

(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
2024年8月15日(15.08.2024)



(10) 国際公開番号

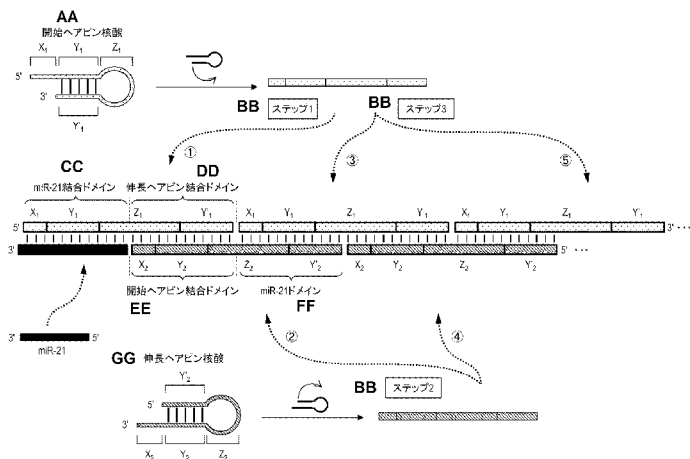
WO 2024/166539 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/11 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/045425
- (22) 国際出願日: 2023年12月19日(19.12.2023)
- (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 2023-016897 2023年2月7日(07.02.2023) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP). 東京核酸合成株式会社(TKG THERAPEUTICS, INC.) [JP/JP]; 〒1138485 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 岡本 晃充 (OKAMOTO Akimitsu); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 森廣 邦彦(MORHIRO Kunihiko); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 長谷川 愛美(HASEGAWA Manami); 〒1138485 東京都文京区本郷七丁目3番1号 東京核酸合成株式会社内 Tokyo (JP). 松井 雅章(MATSUI Masaaki); 〒1138485 東京都文京区本郷七丁目3番1号 東京核酸合成株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 弁理士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 MORIタワー3 2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,

(54) Title: NUCLEIC ACID ASSEMBLY PHARMACEUTICAL

(54) 発明の名称: 核酸集合体医薬

[図2]



AA Initiation hairpin nucleic acid
 BB Step
 CC miR-21 binding domain
 DD Elongation hairpin binding domain
 EE Initiation hairpin binding domain
 FF miR-21 domain
 GG Elongation hairpin nucleic acid

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a composition for treating diseases including cells expressing miR-21, by specifically inducing nucleic acid immunity in cells expressing miR-21. Provided are a cell death-inducing composition including an initiation hairpin nucleic acid and an elongation hairpin nucleic acid, and a pharmaceutical composition and an anticancer agent containing said composition as an active ingredient.

(57) 要約: 本発明の課題は、miR-21を発現する細胞において特異的に核酸免疫を誘導することにより、miR-21を発現する細胞を含む疾患を治療するための組成物を提供することである。開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸を含む細胞死誘導組成物、及びそれを有効成分として含む医薬組成物及び抗がん剤を提供する。

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

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

規則4.17に規定する申立て:

- 一 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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：核酸集合体医薬

技術分野

[0001] 本発明は、ヘアピン核酸を含む細胞死誘導組成物、それを含む医薬組成物及びヘアピン核酸を含む抗がん剤に関する。

背景技術

[0002] 核酸医薬は、核酸分子に基づき、標的の核酸やタンパク質に特異的に結合して機能を抑制する分子標的治療薬である。核酸医薬は、従来治療が困難であった疾病に対する新たな医薬品として注目を集めており、実際に2010年代には、Givlaari等の肝臓を疾病部位とする画期的新薬が国内外で誕生している（非特許文献1）。しかし、特にがんに対する核酸医薬品の実用化は未だに達成されていない。

[0003] これまでに上市された核酸医薬品は、主に、標的のmRNAに対して配列特異的にハイブリダイズすることでその翻訳やスプライシング過程を阻害するアンチセンス核酸及びsiRNAであった。近年では、タンパク質を標的としたアプタマーやデコイ核酸についての研究も精力的に進められている。特にデコイ核酸は、転写因子等の創薬が困難な核酸結合タンパク質を捕捉、及び／又は不活性化することが可能であり、抗がん剤として有望な核酸分子である。しかし、デコイ核酸を核酸医薬として実用化する上では、いくつかの問題点がある。まず、デコイ核酸は細胞選択性が低いため、オフターゲット効果が高く、正常な細胞に対しても毒性を示しやすい。また、特異的な標的タンパク質が存在する疾患に対象が限られることから、多くの疾患に奏効する医薬の開発には不向きであった。

[0004] マイクロRNA (miRNA) を標的とした医薬の開発が進められている。miRNAは、20～25塩基程度の長さを有するノンコーディングRNAであり、複数の標的遺伝子の翻訳や転写を抑制することが知られている。中でも、miR-21と呼ばれるmiRNAはがんをはじめとする多くの疾患で高い発現が見られることから、広

範な疾患に適用可能な治療標的として期待が高まっている。しかし、十分な細胞選択性を有するmiR-21を標的とした医薬はいまだ開発されていない。

[0005] 従来の核酸創薬においては、核酸医薬自身が有する免疫毒性が問題視されてきた。この免疫毒性はウイルス等の外来核酸に対する防御機構（核酸免疫）が核酸医薬を異物として認識した結果であり、回避のためには核酸の化学修飾や配列の選定等、さらなる労力が必要となる（非特許文献2）。

[0006] 一方で、これまで核酸免疫は核酸医薬において抑制することに注力されてきたが、がん細胞等の細胞特異的に誘導することができれば、有効かつ副作用の少ない免疫療法が実現できると考えられる。また、これが実現すれば、核酸免疫を抑制するための化学修飾や配列の検討が最低限にできるため、製造コストや品質管理の面でも大きなメリットがある。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：承認された核酸医薬品（2021年5月時点）、国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第2室

非特許文献2：Shen, W. et al. Nat. Biotechnol. 2019, 37, 640-650.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

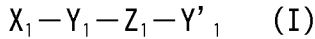
[0008] 本発明の課題は、miR-21を発現する細胞において特異的に核酸免疫を誘導することにより、miR-21を発現する細胞を含む疾患を治療するための組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは以前に、細胞特異的に核酸免疫を誘導し、核酸医薬として応用し得る技術を報告した（PCT/JP2022/026323）。上記課題を解決するために、本発明者らは自身の開発した上記技術を応用し、miR-21を標的とした核酸医薬の開発を進めた。ヘアピン核酸の塩基配列について鋭意検討を行った結果、miR-21の存在特異的に、高い効率で反応産物が得られる構成を見出すに

至った。本発明は、当該新規知見等に基づくものであり、以下を提供する。

[0010] [1] miR-21を発現する細胞において特異的に細胞死を誘導する、一般式 (I) で表される構造を含む開始ヘアピン核酸及び一般式 (II) で表される構造を含む伸長ヘアピン核酸からなる一組のヘアピン核酸を含む細胞死誘導組成物。



(式中、

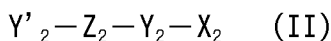
X_1 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_1 及び Y'_1 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

Z_1 は、7~12塩基のCG配列及びGGG配列を含まない配列からなるループ領域であり、

X_1 の全部、及び Y_1 の全部又は一部は、miR-21の塩基配列の全部又は一部とハイブリダイズ可能なmiR-21結合ドメインを構成し、

Y'_1 の全部又は一部は、miR-21の全部又は一部とハイブリダイズ可能な伸長ヘアピン結合ドメインを構成する)



(式中、

X_2 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_2 及び Y'_2 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

Z_2 は、7~12塩基の配列からなるループ領域であり、

Y'_2 の全部又は一部は、miR-21ドメインを構成し、

Y_2 の全部、及び X_2 の全部又は一部は、伸長ヘアピン結合ドメインの全部又は一部とハイブリダイズ可能な開始ヘアピン結合ドメインmiR-21ドメインを構成する)

[2] 前記式 (I) 及び前記式 (II) において、左が5'末端である、[1]に記載の細胞死誘導組成物。

[3] 前記miR-21結合ドメインは配列番号2で表される塩基配列を含み、前記miR-21ドメインは配列番号3で表される塩基配列を含む、[1]又は[2]に記載の細胞死誘導組成物。

[4] 前記開始ヘアピン核酸が、哺乳動物の生理学的条件下において、miR-21存在下で一本鎖構造を形成する、[1]～[3]のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。

[5] 前記Z₁のGC含有率が40%以上60%以下である、[1]～[4]のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。

[6] 前記Z₁のプリン塩基の含有率が40%以上60%以下である、[1]～[5]のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。

[7] 前記ヘアピン核酸が、DNA及び／又はRNAヌクレオチドで構成される、[1]～[6]のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。

[8] 修飾ヌクレオチド及び／又は非天然ヌクレオチドを1つ以上含む、[1]～[7]のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。

[9] 前記修飾ヌクレオチド又は前記非天然ヌクレオチドが、置換基が導入された塩基を含む、[8]に記載の細胞死誘導組成物。

[10] 前記修飾ヌクレオチド又は前記非天然ヌクレオチドが、修飾ヌクレオチド間結合を含む、[8]又は[9]に記載の細胞死誘導組成物。

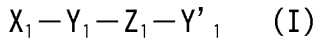
[11] [1]～[10]のいずれかに記載の細胞死誘導組成物を有効成分として含む、医薬組成物。

[12] がん又は炎症性疾患を予防又は治療するための、[11]に記載の医薬組成物。

[13] 前記がんが、乳がん、大腸がん、膵臓がん、肺がん、前立腺がん、肝臓がん、胃がん、脳腫瘍、甲状腺がん、口腔がん、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病及び膠芽腫からなる群から選択される一以上のがんである、[12]に記載の医薬組成物。

[14] miR-21を発現する細胞を含むがんを予防又は治療するための、一般式(I)で表される構造を含む開始ヘアピン核酸及び一般式(II)で表される

構造を含む伸長ヘアピン核酸からなる一組のヘアピン核酸を含む抗がん剤。



(式中、

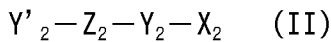
X_1 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_1 及び Y'_1 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

Z_1 は、7~12塩基のCG配列及びGGG配列を含まない配列からなるループ領域であり、

X_1 の全部、及び Y_1 の全部又は一部は、miR-21の塩基配列の全部又は一部とハイブリダイズ可能なmiR-21結合ドメインを構成し、

Y'_1 の全部又は一部は、miR-21の全部又は一部とハイブリダイズ可能な伸長ヘアピン結合ドメインを構成する)



(式中、

X_2 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_2 及び Y'_2 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

Z_2 は、7~12塩基の配列からなるループ領域であり、

Y'_2 の全部又は一部は、miR-21ドメインを構成し、

Y_2 の全部、及び X_2 の全部又は一部は、伸長ヘアピン結合ドメインの全部又は一部とハイブリダイズ可能な開始ヘアピン結合ドメインmiR-21ドメインを構成する)

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2023-016897号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0011] 本発明の細胞死誘導組成物によれば、miR-21を発現する細胞特異的に細胞死を誘導することができる。

[0012] 本発明の医薬組成物によれば、miR-21を発現する細胞を含む疾患を治療す

ることができる。

[0013] 本発明の抗がん剤によれば、miR-21を発現する細胞を含むがんを治療することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明のヘアピン核酸の典型的な構造を示した模式図である。Aは、5'末端突出型の開始ヘアピン核酸 ((I)) と3'末端突出型の伸長ヘアピン核酸 ((II)) のセットの構造を示す。Bは、3'末端突出型の開始ヘアピン核酸 ((I)) と5'末端突出型の伸長ヘアピン核酸 ((II)) のセットの構造を示す。図中、Xは突出領域を、Y及びY'はステム領域を、Zはループ領域を示す。

[図2]HCRの具体例とヘアピン核酸の各ドメインを模式的に示す図である。HCRのステップ1～ステップ3を示す。

[図3]異なる3つのヘアピン核酸のセット (HP-o、HP-a及びHP-b) におけるHCR効率を示す図である。

[図4]異なる2つのヘアピン核酸のセット (HP-c及びHP-d) におけるHCR効率を示す図である。

[図5]HeLa細胞における、ヘアピン核酸のセットの導入による相対細胞生存率の変化を示す図である。図中、「sc」はスクランブル配列を有するヘアピン核酸を導入した場合の結果を示す。また、「***」はp値が0.001未満であることを示す。

発明を実施するための形態

[0015] 1. 細胞死誘導組成物

1-1. 概要

本発明の第1の態様は、ヘアピン核酸を含む細胞死誘導組成物である。本発明の細胞死誘導組成物は開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸を必須の構成要素として含む。本発明の細胞死誘導組成物によれば、miR-21を発現する細胞において特異的に細胞死を誘導することができ、また本発明の医薬組成物の有効成分となり得る。

[0016] 1-2. 定義

本明細書で頻用する用語について、以下で定義する。

本明細書において「ヘアピン核酸」とは、ヘアピン構造を形成し得る一本鎖核酸を指す。本明細書における「ヘアピン構造」は、一本鎖核酸により形成される、ステム構造Y、ループ構造Z及び突出領域Xを1組合む核酸の二次構造を指す。図1 A及びBにヘアピン核酸の模式図を示す。本明細書におけるヘアピン核酸は、突出領域X、ステム領域Y、ループ領域Z及びステム領域Y'を順に含む。

