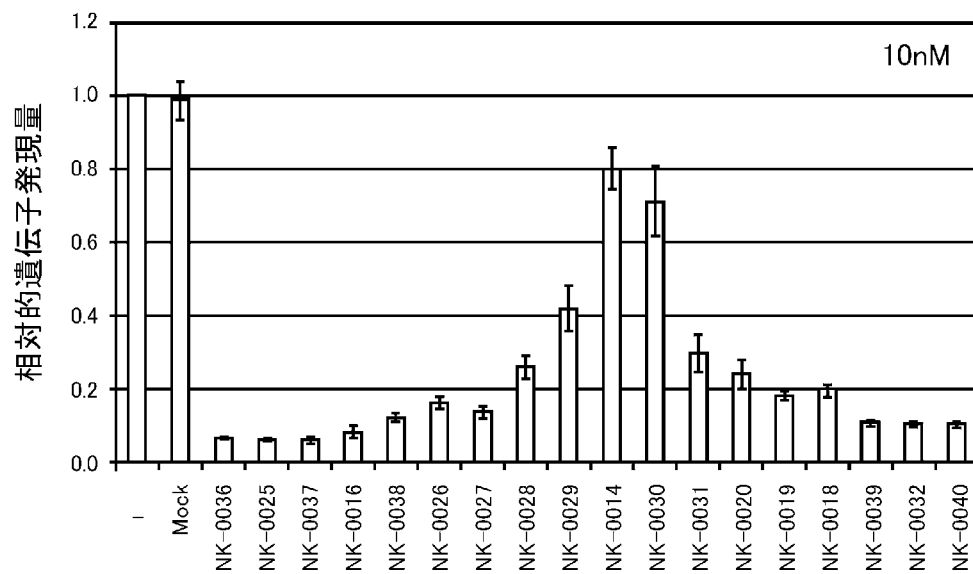
[図20]



[図21]

|         | Xc/Yc |  |
|---------|-------|--|
| NK-0036 | 25/1  | 5' - <u>aaccaugagaaquaugacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCG</u> <u>g</u> -3' 51  |
| NK-0025 | 24/1  | 5' - <u>accaugagaaquaugacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>g</u> -3' 52   |
| NK-0037 | 23/2  | 5' - <u>ccaugagaaquaugacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>ga</u> -3' 53   |
| NK-0016 | 22/3  | 5' - <u>caugagaaquaugacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaa</u> -3' 2  |
| NK-0038 | 21/4  | 5' - <u>augagaaquaugacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaac</u> -3' 54   |
| NK-0026 | 20/5  | 5' - <u>ugagaaquaugacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> -3' 55   |
| NK-0027 | 18/7  | 5' - <u>agaaquaugacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> -3' 56   |
| NK-0028 | 16/9  | 5' - <u>aquaugacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> -3' 57  |
| NK-0029 | 14/11 | 5' - <u>quaugacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> -3' 58   |
| NK-0014 | 12/13 | 5' - <u>augacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> <u>g</u> -3' 14  |
| NK-0030 | 9/16  | 5' - <u>acaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> <u>g</u> <u>au</u> <u>au</u> -3' 59                                 |
| NK-0031 | 7/18  | 5' - <u>aacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> <u>g</u> <u>au</u> <u>au</u> <u>ga</u> -3' 60                         |
| NK-0020 | 5/20  | 5' - <u>cagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> <u>g</u> <u>au</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ca</u> -3' 61                 |
| NK-0019 | 4/21  | 5' - <u>agcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> <u>g</u> <u>au</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>caa</u> -3' 7                  |
| NK-0018 | 3/22  | 5' - <u>gcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> <u>g</u> <u>au</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ca</u> <u>ac</u> -3' 62         |
| NK-0039 | 2/23  | 5' - <u>ccc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> <u>g</u> <u>au</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ca</u> <u>aca</u> -3' 63        |
| NK-0032 | 1/24  | 5' - <u>c</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> <u>g</u> <u>au</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ca</u> <u>ac</u> <u>ag</u> -3' 64 |
| NK-0040 | 1/25  | 5' - <u>c</u> CACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC</u> <u>UUCG</u> <u>gaacc</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ga</u> <u>g</u> <u>au</u> <u>au</u> <u>ga</u> <u>ca</u> <u>ac</u> <u>ag</u> -3' 65  |

