

(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
2023年2月9日(09.02.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/013613 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) C12Q 1/6813 (2018.01)

MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/029566

(22) 国際出願日: 2022年8月1日(01.08.2022)

(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 2021-126578 2021年8月2日(02.08.2021) JP

(71) 出願人: 学校法人上智学院(SOPHIA SCHOOL CORPORATION) [JP/JP]; 〒1028554 東京都千代田区紀尾井町7番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 近藤 次郎(KONDO Jiro); 〒1028554 東京都千代田区紀尾井町7番1号 学校法人上智学院上智大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所(HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズMOR1タワー32階 Tokyo (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,

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

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: ARTIFICIAL NUCLEIC ACID FOR INDUCING SPECIFIC THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE

(54) 発明の名称: 特定の立体構造を誘導する人工核酸

(57) Abstract: The present invention addressing the problem of providing: a method for forming a three-dimensional structure dynamically by utilizing non-complementary base pairs in an oligonucleotide therapeutic; a modification mode for a nucleic acid maintaining a three-dimensional structure; and an artificial nucleic acid capable of bonding to a target sequence stably regardless of mutation. Provided are: an artificial nucleic acid for inducing a specific three-dimensional structure by hybridizing to a nucleic acid of interest that does not form a functional three-dimensional structure; a gene expression inhibitor and a nucleic acid detector including the same as an active ingredient; and a method for producing an artificial nucleic acid.

(57) 要約: 本発明の課題は、非相補的塩基対を核酸医薬において利用して、能動的に立体構造を形成する方法、立体構造を維持した核酸の修飾様式、及び変異によらず安定して標的配列に結合可能な人工核酸を提供することである。機能的立体構造を形成しない目的の核酸にハイブリダイズして特定の立体構造を誘導する人工核酸、及びそれを有効成分として含む遺伝子発現抑制剤及び核酸検出剤、並びに人工核酸の製造方法を提供する。



WO 2023/013613 A1

明 細 書

発明の名称： 特定の立体構造を誘導する人工核酸

技術分野

[0001] 本発明は、機能的立体構造を形成しない目的の核酸にハイブリダイズして特定の立体構造を誘導する人工核酸、及びそれを有効成分として含む遺伝子発現抑制剤及び核酸検出剤、並びに人工核酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] DNAやRNAといった核酸分子は、アデニン (A)、チミン (T) (RNAではウラシル (U))、グアニン (G)、及びシトシン (C) の4種類の塩基を持つヌクレオチドから構成されており、AはT又はUと、CはGと塩基対を組みやすく、この性質は塩基対の相補性と呼ばれる。生体内では、この塩基対の相補性に基づいてDNAの二重らせん構造の形成、DNAの半保存的複製、DNAを鋳型としたRNAの転写等の様々な現象が行われている。また、この相補性はルールが明快であるため、PCR法、DNAシーケンシング、遺伝子ノックダウン法及び遺伝子ノックアウト法等の核酸に関わるほぼ全てのバイオテクノロジー技術に応用されている。特に遺伝子ノックダウン法は、第三世代の医薬品である「核酸医薬品」として幅広く応用され、近年、薬事承認の件数が増加傾向にある。

[0003] 核酸医薬品として利用されている遺伝子ノックダウン法は、主にアンチセンスオリゴヌクレオチド (AntiSense Oligonucleotide : ASO) 又はsiRNA (small interfering RNA) に基づく。ASOやsiRNAはデザインが容易である反面、標的配列に変異が生じている場合に薬効が安定しないという問題がある。これは、相補性を無視した塩基対が形成されるで、標的とこれらの分子との結合が減弱してしまうためである。それ故に、一塩基バリエント (SNV : Single Nucleotide Variant) に代表される、個体ごとの多様性変異を含む遺伝子領域は標的配列の候補から除かれる他なかった。

[0004] 近年、生体内で核酸が非相補的塩基対を安定的に形成していることが明らかとなってきた。例えば、非特許文献1には、機能的な立体構造を形成する

一本鎖核酸において、約150種類の非相補的塩基対により安定な立体構造が形成されることが開示されている。

[0005] これらの非相補的塩基対や、それによって誘導される機能的な立体構造を活用すれば、上述のような変異を含む標的配列に安定に作用する核酸医薬等の開発が実現し得る。しかし、従来の核酸医薬の問題点の、非相補的塩基対を用いた解決はこれまで検討されてこなかった。それどころか、非相補的塩基対を核酸医薬に利用するために必要な、機能的な立体構造を能動的に形成させる方法や、立体構造を維持したまま修飾を行う方法等の基本的な知見も得られていなかった。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Leontis, N.B. et al., *Nucleic Acids Res.* 2002 Aug 15;30(16):3497-3531.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、非相補的塩基対を含む立体構造の形成を誘導する方法を開発し、標的配列に対して、その変異に影響されることなく安定して結合可能な人工核酸を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題を解決するために、本発明者らは研究開発を進めた結果、立体構造を形成しない標的核酸にハイブリダイズして特定の立体構造を誘導する人工核酸を開発するに至った。また、その人工核酸に修飾を導入すると、さらに二本鎖核酸の安定性が増すことが明らかとなった。発明は上記等の新規知見に基づくものであり、以下を提供する。

[0009] (1) 機能的立体構造を形成しない目的の核酸にハイブリダイズして特定の立体構造を誘導する人工核酸であって、

前記人工核酸は前記目的の核酸の標的ドメインと立体構造を形成する立体

構造形成誘導ドメインを含み、

前記標的ドメインと前記立体構造形成誘導ドメインは、特定の立体構造を構成する二本鎖からなる配列モチーフを構成し、

前記配列モチーフにおいて、前記立体構造形成誘導ドメイン及び前記標的ドメインは互いに相補的な配列からなる相補領域を含み、

さらに前記配列モチーフにおいて、前記立体構造形成誘導ドメイン及び／又は前記標的ドメインは互いに非相補的な配列を含む1塩基以上の非相補含有領域を含み、

前記非相補含有領域はその両末端に非相補的な配列を含む、
前記人工核酸。

(2) 前記立体構造形成誘導ドメイン及び／又は前記標的ドメインが複数の前記相補領域を含み、前記非相補含有領域が前記複数の相補領域の間に位置する、(1)に記載の人工核酸。

(3) 前記非相補含有領域が2~7塩基からなる、(1)又は(2)に記載の人工核酸。

(4) 前記特定の立体構造がキンクターン構造、バルジドG構造、リバースキクターン構造、5SループE構造、Cループ構造、及びタンデムGA構造からなる群から選択される1以上を含む、(1)~(3)のいずれかに記載の人工核酸。

(5) キンクターン構造が、配列番号3 (5'-NNNNGAN-3')及び配列番号4 (5'-NGAN-3')、

バルジドG構造が、配列番号1 (5'-NNNGUAN-3')及び配列番号2 (5'-NGANNN-3')、

リバースキクターン構造が、配列番号5 (5'-NNNNAAN-3')及び配列番号6 (5'-NGAN-3')、

5SループE構造が、配列番号7 (5'-NGUAN-3')及び配列番号8 (5'-NGAUN-3')、

Cループ構造が、配列番号9 (5'-NCACU-3')及び配列番号10 (5'-ANN-3')

)、又は

タンデムGA構造が、配列番号11 (5'-NGAN-3')及び配列番号12 (5'-NGAN-3')

からなり、

各塩基配列において、NはA、C、G又はUである、(4)に記載の人工核酸。

(6)前記目的の核酸がmRNA又はmiRNAである、(1)～(5)のいずれかに記載の人工核酸。

(7)前記ハイブリダイズが、高ストリンジентな条件で行われる、(1)～(6)のいずれかに記載の人工核酸。

(8)前記立体構造形成誘導ドメインに1以上の修飾ヌクレオチドを含む、(1)～(7)のいずれかに記載の人工核酸。

(9)前記修飾ヌクレオチドが、2'-OMe RNA、2'-MOE RNA、LNA、2'-O,5'-NBNA、2'-デオキシトランス-3',4'-BNA及びDNAからなる群から選択される、(8)に記載の人工核酸。

(10)前記修飾ヌクレオチドが、リボースの2'位におけるフルオロ基修飾を含む、(8)又は(9)に記載の人工核酸。

(11)前記標的ドメインが、変異を含む前記非相補含有領域を含む、(1)～(10)のいずれかに記載の人工核酸。

(12)前記変異が一塩基バリエーション、挿入欠失変異、構造多型又はその組合せである、(11)に記載の人工核酸。

(13)前記立体構造形成誘導ドメインの一方又は両方に隣接する6塩基～120塩基からなるハイブリダイズドメインをさらに含む、(1)～(12)のいずれかに記載の人工核酸。

(14)(1)～(13)のいずれかに記載の人工核酸を有効成分として含む遺伝子発現抑制剤。

(15)(1)～(13)のいずれかに記載の人工核酸を有効成分として含む核酸検出剤。

(16)機能的立体構造を形成しない目的の核酸にハイブリダイズして特定

の立体構造を誘導する人工核酸の製造方法であって、

前記目的の核酸において、特定の立体構造を構成する二本鎖からなる配列モチーフの一方の配列情報を検索し、そのいずれか1以上を標的ドメインとして選択する標的ドメイン選択工程、

前記標的ドメインと配列モチーフを構成するように立体構造形成誘導ドメインの配列を決定する立体構造形成誘導ドメイン決定工程、及び

前記立体構造形成誘導ドメイン決定工程で決定された配列情報に基づいて前記人工核酸を合成する核酸合成工程

を含み、

前記配列モチーフにおいて、前記標的ドメイン及び前記立体構造形成誘導ドメインは、互いに相補的な配列からなる相補領域を含み、

さらに前記配列モチーフにおいて、前記標的ドメイン及び／又は前記立体構造形成誘導ドメインは、互いに非相補的な配列を含む1塩基以上の非相補含有領域を含み、

前記非相補含有領域はその両末端に非相補的な配列を含む、
前記方法。

(17) 前記立体構造形成誘導ドメインの一方又は両方に隣接する6塩基～120塩基からなるハイブリダイズドメインの配列を決定するハイブリダイズドメイン決定工程をさらに含む、(16)に記載の方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2021-126578号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0010] 本発明の人工核酸によれば、機能的立体構造を形成しない核酸に特定の立体構造を誘導することができる。

また、本発明の遺伝子発現抑制剤によれば、標的遺伝子の発現を抑制することができる。

さらに、本発明の核酸検出剤によれば、目的の核酸を検出することができる。

また、本発明の人工核酸の製造方法によれば、本発明の人工核酸を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]バルジドG (BG) 構造の立体構造及び二次構造を示す図である。Aは、例示的な立体構造を示す。Bは、例示的な二次構造を示す。図1 B中、上の鎖を α 鎖、下の鎖を β 鎖とし、枠内はコンセンサス配列を、Nは任意の塩基を示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。 $\alpha 1 \sim \alpha 6$ 及び $\beta 1 \sim \beta 5$ は、コンセンサス配列中の α 鎖及び β 鎖における各塩基の位置を示し、*はC2'-エンド型のコンホメーションを取ることが明らかになっているヌクレオチドの位置を、#はリボースの2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与するヌクレオチドの位置を示す。

[図2]キンクターン (KT) 構造の立体構造及び二次構造を示す図である。Aは、例示的な立体構造を示す。Bは、標準型モチーフの例示的な二次構造を示す。Cは、非標準型モチーフの例示的な二次構造を示す。図2 B及びC中、上の鎖を α 鎖、下の鎖を β 鎖とし、枠内はコンセンサス配列を、Nは任意の塩基を示す。塩基間の太い棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示し、細い棒線はヌクレオチド間結合を示す。 $\alpha 1 \sim \alpha 7$ 及び $\beta 1 \sim \beta 4$ は、コンセンサス配列中の α 鎖及び β 鎖における各塩基の位置を示し、*はC2'-エンド型のコンホメーションを取ることが明らかになっているヌクレオチドの位置を、#はリボースの2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与するヌクレオチドの位置を示す。

[図3]リバースキンクターン (RKT) 構造の立体構造及び二次構造を示す図である。Aは、例示的な立体構造を示す。Bは、例示的な二次構造を示す。図3 B中、上の鎖を α 鎖、下の鎖を β 鎖とし、枠内はコンセンサス配列を、Nは任意の塩基を示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。 $\alpha 1 \sim \alpha 5$ 及び $\beta 1 \sim \beta 2$ は、コンセンサス配列中の α 鎖及び β 鎖における各塩基の位置を示し、*はC2'-エンド型のコンホメーションを取ることが明らかになっているヌクレオチドの位置を、#はリボースの2'位のヒドロ

キシ基が水素結合に関与するヌクレオチドの位置を示す。

[図4]5SループE (5S) 構造の立体構造及び二次構造を示す図である。Aは、例示的な立体構造を示す。Bは、単純型モチーフの例示的な二次構造を示す。Cは、複雑型モチーフの例示的な二次構造を示す。図4 B及びC中、上の鎖を α 鎖、下の鎖を β 鎖とし、枠内はコンセンサス配列を、Nは任意の塩基を示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。 $\alpha 1 \sim \alpha 7$ 及び $\beta 1 \sim \beta 7$ は、コンセンサス配列中の α 鎖及び β 鎖における各塩基の位置を示し、#はリボースの2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与するヌクレオチドの位置を示す。

[図5]Cループ (CL) 構造の立体構造及び二次構造を示す図である。Aは、例示的な立体構造を示す。Bは、例示的な二次構造を示す。図5 B中、上の鎖を α 鎖、下の鎖を β 鎖とし、枠内はコンセンサス配列を、Nは任意の塩基を示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。 $\alpha 1 \sim \alpha 5$ 及び $\beta 1 \sim \beta 3$ は、コンセンサス配列中の α 鎖及び β 鎖における各塩基の位置を示し、*はC2'-エンド型のコンホメーションを取ることが明らかになっているヌクレオチドの位置を、#はリボースの2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与するヌクレオチドの位置を示す。

[図6]タンデムGA (GA) 構造の立体構造及び二次構造を示す図である。Aは、例示的な立体構造を示す。Bは、例示的な二次構造を示す。図6 B中、上の鎖を α 鎖、下の鎖を β 鎖とし、枠内はコンセンサス配列を、Nは任意の塩基を示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。 $\alpha 1 \sim \alpha 2$ 及び $\beta 1 \sim \beta 2$ は、コンセンサス配列中の α 鎖及び β 鎖における各塩基の位置を示し、#はリボースの2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与するヌクレオチドの位置を示す。

[図7]実施例1で使用した二本鎖核酸分子の塩基配列とその二次構造を示す図である。A (ROI/RNA-ASO) は目的のRNA (RNA of interest : ROI) とそれに完全に相補的な核酸 (RNA-ASO) 、B (ROI/RNA-BG) はROIとバルジドG構造を形成し得る核酸 (RNA-BG) 、C (ROI/RNA-KT) はROIとキンクターン構造を形

成し得る核酸 (RNA-KT)、D (ROI/RNA-RKT) はROIとリバースキントーン構造を形成し得る核酸 (RNA-RKT)、E (ROI/RNA-5S) はROIと5SループE構造を形成し得る核酸 (RNA-5S)、F (ROI/RNA-CL) はROIとCループ構造を形成し得る核酸 (RNA-CL)、及びG (ROI/RNA-GA) はROIとタンデムGA構造を形成し得る核酸 (RNA-GA) を示す。図中、破線枠内は前述の各立体構造を形成している配列を含む領域を示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。

[図8]図7に示した各二本鎖核酸分子の融解曲線を示す図である。図中、A~Gは図7に示すA~Gの二本鎖核酸分子にそれぞれ対応する。

[図9]目的の核酸と2'-O-メチル (2'-OMe) 修飾を含む核酸の二本鎖核酸分子の融解曲線を示す図である。A (ROI/OMe-ASO) はROIとそれに完全に相補的な修飾核酸 (OMe-ASO) の二本鎖核酸、B (ROI/OMe-BG) はROIとバルジドG構造を形成し得る修飾核酸 (OMe-BG) の二本鎖核酸、C (ROI/OMe-5S) はROIと5SループE構造を形成し得る修飾核酸 (OMe-5S) の二本鎖核酸、D (ROI/OMe-GA) はROIとタンデムGA構造を形成し得る修飾核酸 (OMe-GA) の二本鎖核酸の結果を示す。

[図10]バルジドG (BG) 構造を形成した核酸を示す図である。Aは結晶構造解析に使用した非修飾核酸 (非修飾BG) の塩基配列の二次構造を示す。BはAの核酸の結晶Iの結晶構造解析の結果を示す。CはAの核酸の結晶IIの結晶構造解析の結果を示す。Dは結晶構造解析に使用した修飾核酸 (修飾BG) の塩基配列の二次構造を示す。EはDの核酸の結晶Iの結晶構造解析の結果を示す。FはDの核酸の結晶IIの結晶構造解析の結果を示す。図中、破線枠内はバルジドG構造を形成している領域を示す。図10A及びD中、大文字は非修飾RNAヌクレオチドを示し、小文字は2'-OMe修飾されたRNAヌクレオチドを示し、斜体小文字はDNAヌクレオチドを示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。

[図11]バルジドG (BG) 構造を形成した核酸を示す図である。Aは非修飾BGの塩基配列の二次構造を示す。Bは修飾BGの塩基配列の二次構造を示す。図1

1 A 及び B 中、実線枠で囲んだG-A塩基対は、それぞれ以下のC 及び D に示す塩基対の位置を示す。C は非修飾BGにおけるG-A塩基対の結晶構造解析の結果を示す。D は修飾BGにおけるG-A塩基対の結晶構造解析の結果を示す。E は非修飾BGの塩基配列の二次構造を示す。F は修飾BGの塩基配列の二次構造を示す。図 1 1 E 及び F 中、実線枠で囲んだGU-A三つ組は、それぞれ以下のG 及び H に示す塩基三つ組の位置を示す。G は非修飾BGにおけるGU-A三つ組の結晶構造解析の結果を示す。H は修飾BGにおけるD に示したGU-A三つ組の結晶構造解析の結果を示す。図 1 1 A、B、E 及び F において、塩基間の棒線は相補的対合を、また白丸は非相補的対合を示す。図 1 1 D 及び H の2'-OMeA 及び2'-OMeUはそれぞれ、A 及びUが2'-OMe修飾されたRNAヌクレオチドであることを示す。図 1 1 H のdGはGがDNAヌクレオチドであることを示す。また、破線は水素結合を示す。

[図12]バルジドG (BG) 構造を形成した核酸を示す図である。A は非修飾BGの塩基配列の二次構造を示す。B は修飾BGの塩基配列の二次構造を示す。図 1 2 A 及び B 中、実線枠で囲んだCA塩基の組は、それぞれ以下のC 及び D に示す塩基の組の位置を示す。C は非修飾BGにおけるCA塩基の組の結晶構造解析の結果を示す。D は修飾BGにおけるCA塩基の組の結晶構造解析の結果を示す。E は非修飾BGの塩基配列の二次構造を示す。F は修飾BGの塩基配列の二次構造を示す。図 1 2 E 及び F 中、実線枠で囲んだCU塩基の組は、それぞれ以下のG 及び H に示す塩基の組の位置を示す。G は非修飾BGにおけるCU塩基の組の結晶構造解析の結果を示す。H は修飾BGにおけるCU塩基の組の結晶構造解析の結果を示す。図 1 2 A、B、E 及び F において、塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は非相補的対合を示す。図 1 2 D のdAはAがDNAヌクレオチドであることを示す。図 1 2 H の2'-OMeUはUが2'-OMe修飾されたRNAヌクレオチドであることを示す。

[図13]キンクターン (KT) 構造を2つ (破線枠) 形成した核酸を示す図である。A は結晶構造解析に使用した非修飾核酸 (非修飾KT) の塩基配列の二次構造を示す。B はA の核酸の結晶構造解析の結果を示す。C は結晶構造解析に

使用した修飾核酸（修飾KT）の塩基配列の二次構造を示す。DはCの核酸の結晶構造解析の結果を示す。図13A及びC中、大文字は非修飾RNAヌクレオチドを示し、小文字は2'-O-Me修飾されたRNAヌクレオチドを示し、斜体小文字はDNAヌクレオチドを示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。

[図14]図13の各核酸の1つのキンクターン（KT）構造を示す図である。Aは非修飾KTの1つのキンクターン構造を含む塩基配列の二次構造を示す。BはAの核酸の結晶構造解析の結果を示す。Cは修飾KTの1つのキンクターン構造を含む塩基配列の二次構造を示す。DはCの核酸の結晶構造解析の結果を示す。図14A及びC中、大文字は非修飾RNAヌクレオチドを示し、小文字は2'-O-Me修飾されたRNAヌクレオチドを示し、斜体小文字はDNAヌクレオチドを示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。

[図15]キンクターン（KT）構造を形成した核酸を示す図である。Aは非修飾KTの塩基配列の二次構造を示す。Bは修飾KTの塩基配列の二次構造を示す。図15A及びB中、実線枠で囲んだG-AG三つ組は、それぞれ以下のC及びDに示す三つ組の位置を示す。Cは非修飾KTにおけるG-AG三つ組の結晶構造解析の結果を示す。Dは修飾KTにおけるG-AG三つ組の結晶構造解析の結果を示す。Eは非修飾KTの塩基配列の二次構造を示す。Fは修飾KTの塩基配列の二次構造を示す。図15E及びF中、実線枠で囲んだG-AG三つ組は、それぞれ以下のG及びHに示す三つ組の位置を示す。Gは非修飾KTにおけるG-AG三つ組の結晶構造解析の結果を示す。Hは修飾KTにおけるG-AG三つ組の結晶構造解析の結果を示す。図中、各図に示すヌクレオチドの塩基を実線枠で示す。図15A、B、E及びFにおいて、塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は代表的な非相補的対合を示す。図15D及びHにおいて、dA及びdGはそれぞれ、A及びGがDNAヌクレオチドであることを示す。また、破線は水素結合を示し、実線円はGのリボースの2'位の官能基を示す。

[図16]キンクターン（KT）構造を形成した核酸を示す図である。Aは非修飾KTの塩基配列の二次構造を示す。Bは修飾KTの塩基配列の二次構造を示す。図

16A及びB中、実線枠で囲んだG-A塩基対は、それぞれ以下のC及びDに示す塩基対の位置を示す。Cは非修飾KTにおけるAに示した位置の塩基の結晶構造解析の結果を示す。Dは修飾KTにおけるBに示した位置の塩基の結晶構造解析の結果を示す。図16A及びBにおいて、塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は非相補的対合を示す。図16Dにおいて、2'-OMeGはGが2'-OMe修飾されたRNAヌクレオチドであることを示す。また、破線は水素結合を示し、実線円はGのリボースの2'位の官能基を示す。

[図17]テトラループ (TL) 構造とテトラループ受容体 (TLR) 構造を形成した核酸を示す図である。Aは結晶構造解析に使用した非修飾核酸 (非修飾TLR) の塩基配列の二次構造を示す。BはAの核酸の結晶構造解析の結果を示す。Cは結晶構造解析に使用した一部のRNAヌクレオチドがDNAヌクレオチドに置換された核酸 (修飾TLR) の塩基配列の二次構造を示す。DはCの核酸の結晶構造解析の結果を示す。図17A及びC中、大文字は非修飾RNAヌクレオチドを示し、斜体小文字はDNAヌクレオチドを示す。図17A及びCにおいて、塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。また、実線枠内はテトラループ受容体構造を形成する領域を、破線枠内はテトラループ構造を形成する領域を示す。

[図18]テトラループ (TL) 構造とテトラループ受容体 (TLR) 構造の相互作用を示す図である。Aは非修飾TLR分子同士のテトラループ構造とテトラループ受容体構造の結合の様子を示す。Bは修飾TLR分子同士のテトラループ構造とテトラループ受容体構造の結合の様子を示す。破線枠内はテトラループ構造を示し、図右側の灰色像はテトラループ受容体構造の空間充填モデルを示す。

[図19]テトラループ (TL) 構造とテトラループ受容体 (TLR) 構造の相互作用を示す図である。Aは相互作用の結晶構造解析結果を示す。図中、実線枠内は、以下のB及びCに示すU-A-A三つ組の位置を示す。Bは非修飾TLRにおけるU-A-A三つ組の結晶構造解析の結果を示す。Cは修飾TLRにおけるU-A-A三つ組の結晶構造解析の結果を示す。Dは相互作用の結晶構造解析結果を示す。

図中、実線枠内は、以下のE及びFに示すU-G-A三つ組の位置を示す。Eは非修飾TLRにおけるU-G-A三つ組の結晶構造解析の結果を示す。Fは修飾TLRにおけるU-G-A三つ組の結晶構造解析の結果を示す。図19C及びFにおいて、dA及びdGはそれぞれ、A及びGがDNAヌクレオチドであることを示す。また、破線は水素結合を示し、実線円は塩基がGのリボースの2'位の官能基を示す。

[図20]テトラループ (TL) 構造とテトラループ受容体 (TLR) 構造の相互作用を示す図である。Aは相互作用の結晶構造解析結果を示す。図中、実線枠内は、以下のB及びCに示すC-G-A三つ組の位置を示す。Bは非修飾TLRにおけるC-G-A三つ組の結晶構造解析の結果を示す。Cは修飾TLRにおけるC-G-A三つ組の結晶構造解析の結果を示す。図20Cにおいて、dGはGがDNAヌクレオチドであることを示す。また、破線は水素結合を示し、実線円は塩基がGのリボースの2'位の官能基を示す。

