



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I572716 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：104132132

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 08 月 02 日

(51)Int. Cl. : C12N15/63 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61K31/712 (2006.01)

(30)優先權：2010/08/03 日本

2010-174915

2010/10/13 日本

2010-230806

2010/12/02 日本

2010-269823

2011/07/08 日本

2011-152381

(71)申請人：伯納克股份有限公司(日本) BONAC CORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：大木忠明 OHGI, TADAAKI (JP)；林宏剛 HAYASHI, HIROTAKE (JP)；白水久男

SHIROHZU, HISAO (JP)；濱崎智洋 HAMASAKI, TOMOHIRO (JP)；伊藤彰浩

ITO, AKIHIRO (JP)；鈴木寬 SUZUKI, HIROSHI (JP)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

Susanna Bosi et al., "Antimycobacterial Activity of Ionic Fullerene Derivatives", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 10 (2000) 1043-1045.

Vaijayanti Kumar et al., "Pyrrolidine Nucleic Acids: DNA/PNA Oligomers with 2-Hydroxy/Aminomethyl-4-(thymine-1-yl)pyrrolidine-N-acetic acid", Org. Lett., 2001, 3 (9), pp 1269-1272.

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：23 共 194 頁

(54)名稱

具有含氮脂環骨架之單股核酸分子(二)

(57)摘要

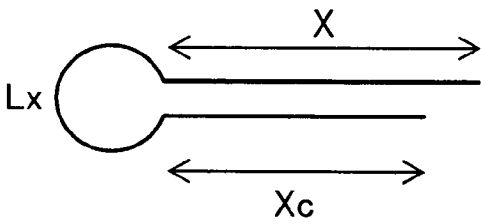
本發明之目的在於提供一種可抑制基因表現之新穎核酸分子，且該核酸分子可藉容易且有效率之製造方法來製造。即，製成一種單股核酸分子，其含有抑制目標基因表現之抑制表現序列，且特徵在於：包含區域(X)、連結區域(Lx)及區域(Xc)，前述區域(Xc)與前述區域(Xc)之間連結有前述連結區域(Lx)，前述區域(Xc)與前述區域(X)互補，前述區域(X)及前述區域(Xc)中之至少一者含有前述抑制表現序列，前述結合區域(Lx)具有非核苷酸結構，且該非核苷酸結構含有吡咯啉骨架及嘧啶骨架中之至少一者。若以此種單股核酸分子，則可抑制前述目標基因之表現。

指定代表圖：

(A)



(B)



第 1 圖

發明摘要

公告本

※ 申請案號：(04/32/32(由100/27384分割))

※ 申請日：100.8.2

※ IPC 分類：C12N 15/63 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

具有含氮脂環骨架之單股核酸分子(二)

【中文】

本發明之目的在於提供一種可抑制基因表現之新穎核酸分子，且該核酸分子可藉容易且有效率之製造方法來製造。即，製成一種單股核酸分子，其含有抑制目標基因表現之抑制表現序列，且特徵在於：包含區域(X)、連結區域(Lx)及區域(Xc)，前述區域(Xc)與前述區域(Xc)之間連結有前述連結區域(Lx)，前述區域(Xc)與前述區域(X)互補，前述區域(X)及前述區域(Xc)中之至少一者含有前述抑制表現序列，前述結合區域(Lx)具有非核苷酸結構，且該非核苷酸結構含有吡咯啉骨架及嘧啶骨架中之至少一者。若以此種單股核酸分子，則可抑制前述目標基因之表現。

【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

具有含氮脂環骨架之單股核酸分子(二)

【技術領域】

發明領域

[0001]本發明係關於一種抑制基因表現之單股核酸分子，更詳而言之，則是關於一種具有含氮脂環骨架之單股核酸分子、含有其之組成物及其用途。

【先前技術】

發明背景

[0002]就抑制基因表現之技術而言，舉例來說，已知有RNA干擾(RNAi)(非專利文獻1)。舉例而言，RNA干擾所致之抑制基因表現一般是藉由將短雙股之RNA分子投予細胞等來實施。前述雙股RNA分子通常被稱為siRNA(small interfering RNA)。此外，有報告指出，透過屬環狀RNA分子且因分子內黏著(anneal)而部分形成雙股之RNA分子，亦可抑制基因表現(專利文獻1)。然而，在此等手法中，誘導抑制基因表現之RNA分子具有如下述般之問題。

[0003]首先，製造前述siRNA時，必須具備一先分別合成出正意股及反意股，最後使此等股進行雜交之步驟。因此而有製造效率不佳之問題。此外，將前述siRNA投予細胞時，必須在抑制朝單股RNA解離之狀態下投予至細胞，因

此其處理條件之設定亦需煞費勞力。其次，在環狀RNA分子之情況下，還有其合成甚是困難之問題。

[0004]此外，此等RNA分子基本上係由核苷酸殘基構成。而欲賦予前述RNA分子某些機能或標記時，就現狀而言，舉例來說，只能對核苷酸殘基構成要素之鹼基、糖殘基或磷酸基施加修飾。因此，在利用RNA干擾之醫藥品等的開發過程中，要在維持基因表現抑制機能之狀態下進行用來賦予更多機能或標記之改變，是極其困難的。

先行技術文獻

非專利文獻

[0005]非專利文獻1：Fire et al., Nature, 1998 Feb 19 ; 391(6669) : 806-11.

專利文獻

[0006]專利文獻1：美國專利公開公報2004-058886

【發明內容】

發明概要

[0007]因此，本發明之目的在於提供一種可抑制基因表現之新穎核酸分子，其可藉容易且有效率之製造方法來製造。

[0008]爲了達成前述目的，本發明之核酸分子係一種單股核酸分子，其含有抑制目標基因表現之抑制表現序列序列，且特徵在於：包含區域(X)、連結區域(Lx)及區域(Xc)，前述區域(X)與前述區域(Xc)之間連結有前述連結區域(Lx)，前述區域(X)及前述區域(Xc)中之至少一者含有前述抑制表

現序列，前述連結區域(Lx)具有非核苷酸結構，且該非核苷酸結構含有吡咯啉骨架及嘧啶骨架中之至少一者。

[0009]本發明之組成物係用以抑制目標基因表現之組成物，其特徵在於含有前述本發明之單股核酸分子。

[0010]本發明之組成物為藥學組成物，其特徵在於含有前述本發明之單股核酸分子。

[0011]本發明之抑制表現方法係一種抑制目標基因表現之方法，其特徵在於使用前述本發明之單股核酸分子。

[0012]本發明之疾病治療方法之特徵在於：包含一將前述本發明之單股核酸分子投予患者之步驟，前述單股核酸分子具有一抑制基因表現之序列，且該基因為前述疾病之成因。

[0013]本發明之單股核酸分子可抑制基因之表現，因非呈環狀，其合成甚是容易；且因其為單股，無需雙股之黏合步驟，可效率良好地進行製造。此外，由於前述連結區域含有前述非核苷酸殘基，舉例來說，可不受限於如同習知技術般之核苷酸殘基改變，例如，亦可作前述連結區域中之修飾等的改變。

[0014]此外，本發明之單股核酸分子之結構可抑制基因表現一事係由本案發明人所首先發現者。本發明之單股核酸分子抑制基因表現之效果雖推測係由與RNA干擾同樣之現象所引起，但本發明之基因表現抑制並不受限且不限定於RNA干擾。

【圖式簡單說明】

[0015]第1(A)至1(B)圖為模式圖，顯示本發明之單股核酸分子之一例。

第2(A)至2(B)圖為模式圖，顯示本發明之單股核酸分子之另一例。

第3(A)至3(D)圖為模式圖，顯示本發明之單股核酸分子之其他例。

第4圖為圖表，顯示本發明實施例之GAPDH基因表現量相對值。

第5圖為電泳照片，顯示本發明實施例之安定性。

第6圖為圖表，顯示本發明實施例之GAPDH基因表現量相對值。

第7圖為電泳結果，顯示截切蛋白質(Dicer protein)對於本發明實施例之ssRNA的反應性。

第8圖為圖表，顯示本發明實施例之A549細胞的GAPDH基因表現量相對值。

第9圖為圖表，顯示本發明實施例之293細胞的GAPDH基因表現量相對值。

第10圖為圖表，顯示本發明實施例之HCT116細胞的GAPDH基因表現量相對值。

第11圖為圖表，顯示本發明實施例之HCT116細胞的GAPDH基因表現量相對值。

第12圖為圖表，顯示本發明實施例之TGF- β 1基因表現量相對值。

第13圖為圖表，顯示本發明實施例各投予群之每單位

重量之肺的TGF- β 1基因表現量。

第14(A)圖為圖表，顯示本發明實施例各投予群之BALF樣本中之TNF- α 量；第14(B)圖為圖表，顯示本發明實施例各投予群之BALF樣本中之IFN- β 量。

第15圖為電泳照片，顯示本發明實施例之核糖核酸酶耐性。

第16圖為電泳照片，顯示本發明實施例之S7核酸酶耐性。

第17圖係一顯示參考例所用ssRNA之圖。

第18圖為圖表，顯示參考例之GAPDH基因表現量相對值。

第19圖為圖表，顯示參考例之TGF- β 1基因表現量相對值。

第20圖為圖表，顯示參考例之LAMA基因表現量相對值。

第21圖為圖表，顯示參考例之LMNA基因表現量相對值。

第22圖係一顯示參考例所用ssRNA之圖。

第23圖為圖表，顯示參考例之GAPDH基因表現量相對值。

【實施方式】

用以實施發明之型態

[0016]本說明書所使用之用語只要未特別提及，即可使用所屬技術領域通常使用之意義。

[0017] 1.ssPN分子

如前所述，本發明之單股核酸分子係一種含有可抑制目標基因表現之抑制表現序列的單股核酸分子，其特徵在於：包含區域(X)、連結區域(Lx)及區域(Xc)，且前述區域(X)與前述區域(Xc)之間連結有前述連結區域(Lx)，前述區域(X)及前述區域(Xc)中之至少一者含有前述抑制表現序列，前述連結區域(Lx)則具有非核苷酸結構，該非核苷酸結構含有吡咯啉骨架及嘧啶骨架中之至少一者。

[0018]於本發明中，舉例來說，「抑制目標基因表現」意指抑制前述目標基因之表現。前述抑制之機制並未特別受限，舉例而言，可為調降(down-regulation)或靜默(silencing)。前述目標基因表現之抑制，舉例而言，可透過源自前述目標基因之轉錄產物生成量減少、前述轉錄產物活性減少、源自前述目標基因之轉譯產物生成量減少或是前述轉譯產物活性減少等予以確認。舉例來說，前述蛋白質可列舉如成熟蛋白質、或是經處理(processing)或轉譯後接受修飾前之前驅蛋白質。

[0019]以下，本發明之單股核酸分子亦稱為本發明之「ssPN分子」。舉例來說，由於本發明之ssPN分子可在活體內(in vivo)或活體外(in vitro)使用於抑制目標基因表現，因此亦稱為「用於抑制目標基因表現之ssPN分子」或「目標基因表現抑制劑」。此外，舉例來說，本發明之ssPN分子可透過RNA干擾來抑制前述目標基因表現，因此亦稱為「RNA干擾用ssPN分子」、「RNA干擾誘導用ssPN分子」、「RNA干

擾劑或RNA干擾誘導劑」。再者，舉例來說，本發明之ssPN分子可抑制干擾素誘導(interferon induction)等之副作用。

[0020]本發明之ssPN分子的5'端未與3'端連結，亦可稱為線狀單股核酸分子。

[0021]本發明之ssPN分子中，舉例來說，在本發明之ssPN分子於活體內或活體外之條件下導入細胞內時，前述抑制表現序列係一會顯示出抑制前述目標基因表現之活性的序列。前述抑制表現序列並未特別受限，可因應目的之目標基因種類來適當設定。舉例來說，前述抑制表現序列可適當地運用與siRNA所致RNA干擾相關之序列。一般而言，RNA干擾為下述現象：長雙股RNA(dsRNA)在細胞內透過截切器(Dicer)而被截斷成3'端突出之19~21鹼基對程度的雙股RNA(siRNA：small interfering RNA)，其中一單股RNA與目標mRNA結合，藉由分解前述mRNA來抑制前述mRNA之轉譯。舉例來說，與前述目標mRNA結合之前述siRNA中，單股RNA之序列依目標基因之種類而異，已有各種受到報告。於本發明中，舉例而言，可將前述siRNA之單股RNA序列用作前述抑制表現序列。

[0022]另，本發明的重點並非在於針對前述目標基因之前述抑制表現序列的序列資訊，而是關於一種核酸分子之結構，該核酸分子係用以使前述抑制表現序列所產生之抑制前述目標基因表現的活性在諸如細胞內發揮機能。因此，於本發明中，舉例而言，除了在申請時已屬習知之前述siRNA的單股RNA序列之外，即便是關於將來才會明朗化

之序列，亦可作為前述抑制表現序列來予以利用。

[0023]舉例來說，前述抑制表現序列相對於前述目標基因之預定區域宜具有90%以上之互補性，且宜為95%，更宜為98%，而以100%尤佳。藉由滿足此種互補性，舉例來說，可使脫靶(off-target)情況充分減少。

[0024]作為具體例，在目標基因為GAPDH基因時，前述抑制表現序列可使用例如序列編號4所示19個鹼基長之序列；目標基因為TGF- β 1時，前述抑制表現序列可使用例如序列編號6所示21個鹼基長之序列；目標基因為LAMA1基因時，前述抑制表現序列可使用例如序列編號6所示19個鹼基長之序列；目標基因為LMNA基因時，可使用序列編號30所示19個鹼基長之序列。

5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3' (序列編號4)

5'-AAAGUCAAUGUACAGCUGCUU-3' (序列編號18)

5'-AUUGUAACGAGACAAACAC-3' (序列編號6)

5'-UUGCGCUUUUUGGUGACGC-3' (序列編號30)

[0025]推測本發明之ssPN分子所致前述目標基因表現之抑制係因例如RNA干擾所引起。此外，本發明並不受此機制所限制。舉例來說，本發明之ssPN分子並非如所謂之siRNA般以兩條單股RNA所構成之dsRNA形式來導入細胞，此外，在細胞內未必需要前述抑制表現序列之切斷。因此，舉例來說，亦可謂本發明之ssPN分子具有類RNA干擾之機能。

[0026]於本發明之ssPN分子中，舉例來說，前述連結區域(Lx)可具有含前述吡咯啉骨架之非核苷酸結構，亦可具有含前述哌啉骨架之非核苷酸結構，亦可具有含前述吡咯啉骨架之非核苷酸結構與含前述哌啉骨架之非核苷酸結構兩者。舉例來說，本發明之ssPN分子可抑制活體內之干擾素誘導等副作用，且具有優異之核酸酶耐性。

[0027]於本發明之ssPN分子中，舉例來說，前述吡咯啉骨架亦可為構成吡咯啉之5員環的碳有1個以上經取代而成之吡咯啉衍生物骨架，且在取代時，舉例來說，宜為C-2之碳以外的碳原子。舉例來說，前述碳亦可經氮、氧或硫取代。舉例而言，前述吡咯啉骨架亦可在吡咯啉之5員環內含有碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵。於前述吡咯啉骨架中，舉例來說，構成吡咯啉之5員環的碳及氮可與氫鍵結，亦可與後述之取代基鍵結。前述連結區域(Lx)亦可透過例如前述吡咯啉骨架中之任一基而與前述區域(X)及前述區域(Xc)結合，且宜為前述5員環中之任1個碳原子與氮，更宜為前述5員環之2位碳(C-2)與氮。前述吡咯啉骨架可列舉如脯胺酸(proline)骨架及脯胺醇(prolinol)骨架等。舉例來說，前述脯胺酸骨架及脯胺醇骨架等由於是活體內物質及其還原物，在安全性上亦優異。

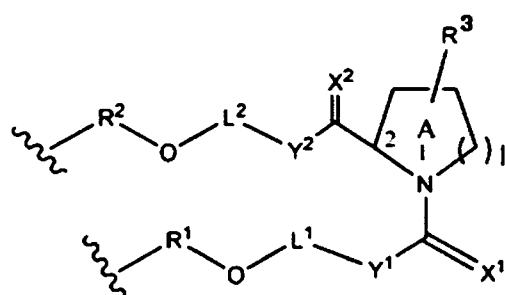
[0028]於本發明之ssPN分子中，舉例來說，前述哌啉骨架亦可為構成哌啉之6員環的碳有1個以上經取代而成之哌啉衍生物骨架，且在取代時，舉例來說宜為C-2之碳以外的碳原子。舉例來說，前述碳亦可經氮、氧或硫取代。舉例

而言，前述嘧啶骨架亦可在嘧啶之6員環內含有碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵。於前述嘧啶骨架中，舉例來說，構成嘧啶之6員環的碳及氮可與氫基鍵結，亦可與如後述之取代基鍵結。舉例來說，前述連結區域(Lx)可透過前述嘧啶骨架中之任一基而與前述區域(X)及前述區域(Xc)結合，且以前述6員環中之任一碳原子與氮為佳，更宜為前述6員環之2位碳(C-2)與氮。

[0029]舉例來說，前述連結區域可僅含有由前述非核苷酸結構所構成之非核苷酸殘基，亦可含有由前述非核苷酸結構所構成之非核苷酸殘基以及核苷酸殘基。

[0030]於本發明之ssPN分子中，舉例來說，前述連結區域係以下述式(I)表示。

[化1]



... (I)

[0031]前述式(I)中，舉例來說，

X¹及X²各自獨立為H₂、O、S或NH；

Y¹及Y²各自獨立為單鍵、CH₂、NH、O或S；

R³係與環A上之C-3、C-4、C-5或C-6鍵結之氫原子或取代基；

L¹係由n個原子構成之伸烷基鏈，於此，伸烷基碳原子

上之氫原子可經OH、OR^a、NH₂、NHR^a、NR^aR^b、SH或SR^a取代或是非經取代，或者，

L¹為前述伸烷基鏈中之1個以上碳原子經氧原子取代而成之聚醚鏈；

但，Y¹為NH、O或S時，與Y¹鍵結之L¹的原子為碳，與OR¹鍵結之L¹的原子為碳，且氧原子彼此不鄰接；

L²係由m個原子構成之伸烷基鏈，於此，伸烷基碳原子上之氫原子可經OH、OR^c、NH₂、NHR^c、NR^cR^d、SH或SR^c取代或是未經取代，或者，

L²為前述伸烷基鏈之1個以上碳原子經氧原子取代而成之聚醚鏈，

但Y²為NH、O或S時，與Y²鍵結之L²的原子為碳，與OR²鍵結之L²的原子為碳，氧原子彼此不鄰接；

R^a、R^b、R^c及R^d各自獨立為取代基或保護基；

l為1或2；

m為0~30範圍內之整數；

n為0~30範圍內之整數；

環A中，前述環A上之C-2以外的1個碳原子亦可經氮、氧或硫取代，

於前述環A內，亦可含有碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵，

前述區域(Y^c)及前述區域(Y)各自透過-OR¹-或-OR²-而與前述連結區域(L_y)結合，

於此，R¹及R²可存在亦可不存在，且存在時，R¹及R²各自獨立為核苷酸殘基或前述結構(I)。

[0032]於前述式(I)中，舉例來說， X^1 及 X^2 各自獨立為 H_2 、O、S或NH。於前述式(I)中， X^1 為 H_2 意指 X^1 與 X^1 所鍵結之碳原子共同形成 CH_2 (亞甲基)。 X^2 亦是相同。

[0033]於前述式(I)中， Y^1 及 Y^2 各自獨立為單鍵、 CH_2 、NH、O或S。

[0034]於前述式(I)中，環A中， l 為1或2。 $l=1$ 時，環A為5員環，例如為前述吡咯啉骨架。前述吡咯啉骨架可列舉如脯胺酸骨架及、脯胺醇骨架等，可例示如其等之二價結構。 $l=2$ 時，環A為6員環，例如為前述哌啉骨架。環A中，環A上之C-2以外的1個碳原子亦可經氮、氧或硫取代。此外，環A亦可在環A內含有碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵。舉例來說，環A可為L型及D型中之任一者。

[0035]於前述式(I)中， R^3 為與環A上之C-3、C-4、C-5或C-6鍵結之氫原子或取代基。 R^3 為前述取代基時，取代基 R^3 可為1或多數個，亦可不存在；有多數個時，可相同亦可不同。

[0036]舉例來說，取代基 R^3 為鹵素、OH、 OR^4 、 NH_2 、 NHR^4 、 NR^4R^5 、SH、 SR^4 或側氧基(=O)等。

[0037]舉例來說， R^4 及 R^5 各自獨立為取代基或保護基，且可相同亦可不同。前述取代基可列舉如鹵素、烷基、烯基、炔基、鹵烷基、芳基、雜芳基、芳烷基、環烷基、環烯基、環烷基烷基、環基烷基(cyclalkyl)、羥基烷基、烷氧基烷基、胺基烷基、雜環基烯基、雜環基烷基、雜芳基烷基、矽基及矽氧烷基等。以下相同。取代基 R^3 亦可為此

等列舉之取代基。

[0038]舉例來說，前述保護基係將反應性較高之官能基轉換成不活性之官能基，可列舉如習知之保護基等。前述保護基可援用例如文獻(J. F. W. McOmie, 「Protecting Groups in Organic Chemistry」 Prenum Press, London and New York, 1973) 之記載。前述保護基並未特別受限，可列舉如第三丁基二甲基矽基(TBDMS)、雙(2-乙醯氧基乙基氧基)甲基(ACE)、三異丙基矽氧基甲基(TOM)、1-(2-氰基乙氧基)乙基(CEE)、2-氰基乙氧基甲基(CEM)及甲苯磺醯基乙氧基甲基(TEM)、二甲氧基三苯甲基(DMTr)等。 R^3 為 OR^4 時，前述保護基並未特別受限，可列舉如TBDMS基、ACE基、TOM基、CEE基、CEM基及TEM基等。此外，亦可列舉如後述[化5]之含矽基的基團。以下相同。

[0039]於前述式(I)中， L^1 係由 n 個原子構成之伸烷基鏈。舉例來說，前述伸烷基碳原子上之氫原子可經OH、 OR^a 、 NH_2 、 NHR^a 、 NR^aR^b 、SH或 SR^a 取代，亦可不經取代。此外， L^1 亦可為前述伸烷基鏈之1個以上碳原子經氧原子取代而成之聚醚鏈。舉例來說，前述聚醚鏈為聚乙二醇。此外， Y^1 為NH、O或S時，與 Y^1 鍵結之 L^1 的原子為碳，與 OR^1 鍵結之 L^1 的原子為碳，且氧原子彼此不鄰接。亦即，舉例來說， Y^1 為O時，其氧原子與 L^1 之氧原子不鄰接，且 OR^1 之氧原子與 L^1 之氧原子不鄰接。

[0040]於前述式(I)中， L^2 係 m 個原子所構成之伸烷基鏈。舉例來說，前述伸烷基碳原子上之氫原子可經OH、 OR^c 、

NH_2 、 NHR^c 、 NR^cR^d 、 SH 或 SR^c 取代，亦可不經取代。或者， L^2 亦可為前述伸烷基鏈之1個以上碳原子經氧原子取代而成之聚醚鏈。另外， Y^2 為 NH 、 O 或 S 時，與 Y^2 鍵結之 L^2 的原子為碳，與 OR^2 鍵結之 L^2 的原子為碳，氧原子彼此不鄰接。亦即，舉例來說， Y^2 為 O 時，其氧原子與 L^2 之氧原子不鄰接， OR^2 之氧原子與 L^2 之氧原子不鄰接。

[0041] L^1 之 n 及 L^2 之 m 並無特別受限，各自之下限例如為0，上限亦不特別受限。舉例來說， n 及 m 可因應前述連結區域(Lx)之所欲長度來適當設定。舉例來說，從製造成本及收率等觀點來看， n 及 m 各自以0~30為宜，且更宜為0~20，尤宜為0~15。 n 與 m 可相同($n=m$)亦可不同。舉例來說， $n+m$ 為0~30，且宜為0~20，更宜為0~15。

[0042]舉例而言， R^a 、 R^b 、 R^c 及 R^d 各自獨立為取代基或保護基。前述取代基及前述保護基例如與前述相同。

[0043]前述式(I)中，舉例來說，氫原子亦可各自獨立經 Cl 、 Br 、 F 及 I 等之鹵素取代。

[0044]舉例來說，前述區域(Xc)及前述區域(X)分別透過 $-\text{OR}^1-$ 或 $-\text{OR}^2-$ 而與前述連結區域(Lx)結合。於此， R^1 及 R^2 可存在亦可不存在。 R^1 及 R^2 存在時， R^1 及 R^2 各自獨立為核苷酸殘基或前述式(I)之結構。 R^1 及/或 R^2 為前述核苷酸殘基時，舉例來說，前述連結區域(Lx)係由前述非核苷酸殘基與前述核苷酸殘基所構成，且該非核苷酸殘基係由核苷酸殘基 R^1 及/或 R^2 除外之前述式(I)結構所構成。 R^1 及/或 R^2 為前述式(I)之結構時，舉例來說，前述連結區域(Xc)會成為連

結有2個以上前述式(I)結構所構成之前述非核苷酸殘基的結構。舉例來說，前述式(I)之結構亦可含有1個、2個、3個或4個。如前述般含有多數個前述結構時，舉例來說，前述(I)之結構可直接連結，亦可透過前述核苷酸殘基而結合。另一方面， R^1 及 R^2 不存在時，舉例來說，前述連結區域(Lx)可僅由前述式(I)結構所構成之前述非核苷酸殘基形成。

[0045]前述區域(Xc)及前述區域(X)與 $-OR^1-$ 及 $-OR^2-$ 之結合的組合並未特別受限，舉例來說，可列舉如以下任一條件。

條件(1)

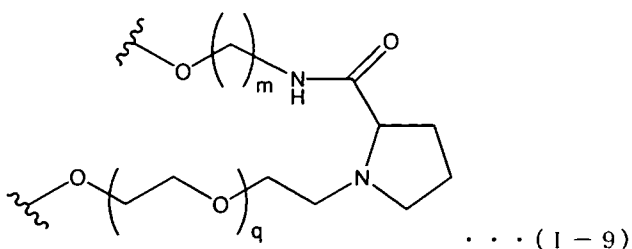
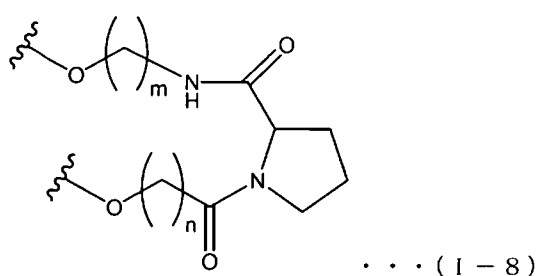
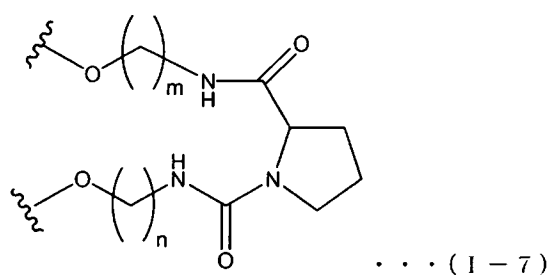
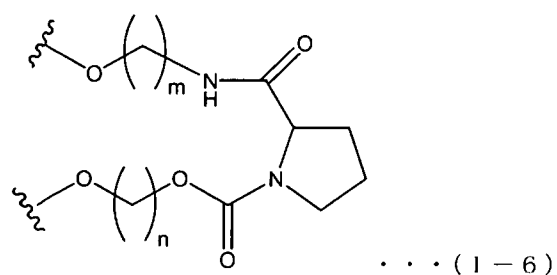
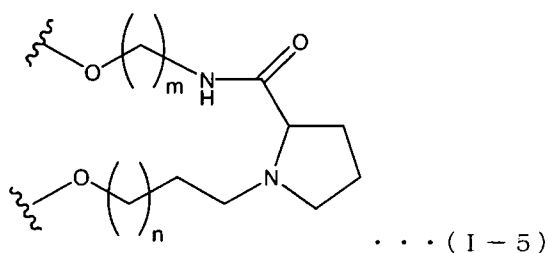
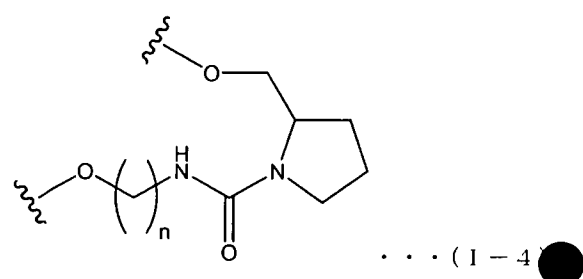
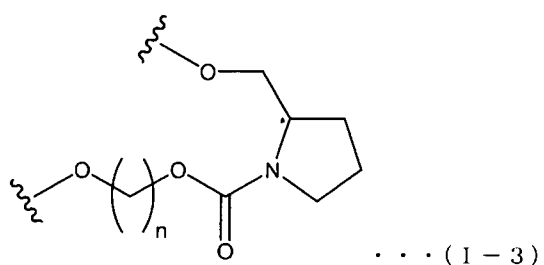
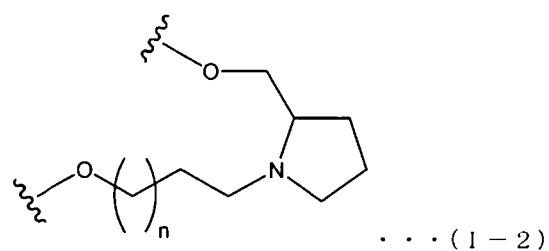
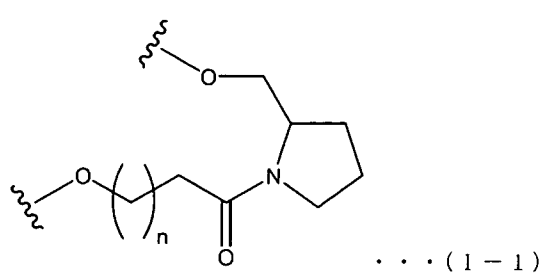
前述區域(Xc)透過 $-OR^2-$ 且前述區域(X)透過 $-OR^1-$ 與前述式(I)之結構結合。

條件(2)

前述區域(Xc)透過 $-OR^1-$ 且前述區域(X)透過 $-OR^2-$ 與前述式(I)之結構結合。

[0046]前述式(I)之結構可例示如下述式(I-1)~式(I-9)，於下述式中，n及m與前述式(I)相同。於下述式中，q為0~10之整數。

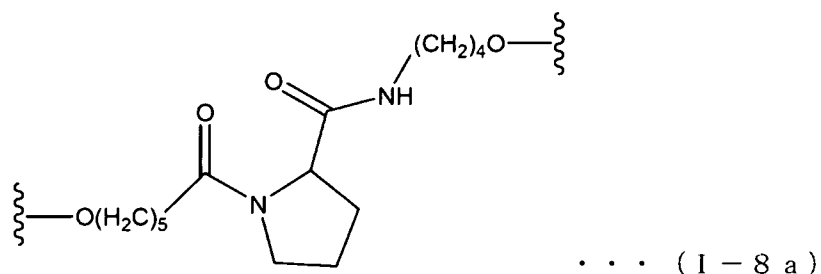
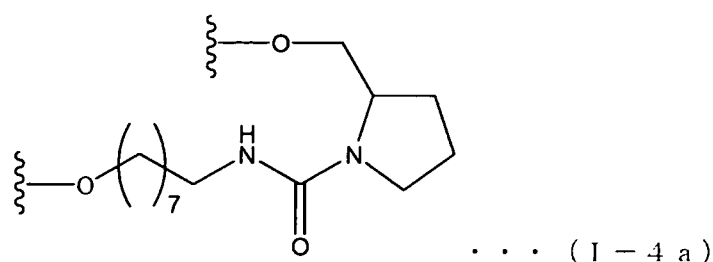
[化2]



[0047] 前述式(I-1)~(I-9)中，n、m及q並未特別受限而如前所述。具體例則可列舉如：前述式(I-1)中，n=8；前述(I-2)中，n=3；前述式(I-3)中，n=4或8；前述(I-4)中，n=7或8；

前述式(I-5)中， $n=3$ 及 $m=4$ ；前述(I-6)中， $n=8$ 及 $m=4$ ；前述式(I-7)中， $n=8$ 及 $m=4$ ；前述(I-8)中， $n=5$ 及 $m=4$ ；前述式(I-9)中， $q=1$ 及 $m=4$ 。茲將前述式(I-4)之一例($n=8$)顯示於下述式(I-4a)，並將前述式(I-8)之一例($n=5$ 、 $m=4$)顯示於下述式(I-8a)。

[化3]



[0048]於本發明之ssPN分子中，前述區域(Xc)與前述區域(X)互補。因此，於本發明之ssPN分子中，前述區域(Xc)朝向前述區域(X)回折，且前述區域(Xc)與前述區域(X)可透過自黏合而形成雙股。本發明之ssPN分子係如前所述般可於分子內形成雙股，舉例來說，與習知之透過已分離之2條單股RNA黏合而形成雙股RNA者(諸如使用於RNA干擾之siRNA)結構明顯不同。

[0049]舉例來說，本發明之ssPN分子可僅有前述區域(Xc)回折而與前述區域(X)形成雙股，亦可更於其他區域形成新的雙股。以下，將前者之ssPN分子(即1處形成雙股之

分子)稱為「第一ssPN分子」，將後者之ssPN分子(即2處形成雙股之分子)稱為「第二ssPN分子」。以下，就前述第一ssPN分子及前述第二ssPN分子予以例示，但本發明並不侷限於此。

[0050](1)第一ssPN分子

舉例來說，前述第一ssPN分子係由前述區域(X)、前述區域(Xc)及前述連結區域(Lx)所構成之分子。

[0051]前述第一ssPN分子舉例來說可從5'端側至3'端側依序具有前述區域(Xc)、前述連結區域(Lx)及前述區域(X)，亦可從3'端側至5'端側依序具有前述區域(Xc)、前述連結區域(Lx)及前述區域(X)。

[0052]於前述第一ssPN分子中，前述區域(Xc)與前述區域(X)互補。於此，前述區域(Xc)僅需具有與前述區域(X)之全區域或其部分區域互補之序列即可，且宜含有與前述區域(X)之全區域或其部分區域互補之序列，或是由前述互補之序列所構成。舉例來說，前述區域(Xc)對於與前述區域(X)互補之前述全區域或前述部分區域可為完全互補，亦可有1個或數個鹼基非為互補，但以完全互補為宜。舉例來說，前述1個鹼基或數個鹼基為1~3鹼基，且宜為1個鹼基或2個鹼基。

[0053]於前述第一ssPN分子中，前述抑制表現序列係如前述般，包含在前述區域(Xc)及前述區域(X)中之至少一者。舉例來說，前述第一ssPN分子可具有1個前述抑制表現序列，亦可具有2個以上。

[0054]在後者的情況下，舉例來說，前述第一ssPN分子可具有2個以上針對相同目標基因之相同抑制表現序列，亦可具有2個以上針對相同目標之不同抑制表現序列，也可具有2個以上針對不同目標基因之不同抑制表現序列。前述第一ssPN分子具有2個以上之前述抑制表現序列時，各抑制表現序列之配置處並未特別受限，可為前述區域(X)及前述區域(Xc)中之任一區域，亦可為不同之區域。前述第一ssPN分子具有2個以上針對不同目標基因之前述抑制表現序列時，舉例來說，可藉由前述第一ssPN分子來抑制2種以上之不同目標基因的表現。

[0055]茲將前述第一ssPN分子之一例顯示於第1圖之模式圖。第1(A)圖係一模式圖，其就前述ssPN分子顯示各區域順序之概略來作為一例；第1(B)圖係一模式圖，其顯示前述ssPN分子在前述分子內形成雙股之狀態。如第1(B)圖所示，前述ssPN分子係於前述區域(Xc)與前述區域(X)之間形成雙股，且前述Lx區域因應其長度而採迴圈(loop)結構。第1圖只不過是用以顯示前述區域之連結順序及形成雙股之各區域的位置關係者，舉例來說，各區域之長度及前述連結區域(Lx)之形狀等均不受其限制。

[0056]前述第一ssPN分子中，前述區域(Xc)及前述區域(X)之鹼基數並未特別受限。茲將各區域之長度例示於下，但本發明並不受其限制。於本發明中，舉例來說，「鹼基數」意指「長度」，亦可稱為「鹼基長」。於本發明中，舉例來說，鹼基數之數值範圍係揭示隸屬於該範圍之所有正整數，