[図22]



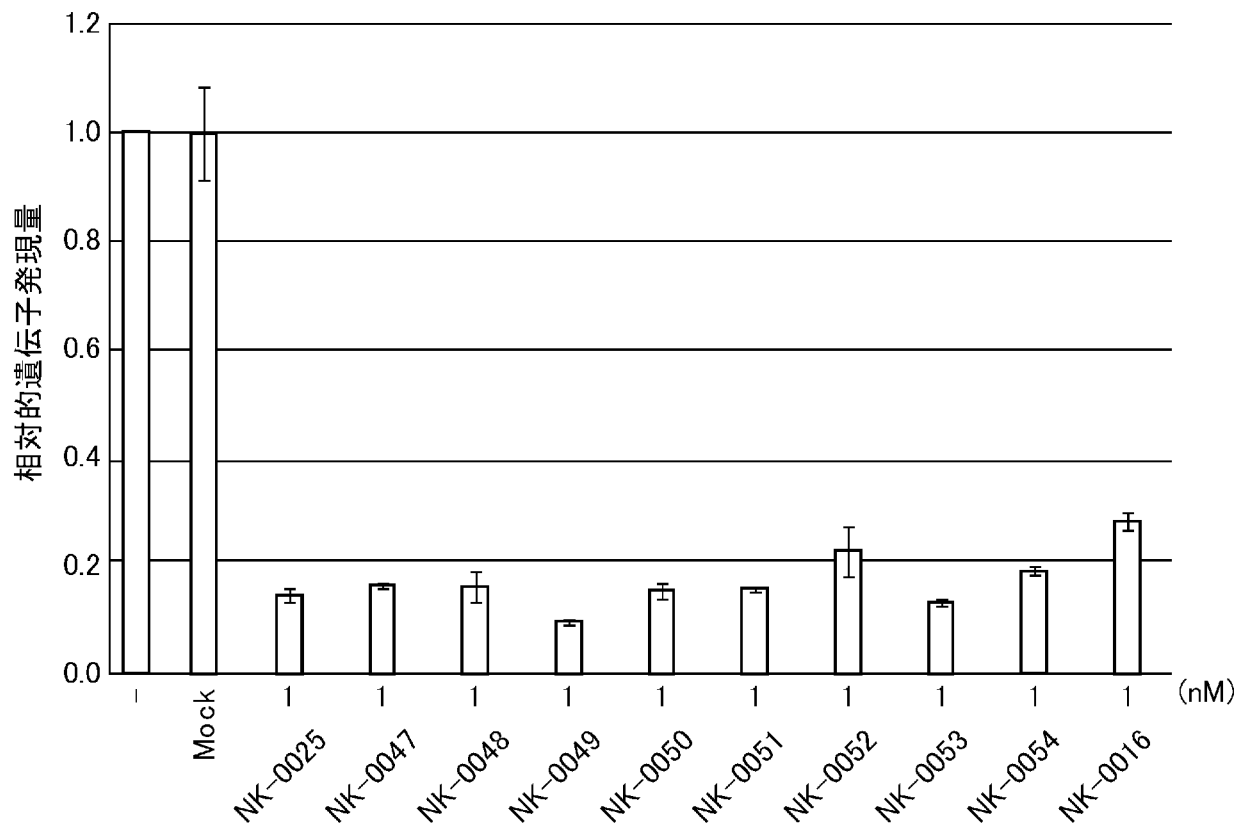
[図23]