[図21]実施例6において使用した核酸分子の塩基配列と二次構造を示す図である。A (ROI-U/AS0-A) は中心付近の塩基配列がUUUである目的のRNA (ROI-U) とそれに完全に相補的な核酸 (AS0-A)、B (ROI-A/AS0-A) は中心付近の塩基配列がAAAに変異した目的のRNA (ROI-A) とAS0-A、C (ROI-U/KT-SKIP) はROI-Uと上記変異部分がバルジ構造に含まれるようにキンクターン構造を誘導するRNA分子 (KT-SKIP)、D (ROI-A/KT-SKIP) はROI-AとKT-SKIPを示す。図中、破線枠内は前述の各立体構造を形成している配列を含む領域を示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。

[図22]図21に示した二本鎖核酸の融解曲線を示す図である。Aは目的の核酸とAS0-Aの二本鎖核酸の融解曲線を示す。Bは目的の核酸とKT-SKIPの二本鎖核酸の融解曲線を示す。

[図23]実施例7において使用した核酸分子の塩基配列と二次構造を示す図である。Aはハイブリダイズ対象領域の配列 (S0-GFP) とそれに完全に相補的な核酸 (AS0-GFP)、BはS0-GFPとタンデムGA構造を誘導するRNA分子 (GA-GFP)、CはS0-GFPとキンクターン構造を誘導するRNA分子 (KT-GFP) を示す。図中、上側の各配列はハイブリダイズ対象領域として使用したpUC-frGFPのmR

NAにおける特定の対象領域の配列を示す。破線枠内は前述の各立体構造を形成している配列を含む領域を示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。

[図24]各種核酸を添加した場合のfrGFP由来の蛍光の測定結果を示す図である。Aは核酸を添加しなかった場合、Bは対象領域と同じ配列を有するRNA分子(S0-GFP)を添加した場合、CはAS0-GFPを添加した場合、DはGA-GFPを添加した場合、EはKT-GFPを添加した場合の結果を示す。

[図25]実施例8において、蛍光標識RNAプローブ(RNA-2AP:下側の配列)が標的RNA(上側の配列)にハイブリダイズした状態を示す図である。図中、Xは2-アミノプリン(2-AminoPurine:2AP)を表す。白丸は、グアニン(G)とアデニン(A)との間の非相補的な塩基対(Sheared G-A塩基対)を示し、縦線は、相補的な塩基対を示す。

[図26]図26Aは、励起波長305 nmを用いて、RNA-2APを含む溶液(コントロール)、及びRNA-2APに対して等モルの標的RNA又は非標的RNAを添加した溶液の蛍光スペクトルを測定した結果を示す図である。図26Bは、RNA-2APに標的RNA又は非標的RNAを添加したときの、波長370nmにおける蛍光強度の変化率(ΔF)を示す図である。

[図27]本発明の人工核酸の構成を模式的に示す図である。Aは、人工核酸の各ドメインの模式的な配置を示す。Bは、目的の核酸の標的ドメインの模式的な配置を示す。Cは、Aの人工核酸及びBの目的の核酸がハイブリダイズした様子を示す図である。図中、斜体は各ドメインの相補領域を、太字は各ドメインの非相補含有領域を示し、破線枠内は配列モチーフを示す。

[図28]実施例7において使用した核酸分子の塩基配列と二次構造を示す図である。Aはハイブリダイズ対象領域の配列(S0-GFP)とそれに完全に相補的な核酸(AS0-GFP)、BはS0-GFPとタンデムGA構造を誘導するRNA分子(GA-GFP)、CはS0-GFPとキンクターン構造を誘導するRNA分子(KT-GFP)を示す。図中、上側の各配列はハイブリダイズ対象領域として使用したpUC-frGFPのmRNAにおける配列を示す。破線枠内は前述の各立体構造を形成している配列を

含む領域を示す。塩基間の棒線は相補的対合を、白丸は重要な非相補的対合を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 1. 人工核酸

1-1. 概要

本発明の第1の態様は、人工核酸である。本発明の人工核酸は、立体構造形成誘導ドメインを必須の構成として含み、目的の核酸にハイブリダイズして特定の立体構造を形成する。本発明の人工核酸は、後述する本発明の遺伝子発現抑制剤及び核酸検出剤の有効成分となり得る。

[0013] 1-2. 定義

本明細書で使用する用語について、以下で定義する。

[0014] (1) 核酸

本明細書において「核酸」又は「核酸分子」とは、ヌクレオチドを構成単位とし、それらがホスホジエステル結合によって連結した生体高分子を指す。天然核酸と人工核酸に大別できるが、本明細書ではいずれも包含する。

[0015] 本明細書において「天然核酸」とは、自然界に存在する核酸を指す。例えば、DNAやRNAが該当する。RNAの例としては、mRNAやmiRNA等が挙げられる。

[0016] 本明細書において「miRNA」とは、生体内に存在し、特定の遺伝子（目的の遺伝子）の発現を調節する長さ18~25塩基長の一本鎖ノンコーディングRNAである。

[0017] 本明細書において「人工核酸」とは、生物学的方法に又は化学合成法によって人為的に合成された核酸分子を指す。本明細書の人工核酸は、特に断りがない限り、例えば、全て非修飾の天然のヌクレオチドからなってもよく、又は非天然のヌクレオチドや修飾されたヌクレオチドを含んでもよい。

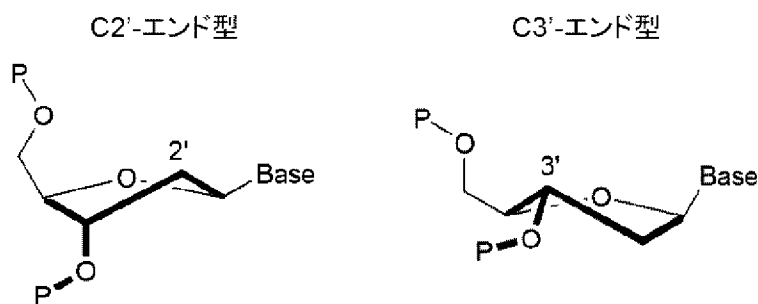
[0018] 「ヌクレオチド」とは、ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合した分子をいう。ペントフラノシル糖を含むヌクレオチドの場合、通常、糖の3'位又は5'位のヒドロキシル基にリン酸基が連結されている。

[0019] 「ヌクレオシド」とは、一般に塩基及び糖の組合せからなる分子をいう。

糖は、限定はしないが、通常、ペントフラノシル糖で構成される。ペントフラノシル糖の例として、リボースやデオキシリボースが挙げられる。また、塩基（核酸塩基）には、例えば、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）、及びウラシル（U）が挙げられる。本明細書では、特に断りのない限り塩基は、修飾塩基又は非修飾塩基のいずれであってもよい。

[0020] 本明細書において「糖部分のコンホメーション」とは、ヌクレオチドのリボース又はデオキシリボースが取る立体構造を指す。主なコンホメーションとしては、以下にデオキシリボースを例に示すC2'-エンド型及びC3'-エンド型が挙げられる。

[0021] [化1]



（式中、「Base」は塩基部分を示し、数字はリボース環におけるそれぞれの炭素の位置を示す。）

[0022] C2'-エンド型は、リボース環平面に対して塩基側に2'位の炭素が張り出したコンホメーションであり、広義にはC2'-エンド-C3'-エクソ型、C3'-エクソ型も含み、South型及びS型等とも呼ばれる。反対に、C3'-エンド型は、リボース環平面に対して塩基側に3'位の炭素が張り出したコンホメーションであり、広義にはC3'-エンド-C2'-エクソ型、C2'-エクソ型も含み、North型及びN型等とも呼ばれる。リボースもデオキシリボースもいずれのコンホメーションも取ることができるが、通常、リボースはC3'-エンド型を取りやすく、デオキシリボースはC2'-エンド型を取りやすい。

本明細書において「リボースの2'位のヒドロキシ基」とは、リボースの2'位の炭素に結合したヒドロキシ基を指す。

- [0023] 本明細書において「修飾」とは、核酸の構成単位であるヌクレオチド又はその構成要素であるヌクレオシドの一部又は全部が他の原子団と置換されること、又は官能基等が付加されることを指す。具体的には、例えば、糖修飾、塩基修飾、又はホスホジエステル結合の修飾が挙げられる。
- [0024] 本明細書において「修飾ヌクレオチド」とは、一部又は全部が他の原子団と置換された、又は官能基等が付加されたヌクレオチドを指す。また、「非修飾ヌクレオチド」とは、修飾ヌクレオチド以外のヌクレオチドを指す。原則として、天然型ヌクレオチドの多くがこれに該当する。
- [0025] 修飾ヌクレオチドは、人工的に構築された修飾ヌクレオチド及び天然の修飾ヌクレオチドをいずれも包含する。非修飾ヌクレオチドに類似の性質及び／又は構造を有する人工ヌクレオチド（ヌクレオチド類似体）や、非修飾ヌクレオチドの構成要素である非修飾ヌクレオシド若しくは非修飾塩基に類似の性質及び／又は構造を有する修飾ヌクレオシド若しくは修飾塩基を含む人工ヌクレオチドが該当する。修飾ヌクレオシドの具体例としては、脱塩基ヌクレオシド、アラビノヌクレオシド、2'-デオキシウリジン、 α -デオキシリボヌクレオシド、 β -L-デオキシリボヌクレオシドが挙げられる。また、修飾塩基の具体例としては、2-オキソ（1H）-ピリジン-3-イル基、5位置換-2-オキソ（1H）-ピリジン-3-イル基、2-アミノ-6-（2-チアゾリル）プリン-9-イル基、2-アミノ-6-（2-チアゾリル）プリン-9-イル基、2-アミノ-6-（2-オキサゾリル）プリン-9-イル基等が挙げられる。
- [0026] 本明細書において、「糖修飾」とは、核酸分子の糖部分における置換及び／又は任意の変化を指す。具体的には、例えば、2'位のヒドロキシ基を、メトキシ基に置換した2'-O-メチルリボース（2'-OMe）、エトキシ基に置換した2'-O-エチルリボース、プロポキシ基に置換した2'-O-プロピルリボース、若しくはブトキシ基に置換した2'-O-ブチルリボース、ヒドロキシ基をフルオロ基に置換した2'-デオキシ-2'-フルオロリボース又はヒドロキシ基を2'-O-メトキシ-エチル基に置換した2'-O-メトキシエチルリボース（2'-MOE）等が挙げられる。ヒドロキシ基が、炭化水素以外の官能基によって置換されてもよ

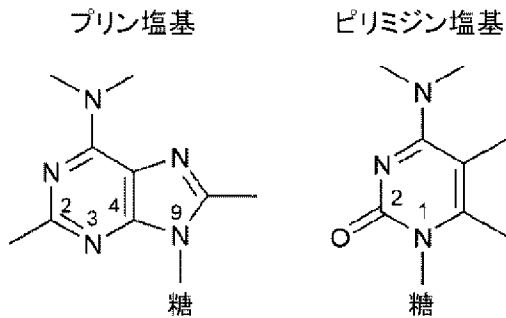
い。具体的には、例えば、H、及びハロゲン元素等による置換が挙げられる。また、ヌクレオシドの（デオキシ）リボース部が他の分子、例えば、糖、モルフォリノ環、PNA及びXNA等に置換されてもよい。具体的には、例えば、リボース部のアラビノース、2'-フルオロ-β-D-アラビノース、リボースの2'位のヒドロキシ基と4'位の炭素原子を架橋したリボース誘導体、リボース環の4'位の酸素を硫黄に置換したリボース誘導体への置換等が挙げられる。また、リボフラノース環上の酸素原子（リボースの4'位の酸素原子）が硫黄に置換したものも含まれる。特に、架橋したリボース誘導体を有するヌクレオチドは架橋核酸と呼ばれ、例えば、2'-OMe RNA、2'-MOE RNA、LNA、2'-O,5'-N BNA、及び2'-デオキシトランス-3',4'-BNA等が挙げられる。

[0027] 「修飾塩基」とは、天然のアデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシル以外の核酸塩基を指し、「塩基修飾」とは、それらの核酸塩基に変化させることを指す。修飾核酸塩基の例としては、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン、5-ヨードシトシン又はN4-メチルシトシン；N6-メチルアデニン又は8-ブロモアデニン；2-チオ-チミン；N2-メチルグアニン又は8-ブロモグアニン；及び5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル又は5-ヒドロキシウラシルが挙げられるが、これらに限定されない。

[0028] 本明細書において「非相補的」とは、核酸塩基が、いわゆるワトソン-クリック塩基対（天然型塩基対）を形成していない関係を意味する。本明細書において「非相補的対合」とは、非相補的である2つの塩基が向かい合い水素結合によって相互作用していることを指し、「非相補的塩基対」とは、その非相補的である2つの塩基を指す。また、2つの塩基が向かい合い、塩基対となることを「塩基対を形成する」という。具体的な非相補的塩基対として、例えば、Sheared型塩基対等が挙げられる。

[0029] 本明細書において「シェアード（Sheared）型塩基対」とは、二本の核酸鎖の間に形成される非相補的な塩基対の一種であり、片方の塩基のシャロウグロヴ（shallow groove）側の官能基が水素結合に関与するものを指す。

[0030] [化2]



[0031] 式中、環構造の中の数字はそれぞれの官能基が位置する位置を示す。「shallow groove側 (shallow groove edge) の官能基」とは、プリン塩基では、2位～4位の官能基、ピリミジン塩基では、2位の官能基を指す。shallow groove側の官能基は糖側 (sugar edge) の官能基とも呼ばれる。具体的なSheared型塩基対としては、例えば、G-A塩基対、A-A塩基対、U-C塩基対、及びC-C塩基対等が挙げられる。

[0032] (2) 変異

本明細書において「変異」とは、生物種集団のゲノム中に存在する塩基配列の多様性を指す。通常、集団内で1%以上の頻度で見られるものを多型、1%未満の頻度で見られるものを変異と弁別するが、本明細書においては、多型も変異に含め、集団内での頻度は問わない。

[0033] 本明細書において「一塩基バリエーション (SNV: single nucleotide variant)」とは、生物種集団のゲノム中に存在する塩基配列のバリエーション変異の一種であり、変異の大きさが1塩基のものを指す。通常、集団内で1%以上の頻度で変異が見られる場合を特に一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) と称する。本明細書における一塩基バリエーションは集団内での変異の頻度を問わない。

[0034] 本明細書において「挿入欠失変異 (in-del変異)」とは、生物種集団のゲノム中に存在する塩基配列のバリエーション変異の一種であり、変異の大きさが2塩基以上50塩基未満のものを指す。変異の種類は特に限定しない。例えば、短い繰り返し配列 (通常、2~7塩基) の繰り返し回数の変化による変異

(ショートタンDEMリピート (STR : short tandem repeat ; マイクロサテライト多型とも呼ばれる) や、繰り返し配列の大きさが50塩基未満の反復配列多型 (VNTR : variable number of tandem repeat) 等を含む。本明細書における挿入欠失変異は集団内での変異の頻度を問わない。

[0035] 本明細書において「構造多型 (Structural Variant) 」とは、生物種集団のゲノム中に存在する塩基配列のバリエーション変異の一種であり、変異の大きさが50塩基以上のものを指す。具体的な変異としては、例えば、逆位、転座、欠失、コピー数の変化及び挿入等が挙げられる。構造多型には、繰り返し配列の大きさが50塩基以上の反復配列多型 (VNTR) 等を含む。本明細書における構造多型は集団内での変異の頻度を問わない。

[0036] (3) 二次構造

本明細書において「二次構造」とは、二本の核酸鎖間の塩基対の形成及び塩基の突出を指す。特に、二次構造を狭義に使用する場合、特徴的な形状を含む構造のことを指す。具体的には、二次構造には、バルジ構造、ループ構造及びステム構造等が挙げられる。以下、代表的な二次構造である、バルジ構造について説明する。

[0037] 本明細書において「バルジ構造」とは、全体としてハイブリダイズしている二本鎖核酸においてみられる二次構造のうち、二本の核酸鎖の間で非相補的な塩基対を形成する部分、及び片方又は両方の鎖で塩基が二本鎖核酸分子の外側に部分的又は完全に突出する部分の立体構造を指す。本明細書におけるバルジ構造は、例えば、バルジループ (bulge loop) 、インターナルループ (internal loop) 及びマルチブランチループ (multi-branch loop) 等のいずれの構造も含む。バルジ構造の領域における実際の立体構造は、他の領域と比較して膨らんでいる必要はない。

[0038] (4) 立体構造

本明細書において「立体構造」とは、完全に相補的な二本鎖核酸分子が形成する二重らせん構造以外の任意の三次元構造である。

[0039] 本明細書において「特定の立体構造」とは、本発明の人工核酸によって誘

導される目的の立体構造を指す。

- [0040] 本明細書において「機能的（な）立体構造」とは、生体内において少なくとも1つの機能を有する立体構造を指す。例えば、リボザイム、アプタマー、トランスファーRNA、リボソームRNA（rRNA）等の立体構造やヘアピン構造は、機能的な立体構造である。一方、例えば、一本鎖RNAが偶発的に形成する、そのRNAの機能とは関係のない立体構造は機能的な立体構造ではない。
- [0041] 本明細書において「立体構造を誘導する」とは、人工核酸が目的の核酸とハイブリダイズすることにより、立体構造を形成させることを指す。例えば、rRNAにおいて見られる立体構造が誘導される。
- [0042] 本明細書において「配列モチーフ」とは、特定の立体構造を誘導し得る、二本鎖からなる配列情報を含むモチーフを指す。図27Cに示した模式図においては、破線枠内に相当する。配列モチーフを構成する二本鎖はそれぞれ相補領域（図27C斜体）を含み、一方又は両方の核酸鎖は非相補含有領域（図27C太字）をさらに含む。
- 本明細書において「コンセンサス配列」とは、同一の立体構造を形成する複数の配列において保存された配列情報を指す。
- [0043] 本明細書において「相補領域」とは、互いに相補的な配列からなる領域を指す。図27Cに示した模式図においては、例えば、斜体で示した塩基が各核酸鎖の相補領域に相当する。
- [0044] 本明細書において「非相補含有領域」とは、互いに非相補的な配列を含む2塩基以上の領域を指す。図27Cに示した模式図においては、例えば、太字で示した塩基が各核酸鎖の相補領域に相当する。ここで、前記領域は、その両末端には非相補的な配列を含む。
- [0045] 具体的な立体構造の例としては、バルジドG構造、キンクターン構造、リバースキンクターン構造、5SループE構造、Cループ構造及びタンデムGA構造等が挙げられる。以下に、立体構造及び配列モチーフの具体例を記載する。
- [0046] (i) バルジドG構造

本明細書において「バルジドG（Bulged-G）構造」とは、両方の核酸鎖がバ

ルジ構造を形成する立体構造であり、バルジ構造とSheared型G-A塩基対に挟まれた塩基三つ組（一方の鎖からの2塩基と他方の鎖からの1塩基の組）を配列上の特徴とする立体構造を指す。例示的なバルジドG構造の様子を図1 Aに示す。バルジドG構造に含まれるバルジ構造は、典型的にはそれぞれ3~5塩基からなる。バルジドG構造は多くの別名でも知られ、例えば、sarcin/ricinループ構造、 α -sarcin及びricin感受性ループ構造、SRL、又はSモチーフ等とも呼ばれる。バルジドG構造の配列モチーフは特に限定しないが、例えば、図1 Bのモチーフが挙げられる。

[0047] 例えば、図1 Bのモチーフ1 (α 鎖：配列番号1 (5'-NNNGUAN-3' : NはA、C、G又はU)、 β 鎖：配列番号2 (5'-NGANN-3' : NはA、C、G又はU)) においては、 α 3位、 α 4位及び β 3位の塩基が塩基三つ組を形成し、モチーフ2においては、 α 4位、 α 5位及び β 4位の塩基が塩基三つ組を形成する。また、モチーフ1及び2においては、それぞれ α 5位と β 4位、及び α 6位と β 5位の塩基がSheared型G-A塩基対を形成する。モチーフ1においては、例えば、各核酸鎖の破線枠内の領域をそれぞれの核酸鎖の非相補含有領域とし得る。

[0048] バルジドG構造の具体的な配列モチーフとしては、例えば、Correll, C. C., et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, Vol. 31, No. 23, 6806-6818; Correll, C. C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, Vol. 95, pp. 13436-13441に記載の配列モチーフ等が挙げられる。バルジドG構造は、例えば、 α -sarcin等のタンパク質により認識され、RNAの切断に関与する等の機能が報告されている（例えば、Gluck, A. 及びWool, I. G., *J. Mol. Biol.*, 1996, 256: 838-848を参照）。

[0049] (ii) キンクターン構造

本明細書において「キンクターン構造」とは、一方の鎖に形成されるバルジ構造によって二本鎖核酸が折り曲げられた立体構造であり、バルジ構造に続くSheared型G-A塩基対を配列上の特徴とする構造を指す。例示的なキンクターン構造の様子を図2 Aに示す。バルジ構造は、典型的には3塩基以上からなる。バルジ構造を形成する鎖では、バルジ構造の3'側にグアニン (G) が存

在し、他方の鎖のアデニン (A) と共に上記のSheared型G-A塩基対が形成されている。キンクターン構造の配列モチーフは特に限定しないが、例えば、図2B及びCのモチーフが挙げられる。

[0050] キンクターン構造には、例えば図2B (α 鎖：配列番号3 (5'-NNNNGAN-3' : NはA、C、G又はU)、 β 鎖：配列番号4 (5'-NGAN-3' : NはA、C、G又はU)) に示されるような標準型キンクターン構造や、例えば図2Cに示されるようなSheared型G-A塩基対の部分にバリエーションを有する非標準型キンクターン構造等が含まれるが、本明細書におけるキンクターン構造はこれらのいずれも包含する。また、例えば、標準型モチーフ1においては、 α 4位と β 1位、及び α 5位と β 2位の塩基がSheared型G-A塩基対を形成する。標準型モチーフ1においては、例えば、各核酸鎖の破線枠内の領域をそれぞれの核酸鎖の非相補含有領域とし得る。

[0051] キンクターン構造の具体的な配列モチーフとしては、例えば、Huang, L. 及びLilley, D. M., *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(5Part A): 790-801; Huang, L. 及びLilley, D. M., *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2018, 51(e5)に記載の配列モチーフ等が挙げられる。キンクターン構造は、例えば、L7Aeファミリーに属するタンパク質等によって認識されることが知られている。

[0052] (iii) リバースキンクターン構造

本明細書において「リバースキンクターン (Reverse Kink-turn) 構造」とは、二本鎖核酸がキンクターン構造とは逆方向に折り曲げられた立体構造を指す。例示的なリバースキンクターン構造の様子を図3Aに示す。キンクターン構造との配列上の最も大きな違いは、バルジ構造にSheared型G-A塩基対でなくA-A塩基対が隣接する点である。リバースキンクターン構造の配列モチーフは特に限定しないが、例えば、図3Bのモチーフが挙げられる。

[0053] 図3Bのモチーフは、キンクターン構造の標準型モチーフ1 (図2B) と比較して、 α 4位と β 1位の塩基の塩基対がA-A塩基対である点が異なる。図3Bのモチーフ (α 鎖：配列番号5 (5'-NNNNAAN-3' : NはA、C、G又はU)、 β 鎖

: 配列番号 6 (5'-NGAN-3' : NはA、C、G又はU)) においては、例えば、各核酸鎖の破線枠内の領域をそれぞれの核酸鎖の非相補含有領域とし得る。本明細書においてリバースキンクターン構造の配列モチーフは、モチーフ1 (図3 B) を標準型の配列モチーフとして、キンクターン構造と同様、幅広い配列モチーフを包含する。リバースキンクターン構造の具体的な配列モチーフとしては、例えば、Strobel, S. A., et al., Rna, 2004, 10(12), 1852-1854 に記載の配列モチーフ等が挙げられる。

[0054] (iv) 5SループE構造

本明細書において「5SループE (5S loop E) 構造」とは、原核生物の5S リボソームRNAにおいて発見された、二重らせん構造が一部ねじれた構造であり、非相補的なA-U塩基対及びSheared型G-A塩基対を含む3つ以上の非相補的塩基対で構成されていることを配列上の特徴とする構造を指す。例示的な5SループE構造の様子を図4 Aに示す。典型的には、5SループE構造の最小単位は、典型的には3つの塩基対からなる。5SループE構造はループE構造とも呼ばれる。5SループE構造の配列モチーフは、複数のサブモチーフを含む場合があり、本明細書においては、そのサブモチーフのことも単に5SループE構造の配列モチーフと呼ぶ。サブモチーフは、典型的には、3つの塩基対からなる。5SループE構造の配列モチーフは特に限定しないが、例えば、図4 B及びCのモチーフが挙げられる。

[0055] 5SループE構造は、単純型と複雑型に大別される。単純型は、例えば図4 Bの単純型モチーフ1~3に示されるような3つの塩基対からなる構造である。複雑型は、例えば図4 Cの複雑型モチーフ1及び2に示されるような複数の単純型モチーフを含む構造や、図4 Cの複雑型モチーフ3に示されるような途中に余分な塩基対を含む構造等が含まれる。例えば、複雑型モチーフ1においては α 1位~ α 3位及び β 1位~ β 3位と、 α 5位~ α 7位及び β 5位~ β 7位の塩基からなる2つのサブモチーフが含まれる。単純型モチーフ1 (α 鎖: 配列番号7 (5'-NGUAN-3' : NはA、C、G又はU)、 β 鎖: 配列番号8 (5'-NGAUN-3' : NはA、C、G又はU)) においては、例えば、各核酸鎖の破線枠内の領域をそれぞれ

