明　細　書

発明の名称 ：

遺伝子発現制御のための人工マッチ型ｍｉＲＮＡおよびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子発現を抑制する人工マッチ型ｍｉＲＮＡおよびその用途に関する。

背景技術

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

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

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：ＷＯ　２０１０／０５６７３７　Ａ２

非特許文献

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

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

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 前記ｍｉＲＮＡを応用するにあたっては、例えば、二本鎖の成熟ｍｉＲＮＡを使用する方法等がある。しかし、この方法は、使用に先立って、二本の一本鎖核酸分子をアニーリングする必要があり、また、二本鎖を認識するＴＬＲ３等によって自己免疫を発生する可能性がある。

[0007] そこで、本発明は、ｍｉＲＮＡを利用した新たな人工マッチ型ｍｉＲＮＡの提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 前記目的を達成するために、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、

Ｘ領域とＹ領域とを有する一本鎖核酸であり、

前記Ｘ領域の３’末端と前記Ｙ領域の５’末端とが、非ヌクレオチド構造のリンカー領域を介して連結し、

前記Ｘ領域は、成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列を含み、

前記Ｙ領域は、前記Ｘ領域と完全に相補な配列を含むことを特徴とする。

[0009] 本発明の組成物は、遺伝子の発現を抑制するための組成物であって、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを含むことを特徴とする。

[0010] 本発明の組成物は、薬学的組成物であって、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを含むことを特徴とする。

[0011] 本発明の発現抑制方法は、標的遺伝子の発現を抑制する方法であって、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを使用することを特徴とする。

[0012] 本発明の疾患の治療方法は、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを、患者に投与する工程を含み、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおける前記ガイド鎖配列が、前記疾患に関与する遺伝子の発現を抑制する成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列であることを特徴とする。

発明の効果

[0013] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡによれば、容易に低コストで合成でき、且つ、前記遺伝子がコードするタンパク質の翻訳の抑制が可能である。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図１は、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡの一例を示す概略図である。

[図2]図２は、本発明の実施例１におけるウェルあたりの細胞数を示すグラフである。

[図3]図３は、本発明の実施例１における細胞増殖の相対値を示すグラフである。

[図4]図４は、本発明の実施例１におけるアポトーシスの割合を示すグラフである。

[図5]図５は、本発明の実施例１におけるＡＸＬ　ｍＲＮＡ量およびＭＥＴ　ｍＲＮＡ量の相対値を示すグラフである。

[図6]図６は、本発明の実施例２におけるＡＸＬ　ｍＲＮＡ量の相対値を示すグラフである。

[図7]図７は、本発明の実施例２におけるＭＥＴ　ｍＲＮＡ量の相対値を示すグラフである。

[図8]図８は、本発明の実施例３におけるＡＸＬ　ｍＲＮＡ量の相対値を示すグラフである。

[図9]図９は、本発明の実施例３におけるＭＥＴ　ｍＲＮＡ量の相対値を示すグラフである。

[図10]図１０は、本発明の実施例４におけるＨＭＧＡ２　ｍＲＮＡ量の相対値を示すグラフである。

[図11]図１１は、本発明の実施例５におけるＣＯＬＡ１　ｍＲＮＡ量の相対

値を示すグラフである。

発明を実施するための形態

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

[0016] （１）人工マッチ型ｍｉＲＮＡ

本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、前述のように、

Ｘ領域とＹ領域とを有する一本鎖核酸であり、

前記Ｘ領域の３’末端と前記Ｙ領域の５’末端とが、非ヌクレオチド構造のリンカー領域を介して連結し、

前記Ｘ領域は、成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列を含み、

前記Ｙ領域は、前記Ｘ領域と完全に相補な配列を含むことを特徴とする。

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

[0018] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、一本鎖の核酸分子であるため、例えば、成熟ｍｉＲＮＡのように二本の一本鎖をアニーリングする必要もなく、安価に製造できる。さらに、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、一本鎖の核酸分子であるため、例えば、自己免疫に関与するＴＬＲ３、ＲＩＧ-Ｉ、ＭＤＡ５等に認識されることも回避できる。

[0019] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおける前記Ｘ領域および前記Ｙ領域の配置関係の概略を、図１に示す。なお、図１は、概略であって、例えば、各領域の長さ、形状等は、制限されない。本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは

、図１に示すように、５’側に前記Ｘ領域が配置され、３’側に前記Ｙ領域が配置され、前記Ｘ領域の３’末端と前記Ｙ領域の５’末端とが、非ヌクレオチド構造のリンカー領域（図において「Ｐ」で表す）を介して連結している。

[0020] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記Ｙ領域は、前記Ｘ領域と完全に相補な配列を含むため、前記Ｘ領域と前記Ｙ領域とは、例えば、分子内アニーリングする。分子内アニーリングとは、例えば、自己アニーリングともいう。本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、前記分子内アニーリングした領域において、二本鎖が形成されるともいう。

[0021] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、その５’末端と３’末端とが未連結である、線状一本鎖核酸分子ということもできる。本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、例えば、両末端の未結合の維持のため、５’末端が非リン酸基であることが好ましい。

[0022] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記Ｘ領域は、前述のように、成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列を含む。成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列は、例えば、各種データベースに登録されている（例えば、http://www.mirbase.org/等）。したがって、例えば、これらの公知の成熟ｍｉＲＮＡの情報に基づいて、前記Ｘ領域を設定できる。前記成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖とは、RNA-induced silencing complex（ＲＩＳＣ）のArgonaute（Ａｇｏ）タンパク質に取り込まれ、ターゲットのｍＲＮＡに結合する鎖である。

[0023] 前記Ｘ領域は、例えば、前記ガイド鎖配列のみからなってもよいし、さらに付加配列を有してもよい。後者の場合、前記Ｘ領域は、例えば、前記ガイド鎖配列と前記付加配列とからなり、前記付加配列は、例えば、前記ガイド鎖配列の３’末端に連結している。

[0024] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記Ｙ領域は、前記Ｘ領域と前記Ｙ領域とをアライメントした際、前記Ｘ領域と完全に相補な配列を含む。前記Ｙ領域は、例えば、前記Ｘ領域と完全に相補的な配列のみからなってもよいし、前記相補的な配列の他に、さらにオーバーハングを有してもよい

。すなわち、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、例えば、前記Ｙ領域と前記Ｘ領域とをアライメントした際に、前記Ｙ領域が、３’末端にオーバーハングを有してもよい。ここで、前記Ｙ領域のオーバーハングとは、例えば、前記Ｙ領域と前記Ｘ領域とをアライメントした場合に、前記Ｙ領域が前記Ｘ領域よりも過剰に有する末端の塩基である。オーバーハングの長さ（Ｏ）は、例えば、下記式で表すことができる。

オーバーハングの長さ（Ｏ）＝［Ｙ領域の全長の塩基数（Ｙ）］－［Ｘ領域の全長の塩基数（Ｘ）］

[0025] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、各領域の長さは、特に制限されない。以下に、条件を例示するが、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、これらの記載には限定されない。また、本発明において、塩基の数値範囲は、その範囲に属する正の整数を全て開示するものであり、例えば、「１～４塩基」との記載は、「１、２、３、４塩基」の全ての開示を意味する（以下、同様）。

[0026] 前記Ｘ領域において、前記ガイド鎖配列の長さは、特に制限されず、例えば、報告されている成熟ｍｉＲＮＡにおけるガイド鎖配列の長さが例示できる。具体例として、下限が、例えば、１９塩基長、２０塩基長であり、上限が、例えば、２５塩基長、２４塩基長であり、範囲が、例えば、１９～２５塩基長、２０～２４塩基長である。

[0027] 前記Ｘ領域における前記付加配列の長さは、特に制限されず、下限が、例えば、０塩基長、１塩基長、２塩基長であり、上限が、例えば、５塩基長、４塩基長、３塩基長であり、範囲が、例えば、０～５塩基長、１～５塩基長、１～４塩基長、２～３塩基長、３～５塩基長である。

[0028] 前記Ｘ領域の長さは、特に制限されず、下限が、例えば、１９塩基長、２１塩基長、２３塩基長であり、上限が、例えば、３０塩基長、２８塩基長、２６塩基長であり、範囲が、例えば、１９～３０塩基長、２１～２８塩基長、２３～２６塩基長である。

[0029] 前記Ｙ領域における前記オーバーハングの長さは、特に制限されず、下限

が、例えば、０塩基長、１塩基長であり、上限が、例えば、４塩基長、３塩基長であり、範囲が、例えば、０～４塩基長、１～３塩基長、２塩基長である。

[0030] 前記オーバーハングの配列は、特に制限されず、例えば、3’側から、ＵＵ、ＣＵ、ＧＣ、ＵＡ、ＡＡ、ＣＣ、ＵＧ、ＣＧ、ＡＵ、ＴＴ等が例示できる。前記オーバーハングは、例えば、ＴＴとすることで、ＲＮＡ分解酵素に対する耐性を付加できる。

[0031] 前記Ｙ領域の長さは、特に制限されず、下限が、例えば、１９塩基長、２１塩基長、２３塩基長であり、上限が、例えば、３２塩基長、３０塩基長、２８塩基長であり、範囲が、例えば、１９～３２塩基長、２１～３０塩基長、２３～２８塩基長である。

[0032] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡの全長（Ｔ）は、特に制限されず、下限が、例えば、３８塩基長、４２塩基長、４６塩基長であり、上限が、例えば、６２塩基長、５８塩基長、５４塩基長であり、範囲が、例えば、３８～６２塩基長、４２～５８塩基長、４６～５４塩基長である。

[0033] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記成熟ｍｉＲＮＡの種類は、特に制限されず、標的とする遺伝子の種類に応じて、適宜選択できる。

[0034] 前記成熟ｍｉＲＮＡとしては、例えば、ｈｓａ－ｍｉＲ－３４ａ（配列番号１）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ（配列番号２）、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ（配列番号３）、ｈｓａ－ｍｉＲ－１５０（配列番号４）、ｈｓａ－ｍｉＲ－２９ｂ（配列番号５）等の成熟ｍｉＲＮＡがあげられる。

ｈｓａ－ｍｉＲ－３４ａ（配列番号１）

UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU

ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａ（配列番号２）

UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU

ｈｓａ－ｌｅｔ－７ｆ（配列番号３）

UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU

ｈｓａ－ｍｉＲ－１５０（配列番号４）

UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG

ｈｓａ－ｍｉＲ－２９ｂ（配列番号５）

UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU

ここで、各配列番号で示されるヌクレオチド配列は、ガイド鎖配列を示す。

[0035] ｍｉＲ－３４ａのガイド鎖は、例えば、ＡＸＬ、ＭＥＴ、ＣＤＫ４、ＣＤＫ６、ＳＩＲＴ１、ＣＣＮＤ１、ＳＩＲＴ１、ＢＣＬ－２等をターゲットとし、これらの標的遺伝子の発現抑制により、例えば、肺がん、大腸がん、胃がん、肝がん、乳がん等の疾患を予防または治療できる。

ｌｅｔ－７ａのガイド鎖は、例えば、ＨＭＧＡ２（high mobility group AT-hook 2）、ＫＲＡＳ、ＮＲＡＳ、ＨＲＡＳ、ＭＹＣ、ＴＬＲ４等をターゲットとし、これらの標的遺伝子の発現抑制により、例えば、肺がん、大腸がん、胃がん、肝がん、乳がん等の疾患を予防または治療できる。

ｌｅｔ－７ｆのガイド鎖は、例えば、ＨＭＧＡ２（high mobility group AT-hook 2）、ＫＲＡＳ、ＮＲＡＳ、ＨＲＡＳ、ＭＹＣ、ＴＬＲ４等をターゲットとし、これらの標的遺伝子の発現抑制により、例えば、肺がん、大腸がん、胃がん、肝がん、乳がん等の疾患を予防または治療できる。

ｍｉＲ－１５０のガイド鎖は、例えば、ＣＯＬ１Ａ１、ＣＯＬ４Ａ４、ＳＭＡＤ２、ＳＰ１等をターゲットとし、これらの標的遺伝子の発現抑制により、例えば、肺線維症、肝線維症等の疾患を予防または治療できる。

ｍｉＲ－２９ｂのガイド鎖は、例えば、ＣＯＬ１Ａ１、ＭＣＬ１、ＤＮＭＴ３Ａ、ＤＮＭＴ３Ｂ、ＴＣＬ１Ａ、ＴＧＦｂ３等をターゲットとし、これらの標的遺伝子の発現抑制により、例えば、肺がん、大腸がん、胃がん、肝がん、乳がん、肺線維症、肝線維症等の疾患を予防または治療できる。

[0036] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡの構成単位は、特に制限されず、例えば、ヌクレオチド残基があげられる。前記ヌクレオチド残基は、例えば、リボヌクレオチド残基およびデオキシリボヌクレオチド残基があげられる。本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記ヌクレオチド残基は、例えば、

リボヌクレオチド残基が好ましい。前記ヌクレオチド残基は、例えば、修飾されていない非修飾ヌクレオチド残基および修飾された修飾ヌクレオチド残基があげられる。本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、例えば、前記修飾ヌクレオチド残基を含むことによって、ヌクレアーゼ耐性を向上し、安定性を向上可能である。また、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、例えば、前記ヌクレオチド残基の他に、さらに、非ヌクレオチド残基を含んでもよい。

[0037] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡが、例えば、前記非修飾リボヌクレオチド残基の他に前記修飾リボヌクレオチド残基を含む場合、前記修飾リボヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「１個もしくは数個」であり、具体的には、例えば、１～５個、好ましくは１～４個、より好ましくは１～３個、最も好ましくは１または２個である。前記非修飾リボヌクレオチド残基に対する前記修飾リボヌクレオチド残基は、例えば、リボース残基がデオキシリボース残基に置換された前記デオキシリボヌクレオチド残基であってもよい。本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡが、例えば、前記非修飾リボヌクレオチド残基の他に前記デオキシリボヌクレオチド残基を含む場合、前記デオキシリボヌクレオチド残基の個数は、特に制限されず、例えば、「１もしくは数個」であり、具体的には、例えば、１～５個、好ましくは１～４個、より好ましくは１～３個、最も好ましくは１または２個である。

[0038] 前記ヌクレオチド残基は、例えば、構成要素として、糖、塩基およびリン酸を含む。前記リボヌクレオチド残基は、例えば、糖としてリボース残基を有し、塩基として、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）およびＵ（ウラシル）を有し、前記デオキシリボース残基は、例えば、糖としてデオキシリボース残基を有し、塩基として、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）およびチミン（Ｔ）を有する。

[0039] 前記非修飾ヌクレオチド残基は、前記各構成要素が、例えば、天然に存在するものと同一または実質的に同一であり、具体的には、例えば、人体において天然に存在するものと同一または実質的に同一である。

[0040] 前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、前記未修飾ヌクレオチド残基の構

成要素のいずれが修飾されてもよい。前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、天然に存在するヌクレオチド残基、人工的に修飾したヌクレオチド残基等があげられる。

[0041] 前記修飾ヌクレオチド残基は、例えば、前記未修飾ヌクレオチドの代替物の残基であってもよい。前記代替物は、例えば、人工核酸モノマー残基があげられる。具体例として、例えば、ＰＮＡ（ペプチド核酸）、ＬＮＡ（Ｌｏｃｋｅｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ）、ＥＮＡ（２’－Ｏ，４’－Ｃ－Ｅｔｈｙｌｅｎｅｂｒｉｄｇｅｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ）等があげられる。

[0042] 前記ヌクレオチド残基において、前記塩基は、特に制限されない。前記塩基は、例えば、天然の塩基でもよいし、非天然の塩基でもよい。前記塩基は、例えば、天然由来でもよいし、合成品でもよい。前記塩基は、例えば、一般的な塩基、その修飾アナログ等が使用できる。

[0043] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記非ヌクレオチド構造のリンカー領域は、アミノ酸残基、ポリアミン残基、およびポリカルボン酸残基からなる群から選択される少なくとも一つを含むことが好ましい。前記リンカー領域は、アミノ酸残基、ポリアミン残基、およびポリカルボン酸残基以外の残基を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。例えば、前記リンカー領域は、ポリカルボン酸残基、テレフタル酸残基またはアミノ酸残基のいずれかを含むものであってよい。

[0044] 本発明において、「ポリアミン」は、アミノ基を複数（２つ、または３つ以上）含む任意の化合物をいう。前記「アミノ基」は、－NH_2基に限定されず、イミノ基（－ＮＨ－）も含む。本発明において、前記ポリアミンは、特に限定されないが、例えば、１，４－ジアミノベンゼン、１，３－ジアミノベンゼン、１，２－ジアミノベンゼン等が挙げられる。また、本発明において、「ポリカルボン酸」は、カルボキシ基を複数（２つ、または３つ以上）含む任意の化合物をいう。本発明において、前記ポリカルボン酸は、特に限定されないが、例えば、１，４－ジカルボキシベンゼン（テレフタル酸）、

１，３－ジカルボキシベンゼン（イソフタル酸）、１，２－ジカルボキシベンゼン（フタル酸）等が挙げられる。また、本発明において、「アミノ酸」は、後述するように、分子中にアミノ基およびカルボキシ基をそれぞれ１つ以上含む任意の有機化合物をいう。前記「アミノ基」は、－ＮＨ$_2$基に限定されず、イミノ基（－ＮＨ－）も含む。

[0045] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記アミノ酸残基は、複数のアミノ酸残基が連結したものであってもよい。なお、本発明において、複数のアミノ酸残基が連結したアミノ酸残基とは、例えば、ペプチド構造を含む残基をいう。より具体的には、前記複数のアミノ酸残基が連結したアミノ酸残基は、例えば、後述する化学式（Ｉ）のアミノ酸残基において、後述する化学式（Ｉａ）がペプチド（例えば、グリシン二量体またはグリシン三量体等）であるアミノ酸残基をいう。

[0046] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記アミノ酸残基は、グリシン残基、テレフタル酸アミド残基、プロリン残基またはリシン残基であってもよい。また、前記アミノ酸残基は、修飾アミノ酸残基またはアミノ酸の誘導体であってもよい。

[0047] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記リンカー領域は、例えば、下記化学式（Ｉ－Ｏ）で表わされる。

[0048] [化1]



（Ｉ－Ｏ）

[0049] 前記化学式（Ｉ－Ｏ）中、

Ｑ１１およびＱ１２は、それぞれ独立して、単結合、ＣＨ$_2$（メチレン基）、ＮＨ（イミノ基）、Ｃ＝Ｏ（カルボニル基）、Ｃ＝Ｓ（チオカルボニル基）、Ｃ＝ＮＨ（イミノメチレン基）、Ｏ、またはＳであり、

Ｑ１およびＱ２は、それぞれ独立して、単結合、ＣＨ$_2$（メチレン基）、ＮＨ（イミノ基）、Ｃ＝Ｏ（カルボニル基）、Ｃ＝Ｓ（チオカルボニル基）、Ｃ

＝ＮＨ（イミノメチレン基）、Ｏ、またはＳであり、

Y^1およびY^2は、それぞれ独立して、単結合、CH_2、ＮＨ、ＯまたはＳであり；

L^1は、ｎ個の炭素原子を有するアルキレン鎖であり、アルキレン炭素原子上の水素原子は、ＯＨ、OR^a、NH_2、NHR^a、NR^aR^b、ＳＨ、もしくはSR^aで置換されても置換されていなくてもよく、または、