[0017] 本明細書において「5'末端突出型（図1 A(I)及びB(II)）」とは、5'末端に突出領域Xを含むヘアピン核酸の型を指す。5'末端突出型のヘアピン核酸は、突出領域X、ステム領域Y、ループ領域Z及びステム領域Y'を5'末端から順に含む。また、本明細書において「3'末端突出型（図1 A(II)及びB(I)）」とは、3'末端に突出領域Xを含むヘアピン核酸の型を指す。3'末端突出型のヘアピン核酸は、ステム領域Y'、ループ領域Z、ステム領域Y及び突出領域Xを5'末端から順に含む。

[0018] 「ステム構造」は、互いにハイブリダイズ可能な塩基配列を含む2つのステム領域（Y及びY'）が二本鎖を形成してなる構造である。

[0019] 「ループ構造」は、一本鎖核酸からなるループ領域（Z）によって形成されるループ状の構造である。

[0020] 本明細書において「突出領域（X）」とは、HCR中でmiR-21又はHCR産物の一本鎖部分を認識する突出末端を指す。「突出末端」とは、ステム領域（Y又はY'）の遊離末端（ループ領域Zとの非隣接末端）のいずれか又は両方に隣接する一本鎖からなる核酸領域を指す。本明細書において突出領域Xの長さは特に限定しないが、例えば、4塩基以上、5塩基以上、6塩基以上、7塩基以上又は8塩基以上である。また、突出領域Xは、例えば、20塩基以下、19塩基以下、18塩基以下、17塩基以下、16塩基以下、15塩基以下、14塩基以下、13塩基以下、12塩基以下、11塩基以下、10塩基以下、又は9塩基以下とすることができる。具体的には、突出領域Xの長さは、例えば、4~20塩基とすることができる。

- [0021] 本明細書において「ステム領域 (Y及びY')」とは、分子内で互いにハイブリダイズしてステム構造を形成する核酸領域を指す。各ステム領域の少なくとも両末端は互いに相補的な塩基からなる。各ステム領域の長さは特に限定しないが、例えば、それぞれ独立に10塩基以上、11塩基以上、12塩基以上、13塩基以上又は14塩基以上である。また、各ステム領域の長さは、それぞれ独立に、例えば、20塩基以下、19塩基以下、18塩基以下、17塩基以下、16塩基以下、又は15塩基以下とすることができる。具体的には、ステム領域の長さは、例えば、それぞれ独立に10~20塩基とすることができる。「ステム領域Y (Y)」とは、突出領域Xに隣接するステム領域を指す。また、「ステム領域Y' (Y')」とは、突出領域Xに隣接しないステム領域を指す。
- [0022] 本明細書において「ループ領域 (Z)」とは、一本鎖核酸中で前記2つのステム領域間に位置する核酸領域を指す。ループ領域Zの長さは特に限定しないが、例えば、7塩基以上又は8塩基以上である。また、ループ領域Zは、例えば、12塩基以下、11塩基以下、10塩基以下、又は9塩基以下とすることができる。具体的には、ループ領域Zの長さは、例えば、7~12塩基とすることができる。
- [0023] 本明細書において「miR-21」とは、配列番号1に表される全長が22塩基の塩基配列を有するmiRNA、及びその変異体、相同体、修飾体及び誘導体をいう。miR-21は多くのがんにおいて発現が上昇していることが知られており、細胞増殖や細胞死、DNA損傷応答等に関与することが知られている。
- [0024] 本明細書において「ハイブリダイゼーション連鎖反応 (Hybridization Chain Reaction: 「HCR」)」とは、開裂した複数のヘアピン核酸が連鎖的にハイブリダイズすることによって起こる二本鎖核酸分子の伸長反応を指す。図2に典型的なHCRの過程を模式的に示す。まず、ステップ1では、開始ヘアピン核酸が突出領域X₁で標的であるmiR-21を認識し、ハイブリダイズしてmiR-21配列-開始ヘアピン核酸複合体を形成する (図2 (1))。このときmiR-21とのハイブリダイゼーションの伸長によって開始ヘアピン核酸のヘアピン構造が開裂する。このmiR-21配列-開始ヘアピン核酸複合体の形成がHCR産物形成

の起点となる。次に、ステップ2では、伸長ヘアピン核酸の突出領域 λ_2 が、前記開裂によって遊離状態となった開始ヘアピン核酸の一本鎖部分（伸長ヘアピン結合ドメイン）を認識してハイブリダイズし、miR-21配列-開始-伸長ヘアピン核酸複合体を形成する（図2（2））。このとき、開始ヘアピン核酸の伸長ヘアピン結合ドメインとのハイブリダイゼーションの伸長によって伸長ヘアピン核酸のヘアピン構造が開裂する。ステップ3では、開始ヘアピン核酸がステップ2で形成されたmiR-21配列-開始-伸長ヘアピン核酸複合体における伸長ヘアピン核酸の一本鎖部分（miR-21ドメイン）のmiR-21様配列を認識して開裂し、miR-21配列-開始-伸長ヘアピン核酸複合体とさらにハイブリダイズしてmiR-21配列-開始-伸長-開始ヘアピン核酸複合体を形成する（図2（3））。その後、このステップ2及び3が交互に繰り返されることによって、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸が次々とハイブリダイズして二本鎖核酸は伸長し、高分子重合体（HCR産物）が形成される（図2（4）及び（5））。HCR産物は直鎖状二本鎖核酸を形成する。

[0025] 本明細書において「ハイブリダイゼーション連鎖構造」とは、上述のHCRによって形成される直鎖状二本鎖核酸に含まれる核酸構造を指す。ハイブリダイゼーション連鎖構造は病原体関連分子パターンを含み、パターン認識受容体を介して核酸免疫を誘導する。

[0026] 本明細書において「核酸免疫」とは、核酸の認識に基づく自然免疫応答を指す。核酸免疫は、非自己の核酸及び／又は傷害された自己由来の核酸がパターン認識受容体によって認識されることによって誘導される。

[0027] 「パターン認識受容体（pattern-recognition receptor）」とは、自然免疫系の誘導に関与するタンパク質であって、非自己分子及び／又は傷害された自己由来の分子に見られる構造パターンを認識する受容体タンパク質の総称である。本明細書においては、特に断りのない限り、核酸分子を認識する受容体タンパク質を指す。パターン認識受容体に認識される構造パターンは病原体関連分子パターン（pathogen-associated molecular pattern：PAMP）と呼ばれる。

- [0028] 「病原体関連分子パターン」とは、ウイルス、原核生物及び／又は前口動物に存在するが正常な脊椎動物においてパターン認識受容体が存在する環境には存在しない分子パターンをいう。本明細書においては特に、ウイルス、原核生物及び／又は前口動物の核酸分子に存在し、脊椎動物の核酸分子には存在しない構造パターンを指す。
- [0029] 「相補的」とは、核酸塩基が水素結合を介して、互いに塩基対合を形成し得る関係をいう。いわゆるワトソン-クリック塩基対（天然型塩基対）又はフーグスティーン型塩基対が該当する。
- [0030] 「ハイブリダイズする」又は「ハイブリダイズ可能」とは、互いに相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドが塩基対合して、完全に又は部分的に相補的な二本鎖を形成することを指す。
- [0031] また、本明細書において「複数個」とは、2以上の個数を指す。具体的には、例えば、2～60個、2～45個、2～30個、2～14個、2～10個、2～8個、2～6個、2～5個、2～4個又は2～3個を指す。本明細書において「数个」は2～3個を指す。
- [0032] 本明細書において「哺乳動物の生理学的条件」とは、哺乳動物個体の体内におけるpH条件及び温度条件と同一であるか又はそれに類似する任意の条件をいう。本明細書における生理学的条件には、*in vitro*条件及び*in vivo*条件のいずれも含まれる。具体的な生理学的条件としては、例えば、約pH7.4（pH 6.8～pH7.8）及び約37℃（35℃～40℃）の水性緩衝液中の条件が挙げられる。
- [0033] 本明細書において、「GC含有率」とは、対象となる塩基配列の全塩基数に対する、グアニン（G）の数及びシトシン（C）の数を合計した塩基数の割合をいう。特に、ループ領域 Z_1 について使用される場合、ループ領域 Z_1 の全塩基数に対する、Gの数及びCの数を合計した塩基数の割合を指す。
- [0034] 本明細書において「プリン塩基」とは、プリン骨格を有する塩基をいい、化学式 $C_5N_4H_4$ で表される複素環化合物であるプリンの誘導体を含む塩基を広く包含する。プリン塩基の具体例としては、アデニン（A）、グアニン（G）、

ヒポキサンチン、キサンチン等が挙げられる。

[0035] 本明細書において「ピリミジン塩基」とは、ピリミジン骨格を有する塩基をいい、化学式 $C_4H_4N_2$ で表される複素環化合物であるピリミジンの誘導体を含む塩基を広く包含する。ピリミジン塩基の具体例としては、シトシン (C)、チミン (T)、ウラシル (U) 等が挙げられる。

[0036] 本明細書において、「プリン塩基の含有率」とは、対象となる塩基配列の全塩基数に対する、プリン塩基の合計塩基数の割合をいう。特に、ループ領域 Z_1 について使用される場合、ループ領域 Z_1 の全塩基数に対する、プリン塩基の合計塩基数の割合を指す。

[0037] 本明細書において「細胞死」とは、細胞が死滅することを指す。細胞死は、プログラム細胞死及び偶発的な細胞死に大別されるが、本明細書における細胞死はそのいずれも含む。プログラム細胞死としては、例えば、アポトーシス、オートファジー及びネクロトーシス等が挙げられる。アポトーシスとは、断片化した核が細胞膜に包まれた凝集体（アポトーシス小体）の形成を特徴とするプログラム細胞死を指す。アポトーシスの過程においては、例えば、細胞の断片化、核の断片化、膜ブレブ形成及びクロマチン凝縮等の現象が見られる。本明細書におけるオートファジーとは、特にマクロオートファジーとも呼ばれ、栄養ストレス時に起こるプログラム細胞死を指す。オートファジーの過程においては、例えば、細胞質の広範囲における空胞化等の現象が見られる。本明細書におけるネクロトーシスとは、細胞内容物が細胞外に放出される等、ネクローシス様の現象が見られるプログラム細胞死を指す。ネクローシス様の現象が見られるプログラム細胞死にはいくつかの種類があるが、本明細書におけるネクロトーシスはそのいずれも包含する。偶発的な細胞死とは、細胞の機械的な損傷や細胞の外部又は内部におけるストレスに起因する細胞死を指す。偶発的な細胞死は、ネクローシスとも呼ばれる。

[0038] 本明細書において特定の遺伝子が「高発現している」とは、正常な細胞における発現量と比較して、顕著に、又は有意に発現量が増加していることを指す。

[0039] 「統計学的に有意」とは、被験対象の測定値と対照値の差異を統計学的に処理したときに、両者間に有意差があることをいう。例えば、得られた値の危険率（有意水準）が小さい場合、具体的には5%より小さい場合（ $p < 0.05$ ）、1%より小さい場合（ $p < 0.01$ ）、0.1%より小さい場合（ $p < 0.001$ ）が挙げられる。ここに示す「p（値）」は、統計学的検定において、帰無仮説に基づいた分布の中で、検定統計量が偶然その値になる確率を示す。したがって「p」が小さいほど、検定統計量がその値となる確率は低く、帰無仮説が棄却されやすいことを意味する。統計学的処理の検定方法は、有意性の有無を判断可能な公知の検定方法を適宜使用すればよく、特に限定しない。例えば、スチューデントt検定法、共変量分散分析等を用いることができる。

[0040] 1-3. 構成

本発明の細胞死誘導組成物は一組のヘアピン核酸を含む。

一組のヘアピン核酸は、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸からなる。より具体的には、一組のヘアピン核酸は、5'末端突出型の開始ヘアピン核酸及び3'末端突出型の伸長ヘアピン核酸からなる、又は3'末端突出型の開始ヘアピン核酸及び5'末端突出型の伸長ヘアピン核酸からなる。以下、それぞれについて具体的に説明する。

[0041] (1) 開始ヘアピン核酸

「開始ヘアピン核酸（図1(I)）」とは、一般式(I)で表される構造を含み、miR-21結合ドメイン及び伸長ヘアピン結合ドメインを含むヘアピン核酸である（図2）。

[0042] $X_1-Y_1-Z_1-Y'_1$ (I)

(式中、

X_1 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_1 及び Y'_1 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

Z_1 は、7~12塩基のCG配列及びGGG配列を含まない配列からなるループ領域であり、

X_1 の全部、及び Y_1 の全部又は一部は、miR-21の塩基配列の全部又は一部とハイブリダイズ可能なmiR-21結合ドメインを構成し、

Y'_1 の全部又は一部は、miR-21の全部又は一部とハイブリダイズ可能な伸長ヘアピン結合ドメインを構成する)

[0043] 一般式 (I) で表される条件を満たす限り、その他の塩基を追加で含むことができる。例えば、突出領域 X_1 に隣接して、miR-21結合ドメインを構成しない塩基又は塩基配列を突出末端に含んでもよく、 Y'_1 に隣接して、ステム領域 Y'_1 及び／又は伸長ヘアピン結合ドメインを構成しない塩基又は塩基配列をステム領域 Y'_1 の遊離末端に含んでもよい。

[0044] 「miR-21結合ドメイン」は、開始ヘアピン核酸におけるmiR-21とハイブリダイズする核酸領域を指す。具体的には、例えば、miR-21結合ドメインは、突出領域 X_1 の全部、及びそれに続くステム領域 Y_1 の全部又は一部を含む (図2) 。miR-21結合ドメインは、miR-21の塩基配列の全部又は一部とハイブリダイズ可能であり、このドメインの塩基配列は、少なくともドメインの両末端でmiR-21と相補的である。