Xc+Yc/X+Y

|         |       |   |    |
|---------|-------|---|----|
| NK-0047 | 26/27 | 5' - <u>aacc<u>aug</u>gagaa<u>gu</u>augacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGG<u>UUC</u>G</u> <sup>*</sup> UUCGg -3' | 66 |
| NK-0025 | 25/26 | 5' - <u>acc<u>aug</u>gagaa<u>gu</u>augacaacagcc</u> CCACACC <u>GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGG<u>UUC</u>G</u> <sup>*</sup> UUCGg -3'  | 52 |
| NK-0048 | 24/25 | 5' - <u>acc<u>aug</u>gagaa<u>gu</u>augacaacagcc</u> CCACACC <u>GCUGUUGUCAUACUUCUCAUGG<u>UUC</u>G</u> <sup>*</sup> UUCGg -3'   | 67 |
| NK-0049 | 23/24 | 5' - <u>cc<u>aug</u>gagaa<u>gu</u>augacaacagcc</u> CCACACC <u>GCUGUUGUCAUACUUCUCAUGG<u>UUC</u>G</u> <sup>*</sup> UUCGa -3'    | 68 |
| NK-0050 | 23/24 | 5' - <u>acc<u>aug</u>gagaa<u>gu</u>augacaacag</u> CCACACC <u>CUGUUGUCAUACUUCUCAUGG<u>UUC</u>G</u> <sup>*</sup> UUCGg -3'      | 69 |
| NK-0051 | 22/23 | 5' - <u>cc<u>aug</u>gagaa<u>gu</u>augacaacag</u> CCACACC <u>CUGUUGUCAUACUUCUCAUGG<u>UUC</u>G</u> <sup>*</sup> UUCGa -3'       | 70 |
| NK-0052 | 21/22 | 5' - <u>caugagaa<u>gu</u>augacaacag</u> CCACACC <u>CUGUUGUCAUACUUCUCAUGG<u>UUC</u>G</u> <sup>*</sup> UUCGa -3'                | 71 |
| NK-0053 | 21/22 | 5' - <u>cc<u>aug</u>gagaa<u>gu</u>augacaaca</u> CCACACC <u>UGUUGUCAUACUUCUCAUGG<u>UUC</u>G</u> <sup>*</sup> UUCGa -3'         | 72 |
| NK-0054 | 20/21 | 5' - <u>caugagaa<u>gu</u>augacaaca</u> CCACACC <u>UGUUGUCAUACUUCUCAUGG<u>UUC</u>G</u> <sup>*</sup> UUCGa -3'                  | 73 |



[図24]



[図25]

