

(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)

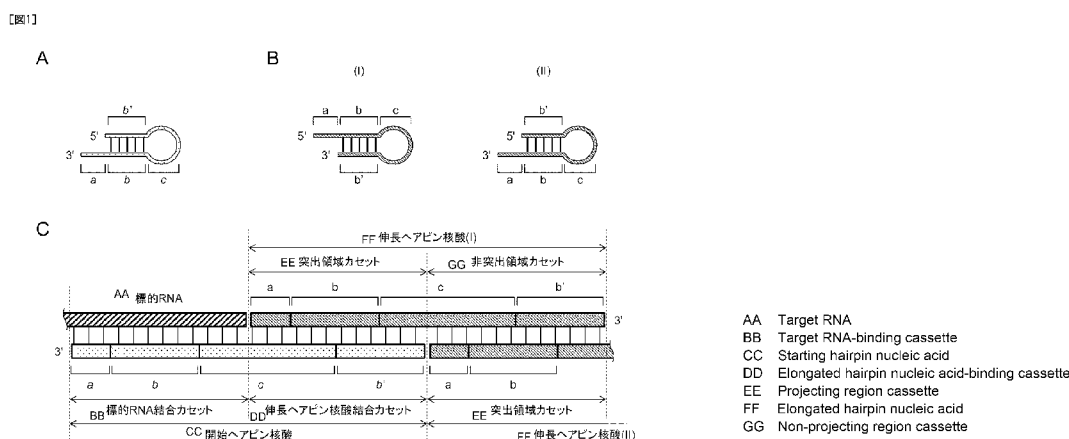


(10) 国際公開番号
WO 2023/013329 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/713 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/026323
- (22) 国際出願日: 2022年6月30日(30.06.2022)
- (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 2021-128492 2021年8月4日(04.08.2021) 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).
- (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 (MORIHIRO 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).
- (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 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, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP,

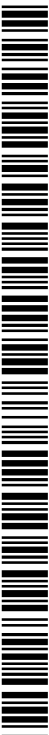
(54) Title: HAIRPIN NUCLEIC ACID COMPOSITION

(54) 発明の名称: ヘアピン核酸組成物



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a nucleic acid medicine which is capable of inducing nucleic acid immunity in a cell-specific manner and is capable of capturing and/or inactivating a nucleic acid binding protein for which drug development is difficult. Provided are: a hairpin nucleic acid composition which contains two or more types of hairpin nucleic acids; and a medicinal composition, a protein function-inhibiting composition and a cell death-promoting composition which contain the same as an active ingredient thereof.

(57) 要約: 本発明の課題は、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、かつ細胞特異的に核酸免疫を誘導し得る核酸医薬を提供することである。2種以上のヘアピン核酸を含むヘアピン核酸組成物、及びそれを有効成分として含む医薬組成物、タンパク質機能阻害組成物、及び細胞死促進組成物を提供する。



WO 2023/013329 A1

KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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, 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).

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：ヘアピン核酸組成物

技術分野

[0001] 本発明は、ヘアピン核酸組成物、細胞死誘導組成物及びそれらを有効成分として含む医薬組成物、タンパク質機能阻害組成物、及び細胞死促進組成物に関する。

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、標的分子が存在する疾患を対象に限られる。

[0004] また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。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）。

[0005] 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。しかしながら、このような観点からの核酸創薬は、これまでほとんどされておらず、成功例も存在しない。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 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

- [0007] 本発明の課題は、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、かつ細胞特異的に核酸免疫を誘導し得る核酸医薬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、核酸自己集合技術の1種であり、主に微量な生体内核酸分子の検出及び蛍光イメージングに用いられてきたハイブリダイゼーション連鎖反応（Hybridization Chain Reaction；以下、本明細書においては「HCR」と称する）に着目した。本発明者らが、転写因子NF- κ Bのタンパク質結合モチーフを有するヘアピン核酸を用いてがん細胞特異的にHCRを誘導したところ、当該がん細胞が死滅し、核酸免疫が誘導されることが明らかとなった。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。

- [0009] [1] タンパク質結合モチーフの全部又は一部を含む2種以上のヘアピン核酸

を含むヘアピン核酸組成物であって、

前記ヘアピン核酸は、

標的RNA結合カセット及び伸長ヘアピン核酸結合カセットを含む開始ヘアピン核酸、及び

突出領域カセット及び非突出領域カセットを含む伸長ヘアピン核酸からなり、

各ヘアピン核酸は、4~20塩基の突出領域、10~20塩基を含むステム第1領域、3~50塩基のループ領域及び10~20塩基を含むステム第2領域を順に含み、

前記ステム第1領域及び前記ステム第2領域は分子内で互いにハイブリダイズ可能であり、

前記開始ヘアピン核酸において、

前記標的RNA結合カセットは、前記突出領域の全部又は一部、及びそれに続く前記ステム第1領域の全部又は一部を含み、かつ、標的RNAの全部又は一部とハイブリダイズ可能であり、

前記伸長ヘアピン核酸結合カセットは、前記ステム第2領域の全部又は一部を含み、かつ、伸長ヘアピン核酸の突出領域カセットとハイブリダイズ可能であり、

前記伸長ヘアピン核酸において、

前記突出領域カセットは、前記突出領域の全部又は一部、及びそれに続く前記ステム第1領域の全部又は一部を含み、かつ、他の互いに異なる伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットとハイブリダイズ可能であり、

前記非突出領域カセットは、前記ステム第2領域の全部又は一部を含み、かつ、他の互いに異なる伸長ヘアピン核酸の突出領域カセットとハイブリダイズ可能であり、

前記ループ領域及び／又は突出領域は前記タンパク質結合モチーフの全部又は一部を含み、

前記開始ヘアピン核酸の前記標的RNA結合カセットへの標的RNAの結合によ

り、前記タンパク質結合モチーフの全部が二本鎖で構成される、前記組成物。

[2] 前記開始ヘアピン核酸が、6~15塩基の突出領域を含む、[1]に記載のヘアピン核酸組成物。

[3] 前記開始ヘアピン核酸が、標的RNAと6塩基以上でハイブリダイズ可能である、[1]又は[2]に記載のヘアピン核酸組成物。

[4] 前記伸長ヘアピン核酸が、互いに異なる伸長ヘアピン核酸と6塩基以上でハイブリダイズ可能である、[1]~[3]のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

[5] 前記開始ヘアピン核酸において、ヘアピン構造形成反応の自由エネルギー変化量が-20~-10 kcal/molである、[1]~[4]のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

[6] 前記ハイブリダイズ可能な領域が以下の塩基配列からなる、[1]~[5]のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

(1) 前記ハイブリダイズする対象配列と完全に相補的な塩基配列

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

(3) 前記ハイブリダイズする対象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

[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ヘアピン核酸組成物。

[8] 前記ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドを含む、[7]に記載のヘアピン核酸組成物。

[9] 前記タンパク質結合モチーフを複数種類含む、[1]~[8]のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

[10] 前記タンパク質結合モチーフが転写因子結合モチーフを含む、[1]~[9]のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

[11] 前記タンパク質結合モチーフに結合可能なタンパク質が、アポトー

シス関連因子、オートファジー関連因子又は炎症関連因子を含む、 [1] ~ [10] のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

[12] 前記標的RNAが、 mRNA又はmiRNAである、 [1] ~ [11] のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

[13] 前記標的RNAが、細胞特異的に発現するRNAである、 [1] ~ [12] のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

[14] 前記細胞が、がん細胞、炎症細胞又は免疫細胞のいずれかを含む、 [13] に記載のヘアピン核酸組成物。

[15] 前記標的RNA結合カセットが、前記伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットとハイブリダイズ可能である、 [1] ~ [14] のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

[16] 前記伸長ヘアピン核酸が、5'末端突出型及び3'末端突出型のヘアピン核酸を含む、 [1] ~ [15] のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物。

[17] [1] ~ [16] のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物を有効成分として含む、タンパク質機能阻害組成物。

[18] [1] ~ [16] のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物を有効成分として含む、細胞死促進組成物。

[19] [1] ~ [16] のいずれかに記載のヘアピン核酸組成物を有効成分として含む、医薬組成物。

[20] がん、免疫系疾患、及び神経変性疾患からなる群から選択される疾患を治療するための、 [19] に記載の医薬組成物。

[0010] (1) ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能なヘアピン構造を有するヘアピン核酸を含む細胞死誘導組成物であって、標的RNAとハイブリダイズする開始ヘアピン核酸、及び、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核酸を含むことを特徴とする細胞死誘導組成物。

(2) 前記開始ヘアピン核酸は、標的RNAとハイブリダイズする標的RNA結合カセット、及び前記伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核

酸結合カセットを含み、前記伸長ヘアピン核酸は、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする突出領域カセット、及びさらに他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする非突出領域カセットを含む、

(1) に記載の細胞死誘導組成物。

(3) 前記標的RNAが前記標的RNA結合カセットに結合することで前記開始ヘアピン核酸のヘアピン構造が解離して前記伸長ヘアピン核酸結合カセットと前記伸長ヘアピン核酸の前記突出領域カセットがハイブリダイズ可能となり、また当該ハイブリダイズすることで前記伸長ヘアピン核酸のヘアピン構造が解離し、前記非突出領域カセットと他の伸長ヘアピン核酸の前記突出領域カセットがハイブリダイズ可能となることによって前記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が形成される(1)又は(2)に記載の細胞死誘導組成物。

(4) 前記伸長ヘアピン核酸が、5'末端突出型及び3'末端突出型のヘアピン核酸を含む、(1)～(3)のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。

(5) 前記標的RNA結合カセットが、前記伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットとさらにハイブリダイズ可能である、(1)～(4)のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。

(6) 前記開始ヘアピン核酸及び／又は伸長ヘアピン核酸が、タンパク質結合モチーフの全部又は一部をさらに含む、(1)～(5)のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。

(7) 前記ループ領域及び／又は前記突出領域が、前記タンパク質結合モチーフの全部又は一部を含み、前記ハイブリダイゼーション連鎖構造の形成時に前記タンパク質結合モチーフの全部が二本鎖で構成される、(6)に記載の細胞死誘導組成物。

(8) 前記開始ヘアピン核酸において、ヘアピン構造形成反応の自由エネルギー変化量が $-20\sim-10$ kcal/molである、(1)～(7)のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。

(9) 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) ~ (8) のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。
- (10) 前記ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドを含む、(9) に記載の細胞死誘導組成物。
- (11) 前記標的RNAが、mRNA又はmiRNAである、(1) ~ (10) のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。
- (12) 前記標的RNAが、細胞特異的に発現する又は細胞特異的に高発現するRNAである、(1) ~ (11) のいずれかに記載の細胞死誘導組成物。
- (13) (1) ~ (12) 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。
- (14) がん、免疫系疾患、及び神経変性疾患からなる群から選択される疾患を治療するための、(13) に記載の医薬組成物。
- (15) ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能なヘアピン構造を有するヘアピン核酸を含む抗癌剤であって、標的RNAとハイブリダイズする開始ヘアピン核酸、及び、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核酸を含むことを特徴とする抗癌剤。
- (16) ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能なヘアピン構造を有するヘアピン核酸を含む抗炎症剤であって、標的RNAとハイブリダイズする開始ヘアピン核酸、及び、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核酸を含むことを特徴とする抗炎症剤。
- (17) ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能なヘアピン構造を有する、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸を含む組成物であって、前記開始ヘアピン核酸は、標的RNAとハイブリダイズする標的RNA結合カセット、及び前記伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核酸結合カセットを含み、前記伸長ヘアピン核酸は、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする突出領域カセット、及びさらに他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする非突出領域カセットを含み、前記開始ヘアピン核酸及び／又は伸長ヘアピン核酸が、タンパク質結合モチーフの全部又は一部をさらに含む、組成物。

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2021-128492号の開示内容を包含する。

発明の効果

- [0011] 本発明のヘアピン核酸組成物によれば、核酸結合タンパク質を捕捉して核酸免疫を誘導することができる。
- [0012] 本発明のタンパク質機能阻害剤によれば、HCRに基づきタンパク質の機能を阻害することができる。
- [0013] 本発明の細胞死促進組成物によれば、目的の細胞において、HCRに基づき細胞死を促進することができる。
- [0014] 本発明の医薬組成物によれば、目的の部位において、HCRに基づいた効果を得ることができる。

図面の簡単な説明

- [0015] [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、開始ヘアピン核酸の構造を示す。Bは、5'末端突出型((I))及び3'末端突出型((II))の伸長ヘアピン核酸の構造を示す。Cは、標的RNA、及びA及びBのヘアピン核酸がハイブリダイズした時の様子を示す。図中、aは突出領域を、bはステム第1領域を、b'はステム第2領域を、cはループ領域を示し、Cにおける細縦線は2本の核酸鎖がハイブリダイズしていることを示す。
- [図2]HCRの具体例を模式的に示す図である。AはHCRのステップ1～ステップ3を示す。Bは、ステップ3の繰り返しにより、HCR産物が形成される様子を示す。図中、sHPは開始ヘアピン核酸を、eHPは伸長ヘアピン核酸を示す。また、図2A中、Targetは標的RNAを示す。
- [図3]最低自由エネルギー変化量が異なる3つのヘアピン核酸のセット(HP(16)、HP(15)及びHP(13))におけるHCR効率を示す図である。
- [図4]HP(16)の第1のヘアピン核酸(HP1(16))及び第2のヘアピン核酸(HP2(16))のヌクレアーゼ存在下での経時的な存在量を示す図である。
- [図5]HP(16)のHCR産物によるNF- κ Bの捕捉効率を示す図である。図中、NF- κ B/HCR産物はNF- κ BとHCR産物の複合体を示す。

[図6]HEK293T細胞及びHeLa細胞における、HP(16)のマイクロインジェクション後の時間とHCR産物の量の関係を示す図である。図中、「**」はp値が0.01未満であることを示す。

[図7]HEK293T細胞及びHeLa細胞における、HP(16)の導入量と細胞生存率の関係を示す図である。図中、「**」はp値が0.01未満であることを、「***」はp値が0.001未満であることを示す。

[図8]MCF7細胞にpoly(dG:dC)とHP(16)をそれぞれ導入した場合におけるIFN- β 量を示す図である。図中、NCはネガティブコントロールを示す。

[図9]HCRの具体例を模式的に示す図である。AはHCRのステップ1～ステップ3を示す。Bは、ステップ3の繰り返しにより、HCR産物が形成される様子を示す。図中、sHPは開始ヘアピン核酸を、eHPは伸長ヘアピン核酸を示す。また、図9 A中、Targetは標的RNAを示す。

