



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104059911 B

(45)授权公告日 2017.01.04

(21)申请号 201410217512.3

滨崎智洋 伊藤彰浩 铃木宽

(22)申请日 2011.07.28

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务
所(普通合伙) 11277

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104059911 A

代理人 刘新宇 李茂家

(43)申请公布日 2014.09.24

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C12N 15/113(2010.01)

2010-174915 2010.08.03 JP

A61K 48/00(2006.01)

2010-230806 2010.10.13 JP

2010-269823 2010.12.02 JP

2011-152381 2011.07.08 JP

(56)对比文件

WO 2006088490 A2,2006.08.24,

WO 03072745 A2,2003.09.04,

CN 1860228 A,2006.11.08,

(62)分案原申请数据

201180037592.9 2011.07.28

审查员 高巍

(73)专利权人 株式会社博纳克
地址 日本国福冈县

权利要求书4页 说明书65页
序列表21页 附图13页

(72)发明人 大木忠明 林宏刚 白水久男

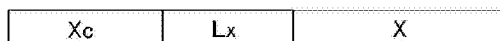
(54)发明名称

具有含氮脂环式骨架的单链核酸分子

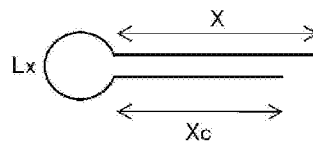
(57)摘要

本发明涉及具有含氮脂环式骨架的单链核酸分子。本发明的目的在于提供一种能够容易且高效地制造、能够抑制基因表达的新的核酸分子。所述分子的特征在于,其为包含抑制靶基因表达的抑制序列的单链核酸分子,包含区域(X)、连接子区域(Lx)和区域(Xc),在上述区域(X)与上述区域(Xc)之间连接有上述连接子区域(Lx),上述区域(Xc)与上述区域(X)互补,上述区域(X)和上述区域(Xc)中的至少一者包含上述表达抑制序列,上述连接子区域(Lx)具有包含吡咯烷骨架和哌啶骨架中的至少一者的非核苷酸结构。根据该单链核酸分子,能够抑制上述靶基因的表达。

(A)



(B)



1. 一种单链核酸分子,其特征在于,其为包含抑制靶基因表达的表达抑制序列的单链核酸分子,

包含区域X、连接子区域L_x和区域X_c,

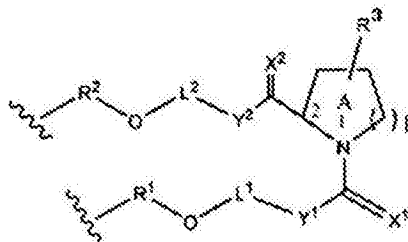
在所述区域X与所述区域X_c之间连结有所述连接子区域L_x,

所述区域X_c与所述区域X互补,

所述区域X和所述区域X_c中的至少一者包含所述表达抑制序列,

所述连接子区域L_x具有包含吡咯烷骨架和哌啶骨架中的至少一者的非核苷酸结构;

其中,所述连接子区域L_x由下述式(I)表示,



... (I)

所述式中,

X¹和X²各自独立地为H₂、O、S或NH;

Y¹和Y²各自独立地为单键、CH₂、NH、O或S;

R³为与环A上的C-3、C-4、C-5或C-6键合的氢原子或取代基;

L¹为由n个原子构成的亚烷基链,此处,亚烷基碳原子上的氢原子可以被OH、OR^a、NH₂、NHR^a、NR^aR^b、SH或SR^a取代,也可以不被取代,或者,

L¹为所述亚烷基链的一个以上碳原子被氧原子取代的聚醚链,

其中,Y¹为NH、O或S的情况下,与Y¹键合的L¹的原子为碳,与OR¹键合的L¹的原子为碳,氧原子彼此不相邻;

L²为由m个原子构成的亚烷基链,此处,亚烷基碳原子上的氢原子可以被OH、OR^c、NH₂、NHR^c、NR^cR^d、SH或SR^c取代,也可以不被取代,或者,

L²为所述亚烷基链的一个以上碳原子被氧原子取代的聚醚链,

其中,Y²为NH、O或S的情况下,与Y²键合的L²的原子为碳,与OR²键合的L²的原子为碳,氧原子彼此不相邻;

R^a、R^b、R^c和R^d各自独立地为取代基或保护基;

l为1或2;

m为0~30的范围的整数;

n为0~30的范围的整数;

环A可以是所述环A上的C-2以外的1个碳原子被氮、氧或硫取代,

所述环A内可以包含碳-碳双键或碳-氮双键,

所述区域X_c和所述区域X分别介由-OR¹-或-OR²-与所述连接子区域L_x结合,

此处,R¹和R²可以存在,也可以不存在,在存在的情况下,R¹和R²各自独立地为核苷酸残基或所述结构(I)。

2. 根据权利要求1所述的单链核酸分子,其中,所述区域X的碱基数X和所述5'侧区域X_c

的碱基数 X_c 满足下述式(3)或式(5)的条件,

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

$$X = X_c \cdot \cdot \cdot (5)。$$

3. 根据权利要求2所述的单链核酸分子,其中,所述区域X的碱基数X和所述5'侧区域 X_c 的碱基数 X_c 满足下述式(11)的条件,

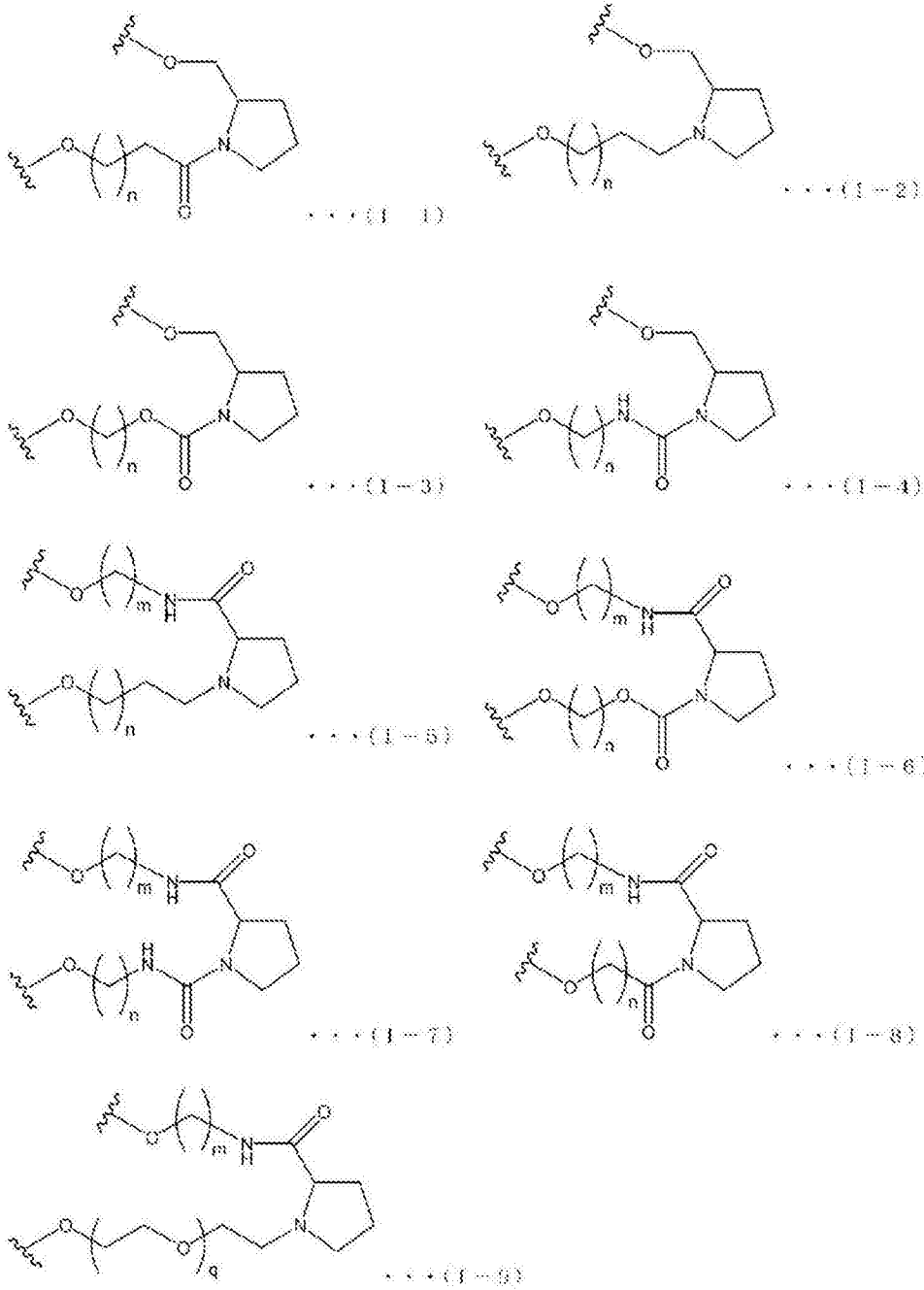
$$X - X_c = 1、2或3 \cdot \cdot \cdot (11)。$$

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的单链核酸分子,其中,所述区域 X_c 的碱基数 X_c 为19碱基~30碱基。

5. 根据权利要求1~3中任一项所述的单链核酸分子,其中,所述式(I)中, L^1 为所述聚醚链,所述聚醚链为聚乙二醇。

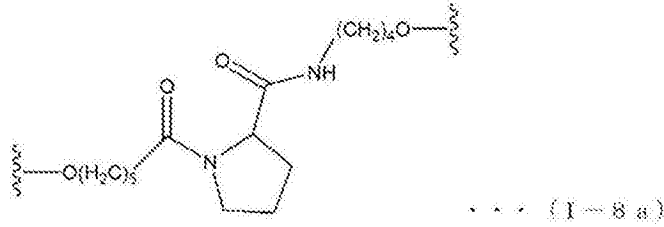
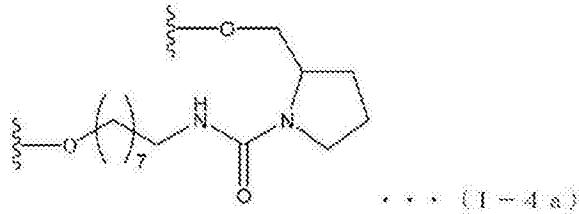
6. 根据权利要求1~3中任一项所述的单链核酸分子,其中,所述式(I)中, L^1 的原子个数n与 L^2 的原子个数m的合计m+n为0~30的范围。

7. 根据权利要求1~3中任一项所述的单链核酸分子,其中,所述式(I)的结构为下述式(I-1)~式(I-9)中的任意一个,下述式中,n为0~30的整数,m为0~30的整数,q为0~10的整数,



8. 根据权利要求7所述的单链核酸分子,其中,所述式(I-1)中, $n=8$; 所述(I-2)中, $n=3$; 所述式(I-3)中, $n=4$ 或 8 ; 所述(I-4)中, $n=7$ 或 8 ; 所述式(I-5)中, $n=3$ 且 $m=4$; 所述(I-6)中, $n=8$ 且 $m=4$; 所述式(I-7)中, $n=8$ 且 $m=4$; 所述(I-8)中, $n=5$ 且 $m=4$; 所述式(I-9)中, $q=1$ 且 $m=4$ 。

9. 根据权利要求8所述的单链核酸分子,其中,所述式(I-4)为下述式(I-4a), 所述式(I-8)为下述式(I-8a),



10. 根据权利要求1~3、8~9中任一项所述的单链核酸分子,其中,所述区域X的碱基数X为19~30碱基。

11. 根据权利要求1~3、8~9中任一项所述的单链核酸分子,其中,所述表达抑制序列的碱基数为19~30碱基。

12. 根据权利要求1~3、8~9中任一项所述的单链核酸分子,其包含至少1个经修饰的残基。

13. 根据权利要求1~3、8~9中任一项所述的单链核酸分子,其包含标记物质。

14. 根据权利要求1~3、8~9中任一项所述的单链核酸分子,其包含稳定同位素。

15. 根据权利要求1~3、8~9中任一项所述的单链核酸分子,其为RNA分子。

16. 根据权利要求1~3、8~9中任一项所述的单链核酸分子,其中,所述单链核酸分子中,碱基数的合计为38碱基以上。

17. 根据权利要求1~3、8~9中任一项所述的单链核酸分子,其中,所述基因的表达抑制为基于RNA干扰的表达抑制。

18. 一种表达抑制用组合物,其特征在于,其为用于抑制靶基因表达的组合物,其包含权利要求1~17中任一项所述的单链核酸分子。

19. 一种药学组合物,其特征在于,其包含权利要求1~17中任一项所述的单链核酸分子。

20. 根据权利要求19所述的药学组合物,其为炎症治疗用。

21. 权利要求1~17中任一项所述的单链核酸分子在制备用于抑制靶基因表达的药物中的用途。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中,所述基因的表达抑制为基于RNA干扰的表达抑制。

23. 权利要求1~17中任一项所述的单链核酸分子在制备用于诱导抑制靶基因表达的RNA干扰的药物中的用途。

24. 一种单链核酸分子,其特征在于,其为用于疾病的治疗的核酸分子,

所述核酸分子为权利要求1~17中任一项所述的单链核酸分子,

所述单链核酸分子具有抑制成为所述疾病的原因的基因的表达的序列作为所述表达抑制序列。

具有含氮脂环式骨架的单链核酸分子

[0001] 本申请是申请号为2011800375929(国际申请号为PCT/JP2011/067292)的原申请的分案申请,该原申请的申请日为2011年7月28日,发明名称为“具有含氮脂环式骨架的单链核酸分子”。

技术领域

[0002] 本发明涉及抑制基因表达的单链核酸分子,更详细而言,涉及具有含氮脂环式骨架的单链核酸分子、包含该单链核酸分子的组合物及其用途。

背景技术

[0003] 作为抑制基因表达的技术,例如,已知RNA干扰(RNAi)(非专利文献1)。基于RNA干扰的基因的表达抑制通常通过例如在细胞等中投与短的双链RNA分子来实施。上述双链RNA分子通常被称为siRNA(小干扰RNA)。除此之外,还报道了一种环状的RNA分子,该RNA分子通过分子内退火而部分地形成了双链,利用该RNA分子也能够抑制基因表达(专利文献1)。但是,这些方法中,诱导基因的表达抑制的RNA分子存在以下问题。

[0004] 首先,在制造上述siRNA的情况下,需要以下工序:在分别合成正义链和反义链之后,最后将这些链杂交。因此,存在制造效率差的问题。另外,在细胞中投与上述siRNA时,需要以抑制了其解离为单链RNA的状态投与至细胞中,因而,其操作条件的设定也需要劳力。接着,在为环状的RNA分子的情况下,存在难以合成的问题。

[0005] 并且,这些RNA分子基本上由核苷酸残基构成。而且,现状是,在对上述RNA分子赋予某些功能、标记时,例如,只能对作为核苷酸残基的构成要素的碱基、糖残基或磷酸基进行修饰。因此,在利用了RNA干扰的医药品等的开发中,极其难以在维持了基因表达的抑制功能的状态下进行赋予进一步的功能、标记的改变。

[0006] 现有技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:Fire等、Nature、1998Feb19;391(6669):806-11

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:美国公开公报2004-058886

发明内容

[0011] 因此,本发明的目的在于提供一种能够容易且高效地制造、能够抑制基因表达的新的核酸分子。

[0012] 为了达到上述目的,本发明的核酸分子的特征在于,其为包含抑制靶基因表达的表达抑制序列的单链核酸分子,包含区域(X)、连接子区域(Lx)和区域(Xc),在上述区域(X)与上述区域(Xc)之间连结有上述连接子区域(Lx),上述区域(X)和上述区域(Xc)中的至少一者包含上述表达抑制序列,上述连接子区域(Lx)具有包含吡咯烷骨架和哌啶骨架中的至少一者的非核苷酸结构。

[0013] 本发明的组合物的特征在于,其为用于抑制靶基因表达的组合物,其包含上述本发明的单链核酸分子。

[0014] 本发明的组合物的特征在于,其为药学组合物,其包含上述本发明的单链核酸分子。

[0015] 本发明的表达抑制方法的特征在于,其为抑制靶基因表达的方法,其使用上述本发明的单链核酸分子。

[0016] 本发明的疾病的治疗方法的特征在于,其包括将上述本发明的单链核酸分子投与至患者的工序,上述单链核酸分子具有抑制成为上述疾病的原因的基因的表达的序列作为上述表达抑制序列。

[0017] 本发明的单链核酸分子能够进行基因的表达抑制,并且由于不是环状,因而其合成容易,另外,由于是单链,因此不存在双链的退火工序,能够高效地制造。另外,由于上述连接子区域包含上述非核苷酸残基,因而不限于例如以往那样的改变核苷酸残基,例如,还能够改变上述连接子区域中的修饰等。

[0018] 需要说明的是,本发明人首次发现了本发明的单链核酸分子的结构能够抑制基因表达。本发明的单链核酸分子的基因的表达抑制效果被推测是与基于RNA干扰同样的现象,但本发明中的基因表达抑制不限制和限定于RNA干扰。

附图说明

[0019] 图1是示出本发明的单链核酸分子的一个例子的示意图。

[0020] 图2是示出本发明的单链核酸分子的其他例子的示意图。

[0021] 图3是示出本发明的单链核酸分子的其他例子的示意图。

[0022] 图4是示出本发明的实施例中的GAPDH基因表达量的相对值的图表。

[0023] 图5是示出本发明的实施例中的稳定性的电泳照片。

[0024] 图6是示出本发明的实施例中的GAPDH基因表达量的相对值的图表。

[0025] 图7是示出本发明的实施例中的切酶(Dicer)蛋白质对于ssRNA的反应性的电泳的结果。

[0026] 图8是示出本发明的实施例中的A549细胞的GAPDH基因表达量的相对值的图表。

[0027] 图9是示出本发明的实施例中的293细胞的GAPDH基因表达量的相对值的图表。

[0028] 图10是示出本发明的实施例中的HCT116细胞的GAPDH基因表达量的相对值的图表。

[0029] 图11是示出本发明的实施例中的HCT116细胞的GAPDH基因表达量的相对值的图表。

[0030] 图12是示出本发明的实施例中的TGF- β 1基因表达量的相对值的图表。

[0031] 图13是示出本发明的实施例中的各投与组中单位重量的肺的TGF- β 1基因表达量的图表。

[0032] 图14的(A)是示出本发明的实施例中的各投与组的BALF样品中的TNF- α 量的图表,图14的(B)是示出本发明的实施例中的各投与组的BALF样品中的IFN- β 量的图表。

[0033] 图15是示出本发明的实施例中的核糖核酸酶耐受性的电泳照片。

[0034] 图16是示出本发明的实施例中的S7核酸酶耐受性的电泳照片。

- [0035] 图17是示出参考例中使用的ssRNA的图。
- [0036] 图18是示出参考例中的GAPDH基因表达量的相对值的图表。
- [0037] 图19是示出参考例中的TGF- β 1基因表达量的相对值的图表。
- [0038] 图20是示出参考例中的LAMA基因的表达量的相对值的图表。
- [0039] 图21是示出参考例中的LMNA基因的表达量的相对值的图表。
- [0040] 图22是示出参考例中使用的ssRNA的图。
- [0041] 图23是示出参考例中的GAPDH基因表达量的相对值的图表。

具体实施方式

[0042] 只要没有特别提及,则本说明书中使用的用语能够以该技术领域中通常所用的含义使用。

[0043] 1. ssPN分子

[0044] 如上所述,本发明的单链核酸分子的特征在于,其为包含抑制靶基因表达的表达抑制序列的单链核酸分子,包含区域(X)、连接子区域(Lx)和区域(Xc),在上述区域(X)与上述区域(Xc)之间连接有上述连接子区域(Lx),上述区域(X)和上述区域(Xc)中的至少一者包含上述表达抑制序列,上述连接子区域(Lx)具有包含吡咯烷骨架和嘧啶骨架中的至少一者的非核苷酸结构。

[0045] 本发明中,“靶基因的表达抑制”例如是指阻碍上述靶基因的表达。上述抑制的机理没有特别限制,例如,可以为下降调节或沉默。上述靶基因的表达抑制能够通过例如由上述靶基因的转录产物的生成量的减少、上述转录产物的活性的减少、由上述靶基因的翻译产物的生成量的减少或者上述翻译产物的活性的减少等来确认。上述蛋白质可以举出例如成熟蛋白或者接受加工或翻译后修饰之前的前体蛋白等。

[0046] 以下,将本发明的单链核酸分子也称为本发明的“ssPN分子”。本发明的ssPN分子例如在体内(in vivo)或体外(in vitro)中能够用于靶基因的表达抑制,因而也称为“靶基因的表达抑制用ssPN分子”或“靶基因的表达抑制剂”。另外,本发明的ssPN分子例如通过RNA干扰而能够抑制上述靶基因的表达,因而也称为“RNA干扰用ssNP分子”、“RNA干扰诱导用ssPN分子”或者“RNA干扰剂或RNA干扰诱导剂”。另外,本发明能够抑制例如干扰素诱导等副作用。

[0047] 本发明的ssPN分子的5'末端和3'末端未连结,还能够称为线状单链核酸分子。

[0048] 在本发明的ssPN分子中,例如,本发明的ssPN分子以体内或体外的方式导入到细胞内的情况下,上述表达抑制序列为显示抑制上述靶基因的表达的活性的序列。上述表达抑制序列没有特别限制,能够根据目标靶基因的种类适宜设定。上述表达抑制序列例如能够适宜适用基于siRNA的RNA干扰的相关序列。RNA干扰通常为下述现象:长的双链RNA(dsRNA)在细胞内被切酶切断成3'末端突出的19~21碱基对左右的双链RNA(siRNA:小干扰RNA),其中一个单链RNA与靶mRNA结合,上述mRNA分解,由此抑制上述mRNA的翻译。与上述靶mRNA结合的上述siRNA中的单链RNA的序列例如根据靶基因的种类被报道了各种种类。本发明可以使用例如上述siRNA的单链RNA的序列作为上述表达抑制序列。

[0049] 需要说明的是,本发明的关键点不在于对于上述靶基因的上述表达抑制序列的序列信息,而是涉及用于在例如细胞内使上述表达抑制序列所产生的上述靶基因的表达抑制

活性发挥功能的核酸分子的结构。因此,本发明中,例如,除了申请时公知的上述siRNA的单链RNA序列之外,还能够利用将来所获知的序列作为上述表达抑制序列。

[0050] 上述表达抑制序列例如相对于上述靶基因的规定区域优选具有90%以上的互补性、更优选为95%、进一步优选为98%、特别优选为100%。通过满足这样的互补性,例如,能够充分减轻脱靶。

[0051] 作为具体例,在靶基因为GAPDH基因的情况下,上述表达抑制序列能够使用例如序列号4所示的19碱基长的序列;在靶基因为TGF- β 1的情况下,上述表达抑制序列能够使用例如序列号18所示的21碱基长的序列;在靶基因为LAMA1基因的情况下,上述表达抑制序列能够使用例如序列号6所示的19碱基长的序列;在靶基因为LMNA基因的情况下,能够使用例如序列号30所示的19碱基长的序列。

[0052] 5'-GUUGUCAUACUUCUCAUGG-3'(序列号4)

[0053] 5'-AAAGUCA AUGUACAGCUGCUU-3'(序列号18)

[0054] 5'-AUUGU AACGAGACAAACAC-3'(序列号6)

[0055] 5'-UUGCGCUUUUUGGUGACGC-3'(序列号30)

[0056] 本发明的ssPN分子所产生的上述靶基因的表达抑制被推测是由于例如产生RNA干扰。需要说明的是,本发明并不限于该机理。本发明的ssPN分子并不是如例如所谓的siRNA那样以由两条单链RNA构成的dsRNA的形式导入细胞等中,并且,在细胞内未必需要上述表达抑制序列的切出。因此,本发明的ssPN分子也可以说例如还具有RNA干扰样的功能。

[0057] 本发明的ssPN分子中,上述连接子区域(Lx)例如可以具有包含上述吡咯烷骨架的非核苷酸结构,也可以具有包含上述哌啶骨架的非核苷酸结构,还可以具有包含上述吡咯烷骨架的非核苷酸结构和包含上述哌啶骨架的非核苷酸结构两者。本发明的ssPN分子例如能够抑制生物体内的干扰素诱导等副作用,核酸酶耐受性优异。

[0058] 本发明的ssPN分子中,上述吡咯烷骨架例如可以是构成吡咯烷的五元环的碳的1个以上被取代了的吡咯烷衍生物的骨架,在被取代的情况下,例如,优选为C-2的碳以外的碳原子。上述碳可以被例如氮、氧或硫取代。上述吡咯烷骨架例如可以在吡咯烷的五元环内包含例如碳-碳双键或碳-氮双键。上述吡咯烷骨架中,构成吡咯烷的五元环的碳和氮例如可以键合氢,也可以键合后述的取代基。上述连接子区域(Lx)例如可以介由上述吡咯烷骨架中的任意基团而与上述区域(X)和上述区域(Xc)结合,优选为上述五元环中的任意1个碳原子和氮,优选为上述五元环的2位的碳(C-2)和氮。作为上述吡咯烷骨架,可以举出例如脯氨酸骨架、脯氨酸醇骨架等。上述脯氨酸骨架和脯氨酸醇骨架等由于为例如生物体内物质及其还原体,因此安全性也优异。

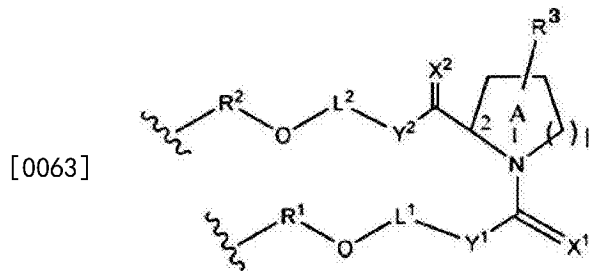
[0059] 本发明的ssPN分子中,上述哌啶骨架例如可以是构成哌啶的六元环的碳的1个以上被取代了的哌啶衍生物的骨架,在被取代的情况下,例如,优选为C-2的碳以外的碳原子。上述碳可以被例如氮、氧或硫取代。上述哌啶骨架例如可以在哌啶的六元环内包含例如碳-碳双键或碳-氮双键。上述哌啶骨架中,构成哌啶的六元环的碳和氮例如可以键合氢基,也可以键合后述的取代基。上述连接子区域(Lx)例如可以介由上述哌啶骨架中的任意基团而与上述区域(X)和上述区域(Xc)结合,优选为上述六元环中的任意1个碳原子和氮,优选为上述六元环的2位的碳(C-2)和氮。

[0060] 上述连接子区域例如可以仅包含由上述非核苷酸结构构成的非核苷酸残基,也可

以包含由上述非核苷酸结构构成的非核苷酸残基与核苷酸残基。

[0061] 本发明的ssPN分子中,上述连接子区域例如由下述式(I)表示。

[0062] [化学式1]



· · · (I)

[0064] 上述式(I)中,例如,

[0065] X^1 和 X^2 各自独立地为 H_2 、 O 、 S 或 NH ;

[0066] Y^1 和 Y^2 各自独立地为单键、 CH_2 、 NH 、 O 或 S ;

[0067] R^3 为与环A上的C-3、C-4、C-5或C-6键合的氢原子或取代基,

[0068] L^1 为由n个原子构成的亚烷基链,此处,亚烷基碳原子上的氢原子可以被 OH 、 OR^a 、 NH_2 、 NHR^a 、 NR^aR^b 、 SH 或 SR^a 取代,也可以不被取代,或者,

[0069] L^1 为上述亚烷基链的一个以上碳原子被氧原子取代的聚醚链,

[0070] 其中, Y^1 为 NH 、 O 或 S 的情况下,与 Y^1 键合的 L^1 的原子为碳,与 OR^1 键合的 L^1 的原子为碳,氧原子彼此不相邻;

[0071] L^2 为由m个原子构成的亚烷基链,此处,亚烷基碳原子上的氢原子可以被 OH 、 OR^c 、 NH_2 、 NHR^c 、 NR^cR^d 、 SH 或 SR^c 取代,也可以不被取代,或者,

[0072] L^2 为上述亚烷基链的一个以上碳原子被氧原子取代的聚醚链,

[0073] 其中, Y^2 为 NH 、 O 或 S 的情况下,与 Y^2 键合的 L^2 的原子为碳,与 OR^2 键合的 L^2 的原子为碳,氧原子彼此不相邻;

[0074] R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 各自独立地为取代基或保护基;

[0075] l为1或2;

[0076] m为0~30的范围的整数;

[0077] n为0~30的范围的整数;

[0078] 环A可以是上述环A上的C-2以外的1个碳原子被氮、氧、硫取代,

[0079] 上述环A内可以包含碳-碳双键或碳-氮双键,

[0080] 上述区域(Y_c)和上述区域(Y)分别介由 $-OR^1-$ 或 $-OR^2-$ 与上述连接子区域(L_y)结合,

[0081] 此处, R^1 和 R^2 可以存在,也可以不存在,在存在的情况下, R^1 和 R^2 各自独立地为核苷酸残基或上述结构(I)。

[0082] 上述式(I)中, X^1 和 X^2 例如各自独立地为 H_2 、 O 、 S 或 NH 。上述式(I)中, X^1 为 H_2 是指 X^1 和与 X^1 键合的碳原子一起形成 CH_2 (亚甲基)。关于 X^2 ,也相同。

[0083] 上述式(I)中, Y^1 和 Y^2 各自独立地为单键、 CH_2 、 NH 、 O 或 S 。

[0084] 上述式(I)中,在环A中,l为1或2。l=1的情况下,环A为五元环,例如为上述吡咯烷骨架。上述吡咯烷骨架可以举出例如脯氨酸骨架、脯氨酸醇骨架等,可例示出它们的二价的结构。l=2的情况下,环A为六元环,例如为上述哌啶骨架。环A可以是环A上的C-2以外的1个碳

原子被氮、氧或硫取代。另外,环A可以在环A内包含碳-碳双键或碳-氮双键。环A可以为例如L型和D型中的任意一种。

[0085] 上述式(I)中, R^3 为与环A上的C-3、C-4、C-5或C-6键合的氢原子或取代基。 R^3 为上述取代基的情况下,取代基 R^3 可以为1个,也可以为多个,还可以不存在,在为多个的情况下,可以相同也可以不同。

[0086] 取代基 R^3 为例如卤素、OH、 OR^4 、 NH_2 、 NHR^4 、 NR^4R^5 、SH、 SR^4 或氧基(=O)等。

[0087] R^4 和 R^5 例如各自独立地为取代基或保护基,可以相同,也可以不同。上述取代基可以举出例如卤素、烷基、烯基、炔基、卤代烷基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、环基烷基、羟基烷基、烷氧基烷基、氨基烷基、杂环基烯基、杂环基烷基、杂芳烷基、甲硅烷基、甲硅烷氧基烷基等。以下相同。取代基 R^3 可以为这些列举的取代基。

[0088] 上述保护基例如为将反应性高的官能团转换成非活性的官能团,可以举出公知的保护基等。上述保护基例如能够援引文献(J.F.W.McOmie, "Protecting Groups in Organic Chemistry" Prentice Hall, London and New York, 1973)的记载。上述保护基没有特别限制,可以举出例如叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、双(2-乙酰氧基乙氧基)甲基(ACE)、三异丙基甲硅烷氧基甲基(TOM)、1-(2-氰基乙氧基)乙基(CEE)、2-氰基乙氧基甲基(CEM)和甲苯磺酰基乙氧基甲基(TEM)、二甲氧基三苯甲基(DMTt)等。 R^3 为 OR^4 的情况下,上述保护基没有特别限制,可以举出例如TBDMS基、ACE基、TOM基、CEE基、CEM基和TEM基等。除此之外,还可以举出后述[化学式5]的含甲硅烷基的基团。以下,同样。

[0089] 上述式(I)中, L^1 为由n个原子构成的亚烷基链。上述亚烷基碳原子上的氢原子可以被例如OH、 OR^a 、 NH_2 、 NHR^a 、 NR^aR^b 、SH或 SR^a 取代,也可以不被取代。或者, L^1 可以为上述亚烷基链的1个以上碳原子被氧原子取代的聚醚链。上述聚醚链例如为聚乙二醇。需要说明的是, Y^1 为NH、O或S的情况下,与 Y^1 键合的 L^1 的原子为碳,与 OR^1 键合的 L^1 的原子为碳,氧原子彼此不相邻。即,例如 Y^1 为O的情况下,该氧原子与 L^1 的氧原子不相邻, OR^1 的氧原子与 L^1 的氧原子不相邻。

[0090] 上述式(I)中, L^2 为由m个原子构成的亚烷基链。上述亚烷基碳原子上的氢原子可以被例如OH、 OR^c 、 NH_2 、 NHR^c 、 NR^cR^d 、SH或 SR^c 取代,也可以不被取代。或者, L^2 可以为上述亚烷基链的1个以上碳原子被氧原子取代的聚醚链。需要说明的是, Y^2 为NH、O或S的情况下,与 Y^2 键合的 L^2 的原子为碳,与 OR^2 键合的 L^2 的原子为碳,氧原子彼此不相邻。即,例如, Y^2 为O的情况下,该氧原子与 L^2 的氧原子不相邻, OR^2 的氧原子与 L^2 的氧原子不相邻。

[0091] L^1 的n和 L^2 的m没有特别限制,下限例如分别为0,上限也没有特别限制。n和m例如能够根据上述连接子区域(Lx)的期望长度适宜设定。例如,从制造成本和收率等方面出发,n和m分别优选为0~30、更优选为0~20、进一步优选为0~15。n和m可以相同($n=m$),也可以不同。 $n+m$ 例如为0~30、优选为0~20、更优选为0~15。

[0092] R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 例如各自独立地为取代基或保护基。上述取代基和上述保护基例如与前述相同。

[0093] 上述式(I)中,氢原子例如可以各自独立地被Cl、Br、F和I等卤素取代。

[0094] 上述区域(Xc)和上述区域(X)例如分别介由 $-OR^1-$ 或 $-OR^2-$ 与上述连接子区域(Lx)结合。此处, R^1 和 R^2 可以存在,也可以不存在。 R^1 和 R^2 存在的情况下, R^1 和 R^2 各自独立地为核苷酸残基或上述式(I)的结构。 R^1 和/或 R^2 为上述核苷酸残基的情况下,上述连接子区域(Lx)例

如由除去了核苷酸残基 R^1 和/或 R^2 的上述式(I)的结构构成的上述非核苷酸残基以及上述核苷酸残基形成。 R^1 和/或 R^2 为上述式(I)的结构的情况下,上述连接子区域(X_c)例如形成2个以上的由上述式(I)的结构构成的上述非核苷酸残基连结而成的结构。上述式(I)的结构可以包含例如1个、2个、3个或4个。这样,在包含多个上述结构的情况下,上述(I)的结构例如可以直接连结,也可以介由上述核苷酸残基结合。另一方面,不存在 R^1 和 R^2 的情况下,上述连接子区域(L_x)例如仅通过由上述式(I)的结构构成的上述非核苷酸残基形成。

[0095] 上述区域(X_c)和上述区域(X)与 $-OR^1-$ 和 $-OR^2-$ 的结合的组合没有特别限制,例如,可以举出以下的任意一种条件。

[0096] 条件(1)

