

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年12月5日(05.12.2013)



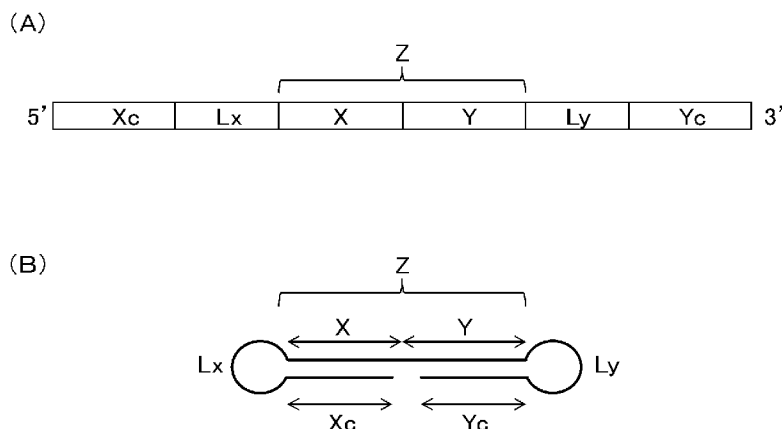
(10) 国際公開番号
WO 2013/180038 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/064541
- (22) 国際出願日: 2013年5月25日(25.05.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-120337 2012年5月26日(26.05.2012) JP
- (71) 出願人: 株式会社ボナック (BONAC CORPORATION) [JP/JP]; 〒8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオファクトリー Fukuoka (JP).
- (72) 発明者: 大木 忠明(OHGI Tadaaki); 〒8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオファクトリー 株式会社ボナック内 Fukuoka (JP). 青木 絵里子(AOKI Eriko); 〒8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオファクトリー 株式会社ボナック内 Fukuoka (JP). 江村 智佐登(EMURA Chisato); 〒8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオファクトリー 株式会社ボナック内 Fukuoka (JP). 濱崎 智洋(HAMASAKI Tomohiro); 〒8390861 福岡県久
- (74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 京都市サテライトパーク 1号館 301号室 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID MOLECULE FOR REGULATING EXPRESSION OF GENE HAVING DELIVERING FUNCTION

(54) 発明の名称: デリバリ-機能を有する遺伝子発現制御用の一本鎖核酸分子



(57) Abstract: Provided is a single-stranded nucleic acid which can inhibit the expression of a target gene having a delivering function. A molecule characterized by comprising a 5'-side region (Xc), a linker region (Lx), an internal region (Z), a linker region (Ly) and a 3'-side region (Yc) in this order when observed in the direction from the 5'-side toward the 3'-side, wherein the internal region (Z) is composed of an internal 5'-side region (X) and an internal 3'-side region (Y) linked to each other, the 5'-side region (Xc) is complementary to the internal 5'-side region (X), the 3'-side region (Yc) is complementary to the internal 3'-side region (Y), at least one selected from the internal region (Z), the 5'-side region (Xc) and the 3'-side region (Yc) contains an expression-inhibiting sequence that inhibits the expression of a target gene, and a biological substance is bound to at least one selected from the group consisting of the 5'-terminal, the 3'-terminal, the linker region (Lx) and the linker region (Ly).

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2013/180038 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

デリバリー機能を有する標的遺伝子の発現を抑制可能な一本鎖核酸を提供する。5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、リンカー領域(Lx)、内部領域(Z)、リンカー領域(Ly)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、前記内部領域(Z)が、内部5'側領域(X)および内部3'側領域(Y)が連結して構成され、前記5'側領域(Xc)が、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、前記3'側領域(Yc)が、前記内部3'側領域(Y)と相補的であり、前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)の少なくとも一つが、標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列を含み、5'末端、3'末端、前記リンカー領域(Lx)および前記リンカー領域(Ly)からなる群から選択された少なくとも一つに、生体関連物質が結合していることを特徴とする分子とする。

明 細 書

発明の名称：

デリバリー機能を有する遺伝子発現制御用の一本鎖核酸分子

技術分野

[0001] 本発明は、デリバリー機能を有する遺伝子発現抑制用の一本鎖核酸分子、それを含む組成物およびその用途に関する。

背景技術

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

[0003] まず、前記siRNAを製造する場合、センス鎖およびアンチセンス鎖を別々に合成した上で、最後にこれらの鎖をハイブリダイズする工程が必要である。このため、製造効率が悪いという問題がある。また、前記siRNAを細胞に投与する際、一本鎖RNAへの解離を抑制した状態で、細胞に投与する必要があるため、その取り扱い条件の設定にも労力を要する。つぎに、環状のRNA分子の場合、その合成が困難という問題がある。これに対して、本発明者らは、このような問題を解消する、自己アニーリングによる2つのループ構造を有する新たな一本鎖核酸分子を構築するに至った（特許文献2）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2008-278784

特許文献2：国際公報WO2012/005368号パンフレット

非特許文献

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

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] そして、このような新たな一本鎖核酸分子について、さらに、ターゲットに対する優れたデリバリー機能の実現が求められている。

[0007] そこで、本発明は、デリバリー機能を有する標的遺伝子の発現を抑制可能な一本鎖核酸の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 前記目的を達成するために、本発明の一本鎖核酸分子は、5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、リンカー領域(Lx)、内部領域(Z)、リンカー領域(Ly)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、前記内部領域(Z)が、内部5'側領域(X)および内部3'側領域(Y)が連結して構成され、前記5'側領域(Xc)が、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、前記3'側領域(Yc)が、前記内部3'側領域(Y)と相補的であり、前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)の少なくとも一つが、標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列を含み、5'末端、3'末端、前記リンカー領域(Lx)および前記リンカー領域(Ly)からなる群から選択された少なくとも一つに、生体関連物質が結合していることを特徴とする、デリバリー機能を有する標的遺伝子の発現抑制用一本鎖核酸分子である。

発明の効果

[0009] 本発明の一本鎖核酸分子によれば、例えば、デリバリー用のキャリアを必

須とすることなく、ターゲットへの優れたデリバリー能を実現できる。このため、例えば、キャリアの毒性を考慮する必要がなく、核酸分子とキャリアとの複合体との形成に関する様々な条件設定の検討を回避できる。このため、例えば、製造面および使用面における労力やコストを低減可能である。

図面の簡単な説明

- [0010] [図1]図1は、本発明の一本鎖核酸分子の一例を示す模式図である。
- [図2]図2は、本発明の一本鎖核酸分子のその他の例を示す模式図である。
- [図3]図3は、本発明の実施例におけるホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3 Luc) が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果 (ルシフェラーゼの相対活性) を示すグラフである。
- [図4]図4は、本発明の実施例におけるホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3 Luc) が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果 (ルシフェラーゼの相対活性) を示す別のグラフである。
- [図5]図5は、本発明の実施例におけるホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3 Luc) が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果 (ルシフェラーゼの相対活性) を示すさらに別のグラフである。
- [図6]図6は、本発明の実施例におけるホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3 Luc) が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果 (ルシフェラーゼの相対活性) を示すさらに別のグラフである。
- [図7]図7は、本発明の実施例におけるホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3 Luc) が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果 (ルシフェラーゼの相対活性) を示すさらに別のグラフである。
- [図8]図8は、本発明の実施例におけるホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3 Luc) が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果 (ルシフェラーゼの相対活性) を示すさらに別のグラフで

ある。

[図9]図9は、本発明の実施例におけるホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3-Luc) が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果 (ルシフェラーゼの相対活性) を示すさらに別のグラフである。

[図10]図10は、本発明の実施例における、マウスを用いたホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制の測定結果を示す写真である。図10(a)は、本発明の一本鎖核酸で処理したマウスの測定結果を示す写真である。図10(b)は、未処理マウスの測定結果を示す写真である。

[図11]図11は、図10の写真における、全身のルシフェラーゼ活性 (ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制) の測定結果を示すグラフである。

[図12]図12は、図10の写真における、脳のルシフェラーゼ活性 (ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制) の測定結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] 本明細書で使用する用語は、特に言及しない限り、当該技術分野で通常用いられる意味で用いることができる。

[0012] 1. ssNc分子

本発明の一本鎖核酸分子は、前述のように、デリバリー機能を有する標的遺伝子の発現抑制用一本鎖核酸分子であって、5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、リンカー領域(Lx)、内部領域(Z)、リンカー領域(Ly)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、

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

前記5'側領域(Xc)が、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、

前記3'側領域(Yc)が、前記内部3'側領域(Y)と相補的であり、

前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)

の少なくとも一つが、標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列を含み、

5'末端、3'末端、前記リンカー領域(Lx)および前記リンカー領域(Ly)

L y) からなる群から選択された少なくとも1つに、生体関連物質が結合していることを特徴とする。

[0013] 本発明において、「標的遺伝子の発現抑制」は、例えば、前記標的遺伝子の発現を阻害することを意味する。前記抑制のメカニズムは、特に制限されず、例えば、ダウンレギュレーションまたはサイレンシングでもよい。前記標的遺伝子の発現抑制は、例えば、前記標的遺伝子からの転写産物の生成量の減少、前記転写産物の活性の減少、前記標的遺伝子からの翻訳産物の生成量の減少、または前記翻訳産物の活性の減少等によって確認できる。前記タンパク質は、例えば、成熟タンパク質、または、プロセッシングもしくは翻訳後修飾を受ける前の前駆体タンパク質があげられる。

[0014] 本発明の一本鎖核酸分子は、以下、本発明の「ssNc分子」ともいう。本発明のssNc分子は、例えば、in vivoまたはin vitroにおいて、標的遺伝子の発現抑制に使用できることから、「標的遺伝子の発現抑制用ssNc分子」または「標的遺伝子の発現抑制剤」ともいう。また、本発明のssNc分子は、例えば、RNA干渉により、前記標的遺伝子の発現を抑制できることから、「RNA干渉用ssNc分子」、「RNA干渉誘導分子」、「RNA干渉剤」または「RNA干渉誘導剤」ともいう。また、本発明のssNc分子は、例えば、インターフェロン誘導等の副作用を抑制できる。

[0015] 本発明のssNc分子は、その5'末端と3'末端とが未連結であり、線状一本鎖核酸分子ということもできる。本発明のssNc分子は、例えば、前記内部領域(Z)において、前記内部5'領域(X)と前記内部3'領域(Y)が、直接的に連結されている。

[0016] 本発明のssNc分子において、前記5'側領域(Xc)は、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、前記3'側領域(Yc)は、前記内部3'側領域(Y)と相補的である。このため、5'側において、前記領域(Xc)が前記領域(X)に向かって折り返し、前記領域(Xc)と前記領域(X)とが、自己アニーリングによって、二重鎖を形成可能であり、また、3'

側において、前記領域（Yc）が前記領域（Y）に向かって折り返し、前記領域（Yc）と前記領域（Y）とが、自己アニーリングによって、二重鎖を形成可能である。

[0017] 本発明のssNc分子において、前記発現抑制配列は、例えば、本発明のssNc分子が、in vivoまたはin vitroで細胞内に導入された場合に、前記標的遺伝子の発現を抑制する活性を示す配列である。前記発現抑制配列は、特に制限されず、目的の標的遺伝子の種類に応じて、適宜設定できる。前記発現抑制配列は、例えば、siRNAによるRNA干渉に関与する配列を適宜適用できる。RNA干渉は、一般に、長い二本鎖RNA（dsRNA）が、細胞内において、Dicerにより、3'末端が突出した19～21塩基対程度の二本鎖RNA（siRNA：small interfering RNA）に切断され、その一方の一本鎖RNAが標的mRNAに結合して、前記mRNAを分解することにより、前記mRNAの翻訳を抑制する現象である。前記標的mRNAに結合する前記siRNAにおける一本鎖RNAの配列は、例えば、標的遺伝子の種類に応じて様々な種類が報告されている。本発明は、例えば、前記siRNAの一本鎖RNAの配列を、前記発現抑制配列として使用できる。本発明においては、例えば、出願時において公知となっている前記siRNAの一本鎖RNA配列の他、将来的に明らかとなる配列に関しても、前記発現抑制配列として利用できる。

[0018] 前記発現抑制配列は、例えば、前記標的遺伝子の所定領域に対して、90%以上の相補性を有していることが好ましく、より好ましくは95%であり、さらに好ましくは98%であり、特に好ましくは100%である。このような相補性を満たすことにより、例えば、オフターゲットを十分に軽減できる。

[0019] 本発明のssNc分子による前記標的遺伝子の発現の抑制は、例えば、前記内部領域（Z）、前記5'側領域（Xc）および前記3'側領域（Yc）の少なくとも一つに前記発現抑制配列を配置した構造をとることで、RNA干渉またはRNA干渉に類似する現象（RNA干渉様の現象）が生じること

によると推測される。なお、本発明は、このメカニズムにより限定されない。本発明の $s s N c$ 分子は、例えば、いわゆる $s i R N A$ のように、二本鎖の一本鎖 $R N A$ からなる $d s R N A$ として、細胞等へ導入するものではなく、また、細胞内において、前記発現抑制配列の切り出しは、必ずしも必須ではない。このため、本発明の $s s N c$ 分子は、例えば、 $R N A$ 干渉様の機能を有するという事もできる。

[0020] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記発現抑制配列は、前述のように、前記内部領域 (Z)、前記 5' 側領域 (Xc) および前記 3' 側領域 (Yc) の少なくとも一つに含まれる。本発明の $s s N c$ 分子は、前記発現抑制配列を、例えば、1つ有してもよいし、2つ以上有してもよい。

[0021] 後者の場合、本発明の $s s N c$ 分子は、例えば、同じ標的遺伝子に対する同じ発現抑制配列を2つ以上有してもよいし、同じ標的遺伝子に対する異なる発現抑制配列を2つ以上有してもよいし、異なる標的遺伝子に対する異なる発現抑制配列を2つ以上有してもよい。本発明の $s s N c$ 分子が、2つ以上の前記発現抑制配列を有する場合、各発現抑制配列の配置箇所は、特に制限されず、前記内部領域 (Z)、前記 5' 側領域 (Xc) および前記 3' 側領域 (Yc) のいずれか一領域でもよいし、異なる領域であってもよい。本発明の $s s N c$ 分子が、異なる標的遺伝子に対する前記発現抑制配列を2つ以上有する場合、例えば、本発明の $s s N c$ 分子によって、2種類以上の異なる標的遺伝子の発現を抑制可能である。

[0022] 前記内部領域 (Z) は、前述のように、前記内部 5' 領域 (X) と前記内部 3' 領域 (Y) が連結されている。前記領域 (X) と前記領域 (Y) は、例えば、直接的に連結され、その間に介在配列を有していない。前記内部領域 (Z) は、前記 5' 側領域 (Xc) および前記 3' 側領域 (Xc) との配列関係を示すために、「前記内部 5' 側領域 (X) と前記内部 3' 側領域 (Y) が連結して構成される」と表わすものであって、前記内部領域 (Z) において、前記 5' 側領域 (Xc) と前記 3' 側領域 (Yc) とが、例えば、前記 $s s N c$ 分子の使用において、別個の独立した領域であることを限定す

るものではない。すなわち、例えば、前記内部領域（Z）が、前記発現抑制配列を有する場合、前記内部領域（Z）において、前記領域（X）と前記領域（Y）とにわたって、前記発現抑制配列が配置されてもよい。

[0023] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記 5' 側領域（Xc）は、前記内部 5' 側領域（X）に相補的である。ここで、前記領域（Xc）は、前記領域（X）の全領域またはその部分領域に対して相補的な配列を有していればよく、具体的には、例えば、前記領域（X）の全領域またはその部分領域に相補的な配列を含む、または、前記相補的な配列からなることが好ましい。前記領域（Xc）は、前記領域（X）の相補的な前記全領域または相補的な前記部分領域に対して、例えば、完全に相補的でもよいし、1もしくは数塩基が非相補的であってもよいが、完全に相補的であることが好ましい。本発明の $s s N c$ 分子において、前記 3' 側領域（Yc）は、前記内部 3' 側領域（Y）に相補的である。ここで、前記領域（Yc）は、前記領域（Y）の全領域またはその部分領域に相補的な配列を有していればよく、具体的には、例えば、前記領域（Y）の全領域またはその部分領域に対して相補的な配列を含む、または、前記相補的な配列からなることが好ましい。前記領域（Yc）は、前記領域（Y）の相補的な前記全領域または相補的な前記部分領域に対して、例えば、完全に相補的でもよいし、1もしくは数塩基が非相補的であってもよいが、完全に相補的であることが好ましい。前記 1 塩基若しくは数塩基は、例えば、1～3 塩基、好ましくは 1 塩基または 2 塩基である。

[0024] 本発明の $s s N c$ 分子は、前記 5' 側領域（Xc）と前記内部 5' 側領域（X）との間に、リンカー領域（Lx）を有し、前記リンカー領域（Lx）を介して、前記領域（Xc）と前記領域（X）とが連結している。

[0025] 本発明の $s s N c$ 分子は、前記 3' 側領域（Yc）と前記内部 3' 側領域（Y）との間に、リンカー領域（Ly）を有し、前記リンカー領域（Ly）を介して、前記領域（Yc）と前記領域（Y）とが連結している。

[0026] 前記リンカー領域（Lx）および前記リンカー領域（Ly）は、それぞれ、それ自体の領域内部において、自己アニーリングを生じない構造であるこ

とが好ましい。

[0027] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記生体関連物質は、生体への親和性を示す物質であり、生体親和性物質ということもできる。前記生体関連物質は、例えば、生体由来成分に含まれる物質、またはそれと同一もしくは類似の構造を有する物質があげられる。前記生体関連物質は、生体への親和性を示す物質であれば、特に制限されないが、例えば、ビタミン、ホルモン等の各種機能性物質があげられる。より具体的には、例えば、以下のとおりである。

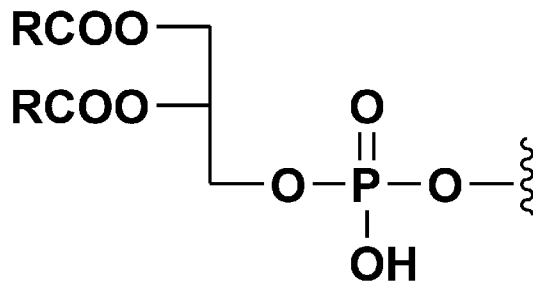
[0028] 前記生体関連物質は、第1形態として、例えば、脂質があげられる。本発明の $s s N c$ 分子は、例えば、脂質を有することによって、細胞内への導入効率および／または耐酵素分解性を向上できる。これは、例えば、以下のようなメカニズムによると推測される。すなわち、本発明の $s s N c$ 分子は、前記脂質領域と、その他の核酸領域とにより、全体としてミセル構造を形成することで、細胞膜の透過性および耐酵素分解性が向上すると解される。また、本発明の $s s N c$ 分子は、前記脂質領域と、その他の核酸領域とにより、全体として、エクソソーム様複合体を形成することにより、生体内の移動性がより向上すると解される。なお、本発明は、これらのメカニズムには、制限されない。

[0029] 前記脂質の具体例は、例えば、単純脂質、複合脂質、誘導脂質、脂溶性ビタミン等があげられる。前記単純脂質は、脂肪酸とアルコールとのエステルである1本鎖脂質があげられる。前記複合脂質は、2本鎖のリン脂質、糖脂質等があげられる。前記誘導脂質は、例えば、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸等の脂肪酸、コレステロール、ステロイドホルモン等のステロイド等があげられる。前記脂溶性ビタミンは、例えば、レチノール、トコフェロール、カルシフェロール等があげられる。また、この他に、前記脂質は、例えば、油脂、スクアレン等の炭化水素、高級アルコール等があげられる。

[0030] 前記1本鎖脂質は例えば、 $R C O O -$ で表すことができる。前記2本鎖脂質は、例えば、下記式で表すことができる。Rは、例えば、パルミチン酸、

ステアリン酸、ミリスチン酸等の飽和脂肪酸、オレイン酸等の不飽和脂肪酸等があげられる。

[化1]



[0031] 前記生体関連物質は、第2形態として、例えば、ペプチドがあげられる。本発明の $s s N c$ 分子は、例えば、前記ペプチドを有することによって、細胞内への導入効率および／または耐酵素分解性を向上できる。

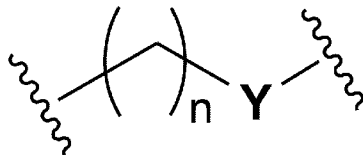
[0032] 前記ペプチドは、特に制限されず、例えば、ターゲット細胞の膜タンパク質に結合可能なタンパク質またはそのペプチド；ターゲット部位に選択的に取り込まれるタンパク質もしくはそのペプチド、特定の受容体に作用する生体内分子もしくはそのペプチド、細胞表面に発現する抗原と反応する抗体タンパク質もしくはそのペプチド等があげられる。前記膜タンパク質に結合可能なタンパク質は、例えば、膜透過性タンパク質等があげられ、そのペプチドは、例えば、アルギニンペプチド等があげられる。前記抗体タンパク質のペプチドは、例えば、F a bドメイン等があげられる。

[0033] 前記生体関連物質は、その他の形態として、例えば、ポリエチレングリコール（P E G）、ポリアミン、蛍光分子、ビオチン、インターカレーター分子、糖、水溶性ビタミン、金属キレート剤、クロスリンク剤等もあげられる。

[0034] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記生体関連物質の数は、特に制限されず、例えば、1個～4個、好ましくは、1～3個、より好ましくは、1個または2個である。前記生体関連物質の結合箇所は、前述のように、前記核酸分子における5'末端、3'末端、前記リンカー領域（L x）、および／または前記リンカー領域（L y）である。

[0035] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記生体関連物質は、例えば、前記核酸分子に直接結合してもよいし、間接的に結合してもよく、好ましくは後者である。前記後者の場合、例えば、結合用リンカーを介して、結合することが好ましい。前記結合用リンカーの構造は、特に制限されず、例えば、下記式の構造が例示できる。下記式において、 n は正の整数であり、 Y は、例えば、 NH 、 S 、 O 、 CO 等があげられる。また、本発明の $s s N c$ 分子において、前記生体関連物質がシステイン等のアミノ酸を有する場合は、例えば、前記核酸分子に対して、ジスルフィド結合により前記生体関連物質を結合させてもよい。

[化2]



[0036] 本発明の $s s N c$ 分子について、核酸構造の一例を、図1の模式図に示す。図1(A)は、前記 $s s N c$ 分子について、5'側から3'側に向かって、各領域の順序の概略を示す模式図であり、図1(B)は、前記 $s s N c$ 分子が、前記分子内において二重鎖を形成している状態を示す模式図である。図1(B)に示すように、前記 $s s N c$ 分子は、前記5'側領域(Xc)が折り返し、前記5'側領域(Xc)と前記内部5'側領域(X)との間で二重鎖が形成され、前記3'側領域(Yc)が折り返し、前記3'側領域(Yc)と前記内部3'側領域(Y)との間で二重鎖が形成され、前記 Lx 領域および前記 Ly 領域が、ループ構造をとる。図1はあくまでも、各領域の連結順番および二重鎖を形成する各領域の位置関係を示すものであり、例えば、各領域の長さ等は、これに制限されない。

[0037] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記生体関連物質は、前述のように、例えば、図1における前記5'側領域(Xc)のフリーの末端、前記3'側領域(Yc)のフリーの末端、リンカー領域(Lx)、リンカー領域(Ly)

のいずれに結合してもよい。

[0038] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記 5' 側領域 (Xc)、前記内部 5' 側領域 (X)、前記内部 3' 側領域 (Y) および前記 3' 側領域 (Yc) の塩基数は、特に制限されず、例えば、以下の通りである。本発明において、「塩基数」は、例えば、「長さ」を意味し、「塩基長」ということもできる。

