

(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
2019年3月7日(07.03.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/044974 A1

(51) 国際特許分類:

CI2N 15/113 (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/032122

(22) 国際出願日: 2018年8月30日(30.08.2018)

(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 2017-166641 2017年8月31日(31.08.2017) JP

(71) 出願人: 株式会社 *Veritas In Silico* (**VERITAS IN SILICO INC.**) [JP/JP]; 〒1410031 東京都品川区西五反田一丁目11番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 上村 孝 (**KAMIMURA, Takashi**); 〒1410031 東京都品川区西五反田一丁目11番1号 株式会社 *Veritas In Sil*

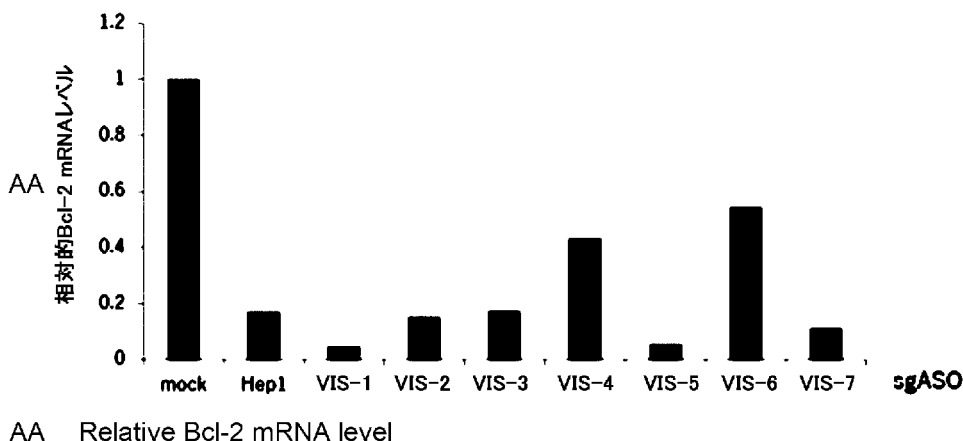
*ico*内 Tokyo (JP). 梨本 正之(**NASHIMOTO, Masayuki**); 〒9502015 新潟県新潟市西区西小針台2丁目7番36号2 Niigata (JP). 中村 慎吾(**NAKAMURA, Shingo**); 〒1410031 東京都品川区西五反田一丁目11番1号 株式会社 *Veritas In Silico*内 Tokyo (JP). 金 玲(**JIN, Ling**); 〒1410031 東京都品川区西五反田一丁目11番1号 株式会社 *Veritas In Silico*内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 伊藤 克博, 外 (**ITO, Katsuhiko et al.**); 〒1030025 東京都中央区日本橋茅場町2丁目13番11号 サンアイ茅場町ビル4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,

(54) **Title:** SMALL GUIDE ANTISENSE NUCLEIC ACID AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: スモールガイドアンチセンス核酸とその使用



(57) **Abstract:** The present invention relates to providing a nucleic acid medicine for managing a disease or disorder related to unwanted gene expression. More specifically, the inventors of the present invention developed a technique for efficiently regulating gene expression in a cell using a relatively short oligonucleotide, by establishing a method for designing a nucleic acid medicine, comprising performing structural analysis based on sequence information of a target RNA sequence as an object for gene expression regulation, calculating the probability of existence of each structure from the obtained results of the structural analysis and the energy of each structure, and calculating the existence probability in unified fashion of an endogenous stem-loop substructure, and thereby specifying a more favorable endogenous stem-loop substructure. This technique can theoretically be applied to regulation of any gene expression, and is therefore useful for treatment or prevention of various diseases and disorders.



WO 2019/044974 A1

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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).

添付公開書類 :

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約 : 本発明は、望ましくない遺伝子の発現に関連する疾患または障害を処置するための核酸医薬を提供することに関する。より具体的には、本発明者らは、遺伝子発現調節の対象となる標的RNA配列について、その配列情報を元に構造解析を行ない、得られた構造解析結果とそれぞれのエネルギー量から、それぞれの存在確率を算出し、内在性のステムループ部分構造の存在確率を統一的に算出することでより好ましい内在性ステムループ部分構造を特定し、核酸医薬を設計する方法を確立することで、比較的短いオリゴヌクレオチドを用いて、効率よく細胞内における遺伝子発現を調節する手法を開発した。本手法は、原理的にあらゆる遺伝子発現の調節に応用可能であることから、多様な疾患および障害の治療または予防に有用である。

明 細 書

発明の名称： スモールガイドアンチセンス核酸とその使用

関連出願の相互参照

[0001] 本願は、特願2017-166641号（出願日：2017年8月31日）の優先権を主張する出願であり、これは引用することによりその全体が本明細書に取り込まれる。

技術分野

[0002] 本発明は、オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子発現の調節に関する。より詳細には、遺伝子発現を調節するための比較的短いオリゴヌクレオチドを含有する医薬組成物とそれを用いた疾患の処置に関する。また、本発明は遺伝子発現を調節するための比較的短いオリゴヌクレオチドの設計方法にも関する。

背景技術

[0003] 医薬品開発における創薬技術では、従来より創薬標的を蛋白質とする取り組みが多く推進されて、低分子医薬や抗体とはじめとする蛋白医薬およびペプチド医薬による創薬が中心であった。近年、ゲノム科学や個別化医療など疾患の原因が遺伝子レベルで解明されてきたため、創薬標的を核酸とする取り組みが開発され、低分子医薬品や抗体医薬品では狙いにくい治療標的にも対応できると考えられるため、核酸医薬が新しいモダリティ（創薬手法）として、期待されつつある。

[0004] 基礎研究としては、アンチセンス核酸やRNAi（RNA干渉）などの研究（非特許文献1）が行われ、その技術に基づく医薬品開発が行われ、上市される製品も出始めている。さらに、蛋白質の遺伝情報を持たない核酸の機能が明らかとされつつあり、miRNA（マイクロRNA）として遺伝子発現調節技術としての創薬技術への応用が進められている（非特許文献2）。

[0005] アンチセンス核酸の技術において、梨本らは、TRUEジーンサイレンシング（tRNase^Z-utilizing efficacious gene silencing）と名付けた遺伝子

発現抑制技術を開発している（特許文献1～3、非特許文献3～10）。このTRUEジーンサイレンシングは、標的RNAと合成スモールガイドアンチセンス核酸とによって形成されるpre-tRNA様またはマイクロpre-tRNA様複合体を認識することによって、いかなるRNAの任意箇所をも切断することができるという哺乳動物tRNase Z^Lのユニークな酵素的特性に基づいている。特に、合成スモールガイドアンチセンス核酸が7塩基である場合については、human BCL-2、WT-1、CCND-1について、TRUEジーンサイレンシングの報告がある（非特許文献5～8）。TRUEジーンサイレンシングの効果は、RNA干渉（RNA interference: RNAi）と同等であり（非特許文献9）、幾つかの場合ではRNAiの効果を凌ぐことも確認されている（非特許文献10）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第3660718号

特許文献2：特許第5959522号

特許文献3：特許第5995849号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Chery, J. (2016) RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J.* 4(7): 35-50

非特許文献2：Rupaimoole, R. & Slack, F. J. (2017) MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Review Drug Discovery*, 16, 203-221

非特許文献3：Tamura, M., Nashimoto, C., Miyake, N., Daikuhara, Y., Ochi, K. and Nashimoto, M. (2003) Intracellular mRNA cleavage by 3' tRNase under the direction of 2'-O-methylRNA heptamers. *Nucleic Acids Res.*, 31, 4354-4360.

非特許文献4：Habu, Y., Miyano-Kurosaki, N., Kitano, M., Endo, Y., Yukita, M., Ohira, S., Takaku, H., Nashimoto, M. and Takaku, H. (2005) Inhibition

of HIV-1 gene expression by retroviral vector-mediated small-guide RNAs that direct specific RNA cleavage by tRNase ZL. *Nucleic Acids Res.*, 33, 235-243.

非特許文献5 : Takako Sano, Masayuki Takahashi, Tadasuke Nozaki, Yoshiaki Takahashi, Masato Tamura, and Masayuki Nashimoto. (2011) Expanding the utility of heptamer-type sgRNA for TRUE gene silencing. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 416, 427-432.

非特許文献6 : Masayuki Takahashi, Reyad A. Elbarbary, Aiko Nakashima, Mayumi Abe, Norihiro Watanabe, Miwako Narita, Masuhiro Takahashi, Masato Tamura, Tetsuo Yoshida, and Masayuki Nashimoto. (2013) A naked RNA heptamer targeting the human Bcl-2 mRNA induces apoptosis of HL60 leukemia cells. *Cancer Letters* 328, 362-368.

非特許文献7 : Norihiro Watanabe, Miwako Narita, Akie Yamahira, Tomoyo Taniguchi, Tatsuo Furukawa, Tetsuo Yoshida, Tatsuya Miyazawa, Masayuki Nashimoto, and Masuhiro Takahashi. (2013) Induction of apoptosis of leukemic cells by TRUE gene silencing using small guide RNAs targeting the WT1 mRNA. *Leukemia Research* 37, 580-585.

非特許文献8 : Satoshi Iizuka, Nobuhiko Oridate, Masayuki Nashimoto, Satoshi Fukuda, and Masato Tamura. (2014) Growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma cells by sgRNA targeting the cyclin D1 mRNA based on TRUE gene silencing. *PLoS One* 9, e114121.

非特許文献9 : Nakashima, A., Takaku, H., Shibata, H. S., Negishi, Y., Takagi, M., Tamura, M. and Nashimoto, M. (2007) Gene-silencing by the tRNA maturase tRNase ZL under the direction of small guide RNA. *Gene Therapy*, 14, 78-85.

非特許文献10 : Elbarbary, R. A., Takaku, H., Tamura, M. and Nashimoto, M. (2009) Inhibition of vascular endothelial growth factor expression by TRUE gene silencing. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 379, 924-927.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、遺伝子発現を調節するための比較的短いオリゴヌクレオチド（スモールガイドアンチセンスオリゴヌクレオチド；以下、sgASOとも言う）を含有する医薬組成物とそれを用いた疾患の処置方法を提供することを目的の一つとする。また、本発明の目的には、本発明は遺伝子発現を調節するための比較的短いオリゴヌクレオチドの設計方法を提供することが含まれる。

[0009] TRUEジーンサイレンシングにおいて、活性薬剤として用いられるスモールガイドアンチセンスオリゴヌクレオチド（sgASO）が標的RNAに結合して、tRNA^{secE}の基質となる構造を形成するためには、標的RNAの配列において少なくとも1つの内在性ステムループ構造が形成されることが必要であり、そのような配列を標的RNA配列中に同定する工程が必要である。しかし、これまでは標的とするRNAの一次配列より網羅的にステムループ構造などの高次構造やその安定性をこのような創薬技術として活用するレベルの精度で解析する手法は開発されてこなかった。本発明においては、sgASOが標的RNAに結合して、tRNA^{secE}の基質となるために少なくとも1つのステムループ構造が形成されるような配列を標的RNA配列中に同定する方法を提供することを課題の一つとする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、遺伝子発現調節の対象となる標的RNA配列について、その配列情報を元に構造解析を行なった。そして、得られた構造解析結果とそれぞれのエネルギー量から、それぞれの存在確率を算出した。内在性のステムループ部分構造の存在確率を統一的に算出することでより好ましい内在性ステムループ部分構造を特定し、sgASOを設計するという方法を確立することで、本発明者らは、比較的短いオリゴヌクレオチドを用いて、効率よく細胞内における遺伝子発現を調節する手法を開発した。本発明は、本発明者らが開発したこのような手法に基づくものであり、以下の態様を包含する

:

[0011] [態様1] 真核細胞内の標的RNAを切断するための方法であって、

1) 標的RNAに相補的な6merから10merのオリゴヌクレオチド (sgASO) がハイブリダイズすることによって、少なくとも1つのステムループ構造が形成される配列を標的RNA配列中に同定する工程、

2) 該sgASOを調製して、真核細胞内において標的RNAと接触させる工程、

を含み、

該sgASOがハイブリダイズして形成されるステムループ構造を真核細胞内のtRNA^{aseZ}が認識して標的RNAを切断することを特徴とする、方法。

[態様2] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のステム部分の塩基対数が11から14である、態様1記載の方法。

[態様3] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のステム部分の塩基対数が12である、態様1または2記載の方法。

[態様4] sgASOが7merである、態様1～3のいずれか記載の方法。

[態様5] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のうち、標的RNAによって形成されるステム部分の塩基対数が5である、態様1～4のいずれか記載の方法。

[態様6] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のうち、ループ部分が標的RNAによって形成されることを特徴とする、態様1～5のいずれか記載の方法。

[態様7] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のループ部分の塩基数が3から10である、態様1～6のいずれか記載の方法。

[態様8] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のループ部分の塩基数が4から8である、態様1～7のいずれか記載の方

法。

[態様 9] 該 s g A S O がハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のループ部分の塩基数が 7 である、態様 1 ~ 8 のいずれか記載の方法。

[態様 10] 該 s g A S O が標的 R N A に完全に相補的であることを特徴とする、態様 1 ~ 9 のいずれか記載の方法。

[態様 11] 該 s g A S O がハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のステム部分がミスマッチまたはバルジを含まない、態様 1 ~ 10 のいずれか記載の方法。

[態様 12] 該 s g A S O がハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のステム部分がミスマッチまたはバルジを含む、態様 1 ~ 10 のいずれか記載の方法。

[態様 13] ステム部分の塩基対数の計数において、ステム中のミスマッチまたはバルジの塩基数が 2 以下の場合、ミスマッチまたはバルジが塩基対を形成するとみなしてカウントし、ステム中のミスマッチまたはバルジの塩基数が 3 以上の場合、ミスマッチまたはバルジの塩基数の 2 分の 1 の数を塩基対数としてカウントする、態様 12 記載の方法。