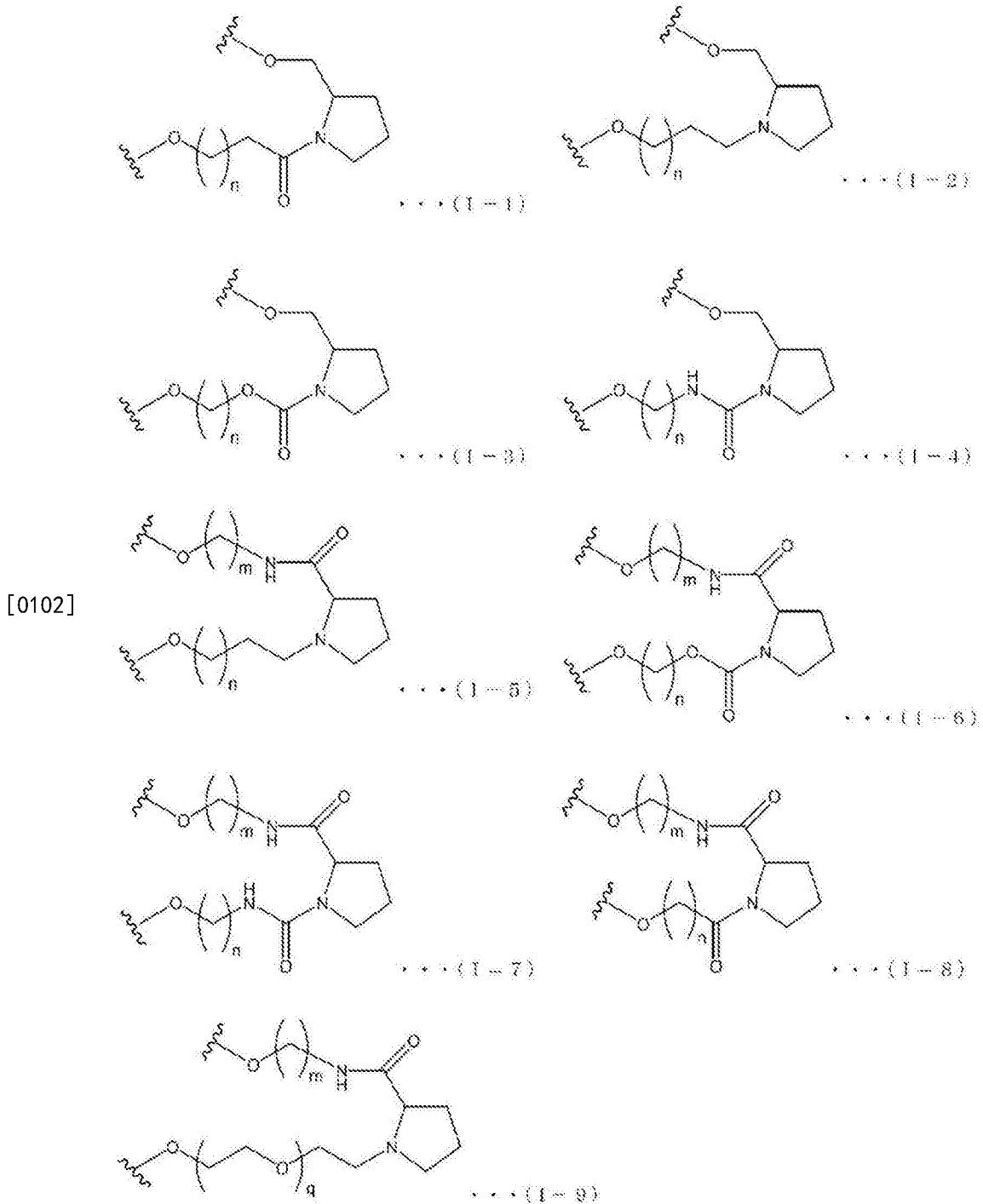
[0097] 上述区域(X_c)介由 $-OR^2-$ 与上述式(I)的结构结合,上述区域(X)介由 $-OR^1-$ 与上述式(I)的结构结合。

[0098] 条件(2)

[0099] 上述区域(X_c)介由 $-OR^1-$ 与上述式(I)的结构结合,上述区域(X)介由 $-OR^2-$ 与上述式(I)的结构结合。

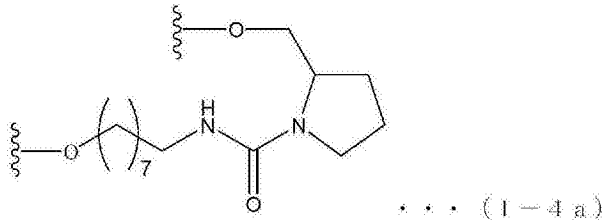
[0100] 上述式(I)的结构可例示出例如下述式(I-1)~式(I-9),下述式中, n 和 m 与上述式(I)相同。下述式中, q 为0~10的整数。

[0101] [化学式2]

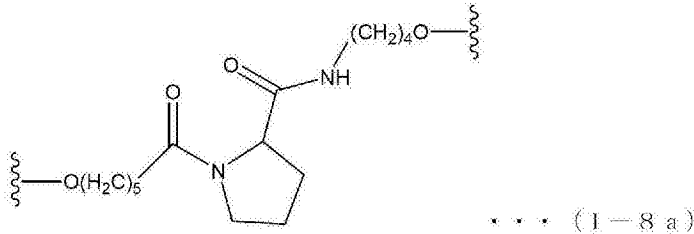


[0103] 上述式(I-1)~(I-9)中,n,m和q没有特别限制,如上所述。作为具体例,可以举出:上述式(I-1)中,n=8;上述(I-2)中,n=3;上述式(I-3)中,n=4或8;上述(I-4)中,n=7或8;上述式(I-5)中,n=3且m=4;上述(I-6)中,n=8且m=4;上述式(I-7)中,n=8且m=4;上述(I-8)中,n=5且m=4;上述式(I-9)中,q=1且m=4。将上述式(I-4)的一例(n=8)示于下述式(I-4a),将上述式(I-8)的一例(n=5,m=4)示于下述式(I-8a),

[0104] [化学式3]



[0105]



[0106] 本发明的ssPN分子中,上述区域(Xc)与上述区域(X)互补。因此,本发明的ssPN分子中,上述区域(Xc)向上述区域(X)折回,上述区域(Xc)和上述区域(X)能够通过自退火形成双链。这样,本发明的ssPN分子能够在分子内形成双链,例如,与以往的RNA干扰中使用的siRNA那样地、由分离的两条单链RNA通过退火形成的双链RNA是明显不同的结构。

[0107] 本发明的ssPN分子例如可以是仅上述区域(Xc)折回而与上述区域(X)形成双链,此外,还可以在其他区域形成新的双链。以下,将前者的ssPN分子、即形成一处双链的分子称为“第一ssPN分子”,将后者的ssPN分子、即形成两处双链的分子称为“第二ssPN分子”。以下,例示出上述第一ssPN分子和上述第二ssPN分子,但本发明不限制于此。

[0108] (1)第一ssPN分子

[0109] 上述第一ssPN分子例如为由上述区域(X)、上述区域(Xc)和上述连接子区域(Lx)构成的分子。

[0110] 上述第一ssPN分子例如可以从5'侧至3'侧依次具有上述区域(Xc)、上述连接子区域(Lx)和上述区域(X),也可以从3'侧至5'侧依次具有上述区域(Xc)、上述连接子区域(Lx)和上述区域(X)。

[0111] 上述第一ssPN分子中,上述区域(Xc)与上述区域(X)互补。此处,上述区域(Xc)只要具有与上述区域(X)的全部区域或其部分区域互补的序列即可,优选包含与上述区域(X)的全部区域或其部分区域互补的序列,或者由上述互补的序列构成。上述区域(Xc)与上述区域(X)的互补的上述全部区域或互补的上述部分区域例如可以完全互补,也可以1碱基或数碱基非互补,但优选完全互补。上述1碱基或数碱基例如为1~3碱基、优选为1碱基或2碱基。

[0112] 上述第一ssPN分子中,如上所述,上述表达抑制序列包含在上述区域(Xc)和上述区域(X)的至少一者中。上述第一ssPN分子例如可以具有1个上述表达抑制序列,也可以具有2个以上的上述表达抑制序列。

[0113] 为后者的情况下,上述第一ssPN分子例如可以具有2个以上的对于相同靶基因的相同表达抑制序列,也可以具有2个以上的对于相同靶基因的不同表达抑制序列,还可以具有2个以上的对于不同靶基因的不同表达抑制序列。上述第一ssPN分子具有2个以上的上述表达抑制序列的情况下,各表达抑制序列的配置部位没有特别限制,可以为上述区域(X)和上述区域(Xc)中的任意一个区域,也可以为不同的区域。上述第一ssPN分子具有2个以上的

对于不同靶基因的上述表达抑制序列的情况下,例如,通过上述第一ssPN分子,能够抑制2种以上不同靶基因的表达。

[0114] 将上述第一ssPN分子的一例示于图1的示意图。图1的(A)是作为一例示出上述ssPN分子的各区域的顺序的概要的示意图,图1的(B)是示出上述ssPN分子在上述分子内形成了双链的状态的示意图。如图1的(B)所示,上述ssPN分子在上述区域(Xc)与上述区域(X)之间形成了双链,上述Lx区域根据其长度而形成环结构。图1仅为示出上述区域的连结顺序和形成双链的各区域的位置关系的图,例如,各区域的长度、上述连接子区域(Lx)的形状等不限于此。

[0115] 上述第一ssPN分子中,上述区域(Xc)和上述区域(X)的碱基数没有特别限制。以下例示出各区域的长度,但本发明不限于此。本发明中,“碱基数”例如指“长度”,也可以称为“碱基长”。本发明中,碱基数的数值范围例如公开了属于其范围的全部正整数,作为具体例,“1~4碱基”的记载是指“1、2、3、4碱基”的全部公开(以下同样)。

[0116] 上述区域(Xc)例如可以与上述区域(X)的全部区域完全互补。该情况下,上述区域(Xc)例如指由与从上述区域(X)的5'末端至3'末端的全部区域互补的碱基序列构成,即,是指上述区域(Xc)与上述区域(X)为相同的碱基长,并且上述区域(Xc)的全部碱基与上述区域(X)的全部碱基互补。

[0117] 另外,上述区域(Xc)例如可以与上述区域(X)的部分区域完全互补。该情况下,上述区域(Xc)例如指由与上述区域(X)的部分区域互补的碱基序列构成,即,是指上述区域(Xc)由比上述区域(X)短1碱基以上的碱基长的碱基序列构成,上述区域(Xc)的全部碱基与上述区域(X)的上述部分区域的全部碱基互补。上述区域(X)的上述部分区域例如优选为上述区域(X)中的、由从上述区域(Xc)侧的末端的碱基(第1位的碱基)连续的碱基序列构成的区域。

[0118] 上述第一ssPN分子中,上述区域(X)的碱基数(X)与上述区域(Xc)的碱基数(Xc)的关系例如满足下述(3)或(5)的条件,为前者的情况下,具体而言,例如,满足下述(11)的条件。

[0119] $X > Xc \cdots (3)$

[0120] $X - Xc = 1 \sim 10$ 、优选为1、2或3、

[0121] 更优选为1或2 $\cdots (11)$

[0122] $X = Xc \cdots (5)$

[0123] 上述区域(X)和/或上述区域(Xc)包含上述表达抑制序列的情况下,上述区域例如可以为仅由上述表达抑制序列构成的区域,也可以为包含上述表达抑制序列的区域。上述表达抑制序列的碱基数例如为19~30碱基、优选为19、20或21碱基。包含上述表达抑制序列的区域例如可以在上述表达抑制序列的5'侧和/或3'侧进一步具有附加序列。上述附加序列的碱基数例如为1~31碱基、优选为1~21碱基、更优选为1~11碱基。

[0124] 上述区域(X)的碱基数没有特别限制。上述区域(X)包含上述表达抑制序列的情况下,其下限例如为19碱基。其上限例如为50碱基、优选为30碱基、更优选为25碱基。上述区域(X)的碱基数的具体例例如为19碱基~50碱基、优选为19碱基~30碱基、更优选为19碱基~25碱基。

[0125] 上述区域(Xc)的碱基数没有特别限制。其下限例如为19碱基、优选为20碱基、更优

选为21碱基。其上限例如为50碱基、更优选为40碱基、进一步优选为30碱基。

[0126] 上述ssPN分子中,上述连接子区域(L_x)的长度没有特别限制。上述连接子区域(L_x)例如优选为上述区域(X)和上述区域(X_c)能够形成双链的长度。上述连接子区域(L_x)除了上述非核苷酸残基之外还包含上述核苷酸残基的情况下,上述连接子区域(L_x)的碱基数的下限例如为1碱基、优选为2碱基、更优选为3碱基,其上限例如为100碱基、优选为80碱基、更优选为50碱基。

[0127] 上述第一ssPN分子的全长没有特别限制。上述第一ssPN分子中,上述碱基数的合计(全长的碱基数)的下限例如为38碱基、优选为42碱基、更优选为50碱基、进一步优选为51碱基、特别优选为52碱基,其上限例如为300碱基、优选为200碱基、更优选为150碱基、进一步优选为100碱基、特别优选为80碱基。上述第一ssPN分子中,除上述连接子区域(L_x)以外的碱基数的合计的下限例如为38碱基、优选为42碱基、更优选为50碱基、进一步优选为51碱基、特别优选为52碱基,上限例如为300碱基、优选为200碱基、更优选为150碱基、进一步优选为100碱基、特别优选为80碱基。

[0128] (2)第二ssPN分子

[0129] 上述第二ssPN分子例如为除了上述区域(X)、上述连接子区域(L_x)和上述区域(X_c)以外还具有区域(Y)和与上述区域(Y)互补的区域(Y_c)的分子。上述第二ssPN分子中,上述区域(X)和上述区域(Y)连结而形成了内部区域(Z)。需要说明的是,只要没有特别表示,则上述第二ssPN分子能够援引上述第一ssPN分子的记载。

[0130] 上述第二ssPN分子例如可以从5'侧至3'侧依次具有上述区域(X_c)、上述连接子区域(L_x)、上述区域(X)、上述区域(Y)和上述区域(Y_c)。该情况下,将上述区域(X_c)也称为5'侧区域(X_c),将上述内部区域(Z)中的上述区域(X)也称为内部5'侧区域(X),将上述内部区域(Z)中的上述区域(Y)也称为内部3'区域(Y),将上述区域(Y_c)也称为3'侧区域(Y_c)。另外,上述第二ssPN分子例如也可以从3'侧至5'侧依次具有上述区域(X_c)、上述连接子区域(L_x)、上述区域(X)、上述区域(Y)和上述区域(Y_c)。该情况下,将上述区域(X_c)也称为3'侧区域(X_c),将上述内部区域(Z)中的上述区域(X)也称为内部3'侧区域(X),将上述内部区域(Z)中的上述区域(Y)也称为内部5'区域(Y),将上述区域(Y_c)也称为5'侧区域(Y_c)。

[0131] 如上所述,上述内部区域(Z)例如由上述区域(X)和上述区域(Y)连结而成。上述区域(X)和上述区域(Y)例如可以直接连结,其间不具有间插序列。为了表示上述内部区域(Z)与上述区域(X_c)和上述区域(Y_c)的序列关系,上述内部区域(Z)定义为“上述区域(X)和上述区域(Y)连结而构成”,上述内部区域(Z)中,上述区域(X)和上述区域(Y)在上述ssPN分子的使用中不限于各自独立的区域。即,例如,上述内部区域(Z)具有上述表达抑制序列的情况下,上述内部区域(Z)中,可以跨越上述区域(X)和上述区域(Y)而配置上述表达抑制序列。

[0132] 上述第二ssPN分子中,上述区域(X_c)与上述区域(X)互补。此处,上述区域(X_c)只要具有与上述区域(X)的全部区域或其部分区域互补的序列即可,优选包含与上述区域(X)的全部区域或其部分区域互补的序列,或者由上述互补的序列构成。上述区域(X_c)与上述区域(X)的互补的上述全部区域或互补的上述部分区域例如可以完全互补,也可以1碱基或数碱基非互补,但优选完全互补。上述1碱基或数碱基例如为1~3碱基、优选为1碱基或2碱基。

[0133] 上述第二ssPN分子中,上述区域(Yc)与上述区域(Y)互补。此处,上述区域(Yc)只要具有与上述区域(Y)的全部区域或其部分区域互补的序列即可,优选包含与上述区域(Y)的全部区域或其部分区域互补的序列,或者由上述互补的序列构成。上述区域(Yc)与上述区域(Y)的互补的上述全部区域或互补的上述部分区域例如可以完全互补,也可以1碱基或数碱基非互补,但优选完全互补。上述1碱基或数碱基例如为1~3碱基、优选为1碱基或2碱基。

[0134] 上述第二ssPN分子中,上述表达抑制序列例如包含在由上述区域(X)和上述区域(Y)形成的上述内部区域(Z)以及上述区域(Xc)的至少一者中,此外,还可以包含在上述区域(Yc)中。上述内部区域(Z)具有上述表达抑制序列的情况下,例如,可以是上述区域(X)和上述区域(Y)中的任意一者具有上述表达抑制序列,另外,也可以是跨越上述区域(X)和上述区域(Y)地具有上述表达抑制序列。上述第二ssPN分子例如可以具有1个上述表达抑制序列,也可以具有2个以上的上述表达抑制序列。

[0135] 上述第二ssPN分子具有2个以上的上述表达抑制序列的情况下,各表达抑制序列的配置部位没有特别限制,可以为上述内部区域(Z)和上述区域(Xc)中的任意一者,也可以为上述内部区域(Z)和上述区域(Xc)中的任意一者以及其他不同的区域。

[0136] 上述第二ssPN分子中,上述区域(Yc)和上述区域(Y)例如可以直接连结,也可以间接连结。为前者的情况下,直接连结可以举出例如基于磷酸二酯键的连结等。为后者的情况下,例如,可以举出以下形态:在上述区域(Yc)与上述区域(Y)之间具有连接子区域(Ly),介由上述连接子区域(Ly)连结了上述区域(Yc)和上述区域(Y);等等。

[0137] 上述第二ssPN分子具有上述连接子区域(Ly)的情况下,上述连接子区域(Ly)例如可以为由上述核苷酸残基构成的连接子,也可以为前述的具有包含吡咯烷骨架和哌啶骨架中的至少一者的非核苷酸结构的连接子。为后者的情况下,上述连接子区域(Ly)例如能够由上述式(I)表示,能够援引上述连接子区域(Lx)中的上述式(I)的全部说明。

[0138] 上述区域(Yc)和上述区域(Y)例如分别介由-OR¹-或-OR²-与上述连接子区域(Ly)结合。此处,R¹和R²与前述的连接子区域(Lx)同样地可以存在,也可以不存在。

[0139] 上述区域(Xc)和上述区域(X)与上述-OR¹-和-OR²-的结合的组合、以及上述区域(Yc)和上述(Y)与上述-OR¹-和-OR²-的结合的组合没有特别限制,例如,可以举出以下的任意一个条件。

[0140] 条件(1)

[0141] 上述区域(Xc)介由-OR²-与上述式(I)的结构结合,上述区域(X)介由-OR¹-与上述式(I)的结构结合,

[0142] 上述区域(Yc)介由-OR¹-与上述式(I)的结构结合,上述区域(Y)介由-OR²-与上述式(I)的结构结合。

[0143] 条件(2)

[0144] 上述区域(Xc)介由-OR²-与上述式(I)的结构结合,上述区域(X)介由-OR¹-与上述式(I)的结构结合,

[0145] 上述区域(Yc)介由-OR²-与上述式(I)的结构结合,上述区域(Y)介由-OR¹-与上述式(I)的结构结合。

[0146] 条件(3)

[0147] 上述区域(Xc)介由-OR¹-与上述式(I)的结构结合,上述区域(X)介由-OR²-与上述式(I)的结构结合,

[0148] 上述区域(Yc)介由-OR¹-与上述式(I)的结构结合,上述区域(Y)介由-OR²-与上述式(I)的结构结合。

[0149] 条件(4)

[0150] 上述区域(Xc)介由-OR¹-与上述式(I)的结构结合,上述区域(X)介由-OR²-与上述式(I)的结构结合,

[0151] 上述区域(Yc)介由-OR²-与上述式(I)的结构结合,上述区域(Y)介由-OR¹-与上述式(I)的结构结合。

[0152] 关于上述第二ssPN分子,将具有上述连接子区域(Ly)的ssPN分子的一例示于图2的示意图。图2的(A)为作为一例示出上述ssPN分子从5'侧向3'侧的各区域的顺序的概要的示意图,图2的(B)为示出上述ssPN分子在上述分子内形成了双链的状态的示意图。如图2的(B)所示,上述ssPN分子在上述区域(Xc)与上述区域(X)之间、在上述区域(Y)与上述区域(Yc)之间形成双链,上述Lx区域和上述Ly区域根据其长度而形成环结构。图2仅为示出各区域的连结顺序和形成双链的各区域的位置关系的图,例如,各区域的长度、连接子区域的形状等不限于此。另外,图2将上述区域(Xc)示于5'侧,但不限于此,上述区域(Xc)也可以位于3'侧。

[0153] 上述第二ssPN分子中,上述区域(Xc)、上述区域(X)、上述区域(Y)和上述区域(Yc)的碱基数没有特别限制。以下例示各区域的长度,但本发明不限于此。

[0154] 如上所述,上述区域(Xc)例如可以与上述区域(X)的全部区域互补。该情况下,优选上述区域(Xc)例如与上述区域(X)为相同碱基长,由与上述区域(X)的全部区域互补的碱基序列构成。上述区域(Xc)更优选与上述区域(X)为相同碱基长,并且上述区域(Xc)的全部碱基与上述区域(X)的全部碱基互补,即,例如完全互补。需要说明的是,并不限于此,例如,如上所述,可以1碱基或数碱基非互补。

[0155] 另外,如上所述,上述区域(Xc)例如可以与上述区域(X)的部分区域互补。该情况下,优选上述区域(Xc)例如与上述区域(X)的部分区域为相同碱基长,即,由比上述区域(X)短1碱基以上的碱基长的碱基序列构成。上述区域(Xc)更优选与上述区域(X)的上述部分区域为相同碱基长,并且上述区域(Xc)的全部碱基与上述区域(X)的上述部分区域的全部碱基互补,即,例如完全互补。上述区域(X)的上述部分区域例如优选为由上述区域(X)中的从上述区域(Xc)侧的末端的碱基(第1位的碱基)连续的碱基序列构成的区域。

[0156] 如上所述,上述区域(Yc)例如可以与上述区域(Y)的全部区域互补。该情况下,优选上述区域(Yc)例如与上述区域(Y)为相同碱基长,由与上述区域(Y)的全部区域互补的碱基序列构成。上述区域(Yc)更优选与上述区域(Y)为相同碱基长,并且上述区域(Yc)的全部碱基与上述区域(Y)的全部碱基互补,即,例如完全互补。需要说明的是,并不限于此,例如,如上所述,可以1碱基或数碱基非互补。

[0157] 另外,如上所述,上述区域(Yc)例如可以与上述区域(Y)的部分区域互补。该情况下,优选上述区域(Yc)例如与上述区域(Y)的部分区域为相同碱基长,即,由比上述区域(Y)短1碱基以上的碱基长的碱基序列构成。上述区域(Yc)更优选与上述区域(Y)的上述部分区域为相同碱基长,并且上述区域(Yc)的全部碱基与上述区域(Y)的上述部分区域的全部碱

基互补,即,例如完全互补。上述区域(Y)的上述部分区域例如优选为由上述区域(Y)中的从上述区域(Yc)侧的末端的碱基(第1位的碱基)连续的碱基序列构成的区域。

[0158] 上述第二ssPN分子中,上述内部区域(Z)的碱基数(Z)与上述区域(X)的碱基数(X)和上述区域(Y)的碱基数(Y)的关系、上述内部区域(Z)的碱基数(Z)与上述区域(X)的碱基数(X)和上述区域(Xc)的碱基数(Xc)的关系例如满足下述式(1)和(2)的条件。

$$[0159] \quad Z=X+Y \cdots (1)$$

$$[0160] \quad Z \geq Xc+Yc \cdots (2)$$

[0161] 上述第二ssPN分子中,上述区域(X)的碱基数(X)与上述区域(Y)的碱基数(Y)的关系没有特别限制,例如满足下式中的任一条件。

$$[0162] \quad X=Y \cdots (19)$$

$$[0163] \quad X < Y \cdots (20)$$

$$[0164] \quad X > Y \cdots (21)$$

[0165] 第二ssPN分子中,上述区域(X)的碱基数(X)、上述区域(Xc)的碱基数(Xc)、上述区域(Y)的碱基数(Y)和上述区域(Yc)的碱基数(Yc)的关系例如满足下述(a)~(d)中的任一条件。

[0166] (a)满足下述式(3)和(4)的条件。

$$[0167] \quad X > Xc \cdots (3)$$

$$[0168] \quad Y = Yc \cdots (4)$$

[0169] (b)满足下述式(5)和(6)的条件。

$$[0170] \quad X = Xc \cdots (5)$$

$$[0171] \quad Y > Yc \cdots (6)$$

[0172] (c)满足下述式(7)和(8)的条件。

$$[0173] \quad X > Xc \cdots (7)$$

$$[0174] \quad Y > Yc \cdots (8)$$

[0175] (d)满足下述式(9)和(10)的条件。

$$[0176] \quad X = Xc \cdots (9)$$

$$[0177] \quad Y = Yc \cdots (10)$$

[0178] 上述(a)~(d)中,上述区域(X)的碱基数(X)与上述区域(Xc)的碱基数(Xc)之差、上述区域(Y)的碱基数(Y)与上述区域(Yc)的碱基数(Yc)之差例如优选满足下述条件。

[0179] (a)满足下述式(11)和(12)的条件。

$$[0180] \quad X-Xc=1 \sim 10, \text{ 优选为 } 1, 2, 3 \text{ 或 } 4,$$

$$[0181] \quad \text{更优选为 } 1, 2 \text{ 或 } 3 \cdots (11)$$

$$[0182] \quad Y-Yc=0 \cdots (12)$$

[0183] (b)满足下述式(13)和(14)的条件。

$$[0184] \quad X-Xc=0 \cdots (13)$$

$$[0185] \quad Y-Yc=1 \sim 10, \text{ 优选为 } 1, 2, 3 \text{ 或 } 4,$$

$$[0186] \quad \text{更优选为 } 1, 2 \text{ 或 } 3 \cdots (14)$$

[0187] (c)满足下述式(15)和(16)的条件。

$$[0188] \quad X-Xc=1 \sim 10, \text{ 优选为 } 1, 2 \text{ 或 } 3,$$

[0189] 更优选为1或2... (15)

[0190] $Y-Y_c=1\sim 10$, 优选为1、2或3,

[0191] 更优选为1或2... (16)

[0192] (d)满足下述式(17)和(18)的条件。

[0193] $X-X_c=0\cdots (17)$

[0194] $Y-Y_c=0\cdots (18)$

[0195] 关于上述(a)~(d)的第二ssPN分子,将各结构的一例示于图3的示意图。图3是包含上述连接子区域(Lx)和上述连接子区域(Ly)的ssPN,(A)是上述(a)的ssPN分子的例子,(B)是上述(b)的ssPN分子的例子,(C)是上述(c)的ssPN分子的例子,(D)是上述(d)的ssPN分子的例子。图3中,虚线表示通过自退火而形成了双链的状态。图3的ssPN分子将上述区域(X)的碱基数(X)和上述区域(Y)的碱基数(Y)表示为上述式(20)的“ $X<Y$ ”,但不限于此,如上所述,可以为上述式(19)的“ $X=Y$ ”,也可以为上述式(21)的“ $X>Y$ ”。另外,图3仅为示出上述区域(X)与上述区域(Xc)的关系、上述区域(Y)与上述区域(Yc)的关系的示意图,例如,各区域的长度、形状、有无连接子区域(Ly)等不限于此。

[0196] 上述(a)~(c)的ssPN分子例如为:通过上述区域(Xc)和上述区域(X)、以及上述区域(Yc)和上述区域(Y)分别形成双链,在上述内部区域(Z)中具有与上述区域(Xc)和上述区域(Yc)均不匹配的碱基的结构,也称为具有不形成双链的碱基的结构。以下,也将上述内部区域(Z)中的上述不匹配的碱基(也称为不形成双链的碱基)称为“自由碱基”。图3中,用“F”表示上述自由碱基的区域。上述区域(F)的碱基数没有特别限制。关于上述区域(F)的碱基数(F),例如,在上述(a)的ssPN分子的情况下,为“ $X-X_c$ ”的碱基数;在上述(b)的ssPN分子的情况下,为“ $Y-Y_c$ ”的碱基数;在上述(c)的ssPN分子的情况下,为“ $X-X_c$ ”的碱基数与“ $Y-Y_c$ ”的碱基数的总数。

[0197] 另一方面,上述(d)的ssPN分子例如为上述内部区域(Z)的全部区域与上述区域(Xc)和上述区域(Yc)匹配的结构,也可称为上述内部区域(Z)的全部区域形成双链的结构。需要说明的是,上述(d)的ssPN分子中,上述区域(Xc)的5'末端与上述区域(Yc)的3'末端为未连结。

[0198] 上述区域(Xc)、上述区域(Yc)和上述内部区域(Z)中的上述自由碱基(F)的碱基数的合计为上述内部区域(Z)的碱基数。因此,上述区域(Xc)和上述区域(Yc)的长度例如可以根据上述内部区域(Z)的长度、上述自由碱基的数量及其位置而适宜决定。

[0199] 上述内部区域(Z)的碱基数例如为19碱基以上。上述碱基数的下限例如为19碱基、优选为20碱基、更优选为21碱基。上述碱基数的上限例如为50碱基、优选为40碱基、更优选为30碱基。上述内部区域(Z)的碱基数的具体例例如为19碱基、20碱基、21碱基、22碱基、23碱基、24碱基、25碱基、26碱基、27碱基、28碱基、29碱基或30碱基。上述内部区域(Z)具有上述表达抑制序列的情况下,例如,优选为该条件。

[0200] 上述内部区域(Z)包含上述表达抑制序列的情况下,上述内部区域(Z)例如可以为仅由上述表达抑制序列构成的区域,也可以为包含上述表达抑制序列的区域。上述表达抑制序列的碱基数例如为19~30碱基、优选为19、20或21碱基。上述内部区域(Z)包含上述表达抑制序列的情况下,在上述表达抑制序列的5'侧和/或3'侧还可以具有附加序列。上述附加序列的碱基数例如为1~31碱基、优选为1~21碱基、更优选为1~11碱基、进一步优选为1

~7碱基。

[0201] 上述区域(Xc)的碱基数例如为1~29碱基、优选为1~11碱基、优选为1~7碱基、更优选为1~4碱基、进一步优选为1碱基、2碱基、3碱基。上述内部区域(Z)或上述区域(Yc)包含上述表达抑制序列的情况下,例如,优选为这样的碱基数。作为具体例,在上述内部区域(Z)的碱基数为19~30碱基(例如,19碱基)的情况下,上述区域(Xc)的碱基数例如为1~11碱基、优选为1~7碱基、更优选为1~4碱基、进一步优选为1碱基、2碱基、3碱基。

[0202] 上述区域(Xc)包含上述表达抑制序列的情况下,上述区域(Xc)例如可以为仅由上述表达抑制序列构成的区域,也可以为包含上述表达抑制序列的区域。上述表达抑制序列的长度例如如前所述。上述区域(Xc)包含上述表达抑制序列的情况下,在上述表达抑制序列的5'侧和/或3'侧还可以具有附加序列。上述附加序列的碱基数例如为1~11碱基、优选为1~7碱基。

[0203] 上述区域(Yc)的碱基数例如为1~29碱基、优选为1~11碱基、优选为1~7碱基、更优选为1~4碱基、进一步优选为1碱基、2碱基、3碱基。上述内部区域(Z)或上述区域(Xc)包含上述表达抑制序列的情况下,例如,优选为这样的碱基数。作为具体例,在上述内部区域(Z)的碱基数为19~30碱基(例如,19碱基)的情况下,上述区域(Yc)的碱基数例如为1~11碱基、优选为1~7碱基、更优选为1碱基、2碱基、3碱基或4碱基、进一步优选为1碱基、2碱基、3碱基。

[0204] 上述区域(Yc)包含上述表达抑制序列的情况下,上述区域(Yc)例如可以为仅由上述表达抑制序列构成的区域,还可以为包含上述表达抑制序列的区域。上述表达抑制序列的长度例如如前所述。上述区域(Yc)包含上述表达抑制序列的情况下,在上述表达抑制序列的5'侧和/或3'侧还可以具有附加序列。上述附加序列的碱基数例如为1~11碱基、优选为1~7碱基。

[0205] 如上所述,上述内部区域(Z)、上述区域(Xc)和上述区域(Yc)的碱基数例如能够以式(2)的“ $Z \geq Xc + Yc$ ”表示。作为具体例,“ $Xc + Yc$ ”的碱基数例如与上述内部区域(Z)相同,或者小于上述内部区域(Z)。为后者的情况下,“ $Z - (Xc + Yc)$ ”例如为1~10、优选为1~4、更优选为1、2或3。上述“ $Z - (Xc + Yc)$ ”例如相当于上述内部区域(Z)中的自由区域(F)的碱基数(F)。

[0206] 上述第二ssPN分子中,上述连接子区域(Lx)和上述连接子区域(Ly)的长度没有特别限制。上述连接子区域(Lx)如前所述。上述连接子区域(Ly)的构成单元包含碱基的情况下,上述连接子区域(Ly)的碱基数的下限例如为1碱基、优选为2碱基、更优选为3碱基,其上限例如为100碱基、优选为80碱基、更优选为50碱基。关于上述各连接子区域的碱基数,作为具体例,可以例示出例如1~50碱基、1~30碱基、1~20碱基、1~10碱基、1~7碱基、1~4碱基等,但不限于此。

[0207] 上述连接子区域(Ly)例如可以与上述连接子区域(Lx)相同,也可以不同。

[0208] 上述第二ssPN分子的全长没有特别限制。上述第二ssPN分子中,上述碱基数的合计(全长的碱基数)的下限例如为38碱基、优选为42碱基、更优选为50碱基、进一步优选为51碱基、特别优选为52碱基,其上限例如为300碱基、优选为200碱基、更优选为150碱基、进一步优选为100碱基、特别优选为80碱基。上述第二ssPN分子中,除上述连接子区域(Lx)和连接子区域(Ly)以外的碱基数的合计的下限例如为38碱基、优选为42碱基、更优选为50碱基、

进一步优选为51碱基、特别优选为52碱基,上限例如为300碱基、优选为200碱基、更优选为150碱基、进一步优选为100碱基、特别优选为80碱基。

[0209] 如上所述,本发明的ssPN分子只要上述连接子区域(Lx)具有上述非核苷酸结构即可,其他构成单元没有特别限制。上述构成单元可以举出例如核苷酸残基等。上述核苷酸残基可以举出例如核糖核苷酸残基和脱氧核糖核苷酸残基等。上述核苷酸残基可以举出例如未经修饰的非修饰核苷酸残基和经修饰的修饰核苷酸残基等。本发明的ssPN分子例如通过包含上述修饰核苷酸残基,能够提高核酸酶耐受性,能够提高稳定性。另外,本发明的ssPN分子除了例如上述核苷酸残基之外,还可以包含非核苷酸残基。

[0210] 上述区域(Xc)、上述区域(X)、上述区域(Y)和上述区域(Yc)的构成单元分别优选为上述核苷酸残基。上述各区域例如由下述(1)~(3)的残基构成。

[0211] (1)非修饰核苷酸残基

[0212] (2)修饰核苷酸残基

[0213] (3)非修饰核苷酸残基和修饰核苷酸残基

[0214] 上述连接子区域(Lx)例如可以仅由上述非核苷酸残基构成,也可以由上述非核苷酸和上述核苷酸残基构成。上述连接子区域(Lx)例如由下述(4)~(7)的残基构成。

[0215] (4)非核苷酸残基

[0216] (5)非核苷酸残基和非修饰核苷酸残基

[0217] (6)非核苷酸残基和修饰核苷酸残基

[0218] (7)非核苷酸残基、非修饰核苷酸残基和修饰核苷酸残基

[0219] 上述连接子区域(Ly)的构成单元没有特别限制,例如,如上所述,可以举出上述核苷酸残基和上述非核苷酸残基等。上述连接子区域例如可以仅由上述核苷酸残基构成,也可以仅由上述非核苷酸残基构成,还可以由上述核苷酸残基和上述非核苷酸残基构成。上述连接子区域例如由下述(1)~(7)的残基构成。

[0220] (1)非修饰核苷酸残基

[0221] (2)修饰核苷酸残基

[0222] (3)非修饰核苷酸残基和修饰核苷酸残基

[0223] (4)非核苷酸残基

[0224] (5)非核苷酸残基和非修饰核苷酸残基

[0225] (6)非核苷酸残基和修饰核苷酸残基

[0226] (7)非核苷酸残基、非修饰核苷酸残基和修饰核苷酸残基

[0227] 本发明的ssPN分子可以举出例如除上述连接子区域(Lx)以外仅由上述核苷酸残基构成的分子、除上述核苷酸残基以外还包含上述非核苷酸残基的分子等。本发明的ssPN分子中,如上所述,上述核苷酸残基例如可以仅为上述非修饰核苷酸残基,也可以仅为上述修饰核苷酸残基,还可以为上述非修饰核苷酸残基和上述修饰核苷酸残基两者。上述ssPN分子包含上述非修饰核苷酸残基和上述修饰核苷酸残基的情况下,上述修饰核苷酸残基的个数没有特别限制,例如为“1个或数个”,具体而言,例如为1~5个、优选为1~4个、更优选为1~3个、最优选为1个或2个。本发明的ssPN分子包含上述非核苷酸残基的情况下,上述非核苷酸残基的个数没有特别限制,例如为“1个或数个”,具体而言,例如为1个或2个。

[0228] 本发明的ssPN分子中,上述核苷酸残基例如优选为核糖核苷酸残基。该情况下,本

发明的ssPN分子例如也称为“ssRNA分子”或“P-ssRNA分子”。上述ssRNA分子可以举出例如除上述连接子区域(Lx)以外仅由上述核糖核苷酸残基构成的分子、除上述核糖核苷酸残基以外还包含上述非核苷酸残基的分子等。上述ssRNA分子中,如上所述,上述核糖核苷酸残基例如可以仅为上述非修饰核糖核苷酸残基,也可以仅为上述修饰核糖核苷酸残基,还可以包含上述非修饰核糖核苷酸残基和上述修饰核糖核苷酸残基两者。