の核酸鎖の非相補含有領域とし得る。

[0056] 5SループE構造の具体的な配列モチーフとしては、例えば、Correll, C. C., et al., *Cell*, 1997, 91(5), 705-712; Leontis, N. B. 及び Westhof, E. *Rna*, 1998, 4(9), 1134-1153等に記載の配列モチーフ等が挙げられる。5SループE構造にはMg⁺等の陽イオンが結合することや、5SループE構造の近傍でヌクレアーゼによる二本鎖切断が起こりやすいこと等が知られている。

[0057] (v) Cループ構造

本明細書において「Cループ (C-loop) 構造」とは、両方の核酸鎖にバルジ構造を形成し、かつ二重らせん構造が一部ねじれた立体構造であり、バルジ構造に続くU-A塩基対を配列上の特徴とする構造を指す。例示的なCループ構造の様子を図5Aに示す。典型的には、両核酸鎖のバルジ構造は大きさが異なり、例えば、長い方のバルジ構造はCを含む。Cループ構造の配列モチーフは特に限定しないが、例えば、図5Bのモチーフが挙げられる。

[0058] 標準的なCループ構造は、例えばモチーフ1に示されるような大きなバルジ構造が3つの塩基からなり、小さなバルジ構造が1塩基からなる構造である。しかし、例えばモチーフ2に示されるように小さいバルジ構造は2塩基以上からなってもよく、モチーフ3に示されるように大きいバルジ構造も4塩基以上からなってもよい。モチーフ1 (α 鎖; 配列番号9 (5'-NCACU-3' : NはA、C、G又はU)、 β 鎖: 配列番号10 (5'-ANN-3' : NはA、C、G又はU)) においては、例えば、 α 鎖の α 1位~ α 3位の領域、 β 鎖の β 1位の領域をそれぞれの核酸鎖の非相補含有領域とし得る。

[0059] Cループ構造の具体的な配列モチーフとしては、例えば、Klein, D. J., et al., *Journal of molecular biology*, 2004, 340(1), 141-177; Lescoute, A., et al., *Nucleic acids research*, 2005, 33(8), 2395-2409等に記載の配列モチーフ等が挙げられる。Cループ構造については、Cループ構造を有する二本鎖核酸同士が複合体を形成しやすいこと等が知られている。

[0060] (vi) タンデムGA構造

本明細書において「タンデムGA (Tandem GA) 構造」とは、両方の核酸鎖に

バルジが形成される立体構造であり、連続する2つのSheared型G-A塩基対を含むことを配列上の特徴とする構造を指す。例示的なタンデムGA構造の様子を図6Aに示す。タンデムGA構造はGA/AGループとも呼ばれる。タンデムGA構造の配列モチーフは特に限定しないが、例えば、図6Bのモチーフが挙げられる。モチーフ1 (α 鎖; 配列番号11 (5'-NGAN-3'; NはA、C、G又はU)、 β 鎖: 配列番号12 (5'-NGAN-3'; NはA、C、G又はU)) においては、例えば、各核酸鎖の破線枠内の領域をそれぞれの核酸鎖の非相補含有領域とし得る。

[0061] タンデムGA構造の具体的な配列モチーフとしては、例えば、Jang, S. B., et al., Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2004, 60(5), 829-835等に記載の配列モチーフ等が挙げられる。

[0062] 1-3. 構成

本発明の人工核酸は、必須の構成として立体構造形成誘導ドメインを含み、任意選択でハイブリダイズドメインを含む。

以下、各ドメインについて具体的に説明する。

[0063] 1-3-1. 立体構造形成誘導ドメイン

「立体構造形成誘導ドメイン」とは、目的の核酸の標的ドメインと立体構造を形成するドメインである。

本明細書において「目的の核酸」とは、人工核酸がハイブリダイズし得る核酸を指す。また、「標的ドメイン」とは、目的の核酸における特定の立体構造を構成する二本鎖からなる配列モチーフの一方の配列情報を含む領域を指す(図27B)。本明細書における目的の核酸は、特に、機能的な立体構造を形成しない核酸である。目的の核酸は機能的な立体構造を形成しない核酸である限り特に限定しないが、具体的には、例えば、mRNA及びマイクロRNA(miRNA)等の任意のRNAが挙げられる。目的の核酸は、天然の核酸であっても、人工の核酸であってもよい。また、目的の核酸は複数種類存在してもよい。例えば、人工核酸は、1種類の核酸を目的の核酸として、特異的にハイブリダイズ可能であってもよいし、複数種類の核酸に非特異的にハイブリダイズ可能であってもよく、又は複数種類の核酸に同時にハイブリダイズ可能で

あってもよい。さらに、例えば、複数種類の核酸にハイブリダイズ可能であっても、その一部の核酸とハイブリダイズした場合にのみ立体構造を誘導する人工核酸も本態様の人工核酸に含まれる。

[0064] 立体構造が誘導される条件は、目的の核酸と人工核酸がハイブリダイズ可能であれば特に限定しない。例えば、生体内において誘導されてもよいし、生体外で誘導されてもよい。また、一方又は両方の核酸鎖において立体構造を誘導することができる。

[0065] 誘導される立体構造は特に限定しない。rRNA等の機能的な立体構造を形成する核酸においてみられる立体構造の全体又は一部であってもよいし、天然には存在が確認されていない立体構造であってもよい。また、誘導される立体構造の種類も数も特に限定しない。例えば、1つの人工核酸によって1種類の立体構造を複数誘導してもよく、複数種類の立体構造を組合せて誘導してもよい。ここで、1種類の立体構造は、複数の立体構造が組合さってなる1つの複合的な立体構造を含む。例えば、アプタマーを1つの立体構造として誘導することも、複数のアプタマーが融合した立体構造を1つの立体構造として誘導することもできる。

[0066] 前述のように、本発明の人工核酸によって誘導される目的の立体構造を特定の立体構造という。特定の立体構造の具体例としては、二本鎖に基づく立体構造（以下の「核酸の折り返しに基づく立体構造」以外の立体構造：例えば、キンクターン構造、バルジドG構造、リバースキンクターン構造、5SループE構造、Cループ構造、タンデムGA構造、テトラループ受容体構造、フックターン構造（Hook-turn）、 Ω ターン構造及び π ターン構造等）、核酸の折り返しに基づく立体構造（一本鎖核酸の折り返し部分のみからなる立体構造：例えば、GNRAテトラループ、UNCGテトラループ及びCUUGテトラループ等を含むテトラループ構造等）、又はその組合せが挙げられる。好ましくは、特定の立体構造は、二本鎖に基づく立体構造を含む。また、好ましくは、特定の立体構造の具体例としては、キンクターン構造、バルジドG構造、リバースキンクターン構造、5SループE構造、Cループ構造、及びタンデムGA構造からな

る群から選択される1以上を含む。誘導される立体構造は、例えば、コンセンサス配列が知られていないものであっても、名称が付されていない立体構造であってもよい。さらに、形成される立体構造は安定であっても、不安定であってもよい。例えば、特定の条件下でのみ形成される立体構造であってもよいし、条件により形成される立体構造が変化してもよい。

[0067] 立体構造は、目的の核酸及び人工核酸で非対称に形成されてもよく、その場合、どちらにより大きな立体構造が形成されてもよい。例えば、キンクターン構造の配列モチーフとして例示した標準型モチーフ1 (図2B) の場合、 α 鎖が目的の核酸で、 β 鎖が人工核酸であってもよいし、その逆であってもよい。

[0068] 目的の立体構造が形成可能であるか否かは、当技術分野において公知の方法を用いて知ることができる。例えば、特定の立体構造を形成することが知られている配列モチーフやコンセンサス配列を使用した場合には、その特定の立体構造が形成されるものと推定することができる。この場合、実際に特定の立体構造が形成されたか否かを確認することを要しない。実際に人工核酸により特定の立体構造が形成されることを確認する場合は、例えば、*in silico*での解析によって、構造解析によって、特定の立体構造特異的に起こる現象の観察によって確認することができる。*in silico*での解析には、例えば、RNAComposer、RNAMotifScan、3dRNA、ModeRNA、MacroMoleculeBuilder、NA ST、iFoldRNA、Vfold3D、SimRNA、又はこれらの組合せ等の当技術分野において公知の立体構造予測プログラムを使用することができる。または、目的の核酸の全部又は一部と同じ塩基配列を有する核酸と人工核酸の複合体の構造解析によって立体構造を観察することもできる。この際、結晶化や構造解析に使用される条件及び方法は特に限定しない。具体的な方法としては、例えば、中性子線結晶解析、中性子小角散乱 (SANS)、核磁気共鳴 (NMR)、X線結晶構造解析、X線小角散乱、クライオ電子顕微鏡、又はこれらの組合せ等が挙げられる。さらに、特定の立体構造特異的に起こる現象の観察によって立体構造の形成を確認することもできる。例えば、キンクターン構造であれば

、L7Aeファミリーに属するタンパク質等が結合することが知られている。したがって、このタンパク質の結合を検出することにより、キクターン構造の形成を確認することができる。各立体構造に形成時に起こり得る現象については、各立体構造の定義の項において例示した。

[0069] 「立体構造形成誘導ドメイン」とは、目的の核酸の標的ドメインと立体構造を形成するドメインである（図27A）。立体構造形成誘導ドメイン及び標的ドメインは特定の立体構造の配列モチーフを構成する（図27C）。配列モチーフにおいて、立体構造形成誘導ドメイン及び標的ドメインは互いに相補的な塩基配列からなる相補領域（図27C斜体）を含み、さらに、立体構造形成誘導ドメイン及び／又は標的ドメインは互いに非相補的な塩基配列を含む1塩基以上の非相補含有領域（図27C太字）を含む。ここで、非相補含有領域はその両末端に非相補的な配列を含む。つまり、当該領域はそれが属するドメインの最も5'側に位置する非相補的な塩基と最も3'側に位置する非相補的な塩基の間の領域である。また、立体構造形成誘導ドメイン及び／又は標的ドメインが非相補含有領域を含む場合、非相補含有領域を含むドメインにおいて相補領域は非相補含有領域の一方又は両方に隣接する。例えば、立体構造形成誘導ドメインは人工核酸の末端に位置することができ、その場合、末端に位置する塩基対が非相補的であってもよい。

[0070] 相補領域を構成する塩基数は特に限定しない。具体的な塩基の数は、例えば、1塩基以上、2塩基以上、3塩基以上、4塩基以上、5塩基以上、10塩基以上、20塩基以上、又は30塩基以上である。また、相補領域の塩基配列は特に限定しない。

[0071] 立体構造形成誘導ドメイン及び標的ドメインに含まれる相補領域の数は特に限定しない。立体構造形成誘導ドメインに含まれる相補領域の数と標的ドメインに含まれる相補領域の数は同一である必要はない。通常、相補領域は互いに相補的な塩基配列からなるため、相補領域に含まれる塩基数の合計は立体構造形成誘導ドメインと相補領域で一致する。

[0072] 通常、立体構造形成誘導ドメイン又は標的ドメインが複数の相補領域を含

む場合、非相補含有領域がその複数の相補領域の間に位置する。好ましくは、立体構造形成誘導ドメイン及び／又は標的ドメインは複数の相補領域を含み、非相補含有領域はその複数の相補領域の間に位置する。

[0073] 非相補含有領域の大きさは1塩基以上であれば特に限定しない。具体的な塩基の数は、例えば、1~1000塩基、1~500塩基、1~400塩基、1~200塩基、1~100塩基、1~80塩基、1~60塩基、1~40塩基、1~30塩基、2~20塩基、2~15塩基、2~10塩基、2~9塩基、2~8塩基、又は2~7塩基である。また、非相補含有領域の塩基配列は、その両末端に非相補的な塩基配列を含む限り特に限定しない。また、非相補含有領域は互いに相補的な塩基配列を含むことができる。例えば、一方の核酸鎖の非相補含有領域が1塩基からなる場合、その非相補的な塩基は、その非相補含有領域の両末端の非相補的な塩基であると考えることができる。また、例えば、一方の核酸鎖の非相補含有領域が3塩基からなる場合、両端の2塩基は非相補的な塩基だが、その間に位置する1塩基は非相補的な塩基であっても相補的な塩基であってもよい。

[0074] 立体構造形成誘導ドメイン及び標的ドメインに含まれる非相補含有領域の数は特に限定しない。立体構造形成誘導ドメイン及び標的ドメインの少なくともいずれか一方に、少なくとも1つの非相補含有領域が含まれていればよい。例えば、人工核酸と目的の核酸の二本鎖の二次構造において、人工核酸がバルジ構造を取り、目的の核酸はそのバルジ構造部分に対応する塩基を持たない場合、立体構造形成誘導ドメインのみが1つの非相補含有領域を含む。非相補含有領域は立体構造の核となる領域であるため、非相補含有領域の数は、誘導する立体構造の種類や数に左右される。

[0075] 立体構造形成誘導ドメイン及び標的ドメインは特定の立体構造を構成する配列モチーフを構成する。配列モチーフは立体構造形成誘導ドメイン及び／又は標的ドメインの全体を構成していなくてもよい。例えば、配列モチーフの全体が非相補含有領域に含まれていてもよいし、配列モチーフの一部が非相補含有領域に含まれてもよい。また、立体構造形成誘導ドメイン及び標的ドメインに含まれる配列モチーフは特に限定しない。配列モチーフとしては

、例えば、コンセンサス配列を使用することもできるし、機能的な立体構造を形成する核酸の塩基配列の一部又は全部をそのまま又は一部改変して使用することもできる。各立体構造の具体的な配列モチーフとしては、例えば、キンクターン構造が、配列番号3 (5'-NNNNGAN-3' : NはA、C、G又はU) 及び配列番号4 (5'-NGAN-3' : NはA、C、G又はU) (配列番号3の1番目のNと配列番号4の4番目のN、配列番号3の7番目のNと配列番号4の1番目のNはそれぞれ互いに相補的)、バルジドG構造が、配列番号1 (5'-NNNGUAN-3' : NはA、C、G又はU) 及び配列番号2 (5'-NGANNN-3' : NはA、C、G又はU) (配列番号1の1番目のNと配列番号2の6番目のN、配列番号1の7番目のNと配列番号2の1番目のNはそれぞれ互いに相補的)、リバースキンクターン構造が、配列番号5 (5'-NNNNAAN-3' : NはA、C、G又はU) 及び配列番号6 (5'-NGAN-3' : NはA、C、G又はU) (配列番号5の1番目のNと配列番号6の4番目のN、配列番号5の7番目のNと配列番号6の1番目のNはそれぞれ互いに相補的)、5SループE構造が、配列番号7 (5'-NGUAN-3' : NはA、C、G又はU) 及び配列番号8 (5'-NGAUN-3' : NはA、C、G又はU) (配列番号7の1番目のNと配列番号8の5番目のN、配列番号7の5番目のNと配列番号8の1番目のNはそれぞれ互いに相補的)、Cループ構造が、配列番号9 (5'-NCACU-3' : NはA、C、G又はU) 及び配列番号10 (5'-ANN-3' : NはA、C、G又はU) (配列番号9の1番目のNと配列番号10の4番目のN、配列番号9の6番目のNと配列番号10の1番目のNはそれぞれ互いに相補的)、又はタンデムGA構造が、配列番号11 (5'-NGAN-3' : NはA、C、G又はU) 及び配列番号12 (5'-NGAN-3' : NはA、C、G又はU) (配列番号11の1番目のNと配列番号12の4番目のN、配列番号11の4番目のNと配列番号12の1番目のNはそれぞれ互いに相補的) からなる。

[0076] 1-3-2. ハイブリダイズドメイン

本発明の人工核酸は、立体構造形成誘導ドメインの一方又は両方に隣接するハイブリダイズドメインを含むことができる。ハイブリダイズドメインは目的の核酸とハイブリダイズ可能であるドメインである。ハイブリダイズドメインが複数存在する場合、個々のドメインをハイブリダイズサブドメイン

と呼ぶ。例えば、ハイブリダイズドメインは、立体構造形成誘導ドメインの両方に隣接する2つのサブドメインからなる。ハイブリダイズドメインの大きさは、6塩基～120塩基であればよい。具体的には、例えば、6塩基以上、7塩基以上、8塩基以上、9塩基以上、10塩基以上、11塩基以上、12塩基以上、13塩基以上、14塩基以上、15塩基以上、16塩基以上、17塩基以上、18塩基以上、19塩基以上、20塩基以上、21塩基以上、22塩基以上であればよく、また、例えば、120塩基以下、110塩基以下、100塩基以下、90塩基以下、80塩基以下、70塩基以下、60塩基以下、50塩基以下、40塩基以下、又は30塩基以下であればよい。ハイブリダイズドメインの塩基配列は、目的の核酸とハイブリダイズ可能である限り特に限定しない。好ましくは、目的の核酸とのハイブリダイズが、高ストリンジентな条件で行われ得る。

[0077] 本明細書において「ハイブリダイズする」とは、互いに完全に又は部分的に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドが二本鎖を形成することを指す。ハイブリダイゼーション条件は特に限定しないが、例えば、低ストリンジентな条件及び高ストリンジентな条件等の様々なストリンジентな条件であり得る。「低ストリンジентな条件」とは、核酸がハイブリダイズしやすい条件を意味する。低ストリンジентな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、低温かつ高塩濃度な条件をいう。例えば、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば5×SSC、0.1% SDSを含むバッファーを用いて42℃～50℃で洗浄する条件である。「高ストリンジентな条件」とは、非特異的なハイブリッドが形成されない条件を意味する。ここでいう低塩濃度は、具体的には、例えば、15～750mM、好ましくは15～500mM、15～300mM又は15～200mMをいう。また、ここでいう高温は、具体的には、例えば、50～68℃、又は55～70℃である。具体的な高ストリンジентな条件として、例えば、65℃、0.1×SSC及び0.1% SDSで洗浄する条件が挙げられる。ここで、1×SSCは、150mM塩化ナトリウム及び15mMクエン酸ナトリウムを含む。

[0078] ハイブリダイズ可能であるかどうかは、当技術分野において公知の方法を

用いて知ることができる。例えば、塩基同一性に基づいて知ることができる。通常、第1の核酸の塩基配列と完全に相補的な配列と塩基同一性が一定以上の塩基配列を有する第2の核酸は、第1の核酸とハイブリダイズ可能である。具体的には、例えば、塩基同一性が70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上又は100%の場合にハイブリダイズ可能である。本明細書において「塩基同一性」とは、2つのポリヌクレオチドの塩基配列を整列（アラインメント）し、必要に応じて、いずれかの塩基配列にギャップを導入して、両者の塩基一致度が最も高くなるようにしたときの、一方のポリヌクレオチドの全塩基数に対する他方のポリヌクレオチドの同一塩基の割合（%）をいう。%同一性は、相同性検索プログラムBLAST（Basic local alignment search tool；Altschul, S. F. et al, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990）検索等の公知のプログラムを用いて容易に決定できる。また、通常、第1の核酸の塩基配列と完全に相補的な配列において1個又は複数個の塩基が別の塩基に置換された塩基配列を有する第2の核酸は、第1の核酸とハイブリダイズ可能である。本明細書における複数個とは2個以上を指し、具体的には、例えば、2～30個、2～14個、2～12個、2～10個、例えば、2～8個、2～6個、2～5個、2～4個又は2～3個を指す。

[0079] また、本発明の人工核酸は、立体構造形成誘導ドメイン及び／又はハイブリダイズドメインの一方又は両方の末端に隣接して任意の長さの任意の追加配列を含んでもよい。

[0080] 1-3-3. 修飾

本態様の人工核酸は1以上の修飾ヌクレオチドを含むことができる。導入される修飾は特に限定しない。例えば、ハイブリダイズドメインにおいてホスホジエステル結合、糖部分及び／又は塩基を修飾することができる。

[0081] また、立体構造形成誘導ドメインに1以上の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。立体構造形成誘導ドメインにおける修飾ヌクレオチドが糖部分の修飾を含む場合、好ましくは、その修飾は立体構造形成時の糖部分のコンホメーションに影響を与えない。例えば、立体構造形成時に糖部分のコンホメーション

ンがC3'-エンド型であるヌクレオチドの位置に修飾ヌクレオチドを導入する場合、修飾ヌクレオチドはC3'-エンド型のコンホメーションを取り得ることが好ましい。具体的には、例えば、C3'-エンド型のコンホメーションを取り得る修飾ヌクレオチドとして、2'-OMe RNA、2'-MOE RNA、LNA及びDNAが挙げられる。また、例えば、立体構造形成時に糖部分のコンホメーションがC2'-エンド型であるヌクレオチドの位置に修飾ヌクレオチドを導入する場合、修飾ヌクレオチドはC2'-エンド型のコンホメーションを取り得ることが好ましい。具体的には、例えば、C2'-エンド型のコンホメーションを取り得る修飾ヌクレオチドとして、2'-O,5'-N BNA、2'-デオキシトランス-3',4'-BNA及びDNAが挙げられる。また、例えば、ホスホジエステル結合や塩基が修飾される場合には、一般に糖部分のコンホメーションは影響されない。

[0082] また、立体構造形成時にリボースの2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与するヌクレオチドの位置に修飾ヌクレオチドを導入する場合、修飾ヌクレオチドは、その水素結合を形成可能か、又はリボースの2'位にかさ高くない置換基を有することが好ましい。立体構造形成時に水素結合に関与するヒドロキシ基は、電子を供与していても、受容していても、そのどちらの側面があってもよい。具体的なかさ高くない置換基としては、例えば、水素基、ハロゲン基（例えば、フルオロ基、クロロ基及びブロモ基等）、メチル基、アミノ基及びシアノ基等が挙げられる。

[0083] 立体構造形成時の糖部分のコンホメーションや水素結合の形成の有無は、当技術分野において公知の方法を用いて知ることができる。例えば、立体構造の結晶構造解析結果をNucleic Acid DatabaseやProtein Data Bank等のデータベースからダウンロードし、目視により、又は3DNA等のソフトウェアを用いて調べることができる。また、各立体構造の定義の項において、糖部分のコンホメーションや水素結合の形成の有無を例示している。

[0084] 本態様の人工核酸は、特定の立体構造を形成した状態で、目的の核酸と安定してハイブリダイズ可能である。特に、立体構造が、非相補含有領域の一部の塩基配列によらずに形成可能である場合、その一部の塩基配列が変異を

含むことができる。本態様の人工核酸によれば、例えば、変異により個体差が存在する目的の核酸の領域に対して、その塩基配列の個体差によらずに同等の安定性で二本鎖を形成することが可能である。変異の種類は特に限定しないが、例えば、一塩基バリエーション、挿入欠失変異、構造多型又はその組合せが含まれる。具体的には、例えば、キクターン構造の標準型モチーフ1（図2B）においては、 α 鎖を標的ドメインとして、 α 1位、 α 2位、 α 3位又はその1以上の位置において変異を含むことができる。

[0085] 2. 遺伝子発現抑制剤

2-1. 概要

本発明の第2の態様は遺伝子発現抑制剤である。本発明の遺伝子発現抑制剤は、第1態様に記載の人工核酸を有効成分として含み、対象において遺伝子発現の抑制効果を有する。本発明の遺伝子発現抑制剤を使用することで、これまで安定した抑制が困難であった遺伝子をより高効率で発現阻害することができる。

[0086] 2-2. 構成

2-2-1. 構成成分

本発明の遺伝子発現抑制剤の構成成分について説明する。本発明の遺伝子発現抑制剤は、必須の構成成分として、人工核酸を含む。以下、各構成成分について具体的に説明をする。

[0087] 本明細書において「遺伝子発現抑制剤」とは、遺伝子発現抑制作用を有する薬剤をいう。

[0088] 本明細書において「遺伝子発現抑制」とは、人工核酸によって目的の遺伝子の転写産物の発現及び／又はタンパク質発現が抑制されることを意味する。本明細書において「転写産物」とは、DNA中の遺伝子領域からRNAポリメラーゼによって合成される任意のRNAを指す。具体的には、例えば、遺伝子から転写されるmRNA（例えば、成熟mRNA、mRNA前駆体、及び塩基修飾を受けていないmRNA等を含む）、miRNA等のノンコーディングRNA（ncRNA：non-coding RNA）、ロングノンコーディングRNA（lncRNA）、及びナチュラルアンチセンス

RNA等が挙げられる。発現抑制の方法は特に限定しない。例えば、siRNA、shRNA及び二本鎖RNA等のRNA干渉（RNAi）作用を有するRNA分子又はその前駆体を使用した方法；miRNA、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスDNA及びアンチセンスRNA等）及びリボザイム等の翻訳を抑制する核酸分子を使用した方法等の従来の発現抑制の方法に準じて実施することができる。

人工核酸については、第1態様で記載した通りである。したがって、ここでの詳細な説明は省略する。

[0089] 本発明の人工核酸は核酸による遺伝子発現抑制方法を改良したものであるため、本明細書における遺伝子発現抑制効果には、例えば、従来の遺伝子発現抑制方法で得られることが知られる効果が全て含まれる。具体的には、例えば、遺伝子の発現又は転写産物の発現量の抑制又は低下、翻訳の阻害、RNA編集、スプライシング機能改変効果（例えばスプライシングスイッチ、エクソンインクルージョン、エクソンスキッピング等を含む）、及び転写産物の分解等が挙げられる。

