



(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 I573870 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：104143857

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 08 日

(51)Int. Cl. : C12N15/09 (2006.01) C07H21/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/07/08	日本	2010-156122
2010/08/03	日本	2010-174915
2010/10/13	日本	2010-230806
2010/10/13	日本	2010-230808
2010/12/02	日本	2010-269823
2010/12/02	日本	2010-269824

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

(74)代理人：憚軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

EP 1669450A1

WO 2009076321A2

審查人員：林桂滿

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：32 共 146 頁

(54)名稱

用以控制基因表現之單股核酸分子 (一)

(57)摘要

本發明提供一種可抑制基因表現之新穎核酸分子，且該核酸分子可容易且有效率地進行製造。即，製成一種單股核酸分子，係含有抑制目標基因表現之抑制表現序列，其特徵在於：從 5' 端側至 3' 端側，依序含有 5' 端側區域(Xc)、內部領域(Z)及 3' 端側區域(Yc)，前述內部區域(Z)係由內部 5' 端側區域(X)與內部 3' 端側區域(Y)連結而構成者，前述 5' 端側區域(Xc)與前述內部 5' 端側區域(X)互補，前述 3' 端側區域(Yc)與前述內部 3' 端側區域(Y)互補，前述內部區域(Z)、前述 5' 端側區域及前述 3' 端側區域中之至少任一者含有前述抑制表現序列。若以此種單股核酸分子，即可抑制前述目標基因之表現。

公告本

發明摘要

※ 申請案號：

104/43857 (由100/24393分案)

※ 申請日：

100.7.8

※IPC 分類：C12N 15/09 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用以控制基因表現之單股核酸分子(一)

【中文】

本發明提供一種可抑制基因表現之新穎核酸分子，且該核酸分子可容易且有效率地進行製造。即，製成一種單股核酸分子，係含有抑制目標基因表現之抑制表現序列，其特徵在於：從 5'端側至 3'端側，依序含有 5'端側區域(Xc)、內部領域(Z)及 3'端側區域(Yc)，前述內部區域(Z)係由內部 5'端側區域(X)與內部 3'端側區域(Y)連結而構成者，前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)互補，前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)互補，前述內部區域(Z)、前述 5'端側區域及前述 3'端側區域中之至少任一者含有前述抑制表現序列。若以此種單股核酸分子，即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（ ）圖。(無)

【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)

用以控制基因表現之單股核酸分子(一)

【技術領域】

本發明有關於一種抑制基因表現之單股核酸分子、含有其之組成物及其用途。

【先前技術】

背景技術

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)。RNA 干擾所致之抑制基因表現，舉例而言，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。

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 分子之狀況下，還有其合成甚是困難之問題。

先行技術文獻

專利文獻

【專利文獻 1】日本特開 2008-278784

非專利文獻

【非專利文獻 1】法伊亞氏等(Fire, et al.)，Nature 第 391 卷，p.806-811，1998 年。

【發明內容】

發明概要

於此，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，該核酸分子可容易並且效率良好地進行製造。

爲了達成前述目的，本發明之單股核酸分子含有抑制目標基因表現之抑制表現序列，其特徵在於：從 5'端側至 3'端側，依序含有 5'端側區域(Xc)、內部區域(Z)及 3'端側區域(Yc)，前述內部區域(Z)係由內部 5'端側區域(X)及內部 3'端側區域(Y)連結所構成，前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)互補，前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)互補，並且前述內部區域(Z)、前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Yc)中之至少一者含有前述抑制表現序列。

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。

本發明之組成物爲藥學組成物，其特徵在於含有前述本發明之單股核酸分子。

本發明之抑制表現方法係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。

本發明之疾病治療方法之特徵在於：包含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抑制基因表現之序列作爲前述抑制表現序列，且該序列爲前述疾病之成因。

若依本發明之單股核酸分子，則可抑制基因表現，且因非呈環狀，其合成甚容易，又因屬單股，而無需雙股之黏合步驟，可效率良好地進行製造。

另，本發明之單股核酸分子結構可抑制基因表現一事，乃由本案發明人所首先發現者。本發明之單股核酸分子之抑制基因表現效果雖推測係因與 RNA 干擾之相同現象所致，但本發明中之抑制基因表現並不侷限及限制於 RNA 干擾。

【圖式簡單說明】

第 1(A)~1(B)圖爲模式圖，顯示本發明之單股核酸分子之一例。

第 2(A)~2(B)圖爲模式圖，顯示本發明之單股核酸分子之另一例。

第 3(A)~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，顯示本發明實施例中之 GAPDH 基因表現量的相對值。

第 5 圖為圖表，顯示本發明實施例中之 GAPDH 基因表現量之相對值。

第 6 圖為圖表，顯示本發明實施例中 A549 細胞之 GAPDH 基因表現量的相對值。

第 7 圖為圖表，顯示本發明實施例中 293 細胞之 GAPDH 基因表現量的相對值。

第 8 圖為圖表，顯示本發明實施例中之 TGF- β 1 基因表現量的相對值。

第 9 圖為圖表，顯示本發明實施例中各投予群中每單位重量之肺的 TGF- β 1 基因表現量。

第 10 圖為圖表，顯示本發明實施例中各投予群之 BALF 樣本中的細胞數。

第 11 圖為圖表，顯示本發明實施例中各投予群之 BALF 樣本中的嗜中性球細胞數。

第 12 圖為照片，顯示本發明實施例中 BALF 樣本中之細胞的吉姆沙染色(Giemsa stain)結果：(A)為 LPS(+)/RNA(-)投予群 4 之結果，(B)為 LPS(+)/陰性控制組 NK-0035(+)-之投予群 6 的結果，(C)為 LPS(+)/NK-0033(+)-之實施例投予群 5 的結果。

第 13 圖為照片，顯示本發明實施例之肺組織 HE 染色結果：(A)為 LPS(+)/RNA(-)-之投予群 4 的結果，(B)為 LPS(+)/陰性控制組 NK-0035(+)-之投予群 6 的結果，(C)為 LPS(+)/NK-0033(+)-之實施例投予群 5 的結果。

第 14(A)圖係顯示本發明實施例中之 TGF- β 1 基因表現量的結果；第 14(B)圖係顯示本發明實施例中之 IFN- α 基因表現量的結果；第 14(C)圖係顯示本發明實施例中之 IFN- β 基因表現量的結果。

第 15 圖為圖表，顯示本發明實施例中 TGF- β 1 基因表現量之相對值。

第 16 圖為圖表，顯示本發明實施例 TGF- β 1 基因表現量之相對值。

第 17 圖為圖表，顯示本發明實施例中各投予群之每單位重量之肺的 TGF- β 1 表現量。

第 18(A)圖為圖表，顯示本發明實施例中各投予群之 BALF 樣本中之

TNF- α 量；第 18(B)圖為圖表，顯示本發明實施例中各投予群之 BALF 樣本中之 IFN- β 量。

第 19 圖為圖表，顯示本發明實施例中 293 細胞之 LAMA 基因表現量的相對值。

第 20 圖為圖表，顯示本發明實施例中 A549 細胞之 LMNA 基因表現量的相對值。

第 21 圖係一顯示本發明實施例所使用 ssRNA 之圖。

第 22 圖為圖表，顯示本發明實施例中 GAPDH 基因表現量之相對值。

第 23 圖係一顯示本發明實施例所使用 ssRNA 之圖。

第 24 圖為圖表，顯示本發明實施例中 GAPDH 基因表現量之相對值。

第 25 圖係一顯示本發明實施例所使用 ssRNA 之圖。

第 26 圖為圖表，顯示本發明實施例中 GAPDH 基因表現量之相對值。

第 27 圖係一顯示本發明實施例所使用 ssRNA 之圖。

第 28 圖為圖表，顯示本發明實施例中 GAPDH 基因表現量之相對值。

第 29 圖為圖表，顯示本發明實施例中 GAPDH 基因表現量之相對值。

第 30 圖為圖表，顯示本發明實施例中 HCT116 細胞之 GAPDH 基因表現量的相對值。

第 31 圖為電泳照片，顯示本發明實施例中之核糖核酸酶耐性。

第 32 圖為電泳照片，顯示本發明實施例中之 S7 核酸酶耐性。

【實施方式】

本發明之實施形態

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。

1. ssNc 分子

如前所述，本發明之單股核酸分子係一種含有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：從 5'端側至 3'端側依序含有 5'端側區域(Xc)、內部區域(Z)及 3'端側區域(Yc)，前述內部區域(Z)係由內部 5'端側區域(X)與內部 3'端側區域(Y)連結而構成者，前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)互補，前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區

域(Y)互補，且前述內部區域(Z)、前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Yc)中之至少一者含有前述抑制表現序列。

於本發明中，舉例來說，「抑制目標基因表現」意指妨礙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來確認。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。

以下，本發明之單股核酸分子亦稱為本發明之「ssNc 分子」。舉例來說，由於本發明之 ssNc 分子可於活體內(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 ssNc 分子」或「目標基因表現抑制劑」。此外，舉例來說，本發明之 ssNc 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 ssNc 分子」、「RNA 干擾誘導分子」、「RNA 干擾劑」或「RNA 干擾誘導劑」。再者，舉例來說，本發明之 ssNc 分子可抑制干擾素誘導(interferon induction)等之副作用。

本發明之 ssNc 分子之 5'端與 3'端未連結，因此亦可稱為線狀單股核酸分子。舉例來說，本發明之 ssNc 分子於其前述內部區域(Z)中，前述內部 5'區域(X)與前述內部 3'區域(Y)直接連結。

於本發明之 ssNc 分子中，前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)互補，且前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)互補。因此，於 5'端側中，前述區域(Xc)朝前述區域(X)回折，前述區域(Xc)與前述區域(X)可透過自黏合(self-annealing)而形成雙股，又，於 3'端側中，前述區域(Yc)朝前述區域(Y)回折，前述區域(Yc)與前述區域(Y)可透過自黏合而形成雙股。本發明之 ssNc 分子可如此這般於分子內形成雙股，舉例來說，與習知之用於 RNA 干擾之 siRNA(已分離之兩條單股 RNA 透過黏合而形成雙股 RNA)結構明顯不同。

本發明之 ssNc 分子中，舉例來說，前述抑制表現序列在本發明之 ssNc 分子以 in vivo 或 in vitro 形式導入細胞內時，係一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利用 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。

另，本發明並非將相對前述目標基因之前述抑制表現序列的序列資訊作為重點，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，除了申請時已成為習知之前述 siRNA 的單股 RNA 序列之外，即便是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。

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。

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 1 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 16 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 5 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 6 所示 19 個鹼基長之序列。

5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3' (序列編號 1)

5'-AAAGUCAAUGUACAGCUGCUU-3' (序列編號 16)

5'-AUUGUAACGAGACAAACAC-3' (序列編號 5)

5'-UUGCGCUUUUUGGUGACGC-3' (序列編號 6)

推測本發明之 ssNc 分子所致前述目標基因表現之抑制係因 RNA 干擾

或類似於 RNA 干擾之現象(類 RNA 干擾之現象)所引起,該現象舉例來說係藉由採用前述內部區域(Z)、前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Yc)中之至少一者配置有前述抑制表現序列之結構而產生。此外,本發明並不受該機制所限制。舉例來說,本發明之 ssNc 分子並非如所謂之 siRNA 般以兩條單股 RNA 所構成之 dsRNA 形式來導入細胞等,又,舉例來說,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,亦可稱本發明之 ssNc 分子具有類 RNA 干擾之機能。

於本發明之 ssNc 分子中,前述抑制表現序列係如前所述,包含在前述內部區域(Z)、前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Yc)中之至少一者。舉例而言,本發明之 ssNc 分子可具有 1 個前述抑制表現序列,且亦可具有 2 個。

在後者之情況下,舉例來說,本發明之 ssNc 分子可具有 2 個以上相對於相同目標基因之相同抑制表現序列,且可具有 2 個以上相對於相同目標基因之相異抑制表現序列,亦可具有 2 個以上相對於相異目標基因之相異抑制表現序列。本發明之 ssNc 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)、前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Yc)中之任一區域,且亦可為不同區域。本發明之 ssNc 分子具有 2 個以上相對於相異目標基因之前述抑制表現序列時,舉例來說,依本發明之 ssNc 分子而定,可抑制 2 種以上之相異目標基因的表現。

前述內部區域(Z)係如前述般,前述內部 5'端區域(X)與前述內部 3'端區域(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)為了表示與前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Xc)之序列關係,而表記成「係由前述內部 5'端側區域(X)與前述內部 3'端側區域(Y)連結所構成」,且於前述內部區域(Z)中,舉例來說,前述 5'端側區域(Xc)與前述 3'端側區域(Xc)在前述 ssNc 分子之使用過程中,並未限定為各別獨立之區域。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)作配置。

本發明之 ssNc 分子中，前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)互補。於此，前述區域(Xc)僅需具有相對於前述區域(X)之全區域或其部分區域呈互補之序列即可，具體來說，例如，以含有與前述區域(X)之全區域或其部分區域互補之序列，或是由前述互補序列所構成爲佳。舉例來說，前述區域(Xc)相對於前述區域(X)之前述互補全區域或前述互補部分區域可爲完全互補，亦可有 1 個或數個鹼基非呈互補，但以完全互補爲佳。本發明之 ssNc 分子中，前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(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，具體來說，例如，以含有相對於前述區域(Y)之全區域或其部分區域呈互補之序列，或是由前述互補序列所構成爲佳。前述區域(Yc)相對於前述區域(Y)之前述互補全區域或前述互補部分區域，舉例來說，可爲完全互補，亦可有 1 個或數個鹼基非呈互補，但以完全互補爲佳。舉例來說，前述 1 個鹼基或數個鹼基爲 1~3 個鹼基，且宜爲 1 個鹼基或 2 個鹼基。

本發明之 ssNc 分子中，舉例而言，前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)可直接連結，亦可間接連結。在前者之情況下，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(Xc)與前述區域(X)之間具有連結區域(Lx)，且前述區域(Xc)與前述區域(X)透過前述連結區域(Lx)而連結的形態。

本發明之 ssNc 分子中，舉例來說，前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)可直接連結，亦可間接連結。在前者之情況下，直接連結可列舉如利用磷酸二酯鍵之連結。後者之情況下，舉例來說則可列舉如：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。

舉例而言，本發明之 ssNc 分子可具有前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)兩者，亦可具有其中之任一者。在後者之情況下，舉例來說，可列舉如：前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)之間具有前述連結區域(Lx)，且前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)之間不具有前述連結區域(Ly)，即，前述區域(Yc)與前述區域(Y)直接連結之形態。此外，在後者之情況下，舉例來說，可列舉如：前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'

端側區域(Y)之間具有前述連結區域(Ly)，且前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)之間不具有前述連結區域(Lx)，即，前述區域(Xc)與前述區域(X)直接連結之形態。

前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)宜分別呈在本身之區域內部不會發生自黏合之結構。

就本發明之 ssNc 分子，茲將不具有前述連結區域之 ssNc 分子之一例顯示於第 1 圖之模式圖中。第 1(A)圖係一模式圖，其針對前述 ssNc 分子顯示從 5'端側朝 3'端側之各區域順序概略，第 1(B)圖則是顯示前述 ssNc 分子在前述分子內形成雙股之狀態的模式圖。如第 1(B)圖所示，前述 ssNc 分子中，前述 5'端側區域(Xc)回折，前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)之間形成雙股，前述 3'端側區域(Yc)回折，前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)之間形成雙股。第 1 圖僅用以顯示各區域之連結順序及形成雙股之各區域的位置關係，舉例來說，各區域之長度等並不受其限制。

就本發明之 ssNc 分子，茲將具有前述連結區域之 ssNc 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 ssNc 分子顯示從 5'端側朝 3'端側之各區域順序概略作為一例，第 2(B)圖則是顯示前述 ssNc 分子於前述分子內形成雙股之狀態的模式圖。如第 2(B)圖所示，前述 ssNc 分子中，前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)之間以及前述內部 3'端側區域(Y)與前述 3'端側區域(Yc)之間形成雙股，前述 Lx 區域及前述 Ly 區域採迴圈結構(loop structure)。第 2 圖僅用以顯示各區域之連結順序及形成雙股之各區域的位置關係，舉例來說，各區域之長度等並不受其限制。

於本發明之 ssNc 分子中，前述 5'端側區域(Xc)、前述內部 5'端側區域(X)、前述內部 3'端側區域(Y)及前述 3'端側區域(Yc)之鹼基數並未特別受限，例如下述者。於本發明中，舉例來說，「鹼基數」意指「長度」，亦可稱為「鹼基長」。

前述 5'端側區域(Xc)係如前述，舉例來說，亦可與前述內部 5'端側區域(X)之全區域互補。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 5'端至 3'端之全區域互補的鹼基序列所

構成。前述區域(Xc)更宜與前述區域(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，即，例如宜呈完全互補。另，並不限於此，舉例來說亦可如前述，有 1 或數個鹼基非呈互補。

此外，前述 5'端側區域(Xc)係如前所述，例如，可與前述內部 5'端側區域(X)之部分區域互補。此時，舉例來說，前述區域(Xc)與前述區域(X)之部分區域宜為相同鹼基長，即，宜由較前述區域(X)短 1 個鹼基以上之鹼基長的鹼基序列所構成。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)之前述部分區域的全部鹼基互補，即，例如宜完全互補。舉例來說，前述區域(X)之前述部分區域宜為前述區域(X)中由 5'端之鹼基(第 1 個鹼基)起連續之鹼基序列所構成的區域(片段)。

前述 3'端側區域(Yc)係如前所述，舉例來說，亦可與前述內部 3'端側區域(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 5'端至 3'端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，即，例如宜完全互補。另，不受此限，舉例來說，亦可如前述般有 1 或數個鹼基非為互補。

此外，此外，前述 3'端側區域(Yc)係如前所述，例如，可與前述內部 3'端側區域(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)之部分區域為相同鹼基長，即，宜由較前述區域(Y)短 1 個鹼基以上之鹼基長的鹼基序列所構成。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，即，例如宜完全互補。舉例來說，前述區域(Y)之前述部分區域宜為前述區域(Y)中由 3'端之鹼基(第 1 個鹼基)起連續之鹼基序列所構成的區域(片段)。