[0045] 「伸長ヘアピン結合ドメイン」は、開始ヘアピン核酸における伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする核酸領域を指す。具体的には、例えば、伸長ヘアピン結合ドメインは、ステム領域 Y'_1 の全部又は一部を含む (図2) 。伸長ヘアピン結合ドメインは、伸長ヘアピン核酸の開始ヘアピン結合ドメインとハイブリダイズ可能であり、またドメインの塩基配列は、少なくともそれぞれのドメインの両末端で互いに相補的である。

[0046] 例えば、開始ヘアピン核酸のmiR-21結合ドメインは、5'末端突出型 (式 (I)) において左が5'末端である開始ヘアピン核酸) か3'末端突出型 (式 (I)) において左が3'末端である開始ヘアピン核酸) にかかわらず、配列番号2で表される塩基配列、又は配列番号2で表される塩基配列に対して1個又は数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列を含むことができる。

[0047] 本明細書における開始ヘアピン核酸のループ領域 Z_1 の塩基配列は、CG配列及びGGG配列を含まなければ特に限定しない。

[0048] 開始ヘアピン核酸のループ領域 Z_1 におけるGC含有率は特に限定しない。例えば、0%以上、10%以上、20%以上、25%以上、30%以上、34%以上、35%以上、36%以上、40%以上、44%以上とすることができる。また、上限についても特に限定しないが。例えば、100%以下、92%以下、91%以下、90%以下、89%以下、88%以下、87%以下、86%以下、85%以下、84%以下、82%以下、80%以下、78%以下、77%以下、75%以下、73%以下、70%以下、67%以下、66%以下、65%以下、64%以下、63%以下、62%以下、61%以下、60%以下、59%以下、58%以下とすることができる。例えば、0%以上92%以下、20%以上90%以下、34%以上80%以下、40%以上60%以下、44%以上58%以下とすることができる。

[0049] 開始ヘアピン核酸のループ領域 Z_1 におけるプリン塩基の含有率は特に限定しない。例えば、0%以上、10%以上、20%以上、25%以上、30%以上、34%以上、35%以上、36%以上、40%以上、44%以上とすることができる。また、上限についても特に限定しない。例えば、100%以下、92%以下、91%以下、90%以下、89%以下、88%以下、87%以下、86%以下、85%以下、84%以下、82%以下、80%以下、78%以下、77%以下、75%以下、73%以下、70%以下、67%以下、66%以下、65%以下、64%以下、63%以下、62%以下、61%以下、60%以下、59%以下、58%以下、57%以下とすることができる。例えば、0%以上92%以下、20%以上90%以下、34%以上80%以下、40%以上60%以下、44%以上57%以下とすることができる。

[0050] 開始ヘアピン核酸のループ領域 Z_1 は、その任意の連続した2以上の塩基からなる塩基配列について、それに相補的な塩基配列の逆配列を同一ループ領域内に含まない塩基配列であってもよい。例えば、「ATGCATGC」という塩基配列は、左端から1~2塩基目からなる「AT」について、その相補的な塩基配列である「TA」の逆配列である「AT」を5~6塩基目に含み、左端から1~3塩基目からなる「ATG」について、その相補的な塩基配列である「TAC」の逆配列である「CAT」を4~6塩基目に含むため、このような塩基配列には該当しない。一方、例えば、「AGTCAGTC」という塩基配列は、連続した塩基配列をどの

ように選択しても、それに相補的な塩基配列の逆配列を含まないため、このような塩基配列に該当する。例えば、AT配列、TA配列又はGC配列を複数含む塩基配列はこのような塩基配列には含まれない。

[0051] また、開始ヘアピン核酸のループ領域 Z_1 は、例えば、以下のいずれかの塩基配列からなってもよい。

- (i) 同一塩基が2以上連続した配列単位を2以上含む塩基配列；
 - (i i) 同一塩基が2以上連続した配列を含まない塩基配列；又は
 - (i i i) 同一塩基を含まない3塩基以上の配列単位を2以上含む塩基配列
- 以下、(i) ~ (i i i) の各塩基配列について説明する。

[0052] (1-1) (i) の塩基配列について

配列単位に含まれる塩基の数は2塩基以上であれば特に限定しない。例えば、3塩基以上、4塩基以上、5塩基以上又は6塩基以上であってよい。また、塩基数は各配列単位の間で同一でも異なってもよい。例えば、1つ目の配列単位は3塩基からなり、2つ目の配列単位は2~4塩基（例えば、2塩基、3塩基、4塩基）からなってもよい。

[0053] 配列単位の数は2個以上であれば特に限定しない。例えば、3個以上、4個以上、5個以上又は6個であってよい。各配列単位に含まれる塩基の種類は特に限定しない。2個以上の配列単位が同じ塩基からなってもよいし、2個以上の配列単位が互いに異なる塩基からなってもよい。例えば、プリン塩基からなる配列単位を2個以上含んでもよく、ピリミジン塩基からなる配列単位を2個以上含んでもよく、プリン塩基からなる配列単位とピリミジン塩基からなる配列単位を含んでもよい。2個以上の配列単位を含む場合、任意の2個の配列単位について、互いに相補的な塩基からなる配列でないことが好ましい。つまり、例えば、Gからなる配列単位とCからなる配列単位や、Aからなる配列単位とTからなる配列単位を含まないことが好ましい。具体的には、例えば、Gからなる配列単位を2個以上、Cからなる配列単位を2個以上、Tからなる配列単位を2個以上、Aからなる配列単位を2個以上、Gからなる配列単位とTからなる配列単位をそれぞれ1個以上、Gからなる配列単位とAからなる配列単位をそ

れぞれ1個以上、Cからなる配列単位とTからなる配列単位をそれぞれ1個以上又はCからなる配列単位とAからなる配列単位をそれぞれ1個以上含むことができる。

[0054] 配列単位の間塩基の数は特に限定しない。例えば、配列単位が互いに隣接していてもよく、1塩基以上を間に含んでもよい。具体的には、例えば、配列単位の間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、6塩基以上、7塩基以上又は8塩基含むことができる。

[0055] 配列単位の間塩基配列は、その両端の塩基が、それぞれ隣接する配列単位を構成する塩基と異なり、同一の塩基が2以上連続した配列を含まなければ特に限定しない。つまり、例えば、Tからなる配列単位に隣接する塩基はT以外であればよい。また、例えば、Aからなる配列単位とTからなる配列単位の両方に隣接する塩基はA及びT以外であればよい。例えば、プリン塩基からなる配列単位に隣接する塩基はプリン塩基であってもよく、ピリミジン塩基であってもよい。

[0056] 特に、配列単位の間2塩基以上を含む場合、同一の塩基が2以上連続した配列を含まない。例えば、配列単位の間は全て異なる塩基からなる配列であってもよい。例えば、プリン塩基及びピリミジン塩基の両方を含んでもよく、プリン塩基又はピリミジン塩基のいずれか一方のみを含んでもよい。具体的には、例えば、配列単位の間が2塩基からなる場合、AC配列、CA配列、TG配列、GT配列、GC配列、AG配列、GA配列、TC配列、CT配列、TA配列、AT配列のいずれであってもよい。

[0057] ループ領域 Z_1 の両端の塩基は、それぞれ配列単位を構成する塩基でもよく、いずれか一方又は両方が配列単位を構成する塩基でなくてもよい。具体的には、例えば、ループ領域 Z_1 の塩基配列がCCCTGAACの場合、ループ領域 Z_1 の両端の塩基がCであるところ、左端のCはCCCという配列単位を構成する塩基であり、右端のCは配列単位を構成しない塩基である。

[0058] (i) の塩基配列としては、例えば、ループ領域 Z_1 の両端の塩基がそれぞれ配列単位を構成する塩基であり、プリン塩基からなる配列単位とピリミジン

塩基からなる配列単位を1個ずつ含み、2個の配列単位の間互いに異なる2塩基を含む塩基配列が挙げられる。

[0059] 具体的には、例えば、(i)の塩基配列は、CCTGAA、CCTGAAA、CCTGAAAA、CCCTGAA、CCCTGAAA、CCCTGAAAA、CCCCTGAA、CCCCTGAAA、CCCCTGAAAA、TTGACC、TTGACCC、TTGACCCC、TTTGACC、TTTGACCC、TTTGACCCC、TTTTGACC、TTTTGACC C、TTTTGACCCC、AATGCC、AATGCCC、AATGCCCC、AAATGCC、AAATGCCC、AAATGCCC C、AAAATGCC、AAAATGCCC、AAAATGCCCC、AAGTCC、AAGTCCC、AAGTCCCC、AAAGTC C、AAAGTCCC、AAAGTCCCC、AAAAGTCC、AAAAGTCCC、AAAAGTCCCC、CCAGTT、CCAG TTT、CCAGTTTT、CCCAGTT、CCCAGTTT、CCCAGTTTT、CCCCAGTT、CCCCAGTTT又はC CCCAGTTTTを含むことができる。

[0060] (1-2) (i i)の塩基配列について

(i i)の塩基配列は、同一塩基が2以上連続した配列を含まない塩基配列であれば、特に限定しない。例えば、同一塩基が2以上連続した配列を含まないように、同一塩基を含まない2塩基以上の配列単位を1以上含めることによって構成することができる。この場合、配列単位に含まれる塩基の数は2塩基以上であれば特に限定しない。例えば、3塩基以上(3塩基、4塩基等)であってもよく、特に修飾塩基を含む場合は、4塩基以上、例えば、5塩基以上又は6塩基以上であってもよい。また、塩基数は各配列単位の間で同一でも異なってもよい。例えば、1つ目の配列単位は3塩基からなり、2つ目の配列単位は3~4塩基(例えば、3塩基、4塩基)からなってもよい。

[0061] 配列単位の数は1個以上であれば特に限定しない。例えば、2個、3個又は4個であってよい。各配列単位に含まれる塩基の種類は特に限定しない。2個以上の配列単位が同じ塩基配列を有していてもよいし、2個以上の配列単位が互いに異なる塩基配列を有していてもよい。2個以上の配列単位を含む場合、任意の2個の配列単位について、互いに逆相補の関係(ある塩基配列と、それに相補的な塩基配列の逆配列の関係)でないことが好ましい。各配列単位は、具体的には、例えば、A及びTからなる配列単位、A及びCからなる配列単位、A及びGからなる配列単位、T及びCからなる配列単位、T及びGからなる配列単位

、GC配列からなる配列単位であってもよいし、(i i i) について後述する配列単位であってもよい。2個以上の配列単位が互いに異なる塩基配列を有する場合、構成塩基が共通する配列単位であってもよく、互いに構成塩基が異なってもよい。具体的は配列単位としては、例えば、AT配列、TA配列、AC配列、CA配列、AG配列、GA配列、TC配列、CT配列、TG配列、GT配列、GC配列、又は(i i i) の塩基配列について例示した配列単位等が挙げられる。

[0062] 配列単位の間塩基の数は特に限定しない。例えば、配列単位が互いに隣接していてもよく、1塩基を間に含んでもよい。通常、間に2塩基を含む場合は、その2塩基が別の配列単位を構成する。

[0063] 配列単位の間塩基は、同一塩基が2以上連続した配列が現れないように選択されれば特に限定しない。つまり、隣接する塩基と異なる塩基であれば特に限定しない。例えば、最後の塩基がプリン塩基である配列単位に隣接する塩基はプリン塩基であってもよく、ピリミジン塩基であってもよい。また、最初の塩基がプリン塩基である配列単位に隣接する塩基はプリン塩基であってもよく、ピリミジン塩基であってもよい。

[0064] (1 - 3) (i i i) の塩基配列について

(i i i) の塩基配列は、同一塩基を含まない3塩基以上の配列単位を2以上含む塩基配列であれば特に限定しない。配列単位に含まれる塩基の数は3塩基以上であれば特に限定しない。例えば、3塩基又は4塩基であってもよく、特に修飾塩基を含む場合は、4塩基以上、例えば、5塩基以上又は6塩基以上であってもよい。また、塩基数は各配列単位の間で同一でも異なってもよい。例えば、1つ目の配列単位は4塩基からなり、2つ目の配列単位は3~4塩基（例えば、3塩基、4塩基）からなってもよい。

[0065] 配列単位の数は2個以上であれば特に限定しない。例えば、2個、3個又は4個であってもよい。各配列単位に含まれる塩基の種類は特に限定しない。2個以上の配列単位が同じ塩基配列を有していてもよいし、2個以上の配列単位が互いに異なる塩基配列を有していてもよい。2個以上の配列単位を含む場合、任意の2個の配列単位について、互いに相補的な配列でないことが好ましい。各

配列単位は、具体的には、例えば、A、T及びGからなる配列単位、A、T及びCからなる配列単位、C、T及びGからなる配列単位、A、C及びGからなる配列単位、又はA、T、C及びGからなる配列単位であってもよい。2個以上の配列単位が互いに異なる塩基配列を有する場合、構成塩基が共通する配列単位であってもよく、互いに構成塩基が異なってもよい。具体的には配列単位としては、例えば、AGT配列、GTC配列、TCA配列、CAG配列及びこれらの逆配列（TGA配列、CTG配列、ACT配列、GAC配列）、AGTC配列、GTCA配列、TCAG配列、CAGT配列及びこれらの逆配列（CTGA配列、ACTG配列、GACT配列、TGAC配列）等が挙げられる。

[0066] 配列単位の間塩基の数は特に限定しない。例えば、配列単位が互いに隣接していてもよく、1塩基以上を間に含んでもよい。具体的には、例えば、配列単位の間1塩基以上、2塩基以上、3塩基以上、4塩基以上、5塩基以上含むことができる。