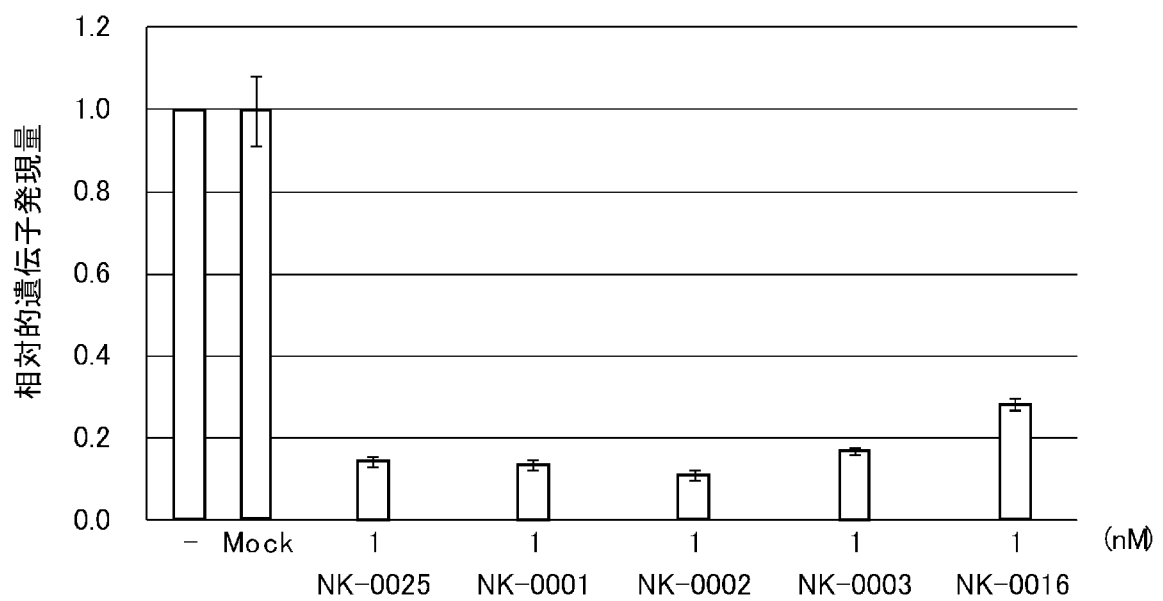
Xc/X

NK-0001 25/25 5' - aaccaugagaaguaugacaacagccCCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCGg -3'

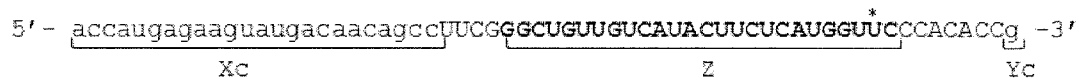
NK-0002 23/25 5' - ccaugagaaguaugacaacagccCCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGG\*\*CUUCGg -3'

NK-0003 22/25 5' - caugagaaguaugacaacagccCCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGG\*\*\*CUUCGg -3'

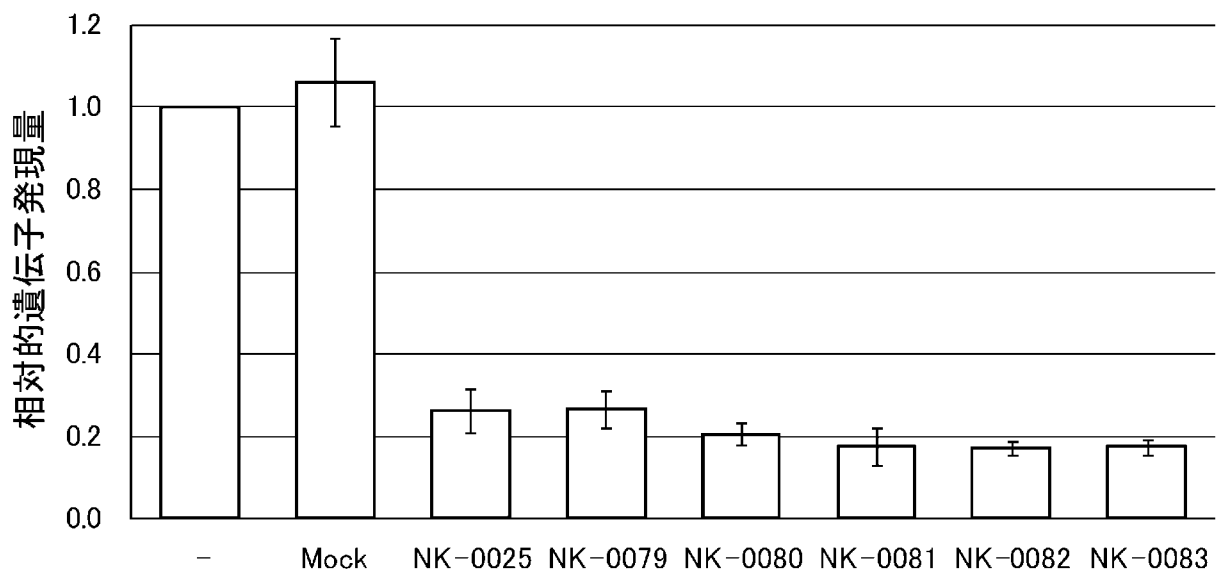
[図26]