以具體例而言，「1~4鹼基」之記載意指「1、2、3、4鹼基」之全部揭示內容(以下相同)。

[0057]舉例來說，前述區域(Xc)亦可與前述區域(X)之全區域完全互補。此時，舉例來說，意指前述區域(Xc)係由與前述區域(X)從5'末端至3'末端之全區域互補的鹼基序列所構成，亦即，意味著前述區域(Xc)與前述區域(X)為相同鹼基長，且前述區域(Xc)之全部鹼基與前述區域(X)之全部鹼基互補。

[0058]此外，舉例來說，前述區域(Xc)亦可與前述區域(X)之部分區域完全互補。此時，舉例來說，意味著前述區域(Xc)係由與前述區域(X)之部分區域互補的鹼基序列所構成，亦即，意味著前述區域(Xc)係由鹼基長較前述區域(X)短1個鹼基以上之鹼基序列所構成，且前述區域(Xc)之全部鹼基與前述區域(X)之前述部分區域的全部鹼基互補。舉例來說，前述區域(X)之前述部分區域宜為下述鹼基序列所構成之區域：前述區域(X)中，以前述區域(Xc)側之末端鹼基(第1個鹼基)為始連續下來的鹼基序列。

[0059]於前述第一ssPN分子中，舉例來說，前述區域(X)之鹼基數(X)與前述區域(Xc)之鹼基數(Xc)的關係滿足下述(3)或(5)之條件，且在前者之情況下，具體來說，例如滿足下述(11)之條件。

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

$$X - Xc = 1 \sim 10, \text{ 且宜為 } 1、2 \text{ 或 } 3, \text{ 更宜為 } 1 \text{ 或 } 2 \quad \cdot \cdot \cdot (11)$$

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

[0060] 前述區域(X)及/或前述區域(Xc)含有前述抑制表現序列時，舉例來說，前述區域可為僅由前述抑制表現序列所構成之區域，亦可為含有前述抑制表現序列之區域。前述抑制表現序列之鹼基數例如為19~30個鹼基，且宜為19、20或21個鹼基。舉例來說，含有前述抑制表現序列之區域亦可在前述抑制表現序列之5'端側及/或3'端側更具有附加序列。前述附加序列之鹼基數例如為1~31個鹼基，且宜為1~21個鹼基，更宜為1~11個鹼基。

[0061] 前述區域(X)之鹼基數並未特別受限。前述區域(X)含有前述抑制表現序列時，舉例來說，其下限為19個鹼基。其上限例如為50個鹼基，且宜為30個鹼基，更宜為25個鹼基。以前述區域(X)之鹼基數的具體例而言，例如為19個鹼基~50個鹼基，且宜為19個鹼基~30個鹼基，更宜為19個鹼基~25個鹼基。

[0062] 前述區域(Xc)之鹼基數並未特別受限。其下限例如為19個鹼基，且宜為20個鹼基，更宜為21個鹼基。其上限例如為50個鹼基，且宜為40個鹼基，更宜為30個鹼基。

[0063] 於前述ssPN分子中，前述連結區域(Lx)之長度並未特別受限。舉例來說，前述連結區域(Lx)宜為前述區域(X)與前述區域(Xc)可形成雙股之長度。前述連結區域(Lx)除了前述非核苷酸殘基之外還含有前述核苷酸殘基時，前述連結區域(Lx)之鹼基數的下限例如為1個鹼基，且宜為2個鹼基，更宜為3個鹼基；其上限則例如為100個鹼基，且宜為80個鹼基，更宜為50個鹼基。

[0064] 前述第一ssPN分子之全長並未特別受限。於前述第一ssPN分子中，前述鹼基數合計(全長之鹼基數)之下限例如為38個鹼基，且宜為42個鹼基，較宜為50個鹼基，更宜為51個鹼基，尤宜為52個鹼基；其上限則例如為300個鹼基，且宜為200個鹼基，較宜為150個鹼基，更宜為100個鹼基，而尤宜為80個鹼基。於前述第一ssPN分子中，前述連結區域(Lx)除外之鹼基數合計的下限例如為38個鹼基，且宜為42個鹼基，較宜為50個鹼基，更宜為51個鹼基，而尤宜為52個鹼基；上限則例如為300個鹼基，且宜為200個鹼基，較宜為150個鹼基，更宜為100個鹼基，而尤宜為80個鹼基。

[0065] (2) 第二ssPN分子

舉例來說，前述第二ssPN分子係除了前述區域(X)、前述連結區域(Lx)及前述區域(Xc)之外更具有區域(Y)以及與前述區域(Y)互補之區域(Yc)的分子。於前述第二ssPN分子中，前述區域(X)與前述區域(Y)連結而形成內部區域(Z)。此外，只要未特別表示，前述第二ssPN分子可援用前述第一ssPN分子之記載。

[0066] 舉例來說，前述第二ssPN分子亦可從5'端側至3'端側依序具有前述區域(Xc)、前述連結區域(Lx)、前述區域(X)、前述區域(Y)及前述區域(Yc)。此時，前述區域(Xc)亦稱為5'端側區域(Xc)，前述內部區域(Z)中之前述區域(X)亦稱為內部5'端側區域(X)，前述內部區域(Z)中之前述區域(Y)亦稱為內部3'端區域(Y)，前述區域(Yc)亦稱為3'端側區域(Yc)。此外，舉例來說，前述第二ssPN分子亦可從3'端側

至5'端側依序具有前述區域(Xc)、前述連結區域(Lx)、前述區域(X)、前述區域(Y)及前述區域(Yc)。此時，前述區域(Xc)亦稱為3'端側區域(Xc)，前述內部區域(Z)中之前述區域(X)亦稱為內部3'端側區域(X)，前述內部區域(Z)中之前述區域(Y)亦稱為內部5'端區域(Y)，前述區域(Yc)亦稱為5'端側區域(Yc)。

[0067]舉例來說，前述內部區域(Z)係如前所述，前述區域(X)與前述區域(Y)呈連結。舉例來說，前述區域(X)與前述區域(Y)直接連結，其間不具有介入序列。前述內部區域(Z)為了顯示與前述區域(Xc)及前述區域(Yc)間之序列關係，而定義成「前述區域(X)與前述區域(Y)連結而構成」，並非限定前述內部區域(Z)中前述區域(X)與前述區域(Y)在前述ssPN分子使用時為各別獨立之領域。亦即，舉例來說，前述內部區域(Z)具有前述抑制表現序列時，於前述內部區域(Z)中，前述抑制表現序列可跨前述區域(X)與前述區域(Y)來配置。

[0068]於前述第二ssPN分子中，前述區域(Xc)與前述區域(X)互補。於此，前述區域(Xc)僅需具有與前述區域(X)之全區域或其部分區域互補的序列即可，且宜含有與前述區域(X)之全區域或其部分區域互補的序列或是由前述互補之序列所構成。舉例來說，前述區域(Xc)可對與前述區域(X)互補之前述全區域或前述部分區域呈完全互補，亦可有1個或數個鹼基非為互補，但以完全互補為宜。前述1個鹼基或數個鹼基例如為1~3個鹼基，且宜為1個鹼基或2個鹼

基。

[0069]於前述第二ssPN分子中，前述區域(Yc)與前述區域(Y)互補。於此，前述區域(Yc)僅需具有與前述區域(Y)之全區域或其部分區域互補之序列即可，且宜含有與前述區域(Y)之全區域或其部分區域互補之序列，或是由前述互補之序列所構成。舉例來說，前述區域(Yc)對於與前述區域(Y)互補之前述全區域或前述部分領域可呈完全互補，亦可有1個或數個鹼基非呈互補，但以完全互補為宜。前述1個鹼基或數個鹼基例如為1~3個鹼基，且宜為1個鹼基或2個鹼基。

[0070]於前述第二ssPN分子中，舉例來說，前述抑制表現序列包含在由前述區域(X)與前述區域(Y)所形成之前述內部區域(Z)及前述區域(Xc)之至少一者中，亦可更包含在前述區域(Yc)中。前述內部區域(Z)具有前述抑制表現序列時，舉例來說，可在前述區域(X)及前述區域(Y)中之任一者具有前述抑制表現序列，此外，亦可跨前述區域(X)與前述區域(Y)來具有前述抑制表現序列。舉例來說，前述第二ssPN分子可具有1個前述抑制表現序列，亦可具有2個以上。

[0071]前述第二ssPN分子具有2個以上前述抑制表現序列時，各抑制表現序列之配置處並未特別受限，可為前述內部區域(Z)及前述區域(Xc)中之任一者，亦可為前述內部區域(Z)及前述區域(Xc)中之任一者與其他之不同區域。

[0072]於前述第二ssPN分子中，舉例來說，前述區域(Yc)

與前述區域(Y)可直接連結，亦可間接連結。於前者之情況下，直接連結可列舉如利用磷酸二酯(phosphodiester)鍵之連結。在後者之情況下，舉例來說可列舉如：前述區域(Yc)與前述區域(Y)之間具有連結區域(Ly)，且前述區域(Yc)與前述區域(Y)透過前述連結區域(Ly)而連結的形態。

[0073] 前述第二ssPN分子具有前述連結區域(Ly)時，舉例來說，前述連結區域(Ly)可為前述核苷酸殘基所構成之連接子(linker)，亦可為前述之具有非核苷酸結構(含有吡咯啉骨架及嘧啶骨架中之至少一者)的連接子。在後者之情況下，舉例來說，前述連結區域(Ly)可以前述式(I)來表示，且可援用前述連結區域(Lx)中之前述式(I)的全部說明。

[0074] 舉例來說，前述區域(Yc)及前述區域(Y)分別透過-OR¹-或-OR²-而與前述連結區域(Ly)結合。於此，R¹及R²與前述連結區域(Lx)相同，可存在亦可不存在。

[0075] 前述區域(Xc)、前述區域(X)以及前述區域(Yc)、前述(Y)與前述-OR¹-及-OR²-之結合的組合並未特別受限，可列舉如以下任一條件。

條件(1)

前述區域(Xc)透過-OR²-且前述區域(X)透過-OR¹-而與前述式(I)之結構結合，並且

前述區域(Yc)透過-OR¹-且前述區域(Y)透過-OR²-而與前述式(I)之結構結合。

條件(2)

前述區域(Xc)透過-OR²-且前述區域(X)透過-OR¹-而與

前述式(I)之結構結合，並且

前述區域(Yc)透過-OR²-且前述區域(Y)透過-OR¹-而與前述式(I)之結構結合。

條件(3)

前述區域(Xc)透過-OR¹-且前述區域(X)透過-OR²-而與前述式(I)之結構結合，並且

前述區域(Yc)透過-OR¹-且前述區域(Y)透過-OR²-而與前述式(I)之結構結合。

條件(4)

前述區域(Xc)透過-OR¹-且前述區域(X)透過-OR²-而與前述式(I)之結構結合，並且

前述區域(Yc)透過-OR²-且前述區域(Y)透過-OR¹-而與前述式(I)之結構結合。

[0076]針對前述第二ssPN分子，茲將具有前述連結區域(Ly)之ssPN分子之一例顯示於第2圖之模式圖中。第2(A)圖為模式圖，其針對前述ssPN分子，顯示從5'端側向3'端側之各區域順序的概略作為一例；第2(B)圖為模式圖，顯示前述ssPN分子在前述分子內形成雙股之狀態。如第2(B)圖所示，前述ssPN分子在前述區域(Xc)與前述區域(X)之間、前述區域(Y)與前述區域(Yc)之間形成雙股，且前述Lx領域及前述Ly領域因應其長度而採迴圈結構。第2圖只不過是用以顯示前述區域之連結順序及形成雙股之各區域的位置關係者，舉例來說，各區域之長度及連結區域之形狀等均不受其限制。此外，雖然第2圖將前述區域(Xc)顯示於5'端側，

但並不限於此，前述區域(Xc)亦可位在3'端側。

[0077]於前述第二ssPN分子中，前述區域(Xc)、前述區域(X)、前述區域(Y)及前述區域(Yc)之鹼基數並未特別受限。茲將各區域之長度例示如下，但本發明並不受其限制。

[0078]前述區域(Xc)係如前述，舉例來說，亦可與前述區域(X)之全區域完全互補。此時，舉例來說，前述區域(Xc)宜與前述區域(X)為相同鹼基長，且宜由與前述區域(X)之全部鹼基互補之鹼基序列所構成。前述區域(Xc)更宜：與前述區域(X)相同鹼基長且前述區域(Xc)之全部鹼基與前述區域(X)之全部鹼基互補，亦即，例如完全互補。此外，並不侷限於此，舉例來說，可如前述般有1個或數個鹼基非為互補。

[0079]此外，舉例來說，前述區域(Xc)亦可與前述區域(X)之部分區域互補。此時，舉例來說，前述區域(Xc)宜與前述區域(X)之部分區域為相同鹼基長，亦即，宜由鹼基長較前述區域(X)短1個鹼基以上之鹼基序列所構成。前述區域(Xc)更宜：與前述區域(X)之前述部分區域為相同鹼基長，且前述區域(Xc)之全部鹼基與前述區域(X)之前述部分區域之全部鹼基互補，亦即，例如完全互補。舉例來說，前述區域(X)之前述部分區域中宜為下述鹼基序列所構成之區域：前述區域(X)中，以前述區域(Xc)側之末端鹼基(第1個鹼基)為始連續下來的鹼基序列。

[0080]前述區域(Yc)係如前述，舉例來說，亦可與前述區域(Y)之全區域互補。此時，舉例來說，前述區域(Yc)宜

與前述區域(Y)為相同鹼基長，且宜由與前述區域(Y)之全區域互補的鹼基序列所構成。前述區域(Yc)更宜與前述區域(Y)為相同鹼基長且前述區域(Yc)之全部鹼基與前述區域(Y)之全部鹼基互補，亦即，例如完全互補。此外，並不侷限於此，例如可如前述般，有1個或數個鹼基非為互補。

[0081]此外，前述區域(Yc)係如前述，舉例來說，亦可與前述區域(Y)之部分區域互補。此時，舉例來說，前述區域(Yc)宜與前述區域(Y)之部分區域相同鹼基長，亦即，宜由鹼基長較前述區域(Y)短1個鹼基以上之鹼基序列所構成。前述區域(Yc)更宜與前述區域(Y)之前述部分區域為相同鹼基長且前述區域(Yc)之全部鹼基與前述區域(Y)之前述部分區域的全部鹼基互補，亦即，例如完全互補。舉例來說，前述區域(Y)之前述部分區域宜為下述鹼基序列所構成之區域：前述區域(Y)中，以前述區域(Yc)側之末端鹼基(第1個鹼基)為始連續下來的鹼基序列。

[0082]於前述第二ssPN分子中，舉例來說，前述內部區域(Z)之鹼基數(Z)與前述區域(X)之鹼基數(X)及前述區域(Y)之鹼基數(Y)的關係、以及前述內部區域(Z)之鹼基數(Z)與前述區域(X)之鹼基數(X)及前述區域(Xc)之鹼基數(Xc)的關係滿足下述式(1)及(2)之條件。

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

$$Z \geq Xc + Yc \quad \cdot \cdot \cdot (2)$$

[0083]於前述第二ssPN分子中，前述區域(X)之鹼基數(X)與前述區域(Y)之鹼基數(Y)的關係並未特別受限，舉例

來說，滿足下述式之任一條件。

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

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

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

[0084]於第二ssPN分子中，舉例來說，前述區域(X)之鹼基數(X)、前述區域(Xc)之鹼基數(Xc)、前述區域(Y)之鹼基數(Y)及前述區域(Yc)之鹼基數(Yc)的關係滿足下述(a)~(d)中之任一條件。

(a)滿足下述式(3)及(4)之條件。

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

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

(b)滿足下述式(5)及(6)之條件。

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

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

(c)滿足下述式(7)及(8)之條件。

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

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

(d)滿足下述式(9)及(10)之條件。

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

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

[0085]於前述(a)~(d)中，舉例來說，前述區域(X)之鹼基數(X)與前述區域(Xc)之鹼基數(Xc)的差以及前述區域(Y)之鹼基數(Y)與前述區域(Yc)之鹼基數(Yc)的差宜滿足下述條件。

(a)滿足下述式(11)及(12)之條件。

$X-X_c=1\sim 10$ ，且宜為1、2、3或4，更宜為1、2或3 . . .

(11)

$Y-Y_c=0$. . . (12)

(b)滿足下述式(13)及(14)之條件。

$X-X_c=0$. . . (13)

$Y-Y_c=1\sim 10$ ，且宜為1、2、3或4，更宜為1、2或3 . . .

(14)

(c)滿足下述式(15)及(16)之條件。

$X-X_c=1\sim 10$ ，且宜為1、2或3，更宜為1或2 . . . (15)

$Y-Y_c=1\sim 10$ ，且宜為1、2或3，更宜為1或2 . . . (16)

(d)滿足下述式(17)及(18)之條件。

$X-X_c=0$. . . (17)

$Y-Y_c=0$. . . (18)

[0086]針對前述(a)~(d)之第二ssPN分子，茲將各個結構之一例顯示於第3圖之模式圖。第3圖為包含前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)之ssPN，且(A)為前述(a)之ssPN分子之例，(B)為前述(b)之ssPN分子之例，(C)為前述(c)之ssPN分子之例，(D)為前述(d)之ssPN分子之例。於第3圖中，虛線顯示藉自黏合而形成雙股之狀態。第3圖之ssPN分子雖將前述區域(X)之鹼基數(X)與前述區域(Y)之鹼基數(Y)表示成前述式(20)之「 $X < Y$ 」，但並不限於此，如前所述，可為前述式(19)之「 $X = Y$ 」，亦可為前述式(21)之「 $X > Y$ 」。此外，第3圖只不過是用以顯示前述區域(X)與前述區域(Xc)

之關係以及前述區域(Y)與前述區域(Yc)之關係的模式圖，舉例來說，各區域之長度、形狀及連結區域(Ly)之有無等，均不受其限制。

[0087]舉例來說，前述(a)~(c)之ssPN分子呈下述結構：前述區域(Xc)與前述區域(X)、及前述區域(Yc)與前述區域(Y)分別形成雙股，藉此而於前述內部區域(Z)中具有不與前述區域(Xc)及前述區域(Yc)中之任一者對準的鹼基；亦可稱為具有不形成雙股之鹼基的結構。以下，將前述內部區域(Z)中之前述不對準之鹼基(亦稱為不形成雙股之鹼基)稱為「自由鹼基」。於第3圖中，前述自由鹼基之區域係以「F」表示。前述區域(F)之鹼基數並未特別受限。舉例來說，在前述(a)之ssPN分子的情況下，前述區域(F)之鹼基數(F)為「X-Xc」之鹼基數；在前述(b)之ssPN分子的情況下，為「Y-Yc」之鹼基數；而在前述(c)之ssPN分子的情況下，則是「X-Xc」之鹼基數與「Y-Yc」之鹼基數的合計數。

[0088]另一方面，舉例來說，前述(d)之ssPN分子呈現前述內部區域(Z)之全區域與前述區域(Xc)及前述區域(Yc)對準之結構，亦可稱為前述內部區域(Z)之全區域形成雙股之結構。此外，前述(d)之ssPN分子中，前述區域(Xc)之5'末端與前述區域(Yc)之3'末端並未連結。

[0089]前述區域(Xc)、前述區域(Yc)及前述內部區域(Z)中，前述自由鹼基(F)之鹼基數合計會成為前述內部區域(Z)之鹼基數。因此，舉例來說，前述區域(Xc)及前述區域(Yc)之長度可因應前述內部區域(Z)之長度、前述自由鹼基之數

量及其位置來適當地決定。

[0090] 前述內部區域(Z)之鹼基數例如為19個鹼基以上。前述鹼基數之下限例如為19個鹼基，且宜為20個鹼基，更宜為21個鹼基。前述鹼基數之上限例如為50個鹼基，且宜為40個鹼基，更宜為30個鹼基。前述內部區域(Z)之鹼基數具體例，舉例來說為19個鹼基、20個鹼基、21個鹼基、22個鹼基、23個鹼基、24個鹼基、25個鹼基、26個鹼基、27個鹼基、28個鹼基、29個鹼基或30個鹼基。前述內部區域(Z)具有前述抑制表現序列時，舉例來說以此條件為宜。

[0091] 前述內部區域(Z)含有前述抑制表現序列時，舉例來說，前述內部區域(Z)可為僅由前述抑制表現序列所構成之區域，亦可為含有前述抑制表現序列之區域。前述抑制表現序列之鹼基數例如為19~30個鹼基，且宜為19、20或21個鹼基，前述內部區域(Z)含有前述抑制表現序列時，前述抑制表現序列の5'端側及/或3'端側亦可更具有附加序列。前述附加序列之鹼基數例如為1~31個鹼基，且宜為1~21個鹼基，更宜為1~11個鹼基，尤宜為1~7個鹼基。

[0092] 前述區域(Xc)之鹼基數例如為1~29個鹼基，且宜為1~11個鹼基，較宜為1~7個鹼基，更宜為1~4個鹼基，尤宜為1個鹼基、2個鹼基或3個鹼基。前述內部區域(Z)或前述區域(Yc)含有前述抑制表現序列時，舉例來說，以此種鹼基數為宜。作為具體例，前述內部區域(Z)之鹼基數為19~30個鹼基(例如19個鹼基)時，前述區域(Xc)之鹼基數例如為1~11個鹼基，且宜為1~7個鹼基，較宜為1~4個鹼基，

且更宜爲1個鹼基、2個鹼基或3個鹼基。

[0093]前述區域(Xc)含有前述抑制表現序列時，舉例來說，前述區域(Xc)可爲僅由前述抑制表現序列所構成之區域，亦可爲含有前述抑制表現序列之區域。前述抑制表現序列之長度例如前述者。前述區域(Xc)含有前述抑制表現序列時，前述抑制表現序列之5'端側及/或3'端側可更具有附加序列。前述附加序列之鹼基數例如爲1~11個鹼基，且宜爲1~7個鹼基。

[0094]前述區域(Yc)之鹼基數例如爲1~29個鹼基，且宜爲1~11個鹼基，較宜爲1~7個鹼基，更宜爲1~4個鹼基，且更宜爲1個鹼基、2個鹼基或3個鹼基。前述內部區域(Z)或前述區域(Xc)含有前述抑制表現序列時，舉例來說，以此種鹼基數爲宜。作爲具體例，前述內部區域(Z)之鹼基數爲19~30個鹼基(例如19個鹼基)時，前述區域(Yc)之鹼基數例如爲1~11個鹼基，且宜爲1~7個鹼基，較宜爲1個鹼基、2個鹼基、3個鹼基或4個鹼基，且更宜爲1個鹼基、2個鹼基或3個鹼基。

[0095]前述區域(Yc)含有前述抑制表現序列時，前述區域(Yc)可爲僅由前述抑制表現序列所構成之區域，亦可爲含有前述抑制表現序列之區域。前述抑制表現序列之長度例如前述者。前述區域(Yc)含有前述抑制表現序列時，前述抑制表現序列之5'端側及/或3'端側可更具有附加序列。前述附加序列之鹼基數例如爲1~11個鹼基，且宜爲1~7個鹼基。

[0096]如前所述，舉例來說，前述內部區域(Z)、前述區域(Xc)及前述區域(Yc)之鹼基數可以前述式(2)之「 $Z \geq Xc + Yc$ 」來表示。作為具體例，舉例來說，「 $Xc + Yc$ 」之鹼基數係與前述內部區域(Z)相同，或是較前述內部區域(Z)更小。後者之情況下，舉例來說，「 $Z - (Xc + Yc)$ 」為1~10，且宜為1~4，且更宜為1、2或3。舉例來說，前述「 $Z - (Xc + Yc)$ 」相當於前述內部區域(Z)中之自由區域(F)的鹼基數(F)。

[0097]於前述第二ssPN分子中，前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)之長度並未特別受限。前述連結區域(Lx)係如前所述。前述連結區域(Ly)之構成單元包含鹼基時，前述連結區域(Ly)之鹼基數的下限舉例來說為1個鹼基，且宜為2個鹼基，更宜為3個鹼基，其上限舉例來說則為100個鹼基，且宜為80個鹼基，更宜為50個鹼基。舉例來說，前述各連結區域之鹼基數可例示如1~50鹼基、1~30鹼基、1~20鹼基、1~10鹼基、1~7鹼基、1~4鹼基等以作為具體例，但並不侷限於此。

[0098]舉例來說，前述連結區域(Ly)可與前述連結區域(Lx)相同，亦可不同。

[0099]前述第二ssPN分子之全長並未特別受限。於前述第二ssPN分子中，前述鹼基數合計(全長之鹼基數)的下限例如為38個鹼基，且以42個鹼基為宜，較宜為50個鹼基，更宜為51個鹼基，且尤宜為52個鹼基；其上限則例如為300個鹼基，且以200個鹼基為宜，較宜為150個鹼基，更宜為100個鹼基，且尤宜為80個鹼基。於前述第二ssPN分子中，前述

連結區域(Lx)及連結區域(Ly)除外之鹼基數合計的下限例如為38個鹼基，且宜為42個鹼基，較宜為50個鹼基，更宜為51個鹼基，尤宜為52個鹼基；其上限例如為300個鹼基，且以200個鹼基為宜，較宜為150個鹼基，更宜為100個鹼基，而尤宜為80個鹼基。

[0100]本發明之ssPN分子係如前所述，前述連結區域(Lx)僅需具有前述非核苷酸結構即可，其他之構成單元並未特別受限。前述構成單元可列舉如核苷酸殘基等。前述核苷酸殘基可列舉如核糖核苷酸殘基及去氧核糖核苷酸殘基等。前述核苷酸殘基可列舉如未經修飾之非修飾核苷酸殘基及經修飾之修飾核苷酸殘基等。舉例來說，本發明之ssPN分子可藉由含有前述修飾核苷酸殘基而提高核酸酶耐性並提高安定性。此外，舉例來說，本發明之ssPN分子除了前述核苷酸殘基之外，亦可更含有非核苷酸殘基。

[0101]前述區域(Xc)、前述區域(X)、前述區域(Y)及前述區域(Yc)之構成單元各自以前述核苷酸殘基為宜。舉例來說，前述各區域係以下述(1)~(3)之殘基來構成。

(1)非修飾核苷酸殘基

(2)修飾核苷酸殘基

(3)非修飾核苷酸殘基及修飾核苷酸殘基

[0102]舉例來說，前述連結區域(Lx)可僅由前述非核苷酸殘基構成，亦可由前述非核苷酸與前述核苷酸殘基構成。例如，前述連結區域(Lx)以下述(4)~(7)之殘基來構成。

(4)非核苷酸殘基

(5)非核苷酸殘基及非修飾核苷酸殘基

(6)非核苷酸殘基及修飾核苷酸殘基

(7)非核苷酸殘基、非修飾核苷酸殘基及修飾核苷酸殘基

[0103]前述連結區域(Ly)之構成單元並未特別受限，舉例來說，如前所述，可列舉如前述核苷酸殘基及前述非核苷酸殘基等。舉例來說，前述連結區域可僅由前述核苷酸殘基構成，亦可僅由前述非核苷酸殘基構成，亦可由前述核苷酸殘基與前述非核苷酸殘基所構成。前述連結區域例如係以下述(1)~(7)之殘基來構成。

(1)非修飾核苷酸殘基

(2)修飾核苷酸殘基

(3)非修飾核苷酸殘基及修飾核苷酸殘基

(4)非核苷酸殘基

(5)非核苷酸殘基及非修飾核苷酸殘基

(6)非核苷酸殘基及修飾核苷酸殘基

(7)非核苷酸殘基、非修飾核苷酸殘基及修飾核苷酸殘基

[0104]舉例來說，本發明之ssPN分子除了前述連結區域(Lx)之外，可列舉如僅由前述核苷酸殘基構成之分子以及除前述核苷酸殘基之外還含有前述非核苷酸殘基之分子等。於本發明之ssPN分子中，前述核苷酸殘基係如前所述，舉例來說，可僅為前述非修飾核苷酸殘基，亦可僅為前述修飾核苷酸殘基，亦可為前述非修飾核苷酸殘基及前述修飾

核苷酸殘基兩者。前述ssPN分子含有前述非修飾核苷酸殘基與前述修飾核苷酸殘基時，前述修飾核苷酸殘基之個數並未特別受限，舉例來說為「1或數個」，具體來說則例如是1~5個，且宜為1~4個，更宜為1~3個，而最宜為1或2個。本發明之ssPN分子含有前述非核苷酸殘基時，前述非核苷酸殘基之個數並未特別受限，舉例來說為「1或數個」，具體來說則例如是1或2個。

[0105]本發明之ssPN分子中，前述核苷酸殘基例如宜為核糖核苷酸殘基。此時，舉例來說，本發明之ssPN分子亦稱為「ssRNA分子」或「P-ssRNA分子」。舉例來說，前述ssRNA分子係除前述連結區域(Lx)之外僅由前述核糖核苷酸殘基構成之分子，可列舉如前述核糖核苷酸殘基之外還含有前述非核苷酸殘基之分子等。於前述ssRNA分子中，前述核糖核苷酸殘基係如前述，例如可僅為前述非修飾核糖核苷酸殘基，亦可僅為前述修飾核糖核苷酸殘基，亦可含有前述非修飾核糖核苷酸殘基及前述修飾核糖核苷酸殘基兩者。

[0106]舉例來說，前述ssRNA分子除了前述非修飾核糖核苷酸殘基之外還含有前述修飾核糖核苷酸殘基時，前述修飾核糖核苷酸殘基之個數並未特別受限，例如為「1或數個」，具體來說例如為1~5個，且宜為1~4個，更宜為1~3個，而最宜為1或2個。相對於前述非修飾核糖核苷酸殘基之前述修飾核糖核苷酸殘基可列舉如核糖殘基取代成去氧核糖殘基之前述去氧核糖核苷酸殘基等。舉例來說，前述ssRNA

分子除前述非修飾核糖核苷酸殘基之外還含有前述去氧核糖核苷酸殘基時，前述去氧核糖核苷酸殘基之個數並未特別受限，舉例來說為「1或數個」，具體來說例如為1~5個，且宜為1~4個，更宜為1~3個，而最宜為1或2個。

[0107]舉例來說，本發明之ssNc分子亦可含有標記物質且以前述標記物質而受到標識化。前述標記物質並未特別受限，可列舉如螢光物質、色素及同位素等。前述標記物質可列舉如芘、TAMRA、螢光黃(fluorescein)、Cy3色素、Cy5色素等之螢光團，且前述色素可列舉如Alexa488等之Alexa色素等。前述同位素可列舉如穩定同位素及放射性同位素，且宜為穩定同位素。前述穩定同位素舉例來說由於幅射外洩之危險性較少，且無需專門設備而具優異之處理性，此外，亦可減低成本。再者，舉例來說，經前述穩定同位素標識之化合物無物性變化，用作示蹤劑(tracer)之性質亦優異。前述穩定同位素並無特別受限，可列舉如 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{33}S 、 ^{34}S 及 ^{36}S 。

[0108]本發明之ssPN分子係如前述，舉例來說，宜於前述非核苷酸結構中導入前述標記物質，且宜對前述連結區域(Lx)之前述非核苷酸殘基導入前述標記物質。舉例來說，對前述非核苷酸殘基之標記物質導入可簡便且價廉地進行。

[0109]本發明之ssPN分子係如前述，可抑制前述目標基因之表現。因此，本發明之ssPN分子可用作基因係成因之疾病的治療劑。只要是含有可抑制前述疾病成因之基因表

現的序列來作為前述抑制表現序列之前述ssPN分子，舉例來說，即可透過抑制前述目標基因之表現來治療前述疾病。於本發明中，舉例來說，「治療」包含預防前述疾病、改善疾病及改善預後等之意義，且可為任一者。

[0110]本發明之ssPN分子之使用方法並未特別受限，舉例來說，僅需對具有前述目標基因之投予對象投予前述ssPN分子即可。

[0111]前述投予對象可列舉如細胞、組織或器官。前述投予對象可列舉如人類以及人類以外之非人哺乳類等之非人動物。舉例來說，前述投予可為活體內(in vivo)亦可為活體外(in vitro)。前述細胞並未特別受限，可列舉如HeLa細胞、293細胞、NIH3T3細胞、COS細胞等之各種培養細胞、ES細胞、造血幹細胞等之幹細胞、初代培養細胞等由活體單離出之細胞等。

[0112]於本發明中，抑制表現對象之前述目標基因並未特別受限，可設定所欲之基因，僅需因應前述目標基因之種類來適當設計前述抑制表現序列即可。

[0113]茲將本發明之ssPN分子之具體例顯示如下，但本發明並不因此而受到任何限制。前述ssPN分子之鹼基序列可例示如序列編號3、11、14~17及23之鹼基序列，此外，前述鹼基序列中，舉例來說亦可是缺損、取代及/或附加有1或數個之鹼基序列。前述目標基因為GAPDH基因時，可列舉如序列編號3及11之鹼基序列；目標基因為TGF- β 1時，可列舉如序列編號14~17及23之鹼基序列。

[0114]關於本發明之ssPN分子的用途，則可援用後述之本發明組成物、抑制表現方法及治療方法等之記載。

[0115]由於本發明之ssNc分子可抑制目標基因之表現，舉例來說，作為醫藥品、診斷藥、農藥以及農藥、醫學、生命科學等之研究工具等甚是有用。

[0116]於本發明中，舉例來說「烷基」包含直鏈狀或分枝狀烷基。前述烷基之碳數並未特別受限，例如為1~30，且宜為1~6或1~4。前述烷基可列舉如：甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、異戊基、新戊基、正己基、異己基、正庚基、正辛基、正壬基及正癸基等。較佳者可列舉如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、異戊基、新戊基、正己基及異己基等。

[0117]於本發明中，舉例來說「烯基」包含直鏈狀或分枝狀之烯基。前述烯基可列舉如在前述烷基中具有1個或多數個雙鍵者等。前述烯基之碳數並未特別受限，舉例來說與前述烷基相同，且宜為2~8。前述烯基可列舉如乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1，3-丁二烯基、3-甲基-2-丁烯基等。

[0118]於本發明中，舉例來說「炔基」包含直鏈狀或分枝狀炔基。前述炔基可列舉如在前述烷基中具有1個或多數個參鍵者等。前述炔基之碳數並未特別受限，舉例來說與前述烷基相同，且宜為2~8。前述炔基可列舉如乙炔基、丙炔基、丁炔基等。舉例來說，前述炔基亦可更具有1個或多

數個雙鍵。

[0119]於本發明中，舉例來說「芳基」包含單環芳香族烴基及多環芳香族烴基。前述單環芳香族烴基可列舉如苯基等。前述多環芳香族烴基可列舉如1-萘基、2-萘基、1-蒽基、2-蒽基、9-蒽基、1-菲基、2-菲基、3-菲基、4-菲基及9-菲基等。較佳者可列舉如苯基、1-萘基及2-萘基等之萘基等。

[0120]於本發明中，舉例來說「雜芳基」包含單環芳香族雜環基及縮合芳香族雜環基。前述雜芳基可列舉如呋喃基(例如：2-呋喃基、3-呋喃基)、噻吩基(例如：2-噻吩基、3-噻吩基)、吡咯基(例如：1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基)、咪唑基(例如：1-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基)、吡唑基(例如：1-吡唑基、3-吡唑基、4-吡唑基)、三唑基(例如：1, 2, 4-三唑-1-基、1, 2, 4-三唑-3-基、1, 2, 4-三唑-4-基)、四唑基(例如：1-四唑基、2-四唑基、5-四唑基)、噁唑基(例如：2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基)、異噁唑基(例如：3-異噁唑基、4-異噁唑基、5-異噁唑基)、噻唑基(例如：2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基)、噻二唑基、異噻唑基(例如：3-異噻唑基、4-異噻唑基、5-異噻唑基)、吡啶基(例如：2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基)、嗒吡基(例如：3-嗒吡基、4-嗒吡基)、嘧啶基(例如：2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基)、呋咕基(例如：3-呋咕基)、吡吡基(例如：2-吡吡基)、噁二唑基(例如：1, 3, 4-噁二唑-2-基)、苯并呋喃基(例如：2-苯并[b]呋喃基、-苯并[b]呋喃基、4-苯并[b]呋喃基、5-苯并[b]呋喃基、6-苯并

