

(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  
2019年4月18日(18.04.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/074110 A1

(51) 国際特許分類:  
C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/038174

(22) 国際出願日: 2018年10月12日(12.10.2018)

(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 2017-199945 2017年10月13日(13.10.2017) 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1488-4 Fukuoka (JP).

(72) 発明者: 大木 忠明 (OHGI, Tadaaki); 〒8390861 福岡県久留米市合川町1488-4 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1488-4 福岡バイオファクトリー 株式会社ボナック内 Fukuoka (JP). 木下 高志 (KINOSHITA, Takashi); 〒8390861 福岡県久留米市合川町1488-4 福岡バイオファクトリー 株式会社ボナック内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 高島 一, 外 (TAKASHIMA, Hajime et al.); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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.

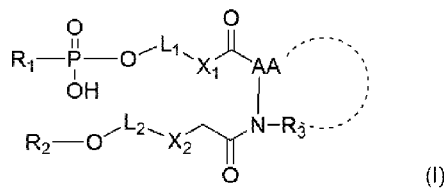
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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))

(54) Title: SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID MOLECULE, AND PRODUCTION METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称: 一本鎖核酸分子およびその製造方法



(57) Abstract: The present invention provides a novel single-stranded nucleic acid molecule, and a production method therefor. The present invention is related to a production method for a single-stranded nucleic acid molecule represented by general formula (I) (each of the symbols in the formula is as defined in the description).

(57) 要約: 本発明は、新規な一本鎖核酸分子およびその製造方法を提供する。本発明は、一般式 (I) : [式中の各記号は明細書に記載の通りである。] で表される一本鎖核酸分子の製造方法に関する。



WO 2019/074110 A1

## 明 細 書

発明の名称：一本鎖核酸分子およびその製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、一本鎖核酸分子およびその製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] 一本鎖核酸分子としては、例えば特許文献1および2に記載のものが知られている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0003] 特許文献1：WO2012/005368

特許文献2：WO2012/017919

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0004] 一般的な長鎖オリゴマーの合成では、技術的および生産的課題として、反応収量の低下、副生成物の除去の困難さ、アミダイトモノマーの使用の制限、コスト高などが挙げられており、これらの課題を解決することができる新たな簡易で汎用性を伴う、実用的な製造方法の開発が望まれている。

#### 課題を解決するための手段

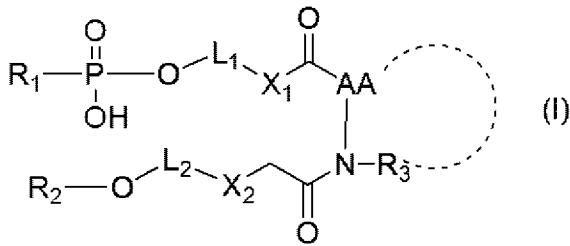
[0005] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、式(Ⅰ)で表される核酸と式(Ⅳ)で表される化合物とを反応させた後、式(ⅠⅠ)で表される核酸と反応させる方法が、長鎖オリゴマーの合成でしばしば問題となるN-1、2、3等の短いオリゴマーのコンタミネーションを顕著に回避でき、そして反応生成物の精製が容易であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0006] すなわち、本発明は、以下の通りである。

[1] 下記一般式(Ⅰ)：

[0007]

[化1]



[0008] [式中、

$R_1$ は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その3'末端ヌクレオチド残基が $-P(=O)(OH)-O-$ と結合し；

$R_2$ は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その5'末端ヌクレオチド残基が $-O-$ と結合し；

$X_1$ および $X_2$ は、それぞれ独立して、NH、SまたはOを示し；

$L_1$ および $L_2$ は、それぞれ独立して、 $C_{1-30}$ アルキレン鎖、または $-(CH_2)_l-(O-(CH_2)_m-)_n-$ (式中、 $l$ は1~3の整数を示し、 $m$ は1~3の整数を示し、 $n$ は1~10の整数を示す。)を示し；

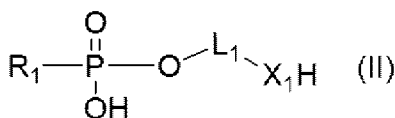
$-C(=O)-AA-NR_3-$ は、アミノ酸残基を示し；

$R_3$ は、水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基を示すか、あるいは、AAと一緒になって窒素含有複素環を形成する。]

で表される一本鎖核酸分子(以下、一本鎖核酸分子(I)ともいう)の製造方法であって、

(工程1) 下記一般式(II)：

[0009] [化2]

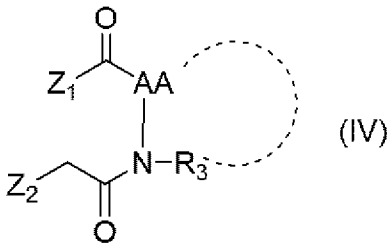


[0010] [式中の各記号は前記と同義である。]

で表される核酸(以下、核酸(II)ともいう)を、下記一般式(IV)：

[0011]

[化3]



[0012] [式中、

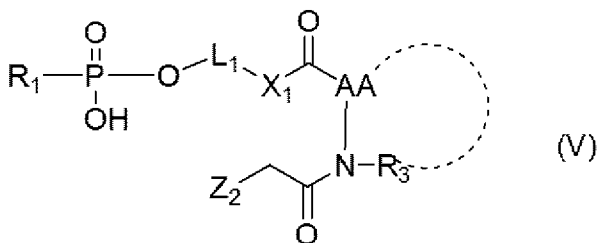
$Z_1$ は、スクシンイミジルオキシ基、ベンゾトリアゾリルオキシ基、ペンタフルオロフェノキシ基またはハロゲン原子を示し；

$Z_2$ は、ハロゲン原子を示し；

その他の記号は前記と同義である。]

で表される化合物（以下、化合物（IV）ともいう）と反応させて、下記一般式（V）：

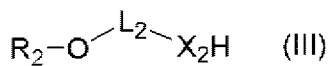
[0013] [化4]



[0014] [式中の各記号は前記と同義である。]

で表される核酸（以下、核酸（V）ともいう）を得る工程；および  
（工程2）一般式（V）で表される核酸を、下記一般式（III）：

[0015] [化5]



[0016] [式中の各記号は前記と同義である。]

で表される核酸（以下、核酸（III）ともいう）と反応させて、上記一般式（I）で表される一本鎖核酸分子を得る工程；  
を包含する、製造方法。

[2] アミノ酸残基が、プロリン残基、グリシン残基、または側鎖アミノ

基が保護されていてもよいリジン残基である、上記 [1] に記載の製造方法。

[3]  $X_2$  が S である、上記 [1] に記載の製造方法。

[4]  $X_1$  が NH である、上記 [1] に記載の製造方法。

[5]  $L_1$  が、 $C_{2-11}$  アルキレン鎖である、請求項 1 に記載の製造方法。

[6]  $L_1$  が、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$  (式中、 $n$  は 1~5 の整数を示す。) である、上記 [1] に記載の製造方法。

[7]  $L_2$  が、 $C_{2-11}$  アルキレン鎖である、上記 [1] に記載の製造方法。

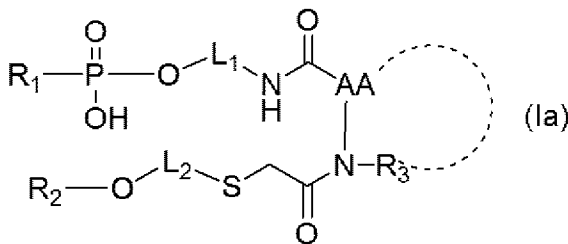
[8]  $L_2$  が、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$  (式中、 $n$  は 1~5 の整数を示す。) である、上記 [1] に記載の製造方法。

[9]  $Z_1$  が、スクシンイミジルオキシ基である、上記 [1] に記載の製造方法。

[10] 一本鎖核酸分子が、標的遺伝子の発現を抑制する配列を含む、上記 [1] ~ [9] のいずれかに記載の製造方法。

[11] 下記一般式 (Ia) :

[0017] [化6]



[0018] [式中、

$R_1$  は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その 3' 末端ヌクレオチド残基が  $-P(=O)(OH)-O-$  と結合し；

$R_2$  は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その 5' 末端ヌクレオチド残基が  $-O-$  と結合し；

$L_1$  および  $L_2$  は、それぞれ独立して、 $C_{1-30}$  アルキレン鎖、または  $-(CH_2)_l-(O-(CH_2)_m-)_n-$  (式中、 $l$  は 1~3 の整数を示し、 $m$  は 1~3 の整数を示し、 $n$  は 1~10 の整数を示す。) を示し；

$-C(=O)-AA-NR_3-$ は、アミノ酸残基を示し；

$R_3$ は、水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基を示すか、あるいは、 $AA$ と一緒に  
なって窒素含有複素環を形成する。]

で表される一本鎖核酸分子（以下、一本鎖核酸分子（I a）ともいう）。

[12] アミノ酸残基が、プロリン残基、グリシン残基、または側鎖アミノ基が保護されていてもよいリジン残基である、上記[11]に記載の一本鎖核酸分子。

[13]  $L_1$ が、 $C_{2-11}$ アルキレン鎖である、上記[11]に記載の一本鎖核酸分子。

[14]  $L_1$ が、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$ （式中、 $n$ は1~5の整数を示す。）である、上記[11]に記載の一本鎖核酸分子。

[15]  $L_2$ が、 $C_{2-11}$ アルキレン鎖である、上記[11]に記載の一本鎖核酸分子。

[16]  $L_2$ が、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$ （式中、 $n$ は1~5の整数を示す。）である、上記[11]に記載の一本鎖核酸分子。

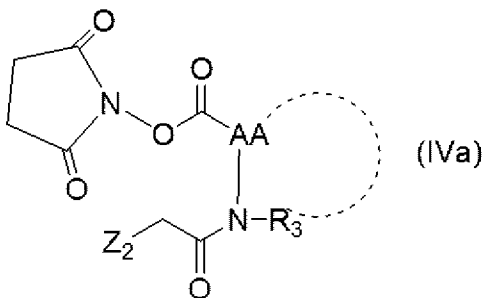
[17] 標的遺伝子の発現を抑制する配列を含む、上記[11]~[16]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子。

[18] 上記[11]~[17]のいずれかに記載の一本鎖核酸分子を含む、医薬組成物。

[19] 上記[17]に記載の一本鎖核酸分子を含む、標的遺伝子の発現抑制剤。

[20] 下記一般式（IV a）：

[0019] [化7]



[0020] [式中、

$Z_2$ は、ハロゲン原子を示し；

$-C(=O)-AA-NR_3-$ は、アミノ酸残基を示し；

$R_3$ は、水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基を示すか、あるいは、 $AA$ と一緒に  
なって窒素含有複素環を形成する。]

で表される化合物（以下、化合物（IVa）ともいう）。

[21] アミノ酸残基が、プロリン残基、グリシン残基、または側鎖アミノ基が保護されていてもよいリジン残基である、上記[20]に記載の化合物。

[22]  $Z_2$ が、塩素原子または臭素原子である、上記[20]に記載の化合物。

### 発明の効果

[0021] 本発明によれば、高難易度の長鎖オリゴマーの合成が短鎖オリゴマーの技術を駆使して可能となる新規な一本鎖核酸分子の製造方法、および該方法によって製造される新規な一本鎖核酸分子を提供できる。

### 図面の簡単な説明

[0022] [図1]図1は、実施例2で合成されるセンス鎖+PのHPLCチャートである。

[図2]図2は、実施例2で合成されるアンチセンス鎖（SH体）のHPLCチャートである。

[図3]図3は、実施例2で合成される一本鎖核酸分子PS-0001-C3のHPLCチャートである。

[図4]図4は、実施例4で合成される一本鎖核酸分子KS-0001のHPLCチャートである。

[図5]図5は、参考例で合成される一本鎖核酸分子AS-0001のHPLCチャートである。

[図6]図6は、試験例1におけるTGF- $\beta$ 1遺伝子の発現量の相対値を示すグラフである。

[図7]図7は、本発明の一本鎖核酸分子の一例を示す模式図である。

[図8]図8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9]図9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。

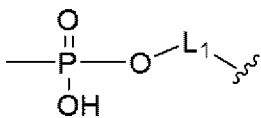
### 発明を実施するための形態

[0023] 以下に、本発明を詳細に説明する。まず、式中の各記号の定義について詳述する。

[0024]  $R_1$ は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その3'末端ヌクレオチド残基が $-P(=O)(OH)-O-$ と結合し、 $R_2$ は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その5'末端ヌクレオチド残基が $-O-$ と結合している。

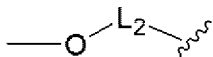
「ヌクレオチド残基」とは、ヌクレオチド（ヌクレオシドの糖部分の5'位の水酸基にリン酸が結合）の5'位のリン酸基中のOHと、3'位の水酸基中のHを除いた2価の基をいい、 $R_1$ 中の「3'末端ヌクレオチド残基」では、その3'位が、式(1)中の

[0025] [化8]



[0026] と結合し、 $R_2$ 中の「5'末端ヌクレオチド残基」では、その5'位が、式(1)中の

[0027] [化9]



と結合している。

[0028]  $R_1$ は、後述する本発明の第1の一本鎖核酸分子中のデオキシリボヌクレオチド(DNA)および/またはリボヌクレオチド(RNA)を構成単位とするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドをそれぞれ含む領域(X)及び領域(Xc)の一方であってもよく、かつ $R_2$ は他方であってもよい。あるいは、 $R_1$ は、後述する本発明の第2の一本鎖核酸分子中のデオキシリボヌクレオ



チド (DNA) および/またはリボヌクレオチド (RNA) を構成単位とするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドをそれぞれ含む領域 (X) および領域 (Y) ならびに領域 (Xc) および領域 (Yc) の一方であってもよく、かつ R<sub>2</sub> は他方であってもよい。また、前記領域 (Yc) と前記領域 (Y) とは、後述するように、例えば、直接連結してもよいし、間接的に連結してもよい。

[0029] X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> は、それぞれ独立して、NH、S または O を示す。

X<sub>1</sub> は、好ましくは、NH である。

X<sub>2</sub> は、好ましくは、S である。

[0030] L<sub>1</sub> および L<sub>2</sub> は、それぞれ独立して、C<sub>1-30</sub> アルキレン鎖、または  $-(CH_2)_l-(O-(CH_2)_m-)_n-$  (式中、l は 1~3 の整数を示し、m は 1~3 の整数を示し、n は 1~10 の整数を示す。) を示す。

L<sub>1</sub> または L<sub>2</sub> で示される「C<sub>1-30</sub> アルキレン鎖」としては、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-CH(C_2H_5)-$ 、 $-CH(C_3H_7)-$ 、 $-(CH(CH_3))_2-$ 、 $-CH_2-CH(CH_3)-$ 、 $-CH(CH_3)-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 、 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_7-$ 、 $-(CH_2)_8-$ 、 $-(CH_2)_9-$ 、 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_{11}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$  等が挙げられる。当該「C<sub>1-30</sub> アルキレン鎖」は、好ましくは C<sub>2-11</sub> アルキレン鎖であり、より好ましくは C<sub>3-6</sub> アルキレン鎖であり、特に好ましくは、L<sub>1</sub> においては C<sub>4-6</sub> アルキレン鎖であり、L<sub>2</sub> においては C<sub>3</sub> アルキレン鎖である。

[0031] L<sub>1</sub> または L<sub>2</sub> で示される「 $-(CH_2)_l-(O-(CH_2)_m-)_n-$ 」において、l は、好ましくは 1~2 の整数であり、m は、好ましくは 1~2 の整数である。n は、好ましくは 1~5 の整数であり、より好ましくは 1~2 の整数である。

L<sub>1</sub> または L<sub>2</sub> で示される「 $-(CH_2)_l-(O-(CH_2)_m-)_n-$ 」の具体例は、 $-CH_2(OCH_2)_n-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$  およ

び $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-$  (式中、 $n$ は1~5の整数である。)であり、

好適な具体例は、 $-\text{CH}_2(\text{OCH}_2)_n-$ および $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$  (式中、 $n$ は1~5の整数である。)であり、

さらに好適な具体例は、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$  (式中、 $n$ は1~5の整数である。)であり、

特に好適な具体例は、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$  (式中、 $n$ は1~2の整数である。)である。

[0032]  $L_1$ および $L_2$ は、好ましくは、それぞれ独立して、 $C_{2-11}$ アルキレン鎖または $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$  (式中、 $n$ は1~5の整数である。)である。

$L_1$ および $L_2$ は、より好ましくは、それぞれ独立して、 $C_{3-6}$ アルキレン鎖または $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$  (式中、 $n$ は1~2の整数である。)である。

特に好ましくは、 $L_1$ は、 $C_{4-6}$ アルキレン鎖であり、かつ $L_2$ は、 $C_3$ アルキレン鎖である。

[0033] 式(I)、(Ia)、(IV)、(IVa)および(V)において、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{AA}-\text{NR}_3-$ は、アミノ酸残基を示し、 $R_3$ は、水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基を示すか、あるいは、AAと一緒に窒素含有複素環を形成する。

$R_3$ で示される「 $C_{1-6}$ アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1,1-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、2-エチルブチルが挙げられる。

$R_3$ とAAと一緒に形成する「窒素含有複素環」としては、例えば、ピロリン、ピロリジン、イミダゾリン、イミダゾリジン、オキサゾリン、オキサゾリジン、ピラゾリン、ピラゾリジン、チアゾリン、チアゾリジン、ピ

ペリジン、ピペラジン、テトラヒドロピリジン、ジヒドロピリジン、テトラヒドロピリミジン、テトラヒドロピリダジン、モルホリン、チオモルホリン、アゼパニン、ジアゼパン、アゼピンなどの3ないし8員単環式窒素含有非芳香族複素環が挙げられる。中でも、ピロリジンが好ましい。

R<sub>3</sub>は、好ましくは、水素原子であるか、あるいはAAと一緒にあってピロリジンを形成する。

当該「アミノ酸残基」とは、アミノ酸のカルボキシ基のOHとアミノ基の1個の水素原子を除いた2価の基を意味する。アミノ酸の側鎖にカルボキシ基やアミノ基が存在する場合、これらの基からのOHや水素原子を除いた2価の基も「アミノ酸残基」に含まれる。

当該「アミノ酸残基」は、特に限定されず、公知の全てのアミノ酸由来の残基がいずれも例示され、 $\alpha$ -アミノ酸由来の残基、 $\beta$ -アミノ酸由来の残基、 $\gamma$ -アミノ酸由来の残基等が挙げられる。

R<sub>3</sub>は、AAと一緒にあって窒素含有複素環を形成してもよく、このような「アミノ酸残基」としては、プロリン残基等の環状アミノ酸残基が挙げられる。

また、アミノ酸残基が側鎖官能基(例、アミノ基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、スルファニル基(SH)、アミド基(CONH<sub>2</sub>)等)を有する場合は、当該側鎖官能基は公知の適切な保護基で保護されていてもよい。アミノ基の保護基としては、tert-ブトキシカルボニル(Boc)基、ベンジルオキシカルボニル(Z)基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基等が挙げられ、カルボキシ基の保護基としては、メチル基、エチル基、ベンジル基等が挙げられる。ヒドロキシ基やスルファニル基(SH)の保護基としては、トリチル(トリフェニルメチル)基等が挙げられる。

さらに、アミノ酸残基は、側鎖官能基が糖、脂質、ペプチド等で修飾されていてもよい。

当該「アミノ酸残基」の好適な具体例としては、プロリン残基、グリシン残基、リジン残基、フェニルアラニン残基、ベータアラニン残基等が挙げら

れる。ここで、リジン残基は側鎖アミノ基が、*tert*-ブトキシカルボニル基で保護されていてもよいし、又は、糖、脂質、ペプチド等で修飾されていてもよい。

好ましい「アミノ酸残基」としては、プロリン残基、グリシン残基、または側鎖アミノ基が保護されていてもよいリジン残基（例えば、側鎖アミノ基が*tert*-ブトキシカルボニル基で保護されていてもよいリジン残基）であり、プロリン残基、または側鎖アミノ基が保護されていてもよいリジン残基（例えば、側鎖アミノ基が*tert*-ブトキシカルボニル基で保護されていてもよいリジン残基）がより好ましい。

[0034]  $Z_1$ は、スクシンイミジルオキシ基、ベンゾトリアゾリルオキシ基、ペンタフルオロフェノキシ基またはハロゲン原子を示す。

$Z_1$ で示される「ハロゲン原子」としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられ、中でも、塩素原子または臭素原子が好ましい。

$Z_1$ は、好ましくはスクシンイミジルオキシ基である。

[0035]  $Z_2$ は、ハロゲン原子を示す。

$Z_2$ で示される「ハロゲン原子」としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられ、中でも、塩素原子または臭素原子が好ましい。

[0036]  $Z_3$ は、ハロゲン原子を示す。

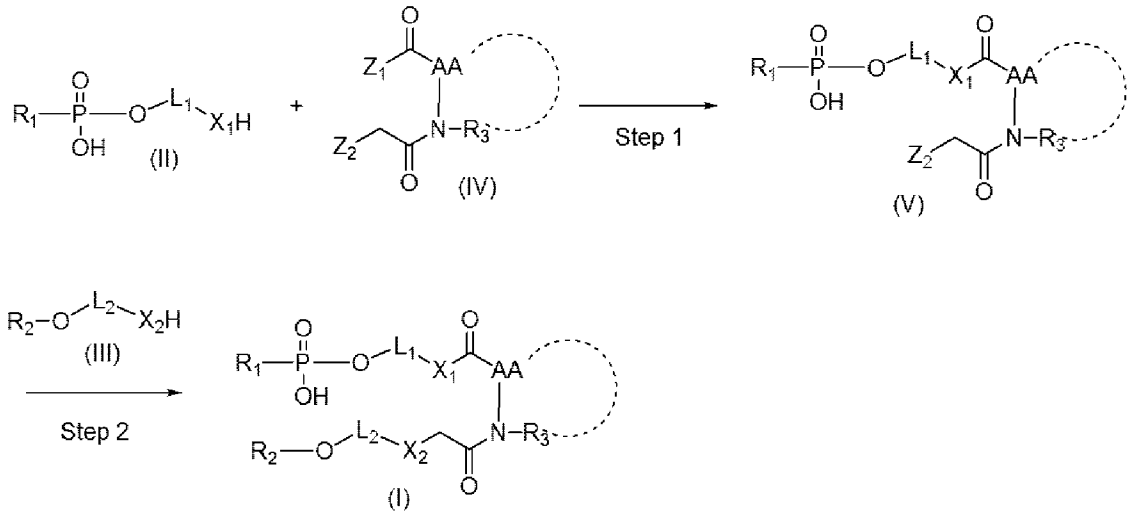
$Z_3$ で示される「ハロゲン原子」としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられ、中でも、塩素原子または臭素原子が好ましい。

[0037] 一本鎖核酸分子（1）の製造法について以下に説明する。一本鎖核酸分子（1）は、例えば、以下の製造法1により製造することができる。

[0038]

## [化10]

## 製造法 1



[0039] [式中の各記号は前記と同義である。]

## [0040] (工程 1)

核酸 (I I) を化合物 (I V) と反応させて、核酸 (V) を製造する。

反応は、通常、塩基性条件下 (好ましくは pH 8~9) (例えば、リン酸緩衝液または炭酸緩衝液中、あるいは、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン等の塩基存在下) で行われる。

また反応は、通常、溶媒中、0°C~室温で行われる。溶媒としては、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等のアミド系溶媒；テトラヒドロフラン (THF)、ジオキサン等のエーテル系溶媒、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル等の極性溶媒；水等が挙げられ、中でも、ジメチルホルムアミドと水の混合溶媒又は水が好ましい。

反応終了後、簡易ゲルろ過カラム等で低分子化合物を除き、核酸 (V) を得る。

## [0041] (工程 2)

核酸 (V) を核酸 (I I I) と反応させて、一本鎖核酸分子 (I) を製造する。

反応は、通常、塩基性条件下 (好ましくは pH 8~9) (例えば、リン酸緩衝液または炭酸緩衝液中) で行われる。

また反応は、通常、溶媒中、室温で行われる。

反応終了後、HPLC等により精製して、一本鎖核酸分子(1)を得る。

[0042]  $-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖官能基が保護されたアミノ酸残基である一本鎖核酸分子(1)は、 $-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖官能基が保護されたアミノ酸残基である化合物(IV)を用いて、工程1および工程2を行うことにより得ることができる。

$-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖官能基が保護されたアミノ酸残基である一本鎖核酸分子(1)は、自体公知の方法に従って脱保護を行い、 $-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖官能基が保護されていないアミノ酸残基である一本鎖核酸分子(1)に導くことができる。例えば、 $-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護されたリジン残基である一本鎖核酸分子(1)は、塩化水素、トリフルオロ酢酸等の酸処理により、 $-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖アミノ基が保護されていないリジン残基である一本鎖核酸分子(1)に導くことができる。

[0043]  $-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖官能基が修飾されたアミノ酸残基である一本鎖核酸分子(1)は、 $-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖官能基が修飾されたアミノ酸残基である化合物(IV)を用いて、工程1および工程2を行うことにより得ることができる。

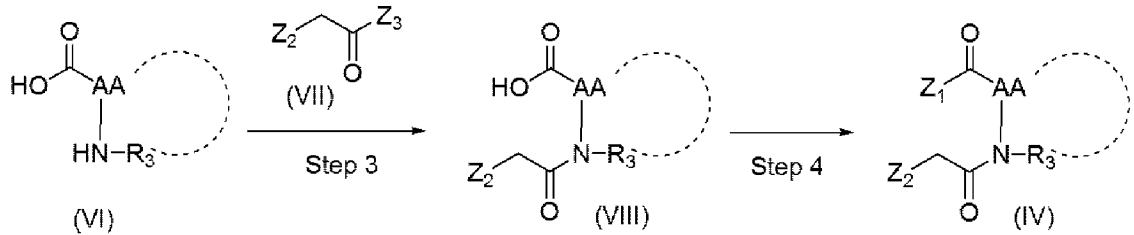
あるいは、 $-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖官能基が保護されていないアミノ酸残基である一本鎖核酸分子(1)の当該側鎖官能基に、糖、脂質、ペプチド等を、アミド化反応、エステル化反応、エーテル化反応等により導入することにより、 $-C(=O)-AA-NR_3-$ が、側鎖官能基が修飾されたアミノ酸残基である一本鎖核酸分子(1)に導くことができる。

[0044] 製造法1で使用する化合物(IV)は、例えば、以下の製造法2により製造することができる。

[0045]

[化11]

製造法2

[0046] [式中、 $Z_3$ は、ハロゲン原子を示し、その他の記号は前記と同義である。]

[0047] (工程3)

アミノ酸である化合物(VI)を化合物(VII)と反応させて、化合物(VIII)を製造する。

$Z_3$ が塩素原子の場合、反応は、通常、溶媒中、室温～加熱下で行われる。溶媒としては、テトラヒドロフラン(THF)、ジオキサン等のエーテル系溶媒；アセトニトリル、ジメチルホルムアミド等の極性溶媒等が挙げられ、中でも、テトラヒドロフランが好ましい。