Ｌ１は、前記アルキレン鎖の一つ以上の炭素原子が、酸素原子で置換されたポリエーテル鎖であり、

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

L^2は、ｍ個の炭素原子を有するアルキレン鎖であり、アルキレン炭素原子上の水素原子は、ＯＨ、OR^c、NH_2、NHR^c、NR^cR^d、ＳＨもしくはSR^cで置換されても置換されていなくてもよく、または、

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

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

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

ｍは、０～３０の範囲の整数であり；

ｎは、０～３０の範囲の整数であり；

前記Ｘ領域および前記Ｙ領域は、それぞれ、$-OR^1-$または$-OR^2-$を介して、前記リンカー残基に結合し、

ここで、R^1およびR^2は、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合、R^1およびR^2は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記構造（Ｉ－０）であり、

Ａは、任意の原子団である。

[0050] 前記Ｘ領域および前記Ｙ領域と、$-OR^1-$および$-OR^2-$との結合の組

合せは、特に制限されず、例えば、以下のいずれかの条件があげられる。

条件（１）

前記Ｘ領域は、－ＯＲ^{2}－を介して、前記Ｙ領域は、－ＯＲ^{1}－を介して、前記式（Ｉ）の構造と結合する。

条件（２）

前記Ｘ領域は、－ＯＲ^{1}－を介して、前記Ｙ領域は、－ＯＲ^{2}－を介して、前記式（Ｉ）の構造と結合する。

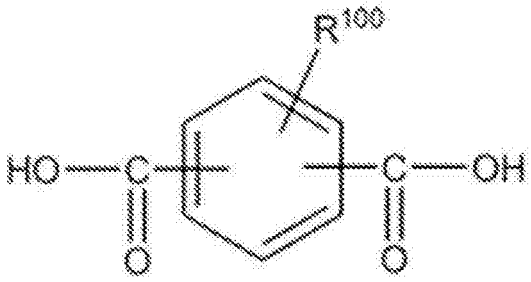
[0051] 前記化学式（Ｉ－０）において、例えば、Ｑ^{11}がＣ＝Ｏ（カルボニル基）であり、Ｑ^{1}がＮＨ（イミノ基）であってもよい。また、例えば、Ｑ^{11}がＮＨ（イミノ基）であり、Ｑ^{1}がＣ＝Ｏ（カルボニル基）であってもよい。また例えば、Ｑ^{12}がＣ＝Ｏ（カルボニル基）であり、Ｑ^{2}がＮＨ（イミノ基）であってもよい。また、例えば、Ｑ^{12}がＮＨ（イミノ基）であり、Ｑ^{2}がＣ＝Ｏ（カルボニル基）であってもよい。

[0052] 前記化学式（Ｉ－０）中、Ｑ^{11}およびＱ^{12}は、例えば、それぞれカルボニル基であってもよい。この場合において、Ｑ^{1}およびＱ^{2}が、それぞれイミノ基であることが好ましい。また、この場合において、下記化学式（Ｉα）の構造が、下記化学式（Ｉα２）で表されることがより好ましい。

[0053] [化2]



（Ｉα）

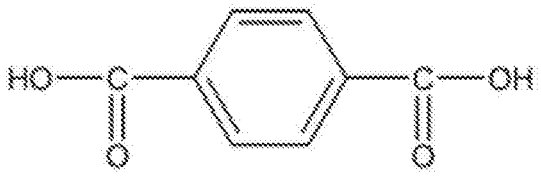


（Ｉα２）

[0054] 前記化学式（Ｉα２）中、

Ｒ^{100}は、任意の置換基であり、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合は、１個でも複数でもよく、複数の場合は、互いに同一でも異なっていてもよい。Ｒ^{100}における前記任意の置換基としては、例えば、前記Ｒ^{a}、Ｒ^{b}、Ｒ^{c}およびＲ^{d}において例示する後述の置換基が挙げられ、より具体的には、例えば、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、カルボキシ、スルホ、ニトロ、カルバモイル、スルファモイル、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、アリール、アリールアルキル、アルキルアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキルアルキル、シクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アミノアルキル、シリル、シリルオキシアルキル、ピロールイル、イミダゾリル、等があげられる。また、前記化学式（Ｉα２）の構造が、下記化学式（Ｉα３）で表されることがさらに好ましい。

[0055] [化3]



（Ｉα３）

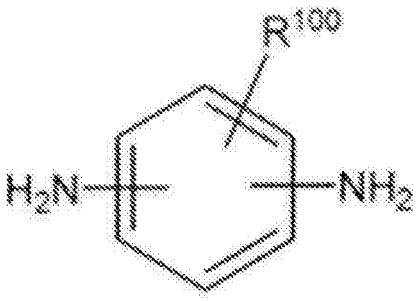
[0056] なお、Ｑ^{11}およびＱ^{12}がカルボニル基であり、かつＱ^{1}およびＱ^{2}がイミノ基である場合、前記化学式（Ｉ－０）のリンカー残基は、カルボン酸アミド残基であるということもできるが、カルボン酸残基であるということもできる。例えば、後述の実施例における「TPA」構造は、テレフタル酸アミド残基であるということもできるが、前記化学式（Ｉα３）で表されるテレフタル酸の残基であるということもできる。

[0057] 前記化学式（Ｉ－０）中、Ｑ^{11}およびＱ^{12}が、それぞれイミノ基であってもよい。この場合において、Ｑ^{1}およびＱ^{2}が、それぞれカルボニル基であることが好ましい。また、この場合において、下記化学式（Ｉβ）の構造が、下記化学式（Ｉβ２）で表されることがより好ましい。

[0058] [化4]



（Ｉβ）

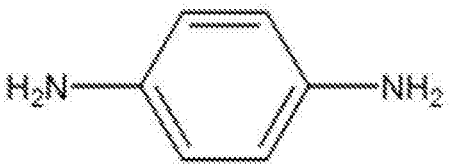


（Ｉβ２）

[0059] 前記化学式（Ｉβ２）中、

Ｒ^{100}は、任意の置換基であり、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合は、１個でも複数でもよく、複数の場合は、互いに同一でも異なっていてもよい。具体的には、例えば、前記化学式（Ｉα２）中のＲ^{100}と同様である。また、前記化学式（Ｉβ２）の構造が、下記化学式（Ｉβ３）で表されることがさらに好ましい。

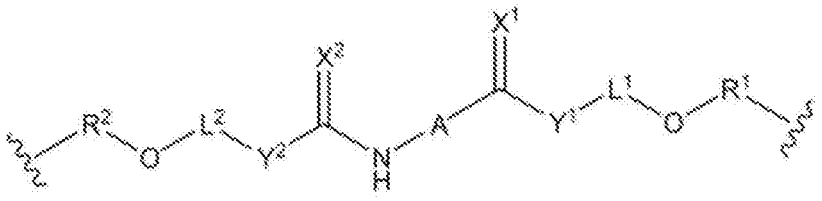
[0060] [化5]



（Ｉβ３）

[0061] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記リンカー残基が、アミノ酸残基である場合、前記アミノ酸残基は、例えば、下記化学式（Ｉ）で表わされる。なお、下記化学式（Ｉ）の構造は、前記化学式（Ｉ－０）で表される構造の一例である。

[0062] [化6]



（Ｉ）

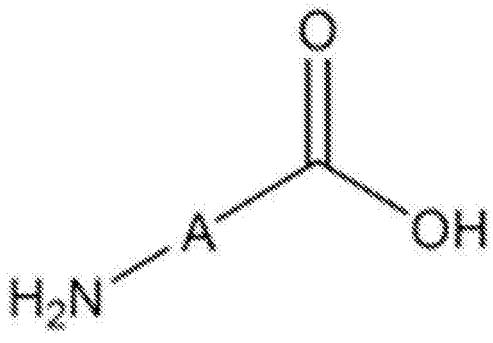
[0063] 前記式（Ｉ）中、例えば、Ｘ[1]、Ｘ[2]、Ｙ[1]、Ｙ[2]、Ｌ[1]およびＬ[2]は、前記と同様である。

前記microRNAの配列に対する相補的配列は、それぞれ、－ＯＲ[1]－または－ＯＲ[2]－を介して、前記アミノ酸残基に結合し、

ここで、Ｒ[1]およびＲ[2]は、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合、Ｒ[1]およびＲ[2]は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記構造（Ｉ）であり、

Ａは、任意の原子団であり、ただし、下記化学式（Ｉａ）は、アミノ酸またはペプチドである。

[0064] [化7]



（Ｉａ）

[0065] 前記化学式（Ｉ）、（Ｉα）または（Ｉａ）中の原子団Ａは、例えば、鎖式原子団、脂環式原子団、芳香族性原子団、ヘテロ芳香族性原子団、およびヘテロ脂環式原子団からなる群から選択される少なくとも一つを含んでいても含んでいなくても良い。前記鎖式原子団は、特に限定されないが、例えば、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル

、アルコキシアルキル、アミノアルキル、シリル、シリルオキシアルキル等が挙げられる。前記脂環式原子団は、特に限定されないが、例えば、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキルアルキル、シクリルアルキル等が挙げられる。前記芳香族性原子団は、特に限定されないが、例えば、アリール、アリールアルキル、アルキルアリール、縮環系アリール、縮環系アリールアルキル、縮環系アルキルアリール等が挙げられる。前記ヘテロ芳香族性原子団は、特に限定されないが、例えば、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリール、縮環系ヘテロアリール、縮環系ヘテロアリールアルキル、縮環系アルキルヘテロアリール等が挙げられる。また、前記化学式（Ｉ）、（Ｉα）または（Ｉａ）中の原子団Ａにおいて、前記各原子団は、さらに置換基または保護基を有していても有していなくても良い。前記置換基または保護基は、複数の場合は同一でも異なってもよい。前記置換基としては、例えば、前記R^a、R^b、R^cおよびR^dで例示した置換基が挙げられ、より具体的には、例えば、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、カルボキシ、スルホ、ニトロ、カルバモイル、スルファモイル、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、アリール、アリールアルキル、アルキルアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキルアルキル、シクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アミノアルキル、シリル、シリルオキシアルキル、ピロールイル、イミダゾリル、等があげられる。前記保護基は、例えば、前記R^a、R^b、R^cおよびR^dで例示した保護基と同様である。

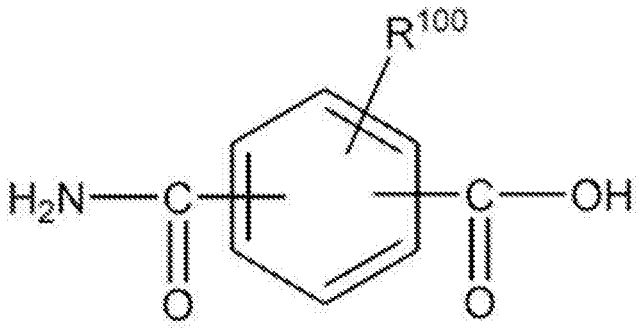
[0066] 本発明において、「アミノ酸」は、前述のとおり、分子中にアミノ基およびカルボキシ基をそれぞれ１つ以上含む任意の有機化合物をいう。前記「アミノ基」は、$-NH_2$基に限定されず、イミノ基（－ＮＨ－）も含む。例えば、プロリン、ヒドロキシプロリン等は、分子中に$-NH_2$基を含まず、イミノ基（－ＮＨ－）を含むが、本発明における「アミノ酸」の定義に含まれる。本発明において、前記「アミノ酸」は、後述するとおり、天然アミノ酸でもよいし、人工アミノ酸でもよい。例えば、後述する化学式（Ｉａ２）または

（Ｉａ３）で表される化合物も、分子中にアミノ基およびカルボキシ基を含むため、本発明における「アミノ酸」の定義に含まれる。したがって、例えば、前記化学式（Ｉ）において、原子団Ａが、後述の化学式（Ａ２）または化学式（Ａ２ａ）で表される構造は、本発明における「アミノ酸残基」の定義に含まれる。また、例えば、後述の実施例における「TPA」構造も、本発明における「アミノ酸残基」の定義に含まれる。また、本発明において、「ペプチド」は、２分子以上のアミノ酸がペプチド結合により結合した構造の有機化合物をいう。前記ペプチド結合は、酸アミド構造でも良いし、酸イミド構造でも良い。また、前記化学式（Ｉａ）で表すアミノ酸またはペプチド分子中にアミノ基が複数存在する場合は、前記化学式（Ｉａ）中に明示しているアミノ基は、いずれのアミノ基であっても良い。また、前記化学式（Ｉａ）で表すアミノ酸またはペプチド分子中にカルボキシ基が複数存在する場合は、前記化学式（Ｉａ）中に明示しているカルボキシ基は、いずれのカルボキシ基であっても良い。

[0067] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡの前記アミノ酸残基において、前記アミノ酸は、例えば、前述のとおり、天然アミノ酸でも良いし、人工アミノ酸であっても良い。なお、本発明において、「天然アミノ酸」は、天然に存在する構造のアミノ酸またはその光学異性体をいう。前記天然アミノ酸の製造方法は特に限定されず、例えば、天然から抽出しても良いし、合成しても良い。また、本発明において、「人工アミノ酸」は、天然に存在しない構造のアミノ酸をいう。すなわち、前記人工アミノ酸は、アミノ酸すなわちアミノ基を含むカルボン酸誘導体（分子中にアミノ基およびカルボキシ基をそれぞれ１つ以上含む有機化合物）であって、天然に存在しない構造のカルボン酸誘導体をいう。前記人工アミノ酸は、例えば、ヘテロ環を含まないことが好ましい。前記アミノ酸は、例えば、タンパク質を構成するアミノ酸であっても良い。前記アミノ酸は、例えば、グリシン、α－アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、ヒドロキシリシン

、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、チロシン、バリン、プロリン、４－ヒドロキシプロリン、トリプトファン、β－アラニン、１－アミノ－２－カルボキシシクロペンタン、アミノ安息香酸、アミノピリジンカルボン酸および下記化学式（Ｉａ２）で表されるアミノ酸からなる群から選択される少なくとも１種類であっても良く、さらに置換基または保護基を有していても有していなくても良い。前記置換基としては、例えば、前記Ｒａ、Ｒｂ、ＲｃおよびＲｄで例示した置換基が挙げられ、より具体的には、例えば、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、カルボキシ、スルホ、ニトロ、カルバモイル、スルファモイル、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、アリール、アリールアルキル、アルキルアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキルアルキル、シクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アミノアルキル、シリル、シリルオキシアルキル、ピロールイル、イミダゾリル、等があげられる。前記保護基は、例えば、前記Ｒａ、Ｒｂ、ＲｃおよびＲｄで例示した保護基と同様である。また、前記化学式（Ｉａ）のペプチドでないアミノ酸に、光学異性体、幾何異性体、立体異性体等の異性体が存在する場合は、いずれの異性体でも良い。

[0068] [化8]

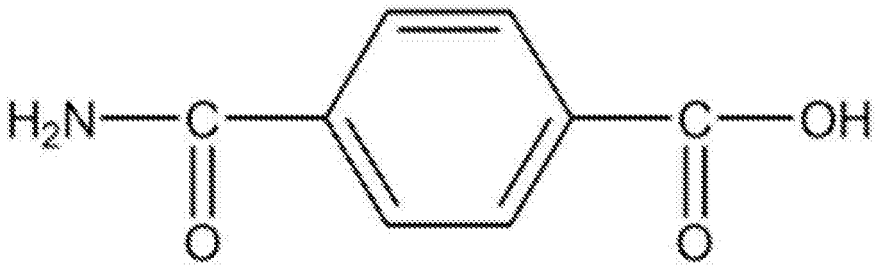


（Ｉａ２）

[0069] 前記化学式（Ｉａ２）中、

Ｒ１００は、任意の置換基であり、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合は、１個でも複数でもよく、複数の場合は、互いに同一でも異なっていてもよい。Ｒ１００における前記任意の置換基としては、例えば、前記Ｒａ、Ｒｂ、ＲｃおよびＲｄで例示した置換基が挙げられ、より具体的には、例えば、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、カルボキシ、スルホ、ニトロ、カルバモイル、スルファモイル、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、アリール、アリールアルキル、アルキルアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキルアルキル、シクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アミノアルキル、シリル、シリルオキシアルキル、ピロールイル、イミダゾリル、等があげられる。また、前記化学式（Ｉａ２）の構造は、例えば、下記化学式（Ｉａ３）であってもよい。

[0070] [化9]

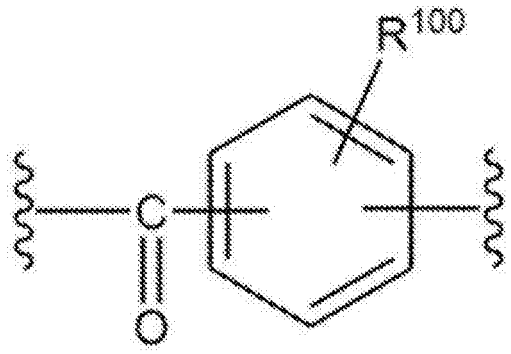


（Ｉａ３）

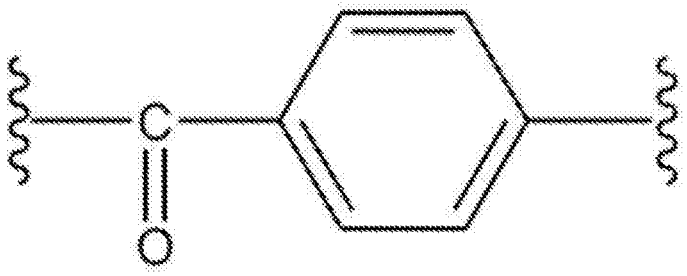
[0071] なお、前記化学式（Ｉａ）の構造が、前記化学式（Ｉａ２）である場合、前記化学式（Ｉ）中の原子団Ａの構造は、下記化学式（Ａ２）で表される。下記化学式（Ａ２）中のＲ１００は、前記化学式（Ｉａ２）中のＲ１００と同じである。また、前記化学式（Ｉａ）の構造が、前記化学式（Ｉａ３）である場合、前記化学式（Ｉ）中の原子団Ａの構造は、下記化学式（Ａ２ａ）で表される。

[0072]

[化10]



（Ａ２）

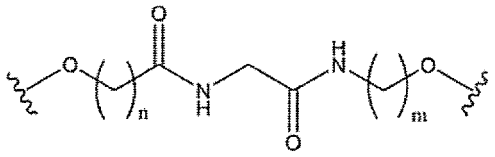


（Ａ２ａ）

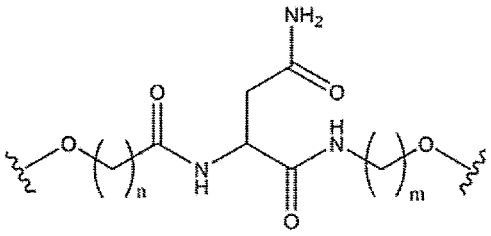
[0073] 前記化学式（Ｉ）の構造は、例えば、下記化学式（Ｉ－１）～（Ｉ－７）が例示でき、下記化学式（Ｉ－１）～（Ｉ－７）において、ｎおよびｍは、前記化学式（Ｉ）と同じである。