[態様 14] 標的 R N A が m R N A または n c R N A である、態様 1 ~ 13 のいずれか記載の方法。

[態様 15] 標的 R N A が核ゲノム由来の R N A である、態様 1 ~ 14 のいずれか記載の方法。

[態様 16] 標的 R N A がミトコンドリアゲノム由来の R N A である、態様 1 ~ 14 のいずれか記載の方法。

[態様 17] 標的 R N A がウイルスゲノムまたは細菌ゲノム由来の R N A である、態様 1 ~ 14 のいずれか記載の方法。

[態様 18] s g A S O が修飾ヌクレオシドおよび／または修飾ヌクレオシド間結合を含む、態様 1 ~ 17 のいずれか記載の方法。

[態様 19] 標的 R N A によって形成されるステム部分の 5' 側配列と 3' 側配列の塩基数の差が 1 以下である、態様 1 ~ 18 のいずれか記載の方法。

[態様20] 該sgASOの末端水酸基の一方または両方が修飾されている、態様1～19のいずれか記載の方法。

[態様21] 該sgASOの末端水酸基の一方または両方にリン酸基が付加されている、態様1～20のいずれか記載の方法。

[態様22] 標的RNA上のsgASOが結合する領域の5'側から構成する塩基をN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7とし、さらにsgASOが結合する領域の3'側に隣接する最初の塩基をN8とした場合に、以下の条件1～3の少なくとも一つが満たされることを特徴とする、態様1～21のいずれか記載の方法：

- 条件1：N8がAもしくはGである；
- 条件2：N7がCである；
- 条件3：N6がA、CもしくはGである。

[態様23] sgASOが配列番号1から配列番号16384のいずれか1つの配列から成るオリゴヌクレオチドである、態様1～22のいずれか記載の方法。

[態様24] 約7merのオリゴヌクレオチドを含む、患者における疾患または障害の治療または予防に用いるための医薬組成物であって、

該約7merのオリゴヌクレオチドが、疾患または障害に関連する標的RNAに相補的であり、

該標的RNAが少なくとも1つのステムループ構造を形成することができ、

該約7merのオリゴヌクレオチドが該ステムループ構造の3'側の領域にハイブリダイズして、該標的RNAが形成するステムループと合わせて少なくとも1つのより大きなステムループ構造を形成することができ、

形成された構造が患者体内のtRNase Z^Lによって認識されて、標的mRNAが切断されることを特徴とする、医薬組成物。

[態様25] 癌の治療もしくは予防のための医薬組成物であって、以下から選択されるいずれかの配列を含むsgASOを含む、医薬組成物：

5' -GAAACUU-3' ;
5' -CUGUCAA-3' ;
5' -UCUUCAA-3' ;
5' -UUAUCGU-3' ;
5' -CUUAUAA-3' ;
5' -GCGGGGG-3' ;
5' -ACUCAAA-3' 。

[態様26] 真核細胞内の標的RNAを切断するためのオリゴヌクレオチド (sgASO) の設計方法であって、

1) 標的RNA配列中に少なくとも1つのステムループ構造が形成される配列を同定する工程、

2) 該ステムループ構造に隣接する3'側の6~10塩基の配列をsgASOの結合配列として同定する工程、および

3) 該結合配列に相補的な配列をsgASOの配列として同定する工程を含む、方法。

[態様27] 態様25記載のオリゴヌクレオチド (sgASO) の設計方法であって、

i) 標的RNAによって形成されるステムループ構造のステム部分の塩基対数が4~8であり、

ii) 該ステムループ構造のループ部分の塩基数が3から10であり、

iii) 該ステムループ構造のステム部分がミスマッチまたはバルジを含む場合、ステム部分の塩基対数の計数において、ステム中のミスマッチまたはバルジの塩基数が2以下の場合、ミスマッチまたはバルジが塩基対を形成するとみなしてカウントし、ステム中のミスマッチまたはバルジの塩基数が3以上の場合、ミスマッチまたはバルジの塩基数の2分の1の数を塩基対数としてカウントし、そして

iv) 該ステム部分の5'側配列と3'側配列の塩基数の差が1以下である、

方法。

[態様28] 標的RNA上のsgASOが結合する領域の5'側から構成する塩基をN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7とし、さらにsgASOが結合する領域の3'側に隣接する最初の塩基をN8とした場合に、以下の条件1~3の少なくとも一つが満たされることを特徴とする、態様27記載の方法：

- N8がAもしくはGである；
- N7がCである；
- N6がA、CもしくはGである。

[態様29] スモールガイドアンチセンスオリゴヌクレオチド (sgASO) の設計方法であって、

- 1) 標的RNA上に、存在確率の高いステムループを同定する工程、
- 2) 該ステムループを評価する工程、および
- 3) 該ステムループを形成する塩基対の3'側直後から7塩基を標的配列 (センス鎖) とし、そのアンチセンス鎖をsgASO配列として同定する工程

を含み、

ここで、1) 標的RNA上に、存在確率の高いステムループを同定する工程は、

i) 5'末端からR塩基刻みでW塩基の幅の枠nを設定し、該枠nは標的RNAからnmax個得られ、それぞれの枠nにおいて、構成するW塩基の塩基配列についてパターンマッチングによって取り得る塩基対パターンを算出し、その結果に公知の熱力学的安定性計算を適用し、それぞれの塩基対パターンに対して ΔG として与えることを含む、構造予測ステップと、

ii) 枠nにおいてmmax(n)個得られている予測構造結果とそれぞれのエネルギー量から該RNAがおかれている細胞内での状態が平衡状態であることを仮定し、予測構造結果それぞれの存在確率をマクスウェル=ボルツマン統計に従って算出し、ここで、n枠目での構造予測結果のうち最安定

構造から m 番目の予測結果について、その存在確率をおのおの $j(n, m)$ とすることを含み、構造解析ステップと、

i i i) 枠内ではなく配列上の絶対位置 x から始まり、構成するループとステムの特徴プロファイル（ステムを構成する塩基対の塩基の位置で定義されるステムループの個性）を p とした時に、当該ステムループを $motif(x, p)$ と呼び、 $motif(x, p)$ の枠 n 内での存在確率を、部分的な存在確率 $P_local(x, p, n)$ とし、その値は、枠 n において得られた構造予測結果すべてについての中で当該ステムループが存在する構造予測結果についての j 値の総和 $\sum j(n, m)$ であるとする含み、局所存在確率計算ステップ、ここで、枠 n における、 $motif(x, p)$ の局所的な存在確率 $P_local(x, p, n)$ は以下で表され：

[数1]

$$P_local(x, p, n) = \sum_{m=1}^{nmax(n)} \begin{cases} 0 & \dots motif(x, p) \text{ が、枠 } n \text{ の } m \text{ 番目の構造に見つからなかった場合} \\ j(n, m) & \dots motif(x, p) \text{ が、枠 } n \text{ の } m \text{ 番目の構造に見つかった場合} \end{cases}$$

i v) $P_local(x, p, n)$ について枠 1 から $nmax$ まで総和をとった結果を $\sum P_local(x, p, n)$ 、ステムループ $motif(x, p)$ を構成する配列全長が枠内におさまることのできる枠の数を $n_all(x, p)$ 個としたとき、全体の中での $motif(x, p)$ の存在確率 $P_global(x, p)$ を $\sum P_local(x, p, n) / n_all(x, p)$ として表すことを含み、存在確率計算ステップ、ここで、 $motif(x, p)$ についての全体の中での存在確率 $P_global(x, p)$ は以下で表され：

[数2]

$$P_global(x, p) = \sum_{n=1}^{nmax} \frac{P_local(x, p, n)}{n_all(x, p)}$$

v) 得られた motif (x, p) についての存在確率 $P_{global}(x, p)$ に対して、存在確率および特徴 p から、ステムループを選択する解析ステップを含む、方法。

図面の簡単な説明

[0012] [図1] 図1は、本発明に従って設計した sgASO (VIS-1~VIS-7) による Bcl-2 mRNA の発現抑制について、ヒト白血病細胞株 HL60 を用いて試験した結果を示すグラフである。結果として、既に報告されている sgASO である Hep1 と比して、倍程度の活性を示す sgASO として VIS-1、VIS-5 を得ることができた。縦軸は mock (溶媒とした水のみ) の試料) を 1 とした場合の相対的 Bcl-2 mRNA レベルを示す。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明者らは、比較的短いオリゴヌクレオチドを用いて、効率よく細胞内における遺伝子発現を調節する手法を開発した。以下に、本発明を詳細に説明する。

[0014] TRUE ジーンサイレンシング

本発明の発明者らは、TRUE ジーンサイレンシング (tRNase Z^L-utilizing efficacious gene silencing) と名付けた新しい遺伝子発現抑制技術を開発している。tRNase Z^L は、tRNA の 3' 末端部をプロセッシングするエンドリボヌクレアーゼ (tRNase Z または 3' tRNase) の分子量の大きい種類の酵素であり、前駆体 tRNA の 3' 末端部を切除する。この TRUE ジーンサイレンシングは、標的 RNA と合成スモールガイドアンチセンス核酸とによって形成される pre-tRNA 様またはマイクロ pre-tRNA 様複合体を認識することによって、いかなる RNA の任意箇所をも切断することができるという哺乳動物 tRNase Z^L のユニークな酵素的特性に基づいている。スモールガイドアンチセンスオリゴヌクレオチド (特にスモールガイド RNA) は、5' -half tRNA (Nashimo

to, M. (1996) Specific cleavage of target RNAs from HIV-1 with 5' half tRNA by mammalian tRNA 3' processing endoribonuclease. *RNA*, 2, 2523-2524.)、12～16-nt直鎖RNA (Shibata, H. S., Takaku, H., Takagi, M. and Nashimoto, M. (2005) The T-loop structure is dispensable for substrate recognition by tRNase ZL. *J. Biol. Chem.*, 280, 22326-22334.)、ヘプタマー型RNA (Nashimoto, M., Geary, S., Tamura, M. and Kasper, R. (1998) RNA heptamers that directs RNA cleavage by mammalian tRNA 3' processing endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.*, 26, 2565-2571.) およびフック型RNA (Takaku, H., Minagawa, A., Takagi, M. and Nashimoto, M. (2004) A novel four-base-recognizing RNA cutter that can remove the single 3' terminal nucleotides from RNA molecules. *Nucleic Acids Res.*, 32, e91.) の4種に分けられる。

[0015] これまでに、様々なmRNAを標的とするスモールガイドアンチセンスオリゴヌクレオチド (sgASO) を、その発現プラスミドまたは2'-O-メチル化RNAを導入することによって、様々な哺乳動物細胞におけるTRUEジーンサイレンシングの有効性が実証されている。例えば、Jurkat細胞におけるHIV-1発現は、5'-half tRNA型sgRNAによって18日間以上抑制され (上掲のHabu et al. (2005))、マウス肝臓におけるルシフェラーゼ発現はヘプタマー型sgASOによって抑制された (上掲のNakashima et al. (2007))。さらに、TRUEジーンサイレンシングの効果は、RNA干渉 (RNA interference: RNAi) と同等であり、幾つかの場合ではRNAiの効果を凌ぐことも確認されている。

[0016] tRNase Z^Lが核内だけでなくサイトゾルにも存在すること、そしてsgASOとして使用していたのと同じ5'-half tRNAが細胞質に存在することが見出されている。また、ヒトサイトゾルtRNase Z^Lが、5'-half tRNAの指揮のもとでmRNAを切断することによって遺伝子発現を調節すること、そしてPPM1F mRNAがtRNase Z^Lの真の標的の一つであることが見出されている (Elbarbary, R. A.,

Takaku, H., Uchiyumi, N., Tamiya, H., Abe, M., Takahashi, M., Nishida, H. and Nashimoto, M. (2009) Modulation of gene expression by human cytosolic tRNase ZL through 5' -half-tRNA. PLoS ONE, 4, e5908.)。さらにまた、miR-103を含むマイクロRNAの一部がフック型sgASOとして働き、サイトゾル tRNase Z^LによるmRNA切断を介して遺伝子発現を下方調節し得ることが証明されている (Elbarbary, R. A., Takaku, H., Uchiyumi, N., Tamiya, H., Abe, M., Nishida, H. and Nashimoto, M. (2009) Human cytosolic tRNase ZL can downregulate gene expression through miRNA. FEBS Lett., 583, 3241-3246.)。以上のことから、TRUEジーンサイレンシングは、細胞内の小さな非コードRNAによって作動されるサイトゾル tRNase Z^Lの新たに解明された生理学的役割を基礎として機能していることは明らかである。

[0017] TRUEジーンサイレンシングの最終的な目的の一つは、特定遺伝子の発現を原因とする疾患治療剤または予防剤としてのsgASOの使用である。例えば、発明者らは以前に、癌治療の分子標的として有望視されているBcl-2およびVEGFをコードする細胞内mRNAレベルが、5' -half tRNA型sgASO、14-nt直鎖型sgASOまたはヘプタマー型sgASOによって発現抑制されることを見出している (上掲のTamura et al. (2003)およびElbarbary et al. (2009))。本発明の態様の一つは、真核細胞内の標的RNAを切断するための方法であって、(1) 標的RNAに相補的な6merから10merのオリゴヌクレオチド (sgASO) がハイブリダイズすることによって、少なくとも1つのステムループ構造が形成される配列を標的RNA配列中に同定する工程、および(2) 該sgASOを調製して、真核細胞内において標的RNAと接触させる工程を含み、該sgASOがハイブリダイズして形成されるステムループ構造を真核細胞内のtRNase Z^Lが認識して標的RNAを切断することを特徴とする方法に関する。本方法は、in vitroでも、in vivoでも適用されうる。ヒトもしくは非ヒト動物に対してin vivoで適用される場合、このよ