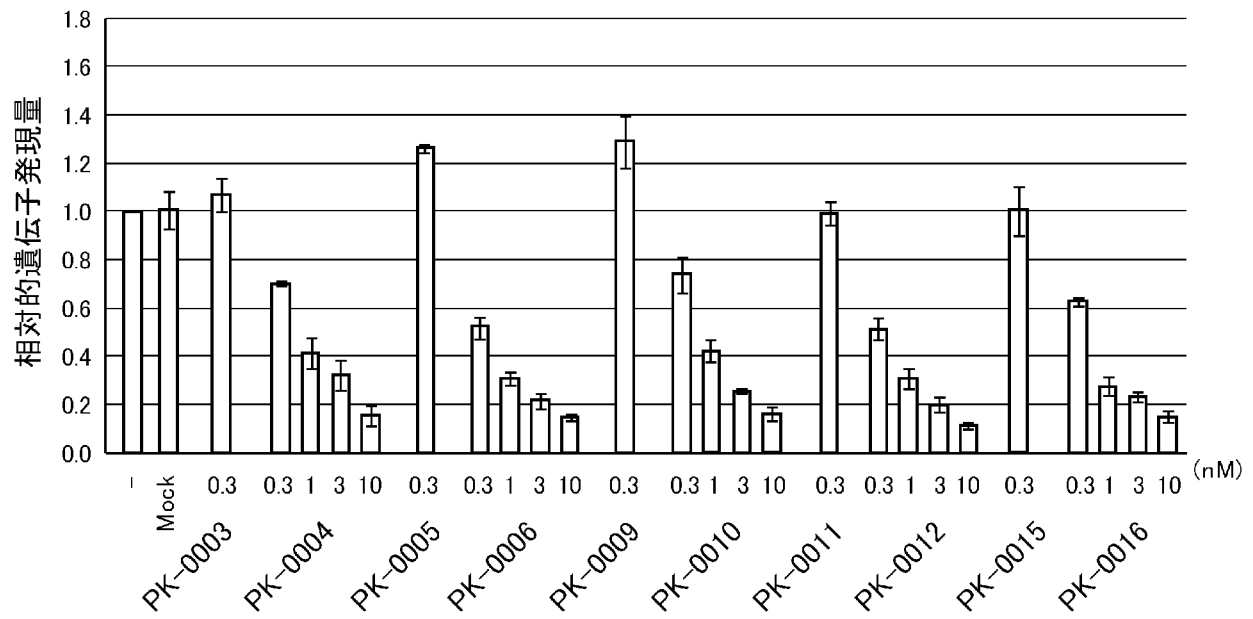
## [図27]

NK-0079 (配列番号77)  $L_x/L_y = 4/7$ NK-0080 (配列番号78)  $L_x/L_y = 1/1$ NK-0081 (配列番号79)  $L_x/L_y = 0/0$ NK-0082 (配列番号8)  $L_x/L_y = 4/3$ NK-0083 (配列番号37)  $L_x/L_y = 9/3$ 