[0039] 前記 5' 側領域 (Xc) は、前述のように、例えば、前記内部 5' 側領域 (X) の全領域に相補的でもよい。この場合、前記領域 (Xc) は、例えば、前記領域 (X) と同じ塩基長であり、前記領域 (X) の 5' 末端から 3' 末端の全領域に相補的な塩基配列からなることが好ましい。前記領域 (Xc) は、より好ましくは、前記領域 (X) と同じ塩基長であり、且つ、前記領域 (Xc) の全ての塩基が、前記領域 (X) の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補的であることが好ましい。なお、これには制限されず、例えば、前述のように、1 もしくは数塩基が非相補的であってもよい。

[0040] また、前記 5' 側領域 (Xc) は、前述のように、例えば、前記内部 5' 側領域 (X) の部分領域に相補的でもよい。この場合、前記領域 (Xc) は、例えば、前記領域 (X) の部分領域と同じ塩基長であり、すなわち、前記領域 (X) よりも、1 塩基以上短い塩基長の塩基配列からなることが好ましい。前記領域 (Xc) は、より好ましくは、前記領域 (X) の前記部分領域と同じ塩基長であり、且つ、前記領域 (Xc) の全ての塩基が、前記領域 (X) の前記部分領域の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補的であることが好ましい。前記領域 (X) の前記部分領域は、例えば、前記領域 (X) における、5' 末端の塩基 (1 番目の塩基) から連続する塩基配列からなる領域 (セグメント) であることが好ましい。

[0041] 前記 3' 側領域 (Yc) は、前述のように、例えば、前記内部 3' 側領域 (Y) の全領域に相補的でもよい。この場合、前記領域 (Yc) は、例えば、前記領域 (Y) と同じ塩基長であり、前記領域 (Y) の 5' 末端から 3'

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

[0042] また、前記3'側領域（ Y_c ）は、前述のように、例えば、前記内部3'側領域（ Y ）の部分領域に相補的でもよい。この場合、前記領域（ Y_c ）は、例えば、前記領域（ Y ）の部分領域と同じ塩基長であり、すなわち、前記領域（ Y ）よりも、1塩基以上短い塩基長の塩基配列からなることが好ましい。前記領域（ Y_c ）は、より好ましくは、前記領域（ Y ）の前記部分領域と同じ塩基長であり、且つ、前記領域（ Y_c ）の全ての塩基が、前記領域（ Y ）の前記部分領域の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補であることが好ましい。前記領域（ Y ）の前記部分領域は、例えば、前記領域（ Y ）における、3'末端の塩基（1番目の塩基）から連続する塩基配列からなる領域（セグメント）であることが好ましい。

[0043] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記内部領域（ Z ）の塩基数（ Z ）と、前記内部5'側領域（ X ）の塩基数（ X ）および前記内部3'側領域（ Y ）の塩基数（ Y ）との関係、前記内部領域（ Z ）の塩基数（ Z ）と、前記内部5'側領域（ X ）の塩基数（ X ）および前記5'側領域（ X_c ）の塩基数（ X_c ）との関係は、例えば、下記式（1）および（2）の条件を満たす。

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

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

[0044] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記内部5'側領域（ X ）の塩基数（ X ）と前記内部3'側領域（ Y ）の塩基数（ Y ）の長さの関係は、特に制限されず、例えば、下記式のいずれの条件を満たしてもよい。

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

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

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

[0045] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X)、前記 5' 側領域 (X_c) の塩基数 (X_c)、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) および前記 3' 側領域 (Y_c) の塩基数 (Y_c) の関係は、例えば、下記 (a) ~ (d) のいずれかの条件を満たす。

(a) 下記式 (3) および (4) の条件を満たす。

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

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

(b) 下記式 (5) および (6) の条件を満たす。

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

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

(c) 下記式 (7) および (8) の条件を満たす。

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

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

(d) 下記式 (9) および (10) の条件を満たす。

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

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

[0046] 前記 (a) ~ (d) において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) と前記 5' 側領域 (X_c) の塩基数 (X_c) の差、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) と前記 3' 側領域 (Y_c) の塩基数 (Y_c) の差は、例えば、下記条件を満たすことが好ましい。

(a) 下記式 (11) および (12) の条件を満たす。

$X - X_c = 1 \sim 10$ 、好ましくは 1、2、3 または 4、
より好ましくは 1、2 または 3 $\dots (11)$

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

(b) 下記式 (13) および (14) の条件を満たす。

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

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

より好ましくは1、2または3 . . . (14)

(c) 下記式(15)および(16)の条件を満たす。

$X - X_c = 1 \sim 10$ 、好ましくは、1、2または3、

より好ましくは1または2 . . . (15)

$Y - Y_c = 1 \sim 10$ 、好ましくは、1、2または3、

より好ましくは1または2 . . . (16)

(d) 下記式(17)および(18)の条件を満たす。

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

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

[0047] 前記(a)～(d)の $s s N c$ 分子について、それぞれの構造の一例を、図2の模式図に示す。図2は、前記リンカー領域(L_x)および前記リンカー領域(L_y)を含む $s s N c$ であり、(A)は、前記(a)の $s s N c$ 分子、(B)は、前記(b)の $s s N c$ 分子、(C)は、前記(c)の $s s N c$ 分子、(D)は、前記(d)の $s s N c$ 分子の例である。図2において、点線は、自己アニーリングにより二重鎖を形成している状態を示す。図2の $s s N c$ 分子は、前記内部5'側領域(X)の塩基数(X)と前記内部3'側領域(Y)の塩基数(Y)を、前記式(20)の「 $X < Y$ 」として表わすが、これには制限されず、前述のように、前記式(19)の「 $X = Y$ 」でも、前記式(21)の「 $X > Y$ 」でもよい。また、図2は、あくまでも、前記内部5'側領域(X)と前記5'側領域(X_c)との関係、前記内部3'側領域(Y)と前記3'側領域(Y_c)との関係を示す模式図であり、例えば、各領域の長さ、形状等は、これには制限されず、また、リンカー領域(L_x)およびリンカー領域(L_y)の有無も、これには制限されない。

[0048] 前記(a)～(c)の $s s N c$ 分子は、例えば、前記5'側領域(X_c)と前記内部5'側領域(X)、および、前記3'側領域(Y_c)と前記内部3'側領域(Y)が、それぞれ二重鎖を形成することによって、前記内部領域(Z)において、前記5'側領域(X_c)および前記3'側領域(Y_c)のいずれともアライメントできない塩基を有する構造であり、二重鎖を形成

しない塩基を有する構造ともいえる。前記内部領域（Z）において、前記アライメントできない塩基（二重鎖を形成しない塩基ともいう）を、以下、「フリー塩基」という。図2において、前記フリー塩基の領域を、「F」で示す。前記領域（F）の塩基数は、特に制限されない。前記領域（F）の塩基数（F）は、例えば、前記（a）の $s s N c$ 分子の場合、「 $X-X c$ 」の塩基数であり、前記（b）の $s s N c$ 分子の場合、「 $Y-Y c$ 」の塩基数であり、前記（c）の $s s N c$ 分子の場合、「 $X-X c$ 」の塩基数と「 $Y-Y c$ 」の塩基数との合計数である。

[0049] 他方、前記(d)の $s s N c$ 分子は、例えば、前記内部領域（Z）の全領域が、前記5'側領域（Xc）および前記3'側領域（Yc）とアライメントする構造であり、前記内部領域（Z）の全領域が二重鎖を形成する構造ともいえる。なお、前記（d）の $s s N c$ 分子において、前記5'側領域（Xc）の5'末端と前記3'側領域（Yc）の3'末端は、未連結である。

[0050] 本発明の $s s N c$ 分子について、各領域の長さを以下に例示するが、本発明は、これには制限されない。本発明において、例えば、塩基数の数値範囲は、その範囲に属する正の整数を全て開示するものであり、例えば、「1～4塩基」との記載は、「1、2、3、4塩基」の全ての開示を意味する（以下、同様）。

[0051] 前記5'側領域（Xc）、前記3'側領域（Yc）、および前記内部領域（Z）における前記フリー塩基（F）の塩基数の合計は、例えば、前記内部領域（Z）の塩基数となる。このため、前記5'側領域（Xc）および前記3'側領域（Yc）の長さは、例えば、前記内部領域（Z）の長さ、前記フリー塩基数（F）およびその位置に応じて、適宜決定できる。

[0052] 前記内部領域（Z）の塩基数は、例えば、19塩基以上である。前記塩基数の下限は、例えば、19塩基であり、好ましくは20塩基であり、より好ましくは21塩基である。前記塩基数の上限は、例えば、50塩基であり、好ましくは40塩基であり、より好ましくは30塩基である。前記内部領域（Z）の塩基数の具体例は、例えば、19塩基、20塩基、21塩基、22

塩基、23塩基、24塩基、25塩基、26塩基、27塩基、28塩基、29塩基、または、30塩基である。

[0053] 前記内部領域（Z）が前記発現抑制配列を含む場合、前記内部領域（Z）は、例えば、前記発現抑制配列のみから構成される領域でもよいし、前記発現抑制配列を含む領域でもよい。前記発現抑制配列の塩基数は、例えば、19～30塩基であり、好ましくは、19、20または21塩基である。前記内部領域（Z）が前記発現抑制配列を含む場合、前記発現抑制配列の5'側および／または3'側に、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列の塩基数は、例えば、1～31塩基であり、好ましくは、1～21塩基であり、より好ましくは、1～11塩基であり、さらに好ましくは、1～7塩基である。

[0054] 前記5'側領域（Xc）の塩基数は、例えば、1～29塩基であり、好ましくは1～11塩基であり、より好ましくは1～7塩基であり、さらに好ましくは1～4塩基であり、特に好ましくは1塩基、2塩基、3塩基である。前記内部領域（Z）または前記3'側領域（Yc）が前記発現抑制配列を含む場合、例えば、このような塩基数が好ましい。具体例として、前記内部領域（Z）の塩基数が、19～30塩基（例えば、19塩基）の場合、前記5'側領域（Xc）の塩基数は、例えば、1～11塩基であり、好ましくは1～7塩基であり、より好ましくは1～4塩基であり、さらに好ましくは1塩基、2塩基、3塩基である。

[0055] 前記5'側領域（Xc）が前記発現抑制配列を含む場合、前記5'側領域（Xc）は、例えば、前記発現抑制配列のみから構成される領域でもよいし、前記発現抑制配列を含む領域でもよい。前記発現抑制配列の長さは、例えば、前述の通りである。前記5'側領域（Xc）が前記発現抑制配列を含む場合、前記発現抑制配列の5'側および／または3'側に、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列の塩基数は、例えば、1～11塩基であり、好ましくは、1～7塩基である。

[0056] 前記3'側領域（Yc）の塩基数は、例えば、1～29塩基であり、好ま

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

[0057] 前記3'側領域(Yc)が前記発現抑制配列を含む場合、前記3'側領域(Yc)は、例えば、前記発現抑制配列のみから構成される領域でもよいし、前記発現抑制配列を含む領域でもよい。前記発現抑制配列の長さは、例えば、前述の通りである。前記3'側領域(Yc)が前記発現抑制配列を含む場合、前記発現抑制配列の5'側および/または3'側に、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列の塩基数は、例えば、1～11塩基であり、好ましくは、1～7塩基である。

[0058] 前述のように、前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)の塩基数は、例えば、前記式(2)の「 $Z \geq Xc + Yc$ 」で表わすことができる。具体例として、「 $Xc + Yc$ 」の塩基数は、例えば、前記内部領域(Z)と同じ、または、前記内部領域(Z)より小さい。後者の場合、「 $Z - (Xc + Yc)$ 」は、例えば、1～10塩基、好ましくは1～4塩基、より好ましくは1塩基、2塩基または3塩基である。前記「 $Z - (Xc + Yc)$ 」は、例えば、前記内部領域(Z)における前記フリー塩基の領域(F)の塩基数(F)に相当する。

[0059] 本発明のssNc分子において、前記リンカー領域(Lx)および前記リンカー領域(Ly)の長さは、特に制限されない。前記リンカー領域(Lx)は、例えば、前記内部5'側領域(X)と前記5'側領域(Xc)とが二重鎖を形成可能な長さであることが好ましく、前記リンカー領域(Ly)は、例えば、前記内部3'側領域(Y)と前記3'側領域(Yc)とが二重鎖

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

[0060] 本発明の $s s N c$ 分子の全長は、特に制限されない。本発明の $s s N c$ 分子において、前記塩基数の合計 (全長の塩基数) は、下限が、例えば、38塩基であり、好ましくは42塩基であり、より好ましくは50塩基であり、さらに好ましくは51塩基であり、特に好ましくは52塩基であり、その上限は、例えば、300塩基であり、好ましくは200塩基であり、より好ましくは150塩基であり、さらに好ましくは100塩基であり、特に好ましくは80塩基である。本発明の $s s N c$ 分子において、前記リンカー領域 (L_x) およびリンカー領域 (L_y) を除く塩基数の合計は、下限が、例えば、38塩基であり、好ましくは42塩基であり、より好ましくは50塩基であり、さらに好ましくは51塩基であり、特に好ましくは52塩基であり、上限が、例えば、300塩基であり、好ましくは200塩基であり、より好ましくは150塩基であり、さらに好ましくは100塩基であり、特に好ましくは80塩基である。

[0061] 本発明の $s s N c$ 分子の構成単位は、特に制限されず、例えば、ヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基およびデオキシリボヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、修飾されていない非修飾ヌクレオチド残基および修飾さ

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

[0062] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記内部領域 (Z)、前記 5' 側領域 ($X c$) および前記 3' 側領域 ($Y c$) の構成単位は、それぞれ、前記ヌクレオチド残基が好ましい。前記各領域は、例えば、下記 (1) ~ (3) の残基で構成される。

- (1) 非修飾ヌクレオチド残基
- (2) 修飾ヌクレオチド残基
- (3) 非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

[0063] 本発明の $s s N c$ 分子において、前記リンカー領域 ($L x$) および前記リンカー領域 ($L y$) の構成単位は、特に制限されず、例えば、前記ヌクレオチド残基および前記非ヌクレオチド残基があげられる。前記リンカー領域は、例えば、前記ヌクレオチド残基のみから構成されてもよいし、前記非ヌクレオチド残基のみから構成されてもよいし、前記ヌクレオチド残基と前記非ヌクレオチド残基から構成されてもよい。前記リンカー領域は、例えば、下記 (1) ~ (7) の残基で構成される。

- (1) 非修飾ヌクレオチド残基
- (2) 修飾ヌクレオチド残基
- (3) 非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基
- (4) 非ヌクレオチド残基
- (5) 非ヌクレオチド残基および非修飾ヌクレオチド残基
- (6) 非ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基
- (7) 非ヌクレオチド残基、非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

[0064] 本発明の $s s N c$ 分子が、前記リンカー領域 ($L x$) および前記リンカー

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

[0065] 本発明の s s N c 分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基のみから構成される分子、前記ヌクレオチド残基の他に前記非ヌクレオチド残基を含む分子等があげられる。本発明の s s N c 分子において、前記ヌクレオチド残基は、前述のように、例えば、前記非修飾ヌクレオチド残基のみでもよいし、前記修飾ヌクレオチド残基のみでもよいし、前記非修飾ヌクレオチド残基および前記修飾ヌクレオチド残基の両方であってもよい。前記 s s N c 分子が、前記非修飾ヌクレオチド残基と前記修飾ヌクレオチド残基を含む場合、前記修飾ヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～5個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、最も好ましくは1または2個である。本発明の s s N c 分子が、前記非ヌクレオチド残基を含む場合、前記非ヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～8個、1～6個、1～4個、1、2または3個である。

[0066] 本発明の s s N c 分子において、前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基が好ましい。この場合、本発明の s s N c 分子は、例えば、「RNA分子」または「s s RNA分子」ともいう。前記 s s RNA分子は、例えば、前記リボヌクレオチド残基のみから構成される分子、前記リボヌクレオチド残基の他に前記非ヌクレオチド残基を含む分子があげられる。前記 s s RNA分子において、前記リボヌクレオチド残基は、前述のように、例えば、前記非修飾リボヌクレオチド残基のみでもよいし、前記修飾リボヌクレオチド残基のみでもよいし、前記非修飾リボヌクレオチド残基および前記修飾リボヌクレオチド残基の両方を含んでもよい。

- [0067] 前記 s s R N A 分子が、例えば、前記非修飾リボヌクレオチド残基の他に前記修飾リボヌクレオチド残基を含む場合、前記修飾リボヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～5個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、最も好ましくは1または2個である。前記非修飾リボヌクレオチド残基に対する前記修飾リボヌクレオチド残基は、例えば、リボース残基がデオキシリボース残基に置換された前記デオキシリボヌクレオチド残基であってもよい。前記 s s R N A 分子が、例えば、前記非修飾リボヌクレオチド残基の他に前記デオキシリボヌクレオチド残基を含む場合、前記デオキシリボヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～5個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、最も好ましくは1または2個である。
- [0068] 本発明の s s N c 分子は、例えば、標識物質を含み、前記標識物質で標識化されてもよい。前記標識物質は、特に制限されず、例えば、蛍光物質、色素、同位体等があげられる。前記標識物質は、例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3色素、Cy5色素等の蛍光団があげられ、前記色素は、例えば、Alexa488等のAlexa色素等があげられる。前記同位体は、例えば、安定同位体および放射性同位体があげられ、好ましくは安定同位体である。前記安定同位体は、例えば、被ばくの危険性が少なく、専用の施設も不要であることから取り扱い性に優れ、また、コストも低減できる。また、前記安定同位体は、例えば、標識した化合物の物性変化がなく、トレーサーとしての性質にも優れる。前記安定同位体は、特に制限されず、例えば、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{33}S 、 ^{34}S および ^{36}S があげられる。
- [0069] 本発明の s s N c 分子は、前述のように、前記標的遺伝子の発現抑制ができる。このため、本発明の s s N c 分子は、例えば、遺伝子が原因となる疾患の治療剤として使用できる。本発明の s s N c 分子が、例えば、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を含む

場合、例えば、前記標的遺伝子の発現抑制により、前記疾患を治療できる。本発明において、「治療」は、例えば、前記疾患の予防、疾患の改善、予後の改善の意味を含み、いずれでもよい。

[0070] 本発明の s s N c 分子の使用方法は、特に制限されず、例えば、前記標的遺伝子を有する投与対象に、前記 s s N c 分子を投与すればよい。

[0071] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、in vivoまたはin vitroでもよい。前記細胞は、特に制限されず、例えば、HeLa細胞、293細胞、NIH3T3細胞、COS細胞等の各種培養細胞、ES細胞、造血幹細胞等の幹細胞、初代培養細胞等の生体から単離した細胞等があげられる。

[0072] 本発明において、発現抑制の対象となる前記標的遺伝子は、特に制限されず、所望の遺伝子を設定できる。そして、前述のように、前記標的遺伝子の種類に応じて、前記発現抑制配列を適宜設計すればよい。

[0073] 本発明の s s N c 分子の使用に関しては、後述する本発明の組成物、発現抑制方法および治療方法等の記載を参照できる。

[0074] 本発明の s s N c 分子は、前述のように、標的遺伝子の発現を抑制可能であることから、例えば、医薬品、診断薬および農薬、ならびに、農薬、医学、生命科学等の研究ツールとして有用である。

[0075] 2. ヌクレオチド残基

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

- [0076] 前記ヌクレオチド残基は、未修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基があげられる。前記未修飾ヌクレオチド残基は、前記各構成要素が、例えば、天然に存在するものと同様または実質的に同一であり、好ましくは、人体において天然に存在するものと同様または実質的に同一である。
- [0077] 前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、前記未修飾ヌクレオチド残基を修飾したヌクレオチド残基である。前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、前記未修飾ヌクレオチド残基の構成要素のいずれかが修飾されてもよい。本発明において、「修飾」は、例えば、前記構成要素の置換、付加および／または欠失、前記構成要素における原子および／または官能基の置換、付加および／または欠失であり、「改変」ということができる。前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、天然に存在するヌクレオチド残基、人工的に修飾したヌクレオチド残基等があげられる。前記天然由来の修飾ヌクレオチド残基は、例えば、リンバックら (Limbach et al., 1994, Summary: the modified nucleosides of RNA, Nucleic Acids Res. 22:2183~2196) を参照できる。また、前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、前記ヌクレオチドの代替物の残基であってもよい。
- [0078] 前記ヌクレオチド残基の修飾は、例えば、リボースリン酸骨格（以下、リボリン酸骨格）の修飾があげられる。
- [0079] 前記リボリン酸骨格において、例えば、リボース残基を修飾できる。前記リボース残基は、例えば、2'位炭素を修飾でき、具体的には、例えば、2'位炭素に結合する水酸基を、水素またはフルオロ等のハロゲンに置換できる。前記2'位炭素の水酸基を水素に置換することで、リボース残基をデオキシリボースに置換できる。前記リボース残基は、例えば、立体異性体に置換でき、例えば、アラビノース残基に置換してもよい。
- [0080] 前記リボリン酸骨格は、例えば、非リボース残基および／または非リン酸を有する非リボリン酸骨格に置換してもよい。前記非リボリン酸骨格は、例えば、前記リボリン酸骨格の非荷電体があげられる。前記非リボリン酸骨格

に置換された、前記ヌクレオチドの代替物は、例えば、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン等があげられる。前記代替物は、この他に、例えば、人工核酸モノマー残基があげられる。具体例として、例えば、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）、ENA（2'-O, 4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acid）等があげられ、好ましくはPNAである。

[0081] 前記リボリン酸骨格において、例えば、リン酸基を修飾できる。前記リボリン酸骨格において、糖残基に最も隣接するリン酸基は、 α リン酸基と呼ばれる。前記 α リン酸基は、負に荷電し、その電荷は、糖残基に非結合の2つの酸素原子にわたって、均一に分布している。前記 α リン酸基における4つの酸素原子のうち、ヌクレオチド残基間のホスホジエステル結合において、糖残基と非結合である2つの酸素原子は、以下、「非結合（non-linking）酸素」ともいう。他方、前記ヌクレオチド残基間のホスホジエステル結合において、糖残基と結合している2つの酸素原子は、以下、「結合（linking）酸素」という。前記 α リン酸基は、例えば、非荷電となる修飾、または、前記非結合酸素における電荷分布が非対称型となる修飾を行うことが好ましい。

[0082] 前記リン酸基は、例えば、前記非結合酸素を置換してもよい。前記酸素は、例えば、S（硫黄）、Se（セレン）、B（ホウ素）、C（炭素）、H（水素）、N（窒素）およびOR（Rは、アルキル基またはアリール基）のいずれかの原子で置換でき、好ましくは、Sで置換される。前記非結合酸素は、例えば、片方がSで置換されていることが好ましく、より好ましくは、両方がSで置換される。前記修飾リン酸基は、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、ホスホネート水素、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステル等があげられ、中でも、前記2つの非結合酸素が両方ともSで置換されているホスホロジチオエートが好ましい。