[0229] 上述ssRNA分子例如在除上述非修饰核糖核苷酸残基以外还包含上述修饰核糖核苷酸残基的情况下,上述修饰核糖核苷酸残基的个数没有特别限制,例如为“1个或数个”,具体而言,例如为1~5个、优选为1~4个、更优选为1~3个、最优选为1个或2个。与上述非修饰核糖核苷酸残基相对的上述修饰核糖核苷酸残基可以举出例如核糖残基被脱氧核糖残基取代了的上述脱氧核糖核苷酸残基等。上述ssRNA分子例如在除上述非修饰核糖核苷酸残基以外还包含上述脱氧核糖核苷酸残基的情况下,上述脱氧核糖核苷酸残基的个数没有特别限制,例如为“1个或数个”,具体而言,例如为1~5个、优选为1~4个、更优选为1~3个、最优选为1个或2个。

[0230] 本发明的ssPN分子例如包含标记物质,可以被上述标记物质标记化。上述标记物质没有特别限制,可以举出例如荧光物质、色素、同位素等。上述标记物质可以举出例如苾、TAMRA、荧光素、Cy3色素、Cy5色素等荧光团,上述色素可以举出例如Alexa488等Alexa色素等。上述同位素可以举出例如稳定同位素和放射性同位素,优选为稳定同位素。上述稳定同位素例如由于暴露的危险性少、也不需要专用的设施,因而操作性优异,另外还能够降低成本。另外,上述稳定同位素例如不存在标记的化合物的物性变化,作为示踪物的性质也优异。上述稳定同位素没有特别限制,可以举出例如²H、¹³C、¹⁵N、¹⁷O、¹⁸O、³³S、³⁴S和³⁶S等。

[0231] 如上所述,本发明的ssPN分子例如优选在上述非核苷酸结构中导入上述标记物质,优选在上述连接子区域(Lx)的上述非核苷酸残基中导入上述标记物质。上述非核苷酸残基中的标记物质的导入例如能够简便且廉价地进行。

[0232] 如上所述,本发明的ssPN分子能够抑制上述靶基因的表达。因此,本发明的ssPN分子例如能够用作基因成为原因的疾病的治疗剂。作为上述表达抑制序列,只要是包含抑制成为上述疾病的原因的基因的表达的序列的上述ssPN分子,例如,通过抑制上述靶基因的表达,即能够治疗上述疾病。本发明中,“治疗”包含例如上述疾病的预防、疾病的改善、预后的改善的含义,可以为任意一种。

[0233] 本发明的ssPN分子的使用方法没有特别限制,例如,对具有上述靶基因的投与对象投与上述ssPN分子即可。

[0234] 上述投与对象可以举出例如细胞、组织或器官等。上述投与对象可以举出例如人、除人以外的非人哺乳类等非人动物等。上述投与例如可以为体内,也可以为体外。上述细胞没有特别限制,可以举出例如HeLa细胞、293细胞、NIH3T3细胞、COS细胞等各种培养细胞、ES细胞、造血干细胞等干细胞、初代培养细胞等由生物体分离的细胞等。

[0235] 本发明中,作为表达抑制的对象上述靶基因没有特别限制,能够设定期望基因,根据上述基因适宜设计上述表达抑制序列即可。

[0236] 以下示出本发明的ssPN分子的具体例,但本发明不受其任何限制。上述ssPN分子的碱基序列可以例示出例如序列号3、11、14~17和23的碱基序列,另外,也可以为上述碱基序列中例如缺失、被取代和/或附加1个或数个的碱基序列。上述靶基因为GAPDH基因的情况

下,可以举出例如序列号3和11的碱基序列,靶基因为TGF- β 1的情况下,可以举出例如序列号14~17和23的碱基序列。

[0237] 关于本发明的ssPN分子的使用,能够援引后述的本发明的组合物、表达抑制方法和治疗方法等的记载。

[0238] 如上所述,本发明的ssPN分子能够抑制靶基因表达,因此作为例如医药品、诊断药和农药、以及农药、医学、生命科学等的研究工具有用。

[0239] 本发明中,“烷基”例如包含直链状或支链状的烷基。上述烷基的碳原子数没有特别限制,例如,为1~30、优选为1~6或1~4。上述烷基可以举出例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、异己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基等。优选可以举出例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、异己基等。

[0240] 本发明中,“烯基”例如包含直链状或支链状的烯基。上述烯基可以举出上述烷基中具有1个或多个双键的烯基等。上述烯基的碳原子数没有特别限制,例如,与上述烷基相同,优选为2~8。上述烯基可以举出例如乙烯基、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。

[0241] 本发明中,“炔基”例如包含直链状或支链状的炔基。上述炔基可以举出上述烷基中具有1个或多个三键的炔基等。上述炔基的碳原子数没有特别限制,例如,与上述烷基相同,优选为2~8。上述炔基可以举出例如乙炔基、丙炔基、丁炔基等。上述炔基例如还可以具有1个或多个双键。

[0242] 本发明中,“芳基”例如包含单环芳香族烃基和多环芳香族烃基。上述单环芳香族烃基可以举出例如苯基等。上述多环芳香族烃基可以举出例如1-萘基、2-萘基、1-蒎基、2-蒎基、9-蒎基、1-菲基、2-菲基、3-菲基、4-菲基、9-菲基等。优选可以举出例如苯基、1-萘基和2-萘基等萘基等。

[0243] 本发明中,“杂芳基”例如包含单环芳香族杂环式基团和稠合芳香族杂环式基团。上述杂芳基可以举出例如呋喃基(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)、异噁唑基(例如:3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基)、噻唑基(例如:2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基)、噻二唑基、异噻唑基(例如:3-异噻唑基、4-异噻唑基、5-异噻唑基)、吡啶基(例如:2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基)、哒嗪基(例如:3-哒嗪基、4-哒嗪基)、嘧啶基(例如:2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基)、咪唑基(例如:3-咪唑基)、吡嗪基(例如:2-吡嗪基)、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、3-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)、噌啉基(例如:3-噌啉基、4-噌啉基、5-噌啉基、6-噌啉基、7-噌啉基、8-噌啉基)、喹唑啉基(例如:2-喹

唑啉基、4-唑啉基、5-唑啉基、6-唑啉基、7-唑啉基、8-唑啉基)、唑啉基(例如:2-唑啉基、3-唑啉基、4-唑啉基、5-唑啉基、6-唑啉基、7-唑啉基、8-唑啉基)、酞嗪基(例如:1-酞嗪基、5-酞嗪基、6-酞嗪基)、异唑啉基(例如:1-异唑啉基、3-异唑啉基、4-异唑啉基、5-异唑啉基、6-异唑啉基、7-异唑啉基、8-异唑啉基)、嘌呤基、喋啶基(例如:2-喋啶基、4-喋啶基、6-喋啶基、7-喋啶基)、咪唑基、菲啶基、吡啶基(例如:1-吡啶基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、9-吡啶基)、吡啶基(例如:1-吡啶基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、7-吡啶基)、异吡啶基、吩嗪基(例如:1-吩嗪基、2-吩嗪基)或吩噻嗪基(例如:1-吩噻嗪基、2-吩噻嗪基、3-吩噻嗪基、4-吩噻嗪基)等。

[0244] 本发明中,“环烷基”例如为环状饱和烃基,碳原子数例如为3~15。上述环烷基可以举出例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、桥环式烃基、螺环烃基等,优选可以举出环丙基、环丁基、环戊基、环己基、桥环式烃基等。

[0245] 本发明中,“桥环式烃基”可以举出例如双环[2.1.0]戊基、双环[2.2.1]庚基、双环[2.2.2]辛基和双环[3.2.1]辛基、三环[2.2.1.0]庚基、双环[3.3.1]壬基、1-金刚烷基、2-金刚烷基等。

[0246] 本发明中,“螺环烃基”可以举出例如螺环[3.4]辛基等。

[0247] 本发明中,“环烯基”例如包含环状的不饱和脂肪族烃基,碳原子数例如为3~7个。上述基团可以举出例如环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基等,优选为环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基等。上述环烯基例如还包含在环中具有不饱和键的桥环式烃基和螺环烃基。

[0248] 本发明中,“芳烷基”可以举出例如苄基、2-苯乙基和萘基甲基等,“环烷基烷基”或“环基烷基”可以举出例如环己基甲基、金刚烷基甲基等,“羟基烷基”可以举出例如羟甲基和2-羟乙基等。

[0249] 本发明中,“烷氧基”例如包含上述烷基-O-基,可以举出例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基和正丁氧基等,“烷氧基烷基”可以举出例如甲氧基甲基等,“氨基烷基”可以举出例如2-氨基乙基等。

[0250] 本发明中,“杂环基”可以举出例如1-吡咯啉基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、1-吡咯烷基、2-吡咯烷基、3-吡咯烷基、吡咯烷酮、1-咪唑啉基、2-咪唑啉基、4-咪唑啉基、1-咪唑烷基、2-咪唑烷基、4-咪唑烷基、咪唑啉酮、1-吡唑啉基、3-吡唑啉基、4-吡唑啉基、1-吡唑烷基、3-吡唑烷基、4-吡唑烷基、哌啶酮、哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-哌啶基、1-哌嗪基、2-哌嗪基、哌嗪酮、2-吗啉基、3-吗啉基、吗啉代、四氢吡喃基、四氢呋喃基等。

[0251] 本发明中,“杂环基烷基”可以举出例如哌啶基甲基、哌嗪基甲基等,“杂环基烯基”可以举出例如2-哌啶基乙烯基等,“杂芳烷基”可以举出例如吡啶基甲基和唑啉-3-基甲基等。

[0252] 本发明中,“甲硅烷基”包含式 R_3Si- 表示的基团,R可以独立地选自上述烷基、芳基和环烷基,可以举出例如三甲基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基等,“甲硅烷氧基”可以举出例如三甲基甲硅烷氧基等,“甲硅烷氧基烷基”可以举出例如三甲基甲硅烷氧基甲基等。

[0253] 本发明中,“亚烷基”可以举出例如亚甲基、亚乙基和亚丙基等。

[0254] 本发明中,上述各种基团可以被取代。上述取代基可以举出例如羟基、羧基、卤素、卤代烷基(例如: CF_3 、 CH_2CF_3 、 CH_2CCl_3)、硝基、亚硝基、氰基、烷基(例如:甲基、乙基、异丙基、

叔丁基)、烯基(例如:乙烯基)、炔基(例如:乙炔基)、环烷基(例如:环丙基、金刚烷基)、环烷基烷基(例如:环己基甲基、金刚烷基甲基)、环烯基(例如:环丙烯基)、芳基(例如:苯基、萘基)、芳烷基(例如:苄基、苯乙基)、杂芳基(例如:吡啶基、呋喃基)、杂芳烷基(例如:吡啶基甲基)、杂环基(例如:哌啶基)、杂环基烷基(例如:吗啉基甲基)、烷氧基(例如:甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基)、卤代烷氧基(例如:OCF₃)、烯基氧基(例如:乙烯基氧基、烯丙基氧基)、芳氧基(例如:苯氧基)、烷氧基羰基(例如:甲氧基羰基、乙氧基羰基、叔丁氧基羰基)、芳烷氧基(例如:苄氧基)、氨基[烷基氨基(例如:甲氨基、乙氨基、二甲氨基)、酰基氨基(例如:乙酰基氨基、苯甲酰基氨基)、芳烷基氨基(例如:苄基氨基、三苯甲基氨基)、羟基氨基]、烷基氨基烷基(例如:二乙氨基甲基)、氨磺酰基、氧代基等。

[0255] 2. 核苷酸残基

[0256] 上述核苷酸残基例如包含糖、碱基和磷酸作为构成要素。如上所述,上述核苷酸残基可以举出例如核糖核苷酸残基和脱氧核糖核苷酸残基等。上述核糖核苷酸残基例如具有核糖残基作为糖,具有腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和U(尿嘧啶)作为碱基,上述脱氧核糖残基例如具有脱氧核糖残基作为糖,具有腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)作为碱基。

[0257] 上述核苷酸残基可以举出未修饰核苷酸残基和修饰核苷酸残基等。上述未修饰核苷酸残基中,上述各构成要素例如与天然存在的构成要素相同或实质上相同,优选与人体中天然存在的构成要素相同或实质上相同。

[0258] 上述修饰核苷酸残基例如为对上述未修饰核苷酸残基进行了修饰的核苷酸残基。上述修饰核苷酸例如可以对上述未修饰核苷酸残基的构成要素的任意一者进行了修饰。本发明中,“修饰”例如为上述构成要素的取代、附加和/或缺失;上述构成要素中的原子和/或官能团的取代、附加和/或缺失,能够称为“改变”。上述修饰核苷酸残基可以举出例如天然存在的核苷酸残基、人工修饰的核苷酸残基等。上述天然来源的修饰核苷酸残基可以参照例如Limbach等(Limbach et al., 1994, Summary: the modified nucleosides of RNA, *Nucleic Acids Res.* 22: 2183~2196)。另外,上述修饰核苷酸残基例如可以为上述核苷酸的代替物的残基。

[0259] 上述核苷酸残基的修饰可以举出例如核糖-磷酸骨架(以下,核糖磷酸骨架)的修饰等。

[0260] 上述核糖磷酸骨架中,例如,能够修饰核糖残基。上述核糖残基例如能够修饰2'位碳,具体而言,例如,能够将2'位碳上键合的羟基取代为氢或氟等。通过将上述2'位碳的羟基取代为氢,能够将核糖残基取代为脱氧核糖。上述核糖残基例如能够取代为立体异构体,例如,可以取代为阿拉伯糖残基。

[0261] 上述核糖磷酸骨架例如可以取代为具有非核糖残基和/或非磷酸的非核糖磷酸骨架。上述非核糖磷酸骨架可以举出例如上述核糖磷酸骨架的非带电体等。被取代为上述非核糖磷酸骨架的上述核苷酸的代替物可以举出例如吗啉代、环丁基、吡咯烷等。除此之外,上述代替物可以举出例如人工核酸单体残基等。作为具体例,可以举出例如PNA(肽核酸)、LNA(锁核酸, Locked Nucleic Acid)、ENA(2'-O, 4'-C-亚乙基桥联核酸, 2'-O, 4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acids)等,优选为PNA。

[0262] 上述核糖磷酸骨架中,例如,能够修饰磷酸基。上述核糖磷酸骨架中,与糖残基最

近的磷酸基被称为 α 磷酸基。上述 α 磷酸基带负电,其电荷均匀分布在不与糖残基键合的2个氧原子。在上述 α 磷酸基的4个氧原子之中,以下将不在核苷酸残基间的磷酸二酯键中与糖残基键合的2个氧原子称为“非键合(non-linking)氧”。另一方面,以下将在上述核苷酸残基间的磷酸二酯键中与糖残基键合的2个氧原子称为“键合(linking)氧”。上述 α 磷酸基例如优选进行成为非带电的修饰、或者上述非键合原子中的电荷分布成为非对称型的修饰。

[0263] 上述磷酸基中,例如可以取代上述非键合氧。上述氧能够用例如S(硫)、Se(硒)、B(硼)、C(碳)、H(氢)、N(氮)和OR(R例如为烷基或芳基)中的任一原子取代,优选S取代。上述非键合氧例如优选两者被取代,更优选两者用S取代。上述修饰磷酸基可以举出例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硫代硒酸酯、硼代磷酸酯、硼代磷酸酯(Borano phosphate esters)、氢磷酸酯(Hydrogen phosphonates)、氮代磷酸酯、烷基磷酸酯或芳基磷酸酯以及磷酸三酯等,其中,优选上述2个非键合氧两者均为被S取代的二硫代磷酸酯。

[0264] 上述磷酸基中,例如可以取代上述键合氧。上述氧能够用例如S(硫)、C(碳)和N(氮)中的任一原子取代。上述修饰磷酸基可以举出例如用N取代的交联磷酰胺酯、用S取代的交联硫代磷酸酯和用C取代的交联亚甲基磷酸酯等。上述键合氧的取代例如优选在本发明的ssPN分子的5'末端核苷酸残基和3'末端核苷酸残基的至少一者进行,在5'侧的情况下,优选利用C取代,在3'侧的情况下,优选利用N取代。

[0265] 上述磷酸基例如可以取代为上述非含磷的连接子。上述连接子包含例如硅氧烷、碳酸酯、羧甲基、氨基甲酸酯、酰胺、硫醚、环氧乙烷连接子、磺酸酯、磺酰胺、硫甲缩醛、甲缩醛、肟、亚甲基亚氨基、亚甲基甲基亚氨基、亚甲基胍基、亚甲基二甲基胍基和亚甲氧基甲基亚氨基等,优选包含亚甲基羰基氨基和亚甲基甲基亚氨基。

[0266] 本发明的ssPN分子例如可以3'末端和5'末端的至少一者的核苷酸残基被修饰。上述修饰例如可以是3'末端和5'末端中的任一者,也可以是两者。如上所述,上述修饰例如优选对末端的磷酸基进行。上述磷酸基例如可以修饰整体,也可以修饰上述磷酸基中的1个以上原子。在前者的情况下,例如,可以为磷酸基整体的取代,也可以为缺失。

[0267] 上述末端的核苷酸残基的修饰可以举出例如其他分子的附加等。上述其他分子可以举出例如上述那样的标记物质、保护基等功能性分子等。上述保护基可以举出例如S(硫)、Si(硅)、B(硼)、含酯基团等。上述标记物质等功能性分子例如能够用于本发明的ssPN分子的检测等。

[0268] 上述其他分子例如可以附加于上述核苷酸残基的磷酸基,也可以通过间隔臂附加于上述磷酸基或上述糖残基。上述间隔臂的末端原子例如能够附加于上述磷酸基的上述键合氧或者糖残基的O、N、S或C或进行取代。上述糖残基的键合部位例如优选为3'位的C或5'位的C、或者与它们键合的原子。上述间隔臂例如还能够附加于上述PNA等核苷酸代替物的末端原子或进行取代。

[0269] 上述间隔臂没有特别限制,可以包含例如 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{N}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{S}-$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、无碱基糖、酰胺、羧基、胺、羟基胺、羟基亚胺、硫醚、二硫醚、硫脲、磺酰胺和吗啉代等、以及生物素试剂和荧光素试剂等。上述式中,n为正整数,优选 $n=3$ 或 6 。

[0270] 除了这些之外,附加在上述末端的分子可以举出例如色素、嵌合剂(例如,吡啶)、交联剂(例如,补骨脂素、丝裂霉素C)、卟啉(TPPC4、Texaphyrin、Sapphyrin)、多环式芳香族烃(例如,吩嗪、二氢吩嗪)、人工核酸内切酶(例如,EDTA)、亲油性载体(例如,胆固醇、胆酸、

金刚烷乙酸、1-萘丁酸、二氢睾酮、1,3-双-O(十六烷基)甘油、牻牛儿醇基己基、十六烷基甘油、冰片、薄荷醇、1,3-丙二醇、十七烷基、棕榈酸、肉豆蔻酸、03-(油酰基)石胆酸、03-(油酰基)胆酸、二甲氧基三苯甲基或者吩噻嗪)和肽复合体(例如,黑腹果蝇触足肽、Tat肽)、烷基化剂、磷酸、氨基、巯基、PEG(例如,PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、聚氨基、烷基、取代烷基、放射线标记物、酶、半抗原(例如,生物素)、输送/吸收促进剂(例如,阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶(例如,咪唑、二咪唑、组胺、咪唑簇、吡啶-咪唑复合体、四氮杂大环的Eu³⁺复合体)等。

[0271] 本发明的ssPN分子的上述5'末端可以用例如磷酸基或磷酸基类似物修饰。上述磷酸基可以举出例如,5'单磷酸((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'-鸟苷帽(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)、任意的修饰或非修饰核苷酸帽结构(N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'),5'-硫代磷酸(硫代磷酸酯:(HO)₂(S)P-O-5'),5'-二硫代磷酸(二硫代磷酸酯:(HO)(HS)(S)P-O-5'),5'-硫代磷酸酯((HO)₂(O)P-S-5'),硫取代的单磷酸、二磷酸和三磷酸(例如,5'-α-硫代三磷酸、5'-γ-硫代三磷酸等)、5'-磷酰胺酯((HO)₂(O)P-NH-5'、(HO)(NH₂)(O)P-O-5'),5'-烷基磷酸(例如,RP(OH)(O)-O-5'、(OH)₂(O)P-5'-CH₂、R为烷基(例如,甲基、乙基、异丙基、丙基等))、5'-烷基醚磷酸(例如,RP(OH)(O)-O-5'、R为烷基醚(例如,甲氧基甲基、乙氧基甲基等))等。

[0272] 上述核苷酸残基中,上述碱基没有特别限制。上述碱基例如可以为天然的碱基,也可以为非天然的碱基。上述碱基例如可以为天然来源,也可以为合成品。上述碱基例如能够使用一般的碱基、其修饰类似物等。

[0273] 上述碱基可以举出例如腺嘌呤和鸟嘌呤等嘌呤碱基;胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶等嘧啶碱基等。除此之外,上述碱基还可以举出肌苷、胸腺嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、nubularine、isoguanisine、杀结核菌素(tubercidine)等。上述碱基可以举出例如2-氨基腺嘌呤、6-甲基化嘌呤等烷基衍生物;2-丙基化嘌呤等烷基衍生物;5-卤代尿嘧啶和5-卤代胞嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶;6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶和6-偶氮胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、5-卤代尿嘧啶、5-(2-氨基丙基)尿嘧啶、5-氨基烯丙基尿嘧啶;8-卤化、氨基化、硫醇化、硫代烷基化、羟基化和其他的8-取代嘌呤;5-三氟甲基化和其他的5-取代嘧啶;7-甲基鸟嘌呤;5-取代嘧啶;6-氮杂嘧啶;N-2、N-6和O-6取代嘌呤(包含2-氨基丙基腺嘌呤);5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶;二氢尿嘧啶;3-去氮-5-氮杂胞嘧啶;2-氨基嘌呤;5-烷基尿嘧啶;7-烷基鸟嘌呤;5-烷基胞嘧啶;7-去氮腺嘌呤;N₆, N₆-二甲基腺嘌呤;2,6-二氨基嘌呤;5-氨基-烯丙基-尿嘧啶;N₃-甲基尿嘧啶;取代1,2,4-三唑;2-吡啶酮;5-硝基吡啶;3-硝基吡咯;5-甲氧基尿嘧啶;尿嘧啶-5-氧基乙酸;5-甲氧基羰基甲基尿嘧啶;5-甲基-2-硫尿嘧啶;5-甲氧基羰基甲基-2-硫尿嘧啶;5-甲氨基甲基-2-硫尿嘧啶;3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿嘧啶;3-甲基胞嘧啶;5-甲基胞嘧啶;N⁴-乙酰基胞嘧啶;2-硫胞嘧啶;N₆-甲基腺嘌呤;N₆-异戊基腺嘌呤;2-甲硫基-N₆-异戊烯基腺嘌呤;N-甲基鸟嘌呤;0-烷基化碱基等。另外,嘌呤和嘧啶包含例如美国专利第3,687,808号、“Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering”、858~859页、Kroschwitz J.I. 编、John Wiley&Sons、1990、和Englisch等、Angewandte Chemie、International Edition、1991、30卷、p.613所公开的物质。

[0274] 除了这些之外,上述修饰核苷酸残基还可以包含例如缺失碱基的残基、即无碱基的核糖磷酸骨架。另外,上述修饰核苷酸残基能够使用例如美国临时申请第60/465,665号(申请日:2003年4月25日)和国际申请第PCT/US04/07070号(申请日:2004年3月8日)中记载的残基,本发明能够援引这些文献。

[0275] 3. 本发明的ssPN分子的合成方法

[0276] 本发明的ssPN分子的合成方法没有特别限制,可以采用现有公知的方法。上述合成方法可以举出例如基于基因工程学方法的合成法、化学合成法等。基因工程学方法可以举出例如体外转录合成法、使用载体的方法、基于PCR盒的方法等。上述载体没有特别限制,可以举出质粒等非病毒载体、病毒载体等。不限于此。上述化学合成法没有特别限制,可以举出例如亚磷酰胺法和H-磷酸酯法等。上述化学合成法能够使用例如市售的自动核酸合成机。上述化学合成法通常使用amidite。上述amidite没有特别限制,作为市售的amidite,可以举出例如RNA亚磷酰胺(2'-O-TBDMSi、商品名,三千里制药)、ACE amidite、TOM amidite、CEE amidite、CEM amidite、TEM amidite等。关于本发明的ssPN分子,例如,在合成上述式(I)表示的连接子区域时,优选使用后述的本发明的单体。

[0277] 4. 组合物

[0278] 如上所述,本发明的表达抑制用组合物的特征在于,其为用于抑制靶基因表达的组合物,其包含上述本发明的ssPN分子。本发明的组合物的特征在于包含上述本发明的ssPN分子,其他构成没有任何限制。本发明的表达抑制用组合物例如还能够称为表达抑制用试剂。

[0279] 根据本发明,例如,通过投与至存在上述靶基因的对象,能够进行上述靶基因的表达抑制。

[0280] 另外,如上所述,本发明的药学组合物的特征在于,其包含上述本发明的ssPN分子。本发明的组合物的特征在于包含上述本发明的ssPN分子,其他构成没有任何限制。本发明的药学组合物例如还能够称为医药品。本发明的药学组合物例如还能够称为医药品。

[0281] 根据本发明,例如,通过投与到基因成为原因的疾病的患者,能够抑制上述基因的表达,能够治疗上述疾病。本发明中,如上所述,“治疗”例如包含上述疾病的预防、疾病的改善、预后的改善的含义,可以为任意一种。

[0282] 本发明中,作为治疗对象的疾病没有特别限制,例如,可以举出基因的表达为原因的疾病等。根据上述疾病的种类,将作为该疾病的原因的基因设定为上述靶基因,进而,根据上述靶基因,适宜设定上述表达抑制序列即可。

[0283] 作为具体例,若将上述靶基因设定为上述TGF- β 1基因,将针对上述基因的表达抑制序列配置于上述ssPN分子,则能够用于例如炎症疾病、具体而言能够用于急性肺损伤等的治疗。

[0284] 本发明的表达抑制用组合物和药学组合物(下文中称为组合物)的使用方法没有特别限制,例如,只要对具有上述靶基因的投与对象投与上述ssPN分子即可。

[0285] 上述投与对象可以举出例如细胞、组织或器官等。上述投与对象可以举出例如人、除人以外的非人哺乳类等非人动物等。上述投与例如可以为体内,也可以为体外。上述细胞没有特别限制,可以举出例如HeLa细胞、293细胞、NIH3T3细胞、COS细胞等各种培养细胞;ES细胞、造血干细胞等干细胞;初代培养细胞等从生物体分离的细胞;等等。

[0286] 上述投与方法没有特别限制,例如,可以根据投与对象适宜决定。上述投与对象为培养细胞的情况下,可以举出例如使用转染试剂的方法、电穿孔法等。上述投与为体内的情况下,例如,可以为经口投与,也可以为非经口投与。上述非经口投与可以举出例如注射、皮下投与、局部投与等。

[0287] 本发明的组合物例如可以仅包含本发明的ssPN分子,也可以还包含其他添加物。上述添加物没有特别限制,例如,优选药学上可接受的添加物。上述添加物的种类没有特别限制,例如,可以根据投与对象的种类适宜选择。

[0288] 本发明的组合物中,上述ssPN例如可以与上述添加物形成复合体。上述添加物例如还能够称为复合化剂。通过上述复合体,例如能够高效地传送上述ssPN分子。上述ssPN分子与上述复合化剂的结合没有特别限制,可以举出例如非共价结合等。上述复合体可以举出例如包合物等。

[0289] 上述复合化剂没有特别限制,可以举出聚合物、环糊精、金刚烷胺等。上述环糊精可以举出例如线状环糊精共聚物、线状酸化环糊精共聚物等。

[0290] 除此之外,上述添加剂还可以举出例如载体、与靶细胞的结合物质、缩合剂、融合剂等。

[0291] 上述载体例如优选为高分子,更优选为生物体高分子。上述载体例如优选为生物降解性。上述载体可以举出例如人血清白蛋白(HSA)、低密度脂蛋白(LDL)、球蛋白等蛋白质;例如葡聚糖、普鲁兰多糖、几丁质、壳聚糖、菊糖、环糊精、透明质酸等糖质;脂质等。上述载体还能够使用例如合成聚氨基酸等合成聚合物。上述聚氨基酸可以举出例如聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸、苯乙烯-马来酸酐共聚物、聚(L-丙交酯-co-乙交酯)共聚物、二乙烯基醚-马来酸酐共聚物、N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺共聚物(HMPA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)、聚氨酯、聚(2-乙基丙烯酸)、N-异丙基丙烯酰胺聚合物或者聚磷嗪(polyphosphazine)等。

[0292] 上述结合物质可以举出例如促甲状腺激素、促黑素细胞激素、外源凝集素、糖蛋白、表面活性蛋白A、粘蛋白糖质、多价乳糖、多价半乳糖、N-乙酰基半乳糖胺、N-乙酰基葡萄糖胺、多价甘露糖、多价海藻糖、糖基化聚氨基酸、多价半乳糖、转铁蛋白、二磷酸酯、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、脂质、胆固醇、类固醇、胆汁酸、叶酸盐、维生素B12、生物素、Neproxin、RGD肽、RDG肽类似物等。

[0293] 上述融合剂和缩合剂可以举出例如聚乙烯亚胺(PEI)等聚氨基链等。PEI例如可以为直链状和支链状中的任意一种,另外,可以为合成物和天然物中的任意一种。上述PEI例如可以进行烷基取代,也可以进行脂质取代。另外,除此之外,上述融合剂能够使用例如聚组氨酸、聚咪唑、聚吡啶、聚丙烯亚胺、蜂毒肽、聚缩醛物质(例如,阳离子性聚缩醛等)等。上述融合剂例如可以具有 α 螺旋结构。上述融合剂例如可以为蜂毒肽等膜崩解剂。

[0294] 对本发明的组合物而言,例如,关于上述复合体的形成等,能够援引美国专利第6,509,323号、美国专利公报第2003/0008818号、PCT/US04/07070号等。

[0295] 除此之外,上述添加剂可以举出例如两亲分子等。上述两亲分子例如为具有疏水性区域和亲水性区域的分子。上述分子例如优选为聚合物。上述聚合物例如为具有二级结构的聚合物,优选为具有重复性二级结构的聚合物。作为具体例,例如,优选为多肽,更优选为 α 螺旋状多肽等。

[0296] 上述两亲聚合物例如可以为具有两个以上两亲亚单位的聚合物。上述亚单位可以举出例如具有包括至少一个亲水性基团和一个疏水性基团的环状结构的亚单位等。上述亚单位可以具有例如胆酸等类固醇、芳香族结构等。上述聚合物例如可以具有芳香族亚单位等环状结构亚单位和氨基酸两者。

[0297] 5. 表达抑制方法

[0298] 如上所述,本发明的表达抑制方法的特征在于,其为抑制靶基因表达的方法,其使用上述本发明的ssPN分子。本发明的表达抑制方法的特征在于使用上述本发明的ssPN分子,其他工序和条件没有任何限制。

[0299] 本发明的表达抑制方法中,上述基因的表达抑制机理没有特别限制,可以举出例如基于RNA干扰的表达抑制等。此处,本发明的表达抑制方法例如为诱导抑制上述靶基因的表达的RNA干扰的方法,也能够称为其特征在于使用上述本发明的ssPN分子的表达诱导方法。

[0300] 本发明的表达抑制方法例如包括对存在上述靶基因的对象投与上述ssPN分子的工序。通过上述投与工序,例如,使上述ssPN分子与上述投与对象接触。上述投与对象可以举出例如细胞、组织或器官等。上述投与对象可以举出例如人、除人以外的非人哺乳类等非人动物等。上述投与例如可以为体内,也可以为体外。

[0301] 本发明的表达抑制方法例如可以单独投与上述ssPN分子,也可以投与包含上述ssPN分子的上述本发明的组合物。上述投与方法没有特别限制,例如,可以根据投与对象种类适宜选择。

[0302] 6. 治疗方法

[0303] 如上所述,本发明的疾病的治疗方法的特征在于,其包括将上述本发明的ssPN分子投与至患者的工序,上述ssPN分子具有抑制成为上述疾病的原因的基因的表达的序列作为上述表达抑制序列。本发明的治疗方法的特征在于使用上述本发明的ssPN分子,其他工序和条件没有任何限制。本发明的治疗方法例如能够援引上述本发明的表达抑制方法。

[0304] 7. ssPN分子的用途

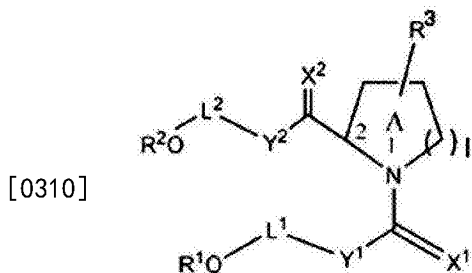
[0305] 本发明的用途为上述本发明的ssPN分子的、用于抑制上述靶基因表达的用途。另外,本发明的用途为上述本发明的ssPN分子的、用于诱导RNA干扰的用途。

[0306] 本发明的核酸分子的特征在于,其为用于治疗疾病的核酸分子,上述核酸分子为上述本发明的ssPN分子,上述ssPN分子具有抑制成为上述疾病的原因的基因的表达的序列作为上述表达抑制序列。

[0307] 8. 单体

[0308] 本发明的单体的特征在于,其为核酸合成用的单体,其具有下述式(II)的结构。只要没有特别表示,则本发明的单体能够援引上述本发明的ssPN分子的说明。

[0309] [化学式4]



· · · (I I)

[0311] 本发明的单体例如在上述本发明的ssPN分子的合成中能够容易地合成上述式(I)表示的连接子区域(Lx)和连接子区域(Ly)。本发明的单体例如能够用作自动核酸合成用的amidite,例如,能够适用于一般的核酸自动合成装置。上述合成方法可以举出例如亚磷酰胺法和H-磷酸酯法等。

[0312] 上述式中,

[0313] X¹和X²各自独立地为H₂、O、S或NH;

[0314] Y¹和Y²各自独立地为单键、CH₂、NH、O或S;

[0315] R¹和R²各自独立地为H、保护基或磷酸保护基;

[0316] R³为与环A上的C-3、C-4、C-5或C-6键合的氢原子或取代基;

[0317] L¹为由n个原子构成的亚烷基链,此处,亚烷基碳原子上的氢原子可以被OH、OR^a、NH₂、NHR^a、NR^aR^b、SH或SR^a取代,也可以不被取代,或者,

[0318] L¹为上述亚烷基链的一个以上碳原子被氧原子取代的聚醚链,

[0319] 其中,Y¹为NH、O或S的情况下,与Y¹键合的L¹的原子为碳,与OR¹键合的L¹的原子为碳,氧原子彼此不相邻;

[0320] L²为由m个原子构成的亚烷基链,此处,亚烷基碳原子上的氢原子可以被OH、OR^c、NH₂、NHR^c、NR^cR^d、SH或SR^c取代,也可以不被取代,或者,

[0321] L²为上述亚烷基链的一个以上碳原子被氧原子取代的聚醚链,

[0322] 其中,Y²为NH、O或S的情况下,与Y²键合的L²的原子为碳,与OR²键合的L²的原子为碳,氧原子彼此不相邻;

[0323] R^a、R^b、R^c和R^d各自独立地为取代基或保护基;

[0324] l为1或2;

[0325] m为0~30的范围的整数;

[0326] n为0~30的范围的整数;

[0327] 环A可以是上述环A上的C-2以外的1个碳原子被氮、氧或硫取代,

[0328] 上述环A内可以包含碳-碳双键或碳-氮双键。

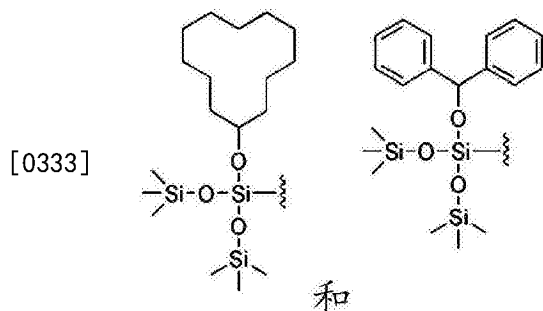
[0329] 上述式(II)中,与上述式(I)相同的部位能够援引上述式(I)的说明。具体而言,上述式(II)中,例如,X¹、X²、Y¹、Y²、R³、L¹、L²、l、m、n和环A能够全部援引上述式(I)的说明。

[0330] 如上所述,上述式(II)中,R¹和R²各自独立地为H、保护基或磷酸保护基。

[0331] 上述保护基例如与上述式(I)中的说明相同,作为具体例,例如,能够选自组I。上述组I可以举出例如二甲氧基三苯甲基(DMT_r)、TBDMS基、ACE基、TOM基、CEE基、CEM基、TEM基和下式所示的含甲硅烷基的基团,其中,优选DMT_r基和上述含甲硅烷基的基团中的任意一

种。

[0332] [化学式5]