[図10]HEK293T細胞、MDA-MB-231細胞、HeLa細胞及びA549細胞における、HP(16)のマイクロインジェクション後のHCR産物の量を示す図である。図中、「*」はp値が0.05未満であることを、「**」はp値が0.01未満であることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図11]HEK293T細胞、MDA-MB-231細胞及びHeLa細胞における、HP(16)を導入した場合における相対細胞生存率を示す図である。図中、「**」はp値が0.01未満であることを、「***」はp値が0.001未満であることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図12]HeLa細胞にpoly(dA:dT)とHP(16)をそれぞれ導入した場合における相対細胞生存率と、STING siRNAをさらに導入したことによるその変化を示す図である。図中、「****」はp値が0.0001未満であることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図13]HeLa細胞にHP(16)を導入した場合におけるIFN- β のmRNA量と、STING siRNAをさらに導入したことによるその変化を示す図である。図中、「*」はp値が0.05未満であることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図14]腫瘍を担持させたマウスにPBS、poly(dA:dT)及びHP(16)をそれぞれ導

入した場合における腫瘍体積の経時的変化を示す図である。図中、「**」はp値が0.01未満であることを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 1 A. ヘアピン核酸組成物

1 A-1. 概要

本発明の第1の態様Aは、ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能な2種以上のヘアピン核酸を包含するヘアピン核酸組成物である。本発明のヘアピン核酸組成物は、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸を必須の構成として含み、標的RNAに開始ヘアピン核酸がハイブリダイズした際に、HCRにより標的RNA、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸の複合体が連鎖的に形成される。本発明のヘアピン核酸組成物は、核酸結合タンパク質を捕捉して核酸免疫を誘導することができ、また本発明のタンパク質機能阻害組成物、細胞死促進組成物及び医薬組成物の有効成分となり得る。

[0017] 1 A-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、ループ構造及び突出領域を1組含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(a)、ステム第1領域(b)、ループ領域(c)及びステム第2領域(b')を順に含む。

[0018] 本明細書において「5'末端突出型(B(I))」とは、5'末端に突出領域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、ステム第1領域、ループ領域及びステム第2領域を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(A及びB(II))」とは、3'末端に突出領域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、ステム第2領域、ループ領域、ステム第1領域及び突出領域を5'末端から順に含む。

[0019] 「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（b及びb'）が二本鎖を形成してなる構造である。

[0020] 「ループ構造」は、一本鎖核酸からなるループ領域（c）によって形成されるループ状の構造である。

[0021] 本明細書において「突出領域（a）」とは、HCR中で標的RNA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、ステム領域の遊離末端（ループ領域との非隣接末端）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、突出領域の長さは、例えば、4～20塩基とすることができる。

[0022] 本明細書において「ステム領域（b及びb'）」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、突出領域の長さは、例えば、それぞれ独立に10～20塩基とすることができる。「ステム第1領域（b）」とは、突出領域に隣接するステム領域を指す。また、「ステム第2領域（b'）」とは、突出領域に隣接しないステム領域を指す。

[0023] 本明細書において「ループ領域（c）」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。ループ領域の長さは特に限定しないが、例えば、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塩基以上である。また、ループ領域は、例えば、50塩基以下、40塩基以下、30塩基以下、25塩基以下、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、ループ領域の長さは、例えば、3~50塩基とすることができる。

[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及び図9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 (sHP: starting HairPin nucleic acid) が突出領域で標的RNAを認識し、ハイブリダイズして標的配列-開始ヘアピン核酸複合体を形成する。このとき標的RNA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。この標的配列-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、第1の伸長ヘアピン核酸 (eHP1: elongating HairPin nucleic acid) の突出領域が、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を認識してハイブリダイズし、標的配列-開始-伸長ヘアピン核酸複合体を形成する。このとき、開始ヘアピン核酸の一本鎖部分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、第2の伸長ヘアピン核酸 (eHP2) がステップ2で形成された標的配列-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を認識して開裂し、標的配列-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標的配列-開始-(伸長)₂ヘアピン核酸複合体を形成する。このステップ3がその後繰り返されることによって、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2B及び図9B)。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] 本明細書において「標的RNA」とは、本発明のヘアピン核酸組成物によるHCR産物形成の起点となるRNAを指す。標的RNAは、本発明のヘアピン核酸組成物によってHCRが誘導される条件を限定する。標的RNAはヘアピン核酸を構成する開始ヘアピン核酸が特異的にハイブリダイズし得る。標的RNAの種類は特に限定しない。具体的には、例えば、mRNA (例えば、成熟mRNA、mRNA前駆体、及び修飾mRNA等を含む)、ノンコーディングRNA (ncRNA: non-coding RNA: マイクロRNA (miRNA) 及びロングノンコーディングRNA (lncRNA) 等を含む)、及びナチュラルアンチセンスRNA等が挙げられる。

[0030] 「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。

[0031] 「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。

- [0032] 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。
- [0033] 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。
- [0034] 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。
- [0035] 本明細書において「タンパク質結合モチーフ」とは、特定のタンパク質が結合可能な二本鎖からなる配列モチーフを指す。例えば、転写因子が結合するタンパク質結合モチーフは、本明細書において「転写因子結合モチーフ」と称する。
- [0036] 本明細書において「タンパク質機能阻害」とは、そのタンパク質が本来発揮し得る機能を阻害することを指す。阻害の程度や阻害の方法は特に限定しない。
- [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「アポトーシス関連因子」とは、アポトーシスを誘導するシグナル経路に関連する任意のタンパク質を指す。本明細書におけるアポトーシス関連因子には、アポトーシス促進因子及びアポトーシス抑制因子のいずれも含む。具体的なアポトーシス関連因子としては、Fas経路関連因子、カスパーゼ、ミトコンドリア経路関連因子、FOXOファミリータンパク質、及び各種キナーゼ（例えば、サイクリン依存的キナーゼ及びMAPキナーゼ）等が挙げられる。本明細書におけるアポトーシス関連因子には、例えば、がん及び神経変性疾患等の疾患に関連することが知られているタンパク質が含まれる。

[0039] 本明細書において「オートファジー関連因子」とは、オートファジーを誘導するシグナル経路に関連する任意のタンパク質を指す。本明細書におけるオートファジー関連因子には、オートファジー促進因子及びオートファジー抑制因子のいずれも含む。オートファジー関連因子は、オートファジーのいずれのステップに関連していてもよく、例えば、ファゴフォアの発生に関連する因子、ファゴフォアの成長やオートファゴソームの形成に関連する因子、及びオートリソソームに関与する因子等が挙げられる。本明細書におけるオートファジー関連因子には、例えば、がん、免疫系疾患及び神経変性疾患等の疾患に関連することが知られているタンパク質が含まれる。

- [0040] 本明細書において「炎症関連因子」とは、炎症中に影響を受けるタンパク質を指す。本明細書における炎症関連因子には、炎症促進因子及び炎症抑制因子のいずれも含む。具体的な炎症関連因子としては、例えば、各種インターロイキン（例えば、IL-1、TNF- α 及びIFN- β 等を含む）、NF- κ Bファミリータンパク質、STATファミリータンパク質、及びHIFタンパク質等が含まれる。本明細書における炎症関連因子には、例えば、がん及び免疫系疾患等の疾患に関連することが知られているタンパク質が含まれる。
- [0041] 本明細書において「免疫系疾患」とは、免疫系の異常に特徴づけられる疾患を指す。具体的には、例えば、自己免疫疾患及び炎症性疾患等が挙げられる。
- [0042] 「免疫細胞」とは、免疫に関与する細胞を指す。具体的には、リンパ球、マクロファージ及び樹状細胞等が挙げられる。リンパ球としては、例えば、T細胞、B細胞、NK細胞及び形質細胞等がある。本明細書における免疫細胞は、好ましくは、免疫系疾患において異常な活性を有する細胞である。
- [0043] 「自己免疫疾患」とは、自己抗原に対して免疫応答を生じる疾患を指す。具体的には、例えば、橋本甲状腺炎、グレーブス病、狼瘡、多発性硬化症、関節リウマチ、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、セリアック病、クローン病、大腸炎、I型糖尿病、強皮症、乾癬等が挙げられる。
- [0044] 「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指す。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。具体的には、例えば、セリアック病、脈管炎、狼瘡、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、過敏性腸症候群、アテローム性動脈硬化症、関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、大腸炎、肝炎（例えば、慢性活動性肝炎等のウイルス性肝炎や非ウイルス性肝炎）、皮膚炎及び乾癬等が挙げられる。本明細書において「炎症細胞」とは、炎症反応に関与する細胞を指す。具体的には、例えば、好酸球、好中球、好塩基球、肥満細胞、及びII型自然リンパ球等が挙げられる。本明細書における炎症細胞は、好ましくは、炎症性疾患において異常な活性を有する細胞である。

[0045] 本明細書において「神経変性疾患」とは、神経組織の構造が経時的に変化する疾患を指す。具体的には、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋委縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン病、黄斑変性、多発性硬化症、筋ジストロフィ、ニーマン・ピック病、骨粗しょう症及び関節リウマチ等が挙げられる。これらの多くは、特定のタンパク質が蓄積することにより誘導される。

[0046] 本明細書において「異常な活性」とは、正常な細胞における活性と比較して、顕著に、又は有意に活性が抑制又は促進されていることを指す。

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。

[0047] 「統計的に有意」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。

[0048] 1 A - 3. 構成

本発明のヘアピン核酸組成物はハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能な2種以上のヘアピン核酸を含み、ヘアピン核酸は任意の構成としてタンパク質結合モチーフの全部又は一部を含む。

[0049] 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。以下、それぞれについて具体的に説明する。

[0050] (1) 開始ヘアピン核酸

「開始ヘアピン核酸（図1A）」とは、標的RNA結合カセット及び伸長ヘアピン核酸結合カセットを含むヘアピン核酸である（図1C）。

[0051] 「標的RNA結合カセット」は、開始ヘアピン核酸における標的RNA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、標的RNA結合カセットは、突出領域の全部又は一部、及びそれに続くステム第1領域の全部又は一部を含む（図1C）。標的RNA結合カセットは、標的RNAの全部又は一部とハイブリダイズ可能であり、このカセットの塩基配列は、少なくともカセットの両末端は標的RNAと相補的である。

[0052] 「伸長ヘアピン核酸結合カセット」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、伸長ヘアピン核酸結合カセットは、ステム第2領域の全部又は一部を含む（図1C）。伸長ヘアピン核酸結合カセットは、伸長ヘアピン核酸の突出領域カセットとハイブリダイズ可能であり、また両カセットの塩基配列は、少なくともそれぞれのカセットの両末端で互いに相補的である。

[0053] 開始ヘアピン核酸は、標的RNA結合カセット及び伸長ヘアピン核酸結合カセット以外にも1個又は複数個の塩基を含むことができる。これらの塩基は、開始ヘアピン核酸において、例えば、標的RNA結合カセット及び伸長ヘアピン核酸結合カセット間でスペーサー配列として、また標的RNA結合カセット及び伸長ヘアピン核酸結合カセットの遊離末端に連結された末端配列として存在し得る。

[0054] また、開始ヘアピン核酸の両カセットは1個又は複数個の塩基が互いに重複していてもよい。

[0055] (2) 伸長ヘアピン核酸

「伸長ヘアピン核酸（図1B）」とは、突出領域カセット及び非突出領域カセットを含むヘアピン核酸である（図1C）。

[0056] 「突出領域カセット」とは、伸長ヘアピン核酸における、開始ヘアピン核酸又は他の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、突出領域カセットは、突出領域の全部又は一部、及びそれに

続くステム第1領域の全部又は一部を含む（図1C）。突出領域カセットは、開始ヘアピン核酸の伸長ヘアピン核酸結合カセット又は他の互いに異なる伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットとハイブリダイズ可能であり、また両カセットの塩基配列は、少なくともそれぞれのカセットの両末端で互いに相補的である。

[0057] 「非突出領域カセット」とは、伸長ヘアピン核酸における、さらに他の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、非突出領域カセットはステム第2領域の全部又は一部を含む（図1C）。非突出領域カセットは他の互いに異なる伸長ヘアピン核酸の突出領域カセットとハイブリダイズ可能であり、また両カセットの塩基配列は、少なくともそれぞれのカセットの両末端で互いに相補的である。

[0058] ここで、突出領域カセットとハイブリダイズする「他の伸長ヘアピン核酸」と、非突出領域カセットとハイブリダイズする「さらに他の伸長ヘアピン核酸」は、通常、互いに異なる伸長ヘアピン核酸分子である。ただ、これらの伸長ヘアピン核酸分子は互いに同じ配列を有する、すなわち同種の伸長ヘアピン核酸であってもよく、互いに異なる配列を有する、すなわち異種の伸長ヘアピン核酸であってもよい。

[0059] 伸長ヘアピン核酸は、突出領域カセット及び非突出領域カセット以外にも1個又は複数個の塩基を含むことができる。これらの塩基は、伸長ヘアピン核酸において、例えば、突出領域カセット及び非突出領域カセット間でスペーサー配列として、また突出領域カセット及び非突出領域カセットの遊離末端に連結された末端配列として存在し得る。

[0060] また、伸長ヘアピン核酸の両カセットは1個又は複数個の塩基の重なりを有していてもよい。

標的RNA（図9の「Target」）が開始ヘアピン核酸（図9の「sHP」）の標的RNA結合カセット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9Aのステップ1及びステップ2）。すると、開始ヘアピン核酸の伸長ヘアピン核酸結合カセットと伸長ヘアピン核酸（図

9の「eHP1」)の突出領域カセットがハイブリダイズ可能となる(図9Aのステップ2)。この2つのカセット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9Aのステップ2及びステップ3)。すると、ステップ2と同様に、この伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットと他の伸長ヘアピン核酸(図9の「eHP2」)の突出領域カセットがハイブリダイズ可能となる(図9Aのステップ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が形成される(図9B)。

[0061] (3) カセット

ヘアピン核酸を構成する各カセット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、各カセットは、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。

[0062] 各カセットの配列は、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配列を含んでいれば特に限定しない。例えば、各カセットは結合対象の核酸の配列と無関係な1又は複数個の塩基を含むことができる。

[0063] (3-1) 標的RNA結合カセット及び突出領域カセット

上述の通り、開始ヘアピン核酸の標的RNA結合カセット及び伸長ヘアピン核酸の突出領域カセットは、好ましくは、突出領域の全部又は一部、及びそれに続くステム第1領域の全部又は一部を含む。例えば、これらのカセットは、突出領域、ステム第1領域及びループ領域の全部、及びステム第2領域の一部を含む連続した領域であってもよいし、突出領域の一部及びステム第1領域の一部を含む連続した領域であってもよい。例えば、突出領域の、標的RNA又は他の互いに異なる伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットとハイブリダイズ可能な配列は、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、例えば、ステム第1領域の、標的RNA又は他の互いに異なる伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットとハイブリダイズ可能な配列は、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。

[0064] (3-2) 伸長ヘアピン核酸結合カセット及び非突出領域カセット

上述の通り、開始ヘアピン核酸の伸長ヘアピン核酸結合カセット及び伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットは、好ましくは、ステム第2領域の全部又は一部を含む。例えば、これらのカセットは、ステム第1領域の一部、ループ領域の全部及びステム第2領域の全部を含む連続した領域であってもよいし、ステム第2領域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第2領域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、ステム第2領域の、伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセット又は他の互いに異なる伸長ヘアピン核酸の突出領域カセットとハイブリダイズ可能な配列は、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。