[0074]

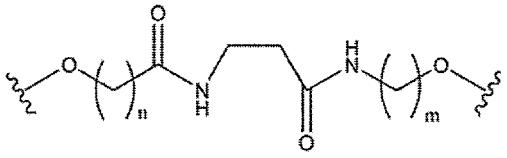
[化11]



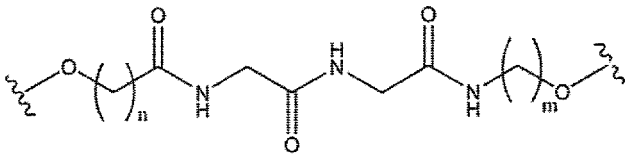
(I－1)



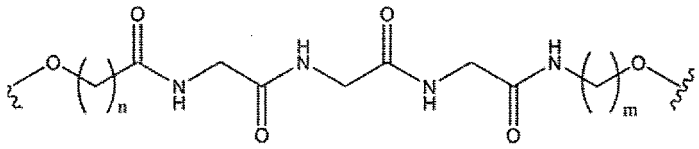
(I－2)



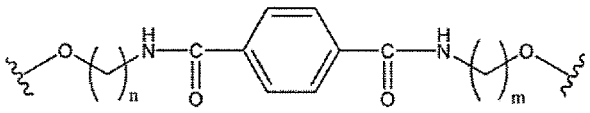
(I－3)



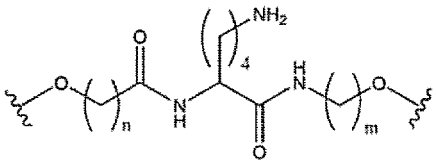
(I－4)



(I－5)



(I－6)

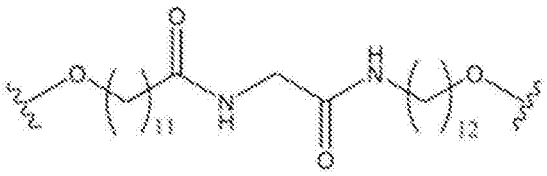


(I－7)

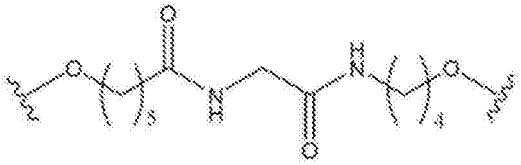
[0075] 前記化学式（Ｉ－１）～（Ｉ－７）において、ｎおよびｍは、特に制限されず、前述の通りである。具体例として、前記化学式（Ｉ－１）においてｎ＝１１およびｍ＝１２、または、ｎ＝５およびｍ＝４と、前記化学式（Ｉ－４）においてｎ＝５およびｍ＝４と、前記化学式（Ｉ－６）において、ｎ＝４およびｍ＝４と、前記化学式（１－７）においてｎ＝５およびｍ＝４とがあげられる。その構造を、下記化学式（Ｉ－１ａ）、（Ｉ－１ｂ）（Ｉ－４ａ）、（Ｉ－６ａ）および（Ｉ－７ａ）に示す。

[0076]

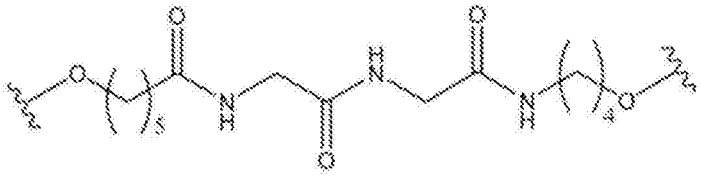
[化12]



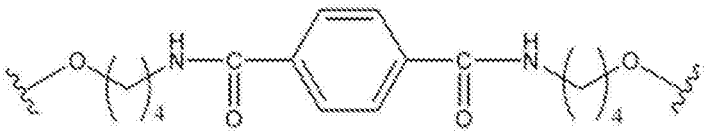
（Ｉ－１ａ）



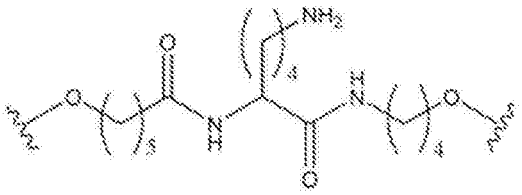
（Ｉ－１ｂ）



（Ｉ－４ａ）



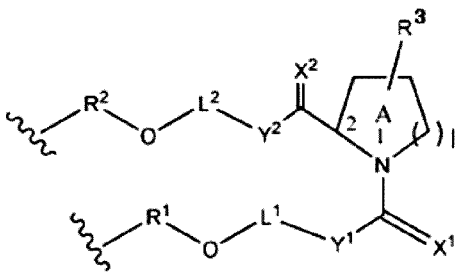
（Ｉ－６ａ）



（Ｉ－７ａ）

[0077] あるいは、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおいて、前記リンカー領域は、例えば、下記式（ＩＩ）で表わされる。

[化13]



・・・（II）

[0078] 前記式（ＩＩ）中、例えば、

Ｘ[1]およびＸ[2]は、それぞれ独立して、Ｈ$_2$、Ｏ、ＳまたはＮＨであり；

Ｙ[1]およびＹ[2]は、それぞれ独立して、単結合、ＣＨ$_2$、ＮＨ、ＯまたはＳであり；

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

Ｌ[1]は、ｎ個の原子からなるアルキレン鎖であり、ここで、アルキレン炭素原子上の水素原子は、ＯＨ、ＯＲ[a]、ＮＨ$_2$、ＮＨＲ[a]、ＮＲ[a]Ｒ[b]、ＳＨ、もしくはＳＲ[a]で置換されても置換されていなくてもよく、または、

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

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

Ｌ[2]は、ｍ個の原子からなるアルキレン鎖であり、ここで、アルキレン炭素原子上の水素原子は、ＯＨ、ＯＲ[c]、ＮＨ$_2$、ＮＨＲ[c]、ＮＲ[c]Ｒ[d]、ＳＨもしくはＳＲ[c]で置換されても置換れていなくてもよく、または、

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

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

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

；

ｌは、１または２であり；

ｍは、０～３０の範囲の整数であり；

ｎは、０～３０の範囲の整数であり；

環Ａは、前記環Ａ上のＣ－２以外の１個の炭素原子が、窒素、酸素、硫黄で置換されてもよく、

前記環Ａ内に、炭素－炭素二重結合または炭素－窒素二重結合を含んでもよく、

前記Ｘ領域および前記Ｙ領域は、それぞれ、－ＯＲ^{1}－または－ＯＲ^{2}－を介して、前記非ヌクレオチド構造に結合し、

ここで、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記構造（ＩＩ）である。

[0079] 前記式（ＩＩ）中、Ｘ^{1}およびＸ^{2}は、例えば、それぞれ独立して、$Ｈ_{2}$、Ｏ、ＳまたはＮＨである。前記式（ＩＩ）中において、Ｘ^{1}が$Ｈ_{2}$であるとは、Ｘ^{1}が、Ｘ^{1}の結合する炭素原子とともに、$ＣＨ_{2}$（メチレン基）を形成することを意味する。Ｘ^{2}についても同様である。

[0080] 前記式（ＩＩ）中、Ｙ^{1}およびＹ^{2}は、それぞれ独立して、単結合、$ＣＨ_{2}$、ＮＨ、ＯまたはＳである。

[0081] 前記式（ＩＩ）中、環Ａにおいて、ｌは、１または２である。ｌ＝１の場合、環Ａは、５員環であり、例えば、前記ピロリジン骨格である。前記ピロリジン骨格は、例えば、プロリン骨格、プロリノール骨格等があげられ、これらの二価の構造が例示できる。ｌ＝２の場合、環Ａは、６員環であり、例えば、前記ピペリジン骨格である。環Ａは、環Ａ上のＣ－２以外の１個の炭素原子が、窒素、酸素または硫黄で置換されてもよい。また、環Ａは、環Ａ内に、炭素－炭素二重結合または炭素－窒素二重結合を含んでもよい。環Ａは、例えば、Ｌ型およびＤ型のいずれでもよい。

[0082] 前記式（ＩＩ）中、Ｒ^{3}は、環Ａ上のＣ－３、Ｃ－４、Ｃ－５またはＣ－６

に結合する水素原子または置換基である。R^3が前記置換基の場合、置換基R^3は、１でも複数でも、存在しなくてもよく、複数の場合、同一でも異なってもよい。

[0083] 置換基R^3は、例えば、ハロゲン、ＯＨ、OR^4、NH_2、NHR^4、NR^4R^5、ＳＨ、SR^4またはオキソ基（＝Ｏ）等である。

[0084] R^4およびR^5は、例えば、それぞれ独立して、置換基または保護基であり、同一でも異なってもよい。前記置換基は、例えば、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキルアルキル、シクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アミノアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリールアルキル、シリル、シリルオキシアルキル等があげられる。以下、同様である。置換基R^3は、これらの列挙する置換基であってもよい。

[0085] 前記保護基は、例えば、反応性の高い官能基を不活性に変換する官能基であり、公知の保護基等があげられる。前記保護基は、例えば、文献（J. F. W. McOmie, 「Protecting Groups in Organic Chemistry」 Prenum Press, London and New York, 1973）の記載を援用できる。前記保護基は、特に制限されず、例えば、ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリル基（ＴＢＤＭＳ）、ビス（２－アセトキシエチルオキシ）メチル基（ＡＣＥ）、トリイソプロピルシリルオキシメチル基（ＴＯＭ）、１－（２－シアノエトキシ）エチル基（ＣＥＥ）、２－シアノエトキシメチル基（ＣＥＭ）およびトリルスルフォニルエトキシメチル基（ＴＥＭ）、ジメトキシトリチル基（ＤＭＴｒ）等があげられる。R^3がOR^4の場合、前記保護基は、特に制限されず、例えば、ＴＢＤＭＳ基、ＡＣＥ基、ＴＯＭ基、ＣＥＥ基、ＣＥＭ基およびＴＥＭ基等があげられる。この他にも、シリル含有基もあげられる。以下、同様である。

[0086] 前記式（ＩＩ）中、L^1は、ｎ個の原子からなるアルキレン鎖である。前記アルキレン炭素原子上の水素原子は、例えば、ＯＨ、OR^a、NH_2、NHR^a

、NR^aR^b、ＳＨ、もしくはSR^aで置換されてもよいし、置換されていなくてもよい。または、L^1は、前記アルキレン鎖の１つ以上の炭素原子が酸素原子で置換されたポリエーテル鎖でもよい。前記ポリエーテル鎖は、例えば、ポリエチレングリコールである。なお、Y^1が、ＮＨ、ＯまたはＳの場合、Y^1に結合するL^1の原子は炭素であり、OR^1に結合するL^1の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接しない。つまり、例えば、Y^1がＯの場合、その酸素原子とL^1の酸素原子は隣接せず、OR^1の酸素原子とL^1の酸素原子は隣接しない。

[0087] 前記式（ＩＩ）中、L^2は、ｍ個の原子からなるアルキレン鎖である。前記アルキレン炭素原子上の水素原子は、例えば、ＯＨ、OR^c、NH_2、NHR^c、NR^cR^d、ＳＨもしくはSR^cで置換されてもよいし、置換されていなくてもよい。または、L^2は、前記アルキレン鎖の１つ以上の炭素原子が酸素原子で置換されたポリエーテル鎖でもよい。なお、Y^2が、ＮＨ、ＯまたはＳの場合、Y^2に結合するL^2の原子は炭素であり、OR^2に結合するL^2の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接しない。つまり、例えば、Y^2がＯの場合、その酸素原子とL^2の酸素原子は隣接せず、OR^2の酸素原子とL^2の酸素原子は隣接しない。

[0088] L^1のｎおよびL^2のｍは、特に制限されず、それぞれ、下限は、例えば、０であり、上限も、特に制限されない。ｎおよびｍは、例えば、前記非ヌクレオチド構造の所望の長さに応じて、適宜設定できる。ｎおよびｍは、例えば、製造コストおよび収率等の点から、それぞれ、０～３０が好ましく、より好ましくは０～２０であり、さらに好ましくは０～１５である。ｎとｍは、同じでもよいし（ｎ＝ｍ）、異なってもよい。ｎ＋ｍは、例えば、０～３０であり、好ましくは０～２０であり、より好ましくは０～１５である。

[0089] R^a、R^b、R^cおよびR^dは、例えば、それぞれ独立して、置換基または保護基である。前記置換基および前記保護基は、例えば、前述と同様である。

[0090] 前記式（ＩＩ）において、水素原子は、例えば、それぞれ独立して、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｆおよびｌ等のハロゲンに置換されてもよい。

[0091] 前記Ｘ領域および前記Ｙ領域は、例えば、それぞれ、－ＯＲ[1]－または－ＯＲ[2]－を介して、前記非ヌクレオチド構造に結合する。ここで、Ｒ[1]およびＲ[2]は、存在しても存在しなくてもよい。Ｒ[1]およびＲ[2]が存在する場合、Ｒ[1]およびＲ[2]は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記式（ＩＩ）の構造である。Ｒ[1]および／またはＲ[2]が前記ヌクレオチド残基の場合、前記非ヌクレオチド構造は、例えば、ヌクレオチド残基Ｒ[1]および／またはＲ[2]を除く前記式（ＩＩ）の構造からなる前記非ヌクレオチド残基と、前記ヌクレオチド残基とから形成される。Ｒ[1]および／またはＲ[2]が前記式（ＩＩ）の構造の場合、前記非ヌクレオチド構造は、例えば、前記式（ＩＩ）の構造からなる前記非ヌクレオチド残基が、２つ以上連結された構造となる。前記式（ＩＩ）の構造は、例えば、１個、２個、３個または４個含んでもよい。このように、前記構造を複数含む場合、前記（ＩＩ）の構造は、例えば、直接連結されてもよいし、前記ヌクレオチド残基を介して結合してもよい。他方、Ｒ[1]およびＲ[2]が存在しない場合、前記非ヌクレオチド構造は、例えば、前記式（ＩＩ）の構造からなる前記非ヌクレオチド残基のみから形成される。

[0092] 前記Ｘ領域および前記Ｙ領域と、－ＯＲ[1]－および－ＯＲ[2]－との結合の組合せは、特に制限されず、例えば、以下のいずれかの条件があげられる。

条件（１）

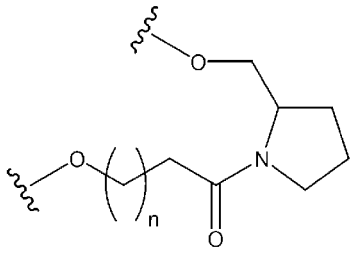
前記Ｘ領域は、－ＯＲ[2]－を介して、前記Ｙ領域は、－ＯＲ[1]－を介して、前記式（ＩＩ）の構造と結合する。

条件（２）

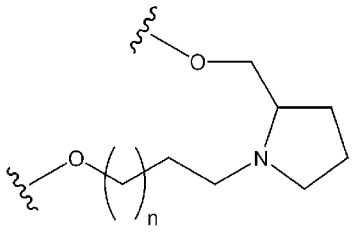
前記Ｘ領域は、－ＯＲ[1]－を介して、前記Ｙ領域は、－ＯＲ[2]－を介して、前記式（ＩＩ）の構造と結合する。

[0093] 前記式（ＩＩ）の構造は、例えば、下記式（ＩＩ－１）～式（ＩＩ－９）が例示でき、下記式において、ｎおよびｍは、前記式（ＩＩ）と同じである。下記式において、ｑは、０～１０の整数である。

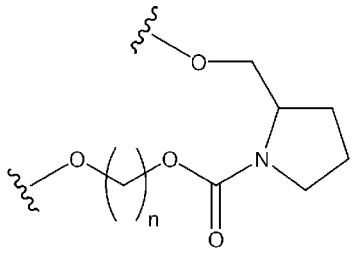
[化14]



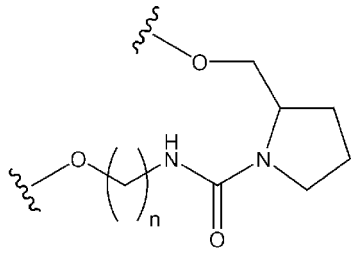
・・・(II－1)



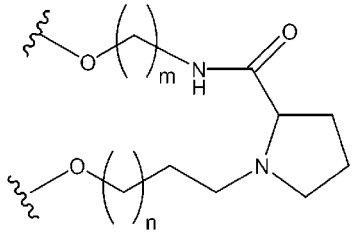
・・・(II　2)



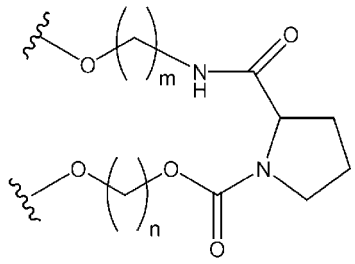
・・・(II－3)



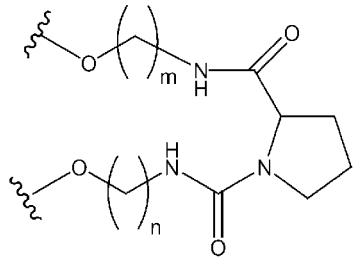
・・・(II－4)



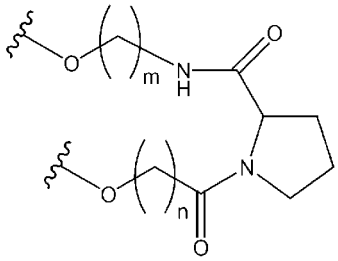
・・・(II－5)



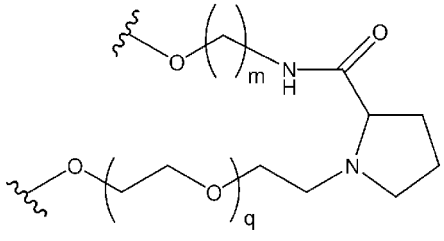
・・・(II－6)



・・・(II　7)



・・・(II　8)

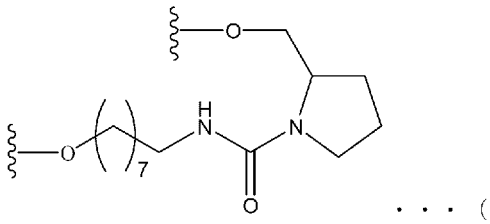


・・・(II　9)

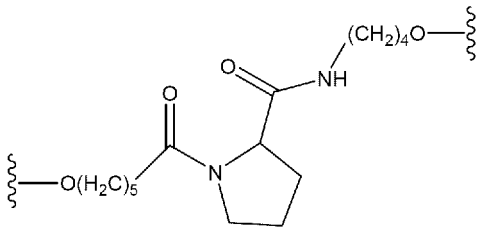
[0094] 前記式（ＩＩ－１）～（ＩＩ－９）において、ｎ、ｍおよびｑは、特に制限されず、前述の通りである。具体例として、前記式（ＩＩ－１）において