[0067] 配列単位の間塩基配列は特に限定しない。例えば、最後の塩基がプリン塩基である配列単位に隣接する塩基はプリン塩基であってもよく、ピリミジン塩基であってもよい。また、最初の塩基がプリン塩基である配列単位に隣接する塩基はプリン塩基であってもよく、ピリミジン塩基であってもよい。

[0068] 配列単位の間が2塩基以上を含む場合、同一の塩基が2以上連続した配列を含まなくてもよく、そのような塩基配列を含んでもよい。例えば、配列単位の間は全て異なる塩基からなる配列であってもよい。例えば、プリン塩基及びピリミジン塩基の両方を含んでもよく、プリン塩基又はピリミジン塩基のいずれか一方のみを含んでもよい。具体的には、例えば、配列単位の間が2塩基からなる場合、AC配列、CA配列、TG配列、GT配列、GC配列、AG配列、GA配列、TC配列、CT配列、TA配列、AT配列のいずれであってもよい。

[0069] ループ領域 Z_1 の両端の塩基は、それぞれ配列単位を構成する塩基でもよく、いずれか一方又は両方が配列単位を構成する塩基でなくてもよい。具体的には、例えば、ループ領域 Z_1 の塩基配列がAGTCAGTAの場合、ループ領域 Z_1 の両端の塩基がAであるところ、左端のAはAGTという配列単位を構成する塩基であり

、右端のAは配列単位を構成しない塩基である。

[0070] (i i i) の塩基配列としては、例えば、ループ領域Z₁の少なくとも一方の端の塩基が配列単位を構成する塩基であり、4塩基からなる同一の配列単位を2つ隣接して含む塩基配列が挙げられる。

[0071] 具体的には、例えば、(i i i) の塩基配列は、AGTCAGTC、GTCAGTCA、TCA GTCAG、CAGTCAGT又はこれらの逆配列(CTGACTGA、TGA CTGAC、GACTGACT、ACTG ACTG)等を含むことができる。

[0072] 開始ヘアピン核酸は、哺乳動物の生理学的条件下において、miR-21存在下でヘアピン構造が開裂して一本鎖構造を形成することが好ましい。生理学的条件においてヘアピン構造が開裂するか否かは当技術分野において公知の手法を用いて確認することができる。例えば、無細胞系、細胞系を用いた *in vitro* の実験系、*in vivo* の実験系、ヘアピン構造形成反応の自由エネルギー変化量等を指標とした *in silico* の解析又はこれらの組合せ等によって判断することができる。判断に使用可能な具体的な *in vitro* の実験系、*in vivo* の実験系及び *in silico* の解析手法として、例えば、本願実施例において例示されている手法を用いてもよいが、それに限定しない。

[0073] 本明細書において「ヘアピン構造形成反応」とは、ヘアピン核酸において、一本鎖核酸が直鎖形態からヘアピン形態に変化してヘアピン構造が形成される反応を指す。

[0074] 本明細書において「自由エネルギー変化量」とは、温度及び圧力条件が一定の場合において、ある反応を通じて外部環境から反応系へ供給される正味のエネルギー量を指す。本明細書においては、特に、ヘアピン構造形成反応において外部環境から供給される正味のエネルギー量が該当する。例えば、出発物質と比較して反応生成物がより熱力学的に安定であれば、反応を通じて反応系がエネルギーを失うため、自由エネルギー変化量は負となる。本発明の自由エネルギー変化量には、例えば、ギブズの自由エネルギー変化量 (ΔG) 及びヘルムホルツの自由エネルギー変化量 (ΔF) 等のいずれも含まれる。

[0075] ヘアピン構造形成反応の自由エネルギー変化量は特に限定しない。一般に、ヘアピン構造形成反応の自由エネルギー変化量は、低い程ヘアピン構造が開裂しにくく、高い程ヘアピン構造が開裂しやすい。自由エネルギー変化量は、例えば、 $-20\sim-10\text{kcal/mol}$ である。具体的には、例えば、 -20kcal/mol 以上、 -19kcal/mol 以上、 -18kcal/mol 以上、 -17.5kcal/mol 以上、 -17kcal/mol 以上又は -16.5kcal/mol 以上である。また、自由エネルギー変化量は、例えば、 -10kcal/mol 以下、 -11kcal/mol 以下、 -12kcal/mol 以下、 -12.5kcal/mol 以下、 -13kcal/mol 以下、 -13.5kcal/mol 以下、 -14kcal/mol 以下、 -14.5kcal/mol 以下又は -15kcal/mol 以下である。自由エネルギー変化量は、NUPAK等の核酸の高次構造の安定性予測に使用される公知のソフトウェアを使用して知ることができる。

[0076] より具体的には、例えば、開始ヘアピン核酸は以下の塩基配列を含む。

(1) 配列番号4、6、15及び17からなる群から選択されるいずれかで表される塩基配列

(2) (1) に対して1個又は数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列

(3) 配列番号4、6、15及び17からなる群から選択されるいずれかで表される塩基配列と相補的な塩基配列と高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列

[0077] 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塩基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、二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塩基配列において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。具体的には、例えば、2~60個、2~45個、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個の塩基が置換されている場合、ハイブリダイズ可能である。

[0078] ハイブリダイズ条件は特に限定しないが、例えば、低ストリンジェントな条件及び高ストリンジェントな条件等の様々なストリンジェントな条件であり得る。「低ストリンジェントな条件」とは、核酸がハイブリダイズしやすい条件を意味する。低ストリンジェントな条件とは、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。「高ストリンジェントな条件」とは、非特異的なハイブリダイゼーションを生じ難い環境条件をいう。高ストリンジェントな条件下では、標的塩基配列を有する核酸とはハイブリッドを形成可能であるが、非特異的な塩基配列を有する核酸はハイブリッドを実質的に形成することができない。一般に高ストリンジェントな条件とは、低塩濃度で、かつ高温な条件をいう。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ェントな条件として、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。

[0079] (2) 伸長ヘアピン核酸

「伸長ヘアピン核酸（図1(II)）」とは、一般式(II)で表される構造を含み、開始ヘアピン核酸とハイブリダイズするヘアピン核酸である。伸長ヘアピン核酸は開始ヘアピン結合ドメイン及びmiR-21ドメインを含む。

[0080] $Y'_2-Z_2-Y_2-X_2$ (II)

(式中、

X_2 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_2 及び Y'_2 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

Z_2 は、7~12塩基の配列からなるループ領域であり、

Y'_2 の全部又は一部は、miR-21ドメインを構成し、

Y_2 の全部、及び X_2 の全部又は一部は、伸長ヘアピン結合ドメインの全部又は一部とハイブリダイズ可能な開始ヘアピン結合ドメインmiR-21ドメインを構成する)

[0081] 一般式(II)で表される条件を満たす限り、その他の塩基を追加で含むことができる。例えば、突出領域 X_2 に隣接して、開始ヘアピン結合ドメインを構成しない塩基又は塩基配列を突出末端に含んでもよく、 Y'_2 に隣接して、ステム領域 Y'_2 及び／又はmiR-21ドメインを構成しない塩基又は塩基配列をステム領域 Y'_2 の遊離末端に含んでもよい。

[0082] 「開始ヘアピン結合ドメイン」とは、伸長ヘアピン核酸における、開始ヘアピン核酸とハイブリダイズする核酸領域を指す。具体的には、例えば、開始ヘアピン結合ドメインは、突出領域 X_2 の全部、及びそれに続くステム領域 Y_2 の全部又は一部を含む(図2)。開始ヘアピン結合ドメインは、開始ヘアピン核酸の伸長ヘアピン結合ドメインとハイブリダイズ可能であり、また両ドメインの塩基配列は、少なくともそれぞれのドメインの両末端で互いに相補的である。

[0083] 「miR-21ドメイン」とは、伸長ヘアピン核酸における、miR-21の塩基配列と相補的な塩基配列とハイブリダイズ可能な塩基配列を有する核酸領域を指す。具体的には、例えば、miR-21ドメインはステム領域 Y'_2 の全部又は一部を

含む(図2)。miR-21ドメインは開始ヘアピン核酸のmiR-21結合ドメインとハイブリダイズ可能であり、また両ドメインの塩基配列は、少なくともそれぞれのドメインの両末端で互いに相補的である。

[0084] 例えば、伸長ヘアピン核酸のmiR-21ドメインの塩基配列は、3'末端突出型(式(II)において左が5'末端である開始ヘアピン核酸)であるか5'末端突出型(式(II)において左が3'末端である開始ヘアピン核酸)であるかにかかわらず、配列番号3で表される塩基配列、又は配列番号3で表される塩基配列に対して1個又は数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列を含むことができる。

[0085] 伸長ヘアピン核酸は、哺乳動物の生理学的条件において、開始ヘアピン核酸存在下でヘアピン構造が開裂して一本鎖構造を形成することが好ましい。

[0086] より具体的には、例えば、伸長ヘアピン核酸は以下の塩基配列を含む。

(1) 配列番号5、7、16及び18からなる群から選択されるいずれか一で表される塩基配列

(2) (1)に対して1個又は数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列

(3) 配列番号5、7、16及び18からなる群から選択されるいずれか一で表される塩基配列と相補的な塩基配列と高ストリンジентな条件でハイブリダイズする塩基配列

一本鎖構造形成の有無の判断、自由エネルギー変化量、高ストリンジентな条件でハイブリダイズする塩基配列等は開始ヘアピン核酸において上述した内容に準ずる。

[0087] miR-21の塩基配列及び開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸に関して上述した塩基配列を表1に示す。

[0088]

[表1]

表 1:miR-21 と各ヘアピン核酸の塩基配列

核酸名	配列	配列番号
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	1
開始ヘアピン核酸 miR-21 結合ドメイン	TCAACATCAGTCTGATAAGCTA	2
伸長ヘアピン核酸 miR-21 ドメイン	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	3
開始ヘアピン核酸 (5'末端突出型)	TCAACATCAGTCTGATAAGCTACCCTGAAAATAGCTTATCAGAC	4
伸長ヘアピン核酸 (3'末端突出型)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAGTCTGATAAGCTATTTTCAGGG	5
開始ヘアピン核酸 (5'末端突出型)	TCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGTCAGTCTAGCTTATCAGACT	6
伸長ヘアピン核酸 (3'末端突出型)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAAGTCTGATAAGCTAGACTGACT	7
開始ヘアピン核酸 (5'末端突出型)	TCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGTCAGTCATAGCTTATCAGAC	15
伸長ヘアピン核酸 (3'末端突出型)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAGTCTGATAAGCTATGACTGACT	16
開始ヘアピン核酸 (5'末端突出型)	TCAACATCAGTCTGATAAGCTAGACTGACTTAGCTTATCAGACT	17
伸長ヘアピン核酸 (3'末端突出型)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAAGTCTGATAAGCTAAGTCAGTC	18

※配列番号2～7、15～18中の「T(チミン)」は「T 又は U(ウラシル)」を示す。

[0089] 典型的なHCR反応をヘアピン核酸のドメインを用いて改めて説明する。miR-21が開始ヘアピン核酸のmiR-21結合ドメインに結合することで開始ヘアピン核酸のヘアピン構造（特にステム構造）が解離する（図2のステップ1（1））。すると、開始ヘアピン核酸の伸長ヘアピン結合ドメインと伸長ヘアピン核酸の開始ヘアピン結合ドメインがハイブリダイズ可能となる（図2のステップ2（2））。この2つのドメインがハイブリダイズすることで、伸長ヘアピン核酸のヘアピン構造（特にステム構造）が解離する（図2のステップ2）。すると、ステップ2と同様に、この伸長ヘアピン核酸のmiR-21ドメインと開始ヘアピン核酸のmiR-21結合ドメインがハイブリダイズ可能となる（図2のステップ3（3））。この反応が連鎖することによってハイブリダイゼーション

連鎖構造を有する直鎖状二本鎖核酸（HCR産物）が形成される（図2（4）及び（5））。

[0090] （3）ドメイン

ヘアピン核酸を構成する各ドメインの長さは特に限定しない。例えば、4塩基以上、5塩基以上、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塩基以上又は22塩基以上である。また、各ドメインは、例えば、55塩基以下、50塩基以下、40塩基以下、30塩基以下、25塩基以下、24塩基以下、又は23塩基以下である。

[0091] 各ドメインの塩基配列は、ハイブリダイズする対象の核酸にハイブリダイズ可能な塩基配列を含んでいれば特に限定しない。例えば、各ドメインは結合対象の核酸の塩基配列と無関係な1又は複数個の塩基を含むことができる。

[0092] （3-1）miR-21結合ドメイン及び開始ヘアピン結合ドメイン

上述の通り、開始ヘアピン核酸のmiR-21結合ドメイン及び伸長ヘアピン核酸の開始ヘアピン結合ドメインは、好ましくは、突出領域Xの全部、及びそれに続くステム領域Yの全部又は一部を含む。例えば、これらのドメインは、突出領域X、ステム領域Y及びループ領域Zの全部、及びステム領域Y'の一部を含む連続した領域であってもよいし、突出領域X及びステム領域Yの一部を含む連続した領域であってもよい。例えば、ステム領域の、miR-21又は開始ヘアピン核酸の伸長ヘアピン結合ドメインとハイブリダイズ可能な塩基配列は、2塩基以上、3塩基以上、4塩基以上、5塩基以上、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塩基以上又は16塩基以上である。

[0093] （3-2）伸長ヘアピン結合ドメイン及びmiR-21ドメイン

上述の通り、開始ヘアピン核酸の伸長ヘアピン結合ドメイン及び伸長ヘアピン核酸のmiR-21ドメインは、好ましくは、ステム領域Y'の全部又は一部を含む。例えば、これらのドメインは、ステム領域Yの一部、ループ領域Zの全