$Z_3$ が臭素原子の場合、反応は、通常、溶媒中、塩基存在下、冷却下～室温で行われる。溶媒としては、水、テトラヒドロフラン(THF)、ジオキサン等のエーテル系溶媒；アセトニトリル、ジメチルホルムアミド等の極性溶媒等が挙げられ、中でも、水とテトラヒドロフランの混合溶媒が好ましい。塩基としては、水酸化ナトリウム等が挙げられる。

反応終了後、公知の後処理を行い、化合物(VIII)を得る。

[0048] (工程4)

化合物(VIII)のカルボキシル基を $-C(=O)Z_1$ に変換して、化合物(IV)を製造する。

$Z_1$ がスクシンイミジルオキシ基の場合、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等の縮合剤の存在下、化合物(VIII)をN-ヒドロキシこはく酸イミドと反応させることにより行われる。

反応は、通常、溶媒中、室温で行われる。溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン系溶媒、テトラヒドロフラン(THF)、ジオ

キサン等のエーテル系溶媒等が挙げられ、中でも、ジクロロメタンが好ましい。

あるいは、塩基存在下、化合物 (V I I I) をジ (N-スクシンイミジルカーボネート) と反応させることにより行われる。

塩基としては、N, N-ジメチルアミノピリジン等が挙げられる。

反応は、通常、溶媒中、室温で行われる。溶媒としては、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド等の極性溶媒等が挙げられ、中でも、アセトニトリルが好ましい。

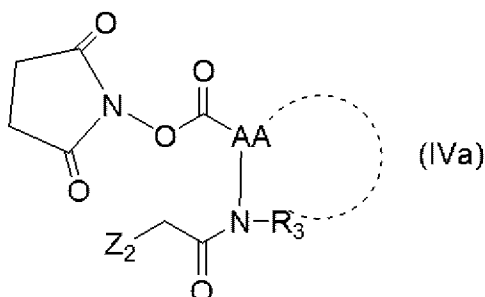
Z<sub>1</sub>がベンゾトリアゾリルオキシ基の場合、化合物 (V I I I) を1-ヒドロキシベンゾトリアゾールと反応させることにより行われる。この反応は、Z<sub>1</sub>がスクシンイミジルオキシ基の場合と同様の方法で行われる。

Z<sub>1</sub>がペンタフルオロフェノキシ基の場合、化合物 (V I I I) をペンタフルオロフェノールと反応させることにより行われる。この反応は、Z<sub>1</sub>がスクシンイミジルオキシ基の場合と同様の方法で行われる。

Z<sub>1</sub>が塩素原子の場合、化合物 (V I I I) を塩化チオニル等の塩素化剤と反応させることにより行われる。

[0049] 化合物 (I V) のうち、Z<sub>1</sub>がスクシンイミジルオキシ基である下記一般式 (I V a) :

[0050] [化12]



[0051] [式中の各記号は前記と同義である。]

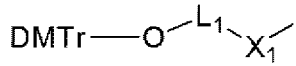
で表される化合物は特に好適に使用される。

[0052] 製造法 1 で使用する核酸 (I I) は、

[0053]



[化13]

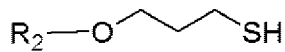


[0054] [式中、DMTrは4, 4'-ジメトキシトリチル基を示し、その他の記号は前記と同義である。]

を含む担体から、DMTr基を除去後、ホスホロアミダイト法による固相合成を開始することにより合成できる。

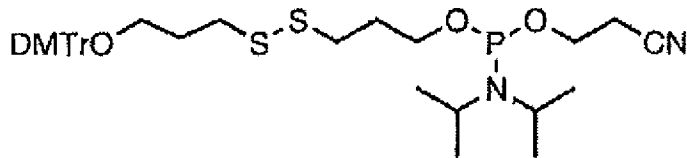
[0055] 製造法1で使用する核酸(111)は、固相合成の最終工程で、5'末端水酸基の保護基を除去後、対応する試剤をホスホロアミダイト法により導入し、適切な処理をすることにより合成できる。例えば、核酸(111)が、

[0056] [化14]



[0057] で表される核酸は、5'末端水酸基の保護基を除去後、ホスホロアミダイト法により

[0058] [化15]

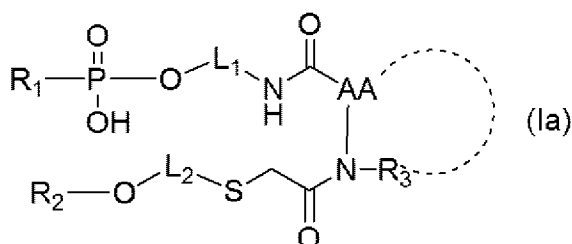


[0059] [式中、DMTrは前記と同義である。]

を導入し、定法に従い固相からの切り出しと脱保護を行った後、ジチオトレイトールで処理することにより、合成することができる。

[0060] このようにして製造される一本鎖核酸分子(1)のうち、下記一般式(1a)：

[0061] [化16]

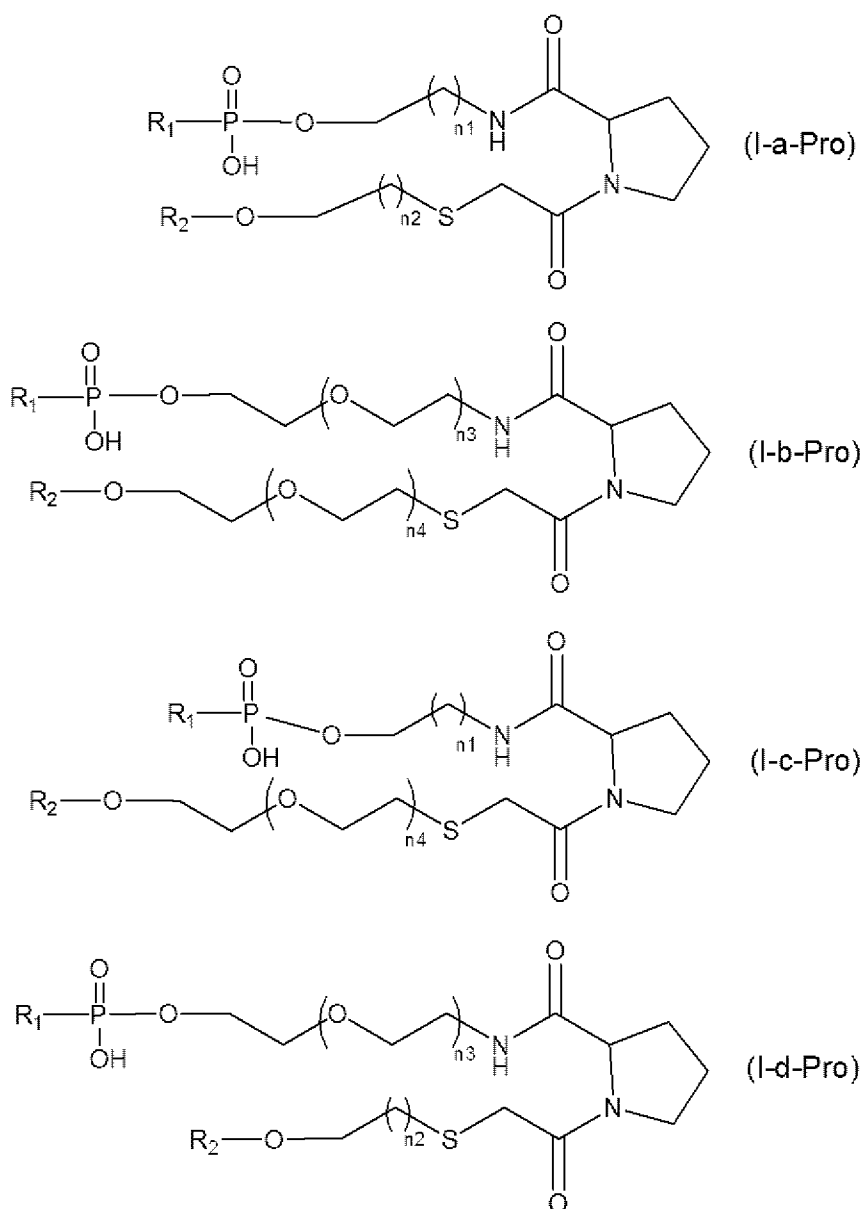


[0062] [式中の各記号は前記と同義である。]

で表される一本鎖核酸分子（以下、一本鎖核酸分子（I a）ともいう）は新規である。

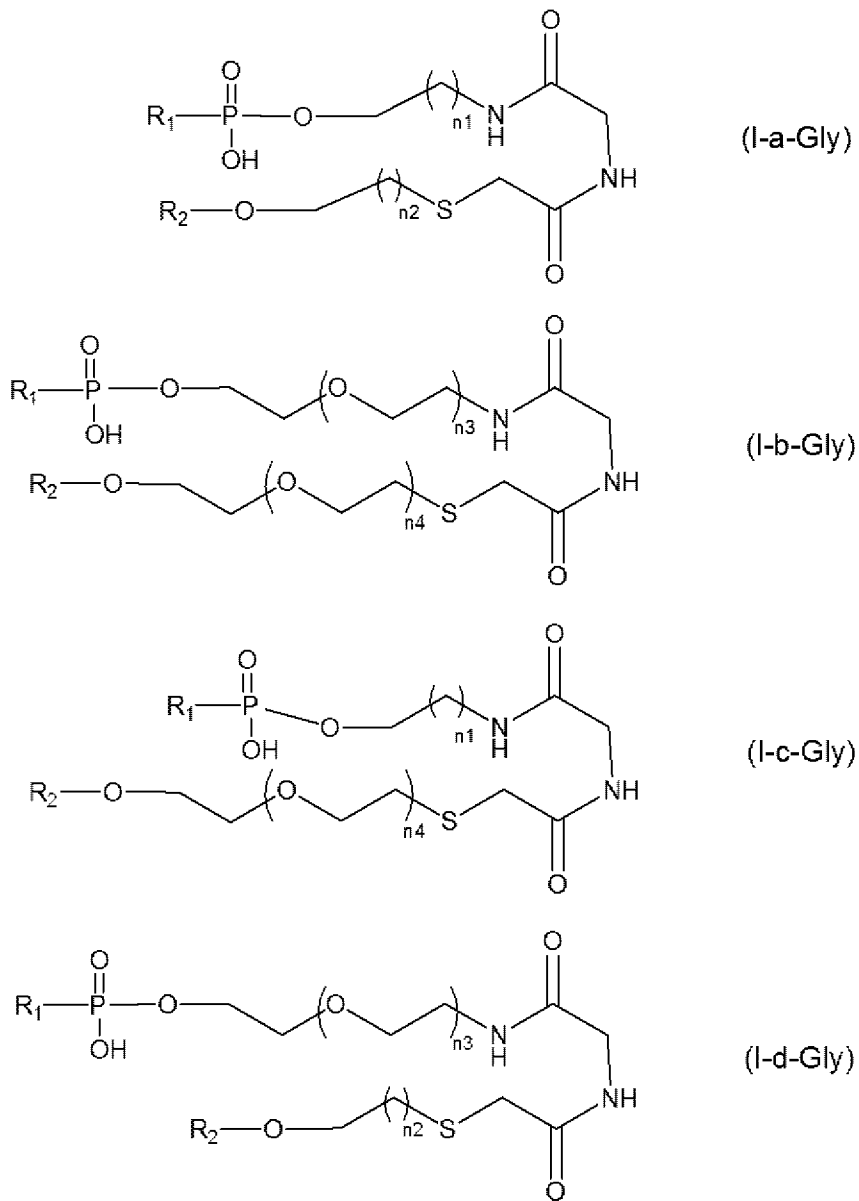
[0063] 一本鎖核酸分子（I a）の好適な例としては、以下の式で表される一本鎖核酸分子が挙げられる。

[0064] [化17]



[0065] [式中、n 1 および n 2 は、それぞれ独立して 1 ~ 1 0 の整数を示し、n 3 および n 4 は、それぞれ独立して 1 ~ 5 の整数を示し、その他の記号は前記と同義である。]

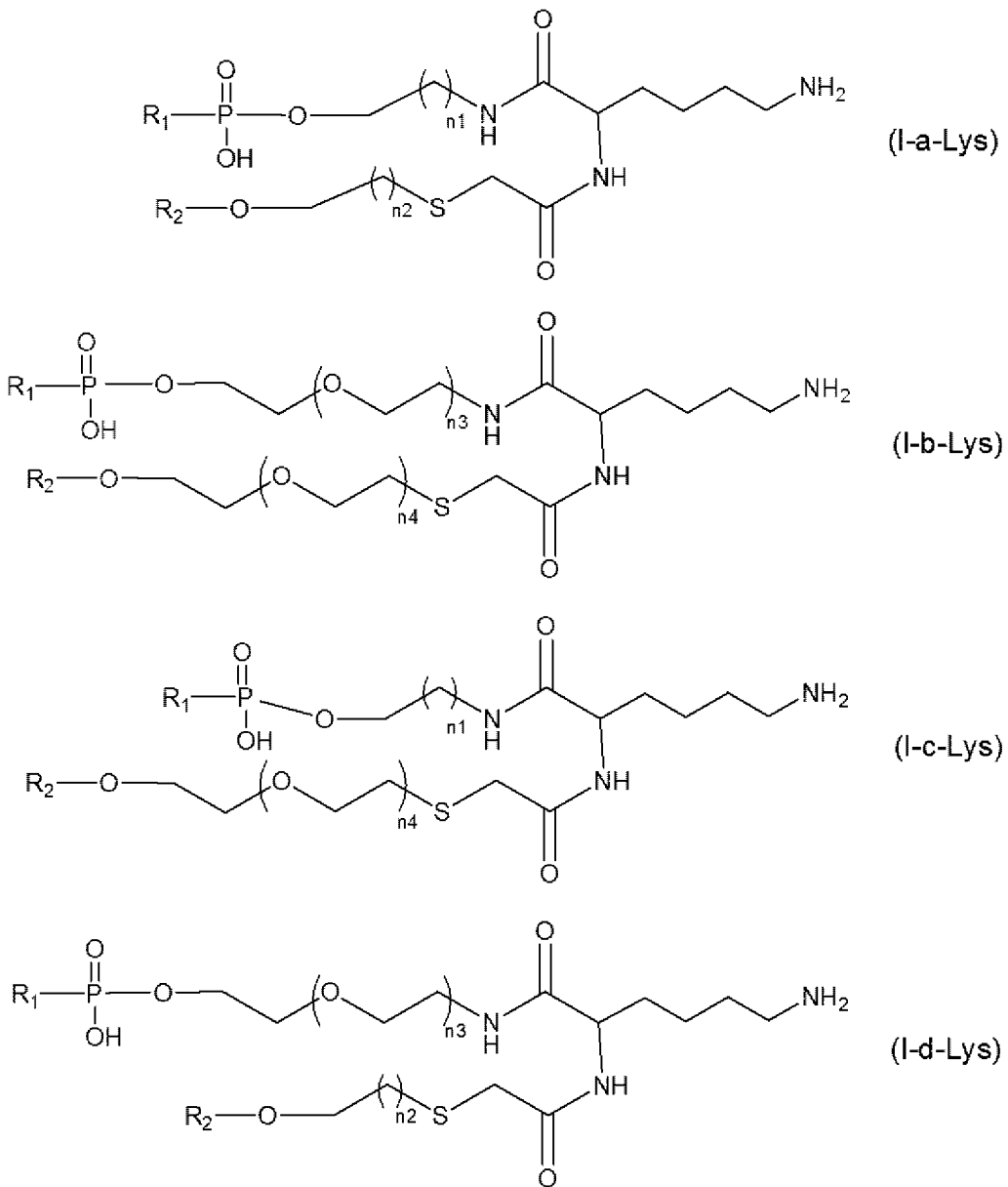
[0066] [化18]



[0067] [式中の各記号は前記と同義である。]

[0068]

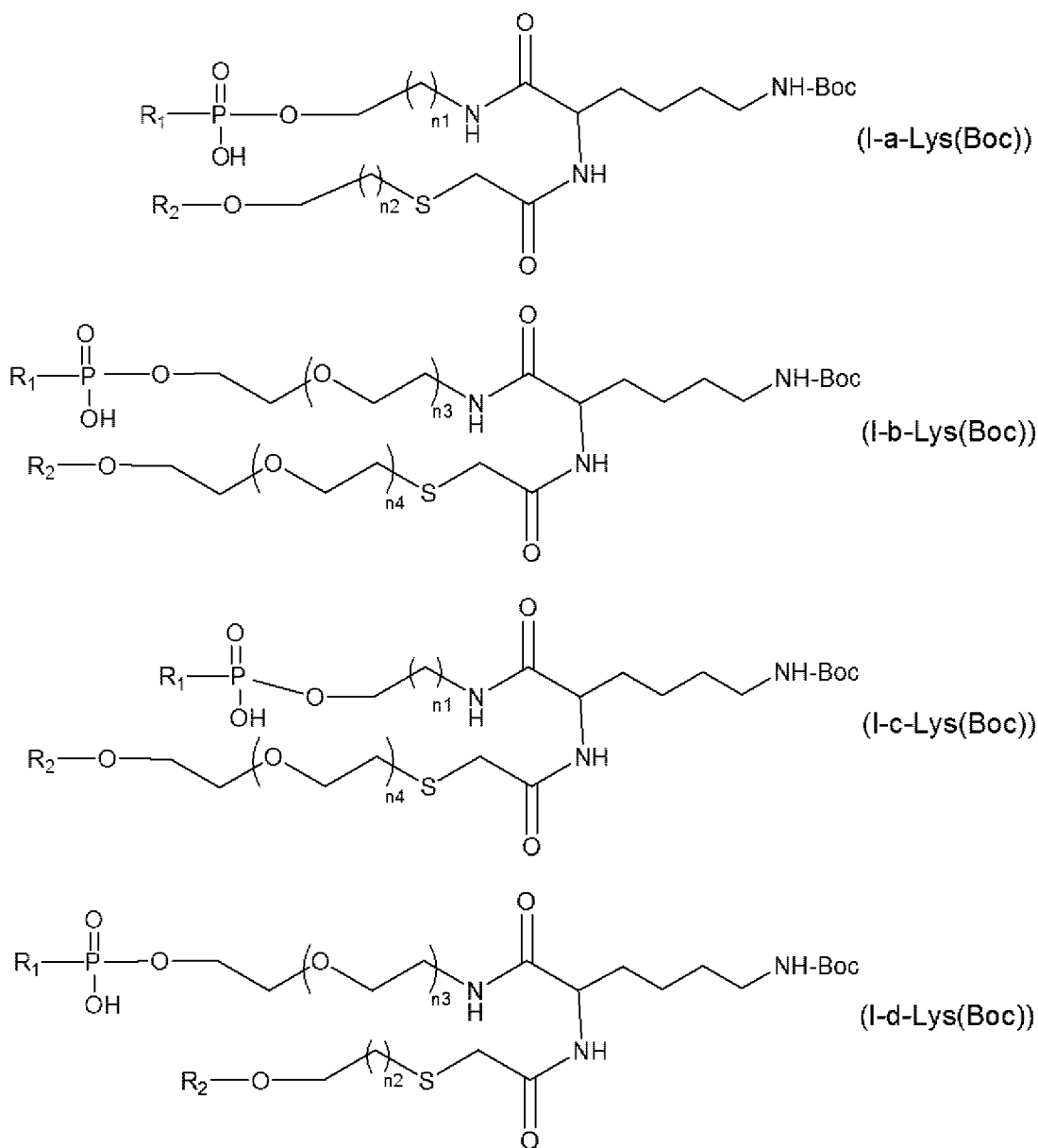
[化19]



[0069] [式中の各記号は前記と同義である。]

[0070]

[化20]



[0071] [式中、Bocはtert-ブトキシカルボニル基を示し、その他の記号は前記と同義である。]

上記式において、

n 1 は、好ましくは3～5の整数であり、

n 2 は、好ましくは2であり、

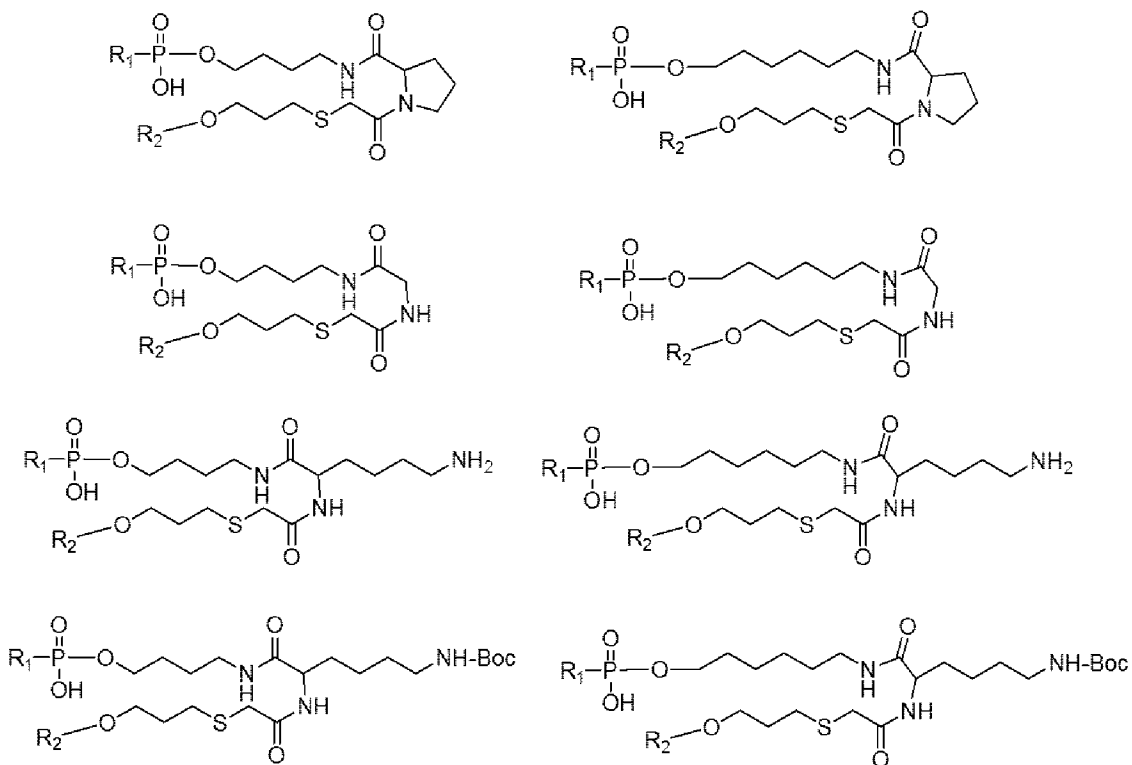
n 3 は、好ましくは1～2の整数であり、

n 4 は、好ましくは1～2の整数である。

[0072] 一本鎖核酸分子 (I a) のより好適な例としては、以下の式で表される一

本鎖核酸分子が挙げられる。

[0073] [化21]

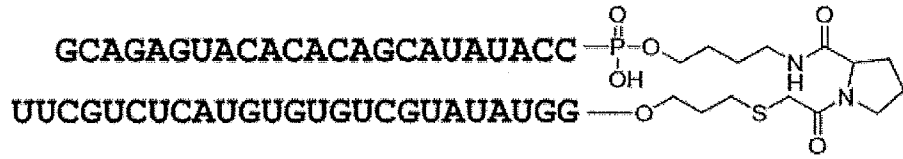


[0074] [式中、Bocはtert-ブトキシカルボニル基を示し、その他の記号は前記と同義である。]

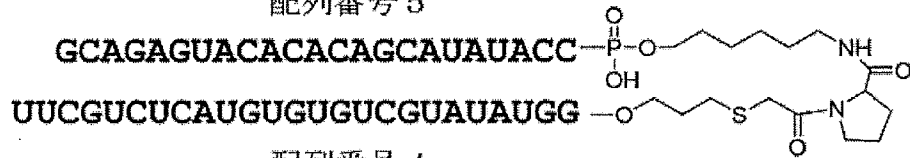
一本鎖核酸分子(1a)のさらに好適な例としては、以下のものが挙げられる。

[0075]

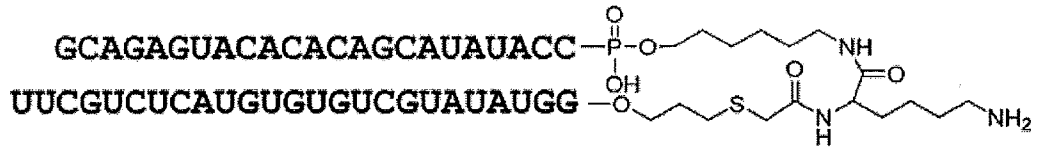
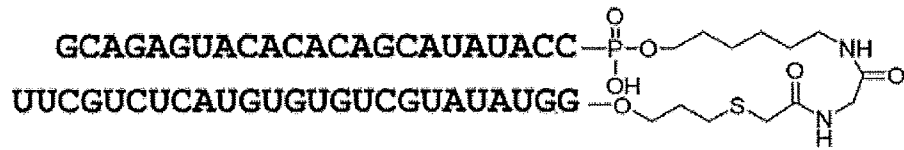
[化22]



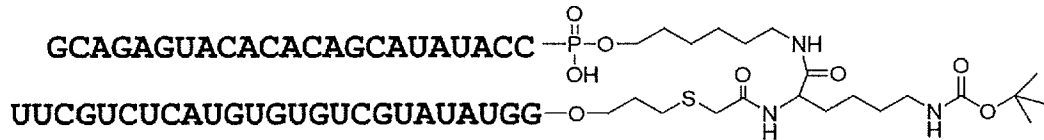
配列番号 5



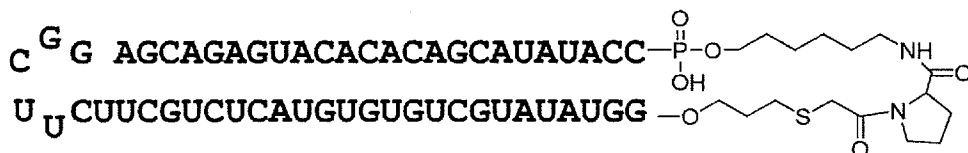
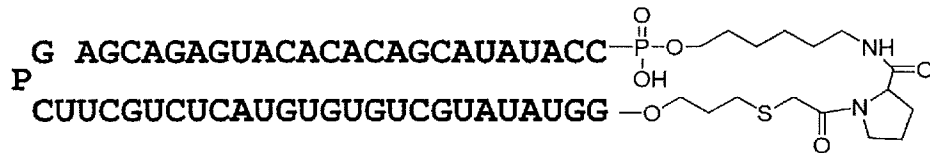
配列番号 4



[0076] [化23]

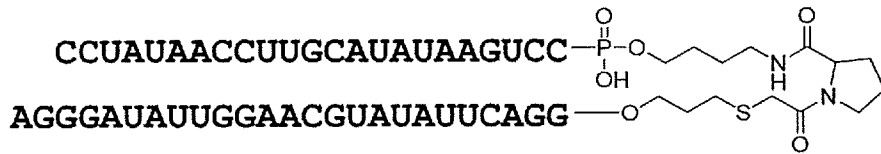


[0077] [化24]

