

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2013 年 5 月 30 日(30.05.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/077446 A1

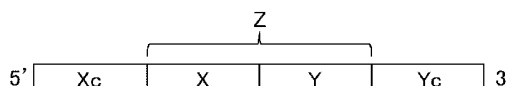
- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/113 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/080461
- (22) 国際出願日: 2012 年 11 月 26 日(26.11.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2011-258367 2011 年 11 月 26 日(26.11.2011) JP
- (71) 出願人: 株式会社ボナック (BONAC CORPORATION) [JP/JP]; 〒8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオファクトリー 4 F Fukuoka (JP).
- (72) 発明者: 大木 忠明(OHGI Tadaaki); 〒8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオファクトリー 4 F 株式会社ボナック内 Fukuoka (JP). 白水 久男(SHIROHIZU Hisao); 〒8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオファクトリー 4 F 株式会社ボナック内 Fukuoka (JP). 濱崎 智洋(HAMASAKI Tomohiro); 〒8390861 福岡県久留米市合川町 1 4 8 8 - 4 福岡バイオファクトリー 4 F 株式会社ボナック内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 京都リサーチパーク 1 号館 3 0 1 号室 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

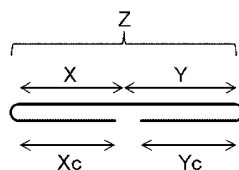
(54) Title: SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID MOLECULE FOR REGULATING EXPRESSION OF GENE

(54) 発明の名称: 遺伝子発現制御のための一本鎖核酸分子

(A)



(B)



(57) Abstract: Provided is a novel nucleic acid molecule capable of suppressing the expression of a gene. A single-stranded nucleic acid molecule containing an expression-suppressing sequence for a target gene and a complementary sequence having a mismatch with the expression-suppressing sequence, wherein a 5'-side region (Xc), an internal region (Z) and a 3'-side region (Yc) are contained in this order from the 5'-side toward the 3'-side, the region (Z) is formed by linking an internal 5'-side region (X) to an internal 3'-side region (Y), the region (Xc) is complementary to the region (X), the region (Yc) is complementary to the region (Y), at least one of the region (Z), the region (Xc) and the region (Yc) contains the expression-suppressing sequence, a region complementary to the region containing the expression-suppressing sequence contains the complementary sequence, and a 5'-terminal nucleotide and a 3'-terminal nucleotide in the single-stranded nucleic acid molecule are not bound to each other. The single-stranded nucleic acid molecule can suppress the expression of the target gene.

(57) 要約: 遺伝子の発現を抑制可能な新たな核酸分子を提供する。 標的遺伝子に対する発現抑制配列および前記発現抑制配列に対してミスマッチを有する相補配列を含む一本鎖核酸分子であって、5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、内部領域(Z)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、領域(Z)が、内部5'側領域(X)および内部3'側領域(Y)が連結して構成され、領域(Xc)が、領域(X)と相補的であり、領域(Yc)が、領域(Y)と相補的であり、領域(Z)、領域(Xc)および領域(Yc)の少なくともいずれかが、前記発現抑制配列を含み、前記発現抑制配列を含む領域と相補的な領域が、前記相補配列を含み、前記一本鎖核酸分子の5'末端塩基と3'末端塩基とが未結合である分子とする。この一本鎖核酸分子によれば、前記標的遺伝子の発現を抑制できる。

WO 2013/077446 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロ  
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, 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))

## 明 細 書

発明の名称： 遺伝子発現制御のための一本鎖核酸分子

### 技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子発現を抑制する一本鎖核酸分子、それを含む組成物およびその用途に関する。

### 背景技術

[0002] 遺伝子の発現を抑制する核酸分子として、例えば、マイクロRNA (miRNA) が知られている。miRNAは、一般に、以下のような生成プロセスを経て、遺伝子がコードするタンパク質の転写を抑制すると報告されています。すなわち、まず、核内において、5' 末端にキャップ構造、3' 末端にポリ (A) を有するmiRNA転写産物 (Pri-miRNA) が生成される。前記Pri-miRNAは、RNase (Drosha) により切断され、miRNA前駆体 (Pre-miRNA) が生成される。前記Pre-miRNAは、ループ領域とステム領域とを有するヘアピン構造をとる。このPre-miRNAは、核外に移動した後、細胞質のRNase (Dicer) により分解され、3' 末端に1～4塩基のオーバーハングを有する、二本鎖のmiRNAが切り出される。この二本鎖のmiRNAのうち、一方の鎖が、RNA induced Silencing Complex (RISC) に類似した複合体に結合する。このmiRNA/RISC複合体が、特定のmRNAの3' 非翻訳領域 (3' UTR) に結合することによって、前記mRNAからのタンパク質の翻訳が抑制される。

[0003] miRNAは、分化、細胞増殖、アポトーシス等の生命現象やウイルス感染症、ガン等の多くの疾患に深く関わっていることが明らかになってきている (特許文献1、非特許文献1、非特許文献2)。このことから、特に医療分野における応用が期待されている。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0004] 特許文献1: WO 2010/056737 A2

### 非特許文献

[0005] 非特許文献1: Deiters, 2009, The AAPS Journal, 12, 51-60

非特許文献2: Takeshita et al., 2010, Mol. Ther., 18, 181-187

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0006] そこで、本発明は、遺伝子の発現を抑制可能な新たな核酸分子の提供を目的とする。

[0007] 前記目的を達成するために、本発明の一本鎖核酸分子は、標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列および前記発現抑制配列に対してミスマッチを有する相補配列を含む一本鎖核酸分子であって、

5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、内部領域(Z)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、

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

前記5'側領域(Xc)が、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、

前記3'側領域(Yc)が、前記内部3'側領域(Y)と相補的であり、

前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)の少なくとも一つが、前記発現抑制配列を含み、

前記発現抑制配列を含む領域と相補的な領域が、前記相補配列を含み、

前記一本鎖核酸分子の5'末端塩基と3'末端塩基とが未結合であることを特徴とする。

[0008] 本発明の組成物は、標的遺伝子の発現を抑制するための組成物であって、前記本発明の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする。

[0009] 本発明の組成物は、薬学的組成物であって、前記本発明の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする。

[0010] 本発明の発現抑制方法は、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。

- [0011] 本発明の疾患の治療方法は、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。
- [0012] 本発明の一本鎖核酸分子によれば、遺伝子の発現抑制、具体的には前記遺伝子がコードするタンパク質の翻訳の抑制が可能である。
- [0013] なお、本発明の一本鎖核酸分子の構造が、遺伝子の発現を抑制可能であることを見出したのは、本発明者が初めてである。本発明の一本鎖核酸分子の遺伝子の発現抑制効果は、RNA干渉と同様の現象によるものと推測されるが、本発明における遺伝子発現抑制は、RNA干渉に制限および限定されない。

### 図面の簡単な説明

- [0014] [図1]図1は、本発明の一本鎖核酸分子の一例を示す模式図である。
- [図2]図2は、本発明の一本鎖核酸分子のその他の例を示す模式図である。
- [図3]図3は、本発明の一本鎖核酸分子のその他の例を示す模式図である。
- [図4]図4は、本発明の実施例におけるHMG A 2 mRNAの量を示すグラフである。
- [図5]図5は、本発明の実施例におけるヒトlet-7a-1 miRNAの成熟miRNAの量を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

- [0015] 本明細書で使用する用語は、特に言及しない限り、当該技術分野で通常用いられる意味で用いることができる。
- [0016] 1. ssNc分子

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する発現抑制配列および前記発現抑制配列に対してミスマッチを有する相補配列を含む一本鎖核酸分子であって、

5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、内部領域(Z)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、

前記内部領域(Z)が、内部5'側領域(X)および内部3'側領域(Y)

が連結して構成され、

前記5'側領域(Xc)が、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、

前記3'側領域(Yc)が、前記内部3'側領域(Y)と相補的であり、

前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)の少なくとも一つが、前記発現抑制配列を含み、

前記発現抑制配列を含む領域と相補的な領域が、前記相補配列を含み、

前記一本鎖核酸分子の5'末端塩基と3'末端塩基とが未結合であることを特徴とする。

[0017] 本発明において、「標的遺伝子の発現抑制」は、例えば、前記標的遺伝子の翻訳の抑制、すなわち、前記標的遺伝子がコードするタンパク質の翻訳の抑制を意味し、より詳細には、前記標的遺伝子のmRNAからの前記タンパク質の翻訳の抑制を意味する。前記標的遺伝子の発現抑制は、例えば、前記標的遺伝子からの転写産物の生成量の減少、前記転写産物の活性の減少、前記標的遺伝子からの翻訳産物の生成量の減少、または前記翻訳産物の活性の減少等によって確認できる。前記タンパク質は、例えば、成熟タンパク質、または、プロセッシングもしくは翻訳後修飾を受ける前の前駆体タンパク質があげられる。

[0018] 本発明の一本鎖核酸分子は、以下、本発明の「ssNc分子」ともいう。本発明のssNc分子は、例えば、in vivoまたはin vitroにおいて、標的遺伝子の発現抑制に使用できることから、「標的遺伝子の発現抑制用ssNc分子」または「標的遺伝子の発現抑制剤」ともいう。また、本発明のssNc分子は、例えば、インターフェロン誘導等の副作用を抑制できる。

[0019] 本発明のssNc分子は、その5'末端と3'末端とが未連結であり、線状一本鎖核酸分子ということもできる。本発明のssNc分子は、例えば、前記内部領域(Z)において、前記内部5'領域(X)と前記内部3'領域(Y)が、直接的に連結されている。本形態の核酸分子は、例えば、両末端の未結合の維持のため、5'末端が非リン酸基であることが好ましい。

[0020] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記 5' 側領域 (Xc) は、前記内部 5' 側領域 (X) と相補的であり、前記 3' 側領域 (Yc) は、前記内部 3' 側領域 (Y) と相補的である。このため、5' 側において、前記領域 (Xc) が前記領域 (X) に向かって折り返し、前記領域 (Xc) と前記領域 (X) とが、自己アニーリングによって、二重鎖を形成可能であり、また、3' 側において、前記領域 (Yc) が前記領域 (Y) に向かって折り返し、前記領域 (Yc) と前記領域 (Y) とが、自己アニーリングによって、二重鎖を形成可能である。前記 5' 側領域 (Xc) の 5' 末端および前記 3' 側領域 (Yc) の 3' 末端を、それぞれ、未結合末端ともいう。

[0021] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記発現抑制配列は、例えば、発現抑制活性を有していればよく、成熟  $m i R N A$  配列が好ましい。生体内における  $m i R N A$  の生成プロセスおよび  $m i R N A$  によるタンパク質の発現抑制プロセスは、以下の通りである。まず、5' 末端にキャップ構造、3' 末端にポリ A 構造を有する、一本鎖の  $m i R N A$  転写産物 (P r i -  $m i R N A$ ) が、核内で発現する。前記 P r i -  $m i R N A$  は、ヘアピン構造を有している。前記 P r i -  $m i R N A$  は、RNase (D r o s h a) によって切断され、一本鎖の前駆体 (P r e -  $m i R N A$ ) が生成される。前記 P r e -  $m i R N A$  は、ステム領域とループ領域とを有するヘアピン構造をとる。前記 P r e -  $m i R N A$  は、細胞質に輸送された後、RNase (D i c e r) によって切断され、そのステム構造から、3' 末端に数塩基 (例えば、1 ~ 4 塩基) のオーバーハングを有する二本鎖の  $m i R N A$  が生成される。そして、二本鎖の  $m i R N A$  のうちの一本鎖の成熟  $m i R N A$  が、RISC (RNA induced Silencing Complex) に類似した複合体に結合し、成熟  $m i R N A$  / RISC 複合体が、特定の  $m R N A$  に結合することで、前記  $m R N A$  からのタンパク質の翻訳が抑制される。本発明においては、前記成熟  $m i R N A$  の配列を、前記発現抑制配列として使用すればよい。前記発現抑制配列は、例えば、具体的にはタンパク質の翻訳を抑制することから、翻訳抑制配列ということもできる。

[0022] なお、本発明は、前記標的遺伝子に対する前記発現抑制配列の配列情報がポイントではなく、前記発現抑制配列による前記標的遺伝子の発現抑制活性を、例えば、細胞内で機能させるための核酸分子の構造に関する。したがって、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 *miRNA* の一本鎖成熟 *miRNA* 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。本発明の *ssNc* 分子は、例えば、前述のように、*miRNA* を搭載することから、*miRNA* 補充用核酸ということもできる。

[0023] 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、相補性を有することが好ましい。前記発現抑制配列は、例えば、その 5' 側領域が、前記標的遺伝子に完全に相補な配列を有することが好ましく、より好ましくは、5' 末端の 2 塩基目から 8 塩基までの配列（Seed 配列ともいう）が、前記標的遺伝子に完全に相補な配列を有する。前記発現抑制配列の相補性は、特に制限されず、例えば、90%以上が好ましく、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。

[0024] 具体例として、HMGA2（high mobility group A T-hook 2）タンパク質の翻訳を抑制する Human let-7a-1 *miRNA* の成熟 *miRNA* があげられる。HMGA2 タンパク質は、非ヒストン性染色体高移動度群（HMG）タンパク質のファミリーに属する。以下に、Human let-7a-1 mature *miRNA* 配列を示す。

UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU（配列番号1）

[0025] 前記発現抑制配列の長さは、特に制限されず、下限が、例えば、18塩基長、好ましくは19塩基長、より好ましくは20塩基長であり、上限が、例えば、25塩基長、好ましくは24塩基長、より好ましくは23塩基長である。



[0026] 前記相補配列は、前記発現抑制配列とアライメントした際にミスマッチを有する配列である。これは、前記発現抑制配列が、前記相補配列とアライメントした際にミスマッチを有する配列であることを意味する。前記ミスマッチの個数は、特に制限されない。

[0027] 本発明の  $s s N c$  分子は、前述のように、前記内部領域 (Z)、前記 5' 側領域 (Xc) および前記 3' 側領域 (Yc) の少なくとも一つに前記発現抑制配列を配置した構造をとることで、Pre-miRNAと同様に、発現抑制が生じると推測される。すなわち、本発明の  $s s N c$  分子から、前記成熟 miRNAが生成され、前記成熟 miRNAにより、標的遺伝子からのタンパク質の翻訳が抑制されると推測される。なお、本発明は、このメカニズムにより限定されない。

[0028] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記発現抑制配列は、前述のように、前記内部領域 (Z)、前記 5' 側領域 (Xc) および前記 3' 側領域 (Yc) の少なくとも一つに含まれる。本発明の  $s s N c$  分子は、前記発現抑制配列を、例えば、1つ有してもよいし、2つ以上有してもよい。

[0029] 後者の場合、本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、同じ標的遺伝子に対する同じ発現抑制配列を2つ以上有してもよいし、同じ標的遺伝子に対する異なる発現抑制配列を2つ以上有してもよいし、異なる標的遺伝子に対する異なる発現抑制配列を2つ以上有してもよい。本発明の  $s s N c$  分子が、2つ以上の前記発現抑制配列を有する場合、各発現抑制配列の配置箇所は、特に制限されず、前記内部領域 (Z)、前記 5' 側領域 (Xc) および前記 3' 側領域 (Yc) のいずれか一領域でもよいし、異なる領域でもよい。本発明の  $s s N c$  分子が、異なる標的遺伝子に対する前記発現抑制配列を2つ以上有する場合、例えば、本発明の  $s s N c$  分子によって、2種類以上の異なる標的遺伝子の発現を抑制可能である。

[0030] 前述のように、生体内において、前記成熟 miRNA配列は、前記Pre-miRNAが切断されることで、そのステム構造の一方の鎖（ガイド鎖ともいう）から生成される。この際、前記ステム構造の構造の他方の鎖からは

、minor miRNA\*配列（パッセンジャー鎖ともいう）が生成される。前記minor miRNA\*配列は、通常、前記Pre-miRNAとアライメントした際に、1～数塩基のミスマッチを有する相補鎖である。本発明のssNc分子は、例えば、さらに、前記minor miRNA\*配列を有してもよい。

[0031] 前記成熟miRNA配列と前記minor miRNA\*配列は、両者をアライメントした際、非相補的となる塩基を有してもよい。前記minor miRNA\*は、例えば、前記成熟miRNA配列に対する相補性が、例えば、60～100%である。前記成熟miRNA配列と前記minor miRNA\*は、それぞれ、内部に、前記非相補となる塩基を、例えば、1塩基または数塩基有してもよく、前記数塩基は、例えば、2～15塩基である。前記非相補的な塩基は、例えば、連続してもよいし、非連続でもよい。

[0032] 本発明のssNc分子において、前記minor miRNA\*配列の位置は、特に制限されず、例えば、前記成熟miRNA配列とアニーリングして二本鎖を形成可能な位置であることが好ましい。本発明のssNc分子において、

前記5'側領域(Xc)が前記成熟miRNA配列を有する場合、前記内部5'側領域(X)が前記minor miRNA\*配列を有することが好ましく、

前記3'側領域(Yc)が前記成熟miRNA配列を有する場合、前記内部3'側領域(Y)が前記minor miRNA\*配列を有することが好ましく、

前記内部5'側領域(X)が前記成熟miRNA配列を有する場合、前記5'側領域(Xc)が前記minor miRNA\*配列を有することが好ましく、

前記内部3'側領域(Y)が前記成熟miRNA配列を有する場合、前記3'側領域(Yc)が前記minor miRNA\*配列を有することが好ましい。

[0033] 前記 *minor miRNA*\* 配列の長さは、特に制限されず、前記成熟 *miRNA* 配列の長さとの差が、例えば、0～10塩基長、好ましくは0～7塩基長、より好ましくは0～5塩基長である。前記 *minor miRNA*\* 配列と前記成熟 *miRNA* 配列は、例えば、同じ長さでもよいし、前者が長くてもよいし、後者が長くてもよい。

[0034] 具体例として、HMG A2 (*high mobility group A T-hook 2*) タンパク質の翻訳を抑制する Human *let-7a-1 miRNA* に対する *minor miRNA*\* 配列があげられる。以下に、その配列の例を示す。

CUAUACA AUCUACUGUCUUUC (配列番号2)

[0035] 前記内部領域 (Z) は、前述のように、前記内部5'領域 (X) と前記内部3'領域 (Y) が連結して構成される。前記領域 (X) と前記領域 (Y) は、例えば、直接的に連結され、その間に介在配列を有していない。前記内部領域 (Z) は、前記5'側領域 (Xc) および前記3'側領域 (Xc) との配列関係を示すために、「前記内部5'側領域 (X) と前記内部3'側領域 (Y) が連結して構成される」と表わすものであって、前記内部領域 (Z) において、前記5'側領域 (Xc) と前記3'側領域 (Yc) とが、例えば、前記 *ssNc* 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。

[0036] 本発明の *ssNc* 分子において、前記5'側領域 (Xc) は、前記内部5'側領域 (X) に相補的である。ここで、前記領域 (Xc) は、前記領域 (X) の全領域またはその部分領域に対して相補的な配列を有していればよく、具体的には、例えば、前記領域 (X) の全領域またはその部分領域に相補的な配列を含む、または、前記相補的な配列からなることが好ましい。前記領域 (Xc) は、前記領域 (X) の相補的な前記全領域または相補的な前記部分領域に対して、例えば、完全に相補的でもよいし、1もしくは数塩基が

非相補的でもよい。本発明の  $s s N c$  分子において、前記 3' 側領域 ( $Y c$ ) は、前記内部 3' 側領域 ( $Y$ ) に相補的である。ここで、前記領域 ( $Y c$ ) は、前記領域 ( $Y$ ) の全領域またはその部分領域に相補的な配列を有していればよく、具体的には、例えば、前記領域 ( $Y$ ) の全領域またはその部分領域に対して相補的な配列を含む、または、前記相補的な配列からなることが好ましい。前記領域 ( $Y c$ ) 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もよい。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。

[0037] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記 5' 側領域 ( $X c$ ) と前記内部 5' 側領域 ( $X$ ) 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があげられる。後者の場合、例えば、前記領域 ( $X c$ ) と前記領域 ( $X$ ) との間に、リンカー領域 ( $L x$ ) を有し、前記リンカー領域 ( $L x$ ) を介して、前記領域 ( $X c$ ) と前記領域 ( $X$ ) とが連結している形態があげられる。

[0038] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記 3' 側領域 ( $Y c$ ) と前記内部 3' 側領域 ( $Y$ ) 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があげられる。後者の場合、例えば、前記領域 ( $Y c$ ) と前記領域 ( $Y$ ) との間に、リンカー領域 ( $L y$ ) を有し、前記リンカー領域 ( $L y$ ) を介して、前記領域 ( $Y c$ ) と前記領域 ( $Y$ ) とが連結している形態があげられる。

[0039] 本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、前記リンカー領域 ( $L x$ ) および前記リンカー領域 ( $L y$ ) の両方を有してもよいし、いずれか一方を有してもよい。後者の場合、例えば、前記 5' 側領域 ( $X c$ ) と前記内部 5' 側領域 ( $X$ ) との間に前記リンカー領域 ( $L x$ ) を有し、前記 3' 側領域 ( $Y c$ ) と前記内部 3' 側領域 ( $Y$ ) との間に前記リンカー領域 ( $L y$ ) を有さない、

つまり、前記領域（Y c）と前記領域（Y）とが直接連結された形態があげられる。また、後者の場合、例えば、前記3'側領域（Y c）と前記内部3'側領域（Y）との間に前記リンカー領域（L y）を有し、前記5'側領域（X c）と前記内部5'側領域（X）との間に前記リンカー領域（L x）を有さない、つまり、前記領域（X c）と前記領域（X）とが直接連結された形態があげられる。

[0040] 前記リンカー領域（L x）および前記リンカー領域（L y）は、それぞれ、それ自体の領域内部において、自己アニーリングを生じない構造であることが好ましい。

[0041] 前記成熟miRNA配列の3'末端に、前記リンカー領域（L x）および前記リンカー領域（L y）のいずれかが隣接する場合、そのリンカー領域は、例えば、前記Pre-miRNAのループ領域の配列と同じでもよいし、前記ループ領域の配列の小型化配列であってもよい。前記Pre-miRNAよりも小型化が可能であることから、前記リンカー領域は、例えば、前記配列の小型化配列また、後述するような非ヌクレオチド残基が好ましい。