本發明之 ssNc 分子中，前述內部區域(Z)之鹼基數(Z)與前述內部 5'端側區域(X)之鹼基數(X)及前述內部 3'端側區域(Y)之鹼基數(Y)的關係、以及前述內部區域(Z)之鹼基數(Z)與前述內部 5'端側區域(X)之鹼基數(X)及前述 5'端側區域(Xc)之鹼基數(Xc)的關係，舉例來說，滿足下述式(1)及(2)之條件。

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

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

本發明之 ssNc 分子中，前述內部 5'端側區域(X)之鹼基數(X)與前述內部 3'端側區域(Y)之鹼基數(Y)的長度關係並未特別受限，舉例來說，亦可滿足下述式中之任一條件。

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

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

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

本發明之 ssNc 分子中，前述內部 5'端側區域(X)之鹼基數(X)、前述 5'端側區域(X_c)之鹼基數(X_c)、前述內部 3'端側區域(Y)之鹼基數(Y)及前述 3'端側區域(Y_c)之鹼基數(Y_c)的關係舉例來說滿足下述(a)~(d)中之任一條件。

(a)滿足下述式(3)及(4)之條件。

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

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

(b)滿足下述式(5)及(6)之條件。

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

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

(c)滿足下述式(7)及(8)之條件。

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

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

(d)滿足下述式(9)及(10)之條件。

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

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

前述(a)~(d)中，前述內部 5'端側區域(X)之鹼基數(X)與前述 5'端側區域(X_c)之鹼基數(X_c)的差、前述內部 3'端側區域(Y)之鹼基數(Y)與前述 3'端側區域(Y_c)之鹼基數(Y_c)的差，舉例來說宜滿足下述條件。

(a)滿足下述式(11)及(12)之條件。

$$X - X_c = 1 \sim 10; \text{ 且以 } 1、2、3 \text{ 或 } 4 \text{ 爲宜，更宜爲 } 1、2 \text{ 或 } 3 \cdot \cdot \cdot (11)$$

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

(b)滿足下述式(13)及(14)之條件。

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

$$Y-Yc=1\sim 10; \text{且以} 1、2、3 \text{ 或} 4 \text{ 爲宜, 更宜爲} 1、2 \text{ 或} 3 \cdot \cdot \cdot (14)$$

(c)滿足下述式(15)及(16)之條件。

$$X-Xc=1\sim 10; \text{且以} 1、2 \text{ 或} 3 \text{ 爲宜, 更宜爲} 1 \text{ 或} 2 \cdot \cdot \cdot (15)$$

$$Y-Yc=1\sim 10; \text{且以} 1、2 \text{ 或} 3 \text{ 爲宜, 更宜爲} 1 \text{ 或} 2 \cdot \cdot \cdot (16)$$

(d)滿足下述式(17)及(18)之條件。

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

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

茲就前述(a)~(d)之 ssNc 分子，將其等之個別結構的一例顯示於第 3 圖之模式圖。第 3 圖爲含有前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)之 ssNc，(A)爲前述(a)之 ssNc 分子之例，(B)爲前述(b)之 ssNc 分子之例，(C)爲前述(c)之 ssNc 分子之例，(D)爲前述(d)之 ssNc 分子之例。於第 3 圖中，虛線表示因自黏合而結合形成雙股的狀態。第 3 圖之 ssNc 分子將前述內部 5'端側區域(X)之鹼基數(X)與前述內部 3'端側區域(Y)之鹼基數(Y)以前述式(20)之「 $X < Y$ 」形式來表現，但並不限於此，而如前述般可爲前述式(19)之「 $X=Y$ 」，亦可爲前述式(21)之「 $X > Y$ 」。此外，第 3 圖僅是用以表示前述內部 5'端側區域(X)與前述 5'端側區域(Xc)之關係以及前述內部 3'端側區域(Y)與前述 3'端側區域(Yc)之關係的模式圖，舉例來說，各區域之長度及形狀等並侷限於此，又，連結區域(Lx)及連結區域(Ly)之有無亦不受其限制。

舉例而言，前述(a)~(c)之 ssNc 分子藉由前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)以及前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)分別形成雙股，而成爲於前述內部區域(Z)中前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Yc)均具有無法對準(alignment)之鹼基的結構，亦可稱爲具有不形成雙股之鹼基的結構。以下，將前述內部區域(Z)中之前述無法對準之鹼基(亦稱爲不形成雙股之鹼基)稱爲「自由鹼基」。於第 3 圖中，以「F」表示前述自由鹼基之區域。前述區域(F)之鹼基數並未特別受限。舉例來說，前述區域(F)之鹼基數(F)在前述(a)之 ssNc 分子的情況下爲「 $X-Xc$ 」之鹼基數，在前述(b)之 ssNc 分子的情況下爲「 $Y-Yc$ 」之鹼基數，在前述(c)之 ssNc 分子的

情況下則為「X-Xc」之鹼基數與「Y-Yc」之鹼基數的合計數值。

另一方面，前述(d)之 ssNc 分子呈現例如前述內部區域(Z)之全區域與前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(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。另外，前述(d)之 ssNc 分子中，前述 5'端側區域(Xc)之 5'端與前述 3'端側區域(Yc)之 3'端未連結。

茲就本發明之 ssNc 分子，將各區域之長度例示如下，但本發明並不受其侷限。於本發明中，舉例來說，鹼基數之數值範圍係將隸屬該範圍之全部正整數予以揭示，例如，「1~4 鹼基」之記載意指「1、2、3、4 鹼基」之全部揭示內容(以下同樣)。

舉例來說，前述 5'端側區域(Xc)、前述 3'端側區域(Yc)及前述內部區域(Z)中之前述自由鹼基(F)之鹼基數合計會成為前述內部區域(Z)之鹼基數。因此，前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Yc)之長度舉例來說可因應前述內部區域(Z)之長度、前述自由鹼基數(F)及其位置來適當決定。

舉例來說，前述內部區域(Z)之鹼基數在 19 個鹼基以上。舉例來說，前述鹼基數之下限為 19 個鹼基，且宜為 20 個鹼基，更宜為 21 個鹼基。舉例而言，前述鹼基數之上限為 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)之鹼基數的具體例係例如 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)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舉例來說為 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，前述抑制表現序列之 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舉例來說為 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。

舉例來說，前述 5'端側區域(Xc)之鹼基數為 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，而以 1 個鹼基、2 個鹼基、3 個鹼基尤佳。前述內部區域(Z)或前述 3'端側區域(Yc)含有前述抑制表現

序列時，舉例而言，宜具有此種鹼基數。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，舉例來說，前述 5'端側區域(Xc)之鹼基數為 1~11 個鹼基，且宜為 1~7 個鹼基，較宜為 1~4 個鹼基，且更宜為 1 個鹼基、2 個鹼基、3 個鹼基。

前述 5'端側區域(Xc)含有前述抑制表現序列時，舉例來說，前述 5'端側區域(Xc)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長度例如前述。前述 5'端側區域(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'端側亦可更具有附加序列。舉例來說，前述附加序列之鹼基數為 1~11 個鹼基，且以 1~7 個鹼基為佳。

舉例來說，前述 3'端側區域(Yc)之鹼基數為 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，且以 1 個鹼基、2 個鹼基、3 個鹼基尤佳。前述內部區域(Z)或前述 5'端側區域(Xc)含有前述抑制表現序列時，舉例來說，宜為此種鹼基數。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，舉例來說，前述 3'端側區域(Yc)之鹼基數為 1~11 個鹼基，且宜為 1~7 個鹼基，更宜為 1~4 個鹼基，且以 1 個鹼基、2 個鹼基、3 個鹼基尤佳。

前述 3'端側區域(Yc)含有前述抑制表現序列的情況下，舉例來說，前述 3'端側區域(Yc)可為僅由前述抑制表現序列所構成之區域，亦可是含有前述抑制表現序列之區域。前述抑制表現序列之長度如前述所示。前述 3'端側區域(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'端側亦可更具有附加序列。前述附加序列之鹼基數例如可為 1~11 個鹼基，且以 1~7 個鹼基為佳。

如前所述，前述內部區域(Z)、前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Yc)之鹼基數舉例來說可以前述式(2)之「 $Z \geq Xc + Yc$ 」來表示。作為具體例，舉例來說，「 $Xc + Yc$ 」之鹼基數與前述內部區域(Z)相同，或是較前述內部區域(Z)更小。在後者之情況下，舉例來說「 $Z - (Xc + Yc)$ 」為 1~10，且宜為 1~4，更宜為 1、2 或 3。舉例而言，前述「 $Z - (Xc + Yc)$ 」相當於前述內部區域(Z)中前述自由鹼基之區域(F)的鹼基數(F)。

於本發明之 ssNc 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。舉例來說，前述連結區域(Lx)宜為前述內部 5'端側區域(X)與前述 5'端側區域(Xc)可形成雙股之長度，舉例來說，前述連結區域(Ly)宜為前述內部 3'端側區域(Y)與前述 3'端側區域(Yc)可形成雙股之長度。前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)之構成單元含有鹼基時，前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)各別之鹼基數可相同亦可不同，此外，其鹼基序列亦可相同或不同。前述連結區域(Lx)及前述連結區域(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，其上限則舉例來說為 100 個鹼基，且宜為 80 個鹼基，更宜為 50 個鹼基。前述各連結區域之鹼基數就具體例而言，舉例來說可例示如 1~50 個鹼基、1~30 個鹼基、1~20 個鹼基、1~10 個鹼基、1~7 個鹼基及 1~4 個鹼基等，但並不侷限於此。

本發明之 ssNc 分子的全長並未特別受限。本發明之 ssNc 分子中，前述鹼基數合計(全長之鹼基數)的下限舉例來說為 38 個鹼基，且宜為 42 個鹼基，更宜為 50 個鹼基，且更以 51 個鹼基為佳，尤宜為 52 個鹼基；其上限舉例來說為 300 個鹼基，且宜為 200 個鹼基，更宜為 150 個鹼基，更以 100 個鹼基為佳，且尤宜為 80 個鹼基。本發明之 ssNc 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舉例來說為 38 個鹼基，且以 42 個鹼基為宜，更宜為 50 個鹼基，且更以 51 個鹼基為佳，尤宜為 52 個鹼基；上限則舉例來說為 300 個鹼基，並以 200 個鹼基為宜，更宜為 150 個鹼基，更以 100 個鹼基為佳，尤宜為 80 個鹼基。

本發明之 ssNc 分子的構成單元並未特別受限，可列舉如核苷酸殘基。前述核苷酸殘基則可列舉如核糖核苷酸殘基及去氧核糖核苷酸殘基。前述核苷酸殘基可列舉如未經修飾之非修飾核苷酸殘基以及業經修飾之修飾核苷酸殘基。舉例而言，本發明之 ssNc 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。再者，舉例來說，本發明之 ssNc 分子除了前述核苷酸殘基之外，更可含有非核苷酸殘基。前述核苷酸殘基及前述非核苷酸殘基之詳情則如後述。

於本發明之 ssNc 分子中，前述內部區域(Z)、前述 5'端側區域(Xc)及前述 3'端側區域(Yc)之構成單元分別以前述核苷酸殘基為宜。舉例來說，前

述各區域可以下述(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；以及
- (3)非修飾核苷酸殘基及修飾核苷酸殘基。

於本發明之 ssNc 分子中，前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)之構成單元並未特別受限，舉例來說，可列舉如前述核苷酸殘基及前述非核苷酸殘基。前述連結區域舉例來說可僅由前述核苷酸殘基所構成，亦可僅由前述非核苷酸殘基所構成，尙可由前述核苷酸殘基與前述非核苷酸殘基所構成。前述連結區域舉例來說由下述(1)~(7)之殘基所構成：

- (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；以及
- (7)非核苷酸殘基、非修飾核苷酸殘基及修飾核苷酸殘基。

本發明之 ssNc 分子具有前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)兩者時，舉例來說，兩者之構成單元可相同亦可不同。就具體例來說，可列舉如：兩者之連結區域的構成單元為前述核苷酸殘基之形態；兩者之連結區域的構成單元為前述非核苷酸殘基之形態；以及，其中一區域之構成單元為前述核苷酸殘基，另一連結區域之構成單元則為非核苷酸殘基的形態等。

本發明之 ssNc 分子舉例來說可列舉如僅由前述核苷酸殘基所構成之分子、除了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 ssNc 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，尙可為前述非修飾核苷酸殘基與前述修飾核苷酸殘基兩者。前述 ssNc 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，例如為「1 或數個」，具體而言則例如為 1~5 個，且宜為 1~4 個，更宜為 1~3 個，而最宜為 1 或 2 個。本發明之 ssNc 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」，具體而言則例如為 1~8 個、1~6 個、1~4 個、1、2 或 3 個。

本發明之 ssNc 分子中，舉例來說前述核苷酸殘基宜為核糖核苷酸殘基。此時，舉例而言，本發明之 ssNc 分子亦稱為「RNA 分子」或「ssRNA 分子」。前述 ssRNA 分子可列舉如僅由前述核糖核苷酸殘基所構成之分子、除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。前述 ssRNA 分子中，前述核糖核苷酸殘基如前所述般，舉例來說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與前述修飾核糖核苷酸殘基兩者。

舉例來說，前述 ssRNA 分子在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。舉例來說，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亦可為核糖殘基業經去氧核糖殘基取代之前述去氧核糖核苷酸殘基。舉例來說，前述 ssRNA 分子在除了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，例如為「1 或數個」，具體來說則例如為 1~5 個，且宜為 1~4 個，更宜為 1~3 個，且最宜為 1 或 2 個。

舉例來說，本發明之 ssNc 分子亦可含有標識物質且以前述標識物質而受到標識化。前述標識物質並未特別受限，可列舉如螢光物質、色素及同位素等。前述標識物質可列舉如芘、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輻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 。

本發明之 ssNc 分子如前述般可抑制前述目標基因之表現。因此，舉例來說，本發明之 ssNc 分子可用作基因為成因之疾病的治療劑。舉例來說，

本發明之 ssNc 分子在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時，例如，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」包含前述疾病之預防、疾病之改善及預後之改善等意義，可為其中任一者。

本發明之 ssNc 分子之使用方法並未特別受限，例如，對具有前述目標基因之投予對象投予前述 ssNc 分子即可。

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，前述投予可作活體內(in vivo)亦可作活體外(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。

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。且如前所述，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。

茲將本發明之 ssNc 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 ssNc 分子之鹼基序列可例示如序列編號 2、7、8、13、14、29-35、37、43、44、47、48 及 51-80 之鹼基序列，此外，前述鹼基序列中，舉例來說亦可是 1 或數個缺損、取代及/或附加之鹼基序列。前述目標基因為 GAPDH 基因時，可列舉如序列編號 2、7、8、13、37 及 51-80 之鹼基序列；目標基因為 TGF- β 1 時，可列舉如序列編號 14、29-35 之鹼基序列；前述目標基因為 LAMA1 基因時，可列舉如序列編號 43、44 之鹼基序列；前述目標基因為 LMNA 基因時，則可列舉如序列編號 47、48 之鹼基序列。

關於本發明之 ssNc 分子的用途，則可參照後述之本發明組成物、抑制表現方法及治療方法等之記載。

如前所述，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。

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。

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。

舉例來說，前述修飾核苷酸殘基為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。

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。

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鹵素。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。

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。

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，最與糖殘基鄰接之磷酸基被稱為 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 磷酸基宜進行呈非帶電之修飾，或是使前述非結合氧中之電荷分布呈非對稱型之修飾。

舉例而言，前述磷酸基亦可將前述非結合氧取代。前述之氧可藉由例如 S(硫)、Se(碲)、B(硼)、C(碳)、H(氫)、N(氮)及 OR(R 為烷基或芳基)中之任一原子作取代，且宜以 S 作取代。舉例來說，前述非結合氧例宜兩者均被取代，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)、磷碲酸酯(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。

舉例來說，前述磷酸基亦可將前述結合氧作取代。前述氧可以例如 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 ssNc 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。

舉例來說，前述磷酸基亦可取代為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、亞甲基伸肟基、亞

甲基二甲基伸肼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。

舉例來說，本發明之 ssNc 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。前述修飾例如可為 3'末端及 5'末端中之任一者，亦可為兩者。前述修飾例如前述，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。

前述末端核苷酸殘基之修飾可列舉如附加其他分子。前述其他分子如前述般可列舉如標識物質、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。前述標識物質等之機能性分子，舉例來說可利用於本發明 ssNc 分子之檢測等。

前述其他分子例如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。

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。

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-芘醌酸、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、巰基、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。

舉例來說，本發明之 ssNc 分子的前述 5' 末端亦可以磷酸基或磷酸基類似物作修飾。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' 一二硫代磷酸(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'-烷基膦酸(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'-烷基醚膦酸(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。

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。

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苳、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-甲基胺基-2-硫代尿嘧啶；3-(3-胺基-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(Englich 等)，Angewandte Chemie，International Edition，1991，第 30 卷，p.613 所揭示之物。

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。

3. 非核苷酸殘基

前述非核苷酸殘基並未特別受限。舉例來說，本發明之 ssNc 分子可具有含吡啶骨架或嘧啶骨架之非核苷酸結構作為前述非核苷酸殘基。舉例來說，宜於前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)中之至少一者具有前述非核苷酸殘基。舉例來說，可於前述連結區域(Lx)具有前述非核苷酸殘基，亦可

於前述連結區域(Ly)具有前述非核苷酸殘基，還可在前述連結區域之兩者中具有前述非核苷酸殘基。舉例來說，前述連結區域(Lx)及前述連結區域(Ly)可相同亦可相異。

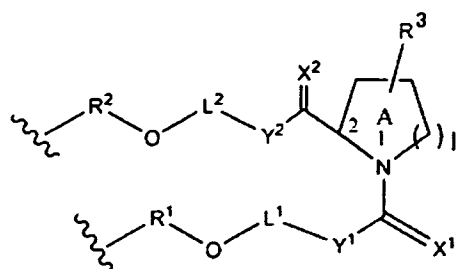
舉例來說，前述吡啶骨架亦可為：構成吡啶之 5 員環的碳中有 1 個以上受到取代之吡啶衍生物的骨架，且受取代的情況下，舉例來說宜為 C-2 之碳以外的碳原子。舉例來說，前述碳可以氮、氧或硫來取代。舉例來說，前述吡啶骨架亦可在吡啶之 5 員環內含有例如碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵。前述吡啶骨架中，舉例來說，構成吡啶之 5 員環的碳及氮可結合有氫基，亦可結合有如後述之取代基。舉例來說，前述連結區域(Lx)亦可透過前述吡啶骨架中之任一基而與前述區域(X)及前述區域(Xc)結合，且宜為前述 5 員環中之任一個碳原子與氮原子，更宜為前述 5 員環之 2 位碳(C-2)與氮。前述吡啶骨架可列舉如脯胺酸(proline)骨架、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。