、ｎ＝８、前記（ＩＩ－２）において、ｎ＝３、前記式（ＩＩ－３）において、ｎ＝４または８、前記（ＩＩ－４）において、ｎ＝７または８、前記式（ＩＩ－５）において、ｎ＝３およびｍ＝４、前記（ＩＩ－６）において、ｎ＝８およびｍ＝４、前記式（ＩＩ－７）において、ｎ＝８およびｍ＝４、前記（ＩＩ－８）において、ｎ＝５およびｍ＝４、前記式（ＩＩ－９）において、ｑ＝１およびｍ＝４があげられる。前記式（ＩＩ－４）の一例（ｎ＝８）を、下記式（ＩＩ－４ａ）に、前記式（ＩＩ－８）の一例（ｎ＝５、ｍ＝４）を、下記式（ＩＩ－８ａ）に示す。

[化15]



・・・（II－４ａ）



・・・（II－８ａ）

[0095] 本発明において、「アルキル」は、例えば、直鎖状または分枝状のアルキル基を含む。前記アルキルの炭素数は、特に制限されず、例えば、１～３０であり、好ましくは、１～６であり、より好ましくは、１～４である。前記アルキル基は、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ｎ－ヘキシル、イソヘキシル、ｎ－ヘプチル、ｎ－オクチル、ｎ－ノニル、ｎ－デシル等があげられる。好ましくは、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ｎ-ヘキシル、イソヘキシル等があげられる。

[0096] 本発明において、「アルケニル」は、例えば、直鎖状または分枝状のアル

ケニルを含む。前記アルケニルは、前記アルキルにおいて、１個または複数の二重結合を有するもの等があげられる。前記アルケニルの炭素数は、特に制限されず、例えば、前記アルキルと同様であり、好ましくは２～８である。前記アルケニルは、例えば、ビニル、１－プロペニル、２－プロペニル、１－ブテニル、２－ブテニル、３－ブテニル、１，３－ブタジエニル、３－メチル－２－ブテニル等があげられる。

[0097] 本発明において、「アルキニル」は、例えば、直鎖状または分枝状のアルキニルを含む。前記アルキニルは、前記アルキルにおいて、１個または複数の三重結合を有するもの等があげられる。前記アルキニルの炭素数は、特に制限されず、例えば、前記アルキルと同様であり、好ましくは２～８である。前記アルキニルは、例えば、エチニル、プロピニル、ブチニル等があげられる。前記アルキニルは、例えば、さらに、１個または複数の二重結合を有してもよい。

[0098] 本発明において、「アリール」は、例えば、単環芳香族炭化水素基および多環芳香族炭化水素基を含む。前記単環芳香族炭化水素基は、例えば、フェニル等があげられる。前記多環芳香族炭化水素基は、例えば、１－ナフチル、２－ナフチル、１－アントリル、２－アントリル、９－アントリル、１－フェナントリル、２－フェナントリル、３－フェナントリル、４－フェナントリル、９－フェナントリル等があげられる。好ましくは、例えば、フェニル、１－ナフチルおよび２－ナフチル等のナフチル等があげられる。

[0099] 本発明において、「ヘテロアリール」は、例えば、単環芳香族複素環式基および縮合芳香族複素環式基を含む。前記ヘテロアリールは、例えば、フリル（例：２－フリル、３－フリル）、チエニル（例：２－チエニル、３－チエニル）、ピロリル（例：１－ピロリル、２－ピロリル、３－ピロリル）、イミダゾリル（例：１－イミダゾリル、２－イミダゾリル、４－イミダゾリル）、ピラゾリル（例：１－ピラゾリル、３－ピラゾリル、４－ピラゾリル）、トリアゾリル（例：１，２，４－トリアゾール－１－イル、１，２，４－トリアゾール－３－イル、１，２，４－トリアゾール－４－イル）、テト

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

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

[0100] 本発明において、「シクロアルキル」は、例えば、環状飽和炭化水素基であり、炭素数は、例えば、３～１５である。前記シクロアルキルは、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、橋かけ環式炭化水素基、スピロ炭化水素基等があげられ、好ましくは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、橋かけ環式炭化水素基等があげられる。

[0101] 本発明において、「橋かけ環式炭化水素基」は、例えば、ビシクロ［２．１．０］ペンチル、ビシクロ［２．２．１］ヘプチル、ビシクロ［２．２．２］オクチルおよびビシクロ［３．２．１］オクチル、トリシクロ［２．２．１．０］ヘプチル、ビシクロ［３．３．１］ノナン、１－アダマンチル、２－アダマンチル等があげられる。

[0102] 本発明において、「スピロ炭化水素基」は、例えば、スピロ［３．４］オクチル等があげられる。

[0103] 本発明において、「シクロアルケニル」は、例えば、環状の不飽和脂肪族炭化水素基を包み、炭素数は、例えば、３～７個である。前記シクロアルケニルは、例えば、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル等があげられ、好ましくは、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル等である。前記シクロアルケニルは、例えば、環中に不飽和結合を有する橋かけ環式

炭化水素基およびスピロ炭化水素基も含む。

[0104] 本発明において、「アリールアルキル」は、例えば、ベンジル、２－フェネチル、およびナフタレニルメチル等があげられ、「シクロアルキルアルキル」または「シクリルアルキル」は、例えば、シクロヘキシルメチル、アダマンチルメチル等があげられ、「ヒドロキシアルキル」は、例えば、ヒドロキシメチルおよび２－ヒドロキシエチル等があげられる。

[0105] 本発明において、「アルコキシ」は、例えば、前記アルキル－Ｏ－基を含み、例えば、メトキシ、エトキシ、ｎ－プロポキシ、イソプロポキシ、およびｎ－ブトキシ等があげられ、「アルコキシアルキル」は、例えば、メトキシメチル等があげられ、「アミノアルキル」は、例えば、２－アミノエチル等があげられる。

[0106] 本発明において、「ヘテロシクリル」は、例えば、１－ピロリニル、２－ピロリニル、３－ピロリニル、１－ピロリジニル、２－ピロリジニル、３－ピロリジニル、ピロリジノン、１－イミダゾリニル、２－イミダゾリニル、４－イミダゾリニル、１－イミダゾリジニル、２－イミダゾリジニル、４－イミダゾリジニル、イミダゾリジノン、１－ピラゾリニル、３－ピラゾリニル、４－ピラゾリニル、１－ピラゾリジニル、３－ピラゾリジニル、４－ピラゾリジニル、ピペリジノン、ピペリジノ、２－ピペリジニル、３－ピペリジニル、４－ピペリジニル、１－ピペラジニル、２－ピペラジニル、ピペラジノン、２－モルホリニル、３－モルホリニル、モルホリノ、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル等があげられる。

[0107] 本発明において、「ヘテロシクリルアルキル」は、例えば、ピペリジニルメチル、ピペラジニルメチル等があげられ、「ヘテロシクリルアルケニル」は、例えば、２－ピペリジニルエテニル等があげられ、「ヘテロアリールアルキル」は、例えば、ピリジルメチルおよびキノリン－３－イルメチル等があげられる。

[0108] 本発明において、「シリル」は、化学式R_3Si－で表される基を含み、Ｒは、独立して、前記アルキル、アリールおよびシクロアルキルから選択でき

、例えば、トリメチルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基等があげられ、「シリルオキシ」は、例えば、トリメチルシリルオキシ基等があげられ、「シリルオキシアルキル」は、例えば、トリメチルシリルオキシメチル等があげられる。

[0109] 本発明において、「アルキレン」は、例えば、メチレン、エチレン、およびプロピレン等があげられる。

[0110] 本発明において、前述した各種基は、置換されてもよい。前記置換基は、例えば、ヒドロキシ、カルボキシ、スルホ、ハロゲン、ハロゲン化アルキル（ハロアルキル、例：CF_3、CH_2CF_3、CH_2CCl_3）、ニトロ、ニトロソ、シアノ、アルキル（例：メチル、エチル、イソプロピル、ｔｅｒｔ－ブチル）、アルケニル（例：ビニル）、アルキニル（例：エチニル）、シクロアルキル（例：シクロプロピル、アダマンチル）、シクロアルキルアルキル（例：シクロヘキシルメチル、アダマンチルメチル）、シクロアルケニル（例：シクロプロペニル）、シクリルアルキル、ヒドロキシアルキル（例：ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル）、アルコキシアルキル（例：メトキシメチル、エトキシメチル、エトキシエチル）、アリール（例：フェニル、ナフチル）、アリールアルキル（例：ベンジル、フェネチル）、アルキルアリール（例、ｐ－メチルフェニル）、ヘテロアリール（例：ピリジル、フリル）、ヘテロアリールアルキル（例：ピリジルメチル）、ヘテロシクリル（例：ピペリジル）、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキル（例：モルホリルメチル）、アルコキシ（例：メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ）、ハロゲン化アルコキシ（例：OCF_3）、アルケニルオキシ（例：ビニルオキシ、アリルオキシ）、アリールオキシ（例：フェニルオキシ）、アルキルオキシカルボニル（例：メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）、アリールアルキルオキシ（例：ベンジルオキシ）、アミノ［アルキルアミノ（例：メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ）、アシルアミノ（例：アセチルアミノ、ベンゾイルアミノ）、アリールアルキルアミノ（例：ベンジルアミノ、トリチルアミノ）

、ヒドロキシアミノ］、アミノアルキル（例：アミノメチル）、アルキルアミノアルキル（例：ジエチルアミノメチル）、カルバモイル、スルファモイル、オキソ、シリル、シリルオキシアルキル等があげられる。

[0111] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、例えば、標識物質を含み、前記標識物質で標識化されてもよい。前記標識物質は、特に制限されず、例えば、蛍光物質、色素、同位体等があげられる。前記標識物質は、例えば、ピレン、ＴＡＭＲＡ、フルオレセイン、Ｃｙ３色素、Ｃｙ５色素等の蛍光団があげられ、前記色素は、例えば、Ａｌｅｘａ４８８等のＡｌｅｘａ色素等があげられる。前記同位体は、例えば、安定同位体および放射性同位体があげられ、好ましくは安定同位体である。また、前記安定同位体は、例えば、標識した化合物の物性変化がなく、トレーサーとしての性質にも優れる。前記安定同位体は、特に制限されず、例えば、^{2}Ｈ、^{13}Ｃ、^{15}Ｎ、^{17}Ｏ、^{18}Ｏ、^{33}Ｓ、^{34}Ｓおよび^{36}Ｓがあげられる。

[0112] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、前述のように、前記標的遺伝子の発現抑制ができる。このため、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、例えば、遺伝子が原因となる疾患の治療剤として使用できる。本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡが、例えば、前記疾患に関与する遺伝子の発現を抑制する成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列を有する場合、例えば、前記標的遺伝子の発現抑制により、前記疾患を治療できる。本発明において、「治療」は、例えば、前記疾患の予防、疾患の改善、予後の改善の意味を含み、いずれでもよい。前記疾患は、特に制限されず、例えば、目的の疾患に応じて前記発現抑制配列を適宜設定できる。前記疾患としては、例えば、乳がん、肺がん、胃がん、大腸がん、肝がん、膵がん、食道がん、前立腺がん、胆嚢がん、子宮体がん、子宮頸がん、卵巣がん、骨肉腫、白血病等のがん、肺線維症、肝線維症等の疾患があげられる。

[0113] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡの使用方法は、特に制限されず、例えば、前記標的遺伝子を有する投与対象に、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを投与すればよい。

[0114] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、ｉｎ ｖｉｖｏでもｉｎ ｖｉｔｒｏでもよい。前記細胞は、特に制限されず、例えば、ＨｅＬａ細胞、２９３細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、ＣＯＳ細胞等の各種培養細胞、ＥＳ細胞、造血幹細胞等の幹細胞、初代培養細胞等の生体から単離した細胞等があげられる。

[0115] 本発明において、発現抑制の対象となる前記標的遺伝子は、特に制限されず、所望の遺伝子を設定できる。そして、前述のように、前記標的遺伝子の種類に応じて、前記成熟ｍｉＲＮＡを選択すればよい。

[0116] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡの使用に関しては、後述する本発明の組成物、発現抑制方法および治療方法等の記載を参照できる。

[0117] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、前述のように、標的遺伝子の発現を抑制可能であることから、例えば、医薬品、診断薬および農薬、ならびに、農学、医学、生命科学等の研究ツールとして有用である。

[0118] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡの合成方法は、特に制限されず、従来公知の核酸の製造方法が採用できる。前記合成方法は、例えば、遺伝子工学的手法による合成法、化学合成法等があげられる。遺伝子工学的手法は、例えば、インビトロ転写合成法、ベクターを用いる方法、ＰＣＲカセットによる方法があげられる。前記ベクターは、特に制限されず、プラスミド等の非ウイルスベクター、ウイルスベクター等があげられる。前記化学合成法は、特に制限されず、例えば、ホスホロアミダイト法およびＨ－ホスホネート法等があげられる。前記化学合成法は、例えば、市販の自動核酸合成機を使用可能である。前記化学合成法は、一般に、アミダイトが使用される。前記アミダイトは、特に制限されず、市販のアミダイトとして、例えば、ＲＮＡ Ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｉｔｅｓ（2’－Ｏ－ＴＢＤＭＳｉ、商品名、三千里製薬）、ＡＣＥアミダイトおよびＴＯＭアミダイト、ＣＥＥアミダイト、ＣＥＭアミダイト、ＴＥＭアミダイト等があげられる。

[0119] （２）組成物

本発明の発現抑制用組成物は、前述のように、標的遺伝子の発現を抑制するための組成物であって、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを含むことを特徴とする。本発明の組成物は、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを含むことが特徴であり、その他の構成は、何ら制限されない。本発明の発現抑制用組成物は、例えば、発現抑制用試薬ということもできる。

[0120] 本発明によれば、例えば、前記標的遺伝子が存在する対象に投与することで、前記標的遺伝子の発現抑制を行うことができる。

[0121] また、本発明の薬学的組成物は、前述のように、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを含むことを特徴とする。本発明の組成物は、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを含むことが特徴であり、その他の構成は何ら制限されない。本発明の薬学的組成物は、例えば、医薬品ということもできる。

[0122] 本発明によれば、例えば、遺伝子が原因となる疾患の患者に投与することで、前記遺伝子の発現を抑制し、前記疾患を治療することができる。本発明において、「治療」は、前述のように、例えば、前記疾患の予防、疾患の改善、予後の改善の意味を含み、いずれでもよい。

[0123] 本発明において、治療の対象となる疾患は、特に制限されず、例えば、遺伝子の発現が原因となる疾患があげられる。前記疾患の種類に応じて、その疾患の原因となる遺伝子を前記標的遺伝子に設定し、さらに、前記標的遺伝子に応じて、前記成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列を選択すればよい。

[0124] 本発明の発現抑制用組成物および薬学的組成物（以下、組成物という）は、その使用方法は、特に制限されず、例えば、前記標的遺伝子を有する投与対象に、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを投与すればよい。

[0125] 前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、ｉｎ ｖｉｖｏでもｉｎ ｖｉｔｒｏでもよい。前記細胞は、特に制限されず、例えば、ＨｅＬａ細胞、２９３細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、ＣＯＳ細胞等の各種培養細胞、ＥＳ細胞、造血幹細胞等の幹細胞、初代培養細胞等の生体から単離した細胞等があげられる。

[0126] 前記投与方法は、特に制限されず、例えば、投与対象に応じて適宜決定できる。前記投与対象が培養細胞の場合、例えば、トランスフェクション試薬を使用する方法、エレクトロポレーション法等があげられる。

[0127] 本発明の組成物は、例えば、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡのみを含んでもよいし、さらにその他の添加物を含んでもよい。前記添加物は、特に制限されず、例えば、薬学的に許容された添加物が好ましい。前記添加物の種類は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類に応じて適宜選択できる。

[0128] 本発明の組成物において、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、例えば、前記添加物と複合体を形成してもよい。前記添加物は、例えば、複合化剤ということもできる。前記複合体形成により、例えば、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを効率よくデリバリーすることができる。

[0129] 前記複合化剤は、特に制限されず、ポリマー、シクロデキストリン、アダマンチン等があげられる。前記シクロデキストリンは、例えば、線状シクロデキストリンコポリマー、線状酸化シクロデキストリンコポリマー等があげられる。

[0130] 前記添加剤は、この他に、例えば、担体、標的細胞への結合物質、縮合剤、融合剤、賦形剤等があげられる。

[0131] （３）発現抑制方法

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

[0132] 本発明の発現抑制方法において、前記標的遺伝子の発現抑制のメカニズムは、特に制限されず、例えば、成熟ｍｉＲＮＡによる発現抑制があげられる。

[0133] 本発明の発現抑制方法は、例えば、前記標的遺伝子が存在する対象に、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを投与する工程を含む。前記投与工程により、例

えば、前記投与対象に前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを接触させる。前記投与対象は、例えば、細胞、組織または器官があげられる。前記投与対象は、例えば、ヒト、ヒトを除く非ヒト哺乳類等の非ヒト動物があげられる。前記投与は、例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏでもｉｎ　ｖｉｔｒｏでもよい。

[0134] 本発明の発現抑制方法は、例えば、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを単独で投与してもよいし、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを含む前記本発明の組成物を投与してもよい。前記投与方法は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類に応じて適宜選択できる。

[0135] （４）治療方法

本発明の疾患の治療方法は、前述のように、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを、患者に投与する工程を含み、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおける前記ガイド鎖配列が、前記疾患に関与する遺伝子の発現を抑制する成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列であることを特徴とする。本発明の治療方法は、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを使用することが特徴であって、その他の工程および条件は、何ら制限されない。

[0136] 本発明の治療方法は、例えば、前記本発明の発現抑制方法等を援用できる。前記投与方法は、特に制限されず、例えば、経口投与および非経口投与のいずれでもよい。

[0137] （５）人工マッチ型ｍｉＲＮＡの使用

本発明の使用は、前記標的遺伝子の発現抑制のための、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡの使用である。

[0138] 本発明の一本鎖核酸は、疾患の治療に使用するための一本鎖核酸であって、前記一本鎖核酸は、前記本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡであり、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおける前記ガイド鎖配列が、前記疾患に関与する遺伝子の発現を抑制する成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列であることを特徴とする。

[0139] 以下、実施例等により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0140] （実施例１）

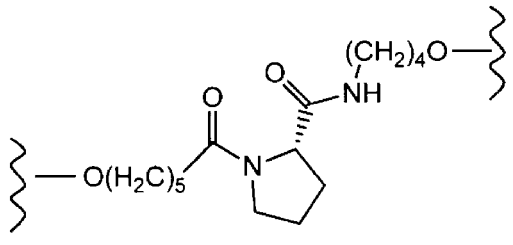
成熟ｍｉＲ－３４ａのガイド鎖に基づいて、本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを合成し、Ｈ１２９９細胞の増殖の抑制を確認した。

[0141] （１）ｍｉＲＮＡの合成

ポジティブコントロールのｍｉＲＮＡとして、以下に示すガイド鎖（配列番号１）およびパッセンジャー鎖（配列番号６）からなるヒト成熟ｍｉＲ－３４ａを合成した。また、ネガティブコントロールとして、前記ガイド鎖の塩基組成をスクランブルにしたガイド鎖スクランブル（配列番号７）とそれに対するパッセンジャー鎖（配列番号８）とからなる成熟ｍｉＲ－３４ａスクランブルを合成した。