[b]呋喃基、7-苯并[b]呋喃基)、苯并噻吩基(例如：2-苯并[b]噻吩基、3-苯并[b]噻吩基、4-苯并[b]噻吩基、5-苯并[b]噻吩基、6-苯并[b]噻吩基、7-苯并[b]噻吩基)、苯并咪唑基(例如：1-苯并咪唑基、2-苯并咪唑基、4-苯并咪唑基、5-苯并咪唑基)、二苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、喹噁啉基(例如：2-喹噁啉基、5-喹噁啉基、6-喹噁啉基)、吡啶基(例如：3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、7-吡啶基、8-吡啶基)、喹啉基(例如：2-喹啉基、4-喹啉基、5-喹啉基、6-喹啉基、7-喹啉基、8-喹啉基)、喹啉基(例如：2-喹啉基、3-喹啉基、4-喹啉基、5-喹啉基、6-喹啉基、7-喹啉基、8-喹啉基)、呋喃基(例如：1-呋喃基、5-呋喃基、6-呋喃基)、異喹啉基(例如：1-異喹啉基、3-異喹啉基、4-異喹啉基、5-異喹啉基、6-異喹啉基、7-異喹啉基、8-異喹啉基)、嘌呤基、嘧啶基(例如：2-嘧啶基、4-嘧啶基、6-嘧啶基、7-嘧啶基)、呋喃基、吡啶基、吡啶基(例如：1-吡啶基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、9-吡啶基)、吡啶基(例如：1-吡啶基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、7-吡啶基)、異吡啶基、吡啶基(例如：1-吡啶基、2-吡啶基)或吡啶基(例：1-吡啶基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基)等。

[0121]於本發明中，舉例來說，「環烷基」為環狀飽和烴基，碳數則例如3~15。前述環烷基可列舉如環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基、橋接環烴基及螺烴基等，且宜為環丙基、環丁基、環戊基、環己基及橋

接環烴基等。

[0122]於本發明中，「橋接環烴基」可列舉如雙環[2.1.0]戊基、雙環[2.2.1]庚基、雙環[2.2.2]辛基及雙環[3.2.1]辛基、三環[2.2.1.0]庚基、雙環[3.3.1]壬烷、1-金剛烷基、2-金剛烷基等。

[0123]於本發明中「螺烴基」可列舉如螺[3.4]辛基等。

[0124]於本發明中，舉例來說「環烯基」包含環狀不飽和脂肪族烴基，碳數則例如3~7個。前述基可列舉如環丙烯基、環丁烯基、環戊烯基、環己烯基及環庚烯基等，且宜為環丙烯基、環丁烯基、環戊烯基及環己烯基等。舉例來說，前述環烯基亦包含環中具有不飽和鍵之橋接環烴基及螺烴基。

[0125]於本發明中，「芳烷基」可列舉如苄基、2-苯乙基及萘甲基等，「環烷基烷基」或「環基烷基(cyclylalkyl)」可列舉如環己基甲基及金剛烷基甲基等，「烴烷基」則可列舉如羥甲基及2-羥乙基等。

[0126]於本發明中，「烷基氧基」包含前述烷基-O-基，可列舉如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基及正丁氧基等，「烷基氧基烷基」可列舉如甲氧基甲基等，「胺基烷基」則可列舉如2-胺基乙基等。

[0127]於本發明中，「雜環基(heterocyclyl)」可列舉如1-吡咯啉基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、1-吡咯啉基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、吡咯啉酮、1-咪唑啉基、2-咪唑啉基、4-咪唑啉基、1-咪唑啉基、2-咪唑啉基、4-咪唑啉基、咪唑

啉酮、1-吡啶啉基、3-吡啶啉基、4-吡啶啉基、1-吡啶啉基、3-吡啶啉基、4-吡啶啉基、哌啶酮、N-六氫吡啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-哌啶基、1-哌啶基、2-哌啶基、哌啶酮、2-咪啶基、3-咪啶基、N-咪啶基、四氫哌喃基及四氫呋喃基等。

[0128]於本發明中，「雜環基烷基」可列舉如哌啶基甲基、哌啶基甲基等，「雜環基烯基」可列舉如2-哌啶基乙烯基等，「雜芳基烷基」則可列舉如吡啶基甲基及喹啉-3-基甲基等。

[0129]於本發明中，「矽基」包含式 R_3Si- 所示之基，R可獨立選自前述烷基、芳基及環烷基，可列舉如三甲基矽基、第三丁基二甲基矽基等，「矽氧基」可列舉如三甲基矽氧基等，「矽氧基烷基」可列舉如三甲基矽氧基甲基等。

[0130]於本發明中，「伸烷基」可列舉如亞甲基、伸乙基及伸丙基等。

[0131]於本發明中，前述各種基亦可經取代。前述取代基可列舉如羥基、羧基、鹵素、鹵化烷基(例如： CF_3 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3)、硝基、亞硝基、氰基、烷基(例如：甲基、乙基、異丙基、第三丁基)、烯基(例如：乙烯基)、炔基(例如：乙炔基)、環烷基(例如：環丙基、金剛烷基)、環烷基烷基(例如：環己基甲基、金剛烷基甲基)、環烯基(例如：環丙烯基)、芳基(例如：苯基、萘基)、芳烷基(例如：苄基、苯乙基)、雜芳基(例如：吡啶基、呋喃基)、雜芳烷基(例如：吡啶基甲基)、雜環基(例如：哌啶基)、雜環基烷基(例如：

Morpholylmethyl)、烷氧基(例如：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基)、鹵化烷氧基(例如： OCF_3)、烯氧基(例如：乙烯氧基、烯丙氧基)、芳氧基(例如：苯氧基)、烷氧羰基(例如：甲氧羰基、乙氧羰基、第三丁氧羰基)、芳烷氧基(例：苄氧基)、胺基[烷基胺基(例如：甲基胺基、乙基胺基、二甲基胺基)、醯基胺基(例如：乙醯基胺基、苯甲醯基胺基)、芳烷基胺基(例如：苄基胺基、三苯甲基胺基)、羥基胺基]、烷基胺基烷基(例如：二甲基胺基甲基)、胺磺醯基、側氧基等。

[0132] 2. 核苷酸殘基

舉例來說，前述核苷酸殘基含有糖、鹼基及磷酸作為構成要素。前述核苷酸殘基係如前述，可列舉如核糖核苷酸殘基及去氧核糖核苷酸殘基。舉例而言，前述核糖核苷酸殘基具有核糖殘基作為糖，且具有腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)及U(尿嘧啶)作為鹼基；前述去氧核糖殘基則例如具有去氧核糖殘基作為糖，且具有腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)及胸腺嘧啶(T)作為鹼基。

[0133] 前述核苷酸殘基可列舉未修飾核苷酸殘基及修飾核苷酸殘基。舉例來說，前述未修飾核苷酸殘基之前述各構成要素可與天然存在物相同或實質相同，且宜與天然存在於人體內者相同或實質相同。

[0134] 舉例來說，前述修飾核苷酸殘基係將前述未修飾核苷酸殘基予以修飾而成之核苷酸殘基。又舉例來說，前述修飾核苷酸殘基之前述未修飾核苷酸殘基的構成要素中

之任一者亦可經修飾。於本發明中，舉例來說，「修飾」即是前述構成要素之取代、附加及/或缺損、前述構成要素中之原子及/或官能基之取代、附加及/或缺損，亦可稱為「改變」。前述修飾核苷酸殘基可列舉如天然存在之核苷酸殘基、經人工修飾之核苷酸殘基等。前述源自天然之修飾核苷酸殘基可參照如林巴赫氏等人(Limbach et al., 1994, Summary : the modified nucleosides of RNA, Nucleic Acids Res.22 : 2183~2196)。此外，前述修飾核苷酸殘基舉例來說亦可為前述核苷酸替代物之殘基。

[0135]前述核苷酸殘基之修飾可列舉如核糖-磷酸骨架(以下稱核糖磷酸骨架)之修飾。

[0136]前述核糖磷酸骨架中，例如可將核糖殘基進行修飾。舉例來說，前述核糖殘基可修飾2'位之碳，具體來說例如可將與2'位之碳鍵結之羥基取代成氫或氟等。藉由將前述2'位碳之羥基取代成氫，可將核糖殘基取代成去氧核糖。舉例來說，前述核糖殘基可取代成立體異構物，例如，亦可取代成阿拉伯糖殘基。

[0137]前述核糖磷酸骨架舉例來說亦可取代成具有非核糖殘基及/或非磷酸之非核糖磷酸骨架。前述非核糖磷酸骨架可列舉如前述核糖磷酸骨架之非帶電體。經取代為前述非核糖磷酸骨架之前述核苷酸替代物可列舉如N-嗎啉基(morpholino)、環丁基、吡啶等。前述替代物除前述者外還可列舉如人工核酸單體殘基。作為具體例，可列舉如PNA(肽核酸)、LNA(鎖固核酸：Locked Nucleic Acid)、

ENA(2'-O, 4'-C-伸乙基橋接核酸：2'-O, 4'-C-Ethylene bridged Nucleic Acid)等，且宜為PNA。

[0138]於前述核糖磷酸骨架中，舉例來說，可將磷酸基予以修飾。於前述核糖磷酸骨架中，最接近糖殘基之磷酸基被稱為 α 磷酸基。前述 α 磷酸基帶負電，其電荷跨非與糖殘基結合之2個氧原子而均勻分佈。前述 α 磷酸基之4個氧原子中，在核苷酸殘基間之磷酸二酯鍵結中非與糖殘基鍵結之2個氧原子以下亦稱作「非結合(non-linking)氧」。另一方面，在前述核苷酸殘基間之磷酸二酯鍵結中，與糖殘基鍵結之2個氧原子則以下稱為「結合(linking)氧」。舉例來說，前述 α 磷酸基宜進行成為非帶電之修飾，或是使前述非結合氧中之電荷分佈成為非對稱型之修飾。

[0139]舉例而言，前述磷酸基亦可取代前述非結合氧。例如，前述之氧可藉由S(硫)、Se(砷)、B(硼)、C(碳)、H(氫)、N(氮)及OR(R例如為烷基或芳基)中之任一原子作取代，且宜以S來取代。舉例來說，前述非結合氧宜兩者均被取代，且更宜兩者均被S取代。前述修飾磷酸基可列舉如硫代磷酸酯(phosphorothioate)、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)、磷砷酸酯(phosphoroselenate)、硼烷磷酸鹽(boranophosphate)、硼烷磷酸酯(boranophosphate ester)、氫磷酸酯、磷醯胺酯(phosphoroamidate)、烷基或芳基磷酸酯、以及磷酸三酯(phosphotriester)等，其中尤以前述2個非結合氧均以S取代之二硫代磷酸酯為佳。

[0140]舉例來說，前述磷酸基亦可取代前述結合氧。例

如，前述氧可藉S(硫)、C(碳)及N(氮)中之任一原子作取代。前述修飾磷酸基可列舉如經N取代之交聯磷酸胺酯、經S取代之交聯硫代磷酸酯及經C取代之交聯亞甲基磷酸酯等。舉例來說，前述結合氧之取代宜在本發明之ssPN分子之5'末端核苷酸殘基及3'末端核苷酸殘基中之至少一者中進行，且在5'端側時宜以C作取代，在3'端側時則宜以N作取代。

[0141]舉例來說，前述磷酸基亦可取代成前述非含磷之連接子(linker)。前述連接子包含如矽氧烷、碳酸酯、羧甲基、胺甲酸酯(carbamate)、醯胺、硫醚、環氧乙烷連接子、磺酸酯(sulfonate)、磺醯胺、硫代甲縮醛(thioformacetal)、甲縮醛、肟、亞甲基醯亞胺基、亞甲基甲基醯亞胺基、亞甲基伸脒基、亞甲基二甲基伸脒基及亞甲基氧基甲基醯亞胺基等，且宜包含亞甲基羰胺基及亞甲基甲基醯亞胺基。

[0142]舉例來說，本發明之ssPN分子之3'末端及5'末端中之至少一者的核苷酸殘基亦可受到修飾。例如，前述修飾可在3'末端及5'末端中之任一者，亦可在兩者。舉例來說，前述修飾係如前所述，且宜對末端之磷酸基進行。舉例來說，前述磷酸基可將全體作修飾，亦可將前述磷酸基中之1個以上原子作修飾。在前者之情況下，例如，可為磷酸基全體之取代，亦可為缺損。

[0143]前述末端核苷酸殘基之修飾可列舉如附加其他分子。前述其他分子可列舉如前述之標記物質及保護基等之機能性分子。前述保護基可列舉如S(硫)、Si(矽)、B(硼)、含酯之基團等。前述標記物質等之機能性分子，舉例來說

可利用於本發明ssPN分子之檢測等。

[0144]舉例來說，前述其他分子可附加至前述核苷酸殘基之磷酸基，亦可透過間隔子(spacer)而附加至前述磷酸基或前述糖殘基。舉例來說，前述間隔子之末端原子可對前述磷酸基之前述結合氧或者糖殘基之O、N、S或C作附加或取代。前述糖殘基之結合部位例如宜為3'位之C或5'位之C，或者是與其等結合之原子。例如前述間隔子可對前述PNA等之核苷酸替代物之末端原子作附加或取代。

[0145]前述間隔子並未特別受限，舉例來說可包含 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ 、無鹼基糖、醯胺、羧基、胺、氧基胺、氧基亞胺、硫醚、二硫化物、硫脲、磺醯胺及N-咪啉基等，以及生物素試劑及螢光黃試劑等。於前述式中，n宜為正整數，且宜n=3或6。

[0146]附加於前述末端之分子除了此等之外，尚可例示如色素、插入(Intercalate)劑(例如吡啶)、交聯劑(例如補骨脂素(psoralen)、絲裂黴素C)、紫質(TPPC4、Texaphyrin、Sapphyrin)、多環式芳香族烴(例如啡咾、二氫啡咾)、人工內核酸酶(例如EDTA)、親油性載體(例如膽固醇、膽酸、金剛烷乙酸、1-萘酚酸、二氫鞣固酮、1, 3-雙-O(十六烷基)甘油、香葉基氧基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1, 3-丙二醇、十七烷基、棕櫚酸、肉豆蔻酸、O3-(油醯基)石膽酸、O3-(油醯基)膽酸、二甲氧基三苯甲基或啡咾)及肽複合物(例如Antennapedia peptide、Tat肽)、烷基化劑、

磷酸、胺基、巯基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚胺基、烷基、經取代烷基、放射線標識標記、酵素、半抗原(例如生物素)、輸送/吸收促進劑(例如阿斯匹靈、維生素E、葉酸)、合成核糖核酸酶(例如咪唑、雙咪唑、組織胺、咪唑簇(imidazole cluster)、吡啶-咪唑複合物、四氮巨環(tetraza micro ring)之Eu³⁺複合物)等。

[0147]舉例來說，本發明之ssPN分子的前述5'末端亦可經磷酸基或磷酸基類似物修飾。前述磷酸基可列舉如5'單磷酸((HO)₂(O)P-O-5')、5'二磷酸((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'三磷酸((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'-鳥苷帽(7-甲基化或非甲基化7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'-腺苷帽(Appp)、任意修飾或非修飾核苷酸帽結構(N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5')、5'單硫代磷酸(硫代磷酸酯：(HO)₂(S)P-O-5')、5'單二硫代磷酸(二硫代磷酸酯：(HO)(HS)(S)P-O-5')、5'-磷硫醇酸((HO)₂(O)P-S-5')、經硫取代之單磷酸、二磷酸及三磷酸(例如5'-α-硫代三磷酸、5'-γ-硫代三磷酸等)、5'-磷醯胺酯((HO)₂(O)P-NH-5'、(HO)(NH₂)(O)P-O-5')、5'-烷基磷酸(例如RP(OH)(O)-O-5'、(OH)₂(O)P-5'-CH₂；R為烷基(例如甲基、乙基、異丙基、丙基等))、5'-烷基醚磷酸(例如RP(OH)(O)-O-5'；R為烷基醚(例如甲氧基甲基、乙氧基甲基等))等。

[0148]於前述核苷酸殘基中，前述鹼基並未特別受限。

舉例來說，前述鹼基可為天然鹼基，亦可為非天然鹼基。
 舉例來說，前述鹼基可源自天然，亦可為合成品。舉例來說，前述鹼基可使用一般之鹼基，亦可使用其修飾類似物等。

[0149]前述鹼基可列舉如腺嘌呤及鳥嘌呤等之嘌呤鹼基、胞嘧啶、尿嘧啶及胸腺嘧啶等之嘧啶鹼基。前述鹼基除此之外還可列舉如肉甘、胸腺嘧啶、黃嘌呤、次黃嘌呤、nubularine、isoguanisine、殺結核菌素(tubercidine)等。前述鹼基可列舉如2-胺基腺嘌呤、6-甲基化嘌呤等之烷基衍生物；2-丙基化嘌呤等之烷基衍生物；5-鹵基尿嘧啶及5-鹵基胞嘧啶；5-丙炔基尿嘧啶及5-丙炔基胞嘧啶；6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶及6-偶氮胸腺嘧啶；5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、5-鹵基尿嘧啶、5-(2-胺基丙基)尿嘧啶、5-胺基烯丙基尿嘧啶；8-鹵基化、胺基化、硫醇化、硫烷基化、羥基化及其他之8-取代嘌呤；5-三氟甲基化及其他之5-取代嘧啶；7-甲基鳥嘌呤；5-取代嘧啶；6-氮雜嘧啶；N-2、N-6及O-6取代嘌呤(含2-胺基丙基腺嘌呤)；5-丙炔基尿嘧啶及5-丙炔基胞嘧啶；二氫尿嘧啶；3-去氮-5-氮雜胞嘧啶(3-deaza-5-azacytosine)；2-胺基嘌呤；5-烷基尿嘧啶；7-烷基鳥嘌呤；5-烷基胞嘧啶；7-去氮腺嘌呤；N6, N6-二甲基腺嘌呤；2, 6-二胺基嘌呤；5-胺基-烯丙基-尿嘧啶；N3-甲基尿嘧啶；取代1, 2, 4-三唑；2-吡啶酮；5-硝基吡咯；3-硝基吡咯；5-甲氧基尿嘧啶；尿嘧啶-5-氧乙酸；5-甲氧羰基甲基尿嘧啶；5-甲基-2-硫代尿嘧啶；5-甲氧羰基甲基-2-

硫代尿嘧啶；5-甲基氨基-2-硫代尿嘧啶；3-(3-氨基-3-羧丙基)尿嘧啶；3-甲基胞嘧啶；5-甲基胞嘧啶；N4-乙醯基胞嘧啶；2-硫代胞嘧啶；N6-甲基腺嘌呤；N6-異戊基腺嘌呤；2-甲基硫代-N6-異戊烯基腺嘌呤；N-甲基鳥嘌呤；O-烷基化鹼基等。此外，舉例來說，嘌呤及嘧啶包含：美國專利第3,687,808號「Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering」，第858~859頁，克羅修比茲．J. I.氏(Kroschwitz J.I.)編，John Wiley & Sons，1990；及，英格利修氏等人(Englisch等)，Angewandte Chemie, International Edition，1991，第30卷，p.613所揭示之物。

[0150]前述修飾核苷酸殘基除了此等之外，舉例來說，亦可包含缺損鹼基之殘基，即無鹼基之核糖磷酸骨架。又，舉例來說，前述修飾核苷酸殘基可使用如美國暫時申請案第60/465,665號(申請日：2003年4月25日)及國際申請案第PCT/US04/07070號(申請日：2004年3月8日)所記載之殘基，本發明可援用此等文獻。

[0151]3.本發明之ssPN分子合成方法

本發明之ssPN分子合成方法並未特別受限，可採用習用公知之方法。前述合成方法可列舉如利用基因工學手法之合成法及化學合成法等。基因工學手法可列舉如活體外轉錄合成法、使用載體之方法、利用PCR卡匣之方法等。前述載體並未特別受限，可列舉如質體等之非病毒載體以及病毒載體等。前述化學合成法並未特別受限，可列舉如亞磷醯胺法(phosphoramidites method)及H-磷酸鹽法

(H-phosphonate method)。舉例來說，前述化學合成法可使用市售之自動核酸合成機。前述化學合成法一般使用亞醯胺(amidite)。前述亞醯胺並未特別受限，市售之亞醯胺可列舉如RNA Phosphoramidites(2'-O-TBDMSi，商品名，三千里製藥)、ACE亞醯胺及TOM亞醯胺、CEE亞醯胺、CEM亞醯胺、TEM亞醯胺等。就本發明之ssPN分子而言，舉例來說，在合成前述式(I)所示連結區域時，宜使用後述之本發明單體。

[0152] 4. 組成物

如前述，本發明之抑制表現用組成物係一種用以抑制目標基因表現之組成物，特徵在於含有前述本發明之ssPN分子。本發明之組成物係以含有前述本發明之ssPN分子為特徵，至於其他構成則不受任何限制。舉例來說，本發明之抑制表現用組成物亦可稱為抑制表現用試劑。

[0153] 若依本發明，舉例來說，可藉由投藥予存有前述目標基因之對象，來進行前述目標基因之表現抑制。

[0154] 此外，本發明之藥學組成物係如前述，其特徵在於含有前述本發明之ssPN分子。本發明之組成物係以含有前述本發明之ssPN分子為特徵，至於其他構成則不受任何限制。例如，本發明之藥學組成物亦可稱為醫藥品。例如，本發明之藥學組成物亦可稱為醫藥品。

[0155] 若依本發明，舉例來說，可藉由投藥予基因為疾病成因之患者而抑制前述基因之表現，進而治療前述疾病。於本發明中，舉例來說，「治療」如前述般包含前述疾病之

預防、疾病之改善及預後之改善等意義，且可為其中任一者。

[0156]於本發明中，治療對象之疾病並未特別受限，可列舉如基因表現為成因之疾病。僅需因應前述疾病之種類，將該疾病成因之基因設定為前述目標基因，再因應前述目標基因來適當設定前述抑制表現序列即可。

[0157]作為具體例，若將前述目標基因設為前述TGF- β 1基因，並將針對前述基因之抑制表現序列配置於前述ssPN分子，則可使用於例如炎症性疾病(具體來說則是急性肺傷害)等的治療上。

[0158]本發明之抑制表現用組成物及藥學組成物(以下稱為組成物)的使用方法並未特別受限，舉例來說，僅需將前述ssPN分子投予具有前述目標基因之投予對象即可。

[0159]前述投予對象可列舉如細胞、組織或器官。前述投予對象可列舉如人類、人類除外之非人哺乳類等之非人動物。舉例來說，前述投予可為活體內(in vivo)亦可為活體外(in vitro)。前述細胞並未特別受限，可列舉如HeLa細胞、293細胞、NIH3T3細胞、COS細胞等之各種培養細胞、ES細胞、造血幹細胞等之幹細胞及初代培養細胞等從活體分離出之細胞等。

[0160]前述投予方法並未特別受限，舉例來說，可因應投予對象來適當決定。前述投予對象為培養細胞時，舉例來說，可列舉如使用轉染試劑之方法及電穿孔法(electroporation method)等。前述投予在活體內之情況下，

舉例來說，可實施經口投予或非經口投予。前述非經口投予可列舉如注射、皮下投予、局部投予等。

[0161]舉例來說，本發明之組成物可僅含本發明之ssPN分子，亦可更含有其他添加物。前述添加物並未特別受限，舉例來說，宜為藥學上可接受之添加物。前述添加物之種類並未特別受限，舉例來說可因應投予對象之種類來適當選擇。

[0162]於本發明之組成物中，舉例來說，前述ssPN分子亦可與前述添加物形成錯合物。前述添加物舉例來說亦可稱為錯化劑。藉由形成前述錯合物，舉例來說，可有效率地輸送前述ssPN分子。前述ssPN分子與前述錯化劑之結合並未特別受限，可列舉如非共價結合。前述錯合物可列舉如內含錯合物(inclusion complexation)。

[0163]前述錯化劑並未特別受限，可列舉如聚合物、環糊精及金剛烷胺等。前述環糊精可列舉如線狀環糊精共聚物、線狀氧化環糊精共聚物等。

[0164]除此之外，前述添加劑可列舉如載子(carrier)、對目標細胞之結合物質、縮合劑及融合劑等。

[0165]舉例來說，前述載子宜為高分子，更宜為生源高分子。舉例來說，前述載子宜具生分解性。前述載子可列舉如：人類血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、球蛋白等之蛋白質；聚葡萄糖、聚三葡萄糖(pullulan)、幾丁質、幾丁聚糖、菊糖、環糊精、玻尿酸等之糖質；脂質等。前述載子舉例來說亦可使用合成聚胺基酸等之合成聚合物。

前述聚胺基酸可列舉如聚離胺酸(PLL)、聚L-天門冬醯胺酸、聚L-麩醯胺酸、苯乙烯-順丁烯二酸酐共聚物、聚(L-乳酸交酯-共-乙交酯)共聚物、二乙烯醚-順丁烯二酸酐共聚物、N-(2-羥丙基)甲基丙烯醯胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚胺甲酸酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-異丙基丙烯醯胺聚合物或聚磷腓(polyphosphazine)等。

[0166] 前述結合物質可列舉如促甲狀腺激素、促黑細胞素、凝集素、醣蛋白、表面張力素蛋白A(surfactant protein A)、黏蛋白糖質、多價乳糖、多價半乳糖、N-乙醯半乳糖胺、N-乙醯葡萄糖胺、多價甘露糖、多價海藻糖、醣化聚胺基酸、多價半乳糖、運鐵蛋白、雙膦酸鹽(酯)類(Bisphosphonate)、聚麩醯胺酸、聚天門冬醯胺酸、脂質、膽固醇、類固醇、膽汁酸、葉酸鹽、維生素B12、生物素、納普洛仙(Neproxin)、RGD肽、RDG肽擬似物等。

[0167] 前述融合劑及縮合劑可列舉如聚乙亞胺(PEI)等之聚胺基酸鏈等。舉例來說，PEI為直鏈狀及分枝狀中之任一者皆可，且可為合成物及天然物中之任一者。舉例來說，前述PEI可經烷基取代，亦可經脂質取代。再者，除此之外，前述融合劑可使用聚組胺酸、聚咪唑、聚吡啶、聚丙亞胺、蜂毒肽(melittin)及聚乙縮醛物質(例如陽離子性聚乙縮醛等)等。舉例而言，前述融合劑亦可具有 α 螺旋結構。前述融合劑舉例來說亦可為蜂毒肽等之膜崩解劑。

[0168] 舉例而言，本發明之組成物就前述錯合物之形成等可援用美國專利第6,509,323號、美國專利公報第

2003/0008818號及PCT/US04/07070號等。

[0169]除此之外，前述添加劑可列舉如兩親媒性分子。舉例而言，前述兩親媒性分子為具有疎水性區域及親水性區域之分子。前述分子舉例來說宜為聚合物。舉例而言，前述聚合物為具有二級結構之聚合物，且宜為具有反復性二級結構之聚合物。作為具體例，聚例來說宜為多肽，更宜為 α 螺旋狀多肽等。

[0170]前述兩親媒性聚合物舉例來說亦可為具有2個以上兩親媒性次單元之聚合物。前述次單元(subunit)可列舉如具有環狀結構之次單元，且該環狀結構具有至少1個親水性基及1個疎水性基。前述次單元舉例來說亦可具有膽酸等之類固醇、芳香族結構等。舉例來說，前述聚合物亦可具有芳香族次單元等之環狀結構次單元與胺基酸兩者。

[0171] 5.抑制表現方法

如前述，本發明之抑制表現方法係一種抑制目標基因表現之方法，特徵在於使用前述本發明之ssPN分子。本發明之抑制表現方法係以使用前述本發明之ssPN分子作為特徵，其他步驟及條件則不受任何限制。

[0172]本發明之抑制表現方法中，抑制前述基因表現之機制並未特別受限，可列舉如RNA干擾或類RNA干擾現象所引起之抑制表現。於此，舉例來說，本發明之抑制表現方法係一誘導可抑制前述目標基因表現之RNA干擾的方法，亦可說是以使用前述本發明之ssPN分子為特徵之表現誘導方法。

[0173]本發明之抑制表現方法舉例來說包含一對存有前述目標基因之對象投予前述ssPN分子的步驟。透過前述投予步驟，舉例來說，使前述ssPN分子接觸前述投予對象。前述投予對象可列舉如細胞、組織或器官。前述投予對象可列舉如人類、人類以外之非人哺乳類等之非人動物。前述投予舉例來說可在活體內(in vivo)亦可在活體外(in vitro)。

[0174]舉例而言，本發明之抑制表現方法可單獨投予前述ssPN分子，亦可投予含有前述ssPN分子之前述本發明組成物。前述投予方法並未特別受限，舉例來說可因應投予對象之種類來適當選擇。

[0175]6.治療方法

本發明之疾病治療方法係如前述，包含一將前述本發明之ssPN分子投予患者之步驟，且特徵在於：前述ssPN分子具有一可抑制前述疾病成因之基因表現的序列作為前述抑制表現序列。本發明之治療方法係以使用前述本發明之ssPN分子作為特徵，其他步驟及條件則不受任何限制。本發明之治療方法舉例來說可援用前述本發明之抑制表現方法。

[0176]7.ssPN分子之用途

本發明之用途係一種用以抑制前述目標基因之表現的前述本發明ssPN分子的用途。此外，本發明之用途係一種用以誘導RNA干擾之前述本發明ssPN分子的用途。

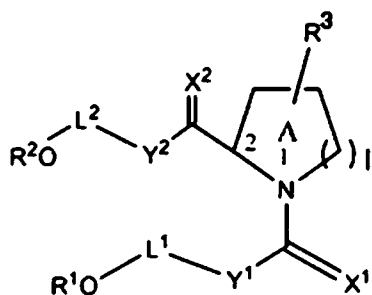
[0177]本發明之核酸分子係一種用於治療疾病之核酸

分子，前述核酸分子為前述本發明之ssPN分子，且前述ssPN分子之特徵在於：具有可抑制前述疾病成因之基因表現的序列作為前述表現抑制序列。

[0178] 8. 單體

本發明之單體係核酸合成用之單體，其特徵在於具有下述式(II)之結構。本發明之單體只要未特別表示，即可援用前述本發明之ssPN分子之說明。

[化4]



... (11)

[0179] 舉例來說，本發明之單體於前述本發明之ssPN分子的合成過程中，可容易地合成前述式(I)所示之連結區域(Lx)及連結區域(Ly)。舉例來說，本發明之單體可作為核酸自動合成用之亞醯胺來使用，例如，可應用於一般之核酸自動合成裝置。前述合成方法可列舉如亞磷醯胺法及H-磷酸酯法等。

[0180] 於前述式中，

X¹及X²各自獨立為H₂、O、S或NH；

Y¹及Y²各自獨立為單鍵、CH₂、NH、O或S；

R¹及R²各自獨立為H、保護基或磷酸保護基；

R^3 係與環A上之C-3、C-4、C-5或C-6鍵結之氫原子或取代基；

L^1 係由n個原子所構成之伸烷基鏈，於此，伸烷基碳原子上之氫原子可經OH、 OR^a 、 NH_2 、 NHR^a 、 NR^aR^b 、SH或 SR^a 取代或是未經取代；或者

L^1 係前述伸烷基鏈之1個以上碳原子經氧原子取代而成之聚醚鏈；

但， Y^1 為NH、O或S時，與 Y^1 鍵結之 L^1 的原子為碳，與 OR^1 鍵結之 L^1 的原子為碳，且氧原子彼此不鄰接；

L^2 係由m個原子所構成之伸烷基鏈，於此，伸烷基碳原子上之氫原子可經OH、 OR^c 、 NH_2 、 NHR^c 、 NR^cR^d 、SH或 SR^c 取代，亦可未經取代；或者

L^2 係前述伸烷基鏈之1個以上碳原子經氧原子取代而成之聚醚鏈；

但， Y^2 為NH、O或S時，與 Y^2 鍵結之 L^2 的原子為碳，與 OR^2 結合之 L^2 的原子為碳，且氧原子彼此不鄰接；

R^a 、 R^b 、 R^c 及 R^d 各自獨立為取代基或保護基；

l為1或2；

m為0~30範圍內之整數；

n為0~30範圍內之整數；

於環A中，前述環A上之C-2以外的1個碳原子亦可經氮、氧或硫取代；

且前述環A內亦可包含碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵。

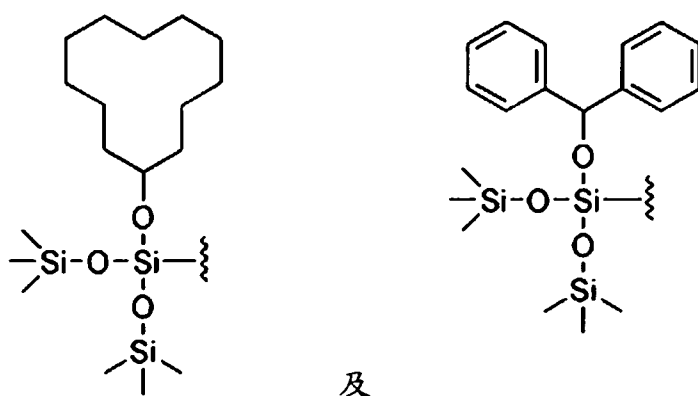
[0181]於前述式(II)中，與前述式(I)相同處可援用前述

式(I)之說明。具體來說，於前述式(II)中，例如 X^1 、 X^2 、 Y^1 、 Y^2 、 R^3 、 L^1 、 L^2 、 l 、 m 、 n 及環A可全部援用前述式(I)之說明。

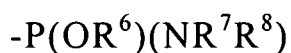
[0182]於前述式(II)中， R^1 及 R^2 係如前述，各自獨立為H、保護基或磷酸保護基。

[0183]舉例來說，前述保護基與前述式(I)之說明相同，作為具體例，則可從群I選出。前述群I可列舉如二甲氧基三苯甲基(DMTr)、TBDMS基、ACE基、TOM基、CEE基、CEM基、TEM基及下式所示之含矽基之基團，其中，以DMTr基及前述含矽基之基團中之任一者為佳。

[化5]



[0184]舉例來說，前述磷酸保護基可以下式表示。



於前述式中， R^6 為氫原子或任意之取代基。舉例來說，取代基 R^6 宜為烴基，且前述烴基可經電子吸引基取代，亦可未經取代。取代基 R^6 可列舉如鹵素、鹵烷基、雜芳基、羧烷基、烷氧基烷基、胺基烷基、矽基、矽氧基烷基、雜環基烯基、雜環基烷基、雜芳基烷基以及烷基、烯基、炔

基、芳基、芳烷基、環烷基、環烯基、環烷基烷基及環基烷基等之烴等，可更經電子吸引基取代，亦可未經取代。具體而言，取代基 R^6 可列舉如 β -氰基乙基、硝基苯基乙基及甲基等。

[0185] R^7 及 R^8 各自為氫原子或任意之取代基，且可相同亦可相異。舉例來說，取代基 R^7 及 R^8 宜為烴基，且前述烴基可更經任意之取代基取代，亦可未經取代。舉例來說，前述烴基與前述 R^6 之列舉者相同，且宜為甲基、乙基及異丙基。此時，具體來說， $-NR^7R^8$ 可列舉如二異丙基胺基、二乙基胺基及乙基甲基胺基等。或者，取代基 R^7 與 R^8 亦可成為一體，而與其等所鍵結之氮原子共同(即， $-NR^7R^8$ 成為一體)形成含氮之環(例如哌啶基、N-咪啉基等)。