舉例來說，前述哌啶骨架亦可為構成哌啶之 6 員環的碳有 1 個以上受到取代之哌啶衍生物的骨架，受取代時，舉例來說宜為 C-2 之碳以外的碳原子。舉例來說，前述碳可以氮、氧或硫來取代。舉例來說，前述哌啶骨架亦可在哌啶之 6 員環內含有例如碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵。前述哌啶骨架中，舉例來說，構成哌啶之 6 員環的碳及氮亦可結合氫基，亦可結合如後述之取代基。舉例來說，前述連結區域(Lx)可透過前述哌啶骨架中之任一基而與前述區域(X)及前述區域(Xc)結合，且宜是前述 6 員環中之任一個碳原子與氮，且更宜是前述 6 員環之 2 位碳(C-2)與氮。就前述連結區域(Ly)而言，亦是相同。

舉例來說，前述連結區域亦可僅是由前述非核苷酸結構所構成之非核苷酸殘基，亦可含有前述非核苷酸結構所構成之非核苷酸殘基與核苷酸殘基。

前述連結區域例如可以下述式(I)表示。

【化 1】



... (I)

前述式(I)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^3 為結合至環 A 上之 C-3、C-4、C-5 或 C-6 的氫原子或取代基，且前述取代基為 OH、 OR^4 、 NH_2 、 NHR^4 、 NR^4R^5 、SH、 SR^4 或側氧基(=O)；

R^3 為前述取代基時，取代基 R^3 可為 1 個或多數個，亦可不存在，且有多數個時可相同亦可不同；

R^4 及 R^5 為取代基或保護基，且可相同或不同；

L^1 為 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以 OH、 OR^a 、 NH_2 、 NHR^a 、 NR^aR^b 、SH 或 SR^a 取代，且亦可不受取代，或者是

L^1 為前述伸烷基鏈中之一個以上碳原子受到氧原子取代而成之聚醚鏈；

但 Y^1 為 NH、O 或 S 時，與 Y^1 結合之 L^1 的原子為碳，且與 OR^1 結合之 L^1 的原子為碳，氧原子則彼此不鄰接；

L^2 為 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以 OH、 OR^c 、 NH_2 、 NHR^c 、 NR^cR^d 、SH 或 SR^c 取代或不受取代，或者，

L^2 為前述伸烷基鏈中之一個以上碳原子受到氧原子取代而成之聚醚鏈；

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

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 中之前述環 A 上之 C-2 以外的 1 個碳原子亦可以氮、氧或硫來取代；

前述環 A 內亦可含有碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵。前述連結區域(Lx)以前述式(1)表示時，前述區域(Xc)及前述區域(X)分別透過-OR¹-或-OR²-而結合至前述連結區域(Lx)。再者，前述連結區域(Ly)以前述式(1)表示時，前述區域(Yc)及前述區域(Y)分別透過-OR¹-或-OR²-而結合至前述連結區域(Ly)。於此，R¹ 及 R² 可存在亦可不存在，且存在時，R¹ 及 R² 分別獨立為核苷酸殘基或前述構造(I)。

前述式(I)中，舉例來說，X¹ 及 X² 分別獨立為 H₂、O、S 或 NH。前述式(I)中，X¹ 為 H₂ 意指：X¹ 與 X¹ 所結合之碳原子共同形成 CH₂(亞甲基)。就 X² 而言亦是相同。

於前述式(I)中，環 A 中之 l 為 1 或 2。 $l=1$ 時，環 A 為 5 員環，舉例來說則為前述吡啶骨架。前述吡啶骨架可例示如脯胺酸骨架、脯胺醇骨架等，其等之二價結構。 $l=2$ 時，環 A 為 6 員環，舉例來說則為前述嘧啶骨架。環 A 之中，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 之中含有碳-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。

前述式(I)中，Y¹ 及 Y² 分別獨立為單鍵、CH₂、NH、O 或 S。

前述式(I)中，R³ 係與環 A 上之 C-3、C-4、C-5 或 C-6 結合的氫原子或取代基。前述取代基為 OH、OR⁴、NH₂、NHR⁴、NR⁴R⁵、SH、SR⁴ 或側氧基(=O)。R³ 為前述取代基時，取代基 R³ 可為 1 個或多數個，亦可不存在；有多數個時，可相同亦可不同。R⁴ 及 R⁵ 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)、羧烷基、烷氧基烷基、胺烷基、雜環基烯基(heterocyclalkenyl)、雜環基烷基、雜芳基烷基、矽基及矽氧烷基等。以下相同。

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」 Penum 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 基)、雙(2-乙醯氧基乙基氧基)甲基(ACE 基)、三異丙基矽氧基甲基(TOM 基)、1-(2-氰基乙氧基)乙基(CEE 基)、2-氰基乙氧基甲基(CEM 基)及甲苯磺醯基乙氧基甲基(TEM 基)、二甲氧基三苯甲基(DMTTr 基)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。

前述式(I)中， L^1 為 n 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亦可經 OH 、 OR^a 、 NH_2 、 NHR^a 、 NR^aR^b 、 SH 或 SR^a 取代，亦可不受取代。或者， L^1 亦可為前述伸烷基鏈之一個以上碳原子經氧原子取代而成的聚醚鏈。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 結合之 L^1 的原子為碳，與 OR^1 結合之 L^1 的原子為碳，氧原子彼此不鄰接。亦即，例如 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。

前述式(I)中， L^2 為 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，亦可不受取代。或者， L^2 亦可為前述伸烷基鏈之一個以上碳原子經氧原子取代而成之聚醚鏈。另， Y^2 為 NH 、 O 或 S 時，與 Y^2 結合之 L^2 的原子為碳，與 OR^2 結合之 L^2 的原子為碳，氧原子則彼此不鄰接。亦即，例如 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。

L^1 之 n 及 L^2 之 m 並未特別受限，各自之下限例如為 0，上限亦未特別受限。舉例來說， n 及 m 可因應前述連結區域(Lx)之所欲長度而適當地予以設定。舉例來說，從製造成本及收率等觀點來看， n 及 m 分別宜為 0~30，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。

R^a 、 R^b 、 R^c 及 R^d 各自獨立，可列舉如取代基或保護基。舉例來說，前述取代基及前述保護基與前述者相同。

前述式(I)中，舉例來說氫原子可分別獨立地被 Cl、Br、F 及 I 等鹵素取代。

前述連結區域(Lx)以前述式(I)表示時，舉例來說，前述區域(Xc)及前述區域(X)分別透過-OR¹-或-OR²-而與前述連結區域(Lx)結合。於此，R¹及R²可存在亦可不存在。R¹及R²存在時，R¹及R²各自獨立為核苷酸殘基或前述式(I)之結構。R¹及/或R²為前述核苷酸殘基時，舉例來說，前述連結區域(Lx)係由下述者形成：由核苷酸殘基R¹及/或R²除外之前述式(I)結構所構成之前述非核苷酸殘基；及，前述核苷酸殘基。R¹及/或R²為前述式(I)結構時，舉例來說，前述連結區域(Lx)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而成的結構。前述式(I)之結構例如可含有1個、2個、3個或4個。如前述般含有多數前述結構時，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連結。另一方面，R¹及R²不存在時，舉例來說，前述連結區域(Lx)僅由前述式(I)結構所構成之前述非核苷酸殘基所形成。此外，前述連結區域(Ly)以前述式(I)表示時，舉例來說，前述區域(Yc)、前述區域(Y)及前述連結區域(Ly)亦可援用前述連結區域(Lx)之說明。

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

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)

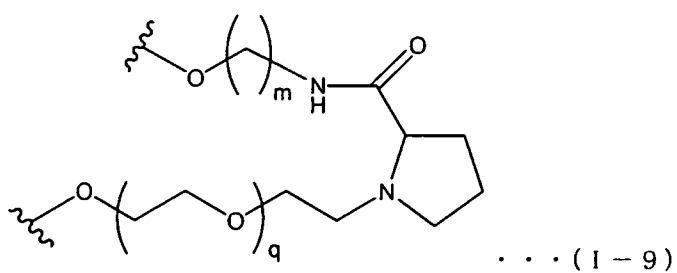
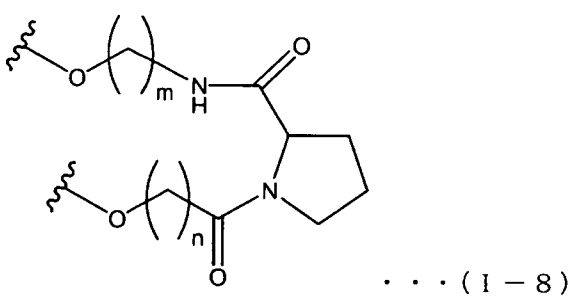
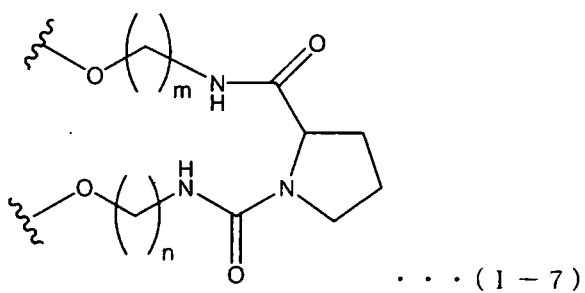
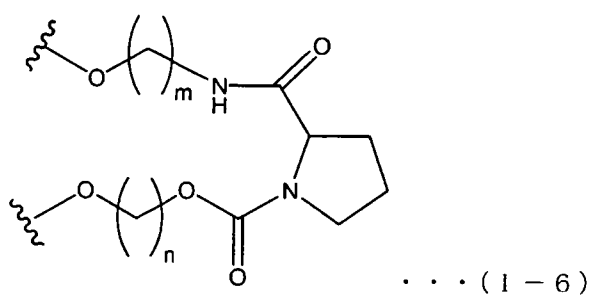
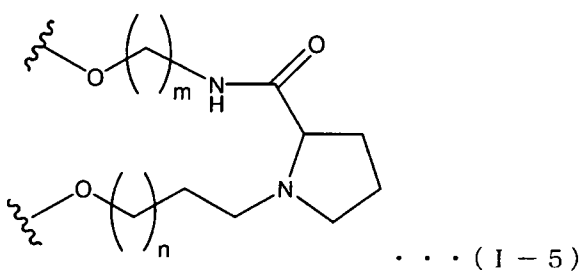
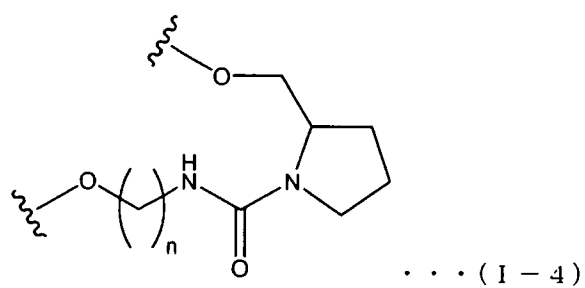
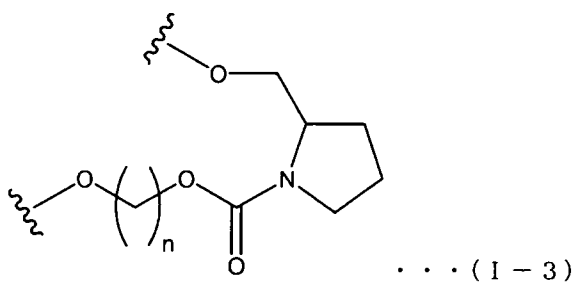
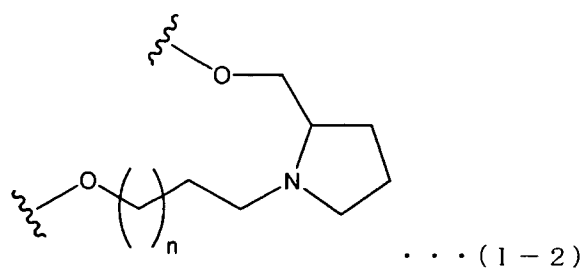
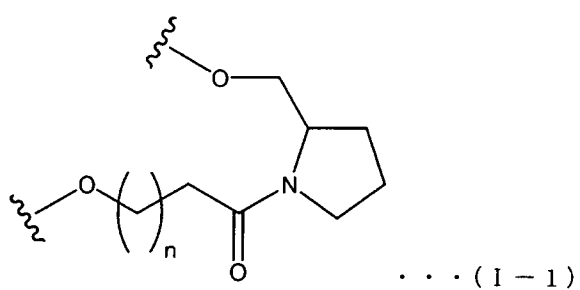
前述區域(Xc)透過-OR¹-且前述區域(X)透過-OR²-而與前述式(I)之結構

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。

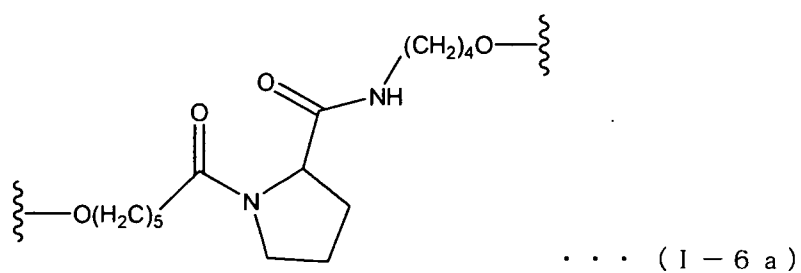
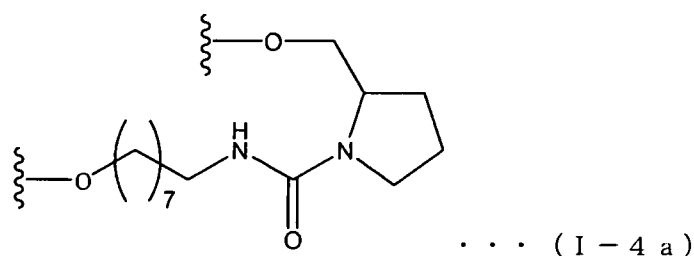
前述式(I)之結構可例示如下述式(I-1)~式(I-9)，於下述式中，n 及 m 與前述式(I)相同。下述式中，q 為 0~10 之整數。

【化 2】



前述式(I-1)~(I-9)中， n 、 m 及 q 並未特別受限，如同前述。作為具體例，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， $n=3$ 且 $m=4$ ；前述(I-6)中， $n=8$ 且 $m=4$ ；前述式(I-7)中， $n=8$ 且 $m=4$ ；前述(I-8)中， $n=5$ 且 $m=4$ ；前述式(I-9)中， $q=1$ 且 $m=4$ 。茲將前述式(I-4)之一例($n=8$)示於下述式(I-4a)，並將前述式(I-6)之一例($n=5$ 、 $m=4$)示於下述式(I-6a)。

【化 3】



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 $1\sim 30$ ，且宜為 $1\sim 6$ 或 $1\sim 4$ 。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。且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。

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 $2\sim 8$ 。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。

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。

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。且較佳者可列舉如苯基、1-萘基及 2-萘基等之萘基等。

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、喹啉基(例如：2-喹啉基、5-喹啉基、6-喹啉基)、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)、呋咁基(例如：1-呋咁基、5-呋咁基、6-呋咁基)、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)、嘧啶基、喋啶基(例如：2-喋啶基、4-喋啶基、6-喋啶基、7-喋啶基)、呋唑基、啡啶基、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)、呋哌基(例如：1-呋哌基、2-呋哌基、3-呋哌基、4-呋哌基、5-呋哌基、6-呋哌基、7-呋哌基)、異呋哌基、啡咁基(例如：1-啡咁基、2-啡咁基)或啡噻咁基(例：1-啡噻咁基、2-啡噻咁基、3-啡噻咁基、4-啡噻咁基)等。

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。

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。

於本發明中「螺烴基」可列舉如螺[3.4]辛基等。

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。

於本發明中，「芳烷基」可列舉如苄基、2-苄乙基及萘甲基等，「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，「羧烷基」則可列舉如羧甲基及 2-羧乙基等。

於本發明中，「烷氧基」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。

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-吡咯啶基、2-吡咯啶基、3-吡咯啶基、吡咯啶酮、1-咪唑啉基、2-咪唑啉基、4-咪唑啉基、1-咪唑啶基、2-咪唑啶基、4-咪唑啶基、

咪唑啉酮、1-吡唑啉基、3-吡唑啉基、4-吡唑啉基、1-吡唑啉基、3-吡唑啉基、4-吡唑啉基、吡唑啉酮、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-咪唑基、3-咪唑基、N-咪唑基、四氫哌喃基及四氫呋喃基等。

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。

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。

於本發明中，「伸烷基」可列舉如亞甲基、伸乙基及伸丙基等。

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、苄乙基)、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(例如：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、苄甲醯基胺基)、芳烷基胺基(例如：苄基胺基、三苄基胺基)、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。

4. 本發明之 ssNc 分子之合成方法

本發明之 ssNc 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。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-膦酸鹽法(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。

5.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 ssNc 分子。本發明之組成物係以含有前述本發明之 ssNc 分子為特徵，至於其他構成則並未受到任何限制。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。

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。

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 ssNc 分子。本發明之組成物係以含有前述本發明之 ssNc 分子為特徵，至於其他構成則並未受到任何限制。本發明之藥學組成物例如亦可稱為醫藥品。

若依本發明，舉例來說，藉由投藥予基因為疾病成因之患者，則可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。

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。

作為具體例，若將前述目標基因設為前述 TGF- β 1 基因，並將對於前述基因之抑制表現序列配置於前述 ssNc 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。

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 ssNc 分子投予具有前述目標基因

之投予對象即可。

前述投藥對象可列舉如細胞、組織或器官。前述投藥對象可列舉如人類、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單離出之細胞等。