[0142] 実施例の人工マッチ型ｍｉＲＮＡとして、前記ガイド鎖（配列番号１）と付加配列とからなるＸ領域と、前記Ｘ領域に完全に相補的な配列とオーバーハングとからなるＹ領域とが、下記式のプロリン誘導体の非ヌクレオチド構造（配列において［P］で表す）を介して連結しているマッチ型ｍｉＲ－３４ａを合成した。下記配列において、下線部が、前記ガイド鎖に対応する。前記マッチ型ｍｉＲＮＡにおける前記非ヌクレオチド構造は、下記式で表され、前記マッチ型ｍｉＲＮＡの合成において、Ｌ－プロリンジアミドアミダイト（ＷＯ２０１２／０１７９１９参照）を使用することにより導入した。また、人工マッチ型ｍｉＲＮＡに対するネガティブコントロールとして、前記ガイド鎖の塩基組成をスクランブルにしたガイド鎖とそれに対応するパッセンジャー鎖とからなるマッチ型ｍｉＲ－３４ａスクランブルを合成した。

[0143] [化16]



[0144] これらのｍｉＲＮＡの配列および構造を、以下に示す。下記において、下線部で示す配列が、ガイド鎖に相当する。

成熟ｍｉＲ－３４ａ

ガイド鎖（配列番号１）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3’

パッセンジャー鎖（配列番号６）

5’-CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU-3’

成熟ｍｉＲ－３４ａスクランブル

ガイド鎖（配列番号７）

5’-UGUAUCGUUAUCGGGUCGGUUG-3’

パッセンジャー鎖（配列番号８）

5’-CAACCGACCCGAUAACGAUACA-3’

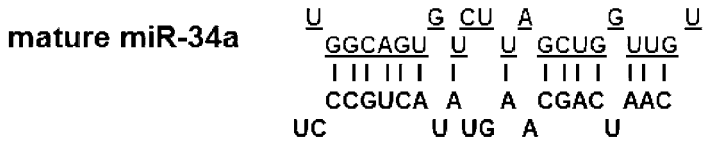
マッチ型ｍｉＲ－３４ａ（配列番号９）

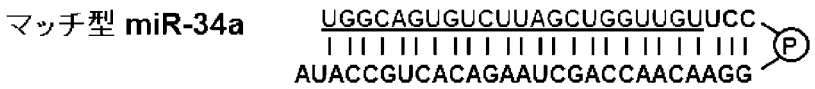
5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCC-[P]-GGAACAACCAGCUAAGACACUGCCAUA-3’

マッチ型ｍｉＲ－３４ａスクランブル（配列番号１０）

5’-UGUAUCGUUAUCGGGUCGGUUGUCC-[P]-GGACAACCGACCCGAUAACGAUACAUA-3’

[0145] [化17]





[0146] （２）肺がん由来細胞に対する人工マッチ型ｍｉＲＮＡの影響

前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを、ヒト非小細胞性肺がん細胞株（ＮＣＩ－Ｈ１２９９）に導入し、前記細胞への影響を確認した。

[0147] （２－１）トランスフェクション

前記ｍｉＲＮＡを、注射用蒸留水（大塚製薬、以下同様）で溶解し、１００μｍｏｌ／ＬのｍｉＲＮＡ溶液を調製した。培地は、１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ－１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用し、培養条件は、３７℃、５％CO_2下とした。

[0148] まず、細胞を、前記培地中で培養し、その培養液を、２４穴プレートに、５００μＬずつ、1×10^4細胞／ウェルとなるように分注した。さらに、前記ウェル中の細胞を２４時間培養した後、前記ｍｉＲＮＡをトランスフェクション試薬ＲＮＡｉ　ＭＡＸ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（商品名、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用い、添付プロトコールに従って、トランスフェクションした。トランスフェクションは、前記ウェルあたりの組成を以下のように設定した。下記組成において、（Ｂ）は、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（商品名、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）であり、（Ｃ）は、前記ＲＮＡ溶液であり、両者をあわせて４９μＬ添加した。なお、前記ウェルにおいて、前記ｍｉＲＮＡの最終濃度は、１００ｎｍｏｌ／Ｌとした。トランスフェクション後、前記ウェル中の細胞を３日間培養した。そして、前記３日間の培養後、培養細胞について、以下に示す確認を行った。

[0149] [表1]

（ウェルあたりの組成：μＬ）

培養液	４５０
（Ａ）トランスフェクション試薬	１
（Ｂ）＋（Ｃ）	４９
	５００

[0150] （２－２）細胞数のカウント

培養後の培養細胞について、ウェルあたりの細胞数をカウントした。この結果を、図２に示す。図２は、ウェルあたりの細胞数を示すグラフである。図２において、「Normal」は、未処理の細胞、「Mock」は、トランスフェクション試薬のみを導入した細胞、「Scramble」は、ネガティブコントロールのｍｉＲ－３４ａスクランブル、「miR-34a」は、ポジティブコントロールの

成熟ｍｉＲ－３４ａ、「Scramble match」は、ネガティブコントロールのマッチ型ｍｉＲ－３４ａスクランブル、「miR-34a match」は、実施例のマッチ型ｍｉＲ－３４ａの結果を示す（以下、同様）。図２に示すように、実施例のマッチ型ｍｉＲ－３４ａは、ポジティブコントロールの成熟ｍｉＲ－３４ａと同程度に、細胞数を減少できた。

[0151] （２－３）ＭＴＴアッセイ

培養後の培養細胞について、市販の試薬キット（商品名 Cell Count Reagent SF、ナカライテスク社）を用いてＭＴＴアッセイを行い、細胞増殖を評価した。細胞増殖の評価は、Ｎｏｒｍａｌ（無処置）の結果を１として、相対値により表した。この結果を、図３に示す。図３は、細胞増殖の相対値を示すグラフである。図３に示すように、実施例のマッチ型ｍｉＲ－３４ａは、ポジティブコントロールの成熟ｍｉＲ－３４ａと同程度に、細胞数を減少できた。

[0152] （２－４）アポトーシス

培養後の培養細胞について、市販の試薬キット（商品名Annexin V:PE Apoptosis Detection Kit、BD Biosciences社）を用いてアポトーシスの検出を行った。この結果を、図４に示す。図４は、早期アポトーシス（％）と後期アポトーシス（％）とを示すグラフである。図４に示すように、実施例のマッチ型ｍｉＲ－３４ａは、ポジティブコントロールの成熟ｍｉＲ－３４ａと同程度に、アポトーシスを亢進できた。

[0153] （２－５）ｍＲＮＡの発現抑制

培養後の培養細胞について、ＩＳＯＧＥＮ ｒｅａｇｅｎｔ（商品名、ニッポンジーン）を用い、添付のプロトコールに従って、ＲＮＡを回収した。

[0154] 次に、逆転写酵素（商品名Ｍ－ＭＬＶ ｒｅｖｅｒｓｅ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用い、添付のプロトコールに従って、前記ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。そして、合成した前記ｃＤＮＡを鋳型として定量ＰＣＲを行い、ＡＸＬ ｃＤＮＡの量およびＭＥＴ ｃＤＮＡの量を測定した。また、ＧＡＰＤＨ ｃＤＮＡを内部コントロールとし、

そのｃＤＮＡの量をあわせて測定した。

[0155] 前記定量ＰＣＲは、試薬として、ＦａｓｔＳｔａｒｔ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ Ｍａｓｔｅｒ（商品名、Ｒｏｃｈｅ）、サーモサイクラーとしてＭＸ３０００Ｐ（商品名、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、解析機器としてＭｘＰｒｏ（商品名、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いた（以下、同様）。前記ＡＸＬ ｃＤＮＡ、前記ＭＥＴ ｃＤＮＡおよび前記ＧＡＰＤＨ ｃＤＮＡの増幅には、それぞれ、下記プライマーセットを使用した。反応液の全量は２５μＬとして、それぞれ３回測定した。

[0156] AXL プライマーセット

5’-CTCAACCAGGACGACTCCAT-3’ （配列番号１１）

5’-AGACCGCTTCACTCAGGAAA-3’ （配列番号１２）

MET プライマーセット

5’-CAGGCAGTGCAGCATGTAGT-3’ （配列番号１３）

5’-TGTCCAACAAAGTCCCATGA-3’ （配列番号１４）

GAPDH プライマーセット

5’-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3’ （配列番号１５）

5’-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3’ （配列番号１６）

[0157] そして、ｍｉＲＮＡ未添加のコントールにおけるＡＸＬ ｍＲＮＡまたはＭＥＴ ｍＲＮＡを１とした場合における、各トランスフェクション細胞でのＡＸＬ ｍＲＮＡおよびＭＥＴ ｍＲＮＡの相対値を算出した。これらの結果を、図５に示す。図５（Ａ）は、ＡＸＬ ｍＲＮＡの結果、図５（Ｂ）は、ＭＥＴ ｍＲＮＡの結果である。

[0158] 図５に示すように、実施例のマッチ型ｍｉＲ－３４ａは、ポジティブコントロールの成熟ｍｉＲ－３４ａと同程度に、ＡＸＬ ｍＲＮＡの量およびＭＥＴ ｍＲＮＡの量が減少した。このため、前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡにより、ＡＸＬ ｍＲＮＡおよびＭＥＴ ｍＲＮＡがそれぞれコードするタンパク質の転写も、抑制されているといえる。

[0159] これらの結果から、実施例のマッチ型ｍｉＲ－３４ａは、ＡＸＬ ｍＲＮ

ＡおよびＭＥＴ　ｍＲＮＡ等の発現を抑制し、Ｈ１２９９細胞の増殖の抑制およびアポトーシスの亢進を可能とすることがわかった。

[0160] 前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、二本鎖の成熟ｍｉＲ－３４ａとは異なり、一本鎖の核酸分子であるため、使用時に各一本鎖をアニーリングする必要がなく、また、自然免疫に関与するＴＬＲ３等に認識されることも回避できる。

[0161] （実施例２）

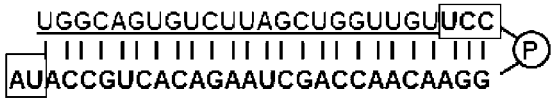
実施例１のマッチ型ｍｉＲ－３４ａについて、Ｘ領域の付加配列およびＹ領域のオーバーハングの短縮化を行った。

[0162] （１）ｍｉＲＮＡの合成

以下に示すように、マッチ型ｍｉＲ－３４ａは、Ｘ領域の３’側に四角で囲んだ３塩基長の付加配列（Ｊ）を有し、Ｙ領域の５’側に四角で囲んだ２塩基長のオーバーハング（Ｏ）を有している。そこで、前記付加配列を３’側から１塩基ずつ欠失させ且つそれに対応するＹ領域側の配列を５’側から１塩基ずつ欠失させた分子、オーバーハングを３’側から１塩基ずつ欠失させた分子、および、前記付加配列とオーバーハングとを１塩基ずつ欠失させた分子を合成し、前記実施例１と同様にして、ＡＸＬ　ｍＲＮＡおよびＭＥＴ　ｍＲＮＡの発現抑制を確認した。下記配列において、［Ｐ］の５’側領域がＸ領域であり、前記Ｘ領域において、下線部は前記ガイド鎖配列であり、その他が、前記付加配列であり、［Ｐ］の３’側領域がＹ領域であり、前記Ｙ領域において、四角で囲んだ領域がオーバーハングである。

[0163] [化18]

マッチ型 **miR-34a**



[0164]

[化19]

マッチ型ｍｉＲ－３４ａ

Ｏ２Ｊ３（配列番号９）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCC- [P] -GGAACAACCAGCUAAGACACUGCCAUA-3’

Ｏ２Ｊ２（配列番号１７）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUC- [P] -GAACAACCAGCUAAGACACUGCCAUA-3’

Ｏ２Ｊ１（配列番号１８）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU- [P] -AACAACCAGCUAAGACACUGCCAUA-3’

Ｏ２Ｊ０（配列番号１９）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU- [P] -ACAACCAGCUAAGACACUGCCAUA-3’

Ｏ１Ｊ３（配列番号２０）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCC- [P] -GGAACAACCAGCUAAGACACUGCCAU-3’

Ｏ１Ｊ２（配列番号２１）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUC- [P] -GAACAACCAGCUAAGACACUGCCAU-3’

Ｏ１Ｊ１（配列番号２２）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU- [P] -AACAACCAGCUAAGACACUGCCAU-3’

Ｏ１Ｊ０（配列番号２３）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU- [P] -ACAACCAGCUAAGACACUGCCAU-3’

ＯＯＪ３（配列番号２４）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCC- [P] -GGAACAACCAGCUAAGACACUGCCA-3’

ＯＯＪ２（配列番号２５）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUC- [P] -GAACAACCAGCUAAGACACUGCCA-3’

ＯＯＪ１（配列番号２６）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU- [P] -AACAACCAGCUAAGACACUGCCA-3’

ＯＯＪ０（配列番号２７）

5’ -UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU- [P] -ACAACCAGCUAAGACACUGCCA-3’

[0165] これらの結果を、図６および図７に示す。図６は、ＡＸＬ ｍＲＮＡの結果であり、図７は、ＭＥＴ ｍＲＮＡの結果である。図６および図７に示すように、前記Ｘ領域における付加配列および前記Ｙ領域におけるオーバーハングを短縮させても、発現抑制の効果は維持された。

[0166] （実施例３）

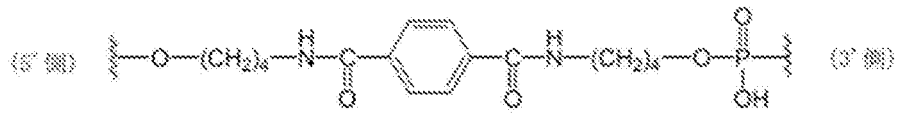
マッチ型ｍｉＲ－３４ａについて、リンカーの非ヌクレオチド構造の改変およびＸ領域の付加配列の増減を行い、ＡＸＬ ｍＲＮＡおよびＭＥＴ ＲＮＡの発現抑制効果を調べた。

[0167] （１）ｍｉＲＮＡの合成

以下に示すように、実施例１のマッチ型ｍｉＲ－３４ａから、オーバーハング部分の塩基配列を改変したマッチ型ｍｉＲ－３４ａ（ＰＨ－００３９）を合成した。さらに、ＰＨ－００３９の付加配列およびそれに対応するＹ領域側の配列を欠失させた分子（ＰＨ－００３７）、付加配列およびそれに対応するＹ領域側の配列を５塩基長に延長した分子（ＰＨ－００９３）を合成した。

また、ＰＨ－００３７、ＰＨ－００３９およびＰＨ－００９３のリンカー領域を、下記式のテレフタル酸誘導体の非ヌクレオチド構造（配列において［TP］で表す）にそれぞれ置換した分子（ＸＨ－００１６、ＸＨ－００２５およびＸＨ－００２７）を合成した。該非ヌクレオチド構造は、テレフタル酸アミダイト（ＷＯ２０１３／１３３２２１参照）を使用することにより導入した。

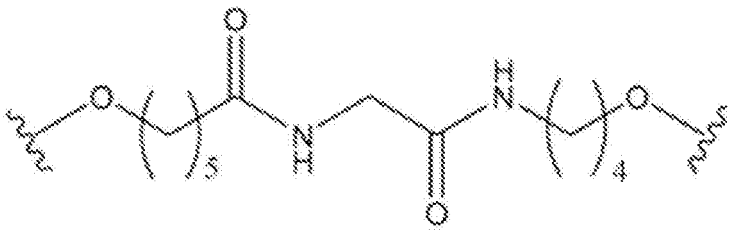
[0168] [化20]



(TPA)

[0169] さらに、ＰＨ－００３７およびＰＨ－００３９のリンカー領域を、下記式のグリシン誘導体の非ヌクレオチド構造（配列において［Gly］で表す）にそれぞれ置換した分子（ＸＨ－００１２およびＸＨ－００２８）、

[0170] [化21]



(I－1b)

[0171] ＰＨ－００３７およびＰＨ－００３９のリンカー領域を、下記式のグリシルグリシン誘導体の非ヌクレオチド構造（配列において［GlyGly］で表す）

にそれぞれ置換した分子（ＸＨ－００１４およびＸＨ－００２９）、

[0172] [化22]

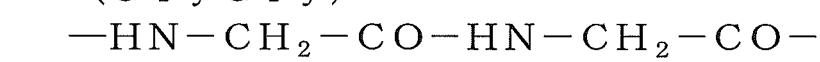


（Ｇ２）

[0173] 前記化学式（Ｇ２）中のＧｌｙＧｌｙは、下記化学式（ＧｌｙＧｌｙ）で表される原子団であり、ただし、下記化学式（ＧｌｙＧｌｙ）中の末端のカルボニル炭素は、上記化学式（Ｇ２）中のＮ原子に結合しており、下記化学式（ＧｌｙＧｌｙ）中の末端の窒素原子は、上記化学式（Ｇ２）のカルボニル炭素に結合している。

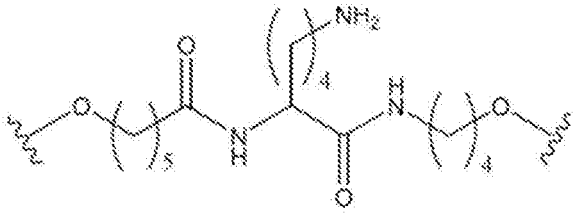
[0174] [化23]

（ＧｌｙＧｌｙ）



[0175] 並びに、ＰＨ－００３７およびＰＨ－００３９のリンカー領域を、下記式のリシン誘導体の非ヌクレオチド構造（配列において［Ｋ］で表す）にそれぞれ置換した分子（ＫＨ－０００７およびＫＨ－００１１）を合成した。

[0176] [化24]