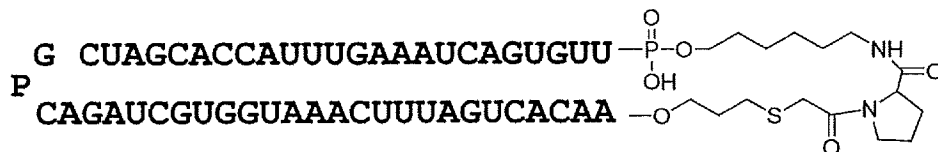
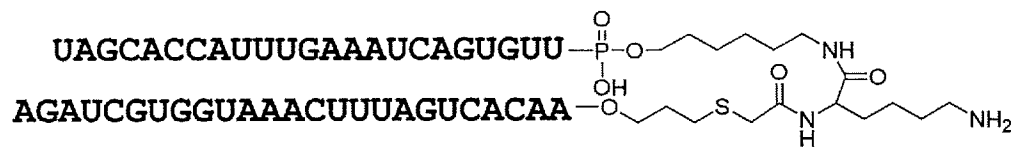
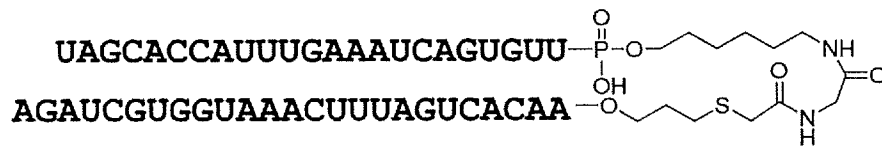
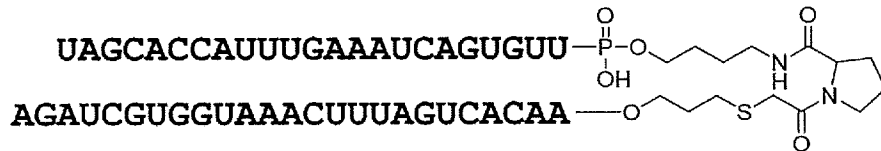


[0078]

[化25]



[0079] [化26]

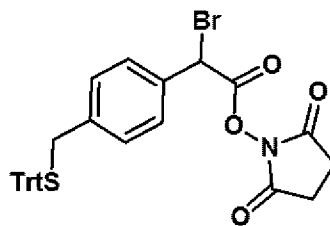
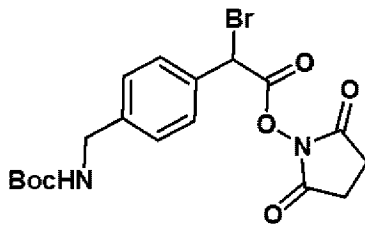
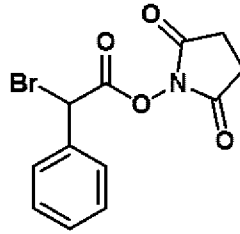
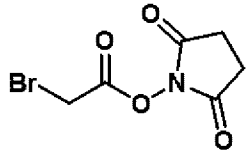
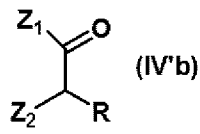


[0080] 化合物(IV)の代わりに、化合物(IV' b)～(IV' g)を用い、上記製造法に従って反応を行うこともできる。以下に、化合物(IV' b)～(IV' g)の構造とその具体例を示す。

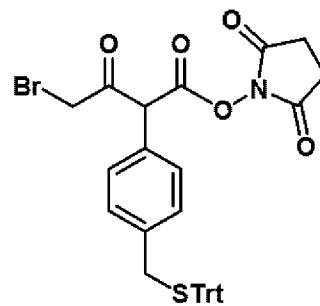
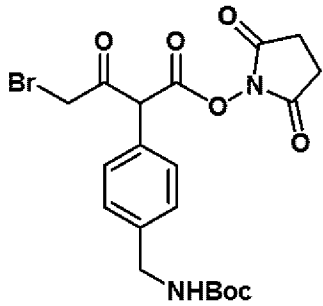
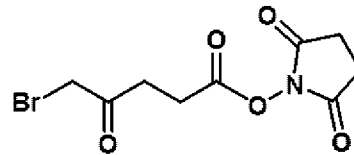
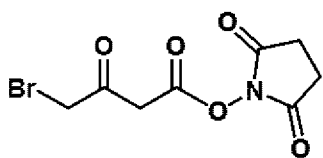
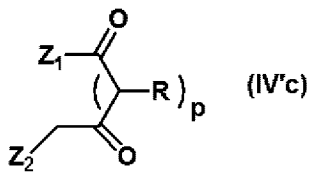
[0081]



[化27]

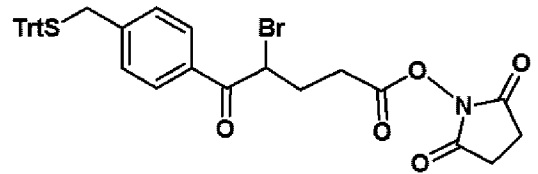
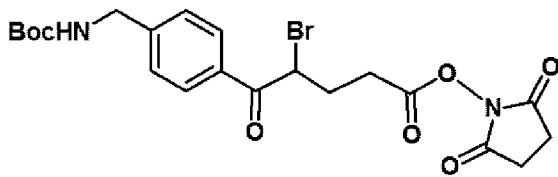
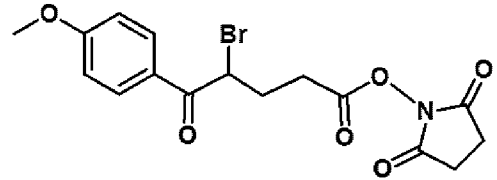
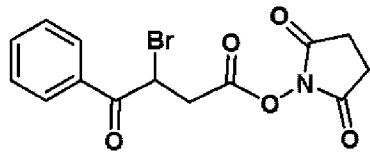
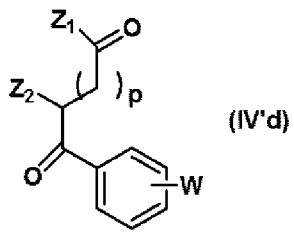


[0082] [化28]

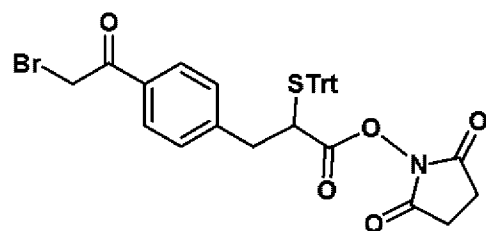
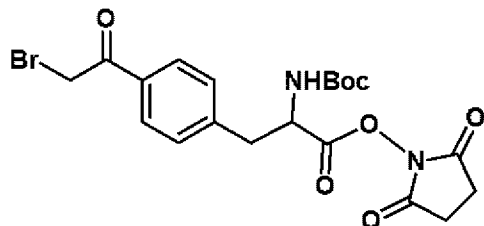
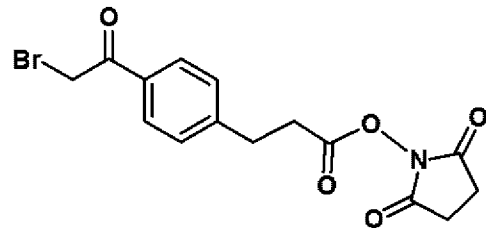
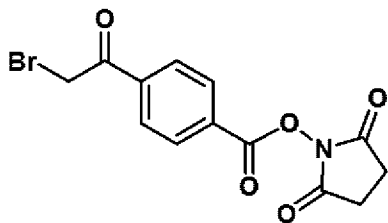
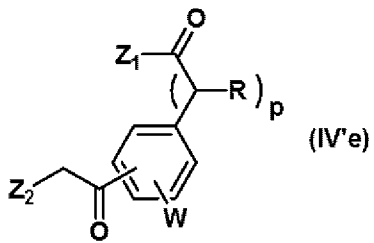


[0083]

[化29]

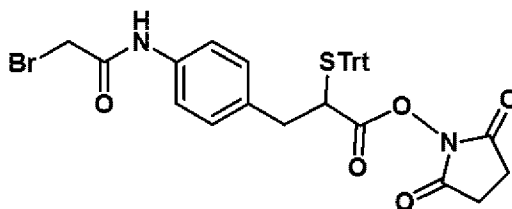
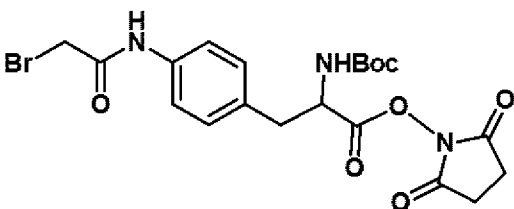
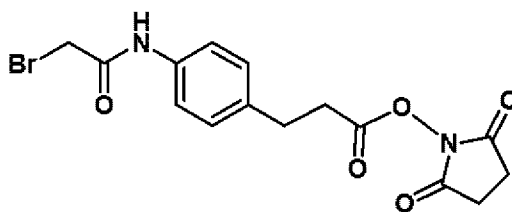
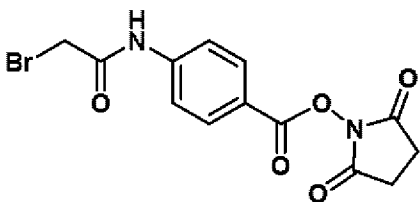
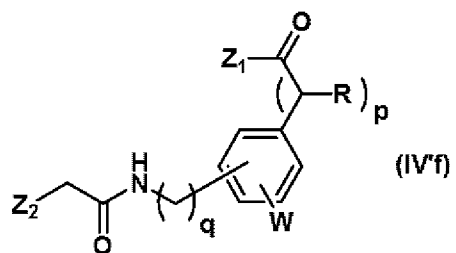


[0084] [化30]

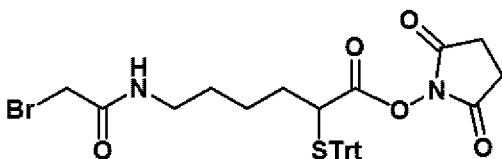
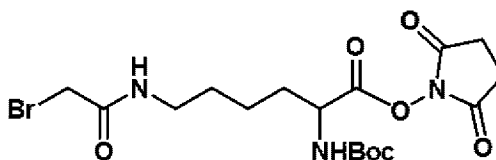
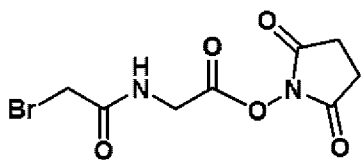
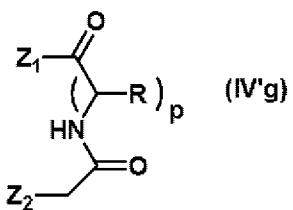


[0085]

[化31]

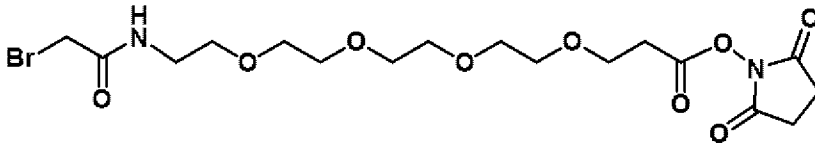
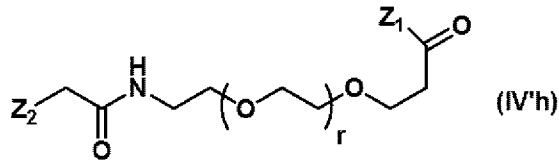


[0086] [化32]



[0087]

[化33]



[0088] 各式中において、

Rは、水素原子、置換されていてもよい $C_{6-10}$ アリール基、保護されたアミノ基、保護されたスルファニル基 (SH) を示し；

Wは、置換されていてもよい $C_{1-6}$ アルキル基、 $C_{1-6}$ アルコキシ基を示し；

pは、0～6の整数を示し；

qは、0～6の整数を示し；

rは、0～6の整数を示し；

T r tはトリチル基を示し；

その他の記号は前記と同義である。

[0089] 「 $C_{6-10}$ アリール基」としては、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチルが挙げられる。

「置換されていてもよい $C_{6-10}$ アリール基」における置換基としては、置換されていてもよい $C_{1-6}$ アルキル基が挙げられる。

「 $C_{1-6}$ アルキル基」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1, 1-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、2-エチルブチルが挙げられる。

「置換されていてもよい $C_{1-6}$ アルキル基」としては、例えば、 $C_{1-6}$ アルキル基；保護されたアミノ基、保護されたスルファニル基 (SH) から選択

される置換基で置換されたC<sub>1-6</sub>アルキル基；が挙げられる。

「保護されたアミノ基」としては、例えば、tert-ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基等の保護基で保護されたアミノ基が挙げられる。

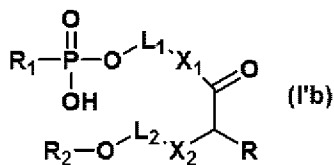
「保護されたスルファニル基」としては、例えば、トリチル（トリフェニルメチル）基等の保護基で保護されたスルファニル基が挙げられる。

「置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基」の好適な具体例としては、tert-ブトキシカルボニル基で保護されたアミノ基を有するC<sub>1-6</sub>アルキル基（例、メチル）、トリチル（トリフェニルメチル）基で保護されたスルファニル基を有するC<sub>1-6</sub>アルキル基（例、メチル）等が挙げられる。

「C<sub>1-6</sub>アルコキシ基」としては、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシが挙げられる。

[0090] 上記化合物（IV' b）～（IV' g）を用いることにより、以下の核酸（I' b）～（I' g）を製造することができる。以下に、核酸（I' b）～（I' g）の構造とその具体例を示す。

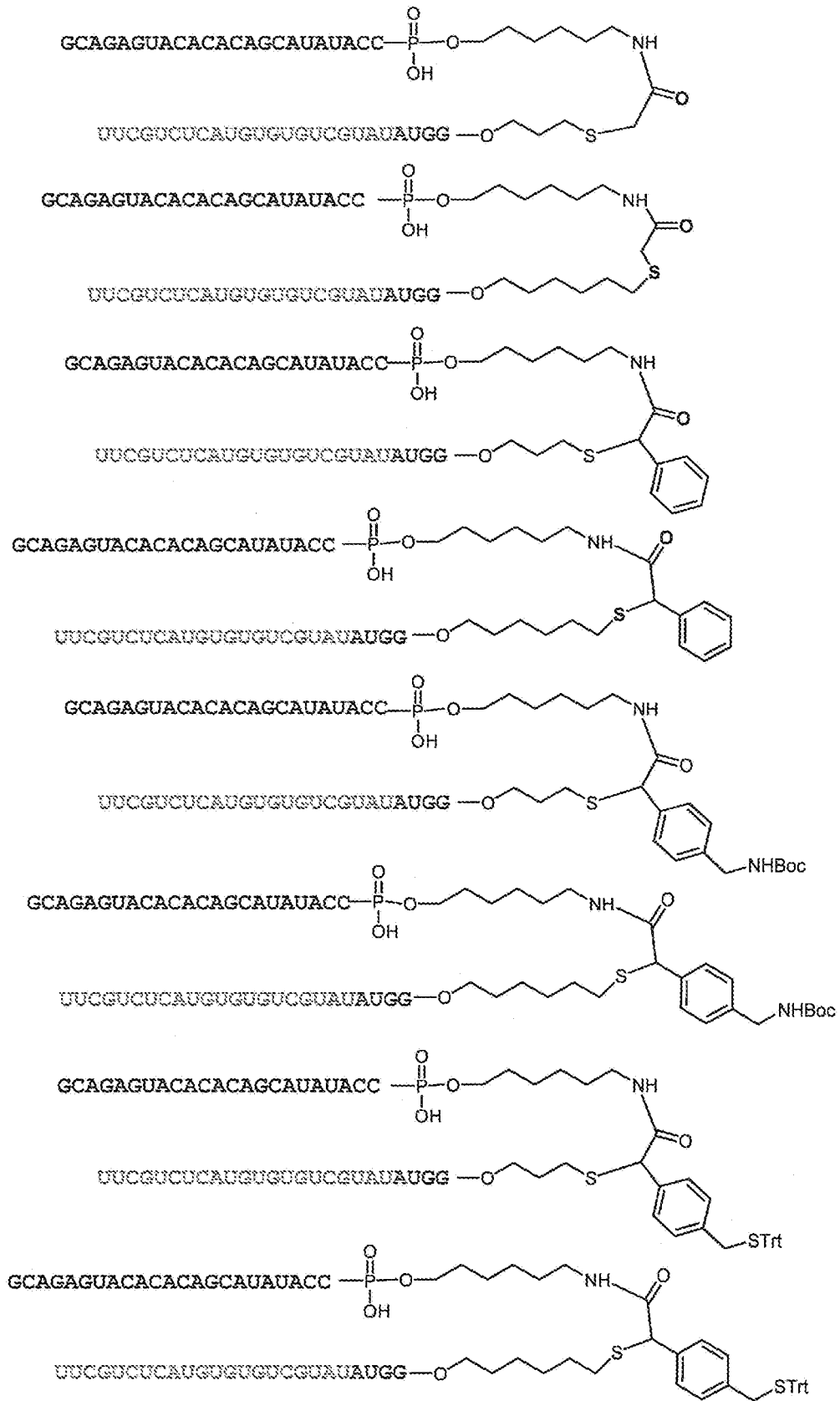
[0091] [化34]



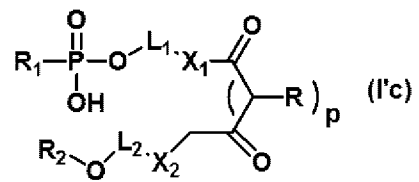
[0092] 核酸（I' b）の具体例としては、以下の核酸が挙げられる。

[0093]

[化35]



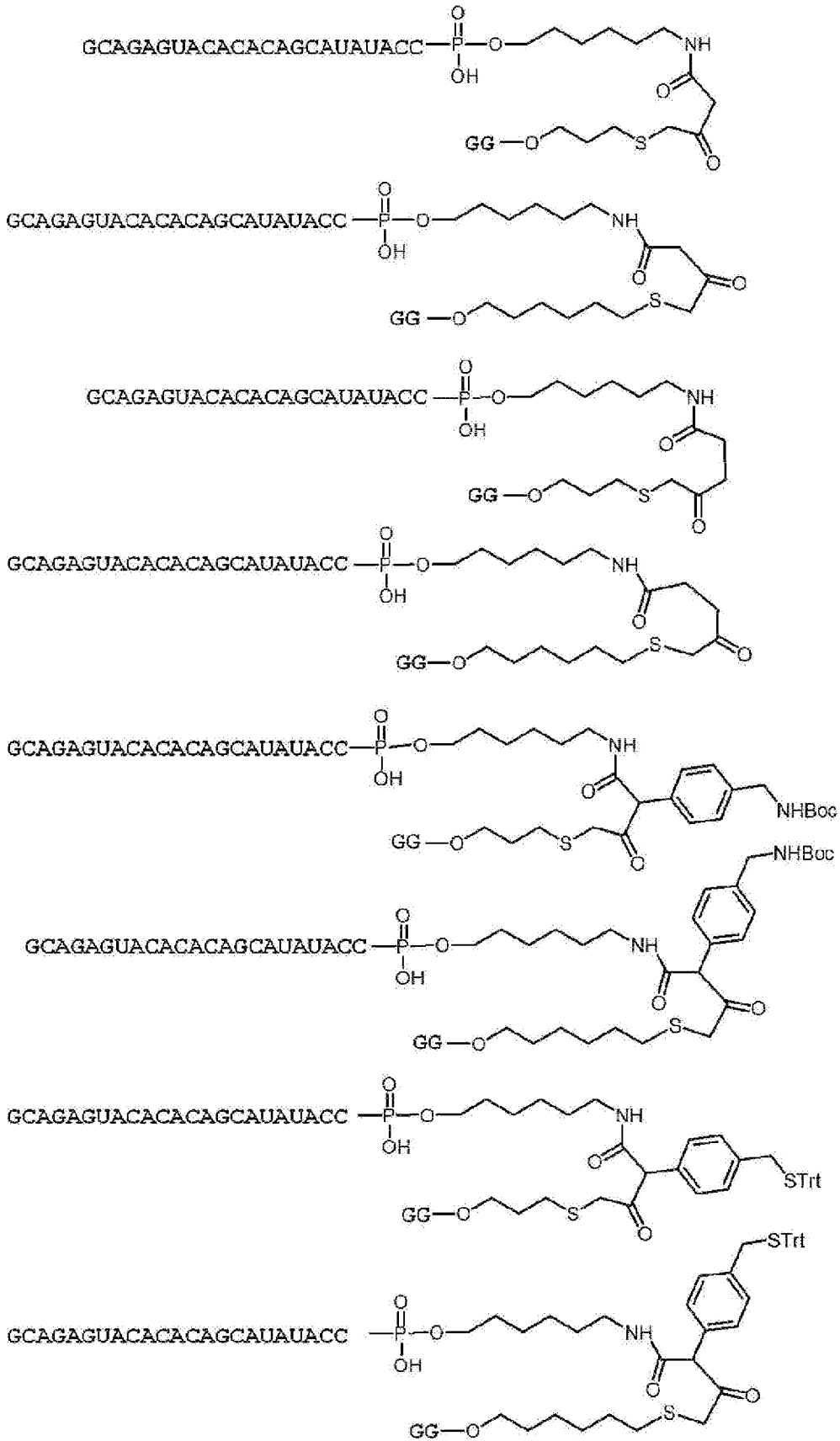
[0094] [化36]



[0095] 核酸 (1' c) の具体例としては、以下の核酸が挙げられる。

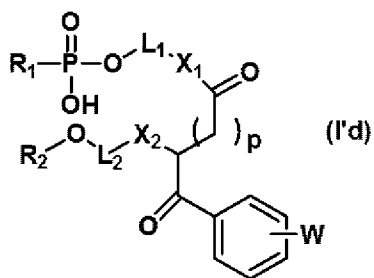
[0096]

[化37]



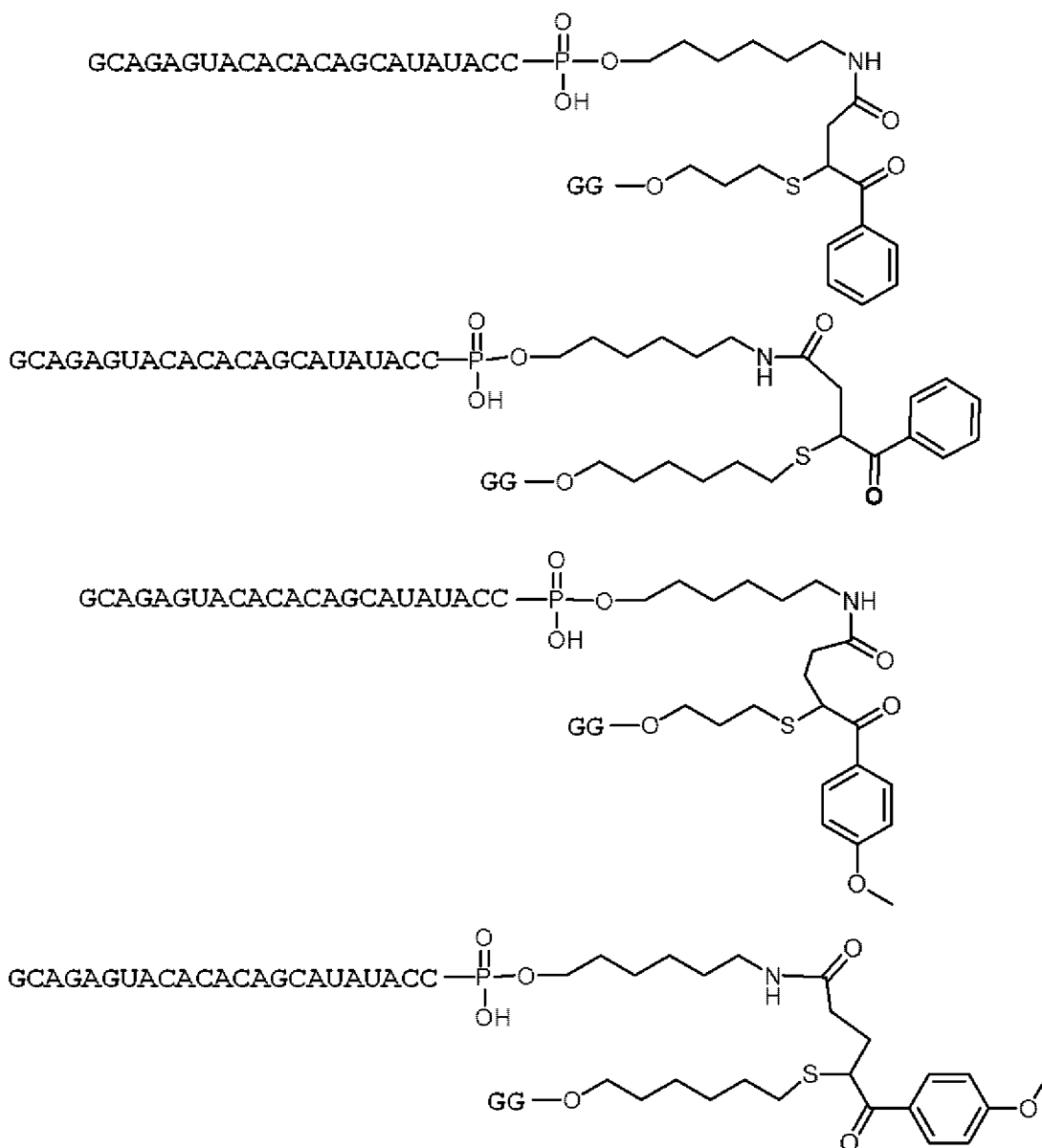


[0097] [化38]