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。

舉例來說，本發明之組成物可僅含本發明之 ssNc 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。

於本發明之組成物中，舉例來說，前述 ssNc 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 ssNc 分子。前述 ssNc 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)。

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。

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、融合劑及賦形劑等。

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-

經丙基)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。

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-乙醯半乳胺糖、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。

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。

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。

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。

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。

6. 表現抑制方法

如前述，本發明之表現抑制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 ssNc 分子。本發明之表現抑制方法係以使用前述本發明之 ssNc 分子作為特徵，至於其他步驟及條件則不受任何限制。

本發明之表現抑制方法中，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 干擾現象所引起之表現抑制。於此，舉例來說，本發明之表現抑制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 ssNc 分子為特徵之表現誘導方法。

本發明之表現抑制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 ssNc 分子的步驟。透過前述投予步驟，舉例來說，使前述 ssNc 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)。

舉例而言，本發明之表現抑制方法可單獨投予前述 ssNc 分子，亦可投予含有前述 ssNc 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。

7. 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 ssNc 分子投予患者之步驟，且特徵在於：前述 ssNc 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 ssNc 分子作為特徵，至於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表現抑制方法。前述投予方法不受特別限制，例如可為經口投予及非經口投予中之任一者。

8. ssNc 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 ssNc 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 ssNc 分子的用途。

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 ssNc 分子，且前述 ssNc 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抑制表現序列。

成所需濃度。

(實施例 A2)HCT116 細胞中之 GAPDH 基因之表現抑制效果

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

(1)材料及方法

使用前述實施例 A1 之 ssRNA(NK-0016)作為實施例之 RNA(Ex)。

【化 6】

E x : N K - 0 0 1 6 (序列編號2)

5'- caugagaaguaugacaacagccCCACACGGGCGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCGgaa-3'

Xc X Y Yc

使前述 RNA 溶解於注射用蒸餾水至所需濃度，調製出 RNA 溶液。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 且 5%CO₂ 下。

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 井皿中而成爲 2 $\times$ 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 之最終濃度爲 5nmol/L、10nmol/L、20nmol/L、40nmol/L。

表 1

(每井之組成: μL)

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

轉染後，將前述井中之細胞培養 48 小時，之後使用 RNeasy Mini Kit(商品名，Qiagen)，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，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。

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 基因用引子組

5'-GGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGC-3'(序列編號9)

5'-TGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTG-3'(序列編號10)

β -肌動蛋白基因用引子組

5'-GCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3'(序列編號11)

5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGTCAC-3'(序列編號12)

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)。

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。

(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。如第 4 圖所示般，前述 NK-0016 與未添加 RNA 之控制組(-)相較下為較低之表現量，而得知已抑制 GAPDH 基因之表現。此外，如第 4 圖所示，得知顯示出投予量相依性之基因表現抑制效果。

(實施例 A3)HCT116 細胞中之 GAPDH 基因之表現抑制效果

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

(1)材料及方法

使用前述實施例 A1 之 ssRNA(NK-0016)作為實施例之 RNA(Ex)。比較例之 RNA 則使用 RNAi 陽性控制組(Pc)之前述 dsRNA(NI-0011)。使前述

RNA 溶解於注射用蒸餾水至成為 40 μ mol/L，調製出 RNA 溶液。

除使用前述 RNA 溶液之外，與前述實施例 A2 同樣地確認 HCT116 細胞中之 GAPDH 基因表現量。令轉染時之 RNA 濃度為 40nmol/L。

(2)結果

茲將其等之結果示於第 5 圖。第 5 圖係一顯示 GAPDH 基因表現量相對值之圖表，縱軸為相對基因表現量。如第 5 圖所示，前述實施例之 NK-0016 與比較例之 NI-0011 相較下，顯示出極強之基因表現抑制活性。

(實施例 A4)A549 細胞及 293 細胞中之 GAPDH 基因表現抑制效果

使用本發明之 ssRNA，確認 RNA 干擾效果所引起之活體外(in vitro)GAPDH 基因表現抑制。

(1)材料及方法

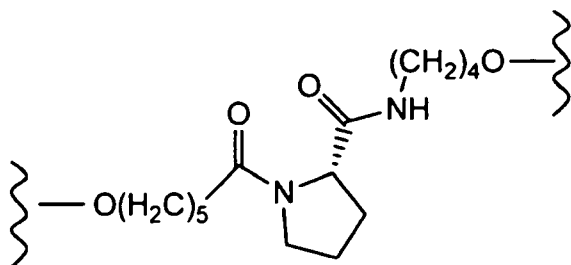
實施例之 RNA(Ex)使用前述實施例 A1 之 NK-0016 及以下之 Ex-ssRNA(PK-0004)。前述 PK-0004 中，連結區域(Lx)及連結區域(Ly)係使用實施例 B 所示流程 3 之化合物 10(L-脯胺酸二醯胺亞醯胺)而使 Xc 與 X 之間及 Yc 與 Y 之間結合。茲將前述兩鏈結(linker)之化學式顯示於下。前述 NK-0016 與前述 PK-0004 除了 Xc 與 X 之間的連結區域(Lx)以及 Yc 與 Y 之間的連結區域(Ly)不同之外，製成相同序列。

【化7】

E x : N K - 0 0 1 6 (序列編號2)



E x : P K - 0 0 0 4 (序列編號13)



使前述 RNA 溶解於注射用蒸餾水至成為 20 μ mol/L，調製出 RNA 溶液。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 $^{\circ}$ C 且於 5%CO₂ 下。

首先，於前述培養基中培養細胞，並將該培養液以 400 μ L 各別注入 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)並依照所附規程而將前述 RNA 予以轉染。具體來說，則是對 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，將兩者一起添加 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 2
(每井之組成： μ L)

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

轉染後，將前述細胞培養 48 小時，與前述實施例 A2 同樣地進行 RNA 回收、cDNA 合成及 PCR，測定 GAPDH 基因之相對表現量。

(2)結果

茲將該等結果示於第 6 及 7 圖。第 6 圖為 A549 細胞之結果，第 7 圖為 293 細胞之結果。第 6 及 7 圖為顯示 GAPDH 基因表現量相對值之圖表。如第 6 及 7 圖所示，實施例之 NK-0016 及 PK-0004 顯示出強烈之基因表現抑制活性，且顯示出濃度相依性之效果。

(實施例 A5)Hepal-6 細胞中之 TGF- β 1 基因表現抑制效果

就本發明之 ssRNA，確認活體外之 TGF- β 1 基因表現抑制效果。

(1)材料及方法

實施例之 RNA(Ex)使用以下所示之 ssRNA(NK-0033)。前述 NK-0033

具有可抑制 TGF- β 1 基因表現且 21 個鹼基長之下述序列。該序列係以 Cheng 氏等人所使用之 siRNA(Mol. Pharm., 2009, 6, 772-779)為準設計者。

TGF- β 1 基因抑制表現序列(序列編號 16)

5'-AAAGUCAAUGUACAGCUGCUU-3'

比較例之 RNA 使用如下所示之 RNAi 陰性控制組 (Nc) 的 ssRNA(NK-0035)。NK-0035 並非組入前述抑制表現序列，而是組入與表現抑制無關之擾亂序列(scramble sequences)。

【化8】

E x : N K - 0 0 3 3 (序列編號80)

5'-cagcuguacauugacuuuagccCACACCGGCUAAAGUCAUGUACAGCUGCUUCUUCgga**-3'**

X_C **Z** **Y_C**

N c : NK-0035 (序列編號15)

5'-ugucagugcucuauuuacaagccCCACACCGGCUUGUAAUAGGCACUGACACUUCUUCGgaa-3'

Xc
Z
Yc

使前述 RNA 溶解於注射用蒸餾水而調製出 RNA 溶液。細胞使用 Hepa1-6 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°C、5%CO₂。

首先，於前述培養基中培養 Hepa1-6 細胞，將該培養液各以 400μL 分別注入 24 井皿中，成為 3×10^4 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)並依照所附規程，將前述 ssRNA 予以轉染。具體來說，則是將前述每井之組成設定如下並進行轉染。於下述組成中，(B)為 Opti-MEM(商品名, Invitrogen)，(C)為 20μmol/L 之前述 RNA 溶液，將兩者一起添加 98.5μL。此外，於前述井中，令前述 RNA 之最終濃度為 10nmol/L、25nmol/L、50nmol/L 及 100nmol/L。

表 3

(每井之組成：μL)

培養液	400
(A) Lipofectamine 2000	1.5
(B)+(C)	98.5

合計

500

轉染後，將前述井中之細胞培養 48 小時，之後使用 RNeasy Mini Kit(商品名，Qiagen)並依照所附規程回收 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，除了使用下述 TGF- β 1 基因用 PCR 引子組及 β -肌動蛋白基因用引子組之外，與前述實施例 A2 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 基因之表現量係以前述 β -肌動蛋白基因之表現量來修正。

TGF- β 1 基因用引子組

5'-CCATTGCTGTCCCGTGCAGAGCTG-3'(序列編號 17)

5'-ATGGTAGCCCTTGGGCTCGTGGATC-3'(序列編號 18)

β -肌動蛋白基因擴增用引子組

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

5'-GCAATGCCTGGGTACATGGTGG-3'(序列編號 20)

首先，與前述實施例 A2 同樣地就控制組(-)及控制組(mock)測定基因表現量。接著，針對補正後之 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。

(2)結果

茲將該等結果示於第 8 圖。第 8 圖為顯示 TGF- β 1 基因表現量相對值之圖表。如第 8 圖所示，前述實施例之 NK-0033 於活體外抑制了 TGF- β 1 基因之表現。另一方面，陰性控制組之 NK-0035 則未抑制 TGF- β 1 基因之表現。

(實施例 A6)活體內(in vivo)之 TGF- β 1 基因表現抑制效果及急性肺傷害抑制效果

針對本發明之 ssRNA 確認活體內之基因表現抑制及急性肺傷害抑制效果。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。

(1)材料及方法

(1.1)對急性肺傷害小鼠投予 ssRNA

實施例之 RNA(Ex)使用前述實施例 A5 之 ssRNA(NK-0033)。比較例之 RNA 則使用前述實施例 A5 所示之 RNAi 陰性控制組(Nc)的 ssRNA(NK-0035)。

使 100 μ g 之前述 RNA 溶解於滅菌生理食鹽水(日本化藥，以下相同)80 μ L，調製出 RNA 溶液。另一方面，使 100 μ g 之脂多醣(LPS)溶解於滅菌生理食鹽水 50 μ L，調製出 LPS 溶液。

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

作為相對於前述 LPS 之陰性控制組，使用 50 μ L 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 80 μ L 之滅菌生理食鹽水。

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 80 μ L 之滅菌生理食鹽水起 1 小時後，投予 50 μ L 之滅菌生理食鹽水。

・投予群 2

自投予 80 μ L 之 RNA 溶液(NK-0033)起 1 小時後，投予 50 μ L 之滅菌生理食鹽水。

・投予群 3

自投予 80 μ L 之 RNA 溶液(NK-0035)起 1 小時後，投予 50 μ L 之滅菌生理食鹽水。

・投予群 4

自投予 80 μ L 之滅菌生理食鹽水起 1 小時後，投予 50 μ L 之前述 LPS 溶液。

・投予群 5

自投予 80 μ L 之 RNA 溶液(NK-0033)起 1 小時後，投予 50 μ L 之前述 LPS 溶液。

・投予群 6

自投予 80 μ L 之 RNA 溶液(NK-0035)起 1 小時後，投予 50 μ L 之前述 LPS

溶液。

(1.2)支氣管肺泡洗淨液(BALF)之採樣

自滴定前述 LPS 溶液起 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，製成生化學解析及組織學解析之樣本。陰性控制組則是添加滅菌生理食鹽水來取代前述 LPS 溶液。

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，使用 NucleoCounter(商品名，ChemoMetec 社)測定前述 BALF 樣本中之總細胞數。

此外，將前述 BALF 樣本供予離心分離，回收前述 BALF 樣本之上清液，至進行生化學分析為止，保存於-80℃下。再者，為了計數前述 BALF 樣本所含不同種類之細胞，使用細胞離心塗片器(CytoSpin)將前述 BALF 樣本作離心分離，並使用 May-Grunwald-Giemsa(商品名，Merck)將分離出之細胞作吉姆沙染色。此外，從前述小鼠採取肺組織，進行 HE 染色。

(2)結果

(2.1)肺中之 TGF- β 1 基因表現抑制

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。

茲將其結果示於第 9 圖。第 9 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。LPS(+)/RNA(-)之投予群 4 與 LPS(-)/RNA(-)之投予群 1 相較下，經 LPS 處理之結果即是前述基因之表現量增加。且 LPS(+)/NK-0033(+)之實施例投予群 5 與 LPS(+)/RNA(-)投予群 4 相較下，前述基因之表現量上昇受到抑制。該抑制效果並未在 LPS(+)/陰性控制組 NK-0035(+)之投予群 6 觀察到。從此一結果得知，可藉由前述實施例之 NK-0033 來有效抑制 TGF- β 1 基因之表現。

(2.2)急性肺傷害抑制效果

急性肺傷害之炎症係因嗜中性球等之細胞浸潤至肺而產生。因此，可抑制嗜中性球等細胞對肺浸潤之藥物會成為急性肺傷害之炎症治療藥。在

此，將支氣管肺泡洗淨液(BALF)中之細胞數作為已朝肺浸潤之細胞數的指標，確認本發明 ssRNA 之藥理效果。

茲將前述 BALF 樣本中之細胞數測定結果示於第 10 圖。第 10 圖為圖表，顯示各投予群之 BALF 樣本中之細胞數。LPS(+)/RNA(-)之投予群 4 與 LPS(-)/RNA(-)之投予群 1 相較下，經 LPS 處理之結果即是前述 BALF 樣本中之細胞數增加。這顯示出炎症作用因 LPS 而受到誘導，其結果為細胞浸潤至肺。再者，LPS(+)/NK-0033(+)之實施例投予群 5 與 LPS(+)/RNA(-)之投予群 4 相較下，細胞數之上昇受到抑制。這顯示急性肺傷害之炎症因前述 NK-0033 而受到抑制。此一抑制效果並未在 LPS(+)/陰性控制組 NK-0035(+)之投予群 6 中觀察到。由此結果得知，可藉由前述實施例之 NK-0033 來有效抑制急性肺傷害之炎症。

茲將前述 BALF 樣本中之嗜中性球數測定結果示於第 11 圖。第 11 圖為圖表，顯示各投予群之 BALF 樣本中之嗜中性球細胞數。LPS(+)/RNA(-)之投予群 4 與 LPS(-)/RNA(-)之投予群 1 相較下，經 LPS 處理之結果即是前述 BALF 樣本中之嗜中性球數增加。這顯示炎症作用因 LPS 而受到誘導，其結果為嗜中性球浸潤至肺。再者，LPS(+)/NK-0033(+)之實施例投予群 5 與 LPS(+)/ssRNA(-)之投予群 4 相較下，前述 BALF 樣本中之嗜中性球數之上昇受到抑制。這顯示急性肺傷害之炎症因前述 NK-0033 而受到抑制。此一抑制效果並未在 LPS(+)/陰性控制組 NK-0035(+)之投予群 6 中觀察到。由此結果得知，可藉由前述實施例之 NK-0033 來有效抑制急性肺傷害之炎症。

(2.3)組織學上的觀察：吉姆沙染色

茲將吉姆沙染色之結果示於第 12 圖。第 12 圖為照片，顯示前述 BALF 樣本中之細胞的吉姆沙染色結果(倍率 100 倍)。於第 12 圖中，(A)為 LPS(+)/RNA(-)之投予群 4 的結果，(B)為 LPS(+)/陰性控制組 NK-0035(+)之投予群 6 的結果，(C)顯示 LPS(+)/NK-0033(+)之實施例投予群 5 的結果。

如第 12 圖所示，LPS(+)/NK-0033(+)之實施例投予群 5(C)與 LPS(+)/RNA(-)之投予群 4(A)及 LPS(+)/陰性控制組 NK-0035(+)之投予群 6(B)相較下，浸潤至肺之細胞數顯著較少。此種組織學上的觀察與前述 BALF 樣本中之細胞數結果一致。

(2.4)組織學上的觀察：HE 染色

茲將 HE 染色之結果示於第 13 圖。第 10 圖為照片，顯示前述肺組織之 HE 染色結果(倍率 10 倍)。於第 10 圖中，(A)為 LPS(+)/RNA(-)之投予群 4 的結果，(B)為 LPS(+)/陰性控制組 NK-0035(+)-之投予群 6 的結果，(C)顯示 LPS(+)/NK-0033(+)-之實施例投予群 5 的結果。從第 13 圖得知，嗜中性球等之細胞朝血管周圍、肺胞腔內、肺胞壁及支氣管周邊之浸潤減少，肺組織之傷害性降低。

(實施例 A7)以誘導干擾素為指標之副作用評估

習知方法之 iRNA 劑已知其副作用會序列非相依性地誘導干擾素，且該副作用被視為問題。於此，就本發明之 ssRNA 評估誘導干擾素之副作用。

(1)材料及方法

藉由與前述實施例 A6 相同之方法及條件，對急性肺傷害小鼠進行 ssRNA 之投予。接著，與前述實施例 A6 相同地滴定前述 LPS 溶液或滅菌生理食鹽水(相對於 LPS 之陰性控制組)，過 24 小時後使小鼠安樂死，採取肺組織。

表 4

投予群	RNA	LPS
1	—	—
2	Ex：NK-0033	—
4	—	+
5	Ex：NK-0033	+

EX：實施例之 RNA
Nc：RNAi 陰性控制組之 RNA

為了測定各基因之表現量，使用 TRIZOL(商品名，Invitrogen)從前述肺組織分離出 RNA。其次，使用逆轉錄酶(商品名 SuperScriptII，Invitrogen)，依照所附規程從前述 RNA 合成出 cDNA。接著，將合成出之前述 cDNA 用作模板進行 PCR，測定出 TGF-β1 基因、IFN-α 基因及 IFN-β 基因之表現量。

前述 PCR 使用 Gold AmpliTaq(商品名, Applied Biosystem, 美國)作為試劑, 測定機器則使用 AB Applied Biosystem 7600(商品名, Applied Biosystem)。TGF- β 1 基因、IFN- α 基因及 IFN- β 基因之擴增分別使用以下之引子組。