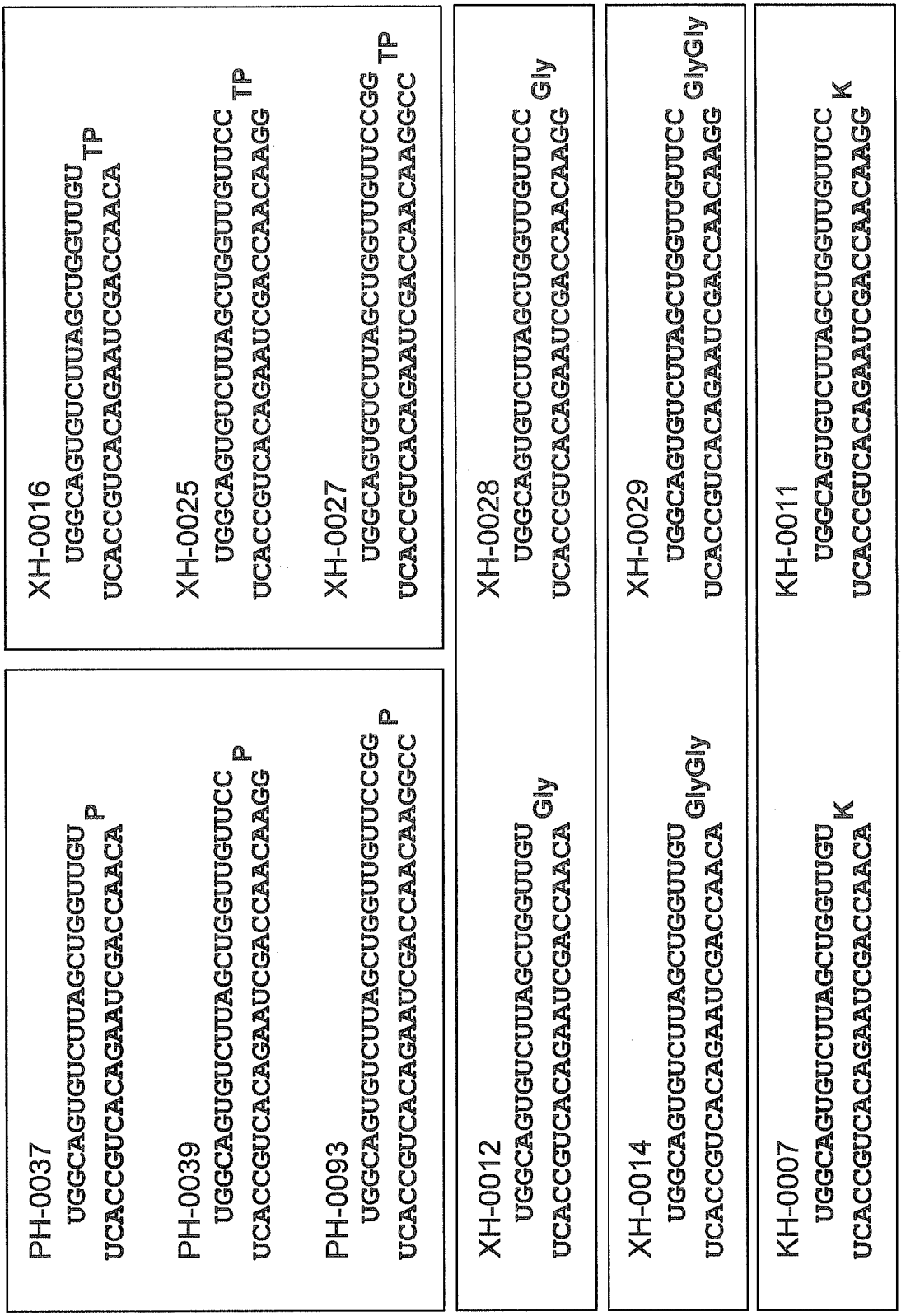


（１－７ａ）

[0177] 前記グリシン誘導体の非ヌクレオチド構造は、グリシンアミドアミダイト（ＷＯ２０１３／１０３１４６参照）を、前記グリシルグリシン誘導体の非ヌクレオチド構造は、グリシルグリシンアミドアミダイト（ＷＯ２０１３／１３３２２１参照）を、リシン誘導体の非ヌクレオチド構造は、Ｌ－リシンアミドアミダイト（ＷＯ２０１３／１０３１４６参照）を、それぞれ使用す

ることにより導入した。

[0178] [化25]



[0179] 下記配列において、各リンカーの５’側領域がＸ領域であり、前記Ｘ領域において、下線部は前記ガイド鎖配列であり、その他が、前記付加配列であり、各リンカーの３’側領域がＹ領域である。

ＰＨ－００３７（配列番号２８）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-[P]-ACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＰＨ－００３９（配列番号２９）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCC-[P]-GGAACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＰＨ－００９３（配列番号３０）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCCGG-[P]-CCGGAACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＸＨ－００１６（配列番号２８）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-[TP]-ACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＸＨ－００２５（配列番号２９）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCC-[TP]-GGAACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＸＨ－００２７（配列番号３０）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCCGG-[TP]-CCGGAACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＸＨ－００１２（配列番号２８）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-[Gly]-ACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＸＨ－００２８（配列番号２９）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCC-[Gly]-GGAACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＸＨ－００１４（配列番号２８）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-[GlyGly]-ACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＸＨ－００２９（配列番号２９）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCC-[GlyGly]-GGAACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＫＨ－０００７（配列番号２８）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-[K]-ACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

ＫＨ－００１１（配列番号２９）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUCC-[K]-GGAACAACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

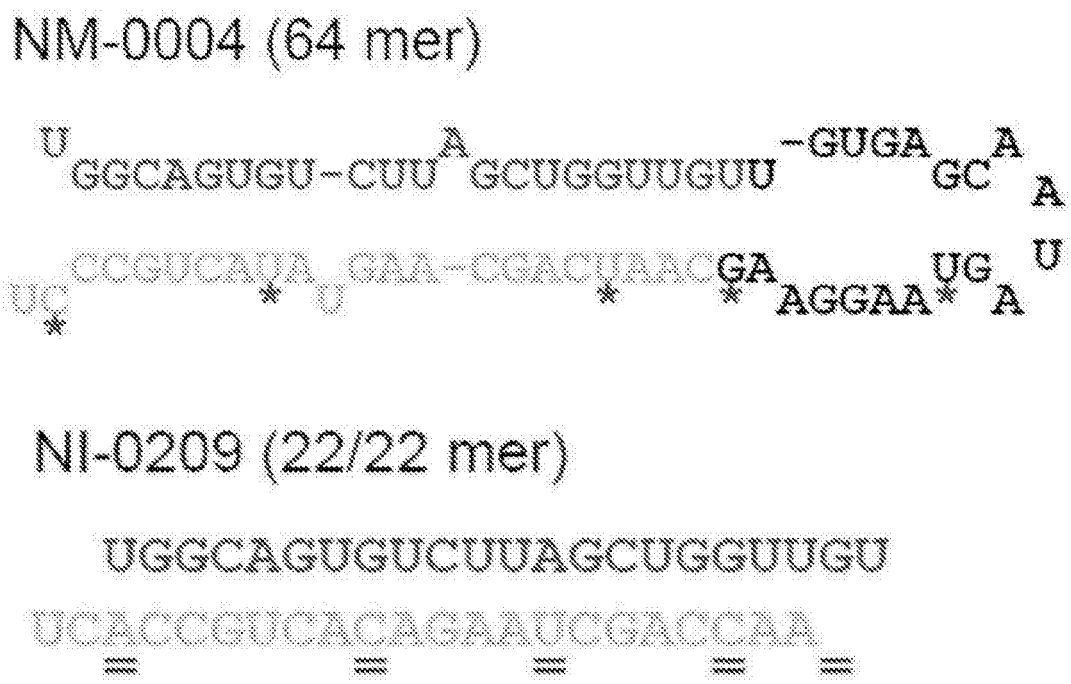
また、ネガティブコントロールとして、核酸データベース上で登録されているすべての配列に相補性を有さない配列からなるガイド鎖とそれに対応するパッセンジャー鎖とからなるマッチ型ｍｉＲＮＡ（ＰＨ－００００）を合成した。

ＰＨ－００００（配列番号３１）

5’-UACUAUUCGACACGCGAAGUUCC-[P]-GGAACUUCGCGUGUCGAAUAGUAUU-3’

ポジティブコントロールとして、成熟ｍｉＲ－３４ａのガイド鎖とパッセンジャー鎖を天然型ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡのループ部分でつないだ分子（ＮＭ－０００４）および成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖とそれに完全相補的な配列とをアニーリングさせた二本鎖マッチ型ＲＮＡ（ＮＩ－０２０９）を合成した。

[0180] [化26]



[0181] ＮＭ－０００４（配列番号３２）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU-3’

ＮＩ－０２０９

ガイド鎖（配列番号１）／パッセンジャー鎖（配列番号３３）

5’-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3’/5’-AACCAGCUAAGACACUGCCACU-3’

[0182] （２）ＡＸＬ遺伝子の発現量の測定

前記各ＲＮＡを、４μｍｏｌ／Ｌとなるように、注射用蒸留水（大塚製薬）に溶解し、ＲＮＡ溶液を調製した。

[0183] 細胞は、Ｈ１２９９細胞（ＡＴＣＣ）を使用した。培地は、１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ Ｍｅｄｉｕｍ １６４０（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用した。培養条件は、３７℃、５％CO_2下とした。

[0184] まず、細胞を、前記培地中で培養し、その培養液を、２４穴プレートに、４００μＬずつ、4×10^4細胞／ウェルとなるように分注した。さらに、前記ＲＮＡをトランスフェクション試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用い、前記トランスフェクション試薬の添付プロトコールに従って、トランスフェクションした。具体的には、前記ウェルあたりの組成を以下のように設定し、トランスフェクションを行った。下記組成において、（Ｂ）は、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、（Ｃ）は、０．４μｍｏｌ／Ｌおよび２μｍｏｌ／Ｌ 前記ＲＮＡ溶液であり、両者をあわせて９８．５μＬ添加した。なお、前記ウェルにおいて、前記ＲＮＡの最終濃度は、２ｎｍｏｌ／Ｌとした。

[0185] [表2]

（ウェルあたりの組成：μＬ）

培養液	４５０
（Ａ）トランスフェクション試薬	１
（Ｂ）＋（Ｃ）	４９
	５００

[0186] トランスフェクション後、前記ウェル中の細胞を２４時間培養した後、ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、オランダ）を用い、添付のプロトコールに従って、ＲＮＡを回収した。次に、トランスクリプターファ

ーストストランドｃＤＮＡ合成キット（Ｒｏｃｈｅ）を用い、添付のプロトコールに従って、前記ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。そして、以下に示すように、合成した前記ｃＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い、ＡＸＬおよびＭＥＴ遺伝子の発現量および内部標準であるＧＡＰＤＨ遺伝子の発現量を測定した。前記ＡＸＬおよびＭＥＴ遺伝子の発現量は、前記ＧＡＰＤＨ遺伝子の発現量により補正した。

[0187] 前記ＰＣＲは、試薬としてＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　４８０　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ　Ｍａｓｔｅｒ（商品名、Ｒｏｃｈｅ）、機器としてＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　４８０　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　II（商品名、Ｒｏｃｈｅ）を用いた（以下、同様）。前記ＡＸＬ、ＭＥＴおよびＧＡＰＤＨ遺伝子の増幅には、それぞれ、以下のプライマーセットを使用した。

ＡＸＬ遺伝子用ＰＣＲプライマーセット

（配列番号１１）　5’-CTCAACCAGGACGACTCCAT-3’

（配列番号１２）　5’-AGACCGCTTCACTCAGGAAA-3’

ＭＥＴ遺伝子用ＰＣＲプライマーセット

（配列番号１３）　5’-CAGGCAGTGCAGCATGTAGT-3’

（配列番号１４）　5’-TGTCCAACAAAGTCCCATGA-3’

ＧＡＰＤＨ遺伝子用プライマーセット

（配列番号１５）　5’-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3’

（配列番号１６）　5’-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3’

[0188] なお、コントロール１として、前記培養液に前記（Ｂ）液１００μＬのみを添加した細胞についても、遺伝子発現量を測定した（－）。また、コントロール２として、トランスフェクションにおいて、前記ＲＮＡ溶液を未添加とし、前記（Ａ）１．５μＬと前記（Ｂ）とを合計１００μＬ添加した以外は、同様にして処理した細胞についても、遺伝子発現量を測定した（ｍｏｃｋ）。

[0189] 補正後のＡＸＬおよびＭＥＴ遺伝子の発現量について、コントロール（ｍｏｃｋ）の細胞における発現量を１として、各ＲＮＡを導入した細胞での発

現量の相対値を求めた。

[0190] （３）結果

図６および７に示すように、リンカー領域の非ヌクレオチド構造を改変しても、また、Ｘ領域の付加配列を欠失もしくは延長しても、ＡＸＬ　ｍＲＮＡおよびＭＥＴ　ＲＮＡの発現抑制効果は維持された。

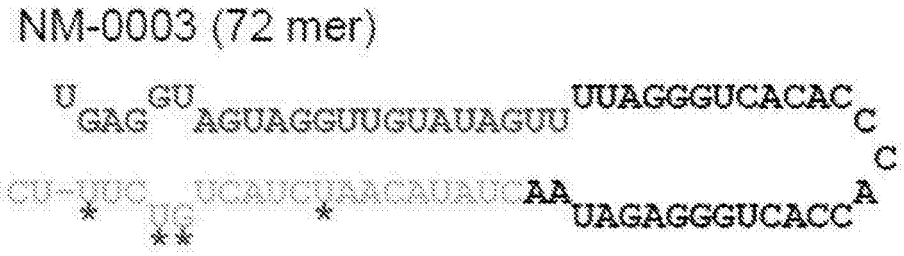
[0191] （実施例４）

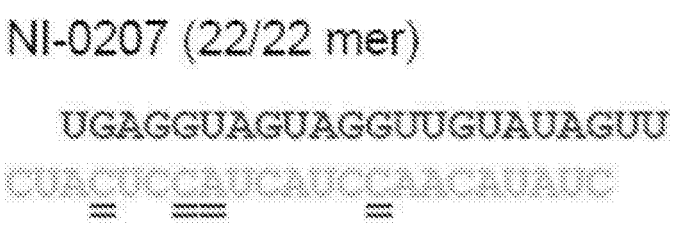
成熟ｌｅｔ－７ａのガイド鎖に基づいて、種々の本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを合成し、標的遺伝子であるＨＭＧＡ２　ｍＲＮＡの発現抑制効果を調べた。

[0192] （１）ｍｉＲＮＡの合成

ポジティブコントロールとして、成熟ｌｅｔ－７ａのガイド鎖（配列番号２）とパッセンジャー鎖（配列番号３４）を天然型ｐｒｅ－ｌｅｔ－７ａのループ部分でつないだ分子（ＮＭ－０００３）および成熟ｌｅｔ－７ａのガイド鎖とそれに完全相補的な配列とをアニーリングさせた二本鎖マッチ型ＲＮＡ（ＮＩ－０２０７）を合成した。

[0193] [化26]





[0194] 下記配列において、下線部は前記ガイド鎖配列を示す。

ＮＭ－０００３（配列番号３５）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUUAGGGUCACACCCACCACUGGGAGAUAACUAUACAAUCUACUGUCUUUC-3’

ＮＩ－０２０７

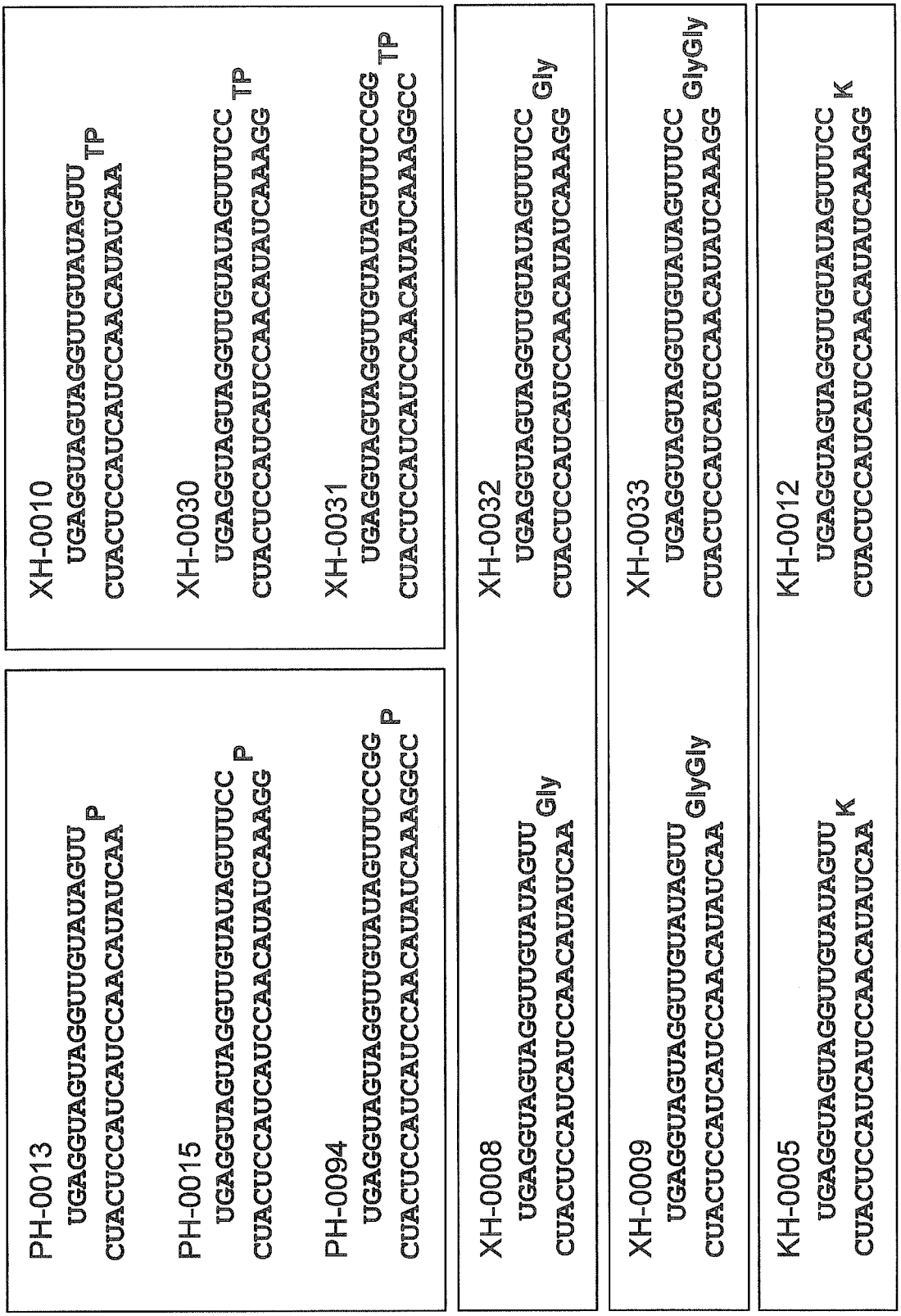
ガイド鎖（配列番号２）／パッセンジャー鎖（配列番号３４）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3’/5’-CUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

[0195] 以下に示すように、成熟ｌｅｔ－７ａのガイド鎖配列およびその３’側の付加配列（０、３または５塩基長）からなるＸ領域と、該Ｘ領域に完全相補的で、かつ５’側に２塩基長のオーバーハングを有するＹ領域との間に、実施例３と同様、プロリン誘導体（[P]）、テレフタル酸誘導体（[TP]）、グリシン誘導体（[Gly]）、グリシルグリシン誘導体（[GlyGly]）およびリシン誘導体（[K]）のリンカーを導入した、種々の人工マッチ型ｌｅｔ－７ａを合成した。

[0196]

[化27]