- [0083] 前記リン酸基は、例えば、前記結合酸素を置換してもよい。前記酸素は、例えば、S（硫黄）、C（炭素）およびN（窒素）のいずれかの原子で置換でき。前記修飾リン酸基は、例えば、Nで置換した架橋ホスホロアミデート、Sで置換した架橋ホスホロチオエート、およびCで置換した架橋メチレンホスホネート等があげられる。前記結合酸素の置換は、例えば、本発明の $s s N c$ 分子の5'末端ヌクレオチド残基および3'末端ヌクレオチド残基の少なくとも一方において行うことが好ましく、5'側の場合、Cによる置換が好ましく、3'側の場合、Nによる置換が好ましい。
- [0084] 前記リン酸基は、例えば、前記リン非含有のリンカーに置換してもよい。前記リンカーは、例えば、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキサイドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノ等を含み、好ましくは、メチレンカルボニルアミノ基およびメチレンメチルイミノ基を含む。
- [0085] 本発明の $s s N c$ 分子は、例えば、3'末端および5'末端の少なくとも一方のヌクレオチド残基が修飾されてもよい。前記修飾は、例えば、3'末端および5'末端のいずれか一方でもよいし、両方でもよい。前記修飾は、例えば、前述の通りであり、好ましくは、末端のリン酸基に行うことが好ましい。前記リン酸基は、例えば、全体を修飾してもよいし、前記リン酸基における1つ以上の原子を修飾してもよい。前者の場合、例えば、リン酸基全体の置換でもよいし、欠失でもよい。
- [0086] 前記末端のヌクレオチド残基の修飾は、例えば、他の分子の付加があげられる。前記他の分子は、例えば、前述のような標識物質、保護基等の機能性分子があげられる。前記保護基は、例えば、S（硫黄）、Si（ケイ素）、B（ホウ素）、エステル含有基等があげられる。前記標識物質等の機能性分子は、例えば、本発明の $s s N c$ 分子の検出等に利用できる。

- [0087] 前記他の分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基のリン酸基に付加してもよいし、スペーサーを介して、前記リン酸基または前記糖残基に付加してもよい。前記スペーサーの末端原子は、例えば、前記リン酸基の前記結合酸素、または、糖残基のO、N、SもしくはCに、付加または置換できる。前記糖残基の結合部位は、例えば、3'位のCもしくは5'位のC、またはこれらに結合する原子が好ましい。前記スペーサーは、例えば、前記PNA等のヌクレオチド代替物の末端原子に、付加または置換することもできる。
- [0088] 前記スペーサーは、特に制限されず、例えば、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ 、無塩基糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、およびモルホリノ等、ならびに、ビオチン試薬およびフルオレセイン試薬等を含んでもよい。前記式において、 n は、正の整数であり、 $n=3$ または6が好ましい。
- [0089] 前記末端に付加する分子は、これらの他に、例えば、色素、インターカレート剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サッフイリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、EDTA）、親油性担体（例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コール酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）およびペプチド複合体（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、[MPEG]2、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射線標識マーカ、酵素、

ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送／吸収促進剤（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール複合体、テトラアザマクロ環のEu³⁺複合体）等があげられる。

[0090] 本発明の s s N c 分子は、前記 5' 末端が、例えば、リン酸基またはリン酸基アナログで修飾されてもよい。前記リン酸基は、例えば、5' -リン酸 ((HO)₂(O)P-0-5')、5' ニリン酸 ((HO)₂(O)P-0-P(HO)(O)-0-5')、5' 三リン酸 ((HO)₂(O)P-0-(HO)(O)P-0-P(HO)(O)-0-5')、5' -グアノシンキャップ（7-メチル化または非メチル化、7m-G-0-5' -(HO)(O)P-0-(HO)(O)P-0-P(HO)(O)-0-5')、5' -アデノシンキャップ (A p p p)、任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造 (N-0-5' -(HO)(O)P-0-(HO)(O)P-0-P(HO)(O)-0-5')、5' -チオリン酸（ホスホロチオエート：(HO)₂(S)P-0-5')、5' -ジチオリン酸（ホスホロジチオエート：(HO)(HS)(S)P-0-5')、5' -ホスホロチオール酸 ((HO)₂(O)P-S-5')、硫黄置換の一リン酸、二リン酸および三リン酸（例えば、5' -α-チオ三リン酸、5' -γ-チオ三リン酸等）、5' -ホスホルアミデート ((HO)₂(O)P-NH-5' 、(HO)(NH₂)(O)P-0-5')、5' -アルキルホスホン酸（例えば、RP(OH)(O)-0-5' 、(OH)₂(O)P-5' -CH₂、Rはアルキル（例えば、メチル、エチル、イソプロピル、プロピル等））、5' -アルキルエーテルホスホン酸（例えば、RP(OH)(O)-0-5' 、Rはアルキルエーテル（例えば、メトキシメチル、エトキシメチル等））等があげられる。

[0091] 前記ヌクレオチド残基において、前記塩基は、特に制限されない。前記塩基は、例えば、天然の塩基でもよいし、非天然の塩基でもよい。前記塩基は、例えば、天然由来でもよいし、合成品でもよい。前記塩基は、例えば、一般的な塩基、その修飾アナログ等が使用できる。

[0092] 前記塩基は、例えば、アデニンおよびグアニン等のプリン塩基、シトシン、ウラシルおよびチミン等のピリミジン塩基があげられる。前記塩基は、この他に、イノシン、チミン、キサントシン、ヒポキサントシン、ヌバラリン (n

ubularine)、イソグアニシン (isoguanisine)、ツベルシジン (tubercidine) 等があげられる。前記塩基は、例えば、2-アミノアデニン、6-メチル化プリン等のアルキル誘導体；2-プロピル化プリン等のアルキル誘導体；5-ハロウラシルおよび5-ハロシトシン；5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン；6-アゾウラシル、6-アゾシトシンおよび6-アゾチミン；5-ウラシル (プソイドウラシル)、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-(2-アミノプロピル)ウラシル、5-アミノアリルウラシル；8-ハロ化、アミノ化、チオール化、チオアルキル化、ヒドロキシル化および他の8-置換プリン；5-トリフルオロメチル化および他の5-置換ピリミジン；7-メチルグアニン；5-置換ピリミジン；6-アザピリミジン；N-2、N-6、およびO-6置換プリン (2-アミノプロピルアデニンを含む)；5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン；ジヒドロウラシル；3-デアザ-5-アザシトシン；2-アミノプリン；5-アルキルウラシル；7-アルキルグアニン；5-アルキルシトシン；7-デアザアデニン；N6, N6-ジメチルアデニン；2, 6-ジアミノプリン；5-アミノ-アリル-ウラシル；N3-メチルウラシル；置換1, 2, 4-トリアゾール；2-ピリジノン；5-ニトロインドール；3-ニトロピロール；5-メトキシウラシル；ウラシル-5-オキシ酢酸；5-メトキシカルボニルメチルウラシル；5-メチル-2-チオウラシル；5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル；5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル；3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウラシル；3-メチルシトシン；5-メチルシトシン；N4-アセチルシトシン；2-チオシトシン；N6-メチルアデニン；N6-イソペンチルアデニン；2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン；N-メチルグアニン；O-アルキル化塩基等があげられる。また、プリンおよびピリミジンは、例えば、米国特許第3, 687, 808号、「Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering」、858~859頁、クロシュビツ

ツジェーアイ (Kroschwitz J. I.) 編、John Wiley & Sons、1990、およびイングリッシュら (Englisch ら)、Angewandte Chemie、International Edition、1991、30巻、p. 613に開示されるものが含まれる。

[0093] 前記修飾ヌクレオチド残基は、これらの他に、例えば、塩基を欠失する残基、すなわち、無塩基のリボリン酸骨格を含んでもよい。また、前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、米国仮出願第60/465,665号(出願日:2003年4月25日)、および国際出願第PCT/US04/07070号(出願日:2004年3月8日)に記載される残基が使用でき、本発明は、これらの文献を援用できる。

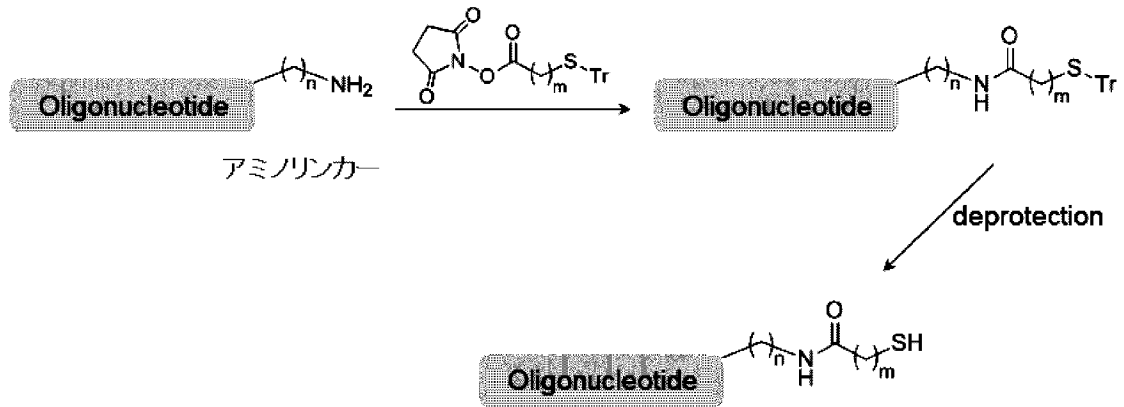
[0094] 3. 非ヌクレオチド残基

前記非ヌクレオチド残基は、特に制限されない。本発明のssNc分子は、例えば、前記非ヌクレオチド残基として、アミノ酸残基またはペプチド残基を含む非ヌクレオチド構造を有してもよい。前記アミノ酸残基またはペプチド残基を構成するアミノ酸としては、例えば、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸等があげられる。前記塩基性アミノ酸としては、例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン等があげられる。前記酸性アミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸等があげられる。前記非ヌクレオチド残基は、例えば、前記リンカー領域(Lx)および前記リンカー領域(Ly)の少なくとも一方に有することが好ましい。前記非ヌクレオチド残基は、例えば、前記リンカー領域(Lx)に有してもよいし、前記リンカー領域(Ly)に有してもよいし、両方の前記リンカー領域に有してもよい。前記リンカー領域(Lx)および前記リンカー領域(Ly)は、例えば、同じでもよいし、異なってもよい。

[0095] 本発明の一本鎖核酸分子において、5'末端、3'末端、前記リンカー領域(Lx)および前記リンカー領域(Ly)を前記生体関連物質で修飾する方法は、特に制限されない。

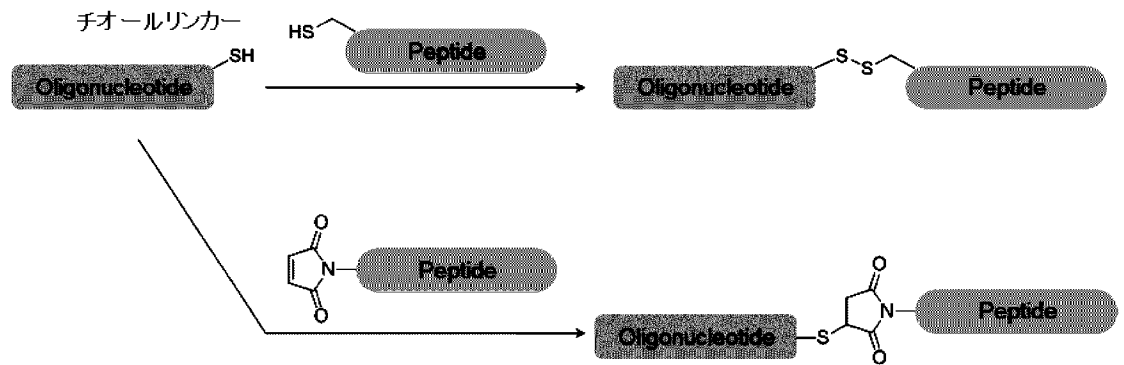
[0100] また、前記結合用リンカーとして、チオールリンカーを導入する場合は、下記スキーム4の合成方法により、前記核酸分子を合成する。

[化S4]



[0101] そして、下記スキーム5のように、前記核酸分子における前記チオールリンカーに、S-S結合により、前記生体関連物質を連結する。

[化S5]



[0102] なお、これらの方法は、例示であって、本発明は、これらの形態に何ら制限されない。例えば、前記スキーム2および3は、前記アミノ酸残基がリシン残基である場合の合成方法の一例であるが、前記アミノ酸残基または前記ペプチド残基が、他のアミノ酸に由来する構造である場合も、同様にして合成できる。

[0103] 4. 組成物

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

[0104] 本発明によれば、例えば、前記標的遺伝子が存在する対象に投与することで、前記標的遺伝子の発現抑制を行うことができる。

[0105] また、本発明の薬学的組成物は、前述のように、前記本発明の $s s N c$ 分子を含むことを特徴とする。本発明の組成物は、前記本発明の $s s N c$ 分子を含むことが特徴であり、その他の構成は何ら制限されない。本発明の薬学的組成物は、例えば、医薬品ということもできる。

[0106] 本発明によれば、例えば、遺伝子が原因となる疾患の患者に投与することで、前記遺伝子の発現を抑制し、前記疾患を治療することができる。本発明において、「治療」は、前述のように、例えば、前記疾患の予防、疾患の改善、予後の改善の意味を含み、いずれでもよい。

[0107] 本発明において、治療の対象となる疾患は、特に制限されず、例えば、遺伝子の発現が原因となる疾患があげられる。前記疾患の種類に応じて、その疾患の原因となる遺伝子を前記標的遺伝子に設定し、さらに、前記標的遺伝子に応じて、前記発現抑制配列を適宜設定すればよい。

[0108] 具体例として、前記標的遺伝子を前記 $TGF-\beta 1$ 遺伝子に設定し、前記遺伝子に対する発現抑制配列を前記 $s s N c$ 分子に配置すれば、例えば、炎症性疾患、具体的には、急性肺傷害等の治療に使用できる。

[0109] 本発明の発現抑制用組成物および薬学的組成物（以下、組成物という）は、その使用方法は、特に制限されず、例えば、前記標的遺伝子を有する投与対象に、前記 $s s N c$ 分子を投与すればよい。

[0110] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、*in vivo* または *in vitro* でもよい。

。前記細胞は、特に制限されず、例えば、HeLa細胞、293細胞、NIH3T3細胞、COS細胞等の各種培養細胞、ES細胞、造血幹細胞等の幹細胞、初代培養細胞等の生体から単離した細胞等があげられる。

[0111] 前記投与方法は、特に制限されず、例えば、投与対象に応じて適宜決定できる。前記投与対象が培養細胞の場合、例えば、トランスフェクション試薬を使用する方法、エレクトロポレーション法等があげられる。

[0112] 本発明の組成物は、例えば、本発明のssNc分子のみを含んでもよいし、さらにその他の添加物を含んでもよい。前記添加物は、特に制限されず、例えば、薬学的に許容された添加物が好ましい。前記添加物の種類は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類に応じて適宜選択できる。

[0113] 5. 発現抑制方法

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

[0114] 本発明の発現抑制方法において、前記遺伝子の発現抑制のメカニズムは、特に制限されず、例えば、RNA干渉またはRNA干渉様の現象による発現抑制があげられる。ここで、本発明の発現抑制方法は、例えば、前記標的遺伝子の発現を抑制するRNA干渉を誘導する方法であり、前記本発明のssNc分子を使用することを特徴とする発現誘導方法ともいえる。

[0115] 本発明の発現抑制方法は、例えば、前記標的遺伝子が存在する対象に、前記ssNc分子を投与する工程を含む。前記投与工程により、例えば、前記投与対象に前記ssNc分子を接触させる。前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、in vivoまたはin vitroでもよい。

[0116] 本発明の発現抑制方法は、例えば、前記ssNc分子を単独で投与してもよいし、前記ssNc分子を含む前記本発明の組成物を投与してもよい。前

記投与方法は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類に応じて適宜選択できる。

[0117] 6. 治療方法

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

[0118] 本発明の治療方法は、例えば、前記本発明の発現抑制方法等を援用できる。前記投与方法は、特に制限されず、例えば、経口投与および非経口投与のいずれでもよい。

[0119] 7. s s N c 分子の使用

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

[0120] 本発明の核酸分子は、疾患の治療に使用するための核酸分子であって、前記核酸分子は、前記本発明の s s N c 分子であり、前記 s s N c 分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする。

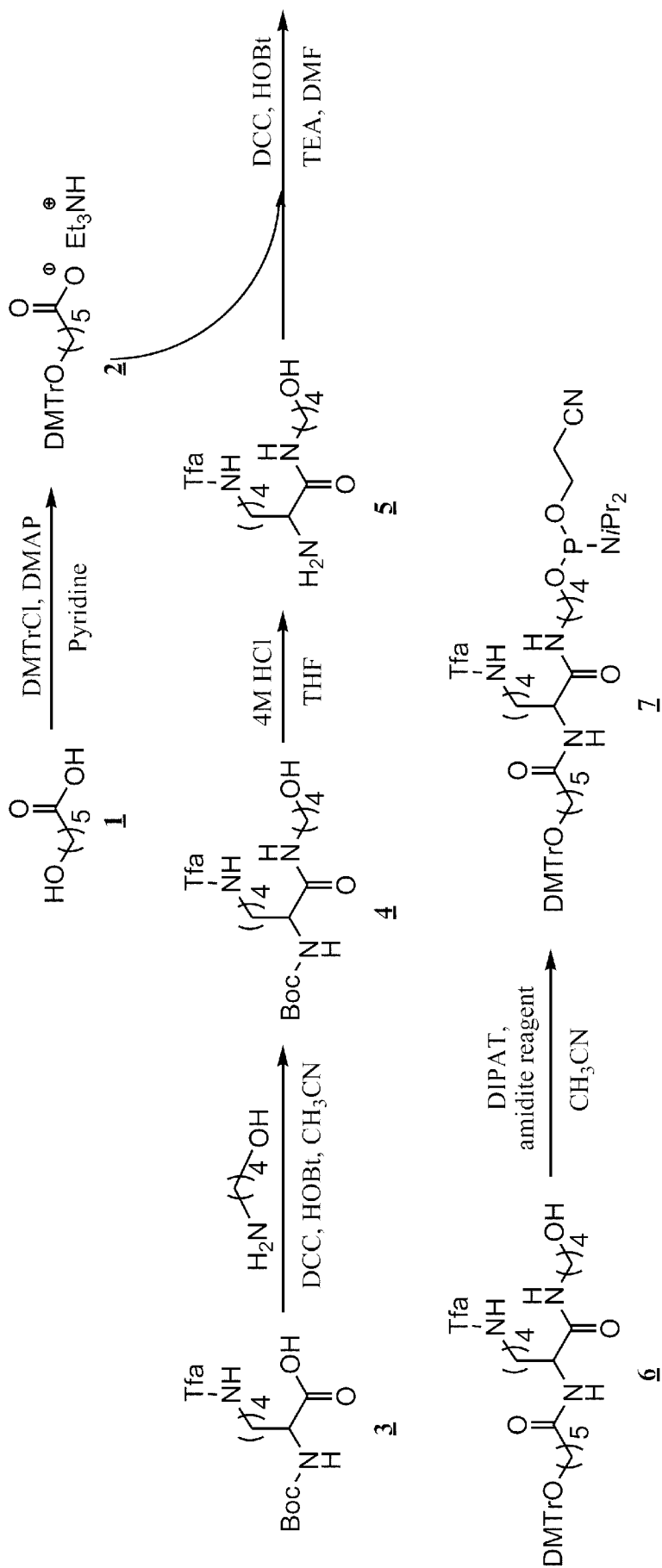
実施例

[0121] つぎに、本発明の実施例について説明する。ただし、本発明は、以下の実施例に限定されない。

[0122] (Lysアミダイトの合成)

下記スキーム6に従い、リシン (Lys) アミダイトであるDMTr-Lysアミダイト (7) を合成した。なお、下記スキーム6中、「T f a」は、トリフルオロアセチル基を表す。

[化S6]



スキーム6

[0123] (1) 化合物2の合成

6-ヒドロキシヘキサン酸(6g, 15.1mmol)のピリジン溶液(124mL)に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(20g, 1.3eq.)およびジメチルアミノピリジン(0.5g, 0.1eq.)を加え、室温にて20時間攪拌した。反応終了後メタノール(10mL)を加えて10分間攪拌し、溶媒留去した。反応液を酢酸エチルで希釈し、TEAA緩衝液(pH 8-9)で3回洗浄、飽和食塩水で1回洗浄後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧下溶媒留去した。このようにして、薄黄色油状物質である化合物2を31g(ピリジン含有)得た。

[0124] (2) 化合物4の合成

化合物3(2.7g, 7.9mmol)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(1.9g, 1.2eq.)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(2.6g, 2.4eq.)のアセトニトリル溶液(45mL)に、4-アミノ-1-ブタノール(0.86g, 1.2eq.)のアセトニトリル溶液(5mL)を加えて室温で16時間攪拌した。反応終了後沈殿物を濾取し、濾液をエバポレーターにて溶媒留去した。得られた残渣にジクロロメタンを加え、酢酸緩衝液(pH4)で3回、飽和重曹水で3回洗浄後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧下溶媒留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒：ジクロロメタン/メタノール=10/1)により精製し、白色固体である化合物4を2.8g(収率85%)得た。以下に、化合物(4)の機器分析値を示す。

[0125] 化合物4；

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 7.07(br, 1H), 6.72(t, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 4.03(m, 1H), 3.66(d, $J=4.9\text{Hz}$, 2H), 3.37(dd, $J=12.9, 6.3\text{Hz}$, 2H), 3.29(dd, $J=12.4, 6.3\text{Hz}$, 2H), 1.83(s, 2H), 1.66-1.60(m, 6H), 1.44(s, 9H), 1.41-1.37(m, 2H)

[0126] (3) 化合物5の合成

化合物4(2.5g, 6.1mmol)を塩酸/テトラヒドロフラン溶液(4M, 45mL)中で室温にて2時間攪拌した。反応終了後、減圧下溶媒留去した。得られた残渣をエタノールに溶かし、トルエンを加えて共沸した。溶媒留去後、白色固体

である化合物5を1.9g得た。以下に、化合物5の機器分析値を示す。

[0127] 化合物5；

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ : 3.85–3.81(m, 1H), 3.59–3.56(m, 2H),
3.32–3.20(m, 2H), 1.94–1.80(m, 2H), 1.66–1.58(m, 6H), 1.46–1.40(m, 2H)

[0128] (4) 化合物6の合成

化合物2(ピリジン含有, 24g, 35.5mmol)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(8.8g, 1.2eq.)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水合物(7.2g, 1.5eq.)の溶液(150mL)にトリエチルアミン(4.5mL, 0.9eq.)を加え、さらに化合物5(10g, 0.9eq.)のN,N-ジメチルホルムアミド溶液(30mL)を加えて室温で20時間攪拌した。反応終了後沈殿物を濾取し、濾液をエバポレーターにて溶媒留去した。得られた残渣にジクロロメタンを加え、飽和重曹水で3回洗浄後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧下溶媒留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:ジクロロメタン/メタノール=20/1+0.05%ピリジン)により精製し、薄黄色固体である化合物6を16g(収率70%)得た。以下に、化合物6の機器分析値を示す。

[0129] 化合物6；

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 7.43–7.40(m, 2H), 7.32–7.26(m, 6H),
7.21–7.17(m, 1H), 6.81(d, $J=8.8\text{Hz}$, 4H), 4.39–4.37(m, 1H), 3.78(s, 6H),
3.64–3.61(m, 2H), 3.33–3.22(m, 4H), 3.03(t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H),
2.19(t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.79–1.54(m, 12H), 1.40–1.34(m, 4H)