GAPDH 基因用引子組

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

5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3'(序列編號 22)

TGF- β 1 基因用引子組

5'-ACTCCACGTGGAAATCAACGG-3'(序列編號 23)

5'-TAGTAGACGATGGGCAGTGG-3'(序列編號 24)

IFN- α 基因用引子組

5'-ATGGCTAGRCTCTGTGCTTCCT-3'(序列編號 25)

5'-AGGGCTCTCCAGAYTTCTGCTCTG-3'(序列編號 26)

IFN- β 基因用引子組

5'-CATCAACTATAAGCAGCTCCA-3'(序列編號 27)

5'-TTCAAGTGGAGAGCAGTTCAG-3(序列編號 28)

接著, 使所得 PCR 產物進行瓊脂電泳。此外, 針對電泳後之瓊脂使用 NIH imaging system 進行密度解析, 確認各基因之表現量。前述 TGF- β 1 基因、前述 IFN- α 基因及前述 IFN- β 基因之表現量係各自以前述 GAPDH 基因之表現量為標準, 並相對性地作評估。具體來說, 則是令使用前述 GAPDH 基因用引子組之 PCR 產物的測定強度為標準 1, 求出使用各基因用引子組之 PCR 產物的測定強度相對值並進行評估。

(2)結果及考察

茲將關於前述 TGF- β 1 基因、IFN- α 基因及 IFN- β 基因之表現量的定量解析結果分別顯示於第 14(A)~(C)圖之圖表。各投予群與前述實施例 A6 同樣地係如下所示。

第 14(A)圖為 TGF- β 1 基因表現量之結果。如第 14(A)圖所示, 已投予前述 NK-0033 之實施例投予群 5 與 RNA(-)之投予群 4 相較下, 以抑制了受 LPS 誘導之 TGF- β 1 基因表現上昇。此一結果與前述實施例 A5 之第 8 圖所

示 TGF- β 1 表現量的測定結果呈正相關。

第 14(B)圖係顯示 IFN- α 基因表現量之結果，第 14(C)圖係顯示 IFN- β 基因表現量之結果。如第 14(B)圖及第 14(C)圖所示，未添加 LPS 時，將 RNA(-) 之投予群 1 與 RNA(+) 之投予群 2 予以比較之結果，並未發生因添加 ssRNA 所導致之 IFN- α 基因及 IFN- β 基因(屬 I 型干擾素)的表現誘導。此外，如第 14(B)圖及第 14(C)圖所示，添加 LPS 時，將 RNA(-) 之投予群 4 與 NK-0033(+) 之投予群 5 予以比較的結果，同樣地未發生因添加 ssRNA 所導致之 IFN- α 基因及 IFN- β 基因的表現誘導。

此一結果與會產生 I 型干擾素誘導之副作用的習知 siRNA 結果呈對照。亦即，本發明之 ssRNA 超乎意料地不會產生在習知方法中成為問題之干擾素誘導的副作用，此一事實已受到證實。

(實施例 A8)Hepal-6 細胞中之 TGF- β 1 基因的表現抑制效果

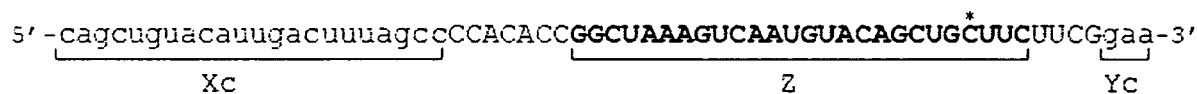
針對本發明之 ssRNA，確認活體外之 TGF- β 1 基因的表現抑制效果。

(1)材料及方法

實施例之 RNA(Ex)使用前述實施例 A5 之 NK-0033 以及如下所示之 NK-0061、NK-0055 及 NK-0062。於下述序列中，「*」表示自由鹼基。

【化 9】

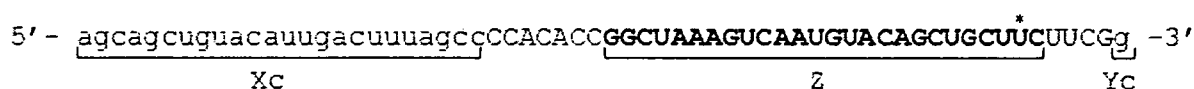
Ex : NK-0033 (序列編號80)



Ex : NK-0061 (序列編號29)



Ex : NK-0055 (序列編號30)



Ex : NK-0062 (序列編號31)



此外，實施例之 RNA(Ex)使用下述 PK-0007、PK-0026、PK-0027 及 PK-0028。該等 ssRNA 中，連結區域(Lx)及連結區域(Ly)係使用實施例 B 所示流程 3 之化合物 10(L-脯胺酸二亞醯胺)而使 Xc 與 X 之間以及 Yc 與 Y 之間結合。

【化 10】

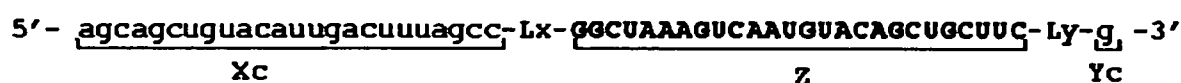
Ex : PK-0007 (序列編號32)



Ex : PK-0026 (序列編號33)



Ex : PK-0027 (序列編號34)



Ex : PK-0028 (序列編號35)



[NK-0033、NK-0061、NK-0055、NK-0062]與[PK-0007、PK-0026、PK-0027]及[PK-0028]除了前述第 1 連接子(L1)及第 2 連接子(L2)不同之外，為相同之序列；且均有可抑制 TGF- β 1 基因表現之序列(序列編號 16)。

(1.2)基因之表現抑制

使已冷凍保存之前述 RNA 溶解於注射用蒸餾水而成為 20 μ mol/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 A5 同樣地進行前述 ssRNA 對 Hepal-6 細胞之轉染、RNA 回收、cDNA 合成及 PCR。測定 TGF- β 1 基因之相對表現量。令轉染時之 RNA 濃度為 1nmol/L。

(2)結果

茲將此等結果示於第 15 及 16 圖。第 15 圖及第 16 圖為圖表，分別顯示 TGF- β 1 基因表現量之相對值。第 15 圖係使用 NK-0033、NK-0061、NK-0055 及 NK-0062 之結果，第 16 圖係使用 PK-0007、PK-0026、PK-0027 及 PK-0028 之結果。如第 15 及 16 圖所示，任一個 ssRNA 均顯示出強烈之基因表現抑制活性。

(實施例 A9)

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

(A9-1)活體內之 TGF- β 1 基因表現抑制效果

使用本發明之 ssRNA，確認活體內之 TGF- β 1 基因的表現抑制效果。

(1)材料及方法

對於急性肺傷害小鼠之 RNA 投予，只要未特別表示，即與前述實施例 A6 相同地進行。

實施例之 RNA(Ex)使用前述實施例 A85 之 PK-0007 及 NK0033。此外，比較例之 RNA 則使用以下所示之 RNAi 陰性控制組(Nc)的 PK-0008 及 NK-0035、RNAi 陽性控制組(Pc)之 dsRNA(NI-0030)及 RNAi 陰性控制組(Nc)之 dsRNA(NI-0031)。陰性控制組之 PK-0008 與 PK-0007 相同，具有源自前述亞醯胺(流程 3 之前述化合物 10：L-脯胺酸二醯胺亞醯胺)之連接子 Lx 及 Ly。

【化 11】

Ex : PK-0007 (序列編號32)

5' - cagcuguacauugacuuuagcc - Lx - GGCUAAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

Nc : PK-0008 (序列編號36)

5' - ugucagugcucauuuacaagcc - Lx - GGCUUGUAAAUGAGCACUGACACUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

Ex : NK-0033 (序列編號80)

5' - cagcuguacauugacuuuagcc CCACACC GGCUAAAAGUCA AUGUACAGCUGCUUCUUCG gaa - 3'
Xc Z Yc

Nc : NK-0035 (序列編號15)

5' - ugucagugcucauuuacaagcc CCACACC GGCUUGUAAAUGAGCACUGACACUUCUUCG gaa - 3'
Xc Z Yc

Pc : NI-0030

5' - GCAGCUGUACAUUGACUUUAG - 3' (序列編號39)

3' - UUCGUCGACAUGUAACUGAAA - 5' (序列編號40)

Nc : NI-0031

5' - GUGUCAGUGCUCAUUUACAAG - 3' (序列編號41)

3' - UUCACAGUCACGAGUAAAUGU - 5' (序列編號42)

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。

茲將各投予群顯示如下。只要無特別表示，即與前述實施例 A6 同樣地進行投予。各投予群中使用 4~6 隻小鼠。

・投予群 1

自投予滅菌生理食鹽水 75μL 起 5 分鐘後 投予滅菌生理食鹽水 50μL。

・投予群 2

自投予滅菌生理食鹽水 75μL 起 5 分鐘後，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

50 μ L。

• 投予群 5

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

• 投予群 6

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

• 投予群 7

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

• 投予群 8

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

接著，與前述實施例 A6 同樣地調製肺樣本，測定每單位重量之肺的 TGF- β 1 表現量。

茲將其結果示於第 17 圖。第 17 圖為圖表，顯示各投予群中每單位重量之肺的 TGF- β 1 表現量。LPS(+)/PK-0007(+)之投予群 3 及 LPS(+)/NK-0033(+)之投予群 5 分別與 LPS(+)/ssRNA(-)之投予群 2 相較，TGF- β 1 基因之表現量受到抑制。此一抑制效果與 LPS(+)/陽性控制組 NI-0030 之投予群 7 相較下明顯較強。特別是，LPS(+)/PK-0007(+)之投予群 3 顯示出顯著之抑制效果。另，經投予陰性控制組之 RNA 的投予群 4(PK-0008)、投予群 6(NK-0035)及投予群 8(NI-0031)未確認抑制效果。

(A9-2)活體內之脫靶(off-target)效果

使用本發明之 ssRNA，確認活體內之脫靶效果，並評估副作用。

實施例之 RNA 使用前述實施例 A8 之 ssRNA(PK-0007)。比較例之 RNA 則使用前述實施例 A9-1 所示之 RNAi 陰性控制組(Nc)的 ssRNA(PK-0008)、RNAi 陽性控制組(Pc)之 dsRNA(NI-0030)及 RNAi 陰性控制組之 dsRNA(NI-0031)。接著，使 100 μ g 之前述 RNA 溶解於滅菌生理食鹽水 75 μ L，調製出 RNA 溶液。

茲將各投予群顯示如下。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 RNA 溶液(PK-0007)。

- 投予群 3

投予 75 μ L 之 RNA 溶液(PK-0008)。

接著，從投予起 24 小時後，與前述實施例 A6 相同地從小鼠回收 BALF 樣本，獲得前述 BALF 樣本之上清液。就前述上清液測定 TNF- α 量及 IFN- β 量。前述 TNF- α 量係使用商品名 Mouse TNF set II(Beckton Dickinson and Company)，依照其使用說明書作定量。此外，前述 IFN- β 量係使用利用商品名 Rabbit Anti-Mouse Interferon β (PBL InterferonSource)及商品名 Biotin Labeling Kit-NH2(同仁化學研究所)而製作出之 ELISA 分析微量盤(ELISA plate)，依照其等之使用說明書作定量。

茲將其等之結果示於第 18 圖。第 18(A)圖為圖表，顯示各投予群之 BALF 樣本中之 TNF- α 量；第 18(B)圖為圖表，顯示各投予群之 BALF 樣本中之 IFN- β 量。於第 18 圖中，橫軸顯示個別之量。前述 PK-0007(+)之投予群 2 與 RNA(-)之投予群 1 相較下，並未引發 TNF- α 及 IFN- β 之表現。

(實施例 A10)293 細胞中之 LAMA1 基因表現抑制效果

使用本發明之 ssRNA，確認 RNA 干擾效果所導致之活體外 LAMA1 基因的表現抑制。

(1)材料及方法

實施例之 RNA(Ex)使用下示 NK-0043 及 NK-0064。於下述序列中，「*」表示自由鹼基(以下相同)。

【化 12】

Ex : NK-0043 (序列編號43)

5' - uguuuugucucguuacaauauccCCACACCGGAUAUUGUAACGAGACAAACACUCUUCGgga -3'
Xc Z Yc

Ex : NK-0064 (序列編號44)

5' - aguguuuugucucguuacaauauccCCACACCGGAUAUUGUAACGAGACAAACACUCUUCGg -3'
Xc Z Yc

除了使用前述 RNA 之外，與前述實施例 A4 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 A2 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。藉由內部標準之 β -肌動蛋白基因表現量來修正前述 LAMA1 基因之表現量。

LAMA1 基因用引子組

5'-AAAGCTGCCAATGCCCCTCGACC-3'(序列編號45)

5'-TAGGTGGGTGGCCCTCGTCTTG-3'(序列編號46)

此外，與前述實施例 A2 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。

(2)結果

茲將該等結果示於第 19 圖。第 19 圖為圖表，顯示 293 細胞之 LAMA1 基因表現量的相對值。如第 19 圖所示，得知實施例之 NK-0043 及 NK-0064 顯示出強烈的基因表現抑制活性。

(實施例 A11)A549 細胞中之 LMNA 基因表現抑制效果

使用本發明之 ssRNA，確認 RNA 干擾效果所導致之活體外 LMNA 基因的表現抑制。

(1)材料及方法

實施例之 RNA(Ex)使用以下所示之 NK-0063 及 NK-0066。於下述序列

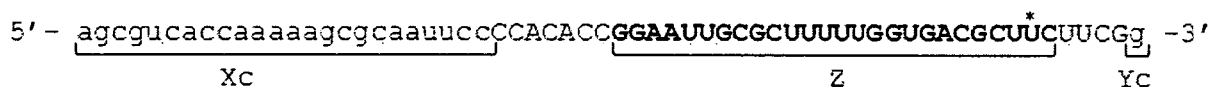
中，「*」表示自由鹼基(以下相同)。

【化 13】

Ex : NK-0063 (序列編號47)



Ex : NK-0066 (序列編號48)



除了使用前述 RNA 之外，與前述實施例 A4 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 A2 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。藉由內部標準之 β -肌動蛋白基因表現量修正前述 LMNA 基因表現量。

LMNA 基因用引子組

5'-CTGGACATCAAGCTGGCCCTGGAC-3'(序列編號49)

5'-CACCAGCTTGCGCATGGCCACTTC-3'(序列編號50)

此外，與前述實施例 A2 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。

(2)結果

茲將該等結果顯示於第 20 圖。第 20 圖為圖表，顯示 A549 細胞之 LMNA 基因表現量的相對值。如第 20 圖所示，得知實施例之 NK-0063 及 NK-0066 顯示出強烈之基因表現抑制活性。

(實施例 A12)Xc 與 Yc 之長度

針對本發明之 ssRNA，使與前述內部 5'端側區域(X)互補之前述 5'端側區域(Xc)的長度以及與前述內部 3'端側區域(Y)互補之前述 3'端側區域(Yc)

的長度發生變化，確認活體外之 GAPDH 基因表現抑制。

(1)材料及方法

實施例之 RNA 使用第 21 圖所示 ssRNA。於第 21 圖中，右端之編號表示序列編號。於第 21 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)。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 21 圖中，「*」表示自由鹼基(以下相同)。

各 ssRNA 均令內部區域(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，將 NK-0036 及 NK-0040 製成不具有自由鹼基之分子。其等之外的各 ssRNA 則是令前述內部區域(Z)中不形成雙股之自由鹼基全部成為 1 個鹼基，且使前述內部區域(Z)中前述自由鹼基之位置從 3'端側變動為 5'端側。

除了使用前述 RNA 之外，與前述實施例 A2 相同地進行對於 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。令轉染時之 RNA 濃度為 10nmol/L。

(2)結果及考察

茲將該等結果示於第 22 圖。第 22 圖為圖表，顯示使用最終濃度為 10nmol/L 之 RNA 時的 GAPDH 基因表現量相對值。如第 22 圖所示，已使前述 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 均可確認到 GAPDH 基因之表現抑制。

特別是，已確認隨著前述區域(Xc)之鹼基長與前述區域(Xc)之鹼基長的差增大，基因表現量相對降低，表現抑制活性增加。亦即，越是將前述內部區域(Z)中自由鹼基之位置配置在較前述內部區域中央更偏 5'端側或 3'端

側，越可提高前述表現抑制活性。

於前述實施例 A2 中，已確認 NK-0016 具有極強烈之表現抑制活性。在本實施例中，則是確認 NK-0025 及 NK-0037 具有更超越前述 NK-0016 之活性。

另外，關於自由鹼基之位置，舉例來說，即使是以不同於本實施例之 TGF- β 1 基因作為對象的實施例 A8、以 LAMA1 基因作為對象之實施例 A10、以 LMNA 基因作為對象之實施例 A11，亦獲得同樣之效果。

亦即，在前述實施例 A8 中，如前述序列所示，NK-0033 與 NK-0055 均具有 1 個鹼基之自由鹼基，前者位在內部區域(Z)之 3'末端起算第 4 個，後者位在內部區域(Z)之 3'末端起算第 2 個。接著，如前述第 15 圖所示，自由鹼基位在更靠 3'末端側之 NK-0055 顯示出較高之表現抑制。即使在自由鹼基為 2 個鹼基之 NK-0061 與 NK-0062 之間，亦是同樣的結果。此外，實施例 A9 及實施例 10 係在與前述實施例 8 相同之條件下使自由鹼基之位置發生變化，但仍是相同地，自由鹼基位在更靠 3'末端側之 ssRNA 顯示出較高之表現抑制。

從此等結果亦可明確看出，無論目標基因之種類以及對其之抑制表現序列，均顯示出同樣的行為(behavior)。因此，本發明之 ssRNA 可說是可不 論目標基因種類而均適用之工具。

(實施例 A13)X、Xc、Y 及 Yc 之長度

針對本發明之 ssRNA，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)之各個長度發生變化，並確認活體外之 GAPDH 基因表現抑制。

(1)材料及方法

實施例之 RNA 使用第 23 圖所示 ssRNA。第 23 圖中，右端編號表示序列編號。第 23 圖中，自 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)及前述區域(Yc)之鹼基長合計與前述區域(X)及前述區域(Y)之鹼基長合計的比。於第 23 圖中，「*」表示自由鹼基。