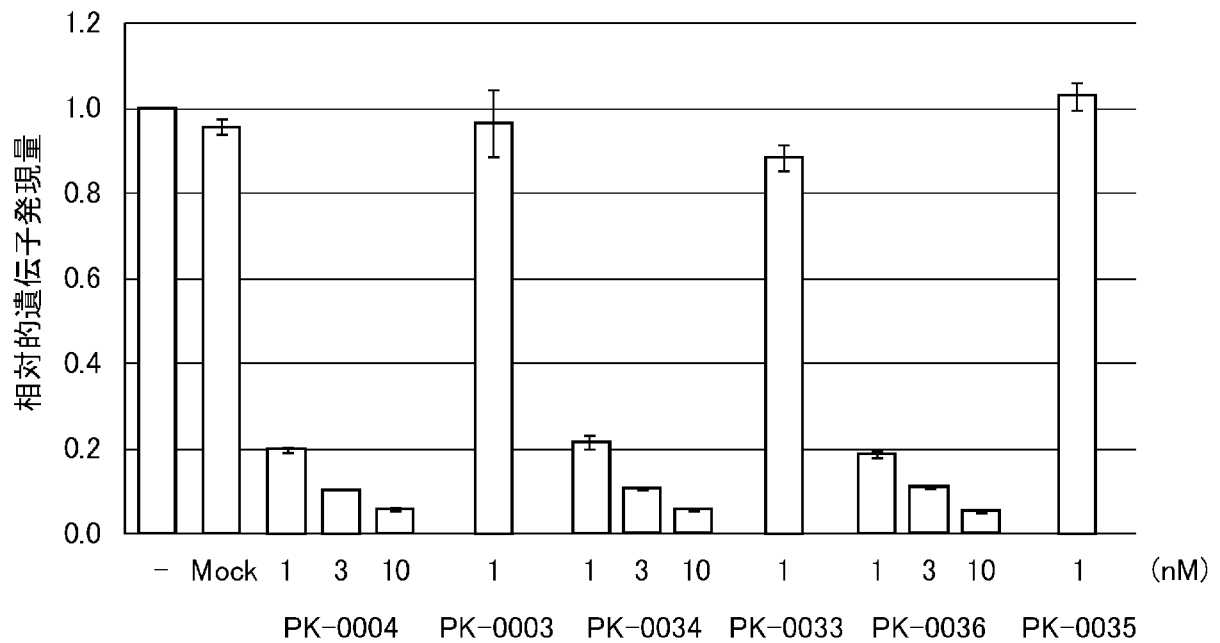
## [図28]



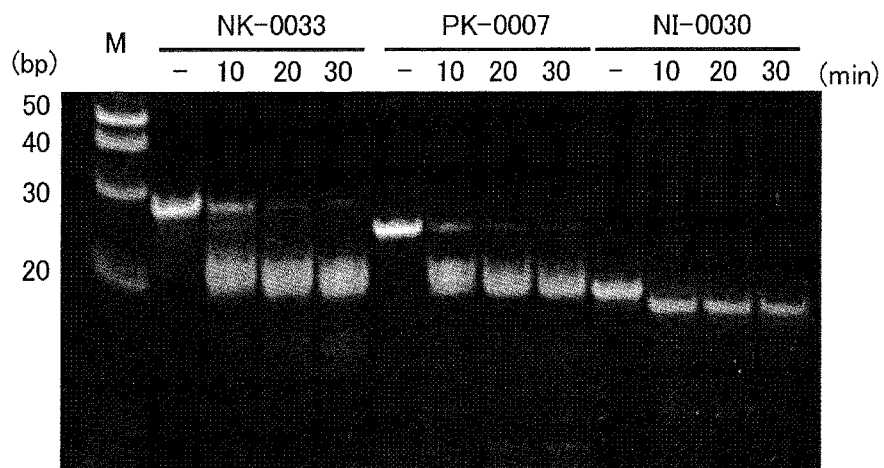
[図29]



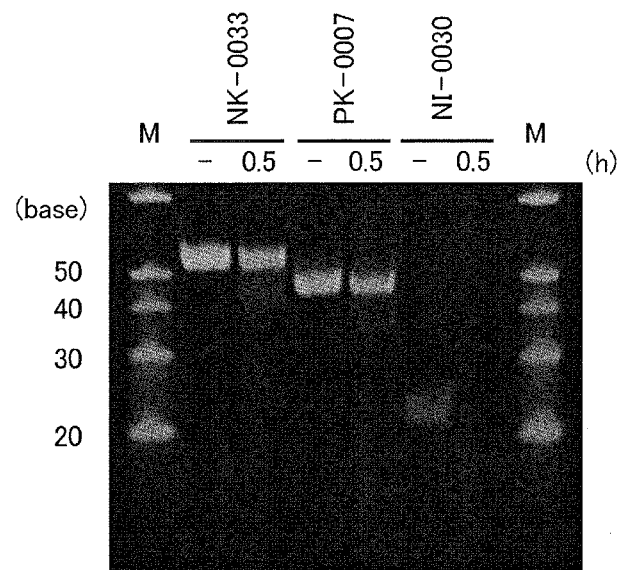
[図30]