うな、真核細胞内の標的RNAを切断するための方法は、望ましくない遺伝子の発現に関係する疾患または障害の治療のために用いられうる。したがって、別の観点からは、本発明の態様の一つは、ヒトもしくは非ヒト動物における望ましくない遺伝子の発現に関係する疾患または障害の治療のための方法であって、(1) 疾患に関係する遺伝子から転写された標的RNAに相補的な6merから10merのオリゴヌクレオチド(sgASO)がハイブリダイズすることによって、少なくとも1つのステムループ構造が形成される配列を標的RNA配列中に同定する工程、および(2) 該sgASOを調製して、ヒトもしくは非ヒト動物に投与し、その細胞内において標的RNAと接触させる工程を含み、該sgASOがハイブリダイズして形成されるステムループ構造を該細胞内のtRNAse^Lが認識して標的RNAを切断することを特徴とする方法に関する。対象とする疾患は、例えば、癌でありうる。

[0018] スモールガイドアンチセンス核酸 (sgASO)

一つの態様において、スモールガイドアンチセンス核酸は、比較的短いオリゴヌクレオチドであり、例えば6merから10mer、つまり、6mer、7mer、8mer、9mer、または10mer、好ましくは7merのオリゴヌクレオチド(ヘプタマー型sgASO)である。sgASOを薬剤成分とする場合、薬理学的およびCMC (Chemistry, Manufacturing and Control) の観点からは、より短いsgASOが好ましい。何故ならば、より短いsgASOは長鎖のsgASOよりも簡便かつ安価に合成することができる。また、より短いsgASOは、細胞導入剤(トランスフェクション試薬等)およびDDS基剤を用いることなく容易に細胞内に取込ませることができる(Loke, S.L., Stein, C.A., Zhang X.H., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., Cohen, J.S. and Neckers, L.M. (1989) Characterization of oligonucleotide transport into living cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 3474-3478.)。実際の応用において、合成上の利点や、配列認識の特異性の観点からは、7merのオリゴヌクレオチドが好ましいとされ得る

。

[0019] 本発明に係る sgASOは、公知の化学合成を用いる方法、あるいは酵素的転写法等にて製造することができる。公知の化学合成を用いる方法として、ホスホロアミダイト法、ホスホロチオエート法、ホスホトリエステル法等をあげることができ、例えば、ABI3900ハイスループット核酸合成機（アプライドバイオシステムズ社製）やNTS H-6核酸合成機（日本テクノサービス社製）、Oligoilot10核酸合成機（GEヘルスケア社製）により合成することができる。酵素的転写法としては、目的の塩基配列を有するプラスミドまたはDNAを鋳型として、T7、T3、SP6RNAポリメラーゼ等のRNAポリメラーゼを用いた転写をあげることができる。合成法または転写法により製造したヘプタマー型sgASOは、次いでHPLC等にて精製する。例えばHPLC精製時には、triethylammonium acetate (TEAA) またはhexylammonium acetate (HAA) とアセトニトリルの混合溶液を用いて、sgASOをカラムから溶出する。その後、溶出体積の1000倍量の蒸留水で溶出溶液を10時間透析し、透析溶液を凍結乾燥した後、使用時まで冷凍保存する。使用時には、例えば、蒸留水で最終濃度が100 μ M程度になるように溶解する。

[0020] 本発明に係るsgASOに用いられる核酸としては、ヌクレオシドまたはそのヌクレオシドと同等の機能を有する分子がヌクレオシド間結合を介して重合した分子であればいかなるものでもよい。ヌクレオシドは、塩基（核酸塩基）と糖が結合した化合物の一種である。塩基としては、アデニン、グアニンなどのプリン塩基、チミン、シトシン、ウラシルなどのピリミジン塩基、ニコチンアミド、ジメチルイソアロキサジンなどを含む。アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジンなどが代表的なヌクレオシドである。ヌクレオチドとは、ヌクレオシドにリン酸基が結合した物質である。オリゴヌクレオチド（ポリヌクレオチドとも言う）としては、例えばリボヌクレオチドの重合体であるRNA、デオキシリボヌクレオチドの重合体であるDNA、RNAおよびDNAが混合した重合体、修飾ヌクレオシドを含むヌ

クレオチド重合体が、それぞれあげられる。天然のDNA、RNAはヌクレオシド間結合として、ホスホジエステル結合を有している。本発明に係るsgASOに用いられる核酸は、修飾を含むものであってもよい。核酸修飾の位置には、糖部分、骨格（連結）部分、核酸塩基（塩基）部分、3'または5'末端部分が含まれる。また、本発明において用いられるsgASOには、モルホリノ核酸、ペプチド核酸が含まれていてもよい。

[0021] 修飾ヌクレオシド

修飾ヌクレオシドとしては、例えばRNAまたはDNAと比較して、ヌクレアーゼ耐性の向上または安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーをあげるため、細胞透過性をあげるため、あるいは可視化させるために、リボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオシド、RNAまたはDNAに修飾を施した分子を挙げるることができる。例えば、糖部修飾ヌクレオシドがあげられる。本発明のsgASOは、例えば、Khvorova & Watts (Nature Biotechnology 35, 238-248 (2017) doi:10.1038/nbt.3765) に開示の修飾核酸分子を含んでいてもよい。

[0022] 修飾糖とは、天然糖部分（すなわち、DNA（2' -H）またはRNA（2' -OH）中に認められる糖部分）からの置換および／または任意の変化を有する糖を指し、糖部修飾ヌクレオシドとは、修飾糖を含む修飾ヌクレオシドを指す。糖部修飾ヌクレオシドとは、ヌクレオシドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の化学構造物質を付加あるいは置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、2' -O-メチルリボースで置換された修飾ヌクレオシド、2' -O-プロピルリボースで置換された修飾ヌクレオシド、2' -メトキシエトキシリボースで置換された修飾ヌクレオシド、2' -O-メトキシエチルリボースで置換された修飾ヌクレオシド、2' -O-[2-(グアニジウム)エチル]リボースで置換された修飾ヌクレオシド、2' -O-フルオリボースで置換された修飾ヌクレオシド、糖部に架橋構造を導入することにより2つの環状構造を有する架橋構造型人工核酸 (Bridged Nucleic Acid) (BNA)、より具体的には、2'位の酸素原子

と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックト人工核酸 (Locked Nucleic Acid: LNA)、エチレン架橋構造型人工核酸 (Ethylene bridged nucleic acid: ENA) [Nucleic Acid Research, 32, e175 (2004)] 等があげられ、さらにペプチド核酸 (PNA) [Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)]、オキシペプチド核酸 (OPNA) [J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)]、およびペプチドリボ核酸 (PRNA) [J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)] 等をあげることができる。

[0023] RNAの2'-O-メチル (2'-OMe) 修飾 (2'-OMe-RNA) は、天然にも存在する修飾であり、修飾オリゴヌクレオチドの結合親和性とヌクレアーゼ耐性を向上させると共に、免疫刺激性を低下させる。2'-O-メトキシエチル (2'-MOE) は、ヌクレアーゼ耐性が2'-OMe修飾よりもさらに増加しており、修飾ヌクレオチドの結合親和性 (ΔT_m) も大幅に上昇している。2'-OMeを含有するsgASOは、tRNAase Zによる認識と切断にも適合する。RNAの2'-フルオロ (2'-F) 修飾 (2'-F-RNA) を用いてオリゴヌクレオチドの親和性を増加させることもできる。他の2'修飾核酸としては、2'-F-ANAや、関根らの2'-修飾誘導体 (特許第5194256号、特開2015-020994) を挙げることができる。

[0024] リボースの2'酸素と4'炭素を連結したLNA (Locked nucleic acid) は、結合親和性に大幅な増加をもたらす。LNAでは、RNAのリボース糖の2'酸素と4'炭素が環構造において固定されている。この修飾は、特異性、親和性、および半減期を増加させ、目的の組織への効果的な送達を、より低い毒性で可能とする。LNAで完全に修飾された約8ヌクレオチドよりも長いオリゴマーは凝集する傾向があることが知られており、一般的には、DNAや他の糖部修飾核酸との混合で用いられる。LNAを含有するsgASOは、tRNAase Zによる認識と切断にも適合する。

[0025] LNAのメチル化類似体であるcEtもLNAと同様に有用である。トリシクロ-DNA (tcDNA) は、3環骨格に基づく拘束型ヌクレオチドで

ある。

[0026] 修飾ヌクレオシドとしては、その他に、核酸の塩基部分の原子（例えば、水素原子、酸素原子）もしくは官能基（例えば、水酸基、アミノ基）が他の原子（例えば、水素原子、硫黄原子）、官能基（例えば、アミノ基）、もしくは炭素数1～6のアルキル基で置換されたものまたは保護基（例えばメチル基またはアシル基）で保護されたもの、ヌクレオシドに、例えば脂質、リン脂質、フェナジン、フォレート、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、色素など、別の化学物質を付加した分子等を用いてもよい。

[0027] 修飾核酸塩基（または修飾塩基）には、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、またはウラシル以外のあらゆる核酸塩基が含まれるが、例えば、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン、5-ヨードシトシン、N4-メチルシトシン、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、2-チオチミン、N6-メチルアデニン、8-ブロモアデニン、N2-メチルグアニン、8-ブロモグアニン、およびイノシンなどが挙げられる。

[0028] ヌクレオシド間結合

天然のDNA、RNAはヌクレオシド間結合として、ホスホジエステル結合を有している。本発明の一つの態様においては、ヌクレオシド間結合は、修飾を含んでもよい。修飾ヌクレオシド間結合とは、天然に存在するヌクレオシド間結合（すなわち、ホスホジエステル結合）からの置換または任意の変化を有するヌクレオシド間結合を指し、修飾ヌクレオシド間結合には、リン原子を含むヌクレオシド間結合、およびリン原子を含まないヌクレオシド間結合が含まれる。修飾ヌクレオシド間結合としては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の化学物質を付加あるいは置換したものでもよく、例えば、ホスホロチオエート結合に置換された修飾ヌクレオシド間結合、N3'-P5'ホスフォアミデート結合に置換された修飾ヌクレオシド間結合等をあげることができる。他の修

飾ヌクレオシド間結合としては ($S_{C5'}$, R_p) - α , β - CNA、PMOなどが挙げられる。

[0029] 代表的なリン含有ヌクレオシド間結合としては、例えば、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホトリエステル結合、およびメチルホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、ホスホロアミデート結合を挙げることができる。

[0030] 主要な修飾ヌクレオシド間結合の一つであるホスホロチオエート (PS) 結合は、ヌクレアーゼによる分解からオリゴヌクレオチドを保護するのに役立つ。ホスホロジチオエート (PS) 修飾は、もともとはヌクレアーゼ耐性を付与するためにオリゴヌクレオチドに組み込まれたものであるが、この修飾は、オリゴヌクレオチドの輸送と取り込みにも大きな影響を与える。PSは、ASOの電荷を変えることによって、受容体部位および血漿タンパク質への結合を増加させ、標的組織に到達するASOの量を増加させる。ヘパリン結合タンパク質は、ホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチドの最も親和性の高い標的の一つである。血漿タンパク質による適切な結合は、腎臓系による血液からの迅速な排除を抑制し、最適な送達を促進する。ホスホチオエート結合を有するsgASOは、tRNAase Z¹による認識と切断にも適合する。

[0031] ホスホロチオエート結合は、リン原子部分に立体中心を有しており、完全修飾オリゴヌクレオチドは通常、 2^{n-1} 種のジアステレオマーの混合物となる (例えば、7merのホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、 2^6 種のジアステレオマーの混合物となる)。S_pおよびR_pジアステレオマー結合は、異なる特性を示すことが知られている。R_pジアステレオマーは、S_pジアステレオマーよりもヌクレアーゼ耐性が低い、より高い親和性で相補鎖と結合する。本発明のsgASOにおいては、特定のホスホロチオエート結合が特定のジアステレオマーとなるように合成を制御してもよい。

[0032] リガンド等を連結したオリゴヌクレオチド／末端修飾オリゴヌクレオチド

核酸に別の化学物質を付加した分子としては、例えば、5' -ポリアミン付加誘導体、コレステロール付加誘導体、ステロイド付加誘導体、胆汁酸付加誘導体、ビタミン付加誘導体、Cy 5付加誘導体、Cy 3付加誘導体、6-FAM付加誘導体、ビオチン付加誘導体等および北出らの誘導体（PCT/J P 2007/000087、PCT/J P 2016/59398）をあげることができる。リガンド等を付加する部位は、オリゴヌクレオチドの末端（5'末端または3'末端）および／またはオリゴヌクレオチドの内部でありうる。

[0033] 末端修飾の例として、GalNAc連結オリゴヌクレオチドやPUFA連結オリゴヌクレオチドが知られている。GalNAcを末端に連結することにより、オリゴヌクレオチドの肝臓への送達効率を高めることができる。本発明において用いられるsgASOには、GalNAcなどのリガンドが連結されていてもよい。

[0034] 短いオリゴヌクレオチドは、腎臓に多く送達され、長いオリゴマーは肝臓に多く送達される傾向がある。短いオリゴヌクレオチドは、血漿タンパク質に結合しにくく、結果として血漿中の半減期が短くなる傾向があるが、切断可能なリンカーなどを用いて多量体を構築することが可能である。本発明において用いられるsgASOは、切断可能なリンカーなどを用いて、他のsgASOに連結されていてもよい。

[0035] 本発明に係るsgASOは、5'末端および／または3'末端にリン酸基が付加されていてもよい。他の末端修飾としては、E-VP、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、C-メチルアナログなどがあり、オリゴヌクレオチドの安定性を高めることが知られている。本発明において用いられるsgASOは、これらの末端修飾を含んでいてもよい。

[0036] sgASOの配列設計

本発明に係るsgASOは、塩基対合を介して標的RNAとtRNAアクセプターシステム様二重鎖を形成することによって、tRNase Z^Lによる標的RNAの特異的切断を可能とするため、sgASOの標的部位は、tR