部及びステム領域Y'の全部を含む連続した領域であってもよいし、ステム領域Y'の一部のみを含む連続した領域であってもよい。また、ヘアピン核酸がステム領域Y'に隣接する突出末端を有する場合、その突出末端の全部又は一部を含んでもよい。具体的には、例えば、ステム領域Y'の、伸長ヘアピン核酸のmiR-21ドメイン又は開始ヘアピン核酸のmiR-21結合ドメインとハイブリダイズ可能な塩基配列は、4塩基以上、5塩基以上、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塩基以上又は16塩基以上である。

[0094] (4) ハイブリダイゼーション連鎖構造

本発明のヘアピン核酸は、miR-21の存在下でハイブリダイゼーション連鎖構造を有する直鎖状二本鎖核酸を形成する。ハイブリダイゼーション連鎖構造は、核酸免疫を誘導することができる。

[0095] ハイブリダイゼーション連鎖構造の具体的な構造は、核酸免疫を誘導することが可能な核酸の二本鎖構造であれば特に限定しない。例えば、ハイブリダイゼーション連鎖構造は、生体膜上又は細胞質中に存在するパターン認識受容体によって認識される病原体関連分子パターンを含む。

[0096] 生体膜上に存在する核酸を認識可能なパターン認識受容体としては、例えば、TLR3、TLR7、TLR8、及びTLR9等をはじめとするToll様受容体等が挙げられる。これらは、エンドソームやリソソームの生体膜上に存在し、細胞に侵入した核酸分子を認識する。

[0097] 細胞質中に存在する核酸を認識可能なパターン認識受容体としては、例えば、RIG-I様受容体（例えば、RIG-I、MDA5、LGP2等）、cGAS及びAIM2が挙げられる。

[0098] 各パターン認識受容体によって認識される病原体関連分子パターンは、当技術分野において公知である。例えば、TLR3は40塩基対以上の二本鎖RNAを認識することが知られ、TLR7及びTLR8はポリウラシル、又はグアニン及びウラシルに富む二本鎖RNAを認識すること等が知られている。また、TLR9は、5'-GTCGTT-3'等のシトシン及びグアニンに富む配列を含むメチル化されていない

一本鎖DNAを認識すること等が知られている。さらに、RIG-Iタンパク質は、平滑末端を含み、5'末端に三リン酸を有する二本鎖RNAを認識する等が知られている。加えて、AIM2タンパク質は二本鎖DNAを認識すること等が知られている。

[0099] ハイブリダイゼーション連鎖構造は、例えば、細胞質中に存在するパターン認識受容体によって認識される病原体関連分子パターンを有してもよく、二本鎖核酸（例えば、二本鎖DNA及び／又は二本鎖RNA）を認識するパターン認識受容体によって認識される病原体関連分子パターンを有してもよい。病原体関連分子パターンは、例えば、cGASに認識される二本鎖構造であってもよく、MDA5に認識される二本鎖構造であってもよい。

[0100] cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) は、環状GMP-AMP合成酵素である。cGASの例示的なアミノ酸配列は配列番号14に示される。外来の二本鎖核酸（例えば、ウイルス由来の核酸等）又は自己の異常な二本鎖核酸（例えば、老化細胞等における核から漏出した核酸等）に結合したcGASは、GTP及びATPから二次メッセンジャーである2'-5'-cGAMPを合成し、この2'-5'-cGAMPを介して下流のSTING (Stimulator of interferon genes) 経路を活性化する。活性化されたSTING経路は、細胞のアポトーシス等を誘導する。

[0101] cGASによって認識される核酸としては、クロマチン構造を構成しない長い二本鎖DNAや、対合していないグアノシンを含む末端を有する短い二本鎖DNA等が知られている。また、cGASによる免疫応答経路は、多量の核酸分子が細胞に侵入した場合や、酸化DNA分子が含まれる二本鎖核酸が侵入した場合に誘導されやすいこと等が知られている。

[0102] 例えば、ハイブリダイゼーション連鎖構造は特定の長さを有する。具体的には、形成されるHCR産物の長さの中央値が、例えば、100塩基対以上、150塩基対以上、200塩基対以上、250塩基対以上、300塩基対以上、350塩基対以上、400塩基対以上、450塩基対以上、500塩基対以上、又は550塩基対以上であればよい。500塩基対以上の二本鎖構造が一定量形成されることが好ましい。例えば、HCR産物の5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以

上、11%以上、12%以上、13%以上、14%以上、15%以上、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上、20%以上、21%以上、22%以上、23%以上、24%以上、又は25%以上が500塩基対以上の二本鎖構造をとる。

[0103] (5) 細胞死誘導組成物

本発明の細胞死誘導組成物を構成する各ヘアピン核酸は、DNA及び／又はRNAヌクレオチドで構成されてもよい。また、各ヘアピン核酸は、構成するヌクレオチドとして天然の及び／又は非天然のヌクレオチドを含むことができる。含まれる天然ヌクレオチド及び非天然ヌクレオチドの種類、数及び位置等は特に限定しない。

[0104] 「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したリン酸基を含む化合物をいう。「ヌクレオシド」は、塩基及び糖の組合せである。ヌクレオシドの核酸塩基（塩基としても知られる）部分は、通常は、複素環式塩基部分である。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドでは、リン酸基は、糖の2'、3'、又は5'ヒドロキシル部分に連結可能である。オリゴヌクレオチドは、互いに隣接するヌクレオシドの共有結合によって形成され、直鎖ポリマーオリゴヌクレオチドを形成する。オリゴヌクレオチド構造の内部で、リン酸基は、一般に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合を形成するとみなされている。

[0105] 本明細書において「天然ヌクレオチド」は、DNA中に見られるデオキシリボヌクレオチド及びRNA中に見られるリボヌクレオチドを含む。本明細書において、「デオキシリボヌクレオチド」及び「リボヌクレオチド」は、それぞれ、「DNAヌクレオチド」及び「RNAヌクレオチド」と称することもある。

[0106] 同様に、本明細書において「天然ヌクレオシド」は、DNA中に見られるデオキシリボヌクレオシド及びRNA中に見られるリボヌクレオシドを含む。本明細書において、「デオキシリボヌクレオシド」及び「リボヌクレオシド」は、それぞれ、「DNAヌクレオシド」及び「RNAヌクレオシド」と称することもある。

[0107] 「非天然ヌクレオチド」は、天然ヌクレオチド以外の任意のヌクレオチド

を指し、修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド模倣体を含む。同様に、本明細書において「非天然ヌクレオシド」は、天然ヌクレオシド以外の任意のヌクレオシドを指し、修飾ヌクレオシド及びヌクレオシド模倣体を含む。本明細書において「修飾ヌクレオチド」とは、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合、及び修飾核酸塩基のいずれか1つ以上を有するヌクレオチドを意味する。本明細書において「修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖部分及び／又は修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。非天然オリゴヌクレオチドを含む核酸は、例えば、細胞取り込みの強化、核酸標的への親和性の強化、ヌクレアーゼ存在下での安定性の増加、又は阻害活性の増加等の特性により、天然型よりも好ましい場合がある。

[0108] 本明細書において「修飾ヌクレオシド間結合」とは、天然に存在するヌクレオシド間結合（すなわち、ホスホジエステル結合）からの置換又は任意の変化を有するヌクレオシド間結合を指す。修飾ヌクレオシド間結合には、リン原子を含むヌクレオシド間結合、及びリン原子を含まないヌクレオシド間結合が含まれる。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合としては、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホトリエステル結合、メチルホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、及びホスホロアミデート結合が挙げられるが、これらに限定されない。ホスホロチオエート結合は、ホスホジエステル結合の非架橋酸素原子を硫黄原子に置換したヌクレオシド間結合を指す。リン含有及び非リン含有結合の調製方法は周知である。修飾ヌクレオシド間結合は、ヌクレアーゼ耐性が天然に存在するヌクレオシド間結合よりも高い結合であることが好ましい。

[0109] 本明細書において「修飾核酸塩基」又は「修飾塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシル以外のあらゆる核酸塩基を意味する。「非修飾核酸塩基」又は「非修飾塩基」（天然核酸塩基）とは、プリン塩基であるアデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）を意味する。修飾核酸塩基

の例としては、例えば、置換基を導入された塩基が挙げられる。置換基が導入される塩基の種類は特に限定しない。ピリミジン塩基及びプリン塩基のいずれであってもよい。また、置換基が導入される位置は特に限定しない。例えば、ピリミジン塩基であれば、3'位、4'位、5'位、6'位又はこれらの組合せであってよく、プリン塩基であれば、2'位、6'位、7'位、8'位又はこれらの組合せであってよい。具体的な修飾塩基としては、例えば、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-ホルミル化シトシン、5-カルボキシル化シトシン、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；2-アミノアデニン、N6-メチルアデニン、7-デアザアデニン、8-ハロアデニン、8-アミノアデニン、8-チオールアデニン、8-チオアルキルアデニン、8-ヒドロキシルアデニン又は8-ブロモアデニン；2-チオチミン；N2-メチルグアニン、6-メチルグアニン、7-デアザグアニン、7-メチルグアニン、8-ハログアニン、8-アミノグアニン、8-チオールグアニン、8-チオアルキルグアニン、8-ヒドロキシルグアニン又は8-ブロモグアニン；5-メチルウラシル、N3-メチルウラシル、6-メチルウラシル、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、5-ヒドロキシウラシル、シュードウラシル又はメチルシュードウラシル；ヒポキサンチン又はキサンチン；及びこれらの誘導体が挙げられるが、それに限定されない。

[0110] 本明細書において「修飾糖」とは、天然糖部分（すなわち、DNA (2'-H) 又はRNA (2'-OH) 中に認められる糖部分) からの置換及び／又は任意の変化を有する糖を指す。本明細書における核酸は、場合により、修飾糖を含む1つ以上の修飾ヌクレオシドを含んでもよい。糖修飾により、ヌクレアーゼ安定性の強化、結合親和性の増加、又は他の何らかの有益な生物学的特性が核酸に付与される場合がある。例えば、ヌクレオシドは、化学修飾リボフラノース環部分を含んでもよい。化学修飾リボフラノース環の例としては、限定するものではないが、置換基 (5' 及び2' 置換基を含む) の付加、非ジェミナル環原子の架橋形成による二環式核酸 (架橋核酸、BNA) の形成、リボシル環酸素原子のS、N(R)、又はC(R₁)(R₂) (R、R₁及びR₂は、それぞれ独立して、H、C₁-C₁₂

アルキル、又は保護基を表す)での置換、及びそれらの組合せ等が挙げられる。

[0111] 本明細書において、修飾糖部分を有するヌクレオシドの例としては、限定するものではないが、5'-ビニル、5'-メチル、4'-S、2'-F (2'-フルオロ基)、2'-OCH₃ (2'-OMe基若しくは2'-O-メチル基)、及び2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。2'位の置換基はまた、アリル、アミノ、アジド、チオ、-O-アリル、-O-C₁-C₁₀アルキル、-OCF₃、-O(CH₂)₂SCH₃、-O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、及び-O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)から選択することができ、各R_m及びR_nは、独立して、H又は置換若しくは非置換C₁-C₁₀アルキルである。本明細書において「2'-修飾糖」は、2'位で修飾されたフラノシル糖を意味する。

[0112] 本明細書で使用する際、「二環式ヌクレオシド」は、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドを指す。二環式糖部分を含む核酸は、一般に架橋核酸 (bridged nucleic acid、BNA) と称される。本明細書において、二環式糖部分を含むヌクレオシドは、「架橋ヌクレオシド」と称することもある。

[0113] 二環式糖は、2'位の炭素原子及び4'位の炭素原子が2つ以上の原子によって架橋されている糖であってよい。二環式糖の例は当業者に公知である。二環式糖を含む核酸 (BNA) の1つのサブグループは、4'-(CH₂)_p-O-2'、4'-(CH₂)_p-CH₂-2'、4'-(CH₂)_p-S-2'、4'-(CH₂)_p-OCO-2'、4'-(CH₂)_n-N(R₃)-O-(CH₂)_m-2' [式中、p、m及びnは、それぞれ1~4の整数、0~2の整数、及び1~3の整数を表し；またR₃は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、及びユニット置換基 (蛍光若しくは化学発光標識分子、核酸切断活性を有する機能性基、細胞内又は核内局在化シグナルペプチド等)を表す]により架橋された2'位の炭素原子と4'位の炭素原子を有するものである。また、BNAの3'位の炭素原子上のOR₂置換基及び5'位の炭素原子上のOR₁置換基に関し、R₁及びR₂は、典型的には水素原子であるが、その他任意の置換基であってもよい。例えば、それぞれの置換基は互いに同一であっても異なってもよい。具体的なR₁及びR₂としては、例えば、それぞれ独立に、核酸合成のためのヒドロキシル基の保護基、アルキ