[0065] (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、標的RNA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。

[0066] 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。

[0067] 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。

- [0068] 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。
- [0069] 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を認識することが知られている。
- [0070] 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。
- [0071] 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。
- [0072] 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。

[0073] MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) はRIG-Iファミリーに属する細胞質中のパターン認識受容体である。MDA5の例示的なアミノ酸配列は配列番号15に示される。二本鎖核酸に結合したMDA5は、ミトコンドリア外膜上に存在するMAVS (Mitochondrial Antiviral Signaling Protein) に結合し、MAVS経路を活性化する。活性化されたMAVS経路は、I型インターフェロン等を介した免疫応答を誘導する。

[0074] MDA5によって認識される核酸としては、二本鎖RNAが挙げられる。特に、長い二本鎖RNAやPoly(I:C)分子等が知られている。

[0075] 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。

[0076] (5) タンパク質結合モチーフ

任意の構成として、ループ領域及び／又は突出領域はタンパク質結合モチーフの全部又は一部を含む。また、この場合、開始ヘアピン核酸の標的RNA結合カセットへの標的RNAの結合により、タンパク質結合モチーフの全部が二本鎖で構成される。ヘアピン核酸の状態においては、タンパク質結合モチーフはその全部又は一部が一本鎖の状態であり、HCRが起こることでその全体が二本鎖となる。例えば、1分子の中に1つ又は複数の配列モチーフの全部又は一部を含んでもよく、1分子の中に完全な配列モチーフを含まなくてもよい。複

数のモチーフを含む場合、その種類は特に限定しない。例えば、複数の配列モチーフが全て同じ配列モチーフであっても、複数種類の配列モチーフを含んでいてもよい。二本鎖核酸に結合可能なタンパク質及びその結合モチーフは、公知の方法によって知ることができる。例えば、Transfac、WordSpy、T-Reg Comparator、MOTIF、TFBIND、TFSEACH及びJASPAR等の公知のデータベースを使用することができる。また、例えば、タンパク質結合モチーフは、DNAフットプリンティング、ゲル移動度シフトアッセイ又はその他公知の方法によって同定することができ、及び／又は公知のコンセンサス配列モチーフに基づいて予測することができる。

[0077] 各配列モチーフに結合するタンパク質の数は特に限定しない。例えば、1種類又は複数種類のタンパク質が結合可能な配列モチーフを使用することができる。また、結合するタンパク質の種類は特に限定しない。例えば、転写因子及びポリメラーゼ等が挙げられる。タンパク質は、好ましくは転写因子である。この場合、タンパク質結合モチーフは転写因子結合モチーフを含む。タンパク質は、例えば、特定の疾患に関与するタンパク質であってもよい。具体的には、例えば、タンパク質は、アポトーシス関連因子、オートファジー関連因子及び炎症関連因子等を含む。

[0078] (6) ヘアピン核酸組成物

本発明のヘアピン核酸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得る。また、各ヘアピン核酸は、構成するヌクレオチドとして修飾ヌクレオチドを含むことができる。含まれる修飾ヌクレオチドの種類、数及び位置等は特に限定しない。具体的には、例えば、ヌクレオチド間結合の修飾、DNA及びRNAに類似の性質及び／又は構造を有する類似体、及びペプチド核酸等が含まれる。修飾の選択は、標的RNAの配列等によって異なり得るが、当業者であれば、核酸医薬に関連する文献（例えば、WO 2007/143315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。

- [0079] ヘアピン核酸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。
- [0080] 本発明のヘアピン核酸組成物に含まれる開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸は、それぞれ5'末端突出型及び3'末端突出型のいずれでもよい。また、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸における5'末端突出型及び3'末端突出型の数は、特に限定しない。伸長ヘアピン核酸は、5'末端突出型及び3'末端突出型の両方を含むことが好ましい。
- [0081] 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、 $-20 \sim -10$ kcal/molである。具体的には、例えば、 -20 kcal/mol以下、 -19 kcal/mol以下、 -18 kcal/mol以下、 -17.5 kcal/mol以下、 -17 kcal/mol以下又は -16.5 kcal/mol以下である。また、自由エネルギー変化量は、例えば、 -10 kcal/mol以上、 -11 kcal/mol以上、 -12 kcal/mol以上、 -12.5 kcal/mol以上、 -13 kcal/mol以上、 -13.5 kcal/mol以上、 -14 kcal/mol以上、 -14.5 kcal/mol以上又は -15 kcal/mol以上である。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。
- [0082] 各ヘアピン核酸において、各領域の長さや自由エネルギー変化量は同一でなくてもよい。一般に、一連のHCRに関与するヘアピン核酸のうち、最も開裂しにくいヘアピン核酸のヘアピン構造の開裂反応がHCRの伸長反応の律速段階とされる。例えば、開始ヘアピン核酸のヘアピン構造形成反応の自由エネルギー変化量を、伸長ヘアピン核酸の自由エネルギー変化量より低くすることができる。
- [0083] 開始ヘアピン核酸は標的RNAとハイブリダイズ可能なヘアピン核酸であり、伸長ヘアピン核酸は他のヘアピン核酸とハイブリダイズ可能なヘアピン核酸である。開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸とはその機能に基づく呼称

であるため、1つのヘアピン核酸が開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸の両方の機能を有することができる。また、例えば、複数種類の開始ヘアピン核酸を含む場合、全ての開始ヘアピン核酸が1種類の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズ可能であってもよく、全てが別々の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズ可能であってもよい。

[0084] 好ましくは、開始ヘアピン核酸は、自身と異なる末端突出型の1以上の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズ可能である。例えば、開始ヘアピン核酸が5'末端突出型である場合、3'末端突出型の伸長ヘアピン核酸の少なくとも1つが開始ヘアピン核酸にハイブリダイズ可能であり得る。また、好ましくは、全ての伸長ヘアピン核酸が、自身と異なる末端突出型の2つ以上の伸長ヘアピン核酸と同時にハイブリダイズ可能である。

[0085] ヘアピン核酸を構成する各カセットの全部又は一部は、複数種類の標的RNA又は複数種類のヘアピン核酸のカセットの全部又は一部にハイブリダイズ可能であり得る。例えば、1つのヘアピン核酸が開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸の両方の機能を有する場合、そのヘアピン核酸の標的RNA結合カセットの全部又は一部は、伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットとハイブリダイズ可能である。この場合、標的RNA結合カセットと突出領域カセットは、その一部が重複する。例えば、標的RNA結合カセットと突出領域カセットが一致する場合、標的RNA結合カセットは、伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットとハイブリダイズ可能である。また、複数種類のヘアピン核酸のカセットの全部又は一部が、同一のカセット又は標的RNAの全部又は一部にハイブリダイズ可能であってもよい。

[0086] カセット同士のハイブリダイズの様式は特に限定しないが、好ましくは、カセット同士がハイブリダイズした際に、各ヘアピン核酸のその他のカセットが、ハイブリダイズしたカセットを挟んで異なる方向に露出する。例えば、開始ヘアピン核酸の伸長ヘアピン核酸結合カセットと伸長ヘアピン核酸の突出領域カセットがハイブリダイズする場合、その複合体は、一本鎖として露出した2つのカセット（開始ヘアピン核酸の標的RNA結合カセット及び伸長

ヘアピン核酸の非突出領域カセット) に二本鎖領域が挟まれる。そのため、3'末端側のカセット同士、及び5'末端側のカセット同士がハイブリダイズ可能であることができる。また、開始ヘアピン核酸と標的RNAのハイブリダイズの様式は特に限定しない。

[0087] ハイブリダイズ可能な領域の塩基配列は、ハイブリダイズ可能であれば特に限定しない。具体的なハイブリダイズ可能な塩基配列は、例えば、以下の配列からなる：

(1) ハイブリダイズする対象配列と完全に相補的な塩基配列

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

(3) 前記ハイブリダイズする対象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。

[0088] 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、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。

[0089] 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。

[0090] 標的RNAの発現様式は特に限定しない。例えば、標的RNAは、全身性に時期や刺激の有無にかかわらず発現していてもよいし、組織特異的に、細胞特異的に、時期特異的に、又は細胞外シグナル等の刺激に反応して発現してもよい。標的RNAは、好ましくは、細胞特異的に発現するRNAである。この場合、標的RNAが発現する細胞は特に限定しない。具体的には、例えば、がん細胞、炎症細胞又は免疫細胞である。標的RNAが発現する炎症細胞及び免疫細胞は、好ましくは、異常な活性を示す。

[0091] ハイブリダイゼーション連鎖構造及びタンパク質結合モチーフに結合するタンパク質の発現様式は特に限定しない。例えば、タンパク質は、全身性に時期や刺激の有無にかかわらず発現していてもよいし、組織特異的に、細胞特異的に、時期特異的に、又は細胞外シグナル等の刺激に反応して発現してもよい。

[0092] また、タンパク質は、配列モチーフにいかなる条件下でも安定して結合可能である必要はなく、特定の条件下において結合可能であればよい。例えば、配列モチーフの配列のみによってはタンパク質は結合せず、特定の修飾を含む時のみ結合が可能なメチル化CpG結合タンパク質等も本発明のタンパク質に含まれる。配列モチーフにタンパク質が結合可能な条件は、本発明のヘアピン核酸組成物の作製及び使用時点で満たされている必要はなく、例えば、細胞内での反応を通じて満たされてもよい。

[0093] 1 A - 4. 効果

本発明のヘアピン核酸組成物は、標的RNAの存在下でHCRを誘導し、形成されたハイブリダイゼーション連鎖構造を介して、又はさらに、HCR産物上に二本鎖の状態で存在するタンパク質結合モチーフを介して、特定のタンパク質と結合することができる。HCR産物は、例えば、100bp~1000bp程度のサイズの重合体となり、そこにパターン認識受容体等のタンパク質が、そのハイブリダイゼーション連鎖構造の長さや構造に応じて結合する。また、タンパク質結合モチーフを含む場合、さらにそこに特定のタンパク質がタンパク質結合モチーフの数に応じて多数結合する。これにより、例えば、凝集体が形成され、液-液相分離が誘導されることで、細胞へのストレスとなることができ。ここで、液-液相分離とは、生物学的相分離とも呼ばれ、均一に混ざりあった混合系が条件の変化によって、一相の液体状態から二相の区別できる液体状態に変化することをいう。

[0094] 本発明のヘアピン核酸組成物により、核酸免疫が誘導される。核酸免疫は、自然免疫系による核酸認識に基づく免疫応答を指す。核酸免疫は、ウイルス感染により誘導される免疫応答であり、Toll 様受容体等を含むパターン認識受容体等による核酸認識に基づき、インターフェロン抑制因子 (interferon regulatory factor : IRF) ファミリーの転写因子を活性化する。この際、I 型インターフェロン (INF- α 、INF- β) 等の発現が誘導され得る。または、例えば、過剰量存在する特定のタンパク質を捕捉することにより、タンパク質の機能を阻害したり、遊離タンパク質量を減少させることができる。これ

により、例えば、がん細胞を免疫系から保護するタンパク質（例えば、NF- κ Bシグナル経路関連タンパク質）の機能を阻害することができる。

[0095] これらの効果の測定は、例えば、被験ヘアピン核酸組成物を被験体（例えば、実験動物及び培養細胞等）に投与し、一定の期間、例えば、30分後、1時間後、2時間後、3時間後、6時間後、12時間後、1日後又は数日後（例えば1～7又は2～7日後）に、被験ヘアピン核酸組成物による効果の指標を測定することによって実施することができる。具体的には、例えば、細胞へのストレスを目的とする場合、細胞の生存率、細胞ストレスマーカー、細胞死マーカー等の細胞ストレスの指標等の測定等により実施することができる。また、例えば、タンパク質の捕捉の場合、その遊離タンパク質量の測定、そのタンパク質の機能に関連する反応生成物（例えば、転写の調節を受ける遺伝子の発現、触媒される酵素反応の生成物、及び媒介されるシグナル経路の活性等）の量の測定等によって実施することができる。

[0096] 例えば、ヘアピン核酸の適用により減少が期待される指標や生成物のレベルが、陰性対照（例えばビヒクル投与）と比較して減少していればよく、又は増加が期待される指標等のレベルが陰性対照と比較して増加していればよい。この場合のレベルの変化量は特に限定しない。具体的には、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、又は少なくとも40%変化している場合に、被験ヘアピン核酸組成物が目的の効果をもたらすことが示される。あるいは、例えば、統計学的に変化が有意であるかを確認することによって目的の効果をもたらすかどうかを判断してもよい。

[0097] 1 B. 細胞死誘導組成物

1 B-1. 概要

本発明の第1の態様Bは細胞死誘導組成物である。本発明の細胞死誘導組成物は、ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能なヘアピン構造を有する、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸を有効成分として含む。標的RNAに開始ヘアピン核酸がハイブリダイズした際に、HCRにより標的RNA、開始へ

アピン核酸及び伸長ヘアピン核酸の複合体が連鎖的に形成される。本発明の細胞死誘導組成物は、核酸結合タンパク質を捕捉して核酸免疫を誘導することができ、また本発明の細胞死促進組成物、医薬組成物、抗がん剤、抗炎症剤及び核酸免疫誘導組成物の有効成分となり得る。

[0098] 1 B - 2. 構成

本態様の細胞死誘導組成物の構成成分について説明する。本発明の細胞死誘導組成物は、必須の構成成分として開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸を含み、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。

[0099] 開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸は、第1態様Aにおいて詳述した通りである。したがってここでの詳しい説明は省略する。

[0100] 本態様の細胞死誘導組成物は有効量の開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸を含む。所望の効果が細胞死（例えば、アポトーシス）の誘導であることを除けば、有効成分の基本的内容は、後述の第2態様に記載の医薬組成物に準ずる。したがって、ここでは相違点のみを記載する。

[0101] 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、第1態様Aに記載のヘアピン核酸組成物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。

[0102] 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)) が促進され得る。

[0103] 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態様に記載のヘアピン核酸組成物及び／又は細胞死誘導組成物を有効成分として含み、標的RNAを含む目的の部位においてHCR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、HCRに基づく所望の効果を達成することができる。

[0104] 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、必須の構成成分として有効成分を含み、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。

[0105] (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態様に記載のヘアピン核酸組成物及び／又は細胞死誘導組成物を有効量含む。ヘアピン核酸組成物及び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。

[0106] 「有効量」とは、ヘアピン核酸組成物及び／又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。

[0107] 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~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。

[0108] 本明細書において「被験体」とは、本発明のヘアピン核酸組成物、細胞死誘導組成物、医薬組成物、タンパク質機能阻害組成物、細胞死促進組成物及び核酸免疫誘導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。

[0109] 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。

[0110] 本明細書において「目的の部位」とは、目的の細胞を含む生体部位を指す。本明細書において「目的の細胞」とは、本発明のヘアピン核酸組成物及び／又は細胞死誘導組成物による効果の発揮が想定される細胞を指す。具体的には、目的の細胞は標的RNAを発現する細胞及び／又は標的RNAを高発現している細胞である。例えば、目的の細胞は、パターン認識受容体をさらに発現する細胞であってもよいし、タンパク質結合モチーフに結合可能なタンパク質をさらに発現する細胞であってもよい。