[0334] 上述磷酸保护基例如能够由下式表示。

[0335] $-P(OR^6)(NR^7R^8)$

[0336] 上述式中, R^6 为氢原子或任意的取代基。取代基 R^6 例如优选为烃基, 上述烃基可以被吸电子基团取代, 也可以不被取代。取代基 R^6 可以举出例如卤素、卤代烷基、杂芳基、羟基烷基、烷氧基烷基、氨基烷基、甲硅烷基、甲硅烷氧基烷基、杂环基烯基、杂环基烷基、杂芳烷基、以及烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、环基烷基等烃等, 进而, 可以被吸电子基团取代, 也可以不被取代。取代基 R^6 具体而言可以举出例如 β -氰基乙基、硝基苯基乙基、甲基等。

[0337] R^7 和 R^8 分别为氢原子或任意的取代基, 可以相同, 也可以不同。取代基 R^7 和 R^8 例如优选为烃基, 上述烃基还可以被任意的取代基取代, 也可以不被取代。上述烃基例如与上述 R^6 中列举的相同, 优选为甲基、乙基、异丙基。该情况下, $-NR^7R^8$ 具体而言可以举出例如二异丙氨基、二乙氨基、乙基甲氨基等。或者, 取代基 R^7 和 R^8 也可以形成一体, 与它们键合的氮原子一起(即, $-NR^7R^8$ 形成一体)形成含氮环(例如, 哌啶基、吗啉基等)。

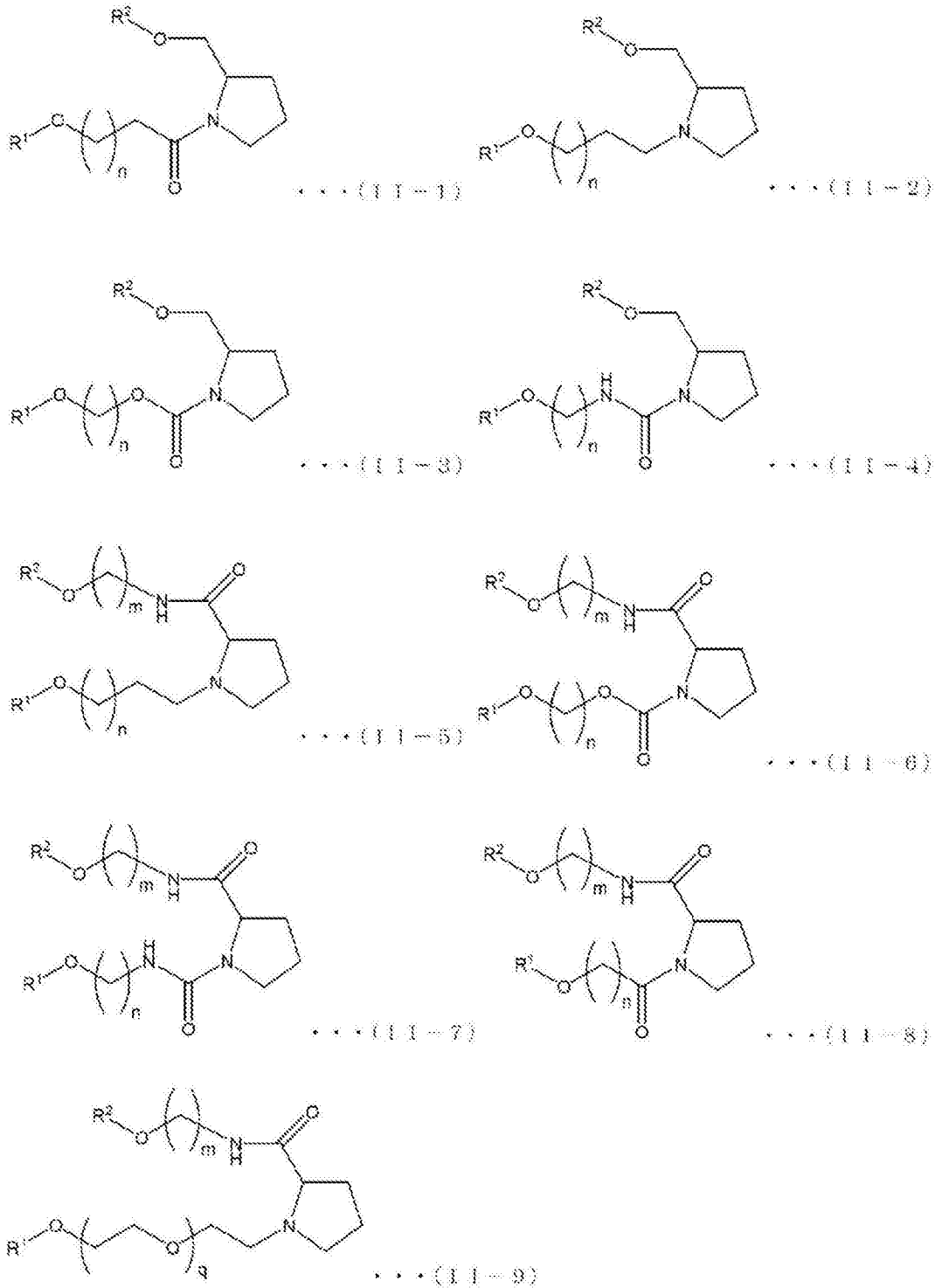
[0338] 作为上述磷酸保护基的具体例, 例如, 能够选自下述组 II。组 II 可以举出例如 $-P(OCH_2CH_2CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$ 等。上述式中, $i-Pr$ 表示异丙基。

[0339] 上述式(II)中, 例如, R^1 和 R^2 中的任意一者为 H 或保护基, 另一者为 H 或磷酸保护基。优选的是, 例如, R^1 为上述保护基的情况下, R^2 优选为 H 或上述磷酸保护基, 具体而言, R^1 选自上述组 I 的情况下, R^2 优选选自 H 或上述组 II。另外, 优选的是, 例如, R^1 为上述磷酸保护基的情况下, R^2 优选为 H 或上述保护基, 具体而言, R^1 选自上述组 II 的情况下, R^2 优选选自 H 或上述组 I。

[0340] 上述式(II)的结构可以例示出例如下述式(II-1)~式(II-9), 下述式中, n 和 m 与上述式(II)相同。下述式中, q 为 0~10 的整数。

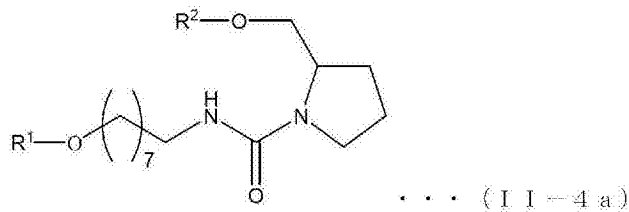
[0341] [化学式6]

[0342]

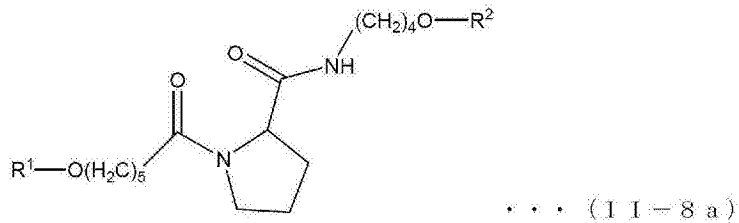


[0343] 上述式(II-1)~(II-9)中,n、m和q没有特别限制,如前所述。作为具体例,可以举出上述式(II-1)中,n=8;上述(II-2)中,n=3;上述式(II-3)中,n=4或8;上述(II-4)中,n=7或8;上述式(II-5)中,n=3且m=4;上述(II-6)中,n=8且m=4;上述式(II-7)中,n=8且m=4;上述(II-8)中,n=5且m=4;上述式(II-9)中,q=1且m=4。将上述式(II-4)的一例(n=8)示于下述式(II-4a),将上述式(II-8)的一例(n=5,m=4)示于下述式(II-8a),

[0344] [化学式7]



[0345]

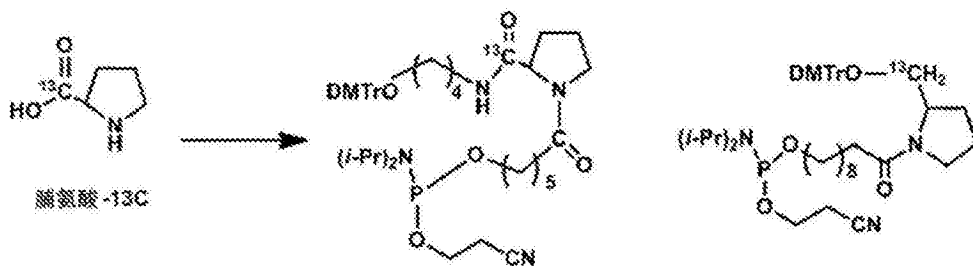


[0346] 本发明的单体例如优选包含上述标记物质,其中,优选包含上述稳定同位素。上述标记物质如前所述。

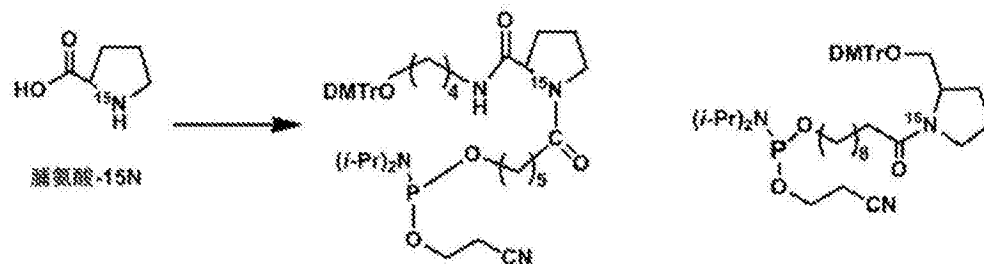
[0347] 本发明的单体包含上述稳定同位素等同位素的情况下,例如,能够简便地在上述本发明的ssPN分子中导入上述同位素。具有同位素的上述单体例如能够由导入了上述同位素的吡咯烷骨架的原料和哌啶骨架的原料合成。上述吡咯烷骨架的原料可以举出例如脯氨酸和脯氨酸醇等。

[0348] 以下,例示出将导入了稳定同位素的脯氨酸和脯氨酸醇作为原料,对导入了稳定同位素的本发明的单体进行合成的方案。以下的方案为例示,本发明并不限于此。

[0349] [化学式8]

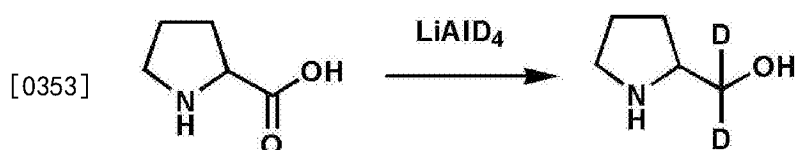


[0350]



[0351] 作为导入了稳定同位素的脯氨酸醇,例如,导入了氘(D)的脯氨酸醇能够如下制备:例如,如下式所示,通过用LiAlD₄处理脯氨酸来制备。

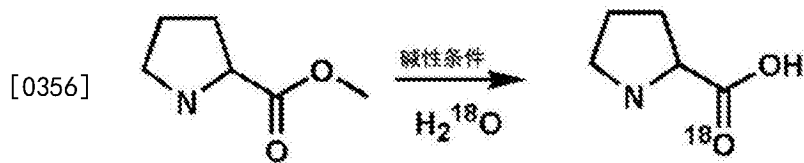
[0352] [化学式9]



[0354] 作为导入了稳定同位素的脯氨酸,例如,导入了重氧(¹⁸O)的脯氨酸能够如下制备:

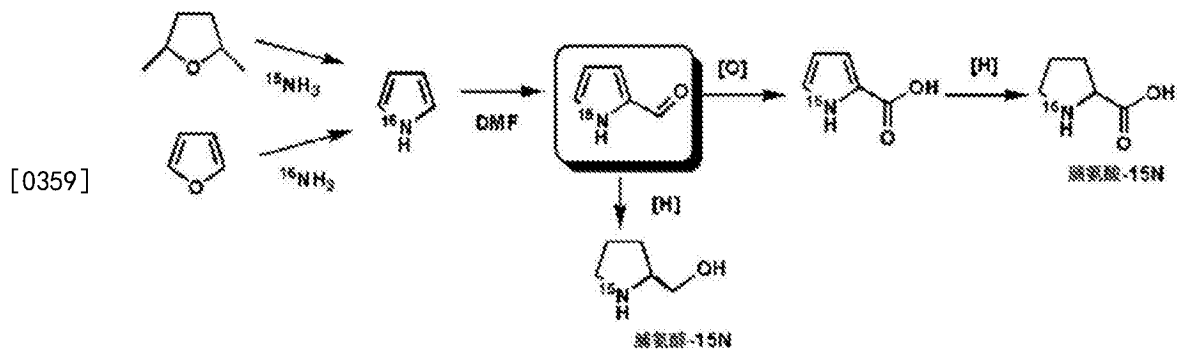
例如,如下式所示,通过在碱性条件下使脯氨酸甲酯与 $H_2^{18}O$ 反应来制备。

[0355] [化学式10]



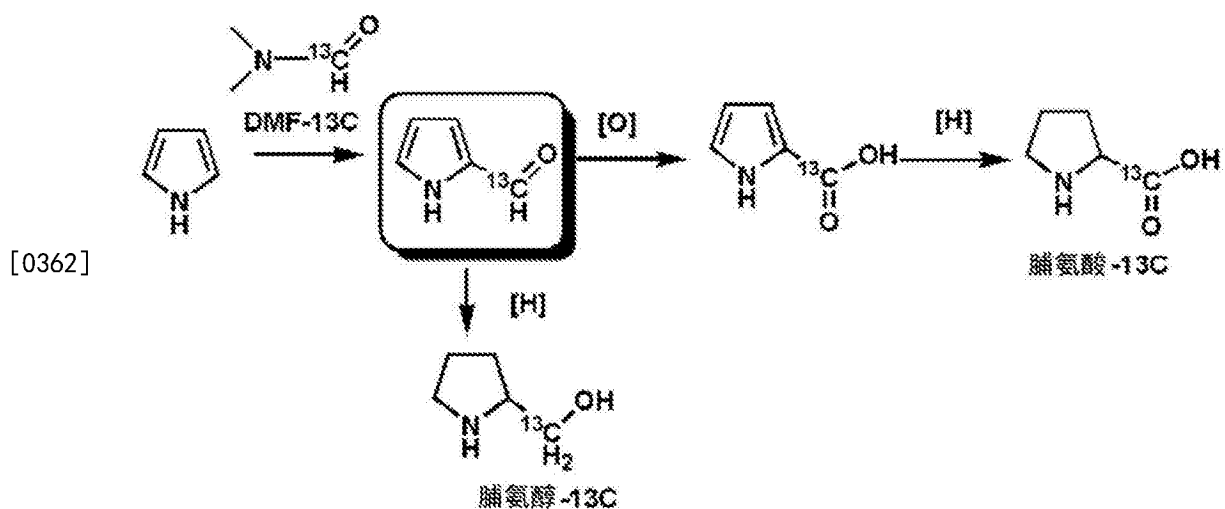
[0357] 重氮(^{15}N)导入脯氨酸(脯氨酸- ^{15}N)和重氮(^{15}N)导入脯氨酸醇(脯氨酸醇- ^{15}N)例如能够通过以下的方案合成。即,首先,使吡咯或四氢吡咯与 $^{15}NH_3$ 反应,制备重氮(^{15}N)导入吡咯,将其甲酰化,得到重氮(^{15}N)导入2-甲酰基吡咯。将其氧化为羧酸,还原吡咯部位,由此能够合成脯氨酸- ^{15}N 。另外,通过还原上述重氮(^{15}N)导入2-甲酰基吡咯,能够合成脯氨酸醇- ^{15}N 。

[0358] [化学式11]



[0360] 上述重碳(^{13}C)导入脯氨酸(脯氨酸- ^{13}C)和上述重碳(^{13}C)导入脯氨酸醇(脯氨酸醇- ^{13}C)例如能够通过以下的方案合成。即,首先,通过上述重碳(^{13}C)导入DMF(DMF- ^{13}C)使吡咯甲酰化,得到重碳(^{13}C)导入2-甲酰基吡咯。将其氧化为羧酸,还原吡咯部位,由此能够合成脯氨酸- ^{13}C 。另外,通过还原上述重碳(^{13}C)导入2-甲酰基吡咯,能够合成脯氨酸醇- ^{13}C 。

[0361] [化学式12]



[0363] 这样,能够合成导入了稳定同位素的单体,另外,通过使用上述单体作为合成用amidite,能够合成在上述连接子区域导入了稳定同位素的核酸分子。

[0364] 以下,通过实施例等详细地说明本发明,但本发明并不限于此。

[0365] 实施例

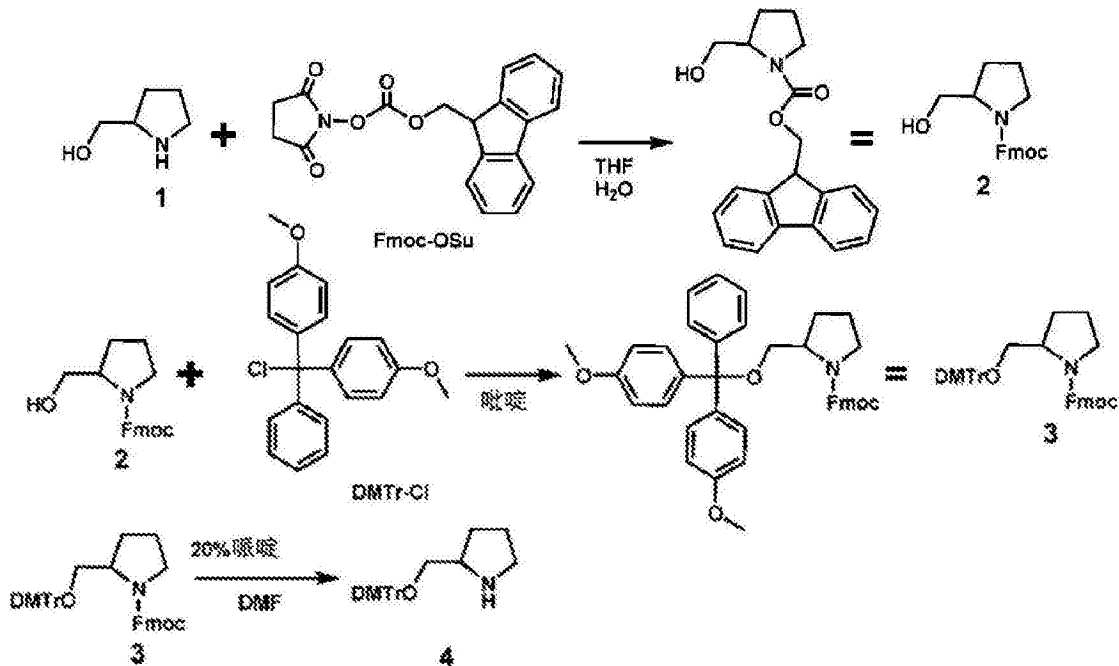
[0366] (实施例A1)

[0367] 1. 脯氨酸的合成

[0368] 根据下式所示的方案1, 合成用二甲氧基三苯甲基进行了保护的脯氨酸。

[0369] [化学式13]

[0370]



方案 1

[0371] (1) Fmoc-L-脯氨酸(化合物2)

[0372] 将L-脯氨酸(化合物1)(0.61g、6.0mmol)溶解于纯水70mL中, 制备L-脯氨酸水溶液。将N-(9-芴甲氧羰基)琥珀酰亚胺(Fmoc-OSu)(2.0g、6.0mmol)溶解于THF10mL中。将该THF溶液加入到上述L-脯氨酸水溶液中, 搅拌1小时, 使两者反应。将该反应液分离为液体组分和沉淀组分, 用乙酸乙酯提取各个组分, 分别回收有机层。然后, 将各个有机层合并后, 添加无水硫酸钠, 吸收水分(下文中称为干燥)。过滤上述有机层, 回收滤液, 将上述滤液减压浓缩。通过硅胶柱层析(展开溶剂己烷: 乙酸乙酯=1:1)精制所得到的残渣, 得到化合物2(1.4g、收率74%)。以下, 示出化合物的NMR的结果。

[0373] ¹H-NMR(CDCl₃): δ7.77(2H, d, J=7.7Hz, Ar-H), 7.60(2H, d, J=7.3Hz, Ar-H), 7.40(2H, t, J=7.5Hz, Ar-H), 7.31(2H, t, J=7.6Hz, Ar-H), 4.40-4.50(2H, m, COOCH₂), 4.22(1H, t, J=6.5Hz, 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)。

[0374] (2) Fmoc-DMTr-L-脯氨酸(化合物3)

[0375] 将上述Fmoc-L-脯氨酸(化合物2)(1.4g、4.3mmol)溶解于吡啶20mL中, 共沸3次。将所得到的残留物溶解于吡啶20mL中。将该溶液一边在氩气下、冰浴中搅拌, 一边添加4,4'-二甲氧基三苯甲基氯化物(DMTr-Cl)(1.8g、5.3mmol)。关于该反应液, 通过氯仿/甲醇的TLC来追踪反应, 直至Fmoc-L-脯氨酸的点消失为止反应4小时。并且, 为了使过剩的DMTr-Cl淬灭, 在上述反应液中加入甲醇3mL并搅拌10分钟。向上述反应液中进一步加入氯仿后, 回收有机层。对于所回收的上述有机层, 进行利用饱和盐水的清洗、利用5%碳酸氢钠水溶液的

清洗,再进行一次利用饱和盐水的清洗。用无水硫酸钠使清洗后的有机层干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩。通过硅胶柱层析(展开溶剂氯仿、1%吡啶)精制所得到的残渣,得到化合物3(2.0g、收率74%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0376] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.77(2H,d,J=7.7Hz,Ar-H),7.60(2H,d,J=7.3Hz,Ar-H),7.40-7.18(13H,m,Ar-H),6.89(4H,d,J=8.6Hz,Ar-H),4.20-4.40(2H,m,COOCH₂),4.02(1H,t,J=6.5Hz,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)。

[0377] (3)DMTr-L-脯氨酸(化合物4)

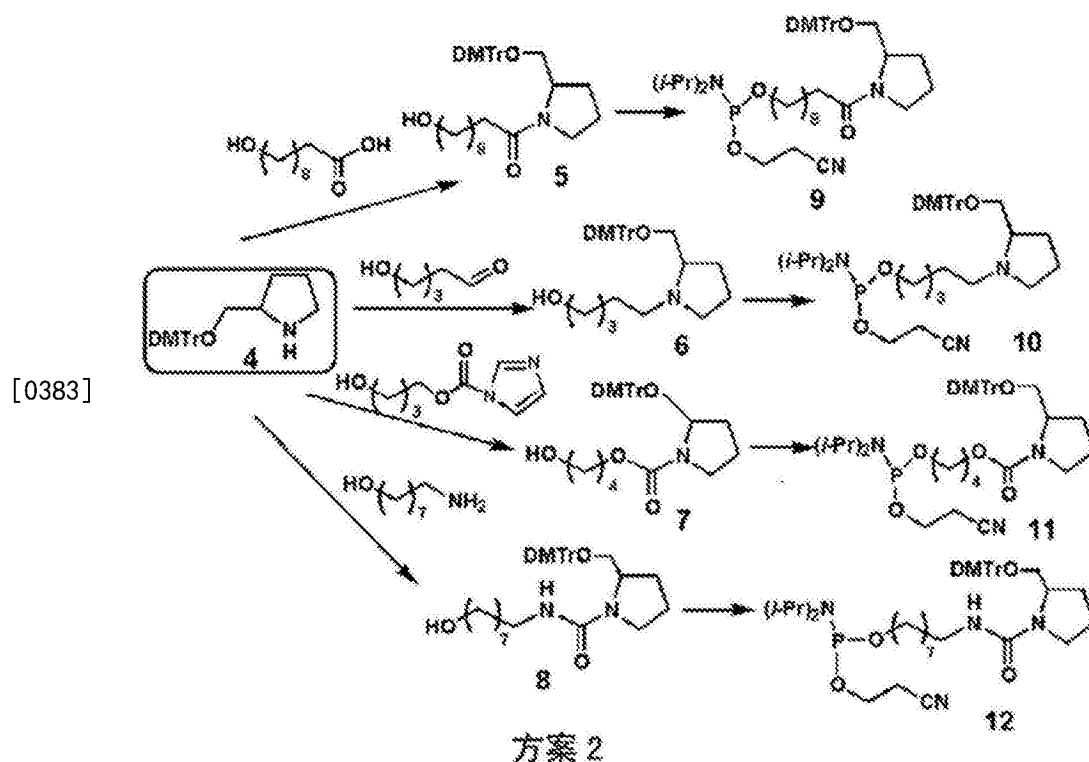
[0378] 将上述Fmoc-DMTr-L-脯氨酸(化合物3)(2.0g、3.2mmol)溶解于包含20%哌啶的DMF溶液25mL中,搅拌12小时。将该溶液减压浓缩,通过硅胶柱层析(氯仿:甲醇=85:15、含有1%吡啶)精制所得到的残渣,得到化合物4(1.0g、收率78%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0379] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H,m,Ar-H),6.82(4H,d,J=8.6Hz,Ar-H),3.78(6H,s,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)。

[0380] 2.amidite衍生物的合成

[0381] 接着,根据下式所示的方案2,合成具有脯氨酸的amidite衍生物。以下,将1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐称为“EDC”,将N,N-二甲氨基吡啶(4-二甲氨基吡啶)称为“DMAP”。

[0382] [化学式14]



[0384] (1)DMTr-酰胺-L-脯氨酸(化合物5)

[0385] 将上述DMTr-L-脯氨酸(化合物4)(0.80g、2.0mmol)、EDC(0.46g、2.4mmol)和DMAP(0.29g、2.4mmol)溶解于二氯甲烷20mL中并搅拌。在该溶液中添加10-羟基癸酸(0.45g、

2.4mmol)并搅拌。关于该反应液,通过乙酸乙酯的TLC来追踪反应,直至DMTr-L-脯氨酸的点消失为止反应20小时。并且,在上述反应液中加入二氯甲烷后,回收有机层。用饱和盐水清洗所回收的上述有机层后,用无水硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩,通过硅胶柱层析(乙酸乙酯、含有1%吡啶)精制其残渣,得到化合物5(0.71g,收率62%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0386] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H,m,Ar-H),6.82(4H,d,J=8.6Hz,Ar-H),3.78(6H,s,0CH₃),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)。

[0387] (2)DMTr-烷基-L-脯氨酸(化合物6)

[0388] 将上述DMTr-L-脯氨酸(化合物4)(0.80g、2.0mmol)溶解于甲醇15mL中,加入5-羟基戊醛(0.31g、3.0mmol)并搅拌。在该溶液中加入氰基硼氢化钠(0.25g、4.0mmol),进而进行搅拌。关于该反应液,通过乙酸乙酯/己烷的TLC来追踪反应,直至DMTr-L-脯氨酸的点消失为止反应24小时。并且,在上述反应液中加入乙酸乙酯,回收有机层。用饱和盐水清洗所回收的上述有机层后,用无水硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩,通过硅胶柱层析(己烷:乙酸乙酯=1:1、含有1%吡啶)精制其残渣,得到化合物6(0.62g、收率63%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0389] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H,m,Ar-H),6.82(4H,d,J=8.6Hz,Ar-H),3.78(6H,s,0CH₃),3.70-2.86(4H,m,CH₂OH,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)。

[0390] (3)DMTr-氨基甲酸酯-L-脯氨酸(化合物7)

[0391] 将1,4-丁二醇(0.90g、10mmol)溶解于二氯甲烷30mL中,进而加入羰二咪唑(1.4g、8.6mmol)并搅拌3小时。用饱和盐水清洗该反应液的有机层后,用无水硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩,通过硅胶柱层析(氯仿:甲醇=9:1)精制该残渣。由此,得到1,4-丁二醇的一个末端被羰二咪唑活化的化合物(0.25g,1.5mmol)。将该化合物溶解于二氯甲烷15mL中,添加上述DMTr-L-脯氨酸(化合物4)(0.6g、1.5mmol)并搅拌24小时。进而在该混合液中加入乙酸乙酯,回收有机层。用饱和盐水清洗所回收的上述有机层后,用无水硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩,通过硅胶柱层析(己烷:乙酸乙酯=1:1、含有1%吡啶)精制其残渣,得到化合物7(0.61g、收率77%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0392] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H,m,Ar-H),6.82(4H,d,J=8.6Hz,Ar-H),4.24-3.94(2H,m,G00CH₂),3.78(s,6H,0CH₃),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)。

[0393] (4)DMTr-脲基-L-脯氨酸(化合物8)

[0394] 将上述DMTr-L-脯氨酸(化合物4)(0.50g、1.2mmol)和三光气(0.12g、0.40mmol)溶解于二氯甲烷8mL中,在氩气下、冰浴中进行搅拌。并且,在上述溶液中添加N,N-二异丙基乙胺(0.31g、2.4mmol)并搅拌1小时。进而,在上述溶液中添加8-氨基-1-辛醇(0.17g、1.2mmol),同样地在冰浴中搅拌30分钟后,在室温下搅拌20小时。在上述溶液中加入二氯甲烷,回收有机层。用饱和盐水清洗所回收的上述有机层后,用无水硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩,通过硅胶柱层析(己烷:乙酸乙酯=4:1、含有1%三乙胺)

精制其残渣,得到化合物8(0.44g、收率62%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0395] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 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)。

[0396] (5)具有脯氨酸的amidite衍生物(化合物9~12)

[0397] 将上述修饰脯氨酸(化合物5~8)分别作为原料,通过以下所示的方法合成化合物9~12。将上述修饰脯氨酸和5-苄硫基-1H-四唑溶解于乙腈3mL中。关于上述修饰脯氨酸的用量,在化合物5的情况下为0.69g(1.2mmol),在化合物6的情况下为0.60g(1.2mmol),在化合物7的情况下为0.60g(1.2mmol),在化合物8的情况下为0.25g(0.43mmol)。另外,关于5-苄硫基-1H-四唑的用量,相对于化合物5~7为0.15g(0.78mmol),相对于化合物8为54mg(0.15mmol)。在氩气下向上述溶液中添加2-氰乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺并搅拌2小时。关于上述2-氰乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺的添加量,在使用了上述化合物5~7的体系中为0.54g(1.8mmol),在使用了上述化合物8的体系中为0.19g(0.64mmol)。并且,在上述溶液中添加饱和碳酸氢钠水溶液,进而用二氯甲烷提取,回收有机层。用无水硫酸钠干燥所回收的上述有机层。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩,通过硅胶柱层析(己烷:乙酸乙酯=1:1、含有1%三乙胺)精制其残渣,得到化合物9~12。以下,示出各化合物的NMR的结果。

[0398] DMTr-酰胺-L-脯氨酸amidite(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=8.6Hz,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)。

[0399] DMTr-烷基-L-脯氨酸amidite(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=8.6Hz,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)。

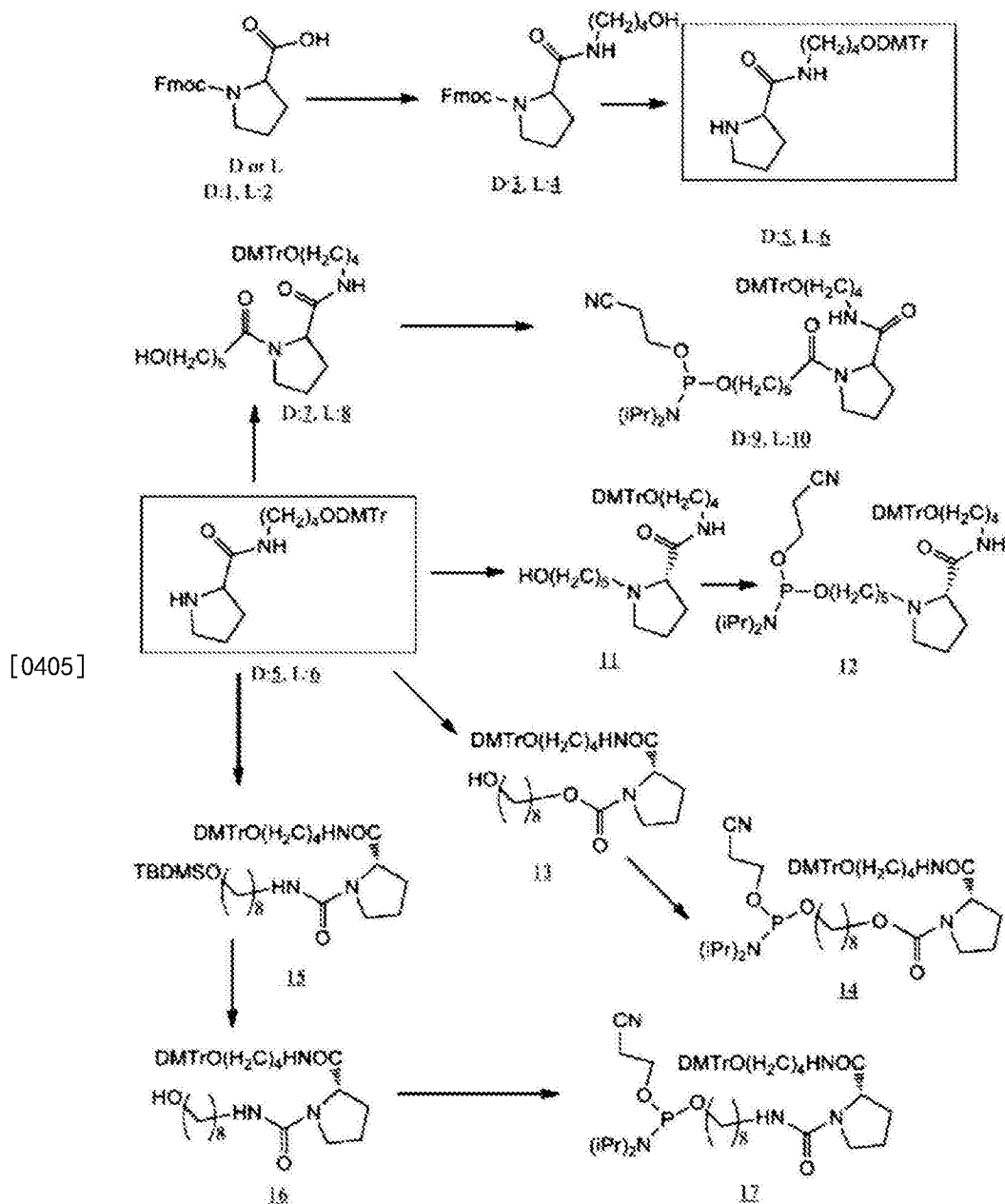
[0400] DMTr-氨基甲酸酯-L-脯氨酸amidite(化合物11、0.67g、收率52%) $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H,m,Ar-H),6.82(4H,d,J=8.6Hz,Ar-H),4.24-3.94(2H,m, COOCH_2),3.78(s,6H, OCH_3),3.72-2.96(11H,m, CH_2O , POCH_2 , CHCH_3 ,H-2,H-5,H-6),2.58(2H,m, CH_2CN),2.10-1.46(8H,m,烷基,H-3,H-4),1.34-1.10(12H,m, CHCH_3)。

[0401] DMTr-脲基-L-脯氨酸amidite(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, CHCH_3)。

[0402] (实施例A2)

[0403] 接着,根据下式所示的方案3,合成具有L-脯氨酸的amidite衍生物。

[0404] [化学式15]



方案 3

[0406] (1)DMTr-羟基酰胺氨基-L-脯氨酸(化合物11)

[0407] 在包含DMTr-酰胺-L-脯氨酸(化合物6)(1.00g、2.05mmol)和5-羟基戊醛(0.33g、3.07mmol)的乙醇溶液(7mL)中,在冰冷却条件下加入乙酸缓冲液(7mL)。将该混合液在冰冷却下搅拌20分钟后,加入氰基硼氢化钠(0.77g、12.28mmol),进而在室温下搅拌7小时。用二氯甲烷稀释上述混合液,并用水清洗后,进而用饱和盐水清洗。并且回收上述有机层,用硫酸钠干燥。过滤上述有机层,对于滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂CH₂Cl₂:CH₃OH=98:2、含有0.05%吡啶)。接着将所得到的产物供于硅胶柱层析(展开溶剂CH₂Cl₂:CH₃OH=98:2、含有0.05%吡啶),进而将所得到的产物供于硅胶柱层析(展开溶剂二氯甲烷:丙酮=7:3、含有0.05%吡啶)。由此得到无色糖浆状的化合物11

(0.49g、收率41%)。

[0408] Ms(FAB+):m/z575(M⁺)、303(DMTr⁺)

[0409] (2)DMTr-酰胺氨基-L-脯氨酸amidite(化合物12)