ル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成のための保護基によって保護されているリン酸基、又は $-P(R_4)R_5$ [ここで、 R_4 及び R_5 は、互いに同一であっても異なってもよく、それぞれヒドロキシル基、核酸合成のための保護基によって保護されているヒドロキシル基、メルカプト基、核酸合成のための保護基によって保護されているメルカプト基、アミノ基、1~5個の炭素原子を有するアルコキシ基、1~5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、1~6個の炭素原子を有するシアノアルコキシ基、又は1~5個の炭素原子を有するアルキル基で置換されているアミノ基を表す] 等が挙げられる。このようなBNAの非限定的な例としては、メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA (LNA (Locked Nucleic Acid(登録商標))、2',4'-BNAとしても知られている)、例えば、 α -L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA若しくは β -D-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA、エチレンオキシ(4'-(CH₂)₂-O-2')BNA (ENAとしても知られている)、 β -D-チオ(4'-CH₂-S-2')BNA、アミノオキシ(4'-CH₂-O-N(R₃)-2')BNA、オキシアミノ(4'-CH₂-N(R₃)-O-2')BNA (2',4'-BNA^{NC}としても知られている)、2',4'-BNA^{COO}、3'-アミノ-2',4'-BNA、5'-メチルBNA、(4'-CH(CH₃)-O-2')BNA (cEt BNAとしても知られている)、(4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2')BNA (cMOE BNAとしても知られている)、アミドBNA(4'-C(O)-N(R)-2')BNA(R=H、Me) (AmNAとしても知られている)、2'-O,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋型核酸 (scpBNAとしても知られている) 及び当業者に公知の他のBNAが挙げられる。

[0114] 修飾糖の調製方法は、当業者に周知である。修飾糖部分を有するヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分(天然、修飾、又はそれらの組合せ)は、適切な核酸標的とのハイブリダイゼーションのために維持されてよい。

[0115] 本明細書における「ヌクレオシド模倣体」は、オリゴマー化合物の1つ以上の位置において糖、糖及び塩基、又は糖、塩基及び結合を置換するために使用される構造体を含む。ヌクレオシド模倣体としては、例えば、モルホリノ、シクロヘキセニル、シクロヘキシル、テトラヒドロピラニル、二環式又は三環式糖模倣体、例えば、非フラノース糖単位を有するヌクレオシド模倣体

が挙げられる。「ヌクレオチド模倣体」は、オリゴマー化合物の1つ以上の位置において、ヌクレオシド及び結合を置換するために使用される構造体を含む。ヌクレオチド模倣体としては、例えば、ペプチド核酸又はモルホリノ核酸 ($-N(H)-C(=O)-O-$ 又は他の非ホスホジエステル結合によって結合されるモルホリノ) が挙げられる。ペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid、PNA) は、糖の代わりにN-(2-アミノエチル)グリシンがアミド結合で結合した主鎖を有するヌクレオチド模倣体である。「模倣体」とは、糖、核酸塩基、及び／又はヌクレオシド間結合を置換する基を指す。一般に、模倣体は、糖又は糖-ヌクレオシド間結合の組合せの代わりに使用され、核酸塩基は、選択される標的に対するハイブリダイゼーションのために維持される。

[0116] 修飾の具体的な態様は特に限定しない。例えば、同一核酸分子中のヌクレオチドに独立して異なる修飾を行うことができる。また、例えば、1つのヌクレオチドにおいて複数種類の修飾がなされていてもよい。例えば、酵素的切断に対する抵抗性を与える等の目的で、ヌクレオチドに、修飾ヌクレオシド間結合 (例えば、ホスホロチオエート結合) 及び修飾糖 (例えば、2'-O-メチル修飾糖又は二環式糖) を含めることができる。また、例えば、修飾核酸塩基 (例えば、5-メチルシトシン) 及び修飾糖 (例えば、2'-O-メチル修飾糖又は二環式糖) を含めることができる。また、例えば、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸のうち1種類以上が全長にわたって天然ヌクレオシド及び非修飾ヌクレオチドを含まない。また、例えば、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸のうち1種類以上に含まれる非天然ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドは全長の半数以下である。また、例えば、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸の両方が天然ヌクレオシド及び非修飾ヌクレオチドを含まない。あるいは、例えば、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸のうち1種類以上において、突出領域Xに含まれるヌクレオチドを全て非天然ヌクレオシド及び／又は修飾ヌクレオチドとしてもよく、突出領域Xとステム領域Yを連結するヌクレオシド間結合を修飾ヌクレオシド間結合としてもよい。

[0117] 修飾の選択は、当業者であれば、核酸医薬に関連する文献 (例えば、WO 20

07/143315等)の説明等を参照することによって好適な実施形態を決定することができる。また、修飾の目的は特に限定しない。例えば、ヘアピン核酸及びHCR産物の、安定化、検出及び薬理機能の発揮のために修飾を行うことができる。

[0118] 細胞死誘導組成物を構成する開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸は複数種類のヘアピン核酸を含んでいてもよい。

[0119] 本明細書における核酸分子は、任意の方法により作成することができる。例えば、化学的合成法により（例えば自動合成装置を使用して）、又は酵素的工程（例えば、限定するものではないが、ポリメラーゼ、リガーゼ、又は制限酵素反応）により、全体的に又は部分的に作製することができる。

[0120] 本発明の細胞死誘導組成物は細胞死の誘導を目的としている。したがって、有効成分として、上述のヘアピン核酸以外に細胞死の誘導が可能な有効成分を1以上含むことができる。具体的な有効成分としては、例えば、細胞死を誘導する化合物、遺伝子の発現促進又は発現抑制に基づく薬剤やタンパク質レベルでの機能促進又は機能阻害に基づく薬剤等が挙げられる。

[0121] 本発明の細胞死誘導組成物は、HCR産物を含む細胞のみにおいて細胞死が誘導される必要はない。例えば、ハイブリダイゼーション連鎖構造がcGASに認識される構造である場合、cGASによって合成された二次メッセンジャーである2'-5'-cGAMPは、ギャップ結合を通じて隣接する細胞等に移動し、それらの細胞においても細胞死が誘導される場合がある。また、例えば、HCR産物を含む細胞の細胞死に伴い、免疫応答を誘導することができる。この免疫応答により、HCR産物を含まない同様の異常を有する細胞において、二次的に細胞死（例えば、免疫原性細胞死（Immunogenic cell death））を促進することができる。

[0122] したがって、本明細書における細胞死誘導組成物は、miR-21を発現し、かつcGAS等のパターン認識受容体を発現する細胞において細胞死を誘導するのに加え、miR-21を発現するその他の細胞においても細胞死を誘導することができる。

[0123] 2. 医薬組成物

2-1. 概要

本発明の第2の態様は医薬組成物である。本発明の医薬組成物は、第1態様に記載の細胞死誘導組成物を有効成分として含み、miR-21を含む目的の部位においてHCR反応を誘導する。本発明の医薬組成物を使用することで、目的の部位において、miR-21発現細胞特異的に細胞死を誘導することができる。

[0124] 2-2. 構成

本態様の医薬組成物の構成成分について説明する。本発明の医薬組成物は、必須の構成成分である有効成分の他に、任意選択可能な構成成分として担体を含む。以下、各構成成分について具体的に説明をする。

[0125] (1) 有効成分

本発明の医薬組成物は、必須の有効成分として第1態様に記載の細胞死誘導組成物を有効量含む。細胞死誘導組成物の構成については第1態様で詳述していることから、ここでの具体的な説明は省略する。本医薬組成物によって達成する所望の効果に応じて、他に1以上の有効成分を含むことができる。

[0126] 「有効量」とは、細胞死誘導組成物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被験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、被験体の情報、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をはじめとする投与者の判断によって決定される。

[0127] 例えば、ハイブリダイゼーション連鎖構造がcGASに認識される構造を含む場合、cGASを活性化するのに十分な量のハイブリダイゼーション連鎖構造が細胞中に形成されるように有効量を決定することができる。特に限定しないが、具体的には、例えば、標的細胞中における核酸の量が、0.01nM~20nM、0.05nM~15nM、0.08nM~12nM、0.09nM~11nM、0.1nM~10nM、0.11nM~10nM、0.2nM~10nM、0.5nM~10nM、0.8nM~10nM、0.9nM~10nM、1nM~10nM、2nM~10nM、5nM~10nM、0.1nM~9nM、0.1nM~8nM、0.1nM~6nM、0.1nM~5nM、0.1nM~3nM、0.1nM~2nM、0.1nM~1nM、0.2nM~0.9nM、又は0.3nM~0.8nMとなるよ

うにすることができる。また、例えば、各ヘアピン核酸の濃度が細胞内のmiR-21の濃度の1.5倍以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、5倍以上、5.5倍以上、6倍以上、6.5倍以上、7倍以上、7.5倍以上、8倍以上、8.5倍以上、9倍以上、9.5倍以上、10倍以上となるようにすることができる。各ヘアピン核酸の濃度は同一でもよいし、異なってもよい。

[0128] 本明細書において「被験体」とは、本発明の細胞死誘導組成物及び医薬組成物を適用する対象をいう。被験体は、個体の他、器官、組織、及び細胞を含む。被験体が個体の場合、ヒトを含むあらゆる動物が該当し得る。例えば、ヒト以外では、様々な家畜、家禽、ペット、実験動物等が挙げられる。限定はしないが、被験体は、タンパク質の発現異常又は異常な細胞を有する個体や、疾患の治療又は予防が必要な個体であってもよい。

[0129] 本明細書において「被験体の情報」とは、適用する生体の様々な個体情報である。例えば、被験体がヒトであれば、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。

[0130] 本発明の医薬組成物は、有効成分であるヘアピン核酸が有する薬理効果を失わない範囲において、他の有効成分を包含する、いわゆる複合製剤であってもよい。ここでいう「他の有効成分」とは、例えば、miR-21発現細胞を標的とし、かつ第1態様の細胞死誘導組成物とは異なる作用機序でその細胞死を誘導する薬剤等が挙げられる。また、他の有効成分は、第1態様の細胞死誘導組成物とは異なる薬理作用を有する薬剤であってもよい。例えば、抗生物質等が挙げられる。

[0131] (2) 担体

本発明の医薬組成物は、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、香料、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、鎮静剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、増粘剤、溶解助剤、及

び他の添加剤が挙げられる。

[0132] 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（例えば、植物性油等）等の任意の溶媒が含まれる。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。

[0133] 上記担体は、有効成分である細胞死誘導組成物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。

[0134] (3) 剤形

本発明の医薬組成物の剤形は、有効成分である第1態様に記載の細胞死誘導組成物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を発揮し得る形態であれば特に限定しない。

[0135] 具体的な剤形は、投与形態及び／又は処方条件によって異なる。本発明の医薬組成物の投与形態は、経口投与と非経口投与に大別することができる。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調節剤等と適宜組み合わせ、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 (cataplasma)、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。

[0136] 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。

[0137] 本発明の細胞死誘導組成物は、水、日本薬局方溶出試験第2液、又は日本薬局方崩壊試験第2液に対する溶解性に優れ、体内動態（例、血中薬物半減期、脳内移行性、代謝安定性、CYP阻害）に優れ、毒性が低く（例えば、急性毒性、慢性毒性、遺伝毒性、生殖毒性、心毒性、薬物相互作用、がん原性、光毒性等の点から医薬として、より優れている）、かつ副作用も少ない（例えば、過沈静（sedation）の抑制、層状壊死の回避）等の医薬品として優れた性質も有する。

[0138] （4）投与形態及び投与量

本明細書において、本発明の医薬組成物の好ましい投与形態には特定の限定はない。例えば、経口投与又は非経口投与であればよい。通常は非経口投与で使用される。

[0139] 非経口投与の具体例として、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、腫瘍内投与、腫瘍近傍投与（例えば、腫瘍近傍における皮内投与又は皮下投与）、脳室内投与、髄腔内投与、経鼻投与、及び筋肉内投与が挙げられる。投与は、筋肉内注射投与、静脈内点滴投与、又は埋め込み型持続皮下投与により行ってもよい。皮下投与には、患者自身による自己注射等も含まれる。

[0140] 本発明の医薬組成物は反復投与でも細胞内において抑制効果が相加的に働く。また、反復投与する場合、ある程度の投与間隔（例えば、半日以上）をおいた方が有効性を向上させることができる。

[0141] （5）適用対象疾患

本発明の医薬組成物の適用対象となる疾患は、miR-21が高発現する疾患であれば特に限定しないが、典型的には悪性腫瘍（がん）や炎症性疾患である。

[0142] 本明細書における悪性腫瘍（がん）には、例えば、乳がん、大腸がん、膵臓がん、肺がん、前立腺がん、肝臓がん、胃がん、脳腫瘍、甲状腺がん、口

腔がん、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、膠芽腫、食道がん、肝細胞がん、神経膠腫、子宮頸がん、膀胱がん、喉頭がん、膵管腺がん、頭頸部扁平上皮がん、口腔扁平上皮がん、卵巣がん、胆管がん、腎細胞がん、皮膚がん、子宮内膜がん、胆管がん、腎臓がん、悪性黒色腫、直腸がん等が含まれる。本明細書におけるがんには、それらの転移後の病態を含む。

[0143] 例えば、がんを適用疾患とする場合、本態様の医薬組成物と同様の構成により、本発明の細胞死誘導組成物を有効成分として含む抗がん剤とすることができる。

[0144] 本発明の抗がん剤は任意で他の抗がん剤を追加で含むことができる。

[0145] また例えば、炎症性疾患を適用疾患とする場合、本態様の医薬組成物と同様の構成により、本発明の細胞死誘導組成物を有効成分として含む抗炎症剤とすることができる。

[0146] 本明細書において「炎症性疾患」とは、組織における高レベルの炎症又は変性を特徴とする疾患をいう。特に、本明細書における炎症性疾患は、慢性炎症性疾患及び急性炎症性疾患のいずれも含む。具体的な炎症性疾患としては、例えば、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、関節炎等が挙げられる。

実施例

[0147] <実施例 1：無細胞系によるHCR効率の評価>

(目的)

無細胞系の実験系において、ヘアピン核酸の構造とHCR効率との関係を調べる。

[0148] (方法)

1. ヘアピン核酸の設計

miR-21 (配列番号 1) を標的RNAとした3種類のヘアピン核酸セットをオンラインソフトウェアNUPACK (<http://www.nupack.org/>) を用いて設計した。各ヘアピン核酸の塩基配列を表 2 に示す。