[0130] (5) 化合物7の合成

アセトニトリルにて共沸乾燥した出発物質(1.26g, 1.73mmol)の無水アセトニトリル溶液(3.5mL)に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(394mg, 1.3eq.)、2-シアノエトキシ-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト(700mg, 1.3eq.)を加え、室温にて2.5時間攪拌した。ジクロロメタンを加えて飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウム乾燥後、

溶媒留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製(アミノシリカ、展開溶媒：n-ヘキサン/酢酸エチル=2/3)し、白色固体である化合物7を1.3g(収率78%)得た。以下に、化合物7の機器分析値を示す。

[0131] 化合物7；

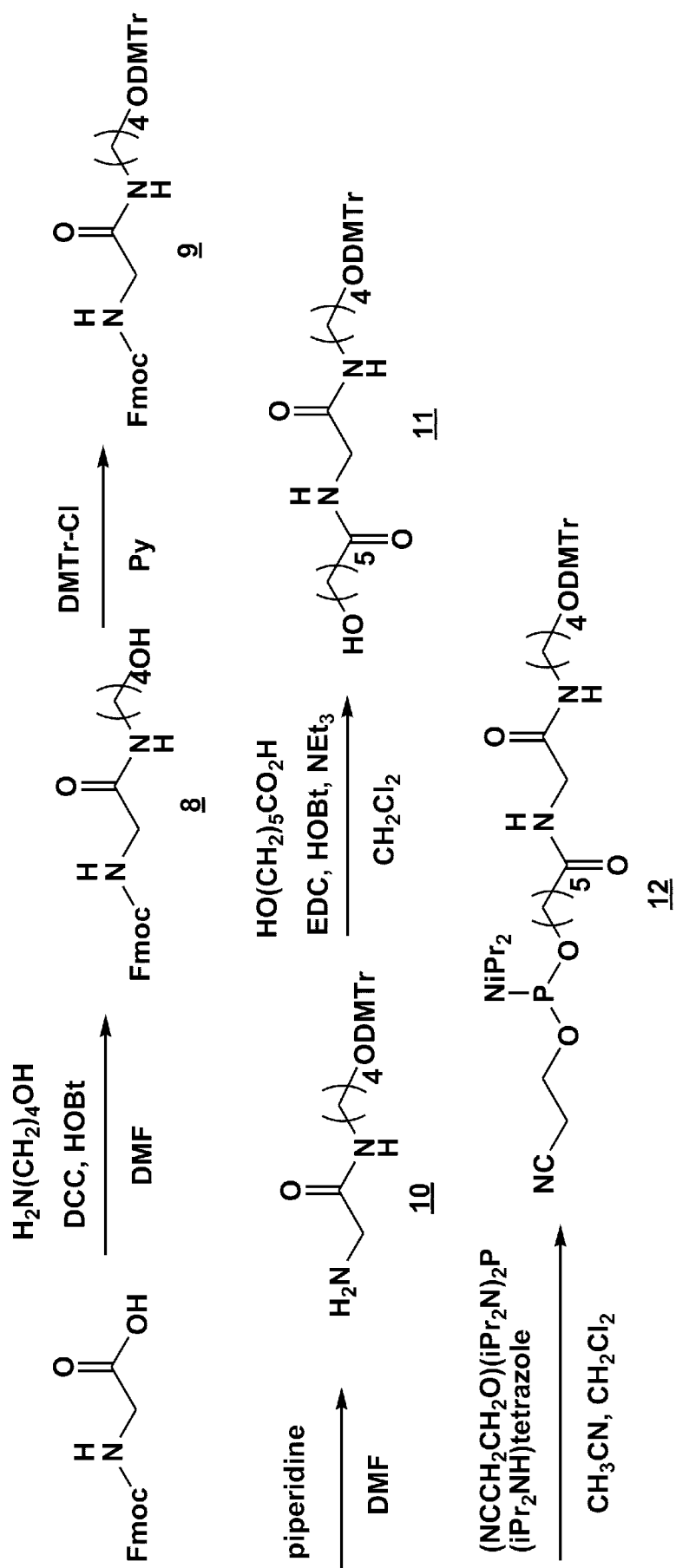
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 7.43-7.41(m, 2H), 7.32-7.17(m, 7H), 6.81(dt, $J=9.3, 2.9\text{Hz}$, 4H), 4.42-4.37(m, 1H), 3.78(s, 6H), 3.88-3.54(m, 6H), 3.32-3.20(m, 4H), 3.03(t, $J=6.3\text{Hz}$, 2H), 2.19(t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.83-1.53(m, 12H), 1.42-1.31(m, 4H), 1.28-1.24(m, 2H), 1.18-1.16(m, 12H)

$^{31}\text{P-NMR}$ (162MHz, CDCl_3) δ : 146.9

[0132] (Glyアミダイトの合成)

下記スキーム7に従い、グリシン(Gly)アミダイトであるDMTr-Glyアミダイト(化合物12)を合成した。

[化S7]



スキーム 7

[0133] (1) N-(4-ヒドロキシブチル)-N α -Fmoc-グリシンアミド (化合物8)

Fmoc-グリシン (4.00 g, 13.45 mmol)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (3.33 g, 16.15 mmol) 及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物 (4.94 g, 32.29 mmol) の無水N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (100 mL) に4-アミノブタノール (1.44 g, 16.15 mmol) の無水N,N-ジメチルホルムアミド溶液 (30 mL) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で終夜攪拌した。生成した沈殿をろ別し、ろ液を減圧下で濃縮した。得られた残渣にジクロロメタン (200 mL) を加え、飽和重曹水で3回洗浄した。更に飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ (展開溶媒: ジクロロメタン-メタノール (95:5) に付し、N-(4-ヒドロキシブチル)-N α -Fmoc-グリシンアミド (8) (4.30 g, 87%) を得た。以下に、N-(4-ヒドロキシブチル)-N α -Fmoc-グリシンアミド (8) の機器分析値を示す。

[0134] N-(4-ヒドロキシブチル)-N α -Fmoc-グリシンアミド (8) ;

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : $\delta = 7.78-7.76$ (2H, d, $J = 7.3$ Hz), $7.65-7.63$ (2H, d, $J = 7.3$ Hz), $7.42-7.41$ (2H, t, $J = 7.6$ Hz), $7.34-7.30$ (2H, td, $J = 7.6, 1.1$ Hz), $4.42-4.40$ (2H, d, $J = 7.3$ Hz), $4.25-4.22$ (1H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.83 (2H, s), $3.60-3.55$ (2H, m), $3.30-3.25$ (2H, m), $1.61-1.55$ (4H, m).

[0135] (2) N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N α -Fmoc-グリシンアミド (化合物9)

化合物8 (4.20 g, 11.40 mmol) に対し無水ピリジンを用いて3回共沸乾燥した。その共沸残渣に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (5.80 g, 17.10 mmol) 及び無水ピリジン (80 mL) を加え、室温下で終夜攪拌した。得られた反応混合物にメタノール (20 mL)

L) を加え室温で30分攪拌した後、減圧下で溶媒を留去した。その後、ジクロロメタン (200 mL) を加え、飽和重曹水で3回洗浄し、更に飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。未精製のN-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N^α-Fmoc-グリシンアミド (9) (11.40 g) を得た。

[0136] (3) N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-グリシンアミド (化合物10)

未精製の化合物9 (11.40 g, 16.99 mmol) にN, N-ジメチルホルムアミド (45 mL) 及びピペリジン (11.7 mL) を室温で加え、室温で終夜攪拌した。反応混合物を減圧下で溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ (展開溶媒: ジクロロメタン-メタノール (9:1) + 0.05% ピリジン) に付し、グリシン-4, 4'-ジメトキシトリチルオキシブタンアミド (3) (4.90 g, 96%, 2 steps) を得た。以下に、N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-グリシンアミド (10) の機器分析値を示す。

[0137] N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-グリシンアミド (10) ;

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) : δ = 7.44-7.42 (2H, m), 7.33-7.26 (6H, m), 7.21-7.20 (1H, m), 6.83-6.80 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.49 (2H, s), 3.30-3.28 (2H, t, J=6.3 Hz), 3.09-3.06 (2H, t, J=5.9 Hz), 1.61-1.55 (4H, m).

[0138] (4) N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N^α-(6-ヒドロキシヘキサノイル)-グリシンアミド (化合物11)

化合物10 (4.80 g, 10.70 mmol) を無水ピリジンで3回共沸乾燥後、アルゴン雰囲気下で6-ヒドロキシヘキサン酸 (1.70 g, 12.84 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (2.46 g, 12.84 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物 (3.93 g, 25.69 mmol)、及び無水ジクロロメタン (60 mL) を室温で加え、10分間攪拌した。

このようにして得た混合物にトリエチルアミン (3.90 g, 38.53 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で終夜攪拌した。得られた反応混合物にジクロロメタン (200 mL) を加え飽和重曹水で3回、更に飽和食塩水で1回洗浄した。有機層を分取し硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ (展開溶媒: ジクロロメタン-メタノール (95:5) + 0.05%ピリジン) に付し、N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N α -(6-ヒドロキシヘキサノイル)-グリシンアミド (11) (4.80 g, 80%) を得た。以下に、N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N α -(6-ヒドロキシヘキサノイル)-グリシンアミド (11) の機器分析値を示す。

[0139] N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N α -(6-ヒドロキシヘキサノイル)-グリシンアミド (11) ;

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ = 7.43–7.40 (2H, m), 7.33–7.26 (6H, m), 7.22–7.20 (1H, m), 6.83–6.80 (4H, m), 3.85 (2H, s), 3.78 (6H, s), 3.63–3.60 (2H, t, J = 6.3 Hz), 3.26–3.23 (2H, t, J = 6.1 Hz), 3.07–3.05 (2H, t, J = 5.6 Hz), 2.26–2.22 (2H, t, J = 7.3 Hz), 1.68–1.52 (8H, m), 1.41–1.36 (2H, m).

[0140] (5) N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N α -(6-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスフィチル)-ヒドロキシヘキサノイル)-グリシンアミド (化合物12)

化合物11 (4.70 g, 8.35 mmol) を無水ピリジンで3回共沸乾燥した。つぎに、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (1.72 g, 10.02 mmol) を加え、減圧下で脱気してアルゴンガスを充填し、無水アセトニトリル (5 mL) を加えた。さらに、2-シアノエトキシー-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (3.02 g, 10.02 mmol) の無水アセトニトリルジクロロメタン混合溶

液 (1 : 1) (4 mL) を加え、混合物をアルゴン雰囲気下、室温で4時間攪拌した。得られた反応混合物にジクロロメタン (150 mL) を加え、飽和重曹水で2回、更に飽和食塩水で1回洗浄した。有機層を分取し、硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。アミノシリカを用いたカラムクロマトグラフ (展開溶媒 : n-ヘキサン-アセトン (3 : 2) + 0.1% トリエチルアミン) に残渣を付し、ヒドロキシヘキサン酸アミドグリシン-4, 4'-ジメトキシトリチルオキシブタンアミドホスホロアミダイト (12) (4.50 g, 71%, HPLC 98.2%) を得た。以下に、N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N α -(6-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスフィチル)-ヒドロキシヘキサノイル)-グリシンアミド (12) の機器分析値を示す。

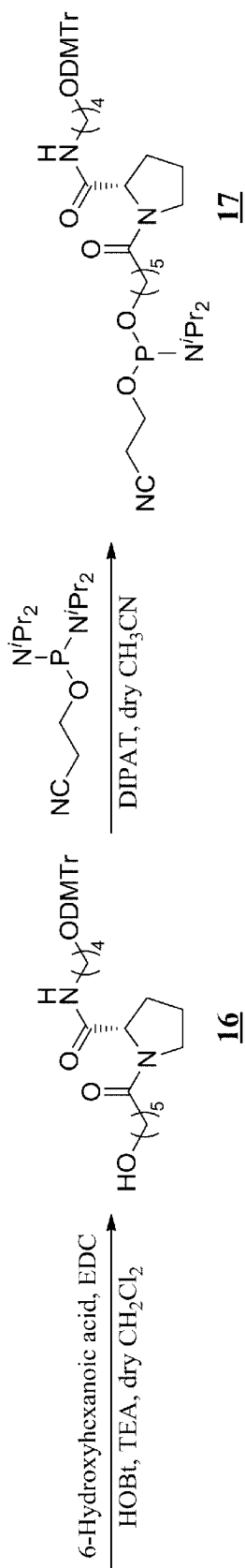
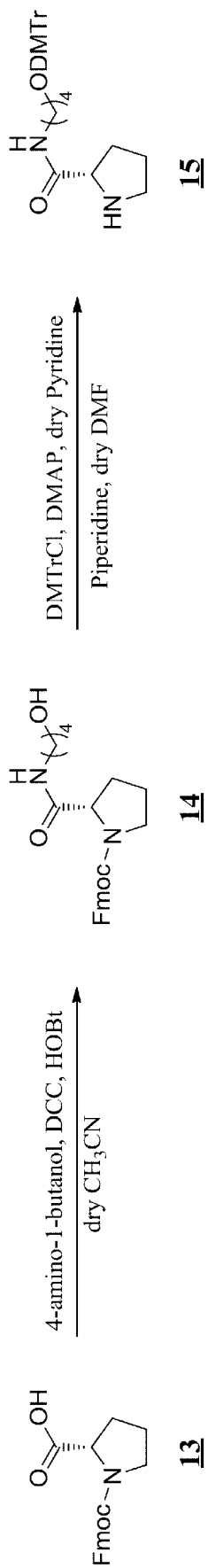
- [0141] N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N α -(6-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスフィチル)-ヒドロキシヘキサノイル)-グリシンアミド (12) ;
 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ = 7.43-7.40 (2H, m), 7.33-7.26 (6H, m), 7.22-7.20 (1H, m), 6.83-6.80 (4H, m), 3.85-3.81 (4H, s), 3.78 (6H, s), 3.63-3.61 (2H, t, $J=6.3\text{ Hz}$), 3.26-3.23 (2H, t, $J=6.1\text{ Hz}$), 3.05-2.97 (4H, m), 2.64-2.62 (2H, t, $J=6.4\text{ Hz}$), 2.25-2.23 (2H, t, $J=7.3\text{ Hz}$), 1.68-1.52 (8H, m), 1.40-1.38 (2H, m), 1.13-1.20 (12H, m).
 $^{31}\text{P-NMR}$ (162MHz, CDCl_3) : δ = 146.57.

- [0142] (プロリンアミダイトの合成)

下記スキーム8に従い、プロリン骨格を含むアミダイトである化合物17を製造した。

- [0143]

[化S8]



スキーム 8

[0144] (1) N-(4-ヒドロキシブチル)-N^α-Fmoc-L-プロリンアミド (化合物14)

化合物13 (Fmoc-L-プロリン) を出発原料とした。前記化合物13 (10.00 g、29.64 mmol)、4-アミノ-1-ブタノール (3.18 g、35.56 mmol) および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (10.90 g、70.72 mmol) を混合し、前記混合物に対し、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に、無水アセトニトリル (140 mL) を室温に加え、さらに、ジシクロヘキシルカルボジイミド (7.34 g、35.56 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (70 mL) を添加した後、アルゴン雰囲気下、室温で15時間攪拌した。反応終了後、生成した沈殿をろ別し、回収したろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣にジクロロメタン (200 mL) を加え、飽和重曹水 (200 mL) で洗浄した。そして、有機層を回収し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去し、その残渣にジエチルエーテル (200 mL) を加え、粉末化した。生じた粉末を濾取することにより、無色粉末状の化合物14 (10.34 g、収率84%) を得た。以下に、前記化合物14の機器分析値を示す。

[0145] 化合物14 :

¹H-NMR (CDCl₃) : δ 7.76-7.83 (m, 2H, Ar-H)、7.50-7.63 (m, 2H, Ar-H)、7.38-7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.28-7.33 (m, 2H, Ar-H)、4.40-4.46 (m, 1H, CH)、4.15-4.31 (m, 2H, CH₂)、3.67-3.73 (m, 2H, CH₂)、3.35-3.52 (m, 2H, CH₂)、3.18-3.30 (m, 2H, CH₂)、2.20-2.50 (m, 4H)、1.81-2.03 (m, 3H)、1.47-1.54 (m, 2H) ;

Ms (FAB+) : m/z 409 (M+H⁺) .

[0146] (2) N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-L-プロリンアミド (化合物15)

Fmoc-ヒドロキシアミド-L-プロリン (化合物14) (7.80 g

、19.09 mmol) を無水ピリジン (5 mL) と混合し、室温で2回共沸乾燥した。得られた残留物に、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (8.20 g、24.20 mmol)、DMAP (23 mg、0.19 mmol) および無水ピリジン (39 mL) を加えた。この混合物を、室温で1時間攪拌した後、メタノール (7.8 mL) を加え、室温で30分攪拌した。この混合物を、ジクロロメタン (100 mL) で希釈し、飽和重曹水 (150 mL) で洗浄後、有機層を分離した。前記有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた未精製の残渣に、無水ジメチルホルムアミド (39 mL) およびピペリジン (18.7 mL、189 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、前記混合液について、減圧下、室温で、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (商品名 Wakogel C-300、展開溶媒 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ 、0.05%ピリジン含有に供し、淡黄色油状の化合物15 (9.11 g、収率98%) を得た。以下に、前記化合物15の機器分析値を示す。

[0147] 化合物15 :

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

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

[0148] (3) N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N $^{\alpha}$ -(6-ヒドロキシヘキサノイル)-L-プロリンアミド (化合物16)

得られた前記DMTr-アミド-L-プロリン（化合物15）（6.01 g、12.28 mmol）、EDC（2.83 g、14.74 mmol）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（3.98 g、29.47 mmol）およびトリエチルアミン（4.47 g、44.21 mmol）の無水ジクロロメタン溶液（120 mL）を混合した。この混合液に、さらに、アルゴン雰囲気下、室温で、6-ヒドロキシヘキサノ酸（1.95 g、14.47 mmol）を加え、その後、アルゴン雰囲気下、室温で、1時間攪拌した。前記混合液をジクロロメタン（600 mL）で希釈し、飽和食塩水（800 mL）で3回洗浄した。有機層を回収し、前記有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を除去した。これにより、淡黄色泡状の前記化合物16（6.29 g、収率85%）を得た。以下に、前記化合物16の機器分析値を示す。

[0149] 化合物16：

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 7.41–7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.27–7.31 (m, 4H, Ar-H)、7.19–7.26 (m, 2H, Ar-H)、7.17–7.21 (m, 1H, Ar-H)、6.79–6.82 (m, 4H, Ar-H)、4.51–4.53 (m, 1H, CH)、3.79 (s, 6H, OCH_3)、3.61 (t, 2H, $J=6.4$ Hz, CH_2)、3.50–3.55 (m, 1H, CH)、3.36–3.43 (m, 1H, CH)、3.15–3.24 (m, 2H, CH_2)、3.04 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2)、2.38–2.45 (m, 1H, CH)、2.31 (t, 6.8 Hz, 2H, CH_2)、2.05–2.20 (m, 1H, CH)、1.92–2.00 (m, 1H, CH)、1.75–1.83 (m, 1H, CH)、1.48–1.71 (m, 8H)、1.35–1.44 (m, 2H, CH_2) ;

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

[0150] (4) N-(4-O-DMTr-ヒドロキシブチル)-N $^{\alpha}$ -(6-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスフィチル)-ヒドロキシヘキサノイル)-L-プロリンアミド (化

合物 17)

得られた前記DMT r-ヒドロキシジアミド-L-プロリン (化合物 16) (8.55 g、14.18 mmol) を無水アセトニトリルと混合し、室温で3回共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (2.91 g、17.02 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (10 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシ-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (5.13 g、17.02 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (7 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で2時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水 (200 mL) で3回洗浄した後、飽和食塩水 (200 mL) で洗浄した。有機層を回収し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られた前記ろ液について、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン:酢酸エチル=1:3、0.05%ピリジン含有) に供し、無色シロップ状の化合物 17 (10.25 g、純度92%、収率83%) を得た。以下に、前記化合物 17 の機器分析値を示す。

[0151] 化合物 17 :

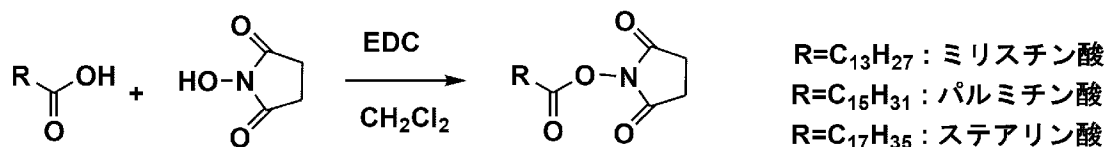
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 7.40–7.42 (m, 2H, Ar-H)、7.29–7.31 (m, 4H, Ar-H)、7.25–7.27 (m, 2H, Ar-H)、7.17–7.21 (m, 1H, Ar-H)、6.80–6.82 (m, 4H, Ar-H)、4.51–4.53 (m, 1H, CH)、3.75–3.93 (m, 4H)、3.79 (s, 6H, OCH_3)、3.45–3.60 (m, 4H)、3.35–3.45 (m, 1H, CH)、3.20–3.29 (m, 1H)、3.04 (t, $J=6.4\text{ Hz}$, 2H, CH_2)、2.62 (t, $J=5.8\text{ Hz}$, 2H, CH_2)、2.40–2.44 (m, 1H, CH)、2.31 (t, $J=7.8\text{ Hz}$, 2H, CH_2)、2.03–2.19 (m, 1H, CH)、1.92–2.02 (m, 1H,

CH)、1.70–1.83 (m, 1H, CH)、1.51–1.71 (m, 8H)、1.35–1.44 (m, 2H, CH₂)、1.18 (d, J=6.8 Hz, 6H, CH₃)、1.16 (d, J=6.8 Hz, 6H, CH₃) ;
³¹P-NMR (CDCl₃) : δ 147.17 ;
 Ms (FAB+) : m/z 802 (M⁺)、303 (DMTr⁺)、201 (C₈H₁₉N₂OP⁺) .

[0152] (脂肪酸活性エステル体の合成)

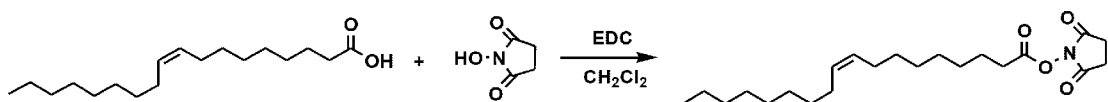
下記スキーム9に従い、ミリスチン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル (C14-NHS)、パルミチン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル (C16-NHS) またはステアリン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル (C18-NHS) を、それぞれ合成した。また、下記スキーム10に従い、オレイン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル (C18:1-NHS) を合成した。

[化S9]



スキーム9

[化S10]



スキーム10

[0153] ミリスチン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル (C14-NHS) の合成

ミリスチン酸(1.5g, 6.6mmol)をジクロロメタン(30mL)に溶解させ攪拌した。この溶液にN-ヒドロキシコハク酸イミド(0.91g, 1.2eq.)と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (1.5g, 1.2eq.)を加え、一晩攪拌した。水で2回洗浄後、飽和食塩水で1回洗浄した。硫酸ナ

トリウムで乾燥して、減圧下溶媒留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン=1/3)により精製し、目的物を1.4g(収率67%)得た。以下に、得られたミリスチン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C14-NHS)のNMR測定結果を示す。

[0154] ミリスチン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C14-NHS) :

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.83 (4H, s), 2.60 (2H, t, $J=7.6\text{ Hz}$), 1.74 (2H, q, $J=7.6\text{ Hz}$), 1.44 (2H, q, $J=6.9\text{ Hz}$), 1.48–1.22 (18H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.8\text{ Hz}$).