[0042] 本発明のssNc分子について、前記リンカー領域を有さないssNc分子の一例を、図1の模式図に示す。図1（A）は、前記ssNc分子について、5'側から3'側に向かって、各領域の順序の概略を示す模式図であり、図1（B）は、前記ssNc分子が、前記分子内において二重鎖を形成している状態を示す模式図である。図1（B）に示すように、前記ssNc分子は、前記5'側領域（X c）が折り返し、前記5'側領域（X c）と前記内部5'側領域（X）との間で二重鎖が形成され、前記3'側領域（Y c）が折り返し、前記3'側領域（Y c）と前記内部3'側領域（Y）との間で二重鎖が形成される。図1は、あくまでも、各領域の連結順番および二重鎖を形成する各領域の位置関係を示すものであり、例えば、各領域の長さ等は、これに制限されない。

[0043] 本発明のssNc分子について、前記リンカー領域を有するssNc分子の一例を、図2の模式図に示す。図2（A）は、一例として、前記ssNc

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2(B)は、前記ssNc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2(B)に示すように、前記ssNc分子は、前記5'側領域(Xc)と前記内部5'側領域(X)との間、前記内部3'側領域(Y)と前記3'側領域(Yc)との間で、二重鎖が形成され、前記Lx領域および前記Ly領域が、ループ構造をとる。図2は、あくまでも、各領域の連結順番および二重鎖を形成する各領域の位置関係を示すものであり、例えば、各領域の長さ等は、これに制限されない。

[0044] 本発明のssNc分子において、前記5'側領域(Xc)、前記内部5'側領域(X)、前記内部3'側領域(Y)および前記3'側領域(Yc)の塩基数は、特に制限されず、例えば、以下の通りである。本発明において、「塩基数」は、例えば、「長さ」を意味し、「塩基長」ということもできる。

[0045] 前記5'側領域(Xc)は、前述のように、例えば、前記内部5'側領域(X)の全領域に相補的でもよい。この場合、前記領域(Xc)は、例えば、前記領域(X)と同じ塩基長であり、前記領域(X)の5'末端から3'末端の全領域に相補的な塩基配列からなることが好ましい。前記領域(Xc)は、より好ましくは、前記領域(X)と同じ塩基長であり、且つ、前記領域(Xc)の全ての塩基が、前記領域(X)の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に相補的であることが好ましい。なお、これには制限されず、例えば、前述のように、1もしくは数塩基が非相補的でもよい。

[0046] また、前記5'側領域(Xc)は、前述のように、例えば、前記内部5'側領域(X)の部分領域に相補的でもよい。この場合、前記領域(Xc)は、例えば、前記領域(X)の部分領域と同じ塩基長であり、すなわち、前記領域(X)よりも、1塩基以上短い塩基長の塩基配列からなることが好ましい。前記領域(Xc)は、より好ましくは、前記領域(X)の前記部分領域と同じ塩基長であり、且つ、前記領域(Xc)の全ての塩基が、前記領域(X)の前記部分領域の全ての塩基と相補的である、つまり、例えば、完全に

相補的であることが好ましい。前記領域（X）の前記部分領域は、例えば、前記領域（X）における、5'末端の塩基（1番目の塩基）から連続する塩基配列からなる領域（セグメント）であることが好ましい。

[0047] 前記3'側領域（Y<sub>c</sub>）は、前述のように、例えば、前記内部3'側領域（Y）の全領域に相補的でもよい。この場合、前記領域（Y<sub>c</sub>）は、例えば、前記領域（Y）と同じ塩基長であり、前記領域（Y）の5'末端から3'末端の全領域に相補的な塩基配列からなることが好ましい。前記領域（Y<sub>c</sub>）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、完全に相補であることが好ましい。なお、これには制限されず、例えば、前述のように、1もしくは数塩基が非相補的でもよい。

[0048] また、前記3'側領域（Y<sub>c</sub>）は、前述のように、例えば、前記内部3'側領域（Y）の部分領域に相補的でもよい。この場合、前記領域（Y<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、完全に相補であることが好ましい。前記領域（Y）の前記部分領域は、例えば、前記領域（Y）における、3'末端の塩基（1番目の塩基）から連続する塩基配列からなる領域（セグメント）であることが好ましい。

[0049] 本発明の s s N c 分子において、前記内部領域（Z）の塩基数（Z）と、前記内部5'側領域（X）の塩基数（X）および前記内部3'側領域（Y）の塩基数（Y）との関係、前記内部領域（Z）の塩基数（Z）と、前記3'側領域（Y<sub>c</sub>）の塩基数（Y<sub>c</sub>）および前記5'側領域（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。

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

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

[0050] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) と前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) の長さの関係は、特に制限されず、例えば、下記式のいずれの条件を満たしてもよい。

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

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

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

[0051] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X)、前記 5' 側領域 ( $X_c$ ) の塩基数 ( $X_c$ )、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) および前記 3' 側領域 ( $Y_c$ ) の塩基数 ( $Y_c$ ) の関係は、例えば、下記 (a) ~ (d) のいずれかの条件を満たす。

(a) 下記式 (3) および (4) の条件を満たす。

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

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

(b) 下記式 (5) および (6) の条件を満たす。

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

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

(c) 下記式 (7) および (8) の条件を満たす。

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

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

(d) 下記式 (9) および (10) の条件を満たす。

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

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

[0052] 前記 (a) ~ (d) において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) と前記 5' 側領域 ( $X_c$ ) の塩基数 ( $X_c$ ) の差、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) と前記 3' 側領域 ( $Y_c$ ) の塩基数 ( $Y_c$ ) の差は、例えば、下記条件を満たすことが好ましい。

(a) 下記式 (11) および (12) の条件を満たす。

$$X - X_c = 1 \sim 10, \text{ 好ましくは } 1, 2, 3 \text{ または } 4,$$



より好ましくは1、2または3 . . . (11)

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

(b) 下記式(13)および(14)の条件を満たす。

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

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

より好ましくは1、2または3 . . . (14)

(c) 下記式(15)および(16)の条件を満たす。

$X - X_c = 1 \sim 10$ 、好ましくは、1、2または3、

より好ましくは1または2 . . . (15)

$Y - Y_c = 1 \sim 10$ 、好ましくは、1、2または3、

より好ましくは1または2 . . . (16)

(d) 下記式(17)および(18)の条件を満たす。

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

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

[0053] 前記(a)～(d)のssNc分子について、それぞれの構造の一例を、図3の模式図に示す。図3は、前記リンカー領域(Lx)および前記リンカー領域(Ly)を含むssNcであり、(A)は、前記(a)のssNc分子、(B)は、前記(b)のssNc分子、(C)は、前記(c)のssNc分子、(D)は、前記(d)のssNc分子の例である。図3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3のssNc分子は、前記内部5'側領域(X)の塩基数(X)と前記内部3'側領域(Y)の塩基数(Y)を、前記式(20)の「 $X < Y$ 」として表わすが、これには制限されず、前述のように、前記式(19)の「 $X = Y$ 」でも、前記式(21)の「 $X > Y$ 」でもよい。また、図3は、あくまでも、前記内部5'側領域(X)と前記5'側領域(Xc)との関係、前記内部3'側領域(Y)と前記3'側領域(Yc)との関係を示す模式図であり、例えば、各領域の長さ、形状等は、これには制限されず、また、リンカー領域(Lx)およびリンカー領域(Ly)の有無も、これには制限されない。

[0054] 前記 (a) ~ (c) の s s N c 分子は、例えば、前記 5' 側領域 (X c) と前記内部 5' 側領域 (X)、および、前記 3' 側領域 (Y c) と前記内部 3' 側領域 (Y) が、それぞれ二重鎖を形成することによって、前記内部領域 (Z) において、前記 5' 側領域 (X c) および前記 3' 側領域 (Y c) のいずれともアライメントできない塩基を有する構造であり、二重鎖を形成しない塩基を有する構造ともいえる。前記内部領域 (Z) において、前記アライメントできない塩基 (二重鎖を形成しない塩基ともいう) を、以下、「フリー塩基」という。図 3 において、前記フリー塩基の領域を、「F」で示す。前記領域 (F) の塩基数は、特に制限されない。前記領域 (F) の塩基数 (F) は、例えば、前記 (a) の s s N c 分子の場合、「X-X c」の塩基数であり、前記 (b) の s s N c 分子の場合、「Y-Y c」の塩基数であり、前記 (c) の s s N c 分子の場合、「X-X c」の塩基数と「Y-Y c」の塩基数との合計数である。

[0055] 他方、前記 (d) の s s N c 分子は、例えば、前記内部領域 (Z) の全領域が、前記 5' 側領域 (X c) および前記 3' 側領域 (Y c) とアライメントする構造であり、前記内部領域 (Z) の全領域が二重鎖を形成する構造ともいえる。なお、前記 (d) の s s N c 分子において、前記 5' 側領域 (X c) の 5' 末端と前記 3' 側領域 (Y c) の 3' 末端は、未連結である。

[0056] 本発明の s s N c 分子について、各領域の長さを以下に例示するが、本発明は、これには制限されない。本発明において、例えば、塩基数の数値範囲は、その範囲に属する正の整数を全て開示するものであり、例えば、「1 ~ 4 塩基」との記載は、「1、2、3、4 塩基」の全ての開示を意味する（以下、同様）。

[0057] 前記 5' 側領域 (X c)、前記 3' 側領域 (Y c)、および前記内部領域 (Z) における前記フリー塩基 (F) の塩基数の合計は、例えば、前記内部領域 (Z) の塩基数となる。このため、前記 5' 側領域 (X c) および前記 3' 側領域 (Y c) の長さは、例えば、前記内部領域 (Z) の長さ、前記フリー塩基の数 (F) およびその位置に応じて、適宜決定できる。

- [0058] 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。
- [0059] 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。
- [0060] 前記5'側領域（Xc）の塩基数は、例えば、1～29塩基であり、好ましくは1～11塩基であり、より好ましくは1～7塩基であり、さらに好ましくは1～4塩基であり、特に好ましくは1塩基、2塩基、3塩基である。前記内部領域（Z）または前記3'側領域（Yc）が前記発現抑制配列を含む場合、例えば、このような塩基数が好ましい。具体例として、前記内部領域（Z）の塩基数が、19～30塩基（例えば、19塩基）の場合、前記5'側領域（Xc）の塩基数は、例えば、1～11塩基であり、好ましくは1～7塩基であり、より好ましくは1～4塩基であり、さらに好ましくは1塩基、2塩基、3塩基である。
- [0061] 前記5'側領域（Xc）が前記発現抑制配列を含む場合、前記5'側領域（Xc）は、例えば、前記発現抑制配列のみから構成される領域でもよいし、前記発現抑制配列を含む領域でもよい。前記発現抑制配列の長さは、例え

ば、前述の通りである。前記 5' 側領域 (X 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。

[0062] 前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数は、例えば、1～29 塩基であり、好ましくは 1～11 塩基であり、より好ましくは 1～7 塩基であり、さらに好ましくは 1～4 塩基であり、特に好ましくは 1 塩基、2 塩基、3 塩基である。前記内部領域 (Z) または前記 5' 側領域 (X c) が前記発現抑制配列を含む場合、例えば、このような塩基数が好ましい。具体例として、前記内部領域 (Z) の塩基数が、19～30 塩基（例えば、19 塩基）の場合、前記 3' 側領域 (Y c) 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。

[0063] 前記 3' 側領域 (Y c) が前記発現抑制配列を含む場合、前記 3' 側領域 (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 3' 側領域 (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。

[0064] 前述のように、前記内部領域 (Z)、前記 5' 側領域 (X c) および前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数は、例えば、前記式 (2) の「 $Z \geq Xc + Yc$ 」で表わすことができる。具体例として、「 $Xc + Yc$ 」の塩基数は、例えば、前記内部領域 (Z) と同じ、または、前記内部領域 (Z) より小さい。後者の場合、「 $Z - (Xc + Yc)$ 」は、例えば、1～10、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「 $Z - (Xc + Yc)$ 」は、例えば、前記内部領域 (Z) における前記フリー塩基の領域 (F) の塩基数 (F) に相当する。

[0065] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) の長さは、特に制限されない。前記リンカー領域 ( $L_x$ ) は、例えば、前記内部 5' 側領域 ( $X$ ) と前記 5' 側領域 ( $X_c$ ) とが二重鎖を形成可能な長さであることが好ましく、前記リンカー領域 ( $L_y$ ) は、例えば、前記内部 3' 側領域 ( $Y$ ) と前記 3' 側領域 ( $Y_c$ ) とが二重鎖を形成可能な長さであることが好ましい。前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) の構成単位が塩基を含む場合、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) のそれぞれの塩基数は、同じであっても異なってもよく、また、その塩基配列も、同じであっても異なってもよい。前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) の塩基数は、その下限が、例えば、1 塩基であり、好ましくは 2 塩基であり、より好ましくは 3 塩基であり、その上限が、例えば、100 塩基であり、好ましくは 80 塩基であり、より好ましくは 50 塩基である。前記各リンカー領域の塩基数は、具体例として、例えば、1～50 塩基、1～30 塩基、1～20 塩基、1～10 塩基、1～7 塩基、1～4 塩基等が例示できるが、これには制限されない。

[0066] 本発明の  $s s N c$  分子において、例えば、図 1～図 3 に示すように、前記内部領域 ( $Z$ ) に、前記 5' 側領域 ( $X_c$ ) と前記 3' 側領域 ( $Y_c$ ) とをアライメントした際、前記内部領域 ( $Z$ ) に対する前記 5' 側領域 ( $X_c$ ) の未結合末端の位置は、例えば、以下の条件があげられる。前記 5' 側領域 ( $X_c$ ) の未結合末端が、前記内部領域 ( $Z$ ) の中心よりも 5' 側に対応する場合、前記未結合末端の位置は、例えば、前記内部領域 ( $Z$ ) において、その 5' 末端から  $1/50 \sim 1/2$  の部位であることが好ましく、より好ましくは  $1/50 \sim 1/3$  または  $1/50 \sim 1/4$  であり、さらに好ましくは  $1/30 \sim 1/2$ 、 $1/30 \sim 1/3$  または  $1/30 \sim 1/4$  である。また、前記 3' 側領域 ( $Y_c$ ) の未結合末端が、前記内部領域 ( $Z$ ) の中心よりも 3' 側に対応する場合、前記未結合末端の位置は、例えば、前記内部領域 ( $Z$ ) において、その 3' 末端から  $1/50 \sim 1/2$  の部位であることが好

ましく、より好ましくは  $1/50 \sim 1/3$  または  $1/50 \sim 1/4$  であり、さらに好ましくは  $1/30 \sim 1/2$ 、 $1/30 \sim 1/3$  または  $1/30 \sim 1/4$  である。

[0067] 本発明の  $s s N c$  分子の全長は、特に制限されない。本発明の  $s s N c$  分子において、前記塩基数の合計（全長の塩基数）は、下限が、例えば、38 塩基であり、好ましくは 42 塩基であり、より好ましくは 50 塩基であり、さらに好ましくは 51 塩基であり、特に好ましくは 52 塩基であり、その上限は、例えば、300 塩基であり、好ましくは 200 塩基であり、より好ましくは 150 塩基であり、さらに好ましくは 100 塩基であり、特に好ましくは 80 塩基である。本発明の  $s s N c$  分子において、前記リンカー領域（ $L x$ ）およびリンカー領域（ $L y$ ）を除く塩基数の合計は、下限が、例えば、38 塩基であり、好ましくは 42 塩基であり、より好ましくは 50 塩基であり、さらに好ましくは 51 塩基であり、特に好ましくは 52 塩基であり、上限が、例えば、300 塩基であり、好ましくは 200 塩基であり、より好ましくは 150 塩基であり、さらに好ましくは 100 塩基であり、特に好ましくは 80 塩基である。

[0068] 本発明の  $s s N c$  分子の構成単位は、特に制限されず、例えば、ヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基およびデオキシリボヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、修飾されていない非修飾ヌクレオチド残基および修飾された修飾ヌクレオチド残基があげられる。本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、前記修飾ヌクレオチド残基を含むことによって、ヌクレアーゼ耐性を向上し、安定性を向上可能である。また、本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基の他に、さらに、非ヌクレオチド残基を含んでもよい。前記ヌクレオチド残基および前記非ヌクレオチド残基の詳細は、後述する。

[0069] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記内部領域（ $Z$ ）、前記 5' 側領域（ $X c$ ）および前記 3' 側領域（ $Y c$ ）の構成単位は、それぞれ、前記ヌクレオチド残基が好ましい。前記各領域は、例えば、下記（1）～（3）の残基

で構成される。

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

[0070] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) の構成単位は、特に制限されず、例えば、前記ヌクレオチド残基および前記非ヌクレオチド残基があげられる。前記リンカー領域は、例えば、前記ヌクレオチド残基のみから構成されてもよいし、前記非ヌクレオチド残基のみから構成されてもよいし、前記ヌクレオチド残基と前記非ヌクレオチド残基から構成されてもよい。前記リンカー領域は、例えば、下記 (1) ~ (7) の残基で構成される。

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

[0071] 本発明の  $s s N c$  分子が、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) の両方を有する場合、例えば、両方の構成単位が同じでもよいし、異なってもよい。具体例として、例えば、両方のリンカー領域の構成単位が前記ヌクレオチド残基である形態、両方のリンカー領域の構成単位が前記非ヌクレオチド残基である形態、一方の領域の構成単位が前記ヌクレオチド残基であり、他方のリンカー領域の構成単位が非ヌクレオチド残基である形態等があげられる。

[0072] 本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、前記ヌクレオチド残基のみから構成される分子、前記ヌクレオチド残基の他に前記非ヌクレオチド残基を含む分子

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

[0073] 本発明の  $s s N c$  分子において、前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基が好ましい。この場合、本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、「RNA分子」または「 $s s RNA$ 分子」ともいう。前記  $s s RNA$  分子は、例えば、前記リボヌクレオチド残基のみから構成される分子、前記リボヌクレオチド残基の他に前記非ヌクレオチド残基を含む分子があげられる。前記  $s s RNA$  分子において、前記リボヌクレオチド残基は、前述のように、例えば、前記非修飾リボヌクレオチド残基のみでもよいし、前記修飾リボヌクレオチド残基のみでもよいし、前記非修飾リボヌクレオチド残基および前記修飾リボヌクレオチド残基の両方を含んでもよい。

[0074] 前記  $s s RNA$  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もしくは数个」であり、具体的には、例えば、1～5個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、最も好ましくは1または2個である。前記非修飾リボヌクレオチド残基に対する前記修飾リボヌクレオチド残基は、例えば、リボース残基がデオキシリボース残基に置換された前記デオキシリボヌクレオチド残基でもよい。前記  $s s RNA$  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。

[0075] 本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、標識物質を含み、前記標識物質で標識化されてもよい。前記標識物質は、特に制限されず、例えば、蛍光物質、色素、同位体等があげられる。前記標識物質は、例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3色素、Cy5色素等の蛍光団があげられ、前記色素は、例えば、Alexa488等のAlexa色素等があげられる。前記同位体は、例えば、安定同位体および放射性同位体があげられ、好ましくは安定同位体である。前記安定同位体は、例えば、被ばくの危険性が少なく、専用の施設も不要であることから取り扱い性に優れ、また、コストも低減できる。また、前記安定同位体は、例えば、標識した化合物の物性変化がなく、トレーサーとしての性質にも優れる。前記安定同位体は、特に制限されず、例えば、 $^2H$ 、 $^{13}C$ 、 $^{15}N$ 、 $^{17}O$ 、 $^{18}O$ 、 $^{33}S$ 、 $^{34}S$ および $^{36}S$ があげられる。

[0076] 本発明の  $s s N c$  分子は、前述のように、前記標的遺伝子の発現抑制ができる。このため、本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、遺伝子が原因となる疾患の治療剤として使用できる。本発明の  $s s N c$  分子が、例えば、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を含む場合、例えば、前記標的遺伝子の発現抑制により、前記疾患を治療できる。本発明において、「治療」は、例えば、前記疾患の予防、疾患の改善、予後の改善の意味を含み、いずれでもよい。前記疾患は、特に制限されず、例えば、目的の疾患に応じて前記発現抑制配列を適宜設定できる。前記疾患としては、例えば、乳がん、肺がん、胃がん等のがんがあげられる。

[0077] 本発明の  $s s N c$  分子の使用方法は、特に制限されず、例えば、前記標的遺伝子を有する投与対象に、前記  $s s N c$  分子を投与すればよい。

[0078] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与

対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、in vivo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、NIH 3T3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。

[0079] 本発明において、発現抑制の対象となる前記標的遺伝子は、特に制限されず、所望の遺伝子を設定できる。そして、前述のように、前記標的遺伝子の種類に応じて、前記発現抑制配列を適宜設計すればよい。

[0080] 本発明のssNc分子の使用に関しては、後述する本発明の組成物、発現抑制方法および治療方法等の記載を参照できる。

[0081] 本発明のssNc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。

[0082] 2. ヌクレオチド残基

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

[0083] 前記ヌクレオチド残基は、未修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基があげられる。前記未修飾ヌクレオチド残基は、前記各構成要素が、例えば、天然に存在するものと同ーまたは実質的に同ーであり、好ましくは、人体において天然に存在するものと同ーまたは実質的に同ーである。

[0084] 前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、前記未修飾ヌクレオチド残基を修飾したヌクレオチド残基である。前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、前

記未修飾ヌクレオチド残基の構成要素のいずれ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、前記ヌクレオチド残基の代替物の残基でもよい

[0085] 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）の修飾があげられる。

[0086] 前記リボリン酸骨格において、例えば、リボース残基を修飾できる。前記リボース残基は、例えば、2' 位炭素を修飾でき、具体的には、例えば、2' 位炭素に結合する水酸基を、水素またはフルオロ等のハロゲンに置換できる。前記2' 位炭素の水酸基を水素に置換することで、リボース残基をデオキシリボースに置換できる。前記リボース残基は、例えば、立体異性体に置換でき、例えば、アラビノース残基に置換してもよい。

[0087] 前記リボリン酸骨格は、例えば、非リボース残基および／または非リン酸を有する非リボリン酸骨格に置換してもよい。前記非リボリン酸骨格は、例えば、前記リボリン酸骨格の非荷電体があげられる。前記非リボリン酸骨格に置換された、前記ヌクレオチドの代替物は、例えば、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン等があげられる。前記代替物は、この他に、例えば、人工核酸モノマー残基があげられる。具体例として、例えば、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）、ENA（2'-O, 4'-C-Ethylenebridged Nucleic Acid）等があげられ、好ましくはPNAである。

[0088] 前記リボリン酸骨格において、例えば、リン酸基を修飾できる。前記リボリン酸骨格において、糖残基に最も隣接するリン酸基は、 $\alpha$ 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、前記非結合酸素における電荷分布が非対称型となる修飾を行うことが好ましい。