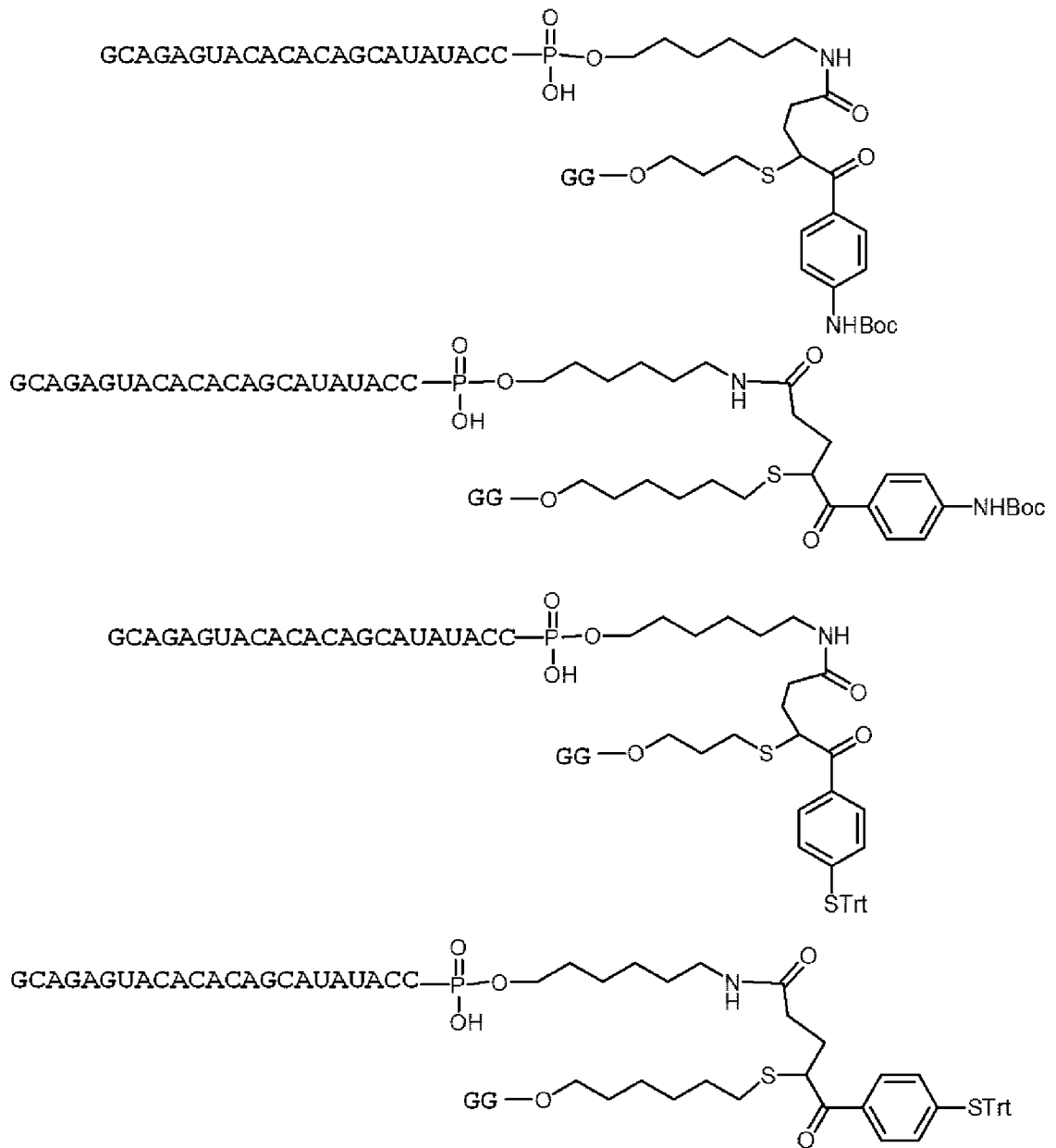
[0098] 核酸 (I' d) の具体例としては、以下の核酸が挙げられる。

[0099] [化39]

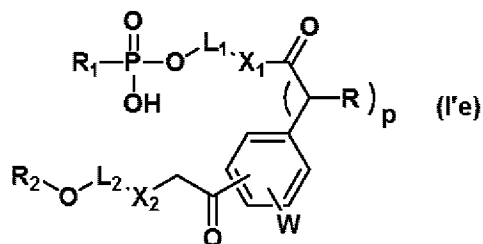


[0100]

[化40]



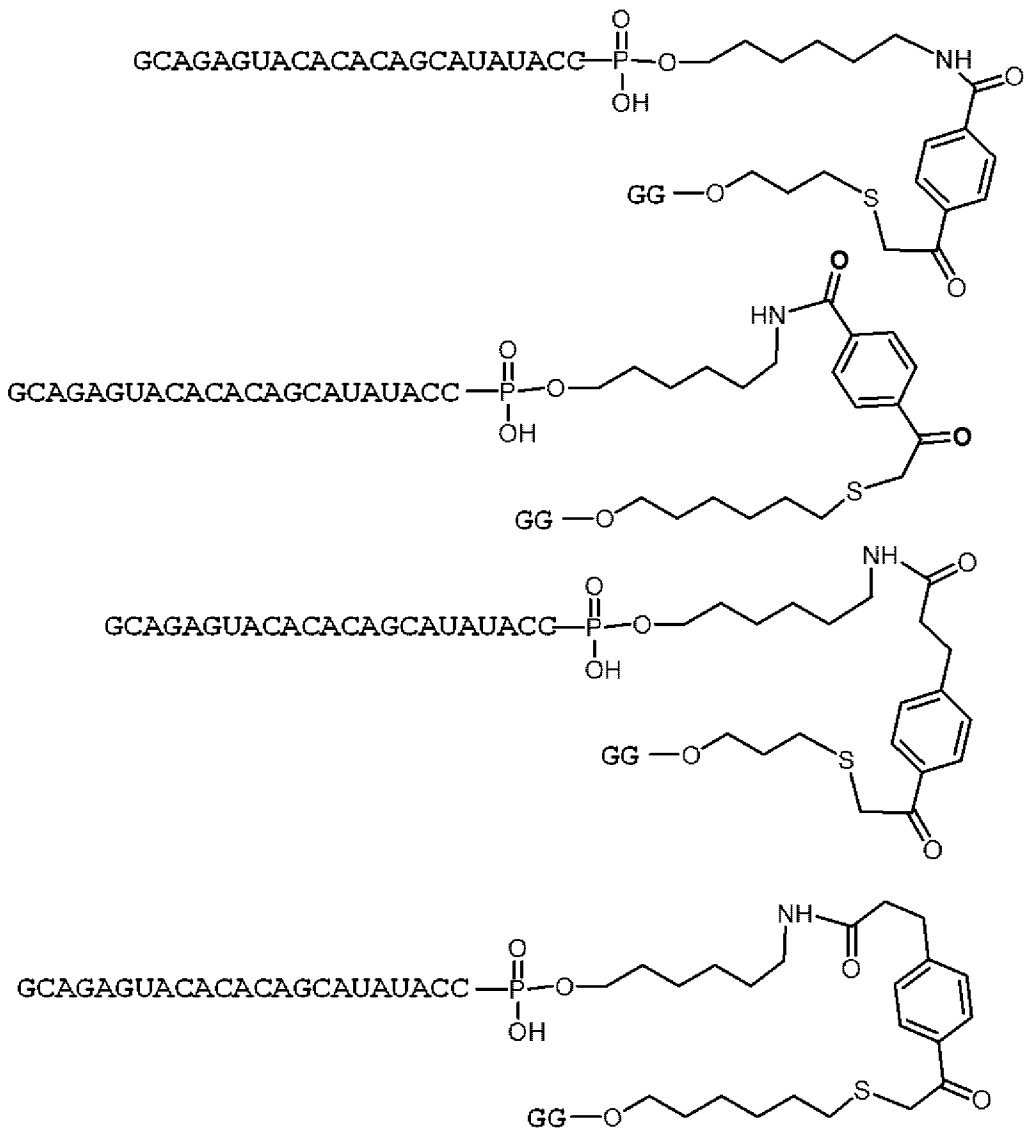
[0101] [化41]



[0102] 核酸 (I' e) の具体例としては、以下の核酸が挙げられる。

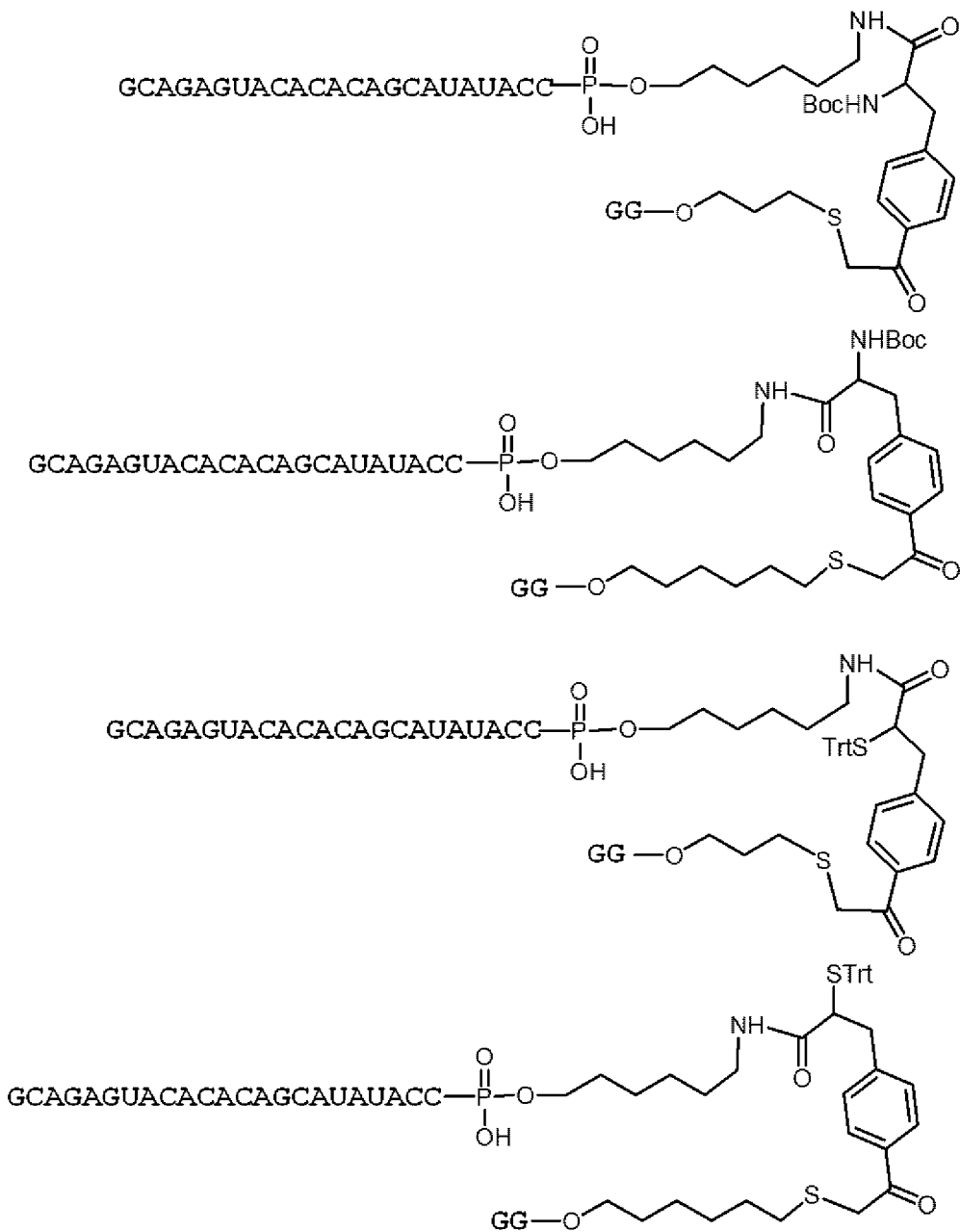
[0103]

[化42]

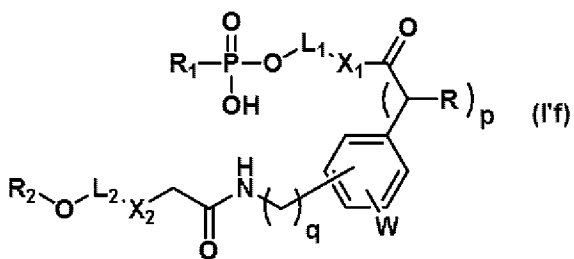


[0104]

[化43]

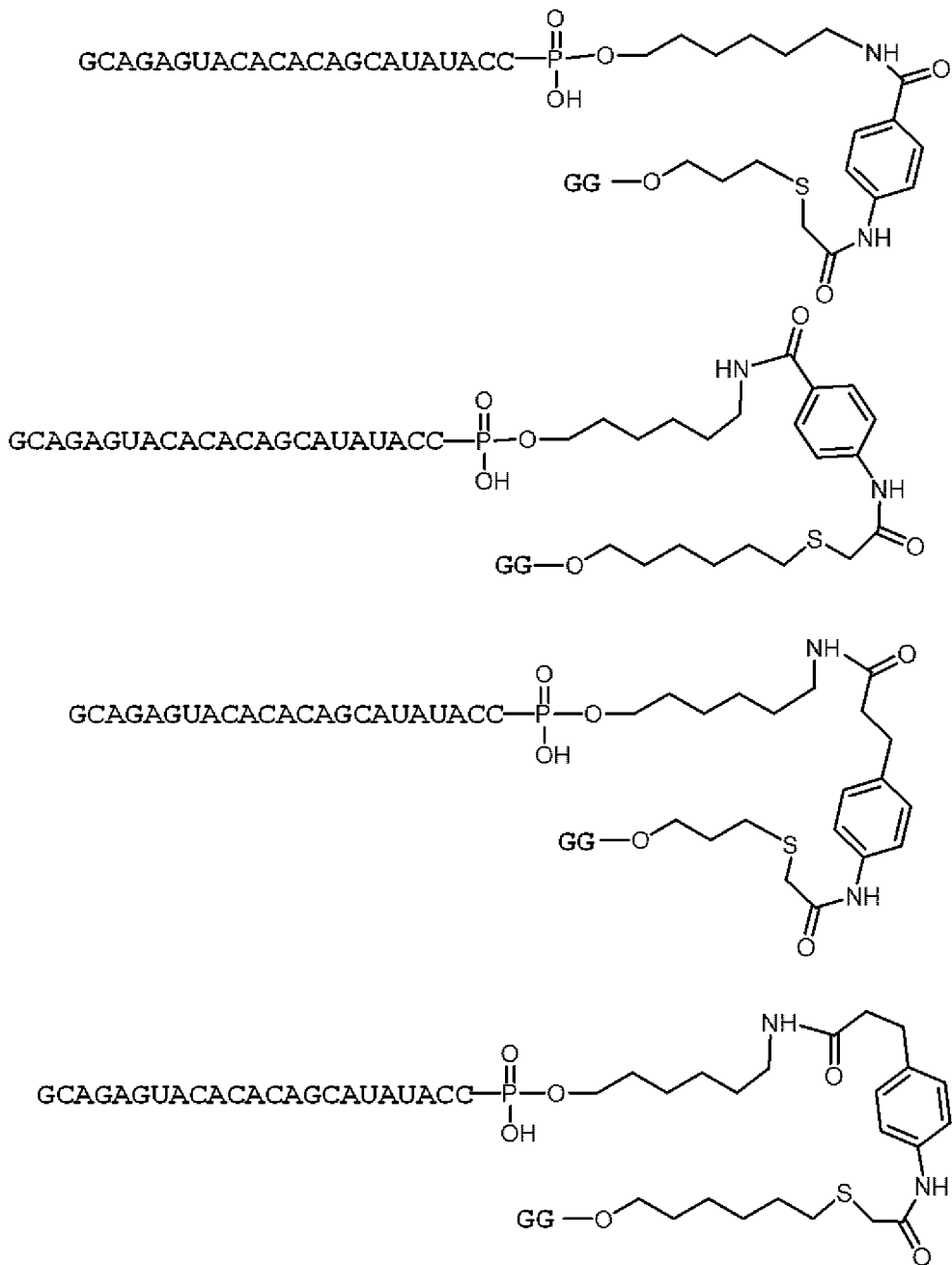


[0105] [化44]



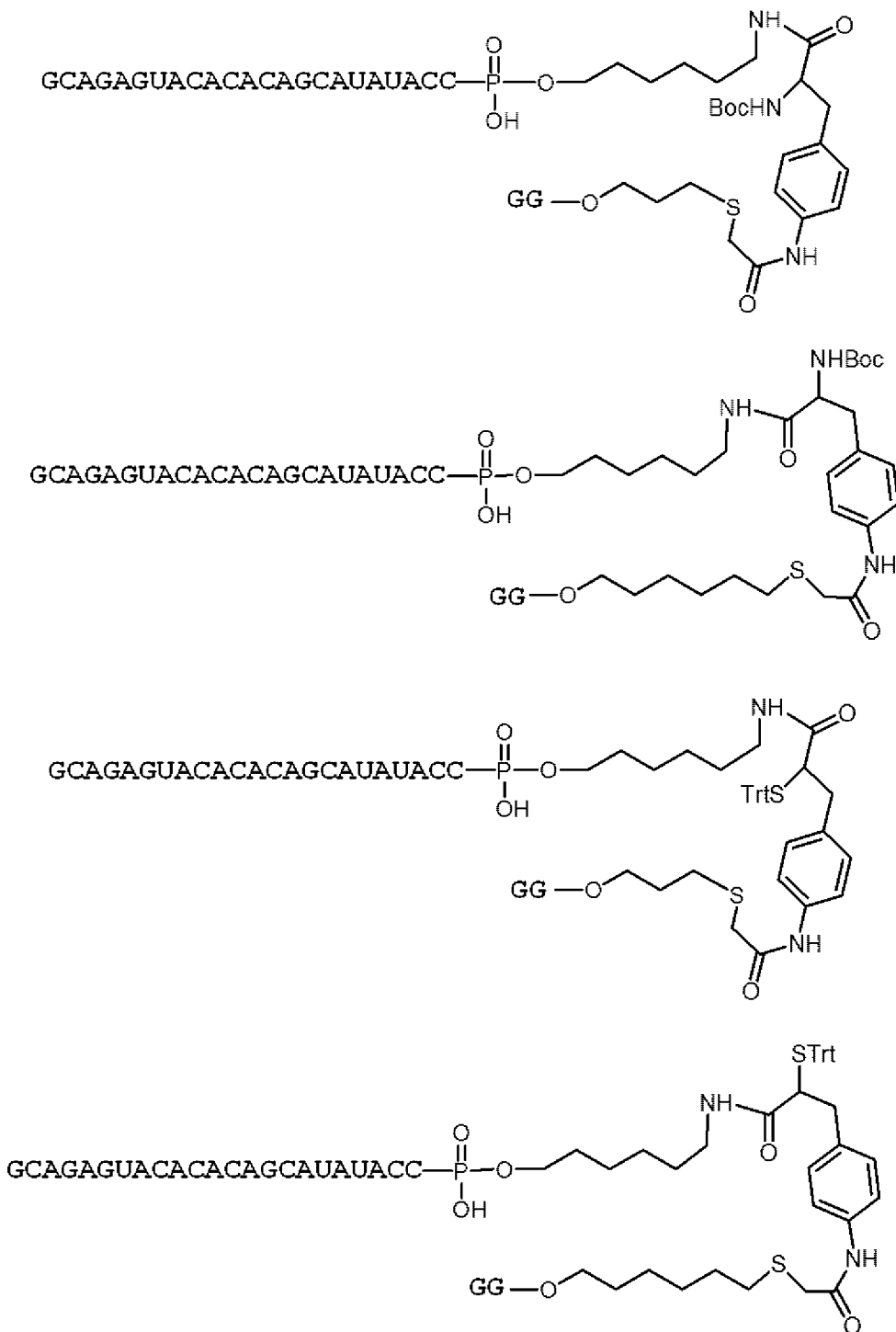
[0106] 核酸 (I' f) の具体例としては、以下の核酸が挙げられる。

[0107] [化45]

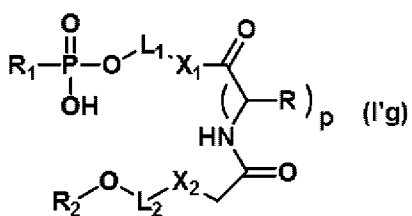


[0108]

[化46]

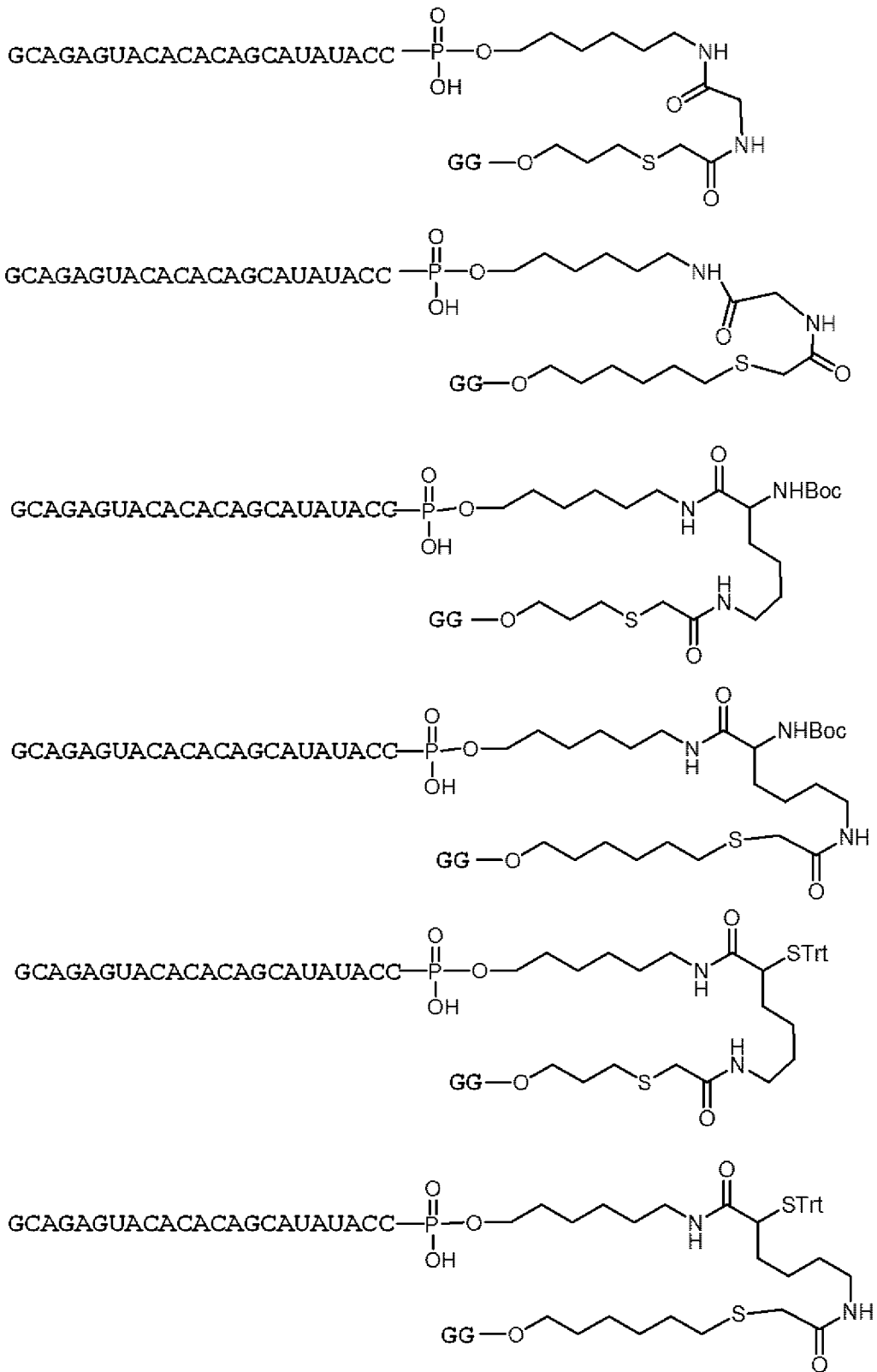


[0109] [化47]



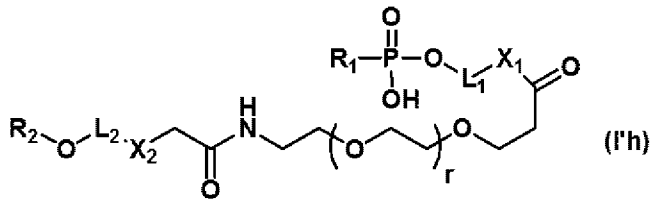
[0110] 核酸（1' g）の具体例としては、以下の核酸が挙げられる。

[0111] [化48]



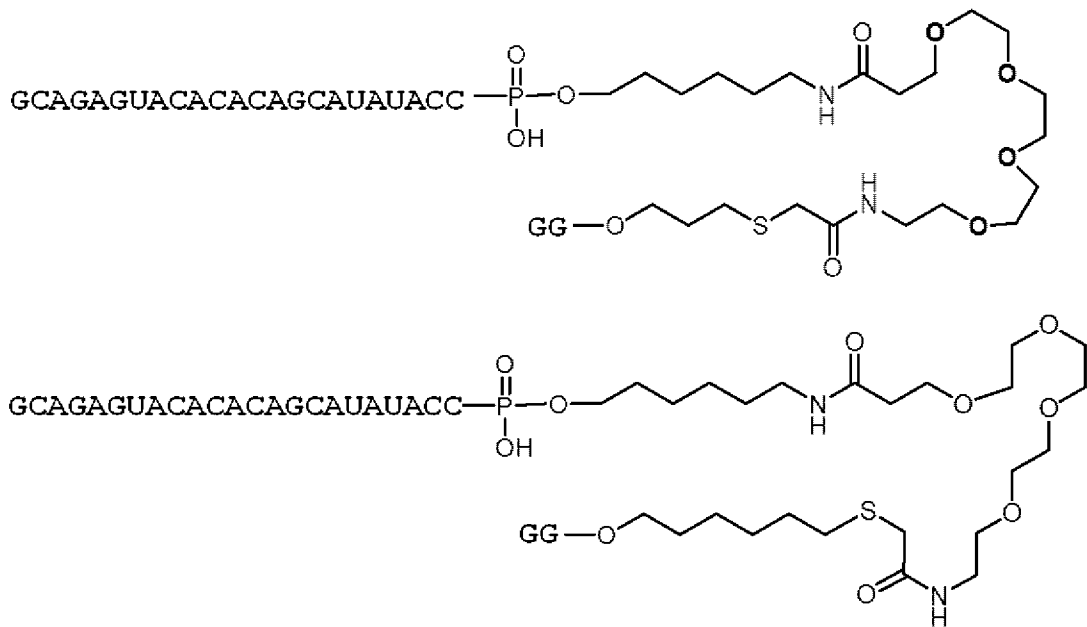
[0112]

[化49]



[0113] 核酸 (I' h) の具体例としては、以下の核酸が挙げられる。

[0114] [化50]



[0115] 1. 一本鎖核酸分子

上述した製造方法で製造される本発明の一本鎖核酸分子 (I) は、前述のように、標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列を含む一本鎖核酸分子であって、領域 (X)、リンカー領域 (Lx) および領域 (Xc) を含み (式 (I) 中の R<sub>1</sub> が、領域 (X) および領域 (Xc) の一方であるか (後述する第1の一本鎖核酸分子)、あるいは領域 (X) および領域 (Xc) の一方を含み (後述する第2の一本鎖核酸分子)、かつ R<sub>2</sub> が他方であるか (後述する第1の一本鎖核酸分子)、あるいは他方を含む (後述する第2の一本鎖核酸分子)。)、前記領域 (X) と前記領域 (Xc) との間に、前記リンカー領域 (Lx) が連結され、前記領域 (X) および前記領域 (Xc) の少なくとも一方が、前記発現抑制配列を含み、前記リンカー領域 (Lx) が、下記式



( I L ) 中に示す構造を有することを特徴とする。

- [0116] 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等があげられる。
- [0117] 本発明の一本鎖核酸分子は、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一本鎖核酸分子」または「標的遺伝子の発現抑制剤」ともいう。また、本発明の一本鎖核酸分子は、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干渉用一本鎖核酸分子」、「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、本発明の一本鎖核酸分子は、例えば、生体内におけるインターフェロン誘導等の副作用を抑制でき、ヌクレアーゼ耐性にも優れる。
- [0118] 本発明の一本鎖核酸分子は、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。
- [0119] 本発明の一本鎖核酸分子において、前記発現抑制配列は、例えば、本発明の一本鎖核酸分子が、*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。