各 ssRNA 均令連結區域(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)之 3'端側起第 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。

只要無特別表示，即與前述實施例 A2 相同地就前述 RNA，進行對 HCT116 細胞之轉染、培養、RNA 回收、cDNA 合成及 PCR，測定 GAPDH 基因表現量。前述轉染條件係使前述每井之組成設定如下。於下述組成中，(B)為 Opti-MEM(商品名、Invitrogen)，(C)為 20μmol/L 之前述 RNA 溶液，兩者合併添加 98.5μL。於前述井中，令前述 RNA 之最終濃度為 1nmol/L。利用內部標準之修正以及表現量相對值之算出亦是與前述實施例 A2 相同地進行。

表 5

(每井之組成：μL)

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

(2)結果及考察

茲將該等結果示於第 24 圖。第 24 圖為圖表，顯示使用最終濃度為 1nmol/L 之 RNA 時 GAPDH 基因表現量之相對值。如第 24 圖所示，針對業已使前述區域(X)、前述區域(Xc)、前述區域(Y)及前述區域(Yc)之長度發生變化之任一 ssRNA，均已確認到 GAPDH 基因之表現抑制。此外，前述實施例 A2 中，已確認 NK-0016 顯示出極強烈之表現抑制活性。在本實施例中，則是確認 NK-0016 以外之 ssRNA 均具有更超越 NK-0016 之活性。

(實施例 A14)Xc 之長度

針對本發明之 ssRNA，使與前述內部 5'端側區域(X)互補之前述 5'端側區域(Xc)的長度發生變化，確認活體外之 GAPDH 基因表現抑制。

(1)材料及方法

實施例之 RNA 使用第 25 圖所示 ssRNA。於第 25 圖中，自 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 5'區域(X)，劃底線之小寫字母區域表示前述區域(Yc)。此外，「Xc/Yc」表示前述區域(Xc)之鹼基長(Xc)與前述區域(X)之鹼基長(X)的比。第 25 圖中，「*」表示自由鹼基。下述 RNA 之序列顯示於序列編號 74~76。

各 ssRNA 均令內部區域(Z)之鹼基長為 26 個鹼基、前述區域(X)為 25 個鹼基、前述區域(Y)為 1 個鹼基、前述區域(Yc)為 1 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。接著在此條件下，使前述區域(Xc)之鹼基長發生變化。各 ssRNA 藉此使前述內部區域(Z)中不形成雙股之自由鹼基的有無及數量發生變化。另外，NK-0001 不具有自由鹼基。

除了使用前述 RNA 之外，與前述實施例 A13 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 基因表現量。利用內部標準之修正以及表現量相對值之算出亦是與前述實施例 A13 同樣地進行。

(2)結果及考察

茲將其該等結果示於第 26 圖。第 26 圖為圖表，顯示使用最終濃度為 1nmol/L 之 RNA 時 GAPDH 基因表現量之相對值。如第 26 圖所示，已使前述 5'端側區域(Xc)長度發生變化之任一 ssRNA 均已確認到 GAPDH 基因之表現抑制。特別是在具有自由鹼基時，其數量越少，越可提高前述表現抑制活性。此外，前述實施例 A2 中，已確認 NK-0016 具有極強烈之表現抑制活性。在本實施例中，則是確認 NK-0016 以外之 ssRNA 全部具有超越 NK-0016 之活性。

另外，就自由鹼基之個數，舉例來說，即使是以不同本實施例之 TGF- β 1 基因作為對象的實施例 A8，亦獲得同樣之效果。亦即，如前述實施例 A8 之序列所示，NK-0033 與 NK-0061 之自由鹼基在前者為 1 個鹼基，後者為 2 個鹼基。接著，如前述第 15 圖所示，自由鹼基較少之 NK-0033 顯示出較高之表現抑制。再者，NK-0055 與 NK-0062 係如實施例 A12 所示，與前述 NK-0033 及前述 NK-0061 相較下，使自由鹼基之位置變動至更偏內部區域

(Z)之 3'端側，藉此表現出較高之表現抑制。由此等結果亦可明確得知，無論目標基因之種類以及對其之抑制表現序列，均顯示出同樣的行為。因此，本發明之 ssRNA 可說是可不論目標基因種類而均適用之工具。

(實施例 A15)連接子(linker)之互換性

針對本發明之 ssRNA，使前述內部 5'端側區域(X)與前述 5'端側區域(Xc)間之連結區域(Lx)以及前述內部 3'端側區域(Y)與前述 3'端側區域(Yc)間之連結區域(Ly)發生變化，並確認活體外之 GAPDH 基因表現抑制。

(1)材料及方法

實施例之 RNA 使用第 27 圖所示 ssRNA。第 27 圖中，從 5'端側起，劃底線之小寫字母區域表示前述 5'端側區域(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 3'端側區域(Yc)。前述 X 與前述 Xc 間之序列為連結區域(Lx)，前述 Y 與前述 Yc 間之序列為連結區域(Ly)。此外，針對各 RNA，顯示連結區域(Lx)之鹼基長(Lx)與連結區域(Ly)之鹼基長(Ly)的比(Lx/Ly)。於第 27 圖中，「*」表示自由鹼基。

除了使用前述 RNA 以外，與前述實施例 A13 相同地進行對 HCT116 細胞之轉染、培養、RNA 回收、cDNA 合成及 PCR，測定 GAPDH 基因表現量。利用內部標準之修正、表現量相對值之算出亦是與前述實施例 A13 同樣地進行。

(2)結果及考察

茲將此等結果示於第 28 圖。第 28 圖為圖表，顯示用最終濃度為 1nmol/L 之 RNA 時 GAPDH 基因表現量之相對值。如第 28 圖所示，即使就已使前述連結區域(Lx)及(Ly)之條件(即長度、兩者間之長度比、序列等)發生變化的任一 ssRNA 而言，同樣地確認到 GAPDH 基因之表現抑制。從此結果得知，前述連結區域(Lx)及(Ly)之條件並未特別受限，可設計成各種長度及序列等。

(實施例 A16)HCT116 細胞中 GAPDH 基因之表現抑制效果

使用已藉具有脯胺酸或脯胺醇之連接子作置換的 ssRNA，確認 HCT116 細胞中之 GAPDH 表現抑制效果。

(1)材料及方法

合成下示 RNA(Ex ssRNA)以作為實施例之 RNA(Ex)。此外，合成下示 RNAi 之陰性控制組(Nc)的 Nc ssRNA 以作為合成比較例之 RNA。於下述式中，連結區域(Lx)及連結區域(Ly)使用具有脯胺酸或脯胺醇之下表的亞醯胺(實施例 B 參照)，使 Xc 與 X 之間以及 Yc 與 Y 之間結合。

【化 14】

Ex ssRNA (序列編號 13)



N c s s R N A (序列編號38)

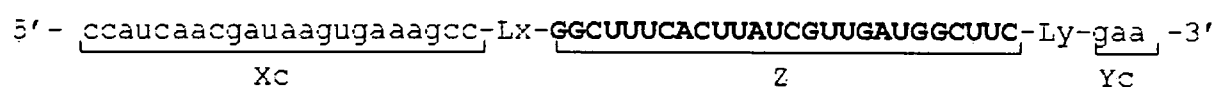


表 6

ssRNA		用於 Lx 及 Ly 之亞醯胺
比較例	實施例	
PK-0003	PK-0004	L-脯胺酸二醯胺亞醯胺 (流程 3 之化合物 10)
PK-0005	PK-0006	脯胺醇胺甲酸酯亞醯胺 (流程 7 之化合物 6)
PK-0009	PK-0010	脯胺酸醯胺-胺亞醯胺 (流程 3 之化合物 12)
PK-0011	PK-0012	脯胺酸醯胺醯脲亞醯胺 (流程 3 之化合物 17)
PK-0015	PK-0016	脯胺醇醯脲亞醯胺 (流程 7 之化合物 7)

除了使用前述 RNA 以外，與前述實施例 A13 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 基因之表現量。利用內部標準之修正、表現量相對值之算出亦是與前述實施例 A13 同樣地進行。

(2)結果

茲將該等結果示於第 29 圖。第 29 圖為圖表，顯示 GAPDH 基因表現量之相對值。如第 29 圖所示，得知含有脯胺酸或脯胺醇之連結區域(Lx)及連結區域(Ly)的每一 Ex ssRNA 均確認有強烈之基因表現抑制活性，且顯示濃度相依性之效果。另一方面，陰性控制組之 ssRNA 則未觀察到抑制效果。(實施例 A17)HCT116 細胞中 GAPDH 基因之表現抑制效果

65

(實施例 A18)核糖核酸酶耐性

針對本發明之 ssRNA 確認核糖核酸酶耐性。

(1)材料及方法

實施例之 RNA(Ex)使用實施例 A5 之 NK-0033 及實施例 A8 之 PK-0007。此外，比較例之 RNA 使用實施例 A9 之陽性控制組(Pc)之 dsRNA(NI-0030)。

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。

(2)結果

茲將該結果示於第 31 圖。第 31 圖為顯示核糖核酸酶耐性之電泳照片。於第 31 圖中，巷(lane)「M」為分子量標記，min 表示保溫時間。

如第 31 圖所示，比較例之 NI-0030 於保溫 10 分鐘後幾乎完全分解。相對於此，實施例之 NK-0033 及 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。

(實施例 A19)核酸酶耐性

針對本發明之 ssRNA 確認核酸酶耐性。

(1)材料及方法

與前述實施例 A18 相同地使用 RNA。首先，於含有 5mmol/L CaCl_2 之 50mmol/L Tris-HCl(pH8)中，混入 60pmol 之前述 RNA、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。

(2)結果

茲將該結果示於第 32 圖。第 32 圖為顯示 S7 核酸酶耐性之電泳照片。

於第 32 圖中，巷「M」為分子量標記。此外，h 表示保溫時間。

如第 32 圖所示，比較例之 NI-0030 在保溫 0.5 小時後幾乎全部分解。相對來說，實施例之 NK-0033 及 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。

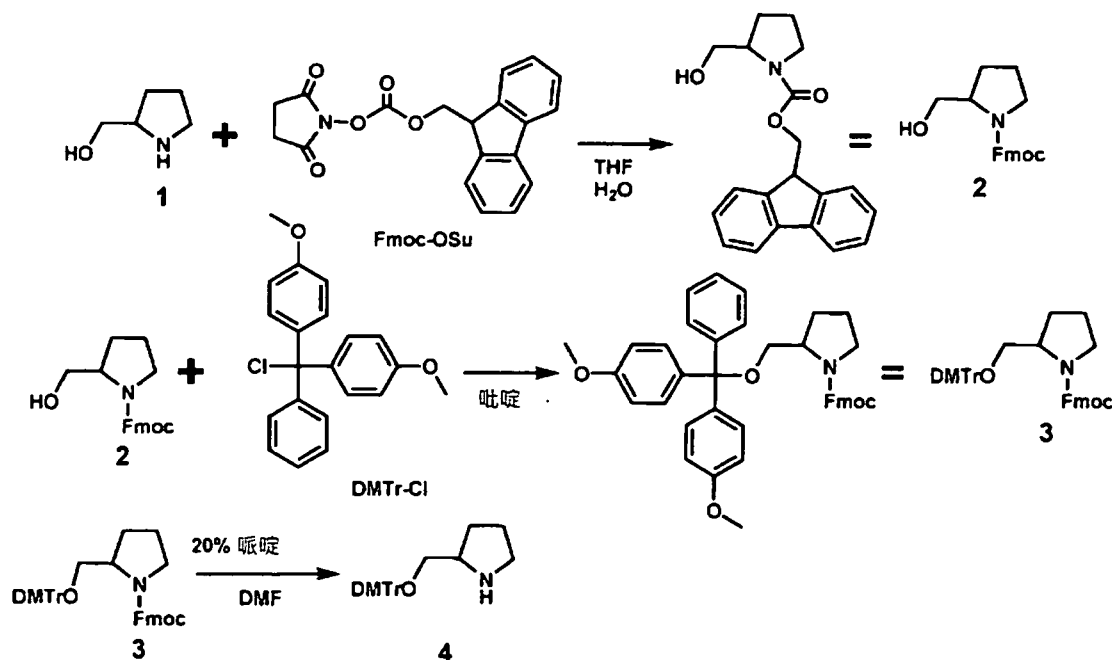
從前述實施例 A 之結果得知，本發明之 ssRNA 舉例來說可不依賴目標基因種類而構築。具體來說，則是得知前述 ssRNA 中，例如前述區域(X)與前述區域(Xc)所形成之雙股長度及前述區域(Y)與前述區域(Yc)所形成之雙股長度、前述內部區域(Z)中不形成雙股之自由鹼基的有無、個數及位置、以及連結區域(Lx)與連結區域(Ly)之有無、種類及長度等均可改變。據此，本發明之 ssRNA 可不依賴目標基因種類地使用在基因之表現抑制上，而可說是具泛用性之新穎工具。

(實施例 B1)

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。

【化 16】



流程1

(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，合併各各別之有機層後，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。

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

(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，為了使過剩之 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, OCH₃), 1.84(3H, m, H-3, H-4), 1.58(1H, m, H-3).

(3)DMTr-L-脯胺醇(化合物 4)

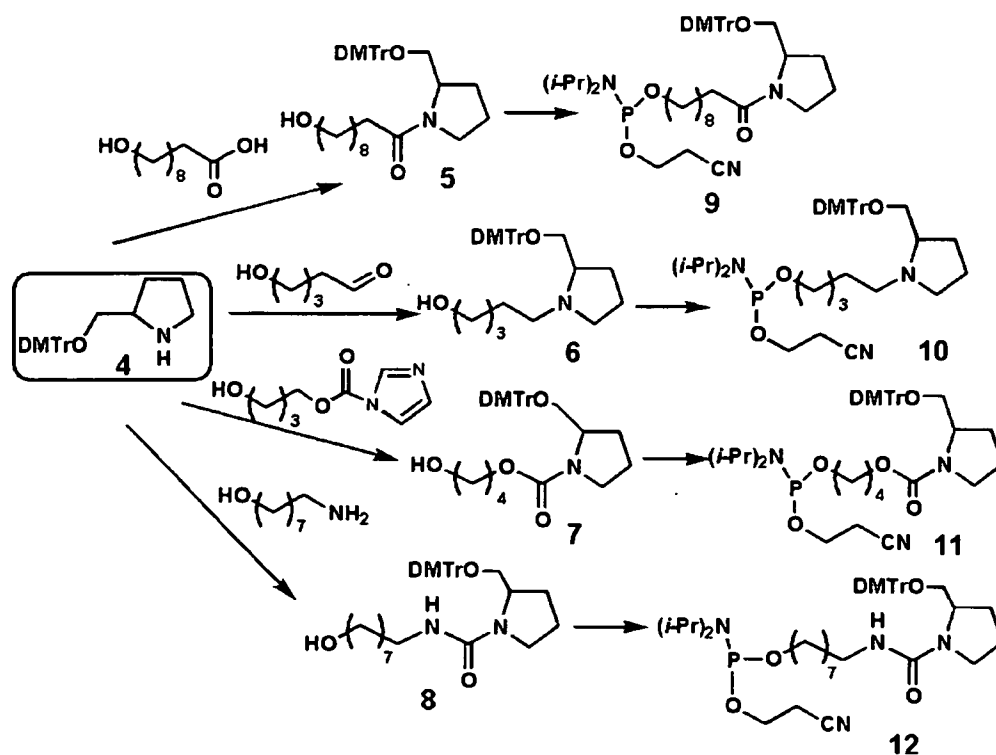
使前述 Fmoc-DMTr-L-脯胺醇(化合物 3)(2.0g, 3.2mmol)溶解於含 20% 吡啶之 DMF 溶液 25mL 中，攪拌 12 小時。將該溶液減壓濃縮，使所得殘渣以二氧化矽凝膠管柱層析法(氯仿：甲醇=85：15，含 1%吡啶)純化，製得化合物 4(1.0g，收率 78%)。茲將化合物之 NMR 結果顯示如下。

¹H-NMR(CDCl₃)：δ7.40-7.14(9H, m, Ar-H), 6.82(4H, d, J=8.6Hz, Ar-H), 3.78(6H, s, OCH₃), 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).

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」。

【化 17】



流程2

(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).

(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).

(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).

(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，於氫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-氨基-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).

(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)。於氫氣下，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。

DMTr-醯胺-L-脯胺醇亞醯胺(化合物 9，0.60g，收率 55%)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ ： 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(11H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-2, H-5, H-6), 2.58(2H, m, CH_2CN), 2.27-1.72(6H, m, 烷基, H-3, H-4), 1.58(4H, s, 烷基), 1.30(22H, s, 烷基, CHCH_3).

DMTr-烷基-L-脯胺醇亞醯胺(化合物 10，0.71g，收率 60%)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ ： 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(8H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-6), 2.58(2H, m, CH_2CN), 2.06-1.79(5H, m, 烷基, H-2, H-5), 1.74-1.49(6H, m, 烷基, H-3, H-4), 1.37-1.10(16H, m, 烷基, CHCH_3).

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

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ ： 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(8H, m, 烷基, H-3, H-4), 1.34-1.10(12H, m, CHCH_3).