[0089] 前記リン酸基は、例えば、前記非結合酸素を置換してもよい。前記酸素は、例えば、S (硫黄)、Se (セレン)、B (ホウ素)、C (炭素)、H (水素)、N (窒素) およびOR (Rは、アルキル基またはアリール基) のいずれかの原子で置換でき、好ましくは、Sで置換される。前記非結合酸素は、例えば、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ールホスホネート、およびホスホトリエステル等があげられ、中でも、前記2つの非結合酸素が両方ともSで置換されているホスホロジチオエートが好ましい。

[0090] 前記リン酸基は、例えば、前記結合酸素を置換してもよい。前記酸素は、例えば、S (硫黄)、C (炭素) およびN (窒素) のいずれかの原子で置換でき、前記修飾リン酸基は、例えば、Nで置換した架橋ホスホロアミデート、Sで置換した架橋ホスホロチオエート、およびCで置換した架橋メチレンホスホネート等があげられる。前記結合酸素の置換は、例えば、本発明の  $s N c$  分子の5'末端ヌクレオチド残基および3'末端ヌクレオチド残基の

少なくとも一方において行うことが好ましく、5' 側の場合、C による置換が好ましく、3' 側の場合、N による置換が好ましい。

[0091] 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の基を含み、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。

[0092] 本発明の  $s s N c$  分子は、例えば、3' 末端および5' 末端の少なくとも一方のヌクレオチド残基が修飾されてもよい。前記修飾は、例えば、3' 末端および5' 末端のいずれか一方でもよいし、両方でもよい。前記修飾は、例えば、前述の通りであり、好ましくは、末端のリン酸基に行うことが好ましい。前記リン酸基は、例えば、全体を修飾してもよいし、前記リン酸基における1つ以上の原子を修飾してもよい。前者の場合、例えば、リン酸基全体の置換でもよいし、欠失でもよい。

[0093] 前記末端のヌクレオチド残基の修飾は、例えば、他の分子の付加があげられる。前記他の分子は、例えば、前述のような標識物質、保護基等の機能性分子があげられる。前記保護基は、例えば、S（硫黄）、Si（ケイ素）、B（ホウ素）、エステル含有基等があげられる。前記標識物質等の機能性分子は、例えば、本発明の  $s s N c$  分子の検出等に利用できる。

[0094] 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。

[0095] 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imin、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。

[0096] 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、サッフィリン）、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 $Eu^{3+}$ 複合体）等があげられる。

[0097] 本発明のssNc分子は、前記5'末端が、例えば、リン酸基またはリン酸基アナログで修飾されてもよい。前記リン酸基は、例えば、5'-リン酸

$((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5')$  )、5' ニリン酸  $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$  )、5' 三リン酸  $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$  )、5' -グアノシンキヤップ (7-メチル化または非メチル化、 $7\text{m-G}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$  )、5' -アデノシンキヤップ (A p p p)、任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキヤップ構造 ( $\text{N}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$  )、5' -チオリン酸 (ホスホロチオエート:  $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$  )、5' -ジチオリン酸 (ホスホロジチオエート:  $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$  )、5' -ホスホロチオール酸  $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$  )、硫黄置換の一リン酸、ニリン酸および三リン酸 (例えば、5' - $\alpha$ -チオ三リン酸、5' - $\gamma$ -チオ三リン酸等)、5' -ホスホルアミデート ( $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ 、 $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$  )、5' -アルキルホスホン酸 (例えば、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$ 、 $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2$ 、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、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$ 、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。

[0098] 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。

[0099] 前記塩基は、例えば、アデニンおよびグアニン等のプリン塩基、シトシン、ウラシルおよびチミン等のピリミジン塩基があげられる。前記塩基は、この他に、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌバラリン (n u b u l a r i n e)、イソグアニシン (i s o g u a n i s i n e)、ツベルシジン (t u b e r c i d i n e) 等があげられる。前記塩基は、例えば、2-アミノアデニン、6-メチル化プリン等のアルキル誘導体；2-プロピル化プリン等のアルキル誘導体；5-ハロウラシルおよび5-ハロシトシン；5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン；6-アゾウラシル、6-アゾシトシンおよび6-アゾチミン；5-ウラシル (プソイド

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

[0100] 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。

[0101] 3. 非ヌクレオチド残基

前記非ヌクレオチド残基は、特に制限されない。本発明のssNc分子は、例えば、前記非ヌクレオチド残基として、ピロリジン骨格またはピペリジン骨格を含む非ヌクレオチド構造を有してもよい。前記非ヌクレオチド残基は、例えば、前記リンカー領域（Lx）および前記リンカー領域（Ly）の少なくとも一方に有することが好ましい。前記非ヌクレオチド残基は、例えば、前記リンカー領域（Lx）に有してもよいし、前記リンカー領域（Ly）に有してもよいし、両方の前記リンカー領域に有してもよい。前記リンカー領域（Lx）および前記リンカー領域（Ly）は、例えば、同じでもよいし、異なってもよい。

[0102] 前記ピロリジン骨格は、例えば、ピロリジンの5員環を構成する炭素が、1個以上、置換されたピペリジン誘導体の骨格でもよく、置換される場合、例えば、C-2の炭素以外の炭素原子であることが好ましい。前記炭素は、例えば、窒素、酸素、または硫黄で置換されてもよい。前記ピロリジン骨格は、例えば、ピロリジンの5員環内に、例えば、炭素-炭素二重結合、または、炭素-窒素二重結合を含んでもよい。前記ピロリジン骨格において、ピロリジンの5員環を構成する炭素および窒素は、例えば、水素基が結合してもよいし、後述するような置換基が結合してもよい。前記リンカー領域（Lx）は、例えば、前記ピロリジン骨格のいずれの基を介して、前記領域（X）および前記領域（Xc）と結合してもよく、好ましくは、前記5員環のいずれか一個の炭素原子と窒素であり、好ましくは、前記5員環の2位の炭素（C-2）と窒素である。前記ピロリジン骨格としては、例えば、プロリン骨格、プロリノール骨格等があげられる。前記プロリン骨格およびプロリノ

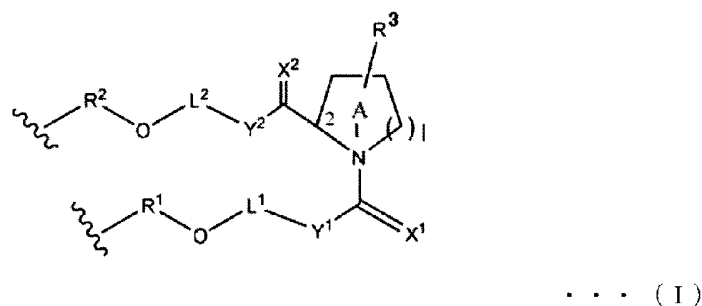
ール骨格等は、例えば、生体内物質およびその還元体であるため、安全性にも優れる。

[0103] 前記ピペリジン骨格は、例えば、ピペリジンの6員環を構成する炭素が、1個以上、置換されたピペリジン誘導体の骨格でもよく、置換される場合、例えば、C-2の炭素以外の炭素原子であることが好ましい。前記炭素は、例えば、窒素、酸素、または硫黄で置換されてもよい。前記ピペリジン骨格は、例えば、ピペリジンの6員環内に、例えば、炭素-炭素二重結合、または、炭素-窒素二重結合を含んでもよい。前記ピペリジン骨格において、ピペリジンの6員環を構成する炭素および窒素は、例えば、水素基が結合してもよいし、後述するような置換基が結合してもよい。前記リンカー領域(L<sub>x</sub>)は、例えば、前記ピペリジン骨格のいずれの基を介して、前記領域(X)および前記領域(X<sub>c</sub>)と結合してもよく、好ましくは、前記6員環のいずれか一個の炭素原子と窒素であり、好ましくは、前記6員環の2位の炭素(C-2)と窒素である。前記リンカー領域(L<sub>y</sub>)についても同様である。

[0104] 前記リンカー領域は、例えば、前記非ヌクレオチド構造からなる非ヌクレオチド残基のみでもよいし、前記非ヌクレオチド構造からなる非ヌクレオチド残基と、ヌクレオチド残基とを含んでもよい。

[0105] 前記リンカー領域は、例えば、下記式(I)で表わされる。

[化1]



[0106] 前記式(I)中、

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

Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、単結合、CH<sub>2</sub>、NH、OまたはSであ

り；

$R^3$ は、環A上のC-3、C-4、C-5またはC-6に結合する水素原子または置換基であり、

前記置換基は、OH、 $OR^4$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^4$ 、 $NR^4R^5$ 、SH、 $SR^4$ またはオキシ基(=O)であり；

$R^3$ が前記置換基の場合、置換基 $R^3$ は、1でも複数でも、存在しなくてもよく、複数の場合、同一でも異なってもよく；

$R^4$ および $R^5$ は、置換基または保護基であり、同一でも異なってもよく；

$L^1$ は、n個の原子からなるアルキレン鎖であり、ここで、アルキレン炭素原子上の水素原子は、OH、 $OR^a$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^a$ 、 $NR^aR^b$ 、SHもしくは $SR^a$ で置換されても置換されていないなくてもよく、または、

$L^1$ は、前記アルキレン鎖の一つ以上の炭素原子が、酸素原子で置換されたポリエーテル鎖であり、

ただし、 $Y^1$ が、NH、OまたはSの場合、 $Y^1$ に結合する $L^1$ の原子は炭素であり、 $OR^1$ に結合する $L^1$ の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接せず；

$L^2$ は、m個の原子からなるアルキレン鎖であり、ここで、アルキレン炭素原子上の水素原子は、OH、 $OR^c$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^c$ 、 $NR^cR^d$ 、SHもしくは $SR^c$ で置換されても置換されていないなくてもよく、または、

$L^2$ は、前記アルキレン鎖の一つ以上の炭素原子が、酸素原子で置換されたポリエーテル鎖であり、

ただし、 $Y^2$ が、NH、OまたはSの場合、 $Y^2$ に結合する $L^2$ の原子は炭素であり、 $OR^2$ に結合する $L^2$ の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接せず；

$R^a$ 、 $R^b$ 、 $R^c$ および $R^d$ は、それぞれ独立して、置換基または保護基であり；

lは、1または2であり；

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；

環Aは、前記環A上のC-2以外の1個の炭素原子が、窒素、酸素、または

硫黄で置換されてもよく、

前記環A内に、炭素-炭素二重結合、または、炭素-窒素二重結合を含んでもよい。前記リンカー領域(L<sup>x</sup>)が前記式(1)で表わされる場合、前記領域(X<sup>c</sup>)および前記領域(X)は、それぞれ、-OR<sup>1</sup>-または-OR<sup>2</sup>-を介して、前記リンカー領域(L<sup>x</sup>)に結合する。また、前記リンカー領域(L<sup>y</sup>)が前記式(1)で表わされる場合、前記領域(Y<sup>c</sup>)および前記領域(Y)は、それぞれ、-OR<sup>1</sup>-または-OR<sup>2</sup>-を介して、前記リンカー領域(L<sup>y</sup>)に結合する。ここで、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記構造(1)である。

[0107] 前記式(1)中、X<sup>1</sup>およびX<sup>2</sup>は、例えば、それぞれ独立して、H<sub>2</sub>、O、SまたはNHである。前記式(1)中において、X<sup>1</sup>がH<sub>2</sub>であるとは、X<sup>1</sup>が、X<sup>1</sup>の結合する炭素原子とともに、CH<sub>2</sub>(メチレン基)を形成することを意味する。X<sup>2</sup>についても同様である。

[0108] 前記式(1)中、環Aにおいて、lは、1または2である。l=1の場合、環Aは、5員環であり、例えば、前記ピロリジン骨格である。前記ピロリジン骨格は、例えば、プロリン骨格、プロリノール骨格等があげられ、これらの二価の構造が例示できる。l=2の場合、環Aは、6員環であり、例えば、前記ピペリジン骨格である。環Aは、環A上のC-2以外の1個の炭素原子が、窒素、酸素または硫黄で置換されてもよい。また、環Aは、環A内に、炭素-炭素二重結合または炭素-窒素二重結合を含んでもよい。環Aは、例えば、L型およびD型のいずれでもよい。

[0109] 前記式(1)中、Y<sup>1</sup>およびY<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、単結合、CH<sub>2</sub>、NH、OまたはSである。

[0110] 前記式(1)中、R<sup>3</sup>は、環A上のC-3、C-4、C-5またはC-6に結合する水素原子または置換基である。前記置換基は、OH、OR<sup>4</sup>、NH<sub>2</sub>、NHR<sup>4</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、SH、SR<sup>4</sup>またはオキソ基(=O)である。R<sup>3</sup>が前記置換基の場合、置換基R<sup>3</sup>は、1でも複数でも、存在しなくてもよく、複数

の場合、同一でも異なってもよい。 $R^4$ および $R^5$ は、置換基または保護基であり、同一でも異なってもよい。

[0111] 前記置換基は、例えば、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキルアルキル、シクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アミノアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリールアルキル、シリル、シリルオキシアルキル等があげられる。以下、同様である。

[0112] 前記保護基は、例えば、反応性の高い官能基を不活性に変換する官能基であり、公知の保護基等があげられる。前記保護基は、例えば、文献(J. F. W. McOmie, 「Protecting Groups in Organic Chemistry」 Plenum Press, London and New York, 1973)の記載を援用できる。前記保護基は、特に制限されず、例えば、tert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)基、ビス(2-アセトキシエチルオキシ)メチル(ACE)基、トリイソプロピルシリルオキシメチル(TOM)基、1-(2-シアノエトキシ)エチル(CEE)基、2-シアノエトキシメチル(CEM)基およびトリルスルフォニルエトキシメチル(TEM)基、ジメトキシトリチル(DMTri)等があげられる。 $R^3$ が $OR^4$ の場合、前記保護基は、特に制限されず、例えば、TBDMS基、ACE基、TOM基、CEE基、CEM基およびTEM基等があげられる。この他にも、後述するシリル含有基等もあげられる。以下、同様である。

[0113] 前記式(1)中、 $L^1$ は、 $n$ 個の原子からなるアルキレン鎖である。前記アルキレン炭素原子上の水素原子は、例えば、OH、 $OR^a$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^a$ 、 $NR^aR^b$ 、SHもしくは $SR^a$ で置換されてもよいし、置換されていなくてもよい。または、 $L^1$ は、前記アルキレン鎖の一つ以上の炭素原子が酸素原子で置換されたポリエーテル鎖でもよい。前記ポリエーテル鎖は、例えば、ポリエチレングリコールである。なお、 $Y^1$ が、NH、OまたはSの場合、 $Y^1$ に結合する $L^1$ の原子は炭素であり、 $OR^1$ に結合する $L^1$ の原子は炭素であり、

酸素原子同士は隣接しない。つまり、例えば、 $Y^1$ がOの場合、その酸素原子と $L^1$ の酸素原子は隣接せず、 $OR^1$ の酸素原子と $L^1$ の酸素原子は隣接しない。

[0114] 前記式(1)中、 $L^2$ は、 $m$ 個の原子からなるアルキレン鎖である。前記アルキレン炭素原子上の水素原子は、例えば、OH、 $OR^c$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^c$ 、 $NR^cR^d$ 、SHもしくは $SR^c$ で置換されてもよいし、置換されていなくてもよい。または、 $L^2$ は、前記アルキレン鎖の一つ以上の炭素原子が酸素原子で置換されたポリエーテル鎖でもよい。なお、 $Y^2$ が、NH、OまたはSの場合、 $Y^2$ に結合する $L^2$ の原子は炭素であり、 $OR^2$ に結合する $L^2$ の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接しない。つまり、例えば、 $Y^2$ がOの場合、その酸素原子と $L^2$ の酸素原子は隣接せず、 $OR^2$ の酸素原子と $L^2$ の酸素原子は隣接しない。

[0115]  $L^1$ の $n$ および $L^2$ の $m$ は、特に制限されず、それぞれ、下限は、例えば、0であり、上限も、特に制限されない。 $n$ および $m$ は、例えば、前記リンカー領域( $L_x$ )の所望の長さに応じて、適宜設定できる。 $n$ および $m$ は、例えば、製造コストおよび収率等の点から、それぞれ、0~30が好ましく、より好ましくは0~20であり、さらに好ましくは0~15である。 $n$ と $m$ は、同じでもよいし( $n=m$ )、異なってもよい。 $n+m$ は、例えば、0~30であり、好ましくは0~20であり、より好ましくは0~15である。

[0116]  $R^a$ 、 $R^b$ 、 $R^c$ および $R^d$ は、それぞれ独立して、置換基または保護基があげられる。前記置換基および前記保護基は、例えば、前述と同様である。

[0117] 前記式(1)において、水素原子は、例えば、それぞれ独立して、Cl、Br、FおよびI等のハロゲンに置換されてもよい。

[0118] 前記リンカー領域( $L_x$ )が、前記式(1)で表わされる場合、前記領域( $X_c$ )および前記領域( $X$ )は、例えば、それぞれ、 $-OR^1-$ または $-OR^2-$ を介して、前記リンカー領域( $L_x$ )に結合する。ここで、 $R^1$ および $R^2$ は、存在しても存在しなくてもよい。 $R^1$ および $R^2$ が存在する場合、 $R^1$ および $R^2$ は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記式(1)の構

造である。 $R^1$ および／または $R^2$ が前記ヌクレオチド残基の場合、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) は、例えば、ヌクレオチド残基 $R^1$ および／または $R^2$ を除く前記式 (I) の構造からなる前記非ヌクレオチド残基と、前記ヌクレオチド残基とから形成される。 $R^1$ および／または $R^2$ が前記式 (I) の構造の場合、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) は、例えば、前記式 (I) の構造からなる前記非ヌクレオチド残基が、2つ以上連結された構造となる。前記式 (I) の構造は、例えば、1個、2個、3個または4個含んでもよい。このように、前記構造を複数含む場合、前記 (I) の構造は、例えば、直接連結されてもよいし、前記ヌクレオチド残基を介して結合してもよい。他方、 $R^1$ および $R^2$ が存在しない場合、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) は、例えば、前記式 (I) の構造からなる前記非ヌクレオチド残基のみから形成される。また、前記リンカー領域 ( $L_y$ ) が、前記式 (I) で表わされる場合、例えば、前記領域 ( $Y_c$ )、前記領域 (Y) および前記リンカー領域 ( $L_y$ ) について、前記リンカー領域 ( $L_x$ ) の説明を援用できる。

[0119] 前記領域 ( $X_c$ ) および前記領域 (X)、ならびに、前記領域 ( $Y_c$ ) および前記領域 (Y) と、前記  $-OR^1-$  および  $-OR^2-$  との結合の組合せは、特に制限されず、例えば、以下のいずれかの条件があげられる。

条件 (1)

前記領域 ( $X_c$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記領域 (X) は、 $-OR^1-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合し、

前記領域 ( $Y_c$ ) は、 $-OR^1-$  を介して、前記領域 (Y) は、 $-OR^2-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合する。

条件 (2)

前記領域 ( $X_c$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記領域 (X) は、 $-OR^1-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合し、

前記領域 ( $Y_c$ ) は、 $-OR^2-$  を介して、前記領域 (Y) は、 $-OR^1-$  を介して、前記式 (I) の構造と結合する。

条件 (3)

前記領域 ( $X_c$ ) は、 $-OR^1-$ を介して、前記領域 ( $X$ ) は、 $-OR^2-$ を介して、前記式 (I) の構造と結合し、

前記領域 ( $Y_c$ ) は、 $-OR^1-$ を介して、前記領域 ( $Y$ ) は、 $-OR^2-$ を介して、前記式 (I) の構造と結合する。

条件 (4)

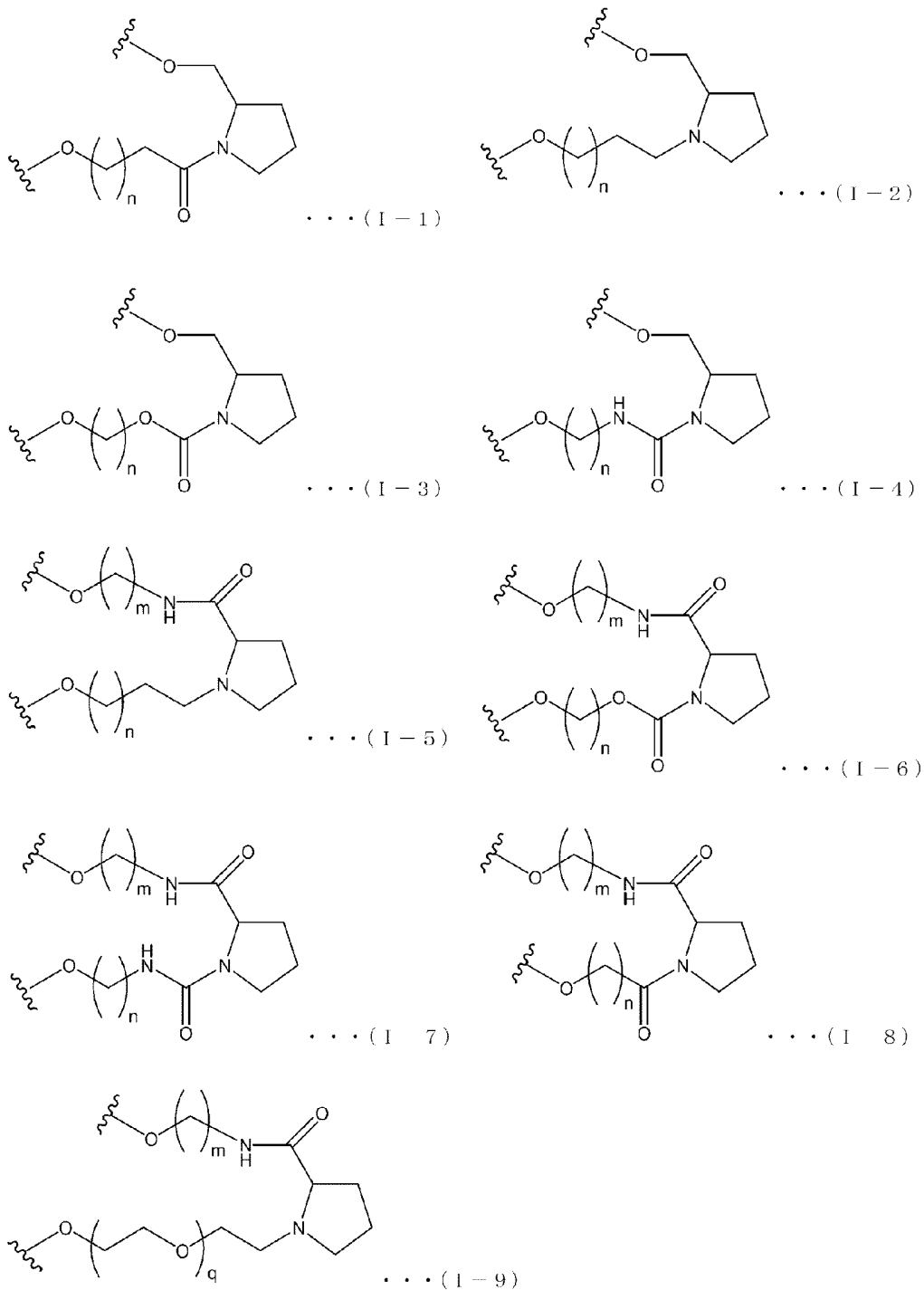
前記領域 ( $X_c$ ) は、 $-OR^1-$ を介して、前記領域 ( $X$ ) は、 $-OR^2-$ を介して、前記式 (I) の構造と結合し、