[0155] パルミチン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C16-NHS)の合成

パルミチン酸(6.0g, 23mmol)をジクロロメタン(110mL)に溶解させ攪拌した。この溶液にN-ヒドロキシコハク酸イミド(3.2g, 1.2eq.)と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(5.4g, 1.2eq.)を加え、一晩攪拌した。水で2回洗浄後、飽和食塩水で1回洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥して、減圧下溶媒留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン=1/2)により精製し、目的物を7.8g(収率94%)得た。以下に、得られたパルミチン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C16-NHS)のNMR測定結果を示す。

[0156] パルミチン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C16-NHS) :

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.84 (4H, s), 2.60 (2H, t, $J=7.6\text{ Hz}$), 1.74 (2H, q, $J=7.6\text{ Hz}$), 1.38 (2H, q, $J=6.9\text{ Hz}$), 1.43–1.20 (m, 22H), 0.88 (3H, t, $J=6.8\text{ Hz}$).

[0157] ステアリン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C18-NHS)の合成

ステアリン酸(3.0g, 11mmol)をジクロロメタン(100mL)に溶解させ攪拌した。この溶液にN-ヒドロキシコハク酸イミド(1.5g, 1.2eq.)と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(2.4g, 1.2eq.)を加え、2日間攪拌した。水で2回洗浄後、飽和食塩水で1回洗浄した。硫酸

ナトリウムで乾燥して、減圧下溶媒留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン=1/3)により精製し、目的物を2.8g(収率70%)得た。以下に、得られたステアリン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C18-NHS)のNMR測定結果を示す。

ステアリン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C18-NHS) :

[0158] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.84 (4H, m), 2.60 (2H, t, $J=7.6\text{ Hz}$), 1.74 (2H, q, $J=7.6\text{ Hz}$), 1.38 (2H, q, $J=6.9\text{ Hz}$), 1.43-1.20 (m, 26H), 0.88 (3H, t, $J=6.8\text{ Hz}$).

[0159] オレイン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C18:1-NHS)の合成

オレイン酸(4.0g, 14mmol)をジクロロメタン(70mL)に溶解させ攪拌した。この溶液にN-ヒドロキシコハク酸イミド(2.0g, 1.2eq.)と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)(3.3g, 1.2eq.)を加え、一晩攪拌した。水で2回洗浄後、飽和食塩水で1回洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥して、減圧下溶媒留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン=1/3)により精製し、目的物を5.2g(収率97%)得た。以下に、得られたオレイン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C18:1-NHS)のNMR測定結果を示す。

[0160] オレイン酸-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル(C18:1-NHS) :

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.35 (2H, m), 2.83 (4H, s), 2.60 (2H, t, $J=7.6\text{ Hz}$), 2.01 (4H, m), 1.75 (2H, q, $J=7.6\text{ Hz}$), 1.41-1.27 (20H, m), 0.88 (3H, t, $J=6.8\text{ Hz}$).

[0161] (実施例A1 : 5'末端脂質コンジュゲート核酸の合成)

5'末端に脂質が結合している5'末端脂質コンジュゲート核酸(「5'末端脂質コンジュゲート体」、「5'末端脂質修飾核酸」、または単に「脂質修飾核酸」ともいう。)を合成した。以下に、合成した5'末端脂質コン

ジュゲート核酸の構造を模式的に示す。下記5'末端脂質コンジュゲート核酸のうち「Negative control」は、後述する標的配列（ホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7（pGL3-Luc）が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の配列）に相補的でない配列を有し、参考例に該当する。「Target sequence」は、前記標的配列に相補的な配列を有する核酸である。「Target sequence」のうちsiRNA型（siRNA type）は、二本鎖核酸の一方の5'末端に脂質が結合している核酸であり、参考例に該当する。「Target sequence」のうちnkRNA（登録商標）型およびPnkRNA（商品名）型は、一本鎖核酸の5'末端に脂質が結合している核酸であり、実施例に該当する。

[化sinkPnk]

5'末端脂質コンジュゲート体の種類

~~~~~ : C16 (1本鎖脂質)  
 DPPE (2本鎖脂質)

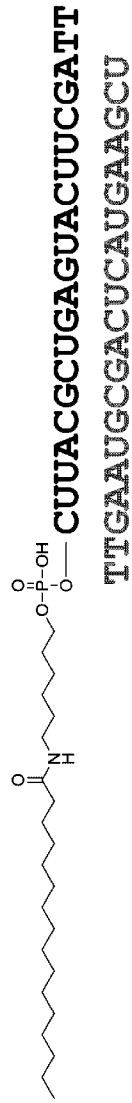
| Type    | Figure | Target sequence                        | Negative control                       |
|---------|--------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| siRNA   |        | NI-0089-C16<br>NI-0089-DPPE<br>NI-0089 | NI-0000-C16<br>NI-0000-DPPE<br>NI-0000 |
| nkRNA®  |        | NK-0139-C16<br>NK-0139-DPPE<br>NK-0139 |                                        |
| PnkRNA™ |        | PK-0071-C16<br>PK-0071-DPPE<br>PK-0071 |                                        |

[0162] 前記5'末端脂質コンジュゲート核酸のうち、siRNA型（siRNA type）であるNI-0089-C16、NI-0089-DPPEおよびそれらの合成原料であるNI-0089s-aminoの具体的な配列および構造を、5'末端に結合した脂質の構造を含めて以下に示す。

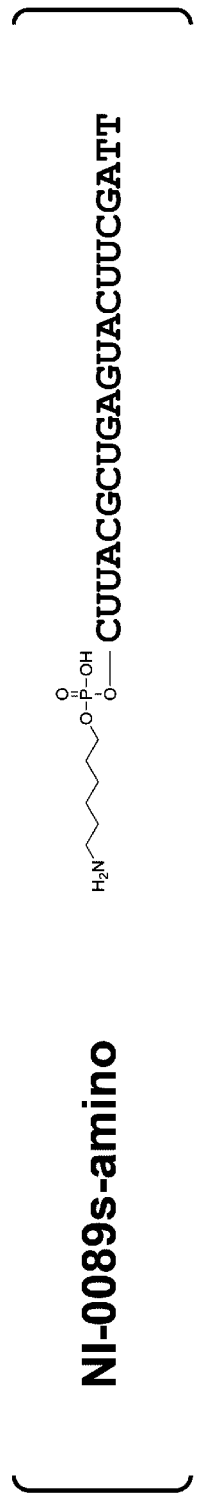
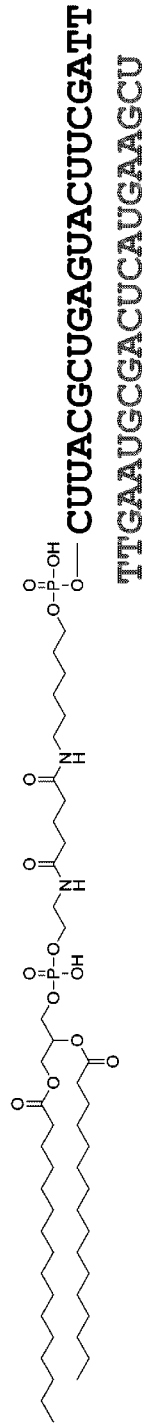
[化si]

### siRNA typeの構造

#### NI-0089-C16



#### NI-0089-DPPE



[0163] NI-0089-C16およびNI-0089-DPPEの上側の配列は下記配列番号1で、下側の配列は下記配列番号2で、それぞれ表される。配列番号1の5'末端の「B」は、生体関連物質（脂質）を表す。NI-0089s-aminoの配列も、下記配列番号1で表される。

5' -B-CUUACGCUGAGUACUUCGATT-3' (配列番号1)

5' -UCGAAGUACUCAGCGUAAGTT-3' (配列番号2)

[0164] また、前記5'末端脂質コンジュゲート核酸のうち、nkRNA型(nkRNA type)であるNK-0139-C16、NK-0139-DPPEおよびそれらの合成原料であるNK-0139-aminoの具体的な配列および構造を、5'末端に結合した脂質の構造を含めて以下に示す。



[0165] NK-0139-C16、NK-0139-DPPEおよびNK-0139-aminoの配列のうち、領域X<sub>c</sub>の配列は下記配列番号3で表され、領域Xの配列は下記配列番号4で表され、全体の配列は、下記配列番号5で表される。配列番号5の5'末端の「B」は、生体関連物質（脂質）を表す。

5' -ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC-3' (配列番号3)

5' -GGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC-3' (配列番号4)

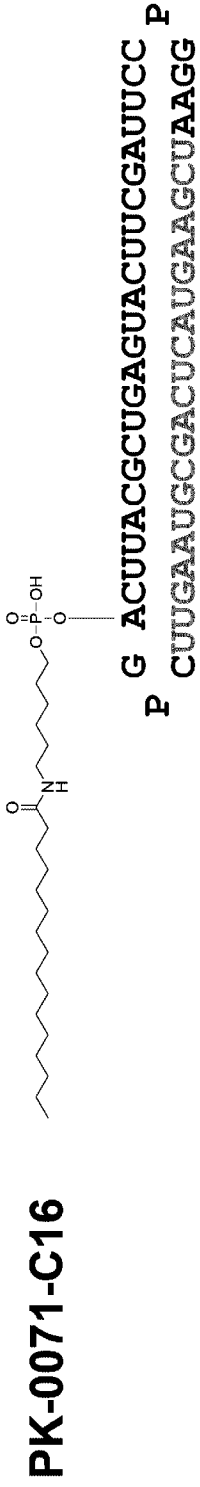
[化seq05]

5' -B-ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC<sup>XC</sup>CCACACCGGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUCUUCGG-3' (配列番号5)

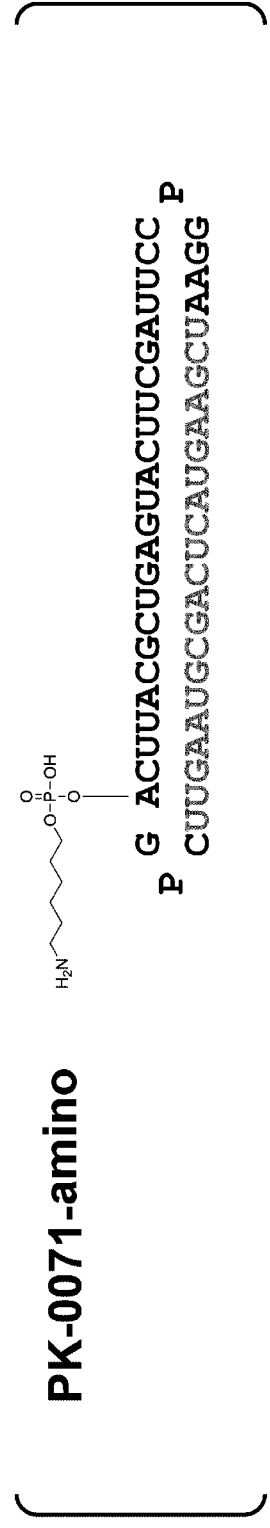
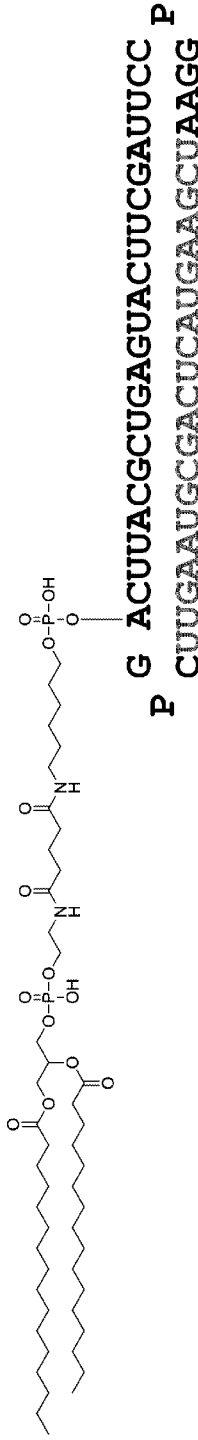
[0166] また、前記5'末端脂質コンジュゲート核酸のうち、PnkRNA型（PnkRNA type）であるPK-0071-C16、PK-0071-DPPEおよびそれらの合成原料であるPK-0071-aminoの具体的な配列および構造を、5'末端に結合した脂質の構造を含めて以下に示す。

[化Pnk]

### PnkRNA type の構造



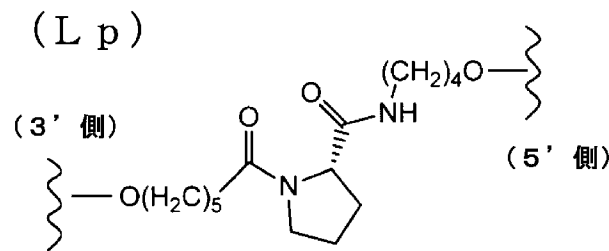
### PK-0071-DPPE



[0167] PK-0071-C16、PK-0071-DPPEおよびPK-0071-aminoの配列は、下記配列番号6で表される。下記配列番号6の配列は、リンカー領域LxおよびLyが、核酸配列に代えてプロリン残基Lpに置き換わっていること以外は、配列番号5と同じである。また、Lpの具体的な構造は、下記式で表される。

5' -B-ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC-Lp-GGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC-Lp-G-3  
(配列番号6)

[化Lp]



[0168] さらに、前記5'末端脂質コンジュゲート核酸のうち、ネガティブコントロール配列を有するNI-0000の具体的な配列および構造を、以下に示す。

[化NI0000]

**NI-0000**

**UACUAUUCGACACGCGAAGTT**  
**TTAUGAUAAGCUGUGCGCUUC**

[0169] NI-0000の上側の配列は、下記配列番号7で、下側の配列は、下記配列番号8で、それぞれ表される。

5' -UACUAUUCGACACGCGAAGTT-3' (配列番号7)

5' -CUUCGCGUGUCGAAUAGUATT-3' (配列番号8)

[0170] NI-0000-C16およびNI-0000-DPPEの配列は、上側の配列が下記配列番号7に代えて下記配列番号9に置き換わっていること以

外は、NI-0000と同じである。下記配列番号9は、5'側に生体関連物質(脂質)Bが結合していること以外は、配列番号7と同じであり、Bの構造は、前記si型またはnk型RNAと同じである。NI-0000-C16およびNI-0000-DPPEの合成原料であるNI-0000s-aminoの配列も、下記配列番号9で表され、この場合、前記Bの構造は、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{PO}(\text{OH})-\text{O}-$ で表される。

5' -B-UACUAUUCGACACGCGAAGTT-3' (配列番号9)

[0171] 前記各RNA(5'末端脂質コンジュゲート核酸)は、以下のようにして合成した。

[0172] NI-0089s-aminoの合成

NI-0089s-aminoは、ホスホロアミダイト法に基づき、核酸合成機(商品名ABI Expedite(登録商標) 8909 Nucleic Acid Synthesis System、アプライドバイオシステムズ)により、3'側から5'側に向かって合成した。前記合成には、RNAアミダイトとして、RNA Phosphoramidites(2'-O-TBDMSi、商品名、ST Pharma)を用いた(以下、同様)。また、5'末端へのアミノ基の導入は、5'-Amino-Modifier C6-TFAアミダイトを用いた(以下、同様)。前記アミダイトの脱保護は、定法に従い、合成したRNAは、HPLCにより精製した。また、以下の実施例において、RNAの合成(核酸配列の形成)は、特に示さない限り、同様に行った。

[0173] <5'末端修飾>

NI-0089-C16の合成

NI-0089s-amino(1.5mM)60 $\mu$ L、10mM C16-NHS/DMF溶液356 $\mu$ L、5%ジイソプロピルアミン水溶液5 $\mu$ L、DMF 150 $\mu$ Lを混合し、室温にて終夜攪拌した。反応液をエタノール沈殿し、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた後HPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50 mm, 4.7mL/min, 260nm, 3

5°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH<sub>3</sub>CN; Buffer B: CH<sub>3</sub>CN; B conc. 0-100%/20min)し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。このようにして、純度97.64%のNI-0089s-amino-C16 (NI-0089-C16のセンス鎖、前記配列番号1) を1.16mg得た。質量分析値は7024.17 (計算値: 7024.37) であった。得られたNI-0089s-amino-C16とNI-0089のアンチセンス鎖を混合してアニーリング操作を行い、NI-0089-C16を得た。

[0174] NI-0000-C16の合成

NI-0089s-aminoと同様の核酸合成法でNI-0000s-aminoを合成し、さらに、NI-0089s-aminoに代えてNI-0000s-aminoを用いる以外はNI-0089-C16と同様の方法でNI-0000-C16の合成を行った。

[0175] NK-0139-C16の合成

NI-0089s-aminoと同様の核酸合成法でNK-0139-aminoを合成した。つぎに、NK-0139-amino(687 μM)50 μL、10mM C16-NHS/DMF溶液172 μL、5%ジイソプロピルアミン水溶液5 μL、DMF 75 μLを混合し、室温にて終夜攪拌した。反応液をエタノール沈殿し、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた後HPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH<sub>3</sub>CN; Buffer B: CH<sub>3</sub>CN; B conc. 0-100%/20min)、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。このようにして、純度95.67%のNK-0139-C16を1.33mg得た。質量分析値は20173.23 (計算値: 20173.11) であった。

[0176] PK-0071-aminoの合成

PK-0071-aminoの合成は、前述と同様のホスホロアミダイト法により行った。具体的には、まず、グアノシンの5'側に、前記化合物17を連結し、プロリン残基を導入した。つぎに、前記グアノシンの5'側に、前記プロリン残基を介して、前記配列番号4で表されるRNAを連結した。さらに、その

5' 側に、前記化合物 17 を連結し、プロリン残基を導入した。さらに、その 5' 側に、前記プロリン残基を介して、下記配列番号 10 で表される RNA を連結した。なお、下記配列番号 10 は、5' 末端に B が連結していること以外は前記配列番号 3 と同じである。また、PK-0071-amino の場合は、前記 B の構造は、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{O}-\text{P}(\text{OH})-\text{O}-$  で表される。

5' -B-ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC-3' (配列番号 10)

[0177] PK-0071-C16の合成

PK-0071-amino (739  $\mu\text{M}$ ) 100  $\mu\text{L}$ 、10mM C16-NHS/DMF 溶液 296  $\mu\text{L}$ 、5% ジイソプロピルアミン水溶液 3  $\mu\text{L}$ 、DMF 250  $\mu\text{L}$  を混合し、室温にて終夜攪拌した。反応液をエタノール沈殿し、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた後 HPLC にて精製 (Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; Buffer B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; B conc. 0-100%/20min) し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nm における吸光度を測定し、収量を算出した。このようにして、純度 94.59% の PK-0071-C16 を 0.57mg 得た。質量分析値は 17450.88 (計算値: 17450.78) であった。

[0178] NI-0089-DPPEの合成

NI-0089s-amino (1.5mM) 60  $\mu\text{L}$ 、10mM DPPE-NHS エタノール溶液 445  $\mu\text{L}$ 、5% トリエチルアミン水溶液 15  $\mu\text{L}$ 、エタノール 130  $\mu\text{L}$ 、注射用蒸留水 220  $\mu\text{L}$  を混合し、室温にて終夜攪拌した。反応液をエタノール沈殿し、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた後 HPLC にて精製 (Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; Buffer B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; B conc. 0-100%/20min)、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nm における吸光度を測定し、収量を算出した。純度 92.41% の NI-0089s-amino-DPPE (NI-0089-DPPE のセンス鎖、前記配列番号 1

)を1.53mg得た。質量分析値は7573.71(計算値:7573.67)であった。得られたNI-0089s-amino-DPPEとNI-0089のアンチセンス鎖を混合してアニーリング操作を行い、NI-0089-DPPEを得た。

[0179] NK-0139-DPPEの合成

NK-0139-amino(687  $\mu$ M)100  $\mu$ L、10mM DPPE-NHSエタノール溶液343  $\mu$ L、5% トリエチルアミン水溶液15  $\mu$ L、エタノール50  $\mu$ L、注射用蒸留水150  $\mu$ Lを混合し、室温にて終夜攪拌した。反応液をエタノール沈殿し、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた後HPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH<sub>3</sub>CN; Buffer B: CH<sub>3</sub>CN; B conc. 0-100%/20min)、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。純度95.79%のNK-0139-DPPEを1.42mg得た。質量分析値は20722.75(計算値:20722.41)であった。

[0180] PK-0071-DPPEの合成

PK-0071-amino(739  $\mu$ M)100  $\mu$ L、10mM DPPE-NHSエタノール溶液369  $\mu$ L、5% トリエチルアミン水溶液10  $\mu$ L、エタノール110  $\mu$ L、注射用蒸留水120  $\mu$ Lを混合し、室温にて終夜攪拌した。反応液をエタノール沈殿し、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた後HPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH<sub>3</sub>CN; Buffer B: CH<sub>3</sub>CN; B conc. 0-100%/20min)、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。このようにして、純度97.67%のPK-0071-DPPEを2.18mg得た。質量分析値は18000.50(計算値:18000.08)であった。

[0181] (実施例B1) 5'末端脂質コンジュゲート核酸によるホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果

前記5'末端脂質コンジュゲート核酸を用いて、*in vitro*におけ

るホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制を確認した。

[0182] (1) 材料および方法

前記各RNAを、所望の濃度(20  $\mu\text{mol/L}$ )となるように、注射用蒸留水(大塚製薬、以下同様)に溶解し、RNA溶液を調製した。

[0183] 細胞は、ホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3 Luc)を使用し、培地は、10% FBSを含むRPMI Medium 1640 (Invitrogen)を使用し、培養条件は、37°C、5% CO<sub>2</sub>下とした。

[0184] ホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3 Luc)の培養は、より具体的には、以下のように行った。

[1] 前記細胞を培地中で培養し、その培養液を96穴プレートに50  $\mu\text{L}$ ずつ $1 \times 10^4$ 細胞/ウェルとなるように分注した。

[2] つぎに、ウェル中の前記細胞に対し、トランスフェクション試薬Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用い、添付プロトコールに従ってRNAサンプルをトランスフェクションした。具体的には、ウェルあたり前記RNAサンプルと前記トランスフェクション試薬との複合体50  $\mu\text{L}$ を添加し、全量を100  $\mu\text{L}$ 、前記RNAサンプルの最終濃度を0.1、1、または10  $\text{nmol/L}$ とした。コントロール1として、前記RNAサンプルおよび前記トランスフェクション試薬を添加していない細胞(-)、コントロール2として、トランスフェクションにおいて前記RNAサンプルを未添加とし、前記トランスフェクション試薬のみを添加した細胞(mock)を用意した。

[3] さらに、前記トランスフェクション後、48時間培養した。

[0185] ルシフェラーゼ活性測定は、以下のように行った。このルシフェラーゼ活性測定は、すなわち、ホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株MCF-7 (pGL3 Luc)が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果の測定である。

[1] まず、Steady-Glo Luciferase Assay S

ystem (商品名) (Promega) を用い、添付のプロトコールに従ってホタルルシフェラーゼの活性を測定した。具体的には、前記ウェルあたり、基質溶液100 $\mu$ Lを添加し、マルチラベルリーダーであるARVO X2 (PerkinElmer) を用いてルシフェラーゼ発光量を測定した。

[2] 前記[1]のルシフェラーゼ活性測定結果は、RNAサンプルおよびトランスフェクション試薬を添加していない細胞(−) (前記コントロール1、非添加細胞群) を1とした相対活性で表した。

[0186] (2) 結果

これらの結果を、図3~5に示す。図3~5は、ルシフェラーゼ活性の相対値を示すグラフである。

[0187] 図3に示すとおり、siRNA型(二本鎖RNA)である参考例B1-1 (NI-0089)、参考例B1-2 (NI-0089-C16)、参考例B1-3 (NI-0089-DPPE) においては、それぞれ、ルシフェラーゼ発光抑制の抑制が見られた。なお、ネガティブコントロール配列を有するsiRNA型(二本鎖RNA)である参考例B1-4 (NI-0000)、参考例B1-5 (NI-0000-C16)、参考例B1-6 (NI-0000-DPPE) においては、ルシフェラーゼ発光抑制の抑制が見られなかった。

[0188] また、図4に示すとおり、nkRNA型であるNK-0139 (参考例B1-7)、NK-0139-C16 (実施例B1-1) およびNK-0139-DPPE (実施例B1-2) においては、それぞれ、ルシフェラーゼ発光抑制の抑制が見られた。5'末端に脂質を結合した(修飾した)NK-0139-C16 (実施例B1-1) およびNK-0139-DPPE (実施例B1-2) は、それぞれ、脂質を結合していない(無修飾の)NK-0139 (参考例B1-7) と遜色ないルシフェラーゼ活性抑制効果を示した。さらに、脂質(生体関連物質)を結合したことで、例えば、デリバリー用のキャリアを必須とすることなく、ターゲットへの優れたデリバリー能を実現

できる。さらに、NK-0139-C16（実施例B1-1）およびNK-0139-DPPE（実施例B1-2）は、siRNA型（二本鎖RNA）である参考例B1-1～B1-3と比較しても遜色ないルシフェラーゼ活性抑制効果を示した。さらに、NK-0139-C16（実施例B1-1）およびNK-0139-DPPE（実施例B1-2）は、一本鎖核酸であることで、siRNA型（二本鎖RNA）と比較して合成および取扱いが容易である。

[0189] また、図5に示すとおり、PnkRNA型であるPK-0071（参考例B1-11）、PK-0071-C16（実施例B1-3）およびPK-0071-DPPE（実施例B1-4）においては、それぞれ、ルシフェラーゼ発光抑制の抑制が見られた。5'末端に脂質を結合した（修飾した）PK-0071-C16（実施例B1-3）およびPK-0071-DPPE（実施例B1-4）は、それぞれ、脂質を結合していない（無修飾の）PK-0071（参考例B1-8）と遜色ないルシフェラーゼ活性抑制効果を示した。さらに、脂質（生体関連物質）を結合したことで、例えば、デリバリー用のキャリアを必須とすることなく、ターゲットへの優れたデリバリー能を実現できる。さらに、PK-0071-C16（実施例B1-3）およびPK-0071-DPPE（実施例B1-4）は、siRNA型（二本鎖RNA）である参考例B1-1～B1-3と比較しても遜色ないルシフェラーゼ活性抑制効果を示した。さらに、PK-0071-C16（実施例B1-3）およびPK-0071-DPPE（実施例B1-4）は、一本鎖核酸であることで、siRNA型（二本鎖RNA）と比較して合成および取扱いが容易である。

[0190] （実施例A2：内部脂質コンジュゲート核酸の合成）




核酸の末端以外の内部に脂質が結合している内部脂質コンジュゲート核酸（「内部脂質コンジュゲート体」、「内部脂質修飾核酸」、または単に「脂質修飾核酸」ともいう。）を合成した。以下に、合成した内部脂質コンジュゲート核酸の構造を模式的に示す。核酸を示す符号（「K（R）-0101

「C16」等)中、「K」は、後述するリシン (Lysine) 残基を示し、「G」は、後述するグリシン (Glycine) 残基を示す。「R」は、下図において右側のリンカー領域 (リンカー領域 L<sub>x</sub>) が前記リシン残基または前記グリシン残基であることを表す。「L」は、下図において左側のリンカー領域 (リンカー領域 L<sub>y</sub>) が前記リシン残基または前記グリシン残基であることを表す。「LR」は、下図において左右のリンカー領域 (リンカー領域 L<sub>x</sub> および L<sub>y</sub>) が前記リシン残基または前記グリシン残基であることを表す。「C16」は、前記リシン残基に、実施例 A1 および B1 と同様の一本鎖脂質が結合していることを表す。「DPPE」は、前記リシン残基に、実施例 A1 および B1 と同様の二本鎖脂質が結合していることを表す。

[化RLLR]

内部脂質コンジュゲート体の種類