[0111] (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。

[0112] 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）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。

[0113] 上記担体は、有効成分であるヘアピン核酸組成物及び／又は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。

[0114] (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態様に記載のヘアピン核酸組成物及び／又は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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 本発明のヘアピン核酸組成物及び／又は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。

[0118] （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。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] （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、特に限定しない。例えば、神経疾患、中枢神経系疾患、代謝性疾患、腫瘍（例えば、悪性腫瘍（がん））、感染症、免疫系疾患（例えば、自己免疫疾患、アレルギー疾患、及び炎症性疾患）、及び異常タンパク質蓄積症といった特定のタンパク質の異常な発現や異常な細胞の存在を伴う疾患を対象とすることができる。本発明の医

薬組成物は、例えば、がん、自己免疫疾患、炎症性疾患、及び異常タンパク質蓄積症からなる群から選択される疾患の治療を目的とすることができる。

[0122] 本明細書における悪性腫瘍（がん）は、例えば、白血病、セミノーマ、黒色腫、奇形腫、リンパ腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、前立腺がん、子宮がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、卵巣がん、副腎がん、甲状腺がん、皮膚がん、頭頸部がん、消化器がん、膵がん、乳がん及び肺がん並びにそれらの転移を含む。

[0123] 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、本発明のヘアピン核酸組成物及び／又は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。

[0124] この場合、対象となるがんは上述した任意のがんであってよい。また、標的RNAは適用対象のがん細胞特異的に発現しているRNA及び／又は適用対象のがん細胞特異的に高発現しているRNAとすることができる。

[0125] 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。

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、本発明のヘアピン核酸組成物及び／又は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。

[0126] この場合、対象となる炎症性疾患は、定義の項で上述した任意の炎症性疾患であってよい。また、標的RNAは適用対象の炎症細胞特異的に発現しているRNA及び／又は適用対象の炎症細胞特異的に高発現しているRNAとすることができる。また、例えば、炎症反応の原因となっている細胞がある場合は、その原因となっている細胞特異的に発現している及び／又は高発現しているRNAを標的RNAとすることができる。

本発明の抗炎症剤は任意で他の抗炎症剤を追加で含むことができる。

[0127] 3. タンパク質機能阻害組成物

3-1. 概要

本発明の第3の態様はタンパク質機能阻害組成物である。本発明のタンパク質機能阻害組成物は、第1態様Aに記載のヘアピン核酸組成物を有効成分

として含み、標的RNAを含む目的の部位においてHCRを誘導する。本発明のタンパク質機能阻害組成物を使用することで、例えば、目的の細胞において、HCRに基づきタンパク質の機能を阻害することができる。

[0128] 3-2. 構成

本態様のタンパク質機能阻害組成物の構成成分について説明する。本発明のタンパク質機能阻害組成物は、必須の構成成分として有効成分を含み、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。

[0129] 本発明のタンパク質機能阻害組成物は、必須の有効成分として第1態様Aに記載のヘアピン核酸組成物を有効量含む。好ましくは、タンパク質結合モチーフを含む第1態様Aに記載のヘアピン核酸組成物を有効量含む。所望の効果がタンパク質機能阻害であることを除けば、有効成分の基本的内容は、第2態様に記載の医薬組成物に準ずる。したがって、ここでは相違点のみを記載する。

[0130] 本発明のタンパク質機能阻害組成物はタンパク質機能阻害を目的としている。したがって、有効成分として、第1態様Aに記載のヘアピン核酸組成物以外にタンパク質機能阻害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、遺伝子発現抑制剤（例えば、アンチセンス核酸及びショートヘアピン核酸等）やタンパク質レベルでの機能阻害剤（例えば、抗体、アプタマー及び拮抗阻害剤等）等が挙げられる。

[0131] 本発明のタンパク質機能阻害組成物に使用される担体や剤形等の基本的内容は、第2態様の医薬組成物に準ずる。したがって、ここでの詳細な説明は省略する。

[0132] 本発明のタンパク質機能阻害組成物は、タンパク質結合モチーフに直接結合するタンパク質のみが阻害対象である必要はない。例えば、タンパク質結合モチーフに結合するタンパク質を介してHCR産物に間接的に結合するタンパク質が対象とされてもよい。

[0133] 4. 細胞死促進組成物

4 - 1. 概要

本発明の第4の態様は細胞死促進組成物である。本発明の細胞死促進組成物は、第1態様Aに記載のヘアピン核酸組成物を有効成分として含み、標的RNAを含む目的の細胞においてHCRを誘導する。本発明の細胞死促進組成物を使用することで、目的の細胞において、HCRに基づき細胞死を促進することができる。

[0134] 4 - 2. 構成

本態様の細胞死促進組成物の構成成分について説明する。本発明の細胞死促進組成物は、必須の構成成分として有効成分を含み、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。

[0135] 本発明の細胞死促進組成物は、必須の有効成分として第1態様Aに記載のヘアピン核酸組成物を有効量含む。所望の効果が細胞死の促進であることを除けば、有効成分の基本的内容は、第2態様に記載の医薬組成物に準ずる。したがって、ここでは相違点のみを記載する。

[0136] 本発明の細胞死促進組成物は細胞死の促進を目的としている。したがって、有効成分として、第1態様Aに記載のヘアピン核酸組成物以外に細胞死の促進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、遺伝子の発現抑制に基づく薬剤やタンパク質レベルでの機能阻害に基づく薬剤等が挙げられる。

[0137] 本発明の細胞死促進組成物に使用される担体や剤形等の基本的内容は、第2態様の医薬組成物に準ずる。したがって、ここでの詳細な説明は省略する。

[0138] 本発明の細胞死促進組成物は、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。本発明の細胞死促進組成物によれば、以下に実施例で示されるように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、二次的に細胞死が促進され得る。本明細書において、促進される細胞死は、例えば、免疫原性細胞死 (Immunogenic cell death) である。

[0139] 5. 核酸免疫誘導組成物

5-1. 概要

本発明の第5の態様は核酸免疫誘導組成物である。本発明の核酸免疫誘導組成物は、第1態様に記載のヘアピン核酸組成物及び／又は細胞死誘導組成物を有効成分として含み、標的RNAを含む目的の部位においてHCRを誘導する。本発明の核酸免疫誘導組成物を使用することで、例えば、目的の細胞において、HCRに基づき核酸免疫を誘導することができる。

[0140] 5-2. 構成

本態様の核酸免疫誘導組成物の構成成分について説明する。本発明の核酸免疫誘導組成物は、必須の構成成分として有効成分であるヘアピン核酸組成物及び／又は細胞死誘導組成物を含み、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。

[0141] 本発明の核酸免疫誘導組成物は、必須の有効成分として第1態様に記載のヘアピン核酸組成物及び／又は細胞死誘導組成物を有効量含む。所望の効果が核酸免疫誘導であることを除けば、有効成分の基本的内容は、第2態様に記載の医薬組成物に準ずる。したがって、ここでは相違点のみを記載する。

[0142] 本発明の核酸免疫誘導組成物は核酸免疫の誘導を目的としている。したがって、有効成分として、第1態様に記載のヘアピン核酸組成物及び／又は細胞死誘導組成物以外に核酸免疫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、パターン認識受容体及び／又はその下流因子の活性を増加させる分子（例えば、それらのアゴニスト、発現促進剤等）、他の種類のパターン認識受容体によって認識される核酸分子、核酸以外を認識するパターン認識受容体によって認識される脂質分子や糖分子等が挙げられる。

[0143] 本発明の核酸免疫誘導組成物に使用される担体や剤形等の基本的内容は、第2態様の医薬組成物に準ずる。したがって、ここでの詳細な説明は省略する。

[0144] 本発明の核酸免疫誘導組成物は、HCR産物を含む細胞以外の細胞において核

酸免疫が誘導されてもよい。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核酸免疫が誘導される場合がある。

実施例

[0145] <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。

(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。各ヘアピン核酸の配列及びそのヘアピン構造形成反応の自由エネルギー変化量を表1に示す。

[0146] [表1]

表1: 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 | 配列番号 | 自由エネルギー (kcal/mol) |
|---------|--|------|--------------------|
| HP1(16) | <u>TCAACATCAGTCTGATAAGCTAGGGACTTTCCTAGCTTATCAGACT</u> | 2 | -16.4 |
| HP2(16) | <u>TAGCTTATCAGACTGATGTTGAAGTCTGATAAGCTAGGAAAAGTCCC</u> | 3 | -12.8 |
| HP1(15) | <u>TCAACATCAGTCTGATAAGCTAGGGACTTTCCTAGCTTATCAGAC</u> | 4 | -15.3 |
| HP2(15) | <u>TAGCTTATCAGACTGATGTTGAGTCTGATAAGCTAGGAAAAGTCCC</u> | 5 | -12.6 |
| HP1(13) | <u>TCAACATCAGTCTGATAAGCTAGGGACTTTCCTAGCTTATCAGA</u> | 6 | -13.5 |
| HP2(13) | <u>TAGCTTATCAGACTGATGTTGATCTGATAAGCTAGGAAAAGTCCC</u> | 7 | -10.0 |

下線: 突出領域、太字: ステム領域、斜体: タンパク質結合モチーフ

[0147] 3つのヘアピン核酸のセット (HP(16)、HP(15)及びHP(13)) では、いずれも第1のヘアピン核酸 (HP1) の自由エネルギー変化量が最も低かった。HP1(16)、HP1(15)及びHP1(13)は、それぞれ-16.4 kcal/mol、-15.3 kcal/mol及び-13.5 kcal/molとなった。

設計した各ヘアピン核酸は核酸自動合成機を用いて化学合成した。

[0148] 2. HCR効率の評価

各ヘアピン核酸セットについて、HP1及び第2のヘアピン核酸（HP2）をそれぞれ1 μ Mの濃度で含むTE緩衝溶液にmiR-21を終濃度0.1 μ M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SYBR™ Gold（Thermo Fisher Scientific社）を用いた。

[0149] （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た。特に、HP1の自由エネルギー変化量が-16.4 kcal/mol及び-15.3 kcal/molのヘアピン核酸セットでは、miR-21を添加しなかった場合にHCR産物がほとんど観察されず、標的RNAであるmiR-21依存的に反応が進行することがわかった。

以下の実験では、最もHCR効率が高かったHP(16)のヘアピン核酸セットを使用した。

[0150] <実施例2：ヘアピン核酸のヌクレアーゼ耐性の評価>

（目的）

ヘアピン核酸の突出領域の長さとのヌクレアーゼ耐性の関係を調べた。

（方法）

10%ウシ胎児血清（FBS；Biowest社）及び0.5%ペニシリン-ストレプトマイシン（ナカライテスク社）を含有するDMEM溶液（Gibco社）にHP1(16)又はHP2(16)を0.5 μ Mの終濃度で添加し、37°Cで静置した。使用したHP1(16)及びHP2(16)の突出領域のヌクレオチド間結合にはホスホロチオエート修飾を施した。一定時間ごとに反応液の一部（20 μ L）を採取し、ホルムアミド（10 μ L）を添加して反応を停止した。その後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した。ゲルの染色にはSYBR™ Gold（Thermo Fisher Scientific社）を用いた。

[0151] (結果)

結果を図4に示す。

いずれのヘアピン核酸も、ヌクレアーゼを多量に含むFBS中であっても、数時間程度であれば十分残存していることが明らかとなった。さらに、1日経過後ではいずれのヘアピン核酸もそのほとんどがヌクレアーゼ分解を受けていることから、未反応のヘアピン核酸は、ヌクレアーゼにより分解され適切に排除されることが示された。また、HP1(16)及びHP2(16)はそれぞれ8塩基及び10塩基の突出領域を有するが、両者のヌクレアーゼ耐性には大きな違いが見られなかったことから、突出領域の長さによってヌクレアーゼ活性は大きくは左右されないことがわかった。

[0152] <実施例3：HCR産物のタンパク質の捕捉効率の評価>

(目的)

HCR産物上のタンパク質結合モチーフのタンパク質の捕捉効率を調べた。

(方法)

HP1(16)及びHP2(16)はそれぞれNF- κ Bの認識配列を有している。そこで、FAMにより蛍光修飾したHP1(16) (FAM-HP1(16) ; 表2、配列番号8) 及びHP2(16)をそれぞれ0.1 μ Mの濃度で含むTE緩衝溶液に、miR-21を終濃度10nMで添加し、室温で静置した。反応溶液にレコンビナントNF- κ B (Cayman Chemical社) を終濃度50ng/ μ Lで添加し、静置した。コントロールとして、NF- κ Bを添加しない反応溶液を使用した。NF- κ Bの結合の検出は、ゲルシフト法を用いて行った。まず、この反応溶液を5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。バンドの検出はGel Doc™ EZ Imager (BioRad社 ; 励起波長 430nm~460nm) を用いたFAMの蛍光の検出により行った。

[0153] 以下に実施例3及び4に使用したヘアピン核酸の配列を示す。下記表2に示す通り、FAM-HP1(16) (配列番号8) において、5'末端から1番目の塩基から9番目の塩基までのヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、5'末端から21番目のヌクレオチドは、チミジン類似体dT-FAM (3')である。TAMRA-HP2(16) (配列番号9) において、5'末端から36番目の塩基から46番目の

塩基までのヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、5'末端から46番目のヌクレオチドは、5-TAMRAがC6アミノリンカー（カタログ番号：26-6418、Gene Link社）を介して結合したシチジンである。

[0154] [表2]

表 2: 実施例3及び4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 |
|---------------|--|------|
| FAM-HP1(16) | T [^] C [^] A [^] A [^] C [^] A [^] T [^] C [^] AGTCTGATAAGCT*AGGGACTTTCCTAGCTTATCAGACT | 8 |
| TAMRA-HP2(16) | TAGCTTATCAGACTGATGTTGAAGTCTGATAAGCTA [^] G [^] G [^] A [^] A [^] A [^] G [^] T [^] C [^] C [^] C [^] ** | 9 |

[^]:ホスホロチオエート、*:FAM-T、**:C-TAMRA

[0155] (結果)

結果を図5に示す。

NF- κ Bを添加しなかった場合において、正常にHCR産物が起こったことがわかった。HCR産物としては、様々な長さの核酸鎖が検出された（図5矢尻）。NF- κ Bを添加した場合、HCR産物のみのバンドはほとんど検出されず、移動度が非常に低いバンドが観察された。このことから、HCR産物の長さに関係なく、HCR産物とNF- κ Bの複合体（NF- κ B/HCR産物）が高効率に形成されることがわかった。

[0156] <実施例4：細胞系におけるHCR効率の評価>

(目的)

ヒト細胞中でHCRが起こることを確認し、その効率を調べた。

(方法)