前記領域 ( $Y_c$ ) は、 $-OR^2-$ を介して、前記領域 ( $Y$ ) は、 $-OR^1-$ を介して、前記式 (I) の構造と結合する。

[0120] 前記式 (I) の構造は、例えば、下記式 (I-1) ~ 式 (I-9) が例示でき、下記式において、 $n$  および  $m$  は、前記式 (I) と同じである。下記式において、 $q$  は、 $0 \sim 10$  の整数である。



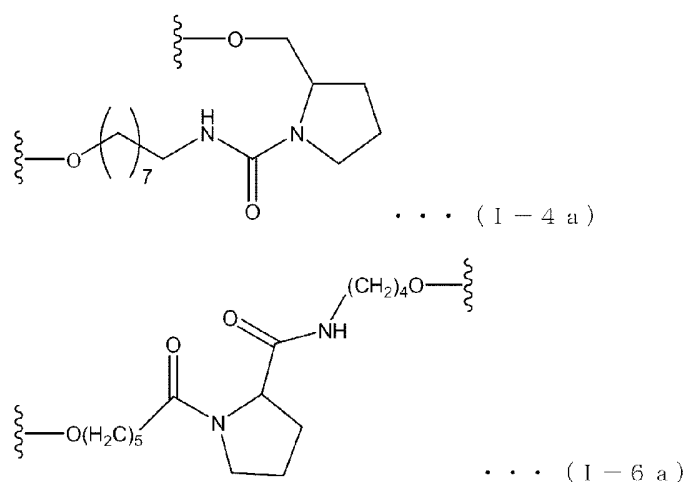
[化2]



[0121] 前記式 (I-1) ~ (I-9) において、 $n$ 、 $m$  および  $q$  は、特に制限されず、前述の通りである。具体例として、前記式 (I-1) において、 $n = 8$ 、前記 (I-2) において、 $n = 3$ 、前記式 (I-3) において、 $n = 4$  または 8、前記 (I-4) において、 $n = 7$  または 8、前記式 (I-5) に

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

[化3]



[0122] 本発明において、「アルキル」は、例えば、直鎖状または分枝状のアルキル基を含む。前記アルキルの炭素数は、特に制限されず、例えば、1～30であり、好ましくは、1～6または1～4である。前記アルキル基は、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、*n*-ヘキシル、イソヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチル、*n*-ノニル、*n*-デシル等があげられる。好ましくは、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、*n*-ヘキシル、イソヘキシル等があげられる。

[0123] 本発明において、「アルケニル」は、例えば、直鎖状または分枝状のアルケニルを含む。前記アルケニルは、前記アルキルにおいて、1個または複数の二重結合を有するもの等があげられる。前記アルケニルの炭素数は、特に

制限されず、例えば、前記アルキルと同様であり、好ましくは2～8である。前記アルケニルは、例えば、ビニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1, 3-ブタジエニル、3-メチル-2-ブテニル等があげられる。

[0124] 本発明において、「アルキニル」は、例えば、直鎖状または分枝状のアルキニルを含む。前記アルキニルは、前記アルキルにおいて、1個または複数の三重結合を有するもの等があげられる。前記アルキニルの炭素数は、特に制限されず、例えば、前記アルキルと同様であり、好ましくは2～8である。前記アルキニルは、例えば、エチニル、プロピニル、ブチニル等があげられる。前記アルキニルは、例えば、さらに、1個または複数の二重結合を有してもよい。

[0125] 本発明において、「アリール」は、例えば、単環芳香族炭化水素基および多環芳香族炭化水素基を含む。前記単環芳香族炭化水素基は、例えば、フェニル等があげられる。前記多環芳香族炭化水素基は、例えば、1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントリル、2-アントリル、9-アントリル、1-フェナントリル、2-フェナントリル、3-フェナントリル、4-フェナントリル、9-フェナントリル等があげられる。好ましくは、例えば、フェニル、1-ナフチルおよび2-ナフチル等のナフチル等があげられる。

[0126] 本発明において、「ヘテロアリール」は、例えば、単環芳香族複素環式基および縮合芳香族複素環式基を含む。前記ヘテロアリールは、例えば、フリル（例：2-フリル、3-フリル）、チエニル（例：2-チエニル、3-チエニル）、ピロリル（例：1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル）、イミダゾリル（例：1-イミダゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル）、ピラゾリル（例：1-ピラゾリル、3-ピラゾリル、4-ピラゾリル）、トリアゾリル（例：1, 2, 4-トリアゾール-1-イル、1, 2, 4-トリアゾール-3-イル、1, 2, 4-トリアゾール-4-イル）、テトラゾリル（例：1-テトラゾリル、2-テトラゾリル、5-テトラゾリル）、オキサゾリル（例：2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、5-オキサゾ

リル)、イソキサゾリル(例: 3-イソキサゾリル、4-イソキサゾリル、5-イソキサゾリル)、チアゾリル(例: 2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル)、チアジアゾリル、イソチアゾリル(例: 3-イソチアゾリル、4-イソチアゾリル、5-イソチアゾリル)、ピリジル(例: 2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル)、ピリダジニル(例: 3-ピリダジニル、4-ピリダジニル)、ピリミジニル(例: 2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、5-ピリミジニル)、フラザニル(例: 3-フラザニル)、ピラジニル(例: 2-ピラジニル)、オキサジアゾリル(例: 1, 3, 4-オキサジアゾール-2-イル)、ベンゾフリル(例: 2-ベンゾ [b] フリル、-ベンゾ [b] フリル、4-ベンゾ [b] フリル、5-ベンゾ [b] フリル、6-ベンゾ [b] フリル、7-ベンゾ [b] フリル)、ベンゾチエニル(例: 2-ベンゾ [b] チエニル、3-ベンゾ [b] チエニル、4-ベンゾ [b] チエニル、5-ベンゾ [b] チエニル、6-ベンゾ [b] チエニル、7-ベンゾ [b] チエニル)、ベンズイミダゾリル(例: 1-ベンズイミダゾリル、2-ベンズイミダゾリル、4-ベンズイミダゾリル、5-ベンズイミダゾリル)、ジベンゾフリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、キノキサリル(例: 2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、6-キノキサリニル)、シンノリニル(例: 3-シンノリニル、4-シンノリニル、5-シンノリニル、6-シンノリニル、7-シンノリニル、8-シンノリニル)、キナゾリル(例: 2-キナゾリニル、4-キナゾリニル、5-キナゾリニル、6-キナゾリニル、7-キナゾリニル、8-キナゾリニル)、キノリル(例: 2-キノリル、3-キノリル、4-キノリル、5-キノリル、6-キノリル、7-キノリル、8-キノリル)、フタラジニル(例: 1-フタラジニル、5-フタラジニル、6-フタラジニル)、イソキノリル(例: 1-イソキノリル、3-イソキノリル、4-イソキノリル、5-イソキノリル、6-イソキノリル、7-イソキノリル、8-イソキノリル)、プリル、プテリジニル(例: 2-プテリジニル、4-プテリジニル、6-プテリジニル、7-プテリジニル)、カルバゾリル、フェナントリジニル、アクリジニル

(例：１－アクリジニル、２－アクリジニル、３－アクリジニル、４－アクリジニル、９－アクリジニル)、インドリル(例：１－インドリル、２－インドリル、３－インドリル、４－インドリル、５－インドリル、６－インドリル、７－インドリル)、イソインドリル、フェナジニル(例：１－フェナジニル、２－フェナジニル)またはフェノチアジニル(例：１－フェノチアジニル、２－フェノチアジニル、３－フェノチアジニル、４－フェノチアジニル)等があげられる。

[0127] 本発明において、「シクロアルキル」は、例えば、環状飽和炭化水素基であり、炭素数は、例えば、３～１５である。前記シクロアルキルは、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、橋かけ環式炭化水素基、スピロ炭化水素基等があげられ、好ましくは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、橋かけ環式炭化水素基等があげられる。

[0128] 本発明において、「橋かけ環式炭化水素基」は、例えば、ビスクロ〔２．１．０〕ペンチル、ビスクロ〔２．２．１〕ヘプチル、ビスクロ〔２．２．２〕オクチルおよびビスクロ〔３．２．１〕オクチル、トリシクロ〔２．２．１．０〕ヘプチル、ビスクロ〔３．３．１〕ノナン、１－アダマンチル、２－アダマンチル等があげられる。

[0129] 本発明において、「スピロ炭化水素基」は、例えば、スピロ〔３．４〕オクチル等があげられる。

[0130] 本発明において、「シクロアルケニル」は、例えば、環状の不飽和脂肪族炭化水素基を包み、炭素数は、例えば、３～７個である。前記基は、例えば、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル等があげられ、好ましくは、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル等である。前記シクロアルケニルは、例えば、環中に不飽和結合を有する橋かけ環式炭化水素基およびスピロ炭化水素基も含む。

[0131] 本発明において、「アリーラルキル」は、例えば、ベンジル、２－フェ

ネチル、およびナフタレニルメチル等があげられ、「シクロアルキルアルキル」または「シクリルアルキル」は、例えば、シクロヘキシルメチル、アダマンチルメチル等があげられ、「ヒドロキシアルキル」は、例えば、ヒドロキシメチルおよび2-ヒドロキシエチル等があげられる。

[0132] 本発明において、「アルコキシ」は、前記アルキル- $O$ -基を含み、例えば、メトキシ、エトキシ、 $n$ -プロポキシ、イソプロポキシ、および $n$ -ブトキシ等があげられ、「アルコキシアルキル」は、例えば、メトキシメチル等があげられ、「アミノアルキル」は、例えば、2-アミノエチル等があげられる。

[0133] 本発明において、「ヘテロシクリル」は、例えば、1-ピロリニル、2-ピロリニル、3-ピロリニル、1-ピロリジニル、2-ピロリジニル、3-ピロリジニル、ピロリジノン、1-イミダゾリニル、2-イミダゾリニル、4-イミダゾリニル、1-イミダゾリジニル、2-イミダゾリジニル、4-イミダゾリジニル、イミダゾリジノン、1-ピラゾリニル、3-ピラゾリニル、4-ピラゾリニル、1-ピラゾリジニル、3-ピラゾリジニル、4-ピラゾリジニル、ピペリジノン、ピペリジノ、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-ピペリジニル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、ピペラジノン、2-モルホリニル、3-モルホリニル、モルホリノ、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル等があげられる。

[0134] 本発明において、「ヘテロシクリルアルキル」は、例えば、ピペリジニルメチル、ピペラジニルメチル等があげられ、「ヘテロシクリルアルケニル」は、例えば、2-ピペリジニルエテニル等があげられ、「ヘテロアリールアルキル」は、例えば、ピリジルメチルおよびキノリン-3-イルメチル等があげられる。

[0135] 本発明において、「シリル」は、式 $R^3Si-$ で表される基を含み、 $R^3$ は、独立して、前記アルキル、アリールおよびシクロアルキルから選択でき、例えば、トリメチルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基等があげられ、「シリルオキシ」は、例えば、トリメチルシリルオキシ基等があげられ、「

シリルオキシアルキル」は、例えば、トリメチルシリルオキシメチル等があげられる。

[0136] 本発明において、「アルキレン」は、例えば、メチレン、エチレン、およびプロピレン等があげられる。

[0137] 本発明において、前述した各種基は、置換されてもよい。前記置換基は、例えば、ヒドロキシ、カルボキシ、ハロゲン、ハロゲン化アルキル（例： $\text{CF}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{CCl}_3$ ）、ニトロ、ニトロソ、シアノ、アルキル（例：メチル、エチル、イソプロピル、tert-ブチル）、アルケニル（例：ビニル）、アルキニル（例：エチニル）、シクロアルキル（例：シクロプロピル、アダマンチル）、シクロアルキルアルキル（例：シクロヘキシルメチル、アダマンチルメチル）、シクロアルケニル（例：シクロプロペニル）、アリール（例：フェニル、ナフチル）、アリールアルキル（例：ベンジル、フェネチル）、ヘテロアリール（例：ピリジル、フリル）、ヘテロアリールアルキル（例：ピリジルメチル）、ヘテロシクリル（例：ピペリジル）、ヘテロシクリルアルキル（例：モルホリルメチル）、アルコキシ（例：メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ）、ハロゲン化アルコキシ（例： $\text{OCF}_3$ ）、アルケニルオキシ（例：ビニルオキシ、アリルオキシ）、アリールオキシ（例：フェニルオキシ）、アルキルオキシカルボニル（例：メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル）、アリールアルキルオキシ（例：ベンジルオキシ）、アミノ〔アルキルアミノ（例：メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ）、アシルアミノ（例：アセチルアミノ、ベンゾイルアミノ）、アリールアルキルアミノ（例：ベンジルアミノ、トリチルアミノ）、ヒドロキシアミノ〕、アルキルアミノアルキル（例：ジエチルアミノメチル）、スルファモイル、オキソ等があげられる。

[0138] 4. 本発明の ssNc 分子の合成方法

本発明の ssNc 分子の合成方法は、特に制限されず、従来公知の方法が採用できる。前記合成方法は、例えば、遺伝子工学的手法による合成法、化

学合成法等があげられる。遺伝子工学的手法は、例えば、インビトロ転写合成法、ベクターを用いる方法、PCRカセットによる方法があげられる。前記ベクターは、特に制限されず、プラスミド等の非ウイルスベクター、ウイルスベクター等があげられる。前記化学合成法は、特に制限されず、例えば、ホスホロアミダイト法およびH-ホスホネート法等があげられる。前記化学合成法は、例えば、市販の自動核酸合成機を使用可能である。前記化学合成法は、一般に、アミダイトが使用される。前記アミダイトは、特に制限されず、市販のアミダイトとして、例えば、RNA Phosphoramidites (2'-O-TBDMSi、商品名、三千里製薬)、ACEアミダイトおよびTOMアミダイト、CEEアミダイト、CEMアミダイト、TEMアミダイト等があげられる。

[0139] 5. 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ssNc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ssNc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。

[0140] 本発明によれば、例えば、前記発現抑制用組成物を、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。

[0141] 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ssNc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ssNc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。

[0142] 本発明によれば、例えば、前記薬学的組成物を、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。



- [0143] 本発明において、治療の対象となる疾患は、特に制限されず、例えば、遺伝子の発現が原因となる疾患があげられる。前記疾患の種類に応じて、その疾患の原因となる遺伝子を前記標的遺伝子に設定し、さらに、前記標的遺伝子に応じて、前記発現抑制配列を適宜設定すればよい。
- [0144] 本発明の発現抑制用組成物および薬学的組成物（以下、組成物という）は、その使用方法是、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 *ssNc* 分子を投与すればよい。
- [0145] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、*in vivo*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、NIH 3T3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。
- [0146] 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。
- [0147] 本発明の組成物は、例えば、本発明の *ssNc* 分子のみを含んでもよいし、さらにその他の添加物を含んでもよい。前記添加物は、特に制限されず、例えば、薬学的に許容された添加物が好ましい。前記添加物の種類は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類に応じて適宜選択できる。
- [0148] 本発明の組成物において、前記 *ssNc* 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。前記複合体形成により、例えば、前記 *ssNc* 分子を効率よくデリバリーすることができる。前記 *ssNc* 分子と前記複合化剤との結合は、特に制限されず、例えば、非共有結合があげられる。前記複合体は、例えば、包接複合体があげられる。
- [0149] 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。

[0150] 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、賦形剤等があげられる。

[0151] 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（polyphosphazene）等があげられる。

[0152] 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（Neproxin）、RGDペプチド、RGDペプチド擬似体等があげられる。

[0153] 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。

[0154] 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。

[0155] 前記添加剤は、この他に、例えば、両親媒性分子があげられる。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。

[0156] 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。

[0157] 6. 発現抑制方法

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

[0158] 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、成熟 *miRNA* による発現抑制があげられる。

[0159] 本発明の発現抑制方法は、例えば、前記標的遺伝子が存在する対象に、前記 *ssNc* 分子を投与する工程を含む。前記投与工程により、例えば、前記投与対象に前記 *ssNc* 分子を接触させる。前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、*in vivo*でも*in vitro*でもよい。

[0160] 本発明の発現抑制方法は、例えば、前記 *ssNc* 分子を単独で投与してもよいし、前記 *ssNc* 分子を含む前記本発明の組成物を投与してもよい。前記投与方法は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類に応じて適宜選択できる。

#### [0161] 7. 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 *ssNc* 分子を、患者に投与する工程を含み、前記 *ssNc* 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 *ssNc* 分子を使用することが特徴であって、その他の工程および条件は、何ら制限されない。

[0162] 本発明の治療方法は、例えば、前記本発明の発現抑制方法等を援用できる。前記投与方法は、特に制限されず、例えば、経口投与および非経口投与のいずれでもよい。

#### [0163] 8. *ssNc* 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 *ssNc* 分子の使用である。

[0164] 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 *ssNc* 分子であり、前記 *ssNc* 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。

[0165] 以下、実施例等により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限

定されるものではない。

## 実施例

[0166] (実施例 A 1)

### (1) RNAの合成

下記配列からなる一本鎖RNA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（登録商標） 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。前記合成には、RNAアミダイトとして、RNA Phosphoramidites（2'-O-TBDMSi、商品名、三千里製薬）を用いた（以下、同様）。前記アミダイトの脱保護は、定法に従った。合成したRNAは、HPLCにより精製した。精製後のRNAは、それぞれ凍結乾燥した。

[0167] 実施例のssRNAを以下に示す。前記各配列において、5'側の大文字の領域は、ヒトlet-7a-1 miRNAの成熟miRNA配列（配列番号1）であり、3'側の大文字の領域は、ヒトlet-7a-1 miRNAのminor miRNA\*配列（配列番号2）であり、四角で囲んだ配列は、5'側がリンカー領域（Lx）であり、3'側がリンカー領域（Ly）である。また、5'側のリンカー領域（Lx）を介した2つの下線部は、互いに自己アニーリングする領域であり、3'側のリンカー領域（Ly）を介した2つの下線部は、互いに自己アニーリングする領域であり、\*を付した塩基はフリー塩基である。

[0168]

[表1]

NK-0057 (83塩基長: 配列番号3)

ggaUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUuagggucacacccaccacugggagauaaCUAUACAAUCUACUGUCUUUC<sup>\*</sup>uauucgu

PK-0021 (79塩基長: 配列番号4)

ggaUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUuagggucacacccaccacugggagauaaCUAUACAAUCUACUGUCUUUC<sup>\*</sup>uaLyu

NK-0059 (61塩基長: 配列番号5)

ggaUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUuugguaaCUAUACAAUCUACUGUCUUUC<sup>\*</sup>uauucgu

PK-0022 (57塩基長: 配列番号6)

ggaUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUuugguaaCUAUACAAUCUACUGUCUUUC<sup>\*</sup>uaLyu

NK-0060 (63塩基長: 配列番号7)

ggaUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUccacaccaaCUAUACAAUCUACUGUCUUUC<sup>\*</sup>uauucgu

PK-0023 (59塩基長: 配列番号8)

ggaUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUccacaccaaCUAUACAAUCUACUGUCUUUC<sup>\*</sup>uaLyu

PK-0024 (56塩基長: 配列番号9)

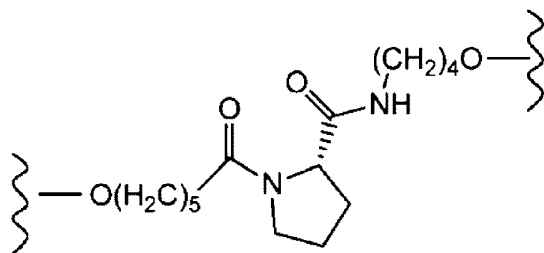
ggaUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUULaaCUAUACAAUCUACUGUCUUUC<sup>\*</sup>uauucgu

PK-0025 (52塩基長: 配列番号10)

ggaUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUULaaCUAUACAAUCUACUGUCUUUC<sup>\*</sup>uaLyu

[0169] 前記PK-0021、PK-0022、PK-0023、PK-0024  
およびPK-0025において、四角で囲んだLxおよびLyは、下記式で  
表わすことができ、アミダイドとして、実施例Bに示すスキーム3の化合物  
10 (L-プロリンジアミドアミダイト) を使用することにより合成した。

[化4]



[0170] また、参照例ssRNAとして、下記NM-0001を合成した。前記N  
M-0001は、ヒトlet-7a-1 前駆体miRNAである。下記配  
列において、大文字の下線は、ヒトlet-7a-1 miRNAの成熟m  
iRNA配列であり、小文字の下線部は、ヒトlet-7a-1 miRN  
Aのminor miRNA\*配列である。また、前記配列において、四角で  
囲んだ領域は、ループ領域である。

[0171]

## [表2]

NM-0001 (80塩基長: 配列番号11)

UGGGAUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUUAGGGUCACACCCACCACUGGGAGAUAAcuauacaauacuacugucuuucCUA

## [0172] (2) HMGA2 mRNAの検出

前記ssRNAを、ヒト肺腺癌の上皮細胞ラインA549細胞に導入し、ヒトlet-7a-1 miRNAがターゲットとするHMGA2 mRNAの検出を行った。

[0173] 前記ssRNAを、注射用蒸留水（大塚製薬、以下同様）で溶解し、100  $\mu\text{mol/L}$ のRNA溶液を調製した。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℃、5% CO<sub>2</sub>下とした。