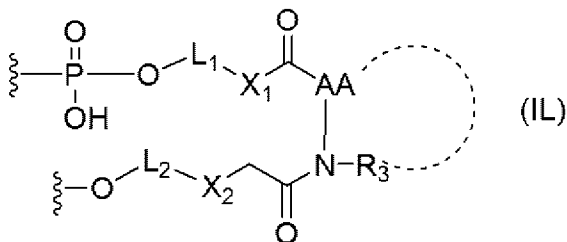
[0120] 前記発現抑制配列は、例えば、前記標的遺伝子の所定領域に対して、90%以上の相補性を有していることが好ましく、より好ましくは95%であり、さらに好ましくは98%であり、特に好ましくは100%である。このような相補性を満たすことにより、例えば、オフターゲットを十分に軽減できる。

[0121] 具体例として、標的遺伝子が TGF- $\beta$ 1 の場合、前記発現抑制配列は、例えば、配列番号1に示す19塩基長の配列が使用できる。

5' -UAUGCUGUGUGUACUCUGC-3' (配列番号1)

[0122] 本発明の一本鎖核酸分子において、前記リンカー領域は、例えば、下記式 (IL) で表される。

[0123] [化51]



[0124] [式中の各記号は前記式 (I) と同義である。]

[0125] 前記領域 (Xc) の3'末端ヌクレオチド残基とリンカー領域 (Lx) 中の -P(=O)(OH)-O- とが結合し、前記領域 (X) の5'末端ヌクレオチド残基とリンカー領域 (Lx) 中の -O- とが結合してもよく、あるいは前記領域 (X) の3'末端ヌクレオチド残基とリンカー領域 (Lx) 中の-

$P(=O)(OH)-O-$ とが結合し、前記領域 (Xc) の 5' 末端ヌクレオチド残基とリンカー領域 (Lx) 中の  $-O-$ とが結合してもよい。

[0126] 本発明の一本鎖核酸分子において、前記領域 (Xc) は、前記領域 (X) と相補的である。このため、本発明の一本鎖核酸分子において、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る。本発明の一本鎖核酸分子は、このように、分子内で二重鎖を形成可能であり、例えば、従来の RNA 干渉に使用する siRNA のように、分離した 2 本の一本鎖 RNA がアニーリングによって二本鎖 RNA を形成するものとは、明らかに異なる構造である。

[0127] 本発明の一本鎖核酸分子は、例えば、前記領域 (Xc) のみが折り返して前記領域 (X) と二重鎖を形成してもよいし、さらに、他の領域において新たな二重鎖を形成してもよい。以下、前者の一本鎖核酸分子、すなわち、二重鎖形成が 1 カ所である分子を「第 1 の一本鎖核酸分子」といい、後者の一本鎖核酸分子、すなわち、二重鎖形成が 2 カ所である分子を「第 2 の一本鎖核酸分子」という。以下に、前記第 1 の一本鎖核酸分子および前記第 2 の一本鎖核酸分子について、例示するが、本発明は、これには制限されない。

[0128] (1) 第 1 の一本鎖核酸分子

前記第 1 の一本鎖核酸分子は、例えば、前記領域 (X)、前記領域 (Xc) および前記リンカー領域 (Lx) からなる分子である。

[0129] 前記第 1 の一本鎖核酸分子は、例えば、5' 側から 3' 側にかけて、前記領域 (Xc)、前記リンカー領域 (Lx) および前記領域 (X) を、前記順序で有してもよいし、3' 側から 5' 側にかけて、前記領域 (Xc)、前記リンカー領域 (Lx) および前記領域 (X) を、前記順序で有してもよい。

[0130] 前記第 1 の一本鎖核酸分子において、前記領域 (Xc) は、前記領域 (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、好ましくは、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。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。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。

[0131] 前記第1の一本鎖核酸分子において、前記発現抑制配列は、前述のように、前記領域 (Xc) および前記領域 (X) の少なくとも一方に含まれる。前記第1の一本鎖核酸分子は、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。

[0132] 後者の場合、前記1の一本鎖核酸分子は、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。前記第1の一本鎖核酸分子が、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、前記領域 (X) および前記領域 (Xc) 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。前記第1の一本鎖核酸分子が、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、前記第1の一本鎖核酸分子によって、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。

[0133] 前記第1の一本鎖核酸分子の一例を、図7の模式図に示す。図7(A)は、一例として、前記一本鎖核酸分子について、各領域の順序の概略を示す模式図であり、図7(B)は、前記一本鎖核酸分子が、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7(B)に示すように、前記一本鎖核酸分子は、前記領域 (Xc) と前記領域 (X) との間で、二重鎖が形成され、ショートヘアピン構造をとる。図7は、あくまでも、前記領域の連結順序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、前記リンカー領域 (Lx) の形状等は、これに制限されない。

[0134] 前記第1の一本鎖核酸分子において、前記領域(Xc)および前記領域(X)の塩基数は、特に制限されない。以下に各領域の長さを例示するが、本発明は、これには制限されない。本発明において、「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。本発明において、塩基数の数値範囲は、例えば、その範囲に属する正の整数を全て開示するものであり、具体例として、「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)。

[0135] 前記領域(Xc)は、例えば、前記領域(X)の全領域に完全に相補的でもよい。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を意味し、すなわち、前記領域(Xc)と前記領域(X)とが、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ことを意味する。

[0136] また、前記領域(Xc)は、例えば、前記領域(X)の部分領域に完全に相補的でもよい。この場合、前記領域(Xc)は、例えば、前記領域(X)の部分領域に相補的な塩基配列からなることを意味し、すなわち、前記領域(Xc)は、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り、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ことを意味する。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、前記領域(Xc)側の末端の塩基(1番目の塩基)から連続する塩基配列からなる領域であることが好ましい。

[0137] 前記第1の一本鎖核酸分子において、前記領域(X)の塩基数(X)と前記領域(Xc)の塩基数(Xc)との関係は、例えば、下記(3)または(5)の条件を満たし、前者の場合、具体的には、例えば、下記(11)の条件を満たす。

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

$$X - X_c = 1 \sim 10、好ましくは1、2または3、$$

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

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

- [0138] 前記領域 (X) および／または前記領域 (X<sub>c</sub>) が前記発現抑制配列を含む場合、前記領域は、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。前記発現抑制配列を含む領域は、例えば、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塩基である。
- [0139] 前記領域 (X) の塩基数は、特に制限されない。前記領域 (X) が、前記発現抑制配列を含む場合、その下限は、例えば、19塩基である。その上限は、例えば、50塩基であり、好ましくは30塩基であり、より好ましくは25塩基である。前記領域 (X) の塩基数の具体例は、例えば、19塩基～50塩基であり、好ましくは、19塩基～30塩基、より好ましくは19塩基～25塩基である。
- [0140] 前記領域 (X<sub>c</sub>) の塩基数は、特に制限されない。その下限は、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。その上限は、例えば、50塩基であり、より好ましくは40塩基であり、さらに好ましくは30塩基である。
- [0141] 前記一本鎖核酸分子において、前記リンカー領域 (L<sub>x</sub>) の長さは、特に制限されない。前記リンカー領域 (L<sub>x</sub>) は、例えば、前記領域 (X) と前記領域 (X<sub>c</sub>) とが二重鎖を形成可能な長さであることが好ましい。
- [0142] 前記第1の一本鎖核酸分子の全長は、特に制限されない。前記第1の一本鎖核酸分子において、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。前記第1の一本鎖核酸分子において、前記リンカー領域(Lx)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。

[0143] (2) 第2の一本鎖核酸分子

前記第2の一本鎖核酸分子は、例えば、前記領域(X)、前記リンカー領域(Lx)および前記領域(Xc)の他に、さらに、領域(Y)および前記領域(Y)に相補的な領域(Yc)を有する分子である。前記第2の一本鎖核酸分子において、前記領域(X)と前記領域(Y)とが連結して、内部領域(Z)を形成している。なお、特に示さない限り、前記第2の一本鎖核酸分子は、前記第1の一本鎖核酸分子の記載を援用できる。

[0144] 前記第2の一本鎖核酸分子は、例えば、5'側から3'側にかけて、前記領域(Xc)、前記リンカー領域(Lx)、前記領域(X)、前記領域(Y)および前記領域(Yc)を、前記順序で有してもよい。この場合、前記領域(Xc)を、5'側領域(Xc)ともいい、前記内部領域(Z)中の前記領域(X)を、内部5'側領域(X)ともいい、前記内部領域(Z)中の前記領域(Y)を、内部3'側領域(Y)ともいい、前記領域(Yc)を、3'側領域(Yc)ともいう。また、前記第2の一本鎖核酸分子は、例えば、3'側から5'側にかけて、前記領域(Xc)、前記リンカー領域(Lx)、前記領域(X)、前記領域(Y)および前記領域(Yc)を、前記順序で有してもよい。この場合、前記領域(Xc)を、3'側領域(Xc)ともいい、前記内部領域(Z)中の前記領域(X)を、内部3'側領域(X)ともいい、前記内部領域(Z)中の前記領域(Y)を、内部5'側領域(Y)ともいい、前記領域(Yc)を、5'側領域(Yc)ともいう。

[0145] 前記内部領域(Z)は、前述のように、例えば、前記領域(X)と前記領

域（Y）とが連結されている。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、前記領域（Xc）および前記領域（Yc）との配列関係を示すために、「前記領域（X）と前記領域（Y）が連結して構成される」と定義するものであって、前記内部領域（Z）において、前記領域（X）と前記領域（Y）とが、前記一本鎖核酸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。

[0146] 前記第2の一本鎖核酸分子において、前記領域（Xc）は、前記領域（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、好ましくは、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。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。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。

[0147] 前記第2の一本鎖核酸分子において、前記領域（Yc）は、前記領域（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、好ましくは、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。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。

[0148] 前記第2の一本鎖核酸分子において、前記発現抑制配列は、例えば、前記



領域（X）と前記領域（Y）とから形成される前記内部領域（Z）および前記領域（X<sub>c</sub>）の少なくとも一つに含まれ、さらに、前記領域（Y<sub>c</sub>）に含まれてもよい。前記内部領域（Z）が前記発現抑制配列を有する場合、例えば、前記領域（X）および前記領域（Y）のいずれに前記発現抑制配列を有してもよく、また、前記領域（X）と前記領域（Y）とにわたって、前記発現抑制配列を有してもよい。前記第2の一本鎖核酸分子は、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。

[0149] 前記第2の一本鎖核酸分子が、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）および前記領域（X<sub>c</sub>）のいずれか一方でもよいし、前記内部領域（Z）および前記領域（X<sub>c</sub>）のいずれか一方と、さらに他の異なる領域であってもよい。

[0150] 前記第2の一本鎖核酸分子において、前記領域（Y<sub>c</sub>）と前記領域（Y）とは、例えば、直接連結してもよいし、間接的に連結してもよい。前者の場合、直接的な連結は、例えば、ホスホジエステル結合による連結等があげられる。後者の場合、例えば、前記領域（Y<sub>c</sub>）と前記領域（Y）との間に、リンカー領域（L<sub>y</sub>）を有し、前記リンカー領域（L<sub>y</sub>）を介して、前記領域（Y<sub>c</sub>）と前記領域（Y）とが連結している形態等があげられる。

[0151] 前記第2の一本鎖核酸分子が前記リンカー領域（L<sub>y</sub>）を有する場合、前記リンカー領域（L<sub>y</sub>）の構成単位は特に制限されず、例えば、ヌクレオチド残基からなるリンカーでもよいし、前述した式（I L）で表される構造を有するリンカーでもよい。後者の場合、前記リンカー領域（L<sub>x</sub>）における前記式（I L）の説明を全て援用できる。

[0152] また、前記リンカー領域（L<sub>y</sub>）は、例えば、アミノ酸残基、ポリアミン残基、およびポリカルボン酸残基からなる群から選択される少なくとも一つを含んでいてもよい。前記リンカー領域は、アミノ酸残基、ポリアミン残基、およびポリカルボン酸残基以外の残基を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。例えば、前記リンカー領域は、ポリカルボン酸残基、テレフタ

ル酸残基またはアミノ酸残基のいずれかを含むものであってよい。

[0153] 本発明において、「ポリアミン」は、アミノ基を複数（2つ、または3つ以上）含む任意の化合物をいう。前記「アミノ基」は、 $-NH_2$ 基に限定されず、イミノ基（ $-NH-$ ）も含む。本発明において、前記ポリアミンは、特に限定されないが、例えば、1,4-ジアミノベンゼン、1,3-ジアミノベンゼン、1,2-ジアミノベンゼン等が挙げられる。また、本発明において、「ポリカルボン酸」は、カルボキシ基を複数（2つ、または3つ以上）含む任意の化合物をいう。本発明において、前記ポリカルボン酸は、特に限定されないが、例えば、1,4-ジカルボキシベンゼン（テレフタル酸）、1,3-ジカルボキシベンゼン（イソフタル酸）、1,2-ジカルボキシベンゼン（フタル酸）等が挙げられる。また、本発明において、「アミノ酸」は、分子中にアミノ基およびカルボキシ基をそれぞれ1つ以上含む任意の有機化合物をいう。前記「アミノ基」は、 $-NH_2$ 基に限定されず、イミノ基（ $-NH-$ ）も含む。例えば、プロリン、ヒドロキシプロリン等は、分子中に $-NH_2$ 基を含まず、イミノ基（ $-NH-$ ）を含むが、本発明における「アミノ酸」の定義に含まれる。本発明において、前記「アミノ酸」は、天然アミノ酸でもよいし、人工アミノ酸でもよい。

[0154] 前記一本鎖核酸分子において、前記アミノ酸残基は、複数のアミノ酸残基が連結したものであってもよい。なお、本発明において、複数のアミノ酸残基が連結したアミノ酸残基とは、例えば、ペプチド構造を含む残基をいう。より具体的には、例えば、グリシルグリシン（ $Gly-Gly$ ）などの構造があげられる。

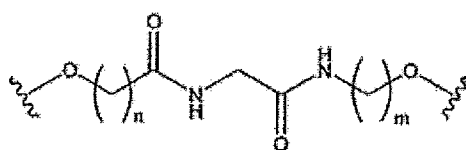
[0155] 前記一本鎖核酸分子において、前記アミノ酸残基は、グリシン残基、テレフタル酸アミド残基、プロリン残基またはリシン残基であってもよい。また、前記アミノ酸残基は、修飾アミノ酸残基またはアミノ酸の誘導体であってもよい。

[0156] 好ましい一実施態様において、前記リンカー領域（ $Ly$ ）は、国際公開第2012/017919号パンフレット、国際公開第2013/103146

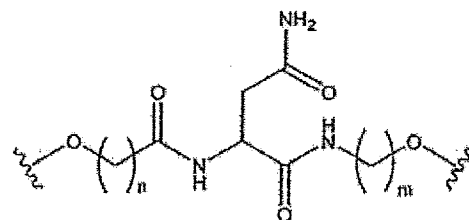
号パンフレット、国際公開第2012/005368号パンフレット、国際公開第2013/077446号パンフレット、国際公開第2013/133393号パンフレット、国際公開第2016/108264号パンフレット、国際公開第2016/104775号パンフレット等に記載されるリンカー領域であり得、本発明はこれらの文献を援用し得る。

[0157] より具体的には、例えば、国際公開第2016/104775号パンフレット中に記載の以下の構造を含むものがあげられる。

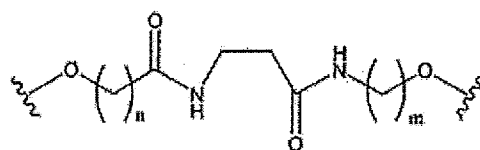
[0158] [化52]



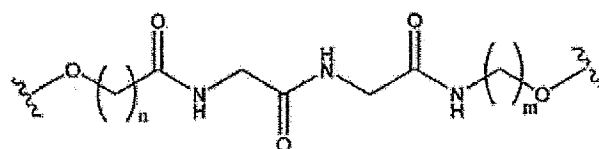
(I-1)



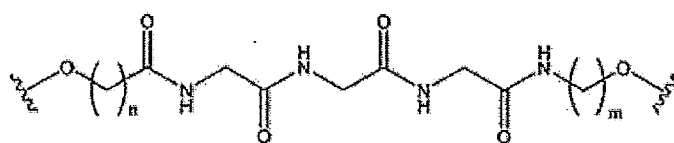
(I-2)



(I-3)



(I-4)



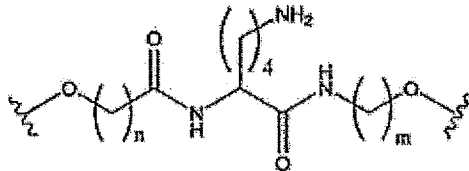
(I-5)

[0159]

[化53]



(I-6)

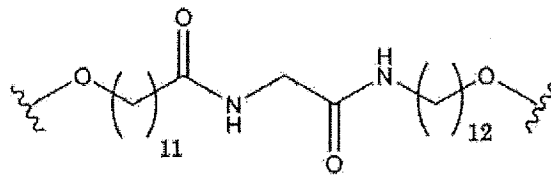


(I-7)

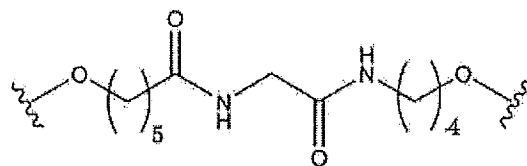
[0160] 前記化学式 (I-1) ~ (I-7) において、 $n$  および  $m$  は、特に制限されず、例えば、 $m$  は、0 ~ 30 の範囲の整数であり、 $n$  は、0 ~ 30 の範囲の整数である。具体例として、前記化学式 (I-1) において  $n = 11$  および  $m = 12$ 、または、 $n = 5$  および  $m = 4$  と、前記化学式 (I-4) において  $n = 5$  および  $m = 4$  と、前記化学式 (I-6) において、 $n = 4$  および  $m = 4$  と、前記化学式 (I-7) において  $n = 5$  および  $m = 4$  とがあげられる。その構造を、下記化学式 (I-1 a)、(I-1 b)、(I-4 a)、(I-6 a) および (I-7 a) に示す。

[0161]

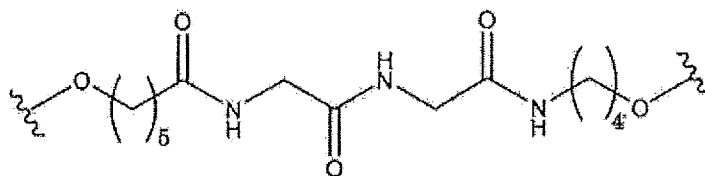
[化54]



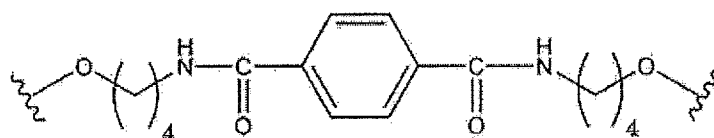
(I-1 a)



(I-1 b)

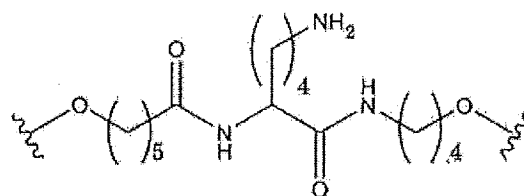


(I-4 a)



(I-6 a)

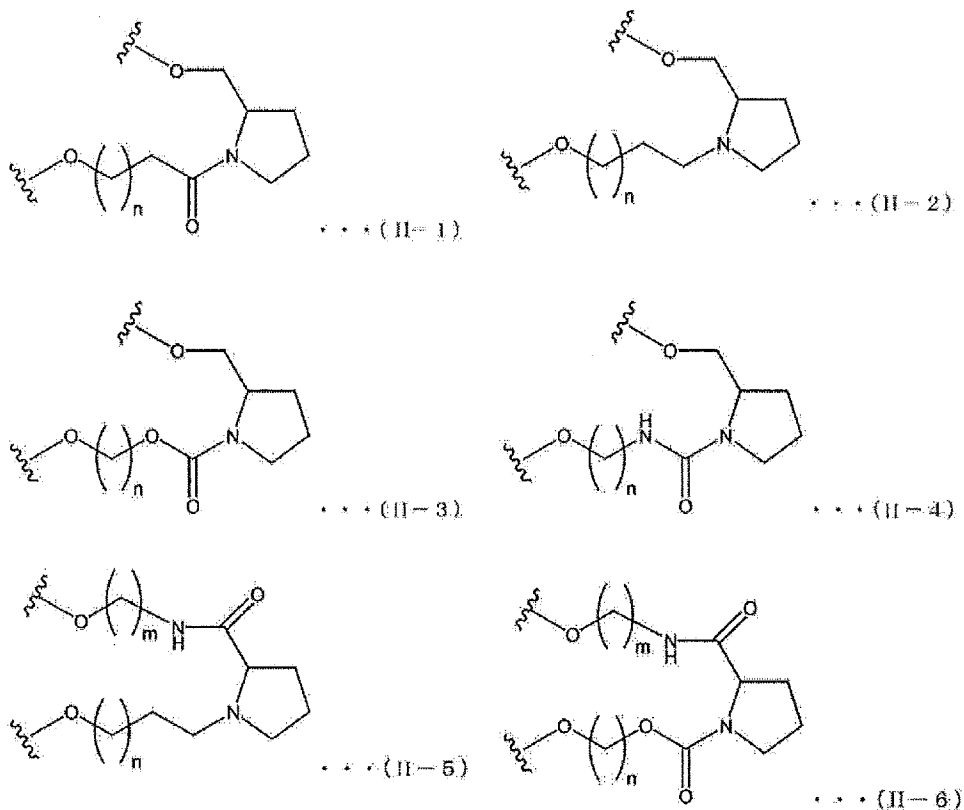
[0162] [化55]



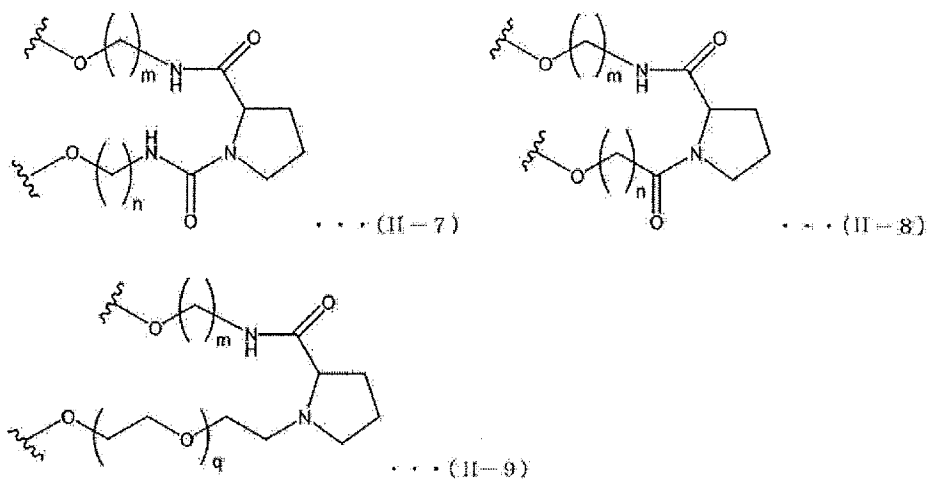
(I-7 a)

[0163]

[化56]



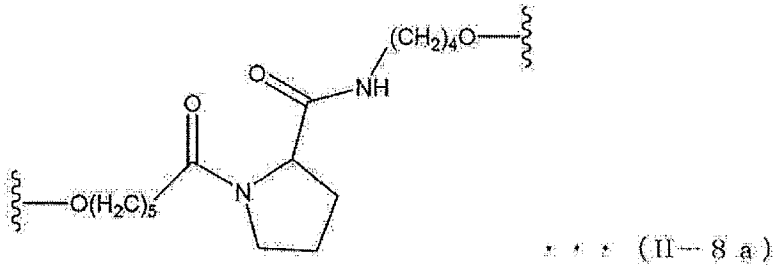
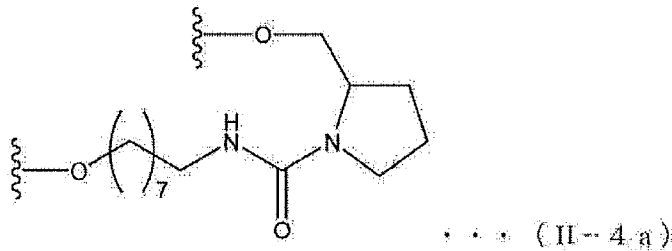
[0164] [化57]



[0165] 前記式 (II-1) ~ (II-9) において、n、mおよびqは、特に制限されず、例えば、例えば、mは、0~30の範囲の整数であり、nは、0~30の範囲の整数であり、qは、0~10の整数である。具体例として、前記式 (II-1) において、n=8、前記 (II-2) において、n=3、前記式 (II-3) において、n=4または8、前記 (II-4) におい

て、 $n = 7$  または  $8$ 、前記式 (I-5) において、 $n = 3$  および  $m = 4$ 、前記 (I-6) において、 $n = 8$  および  $m = 4$ 、前記式 (I-7) において、 $n = 8$  および  $m = 4$ 、前記 (I-8) において、 $n = 5$  および  $m = 4$ 、前記式 (I-9) において、 $q = 1$  および  $m = 4$  があげられる。前記式 (I-4) の一例 ( $n = 8$ ) を、下記式 (I-4 a) に、前記式 (I-8) の一例 ( $n = 5$ 、 $m = 4$ ) を、下記式 (I-8 a) に示す。

[0166] [化58]



[0167] 前記領域 (Y c) のいずれか一方の末端ヌクレオチド残基、および前記領域 (Y) のいずれか一方の末端ヌクレオチド残基は、例えば、それぞれ、前記リンカー領域 (L y) とホスホジエステル結合により結合している。

[0168] 前記第 2 の一本鎖核酸分子について、前記リンカー領域 (L y) を有する一本鎖核酸分子の一例を、図 8 の模式図に示す。図 8 (A) は、一例として、前記一本鎖核酸分子について、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 8 (B) は、前記一本鎖核酸分子が、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 8 (B) に示すように、前記一本鎖核酸分子は、前記領域 (X c) と前記領域 (X) との間、前記領域 (Y) と前記領域 (Y c) との間で、二重鎖が形成された両端折り返し構造をとる。図 8 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

、リンカー領域の形状等は、これに制限されない。また、図8は、前記領域(Xc)を5'側に示したが、これには制限されず、前記領域(Xc)が、3'側に位置してもよい。

[0169] 前記第2の一本鎖核酸分子において、前記領域(Xc)、前記領域(X)、前記領域(Y)および前記領域(Yc)の塩基数は、特に制限されない。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。

[0170] 前記領域(Xc)は、前述のように、例えば、前記領域(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。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。

[0171] また、前記領域(Xc)は、前述のように、例えば、前記領域(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。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、前記領域(Xc)側の末端の塩基(1番目の塩基)から連続する塩基配列からなる領域であることが好ましい。

[0172] 前記領域(Yc)は、前述のように、例えば、前記領域(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(Yc)は、より好ましくは、前記領域(Y)と



同じ塩基長であり、且つ、前記領域（Y<sub>c</sub>）の全ての塩基が、前記領域（Y）の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補である。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。