3.0×10⁴個のHEK293T細胞及びHeLa細胞をそれぞれ3.5cmのガラスボトムディッシュに播種し、200 μ L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。FAM-HP1(16)及びTAMRAにより蛍光修飾したHP2(16) (TAMRA-HP2(16))；表2、配列番号9)をそれぞれ0.1 μ g/ μ Lの濃度で含むTE緩衝溶液をFemtotips (Eppendorf)によってHEK293T細胞及びHeLa細胞それぞれにマイクロインジェクションし

た。HCRが起きFAMとTAMRAが近接した場合に起こる蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）反応を、細胞を共焦点顕微鏡によって観察することにより検出した。FRET効率は、488nmで励起した際の521nm及び575nmの蛍光強度の比で算出した。反応開始時のFRET効率を1とした、各時点のFRET効率の相対値を相対FRET効率として算出した。実験は、4回反復で行った。

[0157] （結果）

結果を図6に示す。

miR-21をほとんど発現しないヒト胚性腎臓HEK293T細胞ではFRET効率の変化は見られなかった（図6白丸グラフ）。一方、miR-21を発現するヒト子宮頸がんHeLa細胞にヘアピン核酸を導入した結果、時間経過に伴いFRETシグナルの増大が観察された（図6黒丸グラフ）。以上の結果から、今回設計したHP(16)が、miR-21を発現する細胞選択的にHCRを誘導することが分かった。また、HCRは、細胞にヘアピン核酸が導入されると同時に開始し、90分前後で完了することがわかった。

[0158] <実施例5：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。

（方法）

1.0×10⁵個のHEK293T細胞及びHeLa細胞を、それぞれ24wellのマルチウェルプレートに播種し、500μLの10%FBS及び0.5%ペニシリンー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。HP1(16)及びHP2(16)を0μg/μL、0.5μg/μL及び1μg/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。その後、反応溶液をディッシュに添加した。さらにその後、500μLの10%FBS及び0.5%ペニシリンー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400 μ L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。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、ヘアピン核酸を含まない条件の細胞生存率を100%とした相対値として、細胞種ごとに算出した。実験は、4回反復で行った。

[0159] (結果)

結果を図7に示す。

miR-21をほとんど発現しないHEK293T細胞では、ヘアピン核酸の濃度を高くしても細胞生存率の有意な低下は見られなかった（図7白棒グラフ）。一方、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、導入されたヘアピン核酸量に依存して細胞死が誘導されることがわかった（図7黒棒グラフ）。このことから、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、蛍光顕微鏡での観察によって、ヘアピン核酸の導入により、凝集体が形成され、液-液相分離が誘導されていることがわかった。

[0160] 単純なHCRの誘導によっては細胞死は誘導されないことが知られていることから、NF- κ Bの捕捉によって凝集体が形成されることにより、細胞死が促進されていることが示唆された。

[0161] <実施例6：HCRによる免疫応答誘導効率の評価>

(目的)

ヒト細胞中でのHCRにより免疫応答が誘導されることを確認し、その効率を調べた。

(方法)

リポフェクションは、培養細胞としてMCF7細胞を使用したことを除いて実施例5に準じて行った。リポフェクション後の培地交換の24時間後、5 μ Lの培地を採取し、IFN- β をELIZA（PBL Assay Science社）を用いて定量した。ネガティブコントロール（NC）としてヘアピン核酸HP(16)を含まない条件で実験を行い、ポジティブコントロール（PC）としてpoly(dG:dC）（InvivoGen

社)をHP(16)の代わりに用いた条件で実験を行った。相対IFN- β 量は、NCのIFN- β 量を1とした相対値として算出した。

[0162] (結果)

結果を図8に示す。

強い免疫活性化能をもつことが分かっているpoly(dG:dC)をmiR-21を発現するヒト乳がんMCF7細胞に導入したPCにおいては、NCと比較して2倍程度のIFN- β が産生された。また、同細胞にHP(16)を導入した場合、PCと同程度の高いレベルのIFN- β が見られた。このことから、HCR産物が核酸免疫を誘導していることがわかった。

[0163] 通常、NF- κ Bによってがん細胞は免疫応答から保護されていることが知られている。このことから、ヘアピン核酸HP(16)は、NF- κ Bの捕捉によるNF- κ Bの機能阻害と核酸免疫の誘導の両方によって、標的RNAであるmiR-21発現細胞特異的にHCRを介して細胞死を誘導することが示された。

[0164] <実施例7：細胞の種類ごとのHCR効率の評価>

(目的)

細胞の種類とHCRが起こる効率の関係を調べた。

[0165] (方法)

細胞へのHP(16)の導入とHCR効率の評価は、使用する細胞以外は実施例4と同様の手順で行った。HP(16)を導入する細胞としては、ヒト胚性腎臓HEK293T細胞、ヒト子宮頸がんHeLa細胞の他に、ヒト乳がんMDA-MB-231細胞及びヒト肺胞基底上皮腺がんA549細胞を用いた。実施例4と同様に、相対FRET効率は、488nmで励起した際の521nm及び575nmの蛍光強度の比で算出した。

[0166] 5.0×10^4 個のHEK293T細胞、HeLa細胞、MDA-MB-231細胞及びA549細胞をそれぞれ24wellのマルチウェルプレートに播種し、500 μ L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ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)溶液中で培養した。24時間の培養の後に、Opti-MEM(Invitrogen)に培地交換を行った。

[0167] ヘアピン核酸を、それぞれウェル当たり0.5 μ gの量でLipofectamine LTX(

Invitrogen) を用いて、各細胞に導入した。導入用のヘアピン核酸としては、Cy5により蛍光修飾したHP1(16) (Cy5-HP1(16) ; 表3、配列番号10) 及びFAMにより蛍光修飾したHP2(16) (FAM-HP2(16) ; 表3、配列番号11) のセット (HP(16))、又はスクランブル配列を有するヘアピン核酸 (スクランブルヘアピン核酸) のセットを使用した。

[0168] 3時間の培養の後に、HCRが起きFAMとCy5が近接した場合に起こるFRET反応を観察した。観察は、細胞を共焦点顕微鏡によって観察することにより行った。FRET効率 (相対値) は、スクランブルヘアピン核酸を導入した場合のFRETシグナル強度に対する、HP(16)を導入した際のFRETシグナル強度を示す。各条件のFRETシグナル強度は、488nmで励起した際に観察されるFAMの蛍光強度に対するCy5の蛍光強度の比で算出した。

実験は、4回反復で行った。

統計的有意性は、対応のないt検定により判定した。

[0169] 以下に実施例7に使用したヘアピン核酸の配列を示す。下記表3に示す通り、Cy5-HP1(16) (配列番号10) において、5'末端から1番目の塩基から9番目の塩基までのヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、5'末端から46番目のヌクレオチドは、Cy5が実施例4で用いたものと同様のC6アミノリンカーを介して結合したチミジンである。FAM-HP2(16) (配列番号11) において、5'末端から36番目の塩基から46番目の塩基までのヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、5'末端から21番目のヌクレオチドは、チミジン類似体dT-FAM (3')である。

[0170] [表3]

表3: 実施例7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 |
|-------------|---|------|
| Cy5-HP1(16) | T^C^A^A^C^A^T^C^AGTCTGATAAGCTAGGGACTTTCCTAGCTTATCAGACT** | 10 |
| FAM-HP2(16) | TAGCTTATCAGACTGATGTTGAAGT*CTGATAAGCTA^G^G^A^A^A^G^T^C^C^C | 11 |

^:ホスホロチオエート、*:FAM-T、**:Cy5-T

[0171] (結果)

結果を図10に示す。

[0172] miR-21をほとんど発現しないヒト胚性腎臓HEK293T細胞ではFRETシグナル強度がスクランブルヘアピン核酸を用いた場合と同等(100%程度)であった(図10)。これは、実施例4の結果と一致する(図6白丸グラフ)。一方、miR-21を発現するヒト子宮頸がんHeLa細胞、ヒト乳がんMDA-MB-231細胞及びヒト肺胞基底上皮腺がんA549細胞のいずれの細胞においても、FRETシグナル強度の増大が観察された(図10)。

[0173] 以上の結果から、今回設計したHP(16)が、miR-21を発現する細胞選択的にHCRを誘導すると共に、miR-21を発現する細胞であれば、がんの種類によらずHCRを誘導することが分かった。

[0174] <実施例8：細胞の種類ごとの細胞死促進効率の評価>

(目的)

細胞の種類がHCRの細胞死を促進する効率に与える影響を調べた。

[0175] (方法)

5.0×10⁴個のA549細胞、MDA-MB-231細胞及びB16細胞を、それぞれ24wellのマルチウェルプレートに播種し、500μLの10%FBS及び0.5%ペニシリンーストレプトマイシンを含有するDMEM溶液中で約80%コンフルエントになるまで培養した。その後、OPTI-MEMに培地交換した。

ウェル当たり0.5μgの量のHP(16)をLipofectamine LTX (Invitrogen) を用いて各細胞に導入した。

[0176] 48時間後、培地を標準増殖溶液に培地交換した。細胞死の検出は、プレストブルー (Invitrogen) の蛍光を測定することで行った。蛍光の測定は、実施例5と同様にマルチウェルCytation™ 5プレートリーダー (BioTek Instruments社) を用いて行った。

[0177] 相対細胞生存率は、ヘアピン核酸を含まない条件の細胞生存率を100%とした相対値として、細胞種ごとに算出した。

実験は、4回反復で行った。

統計的有意性は、対応のないt検定により判定した。

[0178] (結果)

結果を図11に示す。

MDA-MB-231細胞及びマウス悪性黒色腫B16細胞では、HP(16)の導入により細胞生存率が顕著に減少した(図11)。一方、A549細胞ではHP(16)の導入による細胞生存率の減少はあまり見られなかった。

[0179] A549細胞、MDA-MB-231細胞及びB16細胞のいずれもmiR-21を発現する。それにもかかわらず、細胞種ごとに細胞生存率の結果に差が生じたことから、miR-21の発現の有無以外にも細胞死を促進する効率に影響を与える因子があることが示唆された。

[0180] <実施例9：細胞死促進効率にcGAS-STING経路が与える影響の評価>

(目的)

cGAS-STING経路がHCRの細胞死を促進する効率に与える影響を調べた。

[0181] (方法)

5.0×10^5 個のHeLa細胞を、6wellのマルチウェルプレートに播種し、500 μ Lの10%FBS及び0.5%ペニシリンーストレプトマイシンを含有するDMEM溶液中で約80%コンフルエントになるまで培養した。その後、OPTI-MEMに培地交換した。

[0182] 最終濃度が5nMとなるように培地中にSTING siRNA (ヒトTMEM173 siRNA、カタログ番号：AM16708；Silencer select siRNA、Thermo Fisher Scientific社)を添加し、各細胞に導入した。

24時間後、培地を標準増殖溶液に培地交換した。さらに24時間の培養の後、24wellのマルチウェルプレートに播種し、細胞死の検出を行った。細胞死の検出は、基本的には実施例8と同様に行った。ただ、細胞として、STING siRNAを導入された又はされていないHeLa細胞を使用した。また、導入する核酸としてHP(16)又はpoly(dA:dT) (Invitrogen)を使用した。

実験は、4回反復で行った。

統計的有意性は、対応のないt検定により判定した。

[0183] (結果)

結果を図12に示す。

[0184] STING siRNAを導入されていないHeLa細胞では、強い免疫活性化能をもつことが分かっているpoly(dA:dT)を導入した場合と比較しても、HP(16)によって細胞生存率がより大きく低下した(図12)。このことから、HP(16)は、poly(dA:dT)と比較してより効率的に細胞死を誘導できることがわかった。

[0185] 一方、そのHP(16)による細胞死の誘導は、STING siRNAを導入されたHeLa細胞において顕著に抑制された(図12)。

[0186] このことから、HP(16)はcGAS-STING経路を介して細胞死を誘導していることがわかった。このことは、STINGタンパク質を発現しないことが知られているA549細胞においてHP(16)による細胞死が誘導されなかったことと一致する(図11)。

[0187] <実施例10：HCRによる免疫応答誘導効率の評価>

(目的)

ヒト細胞中でのHCRによる免疫応答の誘導効率を調べた。

[0188] (方法)

細胞培養とリポフェクションは、導入する核酸としてHP(16)を用いたことを除いて、実施例9に準じて行った。リポフェクション後の培地交換の18時間後、細胞を懸濁し、Nucleo Spin RNA XS (Macherey-Nagel) を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAを、One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TaKaRa Bio) 及びRotor-Gene 3000 (QIAGEN) を用いたqRT-PCRにより解析した。IFN- β のmRNA用のプライマーとして以下のプライマーを用いた：

フォワードプライマー：5'-ACAGGTTACCTCCGAAACTGAAGA-3' (配列番号12)

リバースプライマー：5'-TTAGCCATCAGTCACTTAAACAGCA-3' (配列番号13)

相対IFN- β mRNA量は、GAPDHのmRNA量で標準化した対照群の標準化IFN- β mRNA量を1とした各条件における標準化IFN- β mRNA量の相対値として算出した。

統計的有意性は、対応のないt検定により判定した。

[0189] (結果)

結果を図13に示す。

[0190] HP(16)を導入しなかった場合には、HeLa細胞からはINF- β のmRNAはほとんど検出されなかった(データ示さず)。実施例6における結果と同様に、HP(16)の導入によりINF- β のmRNAは大幅に上昇した(図13)。しかし、その上昇はSTING siRNAを導入されたHeLa細胞において顕著に抑制された(図13)。

[0191] このことから、HCR産物による核酸免疫の誘導がcGAS-STING経路を介して起きていることがわかった。

[0192] <実施例11：生体内のがん細胞に対する細胞死誘導効率の評価>

(目的)

生体内のがん細胞に対するHCRによる細胞死誘導の効率を調べた。

[0193] (方法)

まず、マウスにがん細胞を担持させた。100 μ LのPBSに懸濁した 1.5×10^5 個のB16細胞を皮下注射により6週齢のC57BL/6マウスに投与した。その後、腫瘍体積が100mm³に到達したマウスを投薬実験に供した。

[0194] 投薬は、腫瘍周囲投与により4日毎に3回行った。薬剤として、8.4 μ gのHP(16)又はpoly(dA:dT)をAteloGene Local Use Quick Gelation (KOKEN)を用いて投与した。対照群としてはPBSを投与した。

[0195] 腫瘍体積と体重の測定を、投与開始から0日後、4日後、6日後、8日後、9日後、12日後及び15日後に行った。

[0196] これらの実験は、東京大学の倫理委員会の承認を得て行った。

エンドポイントとして、腫瘍体積が2,000mm³以上となった段階でマウスを安楽死させた。腫瘍体積は以下の式に基づいて算出した：

$$(\text{腫瘍体積}) = (\text{腫瘍の長径}) \times (\text{腫瘍の短径})^2 / 2$$

[0197] (結果)

結果を図14に示す。

[0198] poly(dA:dT)投与群では、PBS投与の対照群と比較して、投与開始6日後以降

に腫瘍体積の増加の抑制が見られた（図14の(i)及び(ii)）。一方、HP(16)投与群においては、投与開始後の最初の測定時点から、対照群及びpoly(dA:dT)投与群と比較して腫瘍体積の増加の顕著な抑制を示し、投与開始15日後の腫瘍体積は、対照群と比較して有意に小さかった（図14の(iii)）。また、マウスの体重はいずれの群においてもほぼ変化しなかった。