[0410] 将所得到的上述DMTr-羟基酰胺氨基-L-脯氨酸(化合物11)(0.50g、0.87mmol)与无水乙腈混合,在室温下共沸干燥。在所得到的残留物中加入四氮唑二异丙胺(178mg、1.04mmol),在减压下脱气,并填充氩气。对于上述混合物加入无水乙腈(1mL),进而加入2-氰基乙氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(313mg、1.04mmol)的无水乙腈溶液(1mL)。将该混合物在氩气气氛下于室温搅拌4小时。并且,用二氯甲烷稀释上述混合物,并用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水依次清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的上述滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于使用氨基化硅胶作为填充剂的柱层析(展开溶剂己烷:丙酮=7:3、含有0.05%吡啶),得到无色糖浆状的化合物12(0.57g、纯度93%、收率79%)。通过HPLC测定上述纯度(以下同样)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0411] ¹H-NMR(CDCl₃): 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,OCH₃)、3.47-3.64(m,3H)、3.12-3.26(m,2H)、3.05(t,J=6.4Hz,2H,CH₂)、2.98-2.02(m,2H)、2.61(t,J=5.8Hz,2H,CH₂)、2.55-2.63(m,2H)、2.27-2.42(m,1H,CH)、2.31(t,7.8Hz,2H,CH₂)、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);

[0412] P-NMR(CDCl₃): δ 146.91;

[0413] Ms(FAB+):m/z774(M⁺)、303(DMTr⁺)、201(C₈H₁₉N₂OP⁺)。

[0414] (3)DMTr-羟基酰胺氨基甲酰基-L-脯氨酸(化合物13)

[0415] 在氩气气氛下于室温向溶解有DMTr-酰胺-L-脯氨酸(化合物6)(1.00g、2.05mmol)的无水乙腈溶液(10mL)中加入溶解有1-咪唑基羰基氧基-8-羟基辛烷(1.12g、4.92mmol)的无水乙腈溶液(20mL)。将该混合液在40~50℃加热2天后,在室温下放置5天。对于上述混合液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂二氯甲烷:丙酮=4:1、含有0.05%吡啶)。由此,得到无色糖浆状的化合物13(0.68g、收率50%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0416] 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);

[0417] Ms(FAB+):m/z602(M⁺)、303(DMTr⁺)。

[0418] (4)DMTr-酰胺氨基甲酰基-L-脯氨酸amidite(化合物14)

[0419] 将所得到的上述DMTr-羟基酰胺氨基甲酰基-L-脯氨酸(化合物13)(0.63g、1.00mmol)与无水吡啶混合,在室温下共沸干燥。在所得到的残留物中加入四氮唑二异丙胺(206mg、1.20mmol),在减压下脱气,填充氩气。对于上述混合物加入无水乙腈(1mL),进而加入2-氰基乙氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(282mg、1.12mmol)的无水乙腈溶液(1mL)。将该混合物在氩气气氛下于室温搅拌4小时。并且,用二氯甲烷稀释上述混合物,用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水依次清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机

层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于使用氨基化硅胶作为填充剂的柱层析(展开溶剂己烷:丙酮=7:3、含有0.5%吡啶),得到无色糖浆状的化合物14(0.74g、纯度100%、收率87%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0420] P-NMR(CDCl₃): δ 147.19;

[0421] Ms(FAB+):m/z860(M⁺),303(DMTr⁺),201(C₈H₁₉N₂OP⁺)。

[0422] (5)DMTr-叔丁基二甲基甲硅烷氧基酰胺脲基-L-脯氨酸(化合物15)

[0423] 在氩气气氛和冰冷却条件下向三光气(1.22g、4.10mmol)中加入无水四氢呋喃溶液(10mL)。在氩气气氛和冰冷却条件下,用30分钟向该混合液中滴加溶解有DMTr-酰胺-L-脯氨酸(化合物6)(1.00g、2.05mmol)和DIEA(9.80g、75.8mmol)的无水四氢呋喃溶液(10mL),然后在室温下搅拌1小时。在氩气气氛和冰冷却条件下,用45分钟向上述混合液中滴加溶解有10-氨基-1-叔丁基二甲基甲硅烷氧基癸烷(2.66g、10.25mmol)和DIEA(3.20g、24.76mmol)的无水四氢呋喃溶液(20mL)。并且,将上述混合物在氩气气氛下于室温搅拌一晚。用乙酸乙酯(200mL)稀释该混合液,回收有机层。将上述有机层用饱和碳酸氢钠水溶液清洗后,进而用饱和盐水清洗。并且,回收有机层,用硫酸钠干燥。过滤上述有机层,对于滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂二氯甲烷:丙酮=4:1、含有0.05%吡啶)。由此,得到无色糖浆状的化合物15(0.87g、收率55%)。

[0424] (6)DMTr-羟基酰胺脲基-L-脯氨酸化合物(16)

[0425] 在氩气气氛下于室温向所得到的上述DMTr-叔丁基二甲基甲硅烷氧基酰胺脲基-L-脯氨酸(15)(0.87g、1.12mmol)中加入无水四氢呋喃二氯甲烷溶液(10mL)。在氩气气氛下向上述混合液中加入含有1mol/L四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液(4.69mL、东京化成),于室温搅拌3天。用二氯甲烷(150mL)稀释上述混合液,用水清洗后,进而用饱和盐水清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂二氯甲烷:丙酮=1:1、含有0.05%吡啶),得到无色糖浆状的化合物16(0.68g、收率92%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0426] 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=6.4Hz,CH₂)、3.61(d,1H,J=6.4Hz,CH₂)、3.34-3.37(m,1H,CH)、3.16-3.27(m,5H),3.04(t,J=5.9Hz,2H,CH₂)、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)。

[0427] (7)DMTr-酰胺脲基-L-脯氨酸amidite(化合物17)

[0428] 将所得到的上述DMTr-羟基酰胺脲基-L-脯氨酸(化合物16)(0.62g、0.94mmol)与无水乙腈混合,在室温下共沸干燥。在所得到的残留物中加入四氮唑二异丙胺(192mg、1.12mmol),在减压下脱气,填充氩气。对于上述混合液加入无水乙腈(1mL),进而加入2-氰基乙氧基-N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(282mg、1.12mmol)的无水乙腈溶液(1mL)。将该混合物在氩气气氛下于室温搅拌4小时。并且,将上述混合物用二氯甲烷稀释,用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水依次清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的上述滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于使用氨基化硅胶作为填充剂的柱层析(展开溶剂己烷:丙酮=1:1、含有0.05%吡啶),得到无色糖浆状的化合物17(0.77g、纯度88%、收率84%)。以下,示出化合物的NMR的结果。

[0429] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3): \delta 147.27;$

[0430] $\text{Ms}(\text{FAB}^+): m/z 860(\text{M}^+ + 1), 303(\text{DMTr}^+), 201(\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}^+)$ 。

[0431] (实施例A3)脯氨酸二酰胺amidite的合成

[0432] 为了生成包含具有脯氨酸骨架的连接子的本发明的核酸分子,通过上述方案3合成L-脯氨酸二酰胺amidite和D-脯氨酸二酰胺amidite。

[0433] (B3-1)L-脯氨酸二酰胺amidite

[0434] (1)Fmoc-羟基酰胺-L-脯氨酸(化合物4)

[0435] 将上述方案3的化合物2(Fmoc-L-脯氨酸)作为起始原料。混合上述化合物2(10.00g、29.64mmol)、4-氨基-1-丁醇(3.18g、35.56mmol)和1-羟基苯并三唑(10.90g、70.72mmol),对于上述混合物,在减压下脱气,填充氩气。在室温下向上述混合物中加入无水乙腈(140mL),进而添加二环己基碳二亚胺(7.34g、35.56mmol)的无水乙腈溶液(70mL)后,在氩气气氛下于室温搅拌15小时。反应结束后,滤除所生成的沉淀,对于所回收的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。在所得到的残渣中加入二氯甲烷(200mL),用饱和碳酸氢钠水溶液(200mL)清洗。并且,回收有机层,用硫酸镁干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂,在其残渣中加入二乙醚(200mL)并粉末化。滤取所生成的粉末,由此得到无色粉末状的化合物4(10.34g、收率84%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0436] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3): \delta 7.76-7.83(\text{m}, 2\text{H}, \text{Ar-H}), 7.50-7.63(\text{m}, 2\text{H}, \text{Ar-H}), 7.38-7.43(\text{m}, 2\text{H}, \text{Ar-H}), 7.28-7.33(\text{m}, 2\text{H}, \text{Ar-H}), 4.40-4.46(\text{m}, 1\text{H}, \text{CH}), 4.15-4.31(\text{m}, 2\text{H}, \text{CH}_2), 3.67-3.73(\text{m}, 2\text{H}, \text{CH}_2), 3.35-3.52(\text{m}, 2\text{H}, \text{CH}_2), 3.18-3.30(\text{m}, 2\text{H}, \text{CH}_2), 2.20-2.50(\text{m}, 4\text{H}), 1.81-2.03(\text{m}, 3\text{H}), 1.47-1.54(\text{m}, 2\text{H});$

[0437] $\text{Ms}(\text{FAB}^+): m/z 409(\text{M} + \text{H}^+)$ 。

[0438] (2)DMTr-酰胺-L-脯氨酸(化合物6)

[0439] 将Fmoc-羟基酰胺-L-脯氨酸(化合物4)(7.80g、19.09mmol)与无水吡啶(5mL)混合,在室温下共沸干燥2次。在所得到的残留物中加入4,4'-二甲氧基三苯甲基氯化物(8.20g、24.20mmol)、DMAP(23mg、0.19mmol)和无水吡啶(39mL)。将该混合物在室温下搅拌1小时后,加入甲醇(7.8mL),在室温下搅拌30分钟。将该混合物用二氯甲烷(100mL)稀释,并用饱和碳酸氢钠水溶液(150mL)清洗后,分离有机层。将上述有机层用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。在所得到的未精制的残渣中加入无水二甲基甲酰胺(39mL)和哌啶(18.7mL、189mmol),在室温下搅拌1小时。反应结束后,对于上述混合液,在减压下于室温蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于硅胶柱层析(商品名Wakogel C-300、展开溶剂 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=9:1$ 、含有0.05%吡啶),得到淡黄色油状的化合物6(9.11g、收率98%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0440] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3): \delta 7.39-7.43(\text{m}, 2\text{H}, \text{Ar-H}), 7.30(\text{d}, J=8.8\text{Hz}, 4\text{H}, \text{Ar-H}), 7.21(\text{tt}, 1\text{H}, 4.9, 1.3\text{Hz}, \text{Ar-H}), 6.81(\text{d}, J=8.8\text{Hz}, 4\text{H}, \text{Ar-H}), 3.78(\text{s}, 6\text{H}, \text{OCH}_3), 3.71(\text{dd}, \text{H}, J=6.3\text{Hz}, 5.4\text{Hz}, \text{CH}), 3.21(2\text{H}, 12.9, 6.3\text{Hz}, 2\text{H}, \text{CH}_2), 3.05(\text{t}, J=6.3\text{Hz}, 2\text{H}, \text{CH}_2), 2.85-2.91(\text{m}, 2\text{H}, \text{CH}_2), 2.08-2.17(\text{m}, 1\text{H}, \text{CH}), 1.85-2.00(\text{m}, 3\text{H}), 1.55-1.65(\text{m}, 5\text{H});$

[0441] $\text{Ms}(\text{FAB}^+); m/z 489(\text{M} + \text{H}^+), 303(\text{DMTr}^+)$ 。

[0442] (3)DMTr-羟基二酰胺-L-脯氨酸(化合物8)

[0443] 将所得到的上述DMTr-酰胺-L-脯氨酸(化合物6)(6.01g、12.28mmol)、EDC(2.83g、

14.74mmol)、1-羟基苯并三唑(3.98g、29.47mmol)和三乙胺(4.47g、44.21mmol)的无水二氯甲烷溶液(120mL)混合。在氩气气氛下于室温向该混合液中进一步加入6-羟基己酸(1.95g、14.47mmol),之后,在氩气气氛下于室温搅拌1小时。将上述混合液用二氯甲烷(600mL)稀释,用饱和盐水(800mL)清洗3次。回收有机层,将上述有机层用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。由此,得到淡黄色泡状的上述化合物8(6.29g、收率85%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0444] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 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,0CH₃)、3.61(t,2H,J=6.4Hz,CH₂)、3.50-3.55(m,1H,CH)、3.36-3.43(m,1H,CH)、3.15-3.24(m,2H,CH₂)、3.04(t,J=6.3Hz,2H,CH₂)、2.38-2.45(m,1H,CH)、2.31(t,6.8Hz,2H,CH₂)、2.05-2.20(m,1H,CH)、1.92-2.00(m,1H,CH)、1.75-1.83(m,1H,CH)、1.48-1.71(m,8H)、1.35-1.44(m,2H,CH₂);

[0445] Ms(FAB+):m/z602(M⁺)、303(DMTr⁺)。

[0446] (4)DMTr-二酰胺-L-脯氨酸amidite(化合物10)

[0447] 将所得到的上述DMTr-羟基二酰胺-L-脯氨酸(化合物8)(8.55g、14.18mmol)与无水乙腈混合,在室温下共沸干燥3次。在所得到的残留物中加入四氮唑二异丙胺(2.91g、17.02mmol),在减压下脱气,填充氩气。对于上述混合物加入无水乙腈(10mL),进而加入2-氰基乙氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(5.13g、17.02mmol)的无水乙腈溶液(7mL)。将该混合物在氩气气氛下于室温搅拌2小时。并且,将上述混合物用二氯甲烷稀释,并用饱和碳酸氢钠水溶液(200mL)清洗3次后,用饱和盐水(200mL)清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的上述滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于使用氨基化硅胶作为填充剂的柱层析(展开溶剂己烷:乙酸乙酯=1:3、含有0.05%吡啶),得到无色糖浆状的化合物10(10.25g、纯度92%、收率83%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0448] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 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,0CH₃)、3.45-3.60(m,4H)、3.35-3.45(m,1H,CH)、3.20-3.29(m,1H)、3.04(t,J=6.4Hz,2H,CH₂)、2.62(t,J=5.8Hz,2H,CH₂)、2.40-2.44(m,1H,CH)、2.31(t,7.8Hz,2H,CH₂)、2.03-2.19(m,1H,CH)、1.92-2.02(m,1H,CH)、1.70-1.83(m,1H,CH)、1.51-1.71(m,8H)、1.35-1.44(m,2H,CH₂)、1.18(d,J=6.8Hz,6H,CH₃)、1.16(d,J=6.8Hz,6H,CH₃);P-NMR(CDCl₃):Ms δ 147.17;

[0449] Ms(FAB+):m/z802(M⁺)、303(DMTr⁺),201(C₈H₁₉N₂OP⁺)。

[0450] (B3-2)D-脯氨酸二酰胺amidite

[0451] (1)Fmoc-羟基酰胺-D-脯氨酸(化合物3)

[0452] 将上述方案3的化合物1(Fmoc-D-脯氨酸)作为起始原料。对于上述化合物1(1.5g、4.45mmol)、二环己基碳二亚胺(1.1g、5.34mmol)和1-羟基苯并三唑(1.5g、10.69mmol)的混合物,在减压下脱气,填充氩气。在室温下向上述混合物中加入无水乙腈(24mL),进而添加4-氨基-1-丁醇(0.48g、5.34mmol)的无水乙腈溶液(6mL)后,在氩气气氛下于室温搅拌15小时。反应结束后,滤除所生成的沉淀,对于所回收的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。在所得

的残渣中加入二氯甲烷,用乙酸缓冲液(pH4.0)清洗3次,用饱和碳酸氢钠水溶液清洗3次。并且,回收有机层,用硫酸镁干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂,在其残渣中加入二乙醚(50mL)并粉末化。滤取所生成的粉末,得到白色粉末状的化合物3。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0453] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.77(d, $J=7.3\text{Hz}$, 2H); 7.58(br, 2H); 7.41(t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H); 7.32(t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H); 4.25-4.43(m, 4H); 3.25-3.61(m, 6H); 1.57-1.92(m, 8H)。

[0454] MS(FAB+): m/z 409($\text{M}+\text{H}^+$)。

[0455] (2)DMTr-酰胺-D-脯氨酸(化合物5)

[0456] 将Fmoc-羟基酰胺-D-脯氨酸(化合物3)(1.0g、2.45mmol)与无水吡啶(5mL)混合,在室温下共沸干燥2次。在所得到的残留物中加入4,4'-二甲氧基三苯甲基氯化物(1.05g、3.10mmol)、DMAP(3mg、0.024mmol)和无水吡啶(5mL)。将该混合物在室温下搅拌1小时后,加入甲醇(1mL),在室温下搅拌30分钟。将该混合物用二氯甲烷稀释,并用饱和碳酸氢钠水溶液清洗后,分离有机层。将上述有机层用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。在所得到的未精制的残渣中加入无水二甲基甲酰胺(5mL)和哌啶(2.4mL、24mmol),在室温下搅拌1小时。反应结束后,对于上述混合液,在减压下于室温蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于硅胶柱层析(商品名Wakogel C-300、展开溶剂 CH_2Cl_2 : $\text{CH}_3\text{OH}=9:1$ 、含有0.05%吡啶),得到淡黄色油状的化合物5(1.26g、收率96%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0457] $^1\text{H-NMR}$ (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, $J=8.8, 5.4\text{Hz}$, 1H); 3.22(q, 6.5Hz, 2H); 3.07(t, $J=6.1\text{Hz}$, 2H); 2.97-3.03(m, 1H); 2.85-2.91(m, 1H); 1.85-2.15(m, 3H); 1.55-1.73(m, 6H);

[0458] MS(FAB+): m/z 489($\text{M}+\text{H}^+$), 303(DMTr $^+$)。

[0459] (3)DMTr-羟基二酰胺-D-脯氨酸(化合物7)

[0460] 将所得到的上述DMTr-酰胺-D-脯氨酸(化合物5)(1.2g、2.45mmol)、EDC(566mg、2.95mmol)、1-羟基苯并三唑(796mg、5.89mmol)和三乙胺(1.2mL、8.84mmol)的无水二氯甲烷溶液(24mL)混合。在氩气气氛下于室温向该混合液中进一步加入6-羟基己酸(390mg、2.95mmol),之后,在氩气气氛下于室温搅拌1小时。将上述混合液用二氯甲烷稀释,并用饱和碳酸氢钠水溶液清洗3次。回收有机层,将上述有机层用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。由此,得到淡黄色油状的化合物7(1.4g、收率95%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0461] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.40-7.43(m, 2H); 7.25-7.32(m, 6H); 7.17-7.22(m, 1H); 6.79-6.83(m, 4H); 3.79(s, 6H); 3.58-3.63(m, 2H); 3.49-3.55(m, 1H); 3.15-3.26(m, 2H); 3.02-3.07(m, 2H); 2.30-2.33(m, 2H); 2.11-2.20(m, 1H); 1.50-1.99(m, 13H); 1.36-1.43(m, 2H);

[0462] MS(FAB+): m/z 602(M^+), 303(DMTr $^+$)。

[0463] (4)DMTr-二酰胺-D-脯氨酸amidite(化合物9)

[0464] 将所得到的上述DMTr-羟基二酰胺-D-脯氨酸(化合物7)(1.2g、1.99mmol)与无水乙腈混合,在室温下共沸干燥3次。在所得到的残留物中加入四氮唑二异丙胺(410mg、

2.40mmol),在减压下脱气,填充氩气。对于上述混合物加入无水乙腈(2.4mL),进而加入2-氰基乙氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(722mg、2.40mmol)。将该混合物在氩气气氛下于室温搅拌2小时。并且,将上述混合物用二氯甲烷稀释,并用饱和碳酸氢钠水溶液清洗3次后,用饱和盐水清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于使用氨基化硅胶作为填充剂的柱层析(展开溶剂己烷:乙酸乙酯=1:3),得到无色油状的化合物9(1.4g、纯度95%、收率83%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0465] ¹H-NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.40-7.43(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);

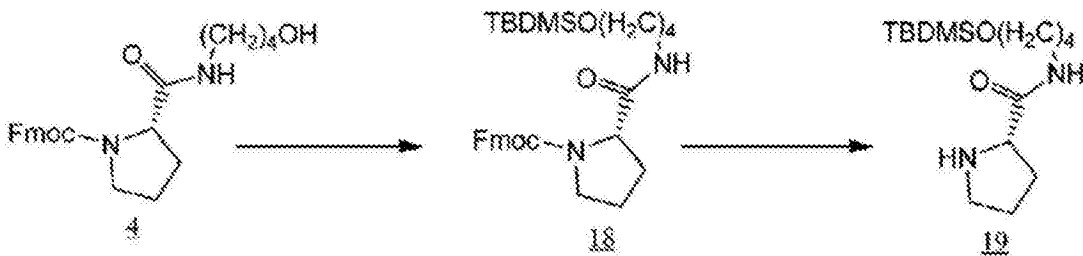
[0466] ³¹P-NMR(162MHz,CDCl₃):δ146.94;

[0467] MS(FAB+):m/z802(M⁺),303(DMT^{r+}),201(C₈H₁₉N₂OP⁺)。

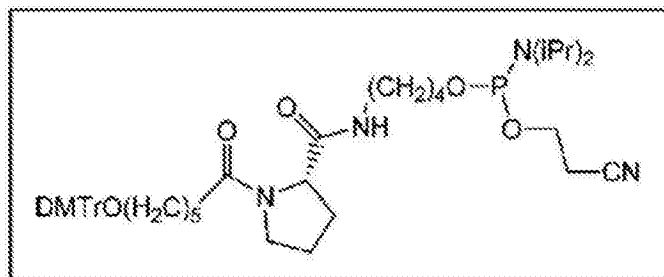
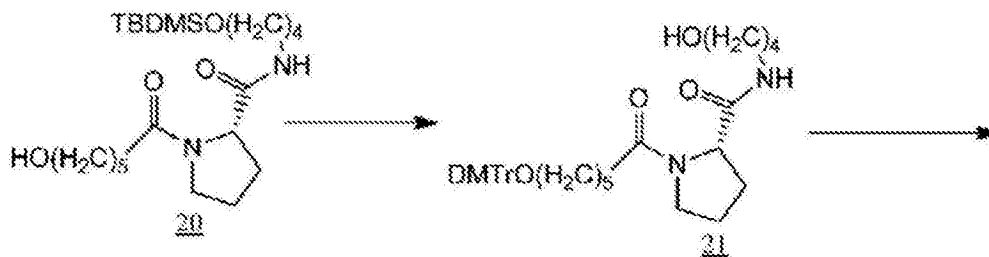
[0468] (实施例A4)

[0469] 为了生成包含具有脯氨酸骨架的连接子的本发明的核酸分子,通过下述方案4合成L-脯氨酸二酰胺amidite B型。

[0470] [化学式16]



[0471]



L-脯氨酸-二酰胺-amidite(B型)

22

Fmoc: 9-芴甲氧羰基

TBDMS: 叔丁基二甲基甲硅烷基

DMTr: 4,4'-二甲氧基三苯甲基

方案 4

[0472] (1) Fmoc-叔丁基-二甲基甲硅烷氧基酰胺-L-脯氨酸(化合物18)

[0473] 将Fmoc-羟基酰胺-L-脯氨酸(化合物4)(2.00g、30mmol)、叔丁基二甲基甲硅烷基氯化物(1.11g、35mmol)和咪唑(10.90g、71mmol)混合。对于上述混合物,在减压下脱气,填充氩气。在室温下向上述混合物中加入无水乙腈(20mL),在氩气气氛下于室温搅拌整夜。反应结束后,在上述混合物中加入二氯甲烷(150mL),用水清洗3次,并用饱和盐水清洗。回收有机层,用硫酸镁干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂,将其残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=95:5$),得到无色糖浆状的化合物18(2.35g、收率92%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0474] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.76-7.78(m, 2H, Ar-H)、7.50-7.63(m, 2H, Ar-H)、7.38-7.42(m, 2H, Ar-H)、7.29-7.34(m, 2H, Ar-H)、4.10-4.46(m, 4H, CH_2)、3.47-3.59(m, 4H, CH_2)、3.20-3.26(m, 2H, CH)、1.85-1.95(m, 2H)、1.42-1.55(m, 6H)、0.96(s, 9H, t-Bu)、0.02(s, 6H, SiCH_3);

[0475] $\text{Ms}(\text{FAB}^+)$: m/z 523($\text{M}+\text{H}^+$)。

[0476] (2) 叔丁基二甲基甲硅烷氧基酰胺-L-脯氨酸(化合物19)

[0477] 对于所得到的上述Fmoc-叔丁基-二甲基甲硅烷氧基酰胺-L-脯氨酸(化合物18)(1.18g、2.5mmol),加入无水乙腈(5mL)和哌啶(2.4mL),在室温下搅拌1小时。反应结束后,在上述混合物中加入乙腈(50mL),滤除不溶物。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂,将所得到的残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=9:1$),得到无色糖浆状的化合物19(0.61g、收率90%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0478] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 3.71(dd, 1H, $J=9.0\text{Hz}, 5.2\text{Hz}$, CH)、3.61-3.64(m, 2H, CH_2)、3.22-3.28(m, 2H, CH_2)、2.98-3.04(m, 1H, CH)、2.86-2.91(m, 1H, CH)、2.08-2.17(m, 1H, CH)、1.86-1.93(m, 1H, CH)、1.66-1.75(m, 2H, CH_2)、1.52-1.57(m, 4H)、0.89(s, 9H, t-Bu)、0.05(s, 6H, SiCH_3);

[0479] $\text{Ms}(\text{FAB}^+)$: m/z 301($\text{M}+\text{H}^+$)。

[0480] (3) 叔丁基二甲基甲硅烷氧基酰胺羟基酰胺-L-脯氨酸(化合物20)

[0481] 将所得到的上述叔丁基二甲基甲硅烷氧基酰胺-L-脯氨酸(化合物19)(550mg、1.8mmol)、6-羟基己酸(300mg、2.3mmol)、EDC(434mg、2.3mmol)和1-羟基苯并三唑(695mg、4.5mmol)的无水二氯甲烷溶液(20mL)混合。在氩气气氛下于室温向上述混合物中加入三乙胺(689mg、6.8mmol),之后,在氩气气氛下于室温搅拌整夜。将上述混合液用饱和盐水清洗。回收有机层,将上述有机层用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=9:1$),得到无色糖浆状的化合物20(696mg、收率92%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0482] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 4.54(d, 1H, CH)、3.58-3.67(m, 5H)、3.52-3.56(m, 1H, CH)、3.32-3.39(m, 1H)、3.20-3.25(m, 2H)、2.40-2.43(m, 1H, CH)、2.33(t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H, CH_2)、2.05-2.25(m, 2H)、1.93-2.03(m, 1H, CH)、1.75-1.85(m, 1H, CH)、1.50-1.73(m, 8H)、1.37-1.46(m, 2H, CH_2)、0.87(s, 9H, t-Bu)、0.04(s, 6H, SiCH_3);

[0483] $\text{Ms}(\text{FAB}^+)$: m/z 415(M^++1)。

[0484] (4) DMTr-羟基二酰胺-L-脯氨酸B型(化合物21)

[0485] 将所得到的上述叔丁基二甲基甲硅烷氧基酰胺羟基酰胺-L-脯氨酸(化合物20)

(640mg、1.54mmol)与无水吡啶(1mL)混合,在室温下共沸干燥。在所得到的残留物中加入4,4'-二甲氧基三苯甲基氯化物(657mg、1.85mmol)、DMAP(2mg)和无水吡啶(5mL),在室温下搅拌4小时后,加入甲醇(1mL),在室温下搅拌30分钟。将上述混合物用二氯甲烷稀释,用饱和碳酸氢钠水溶液清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。在所得到的残渣中加入无水乙腈(5mL)和含有1mol/L四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液(1.42mL、四丁基氟化铵1.42mmol),在室温下搅拌整夜。反应结束后,在上述混合物中加入乙酸乙酯(100mL),用水清洗后,用饱和盐水清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=95:5$ 、含有0.05%吡啶),得到无色糖浆状的化合物21(680mg、收率73%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0486] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.41-7.44(m,2H,Ar-H)、7.26-7.33(m,4H,Ar-H)、7.18-7.21(m,2H,Ar-H)、7.17-7.21(m,1H,Ar-H)、6.80-6.84(m,4H,Ar-H)、4.51-4.53(d,6.8Hz,1H,CH)、3.79(s,6H,0CH₃)、3.61(dd,2H,J=11Hz,5.4Hz,CH₂)、3.50-3.54(m,1H,CH)、3.36-3.43(m,1H,CH)、3.20-3.26(m,2H,CH₂)、3.05(t,J=6.4Hz,2H,CH₂)、2.38-2.45(m,1H,CH)、2.30(t,J=7.8Hz,2H,CH₂)、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,CH₂);

[0487] $\text{MS}(\text{FAB}^+)$: m/z 602(M^+)、303(DMTr^+)。

[0488] (5)DMTr-二酰胺-L-脯氨酸amidite B型(化合物22)

[0489] 将所得到的上述DMTr-羟基二酰胺-L-脯氨酸B型(化合物21)(637mg、1.06mmol)与无水乙腈混合,在室温下共沸干燥。在所得到的残留物中加入四氮唑二异丙胺(201mg、1.16mmol),在减压下脱气,填充氩气。对于上述混合物加入无水乙腈(1mL),进而加入2-氰基乙氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(350mg、1.16mmol)的无水乙腈溶液(1mL)。将该混合物在氩气气氛下于室温搅拌4小时。将上述混合物用二氯甲烷稀释,用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于使用氨基化硅胶作为填充剂的柱层析(展开溶剂己烷:丙酮=7:3),得到无色糖浆状的化合物22(680mg、纯度95%、收率76%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0490] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 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=7.8Hz,1H,CH)、3.75-3.93(m,3H)、3.79(s,6H,0CH₃)、3.46-3.68(m,5H)、3.34-3.41(m,1H,CH)、3.10-3.31(m,1H,CH)、3.05(t,J=6.3Hz,2H,CH₂)、2.62(t,J=6.3Hz,2H,CH₂)、2.39-2.46(m,1H,CH)、2.29(t,7.3Hz,2H,CH₂)、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,CH₂)、1.18(d,J=6.4Hz,6H,CH₃)、1.16(d,J=6.4Hz,6H,CH₃);

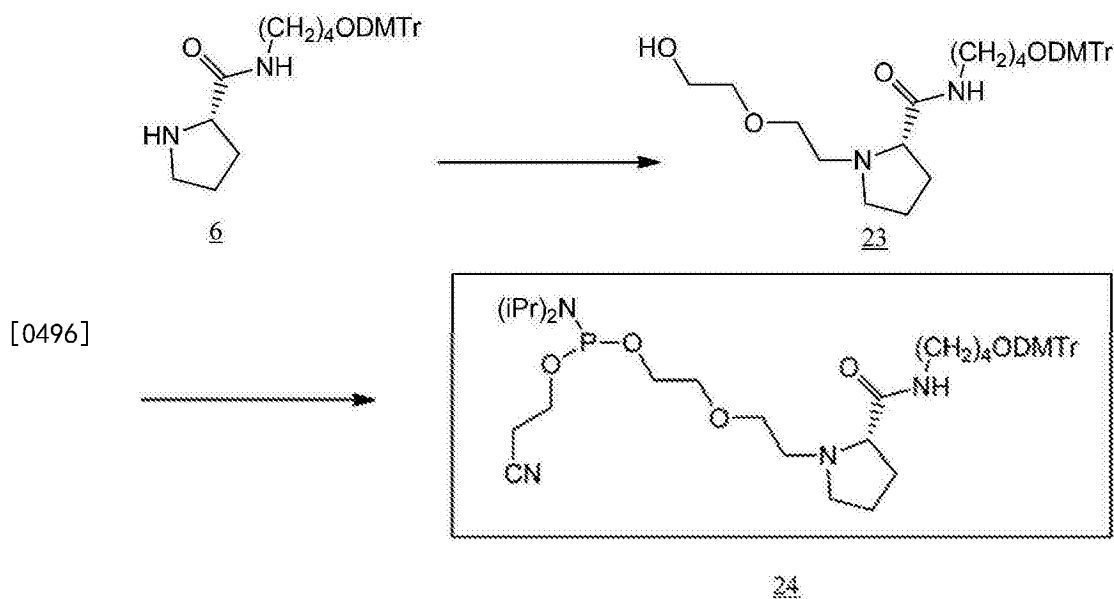
[0491] $\text{P-NMR}(\text{CH}_3\text{CN})\delta$ 146.90;

[0492] $\text{MS}(\text{FAB}^+)$: m/z 803(M^++1)、303(DMTr^+)。

[0493] (实施例A5)

[0494] 为了生成包含具有脯氨酸骨架的连接子的本发明的核酸分子,通过下述方案5合成DMTr-酰胺亚乙氧基乙氨基-L-脯氨酸amidite(以下,称为PEG间隔臂型)。

[0495] [化学式17]



方案 5

[0497] (1)DMTr-酰胺羟基乙氧基乙氨基-L-脯氨酸(化合物23)

[0498] 将DMTr-酰胺-L-脯氨酸(化合物6)(1.00g、2.05mmol)、4-甲苯磺酸2-(2-羟基乙氧基)乙酯(3.10g、12.30mmol)和碳酸钾(0.85g、6.15mmol)的无水二甲基甲酰胺溶液(10mL)混合,在氩气气氛下于室温搅拌4天。对于上述混合物,在减压下于室温蒸馏除去溶剂后,加入二氯甲烷(20mL)并过滤。浓缩滤液,将所得到的残渣供于硅胶柱层析。关于上述硅胶柱层析的展开溶剂,首先,使用含有0.05%吡啶的乙酸乙酯,然后使用含有0.05%吡啶的CH₂Cl₂和CH₃OH的混合液(CH₂Cl₂:CH₃OH=9:1)。其结果,得到无色糖浆状的化合物23(1.15g、收率97%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0499] ¹H-NMR(CDCl₃):δ7.41-7.45(m,2H,Ar-H)、7.27-7.31(m,6H,Ar-H)、7.17-7.21(m,1H,Ar-H)、6.79-6.82(m,4H,Ar-H)、3.79(s,6H,OCH₃)、3.60-3.70(m,2H)、3.39-3.57(m,4H)、3.13-3.27(m,3H)、3.07-3.08(m,2H)、2.71-2.84(m,1H)、2.38-2.46(m,1H)、2.14-2.19(m,1H)、1.84-1.87(m,1H)、1.57-1.76(m,8H)。

[0500] (2)DMTr-酰胺亚乙氧基乙氨基-L-脯氨酸amidite(化合物24)

[0501] 将所得到的上述DMTr-酰胺羟基乙氧基乙氨基-L-脯氨酸(化合物23)(0.63g、1.00mmol)与无水吡啶混合,在室温下共沸干燥。在所得到的残留物中加入四氮唑二异丙胺(206mg、1.20mmol),在减压下脱气,填充氩气。对于上述混合物加入无水乙腈(1mL),进而加入2-氰基乙氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(282mg、1.12mmol)的无水乙腈溶液(1mL)。将该混合物在氩气气氛下于室温搅拌4小时。并且,将上述混合物用二氯甲烷稀释,用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水清洗。回收有机层,用硫酸钠干燥后,过滤上述有机层。对于所得到的上述滤液,在减压下蒸馏除去溶剂。将所得到的残渣供于使用氨基化硅胶作为填充剂的柱层析(展开溶剂己烷:丙酮=7:3、含有0.05%吡啶),得到无色糖浆状的化合物24(0.74g、纯度100%、收率87%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0502] ¹H-NMR(CD₃CN):δ7.41-7.43(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,CH₂)、3.79(s,6H,OCH₃)、3.47-3.64(m,7H)、3.15-3.23(m,1H)、3.11(t,J=6.4Hz,2H,CH₂)、3.01(t,J=5.9Hz,2H,CH₂)、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, CH₃);

[0503] P-NMR(CD₃CN): δ148.00;

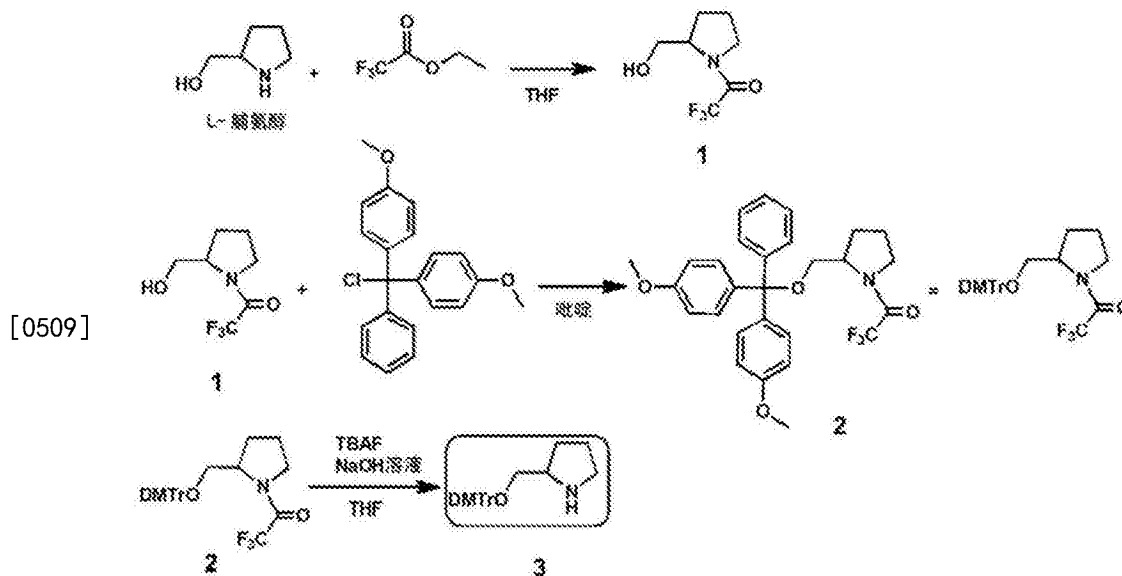
[0504] Ms(FAB⁺): m/z776(M⁺)、303(DMTr⁺)201(C₈H₁₉N₂OP⁺)。