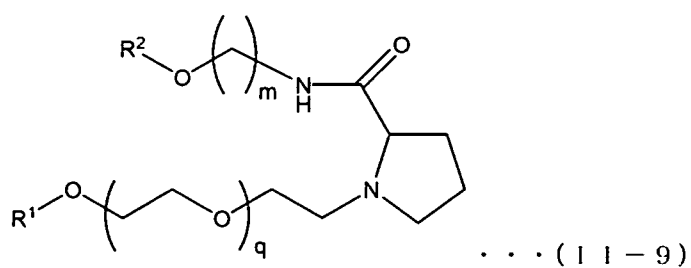
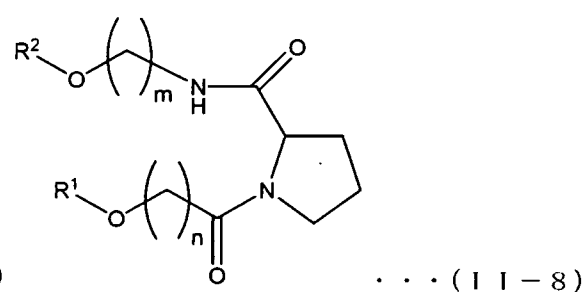
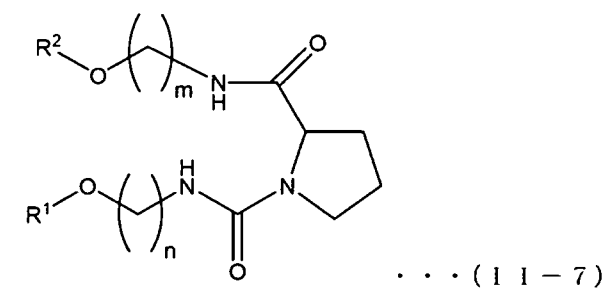
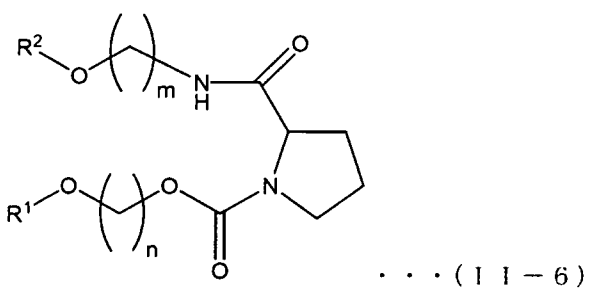
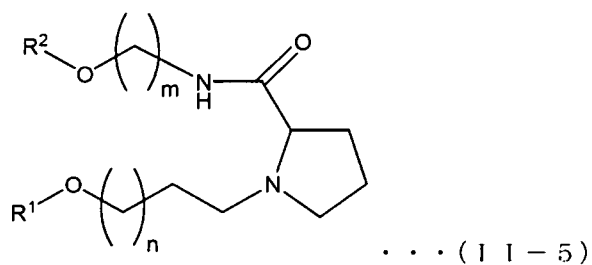
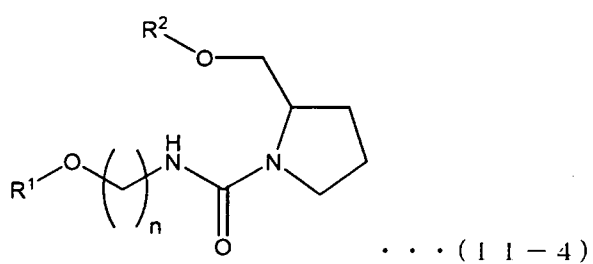
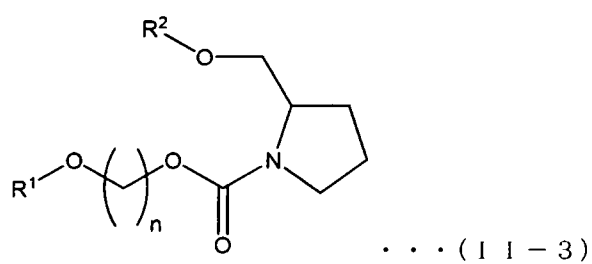
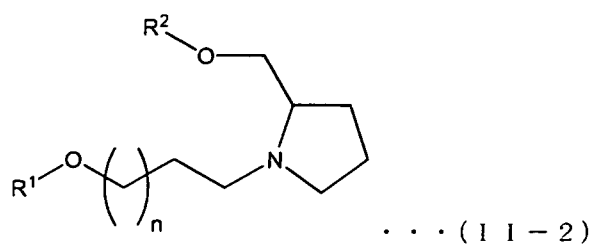
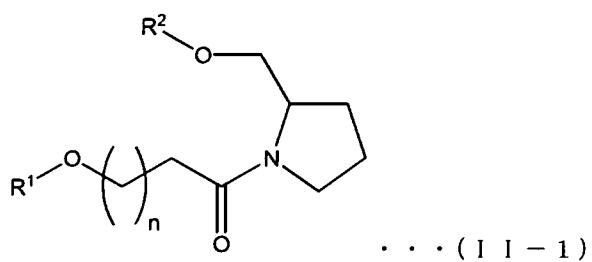
[0186] 舉例來說，前述磷酸保護基之具體例可選自下述群 II。群 II 可列舉如 $-P(OCH_2CH_2CN)(N(i-Pr)_2)$ 及 $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$ 等。於前述式中，i-Pr 表示異丙基。

[0187] 於前述式(II)中，舉例來說， R^1 及 R^2 中之任一者為H或保護基，另一者為H或磷酸保護基。以下述者為宜：例如， R^1 為前述保護基時， R^2 宜為H或前述磷酸保護基；具體來說， R^1 選自前述群I時， R^2 宜為H或選自前述群II。此外，以下述者為宜：例如， R^1 為前述磷酸保護基時， R^2 宜為H或前述保護基；具體來說， R^1 選自前述群II時， R^2 宜為H或選自前述群I。

[0188] 舉例來說，前述式(II)之結構可例示如下述式(II-1)~式(II-9)，於下述式中，n及m與前述式(II)相同。又，

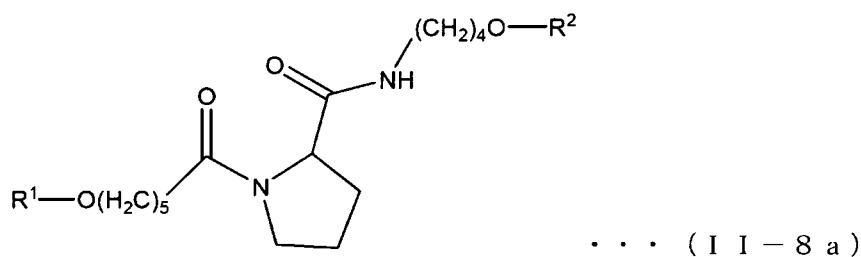
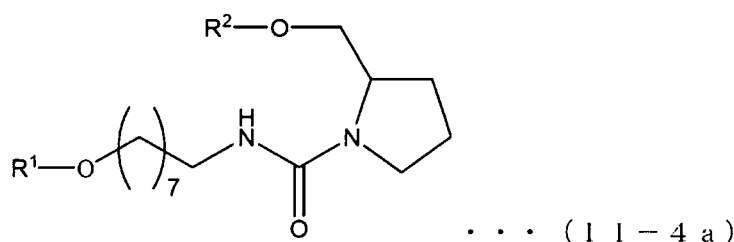
於下述式中，q爲0~10之整數。

[化6]



[0189]於前述式(II-1)~(II-9)中， n 、 m 及 q 並未特別受限而如前所述。具體例可列舉如下：前述式(II-1)中， $n=8$ ；前述(II-2)中， $n=3$ ；前述式(II-3)中， $n=4$ 或 8 ；前述(II-4)中， $n=7$ 或 8 ；前述式(II-5)中， $n=3$ 及 $m=4$ ；前述(II-6)中， $n=8$ 及 $m=4$ ；前述式(II-7)中， $n=8$ 及 $m=4$ ；前述(II-8)中， $n=5$ 及 $m=4$ ；以及，前述式(II-9)中， $q=1$ 及 $m=4$ 。茲將前述式(II-4)之一例($n=8$)顯示於下述式(II-4a)，並將前述式(II-8)之一例($n=5$ 、 $m=4$)顯示於下述式(II-8a)。

[化7]

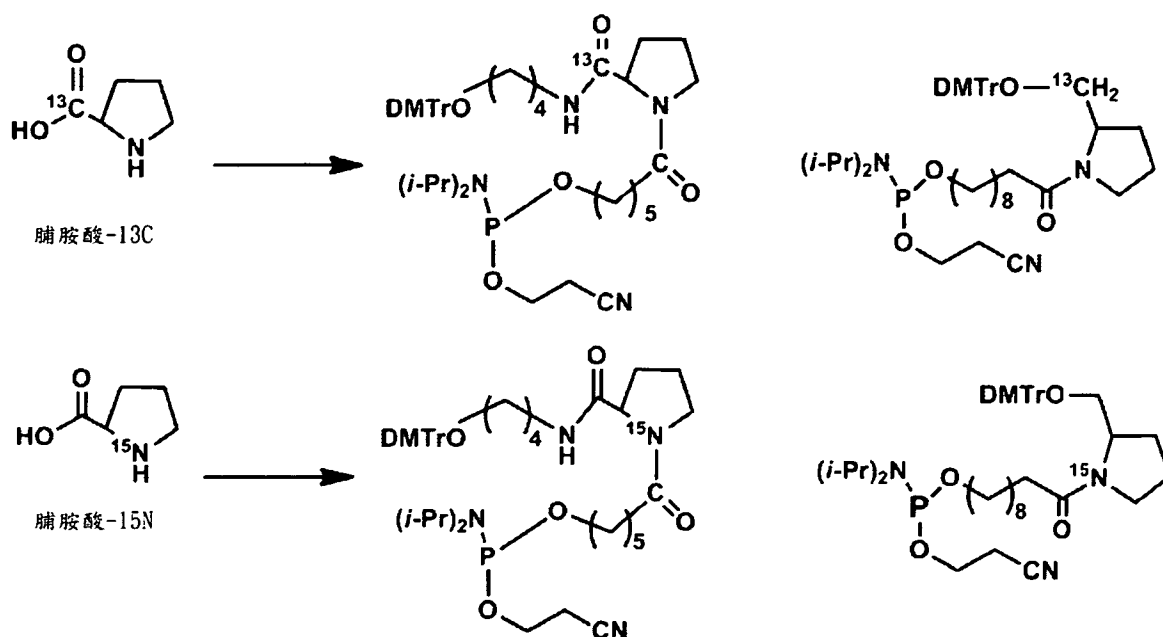


[0190]舉例來說，本發明之單體宜含有前述標記物質，其中，以含有前述穩定同位素為宜。前述標記物質係如前所述。

[0191]本發明之單體含有前述穩定同位素等之同位素時，舉例來說，可簡便地將前述同位素導入前述本發明之ssPN分子。舉例來說，具有同位素之前述單體可從已導入前述同位素之吡咯啉骨架的原料及哌啶骨架的原料合成出。前述吡咯啉骨架之原料可列舉如脯胺酸及脯胺醇等。

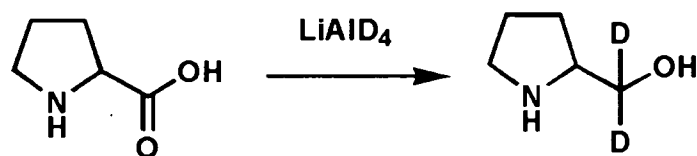
[0192]以下所例示之流程係以已導入穩定同位素之脯胺酸及脯胺醇為原料，而將導入有穩定同位素之本發明單體予以同質化者。以下流程為例示，本發明並不侷限於此。

[0193][化8]



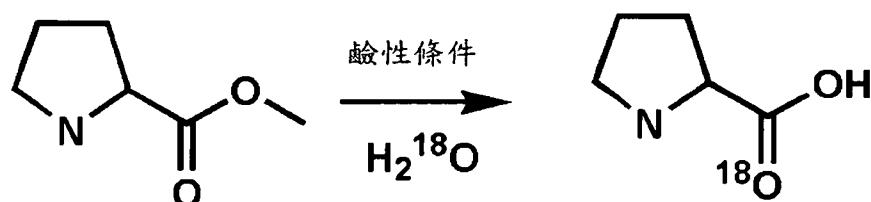
[0194]舉例來說，導入有穩定同位素之脯胺醇(例如已導入氘(D)之脯胺醇)可如下式所示般，以LiAlD₄處理脯胺酸而調製出。

[化9]



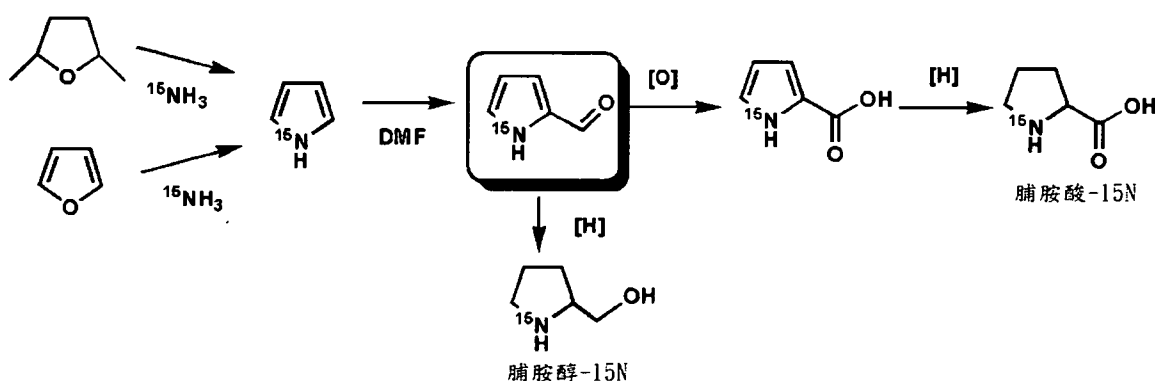
[0195]舉例來說，導入有穩定同位素之脯胺酸(例如已導入重氧(¹⁸O)之脯胺酸)可如下式所示般，於鹼性條件下使脯胺酸甲酯與H₂¹⁸O反應而調製出。

[化10]



[0196]舉例來說，可藉以下流程來合成導入有重氮(^{15}N)之脯胺酸(脯胺酸- ^{15}N)及導入有重氮(^{15}N)之脯胺醇(脯胺醇- ^{15}N)。亦即，先使呋喃或四氫呋喃與 $^{15}\text{NH}_3$ 反應，調製出導入有重氮(^{15}N)之吡咯，使其甲醯化而製得導入有重氮(^{15}N)之2-甲醯基吡咯。可使其氧化成羧酸並使吡咯部位還原，而合成出脯胺酸- ^{15}N 。此外，可藉由令導入有前述重氮(^{15}N)之2-甲醯基吡咯還原，而合成出脯胺醇- ^{15}N 。

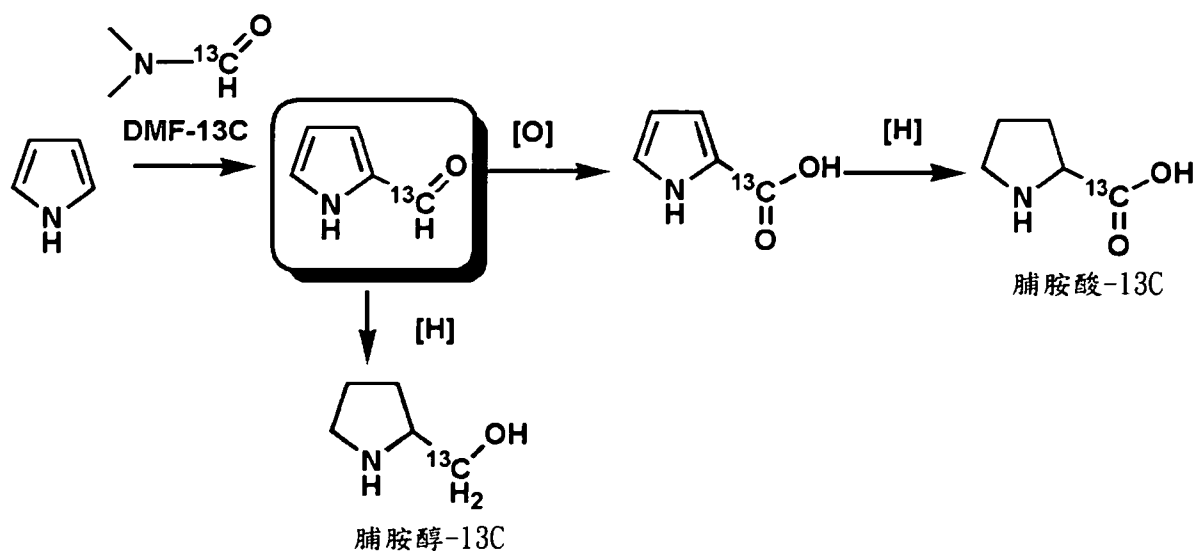
[化11]



[0197]舉例來說，可藉下述流程來合成前述導入有重碳(^{13}C)之脯胺酸(脯胺酸- ^{13}C)及前述導入有重碳(^{13}C)之脯胺醇(脯胺醇- ^{13}C)。亦即，首先以前述導入有重碳(^{13}C)之DMF(DMF- ^{13}C)使吡咯甲醯化，製得導入有重碳(^{13}C)之2-甲醯基吡咯。將其氧化成羧酸，並使吡咯部位還原，藉此可合成出脯胺酸- ^{13}C 。此外，使前述導入有重碳(^{13}C)之2-

甲醯基吡咯還原，可藉此合成出脯胺醇-13C。

[化12]



[0198]可如此這般地合成導入有穩定同位素之單體，此外，可將前述單體作為合成用亞醯胺來使用，藉此可合成出穩定同位素已導入至前述連結區域之核酸分子。

[0199]以下藉由實施例等來詳細說明本發明，但本發明不受其等所侷限。

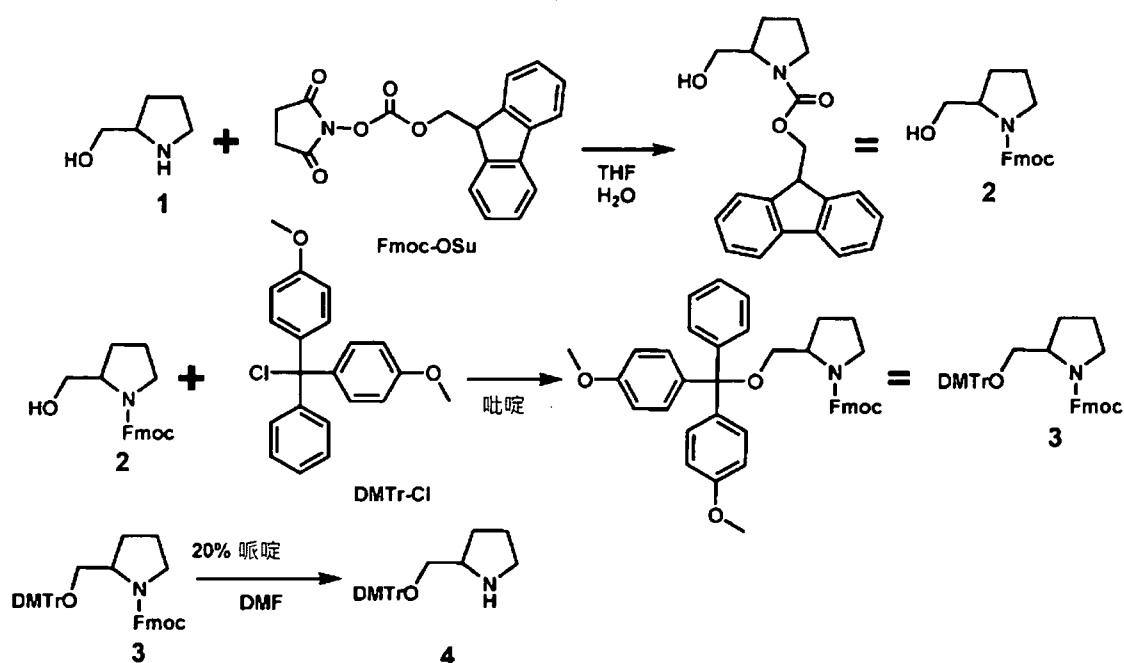
實施例

[0200](實施例A1)

1.脯胺醇之合成

依照下式所示流程1，合成出經二甲氧基三苯甲基保護之脯胺醇。

[0201][化13]



流程1

[0202] (1) Fmoc-L-脯胺醇(化合物2)

將L-脯胺醇(化合物1)(0.61g, 6.0mmol)溶解於純水70mL中，調製出L-脯胺醇水溶液。將N-(9-芴基甲氧基羰氧基)琥珀醯亞胺(Fmoc-OSu)(2.0g, 6.0mmol)溶解於THF 10mL。將該THF溶液加至前述L-脯胺醇水溶液，攪拌1小時使兩者反應。使該反應液分離成液體部分(liquid fraction)與沉澱部分，再以乙酸乙酯將各部份抽提，分別回收有機層。接著，合併各個有機層後，添加無水硫酸鈉，使其吸收水分(以下稱為乾燥)。過濾前述有機層，回收濾液，減壓濃縮前述濾液。將所得殘渣以二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 己烷：乙酸乙酯=1：1)純化，製得化合物2(1.4g, 收率74%)。以下顯示化合物之NMR結果。

¹H-NMR(CDCl₃) : δ7.77(2H, d, J = 7.7Hz, Ar-H),

7.60(2H, d, $J = 7.3\text{Hz}$, Ar-H), 7.40(2H, t, $J = 7.5\text{Hz}$, Ar-H), 7.31(2H, t, $J = 7.6\text{Hz}$, Ar-H), 4.40-4.50(2H, m, COOCH_2), 4.22(1H, t, $J = 6.5\text{Hz}$, 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).

[0203](2)Fmoc-DMTr-L-脯胺醇(化合物3)

使前述Fmoc-L-脯胺醇(化合物2)(1.4g, 4.3mmol)溶解於吡啶20mL中，共沸3次。使所得殘留物溶解於吡啶20mL中。將該溶液於氬氣下且在冰浴中一邊攪拌一邊添加4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(DMTr-Cl)(1.8g, 5.3mmol)。針對該反應液，以氯仿/甲醇之TLC追蹤反應，至Fmoc-L-脯胺醇之點(spot)消失為止，使其反應4小時。接著，爲了使過剩之DMTr-Cl淬冷(quench)，於前述反應液中加入甲醇3mL並攪拌10分鐘。更於前述反應液中加入氯仿後，回收有機層。對回收之前述有機層進行飽和食鹽水之洗淨及5%碳酸氫鈉水溶液之洗淨，再次進行飽和食鹽水之洗淨。以無水硫酸鈉使洗淨後之有機層乾燥。過濾前述有機層，使所得濾液減壓濃縮。以二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 氯仿，1%吡啶)純化所得殘渣，製得化合物3(2.0g，收率74%)。茲將化合物之NMR結果顯示如下。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.77(2H, d, $J = 7.7\text{Hz}$, Ar-H), 7.60(2H, d, $J = 7.3\text{Hz}$, Ar-H), 7.40-7.18(13H, m, Ar-H), 6.89(4H, d, $J = 8.6\text{Hz}$, Ar-H), 4.20-4.40(2H, m, COOCH_2), 4.02(1H, t, $J = 6.5\text{Hz}$, Ar-CH), 3.80-3.10(5H, m, H-5, H-6), 3.73(s, 6H, OCH_3), 1.84(3H, m, H-3, H-4), 1.58(1H, m, H-3).

[0204](3)DMTr-L-脯胺醇(化合物4)

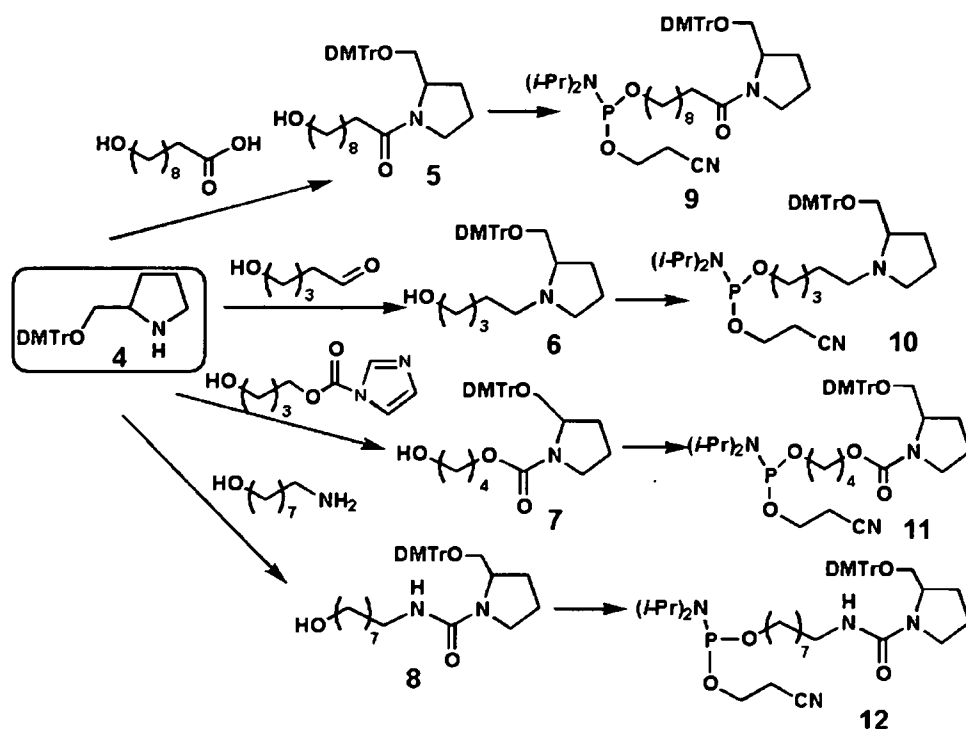
使前述Fmoc-DMTr-L-脯胺醇(化合物3)(2.0g, 3.2mmol)溶解於含20%哌啶之DMF溶液25mL中，攪拌12小時。將該溶液減壓濃縮，使所得殘渣以二氧化矽凝膠管柱層析法(氯仿：甲醇=85：15，含1%吡啶)純化，製得化合物4(1.0g，收率78%)。茲將化合物之NMR結果顯示如下。

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

[0205]2.亞醯胺衍生物之合成

其次，依照下式所示流程2，合成出具有脯胺醇之亞醯胺衍生物。以下，將1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二醯亞胺鹽酸鹽稱為「EDC」，將N,N-二甲基胺基吡啶(4-二甲基胺基吡啶)稱為「DMAP」。

[0206][化14]



流程2

[0207](1)DMTr-醯胺-L-脯胺醇(化合物5)

使前述DMTr-L-脯胺醇(化合物4)(0.80g, 2.0mmol)、EDC(0.46g, 2.4mmol)及DMAP(0.29g, 2.4mmol)溶解於二氯甲烷20mL並進行攪拌。於該溶液中添加10-羥基癸酸(0.45g, 2.4mmol)並攪拌。針對該反應液,以乙酸乙酯之TLC追蹤反應,至DMTr-L-脯胺醇之點消失為止,使其反應20小時。接著,於前述反應液中添加二氯甲烷後,回收有機層。將回收之前述有機層以飽和食鹽水洗淨後,以無水硫酸鈉使其乾燥。過濾前述有機層,將所得濾液減壓濃縮,再使其殘渣以二氧化矽凝膠管柱層析法(乙酸乙酯,含1%吡啶)純化,製得化合物5(0.71g, 收率62%)。以下顯示化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H, m, Ar-H), 6.82(4H, d,

$J = 8.6\text{Hz}$, Ar-H), 3.78(6H, s, OCH_3), 3.68-2.93(7H, m, H-2, H-5, H-6), 2.27-1.72(6H, m, 烷基, H-3, H-4), 1.58(4H, s, 烷基), 1.30(10H, s, 烷基).

[0208](2)DMTr-烷基-L-脯胺醇(化合物6)

使前述DMTr-L-脯胺醇(化合物4)(0.80g, 2.0mmol)溶解於甲醇15mL, 添加5-羥基戊醛(0.31g, 3.0mmol)並攪拌。於溶液中添加氰基氫化硼鈉(0.25g, 4.0mmol), 更進行攪拌。針對該反應液, 以乙酸乙酯/己烷之TLC追蹤反應, 至DMTr-L-脯胺醇之點消失為止, 使其反應24小時。接著, 於前述反應液中添加乙酸乙酯, 回收有機層。將回收之前述有機層以飽和食鹽水洗淨後, 以無水硫酸鈉使其乾燥。過濾前述有機層, 將所得濾液減壓濃縮, 再使其殘渣以二氧化矽凝膠管柱層析法(己烷: 乙酸乙酯=1: 1, 含1%吡啶)純化, 製得化合物6(0.62g, 收率63%)。以下顯示化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H, m, Ar-H), 6.82(4H, d, $J = 8.6\text{Hz}$, Ar-H), 3.78(6H, s, OCH_3), 3.70-2.86(4H, m, CH_2OH , H-6), 2.06-1.79(5H, m, 烷基, H-2, H-5), 1.74-1.49(^6H , m, 烷基, H-3, H-4), 1.45-1.27(4H, m, 烷基).

[0209](3)DMTr-胺甲酸酯-L-脯胺醇(化合物7)

使1, 4-丁二醇(0.90g, 10mmol)溶解於二氯甲烷30mL, 更添加羰基二咪唑(1.4g, 8.6mmol)後攪拌3小時。將該反應液之有機層以飽和食鹽水洗淨後, 以無水硫酸鈉使其乾燥。過濾前述有機層, 將所得濾液減壓濃縮, 使其殘渣以二氧

化矽凝膠管柱層析法(氯仿：甲醇=9：1)純化。藉此，製得1, 4-丁二醇之一側末端業經羰基二咪唑活性化之化合物(0.25g, 1.5mmol)。將該化合物溶解於二氯甲烷15mL中，添加前述DMTr-L-脯胺醇(化合物4)(0.6g, 1.5mmol)，攪拌24小時。於該混合液中更添加乙酸乙酯，回收有機層。將回收之前述有機層以飽和食鹽水洗淨後，以無水硫酸鈉使其乾燥。過濾前述有機層，將所得濾液減壓濃縮，使其殘渣以二氧化矽凝膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯=1：1，含1%吡啶)純化，製得化合物7(0.61g, 收率77%)。以下顯示化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ ： δ 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, COOCH_2), 3.78(s, 6H, OCH_3), 3.72-2.96(7H, m, 烷基, H-2, H-5, H-6), 2.10-1.30(8H, m, 烷基, H-3, H-4).

[0210](4)DMTr-醯脲-L-脯胺醇(化合物8)

使前述DMTr-L-脯胺醇(化合物4)(0.50g, 1.2mmol)及三光氣(0.12g, 0.40mmol)溶解於二氯甲烷8mL，於氬氣下且在冰浴中攪拌。接著，對前述溶液添加N, N-二異丙基乙基胺(0.31g, 2.4mmol)，攪拌1小時。更對前述溶液添加8-胺基-1-辛醇(0.17g, 1.2mmol)，同樣於冰浴中攪拌30分鐘後，於室溫下攪拌20小時。於前述溶液中加入二氯甲烷，回收有機層。將回收之前述有機層以飽和食鹽水洗淨後，以無水硫酸鈉使其乾燥。過濾前述有機層，將所得濾液減壓濃縮，並使其殘渣以二氧化矽凝膠管柱層析法(己烷：乙酸乙

酯=4:1, 含1%三乙胺)純化, 製得化合物8(0.44g, 收率62%)。

以下顯示化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H, m, Ar-H), 6.82(4H, m, Ar-H), 3.78(s, 6H, OCH_3), 3.68-3.25(9H, m, CH_2NH , CH_2OH , H-2, H-5, H-6), 1.74-1.18(16H, m, 烷基, H-3, H-4).

[0211](5)具有脯胺醇之亞醯胺衍生物(化合物9~12)

將前述經修飾之脯胺醇(化合物5~8)分別用作原料, 藉以下所示方法合成出化合物9~12。將前述經修飾之脯胺醇及5-苄基硫代-1H-四唑溶解於乙腈3mL中。前述經修飾之脯胺醇的使用量在化合物5時為0.69g(1.2mmol), 在化合物6時為0.60g(1.2mmol), 在化合物7時為0.60g(1.2mmol), 在化合物8時為0.25g(0.43mmol)。此外, 5-苄基硫代-1H-四唑之使用量對於化合物5~7為0.15g(0.78mmol), 對於化合物8則是54mg(0.15mmol)。於氬氣下, 對前述溶液添加2-氰基乙基N, N, N', N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺, 攪拌2小時。前述2-氰基乙基N, N, N', N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺之添加量在使用前述化合物5~7之系統中為0.54g(1.8mmol), 使用前述化合物8之系統則是0.19g(0.64mmol)。接著, 對前述溶液添加飽和碳酸氫鈉水溶液, 更以二氯甲烷抽提並回收有機層。使回收之前述有機層以無水硫酸鈉乾燥。過濾前述有機層, 將所得濾液減壓濃縮, 將其殘渣以二氧化矽凝膠管柱層析法(己烷: 乙酸乙酯=1:1, 含1%三乙胺)純化, 製得化合物9~12。以下顯示各化合物之NMR結果。

[0212]DMTr-醯胺-L-脯胺醇亞醯胺(化合物9, 0.60g,

收率55%)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta 7.40-7.14(9\text{H}, \text{m}, \text{Ar-H}), 6.82(4\text{H}, \text{d}, J=8.6\text{Hz}, \text{Ar-H}), 3.78(6\text{H}, \text{s}, \text{OCH}_3), 3.68-2.93(11\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{O}, \text{POCH}_2, \text{CHCH}_3, \text{H-2}, \text{H-5}, \text{H-6}), 2.58(2\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{CN}), 2.27-1.72(6\text{H}, \text{m}, \text{烷基}, \text{H-3}, \text{H-4}), 1.58(4\text{H}, \text{s}, \text{烷基}), 1.30(22\text{H}, \text{s}, \text{烷基}, \text{CHCH}_3).$

[0213]DMTr-烷基-L-脯胺醇亞醯胺(化合物10, 0.71g, 收率60%)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3): \delta 7.40-7.14(9\text{H}, \text{m}, \text{Ar-H}), 6.82(4\text{H}, \text{d}, J=8.6\text{Hz}, \text{Ar-H}), 3.78(6\text{H}, \text{s}, \text{OCH}_3), 3.70-2.86(8\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{O}, \text{POCH}_2, \text{CHCH}_3, \text{H-6}), 2.58(2\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{CN}), 2.06-1.79(5\text{H}, \text{m}, \text{烷基}, \text{H-2}, \text{H-5}), 1.74-1.49(6\text{H}, \text{m}, \text{烷基}, \text{H-3}, \text{H-4}), 1.37-1.10(16\text{H}, \text{m}, \text{烷基}, \text{CHCH}_3).$

[0214]DMTr-胺甲酸酯-L-脯胺醇亞醯胺(化合物11, 0.67g, 收率52%)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3): \delta 7.40-7.14(9\text{H}, \text{m}, \text{Ar-H}), 6.82(4\text{H}, \text{d}, J=8.6\text{Hz}, \text{Ar-H}), 4.24-3.94(2\text{H}, \text{m}, \text{COOCH}_2), 3.78(\text{s}, 6\text{H}, \text{OCH}_3), 3.72-2.96(11\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{O}, \text{POCH}_2, \text{CHCH}_3, \text{H-2}, \text{H-5}, \text{H-6}), 2.58(2\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{CN}), 2.10-1.46(8\text{H}, \text{m}, \text{烷基}, \text{H-3}, \text{H-4}), 1.34-1.10(12\text{H}, \text{m}, \text{CHCH}_3).$

[0215]DMTr-醯脲-L-脯胺醇亞醯胺(化合物12, 0.20g, 收率61%)

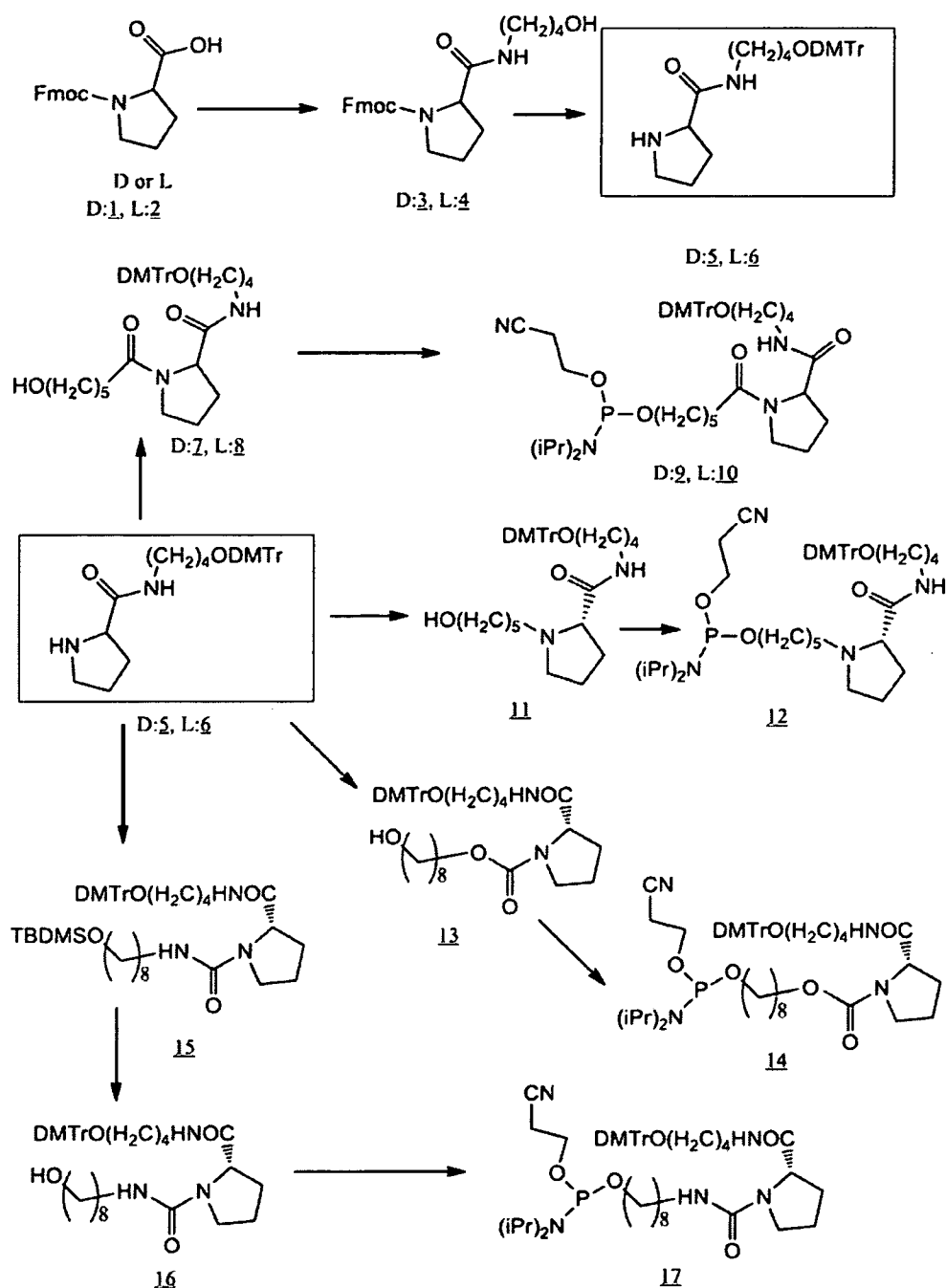
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3): \delta 7.40-7.14(9\text{H}, \text{m}, \text{Ar-H}), 6.82(4\text{H}, \text{m}, \text{Ar-H}), 3.78(\text{s}, 6\text{H}, \text{OCH}_3), 3.65-3.25(13\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{O}, \text{POCH}_2,$

CHCH₃, H-2, CH₂NH, CH₂OH, H-2, H-5, H-6), 2.73(2H, m, CH₂CN), 2.10-1.48(16H, m, 烷基, H-3, H-4), 1.35-1.10(12H, m, CHCH₃).