[0173] また、前記領域（Y<sub>c</sub>）は、前述のように、例えば、前記領域（Y）の部分領域に相補的でもよい。この場合、前記領域（Y<sub>c</sub>）は、例えば、前記領域（Y）の部分領域と同じ塩基長であり、すなわち、前記領域（Y）よりも、1塩基以上短い塩基長の塩基配列からなることが好ましい。前記領域（Y<sub>c</sub>）は、より好ましくは、前記領域（Y）の前記部分領域と同じ塩基長であり、且つ、前記領域（Y<sub>c</sub>）の全ての塩基が、前記領域（Y）の前記部分領域の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補である。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、前記領域（Y<sub>c</sub>）側の末端の塩基（1番目の塩基）から連続する塩基配列からなる領域であることが好ましい。

[0174] 前記第2の一本鎖核酸分子において、前記内部領域（Z）の塩基数（Z）と、前記領域（X）の塩基数（X）および前記領域（Y）の塩基数（Y）との関係、前記内部領域（Z）の塩基数（Z）と、前記領域（X）の塩基数（X）および前記領域（X<sub>c</sub>）の塩基数（X<sub>c</sub>）との関係は、例えば、下記式（1）および（2）の条件を満たす。

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

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

[0175] 前記第2の一本鎖核酸分子において、前記領域（X）の塩基数（X）と前記領域（Y）の塩基数（Y）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す。

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

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

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

[0176] 第2の一本鎖核酸分子において、前記領域（X）の塩基数（X）、前記領

域 ( $X_c$ ) の塩基数 ( $X_c$ )、前記領域 ( $Y$ ) の塩基数 ( $Y$ ) および前記領域 ( $Y_c$ ) 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。

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

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

[0177] 前記 (a) ~ (d) において、前記領域 ( $X$ ) の塩基数 ( $X$ ) と前記領域 ( $X_c$ ) の塩基数 ( $X_c$ ) の差、前記領域 ( $Y$ ) の塩基数 ( $Y$ ) と前記領域 ( $Y_c$ ) 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。

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

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

(b) 下記式 (13) および (14) の条件を満たす。

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

$$Y - Y_c = 1 \sim 10、好ましくは 1、2、3 または 4、  
より好ましくは 1、2 または 3 \quad \dots (14)$$

(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)

[0178] 前記 (a) ~ (d) の第2の一本鎖核酸分子について、それぞれの構造の一例を、図9の模式図に示す。図9は、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) を含む一本鎖核酸分子であり、(A) は、前記 (a) の一本鎖核酸分子、(B) は、前記 (b) の一本鎖核酸分子、(C) は、前記 (c) の一本鎖核酸分子、(D) は、前記 (d) の一本鎖核酸分子の例である。図9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9の一本鎖核酸分子は、前記領域 (X) の塩基数 (X) と前記領域 (Y) の塩基数 (Y) を、前記式 (20) の「 $X < Y$ 」と表わしたが、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9は、あくまでも前記領域 (X) と前記領域 ( $X_c$ ) との関係、前記領域 (Y) と前記領域 ( $Y_c$ ) との関係を示す模式図であり、例えば、各領域の長さ、形状、リンカー領域 ( $L_y$ ) の有無等は、これには制限されない。

[0179] 前記 (a) ~ (c) の一本鎖核酸分子は、例えば、前記領域 ( $X_c$ ) と前記領域 (X)、および、前記領域 ( $Y_c$ ) と前記領域 (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、前記領域 ( $X_c$ ) および前記領域 ( $Y_c$ ) のいずれともアライメントし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、前記アライメントしない塩基 (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9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) の一本鎖核酸分子の場合、「X-Xc」の塩基数であり、前記 (b) の一本鎖核酸分子の場合、「Y-Yc」の塩基数であり、前記 (c) の一本鎖核酸分子の場合、「X-Xc」の塩基数と「Y-Yc」の塩基数との合計数である。

[0180] 他方、前記(d)の一本鎖核酸分子は、例えば、前記内部領域 (Z) の全領域が、前記領域 (Xc) および前記領域 (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) の一本鎖核酸分子において、前記領域 (Xc) の5' 末端と前記領域 (Yc) の3' 末端は、未連結である。

[0181] 前記領域 (Xc)、前記領域 (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、前記内部領域 (Z) の塩基数となる。このため、前記領域 (Xc) および前記領域 (Yc) の長さは、例えば、前記内部領域 (Z) の長さ、前記フリー塩基数およびその位置に応じて、適宜決定できる。

[0182] 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。前記内部領域 (Z) が、前記発現抑制配列を有する場合、例えば、この条件が好ましい。

[0183] 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。

[0184] 前記領域 (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、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。前記内部領域 (Z) または前記領域 (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。

[0185] 前記領域 (Xc) が前記発現抑制配列を含む場合、前記領域 (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。

[0186] 前記領域 (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、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。前記内部領域 (Z) または前記領域 (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塩基、2塩基、3塩基または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。

- [0187] 前記領域 (Y c) が前記発現抑制配列を含む場合、前記領域 (Y c) は、例えば、前記発現抑制配列のみから構成される領域でもよいし、前記発現抑制配列を含む領域でもよい。前記発現抑制配列の長さは、例えば、前述の通りである。前記領域 (Y c) が前記発現抑制配列を含む場合、前記発現抑制配列の5'側および/または3'側に、さらに付加配列を有してもよい。前記付加配列の塩基数は、例えば、1~11塩基であり、好ましくは、1~7塩基である。
- [0188] 前述のように、前記内部領域 (Z)、前記領域 (X c) および前記領域 (Y c) の塩基数は、例えば、前記式 (2) の「 $Z \geq X c + Y c$ 」で表わすことができる。具体例として、「 $X c + Y c$ 」の塩基数は、例えば、前記内部領域 (Z) と同じ、または、前記内部領域 (Z) より小さい。後者の場合、「 $Z - (X c + Y c)$ 」は、例えば、1~10、好ましくは1~4、より好ましくは1、2または3である。前記「 $Z - (X c + Y c)$ 」は、例えば、前記内部領域 (Z) におけるフリーの領域 (F) の塩基数 (F) に相当する。
- [0189] 前記第2の一本鎖核酸分子において、前記リンカー領域 (L x) および前記リンカー領域 (L y) の長さは、特に制限されない。前記リンカー領域 (L x) は、前述の通りである。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 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。
- [0190] 前記リンカー領域 (L y) は、例えば、前記リンカー領域 (L x) と同じでもよいし、異なってもよい。
- [0191] 前記第2の一本鎖核酸分子の全長は、特に制限されない。前記第2の一本鎖核酸分子において、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。前記第2の一本鎖核酸分子において、前記リンカー領域(Lx)およびリンカー領域(Ly)を除く塩基数の合計は、下限が、例えば、38塩基であり、好ましくは42塩基であり、より好ましくは50塩基であり、さらに好ましくは51塩基であり、特に好ましくは52塩基であり、上限が、例えば、300塩基であり、好ましくは200塩基であり、より好ましくは150塩基であり、さらに好ましくは100塩基であり、特に好ましくは80塩基である。

[0192] 本発明の一本鎖核酸分子は、前述のように、前記リンカー領域(Lx)が、式(1L)で表される構造を有していればよく、その他の構成単位は、特に制限されない。前記構成単位は、例えば、ヌクレオチド残基等があげられる。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等があげられる。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等があげられる。本発明の一本鎖核酸分子は、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、本発明の一本鎖核酸分子は、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。

[0193] 前記領域(Xc)、前記領域(X)、前記領域(Y)および前記領域(Yc)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

[0194] 前記リンカー領域(Lx)は、前記非ヌクレオチド残基のみから構成され

る。

[0195] 前記リンカー領域（L<sub>y</sub>）の構成単位は、特に制限されず、例えば、前述のように、前記ヌクレオチド残基および前記非ヌクレオチド残基等があげられる。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（L<sub>y</sub>）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

[0196] 本発明の一本鎖核酸分子は、例えば、前記リンカー領域（L<sub>x</sub>）を除き、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。本発明の一本鎖核酸分子において、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。前記一本鎖核酸分子が、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。本発明の一本鎖核酸分子が、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または２個である。



[0197] 本発明の一本鎖核酸分子において、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、本発明の一本鎖核酸分子は、例えば、「一本鎖RNA分子」という。前記ssRNA分子は、例えば、前記リンカー領域(Lx)を除き、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等があげられる。前記ssRNA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。

[0198] 前記ssRNA分子が、例えば、前記非修飾リボヌクレオチド残基の他に前記修飾リボヌクレオチド残基を含む場合、前記修飾リボヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～5個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、最も好ましくは1または2個である。前記非修飾リボヌクレオチド残基に対する前記修飾リボヌクレオチド残基は、例えば、リボース残基がデオキシリボース残基に置換された前記デオキシリボヌクレオチド残基等があげられる。前記ssRNA分子が、例えば、前記非修飾リボヌクレオチド残基の他に前記デオキシリボヌクレオチド残基を含む場合、前記デオキシリボヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「1もしくは数個」であり、具体的には、例えば、1～5個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、最も好ましくは1または2個である。

[0199] 本発明の一本鎖核酸分子は、例えば、標識物質を含み、前記標識物質で標識化されてもよい。前記標識物質は、特に制限されず、例えば、蛍光物質、色素、同位体等があげられる。前記標識物質は、例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3色素、Cy5色素等の蛍光団があげられ、前記色素は、例えば、Alexa488等のAlexa色素等があげられる。前記同位体は、例えば、安定同位体および放射性同位体があげられ、好ましくは安定同位体である。前記安定同位体は、例えば、被ばくの危険性が少なく

、専用の施設も不要であることから取り扱い性に優れ、また、コストも低減できる。また、前記安定同位体は、例えば、標識した化合物の物性変化がなく、トレーサーとしての性質にも優れる。前記安定同位体は、特に制限されず、例えば、 $^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{33}\text{S}$ 、 $^{34}\text{S}$ および $^{36}\text{S}$ 等があげられる。

[0200] 本発明の一本鎖核酸分子は、前述のように、例えば、前記非ヌクレオチド構造に前記標識物質を導入することが好ましく、前記リンカー領域(Lx)の前記非ヌクレオチド残基に前記標識物質を導入することが好ましい。前記非ヌクレオチド残基への標識物質の導入は、例えば、簡便かつ安価に行うことができる。

[0201] 本発明の一本鎖核酸分子は、前述のように、前記標的遺伝子の発現を抑制ができる。このため、本発明の一本鎖核酸分子は、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。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前記一本鎖核酸分子であれば、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。

[0202] 本発明の一本鎖核酸分子の使用方法は、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、前記一本鎖核酸分子を投与すればよい。

[0203] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官等があげられる。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等があげられる。前記投与は、例えば、*in vivo*でも*in vitro*でもよい。前記細胞は、特に制限されず、例えば、HeLa細胞、293細胞、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。

[0204] 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、前記遺伝子に応じて、前記発現抑制配列を適宜設計すればよい。

[0205] 本発明の一本鎖核酸分子の具体例を以下に示すが、本発明はこれには何ら制限されない。前記一本鎖核酸分子の塩基配列は、標的遺伝子が TGF- $\beta$  1 の場合、例えば、配列番号 1 の塩基配列が例示でき、プロレニン受容体の場合、例えば、配列番号 2 の塩基配列が例示でき、miR-29b の場合、例えば、配列番号 3 の塩基配列が例示できる。また、前記塩基配列において、例えば、1 もしくは数個の欠失、置換および／または付加された塩基配列でもよい。

[0206] プロレニン受容体 5'-UUUAUGCAAGGUUAUAGGGA-3' (配列番号 2)

miR-29b 5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3' (配列番号 3)

[0207] 本発明の一本鎖核酸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援用できる。

[0208] 本発明の一本鎖核酸分子は、前述のように標的遺伝子の発現を抑制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。

[0209] 2. ヌクレオチド残基

本発明の一本鎖核酸分子を構成するヌクレオチド残基は、前述の通りであり、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等があげられる。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) およびウラシル (U) 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。

[0210] 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等があげられる。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じ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じまたは実質的に同一である。

[0211] 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。

- [0212] 前記ヌクレオチド残基の修飾は、例えば、リボースーリン酸骨格（以下、リボリン酸骨格）の修飾等があげられる。
- [0213] 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。
- [0214] 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等があげられる。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等があげられる。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 Acids）等があげられ、好ましくはPNAである。

[0215] 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、糖残基に最も近いリン酸基は、 $\alpha$ リン酸基と呼ばれる。前記 $\alpha$ リン酸基は、負に荷電し、その電荷は、糖残基に非結合の2つの酸素原子にわたって、均一に分布している。前記 $\alpha$ リン酸基における4つの酸素原子のうち、ヌクレオチド残基間のホスホジエステル結合において、糖残基と非結合である2つの酸素原子は、以下、「非結合 (non-linking) 酸素」ともいう。他方、前記ヌクレオチド残基間のホスホジエステル結合において、糖残基と結合している2つの酸素原子は、以下、「結合 (linking) 酸素」という。前記 $\alpha$ リン酸基は、例えば、非荷電となる修飾、または、前記非結合原子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。

[0216] 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、例えば、アルキル基またはアリアル基) のいずれかの原子で置換でき、好ましくは、Sで置換される。前記非結合酸素は、例えば、両方が置換されていることが好ましく、より好ましくは、両方がSで置換される。前記修飾リン酸基は、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、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アルホスホネート、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。

[0217] 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る。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、本発明の一本鎖核酸分子の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。

[0218] 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。

[0219] 本発明の一本鎖核酸分子は、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。

[0220] 前記末端のヌクレオチド残基の修飾は、例えば、他の分子の付加等があげられる。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等があげられる。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、本発明の一本鎖核酸分子の検出等に利用できる。

[0221] 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。

[0222] 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。

[0223] 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。

[0224] 本発明の一本鎖核酸分子は、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。前記リン酸化は、例えば、5'-リン

酸 ((H<sub>0</sub>)<sub>2</sub>(O)P-0-5')、5' ニリン酸 ((H<sub>0</sub>)<sub>2</sub>(O)P-0-P(H<sub>0</sub>)(O)-0-5')、5' 三リン酸 ((H<sub>0</sub>)<sub>2</sub>(O)P-0-(H<sub>0</sub>)(O)P-0-P(H<sub>0</sub>)(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' -(H<sub>0</sub>)(O)P-0-(H<sub>0</sub>)(O)P-0-P(H<sub>0</sub>)(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' -(H<sub>0</sub>)(O)P-0-(H<sub>0</sub>)(O)P-0-P(H<sub>0</sub>)(O)-0-5')、5' -チオリン酸 (ホスホロチオエート : (H<sub>0</sub>)<sub>2</sub>(S)P-0-5')、5' -ジチオリン酸 (ホスホロジチオエート : (H<sub>0</sub>)(HS)(S)P-0-5')、5' -ホスホロチオール酸 ((H<sub>0</sub>)<sub>2</sub>(O)P-S-5')、硫黄置換の一リン酸、ニ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 ((H<sub>0</sub>)<sub>2</sub>(O)P-NH-5'、(H<sub>0</sub>)(NH<sub>2</sub>)(O)PO-5')、5' -アルキルホスホン酸 (例えば、RP(OH)(O)-0-5'、(OH)<sub>2</sub>(O)P-5'-CH<sub>2</sub>、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。

[0225] 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。

[0226] 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等があげられる。前記塩基は、この他に、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、プリン、ヌバラリン (nubularine)、イソグアニシン (isoguanisine)、ツベルシジン (tubercidine)、7-デアザアデニン等があげられる。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；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、クロシュビッツジェーアイ（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。

[0227] 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。

[0228] 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。本発明の一本鎖核酸分子は、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。

[0229] 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、前記本発明の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の組成物は、前記本発明の一本鎖核酸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。

[0230] 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。

[0231] また、本発明の薬学的組成物は、前述のように、前記本発明の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする。本発明の組成物は、前記本発明の一本鎖核酸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。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。

[0232] 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。

[0233] 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等があげられる。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。

[0234] 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一本鎖核酸分子に配置すれば、TGF- $\beta$  1 を抑制することにより治療効果が期待される疾患や病態、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。

[0235] 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）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、前記一本鎖核酸分子を投与すればよい。

[0236] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官等があげられる。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等があげられる。前記投与は、例えば、*in vivo*でも*in vitro*でもよい。前記細胞は、特に制限されず、例えば、HeLa細胞、293細胞、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。

[0237] 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。前記投与が*in vivo*の場合、例えば、経口投与でもよいし、非経口投与でもよい。前記非経口投与は、例えば、注射、皮下投与、局所投与等があげられる。

[0238] 本発明の組成物は、例えば、本発明の一本鎖核酸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。

- [0239] 本発明の組成物において、前記一本鎖核酸分子は、例えば、前記添加物と複合体を形成してもよい。前記添加物は、例えば、複合化剤ということもできる。前記複合体により、例えば、前記一本鎖核酸分子を効率よくデリバリーできる。前記一本鎖核酸分子と前記複合化剤との結合は、特に制限されず、例えば、非共有結合等があげられる。前記複合体は、例えば、包接複合体等があげられる。
- [0240] 前記複合化剤は、特に制限されず、ポリマー、シクロデキストリン、アダマンチン等があげられる。前記シクロデキストリンは、例えば、線状シクロデキストリンコポリマー、線状酸化シクロデキストリンコポリマー等があげられる。
- [0241] 前記添加剤は、この他に、例えば、担体、標的細胞への結合物質、縮合剤、融合剤等があげられる。
- [0242] 前記担体は、例えば、高分子が好ましく、より好ましくは、生体高分子である。前記担体は、例えば、生分解性が好ましい。前記担体は、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リポタンパク質（LDL）、グロブリン等のタンパク質；例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、ヒアルロン酸等の糖質；脂質等があげられる。前記担体は、例えば、合成ポリアミノ酸等の合成ポリマーも使用できる。前記ポリアミノ酸は、例えば、ポリリシン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物コポリマー、ポリ（L-ラクチド-コーグリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル-マレイン酸無水物コポリマー、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、又はポリホスファジン（polyphosphazine）等があげられる。
- [0243] 前記結合物質は、例えば、甲状腺刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントプロテインA、ムチン糖質

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

[0244] 前記融合剤および縮合剤は、例えば、ポリエチレンイミン (PEI) 等のポリアミノ鎖等があげられる。PEIは、例えば、直鎖状および分岐状のいずれでもよく、また、合成物および天然物のいずれでもよい。前記PEIは、例えば、アルキル置換されてもよいし、脂質置換されてもよい。また、前記融合剤は、この他に、例えば、ポリヒスチジン、ポリイミダゾール、ポリピリジン、ポリプロピレンイミン、メリチン、ポリアセタール物質 (例えば、カチオン性ポリアセタール等) 等が使用できる。前記融合剤は、例えば、 $\alpha$ らせん構造を有してもよい。前記融合剤は、例えば、メリチン等の膜崩壊剤でもよい。

[0245] 本発明の組成物は、例えば、前記複合体の形成等について、米国特許第6,509,323号、米国特許公報第2003/0008818号、PCT/US04/07070号等を援用できる。

[0246] 前記添加剤は、この他に、例えば、両親媒性分子等があげられる。前記両親媒性分子は、例えば、疎水性領域および親水性領域を有する分子である。前記分子は、例えば、ポリマーが好ましい。前記ポリマーは、例えば、二次構造を有するポリマーであり、反復性の二次構造を有するポリマーが好ましい。具体例としては、例えば、ポリペプチドが好ましく、より好ましくは、 $\alpha$ らせん状ポリペプチド等である。

[0247] 前記両親媒性ポリマーは、例えば、2つ以上の両親媒性サブユニットを有するポリマーでもよい。前記サブユニットは、例えば、少なくとも1つの親水性基および1つの疎水性基を有する環状構造を有するサブユニット等があげられる。前記サブユニットは、例えば、コール酸等のステロイド、芳香族

構造等を有してもよい。前記ポリマーは、例えば、芳香族サブユニット等の環状構造サブユニットとアミノ酸の両方を有してもよい。

[0248] 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、前記本発明の一本鎖核酸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、前記本発明の一本鎖核酸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。

[0249] 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干渉による発現抑制等があげられる。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ともいえる。

[0250] 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、前記一本鎖核酸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一本鎖核酸分子を接触させる。前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官等があげられる。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等があげられる。前記投与は、例えば、*in vivo*でも*in vitro*でもよい。

[0251] 本発明の発現抑制方法は、例えば、前記一本鎖核酸分子を単独で投与してもよいし、前記一本鎖核酸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、投与対象の種類の種類に応じて適宜選択できる。

[0252] 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。本発明の治療方法は、前記本発明の一本鎖核酸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。本発

明の治療方法は、例えば、前記本発明の発現抑制方法を援用できる。

[0253] 7. 一本鎖核酸分子の使用

本発明の使用は、前記標的遺伝子の発現抑制のための、前記本発明の一本鎖核酸分子の使用である。また、本発明の使用は、RNA干渉の誘導のための、前記本発明の一本鎖核酸分子の使用である。

[0254] 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。

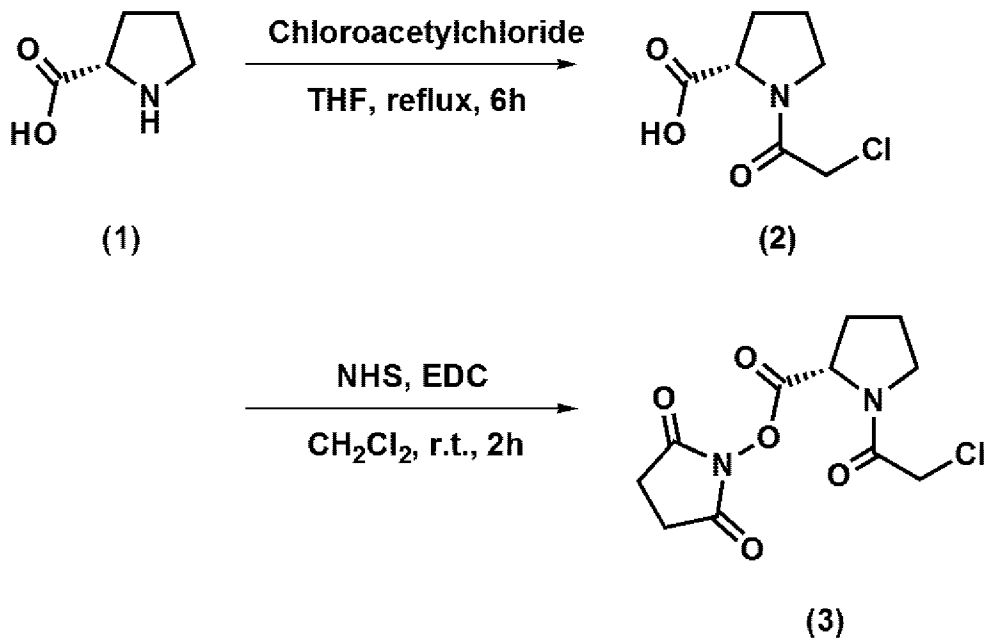
### 実施例

[0255] 本発明は、更に以下の実施例、試験例および製剤例によって詳しく説明されるが、これらは本発明を限定するものではなく、また本発明の範囲を逸脱しない範囲で変化させてもよい。

[0256] 実施例 1 : N-2-クロロアセチル-L-プロリン-サクシニミジルエステル (3) の合成

下記スキームに従い、N-2-クロロアセチル-L-プロリン-サクシニミジルエステル (3) を合成した。

[0257] [化59]



## [0258] [1] N-2-クロロアセチル-L-プロリン (2) の合成

L-プロリン (1) (1.0 g, 8.7 mmol) と脱水THF (10 mL) を加えた懸濁液に、クロロアセチルクロリド (1.05 mL, 13.2 mmol) と脱水THF (1.5 mL) の溶液をアルゴン雰囲気下で滴下しながら攪拌した。この反応混合物を6時間加熱還流し、室温に戻してから脱イオン水 (2 mL) を加え10分間攪拌し、飽和食塩水と酢酸エチルにて分液操作を行い、有機層を分けた。残った水層がpH 2より低いことを確認し、酢酸エチルにて2回抽出した。有機層を合わせて硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をジソプロピルエーテルでトリチュレーションし、白色粉末の化合物 (2) (0.97 g, 収率58.4%) を得た。以下に、化合物 (2) の機器分析値を示す。

化合物 (2) :

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.35 (1H, br. s), 4.56-4.63 (1H, m), 4.00-4.14 (2H, m), 3.57-3.73 (2H, m), 1.93-2.35 (4H, m).

融点: 110-111°C

ESI-MS: 214.03[M+Na]<sup>+</sup>

## [0259] [2] N-2-クロロアセチル-L-プロリン-サクシンイミジルエステル (3) の合成

N-2-クロロアセチル-L-プロリン (2) (0.1 g, 0.5 mmol) をジクロロメタン (3 mL) に溶解し、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 (0.12 g, 0.6 mmol) とN-ヒドロキシコハク酸イミド (0.07 g, 0.6 mmol) を加えて室温で2時間攪拌した。反応終了後、ジクロロメタンを加えて水で2回、飽和食塩水で2回洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、減圧濃縮し白色発泡体の化合物 (3) (0.11 g, 収率73%) を得た。以下に、化合物 (3) の機器分析値を示す。

化合物 (3) :

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.83-4.96 (1H, m), 4.04-4.11 (2H, m), 3.61-3.78 (2H, m), 2.83-2.87 (4H, m), 2.02-2.50 (4H, m).