[0505] (实施例A6)

[0506] 1. 保护脯氨酸的合成

[0507] 根据以下所示的方案6, 合成用二甲氧基三苯甲基进行了保护的脯氨酸(化合物3)。

[0508] [化学式18]



方案6

[0510] (1) 三氟乙酰基-L-脯氨酸(化合物1)

[0511] 将L-脯氨酸(2.0g、20mmol)溶解于THF20mL中。另一方面, 将三氟乙酸乙酯(3.0g、21mmol)溶解于THF20mL中。并且, 将后者的THF溶液滴加到前者的含有L-脯氨酸的THF溶液中, 搅拌12小时。将该反应液减压浓缩, 得到化合物1(3.7g、收率97%)。以下, 示出上述化合物的NMR的结果。

[0512] ¹H-NMR(CDCl₃): δ4.28-4.23(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)。

[0513] (2) 三氟乙酰基-DMTr-L-脯氨酸(化合物2)

[0514] 将所得到的上述三氟乙酰基-L-脯氨酸(化合物1)(3.7g、19mmol)溶解于吡啶中, 在室温下共沸干燥3次。将所得到的残留物溶解于吡啶15mL中, 在氩气下在冰浴中一边搅拌一边加入4,4'-二甲氧基三苯甲基氯化物(DMTr-Cl)(8.1g、24mmol), 进而在室温下反应4小时。并且, 为了将过剩的DMTr-Cl淬灭, 在上述反应液中进一步加入甲醇10mL并搅拌10分钟。之后, 在上述反应液中加入二氯甲烷, 并用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水清洗。将清洗后的所回收的有机层用硫酸钠干燥。过滤上述有机层, 将所得到的滤液减压浓缩, 将其残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂CH₂Cl₂:CH₃OH=95:5、含有0.1%吡啶), 得到精制的化合物2(8.5g、收率89%)。以下, 示出上述化合物的NMR的结果。

[0515] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.39-7.18(9H,m,Ar-H),6.82(4H,d,J=8.6Hz,Ar-H),3.78(6H,s,0CH₃),3.70-3.41(5H,H-2,H-5,H-6,m),2.19-1.85(4H,H-3,H-4,m)。

[0516] (3)DMTr-L-脯氨酸(化合物3)

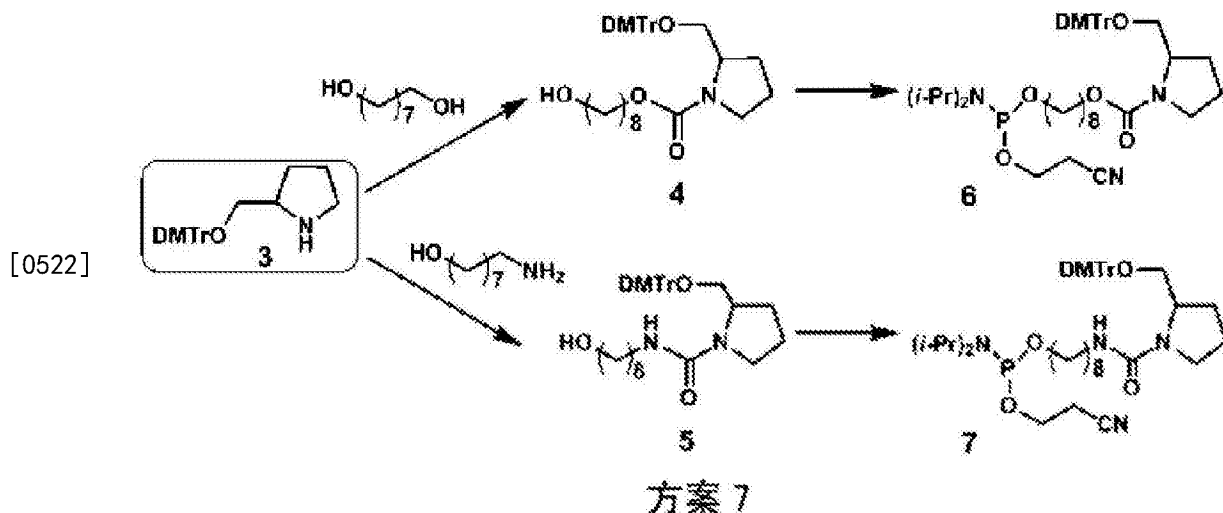
[0517] 将所得到的上述三氟乙酰基-DMTr-L-脯氨酸(化合物2)(5g、10mmol)溶解于THF100mL中。在该THF溶液中加入5%氢氧化钠水溶液100mL并搅拌。在该溶液中加入1M四正丁基氟化铵(TBAF)溶液5mL,在室温下搅拌12小时。将该反应液用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水清洗。将清洗后的所回收的有机层用硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩,得到化合物3(3.6g、收率90%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0518] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H,m,Ar-H),6.82(4H,d,J=8.6Hz,Ar-H),3.78(6H,s,0CH₃),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)。

[0519] 2.amidite衍生物的合成

[0520] 使用上述“1.”中合成的保护脯氨酸(化合物3),通过下述方案7,合成键合形式不同的具有脯氨酸的amidite衍生物。

[0521] [化学式19]



[0523] (1)DMTr-氨基甲酸酯-L-脯氨酸(化合物4)

[0524] 将1,8-辛二醇(9.0g、62mmol)溶解于THF90mL中,放置于氩气下。另一方面,将羰二咪唑(2.0g、12mmol)溶解于THF10mL中。将后者的THF溶液加入到前者的THF溶液中,在室温下搅拌1小时。用水清洗该反应液,直至1,8-辛二醇的TLC点消失为止。进而,将清洗后回收的有机层用饱和盐水清洗,将回收的有机层用无水硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩。将其残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂CH₂Cl₂:CH₃OH=95:5),得到精制的化合物。该化合物是1,8-辛二醇的单末端被羰二咪唑活化的化合物(2.3g、收率77%)。

[0525] 将上述化合物0.9g用乙腈10mL溶解,放置于氩气下。另一方面,将DMTr-L-脯氨酸(化合物3)(1.9g、4.8mmol)溶解于乙腈20mL中。将后者的乙腈溶液加入到上述前者的乙腈溶液中,在室温下搅拌24小时。并且,将该反应液用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水清洗,将回收的有机层用无水硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩。将其残渣供于硅胶柱层析(展开溶剂二氯甲烷:丙酮=9:1、含有0.1%吡啶),得到精制的化合物4(脯氨酸氨基甲酸酯amidite)(1.5g、收率65%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0526] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.40-7.14(9H, m, Ar-H), 6.82(4H, d, $J=8.6\text{Hz}$, Ar-H), 4.24-3.94(2H, m, COOCH_2), 3.78(s, 6H, OCH_3), 3.72-2.96(7H, m, alkyl, H-2, H-5, H-6), 2.10-1.30(16H, m, alkyl, H-3, H-4);

[0527] FAB-MS: 576[M+H]⁺.

[0528] (2)DMTr-脲基-L-脯氨酸(化合物5)

[0529] 在氩气下将三光气(2.0g、6.7mmol)溶解于THF10mL中,于0℃进行搅拌。另一方面,将DMTr-L-脯氨酸(化合物3)(1.3g、3.2mmol)和N,N-二异丙基乙胺(16g、124mmol)溶解于THF10mL中,滴加到上述三光气的THF溶液中。将该反应液在0℃搅拌1小时,接着在室温下搅拌2小时。然后,将8-氨基-1-辛醇(2.3g、16mmol)和N,N-二异丙基乙胺(5.0g、38mmol)溶解于THF30mL中。在该THF溶液中滴加上述搅拌后的反应液,在0℃搅拌1小时,接着在室温下搅拌48小时。将该反应液减压浓缩,将其残渣溶解于二氯甲烷中。将该溶液用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水清洗,将回收的有机层用无水硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩,将其残渣供于反相硅胶柱层析进行精制。此时,展开溶剂使用含有0.1%吡啶的丙酮和水的混合溶剂,上述丙酮和水的混合比例是步进式的,具体而言,使丙酮:水的摩尔比以2:8、3:7、4:6和5:5的顺序变化。用二氯甲烷提取包含目标化合物5的级分,将该有机层用无水硫酸钠干燥。过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩,得到化合物5(脯氨酸脲基amidite)(0.9g、收率49%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0530] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 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);

[0531] FAB-MS: 575[M+H]⁺.

[0532] (3)具有脯氨酸的amidite衍生物(化合物6和7)

[0533] 将作为修饰脯氨酸的所得到的上述化合物4(0.80g、1.4mmol)溶解于乙腈中,在室温下共沸干燥3次。将所得到的残留物溶解于乙腈1mL中,放置于氩气下。在该乙腈溶液中添加四氮唑二异丙胺(0.24g、1.4mmol),作为反应液。另一方面,将2-氰乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(0.50g、1.7mmol)溶解于乙腈1mL中。将其添加到上述反应液中,在室温下搅拌4小时。在上述反应液中加入二氯甲烷,用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和盐水清洗。将清洗后的所回收的有机层用无水硫酸钠干燥,过滤上述有机层,将所得到的滤液减压浓缩。将其残渣供于氨基化硅胶柱层析(展开溶剂己烷:丙酮=10:1、含有0.1%吡啶),得到精制的化合物6(DMTr-氨基甲酸酯-L-脯氨酸amidite)(0.90g、收率83%)。以下示出上述化合物的NMR的结果。

[0534] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 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);

[0535] $^{31}\text{P-NMR}(\text{CD}_3\text{CN})$: δ 146.82;

[0536] FAB-MS: 776[M+H]⁺.

[0537] 作为上述修饰脯氨酸,代替上述化合物4而使用上述化合物5,除此之外同样地进行处理,得到精制的化合物7(DMTr-脲基-L-脯氨酸amidite)(0.80g、收率74%)。以下,示出上述化合物的NMR的结果。

[0538] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 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,CH₂O,POCH₂,CHCH₃,H-2,CH₂NH,CH₂OH,H-2,H-5,H-6),2.73(2H,m,CH₂CN),
2.10-1.48(16H,m,alkyl,H-3,H-4),1.35-1.10(12H,m,CHCH₃);

[0539] ³¹P-NMR(CD₃CN):δ146.83;

[0540] FAB-MS:775[M+H]⁺。

[0541] (实施例B1)RNA的固相合成

[0542] 合成具有本发明的连接子的RNA。根据亚磷酰胺法,利用核酸合成机(商品名ABI Expedite(注册商标)8909Nucleic Acid Synthesis System、Applied Biosystems)从3'侧向5'侧合成RNA。上述合成中使用RNA Phosphoramidites(2'-O-TBDMSi、商品名,三千里制药)作为RNA amidite(以下同样)。上述amidite的脱保护根据常规方法,合成的RNA通过HPLC精制。在以下的实施例中,只要没有特别声明,则RNA的合成同样进行。

[0543] 具体而言,作为本实施例的RNA(Ex),合成具有上述方案2的上述化合物12作为连接子的ssRNA(PH-0001)。首先,合成下述序列号1所示的序列的RNA。并且,在上述RNA的5'末端连结上述化合物12。进而,在上述序列号1所示的RNA的5'侧,通过上述化合物12合成下述序列号2所示的序列的RNA。

[0544] 5'-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3'(序列号1)

[0545] 5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-3'(序列号2)

[0546] 将这样合成的ssRNA称为实施例的ssRNA(PH-0001)。如下述序列号3所示,上述PH-0001具有以下结构:在5'侧具有上述序列号2的RNA序列,在3'侧具有上述序列号1的RNA序列,上述RNA序列通过连接子L_x(即上述化合物12)连结。另外,如下述序列所示,上述序列号2的RNA序列和上述序列号1的RNA序列具有互补的序列。因此,如下式所示,上述PH-0001自退火而形成茎结构。需要说明的是,下述序列中,下划线部分GUUGUCAUACUUCUCAUGG(序列号4)是与GAPDH基因的表达抑制相关的区域。

[0547] Ex:PH-0001(序列号3)

[0548] 5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-L_x-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3'

[0549] [化学式20]

[0550]
$$\begin{array}{l} \text{CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC} \\ \text{UUGGUACUCUUCAUACUGUUGUCGG} \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{L}_x$$

[0551] 另一方面,作为不具有本发明的连接子的比较例的RNA,作为合成RNAi阳性对照(Pc)的下述shRNA(NH-0001)。如下所示,关于上述NH-0001,5'区域的大写字母所示的序列与上述PH-0001同样地为序列号2的RNA序列,3'区域的大写字母所示的序列与上述PH-0001同样地为序列号1的RNA序列。并且,上述NH-0001在序列号2的RNA序列与序列号1的RNA序列之间具有小写字母所示的RNA序列作为连接子,以代替上述化合物12。上述NH-0001与上述PH-0001同样地,如下式所示,自退火而形成茎,形成shRNA的结构。需要说明的是,下述序列中,下划线部分GUUGUCAUACUUCUCAUGG(序列号4)是与表达抑制相关的区域。

[0552] Pc:NH-0001(序列号5)

[0553] 5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCCccacaccGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3'

[0554] [化学式21]

[0555]
$$\begin{array}{l} \text{CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC} \\ \text{UUGGUACUCUUCAUACUGUUGUCGG} \end{array} \begin{array}{l} \text{C}^{\text{C}}\text{A} \\ \text{C} \\ \text{C}^{\text{C}}\text{A} \end{array}$$

[0556] (实施例B2)HCT116细胞中的GAPDH基因的表达抑制效果使用本发明的RNA,确认体外的GAPDH基因的表达抑制。

[0557] (1)材料和方法

[0558] 作为实施例的RNA(Ex),使用上述实施例B1的ssRNA(PH-0001)。将上述RNA溶解于注射用蒸馏水(大塚制药、以下同样)中,以达到期望浓度(1 μ mol/L、5 μ mol/L、25 μ mol/L),制备RNA溶液。

[0559] 细胞使用HCT116细胞(DS Pharma Biomedical),培养基使用含有10%FBS的McCoy's5A(Invitrogen)培养基,培养条件为37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下。

[0560] 首先,在上述培养基中培养HCT116细胞,将其培养液分别以400 μ l、2 \times 10⁴细胞/孔的方式分注到24孔板。进而,将上述孔中的细胞培养24小时后,使用转染试剂Lipofectamine2000(Invitrogen)根据上述转染试剂的所附方案对上述RNA进行转染。具体而言,如下设定上述每孔的组成,进行转染。需要说明的是,上述孔中,上述RNA的最终浓度为1nmol/L、5nmol/L、25nmol/L。

[0561] [表1]

[0562] (每孔的组成: μ L)

培养液	400
(A) Lipofectamine2000	1.5
[0563] (B) Opti-MEM(Invitrogen)	98
(C) RNA溶液	0.5
合计	500

[0564] 转染后,将上述孔中的细胞培养24小时后,使用RNeasy Mini Kit(Qiagen、荷兰),根据所附方案回收RNA。接着,使用逆转录酶(商品名SuperScript III、Invitrogen),根据所附方案,由上述RNA合成cDNA。然后,如下所示,以所合成的上述cDNA为模板进行PCR,测定GAPDH基因的表达量和作为内标的 β -肌动蛋白基因的表达量。上述GAPDH基因的表达量由上述 β -肌动蛋白基因的表达量进行校正。

[0565] 上述PCR中,作为试剂,使用LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I(商品名,Roche),作为设备,使用Light Cycler DX400(商品名,Roche)(以下,同样)。上述GAPDH基因和 β -肌动蛋白基因的扩增分别使用以下的引物对。

[0566] GAPDH基因用PCR引物对

[0567] 5'-GGAGAAGGCTGGGGCTCATTTGC-3'(序列号7)

[0568] 5'-TGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTG-3'(序列号8)

[0569] β -肌动蛋白基因用引物对

[0570] 5'-GCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3'(序列号9)

[0571] 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGTCAC-3'(序列号10)

[0572] 需要说明的是,作为对照1,对于仅添加了上述(B)液100 μ L的细胞也测定基因表达量(-)。另外,作为对照2,在转染中不添加上述RNA溶液,添加合计为100 μ l的上述(A)1.5 μ l和上述(B),除此以外同样地进行处理,对于所得到的细胞也测定基因表达量(mock)。

[0573] 关于校正后的GAPDH基因表达量,将对照(-)的细胞的表达量设为1,求出导入了各RNA的细胞的表达量的相对值。

[0574] (2)结果

[0575] 将这些结果示于图4。图4是示出GAPDH基因表达量的相对值的图表,纵轴为相对基因表达量。如图4所示,上述实施例B1的PH-0001不损害表达抑制活性。另外,认为上述PH-0001被作为本发明的连接子的上述化合物12所稳定化。

[0576] (实施例B3)在人血清中的稳定性

[0577] 对于本发明的RNA,确认了在人血清中的稳定性。

[0578] (1)材料和方法

[0579] 作为实施例的RNA(Ex),使用作为上述实施例B1的ssRNA(PH-0001)。作为比较例的RNA,使用上述实施例B1所示的RNAi阳性对照(Pc)的上述shRNA(NH-0001)。

[0580] 首先,于37℃孵育在1×PBS中混合了上述RNA和正常人血清(MP Biomedicals)的混合液30μl。上述混合液30μl中,上述RNA的添加量为60pmol,上述正常人血清的添加量终浓度为10%。并且,从孵育开始0小时后、0.5小时后、1小时后和2小时后,通过苯酚-氯仿提取停止反应。用15%聚丙烯酰胺凝胶将所得到的提取液电泳后,用SYBR Green II(商品名, Lonza)染色,使用E-BOX-VX2(M&S Instruments、东京)进行分析。

[0581] (2)结果

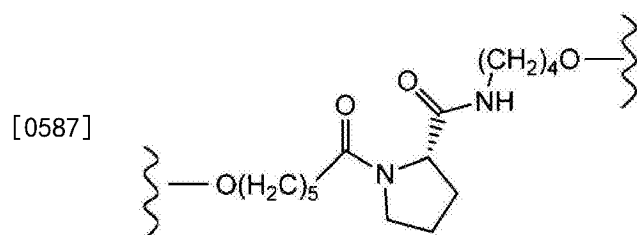
[0582] 将该结果示于图5。图5是表示稳定性的电泳照片。图5中,泳道“M”为分子量标记物,(h)表示孵育时间。

[0583] 如图5所示,由天然的核苷酸构成的比较例的NH-0001在孵育0.5小时后快速的分解反应已经开始,其结果确认到,在0.5小时~2小时的全部结果中,与0小时的结果相比RNA尺寸变小。与此相对,在含有本发明的连接子的实施例的PH-0001中,基本上没有确认到与孵育时间的经过相伴的泳动度的变化、即分解所致的分子量的减少。由该结果可以证实:通过使用具有本发明的连接子的RNA,在人血清中的稳定性提高。

[0584] (实施例B4)HCT116细胞中的GAPDH基因的表达抑制效果

[0585] 合成具有包含脯氨酸的下式的连接子的ssRNA,确认了GAPDH基因的表达抑制效果。

[0586] [化学式22]



[0588] (1)材料和方法

[0589] (1.1)ssRNA的固相合成

[0590] 与上述实施例B1同样地,基于亚磷酰胺法合成上述RNA。

[0591] 作为实施例的RNA(Ex),使用以下所示的ssRNA(PK-0004)。下述序列中,“Lx”和“Ly”分别为包含脯氨酸的上式(化学式22)的连接子。合成上述ssRNA时,根据序列号11,使用上述RNA amidite(商品名RNA Phosphoramidites、三千里制药),从3'侧合成RNA,“Lx”和

“Ly”的部位连结了上述实施例A3-1中合成的DMTr-二酰胺-L-脯氨酸amidite(方案3的化合物10)。需要说明的是,上述序列中,GUUGUCAUACUUCUCAUGG(序列号4)的序列是与表达抑制有关的区域。

[0592] [化学式23]

Ex ssRNA (序列号 11)

[0593] 5' - cangagaaguanjacsacagcc - Lx - GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

[0594] 比较例的RNA使用RNAi阴性对照(Nc)的ssRNA(PK-0003)。下述序列中,“Lx”和“Ly”分别为包含脯氨酸的上式(化学式22)的连接子。合成上述ssRNA时,根据序列号12,使用上述RNAamidite(商品名RNA Phosphoramidites、三千里制药),从3'侧合成RNA,“Lx”和“Ly”的部位连结了上述实施例A3中合成的DMTr-二酰胺-L-脯氨酸amidite(方案3的化合物10)。另外,代替上述与表达抑制有关的序列,为随机序列。

[0595] [化学式24]

NC ssRNA (序列号 12)

[0596] 5' - gcacucaacgaaagagagagcc - Lx - GGCUUUCACUUUCCGUUGAUGGCTUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

[0597] (1.2)基因的表达抑制

[0598] 将冷冻保存的上述RNA以达到20 μ mol/L的方式溶解于注射用蒸馏水(大塚制药)中,制备RNA溶液。

[0599] 使用上述RNA溶液,与上述实施例B2同样地确认了HCT116细胞中的GAPDH基因的表达量。需要说明的是,在转染中,每个孔的组成如下设定。下述组成中,(B)为Opti-MEM(Invitrogen),(C)为20 μ mol/L的上述RNA溶液,两者一共添加98.5 μ l。上述孔中,上述RNA的最终浓度为1nmol/L、3nmol/L、10nmol/L。

[0600] [表2]

[0601] (每孔的组成: μ L)

	培养液	400
	(A) Lipofectamine2000	1.5
[0602]	<u>(B)+(C)</u>	<u>98.5</u>
	合计	500

[0603] (2)结果

[0604] 将这些结果示于图6。图6是表示GAPDH基因表达量的相对值的图表。如图6所示,具有本发明的连接子的实施例的PK-0004显示出强烈的基因表达抑制活性,其活性依赖于投与量。另一方面,阴性对照PK-0003没有观察到抑制效果。

[0605] (实施例B5)切酶蛋白质的反应性

[0606] 确认了重组人切酶蛋白质对于用具有脯氨酸的连接子取代的ssRNA的反应性。

[0607] (1)材料和方法

[0608] 作为实施例的RNA(Ex),使用上述实施例B4的ssRNA(PK-0004)。作为比较例的RNA,

[0622] (每孔的组成:μL)

	A549细胞	293细胞
培养液	400	400
[0623] (A) Lipofectamine2000	1.5	1
(B)+(C)	98.5	99
合计	500	500

[0624] 转染后,与上述实施例B4同样地进行上述细胞的培养、RNA回收、cDNA合成和PCR,测定GAPDH基因的相对表达量。

[0625] (2)结果

[0626] 将这些结果示于图8和图9。图8是A549细胞的结果,图9是293细胞的结果。图8和图9是示出GAPDH基因表达量的相对值的图表。如图8和图9所示,可知实施例的PK-0004显示出强烈的基因表达抑制活性,以依赖于浓度的方式显示出效果。另一方面,作为阴性对照的PK-0003没有观察到抑制效果。

[0627] (实施例B7)HCT116细胞中的GAPDH基因的表达抑制效果

[0628] 使用用具有脯氨酸或脯氨酸的连接子取代的ssRNA,确认了HCT116细胞中的GAPDH表达抑制效果。

[0629] (1)材料和方法

[0630] (1.1)ssRNA的固相合成

[0631] 作为实施例的RNA(Ex ssRNA),合成了与上述实施例B4相同的Ex ssRNA。只要没有特别声明,则上述RNA的合成基于上述实施例B4。

[0632] [化学式26]

Ex ssRNA (序列号 11)

[0633] 5' - cauggagaaggaugscacagcc - Lx - GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUC - Ly - gaa - 3'
Xc Z Yc

[0634] 连接子用amidite使用上述实施例A3-1中合成的L-脯氨酸二酰胺amidite(方案3的化合物10)、上述实施例A6中合成的脯氨酸氨基甲酸酯amidite(方案7的化合物6)、脯氨酸脲基amidite(方案7的化合物7)、脯氨酸酰胺amidite(方案3的化合物12)和脯氨酸酰胺脲基amidite(方案3的化合物17)。关于所合成的各RNA,将连接子部的合成中使用的amidite示于下表。

[0635] [表4]

ssRNA	用于Lx和Ly的amidite
PK-0034	D-脯氨酸二酰胺amidite (方案3的化合物9)
[0650] PK-0036	脯氨酸二酰胺amidite B型 (方案4的化合物22)
PK-0004	L-脯氨酸二酰胺amidite (方案3的化合物10)

[0651] (1.2)基因的表达抑制

[0652] 除了使用上述RNA以外,与上述实施例B4同样地进行向HCT116细胞的转染、培养、RNA回收、cDNA合成和PCR,测定了GAPDH基因的相对表达量。

[0653] (2)结果

[0654] 将这些结果示于图11。图11是示出HCT116细胞的GAPDH基因表达量的相对值的图表。如图11所示,可知包含脯氨酸的ssRNA(PK-0004、PK-0034、PK-0036)显示出强烈的基因表达抑制活性,以依赖于浓度的方式显示出效果。

[0655] (实施例B9)体外的TGF-β1基因的表达抑制效果

[0656] 使用具有脯氨酸的连接子取代的ssRNA,确认了Hepa1-6细胞中的TGF表达抑制效果。

[0657] (1)材料和方法

[0658] (1.1)ssRNA的固相合成

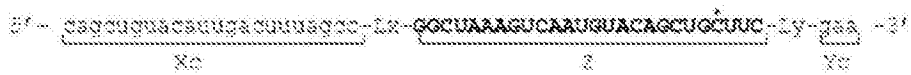
[0659] 作为实施例的RNA,合成了以下所示的PK-0007、PK-0026、PK-0027、PK-0028。如果没有特别声明,则上述RNA的合成基于上述实施例B4。作为连接子用amidite,使用上述实施例A3-1中合成的L-脯氨酸二酰胺amidite(方案3的化合物10)。各RNA具有抑制TGF-β1基因表达的21碱基长的下述序列。该序列基于Cheng等使用的siRNA(Mol.Pharm.,2009,6,772-779)来设计。下述序列中,“*”表示自由碱基。

[0660] TGF-β1基因表达抑制序列(序列号18)

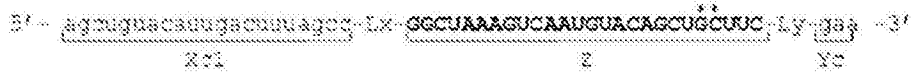
[0661] 5'-AAAGUCA AUGUACAGCUGCUU-3'

[0662] [化学式28]

PK-0007 (序列号 14)

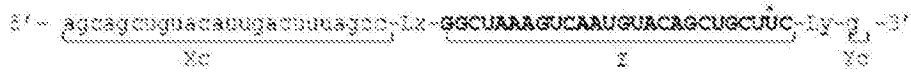


PK-0026 (序列号 15)

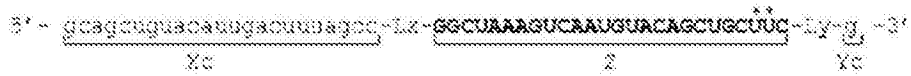


[0663]

PK-0027 (序列号 16)



PK-0028 (序列号 17)



[0664] (1.2)基因的表达抑制

[0665] 将冷冻保存的上述RNA以达到20 $\mu\text{mol/L}$ 的方式溶解于注射用蒸馏水(大塚制药)中,制备RNA溶液。

[0666] 细胞使用Hepal-6细胞(理化学研究所生物资源中心)。培养基使用含有10%FBS的DMEM(Invitrogen)培养基。培养条件为37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂下。

[0667] 在上述培养基中培养Hepal-6细胞,将其培养液分别以400 μl 、3 $\times 10^4$ 细胞/孔的方式分注到24孔板。并且,除了使用上述RNA溶液以外,与上述实施例B4同样地进行向Hepal-6细胞的上述ssRNA的转染、RNA回收和cDNA合成。需要说明的是,关于上述转染,上述孔中的上述RNA的终浓度为1nmol/L。并且,作为引物,使用下述TGF- β 1基因用PCR引物对和 β -肌动蛋白基因用引物对,除此以外与上述实施例B4同样地进行PCR,测定TGF- β 1基因的表达量和作为内标的 β -肌动蛋白基因的表达量。利用作为内标的 β -肌动蛋白基因的表达量校正上述TGF- β 1基因的表达量。

[0668] TGF- β 1基因用PCR引物对

[0669] 5'-CCATTGCTGTCCCGTGCAGAGCTG-3'(序列号19)

[0670] 5'-ATGGTAGCCCTTGGGCTCGTGGATC-3(序列号20)

[0671] β -肌动蛋白基因用引物对

[0672] 5'-GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3'(序列号21)

[0673] 5'-GCAATGCCTGGGTACATGGTGG-3'(序列号22)

[0674] 另外,与上述实施例B4同样地,对于对照(-)和对照(mock),测定基因表达量。并且,关于校正后的TGF- β 1基因表达量,将对照(-)的细胞的表达量设为1,求出导入了各RNA的细胞的表达量的相对值。

[0675] (2)结果

[0676] 将这些结果示于图12。图12是示出TGF- β 1基因表达量的相对值的图表。如图12所示,包含脯氨酸的ssRNA全部显示出强烈的基因表达抑制活性。

[0677] 其中,与自由碱基的位置在上述内部区域(Z)中的从3'末端起第4位和第5位的PK-0007和PK-0026相比,自由碱基的位置在上述内部区域(Z)中的从3'末端起第2位和第3位的

PK-0027和PK-0028显示出更高的表达抑制活性。由该结果可知,与上述内部区域的中央相比,上述内部区域(Z)中的自由碱基的位置越配置于3'侧,则越能够提高上述表达抑制活性。需要说明的是,还已经确认:例如,与上述内部区域的中央相比,上述自由碱基的位置越配置于5'侧,则越能够提高上述表达抑制活性。这样的自由碱基的位置与表达抑制活性的关系显示出与后述的参考例的结果同样的动向。

[0678] (实施例B10)体内的TGF-β1基因表达抑制效果和急性肺损伤抑制效果

[0679] 使用用具有脯氨酸的连接子取代的ssRNA,确认了体内的基因表达抑制和急性肺损伤抑制的效果。上述效果的确认根据Takagi等(J.Thromb Hemost2009;7:2053-2063)记载的方法进行。

[0680] (B10-1)体内的TGF-β1基因的表达抑制效果

[0681] 使用用具有脯氨酸的连接子取代的ssRNA,确认了体内的TGF-β1基因的表达抑制效果。

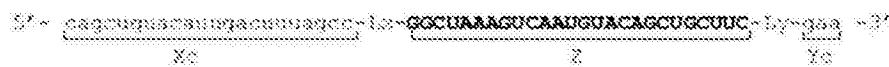
[0682] (1)材料和方法

[0683] (1.1)向急性肺损伤小鼠投与RNA

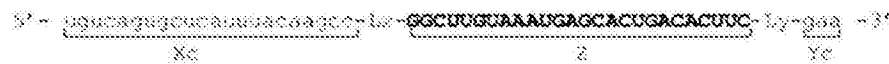
[0684] 实施例的RNA(Ex)使用上述实施例B9中的ssRNA(PK-0007)。比较例的RNA使用以下所示的作为阴性对照(Nc)的ssRNA(PK-0008)、作为阳性对照(Pc)的ssRNA(NK-0033)及其作为阴性对照(Nc)的ssRNA(NK-0035)、作为阳性对照(Pc)的dsRNA(NI-0030)及其作为阴性对照(Nc)的dsRNA(NI-0031)。

[0685] [化学式29]

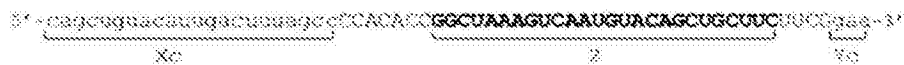
PK-0007 (序列号 14)



PK-0008 (序列号 23)



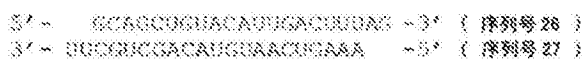
NK-0033 (序列号 24)



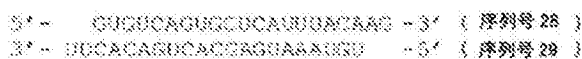
[0686] NK-0035 (序列号 25)



NI-0030



NI-0031



[0687] 将上述RNA100μg溶解于灭菌生理盐水75μl中,制备RNA溶液。另一方面,将100μg的脂多糖(LPS)溶解于灭菌生理盐水50μl中,制备LPS溶液。

[0688] 首先,将上述RNA溶液80μl滴加到小鼠的气管内。滴加后1小时后,在上述小鼠的气管内滴加上述LPS溶液50μl,诱发肺损伤。

- [0689] 作为相对于上述LPS的阴性对照,代替上述LPS溶液而使用未添加LPS的灭菌生理盐水50 μ l。另外,作为相对于上述RNA溶液的阴性对照,使用灭菌生理盐水80 μ l。
- [0690] 以下,示出各投与组。各投与组中,使用4~6只小鼠。
- [0691] • 投与组1
- [0692] 投与灭菌生理盐水75 μ l15分钟后,投与灭菌生理盐水50 μ l
- [0693] • 投与组2
- [0694] 投与灭菌生理盐水75 μ l15分钟后,投与上述LPS溶液50 μ l
- [0695] • 投与组3
- [0696] 投与RNA溶液(PK-0007)75 μ l15分钟后,投与上述LPS溶液50 μ l
- [0697] • 投与组4
- [0698] 投与RNA溶液(PK-0008)75 μ l15分钟后,投与上述LPS溶液50 μ l
- [0699] • 投与组5
- [0700] 投与RNA溶液(NK-0033)75 μ l15分钟后,投与上述LPS溶液50 μ l
- [0701] • 投与组6
- [0702] 投与RNA溶液(NK-0035)75 μ l15分钟后,投与上述LPS溶液50 μ l
- [0703] • 投与组7
- [0704] 投与RNA溶液(NI-0030)75 μ l15分钟后,投与上述LPS溶液50 μ l
- [0705] • 投与组8
- [0706] 投与RNA溶液(NI-0031)50 μ l15分钟后,投与上述LPS溶液50 μ l
- [0707] (1.2)支气管肺泡灌洗液(BALF)的取样
- [0708] 在滴加上述LPS溶液或灭菌生理盐水(相对于LPS的阴性对照)24小时后,向上述小鼠的腹腔投与过量的戊巴比妥,使其安乐死。然后,采集肺,作为样品。
- [0709] 关于上述小鼠的肺样品,使用TGF- β 1Quantikine Colorimetric Sandwich ELISA(商品名,R&D Systems公司),测定单位重量的肺的TGF- β 1表达量。
- [0710] (2)结果
- [0711] 将其结果示于图13。图13是示出各投与组中的单位重量的肺的TGF- β 1基因表达量的图表,横轴表示TGF- β 1蛋白质的表达量。与LPS(+)/ssRNA(-)的投与组2相比,LPS(+)/PK-0007(+的投与组3显著抑制了TGF- β 1蛋白质的表达量。可知该抑制效果比LPS(+)/阳性对照NK-0033(+的投与组5和LPS(+)/阳性对照NI-0030的投与组7更强。需要说明的是,在阴性对照PK-0008(+的投与组4、阴性对照NK-0035(+的投与组6、阴性对照NI-0031(+的投与组8中,没有确认到抑制效果。
- [0712] (B10-2)体内的脱靶效果
- [0713] 使用用具有脯氨酸的连接子取代的ssRNA,确认体内的脱靶效果,评价副作用。
- [0714] 实施例的RNA使用上述实施例B9的ssRNA(PK-0007)。比较例的RNA使用上述实施例B10-1所示的作为RNAi阴性对照(Nc)的上述ssRNA(PK-0008)。将上述RNA100 μ g溶解于灭菌生理盐水75 μ l中,制备各RNA溶液。
- [0715] 以下,示出各投与组。各投与组中,使用2~4只小鼠。
- [0716] • 投与组1
- [0717] 投与灭菌生理盐水75 μ l

[0718] • 投与组2

[0719] 投与ssRNA溶液(PK-0007)75 μ l

[0720] • 投与组3

[0721] 投与ssRNA溶液(PK-0008)75 μ l

[0722] 然后,在投与24小时后,与上述实施例B10-1同样地使小鼠安乐死。对上述小鼠的心脏进行穿刺,回收血液样品,添加到含有3.8%柠檬酸钠水溶液的试管中。上述柠檬酸钠水溶液的量(体积)为上述血液样品的1/10。根据Yasui等(Am J Respir Crit Care Med2001;163:1660-8)的记载,从该混合液回收BALF(支气管肺泡灌洗液)样品。然后,对于上述BALF样品的上清,测定了TNF- α 量和IFN- β 量。