[0216](實施例A2)

接著，依照下述式所示流程3，合成出具有L-脯胺酸之亞醯胺衍生物。

[0217][化15]



流程3

[0218](1)DMTr-羥基醯胺胺基-L-脯氨酸(化合物11)

於冰冷下，將乙酸緩衝液(7mL)加入含有DMTr-醯胺-L-脯氨酸(化合物6)(1.00g，2.05mmol)及5-羥基戊醛(0.33g，3.07mmol)之乙醇溶液(7mL)。於冰冷下將該混合液攪拌20

分鐘後，加入氰基氫化硼鈉(0.77g, 12.28mmol)，更於室溫下攪拌7小時。以二氯甲烷稀釋前述混合液，再以水洗淨後，更以飽和食鹽水洗淨之。接著，回收前述有機層，以硫酸鈉使其乾燥。過濾前述有機層，針對濾液，於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供至二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH}=98 : 2$ ，含0.05%吡啶)。接著，將所得生成物供至二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH}=98 : 2$ ，含0.05%吡啶)，更將所得生成物供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑二氯甲烷：丙酮=7：3，含0.05%吡啶)。藉此，製得無色糖漿狀之化合物11(0.49g，收率41%)。

Ms(FAB+) : m/z 575(M^+)、303(DMTr⁺)

[0219](2)DMTr-醯胺胺基-L-脯胺酸亞醯胺(化合物12)

將所得前述DMTr-羥基醯胺胺基-L-脯胺酸(化合物11)(0.50g, 0.87mmol)與無水乙腈混合，在室溫下共沸乾燥。對所得殘留物添加四唑二異丙基銨(diisopropylammonium tetrazolide)(178mg, 1.04mmol)，減壓下脫氣後充填氫氣。對前述混合物添加無水乙腈(1mL)，更加入2-氰基乙氧基-N, N, N', N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺(313mg, 1.04mmol)之無水乙腈溶液(1mL)。於氫氣環境下將該混合物於室溫下攪拌4小時。接著，以二氯甲烷稀釋前述混合物，再依序以飽和碳酸氫鈉水及飽和食鹽水洗淨。回收有機層，並以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得前述濾液，於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予使用胺基二氧化矽作為充填

劑之管柱層析法(展開溶劑己烷:丙酮=7:3, 含0.05%吡啶), 製得無色糖漿狀之化合物12(0.57g, 純度93%, 收率79%)。前述純度係以HPLC測定(以下相同)。以下顯示化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 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, OCH_3)、3.47-3.64(m, 3H)、3.12-3.26(m, 2H)、3.05(t, $J = 6.4\text{Hz}$, 2H, CH_2)、2.98-2.02(m, 2H)、2.61(t, $J = 5.8\text{Hz}$, 2H, CH_2)、2.55-2.63(m, 2H)、2.27-2.42(m, 1H, CH)、2.31(t, 7.8Hz , 2H, 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, CH_3);

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

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

[0220](3)DMTr-羥基醯胺胺甲醯基-L-脯胺酸(化合物13)

於氬氣環境下, 對已溶有DMTr-醯胺-L-脯胺酸(化合物6)(1.00g, 2.05mmol)之無水乙腈溶液(10mL), 於室溫下加入已溶有1-咪唑羰氧基-8-羥基辛烷(1.12g, 4.92mmol)之無水乙腈溶液(20mL)。於40~50°C下將該混合液加熱2天後, 室溫下放置5天。針對前述混合液, 減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑二氯甲烷:丙酮=4:1, 含0.05%吡啶)。藉此, 製得無色糖漿狀之化合

物13(0.68g, 收率50%)。以下顯示化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 7.40-7.42(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, 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(M^+)、303(DMTr^+).

[0221](4)DMTr-醯胺胺甲醯基-L-脯胺酸亞醯胺(化合物14)

將所得前述DMTr-羥基醯胺胺甲醯基-L-脯胺酸(化合物13)(0.63g, 1.00mmol)與無水吡啶混合, 於室溫下共沸乾燥。對所得殘留物添加四唑二異丙基銨(206mg, 1.20mmol), 減壓下脫氣後充填氬氣。對前述混合物加入無水乙腈(1mL), 更加入2-氰基乙氧基-N, N, N', N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺(282mg, 1.12mmol)之無水乙腈溶液(1mL)。於氬氣環境下將混合物於室溫下攪拌4小時。接著, 以二氯甲烷稀釋前述混合物, 依序以飽和碳酸氫鈉水及飽和食鹽水洗淨。回收有機層, 並以硫酸鈉乾燥後, 過濾前述有機層。針對所得濾液, 於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予充填劑使用胺基二氧化矽之管柱層析法(展開溶劑己烷: 丙酮=7: 3, 含0.5%吡啶), 製得無色糖漿狀之化合物14(0.74g, 純度100%, 收率87%)。以下顯示化合物之NMR結果。

P-NMR (CDCl_3) : δ 147.19 ;

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

[0222](5)DMTr-t-第三丁基二甲基矽氧基醯胺醯脲-L-脯胺酸(化合物15)

於氬氣環境及冰冷下，對三光氣(1.22g, 4.10mmol)加入無水四氫呋喃溶液(10mL)。於氬氣環境及冰冷下，以30分鐘對該混合液中滴定溶有DMTr-醯胺-L-脯胺酸(化合物6)(1.00g, 2.05mmol)及DIEA(9.80g, 75.8mmol)之無水四氫呋喃溶液(10mL)，之後，室溫下攪拌1小時。於氬氣環境及冰冷下，對前述混合液以45分鐘滴定溶有10-胺基-1-第三丁基二甲基矽氧基癸烷(2.66g, 10.25mmol)及DIEA(3.20g, 24.76mmol)之無水四氫呋喃溶液(20mL)。接著，於氬氣環境下將前述混合物於室溫下攪拌一夜。以乙酸乙酯(200mL)稀釋該混合液，回收有機層。將前述有機層以飽和碳酸氫鈉水洗淨後，更以飽和食鹽水洗淨。接著，回收有機層，以硫酸鈉使其乾燥。過濾前述有機層，針對濾液，於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 二氯甲烷：丙酮=4：1，含0.05%吡啶)。藉此，製得無色糖漿狀之化合物15(0.87g, 收率55%)。

[0223](6)DMTr-羥基醯胺醯脲-L-脯胺酸化合物(16)

於氬氣環境下，將無水四氫呋喃二氯甲烷溶液(10mL)於室溫下加入所得前述DMTr-第三丁基二甲基矽氧基醯胺醯脲-L-脯胺酸(15)(0.87g, 1.12mmol)。於氬氣環境下，於前述混合液中加入1mol/L含有氟化四丁基銨之四氫呋喃溶

液(4.69mL，東京化成)，於室溫下攪拌3天。以二氯甲烷(150mL)稀釋前述混合液，再以水洗淨後，更以飽和食鹽水洗淨之。回收有機層，以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 二氯甲烷：丙酮=1：1，含0.05%吡啶)，製得無色糖漿狀之化合物16(0.68g，收率92%)。以下顯示化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 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, CH_2)、3.79(s, 6H, OCH_3)、3.63(d, 1H, $J=6.4\text{ Hz}$, CH_2)、3.61(d, 1H, $J=6.4\text{ Hz}$, CH_2)、3.34-3.37(m, 1H, CH)、3.16-3.27(m, 5H), 3.04(t, $J=5.9\text{ Hz}$, 2H, 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).

[0224] (7)DMTr-醯胺醯脲-L-脯胺酸亞醯胺(化合物17)

將所得前述DMTr-羥基醯胺醯脲-L-脯胺酸(化合物16)(0.62g, 0.94mmol)與無水乙腈混合，於室溫下共沸乾燥。於所得殘留物中加入四唑二異丙基銨(192mg, 1.12mmol)，減壓下脫氣後充填氬氣。對前述混合液加入無水乙腈(1mL)，更加入2-氰基乙氧基-N, N, N', N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺(282mg, 1.12mmol)之無水乙腈溶液(1mL)。於氬氣環境下將該混合物於室溫下攪拌4小時。接著，以二氯甲烷稀釋前述混合物，再依序以飽和碳酸氫鈉水及飽和食鹽水洗淨。

回收有機層，以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得前述濾液，於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予充填劑使用胺基二氧化矽之管柱層析法(展開溶劑 己烷:丙酮=1:1，含有0.05%吡啶)，製得無色糖漿狀之化合物17(0.77g，純度88%，收率84%)。以下顯示化合物之NMR結果。

P-NMR (CDCl_3): δ 147.27;

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

[0225](實施例A3)脯胺酸二醯胺亞醯胺之合成

爲了生成含有具脯胺酸骨架之連接子的本發明核酸分子，利用前述流程3合成出L-脯胺酸二醯胺亞醯胺及D-脯胺酸二醯胺亞醯胺。

[0226](B3-1)L-脯胺酸二醯胺亞醯胺

(1)Fmoc-羥基醯胺-L-脯胺酸(化合物4)

將前述流程3之化合物2(Fmoc-L-脯胺酸)作爲起始原料。混合前述化合物2(10.00g, 29.64mmol)、4-胺基-1-丁醇(3.18g, 35.56mmol)及1-羥基苯并三唑(10.90g, 70.72mmol)，對前述混合物，於減壓下脫氣後充填氬氣。於室溫下對前述混合物加入無水乙腈(140mL)，更添加二環己基碳二亞胺(7.34g, 35.56mmol)之無水乙腈溶液(70mL)後，於氬氣環境下，於室溫下攪拌15小時。反應結束後濾別所生成之沉澱，針對所回收之濾液，於減壓下餾除溶劑。於所得殘渣中加入二氯甲烷(200mL)，以飽和碳酸氫鈉水(200mL)洗淨之。接著回收有機層，以硫酸鎂乾燥後，過濾前述有機層。針

對所得濾液，於減壓下餾除溶劑，對其殘渣添加二乙醚(200mL)而粉末化。藉由濾取產生之粉末，獲得無色粉末狀之化合物4(10.34g，收率84%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.76-7.83(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, CH₂), 3.67-3.73(m, 2H, CH₂)、3.35-3.52(m, 2H, CH₂)、3.18-3.30(m, 2H, CH₂)、2.20-2.50(m, 4H)、1.81-2.03(m, 3H)、1.47-1.54(m, 2H)；

Ms(FAB+) : m/z 409(M + H⁺).

[0227] (2)DMTr-醯胺-L-脯胺酸(化合物6)

將 Fmoc- 羥基醯胺 -L- 脯胺酸 (化合物 4)(7.80g , 19.09mmol)與無水吡啶(5mL)混合，於室溫下共沸乾燥2次。對所得殘留物添加4, 4'-二甲氧基三苯甲基氯(8.20g , 24.20mmol)、DMAP(23mg , 0.19mmol)及無水吡啶(39mL)。於室溫下攪拌該混合物1小時後，加入甲醇(7.8mL)，於室溫下攪拌30分鐘。以二氯甲烷(100mL)稀釋該混合物，並以飽和碳酸氫鈉水(150mL)洗淨後，分離有機層。將前述有機層以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑。對所得未純化殘渣添加無水二甲基甲醯胺(39mL)及吡啶(18.7mL , 189mmol)，室溫下攪拌1小時。反應結束後，針對前述混合液，於減壓下以室溫餾除溶劑。將所得殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(商品名 Wakogel C-300，展開溶劑 CH_2Cl_2 : CH_3OH = 9 : 1，含0.05%吡啶)，

製得淡黃色油狀之化合物6(9.11g，收率98%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7.39-7.43(m, 2H, Ar-H)、7.30(d, J = 8.8Hz, 4H, Ar-H)、7.21(tt, 1H, 4.9, 1.3Hz, Ar-H)、6.81(d, J = 8.8Hz, 4H, Ar-H)、3.78(s, 6H, OCH_3)、3.71(dd, H, J = 6.3Hz, 5.4Hz, CH)、3.21(2H, 12.9, 6.3Hz, 2H, CH_2)、3.05(t, J = 6.3Hz, 2H, CH_2)、2.85-2.91(m, 2H, CH_2)、2.08-2.17(m, 1H, CH)、1.85-2.00(m, 3H)、1.55-1.65(m, 5H)；

Ms(FAB+)； m/z 489($\text{M} + \text{H}^+$)、303(DMTr^+)。

[0228](3)DMTr-羥基二醯胺-L-脯胺酸(化合物8)

混合所得前述DMTr-醯胺-L-脯胺酸(化合物6)(6.01g，12.28mmol)、EDC(2.83g，14.74mmol)、1-羥基苯并三唑(3.98g，29.47mmol)及三乙胺(4.47g，44.21mmol)之無水二氯甲烷溶液(120mL)。更於氬氣環境下，以室溫對該混合液添加6-羥基己烷酸(1.95g，14.47mmol)，之後，於氬環境下以室溫攪拌1小時。以二氯甲烷(600mL)稀釋前述混合液，並以飽和食鹽水(800mL)洗淨三次。回收有機層，使前述有機層以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑。藉此，製得淡黃色泡沫狀之前述化合物8(6.29g，收率85%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7.41-7.43(m, 2H, Ar-H)、7.27-7.31(m, 4H, Ar-H)、7.19-7.26(m, 2H, Ar-H)、7.17-7.21(m, 1H, Ar-H)、6.79-6.82(m, 4H, Ar-H)、4.51-4.53(m, 1H, CH)、3.79(s, 6H, OCH_3)、3.61(t, 2H, J = 6.4Hz, CH_2)、3.50-3.55(m, 1H, CH)、

3.36-3.43(m, 1H, CH), 3.15-3.24(m, 2H, CH₂), 3.04(t, J = 6.3Hz, 2H, CH₂)、2.38-2.45(m, 1H, CH)、2.31(t, 6.8Hz, 2H, CH₂)、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, CH₂) ;

Ms(FAB +) : m/z 602(M⁺)、303(DMTr⁺).

[0229](4)DMTr-二醯胺-L-脯胺酸亞醯胺(化合物10)

將所得前述DMTr-羥基二醯胺-L-脯胺酸(化合物8)(8.55g, 14.18mmol)與無水乙腈混合，於室溫下共沸乾燥3次。於所得殘留物中添加四唑二異丙基鉍(2.91g, 17.02mmol)，於減壓下脫氣後充填氬氣。對前述混合物加入無水乙腈(10mL)，更加入2-氰基乙氧基-N, N, N', N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺(5.13g, 17.02mmol)之無水乙腈溶液(7mL)。於氬氣環境下，將該混合物於室溫下攪拌2小時。接著，以二氯甲烷稀釋前述混合物，並以飽和碳酸氫鈉水(200mL)洗淨3次後，以飽和食鹽水(200mL)洗淨。回收有機層並以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得前述濾液，於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予充填劑使用胺基二氧化矽凝膠之管柱層析法(展開溶劑 己烷:乙酸乙酯=1:3, 含0.05%吡啶)，製得無色糖漿狀之化合物10(10.25g, 純度92%, 收率83%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

¹H-NMR(CDCl₃): δ7.40-7.42(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, CH)、3.75-3.93(m,

4H)、3.79(s, 6H, OCH₃)、3.45-3.60(m, 4H)、3.35-3.45(m, 1H, CH)、3.20-3.29(m, 1H)、3.04(t, J = 6.4Hz, 2H, CH₂)、2.62(t, J = 5.8Hz, 2H, CH₂)、2.40-2.44(m, 1H, CH)、2.31(t, 7.8Hz, 2H, CH₂)、2.03-2.19(m, 1H, CH)、1.92-2.02(m, 1H, CH)、1.70-1.83(m, 1H, CH)、1.51-1.71(m, 8H)、1.35-1.44(m, 2H, CH₂)、1.18(d, J = 6.8Hz, 6H, CH₃)、1.16(d, J = 6.8Hz, 6H, CH₃) ;

P-NMR(CDCl₃) : Msδ147.17 ;

Ms(FAB +) : m/z 802(M⁺)、303(DMTr⁺), 201(C₈H₁₉N₂OP⁺).

[0230](B3-2)D-脯胺酸二醯胺亞醯胺

(1)Fmoc-羥基醯胺-D-脯胺酸(化合物3)

將前述流程3之化合物1(Fmoc-D-脯胺酸)用作起始原料。對於前述化合物1(1.5g, 4.45mmol)、二環己基碳二亞胺(1.1g, 5.34mmol)及1-羥基苯并三唑(1.5g, 10.69mmol)之混合物，減壓下脫氣後填充氬氣。於室溫下對前述混合物添加無水乙腈(24mL)，更添加4-胺基-1-丁醇(0.48g, 5.34mmol)之無水乙腈溶液(6mL)後，於氬氣環境下，於室溫下攪拌15小時。反應結束後濾別所生成之沉澱，針對回收之濾液，於減壓下餾除溶劑。對所得殘渣加入二氯甲烷，以乙酸緩衝液(pH4.0)洗淨3次，並以飽和碳酸氫鈉水洗淨3次。接著回收有機層，以硫酸鎂乾燥後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑，於其殘渣中加入二乙醚(50mL)，使其粉末化。藉由濾取產生之粉末，獲得白色粉末狀之化

合物3。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ 7.77(d, J =7.3Hz, 2H) ;
7.58(br, 2H); 7.41(t, J =7.3Hz, 2H); 7.32(t, J =7.3Hz, 2H);
4.25-4.43(m, 4H) ; 3.25-3.61(m, 6H) ; 1.57-1.92(m, 8H).

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

[0231](2)DMTr-醯胺-D-脯胺酸(化合物5)

將Fmoc-羥基醯胺-D-脯胺酸(化合物3)(1.0g, 2.45mmol)與無水吡啶(5mL)混合，室溫下共沸乾燥2次。對所得殘留物添加4, 4'-二甲氧基三苯甲基氯(1.05g, 3.10mmol)、DMAP(3mg, 0.024mmol)及無水吡啶(5mL)。於室溫下攪拌該混合物1小時後加入甲醇(1mL)，於室溫下攪拌30分鐘。以二氯甲烷稀釋該混合物，以飽和碳酸氫鈉水洗淨後，分離有機層。將前述有機層以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑。於所得未純化之殘渣中加入無水二甲基甲醯胺(5mL)及哌啶(2.4mL, 24mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，針對前述混合液，於減壓下且於室溫下餾除溶劑。將所得殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(商品名Wakogel C-300，展開溶劑 CH_2Cl_2 : CH_3OH =9 : 1，含0.05%吡啶)，製得淡黃色油狀之化合物5(1.26g，收率96%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ 7.62(br, 1H) ; 7.41-7.44(m, 2H); 7.26-7.33(m, 6H); 7.17-7.22(m, 1H); 6.80-6.84(m, 4H) ;
3.78(s, 6H); 3.71(dd, J =8.8, 5.4Hz, 1H); 3.22(q, 6.5Hz, 2H) ;

3.07(t, $J = 6.1\text{Hz}$, 2H); 2.97-3.03(m, 1H); 2.85-2.91(m, 1H);
1.85-2.15(m, 3H); 1.55-1.73(m, 6H);

MS (FAB+) : m/z 489($M + H^+$), 303(DMTr⁺).

[0232](3)DMTr-羥基二醯胺-D-脯胺酸(化合物7)

混合所得前述DMTr-醯胺-D-脯胺酸(化合物5)(1.2g, 2.45mmol)、EDC(566mg, 2.95mmol)、1-羥基苯并三唑(796mg, 5.89mmol)及三乙胺(1.2mL, 8.84mmol)之無水二氯甲烷溶液(24mL)。更於氬氣環境下且於室溫下，對該混合液加入6-羥基己烷酸(390mg, 2.95mmol)，之後於氬氣環境下且於室溫下攪拌1小時。以二氯甲烷稀釋前述混合液，再以飽和碳酸氫鈉水洗淨3次。回收有機層，以硫酸鈉乾燥前述有機層後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑。藉此，製得淡黃色油狀之化合物7(1.4g, 收率95%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.40-7.43(m, 2H); 7.25-7.32(m, 6H); 7.17-7.22(m, 1H); 6.79-6.83(m, 4H); 3.79(s, 6H); 3.58-3.63(m, 2H); 3.49-3.55(m, 1H); 3.15-3.26(m, 2H); 3.02-3.07(m, 2H); 2.30-2.33(m, 2H); 2.11-2.20(m, 1H); 1.50-1.99(m, 13H); 1.36-1.43(m, 2H);

MS (FAB+) : m/z 602(M^+), 303(DMTr⁺).

[0233](4)DMTr-二醯胺-D-脯胺酸亞醯胺(化合物9)

將所得前述DMTr-羥基二醯胺-D-脯胺酸(化合物7)(1.2g, 1.99mmol)與無水乙腈混合，於室溫下共沸乾燥3次。對所得殘留物添加四唑二異丙基鉍(410mg, 2.40mmol)，

減壓下脫氣並充填氬氣。對前述混合物添加無水乙腈(2.4mL)，更添加2-氰基乙氧基-N, N, N', N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺(722mg, 2.40mmol)。於氬氣環境下且於室溫下攪拌該混合物2小時。接著，以二氯甲烷稀釋前述混合物，再以飽和碳酸氫鈉水洗淨3次後，以飽和食鹽水洗淨之。回收有機層，並以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予充填劑使用胺基二氧化矽凝膠之管柱層析法(展開溶劑 己烷：乙酸乙酯=1：3)，製得無色油狀之化合物9(1.4g，純度95%，收率83%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ 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) ;

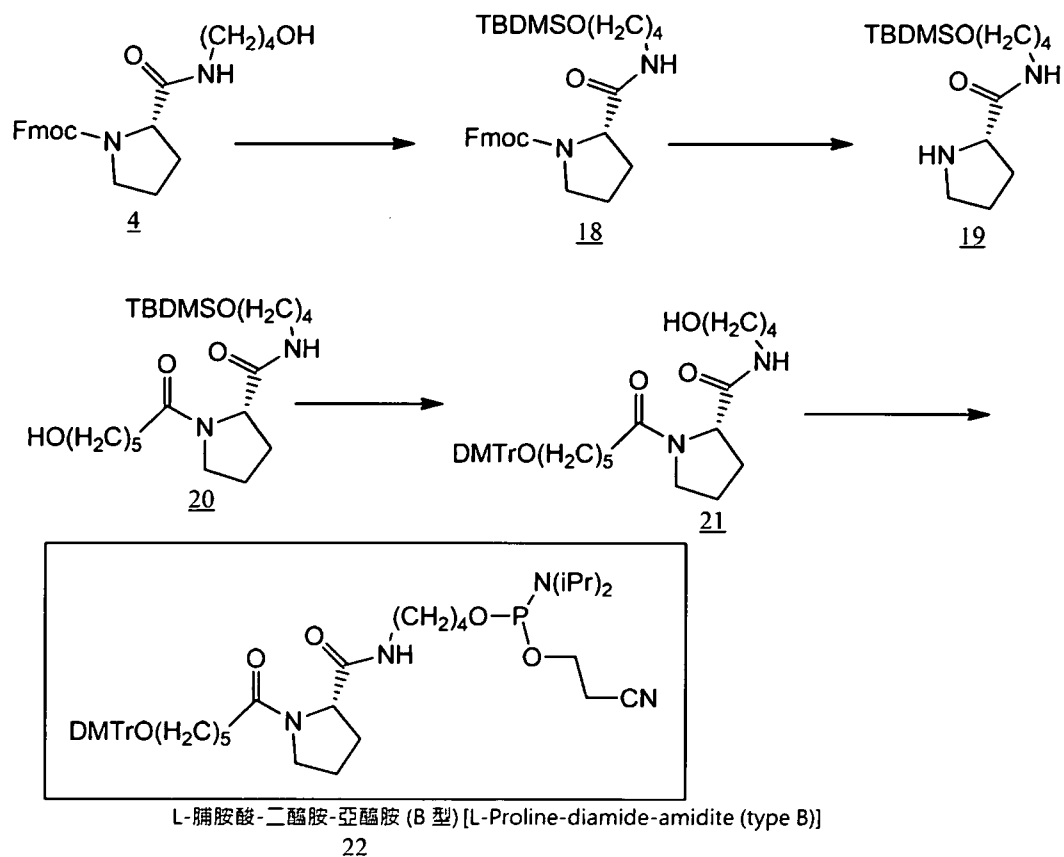
$^{31}\text{P-NMR}$ (162MHz, CDCl_3) : δ 146.94 ;

MS(FAB +) : m/z 802(M^+), 303(DMT r^+), 201($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$).

[0234](實施例A4)

爲了生成含有具脯胺酸骨架之連接子的本發明核酸分子，利用下述流程4，合成出L-脯胺酸二醯胺亞醯胺B型。

[0235][化16]



Fmoc: 9-芴基甲氧羰基 (Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl) TBDMS: 第三丁基二甲基矽基 (TBDMS: tert-butyldimethylsilyl) DMTr: 4,4'-二甲氧基三苯甲基 (DMTr: 4,4'-dimethoxytrityl)

流程4

[0236](1)Fmoc-第三丁基二甲基矽氧基醯胺-L-脯氨酸 (化合物18)

混合 Fmoc-羥基醯胺-L-脯氨酸 (化合物 4)(2.00g , 30mmol)、第三丁基二甲基矽基氯(1.11g , 35mmol)及咪唑 (10.90g , 71mmol)。對於前述混合物，於減壓下脫氣後充填氬氣。於室溫下將無水乙腈(20mL)加入前述混合物，於氬氣環境下且於室溫下攪拌整夜。反應結束後，於前述混合物中加入二氯甲烷(150mL)，以水洗淨3次，再以飽和食鹽水洗淨。回收有機層並以硫酸鎂乾燥後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑，將其殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑CH₂Cl₂: CH₃OH=95: 5)，

製得無色糖漿狀之化合物18(2.35g，收率92%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 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), 4.10-4.46(m, 4H, CH_2), 3.47-3.59(m, 4H, 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_3)；

Ms(FAB+)：m/z 523($\text{M} + \text{H}^+$).

[0237](2)第三丁基二甲基矽氧基醯胺-L-脯胺酸(化合物19)

對所得前述Fmoc-第三丁基二甲基矽氧基醯胺-L-脯胺酸(化合物18)(1.18g，2.5mmol)加入無水乙腈(5mL)及吡啶(2.4mL)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，對前述混合物加入乙腈(50mL)，濾別不溶物。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑，將所得殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 CH_2Cl_2 ： CH_3OH =9：1)，製得無色糖漿狀之化合物19(0.61g，收率90%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 3.71(dd, 1H, $J = 9.0\text{Hz}, 5.2\text{Hz}$, CH)、3.61-3.64(m, 2H, CH_2)、3.22-3.28(m, 2H, 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, CH_2)、1.52-1.57(m, 4H)、0.89(s, 9H, t-Bu)、0.05(s, 6H, SiCH_3)；

Ms(FAB+)；m/z 301($\text{M} + \text{H}^+$).

[0238](3)第三丁基二甲基矽氧基醯胺羥基醯胺-L-脯胺

酸(化合物20)

混合所得前述第三丁基二甲基矽氧基醯胺-L-脯胺酸(化合物19)(550mg, 1.8mmol)、6-羥基己烷酸(300mg, 2.3mmol)、EDC(434mg, 2.3mmol)及1-羥基苯并三唑(695mg, 4.5mmol)之無水二氯甲烷溶液(20mL)。於氬氣環境下且於室溫下, 將三乙胺(689mg, 6.8mmol)加入前述混合物, 之後於氬氣環境且室溫下攪拌整夜。以飽和食鹽水洗淨前述混合液。回收有機層, 使前述者以硫酸鈉乾燥後, 過濾前述有機層。針對所得濾液, 於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 CH_2Cl_2 : CH_3OH =9 : 1), 製得無色糖漿狀之化合物20(696mg, 收率92%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 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 =7.3Hz, 2H, 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, CH_2)、0.87(s, 9H, t-Bu)、0.04(s, 6H, SiCH_3) ;

Ms(FAB+) : m/z 415($\text{M}^+ + 1$).

[0239](4)DMTr-羥基二醯胺-L-脯胺酸B型(化合物21)

將所得前述第三丁基二甲基矽氧基醯胺羥基醯胺-L-脯胺酸(化合物20)(640mg, 1.54mmol)與無水吡啶(1mL)混合, 於室溫下共沸乾燥。於所得殘留物中加入4, 4'-二甲氧基三苯甲基氯(657mg, 1.85mmol)、DMAP(2mg)及無水吡啶

(5mL)，室溫下攪拌4小時後，加入甲醇(1mL)並於室溫下攪拌30分鐘。以二氯甲烷稀釋前述混合物，並以飽和碳酸氫鈉水洗淨之。回收有機層並以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑。於所得殘渣中加入無水乙腈(5mL)及含有1mol/L氟化四丁基銨之四氫呋喃溶液(1.42mL，氟化四丁基銨1.42mmol)，室溫下攪拌一整夜。反應結束後，對前述混合物加入乙酸乙酯(100mL)，以水洗淨後，以飽和食鹽水洗淨。回收有機層並以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得濾液，於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 95 : 5$ ，含0.05%吡啶)，製得無色糖漿狀之化合物21(680mg，收率73%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 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, 6.8Hz, 1H, CH)、3.79(s, 6H, OCH_3)、3.61(dd, 2H, $J = 11\text{Hz}, 5.4\text{Hz}$, CH_2)、3.50-3.54(m, 1H, CH)、3.36-3.43(m, 1H, CH), 3.20-3.26(m, 2H, CH_2), 3.05(t, $J = 6.4\text{Hz}$, 2H, CH_2)、2.38-2.45(m, 1H, CH)、2.30(t, $J = 7.8\text{Hz}$, 2H, 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, CH_2) ;

Ms (FAB+) : m/z 602(M^+)、303(DMTr $^+$).

[0240](5)DMTr-二醯胺-L-脯胺酸亞醯胺B型(化合物

22)

將所得前述DMTr-羥基二醯胺-L-脯胺酸B型(化合物21)(637mg, 1.06mmol)與無水乙腈混合, 於室溫下共沸乾燥。對所得殘留物加入四唑二異丙基銨(201mg, 1.16mmol), 於減壓下脫氣並充填氬氣。對前述混合物加入無水乙腈(1mL), 更加入2-氰基乙氧基-N, N, N', N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺(350mg, 1.16mmol)之無水乙腈溶液(1mL)。於氬氣環境下且室溫下, 將該混合物攪拌4小時。以二氯甲烷稀釋前述混合物, 再以飽和碳酸氫鈉水及飽和食鹽水洗淨。回收有機層, 以硫酸鈉乾燥後, 過濾前述有機層。針對所得濾液, 於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予充填劑使用胺基二氧化矽凝膠之管柱層析法(展開溶劑己烷: 丙酮=7: 3), 製得無色糖漿狀之化合物22(680mg, 純度95%, 收率76%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 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, 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, CH_2)、2.62(t, $J = 6.3\text{Hz}$, 2H, CH_2)、2.39-2.46(m, 1H, CH)、2.29(t, $J = 7.3\text{Hz}$, 2H, 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, 2H, CH_2)、1.18(d, $J = 6.4\text{Hz}$, 6H, CH_3)、1.16(d, $J = 6.4\text{Hz}$, 6H, CH_3) ;

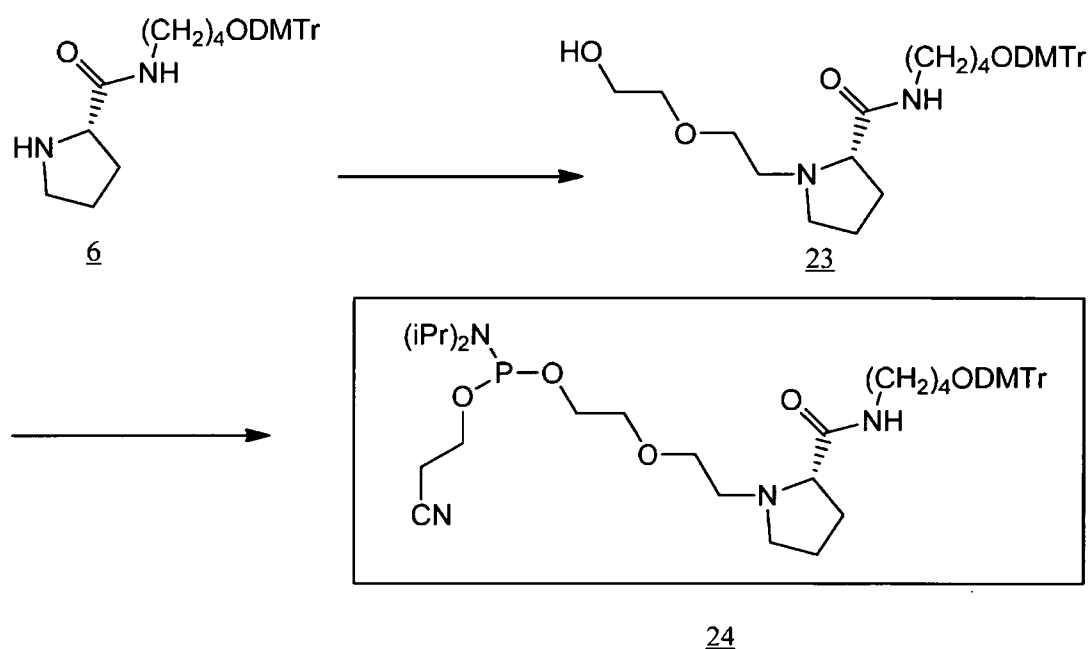
P-NMR (CH_3CN) δ 146.90 ;

Ms (FAB+) : m/z 803($M^+ + 1$)、303(DMT r^+).