[図31]



[図32]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/065737

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1 5/09 (2006.01) ± f A 61K 48/00 (2006.01) i, A 61P 29/00 (2006.01) i, C12N1 5/113 (2010.01) i

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)

C12N1 5/09, A61K 48/00, A61P 29/00, C12N1 5/113

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

|         |         |        |        |           |         |         |        |      |            |
|---------|---------|--------|--------|-----------|---------|---------|--------|------|------------|
| Jitsuyo | Shinan  | Koho   | 1922-1 | 996       | Jitsuyo | Shinan  | Toroku | Koho | 1996-2011  |
| Kokai   | Jitsuyo | Shinan | Koho   | 1971-2011 | Toroku  | Jitsuyo | Shinan | Koho | 1994 -2011 |

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

CA/BI OSIS/MEDLINE (STN), WPI, JSTPlus / JMEDPlus / JST 758 (JDream ⅠⅠ),  
GenBank/EMBL/ DDBJ/ GeneS eq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X / Y     | WO 2009/102081 A1 (Riken, Japan),<br>20 August 2009 (20.08.2009),<br>claims 1 to 5, 8 to 10; example 1<br>& US 2011/0055965 A1 & EP 2256191 A1  | 1 - 37 / 26 - 37      |
| X / Y     | JP 2008-278784 A (Riken, Japan, Otsuka<br>Pharmaceutical Co., Ltd., Hayaishi Kasei Co.,<br>Ltd.),<br>20 November 2008 (20.11.2008),<br>claims 1 to 3, 9 to 11; examples 1 to 5;<br>paragraphs [0006], [0034]<br>& US 2010/0137407 A1 & EP 2143792 A1<br>& WO 2008/140126 A1 & CA 2685994 A<br>& AU 2008250075 A & CN 101679962 A<br>& MX 2009011101 A & KR 10-2010-0024407 A<br>& AR 72034 A & CO 6241167 A | 1 - 37 / 26 - 37      |



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

04 October, 2011 (04.10.11)

Date of mailing of the international search report

11 October, 2011 (11.10.11)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/065737

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | LEIRDAL, Mari anne and SIØUD, Mouldy, Gene silenci ng in mammalian cel ls by preformed smal l RNA duplexe s., Biochem . Biophys. Res . Commun ., 2002, Vol . 295, p. 744- 748, Fig . 1, 4.  | 1-8, 16- 24, 26- 37   |
| Y         | BRAMSEN, Jesper B. et al ., Improved silenci ng prope rties using smal l internal ly segmented inter fering RNAs., Nucl eic Acids Res ., 2007, Vol . 35, No. 17, p. 5886-5 897, ent ire text  | 26- 37                |
| A         | YAMAKAWA, Hidef umi et al ., Propert ies and ant i-HIV activi ty of nicked dumbbell oligonucleoti des., Nucl eoside s Nucleotide s, 1996, Vol . 15 (1-3), p. 519-529, FIG. 1.   | 1-37                  |
| A         | HOSOYA, Take shi et al ., Sequence -spe cific inhibit ion of a trans cript ion factor by circular dumbbell DNA oligonucleot ide s., FEBS Lett ., Vol . 461, 1999, p. 136- 140, Fig . 1.   | 1- 37                 |
| A         | KUNUGI ZA, Yasuo et al ., Inhibitory effect of ribbon- type NF- kappaB decoy oligodeoxynucleo tide s on osteocl ast induct ion and act ivity in vitro and in vivo ., Arthri tis Res. Ther ., 2006, Vol . 8, No. 4, R103, p. 1- 10, Material s and methods | 1- 37                 |
| A         | ABE, Naoko , et al ., Dumbbell - shaped nanocircular RNAs for RNA interference ., J. Am. Chem. Soc ., 2007, Vol . 129, p. 15108- 15109  | 1-37                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