NA Tアームに類似する安定したヘアピン構造領域の直下となる。sgASOはその7塩基だけでなく、安定したヘアピン構造を形成する配列領域の特異性によって効果的にRNAを切断する。したがって、sgASOの塩基配列は、標的遺伝子のmRNA配列情報に基づき設計することができる。

[0037] 本発明の態様の一つは、上述のとおり、真核細胞内の標的RNAを切断するための方法であって、(1) 標的RNAに相補的な6merから10merのオリゴヌクレオチド(sgASO)がハイブリダイズすることによって、少なくとも1つのステムループ構造が形成される配列を標的RNA配列中に同定する工程、および(2) 該sgASOを調製して、真核細胞内において標的RNAと接触させる工程を含み、該sgASOがハイブリダイズして形成されるステムループ構造を真核細胞内のtRNA^{ase Z⁺}が認識して標的RNAを切断することを特徴とする方法に関する。

[0038] tRNAのアクセプターステムとTアームは、立体構造上は直列して一本のステムループ構造をとっており、tRNA^{ase Z⁺}はこのステムループ構造を認識して、RNAの切断を行うと考えられる。よって、sgASOと標的RNAとがハイブリダイズすることにより、このようなアクセプターステムとTアームが形成する構造と類似の一本のステムループ構造を再現できれば、標的RNAの切断も可能となる。

[0039] 例えば、ヒトのグルタミン酸tRNAの場合、アクセプターステムは7塩基長であり、Tアームのステム部分は5塩基長であり、Tアームのループ部分は7塩基長である。よって、アクセプターステムに対応するsgASOは、例えば、7塩基長であり得るが、必ずしもこれに限定はされない。本発明に係るsgASOの長さは、例えば、6~10merであり得る。また、標的RNAが形成するTアーム様のステムループ構造は、ステム部分が5塩基長であり、ループ部分が7塩基であり得るが、必ずしもこれに限定はされない。標的RNAが形成するTアーム様ステムループ構造のステム部分の長さは、例えば、4~8塩基長であり得る。ループ部分の塩基数は、例えば、3~10塩基であることができ、好ましくは4~8塩基である。さらに、sg

A S Oの長さ、標的RNAが形成するTアーム様のステムループ構造のステム部分の長さの和は、12塩基長であり得るが、これも必ずしもそれに限定はされない。この長さの和は、例えば、11～14塩基であり得る。ただし、実際の応用において、合成上の利点や、配列認識の特異性の観点からは、sgASOは7merのオリゴヌクレオチドであることが好ましいとされ得る。また、標的RNAが形成するTアーム様のステムループ構造については、安定性や存在確率の観点から、ステム部分の長さが5塩基長であることが好ましいとされ得る。また、同様な観点から、標的RNAが形成するTアーム様のステムループ構造については、ステム部分の2本の鎖の長さが均等（ループを挟んでステムの5'側配列と3'側配列の塩基数の差が1つ以内）であって、ループ部分の長さが10を超えないものが好ましいとされ得る。

[0040] sgASOの配列設計においては、本発明者らが行ったtRNA遺伝子の配列解析の結果に基づき、標的RNA上のsgASOが結合する領域の5'側から構成する塩基をN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7とし、さらにsgASOが結合する領域の3'側に隣接する最初の塩基をN8とした場合に、以下の条件1～3の少なくとも1つを満たすように配列を設計してもよく、条件1～3の少なくとも2つ、あるいは条件1～3の全てを満たすように配列を設計してもよい：

- 条件1：N8がAもしくはGである；
- 条件2：N7がCである；
- 条件3：N6がA、CもしくはGである。

[0041] 標的RNAが形成するTアーム様のステムループ構造および／または標的RNAとsgASOとが形成するアクセプターステム様構造には、ワトソン-クリック型塩基対以外の非ワトソン-クリック型塩基対（例えばG-U結合）が含まれていてもよい。また、ステムにはミスマッチやバルジが含まれていてもよい。

[0042] sgASOが7merである場合は、sgASOは、配列番号1から配列

番号16384のいずれか1つの配列から成るオリゴヌクレオチドでありうる。なお、本明細書において「配列番号n」は「SEQ ID NO:n」と表記する場合もある。配列番号1から配列番号16384の配列を以下の表に示す：

[0043]

[表17]

SEQ ID NO: 4877	CAUCCAA	SEQ ID NO: 4938	CAUCCAA	SEQ ID NO: 5000	CAUGCCG	SEQ ID NO: 5060	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5101	CAUUGUA	SEQ ID NO: 5162	CCAACUU
SEQ ID NO: 4888	CAUAGAA	SEQ ID NO: 4949	CAUCCCA	SEQ ID NO: 5009	CAUGAGC	SEQ ID NO: 5069	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5102	CAUUGUA	SEQ ID NO: 5163	CCAAGAA
SEQ ID NO: 4889	CAUAGAG	SEQ ID NO: 4950	CAUCCCC	SEQ ID NO: 5010	CAUGAGA	SEQ ID NO: 5070	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5103	CAUUGUC	SEQ ID NO: 5164	CCAAGAC
SEQ ID NO: 4900	CAUAGAU	SEQ ID NO: 4951	CAUCCCG	SEQ ID NO: 5022	CAUGAGC	SEQ ID NO: 5083	CAUUGUA	SEQ ID NO: 5104	CAUUGUU	SEQ ID NO: 5165	CCAAGAG
SEQ ID NO: 4901	CAUAGCA	SEQ ID NO: 4952	CAUCCCU	SEQ ID NO: 5033	CAUGAGC	SEQ ID NO: 5094	CAUUGUC	SEQ ID NO: 5105	CAUUGAA	SEQ ID NO: 5166	CCAAGAA
SEQ ID NO: 4902	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4953	CAUCCGA	SEQ ID NO: 5034	CAUGAGU	SEQ ID NO: 5095	CAUUGUG	SEQ ID NO: 5106	CAUUGAC	SEQ ID NO: 5167	CCAAGCA
SEQ ID NO: 4903	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4954	CAUCCGC	SEQ ID NO: 5005	CAUGAUA	SEQ ID NO: 5066	CAUUGUU	SEQ ID NO: 5107	CAUUGAG	SEQ ID NO: 5168	CCAAGCC
SEQ ID NO: 4904	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4955	CAUCCGG	SEQ ID NO: 5006	CAUGAUA	SEQ ID NO: 5067	CAUUGUA	SEQ ID NO: 5108	CAUUGAU	SEQ ID NO: 5169	CCAAGCG
SEQ ID NO: 4905	CAUAGCA	SEQ ID NO: 4956	CAUCCGU	SEQ ID NO: 5007	CAUGAUG	SEQ ID NO: 5068	CAUUGAC	SEQ ID NO: 5109	CAUUGCA	SEQ ID NO: 5170	CCAAGCC
SEQ ID NO: 4906	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4957	CAUCCUA	SEQ ID NO: 5008	CAUGAUG	SEQ ID NO: 5069	CAUUGAG	SEQ ID NO: 5110	CAUUGCC	SEQ ID NO: 5171	CCAAGCA
SEQ ID NO: 4907	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4958	CAUCCUC	SEQ ID NO: 5009	CAUGAUA	SEQ ID NO: 5070	CAUUGAU	SEQ ID NO: 5111	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5172	CCAAGCC
SEQ ID NO: 4908	CAUAGCU	SEQ ID NO: 4959	CAUCCUG	SEQ ID NO: 5010	CAUGACA	SEQ ID NO: 5082	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5112	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5173	CCAAGCG
SEQ ID NO: 4909	CAUAGUA	SEQ ID NO: 4960	CAUCCUU	SEQ ID NO: 5011	CAUGAGC	SEQ ID NO: 5083	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5113	CAUUGCA	SEQ ID NO: 5174	CCAAGCG
SEQ ID NO: 4910	CAUAGUC	SEQ ID NO: 4961	CAUCCGA	SEQ ID NO: 5012	CAUGAGU	SEQ ID NO: 5084	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5114	CAUUGCC	SEQ ID NO: 5175	CCAAGCA
SEQ ID NO: 4911	CAUAGUG	SEQ ID NO: 4962	CAUCCGAC	SEQ ID NO: 5013	CAUGGCA	SEQ ID NO: 5085	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5115	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5176	CCAAGUG
SEQ ID NO: 4912	CAUAGUU	SEQ ID NO: 4963	CAUCCGAG	SEQ ID NO: 5014	CAUGGCA	SEQ ID NO: 5086	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5116	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5177	CCAAGUG
SEQ ID NO: 4913	CAUAGAA	SEQ ID NO: 4964	CAUCCGAA	SEQ ID NO: 5015	CAUGCCG	SEQ ID NO: 5087	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5117	CAUUGUA	SEQ ID NO: 5178	CCAAGUU
SEQ ID NO: 4914	CAUAGAC	SEQ ID NO: 4965	CAUCCGA	SEQ ID NO: 5016	CAUGCCU	SEQ ID NO: 5088	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5118	CAUUGUC	SEQ ID NO: 5179	CCAAGUA
SEQ ID NO: 4915	CAUAGUG	SEQ ID NO: 4966	CAUCCGCC	SEQ ID NO: 5017	CAUGGCA	SEQ ID NO: 5089	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5119	CAUUGUG	SEQ ID NO: 5180	CCAAGUA
SEQ ID NO: 4916	CAUAGUU	SEQ ID NO: 4967	CAUCCGCC	SEQ ID NO: 5018	CAUGGCG	SEQ ID NO: 5090	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5120	CAUUGUU	SEQ ID NO: 5181	CCAAGUA
SEQ ID NO: 4917	CAUAGCA	SEQ ID NO: 4968	CAUCCGU	SEQ ID NO: 5019	CAUGGGG	SEQ ID NO: 5091	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5121	CAUUGAA	SEQ ID NO: 5182	CCAAGUU
SEQ ID NO: 4918	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4969	CAUCCGA	SEQ ID NO: 5020	CAUGGCU	SEQ ID NO: 5092	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5122	CAUUGAC	SEQ ID NO: 5183	CCAAGUA
SEQ ID NO: 4919	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4970	CAUCCGC	SEQ ID NO: 5021	CAUGGUA	SEQ ID NO: 5093	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5123	CAUUGAG	SEQ ID NO: 5184	CCAAGUC
SEQ ID NO: 4920	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4971	CAUCCGG	SEQ ID NO: 5022	CAUGGUC	SEQ ID NO: 5094	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5124	CAUUGAA	SEQ ID NO: 5185	CCAAGUC
SEQ ID NO: 4921	CAUAGCA	SEQ ID NO: 4972	CAUCCGU	SEQ ID NO: 5023	CAUGGUG	SEQ ID NO: 5095	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5125	CAUUGAA	SEQ ID NO: 5186	CCAAGUC
SEQ ID NO: 4922	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4973	CAUCCUA	SEQ ID NO: 5024	CAUGGUG	SEQ ID NO: 5096	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5126	CAUUGAC	SEQ ID NO: 5187	CCAAGUC
SEQ ID NO: 4923	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4974	CAUCCUC	SEQ ID NO: 5025	CAUGGAA	SEQ ID NO: 5097	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5127	CAUUGAC	SEQ ID NO: 5188	CCAAGUC
SEQ ID NO: 4924	CAUAGUU	SEQ ID NO: 4975	CAUCCUG	SEQ ID NO: 5026	CAUGGAG	SEQ ID NO: 5098	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5128	CAUUGAG	SEQ ID NO: 5189	CCAAGUG
SEQ ID NO: 4925	CAUAGUA	SEQ ID NO: 4976	CAUCCUU	SEQ ID NO: 5027	CAUGGAG	SEQ ID NO: 5099	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5129	CAUUGAA	SEQ ID NO: 5190	CCAAGUU
SEQ ID NO: 4926	CAUAGUC	SEQ ID NO: 4977	CAUCCUA	SEQ ID NO: 5028	CAUGGAA	SEQ ID NO: 5100	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5130	CAUUGAC	SEQ ID NO: 5191	CCAAGUA
SEQ ID NO: 4927	CAUAGUG	SEQ ID NO: 4978	CAUCCUAC	SEQ ID NO: 5029	CAUGGCA	SEQ ID NO: 5101	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5131	CAUUGAG	SEQ ID NO: 5192	CCAAGUC
SEQ ID NO: 4928	CAUAGUU	SEQ ID NO: 4979	CAUCCUAG	SEQ ID NO: 5030	CAUGGCC	SEQ ID NO: 5102	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5132	CAUUGAG	SEQ ID NO: 5193	CCAAGUC
SEQ ID NO: 4929	CAUAGAA	SEQ ID NO: 4980	CAUCCUAN	SEQ ID NO: 5031	CAUGGGG	SEQ ID NO: 5103	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5133	CAUUGAA	SEQ ID NO: 5194	CCAAGUU
SEQ ID NO: 4930	CAUAGAC	SEQ ID NO: 4981	CAUCCUA	SEQ ID NO: 5032	CAUGGGU	SEQ ID NO: 5104	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5134	CAUUGUC	SEQ ID NO: 5195	CCAAGAA
SEQ ID NO: 4931	CAUAGAG	SEQ ID NO: 4982	CAUCCUC	SEQ ID NO: 5033	CAUGGGA	SEQ ID NO: 5105	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5135	CAUUGUC	SEQ ID NO: 5196	CCAAGAA
SEQ ID NO: 4932	CAUAGAU	SEQ ID NO: 4983	CAUCCUG	SEQ ID NO: 5034	CAUGGGG	SEQ ID NO: 5106	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5136	CAUUGAU	SEQ ID NO: 5197	CCAAGAA
SEQ ID NO: 4933	CAUAGAA	SEQ ID NO: 4984	CAUCCUU	SEQ ID NO: 5035	CAUGGGG	SEQ ID NO: 5107	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5137	CAUUGAA	SEQ ID NO: 5198	CCAAGAA
SEQ ID NO: 4934	CAUAGAC	SEQ ID NO: 4985	CAUCCUUA	SEQ ID NO: 5036	CAUGGGU	SEQ ID NO: 5108	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5138	CAUUGAC	SEQ ID NO: 5199	CCAAGAA
SEQ ID NO: 4935	CAUAGAC	SEQ ID NO: 4986	CAUCCUG	SEQ ID NO: 5037	CAUGGUA	SEQ ID NO: 5109	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5139	CAUUGAG	SEQ ID NO: 5200	CCAAGUU
SEQ ID NO: 4936	CAUAGCU	SEQ ID NO: 4987	CAUCCUG	SEQ ID NO: 5038	CAUGGUA	SEQ ID NO: 5110	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5140	CAUUGAA	SEQ ID NO: 5201	CCAAGAA
SEQ ID NO: 4937	CAUAGCA	SEQ ID NO: 4988	CAUCCUGU	SEQ ID NO: 5039	CAUGGUG	SEQ ID NO: 5111	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5141	CAUUGAA	SEQ ID NO: 5202	CCAAGAA
SEQ ID NO: 4938	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4989	CAUCCUUA	SEQ ID NO: 5040	CAUGGUG	SEQ ID NO: 5112	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5142	CAUUGAC		
SEQ ID NO: 4939	CAUAGCC	SEQ ID NO: 4990	CAUCCUUA	SEQ ID NO: 5041	CAUGGUA	SEQ ID NO: 5113	CAUUGCU	SEQ ID NO: 5143	CAUUGCC		
SEQ ID NO: 4940	CAUAGCU	SEQ ID NO: 4991	CAUCCUUG	SEQ ID NO: 5042	CAUGGUA	SEQ ID NO: 5114	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5144	CAUUGCG		
SEQ ID NO: 4941	CAUAGUA	SEQ ID NO: 4992	CAUCCUUU	SEQ ID NO: 5043	CAUGGUA	SEQ ID NO: 5115	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5145	CAUUGCA		
SEQ ID NO: 4942	CAUAGUA	SEQ ID NO: 4993	CAUCCUUA	SEQ ID NO: 5044	CAUGGUA	SEQ ID NO: 5116	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5146	CAUUGCG		
SEQ ID NO: 4943	CAUAGUG	SEQ ID NO: 4994	CAUCCUUA	SEQ ID NO: 5045	CAUGGUA	SEQ ID NO: 5117	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5147	CAUUGCG		
SEQ ID NO: 4944	CAUAGUU	SEQ ID NO: 4995	CAUCCUUA	SEQ ID NO: 5046	CAUGGUA	SEQ ID NO: 5118	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5148	CAUUGCG		
SEQ ID NO: 4945	CAUAGAA	SEQ ID NO: 4996	CAUCCUUA	SEQ ID NO: 5047	CAUGGUG	SEQ ID NO: 5119	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5149	CAUUGCG		
SEQ ID NO: 4946	CAUAGAC	SEQ ID NO: 4997	CAUCCUUA	SEQ ID NO: 5048	CAUGGUG	SEQ ID NO: 5120	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5150	CAUUGCG		
SEQ ID NO: 4947	CAUAGAC	SEQ ID NO: 4998	CAUCCUUA	SEQ ID NO: 5049	CAUGGUG	SEQ ID NO: 5121	CAUUGCG	SEQ ID NO: 5151	CAUUGCG		