~~~~~ : C16 (1本鎖脂質)  
 DPPE (2本鎖脂質)

| Type | Figure | Target sequence |
|---------|---|---|
| R type |  | K(R)-0101-C16
K(R)-0101-DPPE
G(R)-0101 |
| L type |  | K(L)-0102-C16
K(L)-0102-DPPE
G(L)-0102 |
| LR type |  | K(LR)-0100-C16
K(LR)-0100-DPPE
G(LR)-0100 |

[0191] 上記内部脂質コンジュゲート核酸のうち「Negative control」は、標的配列 (ホタルルシフェラーゼ安定発現乳癌細胞株 MCF-7 (pGL3-Luc) が保持するホタルルシフェラーゼ遺伝子の配列) に相補的でない配列を有し、参考例に該当する。「Target sequence」は、前記標的配列に相補的な配列を有する核酸である。「Target sequence」のうち G(R)-0101、G(L)-0102、および G(LR)-0100 は、後述する通り、生体関連物質 (脂質) が結合されておらず、参考例に該当する。「Target sequence」のうち K(R)-0101-C16、K(R)-0101-DPPE、K(L)

L) -0101-C16、K(L) -0101-DPPE、K(LR) -0101-C16、K(LR) -0101-DPPEは、後述するように、一本鎖核酸の末端以外の内部に脂質が結合している核酸であり、実施例に該当する。

[0192] 前記内部脂質コンジュゲート核酸のうち、R型 (R type) であるK(R) -0101-C16、K(R) -0101-DPPE、G(R) -0101の具体的な配列および構造は、下記のとおりである。下記構造式において、「Lys」は、リンカー領域のリシン残基を表し、「Gly」は、リンカー領域のグリシン残基を表す。

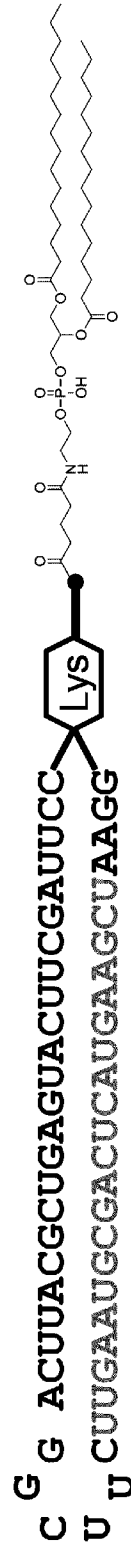
[化R]

R type の構造

K(R)-0101-C16



K(R)-0101-DPPE



G(R)-0101



[0193] K (R) - O 1 0 1 - C 1 6 および G (R) - O 1 0 1 において、L y s (リシン残基) および G l y (グリシン残基) までも含めた具体的な構造は、下記のとおりである。なお、K (R) - O 1 0 1 - D P P E におけるリシン残基 L y s の構造は、K (R) - O 1 0 1 - C 1 6 と同じであり、L y s には、一本鎖脂質 (C 1 6) に代えて前記二本鎖脂質 (D P P E) が結合している。

[化Rs]

R type の構造 (構造式)

K(R)-0101-C16



||



G(R)-0101



||



[0194] K (R) - 0 1 0 1 - C 1 6 および K (R) - 0 1 0 1 - D P P E の配列は、下記配列番号 1 1 で表される。下記配列番号 1 1 において、L l は、リンカー領域 L x である前記リシン残基 L y s を表す。なお、前述のとおり、K (R) - 0 1 0 1 - C 1 6 および K (R) - 0 1 0 1 - D P P E において、L y s には脂質が結合している。また、G (R) - 0 1 0 1 の配列は、下記配列番号 1 2 で表される。下記配列番号 1 2 において、L g は、リンカー領域 L x である前記グリシン残基 G l y を表す。

5' -ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUCCLl-GGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUCUUCGG-3' (配列番号 1 1)

5' -ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUCCLg-GGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUCUUCGG-3' (配列番号 1 2)

[0195] 前記内部脂質コンジュゲート核酸のうち、L 型 (L t y p e) である K (L) - 0 1 0 2 - C 1 6 、 K (L) - 0 1 0 2 - D P P E 、 G (L) - 0 1 0 2 の具体的な配列および構造は、下記のとおりである。下記構造式において、「L y s」は、リンカー領域のリシン残基を表し、「G l y」は、リンカー領域のグリシン残基を表す。L y s および G l y の構造は、前記 R 型と同じである。

[化L]

L type の構造

K(L)-0102-C16



K(L)-0102-DPPE



G(L)-0102



[0196] K (L) - 0 1 0 2 - C 1 6 および K (L) - 0 1 0 2 - D P P E の配列

は、下記配列番号13で表される。下記配列番号13において、L_lは、リンカー領域L_yである前記リシン残基L_ysを表す。なお、前述のとおり、K(L)-0102-C16およびK(L)-0102-DPPEにおいて、L_ysには脂質が結合している。また、G(L)-0102の配列は、下記配列番号14で表される。下記配列番号14において、L_gは、リンカー領域L_yである前記グリシン残基G_lyを表す。

5' -ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC^{CCCCACACCGGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC}-L_l-G-3'
' (配列番号13)

5' -ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC^{CCCCACACCGGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC}-L_g-G-3'
' (配列番号14)

[0197] 前記内部脂質コンジュゲート核酸のうち、LR型(LR type)であるK(LR)-0100-C16、K(LR)-0100-DPPE、G(LR)-0100の具体的な配列および構造は、下記のとおりである。下記構造式において、「L_ys」は、リンカー領域のリシン残基を表し、「G_ly」は、リンカー領域のグリシン残基を表す。L_ysおよびG_lyの構造は、前記R型および前記L型と同じである。

[化LR]

LR type の構造

K(LR)-0100-C16



K(LR)-0100-DPPE



G(LR)-0100



[0198] K(LR)-0100-C16およびK(LR)-0100-DPPEの配列は、下記配列番号15で表される。下記配列番号15において、Llは、リンカー領域Lyである前記リシン残基Lysを表す。なお、前述のとおり、K(LR)-0100-C16およびK(LR)-0100-DPPEにおいて、Lysには脂質が結合している。また、G(LR)-0100の配列は、下記配列番号16で表される。下記配列番号16において、Lgは、リンカー領域Lyである前記グリシン残基Glyを表す。

5' -ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC-Ll-GGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC-Ll-G-3' (配列番号15)

5' -ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC-Lg-GGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC-Lg-G-3' (配列番号16)

[0199] 前記各RNA(内部脂質コンジュゲート核酸)は、以下のようにして合成した。

[0200] K(R)-0101の合成

前述と同様のホスホロアミダイト法により、Lysに脂質が結合していないこと以外はK(R)-0101-C16およびK(R)-0101-DPPEと同じ構造(前記配列番号11)を有するK(R)-0101を合成した。具体的には、まず、下記配列番号17で表される核酸の5'側に、前記化合物7を連結し、リシン残基を導入した。つぎに、前記配列番号17で表される核酸の5'側に、前記リシン残基を介して、前記配列番号3で表されるRNAを連結し、K(R)-0101を合成した。

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

[0201] K(R)-0101-C16の合成

K(R)-0101(500 μ M) 80 μ L、50mM C16-NHS/DMF溶液32 μ L、イソプロパノール128 μ L、pH 9.2の炭酸緩衝液160 μ L(最終濃度100mM)を混合し、40 $^{\circ}$ Cにて3時間攪拌した。反応液をHPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35 $^{\circ}$ C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH₃C

N; Buffer B: CH₃CN; B conc. 0-100%/20min)し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。このようにして、純度99.50%のK(R)-0101-C16を405 μg得た。質量分析値は、18203.18(計算値: 18203.41)であった。

[0202] K(L)-0102-C16の合成

前記配列番号17をグアノシンに変えたことと、前記配列番号3を下記配列番号18に変えたこと以外はK(R)-0101-C16と同様の方法で合成を行い、純度96.69%のK(L)-0102-C16を316 μg得た。質量分析値は、19124.88(計算値: 19125.01)であった。

5' -ACUUACGCUGAGUACUUCGAUUC~~CCCCACACCGGAAUCGAAGUACUCAGCGUAAGUUC~~-3' (配列番号18)

[0203] K(LR)-0100の合成

前述と同様のホスホロアミダイト法により、Lysに脂質が結合していないこと以外はK(LR)-0100-C16およびK(LR)-0100-DPPEと同じ構造(前記配列番号11)を有するK(LR)-0100を合成した。具体的には、まず、グアノシンで表される核酸の5'側に、前記化合物7を連結し、リシン残基を導入した。つぎに、前記グアノシンの5'側に、前記リシン残基を介して、下記配列番号19で表される核酸を導入した。さらに、前記配列番号19で表される核酸の5'側に、前記化合物7を連結し、リシン残基を導入した。さらに、前記配列番号19で表される核酸の5'側に、前記リシン残基を介して、前記配列番号3で表されるRNAを連結し、K(LR)-0100を合成した。

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

[0204] K(LR)-0100-C16の合成

K(R)-0101に代えてK(LR)-0100を用いること以外はK(R)-0101-C16と同様の方法で合成を行い、純度98.07%のK(LR)-0100-C16を317 μg得た。質量分析値

は、17572.21(計算値：17572.52)であった。

[0205] K(R)-0101-DPPEの合成

K(R)-0101(500 μ M)160 μ L、10mM DPPE-NHSエタノール溶液320 μ L、1%トリエチルアミン水溶液80 μ L、エタノール160 μ L、注射用蒸留水80 μ Lを混合し、40°Cにて24時間攪拌した。反応液をHPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH₃CN; Buffer B: CH₃CN; B conc. 0-100%/20min)し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。このようにして、純度99.55%のK(R)-0101-DPPEを0.98mg得た。質量分析値は、18752.70(計算値：18753.04)であった。

[0206] K(L)-0102-DPPEの合成

前記配列番号17をグアノシンに変えたことと、前記配列番号3を前記配列番号18に変えたこと以外はK(R)-0101-DPPEと同様の方法で合成を行い、純度99.10%のK(L)-0102-DPPEを1.05mg得た。質量分析値は、19674.36(計算値：19674.64)であった。

[0207] K(LR)-0100-DPPEの合成

K(LR)-0100(500 μ M) 120 μ L、10mM DPPE-NHSエタノール溶液360 μ L、1%トリエチルアミン水溶液90 μ L、注射用蒸留水30 μ Lを混合し、40°Cにて24時間攪拌した。反応液をHPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH₃CN; Buffer B: CH₃CN; B conc. 0-100%/20min)し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。このようにして、純度99.14%のK(LR)-0100-DPPEを0.54mg得た。質量分析値は、18670.42(計算値：18671.78)であった。

[0208] (実施例B2) 内部脂質コンジュゲート核酸によるホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果

前記5'末端脂質コンジュゲート核酸に代えて、前記内部脂質コンジュゲート核酸を用いること以外は、実施例B1と同様にして、*in vitro*におけるホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制を確認した。これらの結果を、図6～8に示す。図6～8は、ルシフェラーゼ活性の相対値を示すグラフである。

[0209] 図6～8に示すとおり、G(R)-0101(参考例B2-1)、K(R)-0101-C16(実施例B2-1)、K(R)-0101-DPPE(実施例B2-2)、G(L)-0102(参考例B2-2)、K(L)-0102-C16(実施例B2-3)、K(L)-0102-DPPE(実施例B2-4)、G(LR)-0100(参考例B2-3)、K(LR)-0100-C16(実施例B2-5)、K(LR)-0100-DPPE(実施例B2-6)では、それぞれ、ルシフェラーゼ発光抑制の抑制が見られた。

[0210] また、図6～8に示す通り、末端以外の内部に脂質を結合した(修飾した)K(R)-0101-C16(実施例B2-1)、K(R)-0101-DPPE(実施例B2-2)、K(L)-0102-C16(実施例B2-3)、K(L)-0102-DPPE(実施例B2-4)、K(LR)-0100-C16(実施例B2-5)、K(LR)-0100-DPPE(実施例B2-6)は、それぞれ、脂質を結合していない(無修飾の)G(R)-0101(参考例B2-1)、G(L)-0102(参考例B2-2)、G(LR)-0100(参考例B2-3)と遜色ないルシフェラーゼ活性抑制効果を示した。さらに、脂質(生体関連物質)を結合したことで、例えば、デリバリー用のキャリアを必須とすることなく、ターゲットへの優れたデリバリー能を実現できる。また、前記実施例B2-1～B2-6の核酸は、siRNA型(二本鎖RNA)である参考例B1-1～B1-3と比較しても遜色ないルシフェラーゼ活性抑制効果を示し、さらに、一本鎖核酸であることで、siRNA型(二本鎖RNA)と比較して合成および取扱いが容易である。

[0211] (実施例 A 3 : 脂質の構造を変化させた内部脂質コンジュゲート核酸の合成)

前記実施例 A 2 の R 型 (R t y p e) 核酸である K (R) - O 1 0 1 - C 1 6 において、脂質の構造を C 1 6 (パルミチン酸) から C 1 4 (ミリスチン酸) 、 C 1 8 (ステアリン酸) または不飽和結合を 1 つ有する C 1 8 (オレイン酸) に変えた K (R) - O 1 0 1 - C 1 4 、 K (R) - O 1 0 1 - C 1 8 、 および K (R) - O 1 0 1 - C 1 8 : 1 を合成した。それぞれの構造は、下記のとおりである。

[化RFA]

内部脂質コンジュゲート体 (R type; FA)

| Type | Figure | Target sequence |
|------|--------|-----------------|
|------|--------|-----------------|

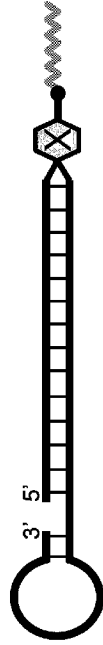
K(R)-0101-C16

K(R)-0101-C14

K(R)-0101-C18

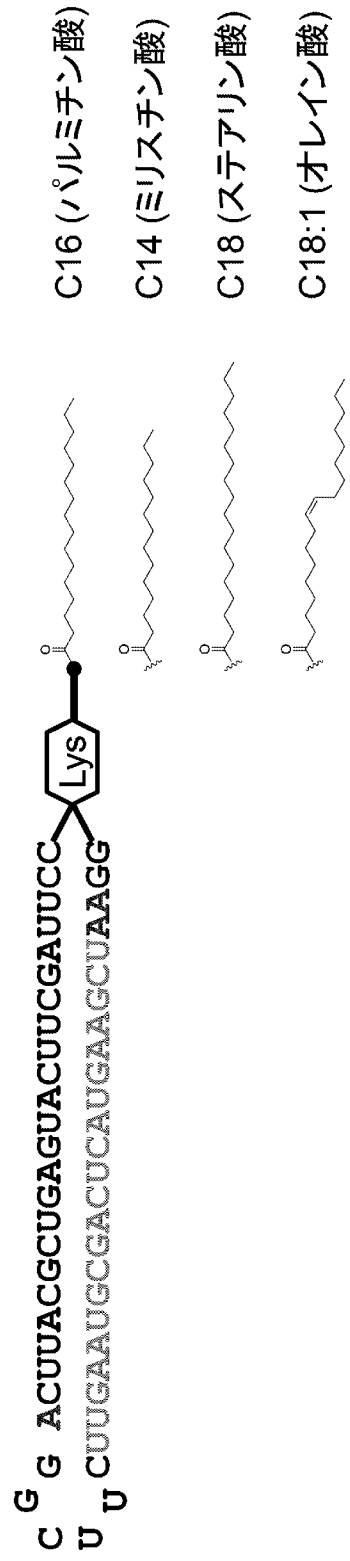
K(R)-0101-C18:1

G(R)-0101



R type

K(R)-0101-C16



[0212] K(R)-0101-C14の合成

K(R)-0101(500 μ M) 40 μ L、50mM C14-NHS/DMF溶液16 μ L、イソプロパノール64 μ L、pH9.2の炭酸緩衝液80 μ L(最終濃度100mM)を混合し、40°Cにて3時間攪拌した。反応液をHPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH₃CN; Buffer B: CH₃CN; B conc. 0-100%/20min)し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。このようにして、純度94.43%のK(R)-0101-C14を193 μ g得た。質量分析値は、18175.91(計算値: 18175.36)であった。

[0213] K(R)-0101-C18の合成

K(R)-0101(500 μ M) 40 μ L、50mM C18-NHS/DMF溶液16 μ L、イソプロパノール64 μ L、pH 9.2の炭酸緩衝液80 μ L(最終濃度100mM)を混合し、40°Cにて3時間攪拌した。反応液をHPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH₃CN; Buffer B: CH₃CN; B conc. 0-100%/20min)し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。このようにして、純度95.97%のK(R)-0101-C18を188 μ g得た。質量分析値は、18231.08(計算値: 18231.46)であった。

[0214] K(R)-0101-C18:1の合成

K(R)-0101(500 μ M) 40 μ L、50mM C18:1-NHS/DMF溶液16 μ L、イソプロパノール64 μ L、pH 9.2の炭酸緩衝液80 μ L(最終濃度100mM)を混合し、40°Cにて3時間攪拌した。反応液をHPLCにて精製(Develosil C8-UG-5, 2.5mm, 10x50mm, 4.7mL/min, 260nm, 35°C, Buffer A: 50mM TEAA, 5% CH₃CN; Buffer B: CH₃CN; B conc. 0-100%/20min)し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションのエタノール沈殿を行い、生じた沈殿を注射用蒸留水に溶解させた。UV 260nmにおける吸光度を測定し、収量を算出した。

このようにして、純度96.22%のK(R)-0101-C18:1を192 μ g得た。質量分析値は、18230.49(計算値:18229.45)であった。

[0215] (実施例B3) 脂質の構造を変化させた内部脂質コンジュゲート核酸によるホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果

K(R)-0101-C16に代えてK(R)-0101-C14、K(R)-0101-C18、およびK(R)-0101-C18:1を用いること以外は、実施例B2と同様にして、*in vitro*におけるホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制を確認した(実施例B3-2~実施例B3-4)。また、G(R)-0101(参考例B3-1)およびK(R)-0101-C16(実施例B3-1)についても、同様にして発現抑制を確認した。これらの結果を、図9に示す。図9は、ルシフェラーゼ活性の相対値を示すグラフである。図示のとおり、ルシフェラーゼ活性の抑制効果は、おおむね、C14修飾<C18:1修飾<C16修飾<C18:0修飾の順であったが、大差はなかった。すなわち、実施例B3-2~実施例B3-4のいずれも、実施例B3-1と遜色ないルシフェラーゼ活性抑制効果が得られたことから、脂質の構造を変化させても本発明の効果が得られることが確認された。また、実施例B3-1~B3-4は、脂質を結合させていない参考例B3-1に対しても遜色ないルシフェラーゼ活性抑制効果を示した。

[0216] (実施例C4)

K(R)-0101-C16の*in vivo*における効果について、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現しているマウス(Luciferase transgenic マウス)を用いて以下のように調査した。すなわち、まず、Luciferase transgenic マウス(C57Blac/J)(♀4週齢)を5匹ずつ2群準備した。1つの群には、尾静脈より、K(R)0101-C16を200 μ g/100 μ L/headの割合で投与した。もう1つの群には、何も投与しなかった(未処理)。投与から4日後にD-Luciferin(Promege)を3mg/headを腹腔内投与し、エーテル麻酔下で解剖し、各臓器を摘出してIVIS Imaging System(Caliper Co.,)で15分間化学発光強度の測定を行い、解析をした。