DMTr-醯脲-L-脯胺醇亞醯胺(化合物 12，0.20g，收率 61%)

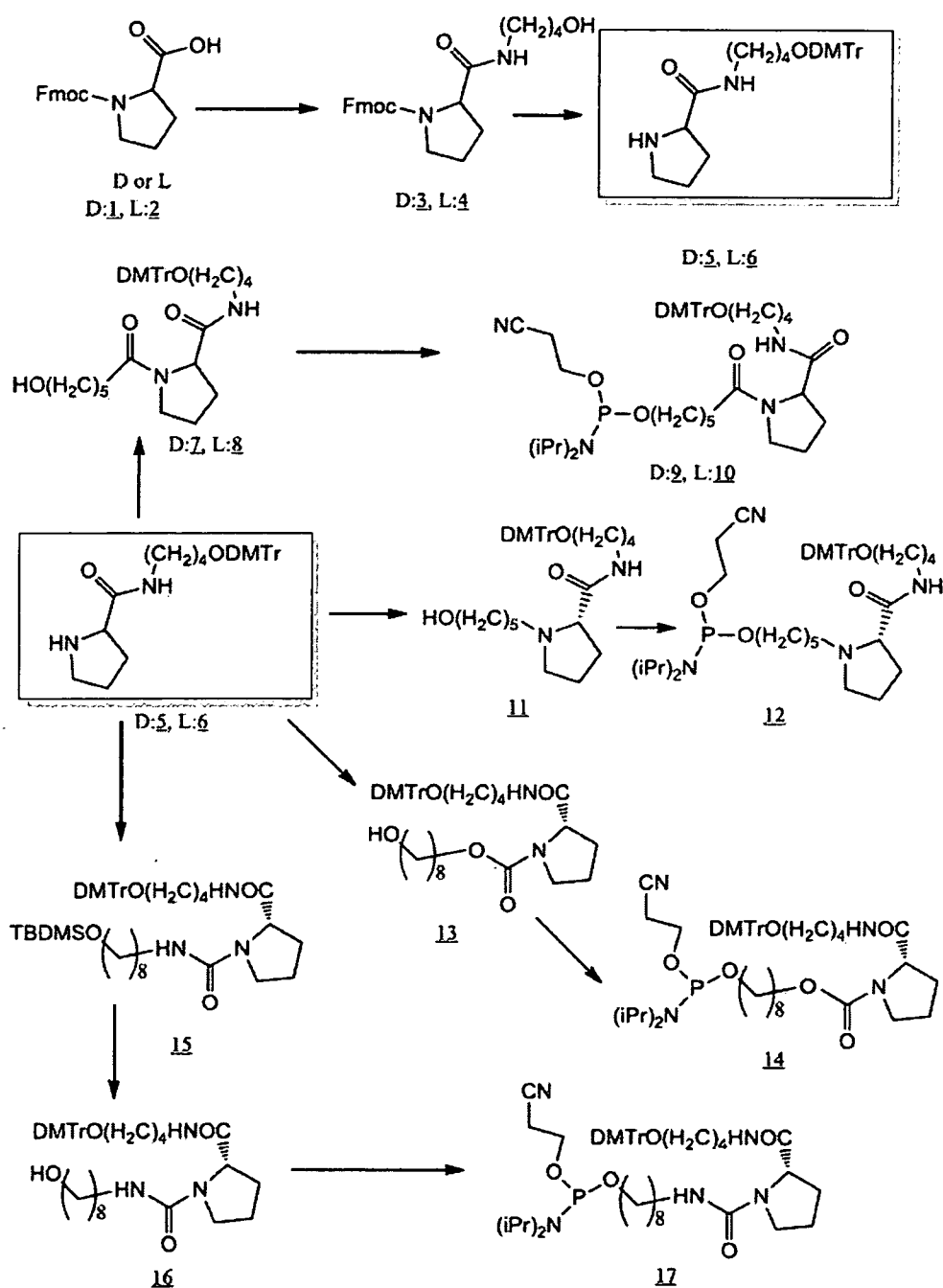
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ ： δ 7.40-7.14(9H, m, Ar-H), 6.82(4H, m, Ar-H), 3.78(s, 6H, OCH_3), 3.65-3.25(13H, m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 , H-2, CH_2NH , CH_2OH , H-2, H-5, H-6), 2.73(2H, m, CH_2CN), 2.10-1.48(16H, m, 烷基, H-3, H-4),

1.35-1.10(12H, m, CHCH₃).

(實施例 B2)

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。

【化 18】



流程3

(1)DMTr-羥基醯胺胺基-L-脯胺酸(化合物 11)

於冰冷下，將乙酸緩衝液(7mL)加入含有 DMTr-醯胺-L-脯胺酸(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 CH_2Cl_2 : CH_3OH =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 CH_2Cl_2 : CH_3OH =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⁺)

(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)，減壓下脫氣後充填氬氣。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，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 0.05%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。

¹H-NMR (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 Hz, 2H, CH_2)、2.98-2.02 (m, 2H)、2.61(t, J=5.8Hz, 2H, CH_2)、2.55-2.63(m, 2H)、2.27-2.42(m, 1H, CH)、2.31(t, 7.8 Hz, 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, CH₃) ;

P-NMR (CDCl₃) : δ 146.91 ;

Ms (FAB+) : m/z 774(M⁺)、303(DMTr⁺), 201(C₈H₁₉N₂OP⁺).

(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。

¹H-NMR (CDCl₃) : 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, OCH₃)、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⁺).

(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(CDCl₃) : δ 147.19 ;

Ms(FAB+) : m/z 860(M⁺)、303(DMTr⁺)、201(C₈H₁₉N₂OP⁺).

(5)DMTr-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，以 45 分鐘對前述混合液滴定溶有 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%)。

(6)DMTr-羥基醯胺醯脲-L-脯胺酸(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。

¹H-NMR(CDCl₃) : 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, CH₂)、3.79(s, 6H, OCH₃)、3.63(d, 1H, J=6.4 Hz, CH₂)、3.61(d, 1H, J=6.4 Hz, CH₂)、3.34-3.37(m, 1H, CH)、3.16-3.27(m, 5H), 3.04(t, J=5.9 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).

(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鉍(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($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$)。

(實施例 B3)脯胺酸二醯胺亞醯胺之合成

為了生成含有具脯胺酸骨架之連結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。

(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)作為起始原料。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, CH_2), 3.67-3.73 (m, 2H, CH_2)、3.35-3.52 (m, 2H, CH_2)、3.18-3.30 (m, 2H, CH_2)、2.20-2.50(m, 4H)、1.81-2.03 (m, 3H)、1.47-1.54 (m, 2H) ;

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

(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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=9:1$ ，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。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.39-7.43(m, 2H, Ar-H)、7.30(d, $J=8.8\text{ Hz}$, 4H, Ar-H)、7.21(tt, 1H, 4.9, 1.3 Hz, Ar-H)、6.81(d, $J=8.8\text{ Hz}$, 4H, Ar-H)、3.78(s, 6H, OCH_3)、3.71(dd, H, $J=6.3\text{ Hz}$, 5.4 Hz, CH)、3.21 (2H, 12.9, 6.3 Hz, 2H, CH_2)、3.05 (t, $J=6.3\text{ Hz}$, 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 $^+$).

(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, $J=6.4$ Hz, CH_2)、3.50-3.55(m, 1H, CH)、3.36-3.43(m, 1H, CH), 3.15-3.24(m, 2H, CH_2), 3.04(t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2)、2.38-2.45(m, 1H, CH)、2.31(t, 6.8 Hz, 2H, CH_2)、2.05-2.20(m, 1H, CH)、1.92-2.00(m, 1H, CH)、1.75-1.83(m, 1H, CH)、1.48-1.71(m, 8H)、1.35-1.44(m, 2H, CH_2) ;

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

(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銨(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。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 7.40-7.42(m, 2H, Ar-H)、7.29-7.31(m, 4H, Ar-H)、

7.25-7.27(m, 2H, Ar-H)、7.17-7.21(m, 1H, Ar-H)、6.80-6.82(m, 4H, Ar-H)、4.51-4.53(m, 1H, 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=6.4 Hz, 2H, CH₂)、2.62(t, J=5.8 Hz, 2H, CH₂)、2.40-2.44(m, 1H, CH)、2.31(t, 7.8 Hz, 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=6.8 Hz, 6H, CH₃)、1.16(d, J=6.8 Hz, 6H, CH₃)；

P-NMR(CDCl₃) Msδ147.17；

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

(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，針對所回收之濾液，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。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃)：δ7.77(d, J=7.3 Hz, 2H)；7.58(br, 2H)；7.41(t, J=7.3 Hz, 2H)；7.32(t, J=7.3 Hz, 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⁺).

(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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ ，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, $J=8.8, 5.4$ Hz, 1H); 3.22(q, 6.5 Hz, 2H); 3.07(t, $J=6.1$ 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($\text{M}+\text{H}^+$), 303(DMTr $^+$).

(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。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.40-7.43(m, 2H); 7.25-7.3(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 $^+$).

(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。

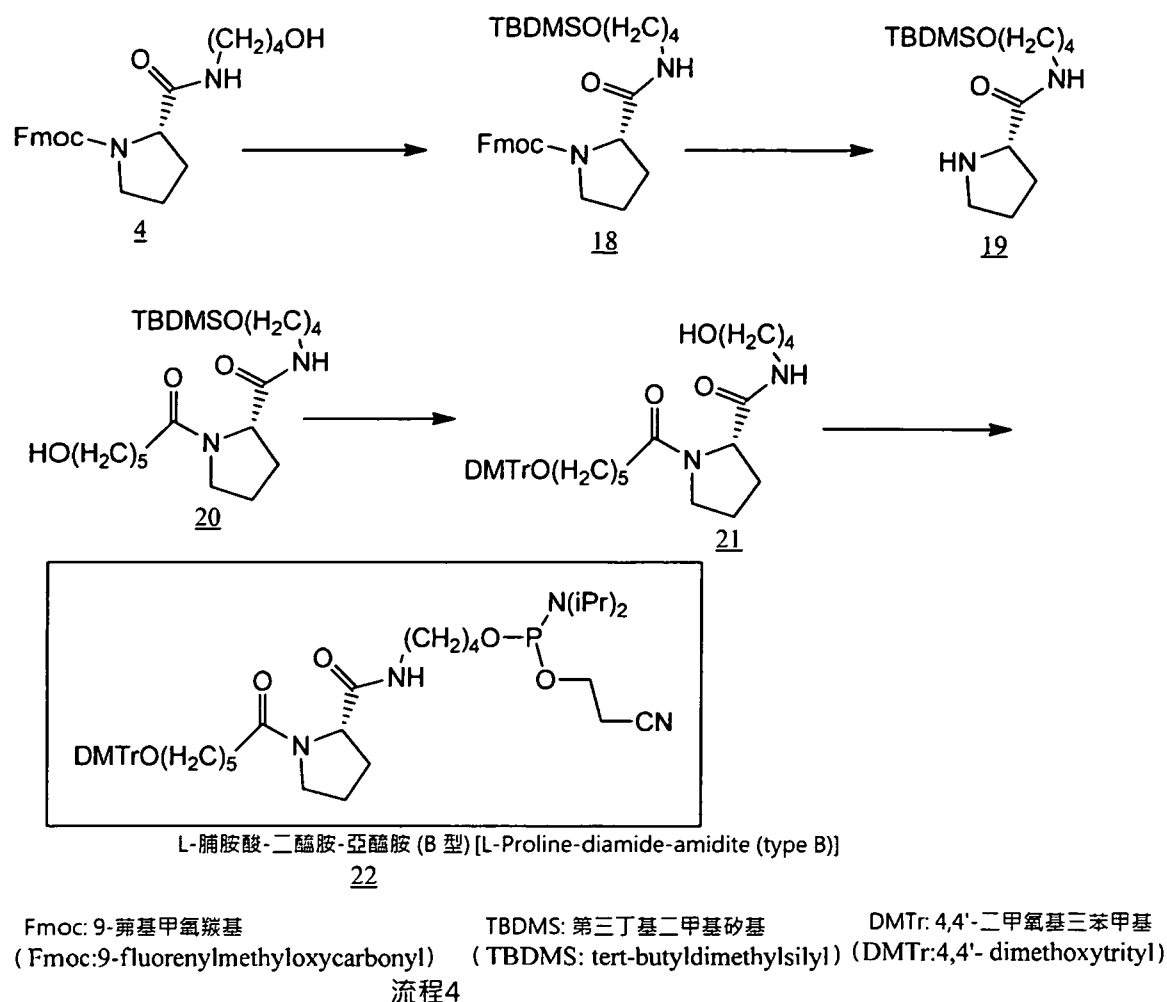
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3)： δ 7.40-7.43(m, 2H)；7.25-7.32(m, 6H)；7.14-7.21(m, 1H)；6.80-6.83(m, 4H)；3.80-3.85(m, 2H)；3.79(s, 6H)；3.49-3.65(m, 5H)；3.02-3.06(m, 2H)；2.60-2.63(m, 2H)；2.29-2.33(m, 2H)；1.77-1.82(m, 2H)；1.56-1.68(m, 8H)；1.38-1.43(m, 2H)；1.15-1.29(m, 18H).
 $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3)： δ 146.94.

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

(實施例 B4)

爲了生成含有具脯胺酸骨架之連結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。

【化 19】



(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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 95 : 5$)，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, SiCH₃) ;

Ms(FAB+) : m/z 523(M+H⁺).

(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 CH₂Cl₂:CH₃OH=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。

¹H-NMR(CDCl₃) : δ3.71(dd, 1H, J=9.0 Hz, 5.2 Hz, CH)、3.61-3.64(m, 2H, CH₂)、3.22-3.28(m, 2H, CH₂)、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, CH₂)、1.52-1.57(m, 4H)、0.89(s, 9H, t-Bu)、0.05(s, 6H, SiCH₃) :

Ms(FAB+) ; m/z 301(M+H⁺).

(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一整夜。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 CH₂Cl₂:CH₃OH=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。

¹H-NMR(CDCl₃) : δ4.54(d, 1H, CH)、3.58-3.67(m, 5H)、3.52-3.56(m, 1H, CH), 3.32-3.39(m, 1H), 3.20-3.25(m, 2H)、2.40-2.43(m, 1H, CH)、2.33(t, J=7.3 Hz, 2H, CH₂)、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, CH₂)、0.87(s, 9H, t-Bu)、0.04(s, 6H, SiCH₃) ;

Ms (FAB+) : m/z 415(M^+ +1).

(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, 6.8 Hz, 1H, CH)、3.79(s, 6H, OCH_3)、3.61(dd, 2H, $J=11$ Hz, 5.4 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, $J=6.4$ Hz, 2H, CH_2)、2.38-2.45(m, 1H, CH)、2.30(t, $J=7.8$ 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 $^+$).

(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(DMTr $^+$)。

(實施例 B5)

爲了生成含有具脯胺酸骨架之連結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)。

【化 20】



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, $J=6.4$ Hz, 2H, CH_2)、3.01(t, $J=5.9$ Hz, 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；

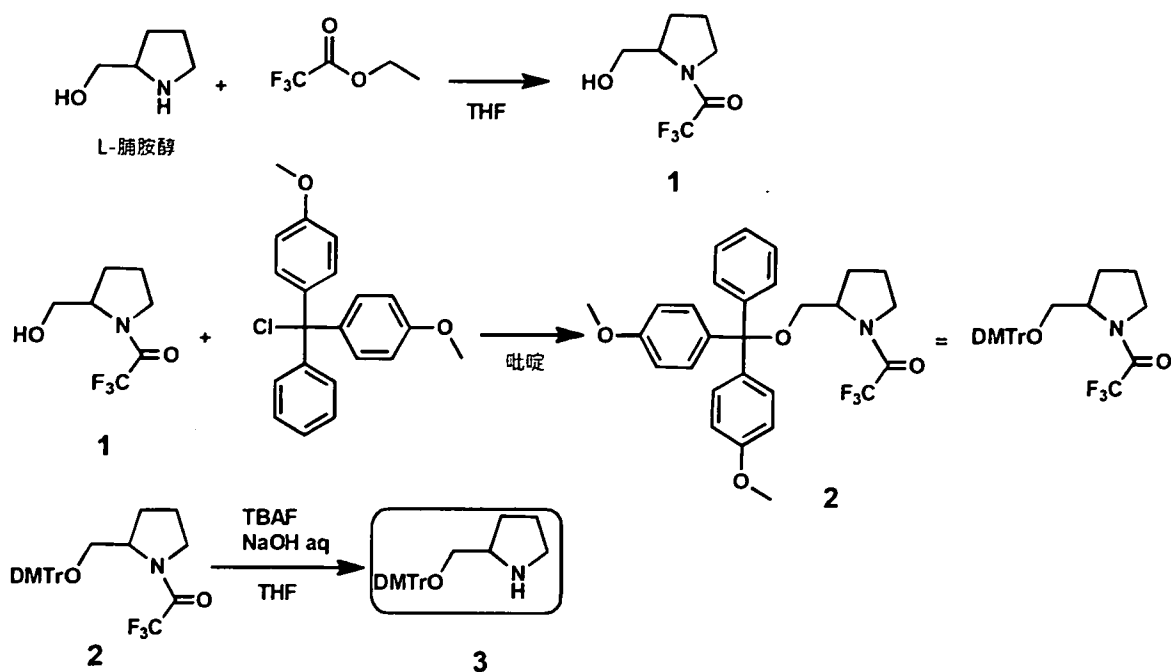
$\text{Ms}(\text{FAB}^+)$: m/z 776(M^+)、303(DMTr^+) 201($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OP}^+$)。

(實施例 B6)

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)。

【化 21】



流程6

(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 THF 20mL。另一方面，使三氟乙酸乙酯(3.0g, 21mmol)溶解於 THF 20mL。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).

(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，為了使過剩之 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，洗淨飽和碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水。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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=95:5$, 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, $J=8.6\text{Hz}$, 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).