ESI-MS : 311.05[M+Na]<sup>+</sup>

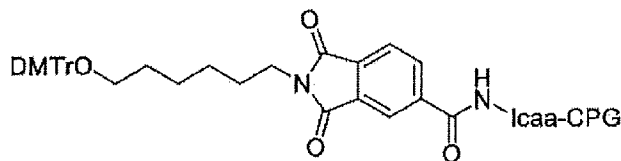
[0260] 実施例2：新規一本鎖核酸分子の合成 (PS-0001-C3)

(1) 核酸合成

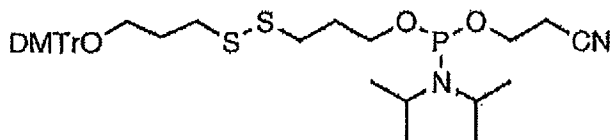
以下に示す核酸を、ホスホロアミダイト法に基づき、核酸合成機（商品名 ABI Expedite（商標登録）8909 Nucleic Acid Synthesis System、アプライドバイオシステムス）により合成した。RNAアミダイトとして、TBDMSアミダイトを用いた固相合成を行った。センス鎖の合成では、3'末端に Phthalamido Amino C6 Icaa CPG (ChemGenes)（以下に構造を示す）を用いた。アンチセンス鎖の合成では、5'末端に 5'-Thiol C-3 Disulfide Modifier CED phosphoramidite (ChemGenes)（以下に構造を示す）を用いた。固相からの切り出しと脱保護は、定法に従った。合成した核酸は、HPLCにより精製した。下記アンチセンス鎖核酸中の下線部は、ヒト TGF-β1 遺伝子の発現抑制配列である。

[0261] [化60]

Phthalamido Amino C6 Icaa CPG



5'-Thiol C-3 Disulfide Modifier CED phosphoramidite



[0262]

[化61]

センス鎖



アンチセンス鎖



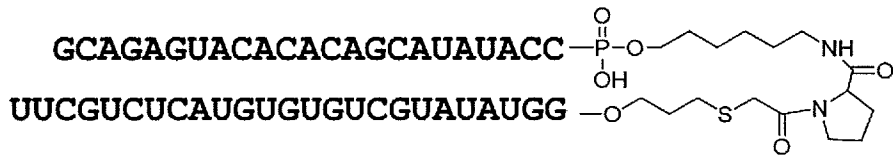
[0263] (2) 新規一本鎖核酸分子の合成

以下に本発明の一本鎖核酸分子である PS-0001-C3 の構造を示す。

PS-0001-C3 は、前記センス鎖の 3' 末端とアンチセンス鎖の 5' 末端を、後述する方法にて、実施例 1 で得られた N-2-クロロアセチル- $\epsilon$ -L-プロリン-サクシンイミジルエステル (3) を介して結合させることにより得られる一本鎖核酸分子である。

[0264] [化62]

PS-0001-C3



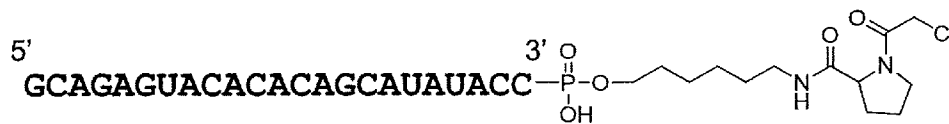
[0265] センス鎖+Pの合成

1 mmol/L のセンス鎖 40  $\mu$ L、1 mol/L のリン酸緩衝液 (pH 8.5) 20  $\mu$ L、2.0 mg/100  $\mu$ L の N-2-クロロアセチル- $\epsilon$ -L-プロリン-サクシンイミジルエステル (3) /DMF 10  $\mu$ L (693 nmol)、注射用蒸留水 30  $\mu$ L を混合し、25  $^{\circ}$ C にて 50 分間攪拌した。さらに、2.0 mg/100  $\mu$ L の N-2-クロロアセチル- $\epsilon$ -L-プロリン-サクシンイミジルエステル (3) /DMF 5  $\mu$ L を追加し、70 分間静置した。この反応液について、注射用蒸留水 (大塚製薬) を溶出液とした illustra MicroSpin G-25 Columns (GE Healthcare) にて精製し、センス鎖+P を得た。質量

分析：7689.00（計算値：7689.29）。HPLC分析結果を図1に示す。分析条件は、XBridge OST C18（4.6×50mm）、移動相A：50mM TEAA（pH7）、5%CH<sub>3</sub>CN、移動相B：50mM TEAA（pH7）、50%CH<sub>3</sub>CN、グラジエントB：0-30%/20min、流速：1mL/min、カラム温度：60℃、検出：UV260nmである。

[0266] [化63]

センス鎖+P



[0267] アンチセンス鎖（SH体）の合成

1mmol/Lのアンチセンス鎖 40μL、1mol/Lのリン酸緩衝液（pH 8.0） 20μL、10mg/mLのジチオトレイトール水溶液 20μL、注射用蒸留水 20μLを混合し、25℃にて45分間撹拌した。さらに、10mg/mLのジチオトレイトール水溶液 5μLを追加し、1.5時間撹拌した。この反応液について、注射用蒸留水（大塚製薬）を溶出液としたillustra MicroSpin G-25 Columns（GE Healthcare）にて精製し、アンチセンス鎖（SH体）を得た。質量分析：8084.30（計算値：8084.85）。HPLC分析結果を図2に示す。分析条件は、XBridge OST C18（4.6×50mm）、移動相A：50mM TEAA（pH7）、5%CH<sub>3</sub>CN、移動相B：50mM TEAA（pH7）、50%CH<sub>3</sub>CN、グラジエントB：0-30%/20min、流速：1mL/min、カラム温度：60℃、検出：UV260nmである。

[0268] [化64]

アンチセンス鎖（SH体）



[0269] PS-0001-C3の合成

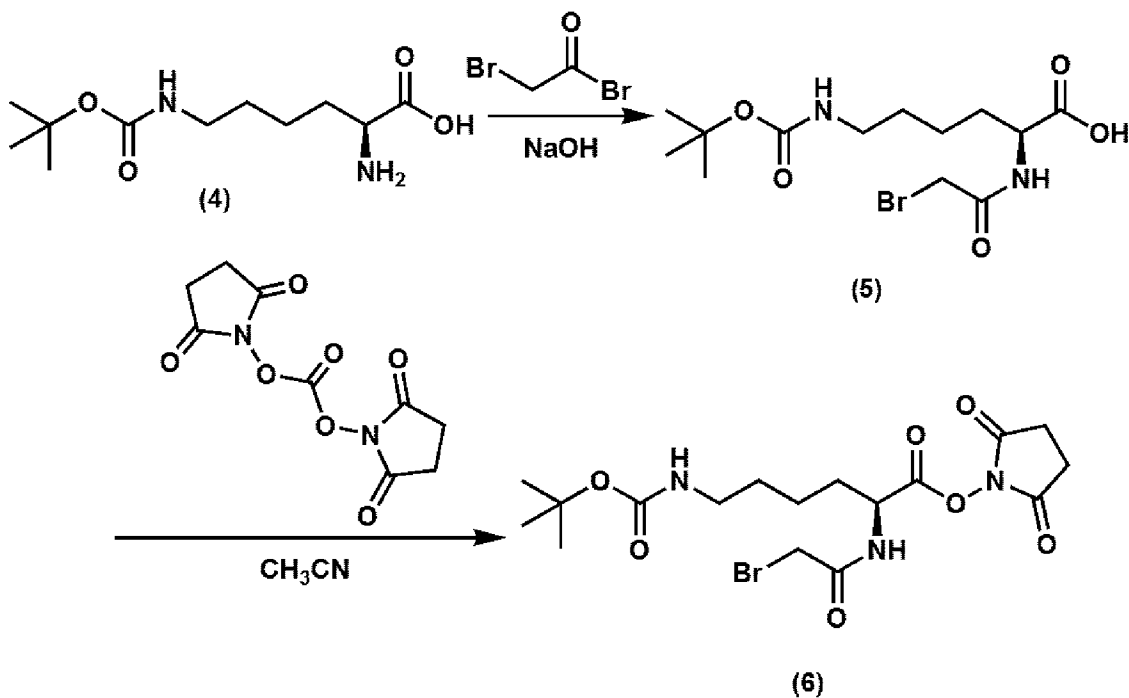
センス鎖+P 170  $\mu$ L、アンチセンス鎖 (SH体) 170  $\mu$ L、1 mol/Lのリン酸緩衝液 (pH 8.5) 100  $\mu$ L、注射用蒸留水 60  $\mu$ Lを混合し、25°Cにて2時間攪拌した。反応液をHPLC (カラム: XBridge Oligonucleotide BEH C18、2.5  $\mu$ m、10×50mm; 流速: 4 mL/min; 検出: UV260nm; カラム温度: 40°C; 移動相A: 50 mmol/L TEAA (pH7.0)、5%CH<sub>3</sub>CN; 移動相B: 50 mmol/L TEAA (pH7.0)、50%CH<sub>3</sub>CN) にて精製し、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、PS-0001-C3を得た。質量分析: 15737.80 (計算値: 15737.67)。精製後のHPLC分析結果を図3に示す。分析条件は、DNAPac PA-100 (4×250mm)、移動相A: 25 mM Tris-HCl (pH8)、10%CH<sub>3</sub>CN、8M Urea、移動相B: 25 mM Tris-HCl (pH8)、10%CH<sub>3</sub>CN、8M Urea、700mM NaClO<sub>4</sub>、グラジエントB: 10-40%/20min、流速: 1 mL/min、カラム温度: 80°C、検出: UV260nmである。

[0270] 実施例3: N<sup>α</sup>-2-ブロモアセチル-N<sup>ε</sup>-tert-ブトキシカルボニル-L-リジン-サクシンイミジルエステル (6) の合成

下記スキームに従い、N<sup>α</sup>-2-ブロモアセチル-N<sup>ε</sup>-tert-ブトキシカルボニル-L-リジン-サクシンイミジルエステル (6) を合成した。

[0271]

[化65]



[0272] [1] N<sup>α</sup>-2-ブロモアセチル-N<sup>ε</sup>-tert-ブトキシカルボニル-L-リジン (5) の合成

N<sup>ε</sup>-tert-ブトキシカルボニル-L-リジン (4) (1.00 g, 4.06 mmol) に水(4 mL)、THF (4 mL) および4N NaOH水溶液(880 μL, 3.52 mmol) を室温で加えて溶解した。この溶液を0 °Cに冷却し、4 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液(1.2 mL, 4.8 mmol) およびブロモアセチルブロミド(400 μL, 4.62 mmol) を添加した。反応後の溶液に3 mol/L 臭化水素酸(2 mL) を添加し、メチルtert-ブチルエーテル10 mLで3回抽出した。合わせた有機層を炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、洗浄後の有機層を減圧濃縮し、化合物(5) (307 mg, 収率21%)を無色油状物として得た。以下に、化合物(5)の機器分析値を示す。

化合物(5) :

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 8.54 (1H, br.s), 6.76 (1H, br.s), 4.10-4.15 (1H, m), 3.85-3.91 (2H, m), 2.84-2.89 (2H, m), 1.51-1.71 (2H, m), 1.19-1.39 (4H, m), 1.35 (9H, s).

ESI-MS : 389.10 [M+Na]<sup>+</sup>

[0273] [2]  $N^{\alpha}$ -2-ブロモアセチル- $N^{\epsilon}$ -tert-ブトキシカルボニル- $L$ -リジン-サクシンイミジルエステル (6) の合成

$N^{\alpha}$ -2-ブロモアセチル- $N^{\epsilon}$ -tert-ブトキシカルボニル- $L$ -リジン (5) (439.4 mg, 1.20 mmol) およびジ (N-スクシンイミジルカーボネート) (322.0 mg, 1.26 mmol) のアセトニトリル (4.4 mL) 懸濁液に、室温で  $N,N$ -ジメチルアミノピリジン (29.6 mg, 0.24 mmol) を加えた。20 分間攪拌した後、反応液を減圧濃縮し、残渣をクロロホルム (11 mL) で希釈した。水 (8.8 mL) で 4 回洗浄した後、有機層を無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、減圧濃縮して化合物 (6) (507.1 mg, 収率 91%) を無色泡状の固体として得た。以下に、化合物 (6) の機器分析値を示す。

化合物 (6) :

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.98 (1H, br. s), 6.79 (1H, br. s), 4.59-4.64 (1H, m), 3.89-3.95 (2H, m), 2.89-2.91 (2H, m), 2.81-2.83 (4H, m), 1.73-1.90 (2H, m), 1.34-1.40 (4H, m), 1.37 (9H, s).

ESI-MS: 486.08 [M+Na] $^+$

[0274] 実施例 4 : 新規一本鎖核酸分子の合成 (KS-0001)

実施例 2 で調製された以下のセンス鎖およびアンチセンス鎖を用いた。

[0275] [化66]

センス鎖



アンチセンス鎖



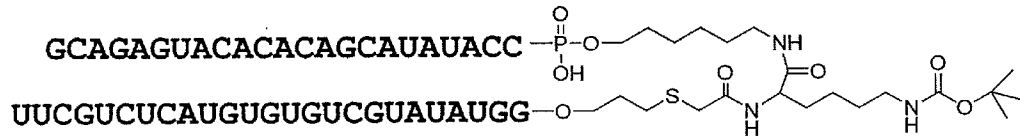
[0276] 以下に本発明の一本鎖核酸分子である KS-0001 の構造を示す。

KS-0001 は、前記センス鎖の 3' 末端とアンチセンス鎖の 5' 末端を、後述する方法にて  $N^{\alpha}$ -2-ブロモアセチル- $N^{\epsilon}$ -tert-ブトキシカルボニル- $L$ -リジン-サクシンイミジルエステル (6) を介して結合さ

せることにより得られる一本鎖核酸分子である。

[0277] [化67]

KS-0001



[0278] KS-0001の合成

844  $\mu\text{mol/L}$ のセンス鎖 48  $\mu\text{L}$ 、注射用蒸留水 438  $\mu\text{L}$ 、ジイソプロピルエチルアミン 14  $\mu\text{L}$ の混合溶液を、17.2 mg/200  $\mu\text{L}$ の、実施例3で得られた $N^{\alpha}$ -2-ブロモアセチル- $N^{\epsilon}$ -tert-ブトキシカルボニル-L-リジン-サクシンイミジルエステル(6)/DMF 200  $\mu\text{L}$ に5回に分けて添加し、25 $^{\circ}\text{C}$ にて20分間攪拌した。

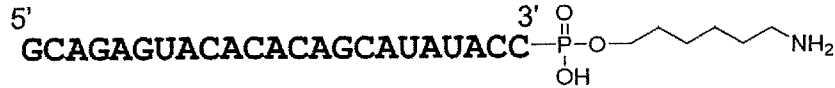
1 mmol/Lのアンチセンス鎖 20  $\mu\text{L}$ 、1 mol/Lのリン酸緩衝液(pH 8.0) 20  $\mu\text{L}$ 、10 mg/mLのジチオトレイトール水溶液 20  $\mu\text{L}$ 、注射用蒸留水 40  $\mu\text{L}$ を混合し、25 $^{\circ}\text{C}$ にて2時間攪拌した。この反応液を前出の反応液に添加し、25 $^{\circ}\text{C}$ にて20分間攪拌した。反応液をエタノール沈殿後、HPLC(カラム: Develosil C8-UG-5、5  $\mu\text{m}$ 、10 $\times$ 50 mm; 流速: 4.7 mL/min; 検出: UV 260 nm; カラム温度: 50 $^{\circ}\text{C}$ ; 移動相A: 50 mmol/L TEAA (pH 7.0)、5% CH<sub>3</sub>CN; 移動相B: 50 mmol/L TEAA (pH 7.0)、50% CH<sub>3</sub>CN)にて精製し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションを減圧濃縮し、KS-0001を得た。質量分析: 15869.50(計算値: 15868.85)。精製後のHPLC分析結果を図4に示す。分析条件は、DNAPac PA-100(4 $\times$ 250 mm)、移動相A: 25 mM Tris-HCl (pH 8)、10% CH<sub>3</sub>CN、8M Urea、移動相B: 25 mM Tris-HCl (pH 8)、10% CH<sub>3</sub>CN、8M Urea、700 mM NaClO<sub>4</sub>、グラジエントB: 10-40%/20 min、流速: 1 mL/min、カラム温度: 80 $^{\circ}\text{C}$ 、検出: UV 260 nmである。

[0279] 参考例：新規一本鎖核酸分子の合成 (AS-0001)

実施例2で調製された以下のセンス鎖およびアンチセンス鎖を用いた。

## [0280] [化68]

センス鎖



アンチセンス鎖

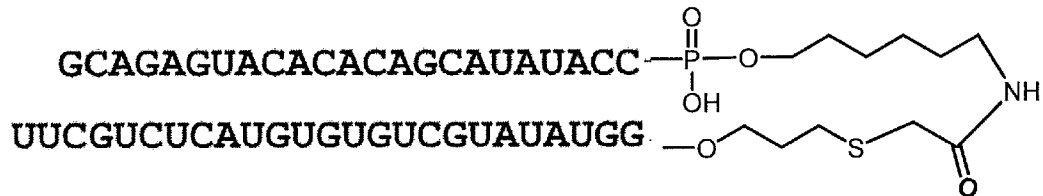


[0281] 以下に本発明の一本鎖核酸分子であるAS-0001の構造を示す。

AS-0001は、前記センス鎖の3'末端とアンチセンス鎖の5'末端を、後述する方法にて2-ブロモ酢酸サクシンイミジルエステルを介して結合させることにより得られる一本鎖核酸分子である。

## [0282] [化69]

AS-0001

[0283] AS-0001の合成

844 μmol/Lのセンス鎖 48 μL、注射用蒸留水 438 μL、ジイソプロピルエチルアミン 14 μLの混合溶液を、7.5 μmol/Lの2-ブロモ酢酸サクシンイミジルエステル/DMF 200 μLに5回に分けて添加し、25℃にて20分間攪拌した。反応液をエタノール沈殿後、HPLC (カラム: Develosil C8-UG-5、5 μm、10×50 mm; 流速: 4.7 mL/min; 検出: UV 260 nm; カラム温度: 50℃; 移動相A: 50 mmol/L TEAA (pH 7.0)、5% CH<sub>3</sub>CN; 移動相B: 50 mmol/L TEAA (pH 7.0)、50% CH<sub>3</sub>CN) にて精製し、目的物のピークを分取した。分取したフラクションを減圧濃縮し、センス鎖+ブロモアセチル体を得た。質量分析: 7636.9



0 (計算値: 7636.62)。

1 mmol/Lのアンチセンス鎖 4  $\mu$ L、1 mol/Lのリン酸緩衝液 (pH 8.0) 4  $\mu$ L、10 mg/mLのジチオトレイトール水溶液 4  $\mu$ L、注射用蒸留水 8  $\mu$ Lを混合し、25°Cにて30分間攪拌した。この反応液17.5  $\mu$ Lとセンス鎖+プロモアセチル体 750  $\mu$ L (3.45 nmol)、1 mol/Lのリン酸緩衝液 (pH 8.5) 85  $\mu$ Lを混合し、25°Cにて30分間攪拌した。反応液をエタノール沈殿後、注射用蒸留水 (大塚製薬) を溶出液とした *illustra MicroSpin G-25 Columns* (GE Healthcare) にて精製し、AS-0001を得た。質量分析: 15641.40 (計算値: 15640.56)。精製後のHPLC分析結果を図5に示す。分析条件は、DNAPac PA-100 (4 $\times$ 250 mm)、移動相A: 25 mM Tris-HCl (pH 8)、10% CH<sub>3</sub>CN、8 M Urea、移動相B: 25 mM Tris-HCl (pH 8)、10% CH<sub>3</sub>CN、8 M Urea、700 mM NaClO<sub>4</sub>、グラジエントB: 10-40%/20 min、流速: 1 mL/min、カラム温度: 80°C、検出: UV 260 nmである。

[0284] 試験例1 (遺伝子発現抑制活性測定法)

細胞は、A549細胞 (DSファーマバイオメディカル) を使用した。培地は、10% FBSを含むDMEM (Invitrogen) を使用した。培養条件は、37°C、5% CO<sub>2</sub>下とした。

まず、細胞を培地中で培養し、その細胞懸濁液を24穴プレートに400  $\mu$ Lずつ、4 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞/ウェルとなるように分注した。さらに、トランスフェクション試薬 *Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent* (Invitrogen) を用い、添付のプロトコールに従って、核酸分子をウェル中の細胞にトランスフェクションした。具体的には、ウェルあたりの組成を以下のように設定しトランスフェクションを行った。下記組成において、(B) は、Opti-MEM (Invitrogen)、(C) は、核酸分子溶液であり、両者をあわせて9

8. 5  $\mu$ L 添加した。なお、ウェルにおいて、核酸分子の終濃度は 0.01、0.1、1 nmol/L とした。

[0285] [表1]

(ウェルあたりの組成: $\mu$ L)	
培養液	400
トランスフェクション試薬	1.5
(B) + (C)	98.5
合計	500

[0286] トランスフェクション後 24 時間培養した後、NucleoSpin RNA Plus (タカラバイオ) を用い、添付のプロトコールに従って、RNA を回収した。次に、逆転写酵素 (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche) を用い、添付のプロトコールに従って、RNA から cDNA を合成した。そして、以下に示すように、合成した cDNA を鋳型として PCR を行い、TGF- $\beta$ 1 遺伝子の発現量および内部標準である  $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量を測定した。TGF- $\beta$ 1 遺伝子の発現量は、 $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量により補正した。

[0287] PCR は、試薬として LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche)、機器として LightCycler 480 Instrument II (Roche) を用いた。TGF- $\beta$ 1 遺伝子および  $\beta$ -アクチン遺伝子の増幅には、それぞれ、以下のプライマーセットを使用した。

TGF- $\beta$ 1 遺伝子用 PCR プライマーセット

5' -ttgtgcggcagtggttgagccg-3' (配列番号 6)

5' -gaagcaggaaaggccggttcacgc-3' (配列番号 7)

$\beta$ -アクチン遺伝子用プライマーセット

5' -gccacggctgcttccagctcctc-3' (配列番号 8)

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

[0288] コントロールとして、トランスフェクションにおいて、核酸分子を未添加

とし、(A) トランスフェクション試薬 1.5  $\mu$ L と (B) とを合計 100  $\mu$ L 添加した以外は、同様にして処理した細胞についても、遺伝子発現量を測定した (m o c k)。

補正後の TGF- $\beta$ 1 遺伝子の発現量について、コントロール (m o c k) の細胞における発現量を 1 として、各核酸分子を導入した細胞での発現量の相対値を求めた。

これらの結果を図 6 に示す。図 6 に示すように、実施例の核酸分子は強い遺伝子発現抑制活性を示すことがわかった。

### 産業上の利用可能性

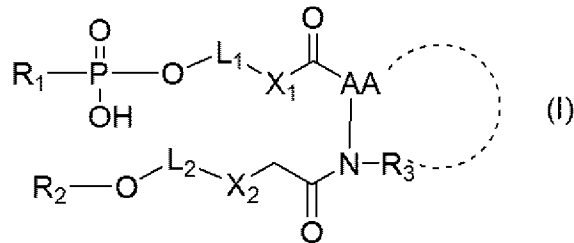
[0289] 本発明によれば、高難易度の長鎖オリゴマーの合成が短鎖オリゴマーの技術を駆使して可能となる新規な一本鎖核酸分子の製造方法、および該方法によって製造される新規な一本鎖核酸分子を提供できる。

[0290] 本出願は、日本で 2017 年 10 月 13 日に出願された特願 2017-199945 号を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含される。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式 ( I ) :

[化1]



[式中、

R<sub>1</sub>は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その3'末端ヌクレオチド残基が-P(=O)(OH)-O-と結合し；

R<sub>2</sub>は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その5'末端ヌクレオチド残基が-O-と結合し；

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

L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は、それぞれ独立して、C<sub>1-30</sub>アルキレン鎖、または-(CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>-(O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-)<sub>n</sub>- (式中、lは1~3の整数を示し、mは1~3の整数を示し、nは1~10の整数を示す。)を示し；

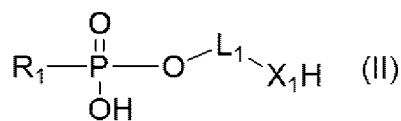
-C(=O)-AA-NR<sub>3</sub>-は、アミノ酸残基を示し；

R<sub>3</sub>は、水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を示すか、あるいは、AAと一緒に窒素含有複素環を形成する。]

で表される一本鎖核酸分子の製造方法であって、

(工程1) 下記一般式 ( II ) :

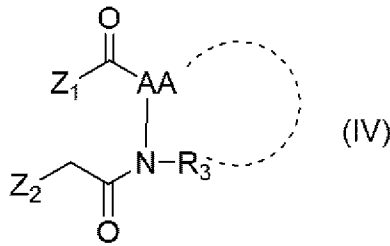
[化2]



[式中の各記号は前記と同義である。]

で表される核酸を、下記一般式 ( IV ) :

[化3]



[式中、

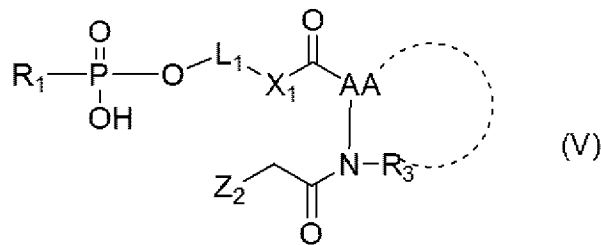
$Z_1$ は、スクシンイミジルオキシ基、ベンゾトリアゾリルオキシ基、  
ペンタフルオロフェノキシ基またはハロゲン原子を示し；

$Z_2$ は、ハロゲン原子を示し；

その他の記号は前記と同義である。]

で表される化合物と反応させて、下記一般式 (V)：

[化4]

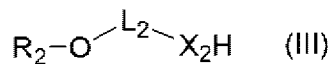


[式中の各記号は前記と同義である。]

で表される核酸を得る工程；および

(工程2) 一般式 (V) で表される核酸を、下記一般式 (III)：

[化5]



[式中の各記号は前記と同義である。]

で表される核酸と反応させて、上記一般式 (I) で表される一本鎖核  
酸分子を得る工程；

を包含する、製造方法。

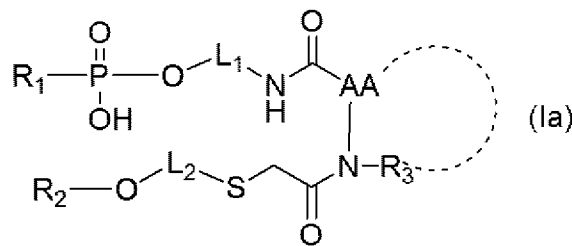
[請求項2]

アミノ酸残基が、プロリン残基、グリシン残基、または側鎖アミノ  
基が保護されていてもよいリジン残基である、請求項1に記載の製造

方法。

- [請求項3]  $X_2$ がSである、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項4]  $X_1$ がNHである、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項5]  $L_1$ が、 $C_{2-11}$ アルキレン鎖である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項6]  $L_1$ が、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$ （式中、 $n$ は1～5の整数を示す。）である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項7]  $L_2$ が、 $C_{2-11}$ アルキレン鎖である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項8]  $L_2$ が、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$ （式中、 $n$ は1～5の整数を示す。）である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項9]  $Z_1$ が、スクシンイミジルオキシ基である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項10] 一本鎖核酸分子が、標的遺伝子の発現を抑制する配列を含む、請求項1～9のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項11] 下記一般式（1a）：

[化6]



[式中、

$R_1$ は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その3'末端ヌクレオチド残基が $-P(=O)(OH)-O-$ と結合し；

$R_2$ は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む領域であって、その5'末端ヌクレオチド残基が $-O-$ と結合し；

$L_1$ および $L_2$ は、それぞれ独立して、 $C_{1-30}$ アルキレン鎖、または $-(CH_2)_l-(O-(CH_2)_m-)_n-$ （式中、 $l$ は1～3の整数を示し、 $m$ は1～3の整数を示し、 $n$ は1～10の整数を示す。）を

示し；

$-C(=O)-AA-NR_3-$ は、アミノ酸残基を示し；

$R_3$ は、水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基を示すか、あるいは、 $AA$ と一緒に窒素含有複素環を形成する。]

で表される一本鎖核酸分子。

[請求項12] アミノ酸残基が、プロリン残基、グリシン残基、または側鎖アミノ基が保護されていてもよいリジン残基である、請求項11に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項13]  $L_1$ が、 $C_{2-11}$ アルキレン鎖である、請求項11に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項14]  $L_1$ が、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$ （式中、 $n$ は1～5の整数を示す。）である、請求項11に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項15]  $L_2$ が、 $C_{2-11}$ アルキレン鎖である、請求項11に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項16]  $L_2$ が、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_n-$ （式中、 $n$ は1～5の整数を示す。）である、請求項11に記載の一本鎖核酸分子。

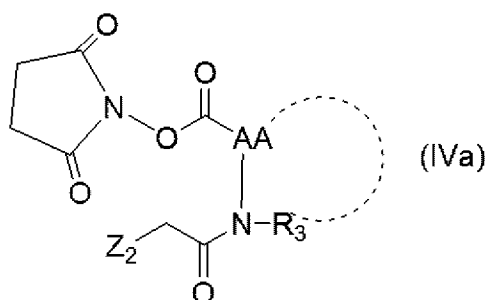
[請求項17] 標的遺伝子の発現を抑制する配列を含む、請求項11～16のいずれかに記載の一本鎖核酸分子。