[0197] 下記配列において、各リンカーの５’側領域がＸ領域であり、前記Ｘ領域

において、下線部は前記ガイド鎖配列であり、その他が、前記付加配列であり、各リンカーの３’側領域がＹ領域である。

ＰＨ－００１３（配列番号３６）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-[P]-AACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＰＨ－００１５（配列番号３７）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUCC-[P]-GGAAACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＰＨ－００９４（配列番号３８）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUCCGG-[P]-CCGGAAACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＸＨ－００１０（配列番号３６）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-[TP]-AACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＸＨ－００３０（配列番号３７）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUCC-[TP]-GGAAACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＸＨ－００３１（配列番号３８）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUCCGG-[TP]-CCGGAAACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＸＨ－０００８（配列番号３６）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-[Gly]-AACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＸＨ－００３２（配列番号３７）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUCC-[Gly]-GGAAACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＸＨ－０００９（配列番号３６）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-[GlyGly]-AACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＸＨ－００３３（配列番号３７）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUCC-[GlyGly]-GGAAACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＫＨ－０００５（配列番号３６）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-[K]-AACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

ＫＨ－００１２（配列番号３７）

5’-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUCC-[K]-GGAAACUAUACAACCUACUACCUCAUC-3’

また、ネガティブコントロールとして、実施例３で合成したＰＨ－００００を使用した。

[0198] （２）ＨＭＧＡ２遺伝子の発現量の測定

前記各ＲＮＡを、０．４μｍｏｌ／Ｌとなるように、注射用蒸留水（大塚製薬）に溶解し、ＲＮＡ溶液を調製した。

[0199] 細胞は、Ａ５４９細胞（ＤＳファーマバイオメディカル）を使用した。培地は、１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用した。培養条件は、３７℃、５％CO_2下とした。

[0200] まず、細胞を、前記培地中で培養し、その培養液を、２４穴プレートに、４００μＬずつ、４×10^4細胞／ウェルとなるように分注した。さらに、前記ＲＮＡをトランスフェクション試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用い、前記トランスフェクション試薬の添付プロトコールに従って、トランスフェクションした。具体的には、前記ウェルあたりの組成を以下のように設定し、トランスフェクションを行った。下記組成において、（Ｂ）は、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、（Ｃ）は、０．１μｍｏｌ／Ｌおよび０．２μｍｏｌ／Ｌ 前記ＲＮＡ溶液であり、両者をあわせて９８．５μＬ添加した。なお、前記ウェルにおいて、前記ＲＮＡの最終濃度は、０．２ｎｍｏｌ／Ｌとした。

[0201] [表3]

（ウェルあたりの組成：μＬ）

培養液	４００
トランスフェクション試薬	１．５
（Ｂ）＋（Ｃ）	９８．５
合計	５００

[0202] トランスフェクション後、前記ウェル中の細胞を２４時間培養した後、Ｒ

Ｎｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、オランダ）を用い、添付のプロトコールに従って、ＲＮＡを回収した。次に、トランスクリプターファーストストランドｃＤＮＡ合成キット（Ｒｏｃｈｅ）を用い、添付のプロトコールに従って、前記ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。そして、以下に示すように、合成した前記ｃＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い、ＨＭＧＡ２遺伝子の発現量および内部標準であるＧＡＰＤＨ遺伝子の発現量を測定した。前記ＨＭＧＡ２遺伝子の発現量は、前記ＧＡＰＤＨ遺伝子の発現量により補正した。

[0203] 前記ＰＣＲは、試薬としてＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　４８０　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ　Ｍａｓｔｅｒ（商品名、Ｒｏｃｈｅ）、機器としてＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　４８０　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　II（商品名、Ｒｏｃｈｅ）を用いた（以下、同様）。前記ＨＭＧＡ２遺伝子およびＧＡＰＤＨ遺伝子の増幅には、それぞれ、以下のプライマーセットを使用した。

ＨＭＧＡ２遺伝子用ＰＣＲプライマーセット

（配列番号３９）　5’-GAAGCCACTGGAGAAAAACG-3’

（配列番号４０）　5’-CTTCGGCAGACTCTTGTGAG-3’

ＧＡＰＤＨ遺伝子用プライマーセット

（配列番号１５）　5’-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3’

（配列番号１６）　5’-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3’

[0204] なお、コントロール１として、前記培養液に前記（Ｂ）液１００μＬのみを添加した細胞についても、遺伝子発現量を測定した（－）。また、コントロール２として、トランスフェクションにおいて、前記ＲＮＡ溶液を未添加とし、前記（Ａ）１．５μＬと前記（Ｂ）とを合計１００μＬ添加した以外は、同様にして処理した細胞についても、遺伝子発現量を測定した（ｍｏｃｋ）。

[0205] 補正後のＨＭＧＡ２遺伝子の発現量について、コントロール（ｍｏｃｋ）の細胞における発現量を１として、各ＲＮＡを導入した細胞での発現量の相対値を求めた。

[0206] （３）結果

図１０に示すように、実施例のマッチ型ｌｅｔ－７ａは、ポジティブコントロールの成熟ｌｅｔ－７ａや二本鎖マッチ型ｌｅｔ－７ａと同程度もしくはそれ以上に、ＨＭＧＡ２　ｍＲＮＡの発現を抑制した。また、リンカー領域の非ヌクレオチド構造や、Ｘ領域の付加配列の塩基長を改変しても、ＨＭＧＡ２　ｍＲＮＡの発現抑制効果は維持された。

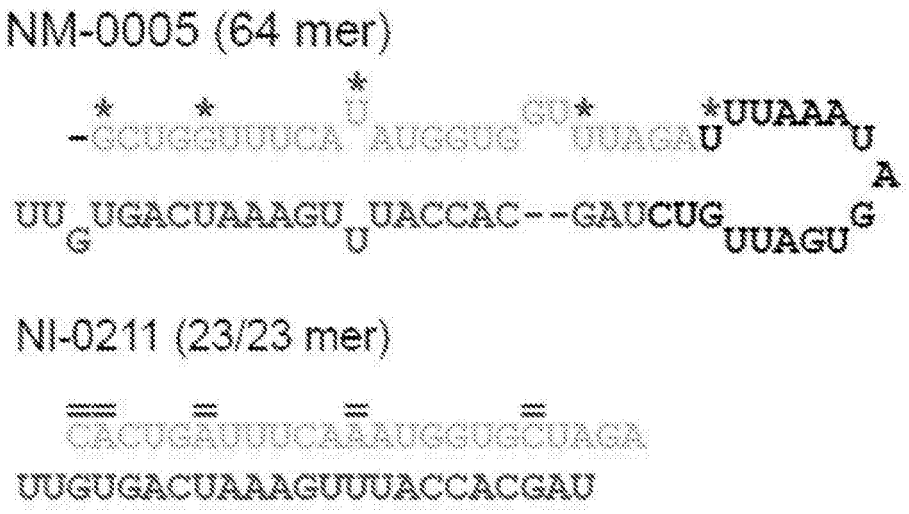
[0207] （実施例５）

成熟ｍｉＲ－２９ｂのガイド鎖に基づいて、種々の本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを合成し、標的遺伝子であるＣＯＬＡ１　ｍＲＮＡの発現抑制効果を調べた。

[0208] （１）ｍｉＲＮＡの合成

ポジティブコントロールとして、成熟ｍｉＲ－２９ｂのガイド鎖（配列番号５）とパッセンジャー鎖（配列番号４１）を天然型ｐｒｅ－ｍｉＲ－２９ｂのループ部分でつないだ分子（ＮＭ－０００５）および成熟ｍｉＲ－２９ｂのガイド鎖とそれに完全相補的な配列とをアニーリングさせた二本鎖マッチ型ＲＮＡ（ＮＩ－０２１１）を合成した。

[0209] [化28]



[0210] 下記配列において、下線部は前記ガイド鎖配列を示す。

ＮＭ－０００５（配列番号４２）

5’-GCUGGUUUCAUAUGGUGGUUUAGAUUUAAAUAGUGAUUGUCUAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3’

ＮＩ－０２１１

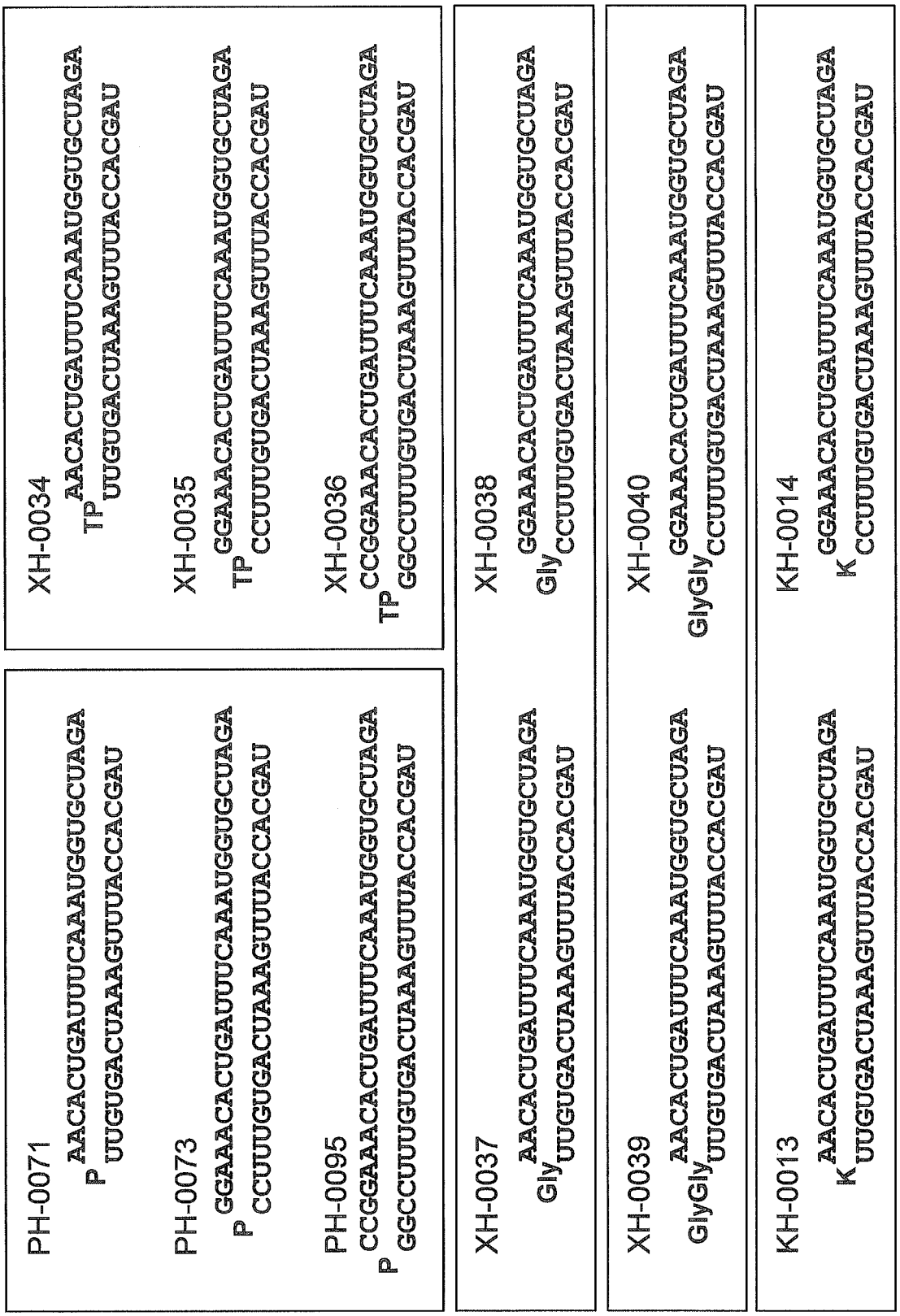
パッセンジャー鎖（配列番号４１）／ガイド鎖（配列番号５）

5’-CACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’/5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3’

[0211] 以下に示すように、成熟ｍｉＲ－２９ｂのガイド鎖配列およびその３’側の付加配列（０、３または５塩基長）からなるＸ領域と、該Ｘ領域に完全相補的で、かつ５’側に２塩基長のオーバーハングを有するＹ領域との間に、実施例３と同様、プロリン誘導体（[P]）、テレフタル酸誘導体（[TP]）、グリシン誘導体（[Gly]）、グリシルグリシン誘導体（[GlyGly]）およびリシン誘導体（[K]）のリンカーを導入した、種々の人工マッチ型ｍｉＲ－２９ｂを合成した。

[0212]

[化29]



[0213] 下記配列において、各リンカーの５’側領域がＸ領域であり、前記Ｘ領域

において、下線部は前記ガイド鎖配列であり、その他が、前記付加配列であり、各リンカーの３’側領域がＹ領域である。

ＰＨ－００７１（配列番号４３）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-[P]-AACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＰＨ－００７３（配列番号４４）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUUCC-[P]-GGAAACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＰＨ－００９５（配列番号４５）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUUCCGG-[P]-CCGGAAACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＸＨ－００３４（配列番号４３）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-[TP]-AACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＸＨ－００３５（配列番号４４）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUUCC-[TP]-GGAAACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＸＨ－００３６（配列番号４５）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUUCCGG-[TP]-CCGGAAACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＸＨ－００３７（配列番号４３）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-[Gly]-AACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＸＨ－００３８（配列番号４４）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUUCC-[Gly]-GGAAACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＸＨ－００３９（配列番号４３）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-[GlyGly]-AACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＸＨ－００４０（配列番号４４）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUUCC-[GlyGly]-GGAAACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＫＨ－００１３（配列番号４３）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-[K]-AACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

ＫＨ－００１４（配列番号４４）

5’-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUUCC-[K]-GGAAACACUGAUUUCAAAUGGUGCUAGA-3’

また、ネガティブコントロールとして、実施例３で合成したＰＨ－００００を使用した。

[0214] （２）ＣＯＬ１Ａ１遺伝子の発現量の測定

前記各ＲＮＡを、１μｍｏｌ／Ｌとなるように、注射用蒸留水（大塚製薬）に溶解し、ＲＮＡ溶液を調製した。

[0215] 細胞は、Ａ５４９細胞（ＤＳファーマバイオメディカル）を使用した。培地は、１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用した。培養条件は、３７℃、５％CO_2下とした。

[0216] まず、細胞を、前記培地中で培養し、その培養液を、２４穴プレートに、４００μＬずつ、４×10^4細胞／ウェルとなるように分注した。さらに、前記ＲＮＡをトランスフェクション試薬Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用い、前記トランスフェクション試薬の添付プロトコールに従って、トランスフェクションした。具体的には、前記ウェルあたりの組成を以下のように設定し、トランスフェクションを行った。下記組成において、（Ｂ）は、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、（Ｃ）は、０．４μｍｏｌ／Ｌおよび２μｍｏｌ／Ｌ　前記ＲＮＡ溶液であり、両者をあわせて９８．５μＬ添加した。なお、前記ウェルにおいて、前記ＲＮＡの最終濃度は、０．５ｎｍｏｌ／Ｌとした。

[0217]

[表4]

（ウェルあたりの組成：μＬ）	
培養液	４００
トランスフェクション試薬	１．５
（Ｂ）＋（Ｃ）	９８．５
合計	５００

[0218] トランスフェクション後、前記ウェル中の細胞を２４時間培養した後、ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、オランダ）を用い、添付のプロトコールに従って、ＲＮＡを回収した。次に、トランスクリプターファーストストランドｃＤＮＡ合成キット（Ｒｏｃｈｅ）を用い、添付のプロトコールに従って、前記ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。そして、以下に示すように、合成した前記ｃＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い、ＣＯＬ１Ａ１遺伝子の発現量および内部標準であるＧＡＰＤＨ遺伝子の発現量を測定した。前記ＣＯＬ１Ａ１遺伝子の発現量は、前記ＧＡＰＤＨ遺伝子の発現量により補正した。

[0219] 前記ＰＣＲは、試薬としてＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ ４８０ ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ Ｉ Ｍａｓｔｅｒ（商品名、Ｒｏｃｈｅ）、機器としてＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ ４８０ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ ＩＩ（商品名、Ｒｏｃｈｅ）を用いた（以下、同様）。前記ＣＯＬ１Ａ１遺伝子およびＧＡＰＤＨ遺伝子の増幅には、それぞれ、以下のプライマーセットを使用した。

ＣＯＬ１Ａ１遺伝子用ＰＣＲプライマーセット

（配列番号４６） 5’-CCCAAGGACAAGAGGCATGT-3’

（配列番号４７） 5’-CCGCCATACTCGAACTGGAA-3’

ＧＡＰＤＨ遺伝子用プライマーセット

（配列番号１５） 5’-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3’

（配列番号１６） 5’-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3’

[0220] なお、コントロール１として、前記培養液に前記（Ｂ）液１００μＬのみを添加した細胞についても、遺伝子発現量を測定した（－）。また、コントロール２として、トランスフェクションにおいて、前記ＲＮＡ溶液を未添加とし、前記（Ａ）１．５μＬと前記（Ｂ）とを合計１００μＬ添加した以外は、同様にして処理した細胞についても、遺伝子発現量を測定した（ｍｏｃｋ）。

[0221] 補正後のＣＯＬ１Ａ１遺伝子の発現量について、コントロール（ｍｏｃｋ）の細胞における発現量を１として、各ＲＮＡを導入した細胞での発現量の相対値を求めた。

[0222] （３）結果

図１１に示すように、実施例のマッチ型ｍｉＲ－２９ｂは、ポジティブコントロールの成熟ｍｉＲ－２９ｂや二本鎖マッチ型ｍｉＲ－２９ｂと同程度もしくはそれ以上に、ＣＯＬＡ１　ｍＲＮＡの発現を抑制した。また、リンカー領域の非ヌクレオチド構造や、Ｘ領域の付加配列の塩基長を改変しても、ＣＯＬＡ１　ｍＲＮＡの発現抑制効果は維持された。

[0223] 以上、実施形態を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をすることができる。　ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

[0224] 本出願は、2013年12月27日付で日本国に出願された特願2013-273033を基礎としており、ここで言及することによりその内容は全て本明細書に包含される。

産業上の利用可能性

[0225] 本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡによれば、容易に低コストで合成でき、且つ、前記遺伝子がコードするタンパク質の翻訳の抑制が可能である。本発明の人工マッチ型ｍｉＲＮＡは、前述のように標的遺伝子の発現を抑制可能

であることから、例えば、医薬品、診断薬および農薬、ならびに、農学、医学、生命科学等の研究ツールとして有用である。

請求の範囲

[請求項1] Ｘ領域とＹ領域とを有する一本鎖核酸であり、
前記Ｘ領域の３’末端と前記Ｙ領域の５’末端とが、非ヌクレオチド構造のリンカー領域を介して連結し、
前記Ｘ領域は、成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列を含み、
前記Ｙ領域は、前記Ｘ領域と完全に相補な配列を含むことを特徴とする、人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項2] 前記Ｙ領域と前記Ｘ領域とをアライメントした際に、前記Ｙ領域が、３’末端にオーバーハングを有する、請求項１記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項3] 前記オーバーハングが、０～４塩基長である、請求項２記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項4] 前記Ｘ領域が、前記ガイド鎖配列と付加配列とからなり、前記付加配列が、前記ガイド鎖配列の３’末端に連結している、請求項１から３のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項5] 前記Ｘ領域における前記付加配列の長さが、０～５塩基長である、請求項４記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項6] 前記Ｘ領域の長さが、１９～３３塩基長である、請求項１から５のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項7] 前記Ｙ領域の長さが、２１～３５塩基長である、請求項１から６のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項8] 全長が、４０～６８塩基長である、請求項１から７のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項9] 前記リンカー領域が、アミノ酸残基、ポリアミン残基、およびポリカルボン酸残基からなる群から選択される少なくとも一つを含む請求項１から８のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項10] 前記リンカー領域が、ポリカルボン酸残基を含む、請求項９に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項11] 前記ポリカルボン酸残基が、テレフタル酸残基である、請求項１０に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項12] 前記リンカー領域が、アミノ酸残基を含む、請求項９に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