[0090] 本発明の人工核酸を使用し、目的の核酸の変異部分をバルジ構造に含めることにより、変異にかかわらず同程度に遺伝子発現抑制効果を発揮する人工核酸を設計可能である。また、本発明の人工核酸によれば、従来のASOと比較して、より高効率で遺伝子発現を抑制することができる。

[0091] 本態様によって発現が抑制される遺伝子は特に限定しないが、例えば、様々な疾患において、その発現が増加する遺伝子が挙げられる。対象となる疾患は特に限定しないが、例えば、正常なタンパク質の過剰発現、異常なタンパク質の発現、及びタンパク質の発現を直接的に又は間接的に調節するRNAの過剰な発現等を伴う。正常なタンパク質の過剰発現とは、正常個体でも発現しているタンパク質が、異常に多く産生されることを指し、例えば、炎症性疾患や自己免疫疾患等において見られる。異常なタンパク質の発現とは、少なくともある条件において、正常個体では発現していないタンパク質が産生されることを指し、例えば、タンパク質自体が異常な形態である場合や、タンパク質自体は正常であり、発現するタイミングや細胞が正常とは異なる場

合を含む。この異常は、例えば、神経変性疾患等において見られる。タンパク質の発現を直接的に又は間接的に調節するRNAの過剰な発現とは、タンパク質の発現を正又は負に調節するRNA（例えば、miRNA等）が過剰発現し、調節されるタンパク質の発現に異常が起きている場合を指す。この異常は、例えば、癌等において見られる。

[0092] 本態様の遺伝子発現抑制剤が適用される具体的な疾患としては、例えば、筋ジストロフィー；癌；心血管疾患；高血圧；感染症；腎疾患；アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン舞踏病、クロイツフェルトヤコブ病等の神経変性疾患；狼瘡、関節リウマチ等の自己免疫疾患；心内膜炎；グレーブス病；ALD；喘息又は嚢胞性線維症等の呼吸器疾患；骨粗鬆症、関節疾患等の骨疾患；肝疾患；乾癬若しくは湿疹等の皮膚疾患；眼疾患；耳鼻咽喉疾患；トゥレット症候群、統合失調症、鬱病、自閉症若しくは脳卒中等の他の神経疾患；又はグリコーゲン貯蔵症若しくは糖尿病等の代謝性疾患等が挙げられる。

[0093] 本態様の遺伝子発現抑制剤による遺伝子発現抑制の程度は特に限定しない。具体的には、例えば、その遺伝子の転写産物及び／又はタンパク質の発現量を指標に判定した場合に、遺伝子発現抑制剤を導入しない場合と比較して、遺伝子の発現が、100%、90%以上、75%以上、60%以上、50%以上、40%以上、30%以上、25%以上、20%以上又は10%以上抑制される。あるいは、遺伝子発現抑制剤を導入しない場合と比較して、遺伝子発現が有意に抑制されていればよい。遺伝子発現抑制の程度は、標的遺伝子の転写産物又はタンパク質の発現量を指標に判定することができる。例えば、転写産物の発現量は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション又はRT-PCR等により決定することができる。また、タンパク質の発現量は、例えば、ウエスタンブロッティング、ELISA、タンパク質の活性測定又は蛍光タンパク質からの蛍光強度等により決定することができる。

[0094] 2-2-2. 医薬組成物

本態様の遺伝子発現抑制剤は、これを有効成分の1つとして担体等と共に製

剤化することにより、医薬組成物とすることができる。

[0095] 使用される担体には、例えば、薬学的に許容可能な担体を含むことができる。「薬学的に許容可能な担体」とは、製剤技術分野において通常使用する添加剤をいう。例えば、溶媒、基剤、乳化剤、懸濁化剤、界面活性剤、pH調整剤、安定化剤、香味料、香料、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、鎮静剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、増粘剤、矯味剤、溶解助剤、及び他の添加剤が挙げられる。

[0096] 溶媒には、例えば、水若しくはそれ以外の薬学的に許容し得る水溶液、又は薬学的に許容される有機溶剤（植物性油等）のいずれであってもよい。水溶液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液が挙げられる。補助剤としては、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム、その他にも低濃度の非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等が挙げられる。

[0097] 上記担体は、有効成分である人工核酸の生体内での酵素等による分解を回避又は抑制する他、製剤化や投与方法を容易にし、剤形及び薬効を維持するために用いられるものであり、必要に応じて適宜使用すればよい。

[0098] 医薬組成物の剤形は、有効成分である本態様に記載の遺伝子発現抑制剤を分解等により不活化させることなく、標的部位まで送達し、生体内でその有効成分の薬理効果（遺伝子発現抑制効果）を発揮し得る形態であれば特に限定しない。

[0099] 具体的な剤形は、投与方法及び／又は処方条件によって異なる。投与方法は、非経口投与と経口投与に大別することができるので、それぞれの投与方法に適した剤形にすればよい。

[0100] 医薬組成物の好ましい投与形態は特に限定せず、経口投与又は非経口投与のいずれでもよい。非経口投与の具体例としては、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与（埋め込み型持続皮下投与を含む）、

皮内投与、気管／気管支投与、直腸投与、輸血による投与、脳室内投与、髄腔内投与、経鼻投与及び筋肉内投与等が挙げられる。

[0101] 投与方法が非経口投与であれば、好ましい剤形は、対象部位への直接投与又は循環系を介した全身投与が可能な液剤である。液剤の例としては、注射剤が挙げられる。注射剤は、前記賦形剤、エリキシル剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、pH調節剤等と適宜組合せて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。その他、軟膏、硬膏剤 (plaster)、パップ剤 (cataplast)、経皮剤、ローション剤、吸入剤、エアロゾル剤、点眼剤、及び坐剤であってもよい。

[0102] なお、上記各剤形の具体的な形状、大きさについては、いずれもそれぞれの剤形において当該分野で公知の剤形の範囲内であればよく、特に限定はしない。本発明の医薬組成物の製造方法については、当該技術分野の常法に従って製剤化すればよい。

[0103] 医薬組成物に含まれる遺伝子発現抑制剤の量 (含有量) は、人工核酸の種類、送達部位、医薬組成物の剤形、医薬組成物の投与量、並びに担体の種類によって異なる。したがって、それぞれの条件を勘案して適宜定めればよい。通常は、単回投与量の医薬組成物に有効量の遺伝子発現抑制剤が包含されるように調整する。「有効量」とは、遺伝子発現抑制剤が有効成分としての機能を発揮する上で必要な量であって、かつそれを適用する生体に対して有害な副作用をほとんど又は全く付与しない量をいう。この有効量は、被検体の情報、投与経路、及び投与回数等の様々な条件によって変化し得る。最終的には医師、獣医師又は薬剤師等の判断によって決定される。「被検体の情報」とは、医薬組成物を適用する生体の様々な個体情報である。例えば、被検体がヒトであれば、年齢、体重、性別、食生活、健康状態、疾患の進行度や重症度、薬剤感受性、併用薬物の有無等を含む。

[0104] 3. 核酸検出剤

3-1. 概要

本発明の第3の態様は核酸検出剤である。本発明の核酸検出剤は、第1態

様に記載の人工核酸を有効成分として含み、目的の核酸存在下において特定の立体構造を形成する。本発明の核酸検出剤を使用することで、被検試料から目的の核酸を検出することができる。

[0105] 3-2. 構成

3-2-1. 構成成分

本発明の核酸検出剤の構成成分について説明する。本発明の核酸検出剤は、必須の構成成分として人工核酸を含み、任意選択の構成成分として検出可能な標識を含む。各構成成分について具体的に説明をする。

[0106] 本明細書において「核酸検出剤」とは、被検試料から目的の核酸を検出する薬剤を指す。本発明の核酸検出剤によれば、目的の核酸の変異部分をバルジ構造に含めることにより、変異にかかわらず同程度に目的の核酸を検出可能である。

[0107] 「被検試料」とは、目的の核酸の存在の有無又は量が検査されるべき物質である。被検試料は、目的の核酸を含み得る試料であれば特に限定しない。具体的な被検試料としては、例えば、血液、血清、血球、尿、便、汗、唾液、口腔内粘膜、喀痰、リンパ液、髄液、涙液、母乳、羊水、精液、組織、バイオプシー及び培養細胞等の生体物質、環境から採取された環境物質、人工合成された核酸、及びそれらの混合物等が含まれる。被検試料は、本態様の核酸検出剤が適用される前に、例えば、細切、ホモジナイズ及び抽出等の公知の前処理を行ってもよい。

人工核酸については、第1態様で記載した通りである。したがって、ここでの詳細な説明は省略する。

[0108] 本態様の核酸検出剤は、任意選択で検出可能な標識を含む。検出可能な標識の種類は特に制限せず、検出方法によって適宜決定すればよい。具体的な検出可能な標識としては、例えば、蛍光色素（例えば、FITC、Texas、Cy3、Cy5、Cy7、FAM、HEX、VIC、JOE、Rox、TET、Bodipy493、NBD及びTAMRA等）、発光物質（例えば、アクリジニウムエステル等）、酵素の基質又は抗原として働く非着色低分子（例えば、ビオチン及びDIG等）、及び放射性同位元素（

例えば、³²P、³H及び¹⁴C等)等が含まれる。

[0109] また、標識として、蛍光塩基を使用することもできる。蛍光塩基の種類は、蛍光を発する核酸塩基であれば特に限定しない。具体的な蛍光塩基は、例えば、Glen research社のカタログ (https://www.glenresearch.com/media/folio3/productattachments/product_catalog/Glen_Product_Catalog_2021.pdf)等に記載されている。蛍光塩基には、限定されないが、2-アミノプリン、ピロロシトシン、9-アミノエチル-1,3-ジアザ-2-オキソフェノキサジン、1,N⁶-エテノアデニン、5-(1-ピレニル-エチニル)ウラシル、1,3-ジアザ-2-オキソフェノチアジン、及び1,3-ジアザ-2-オキソフェノキサジン等が挙げられる。蛍光塩基は、例えば、糖の1'位に結合していてもよい。

[0110] 蛍光塩基を有するヌクレオチドは、例えば、2-アミノプリン又はピロロシトシンを有するヌクレオチドであってもよい。

[0111] 3-2-2. 検出

本態様の核酸検出剤を使用することで、被検試料から目的の核酸を検出することができる。

[0112] 検出方法は核酸検出剤とハイブリダイズした目的の核酸が検出可能であれば特に限定しない。例えば、検出可能な標識等を介さずに、検出可能な標識を介して、検出可能な立体構造認識分子を介して、又はその組合せにより検出を行うことができる。

[0113] 本態様の核酸検出剤によれば検出可能な標識等を介さずに目的の核酸を検出することができる。この場合の検出方法は、核酸の検出方法であれば特に限定しない。具体的には、例えば、電気泳動を用いる方法、ヌクレアーゼを用いる方法及び二本鎖核酸の融解曲線を用いる方法等が挙げられる。本発明の人工核酸と目的の核酸は特定の立体構造を伴ってハイブリダイズする。そのため、人工核酸と目的の核酸の二本鎖核酸の泳動度は、同程度の塩基数からなる通常の相補的な二本鎖核酸とは異なる。したがって、例えば、特定の立体構造を形成した際に予想される泳動度と同じ泳動度の二本鎖核酸を検出することにより、目的の核酸を検出することができる。また、人工核酸と目

的の核酸の二本鎖核酸には、その標的ドメイン及び／又は立体構造形成誘導ドメインに特定の塩基配列を有する一本鎖部分が含有される場合がある。そのため、例えば、被検試料から得られた二本鎖核酸を特異的に切断するヌクレアーゼによって処理した後に、前記特定の塩基配列を持つ核酸を検出することにより、目的の核酸を検出することができる。さらに、本発明の人工核酸と目的の核酸の二本鎖核酸の融解曲線は、同程度の塩基数からなる通常の相補的な二本鎖核酸とは異なる。したがって、例えば、特定の立体構造を形成した際に予想される融解曲線と同じ融解曲線を示す二本鎖核酸を検出することにより、目的の核酸を検出することができる。

[0114] 本態様の核酸検出剤は検出可能な標識を介して検出することができる。検出方法は特に限定しないが、通常、使用される標識の種類や被検試料の性質によって決定される。蛍光色素又は発光物質を使用した場合は、例えば、目視検査によって、顕微鏡（例えば、蛍光顕微鏡等）を用いて、検出器（例えば、蛍光活性化セルソーティング（FACS）、発光光度計、吸光光度計等）を用いて、又はその組合せにより検出することができる。酵素の基質又は抗原として働く非着色低分子を標識として使用した場合は、例えば、酵素処理等の処理の後に、蛍光色素又は発光物質を使用した場合と同様の検出方法により検出を行うことができる。放射性同位元素を標識として使用した場合は、例えば、オートラジオグラフィ、シンチレーションカウンター、陽電子放出断層撮影（PET）又はその組合せにより検出することができる。

[0115] 本態様の核酸検出剤は立体構造形成時の認識分子を介して検出することができる。本発明の人工核酸は目的の核酸と特定の立体構造を形成してハイブリダイズする。したがって、特定の立体構造形成時に特異的に起こる現象の観察により目的の核酸を検出することができる。例えば、特定のタンパク質（例えば、特定の立体構造に対する抗体を含む）の結合、特定の種類の核酸の結合、立体構造に対して特定の位置における二本鎖核酸の切断等を検出することにより、目的の核酸を検出することができる。各立体構造の形成時に起こり得る現象については、各立体構造の定義の項において例示した。使用

される検出方法は検出する現象に応じて適宜決定すればよい。

[0116] 本態様の核酸検出剤は、その他の検出に必要な分子や試薬と混合して組成物として、又はその他の検出に必要な分子や試薬と共にキットとして提供することができる。その他の検出に必要な分子は、上述した目的の検出方法に応じて、検出に必要な分子の一部又は全部を含み得る。

[0117] 本発明の核酸検出剤は、サザンブロット、ノーザンブロット、及びin situ ハイブリダイゼーション等にも使用することができる。

[0118] 4. 人工核酸の製造方法

4-1. 概要

本発明の第4の態様は、人工核酸の製造方法である。本態様の人工核酸の製造方法は、標的ドメイン選択工程、立体構造形成誘導ドメイン決定工程、及び核酸合成工程を必須工程として含み、ハイブリダイズドメイン決定工程を任意選択可能な工程として含む。本方法によれば、第1態様に記載の人工核酸を合成することができる。

[0119] 4-2. 方法

本態様の方法は、標的ドメイン選択工程、立体構造形成誘導ドメイン決定工程、及び核酸合成工程を必須工程として含み、ハイブリダイズドメイン決定工程を任意選択可能な工程として含む。以下、各工程について具体的に説明をする。

[0120] 4-2-1. 標的ドメイン選択工程

「標的ドメイン選択工程」は、目的の核酸において、特定の立体構造を構成する二本鎖からなる配列モチーフの一方の配列情報を検索し、そのいずれか1以上を標的ドメインとして選択する工程である。

[0121] 標的ドメイン選択工程においては、目的の核酸の塩基配列と特定の立体構造の配列モチーフの一方の配列情報を比較し、特定の立体構造を形成し得る標的ドメインを選択する。

[0122] 目的の核酸及び特定の立体構造は第1態様の記載内容に準じて適宜選択することができる。

- [0123] 第1態様に記載の通り、配列モチーフにおいては、標的ドメイン及び前記立体構造形成誘導ドメインは、互いに相補的な配列からなる相補領域を含み、さらに前記標的ドメイン及び／又は前記立体構造形成誘導ドメインは、互いに非相補的な配列を含む1塩基以上の非相補含有領域を含み、前記非相補含有領域はその両末端に非相補的な配列を含む。相補領域は、非相補含有領域が存在する場合、その一方又は両方に隣接することができるが、この選択基準は特に限定しない。例えば、ランダムに、又は過去の報告に基づいて決定すればよい。
- [0124] 本工程では、目的の核酸において、特定の立体構造の配列モチーフの一方の配列情報の一部又は全部と一致する塩基配列を有する領域を検索する。ここで、「配列モチーフの一方の配列情報」とは、二本鎖からなる配列モチーフの配列情報を、一本鎖ずつに分けて検索に使用することを指す。例えば、配列モチーフの片方の鎖の配列情報のみを使用して検索してもよいし、両方の鎖の配列情報を一本鎖ずつに分けて検索に使用してもよい。この際に使用される塩基配列の検索方法は特に限定しない。例えば、同一性検索プログラムBLAST (Basic local alignment search tool ; Altschul, S. F. et al, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) 等の一般に使用される同一性検索プログラムを利用して検索することができる。この時、検索される特定の立体構造は1種類であっても複数種類であってもよい。
- [0125] この際に使用される配列モチーフは特に限定しない。例えば、コンセンサス配列を配列モチーフとして使用してもよいし、全ての塩基配列が決定された配列を配列モチーフとして使用してもよい。特に、コンセンサス配列を使用する場合には、保存されている塩基とその配置が一致している領域が目的の核酸中で検索される。全ての塩基配列が決定された配列を使用する場合には、その配列と完全に一致している領域のみならず、その配列と一定以上の同一性を有する配列を含む領域を標的ドメインの候補として選択することができる。例えば、1塩基、2塩基、3塩基、4塩基、5塩基又は6塩基の塩基が置換されている場合に、標的ドメインの候補とすることができる。あるいは、

例えば、同一性が80%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上、99.9%以上又は100%である場合に、標的ドメインの候補（以下、標的ドメイン候補と称する）とすることができる。また、検索に使用される配列モチーフの数は限定しない。例えば、一度に複数種類の配列モチーフについて検索を行うことができる。

[0126] 複数の標的ドメイン候補が得られた場合、そのいずれか1以上を選択して標的ドメインとすることができる。その選択基準は特に限定しない。例えば、ランダムに、標的ドメイン候補が含まれる遺伝子上の領域に基づいて、各標的ドメイン候補で誘導され得る立体構造に基づいて、配列モチーフとの配列同一性に基づいて、塩基配列と立体構造の形成しやすさに関する情報に基づいて、又はその組合せによって選択することができる。例えば、選択される標的ドメイン候補の配列は、既に立体構造を形成することが示されている配列であってもよい。また、限定するものではないが、好ましくは、標的ドメイン候補は、人工核酸がハイブリダイズすることで所望の効果が得られると考えられる領域に含まれる。また、目的の核酸が第1態様に記載の変異を含む場合、その変異の位置が配列モチーフにおける一意に決定していない塩基の位置に対応する標的ドメイン候補を優先して選択することができる。また、例えば、複数の標的ドメイン候補が一部重なり合って連続して存在する場合、その連続した複数の小さな標的ドメイン候補をまとめて1つの大きな標的ドメインとしてもよい。

[0127] 配列モチーフの検索及び標的ドメインの選択の実施される順序は特に限定しないが、好ましくは、標的ドメインの選択は、配列モチーフの検索と同時に又はそれより後に行われる。

[0128] 4-2-2. 立体構造形成誘導ドメイン決定工程

「立体構造形成誘導ドメイン決定工程」は、前記標的ドメインと配列モチーフを構成するように立体構造形成誘導ドメインの配列を決定する工程である。本工程は、上述の標的ドメイン選択工程と同時に、又はそれより後に実施することができる。

- [0129] 標的ドメインの配列情報を含む配列モチーフにおける人工核酸に対応する側の鎖の配列情報にしたがって、立体構造形成誘導ドメインの配列が決定される。
- [0130] 配列モチーフの塩基配列が一意に決まっていない場合、それらの塩基は任意に決定することができる。また、例えば、一意に決まっていない配列が、他方の鎖の対応する位置の塩基によって一意に決まる場合は、それに従うことができる。塩基の選択基準は特に限定しない。例えば、特定の立体構造を形成するRNAにおいて、その位置に特定の塩基を有する例が多い場合、その塩基を選択してもよい。
- [0131] 本工程において、立体構造形成誘導ドメイン中のヌクレオチドの一部又は全部を修飾ヌクレオチドとすることを決定することができる。立体構造形成誘導ドメインでの修飾ヌクレオチドの導入は、第1態様に記載の内容に従う。
- [0132] 本工程が標的ドメイン選択工程と同時に実施される場合、例えば、全ての標的ドメイン候補に対して立体構造形成誘導ドメインの配列を決定し、その上で、標的ドメイン候補から標的ドメインを選択することができる。
- [0133] 配列の決定及び修飾ヌクレオチド導入の決定の実施される順序は特に限定しないが、好ましくは、修飾ヌクレオチド導入の決定は、配列の決定と同時に又はそれより後に行われる。
- [0134] 4-2-3. ハイブリダイズドメイン決定工程
- 「ハイブリダイズドメイン決定工程」は、立体構造形成誘導ドメインの一方又は両方に隣接する6塩基~120塩基からなるハイブリダイズドメインの塩基配列を決定する工程である。本工程は、任意選択可能な工程であり、上述の立体構造形成誘導ドメイン決定工程と同時に、又はそれより後に実施することができる。
- [0135] 本工程では、人工核酸におけるハイブリダイズドメインの塩基配列を決定する。ハイブリダイズドメインは、立体構造形成誘導ドメインの一方又は両方に隣接することができるが、そのいずれも任意に選択することができる。

例えば、ハイブリダイズドメインが1つの立体構造形成誘導ドメインの両方に隣接する場合、ハイブリダイズドメインは2つのサブドメインを含むこととなる。ハイブリダイズドメインの塩基配列は、目的の核酸における、標的ドメイン以外の領域の塩基配列にしたがって決定することができる。塩基配列の決定方法は特に限定しない。また、塩基配列の塩基同一性の程度も、ハイブリダイズ可能である限り特に限定しない。

[0136] なお、本態様の方法は、さらに修飾や人工核酸に含める任意の追加配列を決定する工程を含んでもよい。これらの工程を行う時期は特に限定しない。また、これらに関する詳細は第1態様に記載の通りであり、その決定方法は特に限定しない。

[0137] 4-2-4. 核酸合成工程

「核酸合成工程」は、立体構造形成誘導ドメイン決定工程で決定された配列情報に基づいて人工核酸を合成する工程である。本工程は、上述の立体構造形成誘導ドメイン決定工程と同時に、又はそれより後に実施することができる。また、ハイブリダイズドメイン決定工程を実施する場合、前記工程と同時に、又はそれより後に実施することができる。

[0138] 本発明の人工核酸は、当業者であれば、公知の方法を適切に選択することによって製造することができる。立体構造形成誘導ドメイン決定工程において決定された人工核酸の塩基配列情報に基づいて、例えば、GE Healthcare社、Thermo Fisher Scientific社、Beckman Coulter社等の市販の自動核酸合成装置を使用して人工核酸を合成すればよい。なお、ハイブリダイズドメイン決定工程を実施する場合、立体構造形成誘導ドメイン決定工程及び立体構造形成誘導ドメイン決定工程において決定された人工核酸の塩基配列情報に基づいて人工核酸を合成することができる。合成の後に、例えば、得られた人工核酸を逆相カラム等を使用して精製する等の後処理をしてもよい。

実施例

[0139] <実施例1：RNA分子とそれにハイブリダイズして立体構造を誘導する核酸分子の安定性の評価>

(目的)

2つの核酸鎖間で能動的に立体構造が形成可能であることを確認し、立体構造が誘導された二本鎖核酸の安定性を調べる。

[0140] (方法)

1. 核酸分子の設計と合成

目的の核酸として配列番号13に示す塩基配列を有するRNA分子を設計した(ROI: 図7A~G上側)。人工核酸としては、立体構造のコンセンサス配列を元に、バルジドG構造を誘導するRNA分子(RNA-BG; 配列番号14: 図7B下側)、キンクターン構造を誘導するRNA分子(RNA-KT; 配列番号15: 図7C下側)、リバースキンクターン構造を誘導するRNA分子(RNA-RKT; 配列番号16: 図7D下側)、5SループE構造を誘導するRNA分子(RNA-5S; 配列番号17: 図7E下側)、Cループ構造を誘導するRNA分子(RNA-CL; 配列番号18: 図7F下側)及びタンデムGA構造を誘導するRNA分子(RNA-GA; 配列番号19: 図7G下側)を設計した。また、コントロールとして、目的の核酸に対して相補的な配列を有するRNA分子(RNA-ASO; 配列番号20: 図7A下側)を設計した。

[0141] RNA分子の合成には、核酸自動合成機NTS-M2-MX (Nihon Techno Service Co, Ltd) を使用した。合成したサンプルはNAP-10 columns (Cytiva社) を使用してゲルろ過により精製した。精製後には、7 M尿素を含む20%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、サンプルが高純度に正しく合成されていることを確認した。

[0142] 2. 二本鎖RNAの熱安定性の測定

温度管理には、温度制御装置PAC-743R (Jasco社) を接続した吸光光度計V-630 (Jasco社) を使用した。二本鎖核酸の熱融解は、20~100°Cの温度範囲(測定間隔1°C、昇温速度1°C/分)で波長260.0 nmの紫外線の吸光度を測定することにより測定した。サンプルとして、10 mMカコジル酸ナトリウム(pH 7.0)、100 mM塩化ナトリウムを含む溶液に、ROI及び人工核酸又はRNA-ASOをそれぞれ最終濃度1 µMとなるよう添加した試験溶液を調製した。

[0143] 熱融解曲線を作成するために、測定された吸光度から、以下の式を用いて相対吸光度 (A) を算出した。

$$A = (A_t - A_{\min}) / (A_{\max} - A_{\min})$$

(A_t : $t^{\circ}\text{C}$ での吸光度、 A_{\min} : 吸光度の最小値、 A_{\max} : 吸光度の最大値)