[0241](實施例A5)

爲了生成含有具脯胺酸骨架之連接子的本發明核酸分子，利用下述流程5，合成出DMTr-醯胺伸乙基氧基乙基胺基-L-脯胺酸亞醯胺(以下，稱爲PEG間隔子型)。

[0242][化17]



流程5

[0243](1)DMTr-醯胺羥基乙氧基乙基胺基-L-脯胺酸
(化合物23)

混合DMTr-醯胺-L-脯胺酸(化合物6)(1.00g, 2.05mmol)、4-甲苯磺酸2-(2-羥基乙氧基)乙基酯(3.10g, 12.30mmol)及碳酸鉀(0.85g, 6.15mmol)之無水二甲基甲醯胺溶液(10mL)，於氬氣環境下且室溫下攪拌4天。針對前述混合物，於減壓下且室溫下餾除溶劑後，加入二氯甲烷(20mL)後過濾。濃縮濾液，將所得殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法。前述

二氧化矽凝膠管柱層析法之添加溶劑係首先使用含0.05%吡啶之乙酸乙酯，之後使用含0.05%吡啶之 CH_2Cl_2 與 CH_3OH 之混合液($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$)。結果，製得無色糖漿狀之化合物23(1.15g，收率97%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 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, 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).

[0244](2) DMTr-醯胺伸乙基氧基乙基胺基-L-脯胺酸亞醯胺(化合物24)

將所得前述DMTr-醯胺羥基乙氧基乙基胺基-L-脯胺酸(化合物23)(0.63g，1.00mmol)與無水吡啶混合，室溫下共沸乾燥。對所得殘留物加入四唑二異丙基鉍(206mg，1.20mmol)，減壓下脫氣後充填氬氣。對前述混合物加入無水乙腈(1mL)，更加入2-氰基乙氧基-N，N，N'，N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺(282mg，1.12mmol)之無水乙腈溶液(1mL)。於氬氣環境下且於室溫下攪拌該混合物4小時。接著，以二氯甲烷稀釋前述混合物，並以飽和碳酸氫鈉水及飽和食鹽水洗淨。回收有機層，以硫酸鈉乾燥後，過濾前述有機層。針對所得前述濾液，於減壓下餾除溶劑。將所得殘渣供予充填劑使用胺基二氧化矽凝膠之管柱層析法

(展開溶劑 己烷：丙酮=7：3，含0.05%吡啶)，製得無色糖漿狀之化合物24(0.74g，純度100%，收率87%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN})$: δ 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, CH_2) 、 3.79(s, 6H, OCH_3) 、
3.47-3.64(m, 7H) 、 3.15-3.23(m, 1H) 、 3.11(t, J =6.4Hz, 2H, CH_2) 、
3.01(t, J =5.9Hz, 2H, 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, CH_3) ;

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

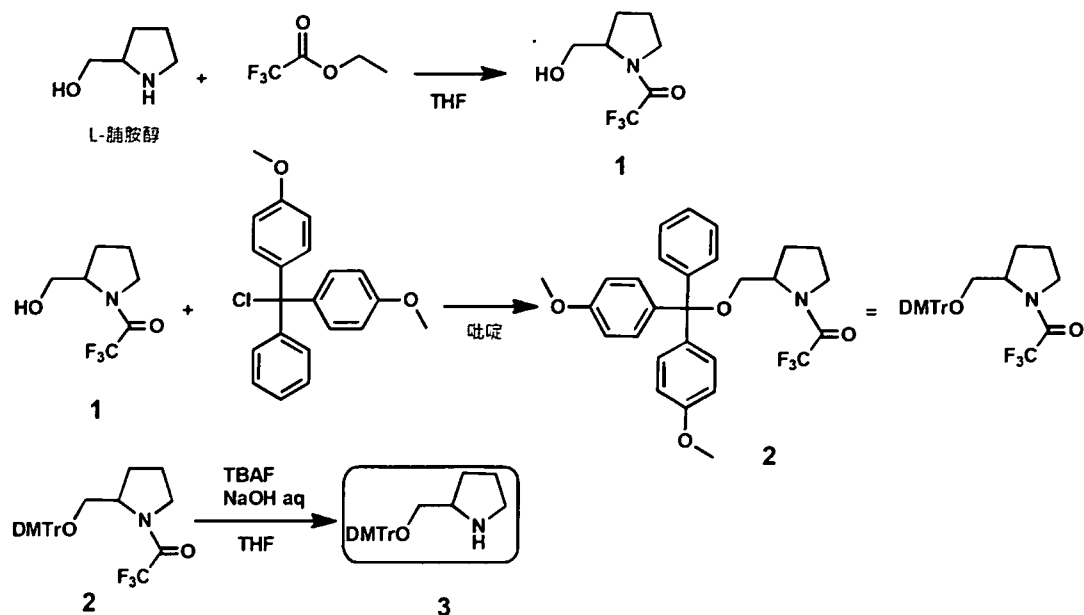
$\text{Ms}(\text{FAB}^+) : m/z$ 776(M^+)、303(DMTr^+) 201($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$).

[0245](實施例A6)

1.受保護脯胺醇之合成

依照以下所示流程6，合成受到二甲氧基三苯甲基保護之脯胺醇(化合物3)。

[0246][化18]



流程6

[0247](1)三氟乙醯基-L-脯胺醇(化合物1)

將L-脯胺醇(2.0g, 20mmol)溶解於THF20mL。另一方面，使三氟乙酸乙酯(3.0g, 21mmol)溶解於THF20mL。接著，將後者之THF溶液滴定至前者之含L-脯胺醇的THF溶液，攪拌12小時。使該反應液減壓濃縮，製得化合物1(3.7g, 收率97%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

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

[0248](2)三氟乙醯基-DMTr-L-脯胺醇(化合物2)

將所得前述三氟乙醯基-L-脯胺醇(化合物1)(3.7g, 19mmol)溶解於吡啶中，於室溫下共沸乾燥3次。使所得殘留物溶解於吡啶15mL中，在氬環境下，於冰浴中一邊攪拌一邊加入4, 4'-二甲氧基三苯甲基氯(DMTr-Cl)(8.1g,

24mmol)，更於室溫下反應4小時。接著，爲了使過剩之DMTr-Cl淬冷，於前述反應液中更加入甲醇10mL並攪拌10分鐘。之後，於前述反應液加入二氯甲烷，以飽和碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水洗淨。使洗淨後之已回收有機層以硫酸鈉乾燥。過濾前述有機層，將所得濾液減壓濃縮，並將其殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 CH_2Cl_2 : CH_3OH =95:5，含0.1%吡啶)，製得已純化之化合物2(8.5g，收率89%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.39-7.18(9H, m, Ar-H), 6.82(4H, d, J =8.6Hz, Ar-H), 3.78(6H, s, OCH_3), 3.70-3.41(5H, H-2, H-5, H-6, m), 2.19-1.85(4H, H-3, H-4, m).

[0249](3)DMTr-L-脯胺醇(化合物3)

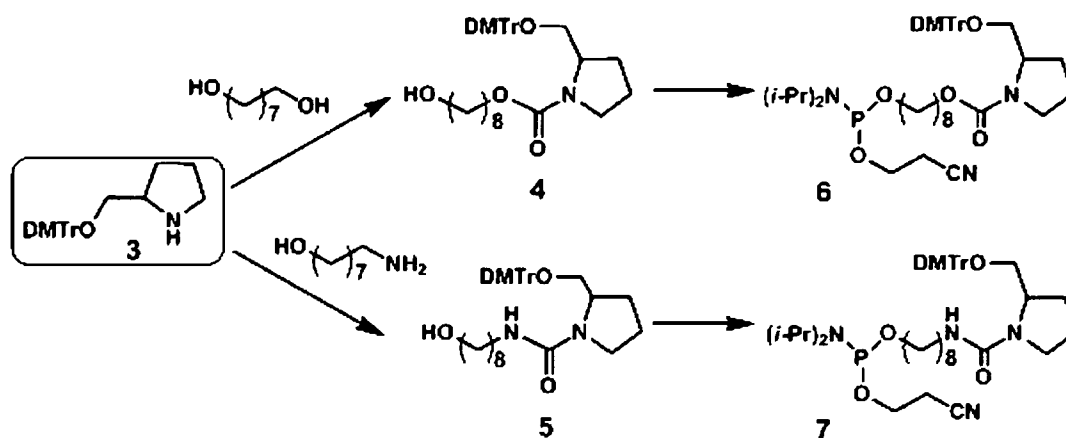
使所得前述三氟乙醯基-DMTr-L-脯胺醇(化合物2)(5g，10mmol)溶解於THF 100mL。於該THF溶液中加入5%氫氧化鈉水溶液100mL並攪拌。於此溶液中加入1M之氟化四正丁基胺(TBAF)溶液5mL，於室溫下攪拌12小時。以飽和碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水洗淨該反應液。使洗淨後之已回收有機層以硫酸鈉乾燥。過濾前述有機層，使所得濾液減壓濃縮，製得化合物3(3.6g，收率90%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

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

[0250] 2.亞醯胺衍生物之合成

使用前述「1.」所合成之受保護脯胺醇(化合物3)，利用下述流程7，合成出結合形式不同且具有脯胺醇之亞醯胺衍生物。

[0251][化19]



流程7

[0252] (1) DMTr-胺甲酸酯-L-脯胺醇(化合物4)

使1, 8-辛二醇(9.0g, 62mmol)溶解於THF 90mL，置於氬環境下。另一方面，將羰基二咪唑(2.0g, 12mmol)溶解於THF 10mL中。將後者之THF溶液加入前者之THF溶液中，於室溫下攪拌1小時。以水洗淨該反應液至1, 8-辛二醇之TLC點消失為止。更將洗淨後所回收之有機層以飽和食鹽水洗淨，以無水硫酸鈉使回收之有機層乾燥。過濾前述有機層，將所得濾液減壓濃縮。將其殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 CH₂Cl₂: CH₃OH=95: 5)，製得已純化之化合物。該化合物為1, 8-辛二醇之單側末端已藉羰基二咪唑而活性化之化合物(2.3g, 收率77%)。

[0253]將前述化合物0.9g溶解於乙腈10mL中，置於氬環境下。另一方面，使DMTr-L-脯胺醇(化合物3)(1.9g，4.8mmol)溶解於乙腈20mL中。將後者之乙腈溶液加入前述前者之乙腈溶液，於室溫下攪拌24小時。接著，以飽和碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水洗淨該反應液，以無水硫酸鈉使回收之有機層乾燥。過濾前述有機層，將所得濾液減壓濃縮。將其殘渣供予二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑二氯甲烷：丙酮=9：1，含0.1%吡啶)，製得已純化之化合物4(脯胺醇胺甲酸酯亞醯胺)(1.5g，收率65%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ ： δ 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, COOCH_2), 3.78(s, 6H, OCH_3), 3.72-2.96(7H, m, alkyl, H-2, H-5, H-6), 2.10-1.30(16H, m, alkyl, H-3, H-4)；

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

[0254](2)DMTr-醯脲-L-脯胺醇(化合物5)

於氬環境下，使三光氣(2.0g，6.7mmol)溶解於THF 10mL中，並於0℃下攪拌。另一方面，使DMTr-L-脯胺醇(化合物3)(1.3g，3.2mmol)及N, N-二異丙基乙基胺(16g，124mmol)溶解於THF 10mL中，滴定至前述三光氣之THF溶液。將該反應液於0℃下攪拌1小時，接著於室溫下攪拌2小時。之後，將8-氨基-1-辛醇(2.3g，16mmol)及N, N-二異丙基乙基胺(5.0g，38mmol)溶解於THF 30mL中。於0℃下將前述攪拌後之反應液滴定至該THF溶液中1小時，接著於室溫

下攪拌48小時。將該反應液減壓濃縮，使其殘渣溶解於二氯甲烷。以飽和碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水洗淨該溶液，並以無水硫酸鈉使回收之有機層乾燥。過濾前述有機層，將所得濾液減壓濃縮後，將其殘渣供予逆相二氧化矽凝膠管柱層析法而純化。此時，展開溶劑使用含有0.1%吡啶之丙酮與水的混合溶劑，令前述丙酮與水之混合比例採步進式(stepwise)，具體來說，則是使丙酮：水之莫耳比依照2：8、3：7、4：6及5：5之順序變化。以二氯甲烷抽提含有目的化合物5之分液，使該有機層以無水硫酸鈉乾燥。過濾前述有機層，使所得濾液減壓濃縮，製得化合物5(脯胺醇醯脲亞醯胺)(0.9g，收率49%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ ： δ 7.40-7.14(9H, m, Ar-H), 6.82(4H, m, Ar-H), 3.78(s, 6H, OCH_3), 3.68-3.25(9H, m, CH_2NH , CH_2OH , H-2, H-5, H-6), 1.74-1.18(16H, m, alkyl, H-3, H-4)；

FAB-MS：575 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

[0255](3)具有脯胺醇之亞醯胺衍生物(化合物6及7)

作為經修飾脯胺醇，將所得前述化合物4(0.80g，1.4mmol)溶解於乙腈，於室溫下共沸乾燥3次。使所得殘留物溶解於乙腈1mL，置於氬環境下。對該乙腈溶液添加四唑二異丙基銨(0.24g，1.4mmol)而作為反應液。另一方面，使2-氰基乙基N, N, N', N'-四異丙基偶磷基二亞醯胺(0.50g，1.7mmol)溶解於乙腈1mL中。將其添加至前述反應液中，於室溫下攪拌4小時。對前述反應液添加二氯甲烷，以飽和

碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水洗淨。以無水硫酸鈉使洗淨後之已回收有機層乾燥，過濾前述有機層，將所得濾液減壓濃縮。將其殘渣供予胺基二氧化矽凝膠管柱層析法(展開溶劑 己烷：丙酮=10：1，含0.1%吡啶)，製得已純化之化合物6(DMTr-胺甲酸酯-L-脯胺醇亞醯胺)(0.90g，收率83%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ ： δ 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, COOCH_2), 3.78(s, 6H, OCH_3), 3.72-2.96(11H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-2, H-5, H-6), 2.58(2H, m, CH_2CN), 2.10-1.46(16H, m, alkyl, H-3, H-4), 1.34-1.10(12H, m, CHCH_3)；

$^{31}\text{P-NMR}(\text{CD}_3\text{CN})$ ： δ 146.82；

FAB-MS：776 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

[0256]除了使用前述化合物5取代前述化合物4來作為前述經修飾脯胺醇以外，同樣地進行處理，製得已純化之化合物7(DMTr-醯脲-L-脯胺醇亞醯胺)(0.80g，收率74%)。以下顯示前述化合物之NMR結果。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ ： δ 7.40-7.14(9H, m, Ar-H), 6.82(4H, m, Ar-H), 3.78(s, 6H, OCH_3), 3.65-3.25(13H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-2, CH_2NH , CH_2OH , H-2, H-5, H-6), 2.73(2H, m, CH_2CN), 2.10-1.48(16H, m, alkyl, H-3, H-4), 1.35-1.10(12H, m, CHCH_3)；

$^{31}\text{P-NMR}(\text{CD}_3\text{CN})$ ： δ 146.83；

FAB-MS：775 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

[0257](實施例B1)RNA之固相合成

合成出具有本發明之連接子的RNA。RNA係以亞磷醯胺法為準且利用核酸合成機(商品名ABI Expedite(註冊商標) 8909 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems), 從3'端側朝向5'端側合成。前述合成中, RNA 亞磷醯胺係使用RNA Phosphoramidites(2'-O-TBDMSi, 商品名, 三千里製藥)(以下相同)。前述亞磷醯胺之脫保護係依定法進行, 合成之RNA係以HPLC純化。於以下之實施例中, 只要無特別表示, 即相同地進行RNA之合成。

[0258]具體來說, 作為本實施例之RNA(Ex), 合成出具有前述流程2之前述化合物12作為連接子的ssRNA(PH-0001)。首先, 合成出下述序列編號1所示序列之RNA。接著, 於前述RNA之5'末端連結前述化合物12。再透過前述化合物12, 於前述序列編號1所示RNA之5'端側合成出下述序列編號2所示序列之RNA。

5'-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3'(序列編號1)

5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-3'(序列編號2)

[0259]茲將如此合成之ssRNA稱為實施例之ssRNA(PH-0001)。前述PH-0001係如下述序列編號3所示般, 構造如下: 於5'端側具有前述序列編號2之RNA序列, 且於3'端側具有前述序列編號1之RNA序列, 前述RNA序列則透過連接子Lx(即前述化合物12)而呈連結。此外, 如下述序列所示, 前述序列編號2之RNA序列與前述序列編號1之

RNA序列具有互補之序列。因此，前述PH-0001係如下式所示般，自黏合而採柄結構(stem structure)。此外，於下述序列中，底線部分GUUGUCAUACUUCUCAUGG(序列編號4)係與GAPDH基因之表現抑制相關的領域。

Ex：PH-0001(序列編號3)

5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-Lx-GGCUGU
UGUCAUACUUCUCAUGGUU-3'

[化20]

CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC\
UGGUACUCUUCUCAUACUGUUGUCGG／Lx

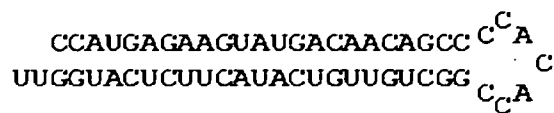
[0260]另一方面，作為不具有本發明之連接子的比較例RNA，則合成RNAi陽性控制組(Pc)之下述shRNA(NH-0001)。如下所示般，前述NH-0001中，5'區域之以大寫字母表示的序列與前述PH-0001同為序列編號2之RNA序列，3'區域之以大寫字母表示的序列則與前述PH-0001同為序列編號1之RNA序列。且，前述NH-0001在序列編號2之RNA序列與序列編號1之RNA序列之間，具有以小寫字母表示之RNA序列來取代前述化合物12作為連接子。前述NH-0001與前述PH-0001相同地如下式所示般，自黏合而形成柄，採取shRNA結構。此外，下述序列中，底線部分GUUGUCAUACUUCUCAUGG(序列編號4)係與表現抑制相關之區域。

Pc：NH-0001(序列編號5)

5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCCccacaccGGCU

GUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3'

[化21]



[0261](實施例B2)HCT116細胞中之GAPDH基因表現抑制效果

使用本發明之RNA，確認活體外(in vitro)之GAPDH基因表現抑制。

[0262](1)材料及方法

使用前述實施例B1之ssRNA(PH-0001)作為實施例之RNA(Ex)。使前述RNA溶解於注射用蒸餾水(大塚製藥，以下相同)至所需濃度(1 μ mol/L、5 μ mol/L、25 μ mol/L)，調製出RNA溶液。

[0263]細胞使用HCT116細胞(DS Pharma Biomedical Co.,Ltd)，培養基使用含有10%FBS之McCoy's 5A(Invitrogen)培養基，令培養條件為37°C及5% CO₂下。

[0264]首先，於前述培養基中培養HCT116細胞，將400 μ L之該培養液分別注入24井皿中而成為2 $\times 10^4$ 細胞/井。更將前述井中之細胞培養24小時後，使用轉染試劑Lipofectamine 2000(商品名，Invitrogen)，依照前述轉染試劑所附規程(protocol)將前述RNA進行轉染。具體來說，則是將前述每井之組成設定如下並進行轉染。此外，於前述井中，令前述RNA之最終濃度為1nmol/L、5nmol/L、25nmol/L。

[表1]

表1

(每井之組成：μL)

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

[0265]轉染後，將前述井中之細胞培養24小時，之後使用RNeasy Mini Kit(Qiagen, 荷蘭)，依照所附規程回收RNA。接著，使用逆轉錄酶(商品名SuperScript III, Invitrogen)，依照所附規程而從前述RNA合成出cDNA。接著，如同以下所示般，以合成出之前述cDNA為模板進行PCR，測定GAPDH基因之表現量以及為內部標準之β-肌動蛋白基因的表現量。前述GAPDH基因之表現量已藉前述β-肌動蛋白基因之表現量來修正。

[0266]前述PCR使用LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I(商品名, Roche)作為試劑，並使用Light Cycler DX400(商品名, Roche)作為機器(以下相同)。前述GAPDH基因及β-肌動蛋白基因之擴增分別使用以下之引子組。

GAPDH基因用PCR引子組

5'-GGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGC-3'(序列編號7)

5'-TGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTG-3'(序列編號8)

β -肌動蛋白基因用引子組

5'-GCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3'(序列編號9)

5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGTCAC-3'(序列編號10)

[0267]此外，作為控制組1，亦對僅添加前述(B)100 μ L之細胞測定基因表現量(-)。又，作為控制組2，亦對除了在轉染過程中未添加前述RNA溶液而添加前述(A)1.5 μ L與前述(B)共100 μ L以外經同樣處理之細胞測定基因表現量(mock)。

[0268]而就修正後之GAPDH基因表現量，則令控制組(-)之表現量為1，求出已導入各RNA之細胞的表現量相對值。

[0269](2)結果

茲將其等之結果示於第4圖。第4圖為顯示GAPDH基因表現量相對值之圖表，縱軸為基因表現相對量。如第4圖所示般，前述實施例B1之PH-0001並未損及抑制表現活性。此外，可以想見，前述PH-0001已藉由前述化合物12(本發明之連接子)而安定化。

[0270](實施例B3)人類血清中之安定性

針對本發明之RNA，確認人類血清中之安定性。

[0271](1)材料及方法

實施例之RNA(Ex)使用前述實施例B1之ssRNA(PH-0001)。比較例之RNA則使用前述實施例B1所示之RNAi陽性控制組(Pc)的前述shRNA(NH-0001)。

[0272]首先，於1×PBS中，將混有前述RNA及正常人類血清(MP Biomedicals)之混合液30μl以37℃保溫。於前述混合液30μl中，令前述RNA之添加量為60pmol，前述正常人類血清之添加量為最終濃度10%。接著，從開始保溫起算，於0小時後、0.5小時後、1小時後及2小時後，藉苯酚·氯仿抽提而使反應停止。使所得抽提液於15%聚丙烯醯胺凝膠電泳後，以SYBR Green II(商品名，Lonza)染色，並使用E-BOX-VX2(MS機器，東京)分析。

[0273](2)結果

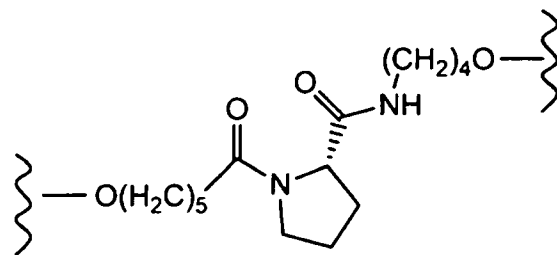
茲將其結果示於第5圖。第5圖為顯示安定性之電泳照片。於第5圖中，巷(lane)「M」為分子量標記，(h)表示保溫時間。

[0274]如第5圖所示，由天然核苷酸構成之比較例NH-0001於保溫0.5小時後即已開始迅速的分解反應，結果，已確認於0.5~2小時之全部結果均是RNA尺寸較0小時之結果更小。相對於此，含有本發明之連接子的實施例PH-0001則幾乎未確認到伴隨保溫時間經過之泳動度變化，亦即，幾乎未確認到因分解而引起的分子量減少。由此一結果證實，可藉由使用具有本發明之連接子的RNA來提高人類血清中之安定性。

[0275](實施例B4)HCT116細胞中GAPDH基因之表現抑制效果

合成出具有含脯胺酸之下式連接子的ssRNA，確認GAPDH基因之表現抑制效果。

[化22]



[0276](1)材料及方法

(1.1)ssRNA之固相合成

與前述實施例B1同樣地藉由亞磷醯胺法合成出前述RNA。

[0277]實施例之RNA(Ex)使用以下所示之ssRNA(PK-0004)。於下述序列中，「Lx」及「Ly」分別為含脯胺酸之前述式(化22)的连接子。合成前述ssRNA時，依序列編號11，使用前述RNA亞醯胺(商品名RNA Phosphoramidites，三千里製藥)，從3端側起合成RNA，「Lx」及「Ly」之部位連結有前述實施例A3-1所合成出之DMTr-二醯胺-L-脯胺酸亞醯胺(流程3之化合物10)。此外，於前述序列中，GUUGUCAUACUUCUCAUGG(序列編號4)之序列係與表現抑制相關的區域。

[化23]

Ex ssRNA (序列編號11)



[0278]比較例之RNA使用RNAi陰性控制組(Nc)之ssRNA(PK-0003)。於下述序列中，「Lx」及「Ly」分別為

•



(B)+(C)	98.5
合計	500

[0281](2)結果

茲將該等結果示於第6圖。第6圖為圖表，顯示GAPDH基因表現量之相對值。如第6圖所示，具有本發明之連接子的實施例PK-0004顯示強烈之抑制基因表現活性，其活性對投予量呈相依性。另一方面，陰性控制組之PK-0003則未觀察到抑制效果。

[0282](實施例B5)截切器(dicer)蛋白質之反應性

確認重組人類蛋白質對於ssRNA(業經具有脯胺酸之連接子取代)的反應性。

[0283](1)材料及方法

實施例之RNA(Ex)使用前述實施例B4之ssRNA(PK-0004)。比較例之RNA則使用前述實施例B4所示RNAi陰性控制組(Nc)之ssRNA(PK-0003)及以下所示RNAi陽性控制組(Pc)之ssRNA(NK-0016)。前述NK-0016構造如下：前述5'側區域(Xc)及前述內部5'側區域(X)、前述3'側區域(Yc)及前述內部3'側區域(Y)與前述PK-0004為相同序列，前述Xc與X之間、Yc與Y之間具有聚核苷酸作為連接子以取代前述PK-0004之前述式(化22)的連接子(Lx、Ly)。

[0284][化25]

0 2

0 2

因的表現抑制效果

使用業經具有脯胺酸之連接子取代的ssRNA，確認活體外之GAPDH基因表現抑制。

[0289](1)材料及方法

實施例之RNA(Ex)使用前述實施例B4之ssRNA(PK-0004)。比較例之RNA則使用前述實施例B4所示RNAi陰性控制組(Nc)之ssRNA(PK-0003)。使前述RNA溶解於注射用蒸餾水(大塚製藥)而成為20 μ mol/L，調製出RNA溶液。

[0290]細胞使用A549細胞及293細胞(DS Pharma Biomedical)。前者之培養基使用含10%FBS之DMEM(Invitrogen)，後者之培養基則使用含10%FBS之MEM(Invitrogen)培養基。令培養條件為37°C及5%CO₂下。

[0291]首先，於前述培養基中培養細胞，並將該培養液以400 μ L分別注入24井皿而成為5 $\times$ 10⁴細胞/井。更將前述井中之細胞培養24小時後，使用轉染試劑Lipofectamine 2000(商品名，Invitrogen)，依照前述轉染試劑所附規程而進行轉染。具體來說，則是針對A549細胞及293細胞，分別將前述每井之組成設定如下並進行轉染。於下述組成中，(B)為Opti-MEM(商品名，Invitrogen)，(C)為20 μ mol/L之前述RNA溶液，將兩者合併添加98.5 μ L或99 μ L。此外，於前述井中，令前述RNA之最終濃度為1nmol/L、3nmol/L、10nmol/L。

[表3]

(每井之組成：μL)

	<u>A549 細胞</u>	<u>293 細胞</u>
培養液	400	400
(A) Lipofectamine 2000	1.5	1
(B)+(C)	98.5	99
合計	500	500

[0292]轉染後，與前述實施例B4同樣地進行前述細胞之培養、RNA回收、cDNA合成及PCR，測定GAPDH基因之相對表現量。

[0293](2)結果

茲將該等結果示於第8及9圖。第8圖為A549細胞之結果，第9圖為293細胞之結果。第8及9圖為顯示GAPDH基因表現量相對值之圖表。如第8及9圖所示，得知實施例之PK-0004顯示出強烈之抑制基因表現活性，且顯示出濃度相依性之效果。另一方面，陰性控制組之PK-0003則未觀察到抑制效果。

[0294](實施例B7)HCT116細胞中之GAPDH基因表現抑制效果

使用業經具脯胺酸或脯胺醇之連接子取代的ssRNA，確認HCT116細胞中之GAPDH表現抑制效果。

[0295](1)材料及方法

(1.1)ssRNA之固相合成

作為實施例之RNA(Ex ssRNA)，與前述實施例B4相同

• •

茲將該等結果示於第10圖。第10圖係顯示HCT116細胞之GAPDH基因表現量相對值的圖表。如第10圖所示，得知含脯胺酸或脯胺醇之ssRNA(PK-0004、PK-0006、PK-0010、PK-0012、PK-0016)顯示出強烈的抑制基因表現活性，且顯示出濃度相依性之效果。

[0300](實施例B8)HCT116細胞中之GAPDH基因表現抑制效果

使用業經具脯胺酸之連接子取代的ssRNA，確認HCT116細胞中之GAPDH表現抑制效果。

[0301](1)材料及方法

(1.1)ssRNA之固相合成

作為實施例之RNA(Ex ssRNA)，與前述實施例B4相同地合成出Ex ssRNA。只要無特別表示，前述RNA之合成係以前述實施例B4為準。

[化27]



[0302]連接子用亞醯胺係使用前述實施例A3-1合成之D-脯胺酸二醯胺亞醯胺(流程3之化合物9)及前述實施例A4合成之脯胺酸二醯胺亞醯胺B型(流程4之化合物22)。針對合成出之各RNA，將用於合成連接子部之亞醯胺顯示於下表。

[0303][表5]

ssRNA	用於 Lx 及 Ly 之亞醯胺
PK-0034	D-脯胺酸二醯胺亞醯胺

	(流程 3 之化合物 9)
PK-0036	脯胺酸二醯胺亞醯胺 B 型 (流程 4 之化合物 22)
PK-0004	L-脯胺酸二醯胺亞醯胺 (流程 3 之化合物 10)

[0304](1.2)基因之表現抑制

除了使用前述RNA以外，與前述實施例B4同樣地進行對HCT116細胞之轉染、培養、RNA回收、cDNA合成及PCR，測定出GAPDH基因之相對表現量。

[0305](2)結果

茲將該等結果顯示於第11圖。第11圖係顯示HCT116細胞之GAPDH基因表現量相對值的圖表。如第11圖所示，得知含脯胺酸之ssRNA(PK-0004、PK-0034、PK-0036)顯示出強烈的抑制基因表現活性，且顯示出濃度相依性之效果。

[0306](實施例B9)活體外之TGF- β 1基因表現抑制效果

使用業經具有脯胺酸之連接子取代的ssRNA，確認Hepal-6細胞中之TGF表現抑制效果。

[0307](1)材料及方法

(1.1)ssRNA之固相合成

作為實施例之RNA，合成出以下所示之PK-0007、PK-0026、PK-0027、PK-0028。只要無特別表示，前述RNA之合成係以前述實施例B4為準。連接子用亞醯胺則使用前述實施例A3-1合成之L-脯胺酸二醯胺亞醯胺(流程3之化合物10)。各RNA具有可抑制TGF- β 1基因表現之21個鹼基長的下述序列。該序列係基於Cheng氏等人所使用的siRNA(Mol. Pharm., 2009, 6, 772-779)為準而設計者。於下述序列中，「*」

表示自由鹼基。

TGF- β 1基因抑制表現序列(序列編號18)

5'-AAAGUCAAUGUACAGCUGCUU-3'

[化28]

PK-0007 (序列編號14)

5'-cagcuguacauugacuuuagcc-Lx-GGCUAAAGUCAAUGUACAGCUG^{*}CUUC-Ly-gaa-3'
Xc Z Yc

PK-0026 (序列編號15)

5'-agcuguacauugacuuuagcc-Lx-GGCUAAAGUCAAUGUACAGCUG^{**}CUUC-Ly-gaa-3'
Xc1 Z Yc

PK-0027 (序列編號16)

5'-agcagcuguacauugacuuuagcc-Lx-GGCUAAAGUCAAUGUACAGCUG^{*}CUUC-Ly-g-3'
Xc Z Yc

PK-0028 (序列編號17)

5'-gcagcuguacauugacuuuagcc-Lx-GGCUAAAGUCAAUGUACAGCUG^{**}CUUC-Ly-g-3'
Xc Z Yc

[0308](1.2)基因之表現抑制

將已冷凍保存之前述RNA溶解於注射用蒸餾水(大塚製藥)而成為20 μ mol/L，調製出RNA溶液。

[0309]細胞使用 Hepal-6 細胞(理化學研究所 BioResource Center)，培養基使用含 10%FBS 之 DMEM(Invitrogen)培養基。令培養條件為37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下。

[0310]首先，於前述培養基中培養Hepal-6細胞，將該培養液以400 μ L分別注入24井皿中，成為3 $\times$ 10⁴細胞/井。接著，除了使用前述RNA溶液以外，與前述實施例B4同樣地進行對Hepal-6細胞之前述ssRNA轉染、RNA回收及cDNA

合成。此外，就前述轉染而言，令前述井中之前述RNA的最終濃度為1nmol/L。接著，除了引子使用下述TGF- β 1基因用PCR引子組及 β -肌動蛋白基因用引子組以外，與前述實施例B4同樣地進行PCR，測定TGF- β 1基因表現量及內部標準之 β -肌動蛋白基因表現量。前述TGF- β 1基因表現量已藉內部標準之 β -肌動蛋白基因表現量來修正。

TGF- β 1基因用PCR引子組

5'-CCATTGCTGTCCCGTGCAGAGCTG-3'(序列編號19)

5'-ATGGTAGCCCTTGGGCTCGTGGATC-3'(序列編號20)

β -肌動蛋白基因用引子組

5'-GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3'(序列編號21)

5'-GCAATGCCTGGGTACATGGTGG-3'(序列編號22)

[0311]此外，與前述實施例B4同樣地就控制組(-)及控制組(mock)測定基因表現量。接著，針對修正後之TGF- β 1基因表現量，令控制組(-)之細胞表現量為1，求出導入有各RNA之細胞的表現量相對值。

[0312](2)結果

茲將該等結果示於第12圖。第12圖係顯示TGF- β 1基因表現量相對值之圖表。如第12圖所示，含脯胺酸之ssRNA全部顯示出強烈的抑制基因表現活性。

[0313]其中，尤以自由鹼基之位置在前述內部區域(Z)

中自3'末端起算為第2個及第3個之PK-0027及PK-0028較PK-0007及PK-0026(自由鹼基之位置在前述內部區域(Z)中自3'末端起算為第4個及第5個)顯示出更高之抑制表現活性。從此結果得知，前述內部區域(Z)中之自由鹼基的位置與前述內部領域之中央相較下，越靠3'端側配置可提高前述抑制表現活性。另外，舉例來說，前述自由鹼基之位置與前述內部領域之中央相較下越靠5'端側配置可提高前述抑制表現活性，此事亦已確認完畢。此種自由鹼基之位置與抑制表現活性之關係係與後述參考例之結果顯示出同樣的特性(behavior)。

[0314](實施例B10)活體內之TGF- β 1基因表現抑制效果及急性肺傷害抑制效果

使用業經具有脯胺酸之連接子取代的ssRNA，確認活體內(in vivo)之基因表現抑制及急性肺傷害抑制的效果。前述效果之確認係依照Takagi氏等人(J. Thromb Hemost 2009 ; 7 : 2053-2063)所記載之方法進行。

[0315](B10-1)活體內之TGF- β 1基因表現抑制效果

使用業經具有脯胺酸之連接子取代的ssRNA，確認活體內(in vivo)之TGF- β 1基因表現抑制效果。

[0316](1)材料及方法

(1.1)對急性肺傷害小鼠投予RNA

實施例之RNA(Ex)使用前述實施例B9中之ssRNA(PK-0007)。比較例之RNA使用以下所示陰性控制組(Nc)之ssRNA(PK-0008)、陽性控制組(Pc)之ssRNA(NK-0033)

及其陰性控制組(Nc)之ssRNA(NK-0035)、陽性控制組(Pc)之dsRNA(NI-0030)及其陰性控制組(Nc)之dsRNA(NI-0031)。

[0317][化29]

PK-0007 (序列編號14)



PK-0008 (序列編號23)



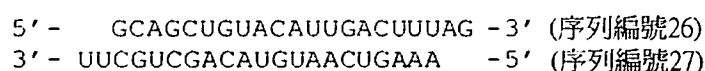
NK-0033 (序列編號24)



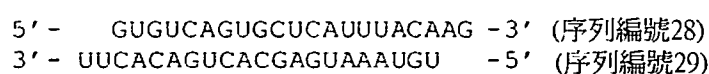
NK-0035 (序列編號25)



NI-0030



NI-0031



[0318]使100μg之前述RNA溶解於滅菌生理食鹽水75μl，調製出RNA溶液。另一方面，使100μg之脂多醣(LPS)溶解於滅菌生理食鹽水50μl，調製出LPS溶液。