[0174] まず、細胞を、前記培地中で培養し、その培養液を、24穴プレートに、400  $\mu\text{L}$ ずつ、 $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルとなるように分注した。前記ウェル中の細胞を24時間培養した後、前記ssRNAをトランスフェクション試薬HiPerFect Reagent（商品名、QIAGEN社）を用い、添付プロトコールに従って、トランスフェクションした。トランスフェクションは、前記ウェルあたりの組成を以下のように設定した。下記組成において、(B)は、Opti-MEM（商品名、Invitrogen）、(C)は、前記RNA溶液であり、両者をあわせて97  $\mu\text{L}$ 添加した。なお、前記ウェルにおいて、前記ssRNAの最終濃度は、1  $\text{nmol/L}$ 、10  $\text{nmol/L}$ 、100  $\text{nmol/L}$ とした。トランスフェクション後、前記ウェル中の細胞を3日間培養した。

## [0175] [表3]

(ウェルあたりの組成:  $\mu\text{L}$ )

培養液	400
(A) トランスフェクション試薬	3
(B) + (C)	97
	<hr/>
	500

[0176] そして、得られた培養細胞について、I S O G E N r e a g e n t (商品名、ニッポンジーン) を用い、添付のプロトコールに従って、R N A を回収した。

[0177] 次に、逆転写酵素 (商品名 M-M L V r e v e r s e t r a n s c r i p t a s e、I n v i t r o g e n) を用い、添付のプロトコールに従って、前記 R N A から c D N A を合成した。そして、合成した前記 c D N A を鋳型として定量的 P C R を行い、H M G A 2 c D N A の量を測定した。また、G A P D H m R N A の量を内部コントロールとし、その c D N A の量を併せて測定した。

[0178] 前記定量 P C R は、試薬として、F a s t S t a r t U n i v e r s a l S Y B R G r e e n M a s t e r (商品名、R o c h e)、サーモサイクラーとして M X 3 0 0 0 P (商品名、S t r a t a g e n e)、解析機器として M x P r o (商品名、S t r a t a g e n e) を用いた (以下、同様)。前記 H M G A 2 c D N A および G A P D H c D N A 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。反応液の全量は 2 5  $\mu$  L として、それぞれ 3 回測定した。

H M G A 2 c D N A 用プライマーセット

5' -GAAGCCACTGGAGAAAAACG-3' (配列番号 1 2)

5' -CTTCGGCAGACTCTTGAG-3' (配列番号 1 3)

G A P D H c D N A 用プライマーセット

5' -ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3' (配列番号 1 4)

5' -GGGTCATTGATGGCAATATC-3' (配列番号 1 5)

[0179] コントロールとして、前記 s s R N A 未添加の A 5 4 9 細胞についても、同様の処理および測定を行った。そして、前記コントロール (s s R N A 未添加) における H M G A 2 m R N A の量を 1 とした場合における、各トランスフェクション細胞における H M G A 2 m R N A の相対値を算出した。

[0180] これらの結果を、図 4 に示す。図 4 は、トランスフェクション時の s s R N A の終濃度が 1 0 0 n m o l / L の場合の H M G A 2 m R N A の量を示



す。図4に示すように、いずれの前記ssRNAを使用した場合も、HMGA2 mRNAの量が、コントロールよりも減少した。このように、実施例の前記ssRNAのトランスフェクションにより、HMGA2 mRNAの量が減少していることから、タンパク質の翻訳も抑制されているといえる。

[0181] (3) 成熟miRNA配列の検出

前記(2)において回収したRNAから、前記ヒトlet-7a-1 miRNAの成熟miRNA配列の定量を行った。前記定量は、TaqMan (商標) MicroRNA Assays (商品名、Applied Biosystems) を使用し、添付の説明書に従って行った。なお、反応液の全量は25  $\mu$ Lとして、それぞれ3回測定した。また、前記成熟miRNA配列の定量は、RNU6B rRNAの量で規準化した。そして、前記ssRNA未添加のA549細胞における内在性mature let7a-1の量を1として、各サンプル中の相対値を求めた。

[0182] これらの結果を図5に示す。図5は、各トランスフェクション細胞における前記ヒトlet-7a-1 miRNAの成熟miRNAの量を示すグラフである。図5において、縦軸は、mature let7a-1の量の相対値を示す。図5に示すように、実施例のいずれの前記ssRNAをトランスフェクトした細胞においても、成熟miRNAが検出された。

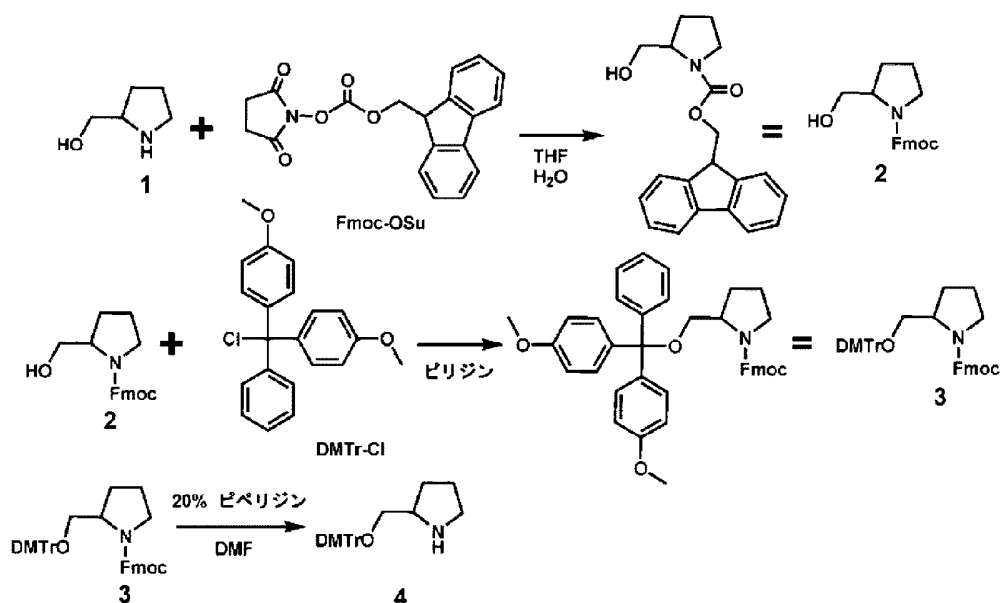
[0183] (実施例B1)

1. プロリノールの合成

下記式に示すスキーム1に従い、ジメトキシトリチル基で保護されたプロリノールを合成した。

[0184]

[化5]



スキーム 1

[0185] (1) Fmoc-L-プロリノール (化合物 2)

L-プロリノール (化合物 1) (0.61 g、6.0 mmol) を、純水 70 mL に溶解し、L-プロリノール水溶液を調製した。N-(9-フルオレニルメトキシカルボニロキシ) スクシンイミド (Fmoc-OSu) (2.0 g、6.0 mmol) を、THF 10 mL に溶解した。この THF 溶液を、前記 L-プロリノール水溶液に加え、1 時間攪拌して、両者を反応させた。この反応液を、液体画分と沈殿画分とに分離し、それぞれの画分を酢酸エチルで抽出し、それぞれ有機層を回収した。そして、それぞれの有機層を合わせた後、無水硫酸ナトリウムを添加して、水分を吸収させた (以下、乾燥という)。前記有機層をろ過して、ろ液を回収し、前記ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1) により精製し、化合物 2 を得た (1.4 g、収率 74%)。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.77 (2H, d, J=7.7 Hz, Ar-H), 7.60 (2H, d, J=7.3 Hz, Ar-H), 7.40 (2H,

t,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Ar-H), 7.31 (2H, t,  $J=7.6\text{ Hz}$ , Ar-H), 4.40–4.50 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 4.22 (1H, t,  $J=6.5\text{ Hz}$ , Ar-CH), 3.20–3.80 (5H, m, H-5, H-6), 1.75 (3H, m, H-3, H-4), 1.40 (1H, m, H-3).

[0186] (2) Fmoc-DMTr-L-プロリノール (化合物3)

前記Fmoc-L-プロリノール (化合物2) (1.4 g、4.3 mmol) を、ピリジン20 mLに溶解して、3回共沸した。得られた残留物を、ピリジン20 mLに溶解した。この溶液を、アルゴン雰囲気下、氷浴中で、攪拌しながら、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTr-Cl) (1.8 g、5.3 mmol) を添加した。この反応液について、クロロホルム/メタノールのTLCにより反応を追跡し、Fmoc-L-プロリノールのスポットが消えるまで、4時間反応させた。そして、過剰のDMTr-Clをクエンチするために、前記反応液に、メタノール3 mLを加えて10分攪拌した。前記反応液に、さらに、クロロホルムを加えた後、有機層を回収した。回収した前記有機層に、飽和食塩水による洗浄、5%炭酸水素ナトリウム水溶液による洗浄を行い、もう一度、飽和食塩水による洗浄を行った。洗浄後の有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム、1%ピリジン) により精製し、化合物3を得た (2.0 g、収率74%)。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.77 (2H, d,  $J=7.7\text{ Hz}$ , Ar-H), 7.60 (2H, d,  $J=7.3\text{ Hz}$ , Ar-H), 7.40–7.18 (13H, m, Ar-H), 6.89 (4H, d,  $J=8.6\text{ Hz}$ , Ar-H), 4.20–4.40 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 4.02 (1H, t,  $J=6.5\text{ Hz}$ , Ar-CH), 3.80–3.10 (5H, m, H-5, H-6), 3.73 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 1.84 (3H, m

, H-3, H-4), 1.58 (1H, m, H-3).

[0187] (3) DMT r-L-プロリノール (化合物4)

前記 Fmoc-DMT r-L-プロリノール (化合物3) (2.0 g、3.2 mmol) を、20% ピペリジンを含む DMF 溶液 25 mL に溶解し、12 時間攪拌した。この溶液を減圧濃縮し、得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム: メタノール = 85:15、1% ピペリジン含有) で精製し、化合物4を得た (1.0 g、収率78%)。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

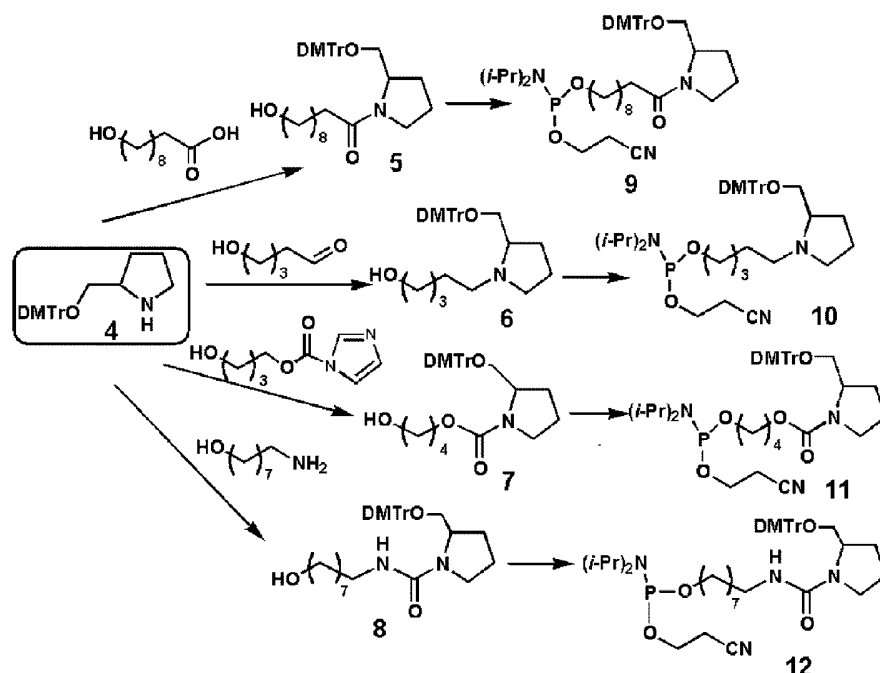
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.40–7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J=8.6\text{ Hz}$ , Ar-H), 3.78 (6H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.31 (1H, m, H-6), 3.07 (2H, m, H-2, H-6), 2.90 (2H, m, H-5), 1.84 (3H, m, H-3, H-4), 1.40 (1H, m, H-3).

[0188] 2. アミダイト誘導体の合成

つぎに、下記式に示すスキーム2に従い、プロリノールを有するアミダイト誘導体を合成した。以下、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を、「EDC」、N,N-ジメチルアミノピリジン (4-ジメチルアミノピリジン) を「DMAP」という。

[0189]

[176]



スキーム 2

[0190] (1) DMT r-アミド- $\gamma$ -プロピノール (化合物5)

前記DMTr-Loopリノール（化合物4）（0.80g、2.0mmol）、EDC（0.46g、2.4mmol）およびDMAP（0.29g、2.4mmol）を、ジクロロメタン20mLに溶解して攪拌した。この溶液に、10-ヒドロキシデカン酸（0.45g、2.4mmol）を添加し、攪拌した。この反応液について、酢酸エチルのTLCにより反応を追跡し、DMTr-Loopリノールのスポットが消えるまで、20時間反応させた。そして、前記反応液に、ジクロロメタンを加えた後、有機層を回収した。回収した前記有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル、1%ピリジン含有）により精製し、化合物5を得た（0.71g、収率62%）。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

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

, s, OCH<sub>3</sub>), 3.68–2.93 (7H, m, H-2, H-5, H-6), 2.27–1.72 (6H, m, アルキル, H-3, H-4), 1.58 (4H, s, アルキル), 1.30 (10H, s, アルキル).

[0191] (2) DMT r-アルキル-Ｌ-プロリノール (化合物6)

前記DMT r-Ｌ-プロリノール (化合物4) (0.80g、2.0mmol) を、メタノール15mLに溶解し、5-ヒドロキシペンタナール (0.31g、3.0mmol) を加えて攪拌した。この溶液に、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (0.25g、4.0mmol) を加え、さらに攪拌した。この反応液について、酢酸エチル／ヘキサンのTLCにより反応を追跡し、DMT r-Ｌ-プロリノールのスポットが消えるまで、24時間反応させた。そして、前記反応液に、酢酸エチルを加え、有機層を回収した。回収した前記有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=1：1、1%ピリジン含有) により精製し、化合物6を得た (0.62g、収率63%)。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.40–7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d, J=8.6Hz, Ar-H), 3.78 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.70–2.86 (4H, m, CH<sub>2</sub>OH, H-6), 2.06–1.79 (5H, m, アルキル, H-2, H-5), 1.74–1.49 (6H, m, アルキル, H-3, H-4), 1.45–1.27 (4H, m, アルキル)。

[0192] (3) DMT r-ウレタン-Ｌ-プロリノール (化合物7)

1,4-ブタンジオール (0.90g、10mmol) を、ジクロロメタン30mLに溶解し、さらに、カルボニルジイミダゾール (1.4g、8.6mmol) を加え、3時間攪拌した。この反応液の有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフ

ィー（クロロホルム：メタノール＝9：1）により精製した。これによって、1, 4-ブタンジオールの一方の末端がカルボニルジイミダゾールで活性化された化合物を得た（0.25 g, 1.5 mmol）。この化合物をジクロロメタン15 mLに溶解し、前記DMTr-Loopリノール（化合物4）（0.6 g, 1.5 mmol）を添加し、24時間攪拌した。この混合液に、さらに、酢酸エチルを加え、有機層を回収した。回収した前記有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1、1%ピリジン含有）により精製し、化合物7を得た（0.61 g、収率77%）。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J=8.6\text{ Hz}$ , Ar-H), 4.24–3.94 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.72–2.96 (7H, m, アルキル, H-2, H-5, H-6), 2.10–1.30 (8H, m, アルキル, H-3, H-4) .

[0193] (4) DMTr-ウレイド-Loopリノール（化合物8）

前記DMTr-Loopリノール（化合物4）（0.50 g, 1.2 mmol）およびトリホスゲン（0.12 g, 0.40 mmol）を、ジクロロメタン8 mLに溶解し、アルゴン雰囲気下、氷浴中で、攪拌した。そして、前記溶液に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン（0.31 g, 2.4 mmol）を添加し、1時間攪拌した。さらに、前記溶液に、8-アミノ-1-オクタノール（0.17 g, 1.2 mmol）を添加し、同様にして氷浴中で30分攪拌した後、室温で20時間攪拌した。前記溶液に、ジクロロメタンを加え、有機層を回収した。回収した前記有機層を、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝4：1、1%トリエチルアミン含有）により精製し

、化合物8を得た(0.44 g、収率62%)。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, m, Ar-H), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.68–3.25 (9H, m,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ , H-2, H-5, H-6), 1.74–1.18 (16H, m, アルキル, H-3, H-4)。

[0194] (5) プロリノールを有するアミダイト誘導体(化合物9~12)

前記修飾プロリノール(化合物5~8)を、それぞれ原料として、以下に示す方法により、化合物9~12を合成した。前記修飾プロリノールおよび5-ベンジルチオ-1H-テトラゾールを、アセトニトリル3 mLに溶解した。前記修飾プロリノールの使用量は、化合物5の場合、0.69 g (1.2 mmol)、化合物6の場合、0.60 g (1.2 mmol)、化合物7の場合、0.60 g (1.2 mmol)、化合物8の場合、0.25 g (0.43 mmol)とした。また、5-ベンジルチオ-1H-テトラゾールの使用量は、化合物5~7に対しては、0.15 g (0.78 mmol)、化合物8に対しては、54 mg (0.15 mmol)とした。前記溶液に、アルゴン雰囲気下、2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトを添加し、2時間攪拌した。前記2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトの添加量は、前記化合物5~7を使用した系では、0.54 g (1.8 mmol)とし、前記化合物8を使用した系では、0.19 g (0.64 mmol)とした。そして、前記溶液に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を添加し、さらに、ジクロロメタンで抽出し、有機層を回収した。回収した前記有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=1:1、1%トリエチルアミン含有)により精製し、化合物9~12を得た。以下に、各化合物のNMRの結果を示す。

[0195] DMT r-アミド-Loopプロリノールアミダイト(化合物9、0.60 g、



収率55%)

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

[0196] DMT r-アルキル- $\text{L}$ -プロリノールアミダイト (化合物10、0.71g、収率60%)

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

[0197] DMT r-ウレタン- $\text{L}$ -プロリノールアミダイト (化合物11、0.67g、収率52%)

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

[0198] DMT r-ウレイド- $\text{L}$ -プロリノールアミダイト (化合物12、0.20g、収率61%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.14 (9H, m, Ar-H)

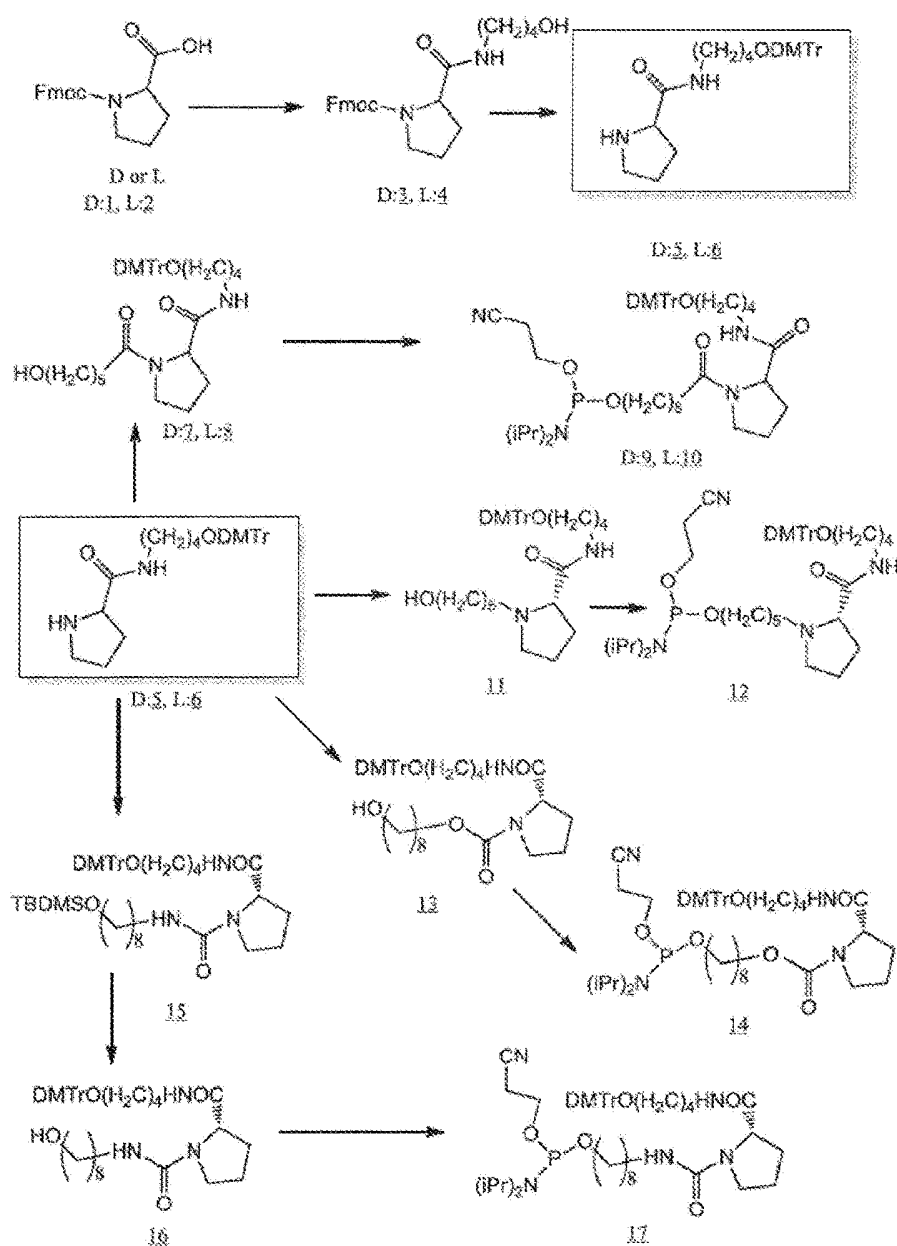
), 6.82 (4H, m, Ar-H), 3.78 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.65-3.25 (13H, m, CH<sub>2</sub>O, POCH<sub>2</sub>, CHCH<sub>3</sub>, H-2, CH<sub>2</sub>NH, CH<sub>2</sub>OH, H-2, H-5, H-6), 2.73 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2.10-1.48 (16H, m, アルキル, H-3, H-4), 1.35-1.10 (12H, m, CHCH<sub>3</sub>).