[0217] 図10の写真に、前記IVISアッセイによる、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制の測定結果を示す。図10(a)は、本発明の一本鎖核酸(K(R)0101-C16)で処理したマウスの測定結果を示す写真である。図10(b)は、未処理マウスの測定結果を示す写真である。

[0218] 図11は、図10の写真における、全身のルシフェラーゼ活性(ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制)の測定結果を示すグラフである。図12は、図10の写真における、脳のルシフェラーゼ活性(ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制)の測定結果を示すグラフである。図11および12において、縦軸は、ルシフェラーゼ活性を示し、「Nontreat」は、未処理マウスの測定結果を示し、「K(R)-0101-C16」は、K(R)-0101-C16で処理したマウスの測定結果を示す。図示のとおり、K(R)-0101-C16で処理したマウスにおいては、未処理マウスと比較して明らかにルシフェラーゼ活性が低下しており、ルシフェラーゼ活性抑制効果が見られた。また、図12に示すとおり、K(R)-0101-C16で処理したマウスにおいては脳におけるルシフェラーゼ活性が低下していることから、本発明の核酸は血液脳関門を通過して脳内で遺伝子発現を抑制することが可能である。さらに、脂質(生体関連物質)を結合したことで、例えば、デリバリー用のキャリアを必須とすることなく、ターゲットへの優れたデリバリー能を実現できる。

[0219] 以上、実施形態を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をすることができる。

産業上の利用可能性

[0220] 本発明の一本鎖核酸分子によれば、例えば、デリバリー用のキャリアを必須とすることなく、ターゲットへの優れたデリバリー能を実現できる。このため、例えば、キャリアの毒性を考慮する必要がなく、核酸分子とキャリアとの複合体との形成に関する様々な条件設定の検討を回避できる。このため、例えば、製造面および使用面における労力やコストを低減可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、リンカー領域(Lx)、内部領域(Z)、リンカー領域(Ly)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、
前記内部領域(Z)が、内部5'側領域(X)および内部3'側領域(Y)が連結して構成され、
前記5'側領域(Xc)が、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、
前記3'側領域(Yc)が、前記内部3'側領域(Y)と相補的であり、
前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)の少なくとも一つが、標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列を含み、
5'末端、3'末端、前記リンカー領域(Lx)および前記リンカー領域(Ly)からなる群から選択された少なくとも一つに、生体関連物質が結合していることを特徴とする、デリバリー機能を有する標的遺伝子の発現抑制用一本鎖核酸分子。
- [請求項2] 前記生体関連物質が、脂質である、請求項1記載の一本鎖核酸分子。
- [請求項3] 前記生体関連物質が、単純脂質、複合脂質、誘導脂質、一本鎖脂質、二本鎖脂質、糖脂質、脂溶性ビタミン、ステロイドである、請求項2記載の一本鎖核酸分子。
- [請求項4] 前記脂質が、パルミチン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸からなる群から選択される少なくとも一つである請求項2記載の一本鎖核酸分子。
- [請求項5] 前記生体関連物質が、抗体タンパク、そのペプチドおよび膜透過性ペプチドからなる群から選択された少なくとも一つである、請求項1記載の一本鎖核酸分子。
- [請求項6] 前記内部領域(Z)の塩基数(Z)、前記内部5'側領域(X)の塩

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

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

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

[請求項7] 少なくとも1つの修飾された残基を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項8] 安定同位体を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項9] 前記リンカー領域 (L_x) および/または前記リンカー領域 (L_y) が、ヌクレオチド残基および非ヌクレオチド残基の少なくとも一つから構成される、請求項1から8のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項10] 前記ヌクレオチド残基が、非修飾ヌクレオチド残基および/または修飾ヌクレオチド残基である、請求項9記載の一本鎖核酸分子。

[請求項11] 前記リンカー領域 (L_x) および/または前記リンカー領域 (L_y) が、下記 (1) ~ (7) のいずれかの残基で構成される、請求項9または10記載の一本鎖核酸分子。

(1) 非修飾ヌクレオチド残基

(2) 修飾ヌクレオチド残基

(3) 非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

(4) 非ヌクレオチド残基

(5) 非ヌクレオチド残基および非修飾ヌクレオチド残基

(6) 非ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基

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

[請求項12] 前記遺伝子の発現抑制が、RNA干渉による発現抑制である、請求項

1 から 1 1 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項13] 前記一本鎖核酸分子の塩基配列が、配列番号 5、6、11、12、13、14、15 または 16 の塩基配列である、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項14] 標的遺伝子の発現を抑制するための組成物であって、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする、発現抑制用組成物。

[請求項15] 請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする、薬学的組成物。

[請求項16] 炎症治療用である、請求項 15 記載の薬学組成物。

[請求項17] 標的遺伝子の発現を抑制する方法であって、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を使用することを特徴とする発現抑制方法。

[請求項18] 前記一本鎖核酸分子を、細胞、組織または器官に投与する工程を含む、請求項 17 記載の発現抑制方法。

[請求項19] 前記一本鎖核酸分子を、in vivo または in vitro で投与する、請求項 18 記載の発現抑制方法。

[請求項20] 前記遺伝子の発現抑制が、RNA 干渉による発現抑制である、請求項 17 から 19 のいずれか一項に記載の発現抑制方法。

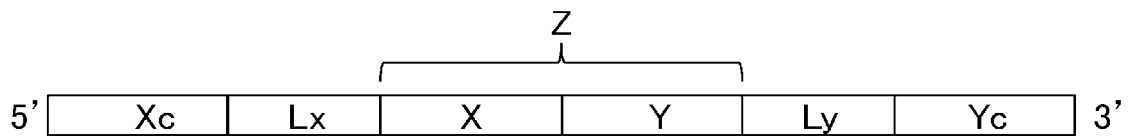
[請求項21] 標的遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉を誘導する方法であって、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を使用することを特徴とする発現誘導方法。

[請求項22] 疾患の治療方法であって、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を、患者に投与する工程を含み、前記一本鎖核酸分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする治療方法。

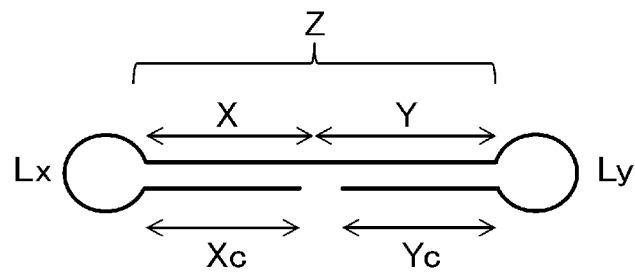
- [請求項23] 標的遺伝子の発現抑制のための、請求項1から13のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子の使用。
- [請求項24] RNA干渉の誘導のための、請求項1から13のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子の使用。
- [請求項25] 疾患の治療に使用するための核酸分子であって、
前記核酸分子は、請求項1から13のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子であり、
前記一本鎖核酸分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする核酸分子。

[図1]

(A)

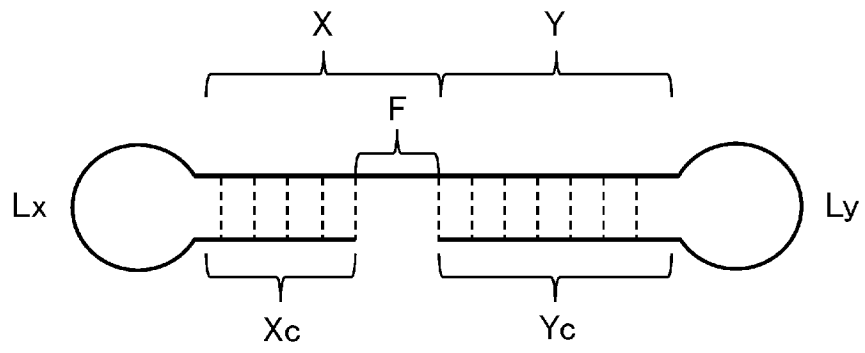


(B)

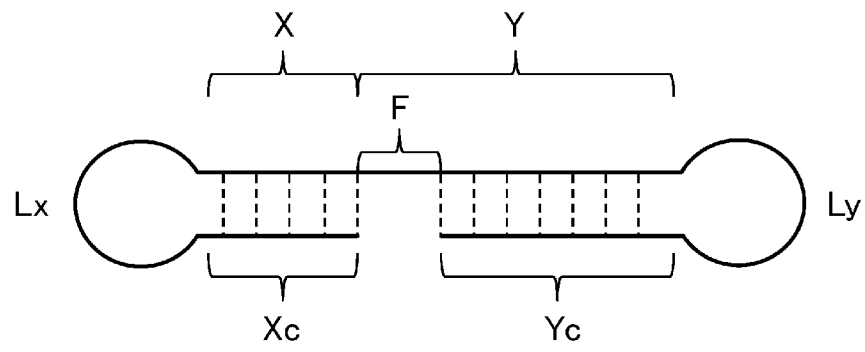


[図2]

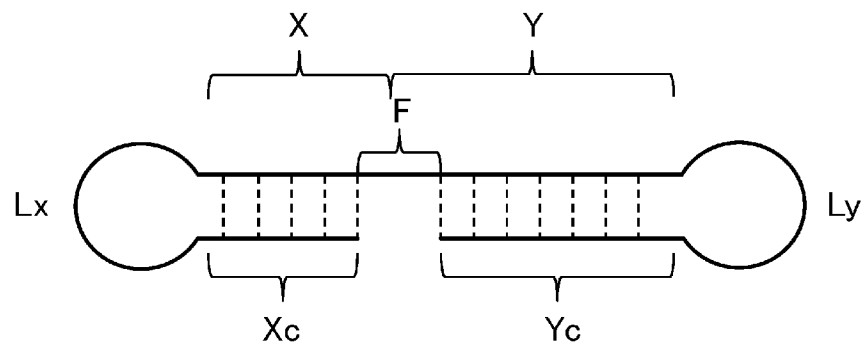
(A)



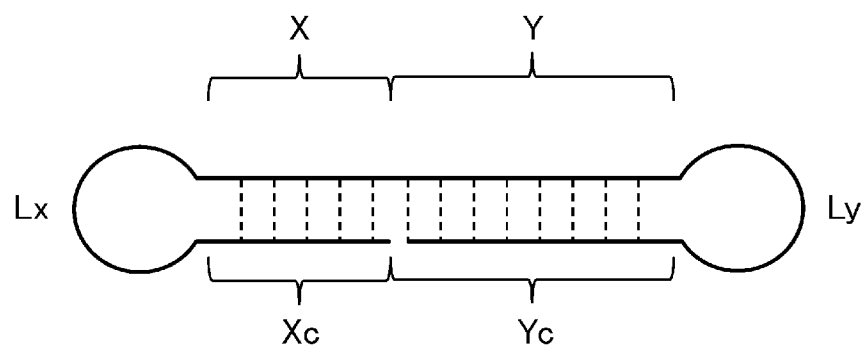
(B)



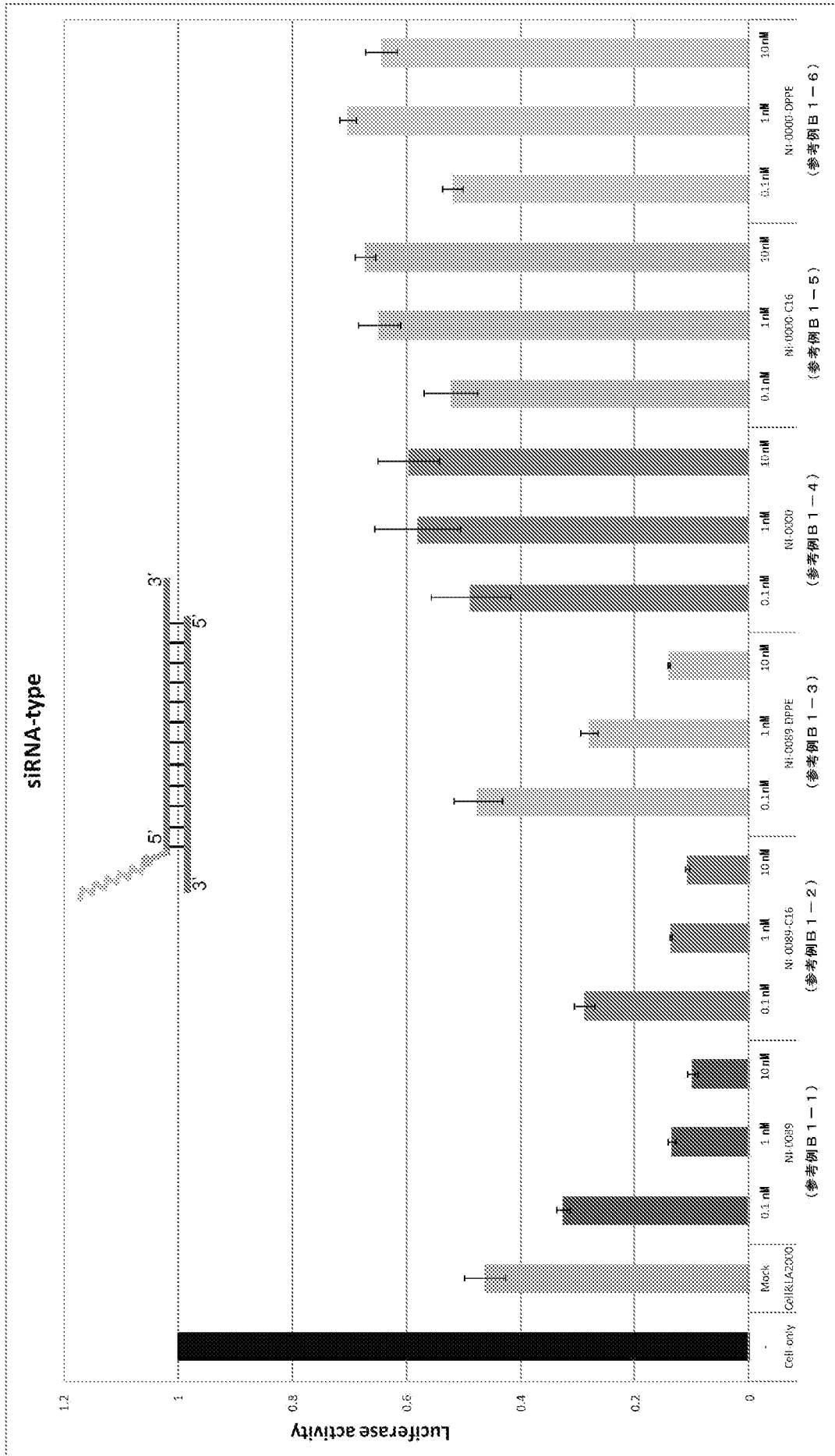
(C)



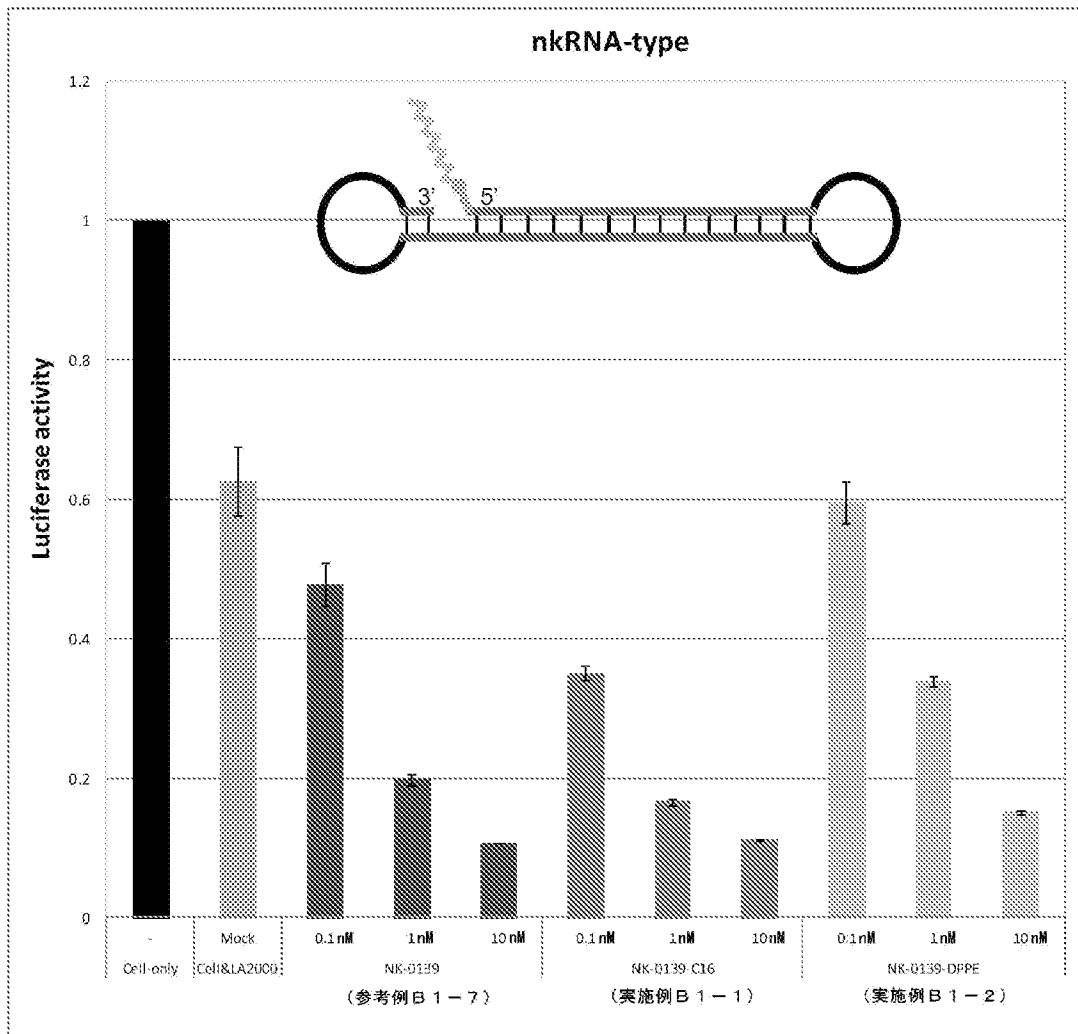
(D)



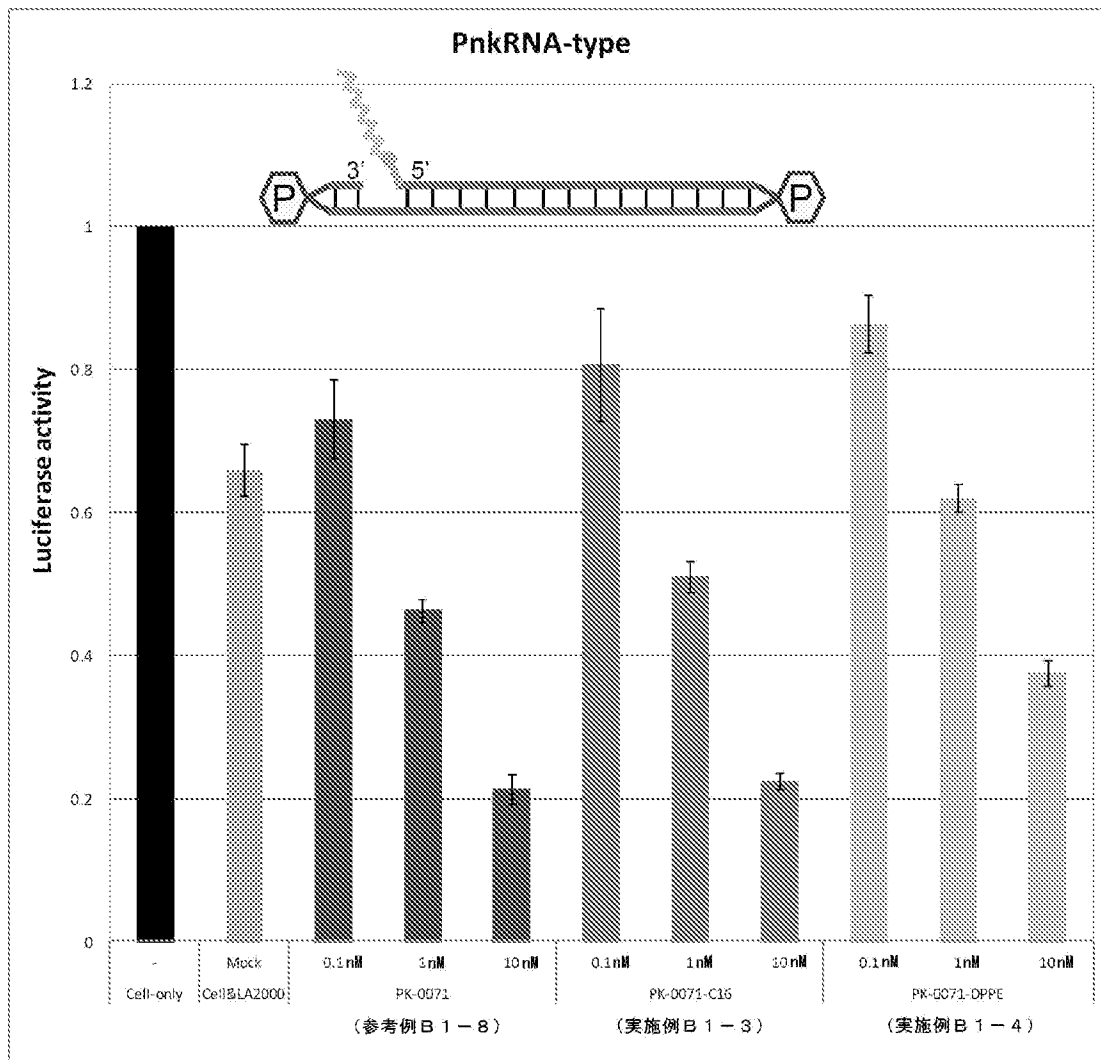
[図3]