[0319]首先，使80μl之前述RNA溶液滴定至小鼠之氣管內。從滴定起1小時後，使50μl之前述LPS溶液滴定至前述小鼠之氣管內而誘發肺傷害。

[0320]作為相對於前述LPS之陰性控制組，使用50μl未添加LPS之滅菌生理食鹽水來取代前述LPS溶液。此外，相

對於前述RNA溶液之陰性控制組則使用80μl之滅菌生理食鹽水。

[0321]以下顯示各投予群。各投予群使用4~6隻小鼠。

・投予群1

自投予75μl之滅菌生理食鹽水起5分鐘後，投予滅菌生理食鹽水50μl。

・投予群2

自投予75μl之滅菌生理食鹽水起5分鐘，投予前述LPS溶液50μl。

・投予群3

自投予75μl之RNA溶液(PK-0007)起5分鐘後，投予前述LPS溶液50μl。

・投予群4

自投予75μl之RNA溶液(PK-0008)起5分鐘後，投予前述LPS溶液50μl。

・投予群5

自投予75μl之RNA溶液(NK-0033)起5分鐘後，投予前述LPS溶液50μl。

・投予群6

自投予75μl之RNA溶液(NK-0035)起5分鐘後，投予前述LPS溶液50μl。

・投予群7

自投予75μl之RNA溶液(NI-0030)起5分鐘後，投予前述LPS溶液50μl。

・ 投予群8

自投予75 μ l之RNA溶液(NI-0031)起5分鐘後，投予前述LPS溶液50 μ l。

[0322](1.2)支氣管肺胞洗淨液(BALF)之採樣

自滴定前述LPS溶液或滅菌生理食鹽水(相對於LPS之陰性控制組)起24小時後，對前述小鼠之腹腔投予過剩量之戊巴比妥使其安樂死。接著採取肺而製成樣本。

[0323]針對前述小鼠之肺樣本，使用TGF- β 1 Quantikine Colorimetric Sandwich ELISA(商品名，R&D Systems社)，測定每單位重量之肺的TGF- β 1表現量。

[0324](2)結果

茲將其結果示於第13圖。第13圖為圖表，顯示各投予群中每單位重量之肺的TGF- β 1基因表現量，橫軸顯示TGF- β 1蛋白質之表現量。LPS(+)/PK-0007(+)-之投予群3與LPS(+)/ssRNA(-)-之投予群2相較下，TGF- β 1蛋白質之表現量明顯受到抑制。此一抑制效果明顯較LPS(+)/陽性控制組NK-0033(+)-之投予群5及LPS(+)/陽性控制組NI-0030之投予群7更強。另外，陰性控制組PK-0008(+)-之投予群4、陰性控制組NK-0035(+)-之投予群6及陰性控制組NI-0031(+)-之投予群8均未確認到抑制效果。

[0325](B10-2)活體內之脫靶效果

使用業經具有脯胺酸之連接子取代的ssRNA，確認活體內之脫靶效果，並評估副作用。

[0326]實施例之RNA使用前述實施例B9之

ssRNA(PK-0007)。比較例之RNA則使用前述實施例B10-1所示RNAi陰性控制組(Nc)之前述ssRNA(PK-0008)。將100 μ g之前述RNA溶解於滅菌生理食鹽水75 μ l中，調製出各個RNA溶液。

[0327]以下顯示各投予群。各投予群中使用2~4隻小鼠。

- ・投予群1

投予滅菌生理食鹽水75 μ l

- ・投予群2

投予75 μ l之ssRNA溶液(PK-0007)

- ・投予群3

投予75 μ l之ssRNA溶液(PK-0008)

[0328]接著，自投予起24小時後，與前述實施例B10-1同樣地使小鼠安樂死。穿刺前述小鼠之心臟，回收血液樣本並添加至含有3.8%檸檬酸鈉水溶液之試管。令前述檸檬酸鈉水溶液之量(體積)為前述血液樣本之1/10。依照Yasui氏等人(Am J Respir Crit Care Med 2001: 163: 1660-8)之記載，從該混合液回收BALF樣本。接著，針對前述BALF樣本之上清液，測定TNF- α 量及IFN- β 量。

[0329]前述TNF- α 量係使用商品名Mouse TNF set II(Beckton Dickinson and Company)，依照其使用說明書進行定量。此外，前述IFN- β 量則是使用ELISA盤(使用商品名Rabbit Anti-Mouse Interferon β (PBL InterferonSource)及商品名Biotin Labeling Kit-NH2(同仁化學研究所)製作)，依照其

等之使用說明書進行定量。

[0330]茲將其結果示於第14圖。第14(A)圖為圖表，顯示各投予群之BALF樣本中的TNF- α 量；第14(B)圖為圖表，顯示各投予群之BALF樣本中的IFN- β 量。於第14圖中，橫軸顯示各別之量。前述PK-0007(+)-之實施例投予群2與ssRNA(-)-之投予群1相較下，並未誘發TNF- α 及IFN- β 之表現。

[0331](實施例B11)核糖核酸酶耐性

針對本發明之ssRNA確認核糖核酸酶耐性。

[0332](1)材料及方法

實施例之RNA(Ex)使用實施例B9之ssRNA(PK-0007)。比較例之RNA使用前述實施例B10-1所示陽性控制組(Pc)之dsRNA(NI-0030)。

[0333]首先，於20mmol/L之Tris-HCl(pH8)中混入60pmol之前述RNA、 5×10^{-5} 單位之RNase A(Roche)及 5×10^{-5} 單位之RNase T1(Roche)，於37°C下保溫(incubate)。自開始保溫起算10分鐘、20分鐘、30分鐘後依定法使RNase反應停止。接著，使前述反應液於15%聚丙烯醯胺凝膠中電泳後，以SYBR Green II(Lonza，瑞士)染色，並使用E-BOX-VX2(MS機器，東京)進行分析。

[0334](2)結果

茲將該結果示於第15圖。第15圖為顯示核糖核酸酶耐性之電泳照片。於第15圖中，巷「M」為分子量標記，(min)表示保溫時間。

[0335]如第15圖所示，由天然核苷酸構成之比較例NI-0030於保溫10分鐘後幾乎完全分解。相對於此，實施例之PK-0007即使在保溫10分鐘後亦殘存下來。從此結果得知，本發明之ssRNA較dsRNA具有更優異之核糖核酸酶耐性。

[0336](實施例B12)核酸酶耐性

針對本發明之ssRNA確認核酸酶耐性。

[0337](1)材料及方法

實施例之RNA(Ex)使用實施例B9之ssRNA(PK-0007)。比較例之RNA使用實施例B10-1所示RNAi陽性控制組(Pc)之dsRNA(NI-0030)。

[0338]首先，於含有5mmol/L CaCl_2 之50mmol/L Tris-HCl(pH8)中，混入60pmol之前述ssRNA、0.5單位之S7核酸酶(Roche)，於37°C下保溫。自保溫開始(0h)起0.5小時後，依定法使S7核酸酶之反應停止。接著，使前述反應液依定法而在7M尿素-15%聚丙烯醯胺凝膠中電泳後，以SYBR Green II(商品名，Lonza)染色，並使用E-BOX-VX2(商品名，MS機器)分析。

[0339](2)結果

茲將該結果示於第16圖。第16圖為顯示S7核酸酶耐性之電泳照片。於第16圖中，巷「M」為分子量標記。此外，(h)表示保溫時間。

[0340]如第16圖所示，由天然核苷酸構成之比較例NI-0030在保溫0.5小時後幾乎全部分解。相對來說，實施例之PK-0007即使在保溫0.5小時後亦殘存下來。從此結果得

知，本發明之 ssRNA 較 dsRNA 具有更優異之 S7 核酸酶耐性。

[0341] 從前述實施例 B 之各個結果得知，舉例來說，本發明之 ssPN 可不依賴目標基因之種類而建構出。據此，本發明之 ssPN 分子在抑制基因之表現上可不依賴目標基因之種類來使用，可說是高泛用性之新穎工具。

[0342] (參考例 1)

使用自由鹼基位置不同之 ssRNA，確認活體外之 GAPDH 基因表現抑制。

[0343] (1) 材料及方法

RNA 使用第 17 圖所示 ssRNA。於第 17 圖中，右端之編號表示序列編號。於第 17 圖中，自 5' 端側起，小寫字母底線區域表示前述區域 (Xc)，大寫字母底線區域表示前述內部區域 (Z)，小寫字母底線區域表示前述區域 (Yc)。前述 Xc 與前述 Z 之間為連結區域 (Lx)，前述 Z 與前述 Yc 之間為連結區域 (Ly)。此外，「Xc/Yc」表示前述區域 (Xc) 之鹼基長 (Xc) 與前述區域 (Yc) 之鹼基長 (Yc) 的比。於第 17 圖中，「*」表示自由鹼基。

[0344] 各 ssRNA 均是令內部區域 (Z) 之鹼基長為 26 個鹼基、連結區域 (Lx) 之鹼基長為 7 個鹼基、連結區域 (Ly) 之鹼基長為 4 個鹼基。此外，NK-0036 及 NK-0040 係令前述區域 (Xc) 與前述區域 (Yc) 之合計鹼基數 (Xc + Yc) 為 26 個鹼基，除此之外，令前述區域 (Xc) 與前述區域 (Yc) 之合計鹼基數 (Xc + Yc) 為 25 個鹼基。接著，在此條件下，使前述區域 (Xc) 及

前述區域(Yc)之鹼基長發生變化。藉此，令NK-0036及NK-0040成為不具有自由鹼基之分子。又，該等以外之各ssRNA則是令前述內部區域(Z)中不形成雙股之自由鹼基全部為1個鹼基，且使前述內部區域(Z)中之前述自由鹼基的位置從3'端側變動為5'端側。

[0345]除了回收前述RNA以外，與前述實施例B2同樣地進行對HCT116細胞之轉染、培養、RNA回收、cDNA合成及PCR，測定GAPDH基因之相對表現量。轉染時之RNA濃度為10nmol/L。

[0346](2)結果及考察

茲將該等結果示於第18圖。第18圖為圖表，顯示使用最終濃度10nmol/L之RNA時GAPDH基因表現量之相對值。如第18圖所示，使前述5'端側區域(Xc)及前述3'端側區域(Yc)之長度發生變化的任一ssRNA均已確認GAPDH基因之表現抑制。

[0347]特別是，隨著前述區域(Xc)之鹼基長與前述區域(Yc)之鹼基長的差增大，基因之表現量相對地降低，而確認抑制表現活性已增加。亦即，越使前述內部區域(Z)中之自由鹼基的位置較前述內部領域中央更靠5'端側或3'端側配置，越可提高前述抑制表現活性。

[0348](參考例2)

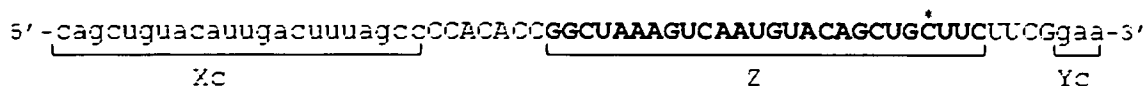
使用自由鹼基位置不同之ssRNA，確認活體外之TGF- β 1基因的表現抑制效果。

[0349](1)材料及方法

RNA使用下示ssRNA。於下述序列中，「*」表示自由鹼基。

[化30]

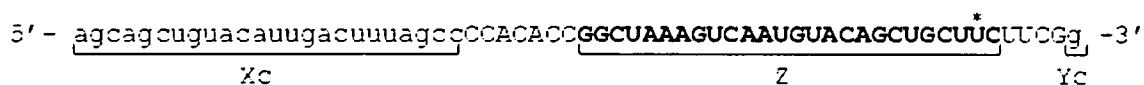
NK-0033 (序列編號49)



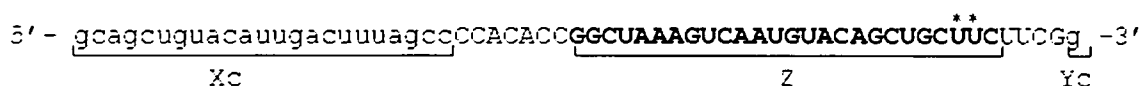
NK-0061 (序列編號50)



NK-0055 (序列編號51)



NK-0062 (序列編號52)



[0350](1.2)基因之表現抑制

將已冷凍保存之前述RNA溶解於注射用蒸餾水(大塚製藥)而成為20μmol/L，調製出RNA溶液。接著，除了使用前述RNA溶液之外，與前述實施例B9同樣地進行對Hepal-6細胞之前述ssRNA的轉染、RNA回收、cDNA合成及PCR。測定TGF-β1基因之相對表現量。轉染時之RNA濃度為1nmol/L。

[0351](2)結果

茲將該等結果示於第19圖。第19圖係顯示TGF-β1基因表現量相對值之圖表。如第19圖所示，任一ssRNA均顯示抑制基因表現之活性。此外，使自由鹼基之位置在前述內

部區域(Z)中自3'末端起算為第2個及第3個之NK-0055及NK-0062與NK-0033及NK-0061(使自由鹼基之位置在前述內部區域(Z)中自3'末端起算為第4個及第5個)相較下，顯示出更高之抑制表現活性。此結果與以不同基因為目標之前述參考例1具有相同特性。

[0352](參考例3)

使用自由鹼基之位置不同的ssRNA，確認活體外之LAMA1基因的表現抑制。

[0353](1)材料及方法

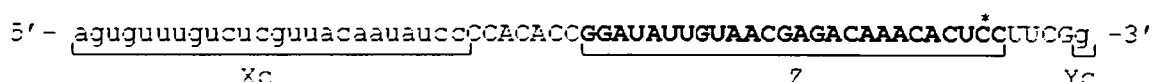
RNA使用以下所示ssRNA。下述序列中，「*」表示自由鹼基。

[化31]

NK-0043 (序列編號53)



NK-0064 (序列編號54)



[0354]除了使用前述RNA之外，與前述實施例B6相同地對293細胞進行轉染，將前述細胞培養48小時。令轉染時之RNA濃度為10nmol/L。接著，除了引子使用以下之LAMA1基因用引子組之外，與前述實施例B2相同地進行RNA回收、cDNA合成及PCR，測定LAMA1基因表現量及內部標準之β-肌動蛋白基因表現量。前述LAMA1基因之表現量已藉由內部標準之β-肌動蛋白基因表現量來修正。

LAMA1基因用引子組

5'-AAAGCTGCCAATGCCCCTCGACC-3'(序列編號55)

5'-TAGGTGGGTGGCCCTCGTCTTG-3'(序列編號56)

[0355]此外，與前述實施例B2同樣地，亦就控制組1(-)及控制組2(mock)測定表現量。之後，針對修正後之LAMA1基因表現量，令控制組(-)之細胞表現量為1，求出已導入各RNA之細胞的表現量相對值。

[0356](2)結果

茲將該等結果示於第20圖。第20圖為圖表，顯示293細胞中之LAMA1基因表現量的相對值。如第20圖所示，任一ssRNA均顯示出抑制基因表現之活性。此外，使自由鹼基之位置在前述內部區域(Z)中自3'末端起算為第2個之NK-0064與NK-0043(使自由鹼基之位置在前述內部區域(Z)中自3'末端起算為第4個)相較下顯示出更高之抑制表現活性。此結果與以不同基因為目標之前述參考例1及參考例2具同樣特性。

[0357](參考例4)

使用自由鹼基位置不同之ssRNA，確認活體外之LMNA基因表現抑制。

[0358](1)材料及方法

RNA使用以下所示ssRNA。下述序列中，「*」表示自由鹼基。

[化32]

NK-0063 (序列編號57)

5'-cgucacacaaaaagcgcaauuccCCACACCGGAAUUGCGCUUUUUGGUGACGCUUCUUGgaa-3'
Xc Z Yc

NK-0066 (序列編號58)

5'-agcgucacacaaaaagcgcaauuccCCACACCGGAAUUGCGCUUUUUGGUGACGCUUCUUGg-3'
Xc Z Yc

[0359]除了使用前述RNA之外，與前述實施例B64相同地對A549細胞進行轉染，培養前述細胞48小時。令轉染時之RNA濃度為3nmol/L。接著，除了引子使用以下之LMNA基因用引子組之外，與前述實施例B2相同地進行RNA回收、cDNA合成及PCR，測定LMNA基因之表現量及內部標準之β-肌動蛋白基因表現量。前述LMNA基因表現量已藉由內部標準之β-肌動蛋白基因表現量修正。

LMNA基因用引子組

5'-CTGGACATCAAGCTGGCCCTGGAC-3'(序列編號59)

5'-CACCAGCTTGCGCATGGCCACTTC-3'(序列編號60)

[0360]此外，與前述實施例B2相同地，亦就控制組1(-)及控制組2(mock)測定表現量。接著，針對修正後之LMNA基因表現量，令控制組(-)之細胞表現量為1，求出已導入各RNA之細胞的表現量相對值。

[0361](2)結果

茲將該等結果顯示於第21圖。第21圖為圖表，顯示A549細胞之LMNA基因表現量的相對值。如第21圖所示，得知

任一ssRNA均顯示出抑制基因表現活性。此外，使自由鹼基之位置在前述內部區域(Z)中自3'末端起算為第2個之NK-0066相較於NK-0063(使自由鹼基之位置在前述內部區域(Z)中自3'末端起算為第4個)顯示出更高之抑制表現活性。此一結果與以不同基因為目標之前述參考例1~參考例3具相同之特性。

[0362]從參考例1~參考例4之結果可明確得知，舉例來說，就自由鹼基之位置而言，可不論目標基因之種類及對其之抑制表現序列而顯示出同樣的特性。且於前述實施例B9中，顯示出與該等參考例同樣之特性，此係如前所述。

[0363](參考例5)

使用已使前述內部5'端側區域(X)、前述5'端側區域(Xc)、前述內部3'端側區域(Y)及前述3'端側區域(Yc)之各長度發生變化的ssRNA，確認活體外之GAPDH基因表現抑制。

[0364](1)材料及方法

RNA使用第22圖所示ssRNA。於第22圖中，右端之編號表示序列編號。於第22圖中，從5'端側起，劃底線之小寫字母區域表示前述區域(Xc)，劃底線之大寫字母區域表示前述內部區域(Z)，劃底線之小寫字母區域表示前述區域(Yc)。此外，「 $Xc+Yc/X+Y$ 」表示前述區域(Xc)之鹼基長(Xc)及前述區域(Yc)之合計鹼基長(Yc)與前述區域(X)及前述區域(Y)之合計鹼基長的比。於第22圖中，「*」表示自由鹼基。

[0365] 各ssRNA均是令連結區域(Lx)之鹼基長為7個鹼基、連結區域(Ly)之鹼基長為4個鹼基、前述區域(Yc)之鹼基長為1個鹼基，且令前述內部區域(Z)自3'端側起算之第2個鹼基為自由鹼基。接著，使前述內部區域(Z)之鹼基長與前述區域(Xc)之鹼基長發生變動。

[0366] 只要未特別表示，與前述實施例B2相同地，針對前述RNA進行對於HCT116細胞之轉染、培養、RNA回收、cDNA合成及PCR，算出GAPDH基因表現量之相對值。前述轉染之條件則是令前述每井之組成與實施例B4之表2相同。

[0367] (2)結果及考察

茲將該等結果示於第23圖。第23圖為圖表，顯示使用最終濃度1nmol/L之RNA時，GAPDH基因表現量之相對值。如第23圖所示，已使前述區域(X)、前述區域(Xc)、前述區域(Y)及前述區域(Yc)之長度發生變化的任一ssRNA均已確認GAPDH基因之表現抑制。

[0368] 以上，參照實施形態來說明本案發明，但本案發明並非受上述實施形態所限定者。本案發明之構成及詳情可在本案發明之要旨(scope)範圍內進行業界人士可理解之各種變更。

[0369] 本申請案主張以下列申請案為基礎之優先權，並在此納入其等之全部揭示內容：已於2010年8月3日提申之日本申請案特願2010-174915號、已於2010年10月13日提申之日本申請案特願2010-230806號、已於2010年12月2日提

申之日本申請案特願2010-269823號以及已於2011年7月8日提申之日本申請案特願2011-152381號。

產業上之可利用性

[0370]若依本發明之ssPN分子，可抑制基因之表現，且因非為環狀而合成容易，又，因其為單股，無需雙股之黏合步驟，而可效率良好地進行製造。此外，因前述連結區域含有前述非核苷酸殘基，舉例來說，可不限於如同習知之核苷酸殘基的改變，例如，亦可進行前述連結區域中之修飾等的改變。如此，由於本發明之ssPN分子係如前述般可抑制目標基因表現，舉例來說，作為醫藥品、診斷藥及農藥，以及農藥、醫學及生命科學等之研究工具均甚有用。

【符號說明】

(無)

【生物材料寄存】

(不需寄存)

【序列表】

<110> BONAC CORPORATION

<120> 具有含氮脂環骨架之單股核酸分子

<130> TF11004TW

<150> JP 2010-174915

<151> 2010-08-03

<150> JP 2010-230806

<151> 2010-10-13

<150> JP 2010-269823

<151> 2010-12-02

<150> JP 2011-152381

<151> 2011-07-08

<160> 69

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 1

ggcuguuguc auacuucuca ugguu 25



<210> 2

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子



<400> 2

ccaugagaag uaugacaaca gcc 23

<210> 3

<211> 48

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 3

ccaugagaag uaugacaaca gccgggcuguu gucauacuuc ucaugguu 48

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 4

guugucauac uucucaugg 19

<210> 5

<211> 55

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 5

ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguu 55

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

●<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 6

auuguaacga gacaaacac 19

●<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400>	7	
ggagaaggct ggggctcatt tgc		23
<210>	8	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引子	
<400>	8	
tggccagggg tgctaagcag ttg		23
<210>	9	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引子	
<400>	9	
gccacggctg cttccagctc ctc		23

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 10

aggtctttgc ggatgtccac gtcac 25

<210> 11

<211> 51

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 11

caugagaagu augacaacag ccggcuguug ucauacuucu caugguucga a 51

<210> 12

<211> 51

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 12

ccaaucaacga uaagugaaag ccggcuuuca cuuauCGuug auggcuucga a 51

<210> 13

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 13

caugagaagu augacaacag cccacacacg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg 60

aa 62

<210> 14

<211> 51

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 14

agcuguaca uugacuuuag ccggcuaaag ucaauguaca gcugcuucga a 51

<210> 15

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 15

agcuguacau ugacuuuagc cggcuaaagu caauguacag cugcuucgaa 50

<210> 16

<211> 51

I572716

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 16

agcagcugua cauugacuuu agccggcuaa agucaaugua cagcugcuuc g 51

<210> 17

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 17

gcagcuguac auugacuuua gccggcuaaa gucaauguac agcugcuucg 50

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 18

aaaguccaag uacagcugcu u 21

<210> 19

●<211> 24

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 19

●ccattgctgt cccgtgcaga gctg 24

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 20

atggtagccc ttgggctcgt ggatc 25

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 21

gtcgtaccac aggcattgtg atgg 24

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 22

gcaatgcctg ggtacatggt gg 22

<210> 23

<211> 51

<212> RNA

<213> 人工的

●<220>

<223> 核酸分子

<400> 23

ugucagugcu cauuuacaag ccggcuugua aaugagcacu gacacuucga a 51

<210> 24

●<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 24

cagcuguaca uugacuuuag cccacacccg gcuaaaguca auguacagcu gcuucuucgg 60

aa 62

<210> 25

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 25

ugucagugcu cauuuacaag ccccacaccg gcuuguaaaau gagcacugac acuucuucgg 60

aa 62

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 正意

<400> 26

gcagcuguac auugacuuua g 21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工的

●<220>

<223> 反意

<400> 27

aaagucaaug uacagcugcu u 21

<210> 28

●<211> 21

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 正意

<400> 28

gugucagugc ucauuuacaa g 21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 反意

<400> 29

uguaaaugag cacugacacu u 21

<210> 30

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 30

uugcgcuuuu uggugacgc 19

<210> 31
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 31

●accaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucuu 60

cg 62

<210> 32
<211> 62
<212> RNA
●<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 32

accaugagaa guaugacaac agccccacac ccggcuguugu cauacuucuc augguucuu 60

gg 62

<210> 33
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 33
ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguucuucg 60

ga 62

<210> 34
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 34
caugagaagu augacaacag cccccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg 60

aa 62

<210> 35

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

●<220>

<223> 核酸分子

<400> 35

augagaagua ugacaacagc cccacaccgg cuguugucau acuucucaug guucuucgga 60

ac 62

●

<210> 36

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

I572716

<400> 36
ugagaaguau gacaacagcc ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uucuucggaa 60

cc 62

<210> 37
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 37
agaaguauga caacagcccc acaccggcug uugucauacu ucucaugguu cuucggaacc 60

au 62

<210> 38
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 38

aaguaugaca acagccccac accggcuguu gucauacuuc ucaugguucu ucggaaccau 60

ga 62

<210> 39

●<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 39

●gaaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc ggaaccaga 60

ga 62

<210> 40

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 40

augacaacag ccccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg aaccaugaga 60

ag 62

<210> 41

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 41

acaacagccc cacaccggcu guugucauac uucucauggu ucuucggaac caugagaagu 60

au 62

<210> 42

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 42

aacagcccca caccggcugu ugucauacuu cucaugguuc uucggaacca ugagaaguau 60

ca 62

<210> 43

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 43

cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucuu cggaaccaug agaaguauga 60

ca 62

<210> 44

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 44

agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc ggaaccauga gaaguaugac 60 ●

aa 62

<210> 45

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的 ●

<220>

<223> 核酸分子

<400> 45

gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguucuucg gaaccaugag aaguaugaca 60

ac 62

<210> 46

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 46

ccccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg aaccaugaga aguaugacaa 60

ca 62

-

-

<210> 47

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 47

cccacaccgg cuguugucau acuucucaug guucuucgga accaugagaa guaугacaac 60

ag 62

<210> 48

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 48

ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uucuucggaa ccaugagaag uaugacaaca 60

gc 62

<210> 49

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 49

cagcuguaca uugacuuuag cccacaccg gcuaaaguca auguacagcu gcuucuucgg 60

aa 62

<210> 50

<211> 61

<212> RNA

●<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 50

agcuguacau ugacuuuagc cccacaccgg cuaaagucaa uguacagcug cuucuucgga 60

●a 61

<210> 51

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 51

agcagcugua cauugacuuu agccccacac cggcuaaagu caauguacag cugcuucuuc 60

gg 62

<210> 52

<211> 61

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 52

gcagcuguac auugacuuua gccccacacc ggcuaaaguc aauguacagc ugcucuucg 60

g 61

<210> 53

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 53

uguuugucuc guuacaauau ccccacaccg gauauuguuaa cgagacaaac acuccuucgg 60

ga 62



<210> 54

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子



<400> 54

aguguuuguc ucguuacaau aucccccacac cggauauugu aacgagacaa acacuccuuc 60

gg 62

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 55

aaagctgccca atgccccctcg acc 23

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 56

taggtgggtg gccctcgtct tg 22

<210> 57

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

—



<211> 24

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 59

ctggacatca agctggccct ggac 24

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 60

caccagcttg cgcatggcca cttc 24

<210> 61

<211> 64

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 61

aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucgu 60

ucgc 64



<210> 62

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子



<400> 62

accaugagaa guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuuc 60

gg 62

<210> 63

<211> 60

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 63

accaugagaa guaugacaac agccccacacc gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg 60

<210> 64

<211> 58

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 64

ccaugagaag uaugacaaca gccccacaccg cuguugucau acuucucaug guuuucga 58

<210> 65

<211> 58

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 65

accaugagaa guaugacaac agccacaccc uguugucaua cuucucaugg uucuucgg 58

<210> 66

●<211> 56

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 66

●ccaugagaag uaugacaaca gccacacccu guugucauac uucucauggu uuucga 56

<210> 67

<211> 54

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 67

caugagaagu augacaacag ccacaccug uugucauacu ucucaugguu ucga 54

<210> 68

<211> 54

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 68

ccaugagaag uaugacaaca ccacaccugu ugucauacuu cucaugguuu ucga 54

<210> 69

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

I572716

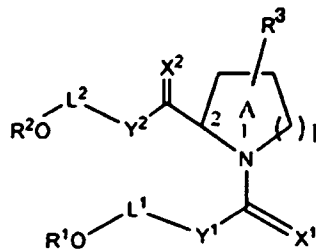
<400> 69

caugagaagu augacaacac cacaccuguu gucauacuuc ucaugguuuc ga 52

申請專利範圍

105年11月18日修正替換頁
第1-6頁

1. 一種單體，係供用於合成核酸分子者，其特徵在於具有下述式(II)之結構：



... (II)

前述式中，

X^1 及 X^2 各自獨立為 H_2 、O、S或NH；

Y^1 及 Y^2 各自獨立為單鍵、 CH_2 、NH、O或S；

R^1 及 R^2 各自獨立為H或保護基；

R^3 係與環A上之C-3、C-4、C-5或C-6鍵結之氫原子或取代基，

前述取代基為選自於由鹵素、OH、 OR^4 、 NH_2 、 NHR^4 、 NR^4R^5 、SH、 SR^4 、側氧基(=O)、烷基、烯基、炔基、鹵烷基、芳基、雜芳基、芳烷基、環烷基、環烯基、環烷基烷基、環基烷基(cyclalkyl)、羥基烷基、烷氧基烷基、胺基烷基、雜環基烯基、雜環基烷基、雜芳基烷基、矽基及矽氧烷基所構成群組之至少一者，

前述 R^4 及 R^5 各自獨立為選自於由保護基、鹵素、烷基、烯基、炔基、鹵烷基、芳基、雜芳基、芳烷基、環烷基、

環烯基、環烷基烷基、環基烷基(cyclylalkyl)、羥基烷基、烷氧基烷基、胺基烷基、雜環基烯基、雜環基烷基、雜芳基烷基、矽基及矽氧烷基所構成群組之至少一者；

L^1 係由 n 個原子構成之伸烷基鏈，於此，伸烷基碳原子上之氫原子可經OH、 OR^a 、 NH_2 、 NHR^a 、 NR^aR^b 、SH或 SR^a 取代或是未經取代，或者，

L^1 為前述伸烷基鏈之1個以上碳原子經氧原子取代而成之聚醚鏈；

但 Y^1 為NH、O或S時，與 Y^1 鍵結之 L^1 的原子為碳，與 OR^1 鍵結之 L^1 的原子為碳，氧原子彼此不鄰接；

L^2 係 m 個原子構成之伸烷基鏈，於此，伸烷基碳原子上之氫原子可經OH、 OR^c 、 NH_2 、 NHR^c 、 NR^cR^d 、SH或 SR^c 取代或是未經取代，或者，

L^2 為前述伸烷基鏈之1個以上碳原子經氧原子取代而成的聚醚鏈，

但 Y^2 為NH、O或S時，與 Y^2 鍵結之 L^2 的原子為碳，與 OR^2 鍵結之 L^2 的原子為碳，氧原子彼此不鄰接；

R^a 、 R^b 、 R^c 及 R^d 各自獨立為保護基或為選自於由鹵素、OH、 OR^4 、 NH_2 、 NHR^4 、 NR^4R^5 、SH、 SR^4 、側氧基(=O)、烷基、烯基、炔基、鹵烷基、芳基、雜芳基、芳烷基、環烷基、環烯基、環烷基烷基、環基烷基(cyclylalkyl)、羥基烷基、烷氧基烷基、胺基烷基、雜環基烯基、雜環基烷基、雜芳基烷基、矽基及矽氧烷基所構成群組之至少一個取代基，

前述 R^4 及 R^5 各自獨立為選自於由保護基、鹵素、烷基、烯基、炔基、鹵烷基、芳基、雜芳基、芳烷基、環烷基、環烯基、環烷基烷基、環基烷基(cyclalkyl)、羥基烷基、烷氧基烷基、胺基烷基、雜環基烯基、雜環基烷基、雜芳基烷基、矽基及矽氧烷基所構成群組之至少一者；

l為1或2；

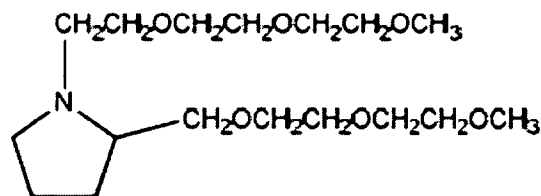
m為0~30範圍內之整數；

n為0~30範圍內之整數；

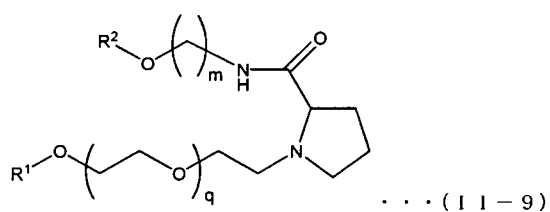
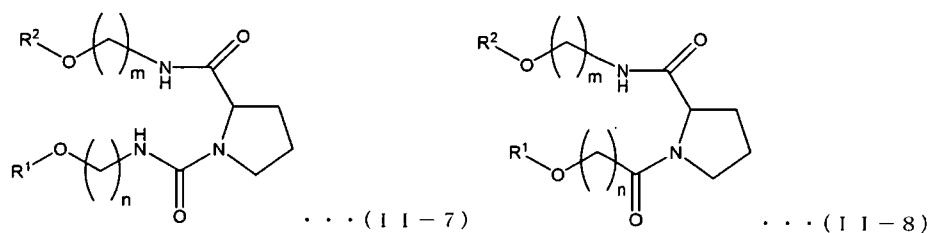
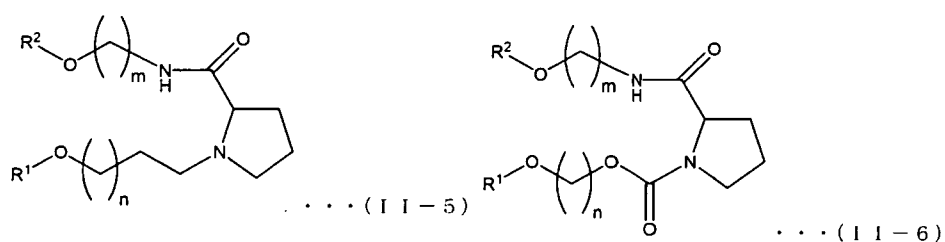
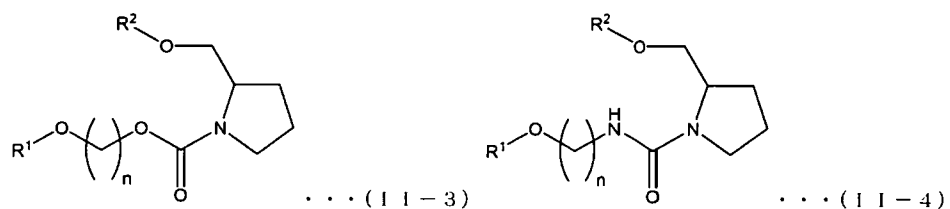
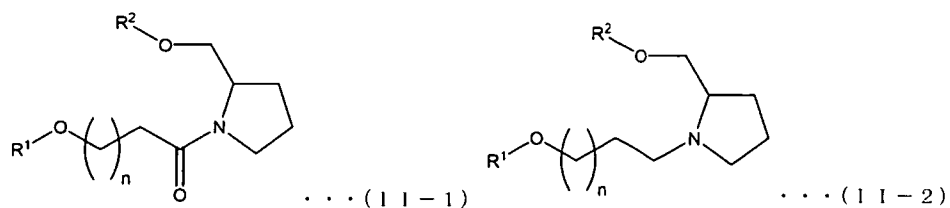
環A中，前述環A上之C-2以外的1個碳原子亦可經氮、氧或硫取代，

且前述環A內亦可含有碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵，

前述單體排除下述式之單體：

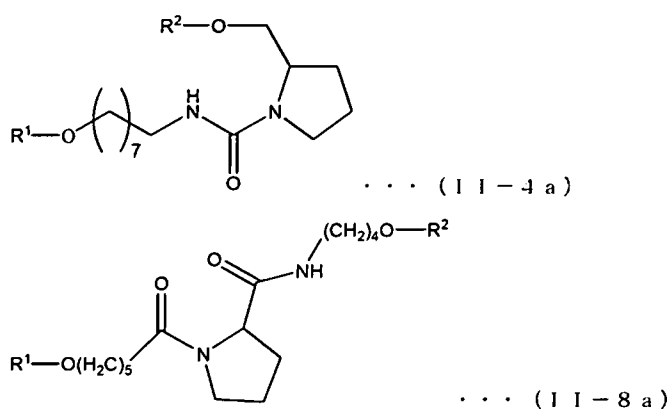


2. 如申請專利範圍第1項之單體，其中前述(II)之結構為下述式(II-1)~式(II-9)中之任一者，且下述式中，n為0~30之整數，m為0~30之整數，q為0~10之整數：