[0144] シグモイド曲線として作成された熱融解曲線の変曲点を、温度変化データの直線領域において最小二乗法で近似した直線とその直線領域が交差する点として近似的に算出し、その温度を二本鎖融解温度 (T_m) とした。

[0145] (結果)

結果を図8及び表1に示す。

[0146] [表1]

表 1. 非修飾人工核酸と目的の核酸の二本鎖核酸の融解温度

人工核酸	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$)
RNA-ASO	80.5	-
RNA-BG	66.2	-14.3
RNA-KT	69.1	-11.4
RNA-RKT	69.7	-10.8
RNA-5S	70.1	-10.4
RNA-CL	67.7	-12.8
RNA-GA	72.3	-8.2

* ΔT_m は、目的の核酸と人工核酸の二本鎖核酸の T_m 値を目的の核酸とRNA-ASOの T_m 値から引いた値を示す。

[0147] いずれの核酸を用いた場合でも、融解曲線がシグモイド型となったことから、どの核酸を用いた場合でも、目的の核酸と安定な二本鎖を形成できることがわかった (図8)。目的の核酸とコントロールの二本鎖核酸の熱融解曲線 (図8 A) と比較して、6種類の人工核酸を使用した場合 (図8 B~G)、目的の核酸との二本鎖核酸の熱融解曲線は低温側にシフトしており、 T_m 値も低かった (表1)。しかし、体温に近い温度 (40°C 以下) では、二本鎖は十分に安定であることがわかった。6種類の人工核酸の中では、RNA-GAが最も安定であり (図8 G)、RNA-BGが最も不安定であった (図8 B)。

[0148] <実施例2: 二本鎖核酸の安定性に修飾が与える影響の評価>

(目的)

修飾ヌクレオチドを使用した場合の二本鎖核酸の安定性を調べる。

[0149] (方法)

実施例 1 の方法に準じて実験を行った。使用した核酸は以下の通りである。

目的の核酸としては、実施例 1 と同様に、配列番号 1 3 に示す塩基配列を有する RNA 分子 (ROI) を使用した。人工核酸としては、実施例 1 と同じ塩基配列を有するが、その全てのヌクレオチドが 2'-O-メチル (2'-OMe) 修飾されている 3 種類の核酸分子を用いた。バルジド G 構造を誘導する核酸分子 (OMe-BG ; 配列番号 2 1) 、5S ループ E 構造を誘導する核酸分子 (OMe-5S ; 配列番号 2 2) 、及びタンデム GA 構造を誘導する核酸分子 (OMe-GA ; 配列番号 2 3) を使用した。また、コントロールとして、実施例 1 と同じ塩基配列を有するが、その全てのヌクレオチドが 2'-OMe 修飾されている核酸分子 (OMe-ASO ; 配列番号 2 4) を使用した。

[0150] (結果)

結果を図 9 及び表 2 に示す。

[0151] [表2]

表 2. 2'-OMe 修飾人工核酸と目的の核酸の二本鎖核酸の融解温度

人工核酸	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	$\Delta T_{m(modi)}$ (°C)
OMe-ASO	77.4	-	-3.1
OMe-BG	67.5	-9.9	1.3
OMe-5S	72.2	-5.2	2.1
OMe-GA	78.0	0.6	5.7

* ΔT_m は、目的の核酸と人工核酸の二本鎖核酸の T_m 値を目的の核酸と RNA-ASO の T_m 値から引いた値を示す。

* $\Delta T_{m(modi)}$ は、非修飾人工核酸を用いたときの T_m 値を修飾人工核酸を用いたときの T_m 値から引いた値を示す。

[0152] コントロール (図 9 A) とは異なり、人工核酸を用いた場合はいずれも、非修飾 RNA を使用した実施例 1 と比較して融解曲線が高温側にシフトし (図 9 B ~ D) 、 T_m 値も高くなった (表 2 の $\Delta T_{m(modi)}$ の列) 。特に、OMe-GA の T_m 値は、コントロールと比較して高くなり、完全に目的の核酸に相補的な場合に比

べ、立体構造が誘導された場合の方がより安定な場合があることがわかった。人工核酸の修飾による安定性の向上は、特に比較的低温の領域において顕著であり、約50°C以下の温度範囲においては、いずれの人工核酸もROI/OMe-AS0より安定であった(図9)。3種類の人工核酸の中では、修飾後もRNA-GAが最も安定であり(図9D)、RNA-BGが最も不安定であった(図9B)。このことから、同様の修飾を行った場合には、人工核酸の安定性の序列は、修飾前後で大きく変化しないことが示された。

[0153] 以上の結果から、人工核酸は目的の核酸に対して非相補的な塩基を複数持っているにも関わらず、目的の核酸と安定な二本鎖を形成できることが確認できた。そして、2'-OMe等によるヌクレオチド修飾が、二本鎖の安定性の向上の手段として有効であることがわかった。

[0154] <実施例3：ヌクレオチド修飾が立体構造に与える影響の評価(バルジドG構造)>

(目的)

ヌクレオチド修飾がバルジドG構造に与える影響を調べる。

[0155] (方法)

1. 核酸分子の設計と合成

バルジドG構造を形成するRNA分子(非修飾BG; 図10A; 配列番号25:PDB-ID=1Q9A)と、その二本鎖領域の片側の核酸鎖に含まれるヌクレオチドを次のように修飾したRNA分子(修飾BG; 図10D; 配列番号26)を用いた。

・糖部分のコンホメーションがC3'-エンド型であり、かつ2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与していないヌクレオチド全てにおいて、2'-OMe修飾を導入した(図10D小文字)。

・糖部分のコンホメーションがC2'-エンド型であるヌクレオチド全てをDNAに置換した(図10D斜体小文字)。

[0156] 各核酸分子を核酸自動合成機を用いて化学合成した。その後、7 M尿素を含む20%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(30 cm×40 cm)により精製し、さらにNAP-10 columnsを使ったゲルろ過により脱塩処理をした。

[0157] 2. X線結晶解析

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。1 mM又は2 mMの結晶化用オリゴヌクレオチドと結晶化用緩衝液を0.2 μ Lずつ混合してドロップを製作し、リザーバー溶液に対して平衡化した。各核酸について、2種類の結晶化条件により結晶化を行った。結晶化条件の詳細は表3の通りである。

[0158] [表3]

表 3. 結晶化条件

	非修飾 BG (結晶 I)	非修飾 BG (結晶 II)	修飾 BG (結晶 I)	修飾 BG (結晶 II)
<u>サンプル溶液: 0.2 μL</u>				
オリゴヌクレオチド	1 mM	2 mM	1 mM	1 mM
<u>結晶化溶液: 0.2 μL</u>				
カコジル酸ナトリウム(pH 7.0)	50 mM	-	50 mM	50 mM
MOPS (pH 7.0)	-	50 mM	-	-
ヘキサアンミンコバルト塩化物	10 mM	-	10 mM	
スペルミン四塩酸塩	-	-	-	1 mM
塩化リチウム	-	-	10 mM	-
塩化カリウム	10 mM	-	-	-
塩化マグネシウム		10 mM		
塩化カルシウム	-	-	-	100 mM
硫酸アンモニウム		3.5 M	-	-
2-メチル-2,4-ペンタジオール	10%	-	10%	1%
<u>リザーバー溶液: 250 μL</u>				
2-メチル-2,4-ペンタジオール	40%	-	40%	40%
その他	-	結晶化溶液	-	-

[0159] 単結晶をCryoLoop (Hampton Research社) で掬い取り、40%の2-メチル-2,4-ペンタジオール (MPD) 溶液に数秒間浸した。その後、液体窒素中で急速凍結したものを、X線回折実験に用いた。

[0160] X線回折実験はPhoton Factory社の構造生物学ビームラインBL-17A及びARNE-3Aを用いて行った。回折データの処理にはプログラムXDSを用いた。初期位相の決定は、プログラムPhaser (Phenix社) を用いた分子置換法により行った。原子パラメーターの精密化はプログラムphenix.refine (Phenix社) を用いて行った。

[0161] (結果)

結果を表4及び5、及び図10～12に示す。

[0162] [表4]

表4. 結晶学的データ、並びにデータ測定及び立体構造精密化の統計値

結晶コード	非修飾 BG (結晶 I)	非修飾 BG (結晶 II)
結晶データ		
空間群	C222 ₂	P4 ₃
単位胞 (Å)	a = 25.1, b = 53.3, c = 105.6	a = b = 29.7, c = 76.8
データ収集		
ビームライン	Photon Factory の BL-17A	Photon Factory の BL-17A
波長 (Å)	1.10567	1.10567
分解能 (Å)	26.7-2.6	27.7-2.2
外殻の分解能 (Å)	2.7-2.6	2.3-2.2
特有の反射	4236	6691
完全性 (%)	99.1	99.8
外殻における完全性 (%)	96.5	97.7
R _{anom} (%)	8.9	11.8
外殻における R _{anom} (%)	37.4	33.5
多重度	3.4	6.8
外殻における多重度	3.2	6.0
I/σ (I)	10.9	13.6
外殻における I/σ (I)	4.0	7.2
構造精密化		
分解能 (Å)	26.7-2.6	27.7-2.2
用いた反射	4236	6691
R 因子 (%)	18.0	17.7
R _{free} (%)	24.4	21.4
R.m.s.d. 結合長 (Å)	0.005	0.005
R.m.s.d. 結合角 (°)	0.9	1.0

[0163]

[表5]

表 5. 結晶学的データ、並びにデータ測定及び立体構造精密化の統計値

結晶コード	修飾 BG (結晶 I)	修飾 BG (結晶 II)
結晶データ		
空間群	P2 ₁	P4 ₃ 2 ₁ 2
単位胞 (Å, °)	a = 24.8, b = 116.4, c = 27.9 β = 107.2	a = b = 68.9, c = 116.0
データ収集		
ビームライン	Photon Factory の BL-17A	Photon Factory の BL-17A
波長 (Å)	1.60496	0.98
分解能 (Å)	29.1-2.7	30.3-1.7
外殻の分解能 (Å)	2.8-2.7	1.74-1.7
特有の反射	7414	30956
完全性 (%)	90.3	98.2
外殻における完全性 (%)	85.3	98.3
R _{merge} (%)	-	8.6
外殻における R _{merge} (%)	-	36.5
R _{anom} (%)	5.4	-
外殻における R _{anom} (%)	26.7	-
多重度	1.6	6.5
外殻の多重度	1.6	6.8
I/σ (I)	8.3	12.0
外殻の I/σ (I)	2.4	4.7
構造精密化		
分解能 (Å)	29.1-2.7	30.3-1.7
用いた反射	7414	30941
R 因子 (%)	20.7	18.9
R _{free} (%)	26.5	23.7
R.m.s.d. 結合長 (Å)	0.006	0.006
R.m.s.d. 結合角 (°)	1.5	1.5

[0164] 非修飾BGと修飾BGのそれぞれについて2種類の結晶化条件で結晶が得られ（表3：それぞれ結晶I及び結晶IIと称する）、いずれも構造解析に成功した（表4及び5）。

[0165] 2種類の結晶から2つの立体構造が得られた。結晶I及び結晶IIは立体構造に

違いがなく、結晶化条件にかかわらず一定の立体構造を形成することがわかった（図10）。特に非修飾BGの立体構造は、先行研究（Correll, C. C., et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(23), 6806-6818）で明らかにされたものと完全に一致した（図10B及びC）。また、修飾BGにおいても、結晶化条件にかかわらずバルジDG構造が形成されることがわかった（図10E及びF）。塩基対ごとにヌクレオチド間の相互作用を観察したところ、非修飾BGと修飾BGは、ヌクレオチド間相互作用が全く同じであることがわかった（図11及び12）。

[0166] このことから、本実施例で行った修飾様式は立体構造に影響を及ぼさないことがわかった。つまり、糖部分のコンホメーションが修飾の前後で変化しない場合は基本的に立体構造に影響はなく、さらに、C3'-エンド型のリボースの2'位は、そのヒドロキシ基が水素結合に関与していない場合には修飾しても問題ないことがわかった。

[0167] <実施例4：ヌクレオチド修飾が立体構造に与える影響の評価（キンクターン構造）>

（目的）

ヌクレオチド修飾がキンクターン構造に与える影響を調べる。

[0168] （方法）

1. 核酸分子の設計と合成

2分子が互いにハイブリダイズして2つのキンクターン構造を形成するRNA分子（非修飾KT；図13A；配列番号27：PDB-ID=4CD1）と、そのキンクターン構造を形成する各二本鎖領域の片側の核酸鎖に含まれるヌクレオチドを次のように修飾したRNA分子（修飾KT；図13C；配列番号28）を用いた。

- ・糖部分のコンホメーションがC3'-エンド型であり、かつ2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与していないヌクレオチド全てにおいて、2'-OMe修飾を導入した（図13C小文字）。

- ・糖部分のコンホメーションがC3'-エンド型であり、かつ2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与している1つのヌクレオチドにおいても、2'位にかさ高い

OMe修飾を導入した（図13C小文字）。

・糖部分のコンホメーションがC2'-エンド型であるヌクレオチド全てをDNAに置換した（図13C斜体小文字）。

核酸分子の合成と精製は実施例3に準じて行った。

[0169] 2. X線結晶解析

結晶化及び構造解析は各核酸について1つの結晶化条件で実施例3に準じて行った。結晶化条件の詳細は表6の通りである。

[0170] [表6]

表 6. 結晶化条件

	非修飾 KT	修飾 KT
<u>サンプル溶液: 0.2 μL</u>		
オリゴヌクレオチド	2 mM	2 mM
<u>結晶化溶液: 0.2 μL</u>		
カコジル酸ナトリウム(pH 7.0)	50 mM	50 mM
スペルミン四塩酸塩	10 mM	10 mM
塩化ナトリウム	500 mM	-
塩化カリウム	-	400 mM
2-メチル-2,4-ペンタジオール	10%	10%
<u>リザーバー溶液: 250 μL</u>		
2-メチル-2,4-ペンタジオール	40%	40%

[0171] (結果)

結果を表7、及び図13～16に示す。

[0172]

[表7]

表 7. 結晶学的データ、並びにデータ測定及び立体構造精密化の統計値

結晶コード	非修飾 KT	修飾 KT
結晶データ		
空間群	P6 ₃ 22	P6 ₃ 22
単位胞 (Å)	a = b = 70.2, c = 47.7	a = b = 70.6, c = 48.2
データ収集		
ビームライン	Photon Factory の BL-17A	Photon Factory の BL-17A
波長 (Å)	0.98	0.98
分解能 (Å)	37.5-2.6	37.8-2.9
外殻の分解能 (Å)	2.7-2.6	3.0-2.9
特有の反射	2386	1761
完全性 (%)	99.9	98.5
外殻における完全性 (%)	99.4	99.3
R _{merge} (%)	5.6	5.7
外殻における R _{merge} (%)	29.9	36.6
多重度	33.5	4.5
外殻における多重度	33.5	4.5
I/σ (I)	55.9	16.9
外殻における I/σ (I)	16.0	4.0
構造精密化		
分解能 (Å)	37.5-2.6	37.8-2.9
用いた反射	2382	1753
R 因子 (%)	18.5	19.2
R _{free} (%)	24.0	23.4
R.m.s.d. 結合長 (Å)	0.006	0.010
R.m.s.d. 結合角 (°)	1.2	1.5

[0173] 非修飾KTと修飾KTのそれぞれについて結晶が得られ、いずれも構造解析に成功した（表7）。

[0174] 非修飾KTの立体構造は、先行研究 (McPhee, S. A., et al., Nature communications, 2014, 5(1), 1-6) で明らかにされたものと完全に一致しており、キクターン構造が2つ形成された（図13A及びB）。本実施例で用いた結晶化条件は先行研究とは異なることから、バルジドG構造と同様に、キク

ターン構造も結晶化条件にかかわらず安定な立体構造であることがわかった。また、修飾KTにおいても、非修飾KTと立体構造に大きな差異は見られなかった(図13及び14)。さらに、2つ形成されたキクターン構造のうち一方について、塩基対ごとにヌクレオチド間の相互作用を観察した(図15及び16)。その結果、塩基同士の水素結合については基本的に維持されていた(図15)。水素結合にリボースの2'位の水酸基が関与していた場合は、DNAヌクレオチドでの置換や2'-OMe修飾により、一部の水素結合が切断されていることがわかった(図15C及びDの丸部分、及び図16C及びDの丸部分)。特に、かさ高い2'-OMe修飾によって、塩基同士の水素結合も一部切断される場合があることがわかった(図16C及びD)。

[0175] このことから、本実施例で行った修飾様式は立体構造に大きな影響を及ぼさないものの、安定性には影響を与え得ることがわかった。つまり、安定性の観点から考えると、C3'-エンド型のコンホメーションを有するリボースの2'位は、その水酸基が水素結合に関与している場合には修飾しないか、塩基同士の水素結合まで切断されないようかさ高くない置換基による修飾が好ましいことがわかった。

[0176] <実施例5：ヌクレオチド修飾が立体構造に与える影響の評価(テトラループ受容体構造)>

(目的)

ヌクレオチド修飾がテトラループ受容体構造に与える影響を調べる。

[0177] (方法)

1. 核酸分子の設計と合成

テトラループ受容体構造を形成するRNA分子(非修飾TLR; 図17A; 配列番号29: PDB-ID=4FNJ)において、その二本鎖領域の片側の核酸鎖に含まれるヌクレオチドをDNAに置換(図17D斜体小文字)した核酸分子(修飾TLR; 図17C; 配列番号30)を用いた。

核酸分子の合成と精製は実施例3に準じて行った。

[0178] 2. X線結晶解析

結晶化及び構造解析は実施例3に準じて行った。2種類の結晶化条件により結晶化を行った。結晶化条件の詳細は表8の通りである。

[0179] [表8]

表 8. 結晶化条件

	修飾 TLR (結晶 I)	修飾 TLR (結晶 II)
<u>サンプル溶液: 0.2 μL</u>		
オリゴヌクレオチド	2 mM	2 mM
<u>結晶化溶液: 0.2 μL</u>		
カコジル酸ナトリウム(pH 7.0)	50 mM	-
マロン酸ナトリウム (pH 7.0)	-	1.1 M
HEPES (pH 7.0)	-	100 mM
ヘキサアンミンコバルト塩化物	10 mM	-
塩化ストロンチウム	500 mM	-
Jeffamine ED-2001 (pH 7.0)	-	0.5%
2-メチル-2,4-ペンタジオール	10%	10%
<u>リザーバー溶液: 250 μL</u>		
2-メチル-2,4-ペンタジオール	40%	-
その他	-	結晶化溶液

[0180] (結果)

結果を表9、及び図17～20に示す。

[0181]

[表9]

表 9. 結晶学的データ、並びにデータ測定及び立体構造精密化の統計値

結晶コード	修飾 TLR (結晶 I)	修飾 TLR (結晶 II)
結晶データ		
空間群	R3	R3
単位胞 (Å)	a = b = 83.2, c = 67.2	a = b = 82.6, c = 70.2
データ収集		
ビームライン	Photon Factory- Advanced Ring の NE-3A	Photon Factory の BL-17A
波長 (Å)	1.0	1.10611
分解能 (Å)	30.4-2.9	31.9-2.9
外殻の分解能 (Å)	3.0-2.9	3.0-2.9
特有の反射	7623	7926
完全性 (%)	98.8	97.8
外殻における完全性 (%)	95.0	99.5
R _{merge} (%)	6.3	-
外殻における R _{merge} (%)	28.6	-
R _{anom} (%)	-	6.8
外殻における R _{anom} (%)	-	27.3
多重度	2.7	2.6
外殻における多重度	2.4	2.6
I/σ (I)	13.8	11.1
外殻における I/σ (I)	3.3	4.1
構造精密化		
分解能 (Å)	30.4-2.9	31.9-2.9
用いた反射	7619	7871
R 因子 (%)	17.2	16.5
R _{free} (%)	19.9	20.1
R.m.s.d. 結合長 (Å)	0.007	0.007
R.m.s.d. 結合角 (°)	0.9	1.0

[0182] 修飾TLRについて2種類の結晶化条件で結晶が得られ（それぞれ結晶I及び結晶IIと称する）、いずれも構造解析に成功した（表9、及び結晶Iの立体構造を図17Dに示す）。

[0183] 非修飾TLRの二次構造と立体構造は、それぞれ図17A及びBに示す通りである (Coonrod, L. A., et al., *Biochemistry*, 2012, 51(42), 8330-8337)。これと比較して、修飾TLRの立体構造に大きな差異は見られなかった (図17D)。また、結晶I及び結晶IIは立体構造に違いがなかったことから、バルジD構造及びキクターン構造と同様に、テトラループ受容体構造も結晶化条件にかかわらず安定な立体構造であることがわかった。さらに、2つの分子間のテトラループ構造 (図18の破線枠内) とテトラループ受容体構造 (図18の空間充填モデル) の相互作用を観察したところ、修飾TLRにおいても、非修飾TLRと相互作用に大きな差異は見られなかった (図18)。

[0184] ヌクレオチドごとにコンホメーションを観察すると、修飾TLRと非修飾TLRの間で、各ヌクレオチドの糖部分のコンホメーションは維持されていた。これは、DNAもRNAもC3'-エンド型及びC2'-エンド型両方のコンホメーションを取ることができることによると考えられる。しかし、比較的C3'-エンド型のコンホメーションを取りやすいRNAを比較的C2'-エンド型のコンホメーションを取りやすいDNAに置換しても、コンホメーションが拘束されたことから、修飾の前後で糖部分のコンホメーションを維持することの重要性が示された。

[0185] さらに、テトラループ (TL) 構造とテトラループ受容体 (TLR) 構造の相互作用で見られるヌクレオチド間の相互作用を観察した (図19及び20)。すると、水素結合に関与していたリボースの2'位のヒドロキシ基が水素に置換されたことにより、一部の水素結合が切断されていることがわかった (図19E及びFの丸部分及び図20の丸部分)。しかしながら、塩基間の水素結合に影響はなく、テトラループ構造とテトラループ受容体構造の相互作用も維持されたことから、リボースの2'位のヒドロキシ基が水素結合に関与している場合であっても、水素のようなかさ高くない置換基での置換であれば、構造や機能に大きな影響がないことが示された。

[0186] <実施例6：変異を含むRNA分子とそれにハイブリダイズして立体構造を誘導する核酸分子の安定性の評価>

(目的)

RNA分子が変異を含む場合に、ハイブリダイズによって立体構造が誘導された二本鎖核酸の安定性を調べる。

[0187] (方法)

1. 核酸分子の設計と合成

実施例1の方法に準じて実験を行った。使用した核酸は以下の通りである。

変異を含む目的の核酸として、中心付近の塩基配列がUUUであるRNA分子 (ROI-U; 図21A及びC上側; 配列番号31) 及び中心付近の塩基配列がAAAに変異したRNA分子 (ROI-A; 図21B及びD上側; 配列番号32) を設計した。人工核酸としては、立体構造のコンセンサス配列を元に、上記変異部分がバルジ構造に含まれるようにキンクターン構造を誘導するRNA分子 (KT-SKIP; 図21C及びD下側; 配列番号34) を設計した。また、コントロールとして、ROI-Uに対して相補的な配列を有するRNA分子 (AS0-A; 図21A及びB下側; 配列番号33) を設計した。

[0188] (結果)

結果を図22に示す。

いずれの核酸を用いた場合でも、融解曲線がシグモイド型となったことから、どの核酸を用いた場合でも、目的の核酸と二本鎖を形成できることがわかった (図22)。コントロールであるAS0-Aを使用した場合、ROI-Uとの二本鎖核酸に比べ、ROI-Aとの二本鎖核酸の熱融解曲線は、低温側に大きくシフトした (図22A)。 T_m 値も、ROI-Uとの二本鎖核酸では86°Cであった一方、ROI-Aとの二本鎖核酸では78°Cとなり、変異が二本鎖核酸の安定性に大きな影響を与えることがわかった。変異部分をバルジ構造に含めるように立体構造を誘導したKT-SKIPを使用した場合、ROI-Uとの二本鎖核酸の熱融解曲線とROI-Aとの二本鎖核酸の熱融解曲線は、大きく違いがなく (図22B)、いずれも T_m 値は75°Cであった。

[0189] このことから、立体構造を誘導して変異部分をバルジ構造に含めることにより、変異にかかわらず同程度に目的の核酸とハイブリダイズする人工核酸

を設計可能であることがわかった。

[0190] <実施例 7 : ハイブリダイズして立体構造を誘導する核酸分子を用いたタンパク質発現の抑制>

(目的)

ハイブリダイズして立体構造を誘導する核酸分子を用いてタンパク質の発現が抑制できることを確認し、アンチセンス核酸を用いた場合の抑制効果と比較する。

[0191] (方法)

目的の核酸として、タンパク質合成キット「無細胞くんN Mini」(大陽日酸)に付属のpUC-frGFP DNA(配列番号35)の転写産物であるmRNAを用いた。ハイブリダイズの対象領域として、特定の領域(配列番号35の277位~301位; 図23A~C上側及び図28A~C上側; 配列番号36)を使用した。人工核酸としては、立体構造のコンセンサス配列を元に、対象領域とハイブリダイズしてタンデムGA構造を誘導するRNA分子(GA-GFP; 図23B下側及び図28B下側; 配列番号38)、キンクターン構造を誘導するRNA分子(KT-GFP; 図23C下側及び図28C下側; 配列番号39)を設計した。また、コントロールRNA分子として、対象領域と同じ配列を有するRNA分子(S0-GFP; 図23A~C上側及び図28A~C上側; 配列番号36)及び対象領域に対して相補的な配列を有するRNA分子(AS0-GFP; 図23A下側及び図28A下側; 配列番号37)を設計した。