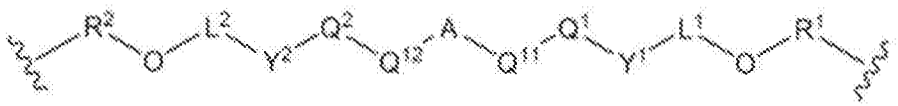
[請求項13] 前記アミノ酸残基が、グリシン残基、テレフタル酸アミド残基、プロリン残基またはリシン残基である、請求項１２に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項14] 前記アミノ酸残基が、複数のアミノ酸残基が連結したものである、請求項１２または１３に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項15] 前記複数のアミノ酸残基が連結したものが、グリシン二量体または三量体の残基である、請求項１４に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項16] 前記リンカー残基が、下記化学式（Ｉ－０）で表される請求項１から１５のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[化1]



（Ｉ－０）

前記化学式（Ｉ－０）中、

Q^{11}およびQ^{12}は、それぞれ独立して、単結合、CH_2（メチレン基）、ＮＨ（イミノ基）、Ｃ＝Ｏ（カルボニル基）、Ｃ＝Ｓ（チオカルボニル基）、Ｃ＝ＮＨ（イミノメチレン基）、Ｏ、またはＳであり、

Q^{1}およびQ^{2}は、それぞれ独立して、単結合、CH_2（メチレン基）、ＮＨ（イミノ基）、Ｃ＝Ｏ（カルボニル基）、Ｃ＝Ｓ（チオカルボニル基）、Ｃ＝ＮＨ（イミノメチレン基）、Ｏ、またはＳであり、

Y^{1}およびY^{2}は、それぞれ独立して、単結合、CH_2、ＮＨ、ＯまたはＳであり；

L^{1}は、ｎ個の炭素原子を有するアルキレン鎖であり、アルキレン炭素原子上の水素原子は、ＯＨ、OR^{a}、NH_2、NHR^{a}、$NR^{a}R^{b}$、

ＳＨ、もしくはＳＲ^{a}で置換されても置換されていなくてもよく、または、

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

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

Ｌ^{2}は、ｍ個の炭素原子を有するアルキレン鎖であり、アルキレン炭素原子上の水素原子は、ＯＨ、ＯＲ^{c}、NH_2、ＮＨＲ^{c}、ＮＲ^{c}Ｒ^{d}、ＳＨもしくはＳＲ^{c}で置換されても置換されていなくてもよく、または、

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

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

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

ｍは、０～３０の範囲の整数であり；

ｎは、０～３０の範囲の整数であり；

前記Ｘ領域および前記Ｙ領域は、それぞれ、－ＯＲ^{1}－または－ＯＲ^{2}－を介して、前記リンカー残基に結合し、

ここで、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記構造（Ｉ－０）であり、

Ａは、任意の原子団である。

[請求項17] 前記化学式（Ｉ－０）中、Ｑ^{11}およびＱ^{12}が、それぞれカルボニル基である請求項１６記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

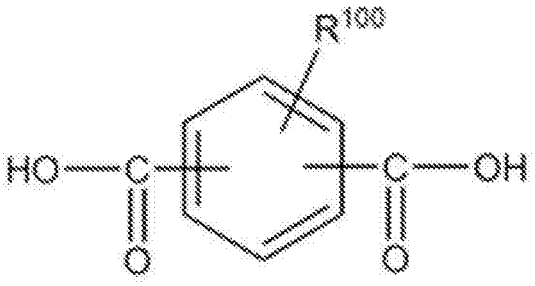
[請求項18] 前記化学式（Ｉ－０）中、Q^1およびQ^2が、それぞれイミノ基である請求項１７記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項19] 下記化学式（Ｉα）の構造が、下記化学式（Ｉα２）で表される請求項１７または１８に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[化2]



（Ｉα）



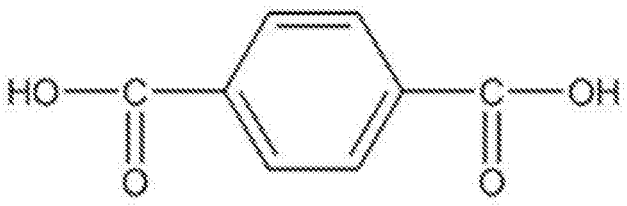
（Ｉα２）

前記化学式（Ｉα２）中、

R^{100}は、任意の置換基であり、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合は、１個でも複数でもよく、複数の場合は、互いに同一でも異なっていてもよい。

[請求項20] 前記化学式（Ｉα２）の構造が、下記化学式（Ｉα３）で表される請求項１４記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[化3]



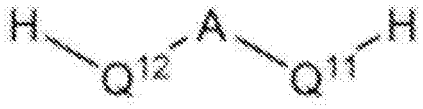
（Ｉα３）

[請求項21] 前記化学式（Ｉ－０）中、Ｑ^{11}およびＱ^{12}が、それぞれイミノ基である請求項１６記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

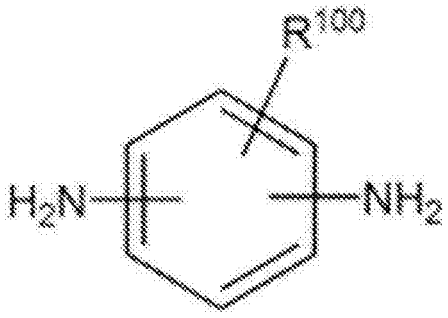
[請求項22] 前記化学式（Ｉ－０）中、Ｑ^{1}およびＱ^{2}が、それぞれカルボニル基である請求項２１記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項23] 下記化学式（Ｉβ）の構造が、下記化学式（Ｉβ２）で表される請求項１６または１７記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[化4]



（Ｉβ）



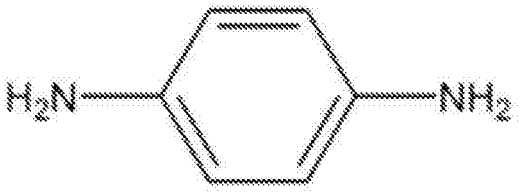
（Ｉβ２）

前記化学式（Ｉβ２）中、

Ｒ^{100}は、任意の置換基であり、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合は、１個でも複数でもよく、複数の場合は、互いに同一でも異なっていてもよい。

[請求項24] 前記化学式（Ｉβ２）の構造が、下記化学式（Ｉβ３）で表される請求項２３記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

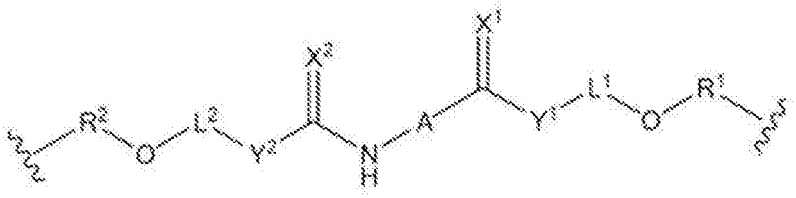
[化5]



（Ｉβ３）

[請求項25] 前記リンカー領域が、アミノ酸残基を含み、前記アミノ酸残基が、下記化学式（Ｉ）で表される請求項１から３および６から１０のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[化6]



（Ｉ）

前記化学式（Ｉ）中、

X^1およびX^2は、それぞれ独立して、H_2、Ｏ、ＳまたはＮＨであり；

Y^1およびY^2は、それぞれ独立して、単結合、CH_2、ＮＨ、ＯまたはＳであり；

L^1は、ｎ個の炭素原子を有するアルキレン鎖であり、アルキレン炭素原子上の水素原子は、ＯＨ、OR^a、NH_2、NHR^a、NR^aR^b、ＳＨ、もしくはSR^aで置換されても置換されていなくてもよく、または、

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

ただし、Y^1が、ＮＨ、ＯまたはＳの場合、Y^1に結合するL^1の原子

は炭素であり、ＯＲ[1]に結合するＬ[1]の原子は炭素であり、酸素原子同士は隣接せず；

Ｌ[2]は、ｍ個の炭素原子を有するアルキレン鎖であり、アルキレン炭素原子上の水素原子は、ＯＨ、ＯＲ[c]、NH_2、ＮＨＲ[c]、ＮＲ[c]Ｒ[d]、ＳＨもしくはＳＲ[c]で置換されても置換されていなくてもよく、または、

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

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

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

ｍは、０～３０の範囲の整数であり；

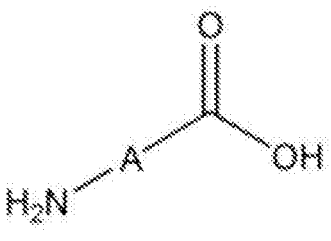
ｎは、０～３０の範囲の整数であり；

前記Ｘ領域および前記Ｙ領域は、それぞれ、－ＯＲ[1]－または－ＯＲ[2]－を介して、前記アミノ酸残基に結合し、

ここで、Ｒ[1]およびＲ[2]は、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合、Ｒ[1]およびＲ[2]は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記構造（Ｉ）であり、

Ａは、任意の原子団であり、ただし、下記化学式（Ｉａ）は、アミノ酸またはペプチドである。

[化7]



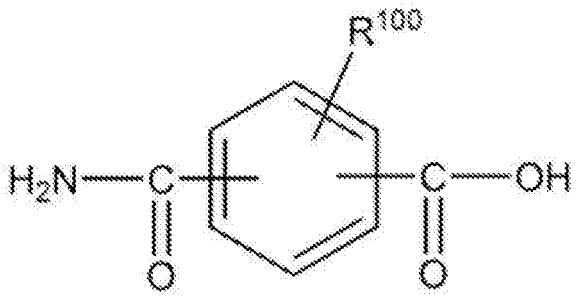
（Ｉａ）

[請求項26] 前記アミノ酸残基における前記アミノ酸が、天然アミノ酸および人工アミノ酸の少なくとも一方である請求項１から３、６から１０および２０のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項27] 前記天然アミノ酸が、タンパク質を構成するアミノ酸である請求項２６記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項28] 前記アミノ酸残基における前記アミノ酸が、グリシン、α－アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、シスチン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、ヒドロキシリシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、チロシン、バリン、プロリン、４－ヒドロキシプロリン、トリプトファン、β－アラニン、１－アミノ－２－カルボキシシクロペンタン、アミノ安息香酸、アミノピリジンカルボン酸および下記化学式（Ｉａ２）で表されるアミノ酸からなる群から選択される少なくとも１種類であり、前記アミノ酸は、さらに置換基または保護基を有していても有していなくても良い、請求項１から９、１２から１５、２５および２６のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[化8]



（Ｉａ２）

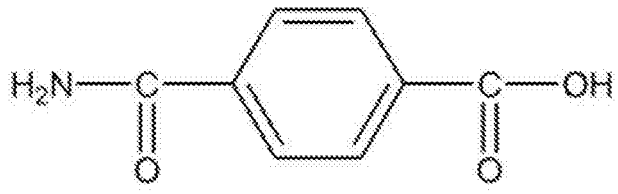
前記化学式（Ｉａ２）中、

R^{100}は、任意の置換基であり、存在しても存在しなくてもよく、存

在する場合は、１個でも複数でもよく、複数の場合は、互いに同一でも異なっていてもよい。

[請求項29] 前記化学式（Ｉａ２）の構造が、下記化学式（Ｉａ３）で表される請求項２８記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

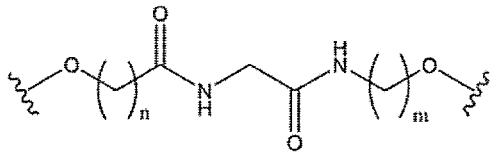
[化9]



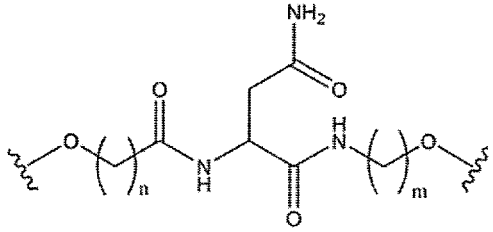
（Ｉａ３）

[請求項30] 前記化学式（Ｉ－０）または（Ｉ）の構造が、下記化学式（Ｉ－１）～（Ｉ－７）であり、下記化学式（Ｉ－１）～（Ｉ－７）において、ｎは、０～３０の整数、ｍは、０～３０の整数である、請求項１６または２５記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

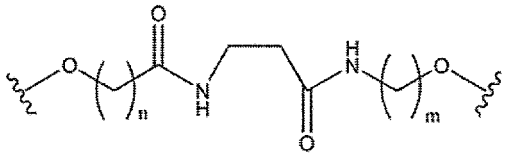
[化10]



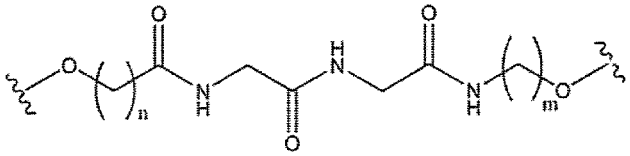
(I－1)



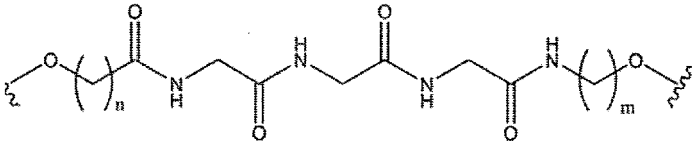
(I－2)



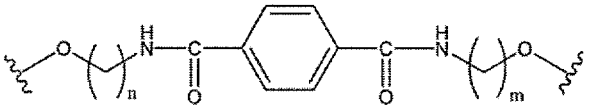
(I－3)



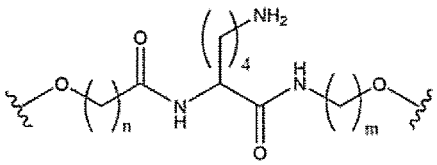
(I－4)



(I－5)



(I－6)



(I－7)

[請求項31] 前記化学式（Ｉ－１）において、ｎ＝１１およびｍ＝１２、またはｎ＝５およびｍ＝４である、請求項３０記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項32] 前記化学式（Ｉ－４）において、ｎ＝５およびｍ＝４である、請求項３０記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

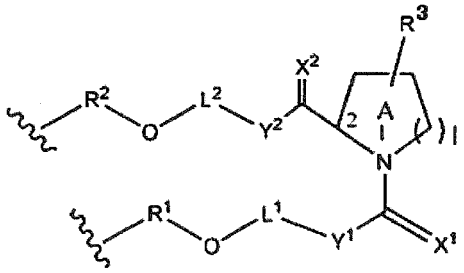
[請求項33] 前記化学式（Ｉ－６）において、ｎ＝４およびｍ＝４である、請求項３０記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項34] 前記化学式（Ｉ－７）において、ｎ＝５およびｍ＝４である、請求項３０記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項35] 前記リンカー領域の非ヌクレオチド構造が、ピロリジン骨格およびピペリジン骨格の少なくとも一方を含む、請求項１から９、１２および１３のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項36] 前記非ヌクレオチド構造が、下記式（ＩＩ）で表わされる、請求項１から８のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[化11]



・・・（II）

前記式中、

X^1およびX^2は、それぞれ独立して、H_2、Ｏ、ＳまたはＮＨであり；

Y^1およびY^2は、それぞれ独立して、単結合、CH_2、ＮＨ、ＯまたはＳであり；

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

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

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

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

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

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

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

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

ｌは、１または２であり；

ｍは、０～３０の範囲の整数であり；

ｎは、０～３０の範囲の整数であり；

環Ａは、前記環Ａ上のＣ－２以外の１個の炭素原子が、窒素、酸素または硫黄で置換されてもよく、

前記環Ａ内に、炭素－炭素二重結合または炭素－窒素二重結合を含んでもよく、

前記Ｘ領域および前記Ｙ領域は、それぞれ、－OR^1－または－ＯＲ

^{2}－を介して、前記非ヌクレオチド構造に結合し、

ここで、R^{1}およびR^{2}は、存在しても存在しなくてもよく、存在する場合、R^{1}およびR^{2}は、それぞれ独立して、ヌクレオチド残基または前記構造（Ｉ）である。

[請求項37] 前記Ｘ領域は、ｈｓａ－ｍｉＲ－３４、ｈｓａ－ｍｉＲ－２９およびｈｓａ－ｌｅｔ－７からなる群から選択される成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列を含む、請求項１から３６のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項38] 前記成熟ｍｉＲＮＡが、ｈｓａ－ｍｉＲ－３４ａである、請求項３７記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項39] ヌクレオチド配列が、配列番号９および１７～２８からなる群から選択されるヌクレオチド配列である、請求項３８記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項40] 前記成熟ｍｉＲＮＡが、ｈｓａ－ｌｅｔ－７ａである、請求項３７記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項41] ヌクレオチド配列が、配列番号３６～３８からなる群から選択されるヌクレオチド配列である、請求項４０記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項42] 前記成熟ｍｉＲＮＡが、ｈｓａ－ｍｉＲ－２９ｂである、請求項３７記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項43] ヌクレオチド配列が、配列番号４３～４５からなる群から選択されるヌクレオチド配列である、請求項４２記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡ。

[請求項44] 標的遺伝子の発現を抑制するための組成物であって、

請求項１から４３のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを含むことを特徴とする、発現抑制用組成物。

[請求項45] 請求項１から４３のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを含むことを特徴とする、薬学的組成物。

[請求項46] 標的遺伝子の発現を抑制する方法であって、
請求項１から４３のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを使用することを特徴とする、発現抑制方法。

[請求項47] 前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを、細胞、組織または器官に投与する工程を含む、請求項４６記載の発現抑制方法。

[請求項48] 前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを、ｉｎ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｔｒｏで投与する、請求項４６または４７記載の発現抑制方法。

[請求項49] 前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡを、非ヒト動物に投与する、請求項４６または４７記載の発現抑制方法。

[請求項50] 疾患の治療方法であって、
請求項１から４３のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡを、患者に投与する工程を含み、
前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおける前記ガイド鎖配列が、前記疾患に関与する遺伝子の発現を抑制する成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列であることを特徴とする、治療方法。

[請求項51] 疾患の治療に使用するための一本鎖核酸であって、
前記一本鎖核酸は、請求項１から４３のいずれか一項に記載の人工マッチ型ｍｉＲＮＡであり、
前記人工マッチ型ｍｉＲＮＡにおける前記ガイド鎖配列が、前記疾患に関与する遺伝子の発現を抑制する成熟ｍｉＲＮＡのガイド鎖配列であることを特徴とする、一本鎖核酸。