IntCl. C12N15/09 (2006. 01) i, A61K48/00 (2006. 01) i, A61P29/00 (2006. 01) i, C12N15/113 (2010. 01) i

## 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))

IntCl. C12N15/09, A61K48/00, A61P29/00, C12N15/1 13

## 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

日本国実用新案公報 1922—1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971—2011年  
 日本国実用新案登録公報 1996—2011年  
 日本国登録実用新案公報 1994—2011年

## 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)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), WPI, JSTPlus/JIEDPlus/JST7580 (jDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号       |
|-----------------|---|----------------------|
| X/Y             | WO 2009/102081 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2009. 08. 20, 請求<br>の範囲 1—5、8—10、実施例 1 & US 2011/0055965 A1 & EP<br>2256191 A1   | 1 - 37 / 2<br>6 - 37 |
| X/Y             | JP 2008-278784 A (独立行政法人理化学研究所、大塚製薬株式会社、<br>林化成株式会社) 2008. 11. 20, 請求項 1—3、9—11、実施例 1<br>- 5、段落 [0006]、[0034] & US 2010/0137407 A1 & EP<br>2143792 A1 & WO 2008/140126 A1 & CA 2685994 A & AU 2008250075<br>A & CN 101679962 A & MX 2009011101 A & KR 10-2010-0024407 A & | 1 - 37 / 2<br>6 - 37 |

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

IA「特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの」  
 IE「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」  
 I「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)」  
 Iθ「口頭による開示、使用、展示等に言及する文献」  
 IP「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」  
 IT「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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの」  
 IX「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」  
 Iγ「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

04. 10. 2011

## 国際調査報告の発送日

11. 10. 2011

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA / JP)

郵便番号 100—8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

小倉 梢

電話番号 03—3581—1101 内線 3448

4B

4504

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                             |
|-----------------------|--|-----------------------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号              |
|                       | AR 72034 A & CO 6241 167 A   |                             |
| X                     | LEIRDAL, Marianne and SLOUD, Mouldy, Gene silencing in mammalian cells by preformed small RNA duplexes. , Biochem. Biophys. Res. Commun. , 2002, Vol. 295, p. 744—748 , Fig. 1, 4.   | 1 — 8、16<br>— 24、26<br>— 37 |
| Y                     | BRAMSEN, Jesper B. et al. , Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs. , Nucleic Acids Res. , 2007, Vol. 35, No. 17, p. 5886—5897, 全文  | 26 — 37                     |
| A                     | YAMAKAWA, Hidefumi et al. , Properties and anti-HIV activity of nicked dumbbell oligonucleotides. , Nucleosides Nucleotides , 1996, Vol. 15 (1-3) , p. 519-529 , FIG. 1.   | 1 — 37                      |
| A                     | HOSoya, Takeshi et al. , Sequence-specific inhibition of a transcription factor by circular dumbbell DNA oligonucleotides. , FEBS Lett. , Vol. 461, 1999, p. 136-140 , Fig. 1.   | 1 — 37                      |
| A                     | KUNUGIZA, Yasuo et al. , Inhibitory effect of ribbon-type NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides on osteoclast induction and activity in vitro and in vivo. , Arthritis Res. Ther. , 2006, Vol. 8, No. 4, R103, p. 1—10 , Materials and methods | 1 — 37                      |
| A                     | ABE, Naoko, et al. , Dumbbell-shaped nanocircular RNAs for RNA interference. , J. Am. Chem. Soc. , 2007, Vol. 129, p. 15108—15109  | 1 — 37                      |