核酸の合成は、実施例1に準じて行った。

[0192] 設計した核酸分子を添加せずに、又は設計した核酸分子を添加して、タンパク質合成を行った。タンパク質合成は、タンパク質合成キット「無細胞くんN Mini」(大陽日酸)を用い、製造者推奨のプロトコールにしたがって行った。概略は以下の通りである。

「無細胞くんN Mini」の反応液プレミックス、pUC-frGFP DNA(終濃度0.5 nM)及び設計したRNA分子(S0-GFP、AS0-GFP、GA-GFP、KT-GFP:それぞれ終濃度20 μ M)を混合して50 μ lの反応溶液を調製した。ネガティブコントロ

ールとして、RNAを添加していない反応溶液も調製した。これらの反応溶液をPCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara) で30℃で90分間インキュベートしてタンパク質合成反応を行い、その後4℃で5分間インキュベートして反応を停止した。その反応溶液を以下の実験に用いた。

[0193] タンパク質合成阻害効果を調べるために、蛍光スペクトルの測定を行った。

蛍光スペクトルの測定は、FP-8300 (Jasco) により、励起波長480 nmを用いて500~600 nmの範囲の蛍光スペクトルを測定した。

なお、上記の実験は室温で行った。

[0194] (結果)

結果を図24に示す。

設計したRNA分子を添加しなかった反応液では、510 nmにfrGFP由来の明りょうなピークが観察された(図24A)。S0-GFPを添加した場合、同じ波長に同程度のピークが観察された(図24B)。このことから、RNA分子の添加自体によってはタンパク質合成や蛍光の検出に影響はないことが確認できた。AS0-GFPを添加した場合、ピークの高さは低下し、タンパク質の翻訳が阻害されたことがわかった(図24C)。GA-GFP及びKT-GFPを使用した場合、いずれにおいても、510 nmにおけるピークがほとんど観察されなかった(図24D及びE)。

[0195] このことから、立体構造を誘導する核酸を使用することにより通常のAS0を使用した場合と比較しても高効率でタンパク質合成を阻害できることがわかった。

[0196] <実施例8：2-アミノプリンを含む蛍光標識RNAプローブ (RNAを主な構成ヌクレオチドとする蛍光標識核酸プローブ) による標的RNAの検出>

標的RNA及び非標的RNAとして配列番号40~43のものを使用し(表10)、2-アミノプリンを含む蛍光標識RNAプローブによる標的RNAの検出を検討した。

[0197]

[表10]

表 10. 標的 RNA 及び非標的 RNA の塩基配列

	塩基配列
標的 RNA	5'-ACU CUC CUC GAC UCU UCA UCA UCA UGU-3'(配列番号40)
非標的 RNA1	5'-CGA GCG CCC CAC CAC CC-3'(配列番号41)
非標的 RNA2	5'-GGG CCG GUC CCC CGG G-3'(配列番号42)
非標的 RNA3	5'-CCC GGU UCU UGG CCG GCC C-3'(配列番号43)

[0198] 図 25 に示すように、標的 RNA (配列番号 40) にハイブリダイズしてキンクターン構造を形成し、キンクターンモチーフ中の L3 の位置 (図 25 の配列の X) に、蛍光塩基 2-アミノプリン (2-aminopurine、2AP) を有する 2' -デオキシリボヌクレオチドを含むよう、蛍光標識 RNA プローブの塩基配列を設計した (図 25)。蛍光標識 RNA プローブ中のヌクレオチドは、上記の蛍光塩基を有する 2' -デオキシリボヌクレオチド以外全て RNA とした (以下、このように設計した 2AP を含む蛍光標識 RNA プローブを RNA-2AP と称する)。設計した RNA-2AP の塩基配列を以下に示す。

5'-ACA UGA UGA UGA AGA GGA XGA GAG GAG AGU-3' (配列番号 44) (式中、X = 2AP である。)

[0199] 上記蛍光標識 RNA プローブ (RNA-2AP)、標的 RNA、及び 3 種類の非標的 RNA (非標的 RNA1~3) を、核酸自動合成機 NTS-M2-MX (日本テクノサービス株式会社) を用いてホスホロアミダイト法により化学合成した。2-アミノプリンを含むヌクレオチドのホスホロアミダイトとしては、2-アミノプリン-CE ホスホロアミダイト (2-Aminopurine-CE Phosphoramidite) (Glen Research) を用いた。上記の化学合成により得られたサンプルを NAP-10 columns (Cytiva) を用いてゲルろ過により精製し、7 M 尿素を含む 20% 変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により目的の RNA が高純度で正しく合成されていることを確認した。

[0200] 合成した蛍光標識 RNA プローブ (RNA-2AP) が標的 RNA を塩基配列特異的に検出できるかどうかを、以下に述べるように、蛍光スペクトル測定により調べた。

[0201] 10 mMカコジル酸ナトリウム (pH7) 及び100 mM塩化ナトリウムを含む溶液に、RNA-2APと0.01mMの標的RNA又は非標的RNAをそれぞれ最終濃度0.01mMとなるように添加した溶液 (試験溶液) を調製した。また、コントロールとして、10 mMカコジル酸ナトリウム (pH7) 及び100 mM塩化ナトリウムを含む溶液に0.01mMのRNA-2APのみを添加した溶液 (コントロール溶液) を調製した。

[0202] コントロール溶液の3D蛍光スペクトルをFP-8300 (Jasco) を用いて測定し、最大励起波長と最大蛍光波長を決定した。その結果に基づいて、その後の蛍光スペクトル測定に用いる測定条件 (励起波長及び検出する蛍光波長の範囲) を決定した。

[0203] 上記のように決定した測定条件を用いてFP-8300 (Jasco) により試験溶液の蛍光スペクトルを測定した。具体的には、励起波長305 nmを用いて330~450 nmの範囲の蛍光スペクトルを測定した。

[0204] さらに、以下の式により、RNA-2APに対して標的RNA又は非標的RNAを添加したときの、蛍光強度の変化率 ΔF を算出し、RNA-2APの標的RNA検出能力を評価した。

$$\Delta F = (F - F_0) / F$$

(F : 試験溶液の特定の波長における蛍光強度、 F_0 : コントロール溶液の同波長における蛍光強度)

なお、上記の実験は室温で行った。

結果を図26に示す。

[0205] RNA-2APは、3種類の非標的RNAいずれを添加しても蛍光強度がほとんど変化しなかったが、標的RNAを添加すると蛍光強度が著しく上昇した (図26A)。RNA-2APに標的RNA又は非標的RNAを添加したときの、波長370nmにおける蛍光強度の変化率を算出すると、標的RNAを添加したときの蛍光強度の変化率は $\Delta F = 0.59$ であり、非標的RNAを添加したときの蛍光強度の変化率 ($\Delta F = -0.05 \sim -0.07$) に比べて顕著に高かった (図26B)。これらの結果から、RNA-2APは標的RNAを塩基配列特異的に検出できることが示された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用によ

り本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 機能的立体構造を形成しない目的の核酸にハイブリダイズして特定の立体構造を誘導する人工核酸であって、
- 前記人工核酸は前記目的の核酸の標的ドメインと立体構造を形成する立体構造形成誘導ドメインを含み、
- 前記標的ドメインと前記立体構造形成誘導ドメインは、特定の立体構造を構成する二本鎖からなる配列モチーフを構成し、
- 前記配列モチーフにおいて、前記立体構造形成誘導ドメイン及び前記標的ドメインは互いに相補的な配列からなる相補領域を含み、
- さらに前記配列モチーフにおいて、前記立体構造形成誘導ドメイン及び／又は前記標的ドメインは互いに非相補的な配列を含む1塩基以上の非相補含有領域を含み、
- 前記非相補含有領域はその両末端に非相補的な配列を含む、
- 前記人工核酸。
- [請求項2] 前記立体構造形成誘導ドメインの一方又は両方に隣接する6塩基～120塩基からなるハイブリダイズドメインをさらに含む、請求項1に記載の人工核酸。
- [請求項3] 前記立体構造形成誘導ドメイン及び／又は前記標的ドメインが複数の前記相補領域を含み、前記非相補含有領域が前記複数の相補領域の間に位置する、請求項1又は2に記載の人工核酸。
- [請求項4] 前記非相補含有領域が2～7塩基からなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の人工核酸。
- [請求項5] 前記特定の立体構造がキンクターン構造、バルジドG構造、リバースキンクターン構造、5SループE構造、Cループ構造、及びタンデムGA構造からなる群から選択される1以上を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の人工核酸。
- [請求項6] キンクターン構造が、5'-NNNGAN-3'及び5'-NGAN-3'、
- バルジドG構造が、5'-NNNGUAN-3'及び5'-NGANN-3'、

リバースキントーン構造が、5'-NNNNAAN-3'及び5'-NGAN-3'、
5SループE構造が、5'-NGUAN-3'及び5'-NGAUN-3'、
Cループ構造が、5'-NCACU-3'及び5'-ANN-3'、又は
タンデムGA構造が、5'-NGAN-3'及び5'-NGAN-3'
からなり、
各塩基配列において、NはA、C、G又はUである、
請求項5に記載の人工核酸。

- [請求項7] 前記目的の核酸がmRNA又はmiRNAである、請求項1～6のいずれか一項に記載の人工核酸。
- [請求項8] 前記ハイブリダイズが、高ストリンジентな条件で行われる、請求項1～7のいずれか一項に記載の人工核酸。
- [請求項9] 前記立体構造形成誘導ドメインに1以上の修飾ヌクレオチドを含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の人工核酸。
- [請求項10] 前記修飾ヌクレオチドが、2'-OMe RNA、2'-MOE RNA、LNA、2'-O,5'-N BNA、2'-デオキシトランス-3',4'-BNA及びDNAからなる群から選択される、請求項9に記載の人工核酸。
- [請求項11] 前記修飾ヌクレオチドが、リボースの2'位におけるフルオロ基修飾を含む、請求項9又は10に記載の人工核酸。
- [請求項12] 前記標的ドメインが、変異を含む前記非相補含有領域を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の人工核酸。
- [請求項13] 前記変異が一塩基バリエーション、挿入欠失変異、構造多型又はその組合せである、請求項12に記載の人工核酸。
- [請求項14] 請求項1～13のいずれか一項に記載の人工核酸を有効成分として含む遺伝子発現抑制剤。
- [請求項15] 請求項1～13のいずれか一項に記載の人工核酸を有効成分として含む核酸検出剤。
- [請求項16] 機能的立体構造を形成しない目的の核酸にハイブリダイズして特定の立体構造を誘導する人工核酸の製造方法であって、

前記目的の核酸において、特定の立体構造を構成する二本鎖からなる配列モチーフの一方の配列情報を検索し、そのいずれか1以上を標的ドメインとして選択する標的ドメイン選択工程、

前記標的ドメインと配列モチーフを構成するように立体構造形成誘導ドメインの配列を決定する立体構造形成誘導ドメイン決定工程、及び

前記立体構造形成誘導ドメイン決定工程で決定された配列情報に基づいて前記人工核酸を合成する核酸合成工程
を含み、

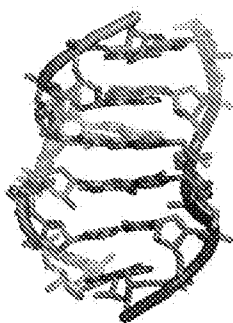
前記配列モチーフにおいて、前記標的ドメイン及び前記立体構造形成誘導ドメインは、互いに相補的な配列からなる相補領域を含み、

さらに前記配列モチーフにおいて、前記標的ドメイン及び／又は前記立体構造形成誘導ドメインは、互いに非相補的な配列を含む1塩基以上の非相補含有領域を含み、

前記非相補含有領域はその両末端に非相補的な配列を含む、
前記方法。

[図1]

A

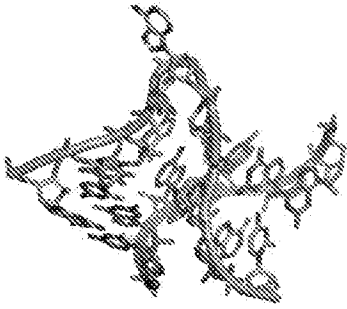


B



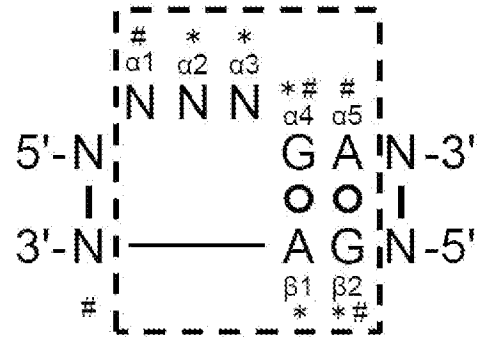
[図2]

A



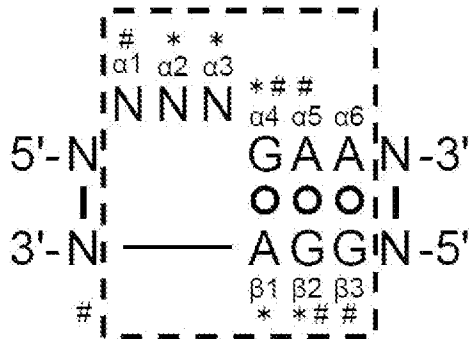
B

標準型モチーフ1

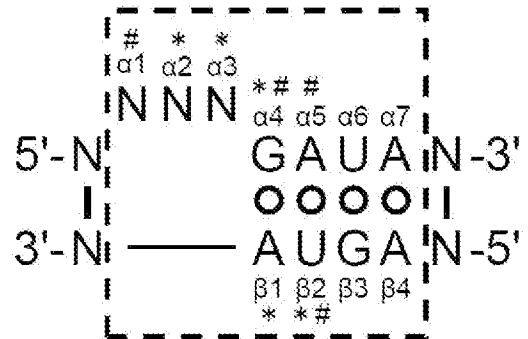


C

非標準型モチーフ1

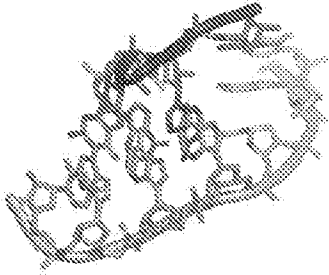


非標準型モチーフ2

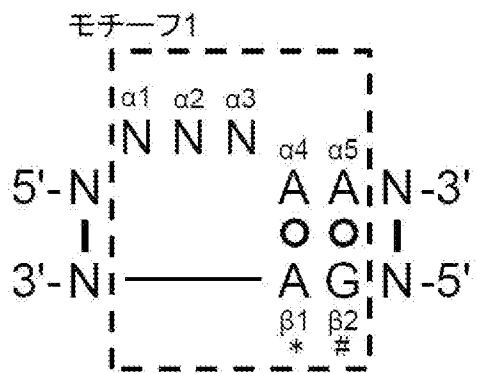


[図3]

A

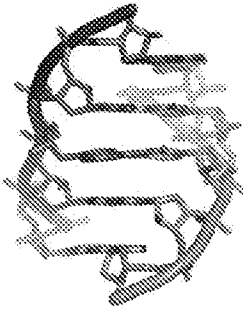


B



[図4]

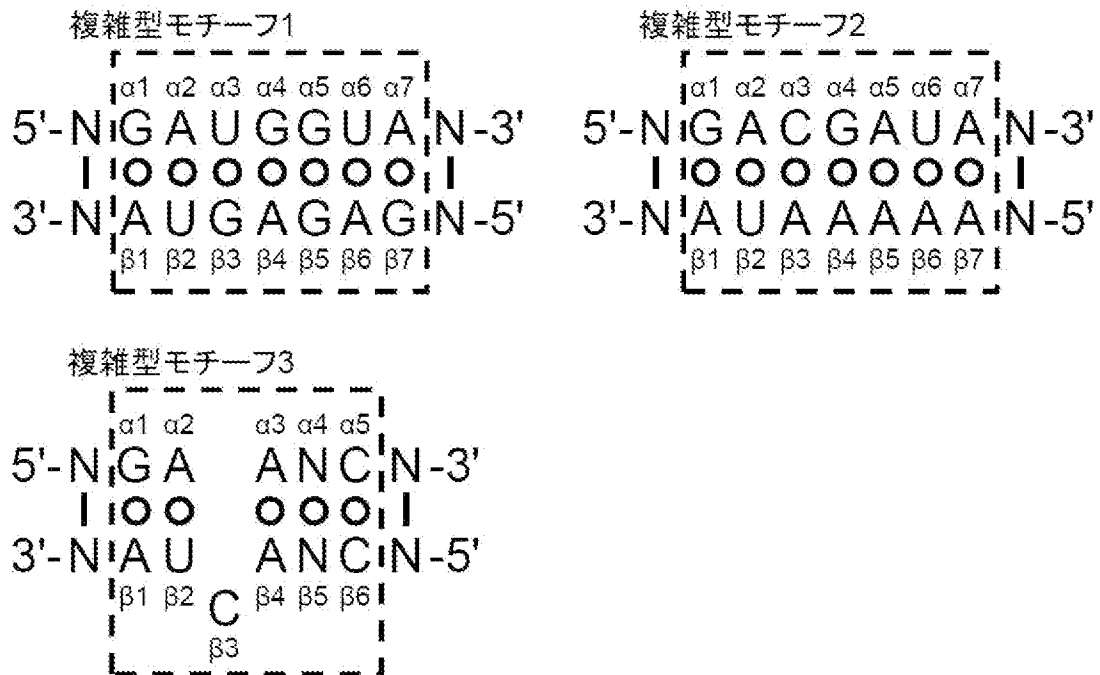
A



B

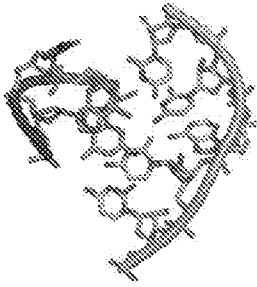


C

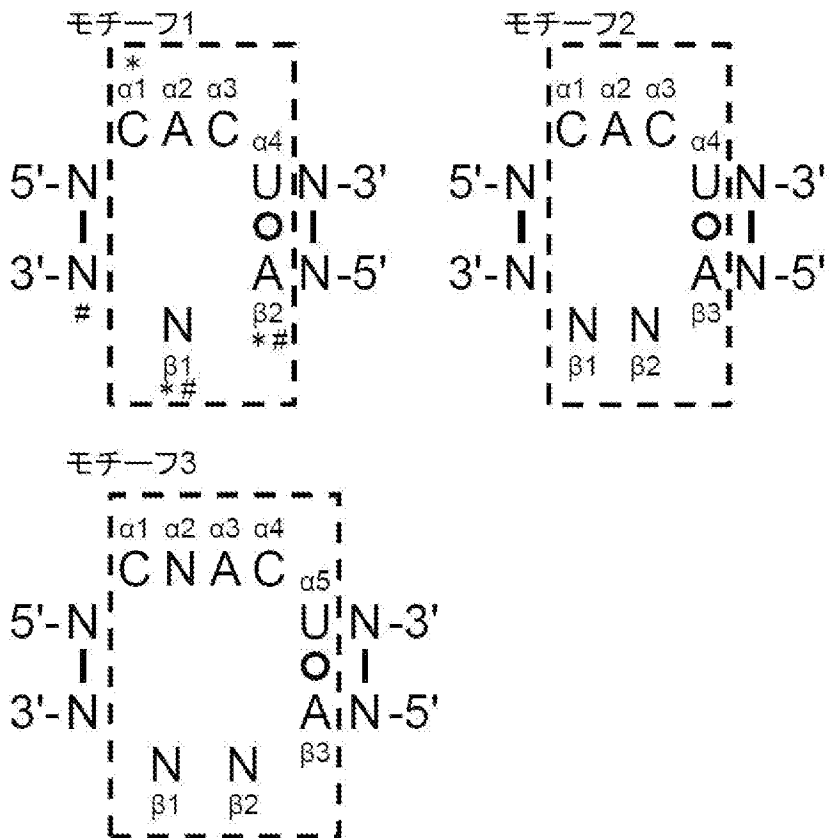


[図5]

A

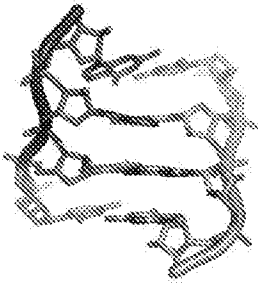


B

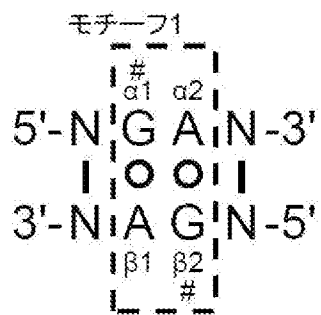


[図6]

A



B



[図7]

A

ROI: 5' -CAU GGC UCU UGC AGA UGC GAU GUU GC -3' (配列番号13)
 ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||
 RNA-ASO: 3' -GUA CCG AGA ACG UCU ACG CUA CAA CG -5' (配列番号20)

B

ROI: 5' -CAU GGC UCU UGC AGA UGC GAU GUU GC -3' (配列番号13)
 ||| ||| ||| ||| |○ | ||| ||| ||
 RNA-BG: 3' -GUA CCG AGA ACG UA G CUA CAA CG -5' (配列番号14)
 UGAU

C

ROI: 5' -CAU GGC UCU UGC AGA UGC GAU GUU GC -3' (配列番号13)
 ||| ||| ||| ||| |○○ | ||| ||| ||
 RNA-KT: 3' -GUA CCG AGA ACG UAG ACG CUA CAA CG -5' (配列番号15)
 AAG

D

ROI: 5' -CAU GGC UCU UGC AGA UGC GAU GUU GC -3' (配列番号13)
 ||| ||| ||| ||| |○○ | ||| ||| ||
 RNA-RKT: 3' -GUA CCG AGA ACG UAA ACG CUA CAA CG -5' (配列番号16)
 ACA

E

ROI: 5' -CAU GGC UCU UGC AGA UGC GAU GUU GC -3' (配列番号13)
 ||| ||| ||| ||| |○○ ○|| | ||| ||| ||
 RNA-5S: 3' -GUA CCG AGA ACG UAU GCG CUA CAA CG -5' (配列番号17)

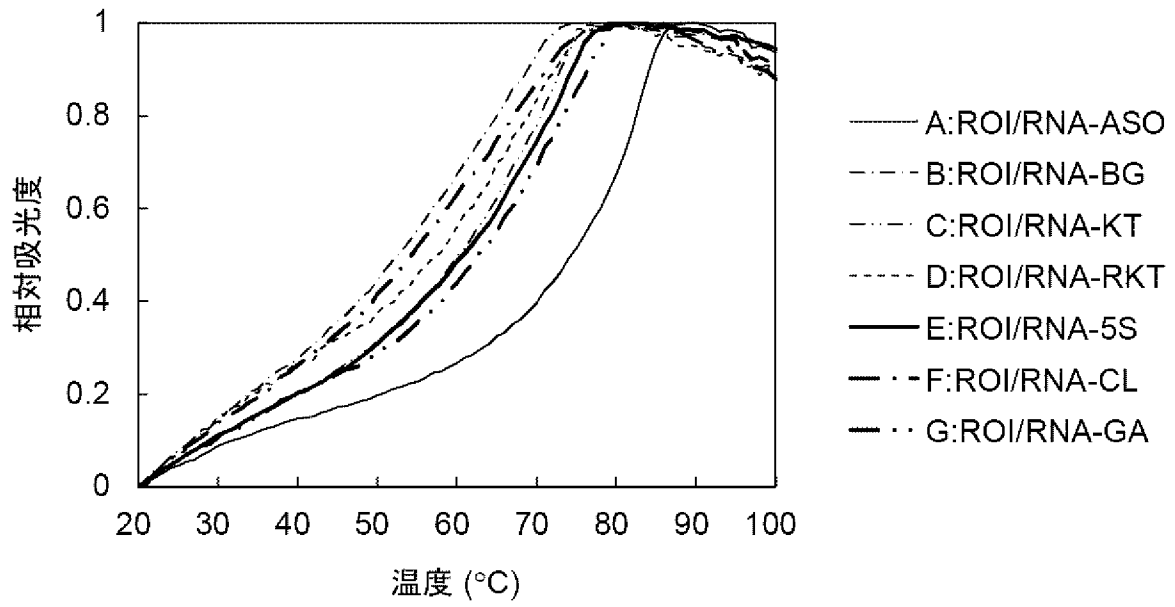
F

ROI: 5' -CAU GGC UCU UGC AGA UGC GAU GUU GC -3' (配列番号13)
 ||| ||| ||| ||| |○○ || | ||| ||| ||
 RNA-CL: 3' -GUA CCG AGA ACG UAU CG CUA CAA CG -5' (配列番号18)
 CAC