(3)DMTr-L-脯胺醇(化合物 3)

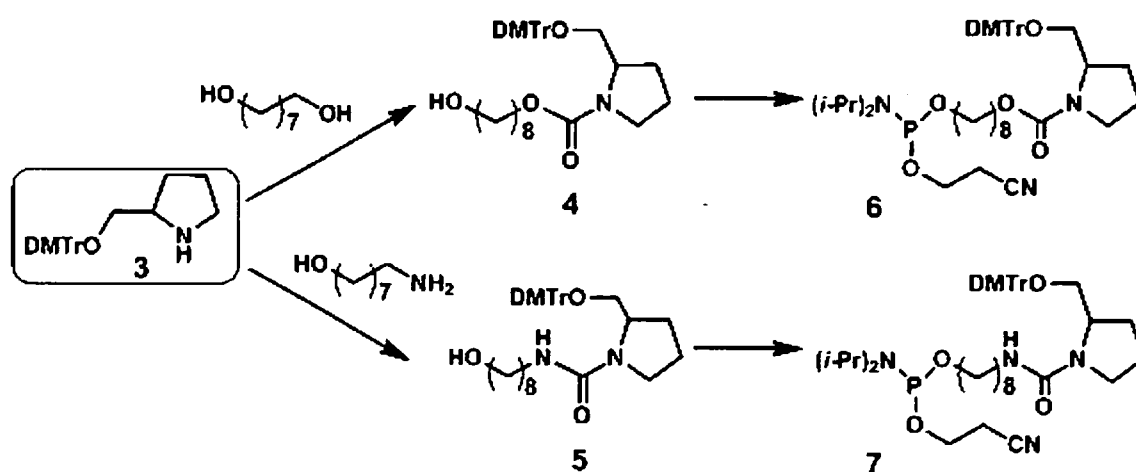
使所得前述三氟乙醯基-DMTr-L-脯胺醇(化合物 2)(5g，10mmol)溶解於 THF 100mL。於該 THF 溶液中加入 5%水酸化鈉水溶液 100mL 並攪拌。於此溶液中加入 1M 之氟化四正丁基胺(TBAF)溶液 5mL，於室溫下攪拌 12 小時。以飽和碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水洗淨該反應液。使洗淨後之已回收有機層以硫酸鈉乾燥。過濾前述有機層，使所得濾液減壓濃縮，製得化合物 3(3.6g，收率 90%)。以下顯示前述化合物之 NMR 結果。

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

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，合成出鍵結形式不同且具有脯胺醇之亞醯胺衍生物。

【化 22】



流程7

(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 CH_2Cl_2 : CH_3OH =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%)。

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 =8.6Hz, 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 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(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°C 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°C 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°C 下將前述攪拌後之反應液滴定至該 THF 溶液中 1 小時, 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 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(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鉍(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)。 $^{31}\text{P-NMR}(\text{CD}_3\text{CN})\delta$ 146.82.

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

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).

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

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

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。

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 7 月 8 日提申之日本申請案特願 2010-156122 號、已於 2010 年 10 月 13 日提申之日本申請案特願 2010-230808 號、已於 2010 年 12 月 2 日提申之日本申請案特願 2010-269824 號、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 號以及已於 2010 年 12 月 2 日提申之日本申請案特願 2010-269823 號。

產業上之可利用性

若依本發明之單股核酸分子，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。由於本發明之 ssNc 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、生命科學等之研究工具均甚有用。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110> BONAC CORPORATION

<120> 用以控制基因表現之單股核酸分子

<130> TF11005TW

<150> JP 2010-156122

<151> 2010-07-08

<150> JP 2010-174915

<151> 2010-08-03

<150> JP 2010-230806

<151> 2010-10-13

<150> JP 2010-230808

<151> 2010-10-13

<150> JP 2010-269823

<151> 2010-12-02

<150> JP 2010-269824

<151> 2010-12-02

<160> 80

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> siRNA

<400> 1

guugucauac uucucaugg

<210> 2
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 2
caugagaagu augacaacag cccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg 60
aa 62 ●

<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 正意

<400> 3
ccaugagaag uaugacaaca g 21 ●

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 反意

<400> 4
guugucauac uucucauggu u 21

<210> 5
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> siRNA

<400> 5
auuguaacga gacaaacac 19

<210> 6
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> siRNA

<400> 6
uugcgcuuuu uggugacgc 19

<210> 7
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 7
agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuc ggaaccauga gaaguaugac 60

aa 62

<210> 8
<211> 58
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 8
accaugagaa guaugacaac agccuucggg cuguugucau acuucucaug guucaugg 58

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子

<400> 9
ggagaaggct ggggctcatt tgc 23

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子

<400> 10
tggccagggg tgctaagcag ttg 23

<210> 11
<211> 23

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 11

gccacggctg cttccagctc ctc 23

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 12

aggtctttgc ggatgtccac gtcac 25

<210> 13

<211> 51

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 13

caugagaagu augacaacag ccggcuguug ucauacuucu caugguucga a 51

<210> 14

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 14
augacaacag cccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucuucgg aaccaugaga 60
ag 62

<210> 15
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 15
ugucagugcu cauuuacaag cccacaccg gcuuguaau gagcacugac acuucuucgg 60
aa 62

<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> siRNA

<400> 16
aaagucaaug uacagcugcu u 21

<210> 17
<211> 24

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子

<400> 17
ccattgctgt cccgtgcaga gctg 24

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子

<400> 18
atggtagccc ttgggctcgt ggatc 25

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子

<400> 19
gtcgtaccac aggcatgtg atgg 24

<210> 20
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 20

gcaatgcctg ggtacatggt gg 22

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 21

cccttattga cctcaactac atggt 25

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 22

gaggggcat ccacagtctt ctg 23

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>
<223> 引子

<400> 23
actccacgtg gaaatcaacg g 21

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

● <220>
<223> 引子

<400> 24
tagtagacga tgggcagtgg 20

<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工的

● <220>
<223> 引子

<400> 25
atggctagrc tctgtgcttc ct 22

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223>	引子	
<400>	26	
	agggctctcc agayttctgc tctg	24
<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引子	
<400>	27	
	catcaactat aagcagctcc a	21
<210>	28	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引子	
<400>	28	
	ttcaagtgga gagcagtca g	21
<210>	29	
<211>	61	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	核酸分子	

<400> 29
agcuguacau ugacuuuagc cccacaccgg cuaaagucaa uguacagcug cuucuuaggga
a 60
61

<210> 30
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 30
agcagcugua cauugacuuu agccccacac cggcuaaagu caauguacag cugcuucuc
gg 60
62

<210> 31
<211> 61
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 31
gcagcuguac auugacuuua gccccacacc ggcuaaaguc aauguacagc ugcuuucucg
g 60
61

<210> 32
<211> 51
<212> RNA
<213> 人工的

<220>		
<223>	核酸分子	
<400>	32	
cagcuguaca uugacuuuag ccggcuaaaag ucaauguaca gcugcuucga a		51
<210>	33	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	核酸分子	
<400>	33	
agcuguacau ugacuuuagc cggcuaaaagu caauguacag cugcuucgaa		50
<210>	34	
<211>	51	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	核酸分子	
<400>	34	
agcagcugua cauugacuuu agccggcuaa agucaaugua cagcugcuuc g		51
<210>	35	
<211>	50	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		

<223> 核酸分子

<400> 35
gcagcuguac auugacuuua gccggcuaaa gucaauguac agcugcuucg 50

<210> 36
<211> 51
<212> RNA
<213> 人工的

<220>



<223> 核酸分子

<400> 36
ugucagugcu cauuuacaag ccggcuugua aaugagcacu gacacuucga a 51

、
:
<210> 37
<211> 63
<212> RNA
<213> 人工的

<220>



<223> 核酸分子

<400> 37
accaugagaa guaugacaac agccuucag agaggcuguu gucauacuc ucaugguuca 60

ugg 63

<210> 38
<211> 51
<212> RNA
<213> 人工的

<220>

<223>	核酸分子	
<400>	38	
	ccaUCAacga uaagUGaaag ccgGcuuCa cuuAucguug auggCuucga a	51
<210>	39	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	正意	
<400>	39	
	gcagCuguac auGacuuua g	21
<210>	40	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	反意	
<400>	40	
	aaagUcaaug uacagCugcu u	21
<210>	41	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	正意	

<400> 41
gugucagugc ucauuuacaa g 21

<210> 42
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 反意

● <400> 42
uguuaaagag cacugacacu u 21

<210> 43
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

● <400> 43
uguuugucuc guuacaauau cccacaccg gauauuguaa cgagacaaac acuccuucgg 60
ga 62

<210> 44
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 44
aguguuuguc ucguuacaau auccccacac cggauauugu aacgagacaa acacuccuuc 60

gg 62

<210> 45
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子

<400> 45
aaagctgccca atgccctcg acc 23

<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子

<400> 46
taggtgggtg gccctcgtct tg 22

<210> 47
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 47
cgucaccaa aagcgcaau cccacaccg gaauugcgc uuuuggugac gcuucucgg 60
aa 62

<210> 48
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 48
agcgucacca aaaagcgcaa uuccccacac cggaauugcg cunuuuggug acgcunucuc 60
gg 62

<210> 49
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子

<400> 49
ctggacatca agctggccct ggac 24

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 引子

<400> 50
caccagcttg cgcatggcca cttc 24

<210> 51
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 51
aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacucuc caugguucuu 60
cg 62

<210> 52
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 52
accaugagaa guaugacaac agccccacac ccggcuguugu cauacucuc augguucuc 60
gg 62

<210> 53
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 53

ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguucucg 60

ga 62

<210> 54

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 54

augagaagua ugacaacagc ccacaccgg cuguugucau acuucucaug guucucggga 60

ac 62

<210> 55

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 55

ugagaagua gacaacagc ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uuucucggaa 60

cc 62

<210> 56

<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 56
agaaguauga caacagcccc acaccggcug uugucauacu ucucaugguu cuucggaacc 60
au 62

<210> 57
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 57
aaguaugaca acagccccac accggcuguu gucauacuc ucaugguuc ucggaaccau 60
ga 62

<210> 58
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 58
guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacucuc augguucuc ggaaccauga 60

ga	62
<210> 59	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 核酸分子	
<400> 59	
acaacagccc cacaccggcu guugucauac uucucauggu ucuucggaac caugagaagu	60
au	62
<210> 60	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 核酸分子	
<400> 60	
aacagcccca caccggcugu ugucauacuu cucaugguuc uucggaacca ugagaaguau	60
ga	62
<210> 61	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 核酸分子	

<400> 61
cagccccaca ccggcuguug ucauacuuu caugguucuu cggaaccaug agaaguauga 60
ca 62

<210> 62
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 62
gccccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguucucg gaaccaugag aaguaugaca 60
ac 62

<210> 63
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 63
ccccacaccg gcuguuguca uacuucucau ggucucucgg aaccaugaga aguaugacaa 60
ca 62

<210> 64
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 64

cccacaccgg cuguugucau acucucaug guucucgga accaugagaa guaagacaac 60

ag 62

<210> 65

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 65

ccacaccggc uguugucaua cuucucaugg uuucucggaa ccaugagaag uaugacaaca 60

gc 62

<210> 66

<211> 64

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 66

aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuuu caugguucgu 60

ucgc 64

<210> 67

<211> 60
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 67
accaugagaa guaugacaac agccacacc gcuguguca uacuucucu gguucucgg 60

<210> 68
<211> 58
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 68
ccaugagaaag uaugacaaca gccacaccg cugugucau acuucucaug guuuucga 58

<210> 69
<211> 58
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 69
accaugagaa guaugacaac agccacacc uguugucaua cuucucaugg uuucucgg 58

<210> 70
<211> 56
<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 70

ccaugagaag uaugacaaca gccacaccu guugucauac uucauggu uuucga 56

<210> 71

<211> 54

<212> RNA



<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 71

caugagaagu augacaacag ccacaccug uugucauacu ucuaugguu ucga 54

<210> 72

<211> 54

<212> RNA



<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 72

ccaugagaag uaugacaaca ccacaccug uugucauacu cucaugguu ucga 54

<210> 73

<211> 52

<212> RNA

<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 73
caugagaagu augacaacac cacaccuguu gucauacuc ucaugguuc ga 52

<210> 74
<211> 63
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 74
aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuc ucaugguuc 60
cgg 63

<210> 75
<211> 61
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 75
ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuuguguc auacucuca uggucucg 60
g 61

<210> 76
<211> 60
<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 76

caugagaagu augacaacag cccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucucgg 60

<210> 77

<211> 62

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 77

accaugagaa guaagacaac agccuucggg cuguugucau acuucucaug guucccacac 60

cg 62

<210> 78

<211> 65

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 核酸分子

<400> 78

ggaaccauga gaaguaugac aacagccaag ucuuggcugu ugucuaucu cucaugguuc 60

cucug 65

<210> 79

<211> 63
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 79
ggaaccauga gaaguaugac aacagccaag cuuggcuguu gucauacuuc ucaugguucc 60
ucg 63

<210> 80
<211> 62
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 核酸分子

<400> 80
cagcuguaca uugacuuuag cccacaccg gcuaaaguca auguacagcu gcuucucgg 60
aa 62

申請專利範圍

1. 一種單股 RNA 分子，係含有 1 個抑制目標基因表現之抑制表現序列者，其特徵在於：

從 5'端側至 3'端側依序含有 5'端側區域(Xc)、內部區域(Z)及 3'端側區域(Yc)，

前述內部區域(Z)係內部 5'端側區域(X)及內部 3'端側區域(Y)連結而構成者，

前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)互補，

前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)互補，

前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)之間具有連結區域(Lx)，且前述 5'端側區域(Xc)與前述內部 5'端側區域(X)透過前述連結區域(Lx)而連結，

前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)之間具有連結區域(Ly)，且前述 3'端側區域(Yc)與前述內部 3'端側區域(Y)透過前述連結區域(Ly)而連結，

前述內部區域(Z)含有前述抑制表現序列，

前述內部區域(Z)之鹼基數(Z)、前述內部 5'端側區域(X)之鹼基數(X)、前述內部 3'端側區域(Y)之鹼基數(Y)、前述 5'端側區域(Xc)之鹼基數(Xc)以及前述 3'端側區域(Yc)之鹼基數(Yc)滿足下列條件：

$$Z=X+Y；$$

$$Z\geq Xc+Yc；$$

$$Z-(Xc+Yc)=0\sim 10；$$

前述內部區域(Z)之鹼基數(Z)為 19 個鹼基至 30 個鹼基，

前述 5'端側區域(Xc)之鹼基數(Xc)為 1~7 個鹼基，

前述 3'端側區域(Yc)之鹼基數(Yc)為 1~9 個鹼基。

2. 如申請專利範圍第 1 項之單股 RNA 分子，其中前述內部 5'端側區域(X)之鹼基數(X)、前述 5'端側區域(Xc)之鹼基數(Xc)、前述內部 3'端側區域(Y)之鹼基數(Y)以及前述 3'端側區域(Yc)之鹼基數(Yc)滿足下述

(a)~(d)中之任一條件：

(a)滿足下述式(3)及(4)之條件；

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

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

(b)滿足下述式(5)及(6)之條件；

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

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

(c)滿足下述式(7)及(8)之條件；

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

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

(d)滿足下述式(9)及(10)之條件；

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

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

3. 如申請專利範圍第 2 項之單股 RNA 分子，其中前述(a)~(d)中，前述內部 5'端側區域(X)之鹼基數(X)與前述 5'端側區域(X_c)之鹼基數(X_c)的差、前述內部 3'端側區域(Y)之鹼基數(Y)與前述 3'端側區域(Y_c)之鹼基數(Y_c)的差滿足下述條件：

(a)滿足下述式(11)及(12)之條件；

$$X - X_c = 1、2 \text{ 或 } 3 \quad \cdot \cdot \cdot (11)$$

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

(b)滿足下述式(13)及(14)之條件；

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

$$Y - Y_c = 1、2 \text{ 或 } 3 \quad \cdot \cdot \cdot (14)$$

(c)滿足下述式(15)及(16)之條件；

$$X - X_c = 1、2 \text{ 或 } 3 \quad \cdot \cdot \cdot (15)$$

$$Y - Y_c = 1、2 \text{ 或 } 3 \quad \cdot \cdot \cdot (16)$$

(d)滿足下述式(17)及(18)之條件；

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

Y-Yc=0 . . . (18)。

4. 如申請專利範圍第 1 項之單股 RNA 分子，其中前述 5'端側區域(Xc)之鹼基數(Xc)為 1~3 個鹼基。
5. 如申請專利範圍第 1 項之單股 RNA 分子，其中前述 3'端側區域(Yc)之鹼基數(Yc)為 1~7 個鹼基。
6. 如申請專利範圍第 1 項之單股 RNA 分子，其中前述 3'端側區域(Yc)之鹼基數(Yc)為 1~3 個鹼基。
7. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之單股 RNA 分子，其含有至少 1 個經修飾之殘基。
8. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之單股 RNA 分子，其含有標記物質。
9. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之單股 RNA 分子，其含有穩定同位素。
10. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之單股 RNA 分子，其中前述連結區域(Lx)及/或前述連結區域(Ly)係由核苷酸殘基及非核苷酸殘基中之至少一者所構成。
11. 如申請專利範圍第 10 項之單股 RNA 分子，其中前述核苷酸殘基為非經修飾核苷酸殘基及/或經修飾核苷酸殘基。
12. 如申請專利範圍第 10 項之單股 RNA 分子，其中前述連結區域(Lx)及/或前述連結區域(Ly)係由下述(1)~(7)中之任一殘基所構成：
 - (1)非經修飾核苷酸殘基；
 - (2)經修飾核苷酸殘基；
 - (3)非經修飾核苷酸殘基及經修飾核苷酸殘基；
 - (4)非核苷酸殘基；
 - (5)非核苷酸殘基及非經修飾核苷酸殘基；
 - (6)非核苷酸殘基及經修飾核苷酸殘基；及
 - (7)非核苷酸殘基、非經修飾核苷酸殘基及經修飾核苷酸殘基。
13. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之單股 RNA 分子，其中前述單股

RNA 分子中，鹼基數總計為 50 鹼基以上。

14. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之單股 RNA 分子，其中前述基因之抑制表現係 RNA 干擾所致之抑制表現。
15. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之單股 RNA 分子，其中前述單股 RNA 分子之鹼基序列為序列編號 2、7、8、13、14、29 至 35、37、43、44、47、48 及 51 至 80 中之任一鹼基序列。
16. 一種抑制表現用組成物，係用以抑制目標基因之表現者，其特徵在於：含有如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項之單股 RNA 分子。
17. 一種藥學組成物，其特徵在於：含有如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項之單股 RNA 分子。
18. 如申請專利範圍第 17 項之藥學組成物，其係供炎症治療用者。
19. 一種抑制表現方法，係於活體外(in vitro)抑制目標基因之表現者，其特徵在於：使用如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項之單股 RNA 分子。
20. 如申請專利範圍第 19 項之抑制表現方法，其含有：於活體外將前述單股 RNA 分子投予細胞、組織或器官之步驟。
21. 如申請專利範圍第 19 或 20 項之抑制表現方法，其中前述基因之抑制表現係 RNA 干擾所致之抑制表現。
22. 一種誘導表現方法，係於活體外誘導抑制目標基因表現之 RNA 干擾者，其特徵在於：使用如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項之單股 RNA 分子。
23. 一種核酸分子，係用於治療疾病者，其特徵在於：

前述核酸分子為如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項之單股 RNA 分子，

且，前述單股核酸分子具有一抑制基因表現之序列作為前述抑制表現序列，且該基因係前述疾病之成因。