[表47]

SEQ ID NO: 14077	UCGUUUA	SEQ ID NO: 14128	UCUAGUU	SEQ ID NO: 14230	UCUGCCG	SEQ ID NO: 14282	UCUJAGA	SEQ ID NO: 14332	UCUJUGU
SEQ ID NO: 14078	UCGUUUC	SEQ ID NO: 14129	UCUABUA	SEQ ID NO: 14231	UCUGCCG	SEQ ID NO: 14283	UCUJAGG	SEQ ID NO: 14333	UCUJUIA
SEQ ID NO: 14079	UCGUUUG	SEQ ID NO: 14130	UCUABAC	SEQ ID NO: 14232	UCUGCCU	SEQ ID NO: 14284	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14334	UCUJUUC
SEQ ID NO: 14080	UCGUUUU	SEQ ID NO: 14131	UCUABAG	SEQ ID NO: 14233	UCUGCCG	SEQ ID NO: 14285	UCUJAGU	SEQ ID NO: 14335	UCUJUUG
SEQ ID NO: 14081	UCUAAAA	SEQ ID NO: 14132	UCUABAU	SEQ ID NO: 14234	UCUGCCG	SEQ ID NO: 14286	UCUJAJA	SEQ ID NO: 14336	UCUJUUU
SEQ ID NO: 14082	UCUJAAC	SEQ ID NO: 14133	UCUABCA	SEQ ID NO: 14235	UCUGCCG	SEQ ID NO: 14287	UCUJAJC	SEQ ID NO: 14337	UGAAAAA
SEQ ID NO: 14083	UCUJAAG	SEQ ID NO: 14134	UCUABCC	SEQ ID NO: 14236	UCUGCCU	SEQ ID NO: 14288	UCUJAJU	SEQ ID NO: 14338	UGAAAAG
SEQ ID NO: 14084	UCUJAAL	SEQ ID NO: 14135	UCUABCG	SEQ ID NO: 14237	UCUGCIA	SEQ ID NO: 14289	UCUJAJU	SEQ ID NO: 14339	UGAAAAC
SEQ ID NO: 14085	UCUJAACA	SEQ ID NO: 14136	UCUABCU	SEQ ID NO: 14238	UCUGCUC	SEQ ID NO: 14290	UCUJAJA	SEQ ID NO: 14340	UGAAAAG
SEQ ID NO: 14086	UCUJAACC	SEQ ID NO: 14137	UCUABGA	SEQ ID NO: 14239	UCUGCUG	SEQ ID NO: 14291	UCUJACG	SEQ ID NO: 14341	UGAAACA
SEQ ID NO: 14087	UCUJAACG	SEQ ID NO: 14138	UCUABGC	SEQ ID NO: 14240	UCUGCUU	SEQ ID NO: 14292	UCUJACG	SEQ ID NO: 14342	UGAAACC
SEQ ID NO: 14088	UCUJAACU	SEQ ID NO: 14139	UCUABGG	SEQ ID NO: 14241	UCUGGAA	SEQ ID NO: 14293	UCUJACU	SEQ ID NO: 14343	UGAAACG
SEQ ID NO: 14089	UCUJAAGA	SEQ ID NO: 14140	UCUABGU	SEQ ID NO: 14242	UCUGGAC	SEQ ID NO: 14294	UCUJACU	SEQ ID NO: 14344	UGAAACU
SEQ ID NO: 14090	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14141	UCUABUA	SEQ ID NO: 14243	UCUGGAG	SEQ ID NO: 14295	UCUJACC	SEQ ID NO: 14345	UGAAGA
SEQ ID NO: 14091	UCUJAGG	SEQ ID NO: 14142	UCUABUC	SEQ ID NO: 14244	UCUGGAU	SEQ ID NO: 14296	UCUJCCG	SEQ ID NO: 14346	UGAAGCC
SEQ ID NO: 14092	UCUJAGU	SEQ ID NO: 14143	UCUABUG	SEQ ID NO: 14245	UCUGGGA	SEQ ID NO: 14297	UCUJCCG	SEQ ID NO: 14347	UGAAGCG
SEQ ID NO: 14093	UCUJAJA	SEQ ID NO: 14144	UCUABUU	SEQ ID NO: 14246	UCUGGCG	SEQ ID NO: 14298	UCUJCCG	SEQ ID NO: 14348	UGAAGCU
SEQ ID NO: 14094	UCUJAJC	SEQ ID NO: 14145	UCUJAAA	SEQ ID NO: 14247	UCUGGCG	SEQ ID NO: 14299	UCUJCCG	SEQ ID NO: 14349	UGAAMUA
SEQ ID NO: 14095	UCUJAJG	SEQ ID NO: 14146	UCUJAAC	SEQ ID NO: 14248	UCUGGCU	SEQ ID NO: 14300	UCUJCCG	SEQ ID NO: 14350	UGAAMUC
SEQ ID NO: 14096	UCUJAAU	SEQ ID NO: 14147	UCUJAAG	SEQ ID NO: 14249	UCUGGGA	SEQ ID NO: 14301	UCUJCCU	SEQ ID NO: 14351	UGAAMUG
SEQ ID NO: 14097	UCUJAGAA	SEQ ID NO: 14148	UCUJAAL	SEQ ID NO: 14250	UCUGGGA	SEQ ID NO: 14302	UCUJCCU	SEQ ID NO: 14352	UGAAMUU
SEQ ID NO: 14098	UCUJACAC	SEQ ID NO: 14149	UCUJACA	SEQ ID NO: 14251	UCUGGCG	SEQ ID NO: 14303	UCUJCCU	SEQ ID NO: 14353	UGAACCA
SEQ ID NO: 14099	UCUJACG	SEQ ID NO: 14150	UCUJACC	SEQ ID NO: 14252	UCUGGCU	SEQ ID NO: 14304	UCUJCCU	SEQ ID NO: 14354	UGAACAC
SEQ ID NO: 14100	UCUJACU	SEQ ID NO: 14151	UCUJACG	SEQ ID NO: 14253	UCUGGUA	SEQ ID NO: 14305	UCUJCCU	SEQ ID NO: 14355	UGAACAG
SEQ ID NO: 14101	UCUJACCA	SEQ ID NO: 14152	UCUJACU	SEQ ID NO: 14254	UCUGLIC	SEQ ID NO: 14306	UCUJGAA	SEQ ID NO: 14356	UGAACAA
SEQ ID NO: 14102	UCUJACCC	SEQ ID NO: 14153	UCUJAGA	SEQ ID NO: 14255	UCUGLUG	SEQ ID NO: 14307	UCUJGAC	SEQ ID NO: 14357	UGAACCA
SEQ ID NO: 14103	UCUJACCG	SEQ ID NO: 14154	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14256	UCUGLUG	SEQ ID NO: 14308	UCUJGAG	SEQ ID NO: 14358	UGAACCC
SEQ ID NO: 14104	UCUJACCU	SEQ ID NO: 14155	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14257	UCUGJAA	SEQ ID NO: 14309	UCUJGAG	SEQ ID NO: 14359	UGAACCC
SEQ ID NO: 14105	UCUJACGA	SEQ ID NO: 14156	UCUJAGU	SEQ ID NO: 14258	UCUGJAG	SEQ ID NO: 14310	UCUJGCA	SEQ ID NO: 14360	UGAACCU
SEQ ID NO: 14106	UCUJACGC	SEQ ID NO: 14157	UCUJAJA	SEQ ID NO: 14259	UCUGJAG	SEQ ID NO: 14311	UCUJGCC	SEQ ID NO: 14361	UGAACCA
SEQ ID NO: 14107	UCUJACGG	SEQ ID NO: 14158	UCUJAJC	SEQ ID NO: 14260	UCUGJAU	SEQ ID NO: 14312	UCUJGGG	SEQ ID NO: 14362	UGAACCC
SEQ ID NO: 14108	UCUJACGU	SEQ ID NO: 14159	UCUJAJG	SEQ ID NO: 14261	UCUGJAA	SEQ ID NO: 14313	UCUJGGG	SEQ ID NO: 14363	UGAACCC
SEQ ID NO: 14109	UCUJACUA	SEQ ID NO: 14160	UCUJAJU	SEQ ID NO: 14262	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14314	UCUJGGG	SEQ ID NO: 14364	UGAACCU
SEQ ID NO: 14110	UCUJACUC	SEQ ID NO: 14161	UCUJAGA	SEQ ID NO: 14263	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14315	UCUJGGG	SEQ ID NO: 14365	UGAACCU
SEQ ID NO: 14111	UCUJACUG	SEQ ID NO: 14162	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14264	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14316	UCUJGGG	SEQ ID NO: 14366	UGAACCU
SEQ ID NO: 14112	UCUJAGU	SEQ ID NO: 14163	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14265	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14317	UCUJGGU	SEQ ID NO: 14367	UGAACCU
SEQ ID NO: 14113	UCUJAGAA	SEQ ID NO: 14164	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14266	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14318	UCUJGGU	SEQ ID NO: 14368	UGAACCU
SEQ ID NO: 14114	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14165	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14267	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14319	UCUJGGU	SEQ ID NO: 14369	UGAACCU
SEQ ID NO: 14115	UCUJAGAG	SEQ ID NO: 14166	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14268	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14320	UCUJGGU	SEQ ID NO: 14370	UGAACCU
SEQ ID NO: 14116	UCUJAGAU	SEQ ID NO: 14167	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14269	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14321	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14371	UGAAGAG
SEQ ID NO: 14117	UCUJAGCA	SEQ ID NO: 14168	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14270	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14322	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14372	UGAAGAU
SEQ ID NO: 14118	UCUJAGCC	SEQ ID NO: 14169	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14271	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14323	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14373	UGAAGCA
SEQ ID NO: 14119	UCUJAGCG	SEQ ID NO: 14170	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14272	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14324	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14374	UGAAGCA
SEQ ID NO: 14120	UCUJAGCU	SEQ ID NO: 14171	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14273	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14325	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14375	UGAAGCC
SEQ ID NO: 14121	UCUJAGCA	SEQ ID NO: 14172	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14274	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14326	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14376	UGAAGCC
SEQ ID NO: 14122	UCUJAGCC	SEQ ID NO: 14173	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14275	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14327	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14377	UGAAGCC
SEQ ID NO: 14123	UCUJAGCG	SEQ ID NO: 14174	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14276	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14328	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14378	UGAAGCC
SEQ ID NO: 14124	UCUJAGCU	SEQ ID NO: 14175	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14277	UCUGJCC	SEQ ID NO: 14329	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14379	UGAAGCC
SEQ ID NO: 14125	UCUJAGCA	SEQ ID NO: 14176	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14278	UCUJACC	SEQ ID NO: 14330	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14380	UGAAGCU
SEQ ID NO: 14126	UCUJAGUC	SEQ ID NO: 14177	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14279	UCUJAGG	SEQ ID NO: 14331	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14381	UGAAGCU
SEQ ID NO: 14127	UCUJAGUG	SEQ ID NO: 14178	UCUJAGC	SEQ ID NO: 14280	UCUJAGG	SEQ ID NO: 14332	UCUJGUA	SEQ ID NO: 14382	UGAAGCU