[0723] 使用商品名Mouse TNF set II(Beckton Dickinson and Company),根据其使用说明书对上述TNF- α 量进行定量。另外,使用利用商品名Rabbit Anti-Mouse Interferon β (PBL InterferonSource)和商品名Biotin Labeling Kit-NH₂(同仁化学研究所)制作的ELISA板,根据它们的使用说明书对上述IFN- β 量进行定量。

[0724] 将其结果示于图14。图14的(A)是示出各投与组的BALF样品中的TNF- α 量的图表,图14的(B)是示出各投与组的BALF样品中的IFN- β 量的图表。图14中,横轴表示各量。与ssRNA(-)的投与组1相比,上述PK-0007(+)的实施例投与组2没有引起TNF- α 和IFN- β 的表达。

[0725] (实施例B11)核糖核酸酶耐受性

[0726] 对于本发明的ssRNA,确认了核糖核酸酶耐受性。

[0727] (1)材料和方法

[0728] 作为实施例的RNA(Ex),使用上述实施例B9的ssRNA(PK-0007)。作为比较例的RNA,使用上述实施例B10-1所示的阳性对照(Pc)的dsRNA(NI-0030)。

[0729] 首先,在20mmol/L Tris-HCl(pH8)中混合60pmol的上述RNA、 5×10^{-5} 单位的RNase A(Roche)和 5×10^{-5} 单位的RNase T1(商品名,Roche),于37 $^{\circ}$ C进行孵育。孵育开始10分钟、20分钟、30分钟后,根据常规方法停止RNase的反应。然后,将上述反应液用15%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,用SYBR Green II(商品名,Lonza)染色,使用E-BOX-VX2(商品名,M&S Instruments、东京)进行分析。

[0730] (2)结果

[0731] 将该结果示于图15。图15是示出核糖核酸酶耐受性的电泳照片。图15中,泳道“M”为分子量标记物,(min)表示孵育时间。

[0732] 如图15所示,由天然的核苷酸构成的比较例的NI-0030在孵育10分钟后基本上全部被分解。与此相对,实施例的PK-0007即使孵育10分钟后也残存。由该结果可知,与dsRNA相比,本发明的ssRNA的核糖核酸酶耐受性更优异。

[0733] (实施例B12)核酸酶耐受性

[0734] 对于本发明的ssRNA,确认了核酸酶耐受性。

[0735] (1)材料和方法

[0736] 作为实施例的RNA(Ex),使用上述实施例B9的ssRNA(PK-0007)。作为比较例的RNA,使用上述实施例B10-1所示的RNAi阳性对照(Pc)的dsRNA(NI-0030)。

[0737] 首先,在含有5mmol/L CaCl₂的50mmol/L Tris-HCl(pH8)中混合60pmol的上述

ssRNA、0.5单位的S7核酸酶(Roche),于37℃进行孵育。孵育开始(0小时)0.5小时后,根据常规方法停止S7核酸酶的反应。然后,根据常规方法将上述反应液用7M尿素-15%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,用SYBR Green II(商品名,Lonza)染色,使用E-BOX-VX2(商品名,M&S Instruments)进行分析。

[0738] (2)结果

[0739] 将该结果示于图16。图16是示出S7核酸酶耐受性的电泳照片。图16中,泳道“M”为分子量标记物,(h)表示孵育时间。

[0740] 如图16所示,由天然的核苷酸构成的比较例的NI-0030在孵育0.5小时后基本上全部被分解。与此相对,实施例的PK-0007即使孵育0.5小时后也残存。由该结果可知,与dsRNA相比,本发明的ssRNA的S7核酸酶耐受性更优异。

[0741] 由上述实施例B的各结果可知,本发明的ssPN例如不依赖于靶基因的种类,能够构筑。由此,可以说本发明的ssPN分子是在基因的表达抑制中能够不依赖于靶基因的种类而使用的通用性高的新型工具。

[0742] (参考例1)

[0743] 使用自由碱基的位置不同的ssRNA,确认了体外的GAPDH基因的表达抑制。

[0744] (1)材料和方法

[0745] 作为RNA,使用图17所示的ssRNA。图17中,右端的编号表示序列号。图17中,从5'侧起,小写字母下划线的区域表示上述区域(Xc),大写字母下划线的区域表示上述内部区域(Z),小写字母下划线的区域表示上述区域(Yc)。上述Xc与上述Z之间为连接子区域(Lx),上述Z与上述Yc之间为连接子区域(Ly)。另外,“Xc/Yc”表示上述区域(Xc)的碱基长(Xc)与上述区域(Yc)的碱基长(Yc)之比。图17中,“*”表示自由碱基。

[0746] 各ssRNA均使内部区域(Z)的碱基长为26碱基,使连接子区域(Lx)的碱基长为7碱基,使连接子区域(Ly)的碱基长为4碱基。另外,NK-0036和NK-0040使上述区域(Xc)与上述区域(Yc)的总碱基数(Xc+Yc)为26碱基,除此以外,使上述区域(Xc)与上述区域(Yc)的总碱基数(Xc+Yc)为25碱基。并且,在该条件下,变化上述区域(Xc)和上述区域(Yc)的碱基长。由此,NK-0036和NK-0040为不具有自由碱基的分子。另外,这些以外的各ssRNA使上述内部区域(Z)中的不形成双链的自由碱基全为1碱基,并且使上述内部区域(Z)中的上述自由碱基的位置从3'侧变动到5'侧。

[0747] 除了使用上述RNA以外,与上述实施例B2同样地进行向HCT116细胞的转染、培养、RNA回收、cDNA合成和PCR,测定了GAPDH基因的相对表达量。转染时的RNA浓度为10nmol/L。

[0748] (2)结果和考察

[0749] 将这些结果示于图18。图18是示出使用终浓度为10nmol/L的RNA时的GAPDH基因表达量的相对值的图表。如图18所示,关于使上述5'侧区域(Xc)和上述3'侧区域(Yc)的长度变化的任一ssRNA,均能够确认GAPDH基因的表达抑制。

[0750] 特别是,随着上述区域(Xc)的碱基长与上述区域(Yc)的碱基长之差变大,确认到相对地基因的表达量降低、表达抑制活性增加。即,可知:与上述内部区域的中央相比,上述内部区域(Z)中的自由碱基的位置越配置于5'侧或3'侧,则越能够提高上述表达抑制活性。

[0751] (参考例2)

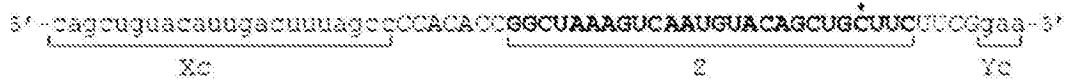
[0752] 使用自由碱基的位置不同的ssRNA,确认了体外的TGF-β1基因的表达抑制效果。

[0753] (1)材料和方法

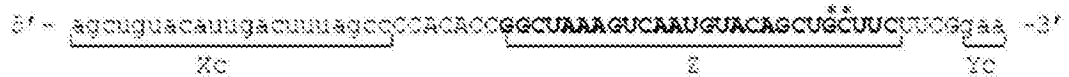
[0754] 作为RNA,使用以下所示的ssRNA。下述序列中,“*”表示自由碱基。

[0755] [化学式30]

NK-0033 (序列号 49)

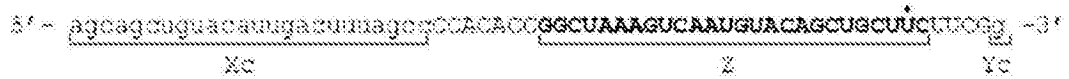


NK-0061 (序列号 50)

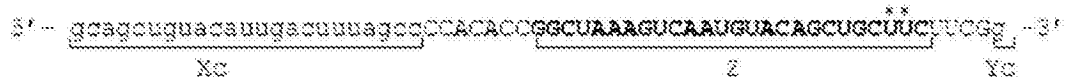


[0756]

NK-0055 (序列号 51)



NK-0062 (序列号 52)



[0757] (1.2)基因的表达抑制

[0758] 将冷冻保存的上述RNA以达到 $20\mu\text{mol/L}$ 的方式溶解于注射用蒸馏水中,制备RNA溶液。并且,除了使用上述RNA溶液以外,与上述实施例B9同样地进行向Hepa1-6细胞的上述ssRNA的转染、RNA回收、cDNA合成和PCR。测定TGF- β 1基因的相对表达量。转染时的RNA浓度为 1nmol/L 。

[0759] (2)结果

[0760] 将这些结果示于图19。图19是示出TGF- β 1基因表达量的相对值的图表。如图19所示,所有ssRNA均表现出基因表达抑制活性。另外,与使自由碱基的位置在上述内部区域(Z)中的从3'末端起第4位和第5位的NK-0033和NK-0061相比,使自由碱基的位置在上述内部区域(Z)中的从3'末端起第2位和第3位的NK-0055和NK-0062显示出更高的表达抑制活性。该结果是与以不同基因为靶标的上述参考例1同样的动向。

[0761] (参考例3)

[0762] 使用自由碱基的位置不同的ssRNA,确认了体外的LAMA1基因的表达抑制。

[0763] (1)材料和方法

[0764] 作为RNA,使用以下所示的ssRNA。下述序列中,“*”表示自由碱基。

[0765] [化学式31]

NK-0043 (序列号 53)



[0766]

NK-0064 (序列号 54)



[0767] 除了使用上述RNA以外,与上述实施例B6同样地进行向293细胞的转染,将上述细胞培养48小时。转染时的RNA浓度为10nmol/L。并且,作为引物,使用以下的LAMA1基因用引物对,除此以外与上述实施例B2同样地进行RNA回收、cDNA合成和PCR,测定LAMA1基因的表达量和作为内标的β-肌动蛋白基因的表达量。利用作为内标的β-肌动蛋白基因的表达量校正上述LAMA1基因的表达量。

[0768] LAMA1基因用引物对

[0769] 5'-AAAGCTGCCAATGCCCTCGACC-3'(序列号55)

[0770] 5'-TAGGTGGGTGGCCCTCGTCTTG-3'(序列号56)

[0771] 另外,与上述实施例B2同样地,对于对照1(-)和对照2(mock)也测定了表达量。并且,关于校正后的LAMA1基因表达量,将对照(-)的细胞的表达量设为1,求出导入了各RNA的细胞的表达量的相对值。

[0772] (2)结果

[0773] 将这些结果示于图20。图20是示出293细胞中的LAMA1基因的表达量的相对值的图表。如图20所示,所有ssRNA均显示出基因表达抑制活性。另外,与使自由碱基的位置在上述内部区域(Z)中的从3'末端起第4位的NK-0043相比,使自由碱基的位置在上述内部区域(Z)中的从3'末端起第2位的NK-0064显示出更高的表达抑制活性。该结果是与以不同基因为靶标的上述参考例1和参考例2同样的动向。

[0774] (参考例4)

[0775] 使用自由碱基的位置不同的ssRNA,确认了体外的LMNA基因的表达抑制。

[0776] (1)材料和方法

[0777] 作为RNA,使用以下所示的ssRNA。下述序列中,*表示自由碱基。

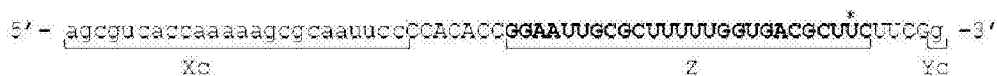
[0778] [化学式32]

NK-0063 (序列号 57)



[0779]

NK-0066 (序列号 58)



[0780] 除了使用上述RNA以外,与上述实施例B6同样地进行向A549细胞的转染,将上述细胞培养48小时。转染时的RNA浓度为3nmol/L。并且,作为引物,使用以下的LMNA基因用引物

对,除此以外与上述实施例B2同样地进行RNA回收、cDNA合成和PCR,测定LMNA基因的表达式和作为内标的 β -肌动蛋白基因的表达式。利用作为内标的 β -肌动蛋白基因的表达式校正上述LMNA基因的表达式。

[0781] LMNA基因用引物对

[0782] 5'-CTGGACATCAAGCTGGCCCTGGAC-3'(序列号59)

[0783] 5'-CACCAGCTTGCGCATGGCCACTTC-3'(序列号60)

[0784] 另外,与上述实施例B2同样地,对于对照1(-)和对照2(mock)也测定了表达式。并且,关于校正后的LMNA基因表达式,将对照(-)的细胞的表达式设为1,求出导入了各RNA的细胞的表达式的相对值。

[0785] (2)结果

[0786] 将这些结果示于图21。图21是示出A549细胞中的LMNA基因的表达式相对值的图表。如图21所示,所有ssRNA均显示出基因表达抑制活性。另外,与使自由碱基的位置在上述内部区域(Z)中的从3'末端起第4位的NK-0063相比,使自由碱基的位置在上述内部区域(Z)中的从3'末端起第2位的NK-0066显示出更高的表达抑制活性。该结果是与以不同的基因为靶标的上述参考例1~参考例3同样的动向。

[0787] 由参考例1~参考例4的结果可知,例如,关于自由碱基的位置,与靶基因的种类以及针对其的表达抑制序列无关,显示出同样的动向。并且,上述实施例B9中,如上所述,显示出与这些参考例同样的动向。

[0788] (参考例5)

[0789] 使用改变了上述内部5'侧区域(X)、上述5'侧区域(Xc)、上述内部3'侧区域(Y)和上述3'侧区域(Yc)的各长度的ssRNA,确认了体外的GAPDH基因的表达抑制。

[0790] (1)材料和方法

[0791] 作为RNA,使用图22所示的ssRNA。图22中,右端的编号表示序列号。图22中,从5'侧起,小写字母下划线的区域表示上述区域(Xc),大写字母下划线的区域表示上述内部区域(Z),小写字母下划线的区域表示上述区域(Yc)。另外,“Xc+Yc/X+Y”表示上述区域(Xc)和上述区域(Yc)的碱基长的合计与上述区域(X)和上述区域(Y)的碱基长的合计之比。图22中,“*”表示自由碱基。

[0792] 各ssRNA均使连接子区域(Lx)的碱基长为7碱基,使连接子区域(Ly)的碱基长为4碱基,使上述区域(Yc)的碱基长为1碱基,使从上述内部区域(Z)的3'侧起第2位的碱基为自由碱基。并且,改变上述内部区域(Z)的碱基长和上述区域(Xc)的碱基长。

[0793] 只要没有特别声明,与上述实施例B2同样地对上述RNA进行向HCT116细胞的转染、培养、RNA回收、cDNA合成和PCR,计算出GAPDH基因的表达式相对值。关于上述转染的条件,使上述每孔的组成与上述实施例B4的表2相同。

[0794] (2)结果和考察

[0795] 将这些结果示于图23。图23是示出使用终浓度为1nmol/L的RNA时的GAPDH基因表达式相对值的图表。如图23所示,对于改变了上述区域(X)、上述区域(Xc)、上述区域(Y)和上述区域(Yc)的长度的任意ssRNA,均能够确认GAPDH基因的表达抑制。

[0796] 以上,参照实施方式对本申请发明进行了说明,但本申请发明不限于上述实施方式。可以在本申请发明的范围内对本申请发明的构成、详细内容进行本领域技术人员能

够理解的各种变更。

[0797] 本申请主张以2010年8月3日提交的日本申请特愿2010-174915、2010年10月13日提交的日本申请特愿2010-230806、2010年12月2日提交的日本申请特愿2010-269823和2011年7月8日提交的日本申请特愿2011-152381为基础的优先权,并将其公开内容全部引用于此。

[0798] 产业上的可利用性

[0799] 根据本发明的ssPN分子,能够进行基因的表达抑制,并且由于不是环状,因而其合成容易,另外,由于是单链,因此不存在双链的退火工序,能够高效地制造。另外,由于上述连接子区域包含上述非核苷酸残基,因而不限于例如以往那样的改变核苷酸残基,例如,还能够改变上述连接子区域中的修饰等。这样,如上所述,本发明的ssPN分子能够抑制靶基因表达,因此作为例如医药品、诊断药和农药、以及农药、医学、生命科学等的研究工具有用。

序列表

- <110> 博纳克株式会社
 <120> 具有含氮脂环式骨架的单链核酸分子
 <130> TF11004W0
 <150> JP 2010-174915
 <151> 2010-08-03
 <150> JP 2010-230806
 <151> 2010-10-13
 <150> JP 2010-269823
 <151> 2010-12-02
 <150> JP 2011-152381
 <151> 2011-07-08
 <160> 69
 [0001]
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 核酸分子
 <400> 1
 ggcuuguuguc auacuuuca ugguu 25
 <210> 2
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 核酸分子

	<400> 2	
	ccaugagaag uaugacaaca gcc	23
	<210> 3	
	<211> 48	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 3	
	ccaugagaag uaugacaaca gccggeuguu gucauacuuc ucaugguu	48
	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0002]	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 4	
	guugucauac uucucaugg	19
	<210> 5	
	<211> 55	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 5	
	ccaugagaag uaugacaaca gecccacacc ggcuguuguc auacuucuca ugguu	55
	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	核酸分子	
	<400>	6	
		auuguaacga gacaaacac	19
	<210>	7	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	7	
		ggagaaggct gggctcatt tgc	23
[0003]	<210>	8	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	8	
		tggccagggg tgctaagcag ttg	23
	<210>	9	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	9	
		gccacggetg cttccagctc etc	23

	<210> 10	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 10	
	aggtctttgc ggatgtccac gtcac	25
	<210> 11	
	<211> 51	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 11	
[0004]	caugagaagu augacaacag ccggcuguug ucuaucuucu caugguucga a	51
	<210> 12	
	<211> 51	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 12	
	ccaUCAACGA uaagugaaag ccggcuuUCA cuuaucguug auggcuucga a	51
	<210> 13	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 17	
	gcagcuguac auugacuuua gccggcuaaa gucaauguac agcugcuucg	50
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 18	
	aaagucaaug uacagcugcu u	21
[0006]	<210> 19	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 19	
	ccattgctgt cccgtgcaga gctg	24
	<210> 20	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 20	
	atggtagccc ttggctcgt ggate	25

	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 21	
	gtcgtaccac aggcattgtg atgg	24
	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
[0007]	<400> 22	
	geaatgcctg ggtacatggt gg	22
	<210> 23	
	<211> 51	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 23	
	ugucagugcu cauuacaag ccggcuugua aaugagcacu gacacuucga a	51
	<210> 24	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 核酸分子	
	<400> 24	
	cagcuguaca uugacuuuag ccccacaccg gcuaaaguca auguacagcu gcuucuuucgg	60
	aa	62
	<210> 25	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 25	
	ugucagugcu cauuuacaag ccccacaccg gcuuuuuuuu gagcacugac acuuucuuucgg	60
	aa	62
[0008]	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 正向	
	<400> 26	
	gcagcuguac auugacuuua g	21
	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反向	
	<400> 27	
	aaaguccaag uacagcugcu u	21

	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 正向	
	<400> 28	
	gugucagugc ucuuuacaa g	21
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反向	
[0009]	<400> 29	
	uguaaaugag cacugacacu u	21
	<210> 30	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 30	
	uugcgcuuuu uggugacgc	19
	<210> 31	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

<223> 核酸分子	
<400> 31	
aaccaugaga aguaugacaa cageccaca cggcuguug ucauacuucu caugguucuu	60
cg	62
<210> 32	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸分子	
<400> 32	
accaugagaa guaugacaac agccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuc	60
gg	62
[0010]	
<210> 33	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸分子	
<400> 33	
ccaugagaag uaugacaaca gccccacacc ggcuguuguc auacuucua ugguucucg	60
ga	62
<210> 34	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸分子	

	<400> 34		
	caugagaagü aügacaacag ccccacaccg gcüguüguca uacüüücaü ggüüüüücgg	60	
	aa	62	
	<210> 35		
	<211> 62		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 核酸分子		
	<400> 35		
	augagaagüa ugacaacagc cccacaccgg cüguugücaü acüüüücaüg güüüüücgga	60	
	ac	62	
[0011]	<210> 36		
	<211> 62		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 核酸分子		
	<400> 36		
	ugagaagüaü gacaacagcc ccacaccggc üguugücaüa cüüüücaügg üüüüücgga	60	
	cc	62	
	<210> 37		
	<211> 62		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 核酸分子		
	<400> 37		
	agaagüaüga caacagcccc acaccggcüg üngücaüaüc ücücaüggüü cüücggaacc	60	

au	62
<210> 38	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸分子	
<400> 38	
aaguaugaca acagecccccac accggcuguu gucauaeuic ucaugguucu ucggaaccuu	60
ga	62
<210> 39	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸分子	
<400> 39	
guaugacaac ageccccacac cggcuguugu cauacuucuc augguucuc ggaaccauga	60
ga	62
<210> 40	
<211> 62	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 核酸分子	
<400> 40	
augacaacag cccccacccg gcuguuguca uacuucucau gguucucgg aaccaugaga	60
ag	62

[0012]

	<210> 41		
	<211> 62		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 核酸分子		
	<400> 41		
	acaacagccc cacaccggcu guugucauac uucucauggu ucuucggaac caugagaagu	60	
	au	62	
	<210> 42		
	<211> 62		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
[0013]	<220>		
	<223> 核酸分子		
	<400> 42		
	aacagcccca caecggcugü ügucäuäcuii cücaügügüüc üüücggaacca ügagaagüaii	60	
	ga	62	
	<210> 43		
	<211> 62		
	<212> RNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 核酸分子		
	<400> 43		
	cagcccccaca ccggcuguug ucäuäcuiüü caugguüüüü cggäaccäug ägäägüäügä	60	
	ca	62	

	<210> 44	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 44	
	agccccacac cggcuguugu cauaciucuc augguuciuc ggaaccauga gaaguaugac	60
	aa	62
	<210> 45	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
[0014]	<400> 45	
	gccccacacc ggcuguuguc auacuucua ugguucucg gaaccaugag aaguaugaca	60
	ac	62
	<210> 46	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 46	
	ccccacaccg gcuguuguca uacuucucau gguucucgg aaccaugaga aguaugacaa	60
	ca	62
	<210> 47	
	<211> 62	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 47	
	cccacaccgg cuguugucan acuucucaug guucuucgga accaugagaa guaugacaac	60
	ag	62
	<210> 48	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 48	
[0015]	ccacaccggc uguugucuaa cuucucaugg uucuucggaa ccaugagaag uaugacaaca	60
	gc	62
	<210> 49	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 49	
	cagcuguaca uugacuuuag cccacaccg geuaaaguca auguacagcu gcuucuucgg	60
	aa	62
	<210> 50	
	<211> 61	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	核酸分子	
	<400>	50	
		agcuguacau ugacuuuagc cccacaccgg cuaaagucaa uguacagcug cuucucgga	60
		a	61
	<210>	51	
	<211>	62	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	核酸分子	
	<400>	51	
		agcagcugua caugacuuu agccceacac cggcuaaagu caauguacag cugcuucuc	60
		gg	62
[0016]			
	<210>	52	
	<211>	61	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	核酸分子	
	<400>	52	
		gcagcuguac auugacuuua gcccacacc ggcuaaaguc aauguacagc ugcuuucucg	60
		g	61
	<210>	53	
	<211>	62	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 核酸分子	
	<400> 53	
	uguuuguc guuacaaau cccacaccg gauauuguaa cgagacaaac acuccuucgg	60
	ga	62
	<210> 54	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 54	
	aguuuuguc ueguuacaau aucccccacac cggauuuugu aacgagacaa acacuccuuc	60
	gg	62
[0017]	<210> 55	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 55	
	aaagctgcc aatgccctcg acc	23
	<210> 56	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 56	
	taggtgggtg gccctcgtct tg	22

	<210> 57	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 57	
	cgucaccaaa aagcgcauu ccccacaccg gaauugcgcu uuuuggugac gcuucuucgg	60
	aa.	62
	<210> 58	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0018]	<223> 核酸分子	
	<400> 58	
	agcgucacca aaaagegcaa uucccacac cggaauugcg cUUUUUggug acgcuucuuic	60
	gg	62
	<210> 59	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 59	
	ctggacatca agctggccct ggac	24
	<210> 60	
	<211> 24	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 60	
	caccagattg cgcattgcca ctte	24
	<210> 61	
	<211> 64	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 61	
	aaccaugaga aguaugacaa cagccccaca ccggcuguug ucauacuucu caugguucgu	60
[0019]	ucgc	64
	<210> 62	
	<211> 62	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 62	
	accaugagaa guaugacaac agccccacac ccggcuguugu cauacuucuc augguucuc	60
	gg	62
	<210> 63	
	<211> 60	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 核酸分子	
	<400> 63	
	accaugagaa guaugacaac ageccacacc gcuguuguca uacuuucucu gguucuuugg	60
	<210> 64	
	<211> 58	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 64	
	ccaugagaag uaugacaaca geccacaccg cuguugucuu acuuucuaug guuuucga	58
	<210> 65	
	<211> 58	
	<212> RNA	
[0020]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 65	
	accaugagaa guaugacaac ageccacacc uguugucuuu cuucuaugg uuucugg	58
	<210> 66	
	<211> 56	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 66	
	ccaugagaag uaugacaaca gccacaccu guugucuuac uuucuaugg uuucga	56
	<210> 67	
	<211> 54	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 67	
	caugagaagu augacaacag ccacaccug uugucauacu ucucaugguu ucga	54
	<210> 68	
	<211> 54	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0021]	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 68	
	ccaugagaag uaugacaaca ccacaccugu ugucauacuu cucaugguuu ucga	54
	<210> 69	
	<211> 52	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 核酸分子	
	<400> 69	
	caugagaagu augacaacac cacaccuguu gucauacuuc ucaugguuuc ga	52

(A)



(B)

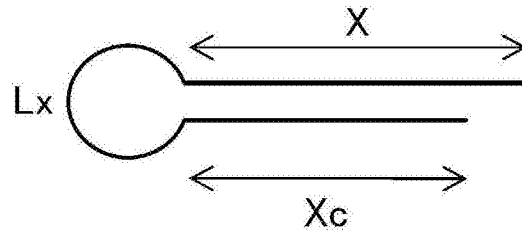
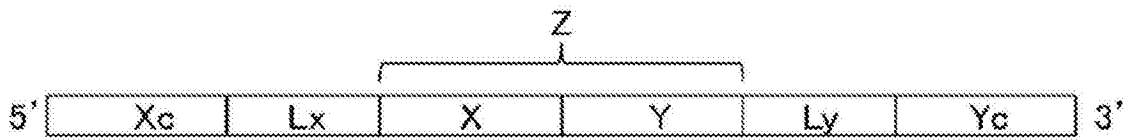


图1

(A)



(B)