[0149]

[表2]

表 2: 実施例1において使用したヘアピン核酸の配列

核酸名	配列 (5'→3')	配列番号
HP-o(1)	<u>T[^]C[^]A[^]A[^]C[^]A[^]T[^]C[^]</u> AGTCTGATAAGCTAGGGACTTTCCTAGCTTATCAGACT	8
HP-o(2)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAAGTCTGATAAGCTA [^] G [^] G [^] A [^] A [^] A [^] G [^] T [^] C [^] C [^]	9
HP-a(1)	<u>T[^]C[^]A[^]A[^]C[^]A[^]T[^]C[^]A[^]</u> GTCTGATAAGCTACCCCTGAAAAATAGCTTATCAGAC	10
HP-a(2)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAGTCTGATAAGCTA [^] T [^] T [^] T [^] T [^] C [^] A [^] G [^] G [^] G [^]	11
HP-b(1)	<u>T[^]C[^]A[^]A[^]C[^]A[^]T[^]C[^]</u> AGTCTGATAAGCTAAGTCAGTCTAGCTTATCAGACT	12
HP-b(2)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAAGTCTGATAAGCTA [^] G [^] A [^] C [^] T [^] G [^] A [^] C [^] T [^]	13

^: ホスホロチオエート、下線: 突出領域 X、太字: ステム領域 Y

[0150] 2. HCR効率の評価

各ヘアピン核酸セットについて、開始ヘアピン核酸 (HP(1)) 及び伸長ヘアピン核酸 (HP(2)) をそれぞれ500nMの濃度で含む100 μLのTE緩衝溶液 (500mMのNaCl及び1.25mMのMgCl₂を含む) にmiR-21を終濃度50nMで添加し、その混合液を37°Cで2時間インキュベートした。コントロールとしては、miR-21を添加しない混合液を用いた。5%ポリアクリルアミドゲルを用いてネイティブPAGE (非変性PAGE) で分析し、SYBR™Gold (Invitrogen社) を用いた15分間の染色の後に、Gel Doc EZ Imager (BioRad社) を用いて可視化した。

[0151] (結果)

結果を図3に示す。

評価した3種類のヘアピン核酸セットのいずれにおいても、HCRが誘導された。いずれも、miR-21を添加しなかった場合は単量体のヘアピン核酸分子が多く存在し、miR-21の添加によって、単量体は顕著に減少し、分子量の大きなHCR産物が観察された。HP-a及びHP-bのヘアピン核酸セットは、比較対象のヘアピン核酸セット (HP-o) と比較して、miR-21が存在する条件において、単量体の量がより顕著に減少し、より多くのHCR産物が形成された。このことから、HP-a及びHP-bのヘアピン核酸セットはHCR産物の形成効率が顕著に高いことが示唆された。

[0152] <実施例2：無細胞系によるHCR効率の評価 (2)>

(目的)

無細胞系の実験系において、ヘアピン核酸の構造とHCR効率との関係を探る。

[0153] (方法)

実施例 1 と同様に、以下の表 3 に示す配列を有するヘアピン核酸を設計した。

[0154] [表3]

表 3: 実施例 2 において使用したヘアピン核酸の配列

核酸名	配列 (5'→3')	配列番号
HP-c(1)	<u>T[^]C[^]A[^]A[^]C[^]A[^]T[^]C[^]A[^]</u> GTCTGATAAGCTAAGTCAGTCATAGCTTATCAGAC	19
HP-c(2)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAGTCTGATAAGCTA [^] T [^] G [^] A [^] C [^] T [^] G [^] A [^] C [^] T [^]	20
HP-d(1)	<u>T[^]C[^]A[^]A[^]C[^]A[^]T[^]C[^]A[^]</u> AGTCTGATAAGCTAGACTGACTTAGCTTATCAGACT	21
HP-d(2)	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAAGTCTGATAAGCTA [^] A [^] G [^] T [^] C [^] A [^] G [^] T [^] C [^]	22

^: ホスホロチオエート、下線: 突出領域 X、太字: ステム領域 Y

[0155] HCR 効率の評価は以下の通り行った。

各ヘアピン核酸セットについて、HP(1) 及び HP(2) をそれぞれ 1 μM の濃度で含む TE 緩衝溶液に miR-21 を終濃度 0.1 μM で添加し、その混合液を室温で静置した。コントロールとしては、miR-21 を添加しない混合液を用いた。静置後に反応溶液を 1% アガロースゲル電気泳動によって分析した。ゲルの染色には GelRed (Biotium 社) を用いた。

[0156] (結果)

結果を図 4 に示す。

実施例 1 と同様に、本実施例で評価した 2 種類のヘアピン核酸セットのいずれにおいても、miR-21 の存在下で特異的に HCR が誘導された。

[0157] <実施例 3 : HCR による細胞死促進効率の評価>

(目的)

ヒト細胞中での HCR により細胞死が促進されることを確認し、その効率を調べた。

[0158] (方法)

1.0×10⁵個のHeLa細胞を、96wellのマルチウェルプレートに播種し、200μLの10%FBS及び0.5%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有するDMEM溶液中で約90%コンフルエントになるまで培養した。

[0159] 表3に示す2種類のヘアピン核酸のセットにおいて、HP(1)及びHP(2)を0μg/μL又は0.5μg/μLの濃度で含む、50μLのOPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific社)、1μLのLipofectamine Plus Reagent (Thermo Fisher Scientific社)の混合溶液に、Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific社)及び50μLのOPTI-MEMを添加し、室温で静置した。

[0160] その後、反応溶液をディッシュに添加し、2時間後に200μLの10%FBS及び0.5%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有するDMEM溶液に培地交換した。24時間後、培地を100μLの9%FBS、0.45%ペニシリン-ストレプトマイシン及び10%プレストブルー (Invitrogen社)を含有するDMEM溶液に培地交換した。

[0161] 細胞死の検出は、プレストブルーの蛍光を測定することで行った。相対細胞生存率は、ヘアピン核酸としてスクランブル配列を有するヘアピン核酸を導入した場合の細胞生存率を100%とした相対値として算出した。実験は、3回反復で行った。

[0162] (結果)

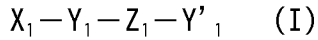
結果を図5に示す。

miR-21を発現するHeLa細胞ではヘアピン核酸の導入により細胞生存率が顕著に減少し、ヘアピン核酸の導入によって、標的RNAが存在する細胞特異的にHCRを介して細胞死を促進できることがわかった。また、細胞死の誘導効率は顕著に高かった。

[0163] 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] miR-21を発現する細胞において特異的に細胞死を誘導する、一般式 (I) で表される構造を含む開始ヘアピン核酸及び一般式 (II) で表される構造を含む伸長ヘアピン核酸からなる一組のヘアピン核酸を含む細胞死誘導組成物。



(式中、

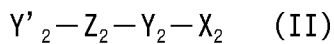
X_1 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_1 及び Y'_1 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

Z_1 は、7~12塩基のCG配列及びGGG配列を含まない配列からなるループ領域であり、

X_1 の全部、及び Y_1 の全部又は一部は、miR-21の塩基配列の全部又は一部とハイブリダイズ可能なmiR-21結合ドメインを構成し、

Y'_1 の全部又は一部は、miR-21の全部又は一部とハイブリダイズ可能な伸長ヘアピン結合ドメインを構成する)



(式中、

X_2 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_2 及び Y'_2 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

Z_2 は、7~12塩基の配列からなるループ領域であり、

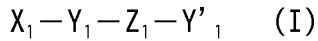
Y'_2 の全部又は一部は、miR-21ドメインを構成し、

Y_2 の全部、及び X_2 の全部又は一部は、伸長ヘアピン結合ドメインの全部又は一部とハイブリダイズ可能な開始ヘアピン結合ドメインmiR-21ドメインを構成する)

[請求項2] 前記式 (I) 及び前記式 (II) において、左が5'末端である、請求項1に記載の細胞死誘導組成物。

- [請求項3] 前記miR-21結合ドメインは配列番号2で表される塩基配列を含み、前記miR-21ドメインは配列番号3で表される塩基配列を含む、請求項1又は2に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項4] 前記開始ヘアピン核酸が、哺乳動物の生理学的条件下において、miR-21存在下で一本鎖構造を形成する、請求項1に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項5] 前記Z₁のGC含有率が40%以上60%以下である、請求項1に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項6] 前記Z₁のプリン塩基の含有率が40%以上60%以下である、請求項1に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項7] 前記ヘアピン核酸が、DNA及び／又はRNAヌクレオチドで構成される、請求項1に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項8] 修飾ヌクレオチド及び／又は非天然ヌクレオチドを1つ以上含む、請求項1に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項9] 前記修飾ヌクレオチド又は前記非天然ヌクレオチドが、置換基が導入された塩基を含む、請求項8に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項10] 前記修飾ヌクレオチド又は前記非天然ヌクレオチドが、修飾ヌクレオチド間結合を含む、請求項8又は9に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項11] 請求項1に記載の細胞死誘導組成物を有効成分として含む、医薬組成物。
- [請求項12] がん又は炎症性疾患を予防又は治療するための、請求項11に記載の医薬組成物。
- [請求項13] 前記がんが、乳がん、大腸がん、膵臓がん、肺がん、前立腺がん、肝臓がん、胃がん、脳腫瘍、甲状腺がん、口腔がん、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病及び膠芽腫からなる群から選択される一以上のがんである、請求項12に記載の医薬組成物。
- [請求項14] miR-21を発現する細胞を含むがんを予防又は治療するための、一般式(I)で表される構造を含む開始ヘアピン核酸及び一般式(II)で

表される構造を含む伸長ヘアピン核酸からなる一組のヘアピン核酸を含む抗がん剤。



(式中、

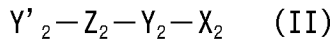
X_1 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_1 及び Y'_1 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

Z_1 は、7~12塩基のCG配列及びGGG配列を含まない配列からなるループ領域であり、

X_1 の全部、及び Y_1 の全部又は一部は、miR-21の塩基配列の全部又は一部とハイブリダイズ可能なmiR-21結合ドメインを構成し、

Y'_1 の全部又は一部は、miR-21の全部又は一部とハイブリダイズ可能な伸長ヘアピン結合ドメインを構成する)



(式中、

X_2 は、4~20塩基の配列からなる突出領域であり、

Y_2 及び Y'_2 は、分子内で互いにハイブリダイズ可能な10~20塩基の配列からなるステム領域であり、

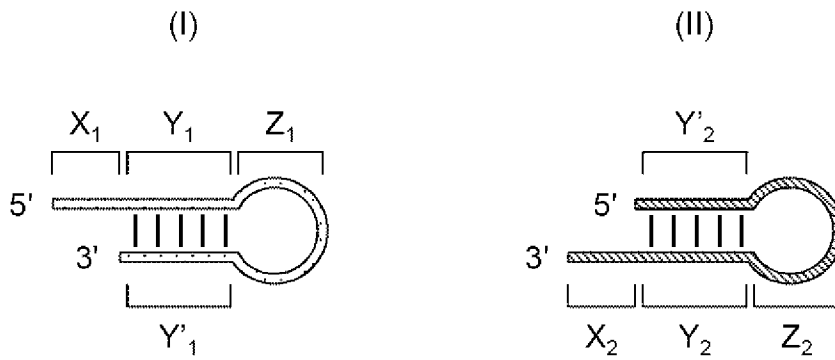
Z_2 は、7~12塩基の配列からなるループ領域であり、

Y'_2 の全部又は一部は、miR-21ドメインを構成し、

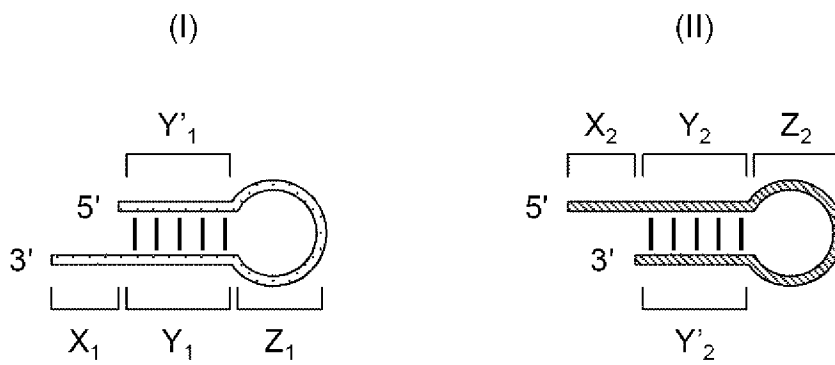
Y_2 の全部、及び X_2 の全部又は一部は、伸長ヘアピン結合ドメインの全部又は一部とハイブリダイズ可能な開始ヘアピン結合ドメインmiR-21ドメインを構成する)

[図1]