[0199] (実施例 B 2)

つぎに、下記式に示すスキーム 3 に従い、L-プロリンを有するアミダイト誘導体を合成した。

[0200]

[化7]



スキーム 3

[0201] (1) DMT r-ヒドロキシアミドアミノ-L-プロリン (化合物 11)

DMT r-アミド-L-プロリン (化合物 6) (1.00 g、2.05 mmol) および 5-ヒドロキシペンタナール (0.33 g、3.07 mmol) を含むエタノール溶液 (7 mL) に、氷冷下、酢酸緩衝液 (7 mL) を加えた。この混合液を、氷冷下、20 分撹拌した後、シアノ化ホウ素ナトリ

ウム (0.77 g、12.28 mmol) を加え、さらに、室温下、7 時間攪拌した。前記混合液をジクロロメタンで希釈し、水で洗浄した後、さらに飽和食塩水で洗浄した。そして、前記有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、ろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 98 : 2$ 、0.05%ピリジン含有) に供した。ついで、得られた生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 98 : 2$ 、0.05%ピリジン含有) に供し、さらに、得られた生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ジクロロメタン : アセトン = 7 : 3、0.05%ピリジン含有) に供した。これによって、無色シロップ状の化合物 11 を得た (0.49 g、収率 41%)。

Ms (FAB+) :  $m/z$  575 ( $\text{M}^+$ )、303 ( $\text{DMTr}^+$ )

[0202] (2) DMTr-アミドアミノ-L-プロリンアミダイト (化合物 12)

得られた前記 DMTr-ヒドロキシアミドアミノ-L-プロリン (化合物 11) (0.50 g、0.87 mmol) を無水アセトニトリルと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (178 mg、1.04 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (1 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (313 mg、1.04 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で 4 時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で、順次洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られた前記ろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカを用いたカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン : アセトン = 7 : 3、0.05%ピリジン含有) に供し、無色シロップ状の化合物 12 (0.57 g

、純度 93%、収率 79%) を得た。前記純度は、HPLC により測定した (以下、同様)。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.41–7.43 (m, 2H, Ar–H)、7.28–7.32 (m, 4H, Ar–H)、7.25–7.27 (m, 2H, Ar–H)、7.18–7.21 (m, 1H, Ar–H)、6.80–6.84 (m, 4H, Ar–H)、3.73–3.84 (m, 1H)、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.47–3.64 (m, 3H)、3.12–3.26 (m, 2H)、3.05 (t,  $J=6.4\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.98–2.02 (m, 2H)、2.61 (t,  $J=5.8\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.55–2.63 (m, 2H)、2.27–2.42 (m, 1H, CH)、2.31 (t,  $J=7.8\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.03–2.19 (m, 1H, CH)、1.40–1.90 (m, 8H)、1.23–1.33 (m, 5H)、1.14–1.20 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ) ;

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

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

[0203] (3) DMT r-ヒドロキシアミドカルバモイル- $\text{L}$ -プロリン (化合物 13)

DMT r-アミド- $\text{L}$ -プロリン (化合物 6) (1.00 g、2.05 mmol) を溶解した無水アセトニトリル溶液 (10 mL) に、1-イミダゾカルボニルオキシ-8-ヒドロキシオクタン (1.12 g、4.92 mmol) を溶解した無水アセトニトリル溶液 (20 mL) を、アルゴン雰囲気下、室温で加えた。この混合液を、40–50°C で 2 日間加熱した後、5 日間室温で放置した。前記混合液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ジクロロメタン : アセトン = 4 : 1、0.05% ピリジン含有) に供した。これによって、無色シロップ状の化合物 13 を得た (0.68 g、収率 50%)。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.42 (m, 2H, Ar-H)、7.27–7.31 (m, 6H, Ar-H)、7.17–7.21 (m, 1H, Ar-H)、6.79–6.82 (m, 4H, Ar-H)、4.23–4.30 (m, 1H)、4.05–4.10 (m, 2H)、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.60–3.65 (m, 2H)、3.32–3.55 (m, 2H)、3.16–3.29 (m, 2H)、3.01–3.07 (m, 2H)、2.38–2.40 (m, 1H, CH)、1.83–1.90 (m, 2H)、1.57–1.69 (m, 8H)、1.26–1.36 (m, 2H) ;

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

[0204] (4) DMTr-アミドカルバモイル- $\text{L}$ -プロリンアミダイト (化合物 14)

得られた前記 DMTr-ヒドロキシアミドカルバモイル- $\text{L}$ -プロリン (化合物 13) (0.63 g、1.00 mmol) を無水ピリジンと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (206 mg、1.20 mmol) を加え、減圧下に脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (1 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (282 mg、1.12 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で4時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカを用いたカラムクロマト (展開溶媒 ヘキサン : アセトン = 7 : 3、0.5%ピリジン含有) に供し、無色シロップ状の化合物 14 (0.74 g、純度 100%、収率 87%) を得た。以下に、化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  147.19 ;

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

[0205] (5) DMT  $r$ - $t$ -ブチルジメチルシロキシアミドウレイドーロープロリン (化合物15)

トリホスゲン (1.22 g、4.10 mmol) に、アルゴン雰囲気および氷冷下、無水テトラヒドロフラン溶液 (10 mL) を加えた。この混合液に、アルゴン雰囲気および氷冷下、DMT  $r$ -アミドローロープロリン (化合物6) (1.00 g、2.05 mmol) およびDIEA (9.80 g、75.8 mmol) を溶解した無水テトラヒドロフラン溶液 (10 mL) を、30分間で滴下し、その後、室温で1時間攪拌した。前記混合液に、アルゴン雰囲気および氷冷下、10-アミノ-1- $t$ -ブチルジメチルシロキシデカン (2.66 g、10.25 mmol) およびDIEA (3.20 g、24.76 mmol) を溶解した無水テトラヒドロフラン溶液 (20 mL) を、45分間で滴下した。そして、前記混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で一晩攪拌した。この混合液を酢酸エチル (200 mL) で希釈し、有機層を回収した。前記有機層を、飽和重曹水で洗浄した後、さらに、飽和食塩水で洗浄した。そして、有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、ろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ジクロロメタン : アセトン = 4 : 1、0.05%ピリジン含有) に供した。これによって、無色シロップ状の化合物15を得た (0.87 g、収率55%)。

[0206] (6) DMT  $r$ -ヒドロキシアミドウレイドーロープロリン (化合物16)

得られた前記DMT  $r$ - $t$ -ブチルジメチルシロキシアミドウレイドーロープロリン (化合物15) (0.87 g、1.12 mmol) に、アルゴン雰囲気下、無水テトラヒドロフランジクロロメタン溶液 (10 mL) を室温で加えた。前記混合液に、アルゴン雰囲気下、1 mol/Lテトラブチルアンモニウムフルオライド含有テトラヒドロフラン溶液 (4.69 mL、東京化成) を加え、室温で3日間攪拌した。前記混合液をジクロロメタン (150 mL)

L)で希釈し、水で洗浄した後、さらに飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ジクロロメタン：アセトン＝1：1、0.05%ピリジン含有）に供し、無色シロップ状の化合物16を得た（0.68 g、収率92%）。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.41–7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.27–7.31 (m, 4H, Ar-H)、7.19–7.26 (m, 2H, Ar-H)、7.19–7.21 (m, 1H, Ar-H)、6.80–6.83 (m, 4H, Ar-H)、4.34 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.63 (d, 1H,  $J=6.4\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ )、3.61 (d, 1H,  $J=6.4\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ )、3.34–3.37 (m, 1H, CH)、3.16–3.27 (m, 5H)、3.04 (t,  $J=5.9\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.38–2.45 (m, 1H, CH)、1.83–2.05 (m, 3H)、1.45–1.64 (m, 8H)、1.25–1.38 (m, 7H)。

[0207] (7) DMT r-アミドウレイドーL-プロリンアミダイト（化合物17）

得られた前記DMT r-ヒドロキシアミドウレイドーL-プロリン（化合物16）（0.62 g、0.94 mmol）を無水アセトニトリルと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド（192 mg、1.12 mmol）を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合液に対し、無水アセトニトリル（1 mL）を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト（282 mg、1.12 mmol）の無水アセトニトリル溶液（1 mL）を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で4時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で、順次洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られた前記ろ液について、



減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカを用いたカラムクロマト（展開溶媒 ヘキサン：アセトン＝１：１、０．０５％ピリジン含有）に供し、無色シロップ状の化合物１７を得た（０．７７ｇ、純度８８％、収率８４％）。以下に、化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1.47, 2.7 ;

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

[0208] （実施例Ｂ３）プロリンジアミドアミダイトの合成

プロリン骨格を有するリンカーを含む本発明の核酸分子を生成するため、前記スキーム３により、Ｌ－プロリンジアミドアミダイトおよびＤ－プロリンジアミドアミダイトを合成した。

[0209] （Ｂ３－１）Ｌ－プロリンジアミドアミダイト

（１） $\text{Fmoc}$ －ヒドロキシアミド－Ｌ－プロリン（化合物４）

前記スキーム３の化合物２（ $\text{Fmoc}$ －Ｌ－プロリン）を開始原料とした。前記化合物２（１０．００ｇ、２９．６４ｍｍｏｌ）、４－アミノ－１－ブタノール（３．１８ｇ、３５．５６ｍｍｏｌ）および１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（１０．９０ｇ、７０．７２ｍｍｏｌ）を混合し、前記混合物に対し、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に、無水アセトニトリル（１４０ｍＬ）を室温に加え、さらに、ジシクロヘキシルカルボジイミド（７．３４ｇ、３５．５６ｍｍｏｌ）の無水アセトニトリル溶液（７０ｍＬ）を添加した後、アルゴン雰囲気下、室温で１５時間攪拌した。反応終了後、生成した沈殿をろ別し、回収したろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣にジクロロメタン（２００ｍＬ）を加え、飽和重曹水（２００ｍＬ）で洗浄した。そして、有機層を回収し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去し、その残渣にジエチルエーテル（２００ｍＬ）を加え、粉末化した。生じた粉末を濾取することにより、無色粉末状の化合物４（１０．３４ｇ、収率８４％）を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

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

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

[0210] (2) DMT r-アミド-Loopロリン (化合物6)

Fmoc-ヒドロキシアミド-Loopロリン (化合物4) (7.80 g、19.09 mmol) を無水ピリジン (5 mL) と混合し、室温で2回共沸乾燥した。得られた残留物に、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (8.20 g、24.20 mmol)、DMAP (23 mg、0.19 mmol) および無水ピリジン (39 mL) を加えた。この混合物を、室温で1時間攪拌した後、メタノール (7.8 mL) を加え、室温で30分攪拌した。この混合物を、ジクロロメタン (100 mL) で希釈し、飽和重曹水 (150 mL) で洗浄後、有機層を分離した。前記有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた未精製の残渣に、無水ジメチルホルムアミド (39 mL) およびピペリジン (18.7 mL、189 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、前記混合液について、減圧下、室温で、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (商品名 Wakogel C-300、展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ 、0.05%ピリジン含有に供し、淡黄色油状の化合物6 (9.11 g、収率98%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.39–7.43 (m, 2H, Ar–H)、7.30 (d,  $J=8.8\text{ Hz}$ , 4H, Ar–H)、7.21 (tt

, 1 H, 4.9, 1.3 Hz, Ar-H)、6.81 (d, J=8.8 Hz, 4 H, Ar-H)、3.78 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>)、3.71 (dd, H, J=6.3 Hz, 5.4 Hz, CH)、3.21 (2 H, 12.9, 6.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>)、3.05 (t, J=6.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>)、2.85–2.91 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>)、2.08–2.17 (m, 1 H, CH)、1.85–2.00 (m, 3 H)、1.55–1.65 (m, 5 H) :

Ms (FAB+) ; m/z 489 (M+H<sup>+</sup>)、303 (DMTr<sup>+</sup>)

.

[0211] (3) DMTr-ヒドロキシジアミド-Loopリン (化合物8)

得られた前記DMTr-アミド-Loopリン (化合物6) (6.01 g、12.28 mmol)、EDC (2.83 g、14.74 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (3.98 g、29.47 mmol) およびトリエチルアミン (4.47 g、44.21 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (120 mL) を混合した。この混合液に、さらに、アルゴン雰囲気下、室温で、6-ヒドロキシヘキサン酸 (1.95 g、14.47 mmol) を加え、その後、アルゴン雰囲気下、室温で、1時間攪拌した。前記混合液をジクロロメタン (600 mL) で希釈し、飽和食塩水 (800 mL) で3回洗浄した。有機層を回収し、前記有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。これにより、淡黄色泡状の前記化合物8 (6.29 g、収率85%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.41–7.43 (m, 2 H, Ar-H)、7.27–7.31 (m, 4 H, Ar-H)、7.19–7.26 (m, 2 H, Ar-H)、7.17–7.21 (m, 1 H, Ar-H)、6.79–6.82 (m, 4 H, Ar-H)、4.51–4.53 (m, 1 H, CH)、3.79 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>)、3.61 (t, 2 H, J=6.4 Hz, CH<sub>2</sub>)、3.50–3.55 (m, 1 H, CH)、3.36–3.4

3 (m, 1 H, CH), 3.15–3.24 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.04 (t, J=6.3 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.38–2.45 (m, 1 H, CH), 2.31 (t, 6.8 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.05–2.20 (m, 1 H, CH), 1.92–2.00 (m, 1 H, CH), 1.75–1.83 (m, 1 H, CH), 1.48–1.71 (m, 8 H), 1.35–1.44 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>);

Ms (FAB+): m/z 602 (M<sup>+</sup>), 303 (DMTr<sup>+</sup>).

[0212] (4) DMTr-ジアミド-Looprolinアミダイト (化合物10)

得られた前記DMTr-ヒドロキシジアミド-Looprolin (化合物8) (8.55 g, 14.18 mmol) を無水アセトニトリルと混合し、室温で3回共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (2.91 g, 17.02 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (10 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (5.13 g, 17.02 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (7 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で2時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水 (200 mL) で3回洗浄した後、飽和食塩水 (200 mL) で洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られた前記ろ液について、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン: 酢酸エチル=1:3, 0.05%ピリジン含有) に供し、無色シロップ状の化合物10 (10.25 g, 純度92%, 収率83%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.40–7.42 (m, 2 H, Ar-H), 7.29–7.31 (m, 4 H, Ar-H), 7.25–7.27 (m, 2 H, Ar-H), 7.17–7.21 (m, 1 H, Ar-H), 6.80–6.82 (m, 4 H, Ar-H), 4.51–4.53 (m, 1 H,

CH)、3.75–3.93 (m, 4H)、3.79 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>)、3.45–3.60 (m, 4H)、3.35–3.45 (m, 1H, CH)、3.20–3.29 (m, 1H)、3.04 (t, J=6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)、2.62 (t, J=5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)、2.40–2.44 (m, 1H, CH)、2.31 (t, 7.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)、2.03–2.19 (m, 1H, CH)、1.92–2.02 (m, 1H, CH)、1.70–1.83 (m, 1H, CH)、1.51–1.71 (m, 8H)、1.35–1.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)、1.18 (d, J=6.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>)、1.16 (d, J=6.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>) ;

P-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : Ms δ 147.17 ;

Ms (FAB+) : m/z 802 (M<sup>+</sup>)、303 (DMTr<sup>+</sup>)、201 (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>OP<sup>+</sup>) .

[0213] (B3-2) D-プロリンジアミドアミダイト

(1) Fmoc-ヒドロキシアミド-D-プロリン (化合物3)

前記スキーム3の化合物1 (Fmoc-D-プロリン) を開始原料とした。前記化合物1 (1.5 g、4.45 mmol)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (1.1 g、5.34 mmol) および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (1.5 g、10.69 mmol) の混合物に対し、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に、無水アセトニトリル (24 mL) を室温に加え、さらに、4-アミノ-1-ブタノール (0.48 g、5.34 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (6 mL) 添加した後、アルゴン雰囲気下、室温で15時間攪拌した。反応終了後、生成した沈殿をろ別し、回収したろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣にジクロロメタンを加え、酢酸緩衝液 (pH 4.0) で3回、飽和重曹水で3回洗浄した。そして、有機層を回収し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒留去し、その残渣にジエチルエーテル (50 mL) を加え、粉末化した。生じた粉末を濾取するこ

とにより、白色粉末状の化合物3を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.77 (d,  $J=7.3$  Hz, 2H) ; 7.58 (br, 2H) ; 7.41 (t,  $J=7.3$  Hz, 2H) ; 7.32 (t,  $J=7.3$  Hz, 2H) ; 4.25–4.43 (m, 4H) ; 3.25–3.61 (m, 6H) ; 1.57–1.92 (m, 8H) .

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

[0214] (2) DMT r-アミド-D-プロリン (化合物5)

Fmoc-ヒドロキシアミド-D-プロリン (化合物3) (1.0 g、2.45 mmol) を無水ピリジン (5 mL) と混合し、室温で2回共沸乾燥した。得られた残留物に、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (1.05 g、3.10 mmol) 、DMAP (3 mg、0.024 mmol) および無水ピリジン (5 mL) を加えた。この混合物を、室温で1時間攪拌した後、メタノール (1 mL) を加え、室温で30分攪拌した。この混合物を、ジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で洗浄後、有機層を分離した。前記有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた未精製の残渣に、無水ジメチルホルムアミド (5 mL) およびピペリジン (2.4 mL、24 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、前記混合液について、減圧下、室温で、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (商品名Wakogel C-300、展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  :  $\text{CH}_3\text{OH}=9:1$ 、0.05%ピリジン含有) に供し、淡黄色油状の化合物5 (1.26 g、収率96%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.62 (br, 1H) ; 7.41–7.44 (m, 2H) ; 7.26–7.33 (m, 6H) ; 7.17–7.22 (m, 1H) ; 6.80–6.84 (m, 4H) ; 3.7

8 (s, 6H) ; 3.71 (dd,  $J=8.8, 5.4$  Hz, 1H) ; 3.22 (q, 6.5 Hz, 2H) ; 3.07 (t,  $J=6.1$  Hz, 2H) ; 2.97–3.03 (m, 1H) ; 2.85–2.91 (m, 1H) ; 1.85–2.15 (m, 3H) ; 1.55–1.73 (m, 6H) .  
MS (FAB+) :  $m/z$  489 ( $M+H^+$ ), 303 (DMTr<sup>+</sup>) .

[0215] (3) DMTr-ヒドロキシジアミド-D-プロリン (化合物7)

得られた前記DMTr-アミド-D-プロリン (化合物5) (1.2 g、2.45 mmol)、EDC (566 mg、2.95 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (796 mg、5.89 mmol)、およびトリエチルアミン (1.2 mL、8.84 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (24 mL) を混合した。この混合液に、さらに、アルゴン雰囲気下、室温で、6-ヒドロキシヘキサン酸 (390 mg、2.95 mmol) を加え、その後、アルゴン雰囲気下、室温で1時間攪拌した。前記混合液をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で3回洗浄した。有機層を回収し、前記有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。これにより、淡黄色油状の化合物7 (1.4 g、収率95%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.43 (m, 2H) ; 7.25–7.32 (m, 6H) ; 7.17–7.22 (m, 1H) ; 6.79–6.83 (m, 4H) ; 3.79 (s, 6H) ; 3.58–3.63 (m, 2H) ; 3.49–3.55 (m, 1H) ; 3.15–3.26 (m, 2H) ; 3.02–3.07 (m, 2H) ; 2.30–2.33 (m, 2H) ; 2.11–2.20 (m, 1H) ; 1.50–1.99 (m, 13H) ; 1.36–1.43 (m, 2H) .

MS (FAB+) :  $m/z$  602 ( $M^+$ ), 303 (DMTr<sup>+</sup>) .

[0216] (4) DMTr-ジアミド-D-プロリンアミダイト (化合物9)

得られた前記DMTr-ヒドロキシジアミド-D-プロリン（化合物7）（1.2 g、1.99 mmol）を無水アセトニトリルと混合し、室温で3回共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド（410 mg、2.40 mmol）を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル（2.4 mL）を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト（722 mg、2.40 mmol）を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で2時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で3回洗浄後、飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：酢酸エチル＝1：3）に供し、無色油状の化合物9（1.4 g、純度95%、収率83%）を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.43 (m, 2H) ; 7.25–7.32 (m, 6H) ; 7.14–7.21 (m, 1H) ; 6.80–6.83 (m, 4H) ; 3.80–3.85 (m, 2H) ; 3.79 (s, 6H) ; 3.49–3.65 (m, 5H) ; 3.02–3.06 (m, 2H) ; 2.60–2.63 (m, 2H) ; 2.29–2.33 (m, 2H) ; 1.77–1.82 (m, 2H) ; 1.56–1.68 (m, 8H) ; 1.38–1.43 (m, 2H) ; 1.15–1.29 (m, 18H) .

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  146.94.