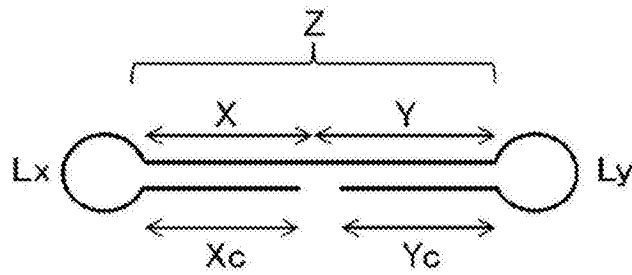


图2

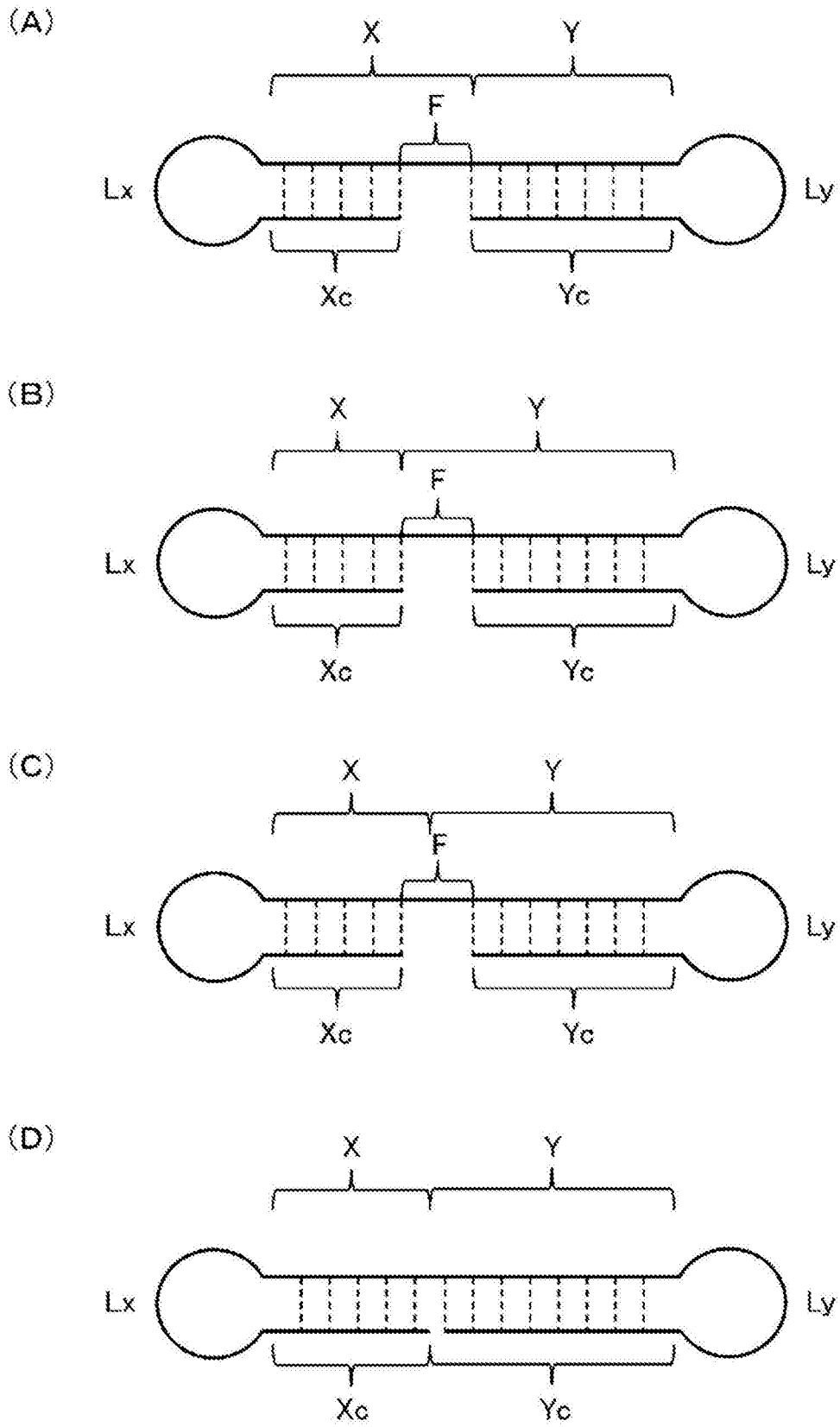


图3

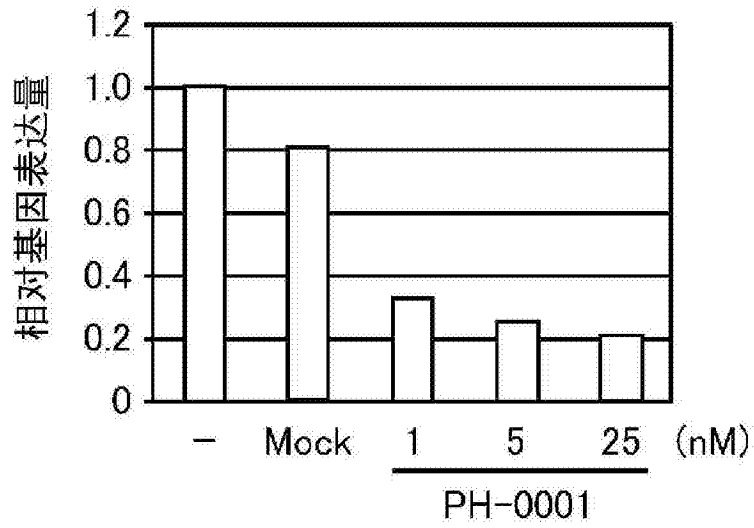


图4

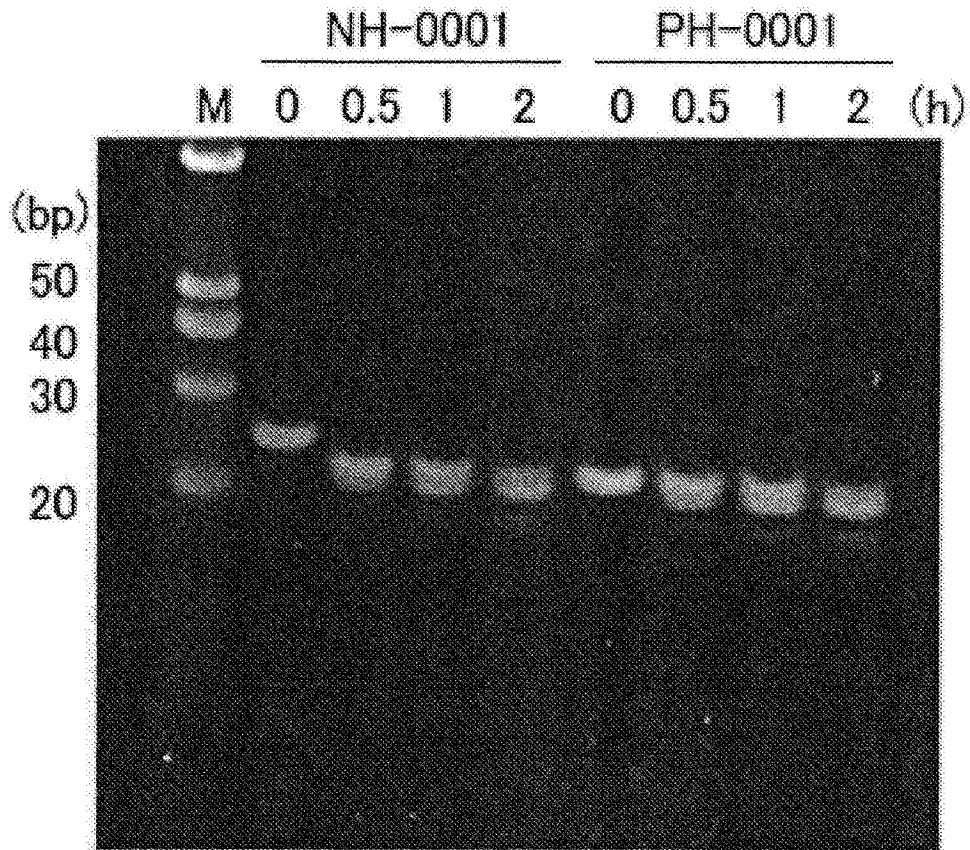


图5

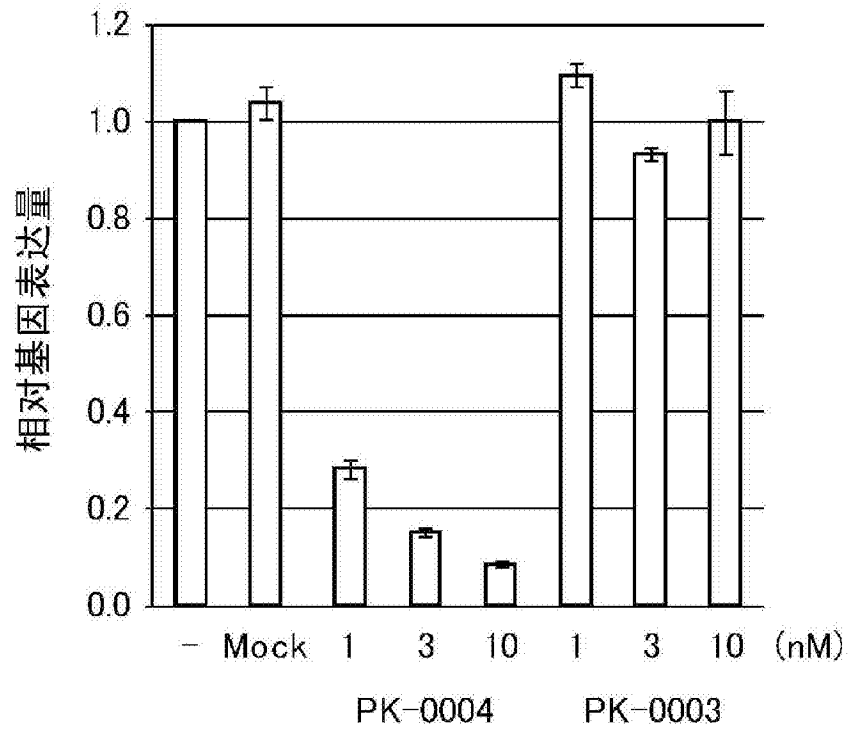


图6

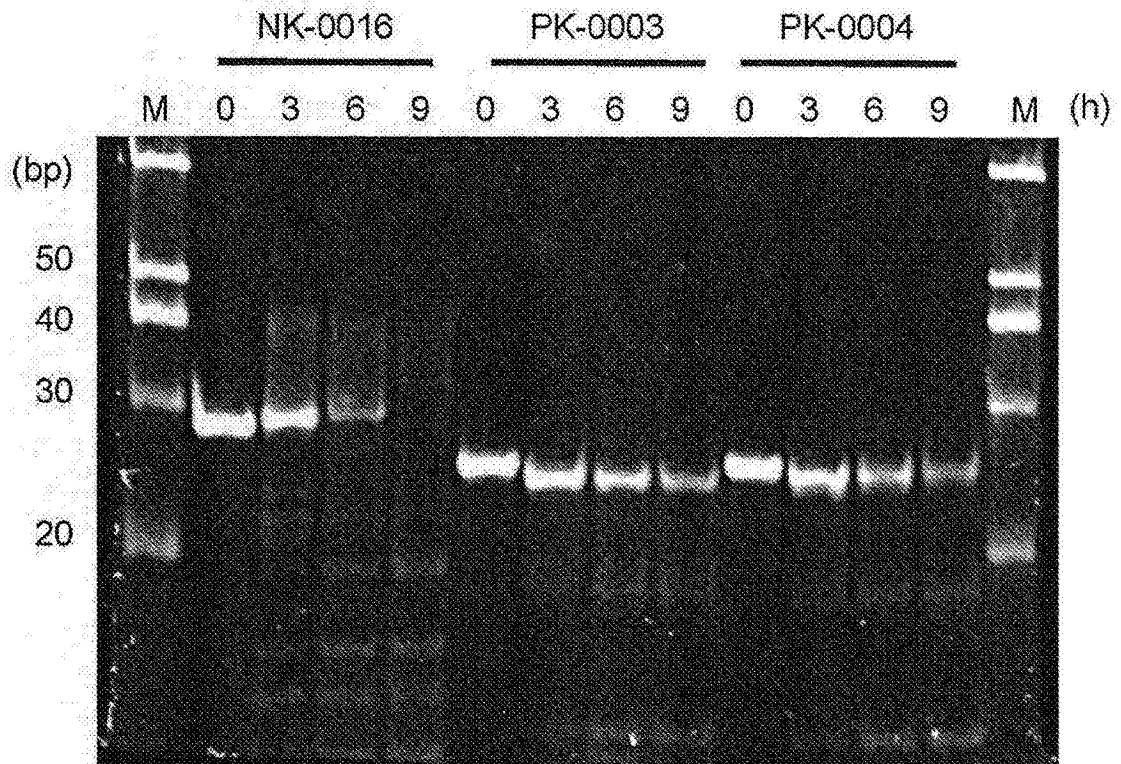


图7

A549细胞

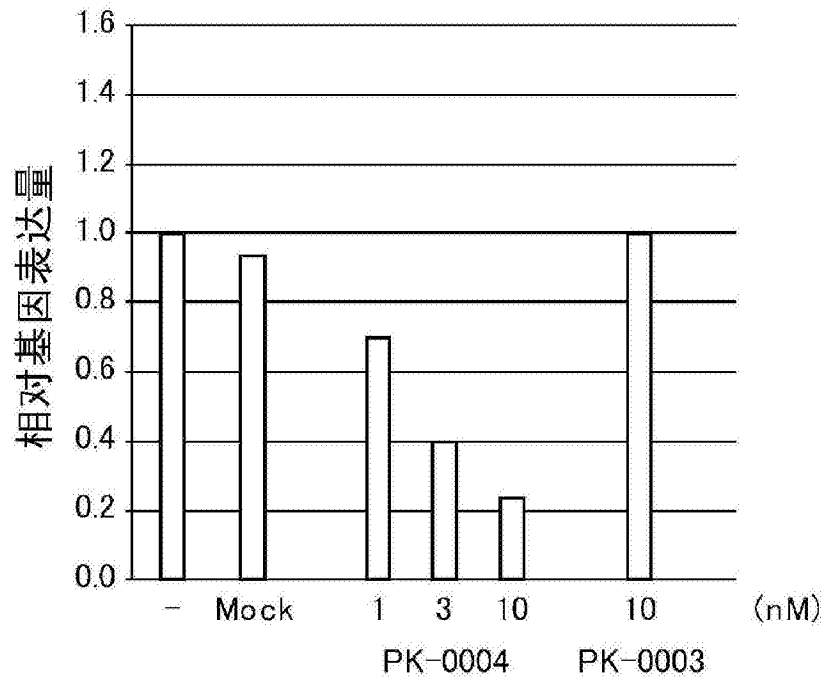


图8

293细胞

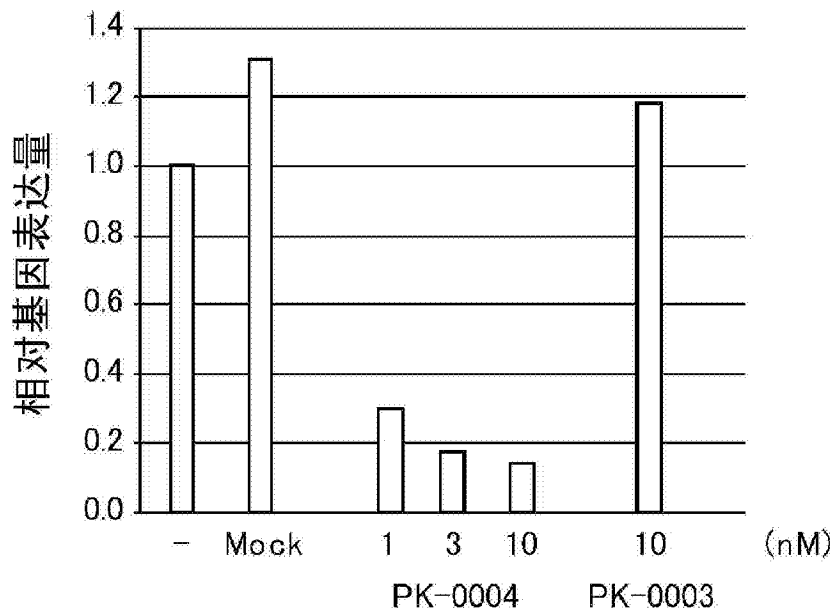


图9

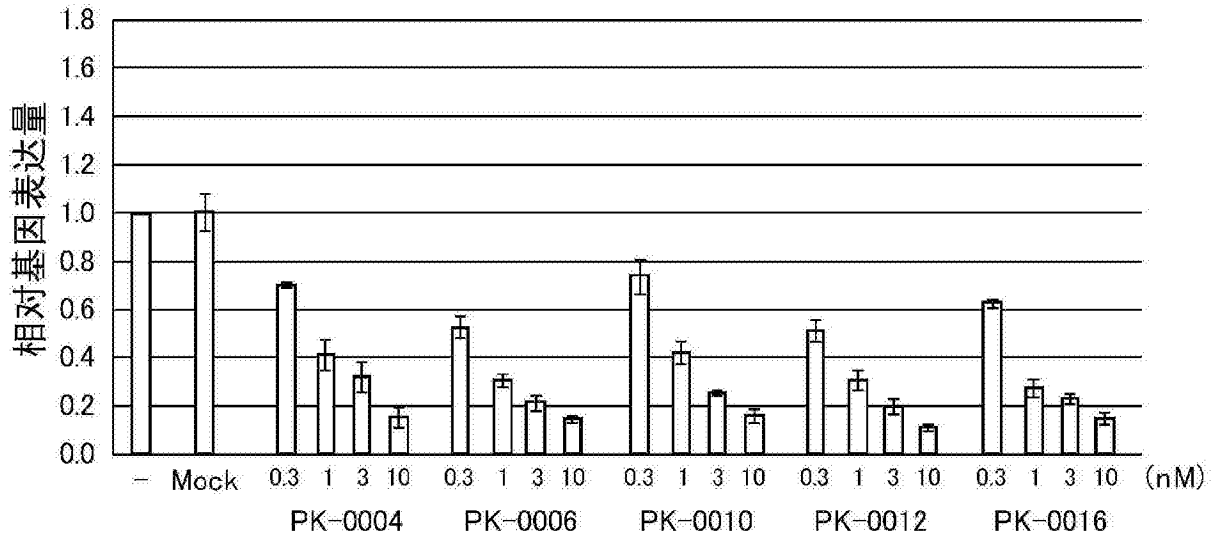


图10

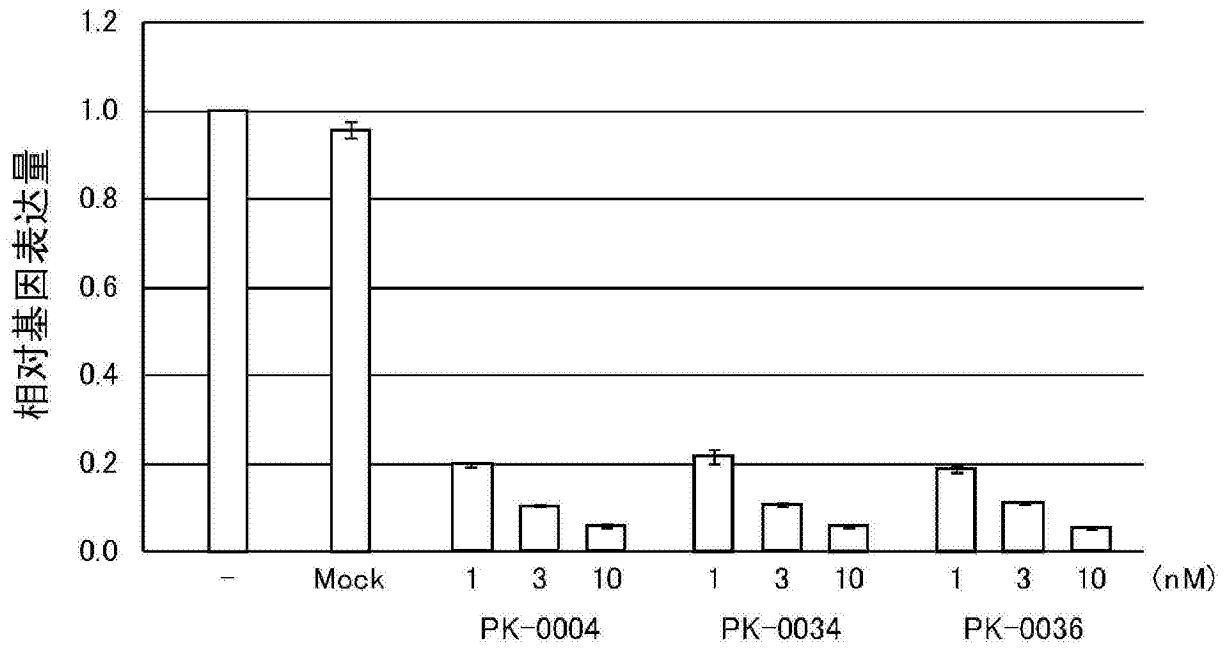


图11

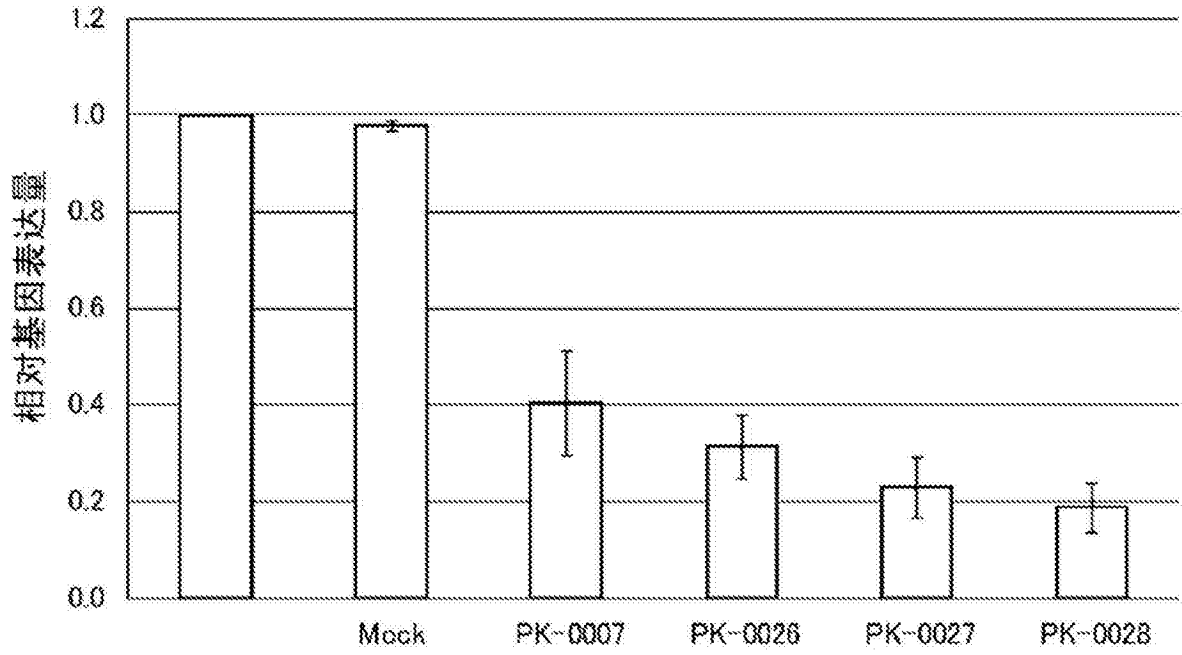


图12

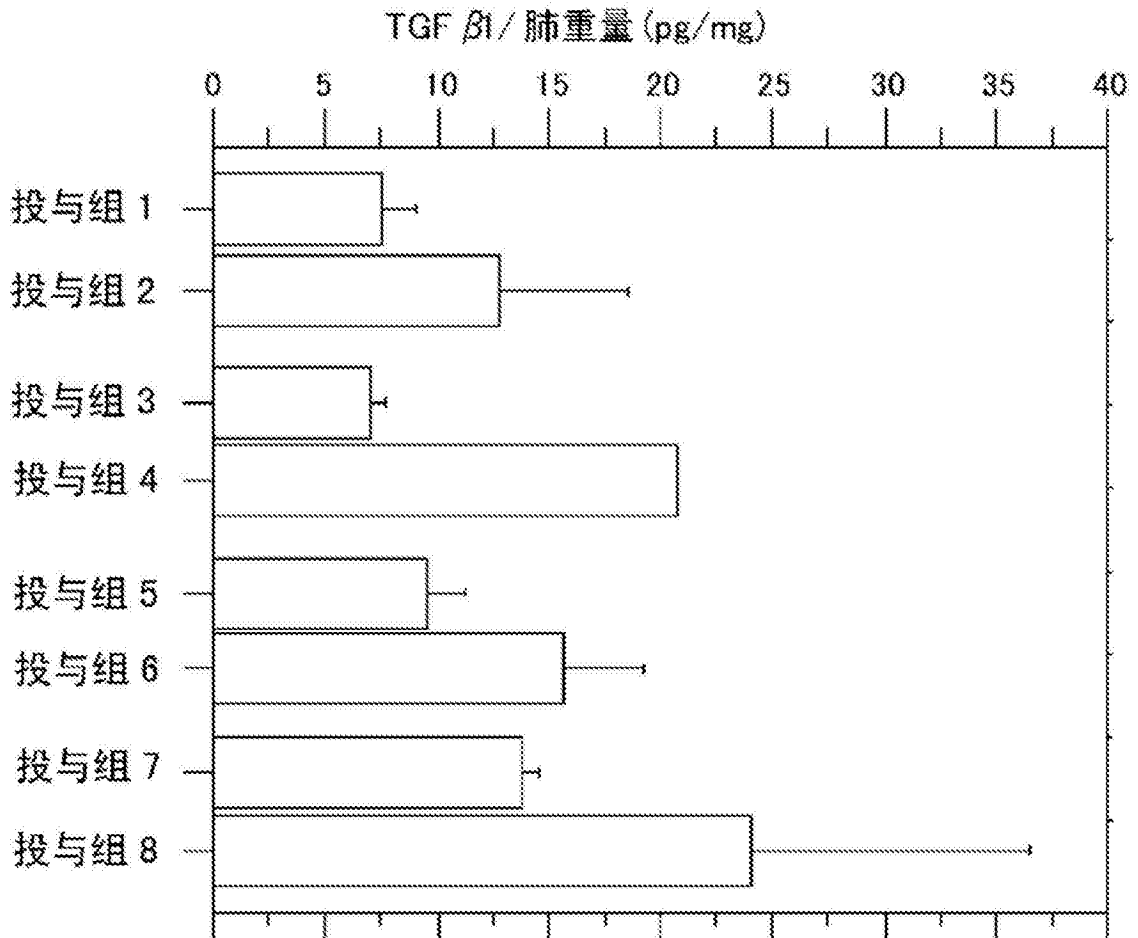


图13

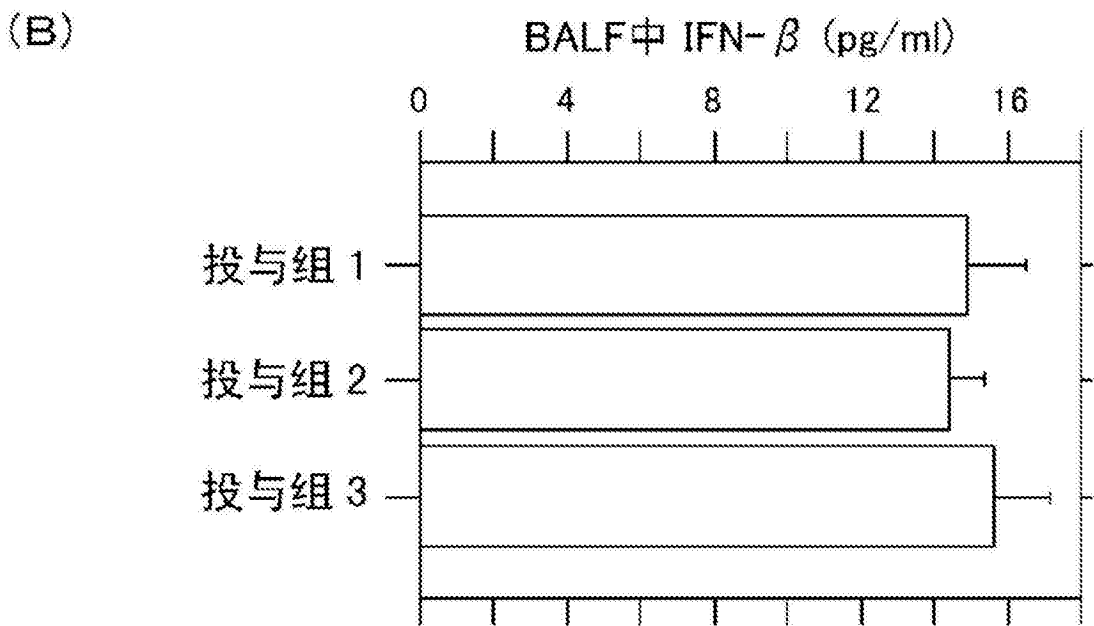
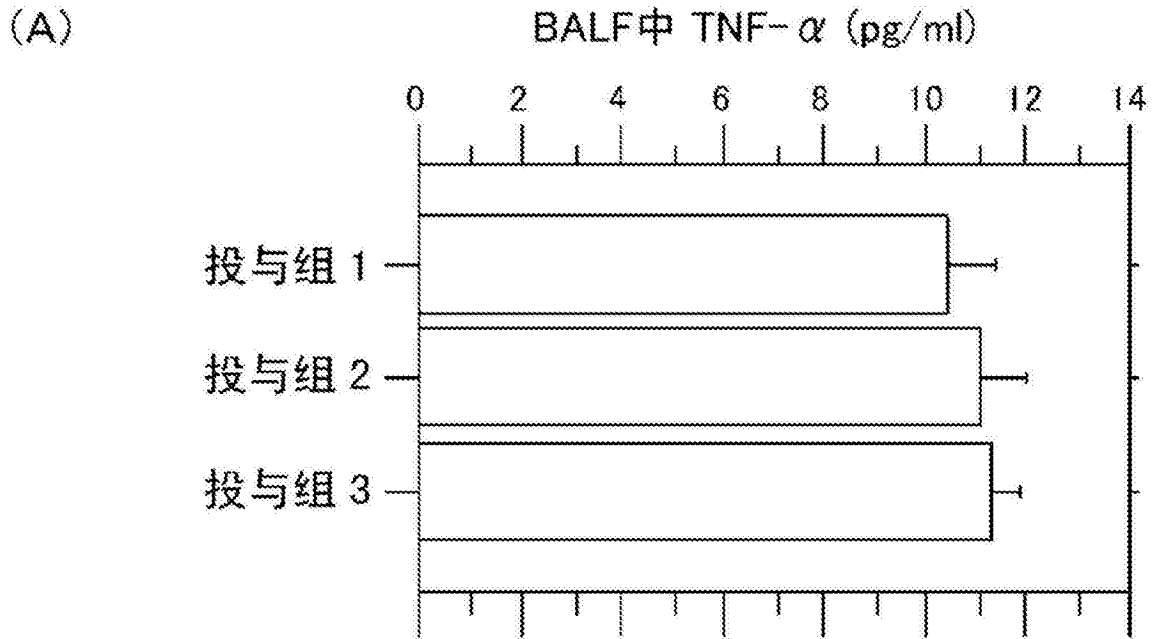


图14

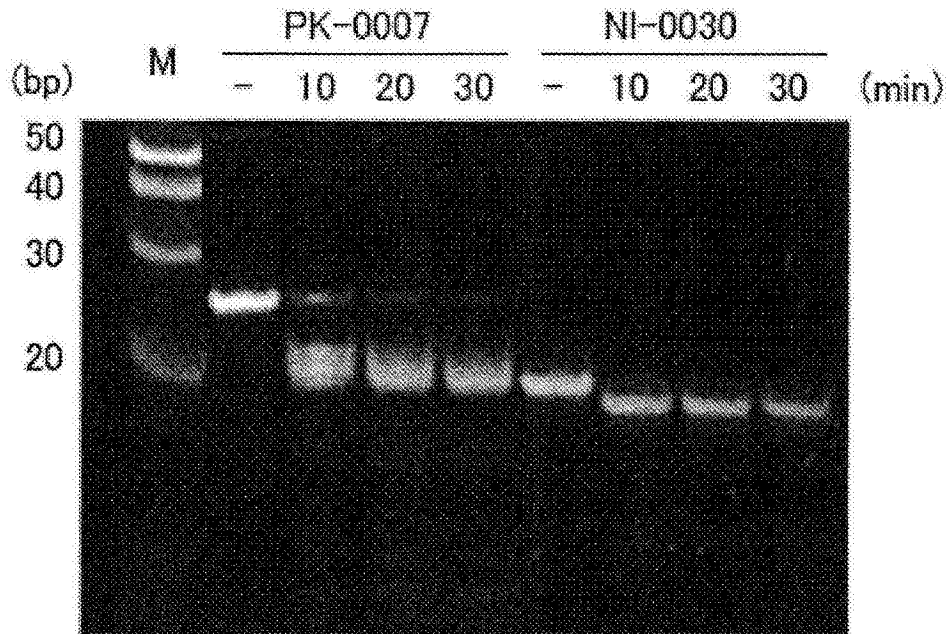


图15

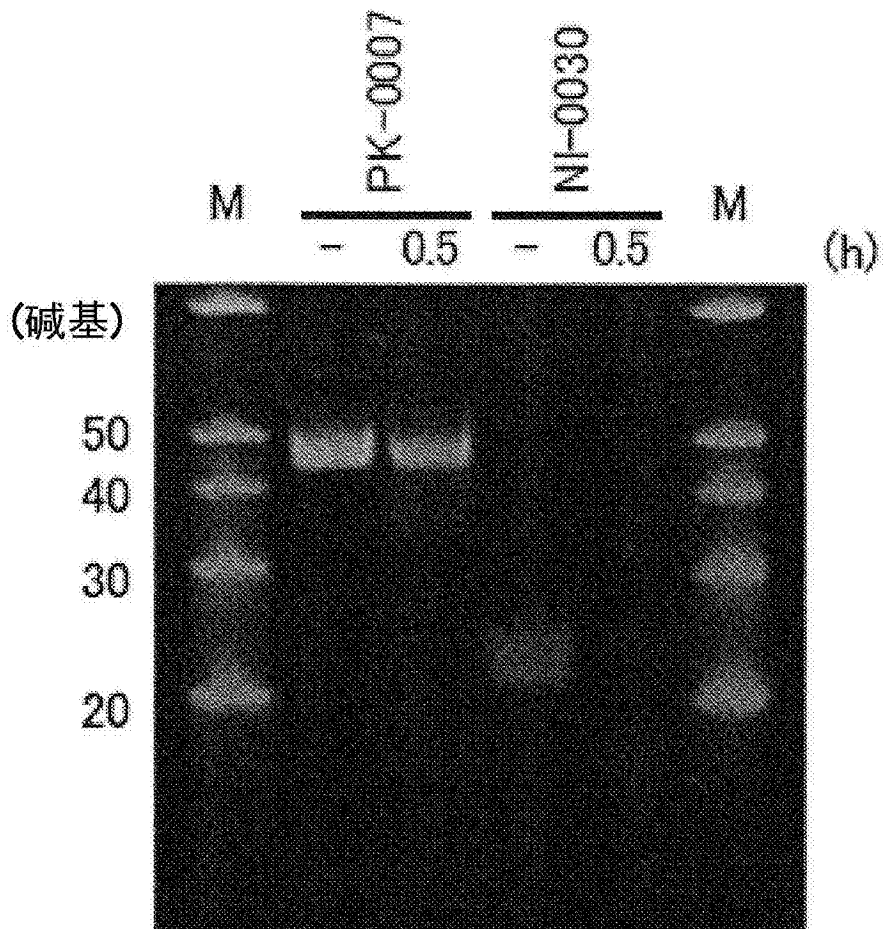


图16

Xc/Yc

NK-0036 25/1 5'- aaaccaucagaaguaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 31

NK-0025 24/1 5'- accaugagagaaquaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 32

NK-0037 23/2 5'- ccaugagagaaquaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 33

NK-0016 22/3 5'- caugagaaguaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 34

NK-0038 21/4 5'- augagaaguaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 35

NK-0026 20/5 5'- ugagaaguaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 36

NK-0027 18/7 5'- agaaguaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 37

NK-0028 16/9 5'- aaguaugagaaquaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 38

NK-0029 14/11 5'- guaugagagaaquaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 39

NK-0014 12/13 5'- augacaagagaaquaugacaaacagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 40

NK-0030 9/16 5'- acaacagagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 41

NK-0031 7/18 5'- aacagagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 42

NK-0020 5/20 5'- cagcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 43

NK-0019 4/21 5'- agcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 44

NK-0018 3/22 5'- gcccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 45

NK-0039 2/23 5'- ccccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 46

NK-0032 1/24 5'- ccccCACACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 47

NK-0040 1/25 5'- cCACCGGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUUCUUCg -3' 48

图17

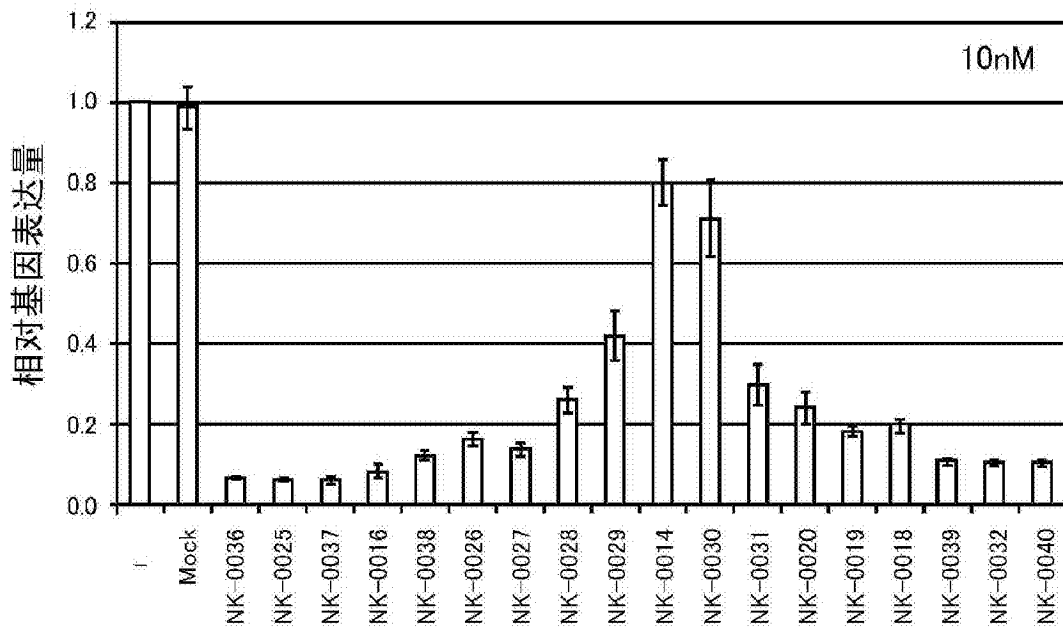


图18

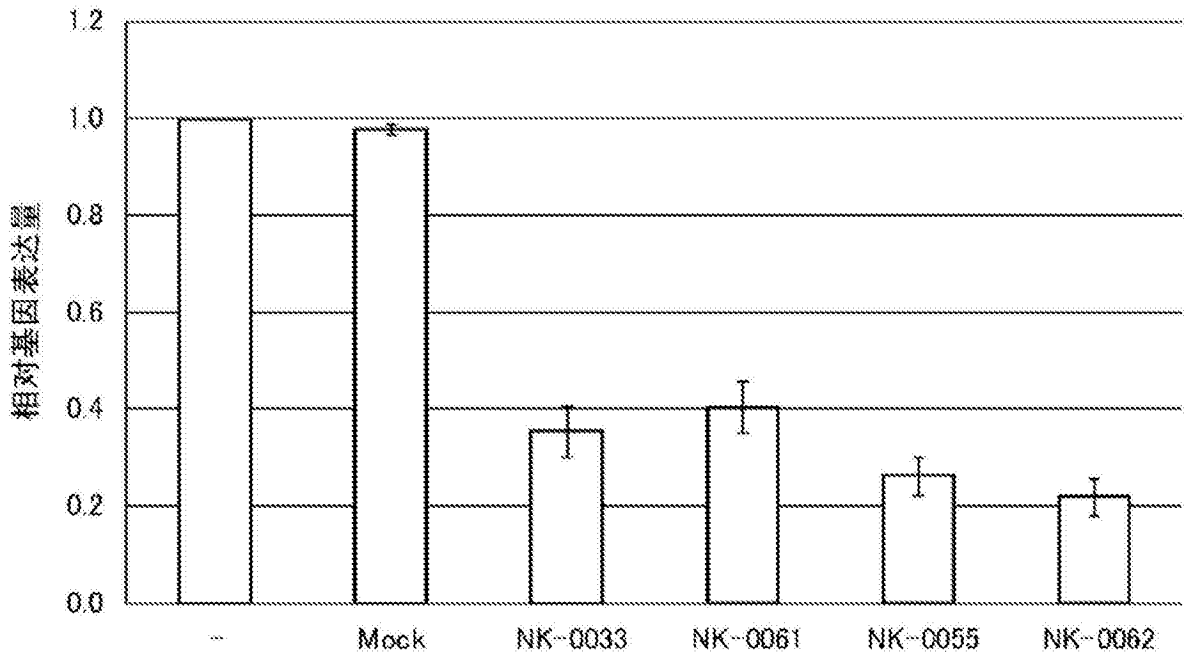


图19

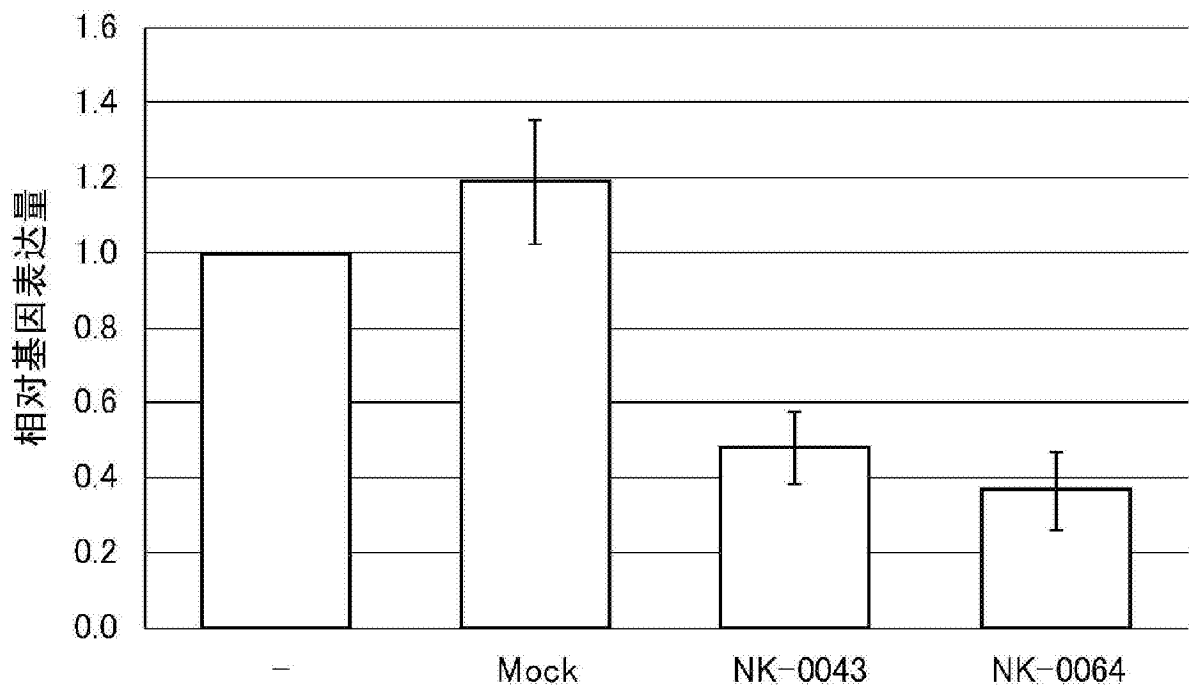


图20

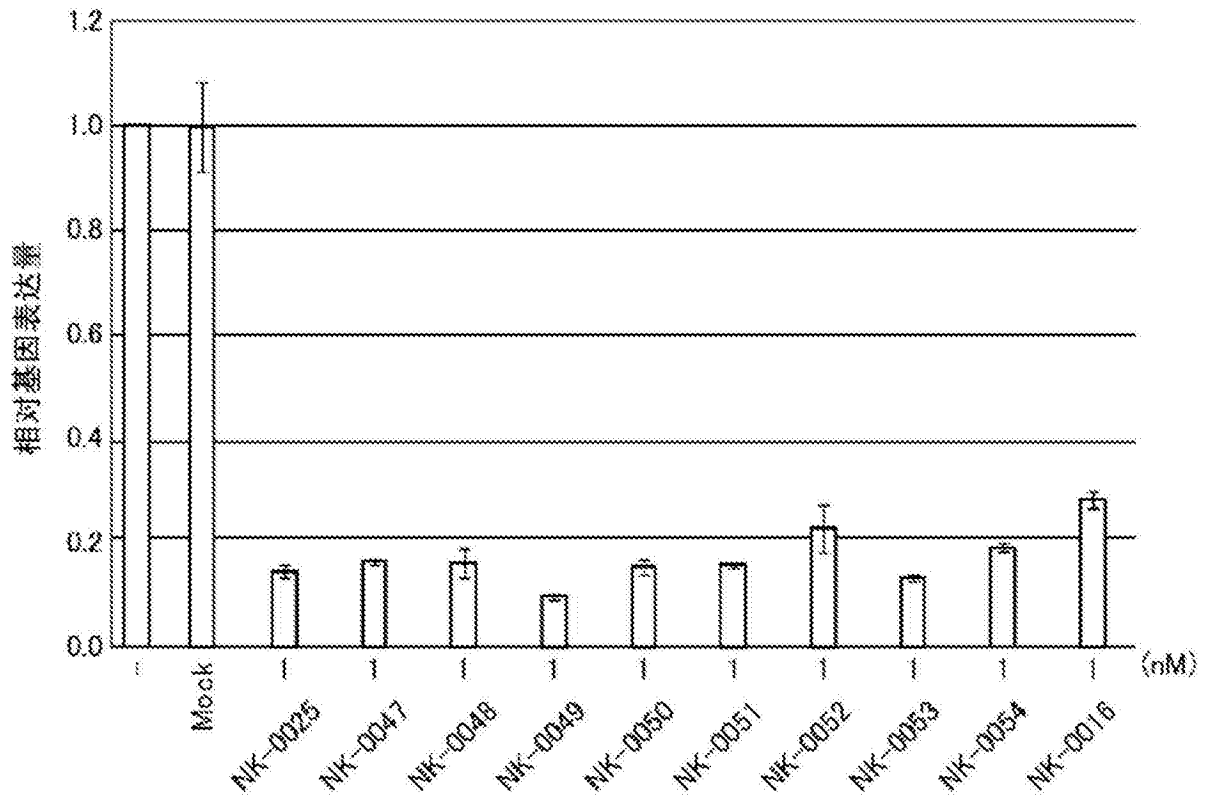


图23