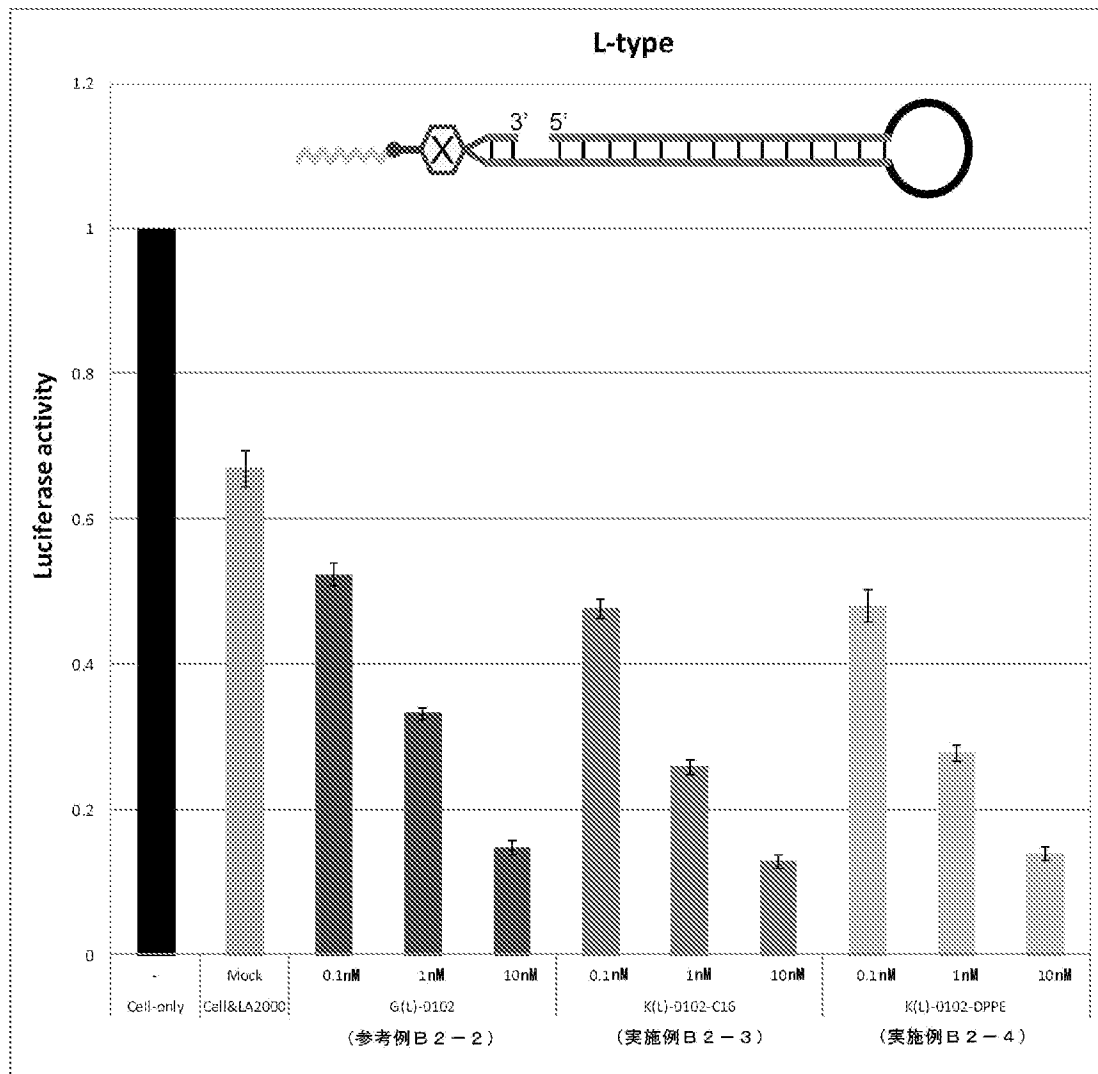
[図4]



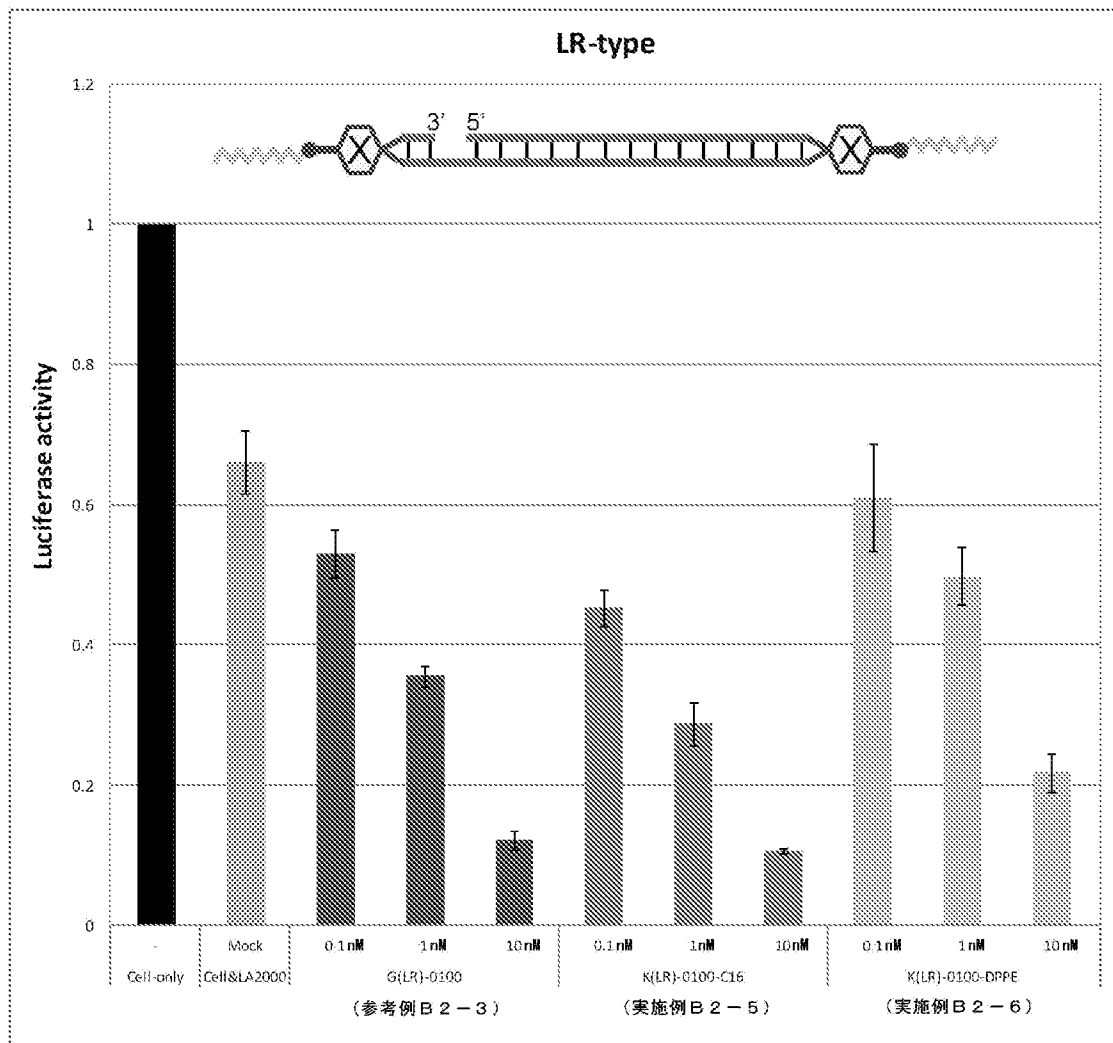
[図5]



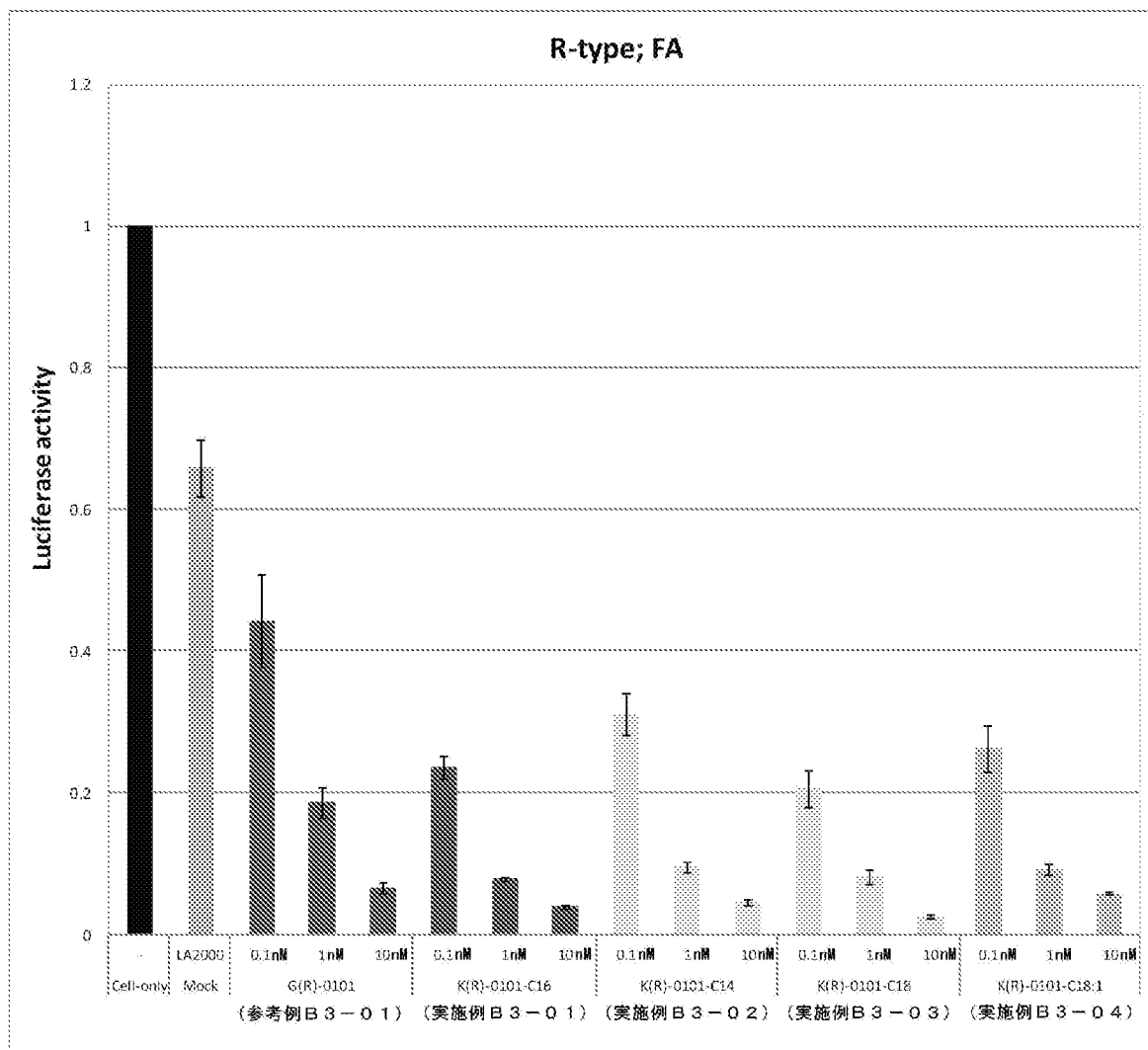
[図7]



[図8]

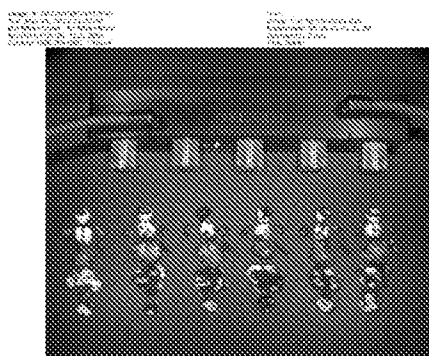


[図9]



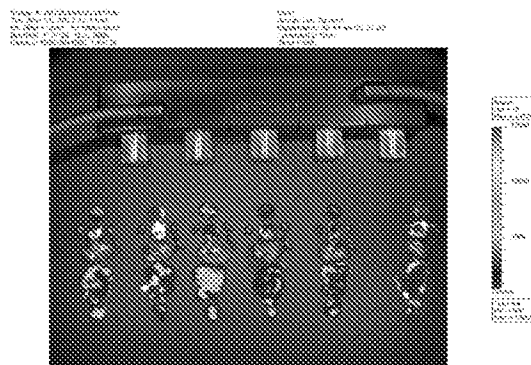
[図10]

(a)



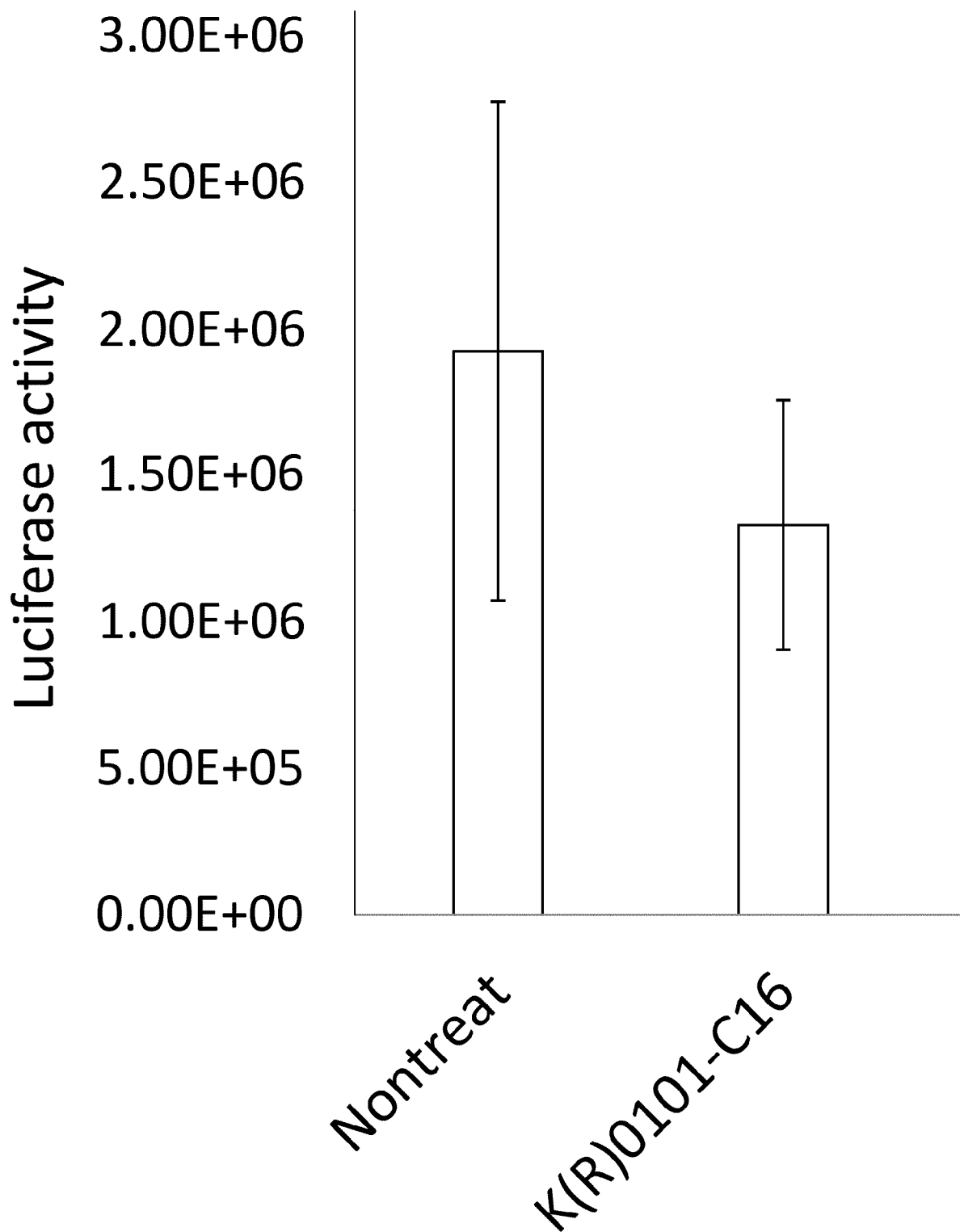
0101-C16

(b)



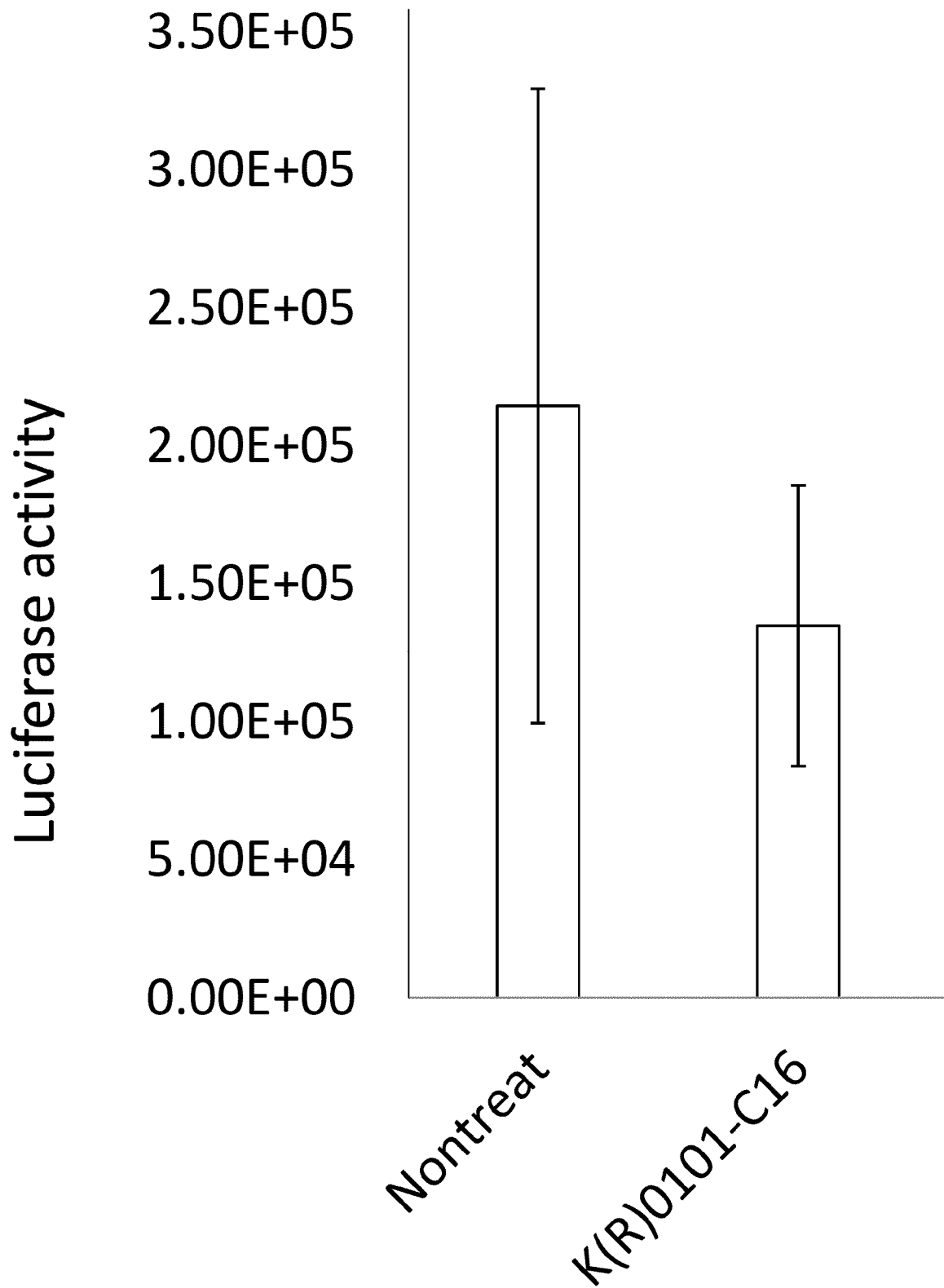
Nontreat

[Figure 11]



Luciferase activity in whole body

[圖12]



Luciferase activity in brain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/113(2010.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/113, A61K47/48, A61K48/00, A61P43/00, C12N15/09

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|--------------------------------------|
| X/Y | WO 2012/005368 A1 (Bonac Corp.),
12 January 2012 (12.01.2012),
entire text
& JP 4968811 B & JP 2012-130342 A
& JP 4965745 B & JP 2013-34470 A
& US 2012/0010271 A1 & US 2012/0035246 A1
& EP 2431466 A1 & EP 2436767 A1
& WO 2012/017919 A | 1-3, 6-12,
14-16, 25/
1-16, 25 |
| Y | SONOKE, S. et al., Tumor regression in mice by
delivery of Bcl-2 small interfering RNA with
pegylated cationic liposomes, Cancer Res., 2008,
Vol.68, No.21, pages 8843-8851. | 1-16, 25 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 June, 2013 (24.06.13)

Date of mailing of the international search report
02 July, 2013 (02.07.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064541

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | JP 2007-508030 A (Kernel Biopharma Inc.),
05 April 2007 (05.04.2007),
entire text
& US 2005/0222009 A1 & EP 1680439 A
& WO 2005/035550 A2 | 1-16,25 |
| Y | JP 2011-501662 A (The Provost, Fellows and
Scholars of the College of the Holy and
Undivided Trinity of Queen Elizabeth near
Dublin),
13 January 2011 (13.01.2011),
entire text
& US 2011/0064792 A1 & EP 2209894 A
& WO 2009/047362 A2 | 1-16,25 |
| Y | WO 2006/022325 A1 (Nippon Shinyaku Co., Ltd.),
02 March 2006 (02.03.2006),
entire text
& JP 5087924 B & US 2007/0244058 A1
& US 7655768 B2 & EP 1783137 A1 | 1-16,25 |
| Y | WO 2007/099981 A1 (Nippon Shinyaku Co., Ltd.),
07 September 2007 (07.09.2007),
entire text
& JP 5093095 B & US 2009/0292005 A1
& EP 2003140 A2 | 1-16,25 |
| Y | WO 2011/076807 A2 (NOVARTIS AG),
30 June 2011 (30.06.2011),
entire text
& US 2011/0200582 A1 & EP 2516010 A | 1-16,25 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/064541

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 17-24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 17 to 24 involve therapeutic methods for a human being and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/113, A61K47/48, A61K48/00, A61P43/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)、PubMed、CiNii

| C. 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------|---|-------------------------------|
| 引用文献の
カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する
請求項の番号 |
| X/Y | WO 2012/005368 A1 (株式会社ボナック)
2012.01.12, 全文
& JP 4968811 B & JP 2012-130342 A & JP 4965745 B & JP 2013-34470 A & US 2012/0010271 A1 & US 2012/0035246 A1 & EP 2431466 A1 & EP 2436767 A1 & WO 2012/017919 A | 1-3, 6-12, 14-16, 25/1-16, 25 |
| Y | SONOKE, S. et al., Tumor regression in mice by delivery of Bcl-2 small interfering RNA with pegylated cationic liposomes, Cancer Res., 2008, Vol.68, No.21, pages 8843-8851. | 1-16, 25 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

| | |
|---|---|
| <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> | <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p> |
|---|---|

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| 国際調査を完了した日
24.06.2013 | 国際調査報告の発送日
02.07.2013 |
|--------------------------|--------------------------|

| | | | |
|---|----------------------------|-----|---------|
| 国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)
白井 美香保 | 4 N | 4 5 0 2 |
| | 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | | |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|----------------|
| 引用文献の
カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する
請求項の番号 |
| Y | JP 2007-508030 A (カーネル・バイオフィーマ・インコーポレイテッド) 2007.04.05, 全文
& US 2005/0222009 A1 & EP 1680439 A & WO 2005/035550 A2 | 1-16, 25 |
| Y | JP 2011-501662 A (ザ プロウボウスト・フェロウズ・アンド・スカラズ・オブ・ザ・カレッジ・オブ・ザ・ホリー・アンド・アンデバイデッド・トリニティ・オブ・クイーン・エリザベス・ニア・ダブリン) 2011.01.13, 全文
& US 2011/0064792 A1 & EP 2209894 A & WO 2009/047362 A2 | 1-16, 25 |
| Y | WO 2006/022325 A1 (日本新薬株式会社)
2006.03.02, 全文
& JP 5087924 B & US 2007/0244058 A1 & US 7655768 B2 & EP 1783137 A1 | 1-16, 25 |
| Y | WO 2007/099981 A1 (日本新薬株式会社)
2007.09.07, 全文
& JP 5093095 B & US 2009/0292005 A1 & EP 2003140 A2 | 1-16, 25 |
| Y | WO 2011/076807 A2 (NOVARTIS AG)
2011.06.30, 全文
& US 2011/0200582 A1 & EP 2516010 A | 1-16, 25 |

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 17-24 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 1 7 ~ 2 4 は、人間を対象として治療する方法を含んでおり、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。