[表54]

SEQ ID NO: 16372	UUUUUAA
SEQ ID NO: 16373	UUUUUCA
SEQ ID NO: 16374	UUUUUCC
SEQ ID NO: 16375	UUUUUCG
SEQ ID NO: 16376	UUUUUCU
SEQ ID NO: 16377	UUUUUCA
SEQ ID NO: 16378	UUUUUCC
SEQ ID NO: 16379	UUUUUCG
SEQ ID NO: 16380	UUUUUCU
SEQ ID NO: 16381	UUUUUCA
SEQ ID NO: 16382	UUUUUCC
SEQ ID NO: 16383	UUUUUCG
SEQ ID NO: 16384	UUUUUCU

SEQ ID NO: 16321	UUUUAAA
SEQ ID NO: 16322	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16323	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16324	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16325	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16326	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16327	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16328	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16329	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16330	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16331	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16332	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16333	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16334	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16335	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16336	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16337	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16338	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16339	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16340	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16341	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16342	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16343	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16344	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16345	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16346	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16347	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16348	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16349	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16350	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16351	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16352	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16353	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16354	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16355	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16356	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16357	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16358	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16359	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16360	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16361	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16362	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16363	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16364	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16365	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16366	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16367	UUUU9AG
SEQ ID NO: 16368	UUUU9AU
SEQ ID NO: 16369	UUUU9AA
SEQ ID NO: 16370	UUUU9AC
SEQ ID NO: 16371	UUUU9AG

SEQ ID NO: 16270	UUUGAUC
SEQ ID NO: 16271	UUUGAUG
SEQ ID NO: 16272	UUUGAUA
SEQ ID NO: 16273	UUUGAAA
SEQ ID NO: 16274	UUUGAAC
SEQ ID NO: 16275	UUUGAAG
SEQ ID NO: 16276	UUUGAAU
SEQ ID NO: 16277	UUUGACA
SEQ ID NO: 16278	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16279	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16280	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16281	UUUGACA
SEQ ID NO: 16282	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16283	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16284	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16285	UUUGACA
SEQ ID NO: 16286	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16287	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16288	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16289	UUUGACA
SEQ ID NO: 16290	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16291	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16292	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16293	UUUGACA
SEQ ID NO: 16294	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16295	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16296	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16297	UUUGACA
SEQ ID NO: 16298	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16299	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16300	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16301	UUUGACA
SEQ ID NO: 16302	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16303	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16304	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16305	UUUGACA
SEQ ID NO: 16306	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16307	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16308	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16309	UUUGACA
SEQ ID NO: 16310	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16311	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16312	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16313	UUUGACA
SEQ ID NO: 16314	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16315	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16316	UUUGAGU
SEQ ID NO: 16317	UUUGACA
SEQ ID NO: 16318	UUUGAGC
SEQ ID NO: 16319	UUUGAGG
SEQ ID NO: 16320	UUUGAGU

SEQ ID NO: 16219	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16220	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16221	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16222	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16223	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16224	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16225	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16226	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16227	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16228	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16229	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16230	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16231	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16232	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16233	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16234	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16235	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16236	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16237	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16238	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16239	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16240	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16241	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16242	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16243	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16244	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16245	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16246	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16247	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16248	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16249	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16250	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16251	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16252	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16253	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16254	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16255	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16256	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16257	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16258	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16259	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16260	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16261	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16262	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16263	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16264	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16265	UUUUGCA
SEQ ID NO: 16266	UUUUGCC
SEQ ID NO: 16267	UUUUGCG
SEQ ID NO: 16268	UUUUGCU
SEQ ID NO: 16269	UUUUGCA

[0097] 標的RNAが形成するTアーム様のステムループ構造を標的RNA中に同

定するために、パターンマッチングおよび熱力学的安定性に基づく評価を行うという構造解析を行うことができる。構造解析のための計算においては、

- 1) mRNAは一本鎖でタンパク質の関与なく自身のみで高次構造をとる、
- 2) mRNAはリボソームによりタンパク質合成の最中にある場合は全長ではなくリボソームとリボソームに挟まれたと仮定されるある部分としての一定長の部分配列で高次構造をとる、
- 3) 単一の一次構造のmRNA（あるいはその部分としての一定長の部分配列）は複数の高次構造をとることが想定されそれらは平衡状態にある（すなわちエネルギー量に応じて存在確率が分布している）、という作業仮説を置くことができる。内在性の部分構造の算出や評価については、この仮説を元に算出することができる。さらに、sgASOの設計は、sgASOと内在性の構造が形作る高次構造をtRNAseZ^Lが認識しうるかという点について、内在性の構造として1) ループが10塩基以下、2) ステムが5塩基対、であるという仮説を置くことができる。

パターンマッチングおよび熱力学的安定性に基づく構造解析においては網羅的に考えうるすべての構造を取り扱うこともできれば、一般的な構造予測ソフトウェアを用いて重要と思われる構造のみを算出することで解析を簡素化することもできる。構造予測には、例えば、vswindow、UNAFold、mfoldなどのソフトウェアを利用することができる。

[0098] 構造予測に関しては、以下の参考文献を参照してもよい：

- Markham, N. R. & Zuker, M. (2005) DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.*, 33, W577-W581;
- Markham, N. R. & Zuker, M. (2008) UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. In Keith, J. M., editor, *Bioinformatics, Volume II. Structure, Function and Applications*, number 453 in *Methods in Molecular Biology*, chapter 1, pages 3-31. Humana Press, Totowa, NJ. ISBN 978-1-60327-428-9.)

[0099] 例えば、mRNAの5'末端からR塩基刻みでW塩基の幅の枠nを設定し（枠は、対象とするトランスクリプトからnmax個得られる）、それぞれ

の枠 n において、予測構造結果とそれぞれのエネルギー量から、当該 m RNA がおかれている細胞内での状態が平衡状態であることを仮定して、予測構造結果それぞれの存在確率をマクスウェル=ボルツマン統計より算出する。ここで、 n 枠目での構造予測結果のうち最安定構造から m 番目の予測結果（枠 n において、予測構造結果は $m \max (n)$ 個得られている）については、その予測された構造の存在確率を $j (n, m)$ とすることができる。

[0100] ここで、各構造予測結果中それぞれに発見される部分構造として、ループ部位を1つだけ持ち、互いに相手とだけ相補的である1つのステムよりなるものをステムループ構造と定義する（ステムループ中のステムの「互いに相手とだけ相補的である」とは、他の予測構造枠であっても他のステムループを構成しないという意味ではなく、ある1つの予測構造結果において、単一のステムループ中に他のステムループの一部を決して含まないという意味である）。ここで、ステムにはミスマッチ（ステム中にある、塩基対に参加しない塩基が対向しているもの）やバルジ（ステム中にある、塩基対に参加しない塩基が対向していないもの）を含んでもよいが、両端は塩基対であるものとする。さらに、ステムループが内包するステムループも別個のステムループとみなす（例えば、ステムの最もループから遠い塩基対がほどけたものは、解けていないものと別のステムループとみなす）。

[0101] こうしたステムループを、枠内ではなく配列上の絶対位置 x から始まり、構成するループとステムの特徴プロファイル（ステムを構成する塩基対の塩基の位置で定義されるステムループの個性）を p とした時に、 $motif (x, p)$ と呼ぶ。そして、 $motif (x, p)$ の枠 n 内での存在確率を、部分的な存在確率 $P_local (x, p, n)$ とし、その値は、 n 枠において得られた構造予測結果の中で当該ステムループが存在する構造についての j 値の総和すなわち $\sum j (n, m)$ であるとする。さらに、この $P_local (x, p, n)$ について枠1から $n \max$ まで総和をとった結果を $\sum P_local (x, p, n)$ 、当該ステムループを構成する配列全長が枠内におさまることのできる枠の数を $n_all (x, p)$ 個としたとき、全

体の中での $\text{motif}(x, p)$ の存在確率 $P_{\text{global}}(x, p)$ は、 $\sum P_{\text{local}}(x, p, n) / n_{\text{all}}(x, p)$ として表される。

[0102] すなわち、枠 n における、 $\text{motif}(x, p)$ の局所的な存在確率 $P_{\text{local}}(x, p, n)$ は：

[数3]

$$P_{\text{local}}(x, p, n) = \sum_{m=1}^{n_{\text{max}}(n)} \begin{cases} 0 & \dots \text{motif}(x, p) \text{ が、枠 } n \text{ の } m \text{ 番目の構造に見つからなかった場合} \\ j(n, m) & \dots \text{motif}(x, p) \text{ が、枠 } n \text{ の } m \text{ 番目の構造に見つかった場合} \end{cases}$$

$\text{motif}(x, p)$ についての、全体の中での存在確率 $P_{\text{global}}(x, p)$ は：

[数4]

$$P_{\text{global}}(x, p) = \sum_{n=1}^{n_{\text{max}}} \frac{P_{\text{local}}(x, p, n)}{n_{\text{all}}(x, p)}$$

で表される。

[0103] 標的 RNA 中に、 $P_{\text{global}}(x, p)$ が 50% 以上であって $p1 = \text{“ステムが 5 塩基対”}$ である $\text{motif}(x, p1)$ を同定することができる。このうち、 $p2 = \text{“左右均等（ループを挟んでステムの 5' 側配列と 3' 側配列の塩基数の差が 1 つ以内）であって、ループの長さが 10 を超えないもの”}$ である $\text{motif}(x, p2)$ をさらに同定することができる。

[0104] ついで、 $\text{motif}(x, p2)$ のそれぞれのステムループ直後の 7 塩基に対して sgASO の結合サイトとすることができるが、以下の補正処理を行ってもよい：（1）ループ部分が 3 塩基と予測されているものはその次の塩基対をほどいて 5 塩基のループとなっていると想定する、（2）ステム中のミスマッチやバルジの塩基数が 2 以下の場合にはそれを無視して塩基対数をカウントする、かつ／または（3）ステム中のミスマッチやバルジの塩基

数が3以上の場合はミスマッチやバルジの塩基数の2分の1の数を塩基対数とカウントする。こうした処理によってステムループ構造の5塩基対目を特定し、その直後(3'側)をsgASO結合サイトとすることができる。

[0105] 本発明の一つの態様は、真核細胞内の標的RNAを切断するためのオリゴヌクレオチド(sgASO)の設計方法であって、(1)標的RNA配列中に少なくとも1つのステムループ構造が形成される配列を同定する工程、(2)該ステムループ構造に隣接する3'側の6~10塩基の配列をsgASOの結合配列として同定する工程、および(3)該結合配列に相補的な配列をsgASOの配列として同定する工程を含む、方法に関する。

[0106] 標的転写産物

標的RNAは、その発現を抑制または消失させる対象となる遺伝子(標的遺伝子)の転写産物RNA、特にmRNAであるが、ncRNAであってもよい。また、標的RNAとしては、核ゲノム由来のRNA、ミトコンドリアゲノム由来のRNA、ウイルスゲノムまたは細菌ゲノム由来のRNAなどが含まれる。本発明において用いられるsgASOは、必ずしも標的RNAに完全に相補的である必要はないが、典型的には、標的RNAに完全に相補的である。標的遺伝子の発現抑制とは、その遺伝子から転写合成されるタンパク質量が、25%以下、好ましくは50%以下、さらに好ましくは75%以下、特に好ましくは95%以下に低減することである。標的遺伝子は、その発現抑制または発現消失が産業上の利用価値を有する遺伝子であり、とくにその遺伝子の発現亢進が特定の疾患の原因となるような遺伝子(以下、病原遺伝子と記載することがある)。そのような病原遺伝子の例としては、例えば、*ras*、*erbB2*、*myc*、*apc*、*brca1*、*rb*、*Bcl-2*、BGEF癌遺伝子、レニンなどの高血圧に関与する遺伝子、インスリンなどの糖尿病関連遺伝子、LDLレセプターなどの高脂血症関連遺伝子、レプチンなどの肥満関連遺伝子、アンギオテンシンなどの動脈硬化疾患関連遺伝子、痴呆の原因として知られているアポリポタンパク質およびプレセリニン、老化に関連する遺伝子などが例示される。これらの遺伝子およびそのmR

NA配列は公知のデータベース（NCBIヌクレオチドデータベース等）において公知である。

[0107] 医薬組成物

スモールガイドアンチセンス核酸はそれ単独で製剤化することもできるが、通常は薬理的に許容される1つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として投与するのが望ましい。医薬組成物には、異なる配列を有する複数のsgASOの混合物が含まれていてもよい。

[0108] 投与対象には、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、非ヒト哺乳動物が含まれる。投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、静脈内および経皮などの非経口投与をあげることができ、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

[0109] 経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造できる。

[0110] 非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液あるいは両者の混合物からなる担体などを用いて調製される。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸など

の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ有効成分を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体などを用いて調製される。

[0111] 担体として具体的には乳糖、グリセリン、リポソーム、ナノミセルなどが例示される。本発明で用いる核酸、さらには用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0112] 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重などにより異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ である。

[0113] 本発明の一つの態様は、約7merのオリゴヌクレオチド(sgASO)を含む、患者における疾患または障害の治療または予防に用いるための医薬組成物であって、該約7merのオリゴヌクレオチドが、疾患または障害に関連する標的RNAに相補的であり、該標的RNAが少なくとも1つのステムループ構造を形成することができ、該約7merのオリゴヌクレオチドが該ステムループ構造の3'側の領域にハイブリダイズして、該標的RNAが形成するステムループと合わせて少なくとも1つのより大きなステムループ構造を形成することができ、形成された構造が患者体内のtRNase Z⁺によって認識されて、標的RNAが切断されることを特徴とする、医薬組成物に関する。患者は、ヒトもしくは非ヒト動物でありうる。なお、本明細書において、約7merと言った場合は、6mer、7mer、および8merを含むものと解される。