このことから、HCR産物による腫瘍細胞の細胞死の誘導が生体内においても有効に作用し、がんの治療に有用であることがわかった。

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] ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能なヘアピン構造を有するヘアピン核酸を含む細胞死誘導組成物であって、標的RNAとハイブリダイズする開始ヘアピン核酸、及び、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核酸を含むことを特徴とする細胞死誘導組成物。
- [請求項2] 前記開始ヘアピン核酸は、標的RNAとハイブリダイズする標的RNA結合カセット、及び前記伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核酸結合カセットを含み、
前記伸長ヘアピン核酸は、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする突出領域カセット、及びさらに他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする非突出領域カセットを含む、請求項1に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項3] 前記標的RNAが前記標的RNA結合カセットに結合することで前記開始ヘアピン核酸のヘアピン構造が解離して前記伸長ヘアピン核酸結合カセットと前記伸長ヘアピン核酸の前記突出領域カセットがハイブリダイズ可能となり、また当該ハイブリダイズすることで前記伸長ヘアピン核酸のヘアピン構造が解離し、前記非突出領域カセットと他の伸長ヘアピン核酸の前記突出領域カセットがハイブリダイズ可能となることによって前記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が形成される請求項1又は2に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項4] 前記伸長ヘアピン核酸が、5'末端突出型及び3'末端突出型のヘアピン核酸を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項5] 前記標的RNA結合カセットが、前記伸長ヘアピン核酸の非突出領域カセットとさらにハイブリダイズ可能である、請求項1～4のいずれか一項に記載の細胞死誘導組成物。
- [請求項6] 前記開始ヘアピン核酸及び／又は伸長ヘアピン核酸が、タンパク質

結合モチーフの全部又は一部をさらに含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の細胞死誘導組成物。

[請求項7] 前記ループ領域及び／又は前記突出領域が、前記タンパク質結合モチーフの全部又は一部を含み、

前記ハイブリダイゼーション連鎖構造の形成時に前記タンパク質結合モチーフの全部が二本鎖で構成される、
請求項 6 に記載の細胞死誘導組成物。

[請求項8] 前記開始ヘアピン核酸において、ヘアピン構造形成反応の自由エネルギー変化量が $-20\sim-10$ kcal/molである、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の細胞死誘導組成物。

[請求項9] 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 1～8 のいずれか一項に記載の細胞死誘導組成物。

[請求項10] 前記ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドを含む、請求項 9 に記載の細胞死誘導組成物。

[請求項11] 前記標的RNAが、mRNA又はmiRNAである、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の細胞死誘導組成物。

[請求項12] 前記標的RNAが、細胞特異的に発現する又は細胞特異的に高発現するRNAである、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の細胞死誘導組成物。

[請求項13] 請求項 1～12 のいずれか一項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。

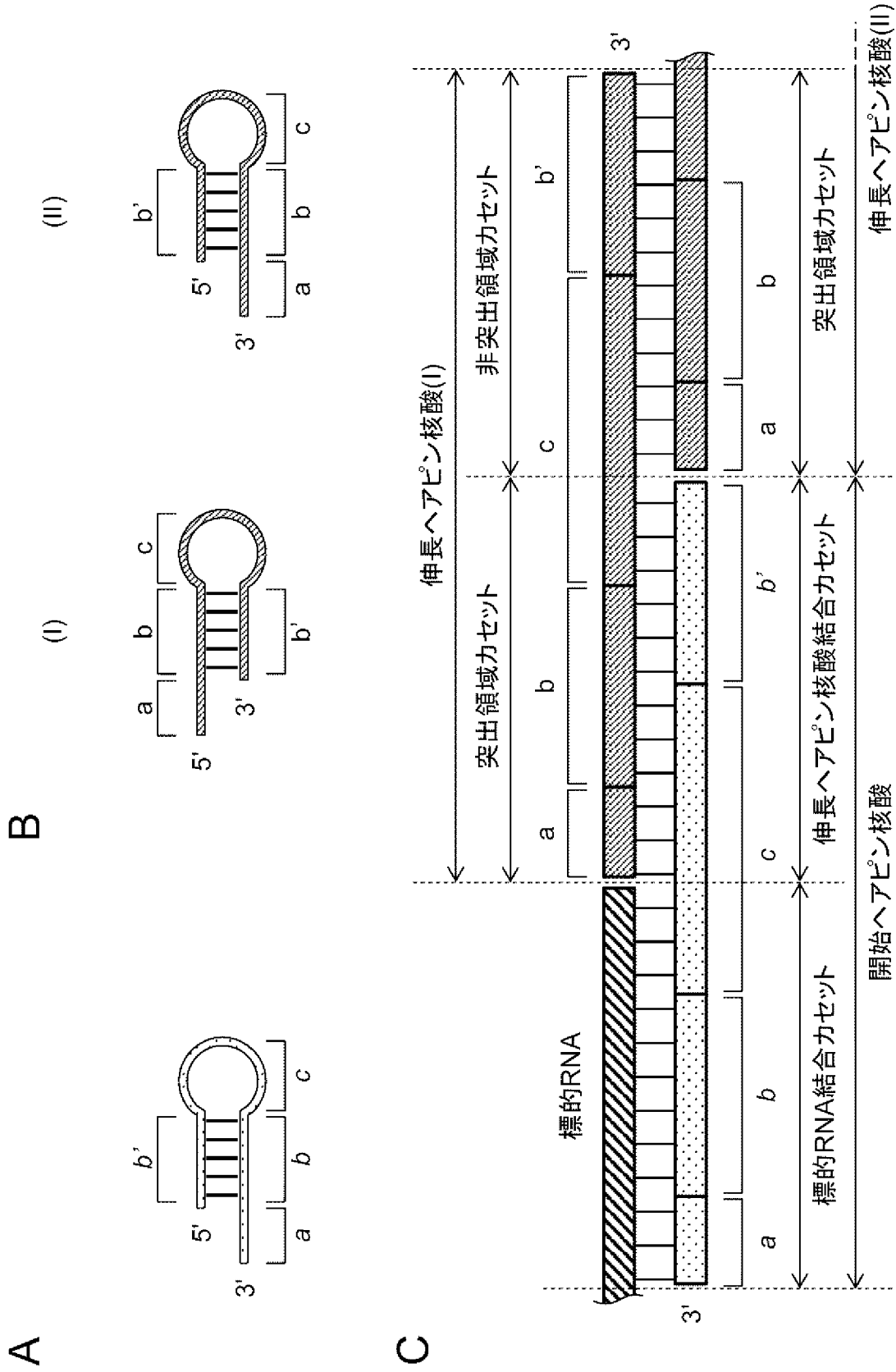
[請求項14] がん、免疫系疾患、及び神経変性疾患からなる群から選択される疾患を治療するための、請求項 13 に記載の医薬組成物。

[請求項15] ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能なヘアピン構造を有するヘアピン核酸を含む抗癌剤であって、標的RNAとハイブリダイズする開始ヘアピン核酸、及び、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核酸を含むことを特徴とする抗癌剤。

[請求項16] ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能なヘアピン構造を有するヘアピン核酸を含む抗炎症剤であって、標的RNAとハイブリダイズする開始ヘアピン核酸、及び、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核酸を含むことを特徴とする抗炎症剤。

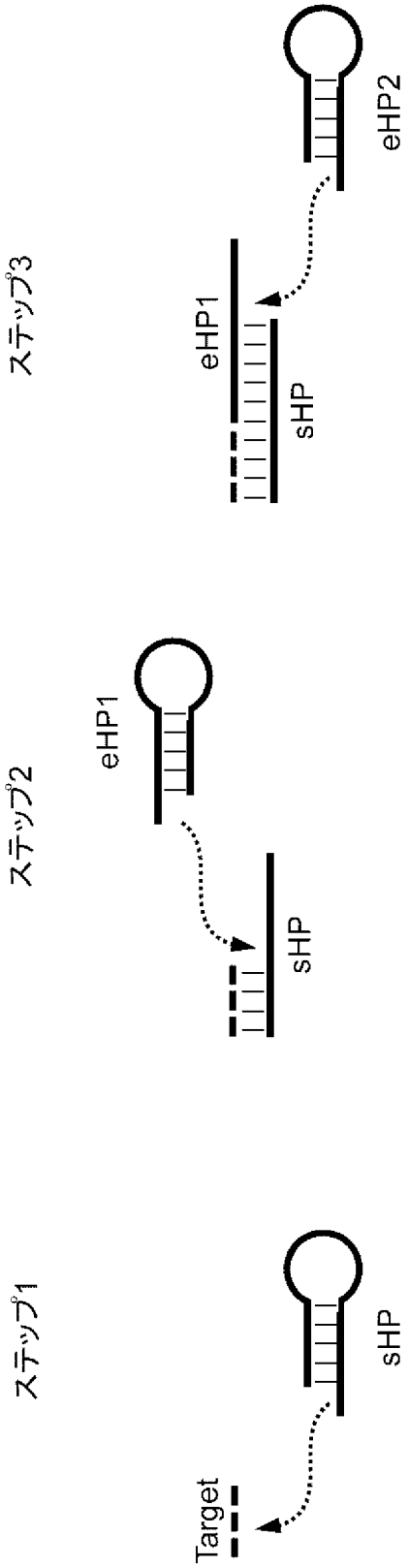
[請求項17] ハイブリダイゼーション連鎖構造を形成可能なヘアピン構造を有する、開始ヘアピン核酸及び伸長ヘアピン核酸を含む組成物であって、
 前記開始ヘアピン核酸は、標的RNAとハイブリダイズする標的RNA結合カセット、及び前記伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする伸長ヘアピン核酸結合カセットを含み、
 前記伸長ヘアピン核酸は、前記開始ヘアピン核酸又は他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする突出領域カセット、及びさらに他の伸長ヘアピン核酸とハイブリダイズする非突出領域カセットを含み、
 前記開始ヘアピン核酸及び／又は伸長ヘアピン核酸が、タンパク質結合モチーフの全部又は一部をさらに含む、組成物。

[図1]

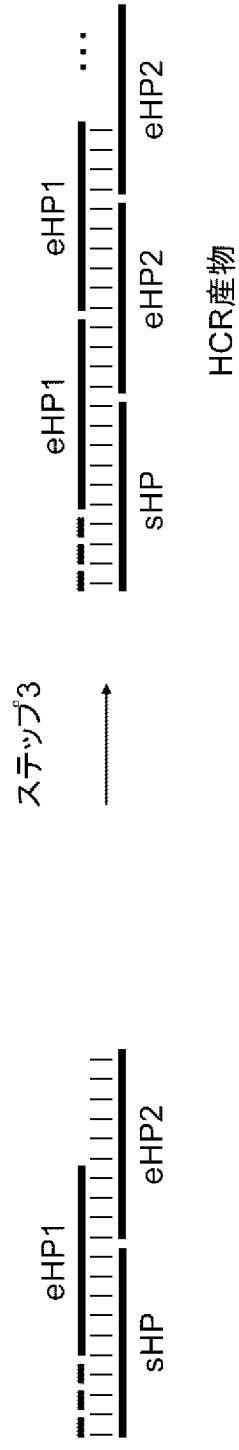


[図2]

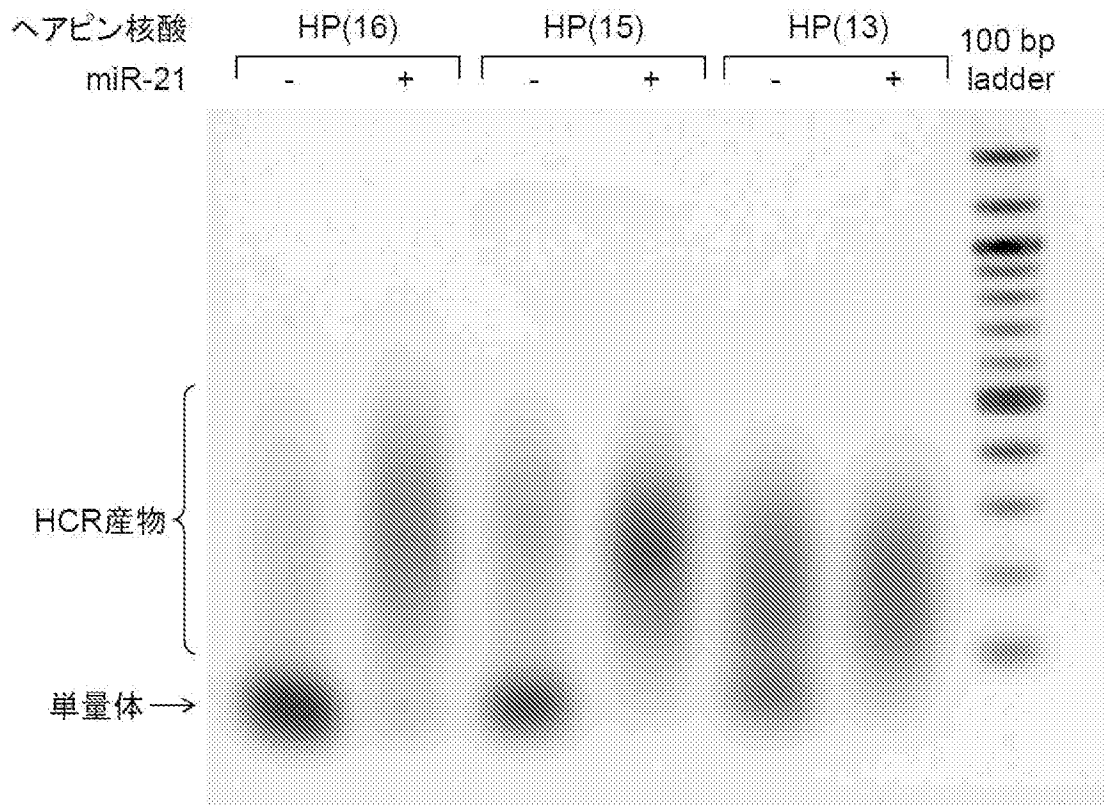
A



B

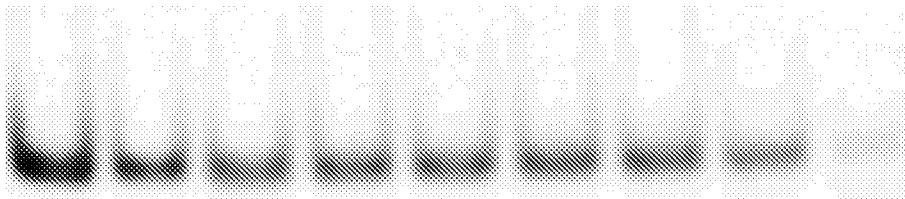


[図3]