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

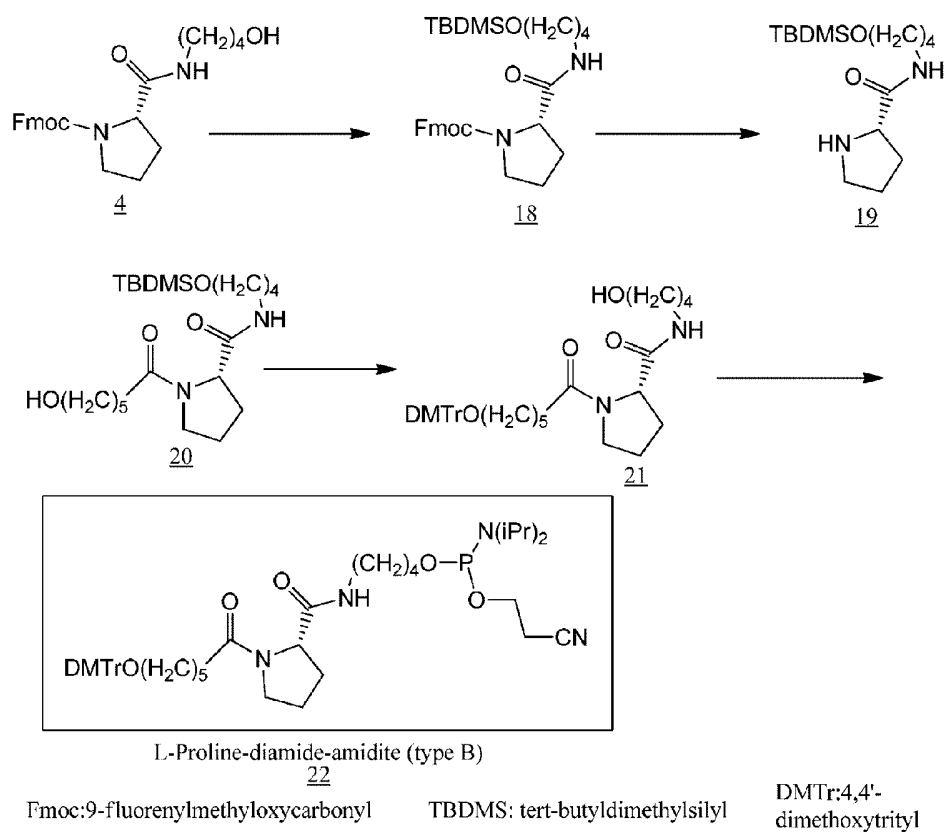
[0217] （実施例B4）

プロリン骨格を有するリンカーを含む本発明の核酸分子を生成するため、



下記スキーム 4 により、L-プロリンジアミドアミダイトタイプ B を合成した。

[0218] [化8]



スキーム 4

[0219] (1) Fmoc- $\alpha$ -tert-butyl-L-glutamate-L-proline (化合物 18)

Fmoc- $\alpha$ -hydroxy-L-proline (化合物 4) (2.00 g、30 mmol)、 $\alpha$ -tert-butyl-L-glutamate-L-proline (1.11 g、35 mmol) およびイミダゾール (10.90 g、71 mmol) を混合した。前記混合物に対し、減圧下に脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に、無水アセトニトリル (20 mL) を室温に加え、アルゴン雰囲気下、室温で終夜攪拌した。反応終了後、前記混合物にジクロロメタン (150 mL) を加え、水で 3 回洗浄し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液につい

て、減圧下で溶媒を留去し、その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 95 : 5$ ）に供し、無色シロップ状の化合物 18（2.35 g、収率 92%）を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.76–7.78 (m, 2H, Ar–H)、7.50–7.63 (m, 2H, Ar–H)、7.38–7.42 (m, 2H, Ar–H)、7.29–7.34 (m, 2H, Ar–H)、4.10–4.46 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ )、3.47–3.59 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ )、3.20–3.26 (m, 2H, CH)、1.85–1.95 (m, 2H)、1.42–1.55 (m, 6H)、0.96 (s, 9H, t–Bu)、0.02 (s, 6H,  $\text{SiCH}_3$ ) ;

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

[0220] (2) t–ブチルージメチルシロキシアミド–L–プロリン（化合物 19）

得られた前記 Fmoc–t–ブチルージメチルシロキシアミド–L–プロリン（化合物 18）（1.18 g、2.5 mmol）に対し、無水アセトニトリル（5 mL）およびピペリジン（2.4 mL）を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、前記混合物にアセトニトリル（50 mL）を加え、不溶物をろ別した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$ ）に供し、無色シロップ状の化合物 19（0.61 g、収率 90%）を得た。以下に、前記化合物の NMR の結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  3.71 (dd, 1H,  $J = 9.0 \text{ Hz}$ , 5.2 Hz, CH)、3.61–3.64 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.22–3.28 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.98–3.04 (m, 1H, CH)、2.86–2.91 (m, 1H, CH)、2.08–2.17 (m, 1H, CH)、1.86–1.93 (m, 1H, CH)、1.66–1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、1.52–1.57 (m, 4H)、0.89 (s, 9H, t–Bu)、0.05 (s, 6H,  $\text{SiCH}_3$ ) :

Ms (FAB+) ;  $m/z$  301 ( $M+H^+$ ) .

[0221] (3) t-ブチルジメチルシロキシアミドヒドロキシアミド- $\gamma$ -プロリン (化合物20)

得られた前記 t-ブチルジメチルシロキシアミド- $\gamma$ -プロリン (化合物19) (550 mg、1.8 mmol)、6-ヒドロキシヘキサン酸 (300 mg、2.3 mmol)、EDC (434 mg、2.3 mmol)、および 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (695 mg、4.5 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (20 mL) を混合した。前記混合物に、アルゴン雰囲気下、室温で、トリエチルアミン (689 mg、6.8 mmol) を加え、その後、アルゴン雰囲気下、室温で、終夜撹拌した。前記混合液を飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、前記を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒  $CH_2Cl_2 : CH_3OH = 9 : 1$ ) に供し、無色シロップ状の化合物20 (696 mg、収率92%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  4.54 (d, 1H, CH)、3.58–3.67 (m, 5H)、3.52–3.56 (m, 1H, CH)、3.32–3.39 (m, 1H)、3.20–3.25 (m, 2H)、2.40–2.43 (m, 1H, CH)、2.33 (t,  $J=7.3$  Hz, 2H,  $CH_2$ )、2.05–2.25 (m, 2H)、1.93–2.03 (m, 1H, CH)、1.75–1.85 (m, 1H, CH)、1.50–1.73 (m, 8H)、1.37–1.46 (m, 2H,  $CH_2$ )、0.87 (s, 9H, t-Bu)、0.04 (s, 6H,  $SiCH_3$ ) ;

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

[0222] (4) DMT  $\gamma$ -ヒドロキシジ- $\gamma$ -プロリンタイプB (化合物21)

得られた前記 t-ブチルジメチルシロキシアミドヒドロキシアミド- $\gamma$ -プロリン (化合物20) (640 mg、1.54 mmol) を無水ピリジ

ン（１ｍＬ）と混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、４，４′-ジメトキシトリチルクロリド（６５７ｍｇ、１．８５ｍｍｏｌ）、DMA P（２ｍｇ）および無水ピリジン（５ｍＬ）を加え、室温で４時間攪拌した後、メタノール（１ｍＬ）を加え、３０分室温で攪拌した。前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水で洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣に、無水アセトニトリル（５ｍＬ）および１ｍｏｌ／Ｌテトラブチルアンモニウムフルオリド含有テトラヒドロフラン溶液（１．４２ｍＬ、テトラブチルアンモニウムフルオリド１．４２ｍｍｏｌ）を加え、室温で終夜攪拌した。反応終了後、前記混合物に酢酸エチル（１００ｍＬ）を加え、水で洗浄した後、飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 95 : 5$ 、０．０５％ピリジン含有）に供し、無色シロップ状の化合物２１（６８０ｍｇ、収率７３％）を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  ７．４１－７．４４ (m, 2H, Ar-H)、７．２６－７．３３ (m, 4H, Ar-H)、７．１８－７．２１ (m, 2H, Ar-H)、７．１７－７．２１ (m, 1H, Ar-H)、６．８０－６．８４ (m, 4H, Ar-H)、４．５１－４．５３ (d, 6.8Hz, 1H, CH)、３．７９ (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、３．６１ (dd, 2H,  $J = 11\text{Hz}$ , 5.4Hz,  $\text{CH}_2$ )、３．５０－３．５４ (m, 1H, CH)、３．３６－３．４３ (m, 1H, CH)、３．２０－３．２６ (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、３．０５ (t,  $J = 6.4\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、２．３８－２．４５ (m, 1H, CH)、２．３０ (t,  $J = 7.8\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、２．０５－２．２５ (m, 1H, CH)、１．９２－２．００ (m, 1H, CH)、１．７５－１．８３ (m, 1H, CH)、１．５２－１．６７ (m, 8H)、１．３５－１．４５ (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ;

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

[0223] (5) DMTr-ジアミド-LoopリンアミダイトタイプB (化合物22)

得られた前記DMTr-ヒドロキシジアミド-LoopリンタイプB (化合物21) (637 mg、1.06 mmol) を無水アセトニトリルと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (201 mg、1.16 mmol) を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル (1 mL) を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (350 mg、1.16 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で4時間攪拌した。前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られたろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン : アセトン = 7 : 3) に供し、無色シロップ状の化合物22 (680 mg、純度95%、収率76%) を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.41–7.43 (m, 2H, Ar-H)、7.25–7.32 (m, 4H, Ar-H)、7.17–7.22 (m, 2H, Ar-H)、6.80–6.83 (m, 4H, Ar-H)、4.53 (d,  $J=7.8\text{ Hz}$ , 1H, CH)、3.75–3.93 (m, 3H)、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.46–3.68 (m, 5H)、3.34–3.41 (m, 1H, CH)、3.10–3.31 (m, 1H, CH)、3.05 (t,  $J=6.3\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.62 (t,  $J=6.3\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.39–2.46 (m, 1H, CH)、2.29 (t,  $J=7.3\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.03–2.19 (m, 1H, CH)、1.90–2.00 (m, 1H, CH)、1.70–1.83 (m, 1

H, CH)、1.51–1.71 (m, 8H)、1.35–1.45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)、1.18 (d, J=6.4 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>)、1.16 (d, J=6.4 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>) ;

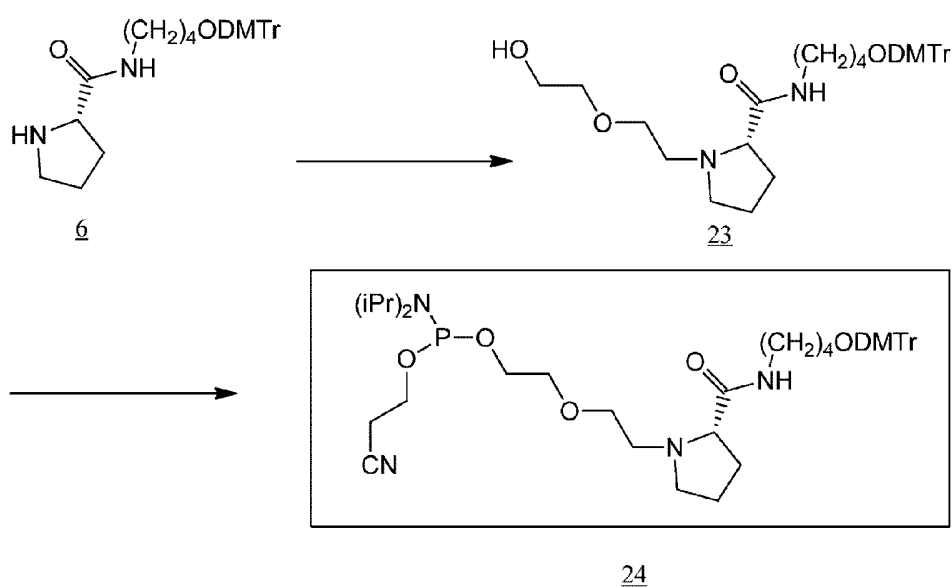
<sup>1</sup>H-NMR (CH<sub>3</sub>CN) : δ 146.90 ;

MS (FAB+) : m/z 803 (M<sup>+</sup>+1)、303 (DMTr<sup>+</sup>) .

[0224] (実施例 B 5)

プロリン骨格を有するリンカーを含む本発明の核酸分子を生成するため、下記スキーム 5 により、DMTr-アミドエチレンオキシエチルアミノ- $\gamma$ -プロリンアミダイト (以下、PEG スペースタータイプという) を合成した。

[0225] [化9]



スキーム 5

[0226] (1) DMTr-アミドヒドロキシエトキシエチルアミノ- $\gamma$ -プロリン (化合物 23)

DMTr-アミド- $\gamma$ -プロリン (化合物 6) (1.00 g、2.05 mmol)、4-トリエンルスホン酸 2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルエステル (3.10 g、12.30 mmol)、および炭酸カリウム (0.85 g、6.15 mmol) の無水ジメチルホルムアミド溶液 (10 mL)

を混合し、アルゴン雰囲気下、室温で4日間攪拌した。前記混合物について、減圧化、室温で溶媒を留去した後、ジクロロメタン（20 mL）を加え、ろ過した。ろ液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。前記シリカゲルカラムクロマトグラフィーの添加溶媒は、まず、0.05%ピリジンを含む酢酸エチルを使用した後、0.05%ピリジンを含む $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ と $\text{CH}_3\text{OH}$ の混合液（ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ： $\text{CH}_3\text{OH}$ =9：1）を使用した。その結果、無色シロップ状の化合物23（1.15 g、収率97%）を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H}$ -NMR（ $\text{CDCl}_3$ ）：  $\delta$  7.41–7.45（m, 2H, Ar-H）、7.27–7.31（m, 6H, Ar-H）、7.17–7.21（m, 1H, Ar-H）、6.79–6.82（m, 4H, Ar-H）、3.79（s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ）、3.60–3.70（m, 2H）、3.39–3.57（m, 4H）、3.13–3.27（m, 3H）、3.07–3.08（m, 2H）、2.71–2.84（m, 1H）、2.38–2.46（m, 1H）、2.14–2.19（m, 1H）、1.84–1.87（m, 1H）、1.57–1.76（m, 8H）。

[0227] （2）DMTr-アミドエチレンオキシエチルアミノ- $\gamma$ -プロリンアミダイト（化合物24）

得られた前記DMTr-アミドヒドロキシエトキシエチルアミノ- $\gamma$ -プロリン（化合物23）（0.63 g、1.00 mmol）を無水ピリジンと混合し、室温で共沸乾燥した。得られた残留物に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド（206 mg、1.20 mmol）を加え、減圧下で脱気し、アルゴンガスを充填した。前記混合物に対し、無水アセトニトリル（1 mL）を加え、さらに、2-シアノエトキシー-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト（282 mg、1.12 mmol）の無水アセトニトリル溶液（1 mL）を加えた。この混合物を、アルゴン雰囲気下、室温で4時間攪拌した。そして、前記混合物をジクロロメタンで希釈し、飽和重曹水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を回収し、無水硫酸ナト

リウムで乾燥した後、前記有機層をろ過した。得られた前記ろ液について、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：アセトン＝7：3、0.05%ピリジン含有）に供し、無色シロップ状の化合物24（0.74 g、純度100%、収率87%）を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) :  $\delta$  7.41–7.43 (m, 2H, Ar–H)、7.28–7.31 (m, 6H, Ar–H)、7.18–7.22 (m, 1H, Ar–H)、6.84–6.86 (m, 4H, Ar–H)、3.73–3.84 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.47–3.64 (m, 7H)、3.15–3.23 (m, 1H)、3.11 (t,  $J=6.4\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、3.01 (t,  $J=5.9\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ )、2.95–2.99 (m, 1H)、2.58–2.63 (m, 2H)、2.31–2.35 (m, 1H, CH)、2.03–2.19 (m, 1H, CH)、1.48–1.78 (m, 10H)、1.12–1.57 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ) ;

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

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

[0228] (実施例B6)

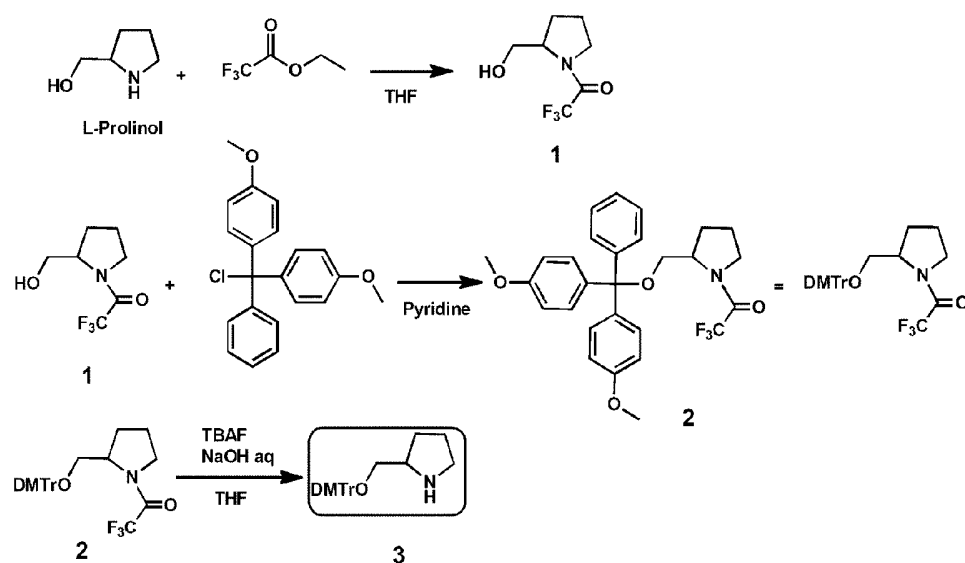
#### 1. 保護プロリノールの合成

以下に示すスキーム6に従い、ジメトキシトリチル基で保護されたプロリノール（化合物3）を合成した。

[0229]



## [化10]



スキーム 6

## [0230] (1) トリフルオロアセチル-L-プロリノール(化合物1)

L-プロリノール(2.0 g、20 mmol)をTHF 20 mLに溶解した。他方、トリフルオロ酢酸エチル(3.0 g、21 mmol)をTHF 20 mLに溶解した。そして、後者のTHF溶液を、前者のL-プロリノール含有THF溶液に滴下し、12時間攪拌した。この反応液を減圧濃縮し、化合物1を得た(3.7 g、収率97%)。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

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

## [0231] (2) トリフルオロアセチル-DMTr-L-プロリノール(化合物2)

得られた前記トリフルオロアセチル-L-プロリノール(化合物1)(3.7 g、19 mmol)をピリジンに溶解して、3回、室温で共沸乾燥した。得られた残留物をピリジン15 mLに溶かし、アルゴン雰囲気下、氷浴中で攪拌しながら、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(DMTr-Cl)(8.1 g、24 mmol)を加え、さらに、室温で4時間反応させた。

そして、過剰のDMT r-CIをクエンチするために、前記反応液に、さらに、メタノール10 mLを加え10分撹拌した。その後、前記反応液に、ジクロロメタンを加え飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した。洗浄後の回収した有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=95:5$ 、0.1%ピリジン含有）に供し、精製した化合物2を得た（8.5 g、収率89%）。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

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

[0232] (3) DMT r-L-プロリノール（化合物3）

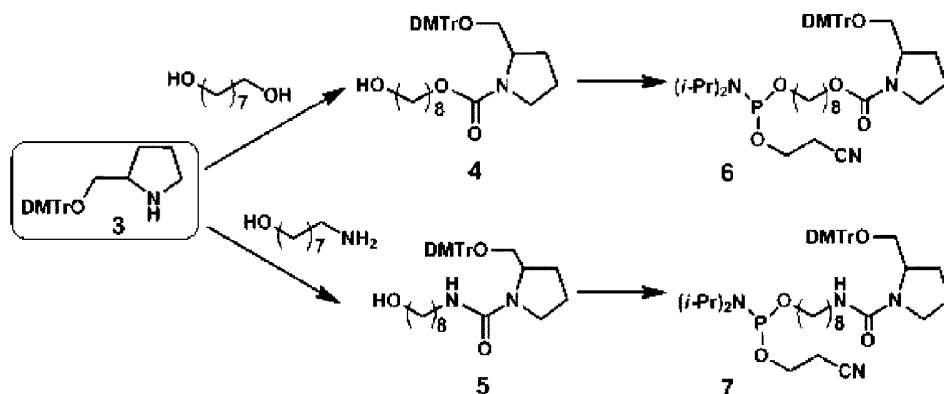
得られた前記トリフルオロアセチル-DMT r-L-プロリノール（化合物2）（5 g、10 mmol）をTHF 100 mLに溶解した。このTHF溶液に5%水酸化ナトリウム水溶液100 mLを加え、撹拌した。この溶液に、1 mol/L フッ化テトラ-n-ブチルアンモニウム（TBAF）溶液5 mL加え、室温で12時間撹拌した。この反応液を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した。洗浄後の回収した有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、化合物3を得た（3.6 g、収率90%）。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J=8.6\text{ Hz}$ , Ar-H), 3.78 (6H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.31 (1H, m, H-6), 3.07 (2H, m, H-2, H-6), 2.90 (2H, m, H-5), 1.84 (3H, m, H-3, H-4), 1.40 (1H, m, H-3) .

[0233] 2. アミナイト誘導体の合成

前記「1.」で合成した保護プロリノール（化合物3）を用いて、下記スキーム7により、結合形式が異なる、プロリノールを有するアミダイト誘導体を合成した。

[0234] [化11]



スキーム7

[0235] (1) DMTr-ウレタン-Loopプロリノール（化合物4）

1, 8-オクタジオール（9.0 g、62 mmol）をTHF 90 mLに溶解し、アルゴン雰囲気下に置いた。他方、カルボニルジイミダゾール（2.0 g、12 mmol）をTHF 10 mLに溶解した。後者のTHF溶液を、前者のTHF溶液に加え、室温で1時間攪拌した。この反応液を、1, 8-オクタジオールのTLCスポットが消えるまで、水で洗浄した。さらに、洗浄後に回収した有機層を、飽和食塩水で洗浄し、回収した有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、得られたろ液を減圧濃縮した。その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 95 : 5）に供し、精製した化合物を得た。この化合物は、1, 8-オクタジオールの片末端がカルボニルジイミダゾールで活性化された化合物であった（2.3 g、収率77%）。

[0236] 前記化合物0.9 gをアセトニトリル10 mLで溶解し、アルゴン雰囲気下においた。他方、DMTr-Loopプロリノール（化合物3）（1.9 g、4.8 mmol）をアセトニトリル20 mLに溶解した。後者のアセトニトリル溶液を、前記前者のアセトニトリル溶液に加え、室温で24時間攪拌し

た。そして、この反応液を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、回収した有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、得られたろ液を減圧濃縮した。その残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒ジクロロメタン：アセトン＝9：1、0.1%ピリジン含有）に供し、精製した化合物4（プロリノールウレタンアミダイト）を得た（1.5 g、収率65%）。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J=8.6\text{ Hz}$ , Ar-H), 4.24–3.94 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.72–2.96 (7H, m, alkyl, H-2, H-5, H-6), 2.10–1.30 (16H, m, alkyl, H-3, H-4).