[請求項18] 請求項11～17のいずれかに記載の一本鎖核酸分子を含む、医薬組成物。

[請求項19] 請求項17に記載の一本鎖核酸分子を含む、標的遺伝子の発現抑制剤。

[請求項20] 下記一般式（IVa）：

[化7]



[式中、

$Z_2$ は、ハロゲン原子を示し；

$-C(=O)-AA-NR_3-$ は、アミノ酸残基を示し；

$R_3$ は、水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基を示すか、あるいは、 $AA$ と一緒に窒素含有複素環を形成する。]

で表される化合物。

[請求項21] アミノ酸残基が、プロリン残基、グリシン残基、または側鎖アミノ基が保護されていてもよいリジン残基である、請求項20に記載の化合物。

[請求項22]  $Z_2$ が、塩素原子または臭素原子である、請求項20に記載の化合物。



[図1]

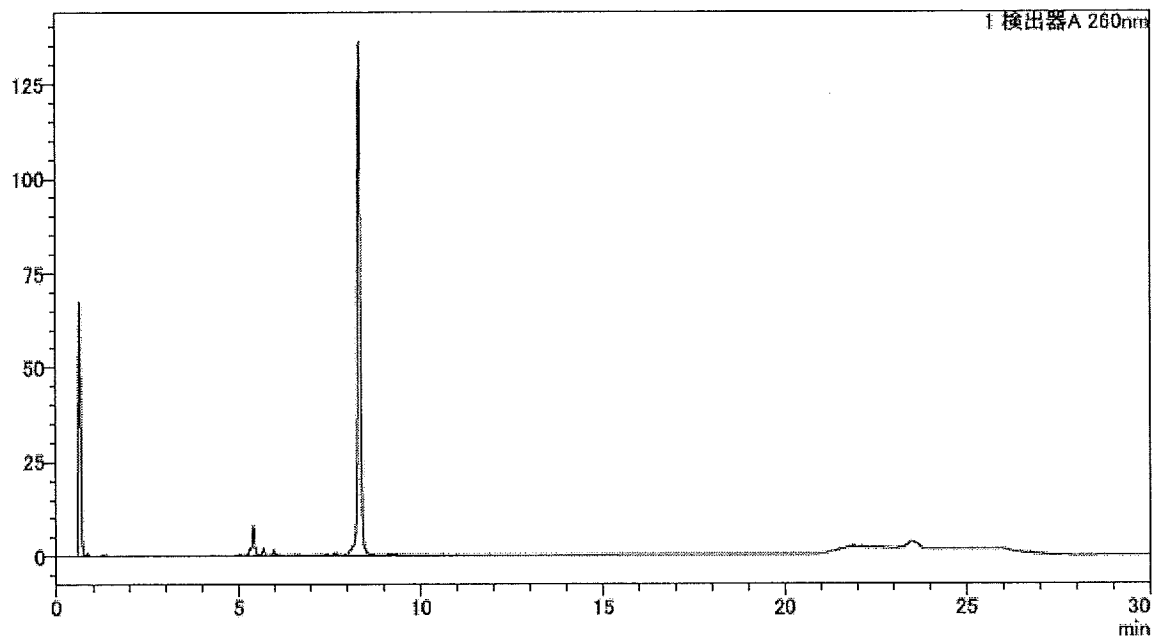


図1 センス鎖+PのHPLCチャート

[図2]

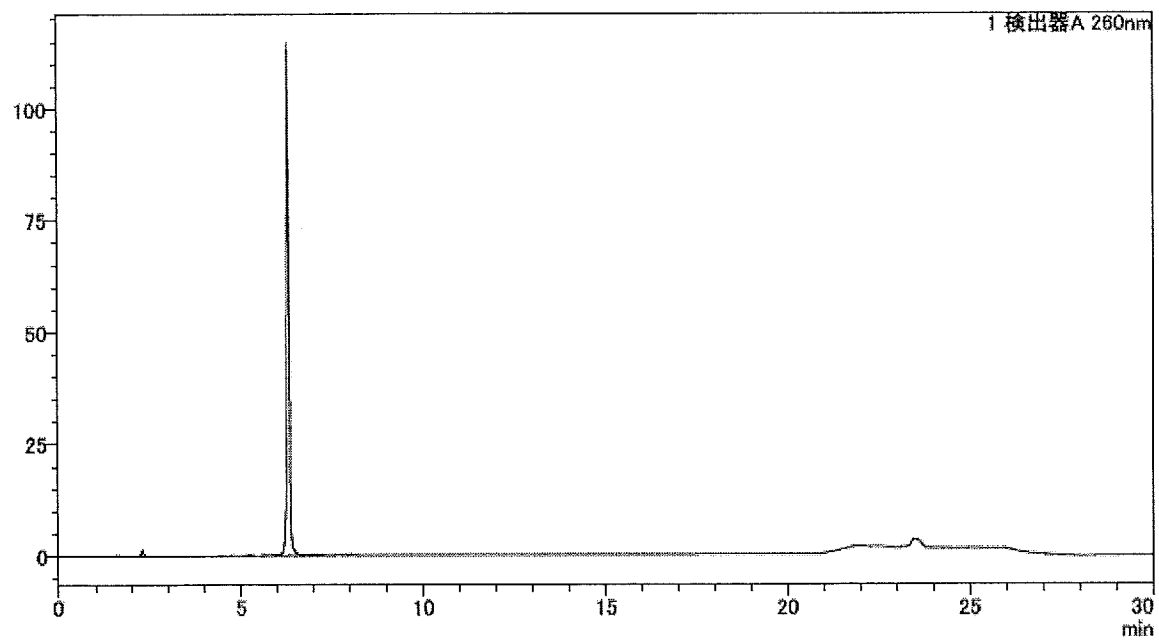


図2 アンチセンス鎖 (SH体) のHPLCチャート

[図3]

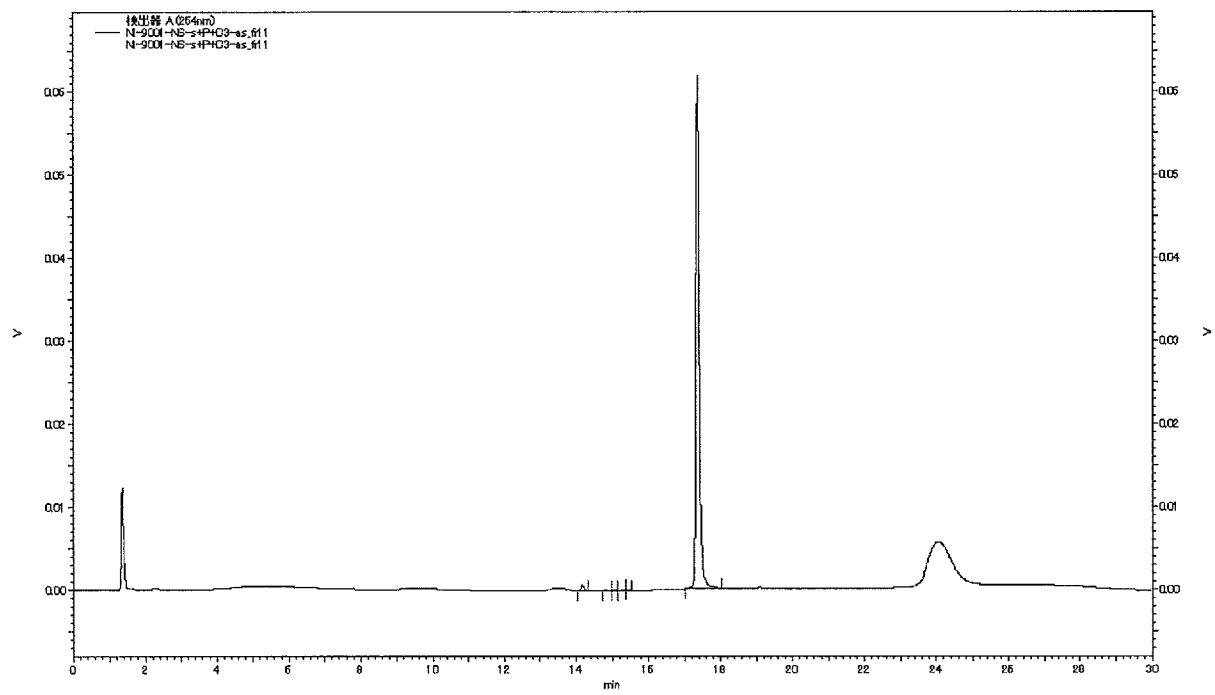


図3 PS-0001-C3のHPLCチャート

[図4]

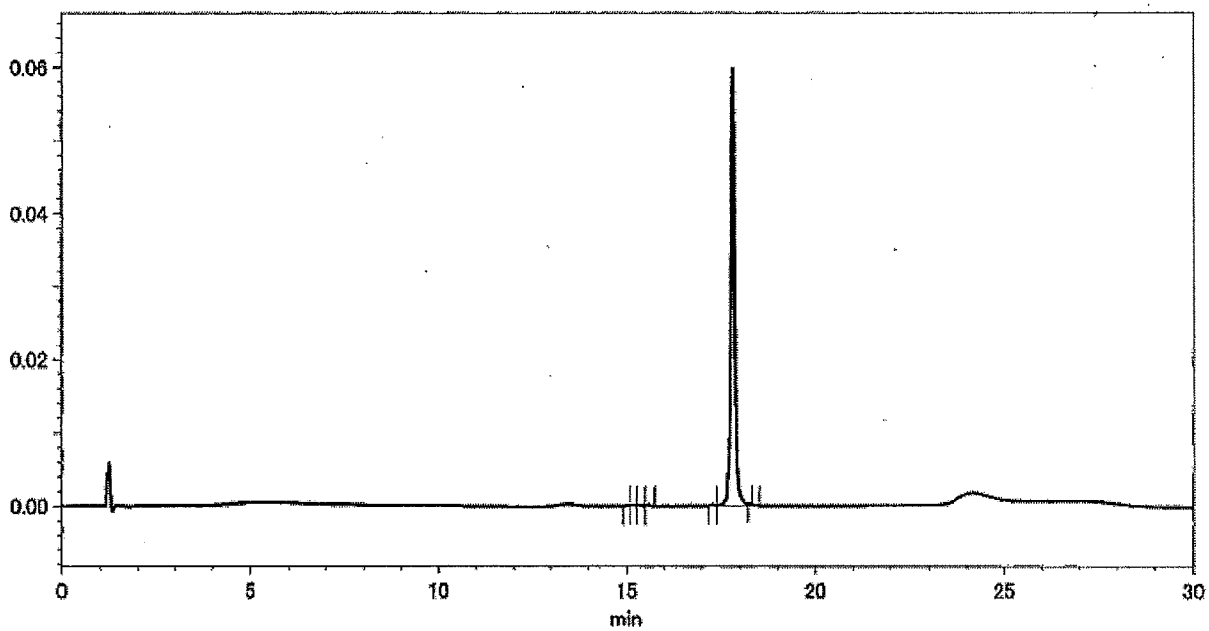


図4 KS-0001のHPLCチャート

[図5]

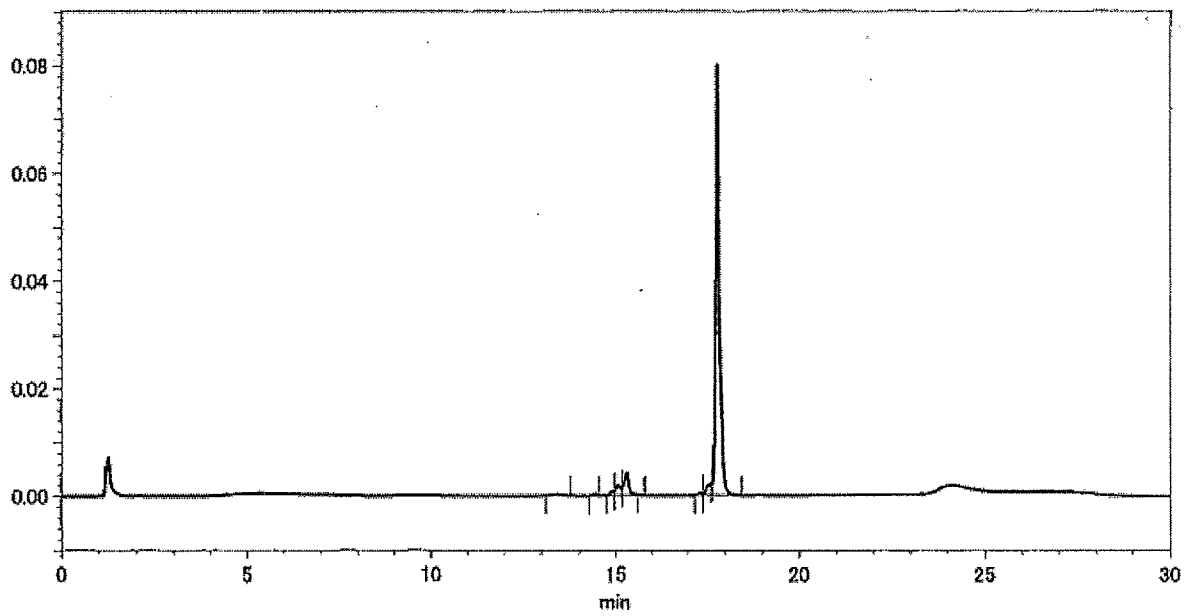
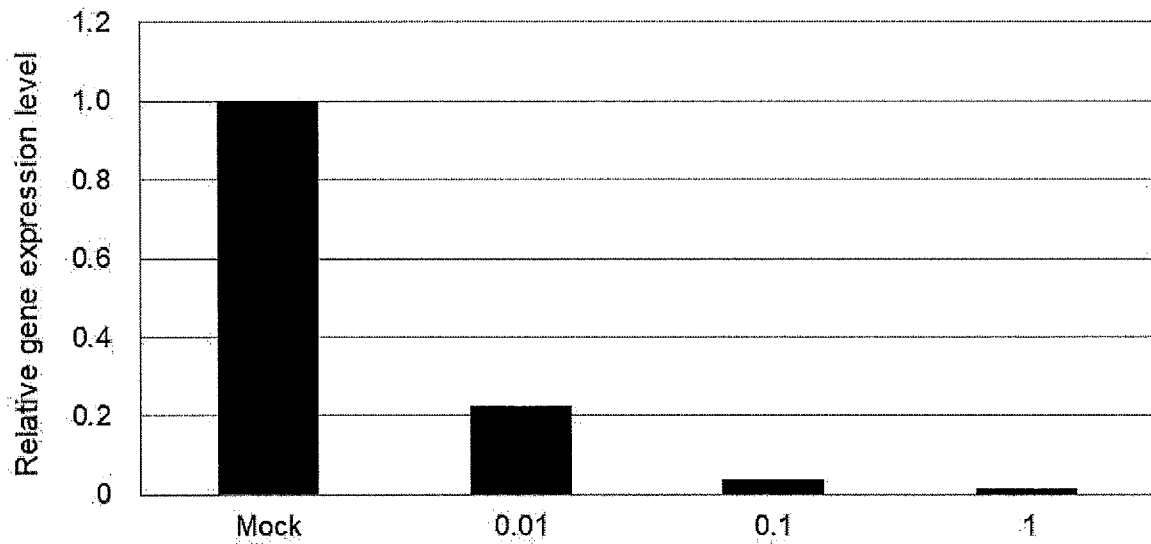


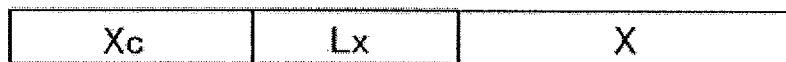
図5 AS-0001のHPLCチャート

[図6]

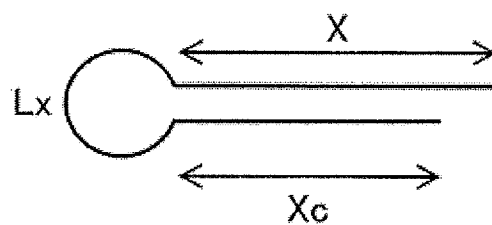


[図7]

(A)

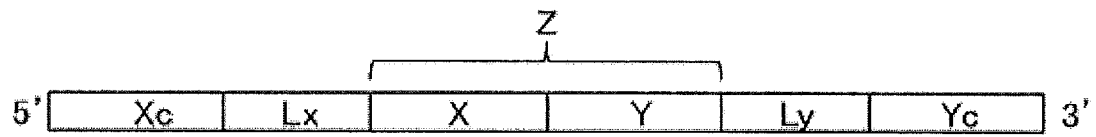


(B)

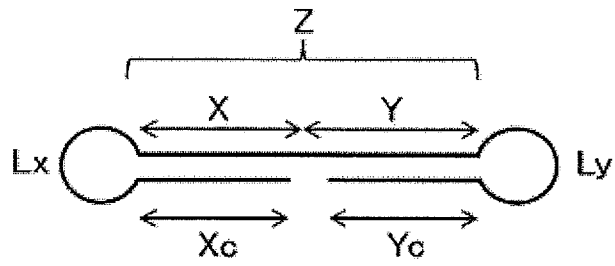


[図8]

(A)

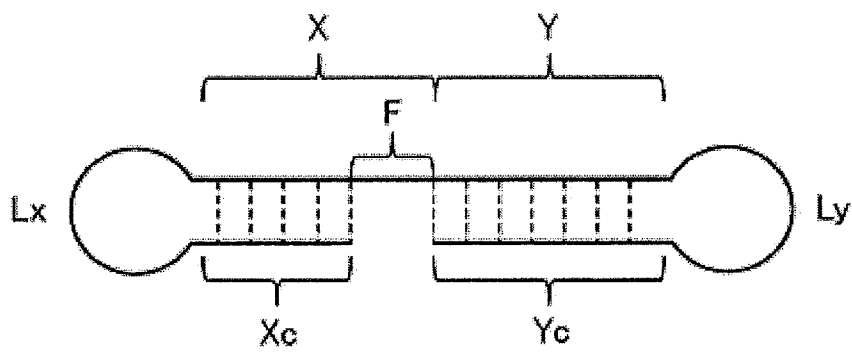


(B)

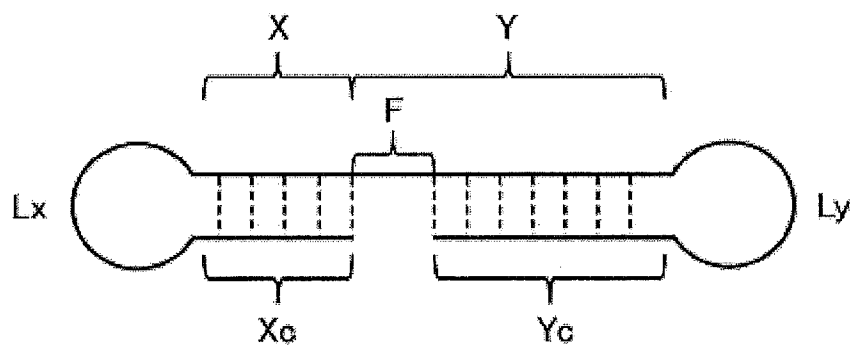


[図9]

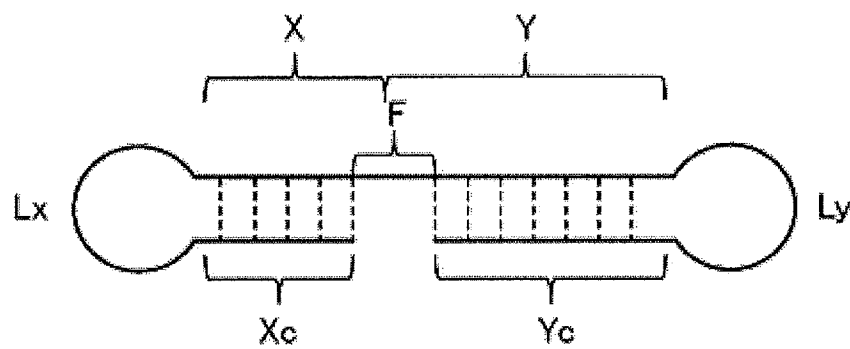
(A)



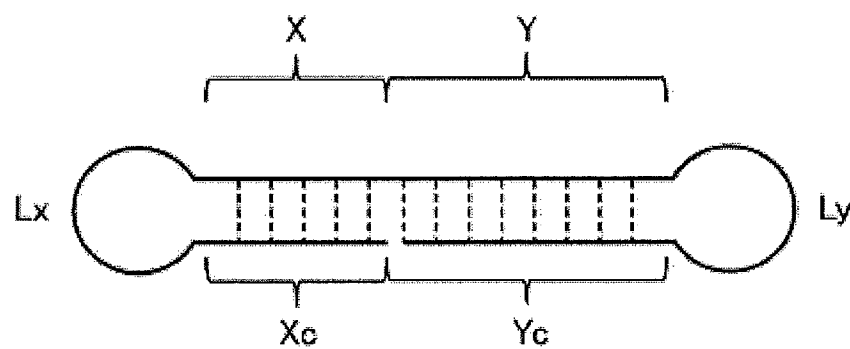
(B)



(C)



(D)



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/038174

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl. C12N15/113 (2010.01) i, A61K31/7088 (2006.01) i, A61K48/00 (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)

Int.Cl. C12N15/00-15/90, C07H21/00-21/04, A61K31/7088, A61K48/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZAITSU, Kiyoshi et al., "New Heterobifunctional Cross-Linking Reagents for Protein Conjugation, N-(Bromoacetamido-n-alkanoyloxy) succinimides", Chem. Pharm. Bull., 1987, vol. 35, pp. 1991-1997, abstract, page 1994, lines 48-49, page 1995, lines 12-13, charts 1, 2	20-22
Y		1-19

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

"I" 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  
20 December 2018 (20.12.2018)

Date of mailing of the international search report  
08 January 2019 (08.01.2019)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/038174

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

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2016/100113 A2 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.) 23 June 2016, paragraph [0063], fig. 7, 8 & US 2017/0362579 A1 & EP 3234604 A2 & CN 107003304 A	20-22 1-19
X	US 2005/0130244 A1 (ZHENG, Yifeng et al.) 16 June 2005, paragraph [0389], fig. 4A & WO 2005/058864 A1 & EP 1701948 A1	20-22
X	WO 2005/103697 A2 (DADE BEHRING INC.) 03 November 2005, paragraph [0089], fig. 12 & US 2005/0221405 A1 & EP 1756570 A2	20-22
X	SUCHY, Mojmir et al., "Analogues of Eu <sup>3+</sup> DOTAM-Gly-Phe-OH and Tm <sup>3+</sup> DOTAM-Gly-Lys-OH: Synthesis and magnetic properties of potential PARACEST MRI contrast agents", Bioorg. Med. Chem., 2008, vol. 16, pp. 6156-6166, page 6161, left column, lines 36-38	20-22
X	WO 2016/061562 A2 (KODIAK SCIENCES INC.) 21 April 2016, example 28 & JP 2017-536105 A & US 2016/0184445 A & EP 3207128 A2 & KR 10-2017-0086036 A & CN 107208076 A	20-21
Y	WO 2016/104775 A1 (BONAC CORPORATION) 30 June 2016, claims & EP 3239297 A1, claims & CN 107109415 A & KR 10-2017-0098914 A	1-19
Y	JP 2002-504096 A (HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE) 05 February 2002, claims, fig. 1 & US 6087328 A, claims, fig. 1A & WO 1998/047530 A2 & EP 977588 A2	1-19
P,X	WO 2018/185131 A2 (NOVO NORDISK A/S) 11 October 2018, example 3.3 (Family: none)	20-21

<p>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, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i</p>												
<p>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. C12N15/00-15/90, C07H21/00-21/04, A61K31/7088, A61K48/00</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2018年											
日本国実用新案登録公報	1996-2018年											
日本国登録実用新案公報	1994-2018年											
<p>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）                  CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td rowspan="2">                     ZAITSU, Kiyoshi et al., New Heterobifunctional Cross-Linking Reagents for Protein Conjugation, <i>N</i>-(Bromoacetamido-<i>n</i>-alkanoyloxy)succinimides, Chem. Pharm. Bull., 1987, Vol. 35, pp. 1991-1997                      要約、第1994頁第48-49行、第1995頁第12-13行、チャート1、2                 </td> <td>20-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table>			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	ZAITSU, Kiyoshi et al., New Heterobifunctional Cross-Linking Reagents for Protein Conjugation, <i>N</i> -(Bromoacetamido- <i>n</i> -alkanoyloxy)succinimides, Chem. Pharm. Bull., 1987, Vol. 35, pp. 1991-1997 要約、第1994頁第48-49行、第1995頁第12-13行、チャート1、2	20-22	Y	1-19		
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	ZAITSU, Kiyoshi et al., New Heterobifunctional Cross-Linking Reagents for Protein Conjugation, <i>N</i> -(Bromoacetamido- <i>n</i> -alkanoyloxy)succinimides, Chem. Pharm. Bull., 1987, Vol. 35, pp. 1991-1997 要約、第1994頁第48-49行、第1995頁第12-13行、チャート1、2	20-22										
Y		1-19										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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）</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	「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	「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	「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	「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）	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「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	「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											
「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	「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											
「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）	「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											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
国際調査を完了した日 20.12.2018	国際調査報告の発送日 08.01.2019											
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） 西 賢二 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 5803										



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
X Y	WO 2016/100113 A2 (SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.) 2016.06.23, 段落 [0063]、図7、8 & US 2017/0362579 A1 & EP 3234604 A2 & CN 107003304 A	20-22 1-19
X	US 2005/0130244 A1 (ZHENG, Yi Feng et al.) 2005.06.16, 段落 [0389]、図4A & WO 2005/058864 A1 & EP 1701948 A1	20-22
X	WO 2005/103697 A2 (DADE BEHRING INC.) 2005.11.03, 段落 [0089]、図12 & US 2005/0221405 A1 & EP 1756570 A2	20-22
X	SUCHY, Mojmir et al., Analogs of Eu <sup>3+</sup> DOTAM-Gly-Phe-OH and Tm <sup>3+</sup> DOTAM-Gly-Lys-OH: Synthesis and magnetic properties of potential PARACEST MRI contrast agents, Bioorg. Med. Chem., 2008, Vol. 16, pp. 6156-6166 第6161頁左欄第36-38行	20-22
X	WO 2016/061562 A2 (KODIAK SCIENCES INC.) 2016.04.21, 実施例28 & JP 2017-536105 A & US 2016/0184445 A & EP 3207128 A2 & KR 10-2017-0086036 A & CN 107208076 A	20-21
Y	WO 2016/104775 A1 (株式会社ボナック) 2016.06.30, 請求の範囲 & EP 3239297 A1、C l a i m s & CN 107109415 A & KR 10-2017-0098914 A	1-19
Y	JP 2002-504096 A (ヘンリー エム. ジャクソン ファウンデーシ ョン フォー ザ アドバンスメント オブ ミリタリー メディ シン) 2002.02.05, 特許請求の範囲、図1 & US 6087328 A、C l a i m s、F i g. 1 A & WO 1998/047530 A2 & EP 977588 A2	1-19
P, X	WO 2018/185131 A2 (NOVO NORDISK A/S) 2018.10.11, 実施例3.3 (ファミリーなし)	20-21