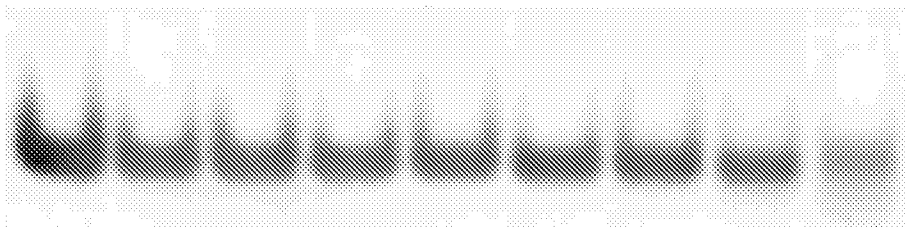


[図4]

HP1(16)



HP2(16)

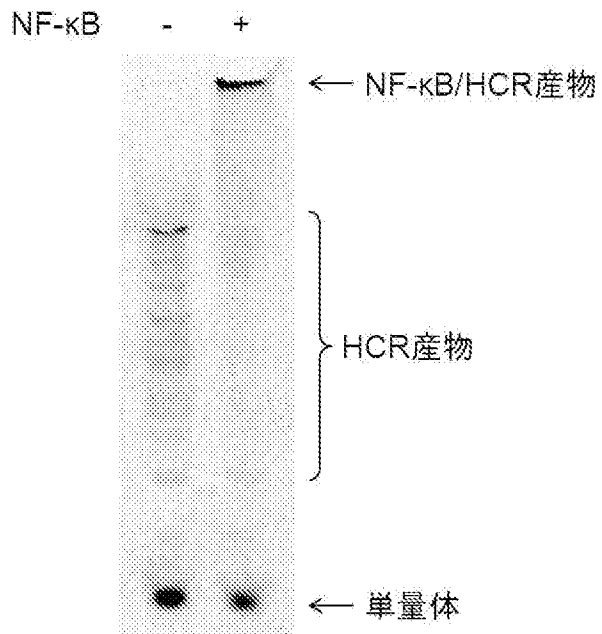


0 1 10 30 60 120 180 360 1日

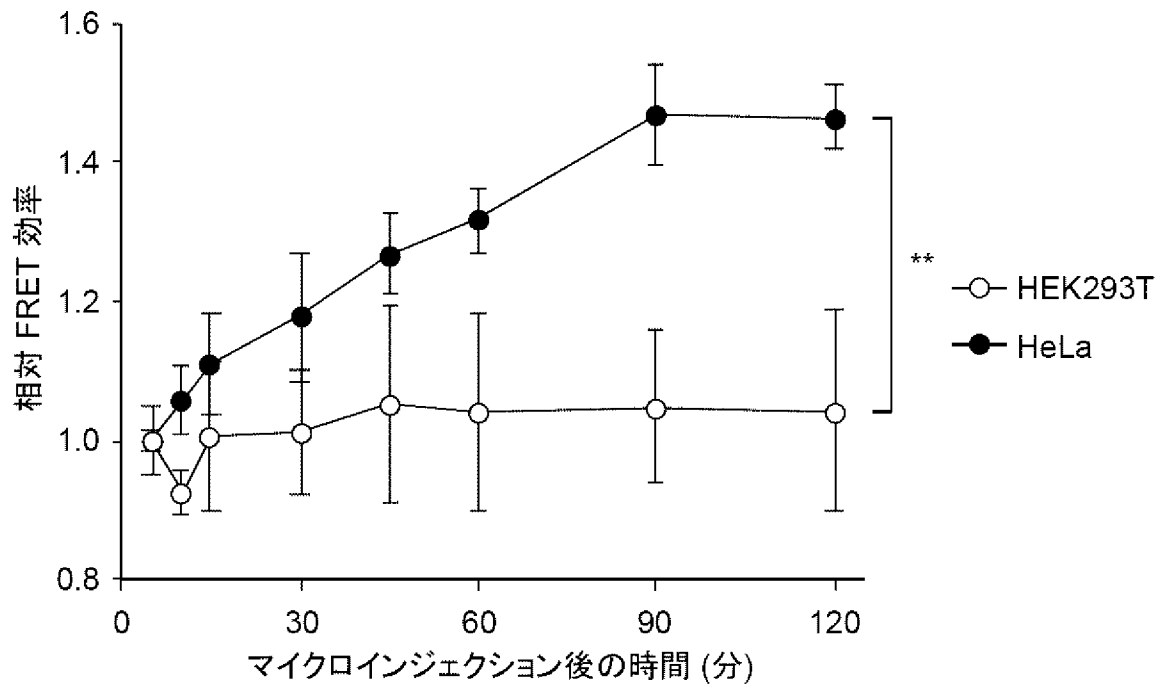
分

反応時間

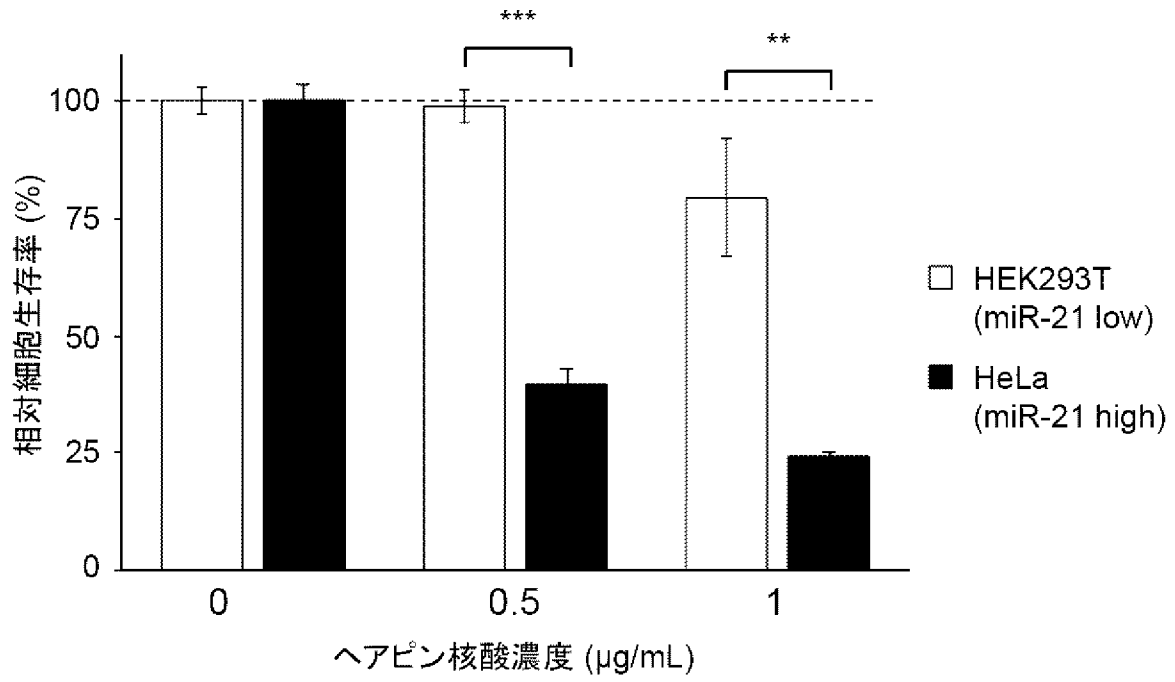
[図5]



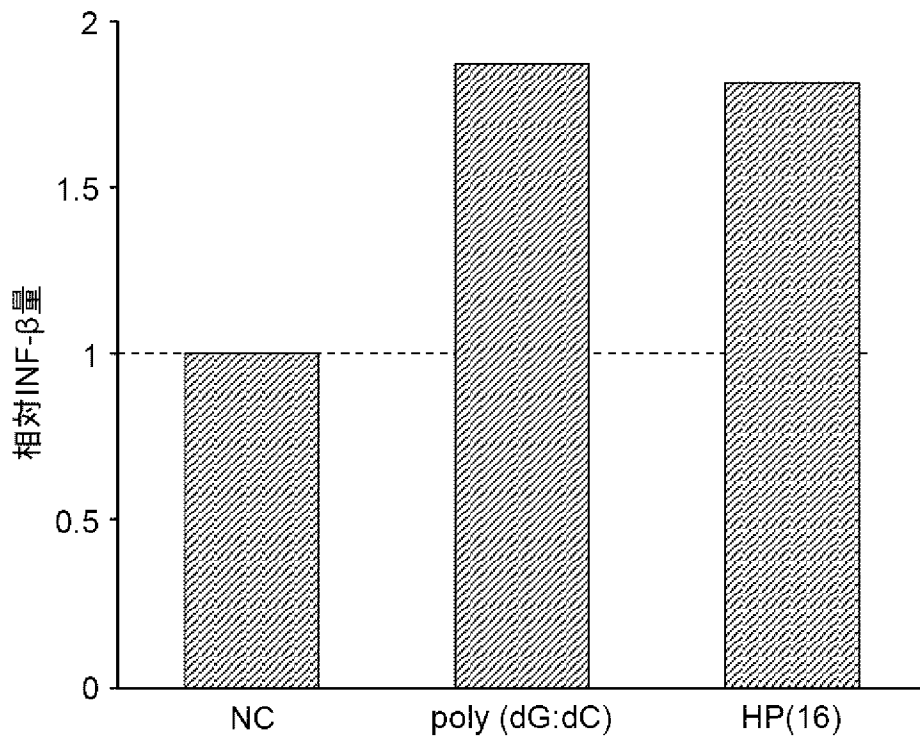
[図6]



[図7]

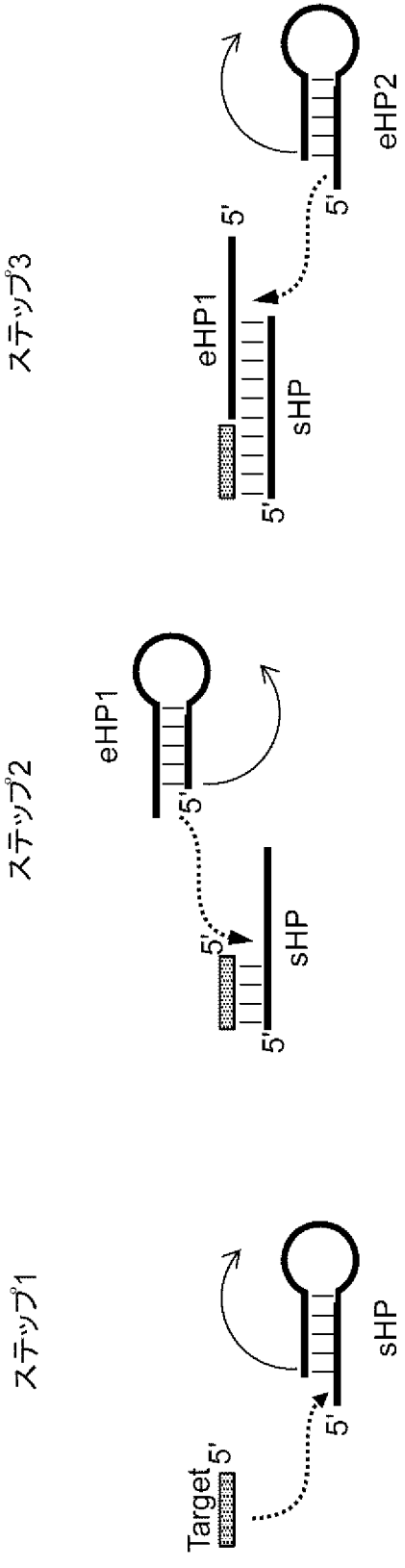


[図8]

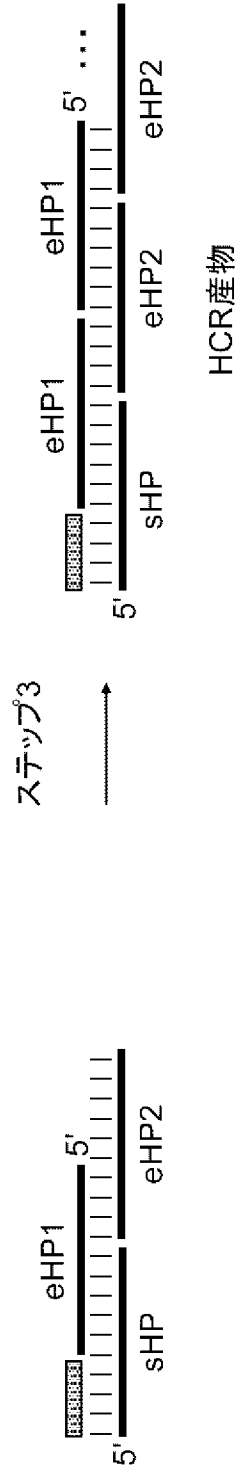


[図9]