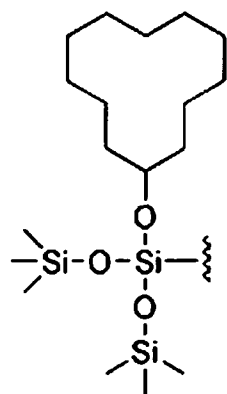


3. 如申請專利範圍第2項之單體，其中前述式(II-1)中， $n=8$ ；
 前述(II-2)中， $n=3$ ；前述式(II-3)中， $n=4$ 或 8 ；前述(II-4)
 中， $n=7$ 或 8 ；前述式(II-5)中， $n=3$ 且 $m=4$ ；前述(II-6)
 中， $n=8$ 且 $m=4$ ；前述式(II-7)中， $n=8$ 且 $m=4$ ；前述(II-8)
 中， $n=5$ 且 $m=4$ ；前述式(II-9)中， $q=1$ 且 $m=4$ 。
4. 如申請專利範圍第3項之單體，其中前述式(II-4)為下述

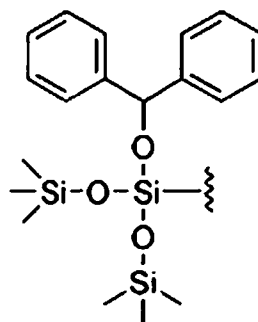
式(II-4a)，且前述式(II-8)為下述式(II-8a)；



5. 如申請專利範圍第1至4項中任一項之單體，其中前述式(II)中， L^1 為前述聚醚鏈，且前述聚醚鏈為聚乙二醇。
6. 如申請專利範圍第1或2項之單體，其中前述式(II)中， L^1 之原子個數(n)與 L^2 之原子個數(m)的合計(m+n)係在0~30之範圍內。
7. 如申請專利範圍第1或2項之單體，其含有標記物質。
8. 如申請專利範圍第1或2項之單體，其含有穩定同位素。
9. 如申請專利範圍第1或2項之單體，其供用於自動合成核酸。
10. 如申請專利範圍第1或2項之單體，其中前述式(II)中，前述保護基為選自於由第三丁基二甲基矽基、雙(2-乙醯氧基乙基氧基)甲基、三異丙基矽氧基甲基、1-(2-氰基乙氧基)乙基、2-氰基乙氧基甲基、甲苯磺醯基乙氧基甲基、二甲氧基三苯甲基、



及



、及

以式 $-P(OR^6)(NR^7R^8)$ 表示之磷酸保護基所構成群組中之至少一者，前述式中，

R^6 為鹵素、 β -氰基乙基、硝基苯基乙基或甲基，

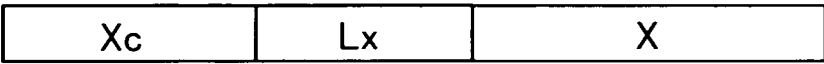
R^7 及 R^8 各自為氫原子、甲基、乙基或異丙基。

11. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之單體，其中前述式 (II) 中，
 前述 R^3 為鹵素、OH、 OR^4 、 NH_2 、 NHR^4 、 NR^4R^5 、SH、 SR^4 或側氧基 (=O)，
 前述 R^4 及 R^5 各自獨立為選自於由第三丁基二甲基矽基、雙(2-乙醯氧基乙基氧基)甲基、三異丙基矽氧基甲基、1-(2-氰基乙氧基)乙基、2-氰基乙氧基甲基、甲苯磺醯基乙氧基甲基及二甲氧基三苯甲基所構成群組之至少一個保護基。

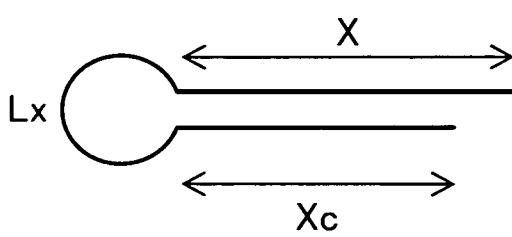
12. 一種合成方法，係核酸之合成方法，其特徵在於：使用如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項之單體。

圖式：

(A)

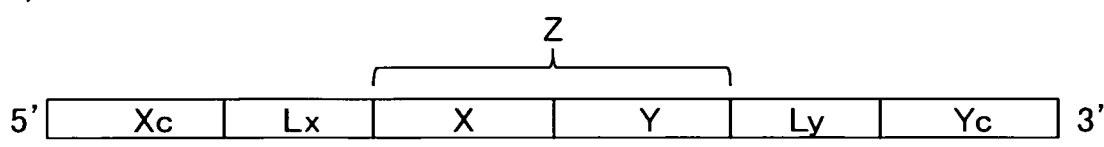


(B)

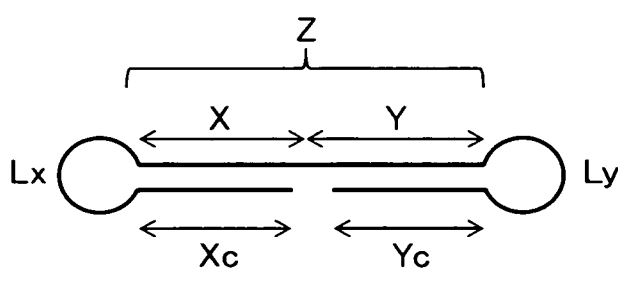


第 1 圖

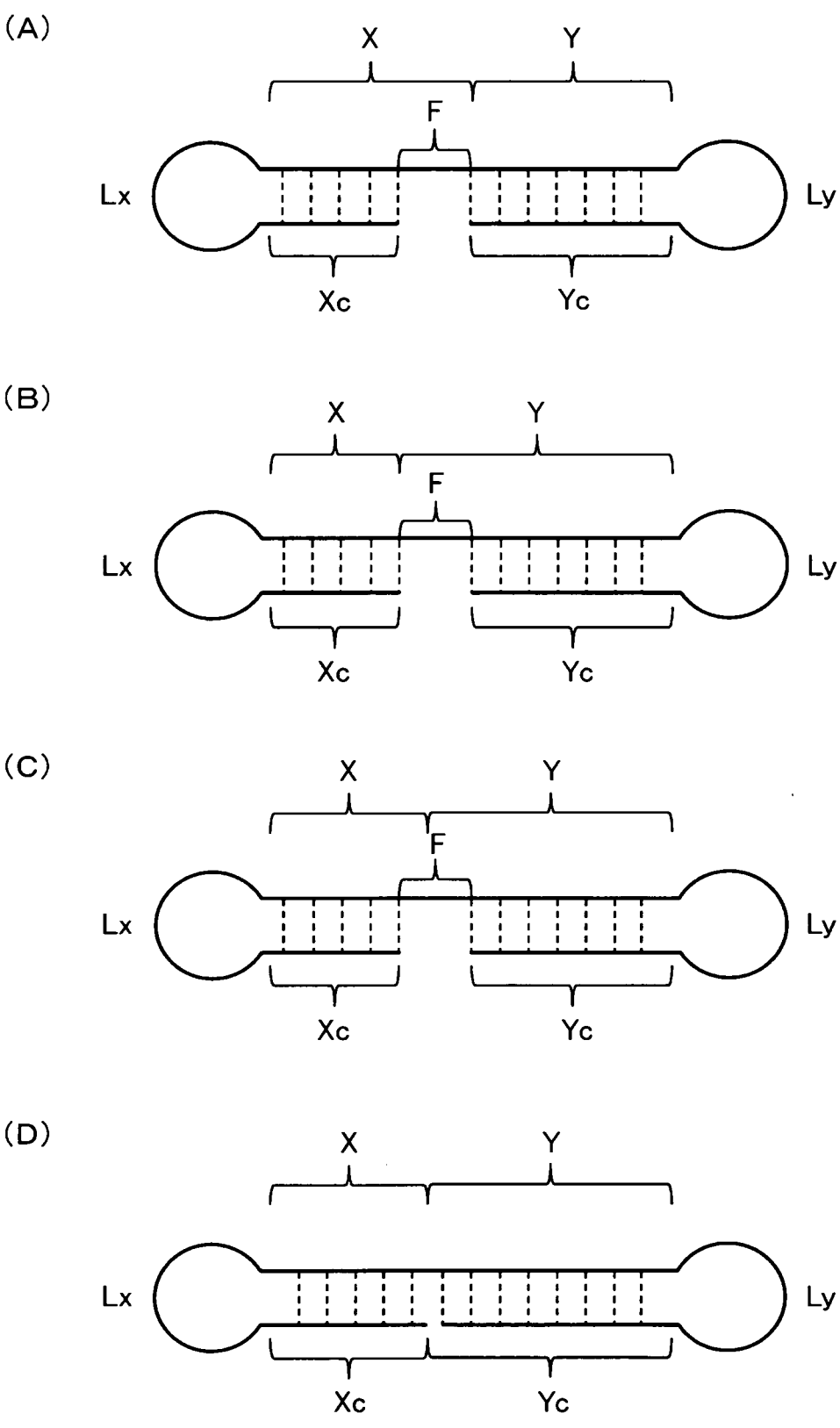
(A)



(B)

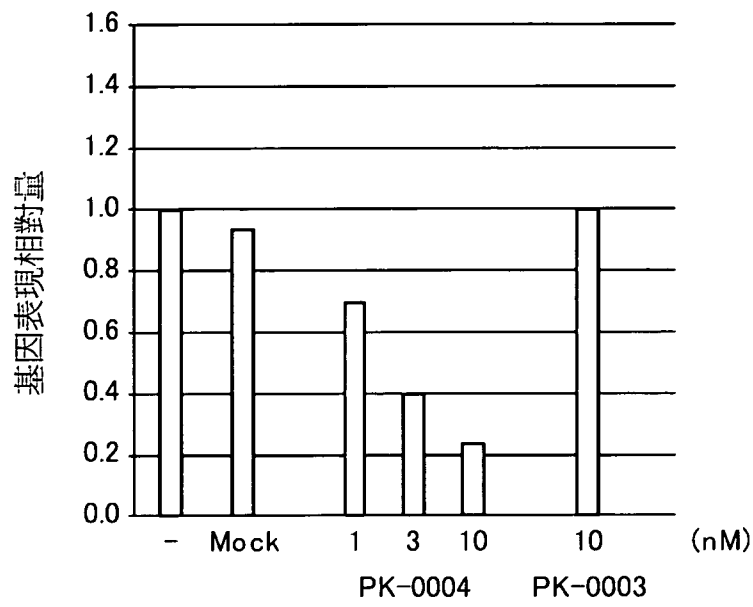


第 2 圖



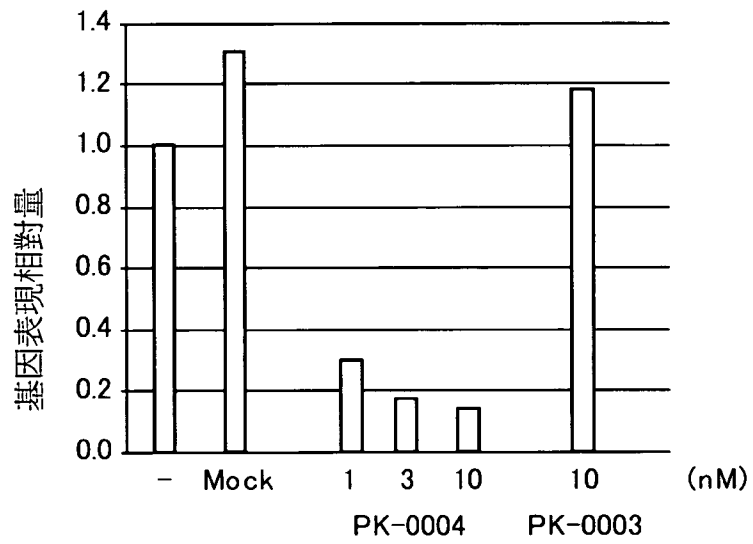
第 3 圖

A549 細胞

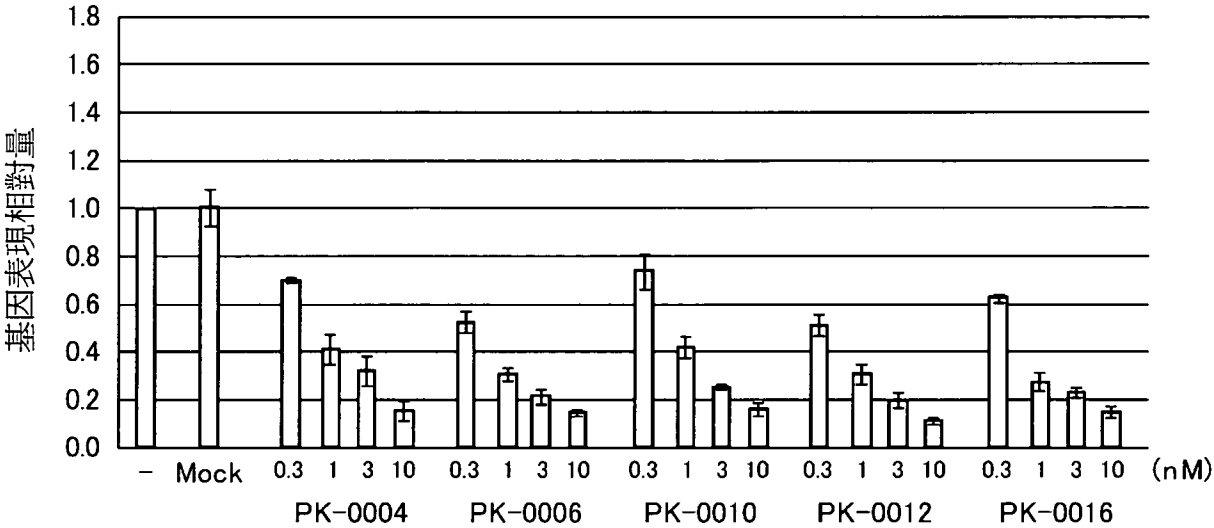


第 8 圖

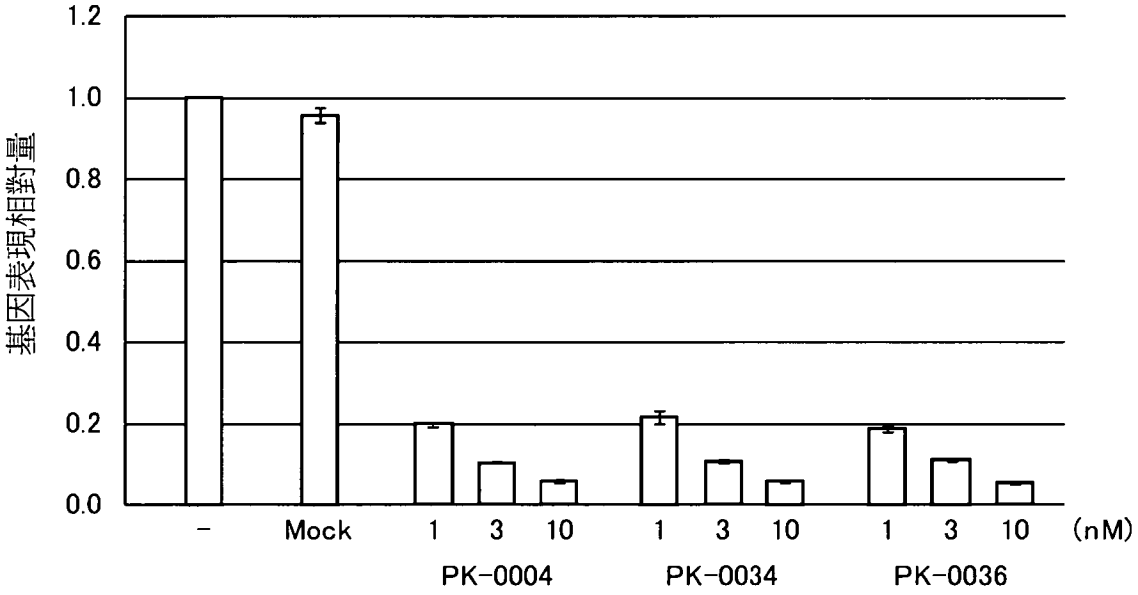
293 細胞



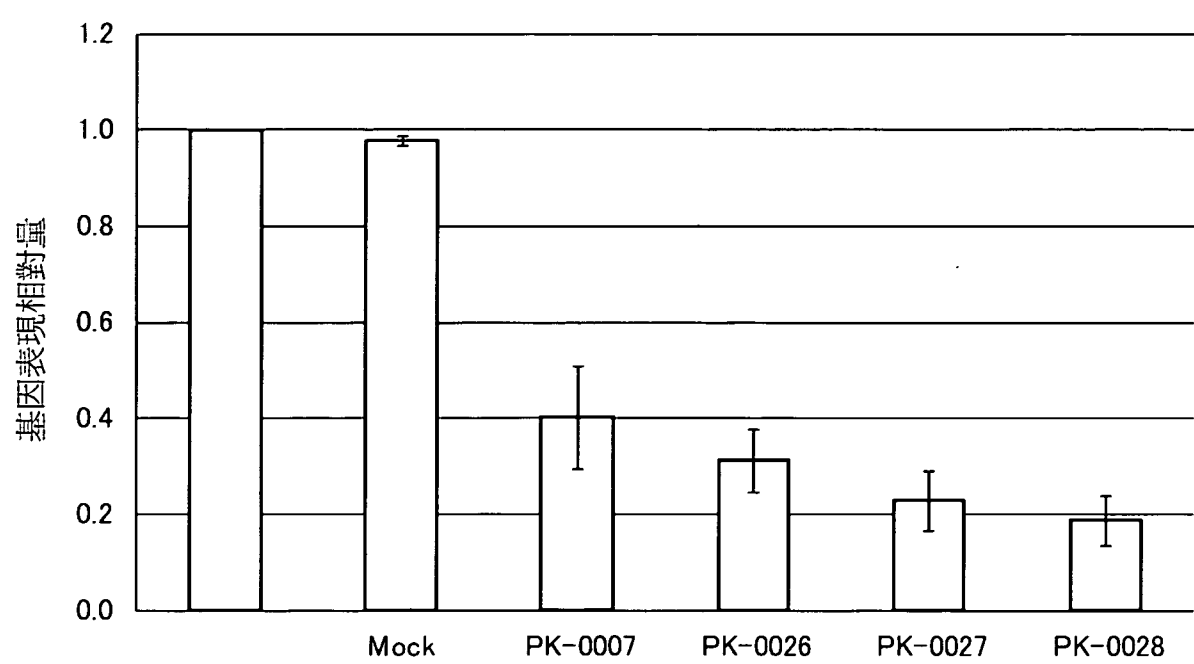
第 9 圖



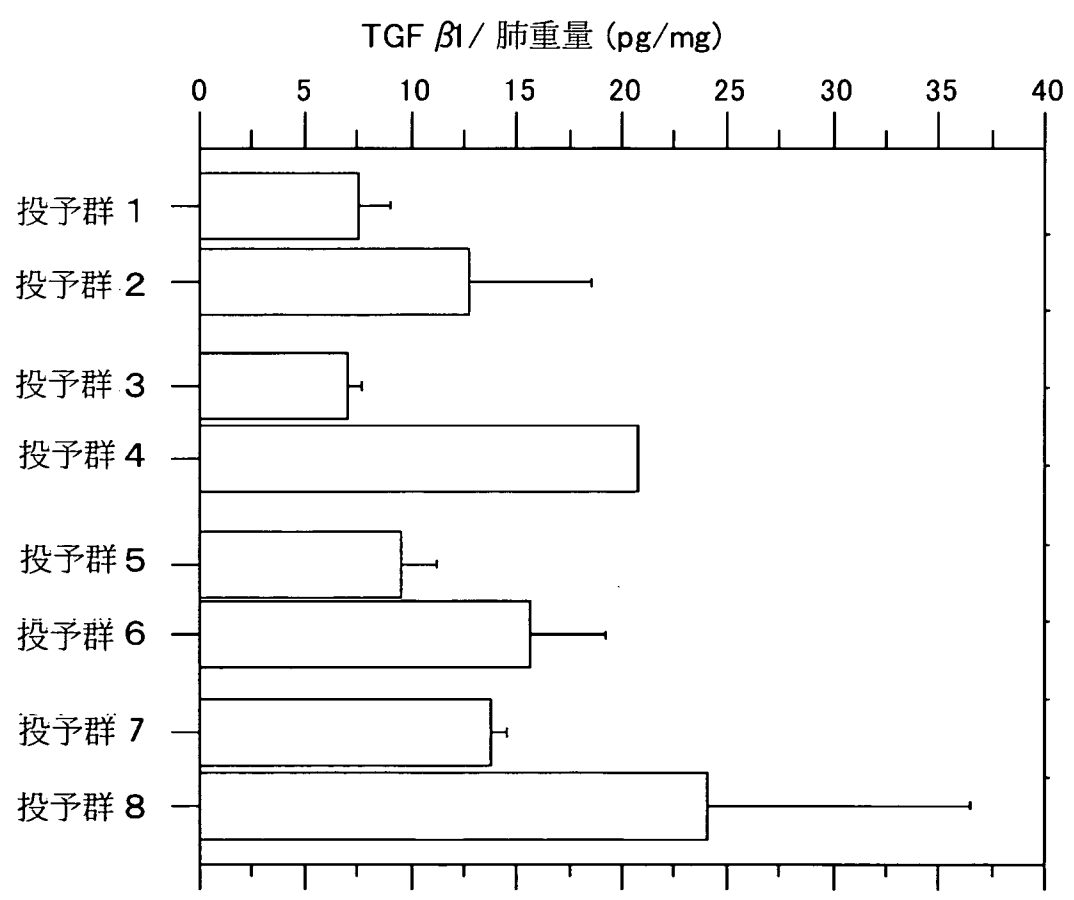
第 10 圖



第 11 圖

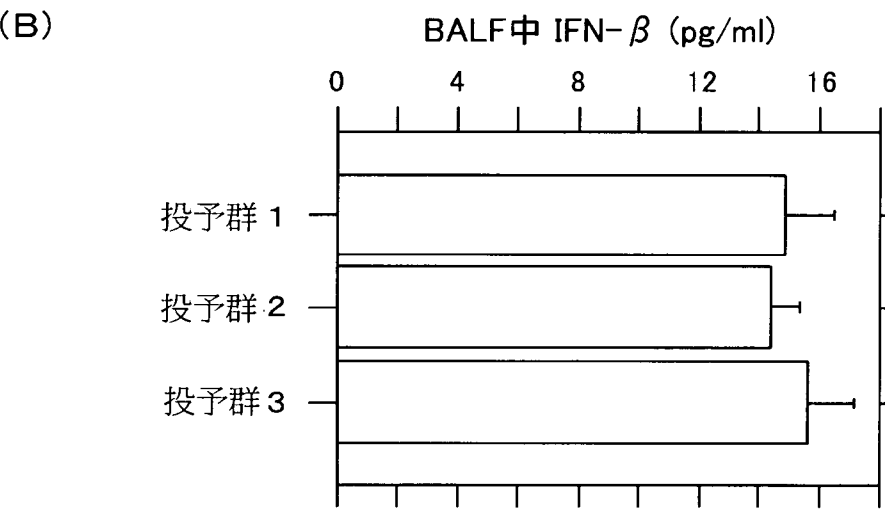
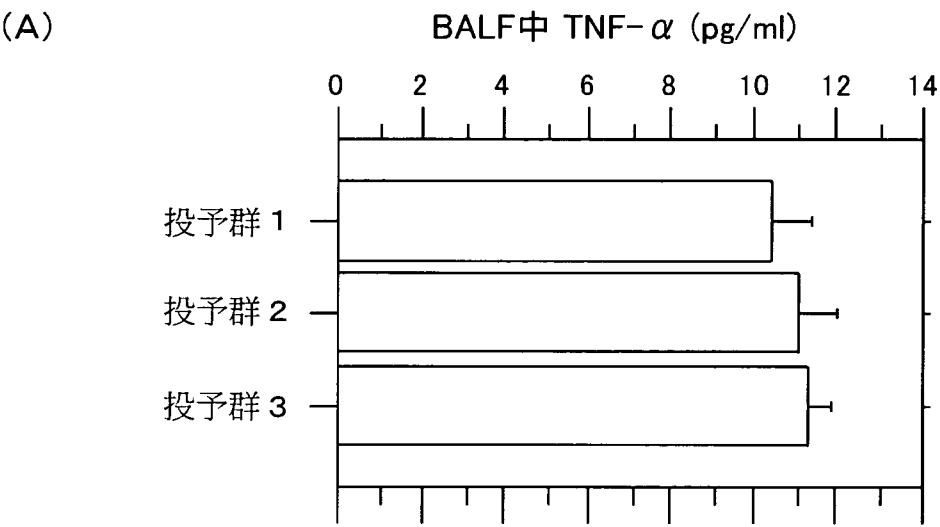


第 12 圖

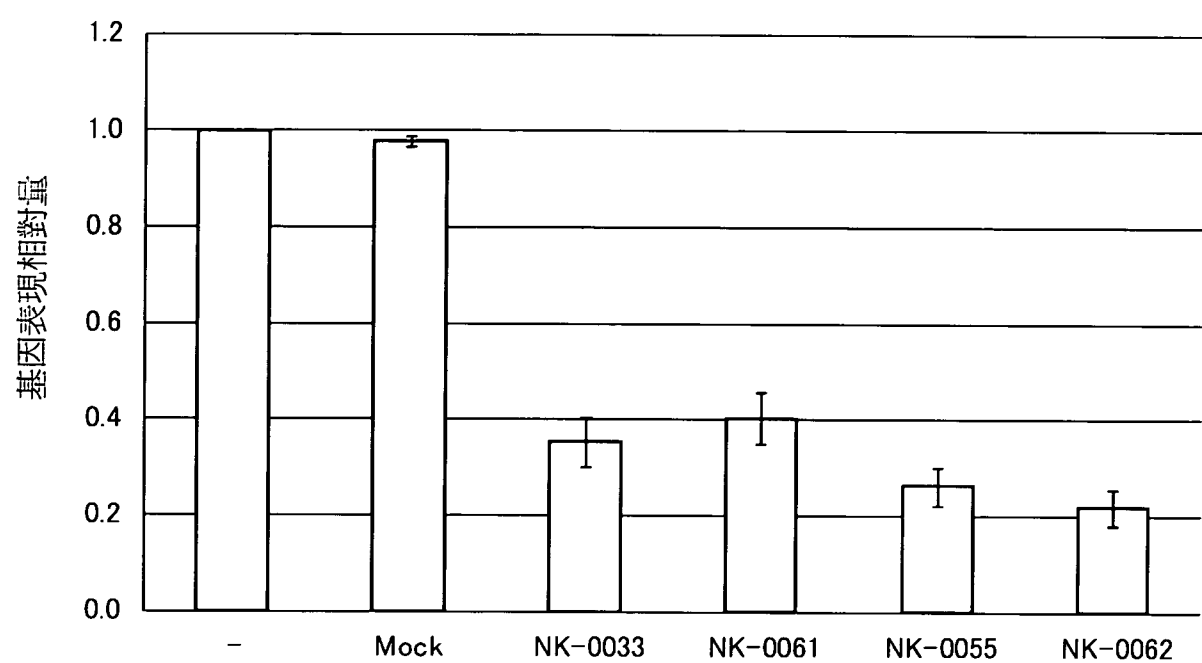


第 13 圖

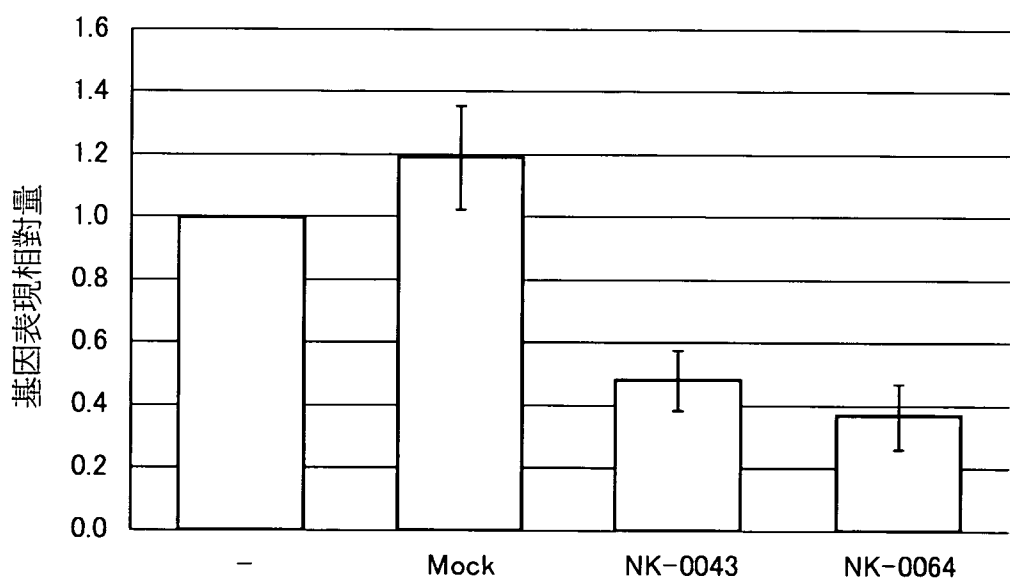
投予群



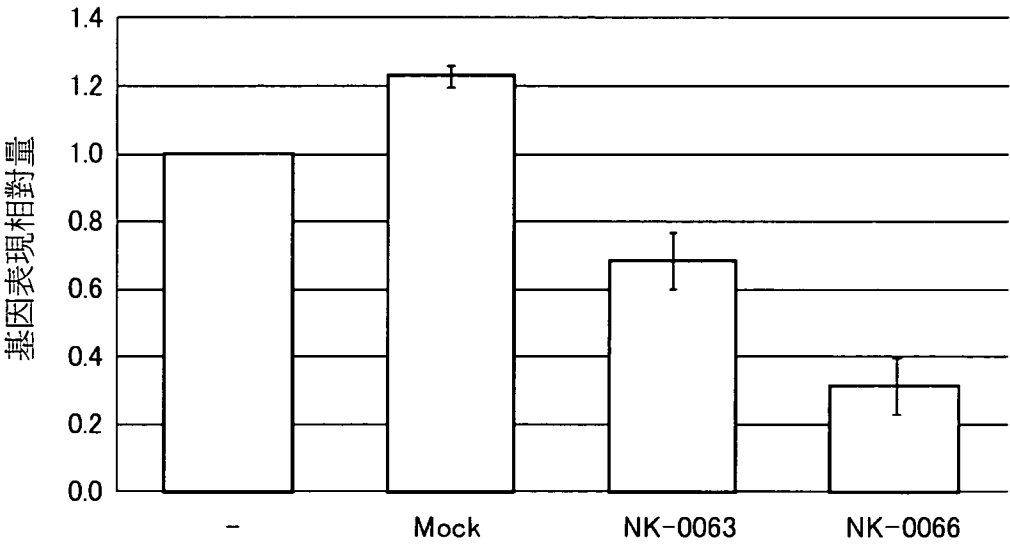
第14 圖



第 19 圖



第 20 圖

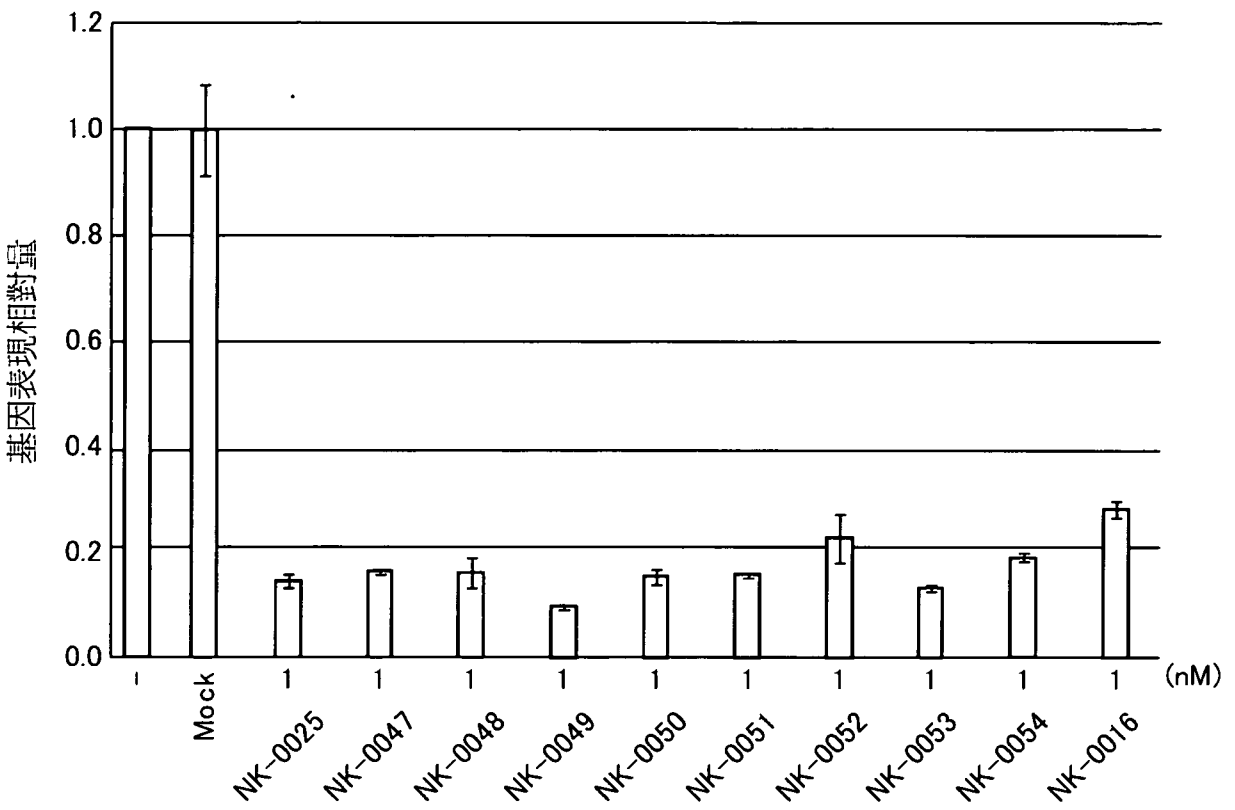


第 21 圖

Xc+Yc/X+Y

NK-0047	26/27	5' - <u>aacc<u>au</u>gagaa<u>gu</u>au<u>ga</u>ca<u>ac</u>agcc</u> CCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU [*] CUJCGc -3'	61
NK-0025	25/26	5' - <u>aacc<u>au</u>gagaa<u>gu</u>au<u>ga</u>ca<u>ac</u>agcc</u> CCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU [*] CUJCGg -3'	62
NK-0048	24/25	5' - <u>aacc<u>au</u>gagaa<u>gu</u>au<u>ga</u>ca<u>ac</u>agcc</u> CCACACCGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU [*] CUJCGg -3'	63
NK-0049	23/24	5' - <u>cc<u>au</u>gagaa<u>gu</u>au<u>ga</u>ca<u>ac</u>agcc</u> CCACACCGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGU [*] UJCGa -3'	64
NK-0050	23/24	5' - <u>aacc<u>au</u>gagaa<u>gu</u>au<u>ga</u>ca<u>ac</u>ag</u> CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU [*] CUJCGg -3'	65
NK-0051	22/23	5' - <u>cc<u>au</u>gagaa<u>gu</u>au<u>ga</u>ca<u>ac</u>ag</u> CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU [*] JJCGa -3'	66
NK-0052	21/22	5' - <u>ca<u>u</u>gagaa<u>gu</u>au<u>ga</u>ca<u>ac</u>ag</u> CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGU [*] UJCGa -3'	67
NK-0053	21/22	5' - <u>cc<u>au</u>gagaa<u>gu</u>au<u>ga</u>ca<u>ac</u>a</u> CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU [*] UJCGa -3'	68
NK-0054	20/21	5' - <u>ca<u>u</u>gagaa<u>gu</u>au<u>ga</u>ca<u>ac</u>a</u> CCACACCCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGU [*] UJCGa -3'	69

第 22 圖



第 23 圖