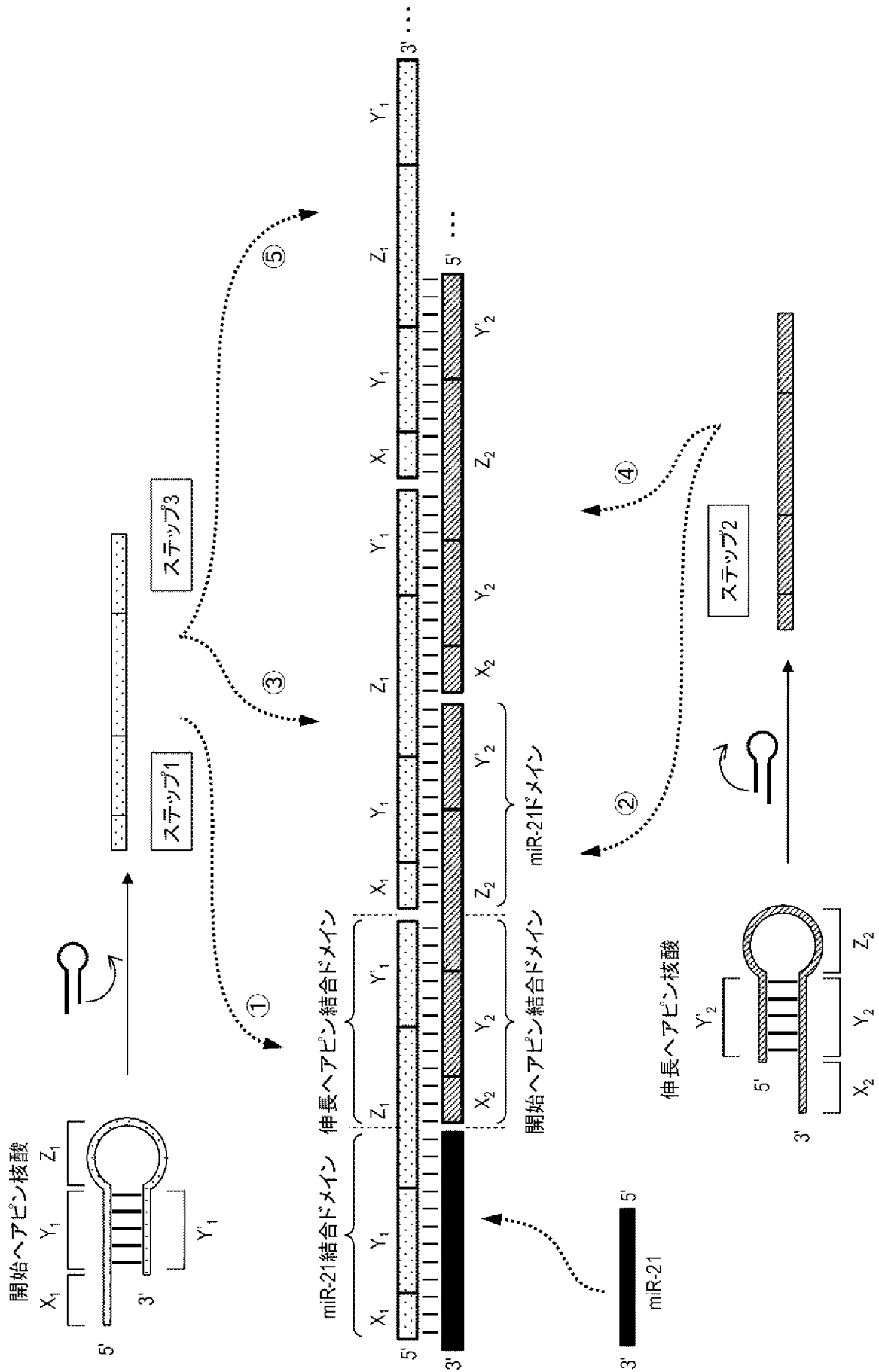
A



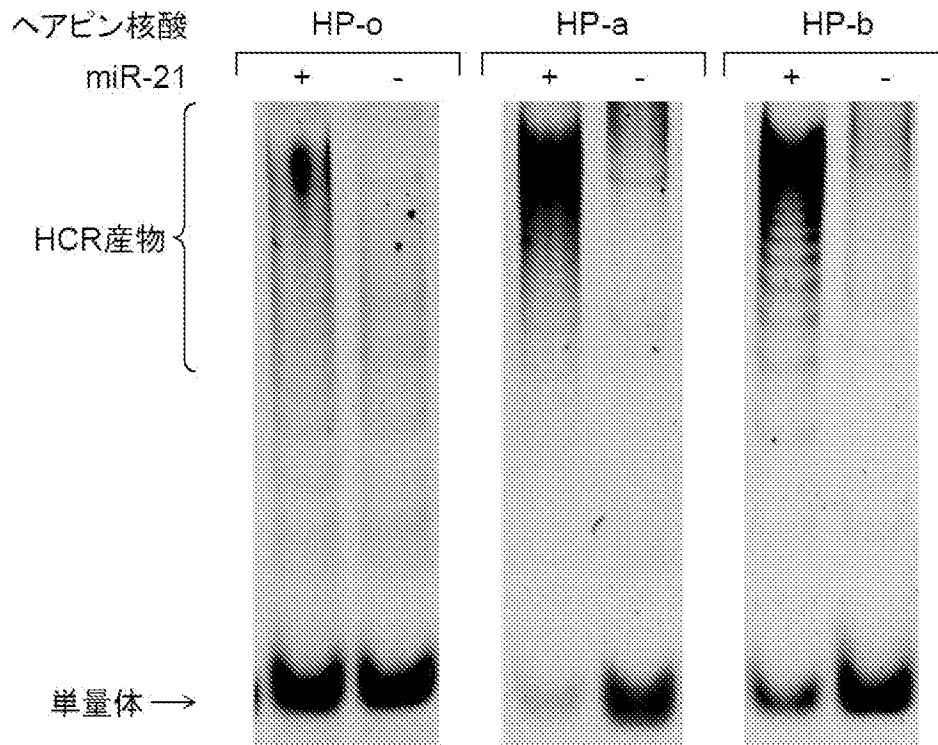
B



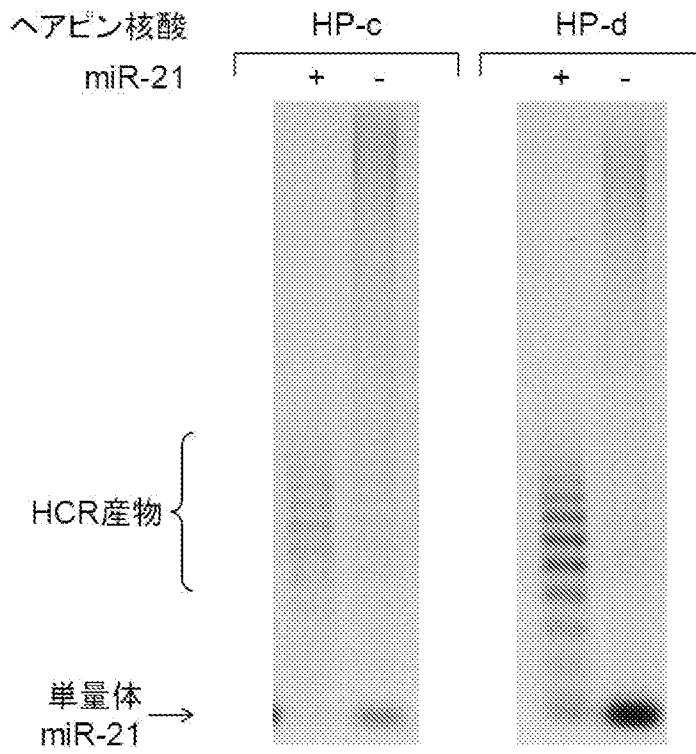
[図2]



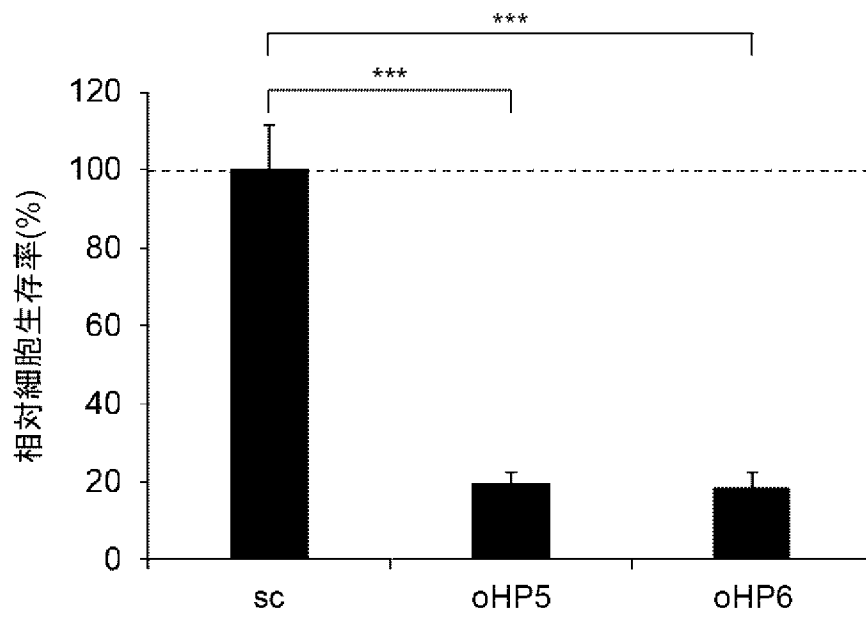
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/045425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>C12N 15/11(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i FI: C12N15/11 Z ZNA; A61P35/00; A61P35/02; A61K31/7088; A61K48/00; A61P29/00</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) C12N15/00-15/90; A61K31/7088; A61K48/00; A61P29/00; A61P35/00; A61P35/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
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.
Y	森廣邦彦, DNAナノテクノロジーを駆使したマイクロRNA応答型デコイ核酸医薬の創製, 第49集 倉田奨励金研究報告書, [online], received no. 1384, 2020, [retrieved on 05 September 2022], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.hitachi-zaidan.org/activities/kurata/reseach-report49.html >, (MORIHIRO, Kunihiko, MicroRNA-responsive DNA decoy therapeutics based on DNA nanotechnology), non-official translation (Kurata Scholarship Research Report vol. 49) entire text	1-14
Y	大住拓輝, マイクロRNA応答型デコイ核酸多重構築システム, 第20回東京大学生命科学シンポジウム ポスター発表の要旨, [online], poster no. 057, 2020, [retrieved on 17 March 2021], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.todaibio.info/ >, (OSUMI, Hiraki, Multiple decoy construction system responding to microRNA), non-official translation (The 20th Life Science Symposium in The University of Tokyo, Abstract of poster presentation) entire text	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 04 March 2024		Date of mailing of the international search report 19 March 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/045425

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0313030 A1 (DIRKS, Robert et al.) 22 December 2011 (2011-12-22) claims 17-18, paragraphs [0037], [0064], example 3	1-14
X	MORIHIRO, Kunihiko et al., Oncolytic Hairpin DNA Pair: Selective Cytotoxic Inducer through MicroRNA-Triggered DNA Self-Assembly, J. Am. Chem. Soc., 2023, vol. 145, pages 135-142, Published online: 20 December 2022 abstract, page 136, left column, line 27 to page 137, left column, line 3, page 137, right column, line 9 to page 139, left column, line 25, fig. 1-2, 4-5	1-14
P, X	WO 2023/013329 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 09 February 2023 (2023-02-09) entire text	1-14
E, X	WO 2024/005045 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 04 January 2024 (2024-01-04) entire text	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/045425

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.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2023/045425

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2011/0313030	A1	22 December 2011	US 2007/0087334 A1 WO 2007/044727 A2 EP 1931806 A2	
WO	2023/013329	A1	09 February 2023	(Family: none)	
WO	2024/005045	A1	04 January 2024	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/11(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i FI: C12N15/11 Z ZNA; A61P35/00; A61P35/02; A61K31/7088; A61K48/00; A61P29/00</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）） C12N15/00-15/90; A61K31/7088; A61K48/00; A61P29/00; A61P35/00; A61P35/02</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 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2024年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2024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 - 2024年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年									
<p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
Y	森廣 邦彦, DNAナノテクノロジーを駆使したマイクロRNA応答型デコイ核酸医薬の創製, 第49集 倉田奨励金研究報告書, [オンライン], 受領No.1384, 2020, [retrieved on 2022.09.05], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.hitachi-zaidan.org/activities/kurata/reseach-report49.html> 全文	1-14								
Y	大住 拓輝, マイクロRNA応答型デコイ核酸多重構築システム, 第20回東京大学生命科学シンポジウム ポスター発表の要旨, [オンライン], ポスターNo. 057, 2020, [retrieved on 2021.03.17], Retrieved from the Internet: <URL:http://www.todaibio.info/> 全文	1-14								
Y	US 2011/0313030 A1 (DIRKS, Robert et al.) 22.12.2011 (2011-12-22) 請求項17-18、[0037]、[0064]、実施例3	1-14								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" 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 “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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 “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</p>										
国際調査を完了した日	04.03.2024	国際調査報告の発送日 19.03.2024								
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 西 賢二 4B 5803 電話番号 03-3581-1101 内線 3488									

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	MORIHITO, Kunihiko et al., Oncolytic Hairpin DNA Pair: Selective Cytotoxic Inducer through MicroRNA-Triggered DNA Self-Assembly, J. Am. Chem. Soc., 2023, Vol. 145, pp. 135-142, Published online: Dec 20, 2022 要約、第136頁左欄第27行-第137頁左欄第3行、第137頁右欄第9行-第139頁左欄第25行、図1-2、4-5	1-14
P, X	WO 2023/013329 A1 (国立大学法人東京大学) 09.02.2023 (2023 - 02 - 09) 全文	1-14
E, X	WO 2024/005045 A1 (国立大学法人東京大学) 04.01.2024 (2024 - 01 - 04) 全文	1-14

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
 - b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. 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、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/045425

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2011/0313030 A1	22.12.2011	US 2007/0087334 A1	
		WO 2007/044727 A2	
		EP 1931806 A2	
-----	-----	-----	-----
WO 2023/013329 A1	09.02.2023	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
WO 2024/005045 A1	04.01.2024	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----