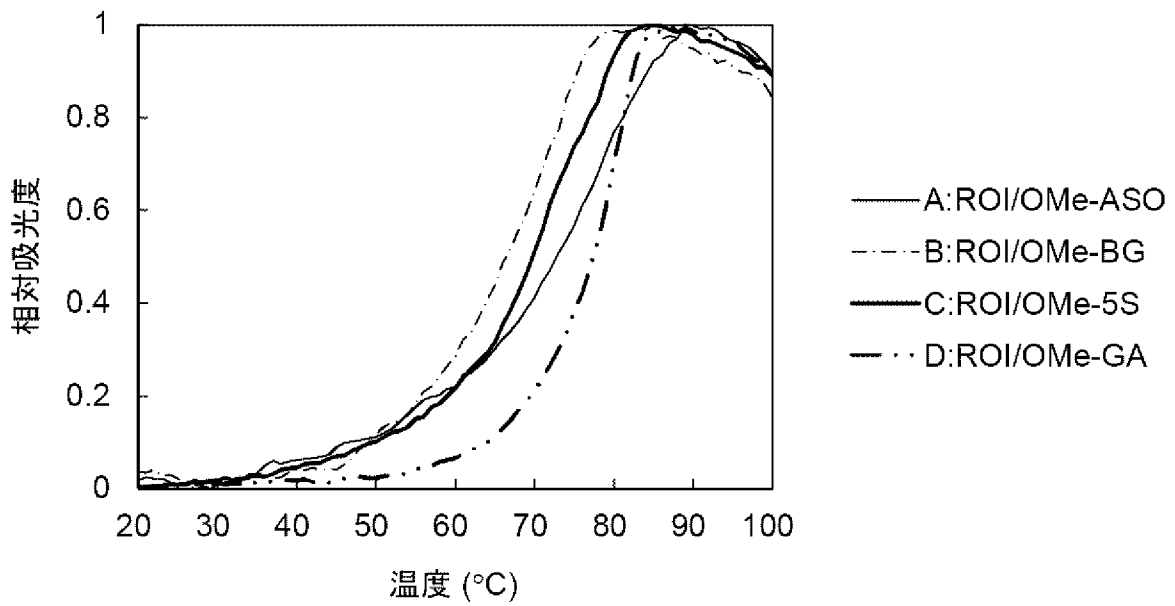
G

ROI: 5' -CAU GGC UCU UGC AGA UGC GAU GUU GC -3' (配列番号13)
 ||| ||| ||| ||| |○○ | ||| ||| ||
 RNA-GA: 3' -GUA CCG AGA ACG UCG ACG CUA CAA CG -5' (配列番号19)

[图8]

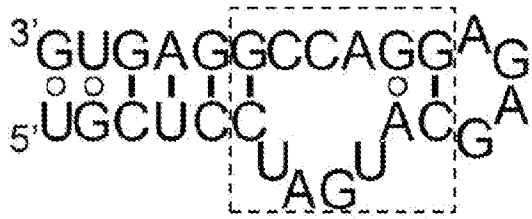


[图9]



[図10]

A



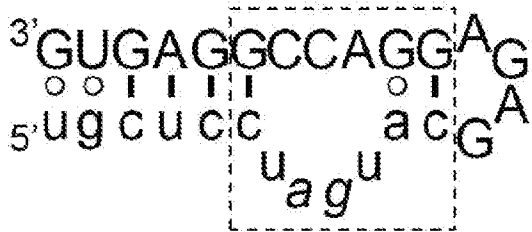
B



C



D



E

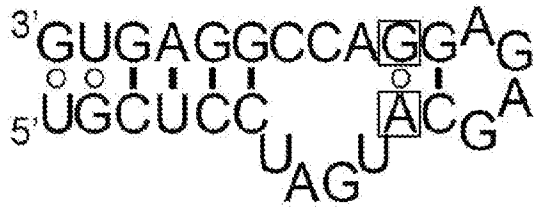


F

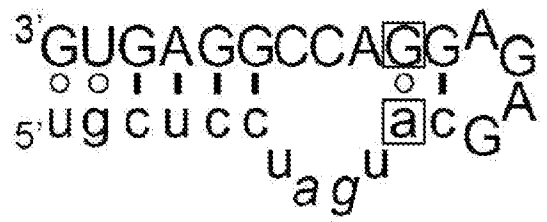


[図11]

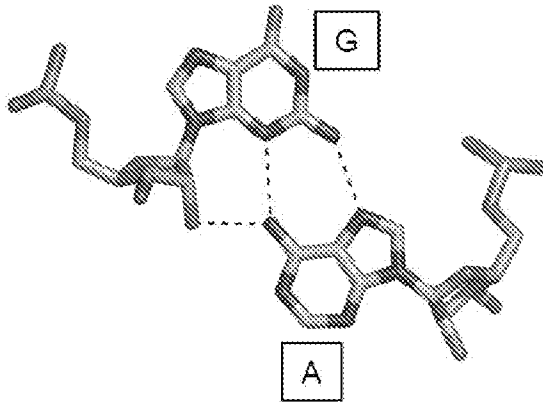
A



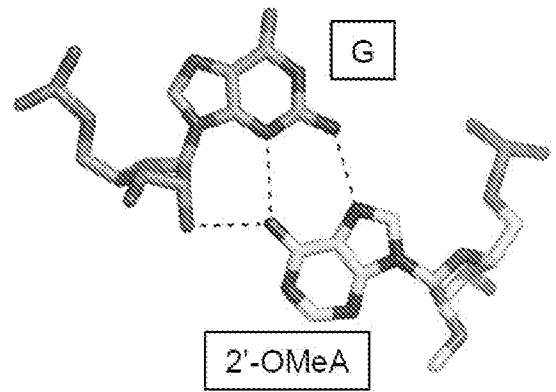
B



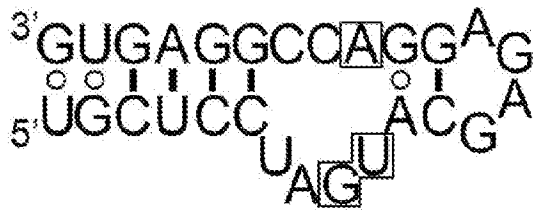
C



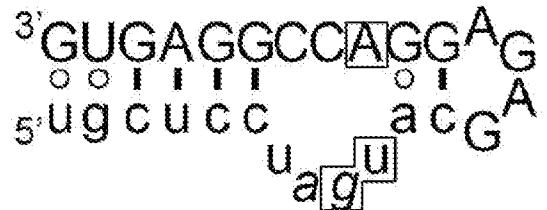
D



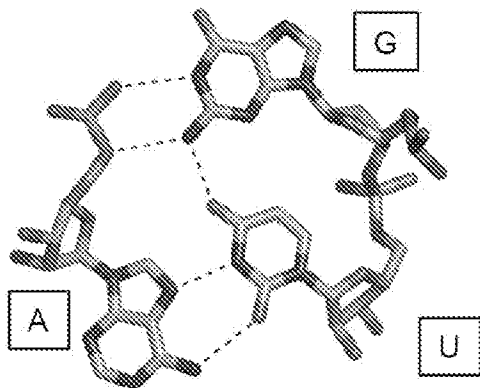
E



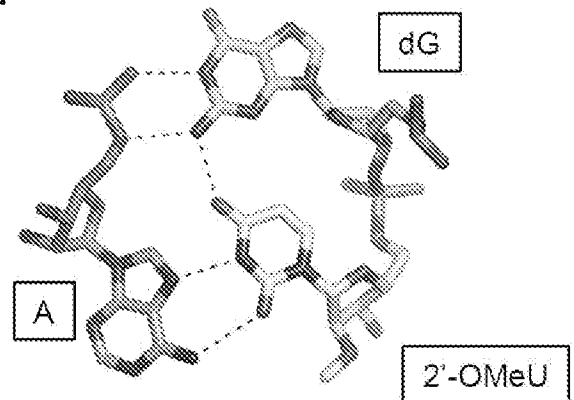
F



G

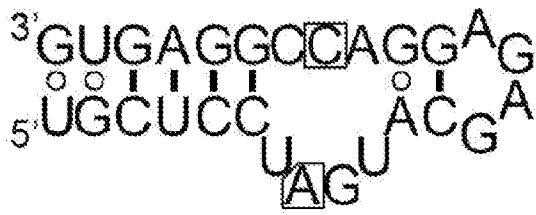


H

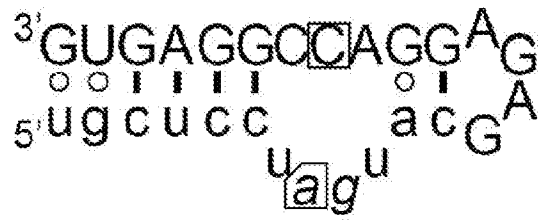


[図12]

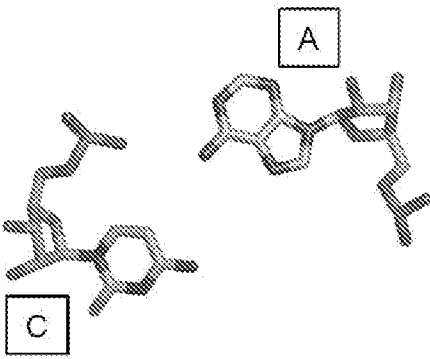
A



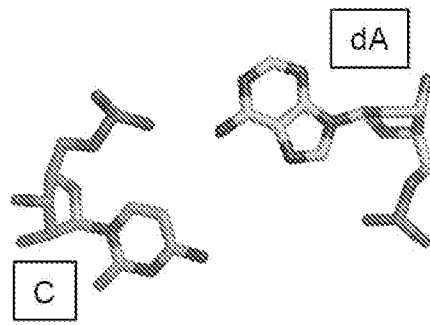
B



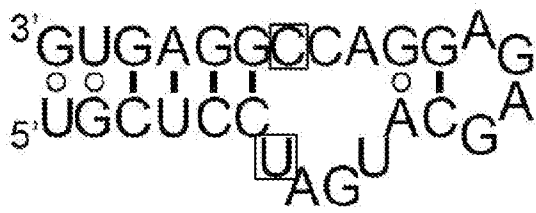
C



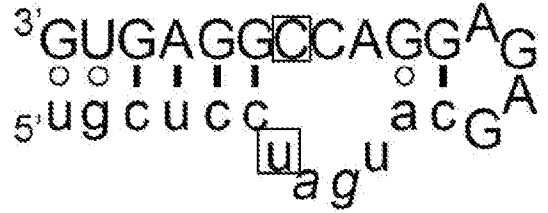
D



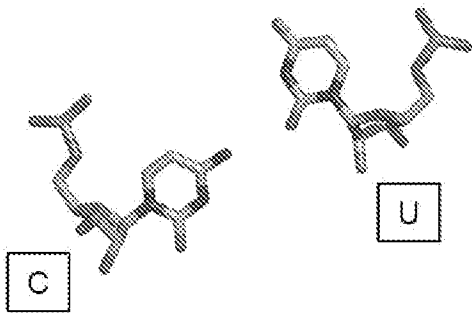
E



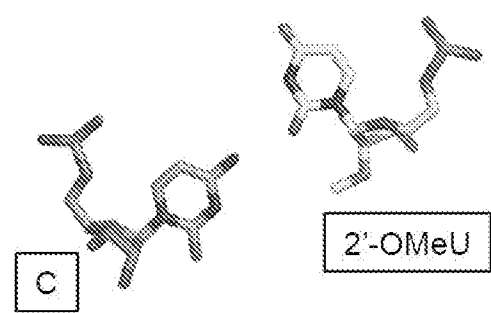
F



G



H

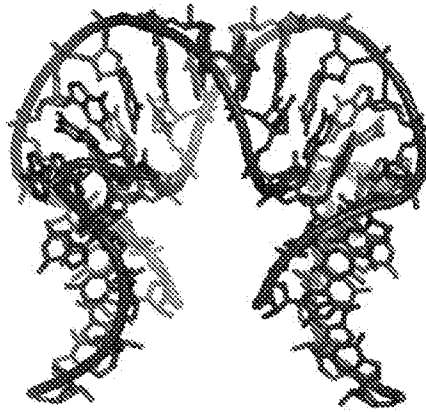


[図13]

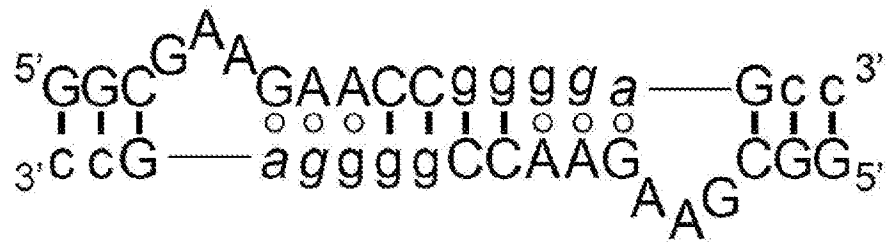
A



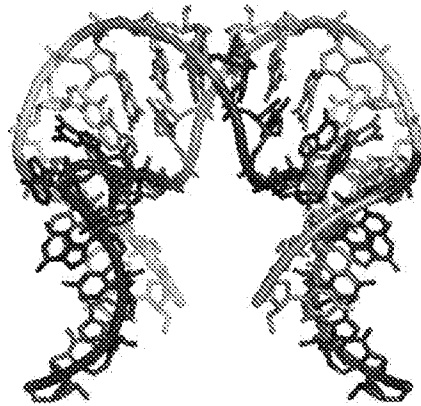
B



C

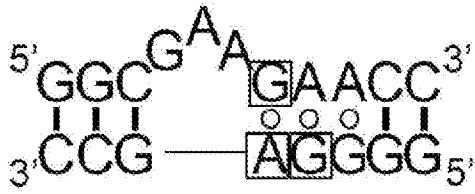


D

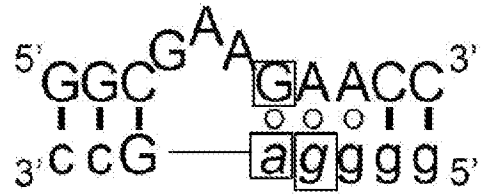


[図15]

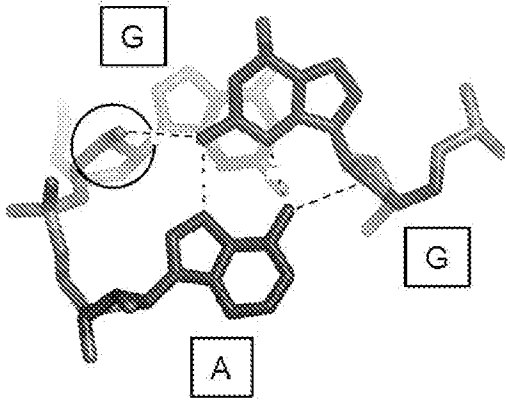
A



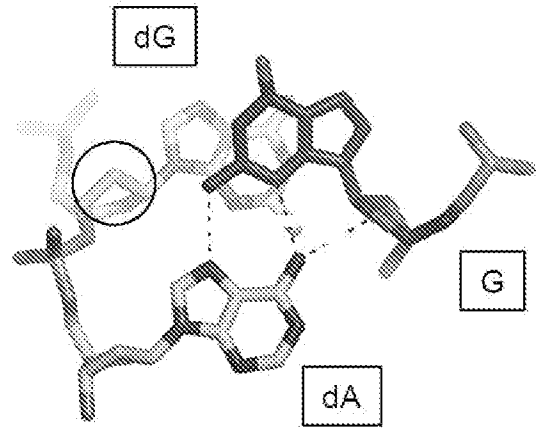
B



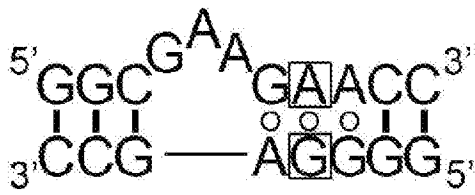
C



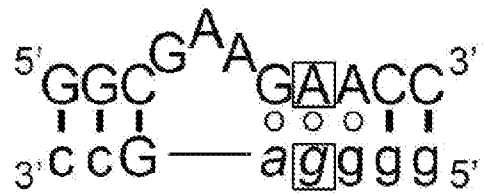
D



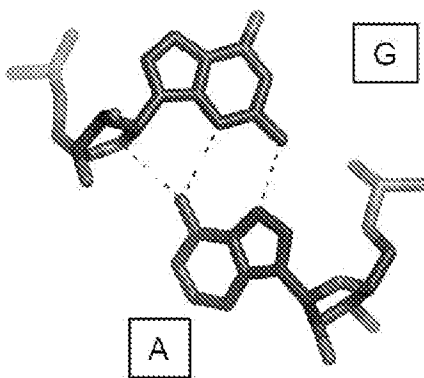
E



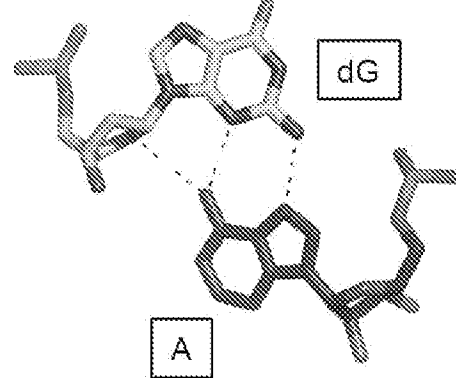
F



G

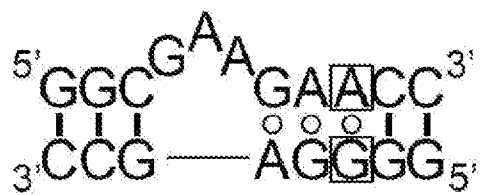


H

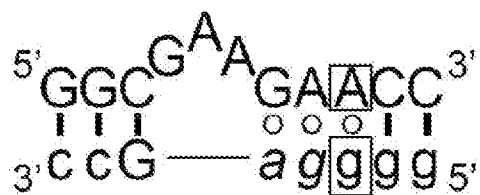


[図16]

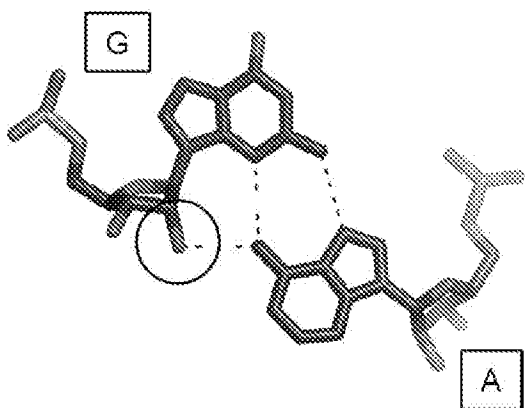
A



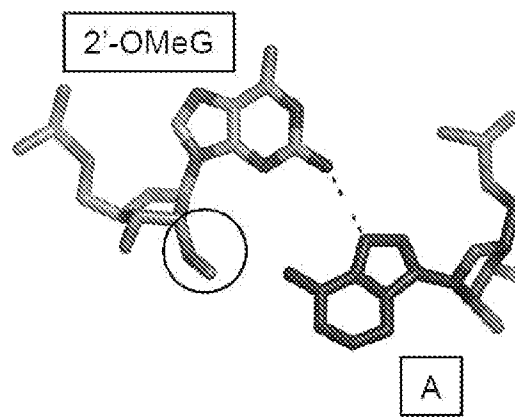
B



C

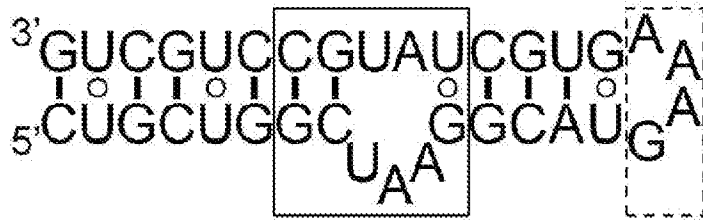


D



[図17]

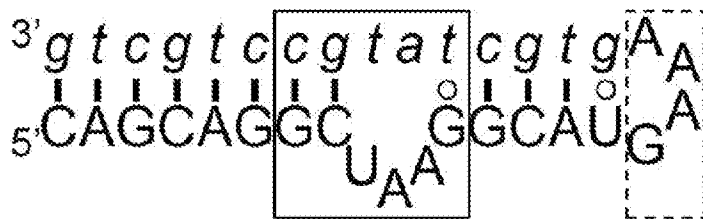
A



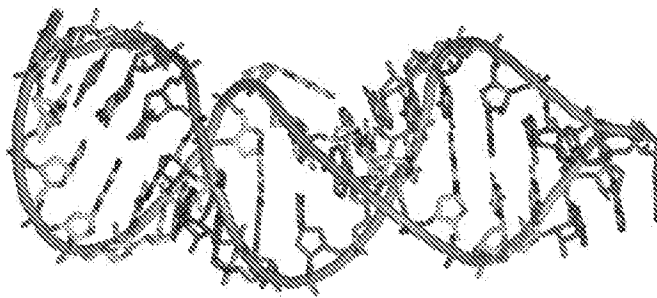
B



C

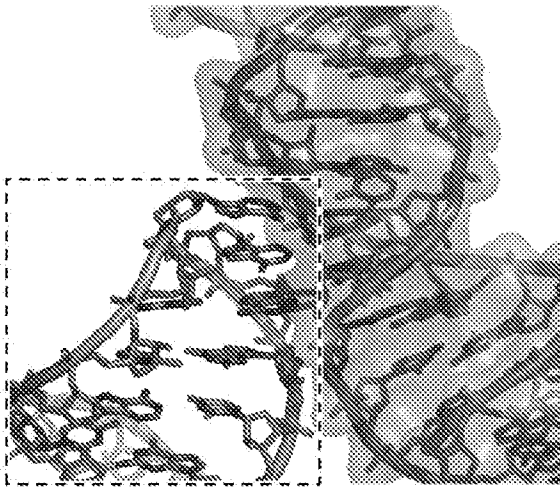


D

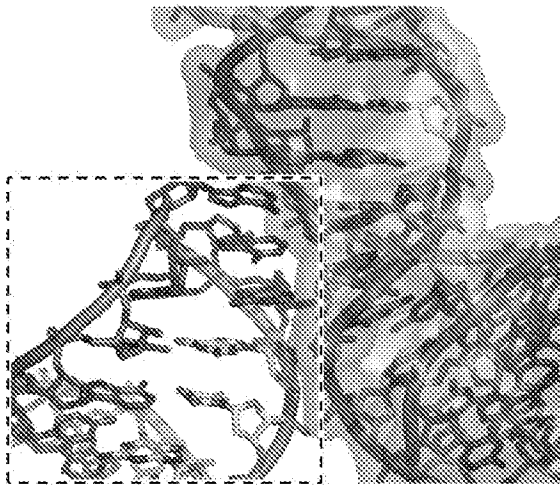


[図18]

A

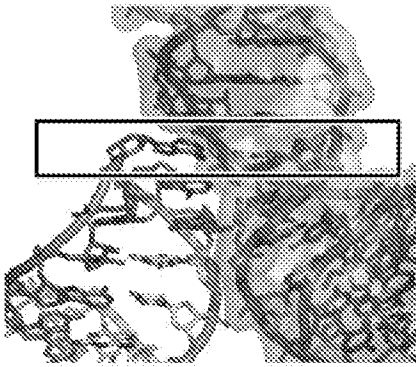


B

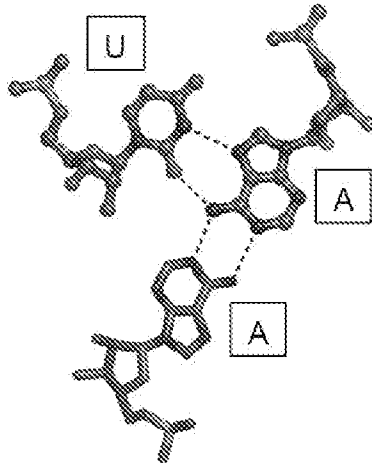


[図19]

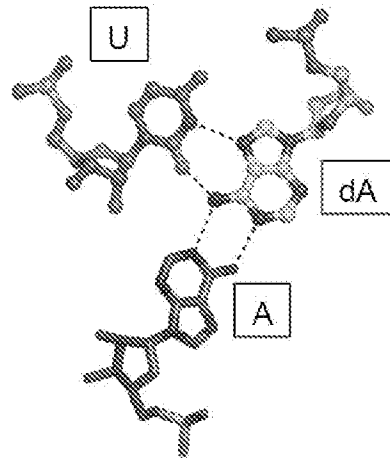
A



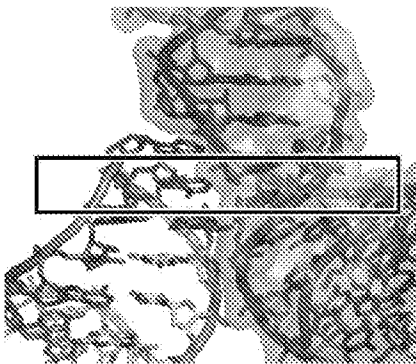
B



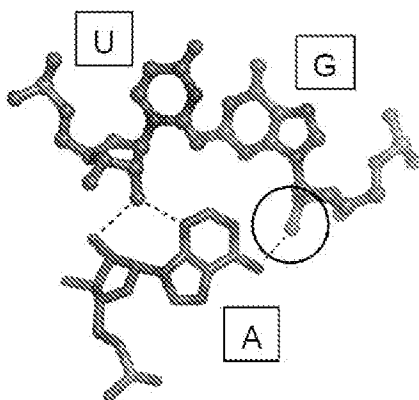
C



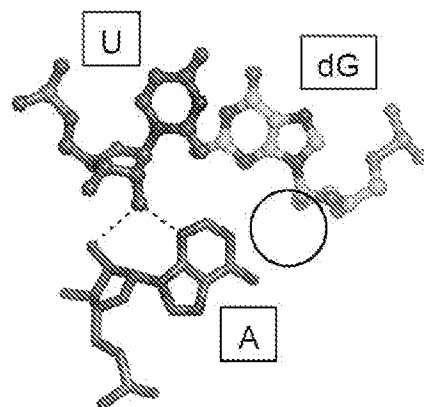
D



E

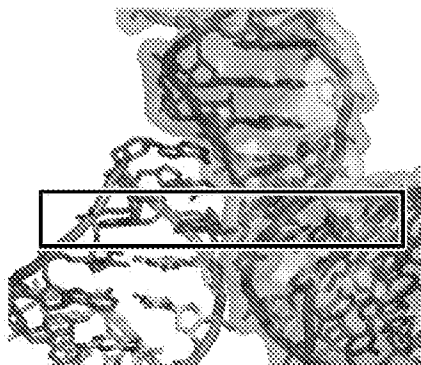


F

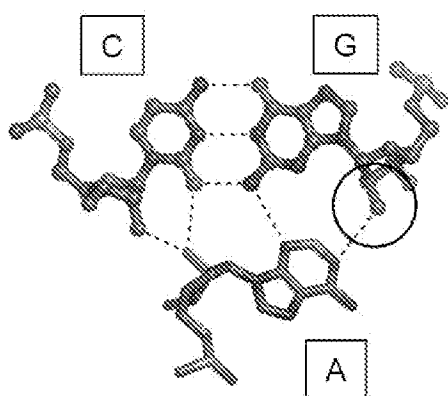


[図20]