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

[0237] (2) DMT r-ウレイドーL-プロリノール（化合物5）

アルゴン雰囲気下、トリホスゲン（2.0 g、6.7 mmol）をTHF 10 mLに溶解し、0℃で攪拌した。他方、DMT r-L-プロリノール（化合物3）（1.3 g、3.2 mmol）およびN, N-ジイソプロピルエチルアミン（16 g、124 mmol）をTHF 10 mLに溶解し、前記トリホスゲンのTHF溶液に滴下した。この反応液を、0℃で1時間、続いて、室温で2時間攪拌した。そして、8-アミノ-1-オクタノール（2.3 g、16 mmol）およびN, N-ジイソプロピルエチルアミン（5.0 g、38 mmol）をTHF 30 mLに溶解した。このTHF溶液に、前記攪拌後の反応液を滴下し、0℃で1時間、続いて、室温で48時間攪拌した。この反応液を減圧濃縮し、その残渣をジクロロメタンに溶解した。この溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、回収した有機層を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮し、その残渣を、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して、精製した。この際、展開溶媒は、0.1%ピリジンを含有するアセ

トンと水との混合溶媒を使用し、前記アセトンと水との混合割合は、ステップワイズとし、具体的には、アセトン：水のモル比を、2：8、3：7、4：6および5：5の順に変化させた。目的の化合物5を含むフラクションを、ジクロロメタンで抽出し、この有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。前記有機層をろ過し、得られたろ液を減圧濃縮し、化合物5（プロリノールウレイドアミダイト）を得た（0.9 g、収率49%）。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, m, Ar-H), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.68–3.25 (9H, m,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ , H-2, H-5, H-6), 1.74–1.18 (16H, m, alkyl, H-3, H-4)

FAB-MS : 575  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

[0238] (3) プロリノールを有するアミダイト誘導体（化合物6および7）

修飾プロリノールとして、得られた前記化合物4（0.80 g、1.4 mmol）をアセトニトリルに溶解し、室温で3回共沸乾燥した。得られた残留物をアセトニトリル1 mLに溶解し、アルゴン雰囲気下においた。このアセトニトリル溶液に、ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド（0.24 g、1.4 mmol）を添加し、反応液とした。他方、2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト（0.50 g、1.7 mmol）をアセトニトリル1 mLに溶解した。これを、前記反応液に添加し、室温で4時間攪拌した。前記反応液に、ジクロロメタンを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した。洗浄後の回収した有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、前記有機層をろ過して、得られたろ液を減圧濃縮した。その残渣を、アミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒ヘキサン：アセトン=10：1、0.1%ピリジン含有）に供し、精製した化合物6（DMT r-ウレタン-Loopロリノールアミダイト）（0.90 g、収率83%）を得た。以下に、前記化合物のNMRの

結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d,  $J=8.6\text{ Hz}$ , Ar-H), 4.24–3.94 (2H, m,  $\text{COOCH}_2$ ), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.72–2.96 (11H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_3$ , H-2, H-5, H-6), 2.58 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.10–1.46 (16H, m, alkyl, H-3, H-4), 1.34–1.10 (12H, m,  $\text{CHCH}_3$ )。  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  146.82.

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

[0239] 前記修飾プロリノールとして、前記化合物4に代えて、前記化合物5を使用した以外は、同様に処理を行い、精製した化合物7 (DMTr-ウレイド- $\text{L}$ -プロリノールアミダイト) (0.80g、収率74%)を得た。以下に、前記化合物のNMRの結果を示す。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.40–7.14 (9H, m, Ar-H), 6.82 (4H, m, Ar-H), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.65–3.25 (13H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{POCH}_2$ ,  $\text{CHCH}_3$ , H-2,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ , H-2, H-5, H-6), 2.73 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.10–1.48 (16H, m, alkyl, H-3, H-4), 1.35–1.10 (12H, m,  $\text{CHCH}_3$ ) .

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

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

[0240] 以上、実施形態を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をすることができる。

### 産業上の利用可能性

[0241] 本発明の一本鎖核酸分子によれば、遺伝子の発現抑制、具体的には、遺伝子がコードするタンパク質の翻訳の抑制が可能である。本発明の  $\text{ssNc}$  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。

## 請求の範囲

- [請求項1] 標的遺伝子の発現を抑制する発現抑制配列および前記発現抑制配列に対してミスマッチを有する相補配列を含む一本鎖核酸分子であって、5'側から3'側にかけて、5'側領域(Xc)、内部領域(Z)および3'側領域(Yc)を、前記順序で含み、前記内部領域(Z)が、内部5'側領域(X)および内部3'側領域(Y)が連結して構成され、前記5'側領域(Xc)が、前記内部5'側領域(X)と相補的であり、前記3'側領域(Yc)が、前記内部3'側領域(Y)と相補的であり、前記内部領域(Z)、前記5'側領域(Xc)および前記3'側領域(Yc)の少なくとも一つが、前記発現抑制配列を含み、前記発現抑制配列を含む領域と相補的な領域が、前記相補配列を含み、前記一本鎖核酸分子の5'末端塩基と3'末端塩基とが未結合であることを特徴とする一本鎖核酸分子。
- [請求項2] 前記発現抑制配列が、成熟miRNA配列である、請求項1記載の一本鎖核酸分子。
- [請求項3] 前記5'側領域(Xc)と前記内部5'側領域(X)との間に、リンカー領域(Lx)を有し、前記リンカー領域(Lx)を介して、前記5'側領域(Xc)と前記内部5'側領域(X)とが連結している、請求項1または2記載の一本鎖核酸分子。
- [請求項4] 前記3'側領域(Yc)と前記内部3'側領域(Y)との間に、リンカー領域(Ly)を有し、前記リンカー領域(Ly)を介して、前記3'側領域(Yc)と前記内部3'側領域(Y)とが連結している、請求項1から3のいずれか



一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項5] 前記5'側領域(X<sub>c</sub>)と前記内部5'側領域(X)との間に、リンカー領域(L<sub>x</sub>)を有し、  
前記リンカー領域(L<sub>x</sub>)を介して、前記5'側領域(X<sub>c</sub>)と前記内部5'側領域(X)とが連結し、  
前記3'側領域(Y<sub>c</sub>)と前記内部3'側領域(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3'側領域(Y<sub>c</sub>)と前記内部3'側領域(Y)とが連結している、請求項1または2記載の一本鎖核酸分子。

[請求項6] 前記内部領域(Z)の塩基数(Z)、前記内部5'側領域(X)の塩基数(X)、前記内部3'側領域(Y)の塩基数(Y)、前記5'側領域(X<sub>c</sub>)の塩基数(X<sub>c</sub>)および前記3'側領域(Y<sub>c</sub>)の塩基数(Y<sub>c</sub>)が、下記式(1)および(2)の条件を満たす、請求項1から5のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

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

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

[請求項7] 前記内部5'側領域(X)の塩基数(X)、前記5'側領域(X<sub>c</sub>)の塩基数(X<sub>c</sub>)、前記内部3'側領域(Y)の塩基数(Y)および前記3'側領域(Y<sub>c</sub>)の塩基数(Y<sub>c</sub>)が、下記(a)～(d)のいずれかの条件を満たす、請求項1から6のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

(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。

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

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

[請求項8] 前記 (a) ~ (d) において、前記内部 5' 側領域 (X) の塩基数 (X) と前記 5' 側領域 (X<sub>c</sub>) の塩基数 (X<sub>c</sub>) の差、前記内部 3' 側領域 (Y) の塩基数 (Y) と前記 3' 側領域 (Y<sub>c</sub>) の塩基数 (Y<sub>c</sub>) の差が、下記条件を満たす、請求項 7 記載の一本鎖核酸分子。

(a) 下記式 (11) および (12) の条件を満たす。

$$X - X_c = 1, 2 \text{ または } 3 \quad \dots (11)$$

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

(b) 下記式 (13) および (14) の条件を満たす。

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

$$Y - Y_c = 1, 2 \text{ または } 3 \quad \dots (14)$$

(c) 下記式 (15) および (16) の条件を満たす。

$$X - X_c = 1, 2 \text{ または } 3 \quad \dots (15)$$

$$Y - Y_c = 1, 2 \text{ または } 3 \quad \dots (16)$$

(d) 下記式 (17) および (18) の条件を満たす。

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

$$Y - Y_c = 0 \quad \dots (18)$$

[請求項9] 前記内部領域 (Z) の塩基数 (Z) が、19 塩基以上である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項10] 前記内部領域 (Z) の塩基数 (Z) が、19 塩基 ~ 30 塩基である、

請求項 9 記載の一本鎖核酸分子。

[請求項11] 前記 5' 側領域 (X c) の塩基数 (X c) が、1 ~ 11 塩基である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項12] 前記 5' 側領域 (X c) の塩基数 (X c) が、1 ~ 7 塩基である、請求項 11 記載の一本鎖核酸分子。

[請求項13] 前記 5' 側領域 (X c) の塩基数 (X c) が、1 ~ 3 塩基である、請求項 11 記載の一本鎖核酸分子。

[請求項14] 前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数 (Y c) が、1 ~ 11 塩基である、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項15] 前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数 (Y c) が、1 ~ 7 塩基である、請求項 14 記載の一本鎖核酸分子。

[請求項16] 前記 3' 側領域 (Y c) の塩基数 (Y c) が、1 ~ 3 塩基である、請求項 14 記載の一本鎖核酸分子。

[請求項17] 少なくとも 1 つの修飾された残基を含む、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項18] 標識物質を含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項19] 安定同位体を含む、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項20] RNA 分子である、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項21] 前記リンカー領域 (L x) および／または前記リンカー領域 (L y) が、ヌクレオチド残基および非ヌクレオチド残基の少なくとも一つから構成される、請求項 3 から 20 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。

[請求項22] 前記ヌクレオチド残基が、非修飾ヌクレオチド残基および／または修飾ヌクレオチド残基である、請求項 21 記載の一本鎖核酸分子。

- [請求項23] 前記リンカー領域（L<sub>x</sub>）および／または前記リンカー領域（L<sub>y</sub>）が、下記（１）～（７）のいずれかの残基で構成される、請求項 2 1 または 2 2 記載の一本鎖核酸分子。
- （１）非修飾ヌクレオチド残基
  - （２）修飾ヌクレオチド残基
  - （３）非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基
  - （４）非ヌクレオチド残基
  - （５）非ヌクレオチド残基および非修飾ヌクレオチド残基
  - （６）非ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基
  - （７）非ヌクレオチド残基、非修飾ヌクレオチド残基および修飾ヌクレオチド残基
- [請求項24] 前記一本鎖核酸分子において、塩基数の合計が、5 0 塩基以上である、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子。
- [請求項25] 標的遺伝子の発現を抑制するための組成物であって、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする、発現抑制用組成物。
- [請求項26] 請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を含むことを特徴とする、薬学的組成物。
- [請求項27] がん治療用である、請求項 2 6 記載の薬学的組成物。
- [請求項28] 標的遺伝子の発現を抑制する方法であって、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を使用することを特徴とする発現抑制方法。
- [請求項29] 前記一本鎖核酸分子を、細胞、組織または器官に投与する工程を含む、請求項 2 8 記載の発現抑制方法。
- [請求項30] 前記一本鎖核酸分子を、i n v i v oまたはi n v i t r oで投与する、請求項 2 9 記載の発現抑制方法。
- [請求項31] 疾患の治療方法であって、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子を、患者に

投与する工程を含み、

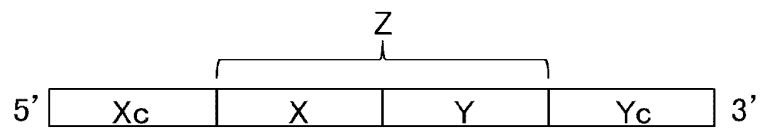
前記一本鎖核酸分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする治療方法。

[請求項32] 標的遺伝子の発現抑制のための、請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子の使用。

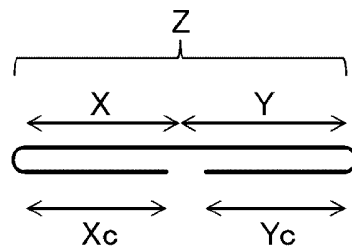
[請求項33] 疾患の治療に使用するための核酸分子であって、  
前記核酸分子は、請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の一本鎖核酸分子であり、  
前記一本鎖核酸分子が、前記発現抑制配列として、前記疾患の原因となる遺伝子の発現を抑制する配列を有することを特徴とする核酸分子。

[図1]

(A)

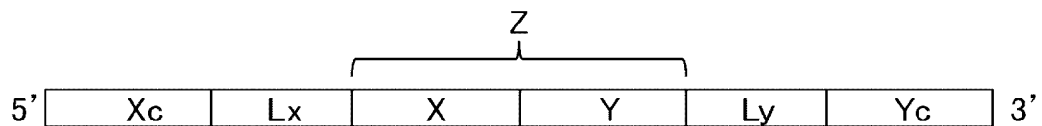


(B)

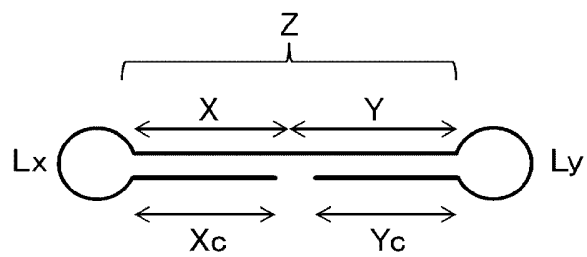


[図2]

(A)

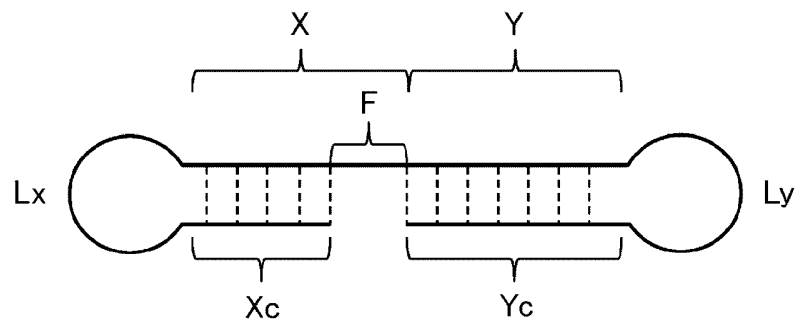


(B)

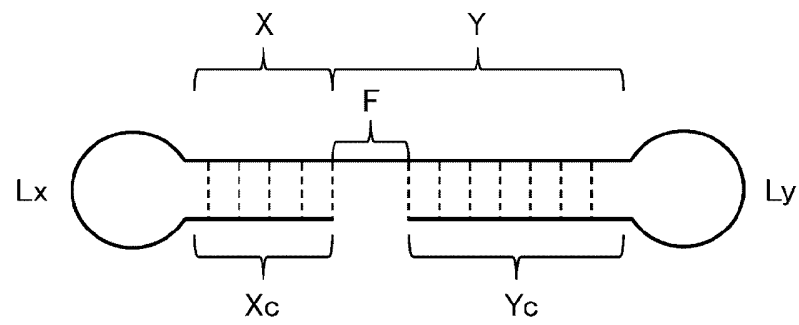


[図3]

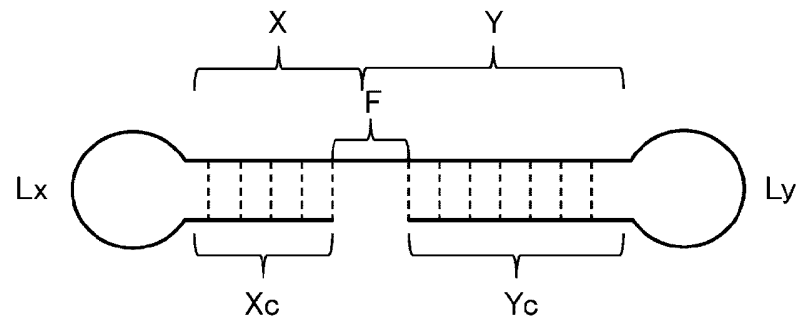
(A)



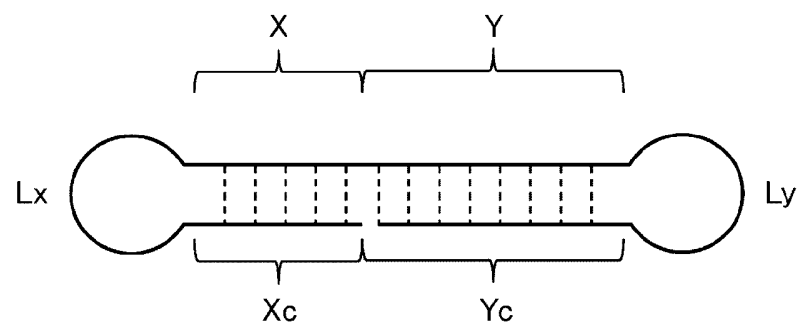
(B)



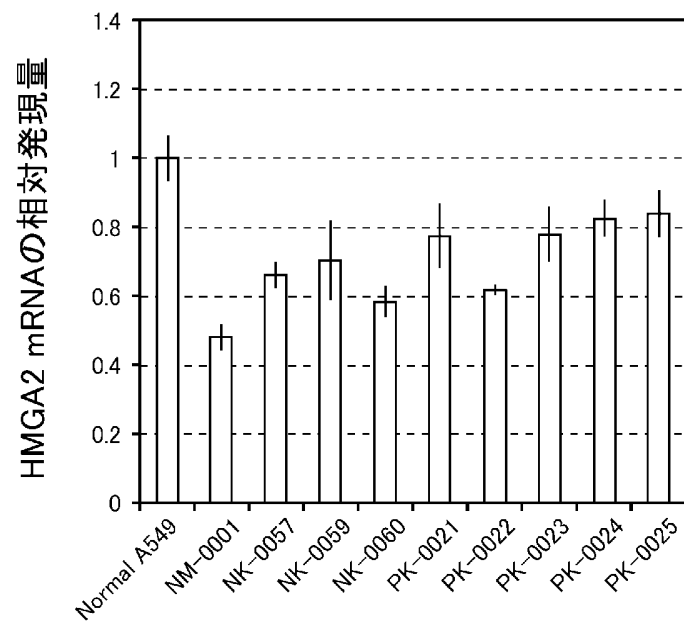
(C)



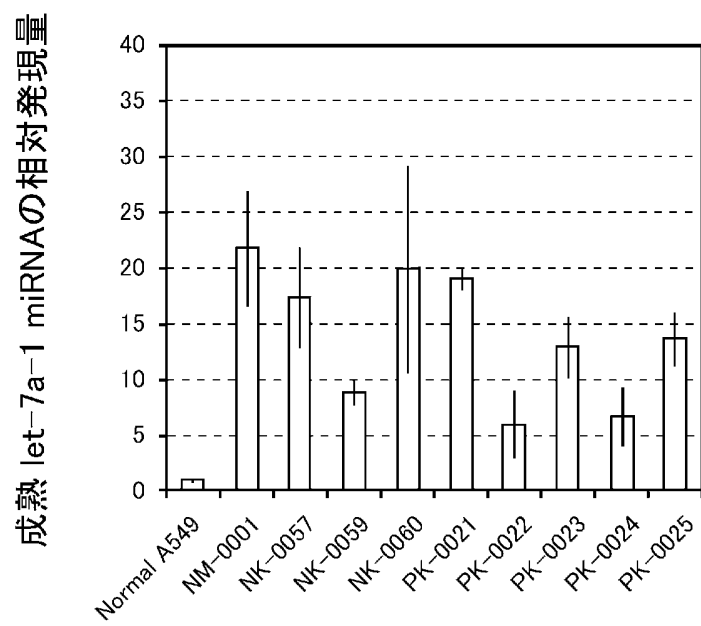
(D)



[図4]



[図5]





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080461

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/113(2010.01) i, A61K31/7088(2006.01) i, A61P35/00(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)

C12N15/113, A61K31/7088, A61P35/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/132672 A1 (Riken, Japan), 27 October 2011 (27.10.2011), claims 21, 2; paragraphs [0046] to [0049], [0050], [0052], [0063], [0072] to [0075]; fig. 1A, 5, 6, 9B & US 2011/0306653 A1	1-27, 33
X	US 2011/0052666 A1 (Medtronic, Inc.), 03 March 2011 (03.03.2011), claims 21 to 22; paragraphs [0010], [0026], [0033]; fig 1, 2 (Family: none)	1-27, 33
A	JP 2008-278784 A (Riken, Japan), 20 November 2008 (20.11.2008), & US 2010/0137407 A1 & EP 2143792 A1 & WO 2008/140126 A1	1-27, 33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 January, 2013 (10.01.13)

Date of mailing of the international search report  
22 January, 2013 (22.01.13)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080461

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-521393 A (Massachusetts Institute of Technology), 21 July 2005 (21.07.2005), & US 2004/0248296 A1 & EP 1495141 A2 & WO 2003/079757 A2	1-27, 33
E, X	WO 2012/005368 A1 (Bonac Corp.), 12 January 2012 (12.01.2012), & EP 2431466 A1 & US 2012/0010271 A1 & JP 4968811 B & JP 2012-130342 A	1-27, 33
E, X	WO 2012/017919 A1 (Bonac Corp.), 09 February 2012 (09.02.2012), & EP 2436767 A1 & US 2012/0035246 A1 & JP 4965745 B	1-27, 33

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2012/080461

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 28-32  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
(See extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080461

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

Claims 28-32 pertain to "method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy" and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2) (a) (i) and [PCT Rule 39.1(iv)].

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/113 (2010.01) i, A61K31/7088 (2006.01) i, A61P35/00 (2006.01) i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/113, A61K31/7088, A61P35/00

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2011/132672 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2011.10.27, 請求項 2 1、請求項 2、[0 0 4 6] ~ [0 0 4 9]、[0 0 5 0]、[0 0 5 2]、[0 0 6 3]、[0 0 7 2] ~ [0 0 7 5]、図 1 A、図 5、図 6、図 9 B & US 2011/0306653 A1	1 - 2 7, 3 3
X	US 2011/0052666 A1 (Medtronic, Inc.) 2011.03.03, C l a i m 2 1 ~ 2 2、[0 0 1 0]、[0 0 2 6]、[0 0 3 3]、F i g 1、2 (ファミリーなし)	1 - 2 7, 3 3

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「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  
「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  
「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)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「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  
「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  
「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  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 0 . 0 1 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 1 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

伊藤 良子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 6 4 4

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
A	JP 2008-278784 A (独立行政法人理化学研究所) 2008. 11. 20, & US 2010/0137407 A1 & EP 2143792 A1 & WO 2008/140126 A1	1 - 2 7 , 3 3
A	JP 2005-521393 A (マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー) 2005. 07. 21, & US 2004/0248296 A1 & EP 1495141 A2 & WO 2003/079757 A2	1 - 2 7 , 3 3
E, X	WO 2012/005368 A1 (株式会社ボナック) 2012. 01. 12, & EP 2431466 A1 & US 2012/0010271 A1 & JP 4968811 B & JP 2012-130342 A	1 - 2 7 , 3 3
E, X	WO 2012/017919 A1 (株式会社ボナック) 2012. 02. 09, & EP 2436767 A1 & US 2012/0035246 A1 & JP 4965745 B	1 - 2 7 , 3 3

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

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 28-32 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求項28-32は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」に関するものであって、PCT17条(2) (a) (i) 及び「PCT規則39.1(iv)」の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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