[0114] sgASOは一般的には、標的RNAが形成するステムループ構造の根本(つまり、ループとは反対側の末端塩基対)を形成する塩基の3'側に直に隣接する塩基と、sgASOの3'末端塩基とが塩基対を形成するように設計されるが、これに限定はされない。例えば、標的RNAが形成するステムループ構造の根本から数えて2~3番目の塩基とsgASOの3'末端塩基とが塩基対を形成するように設計されてもよい。

[0115] 本発明の一つの態様において、医薬組成物は、本願の実施例に開示される V I S - 0 1 ~ V I S - 0 7 の少なくとも1つの s g A S O を含むことができる。本発明の一つの態様において、医薬組成物は、癌の治療もしくは予防のための組成物、または癌の治療もしくは予防に用いるための組成物でありうる。

[0116] 本発明の一つの態様は、癌の治療もしくは予防のための医薬組成物、または癌の治療もしくは予防に用いるための医薬組成物であって、以下から選択されるいずれかの配列を含むか、いずれかの配列から成る s g A S O を含む、医薬組成物に関する：5' - G A A A C U U - 3' ; 5' - C U G U C A A - 3' ; 5' - U C U U C A A - 3' ; 5' - U U A U C G U - 3' ; 5' - C U U A U A A - 3' ; 5' - G C G G G G G - 3' ; 5' - A C U C A A A - 3' 。 s g A S O は、その一方または両方の末端にリン酸基を有していてもよい。本医薬組成物が用いられうる癌は、B c l - 2 遺伝子が関与する癌であり、例えば、リンパ腫を含む。

[0117] 医薬の製造における使用および治療方法

本発明の一つの態様は、患者における疾患または障害の治療または予防に用いるための医薬の製造における、約7merのオリゴヌクレオチド(sgASO)の使用であって、該約7merのオリゴヌクレオチドが、疾患または障害に関連する標的RNAに相補的であり、該標的RNAが少なくとも1つのステムループ構造を形成することができ、該約7merのオリゴヌクレオチドが該ステムループ構造の3'側の領域にハイブリダイズして、該標的RNAが形成するステムループと合わせて少なくとも1つのより大きなステムループ構造を形成することができ、形成された構造が患者体内のtRNAase^Lによって認識されて、標的RNAが切断されることを特徴とする、使用に関する。

[0118] また、本発明の一つの態様は、患者における疾患または障害の治療または予防のための方法であって、該患者に約7merのオリゴヌクレオチド(sgASO)を投与する工程を含み、ここで、該約7merのオリゴヌクレオ

チドは、疾患または障害に関連する標的RNAに相補的であり、該標的RNAが少なくとも1つのステムループ構造を形成することができ、該約7merのオリゴヌクレオチドが該ステムループ構造の3'側の領域にハイブリダイズして、該標的RNAが形成するステムループと合わせて少なくとも1つのより大きなステムループ構造を形成することができ、形成された構造が患者体内のtRNA^{aseZ}によって認識されて、標的RNAが切断されることを特徴とする、方法に関する。

[0119] 本発明の一つの態様は、癌の治療もしくは予防のための医薬の製造における、以下から選択されるいずれかの配列を含むか、いずれかの配列から成るsgASOの使用に関する：5' -GAAACUU-3' ; 5' -CUGUCAAA-3' ; 5' -UCUUCAAA-3' ; 5' -UUAUCGU-3' ; 5' -CUUAUAA-3' ; 5' -GCGGGGG-3' ; 5' -ACUCAAA-3' 。

[0120] また、本発明の一つの態様は、患者における癌の治療もしくは予防のための方法であって、以下から選択されるいずれかの配列を含むか、いずれかの配列から成るsgASOを患者に投与する工程を含む方法に関する：5' -GAAACUU-3' ; 5' -CUGUCAAA-3' ; 5' -UCUUCAAA-3' ; 5' -UUAUCGU-3' ; 5' -CUUAUAA-3' ; 5' -GCGGGGG-3' ; 5' -ACUCAAA-3' 。

[0121] 以下に、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、これらにより本発明は何ら制限を受けるものではない。

実施例

[0122] 概要

対象疾患として、癌を選び、その治療法としてBcl-2をダウンレギュレーションすることを想起した。そのために、Bcl-2 mRNAを標的とした核酸医薬品を創出することを試みた。構造予測および構造解析セクションでは、1) mRNAは一本鎖でタンパク質の関与なく自身のみで高次構造をとる、2) 単一の一次構造のmRNAは複数の高次構造をとることが想

定されそれらは平衡状態にある（すなわちエネルギー量に応じて存在確率が分布している）、という作業仮説を置いている。内在性の部分構造の算出や評価については、この仮説を元に算出する。さらに、sgASOの設計は、sgASOと内在性の構造が形作る高次構造をtRNase Z⁺が認識するかという点について、内在性の構造として1) ループが10塩基以下、2) ステムが5塩基対、であるという仮説を基本的に置いている。

[0123] <例1：構造予測および構造解析>

Bc1-2 mRNAの配列情報（アクセッション番号：NM_000633.2）をNCBIのデータベースより取得した。その配列情報を元に、5'末端から3塩基刻みで300塩基の幅の枠を設定した（第一枠は、5'末端の塩基（1塩基目）から300塩基目まで。第2枠は、4塩基目から303塩基目まで。以下同様。枠はnmax個得られているとする）。それぞれの枠において、構成する300塩基の塩基配列についてパターンマッチングおよび熱力学的安定性に基づく構造予測を行なった（例えば、以下の参考文献を参照：Markham, N. R. & Zuker, M. (2005) DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.*, 33, W577-W581; Markham, N. R. & Zuker, M. (2008) UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. In Keith, J. M., editor, *Bioinformatics, Volume II. Structure, Function and Applications*, number 453 in *Methods in Molecular Biology*, chapter 1, pages 3-31. Humana Press, Totowa, N J. ISBN 978-1-60327-428-9.）。得られた予測構造結果とそれぞれのエネルギー量から、当該mRNAがおかれている細胞内での状態が平衡状態であることを仮定して、予測構造結果それぞれの存在確率を算出した。ここで、n枠目での構造予測結果のうち最安定構造からm番目の予測結果（枠nにおいて、予測構造結果はmmax(n)個得られている）については、その存在確率をj(n, m)とした。

[0124] ここで、各構造予測結果中それぞれに発見される部分構造として、ループ部位を1つだけ持ち、互いに相手とだけ相補的である1つのステムよりなる

ものをステムループ構造と定義する（ステムループ中のステムの「互いに相手とだけ相補的である」とは、他の予測構造枠であっても他のステムループを構成しないという意味ではなく、ある1つの予測構造結果において、単一のステムループ中に他のステムループの一部を決して含まないという意味である）。ここで、ステムにはミスマッチ（ステム中にある、塩基対に参加しない塩基が対向しているもの）やバルジ（ステム中にある、塩基対に参加しない塩基が対向していないもの）を含んでもよいが、両端は塩基対であるものとする。さらに、ステムループが内包するステムループも別個のステムループとみなす（例えば、ステムの最もループから遠い塩基対がほどけたものは、解けていないものと別のステムループとみなす）。

[0125] こうしたステムループを、枠内ではなく配列上の絶対位置 x から始まり、構成するループとステムの情報プロフィール（ステムを構成する塩基対の塩基の位置で定義されるステムループのアイデンティティ）を p とした時に、 $\text{motif}(x, p)$ と呼ぶ。そして、 $\text{motif}(x, p)$ の枠 n 内での存在確率を、部分的な存在確率 $P_{\text{local}}(x, p, n)$ とし、その値は、 n 枠において得られた構造予測結果の中で当該ステムループが存在する構造についての j 値の総和すなわち $\sum_j(n, m)$ であるとする。さらに、この $P_{\text{local}}(x, p, n)$ について枠 1 から n_{max} まで総和をとった結果を $\sum P_{\text{local}}(x, p, n)$ 、当該ステムループを構成する配列全長が枠内におさまることのできる枠の数を $n_{\text{all}}(x, p)$ 個としたとき、全体の中での $\text{motif}(x, p)$ の存在確率 $P_{\text{global}}(x, p)$ は、 $\sum P_{\text{local}}(x, p, n) / n_{\text{all}}(x, p)$ として表される。

[0126] <例2：sgASO配列設計>

Bcl-2 mRNAの5' UTRおよびCDSおよび3' UTR中に、 $P_{\text{global}}(x, p)$ が50%以上であって $p1 =$ “ステムが5塩基対”である $\text{motif}(x, p1)$ を探したところ、12個が見つかった。このうち、 $p2 =$ “左右均等（ループを挟んでステムの5'側配列と3'側

配列の塩基数の差が1つ以内) であって、ループの長さが10を超えないもの”である motif (x, p2) は7個であった。

[0127] ついで、 motif (x, p2) のそれぞれのステムループ直後の7塩基に対して sgASOの結合サイトとするが、以下の補正処理を行なった。1) ループ部分が3塩基と予測されているものはその次の塩基対をほどいて5塩基のループとなっていると想定する、2) ステム中のミスマッチやバルジの塩基数が2以下の場合にはそれを無視して塩基対数をカウント、3) ステム中のミスマッチやバルジの塩基数が3以上の場合にはミスマッチやバルジの塩基数の2分の1の数を塩基対数とカウント、こうした処理によって5塩基対目を特定し、その直後を sgASO結合サイトとした。

[0128] 結果として、 sgASOが効果を発揮すると期待される結合箇所の配列は、AAGUUUC、UUGACAG、UUGAAGA、ACGAUAA、UUAUAAG、CCCCCGC、UUUGAGUであり、それぞれに対して以下の7merのアンチセンスオリゴ (VIS-01~VIS-07) を合成した (株式会社日本バイオサービスにて合成)。

[0129]	標的配列	名称	sgASO配列	配列番号
	AAGUUUC	VIS-01	5' - pGAAACUUp -3'	8224
	UUGACAG	VIS-02	5' - pCUGUCAAp -3'	7889
	UUGAAGA	VIS-03	5' - pUCUUCAAp -3'	14289
	ACGAUAA	VIS-04	5' - pUUAUCGUp -3'	15580
	UUAUAAG	VIS-05	5' - pCUUAUAAp -3'	7985
	CCCCCGC	VIS-06	5' - pGCGGGGGp -3'	9899
	UUUGAGU	VIS-07	5' - pACUCAAAp -3'	1857

[0130] <例3：細胞実験>

上記 sgASO (VIS-1~VIS-7) による Bcl-2 mRNA 発現抑制実験をヒト白血病細胞株 HL60 を用いて行った。核酸鎖は全て、両末端をリン酸化し、2' OH部分を OMe化したものを用いた。すでに報告されている sgASOの一つである Hep1 (配列: GGGCCAG; 日

本国特許第5995849号およびCancer Letters 328 (2013) 362-368を参照)についても参考として用いた。24-wellプレートを用いてHL60細胞を10,000 cells/500 μ Lの密度で、RPMI-1640培地(10%ウシ胎仔血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有)中、37°C、5%CO₂インキュベーターにて培養した。培地に最終濃度1 μ Mになるように各sgASOを添加し、更に48時間培養した。48時間後、HL60細胞からRNAisoPlusを用いて全RNAを抽出し、定量RT-PCRを行った。インターナルコントロールとしてGAPDH mRNA量を用い、Bcl-2 mRNA量をノーマライズした。結果として、既に報告されているsgASOであるHep1と比して倍程度の活性を示すsgASOとしてVIS-1、VIS-5を得ることができた(図1)。この結果より、本発明によるsgASOの設計および同定方法が、先行技術より優れていることが明らかとなった。

[0131] 本明細書には、本発明の好ましい実施態様を示してあるが、そのような実施態様が単に例示の目的で提供されていることは、当業者には明らかであり、当業者であれば、本発明から逸脱することなく、様々な変形、変更、置換を加えることが可能であろう。本明細書に記載されている発明の様々な代替的实施形態が、本発明を実施する際に使用されることが理解されるべきである。また、本明細書中において参照している特許および特許出願書類を含む、全ての刊行物に記載の内容は、その引用によって、本明細書中に明記された内容と同様に取り込まれていると解釈すべきである。

産業上の利用可能性

[0132] 本発明者らは、遺伝子発現調節の対象となる標的RNA配列について、その配列情報を元に構造予測を行ない、得られた予測構造結果とそれぞれのエネルギー量から、それぞれの存在確率を算出し、存在確率とステムループ構造より、sgASOを設計する方法を確立することで、比較的短いオリゴヌクレオチドを用いて、効率よく細胞内における遺伝子発現を調節する手法を開発した。本手法は、原理的にあらゆる遺伝子発現の調節に応用可能である

ことから、多様な疾患および障害の治療または予防に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 真核細胞内の標的RNAを切断するための方法であって、
- 1) 標的RNAに相補的な6merから10merのオリゴヌクレオチド(sgASO)がハイブリダイズすることによって、少なくとも1つのステムループ構造が形成される配列を標的RNA配列中に同定する工程、
 - 2) 該sgASOを調製して、真核細胞内において標的RNAと接触させる工程、
- を含み、
- 該sgASOがハイブリダイズして形成されるステムループ構造を真核細胞内のtRNAse^zが認識して標的RNAを切断することを特徴とする、方法。
- [請求項2] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のステム部分の塩基対数が11から14である、請求項1記載の方法。
- [請求項3] sgASOが7merである、請求項1または2記載の方法。
- [請求項4] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のうち、ループ部分が標的RNAによって形成されることを特徴とする、請求項1～3のいずれか記載の方法。
- [請求項5] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のループ部分の塩基数が3から10である、請求項1～4のいずれか記載の方法。
- [請求項6] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のステム部分がミスマッチまたはバルジを含まない、請求項1～5のいずれか記載の方法。
- [請求項7] 該sgASOがハイブリダイズして形成される該ステムループ構造のステム部分がミスマッチまたはバルジを含む、請求項1～6のいずれか記載の方法。