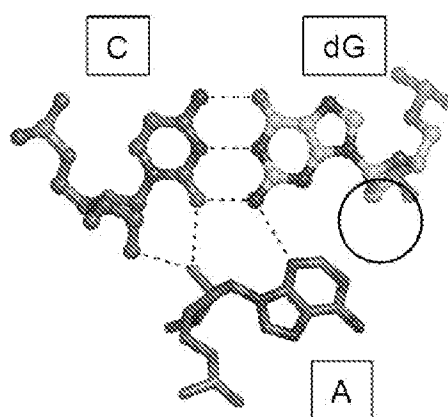
A



B

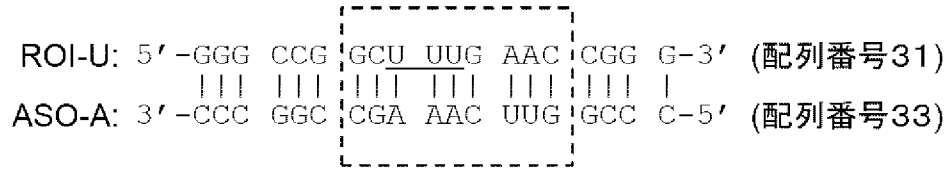


C

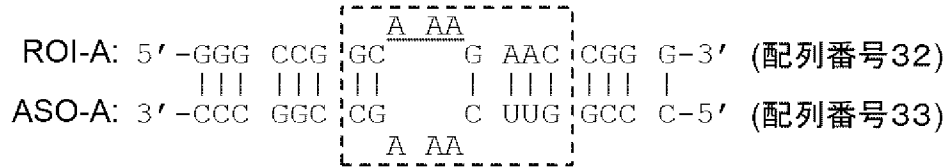


[図21]

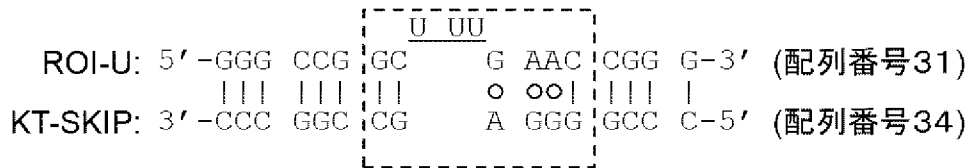
A



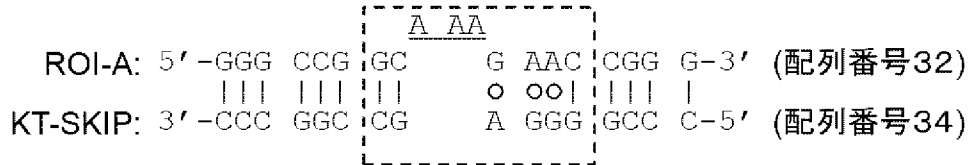
B



C

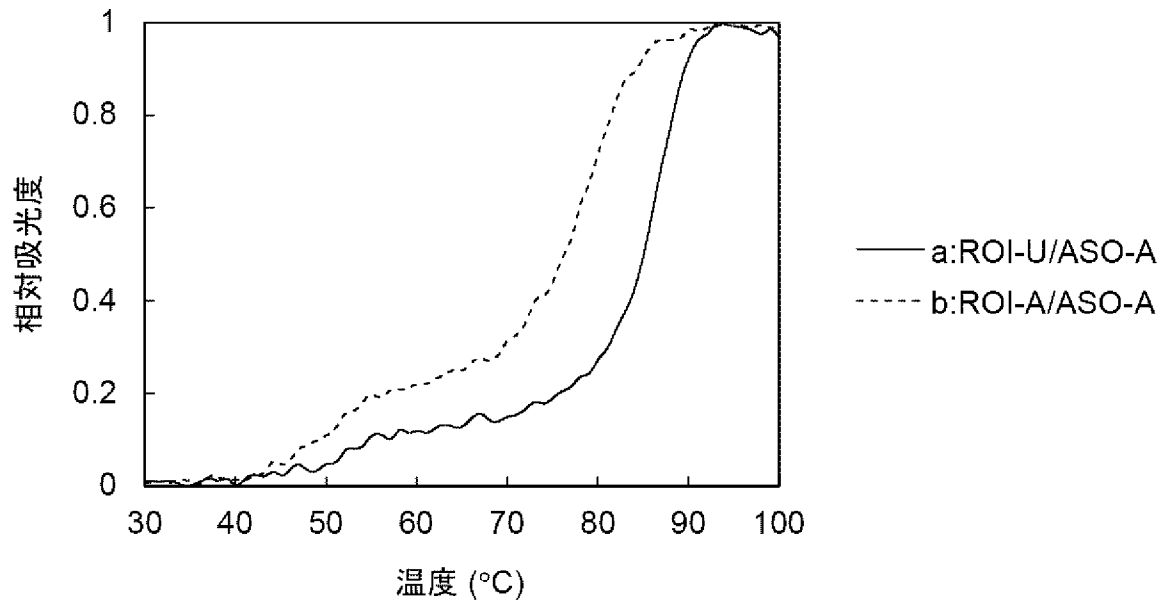


D

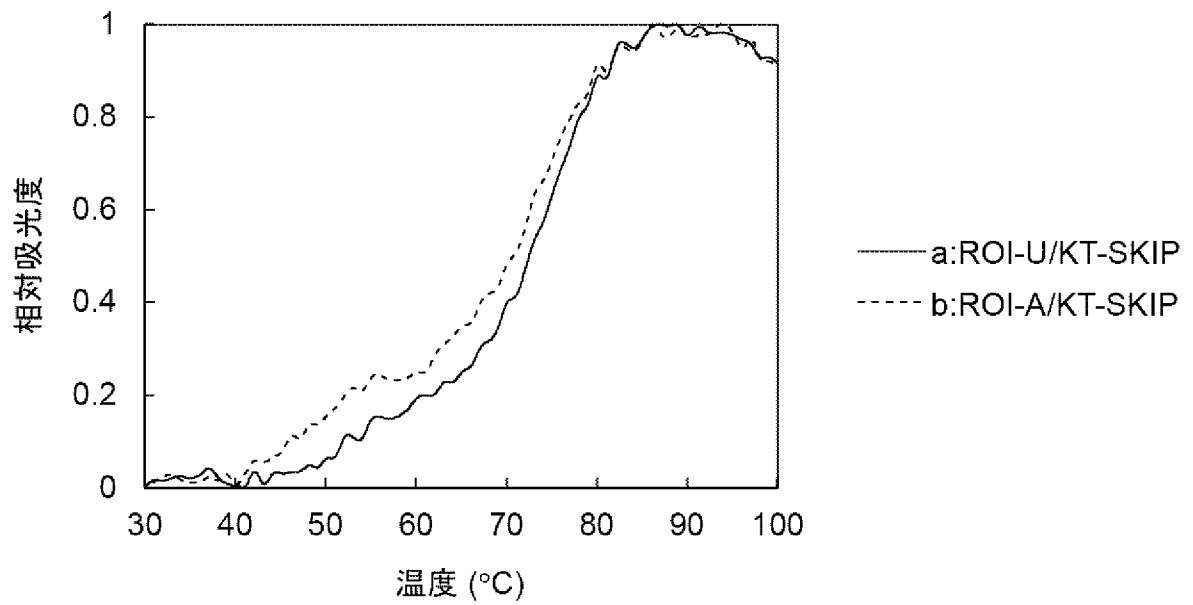


[図22]

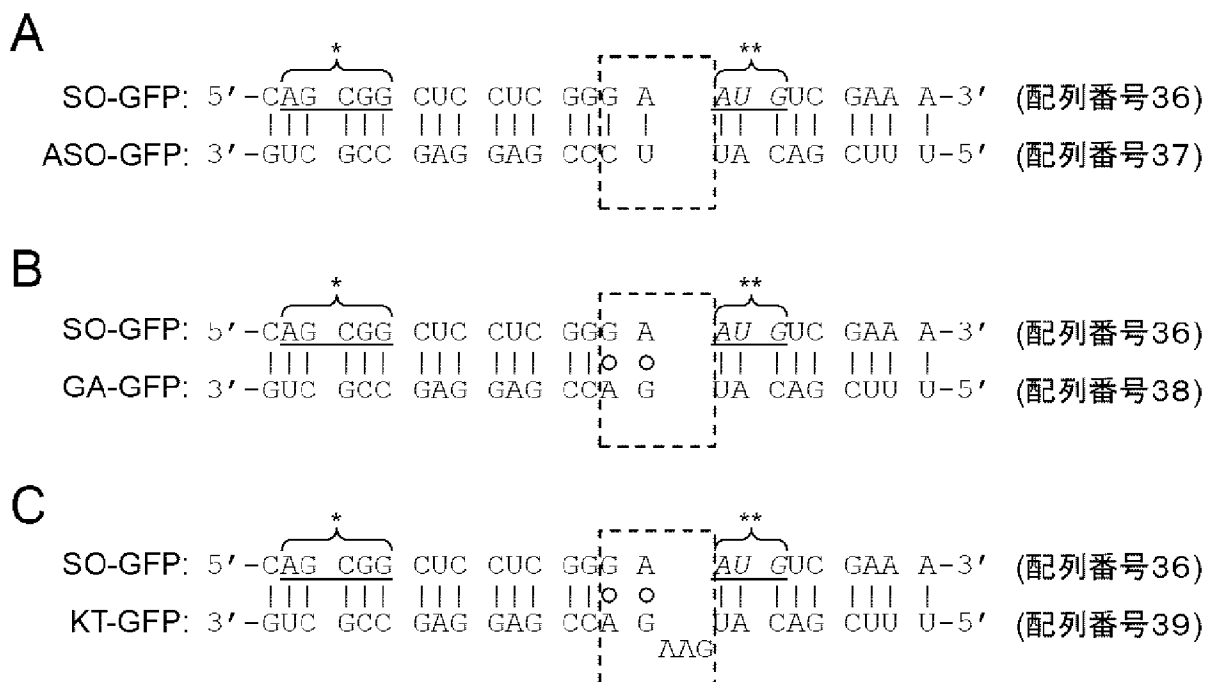
A



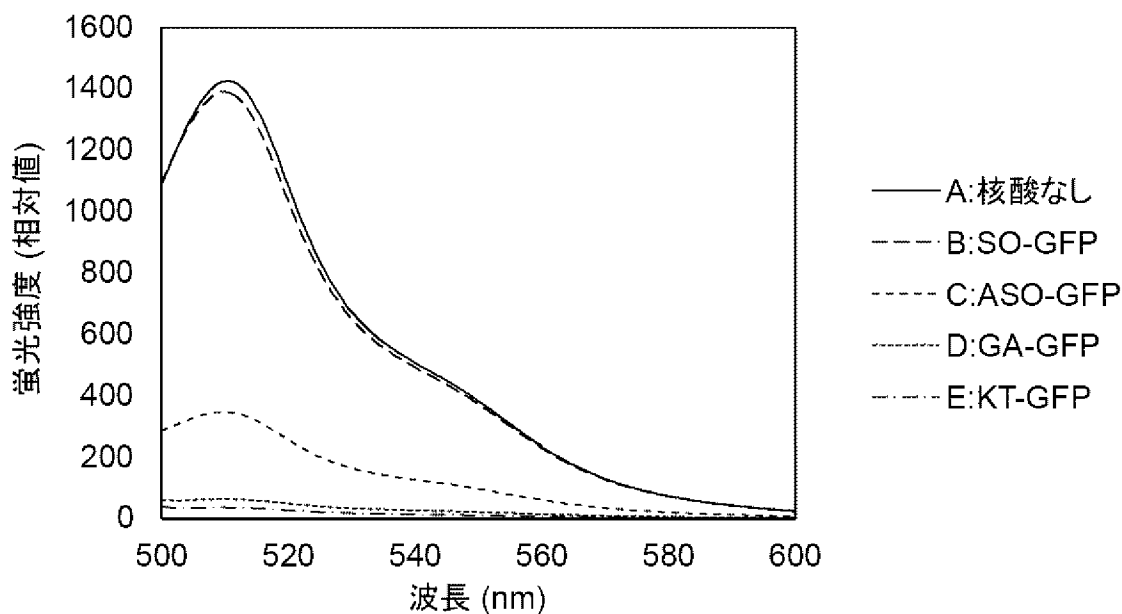
B



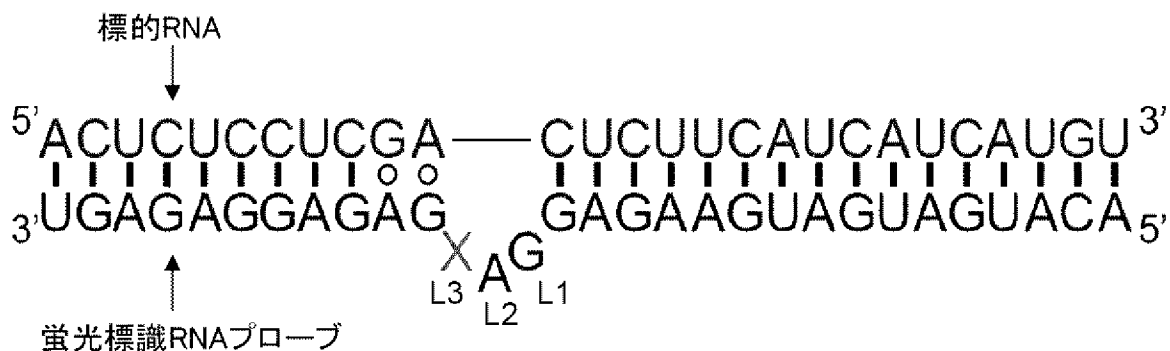
[図23]



[図24]

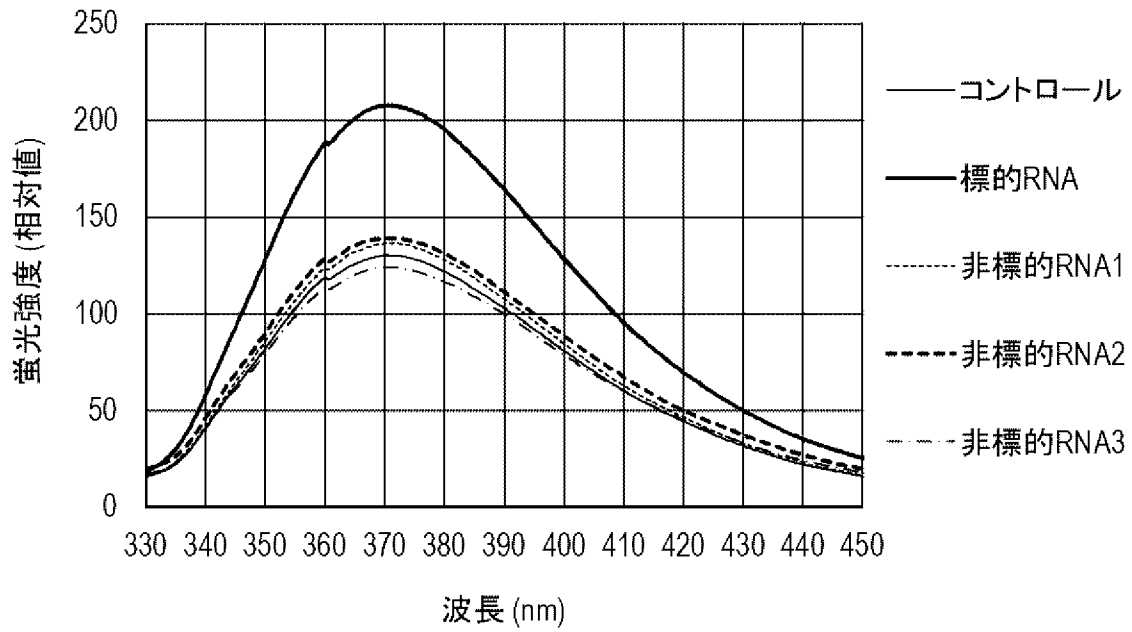


[図25]

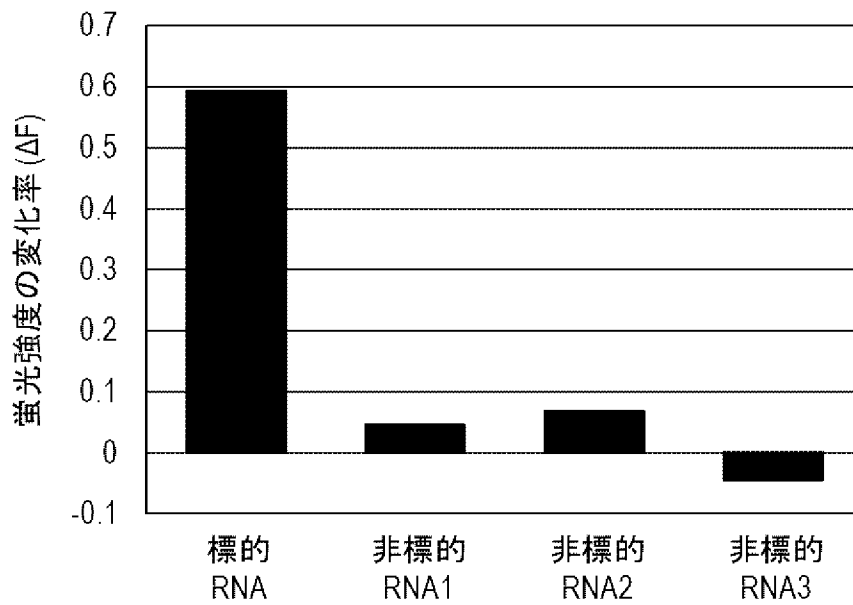


[図26]

A



B



[図28]

A

SO-GFP:	5'	-CAG	CGG	CUC	CUC	GGG	A	AU	GUC	GAA	A-3'	(配列番号36)
ASO-GFP:	3'	-GUC	GCC	GAG	GAG	CCC	U	UA	CAG	CUU	U-5'	(配列番号37)

B

SO-GFP:	5'	-CAG	CGG	CUC	CUC	GGG	A	AU	GUC	GAA	A-3'	(配列番号36)
GA-GFP:	3'	-GUC	GCC	GAG	GAG	CCA	G	UA	CAG	CUU	U-5'	(配列番号38)

C

SO-GFP:	5'	-CAG	CGG	CUC	CUC	GGG	A	AU	GUC	GAA	A-3'	(配列番号36)
KT-GFP:	3'	-GUC	GCC	GAG	GAG	CCA	G	UA	CAG	CUU	U-5'	(配列番号39)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/029566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 15/113</i>(2010.01)i; <i>A61K 31/7088</i>(2006.01)i; <i>A61K 31/712</i>(2006.01)i; <i>A61K 31/713</i>(2006.01)i; <i>A61K 48/00</i>(2006.01)i; <i>A61P 43/00</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/10</i>(2006.01)i; <i>C12Q 1/6813</i>(2018.01)i</p> <p>FI: C12N15/113 Z ZNA; C12Q1/6813 Z; C12N15/10 Z; A61K48/00; A61K31/7088; A61K31/713; A61K31/712; A61P43/00 105</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N15/113; A61K31/7088; A61K31/712; A61K31/713; A61K48/00; A61P43/00; C12N15/10; C12Q1/6813		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2022</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2022</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALEMAN, Lourdes M. et al. Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. RNA. 2007, vol. 13, pp. 385-395 table 1	1-4, 7-16
A	table 1	5, 6
X	CHIU, Yalin et al. RNAi in Human Cells: Basic Structural and Functional Features of Small Interfering RNA. Mol. Cell. 2002, vol. 10, pp. 549-561 fig. 2	1-4, 7-16
A	fig. 2	5, 6
A	BOONE, Edna. SCHUSTER, Gary B. Long-range oxidative damage in duplex DNA: the effect of bulged G in a G-C tract and tandem G/A mispairs. Nucleic Acids Res. 2002, vol. 30, no. 3, pp. 830-837 fig. 2	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
06 October 2022		18 October 2022
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHROEDER, Kersten T. et al. Structure and folding of a rare, natural kink turn in RNA with an A•A pair at the 2b•2n position. RNA. 2012, vol. 18, pp. 1257-1266 fig. 1	1-16
A	WIMBERLY, Brian et al. The Conformation of Loop E of Eukaryotic 5S Ribosomal RNA. Biochemistry. 1993, vol. 32, pp. 1078-1087 fig. 1	1-16
A	YANG, Mei (Monica) and THOMPSON, Richard. Comparative Stability Determination of Oligonucleotide Duplexes in Gas and Solution Phase. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2004, vol. 15, pp. 1354-1359 table 1	1-16

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/712(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C12Q 1/6813(2018.01)i</p> <p>FI: C12N15/113 Z ZNA; C12Q1/6813 Z; C12N15/10 Z; A61K48/00; A61K31/7088; A61K31/713; A61K31/712; A61P43/00 105</p>																				
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N15/113; A61K31/7088; A61K31/712; A61K31/713; A61K48/00; A61P43/00; C12N15/10; C12Q1/6813</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年										
日本国実用新案公報	1922-1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																			
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																			
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																			
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>ALEMAN, Lourdes M. et al., Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects, RNA, 2007, Vol. 13, p. 385-395 TABLE 1.</td> <td>1-4, 7-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>TABLE 1.</td> <td>5, 6</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CHIU, Ya-Lin et al., RNAi in Human Cells: Basic Structural and Functional Features of Small Interfering RNA, Mol. Cell, 2002, Vol. 10, p. 549-561 Figure 2.</td> <td>1-4, 7-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Figure 2.</td> <td>5, 6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>BOONE, Edna and SCHUSTER, Gary B., Long-range oxidative damage in duplex DNA: the effect of bulged G in a G-C tract and tandem G/A mispairs, Nucleic Acids Res., 2002, Vol. 30, No. 3, p. 830-837 Figure 2.</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	ALEMAN, Lourdes M. et al., Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects, RNA, 2007, Vol. 13, p. 385-395 TABLE 1.	1-4, 7-16	A	TABLE 1.	5, 6	X	CHIU, Ya-Lin et al., RNAi in Human Cells: Basic Structural and Functional Features of Small Interfering RNA, Mol. Cell, 2002, Vol. 10, p. 549-561 Figure 2.	1-4, 7-16	A	Figure 2.	5, 6	A	BOONE, Edna and SCHUSTER, Gary B., Long-range oxidative damage in duplex DNA: the effect of bulged G in a G-C tract and tandem G/A mispairs, Nucleic Acids Res., 2002, Vol. 30, No. 3, p. 830-837 Figure 2.	1-16
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	ALEMAN, Lourdes M. et al., Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects, RNA, 2007, Vol. 13, p. 385-395 TABLE 1.	1-4, 7-16																		
A	TABLE 1.	5, 6																		
X	CHIU, Ya-Lin et al., RNAi in Human Cells: Basic Structural and Functional Features of Small Interfering RNA, Mol. Cell, 2002, Vol. 10, p. 549-561 Figure 2.	1-4, 7-16																		
A	Figure 2.	5, 6																		
A	BOONE, Edna and SCHUSTER, Gary B., Long-range oxidative damage in duplex DNA: the effect of bulged G in a G-C tract and tandem G/A mispairs, Nucleic Acids Res., 2002, Vol. 30, No. 3, p. 830-837 Figure 2.	1-16																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																				
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>																				
<p>国際調査を完了した日</p> <p>06.10.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>18.10.2022</p>																			
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP)</p> <p>〒100-8915</p> <p>日本国</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>小倉 梢 4B 4504</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>																			

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
A	SCHROEDER, Kersten T. et al., Structure and folding of a rare, natural kink turn in RNA with an A·A pair at the 2b·2n position, RNA, 2012, Vol. 18, p. 1257-1266 FIGURE 1.	1-16
A	WIMBERLY, Brian et al., The Conformation of Loop E of Eukaryotic 5S Ribosomal RNA, Biochemistry, 1993, Vol. 32, p. 1078-1087 FIGURE 1	1-16
A	YANG, Mei (Monica) and THOMPSON, Richard, Comparative Stability Determination of Oligonucleotide Duplexes in Gas and Solution Phase, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2004, Vol. 15, p. 1354-1359 Table 1.	1-16

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。