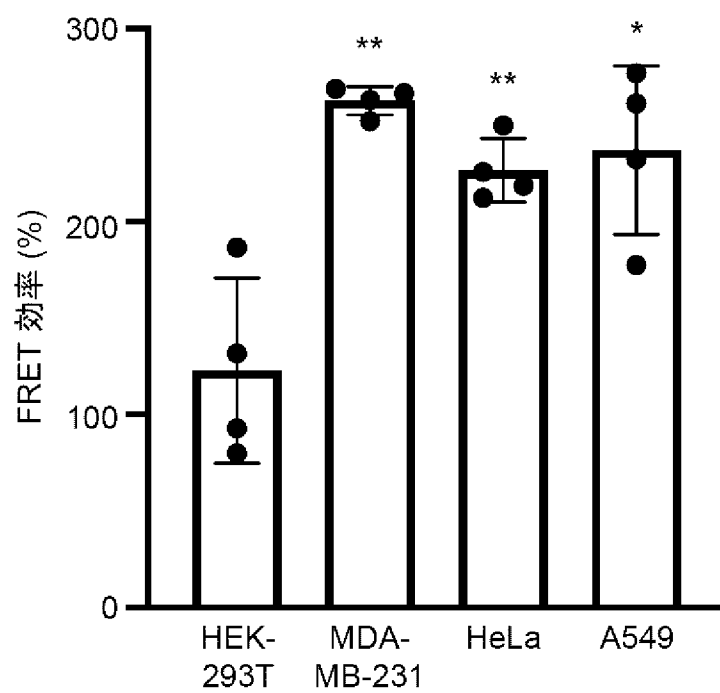
A



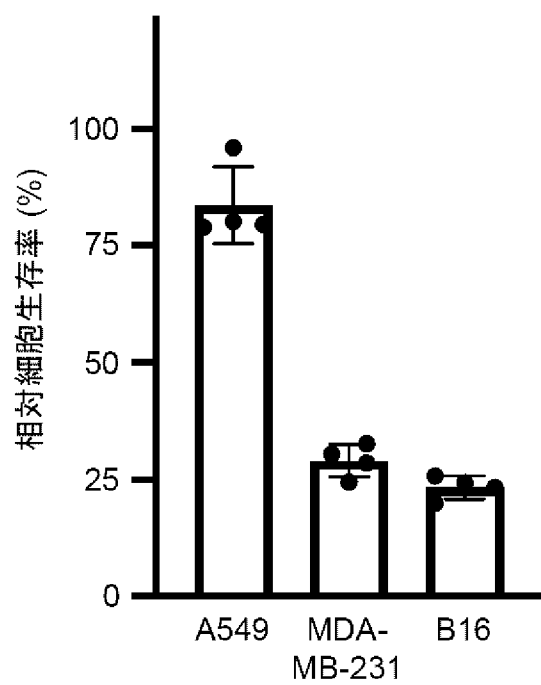
B



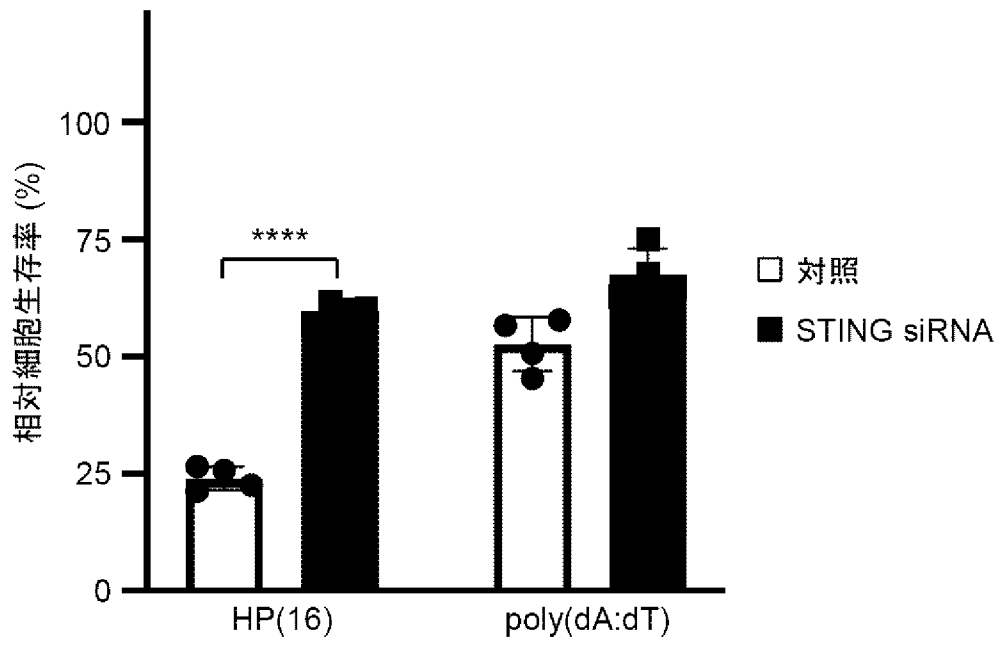
[図10]



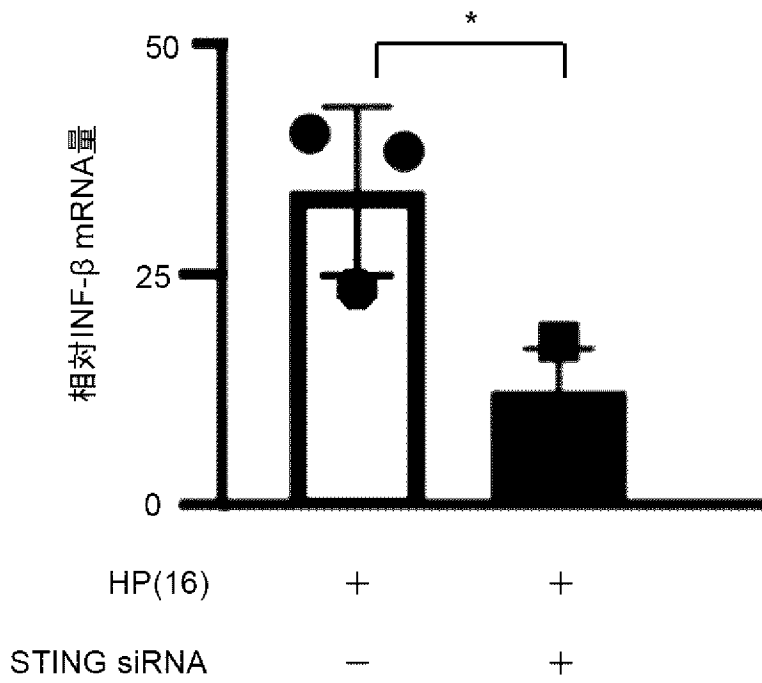
[図11]



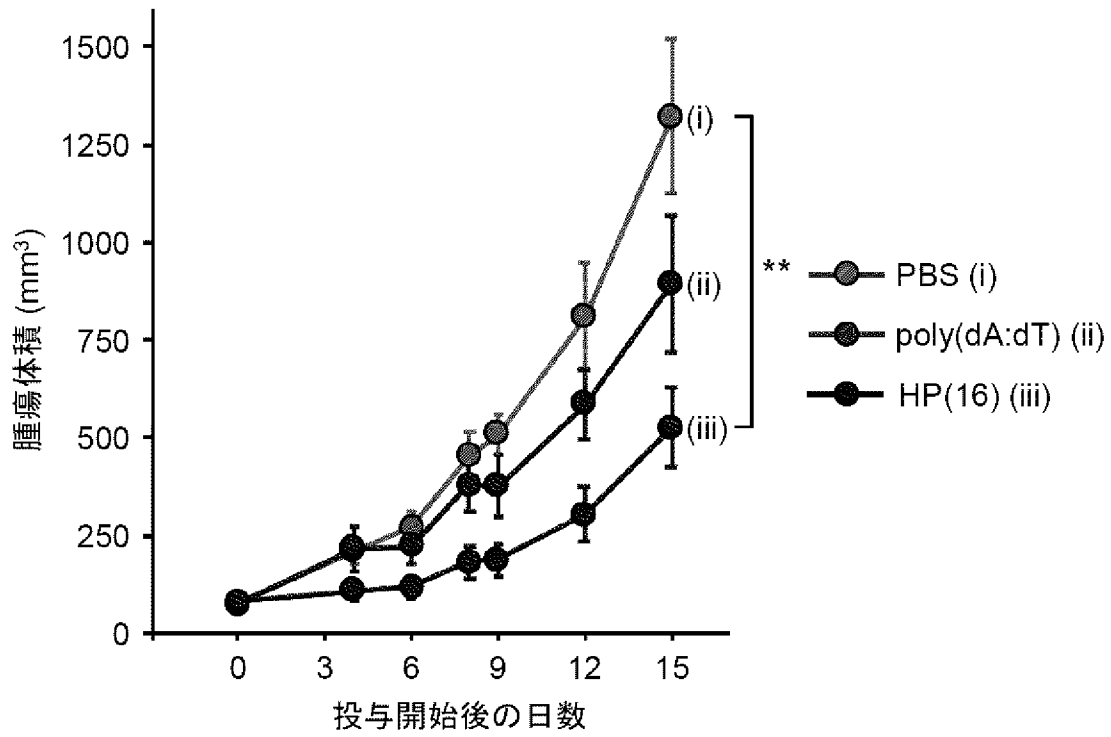
[图12]



[图13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/026323

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|---|--|--|
| <p>A61K 31/713(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i FI: A61K31/713; A61P25/28; A61P35/00; A61P37/02; C12N15/11 Z ZNA</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) A61K31/713; A61P25/28; A61P35/00; A61P37/02; C12N15/11 | | |
| 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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/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 | US 2007/0087334 A1 (DIRKS, Robert. PIERCE, Niles A.) 19 April 2007 (2007-04-19) claims 17-18, paragraph [0036], examples 1, 3 | 1-15, 17 |
| X | VENKATARAMAN, Suvir et al. Selective cell death mediated by small conditional RNAs. PNAS. 07 September 2010, vol. 107, pp. 16777-16782, supporting information, <DOI: 10.1073/pnas.1006377107> abstract, fig. 1, supporting information | 1-9, 11-15, 17 |
| A | DIRKS, Robert M. et al. Retraction. PNAS. 17 December 2012, vol. 110, p. 384, <DOI: 10.1073/pnas.1221212110> entire text | 1-17 |
| X | PATEL, Kalpesh. KERN, Scott E. "Selective cell death mediated by small conditional RNAs" is not selective. Cancer Biology & Therapy. 31 May 2013, vol. 14, pp. 693-696, <DOI: 10.4161/cbt.25093> abstract, pp. 695-696 | 1-9, 11-15, 17 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 08 September 2022 | | Date of mailing of the international search report 20 September 2022 |
| 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. |

| 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, 倉田奨励金研究報告書 [online], vol. 49, receipt no.1384, 01 September 2020, [retrieved on 05 September 2022], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.hitachi-zaidan.org/activities/kurata/reseach-report49.html > entire text, (MORIHIRO, Kunihiro), non-official translation (Creation of microRNA-responsive decoy type nucleic acid drugs using DNA nanotechnology. Research Report of The Kurata Grants [online].) | 1-17 |
| Y | 森廣 邦彦, タンデムリピート長鎖DNAの細胞内化学構築, ACT-X 年次報告書 [online], 研究領域「生命と化学」2019年度研究年報, 2020, [retrieved on 05 September 2022], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.jst.go.jp/kisoken/act-x/evaluation/nenpou/r01/r01_02.html > entire text, (MORIHIRO, Kunihiro), non-official translation (Intracellular chemical construction of tandem repeated-long chain DNA. ACT-X Annual Report [online]. Research Area "Life and Chemistry" Annual Research Report 2019.) | 1-17 |
| Y | US 2009/0227661 A1 (WANG, Zhiguo) 10 September 2009 (2009-09-10) examples | 1-17 |
| Y | 大住 拓輝, Multiple decoy construction system responding to microRNA. (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], 21 October 2020, [retrieved on 17 March 2021], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.todaibio.info/ > entire text, non-official translation (OSUMI, Hiroki. Abstracts of 20th Life Science Symposium Poster Presentation of University of Tokyo [online].) | 1-17 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/026323

| Patent document cited in search report | | | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | | | Publication date (day/month/year) |
|--|--------------|----|-----------------------------------|-------------------------|-------------|----|-----------------------------------|
| US | 2007/0087334 | A1 | 19 April 2007 | WO | 2007/044727 | A2 | |
| | | | | EP | 1931806 | A2 | |
| US | 2009/0227661 | A1 | 10 September 2009 | WO | 2007/071069 | A1 | |

| <p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 31/713(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i FI: A61K31/713; A61P25/28; A61P35/00; A61P37/02; C12N15/11 Z ZNA</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）） A61K31/713; A61P25/28; A61P35/00; A61P37/02; C12N15/11</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） 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>US 2007/0087334 A1 (DIRKS, Robert & PIERCE, Niles A.) 19.04.2007 (2007-04-19) 請求項17-18, 段落0036, 実施例1, 3</td> <td>1-15, 17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>VENKATARAMAN, Suvir et al., Selective cell death mediated by small conditional RNAs, PNAS, 2010.09.07, Vol. 107, pp. 16777-16782, supporting information, <DOI: 10.1073/pnas.1006377107> 要約, 図1, 補足情報</td> <td>1-9, 11-15, 17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>DIRKS, Robert M. et al., Retraction, PNAS, 2012.12.17, Vol. 110, p. 384, <DOI: 10.1073/pnas.1221212110> 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>PATEL, Kalpesh & KERN, Scott E., "Selective cell death mediated by small conditional RNAs" is not selective, Cancer Biology & Therapy, 2013.05.31, Vol. 14, pp. 693-696, <DOI: 10.4161/cbt.25093> 要約, 第695-696ページ</td> <td>1-9, 11-15, 17</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 | US 2007/0087334 A1 (DIRKS, Robert & PIERCE, Niles A.) 19.04.2007 (2007-04-19) 請求項17-18, 段落0036, 実施例1, 3 | 1-15, 17 | X | VENKATARAMAN, Suvir et al., Selective cell death mediated by small conditional RNAs, PNAS, 2010.09.07, Vol. 107, pp. 16777-16782, supporting information, <DOI: 10.1073/pnas.1006377107> 要約, 図1, 補足情報 | 1-9, 11-15, 17 | A | DIRKS, Robert M. et al., Retraction, PNAS, 2012.12.17, Vol. 110, p. 384, <DOI: 10.1073/pnas.1221212110> 全文 | 1-17 | X | PATEL, Kalpesh & KERN, Scott E., "Selective cell death mediated by small conditional RNAs" is not selective, Cancer Biology & Therapy, 2013.05.31, Vol. 14, pp. 693-696, <DOI: 10.4161/cbt.25093> 要約, 第695-696ページ | 1-9, 11-15, 17 |
| 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 | US 2007/0087334 A1 (DIRKS, Robert & PIERCE, Niles A.) 19.04.2007 (2007-04-19) 請求項17-18, 段落0036, 実施例1, 3 | 1-15, 17 | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | VENKATARAMAN, Suvir et al., Selective cell death mediated by small conditional RNAs, PNAS, 2010.09.07, Vol. 107, pp. 16777-16782, supporting information, <DOI: 10.1073/pnas.1006377107> 要約, 図1, 補足情報 | 1-9, 11-15, 17 | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | DIRKS, Robert M. et al., Retraction, PNAS, 2012.12.17, Vol. 110, p. 384, <DOI: 10.1073/pnas.1221212110> 全文 | 1-17 | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | PATEL, Kalpesh & KERN, Scott E., "Selective cell death mediated by small conditional RNAs" is not selective, Cancer Biology & Therapy, 2013.05.31, Vol. 14, pp. 693-696, <DOI: 10.4161/cbt.25093> 要約, 第695-696ページ | 1-9, 11-15, 17 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <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</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>08.09.2022</p> | <p>国際調査報告の発送日</p> <p>20.09.2022</p> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>名称及びあて先</p> <p>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</p> | <p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>木原 啓一郎 4B 4867</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</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 |
| 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, 倉田奨励金研究報告書 [online], 第49集, 受領No.1384, 2020.09.01, [retrieved on 2022.09.05], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.hitachi-zaidan.org/activities/kurata/reseach-report49.html > 全文 | 1-17 |
| Y | 森廣 邦彦, タンデムリピート長鎖DNAの細胞内化学構築, ACT-X 年次報告書 [online], 研究領域「生命と化学」2019年度研究年報, 2020, [retrieved on 2022.09.05], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.jst.go.jp/kisoken/act-x/evaluation/nenpou/r01/r01_02.html > 全文 | 1-17 |
| Y | US 2009/0227661 A1 (WANG, Zhiguo) 10.09.2009 (2009 - 09 - 10) 実施例 | 1-17 |
| Y | 大住 拓輝, Multiple decoy construction system responding to microRNA (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], 2020.10.21, [retrieved on 2021.03.17], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.todaibio.info/ > 全文 | 1-17 |

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/JP2022/026323

| 引用文献 | | | 公表日 | パテントファミリー文献 | | | 公表日 |
|------|--------------|----|------------|-------------|-------------|----|-----|
| US | 2007/0087334 | A1 | 19.04.2007 | WO | 2007/044727 | A2 | |
| | | | | EP | 1931806 | A2 | |
| US | 2009/0227661 | A1 | 10.09.2009 | WO | 2007/071069 | A1 | |