- [請求項8] ステム部分の塩基対数の計数において、ステム中のミスマッチまたはバルジの塩基数が2以下の場合は、ミスマッチまたはバルジが塩基対を形成するとみなしてカウントし、ステム中のミスマッチまたはバルジの塩基数が3以上の場合は、ミスマッチまたはバルジの塩基数の2分の1の数を塩基対数としてカウントする、請求項7記載の方法。
- [請求項9] 標的RNAがmRNAまたはncRNAである、請求項1～8のいずれか記載の方法。
- [請求項10] sgASOが修飾ヌクレオシドおよび／または修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項1～9のいずれか記載の方法。
- [請求項11] 標的RNAによって形成されるステム部分の5'側配列と3'側配列の塩基数の差が1以下である、請求項1～10のいずれか記載の方法。
- [請求項12] 該sgASOの末端水酸基の一方または両方が修飾されている、請求項1～11のいずれか記載の方法。
- [請求項13] 該sgASOの末端水酸基の一方または両方にリン酸基が付加されている、請求項1～12のいずれか記載の方法。
- [請求項14] 標的RNA上のsgASOが結合する領域の5'側から構成する塩基をN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7とし、さらにsgASOが結合する領域の3'側に隣接する最初の塩基をN8とした場合に、以下の条件1～3の少なくとも一つが満たされることを特徴とする、請求項1～13のいずれか記載の方法：
- －条件1：N8がAもしくはGである；
 - －条件2：N7がCである；
 - －条件3：N6がA、CもしくはGである。
- [請求項15] sgASOが配列番号1から配列番号16384のいずれか1つの配列から成るオリゴヌクレオチドである、請求項1～14のいずれか記載の方法。
- [請求項16] 約7merのオリゴヌクレオチドを含む、患者における疾患または

障害の治療または予防に用いるための医薬組成物であって、

該約 7 m e r のオリゴヌクレオチドが、疾患または障害に関連する標的 R N A に相補的であり、

該標的 R N A が少なくとも 1 つのステムループ構造を形成することができ、

該約 7 m e r のオリゴヌクレオチドが該ステムループ構造の 3' 側の領域にハイブリダイズして、該標的 R N A が形成するステムループと合わせて少なくとも 1 つのより大きなステムループ構造を形成することができ、

形成された構造が患者体内の t R N a s e Z^Lによって認識されて、標的 m R N A が切断されることを特徴とする、医薬組成物。

[請求項17]

癌の治療もしくは予防のための医薬組成物であって、以下から選択されるいずれかの配列を含む s g A S O を含む、医薬組成物：

5' - G A A A C U U - 3' ；

5' - C U G U C A A - 3' ；

5' - U C U U C A A - 3' ；

5' - U U A U C G U - 3' ；

5' - C U U A U A A - 3' ；

5' - G C G G G G G - 3' ；

5' - A C U C A A A - 3' 。

[請求項18]

真核細胞内の標的 R N A を切断するためのオリゴヌクレオチド (s g A S O) の設計方法であって、

1) 標的 R N A 配列中に少なくとも 1 つのステムループ構造が形成される配列を同定する工程、

2) 該ステムループ構造に隣接する 3' 側の 6 ~ 1 0 塩基の配列を s g A S O の結合配列として同定する工程、および

3) 該結合配列に相補的な配列を s g A S O の配列として同定する工程

を含む、方法。

[請求項19] 請求項18記載のオリゴヌクレオチド (sgASO) の設計方法であって、

i) 標的RNAによって形成されるステムループ構造のステム部分の塩基対数が4~8であり、

ii) 該ステムループ構造のループ部分の塩基数が3から10であり、

iii) 該ステムループ構造のステム部分がミスマッチまたはバルジを含む場合、ステム部分の塩基対数の計数において、ステム中のミスマッチまたはバルジの塩基数が2以下の場合は、ミスマッチまたはバルジが塩基対を形成するとみなしてカウントし、ステム中のミスマッチまたはバルジの塩基数が3以上の場合は、ミスマッチまたはバルジの塩基数の2分の1の数を塩基対数としてカウントし、そして

iv) 該ステム部分の5'側配列と3'側配列の塩基数の差が1以下である、

方法。

[請求項20] スモールガイドアンチセンスオリゴヌクレオチド (sgASO) の設計方法であって、

1) 標的RNA上に、存在確率の高いステムループを同定する工程、

2) 該ステムループを評価する工程、および

3) 該ステムループを形成する塩基対の3'側直後から7塩基を標的配列 (センス鎖) とし、そのアンチセンス鎖をsgASO配列として同定する工程

を含み、

ここで、1) 標的RNA上に、存在確率の高いステムループを同定する工程は、

i) 5'末端からR塩基刻みでW塩基の幅の枠nを設定し、該枠n

は標的RNAから n_{max} 個得られ、それぞれの枠 n において、構成する W 塩基の塩基配列についてパターンマッチングによって取り得る塩基対パターンを算出し、その結果に公知の熱力学的安定性計算を適用し、それぞれの塩基対パターンに対して ΔG として与えることを含む、構造予測ステップと、

i i) 枠 n において $m_{max}(n)$ 個得られている予測構造結果とそれぞれのエネルギー量から該RNAがおかれている細胞内での状態が平衡状態であることを仮定し、予測構造結果それぞれの存在確率をマクスウェル=ボルツマン統計に従って算出し、ここで、 n 枠目での構造予測結果のうち最安定構造から m 番目の予測結果について、その存在確率をおのおの $j(n, m)$ とすることを含む、構造解析ステップと、

i i i) 枠内ではなく配列上の絶対位置 x から始まり、構成するループとステムの特徴プロファイル（ステムを構成する塩基対の塩基の位置で定義されるステムループの個性）を p とした時に、当該ステムループを $motif(x, p)$ と呼び、 $motif(x, p)$ の枠 n 内での存在確率を、部分的な存在確率 $P_{local}(x, p, n)$ とし、その値は、枠 n において得られた構造予測結果すべてについての中で当該ステムループが存在する構造予測結果についての j 値の総和 $\sum j(n, m)$ であるとするを含む、局所存在確率計算ステップ、ここで、枠 n における、 $motif(x, p)$ の局所的な存在確率 $P_{local}(x, p, n)$ は以下で表され：

[数1]

$$P_{local}(x, p, n) = \sum_{m=1}^{m_{max}(n)} \begin{cases} 0 & \dots motif(x, p) \text{ が、枠 } n \text{ の } m \text{ 番目の構造に見つからなかった場合} \\ j(n, m) & \dots motif(x, p) \text{ が、枠 } n \text{ の } m \text{ 番目の構造に見つかった場合} \end{cases}$$

i v) $P_{local}(x, p, n)$ について枠 1 から n_{max} まで総和をとった結果を $\sum P_{local}(x, p, n)$ 、ステムルー

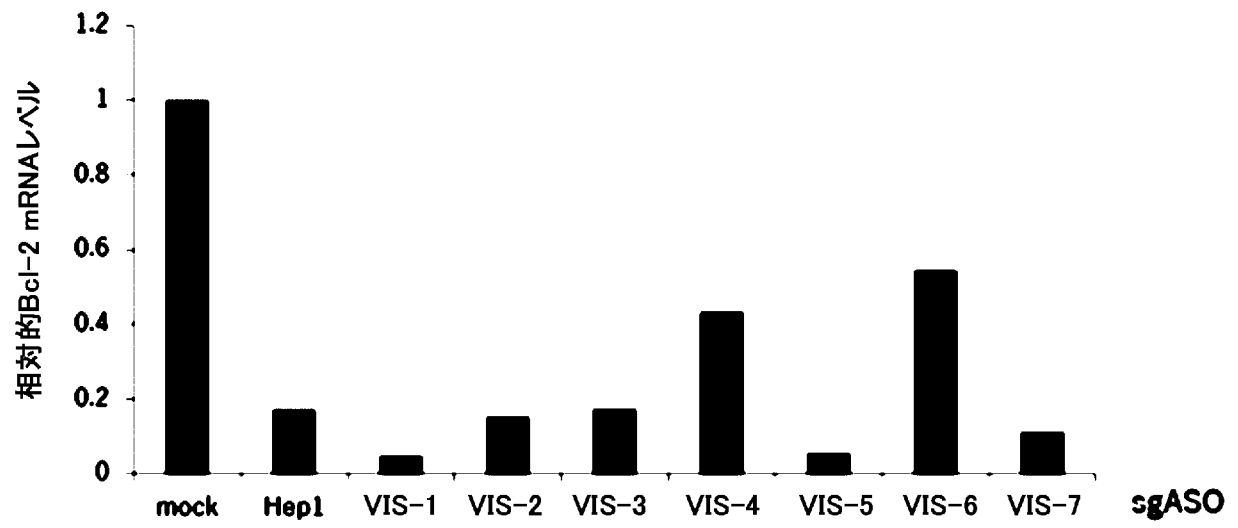
プを構成する配列全長が枠内におさまることのできる枠の数を $n_all(x, p)$ 個としたとき、全体の中での $motif(x, p)$ の存在確率 $P_global(x, p)$ を $\sum P_local(x, p, n) / n_all(x, p)$ として表すことを含む、存在確率計算ステップ、ここで、 $motif(x, p)$ についての全体の中での存在確率 $P_global(x, p)$ は以下で表され：

[数2]

$$P_global(x, p) = \sum_{n=1}^{nmax} \frac{P_local(x, p, n)}{n_all(x, p)}$$

v) 得られた $motif(x, p)$ についての存在確率 $P_global(x, p)$ に対して、存在確率および特徴 p から、ステムループを選択する解析ステップを含む、方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/032122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/113 (2010.01) i, A61K31/7088 (2006.01) i,
A61P35/00 (2006.01) i, A61P43/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12Q1/68-1/6897

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	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/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 Y	HAINO, A. et al., "TRUE Gene Silencing: Screening of a Heptamer-type Small Guide RNA Library for Potential Cancer Therapeutic Agents", J. Vis. Exp., 2016, 112, e53879, in particular, pp. 1-2, 4, section "Discussion"	1-7, 9-18 1-20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 November 2018 (14.11.2018)

Date of mailing of the international search report
27 November 2018 (27.11.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/032122

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	TAKAHASHI, M. et al., "Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies", Leuk. Res., 2014, 38 (7), pp. 808-815, in particular, abstract, page 810, right column, paragraph [0004], table S1, fig. 5	1-7, 9-17 8, 18-20
X A	WATANABE, N. et al., "Induction of apoptosis of leukemic cells by TRUE gene silencing using small guide RNAs targeting the WT1 mRNA", Leuk. Res., 2013, 37(5), pp. 580-585, in particular, abstract, page 581, left column, paragraph [0002], fig. 1	1-6, 9-17 7-8, 18-20
X A	WO 2013/031704 A1 (NIIGATA UNIVERSITY OF PHARMACY AND APPLIED LIFE SCIENCES) 07 March 2013, paragraphs [0015]-[0016] & US 2015/0025232 A1, paragraphs [0042]-[0043]	16-17 1-15, 18-20
X A	WO 2013/022092 A1 (NIIGATA UNIVERSITY OF PHARMACY AND APPLIED LIFE SCIENCES) 14 February 2013, paragraphs [0013]-[0014] (Family: none)	16-17 1-15, 18-20
Y	WO 2013/161964 A1 (KIRIN HOLDINGS COMPANY, LIMITED) 31 October 2013, paragraph [0056] & US 2015/0292005 A1, paragraph [0161]	1-20
Y	JP 2005-341865 A (KYOTO UNIVERSITY) 15 December 2005, paragraph [0056] (Family: none)	1-20
Y	WO 2011/062166 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 26 May 2011, examples (Family: none)	1-20

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12Q1/68-1/6897			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y	HAINO A et al., TRUE Gene Silencing: Screening of a Heptamer-type Small Guide RNA Library for Potential Cancer Therapeutic Agents, J. Vis. Exp., 2016, 112, e53879, 特に、1-2頁、4頁 Discussionの項	1-7, 9-18 1-20	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 14.11.2018		国際調査報告の発送日 27.11.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 竹内 祐樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	
		4B	5082

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	TAKAHASHI M et al., Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies, Leuk. Res., 2014, 38(7), pp.808-815, 特に、要約、810頁右欄第4段落、Table S1、Fig. 5	1-7, 9-17 8, 18-20
X A	WATANABE N et al., Induction of apoptosis of leukemic cells by TRUE gene silencing using small guide RNAs targeting the WT1 mRNA, Leuk. Res., 2013, 37(5), pp.580-585, 特に、要約、581頁左欄第2段落、Fig. 1	1-6, 9-17 7-8, 18-20
X A	WO 2013/031704 A1 (学校法人 新潟科学技術学園 新潟薬科大学) 2013.03.07, [0015] - [0016] & US 2015/0025232 A1, [0042] - [0043]	16-17 1-15, 18-20
X A	WO 2013/022092 A1 (学校法人 新潟科学技術学園 新潟薬科大学) 2013.02.14, [0013] - [0014] (ファミリーなし)	16-17 1-15, 18-20
Y	WO 2013/161964 A1 (キリンホールディングス株式会社) 2013.10.31, [0056] & US 2015/0292005 A1, [0161]	1-20
Y	JP 2005-341865 A (国立大学法人京都大学) 2005.12.15, [0056] (ファミリーなし)	1-20
Y	WO 2011/062166 A1 (武田薬品工業株式会社) 2011.05.26, 実施例 (ファミリーなし)	1-20