

(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9月19日(19.09.2019)



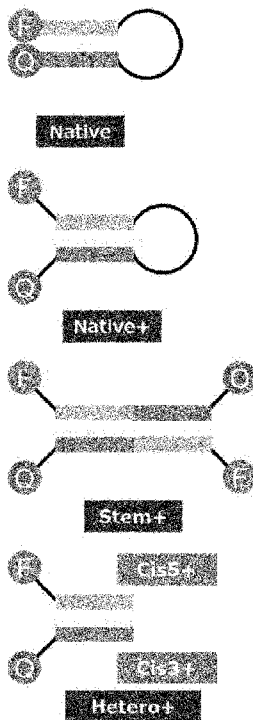
(10) 国際公開番号

WO 2019/177103 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12Q 1/6806* (2018.01) *G16B 30/00* (2019.01)  
*C12Q 1/6818* (2018.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/010571
- (22) 国際出願日: 2019年3月14日(14.03.2019)
- (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 2018-047749 2018年3月15日(15.03.2018) 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: 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). 篠阿弥宇 (SHINO, Amiu); 〒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). 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 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

(54) Title: METHOD FOR SCREENING COMPOUND FOR CONTROLLING RNA FUNCTION

(54) 発明の名称: RNAの機能を制御する化合物のスクリーニング方法



(57) Abstract: The present invention provides a method for screening a compound capable of regulating gene expression by binding to a transcription product. The present invention more specifically relates to obtaining a drug candidate compound by selecting a stem-loop structure as a desired motif in an RNA, inputting a parameter of a specific stem-loop structure, and executing a plurality of RNA higher-order structural analysis programs to search/extract a sequence that can assume the structure in a molecule thereof from an mRNA sequence, selecting a specific target sequence in a specific transcription product as an indicator of the position at which the stem-loop structure is present in the molecule in an mRNA having significance for development of a potential drug target in an object disease or the like from the extracted mRNA, designing/preparing a labeling probe on the basis of the sequence, performing screening using the labeling probe as an assessment system, and acquiring a low-molecular-weight compound that selectively stabilizes the stem-loop structure.

(57) 要約: 本発明は、転写産物に結合することにより遺伝子発現を調節可能な化合物をスクリーニングするための方法を提供する。本発明は、より具体的には、RNA中の所望のモチーフとしてステムループ構造を選択し、特定のステムループ構造のパラメータを入力し、複数のRNA高次構造解析プログラムを実行して、当該構造を分子内にとり得る配列をmRNAの配列から検索・抽出し、抽出されたmRNAから、対象疾患等で創薬標的として開発する意義があるmRNA中の該ステムループ構造の分子上の存在位置などを指標として、特定の転写産物における特定の標的配列を選択し、その配列に基づいて、標識プローブを設計・調製して、それを評価系としてスクリーニングして、選択的に該ステムループ構造を安定化する低分子化合物を取得することによって医薬品候補化合物を得ることに関する。



WO 2019/177103 A1

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, 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 :

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

## 明 細 書

発明の名称：

**RNAの機能を制御する化合物のスクリーニング方法**

**関連出願の相互参照**

[0001] 本願は、特願2018-47749号（出願日：2018年3月15日）の優先権の利益を享受する出願であり、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、RNAの機能を制御する化合物のスクリーニング方法に関する。より具体的には、本発明は、特定のmRNA、特にそこにコードされるタンパク質の発現が疾患の発症や進展に関与する遺伝子のmRNAからの翻訳を制御し得る化合物、特に脂溶性低分子化合物のような医薬品として有利な物性を有する化合物のスクリーニング方法、当該化合物が標的とするmRNAの標的部位となる塩基配列の選択方法、並びにそのためのツール、特にコンピュータ・ソフトウェア等に関する。

**背景技術**

[0003] 核酸の標的のなかでも、RNA分子に対する低分子創薬研究の歴史は実は古くからおこなわれて来た。例えば、いくつかの抗生物質の作用機序はバクテリアrRNAを標的とした蛋白質合成阻害であることが知られていた。しかし、従来の低分子薬の標的分子の大部分は蛋白質であり、RNAは妥当な創薬標的分子とは考えられていなかった。この原因として、(i) RNA分子はセントラルドグマにおける重要な情報伝達分子であるがゆえ、その機能が必須かつシンプルであり、創薬標的に求められる多様性に欠けている、(ii) RNA分子は安定した三次元構造を形成しにくいいため、低分子化合物が結合しうるdruggable siteを持たない、と見なされていたことが挙げられる。一方で近年、ncRNAなどRNAの多様な機能が明らかになり、疾患関連性の高いRNA分子が見いだされている。更には、riboswitchの立体構造解析や、細胞レベルスクリーニングであ

るphenotypic screeningヒット化合物の機序解析などから、低分子化合物がRNAの機能を制御している実例が数多く報告されている。加えて、アミノ酸モノマーに対して核酸モノマーはその多様性が少ないのは事実ではあるが、核酸モノマーの相互作用可能な部分は、それぞれのモノマーに対してワトソン-クリック面、フーグスティン面、シュガーエッジ面、芳香族表面の4か所がありかつそれぞれに方向があることから、核酸分子の作る相互作用パターンはきわめて多様であり、決して低分子化合物との相互作用の多様性においてたんぱく質に劣らない。実際にアプタマーのような核酸分子が抗体と比べてさえ、標的に対して高い親和性を与えることもそれを支持する。このようなbiological/chemicalの両面におけるRNA研究の新しい知見を受け、RNAを低分子創薬の標的として見直す動きが活発になりつつある。

[0004] Disneyらは、RNAの二次構造が解析されているmicroRNA前駆体やRNAの繰り返しモチーフ構造を低分子の結合部位とした創薬を発表しているが（非特許文献1）、創薬標的として利用できるmicroRNAは限定的であるため、多くの疾患の治療への標的候補群としては、多様性が不十分である。

[0005] また、Arrakis社はriboswitchでの実績に基づいて、mRNA中のriboswitch構造を低分子の結合部位として、その部位に結合する基本骨格を見出して創薬を進めているが（非特許文献2）、mRNA中に創薬標的として活用できるriboswitch構造を同定する確率は非常に低いので、創薬標的となるmRNAが限定され、多様性が不十分である。

[0006] 一方、中村らは、mRNA中に内在する単純なステムループ構造について、それを局所的に安定化することで翻訳量が影響を受けることを見出していた（RNA学会での発表）。そこで、天然のmRNA配列データから二次構造（ステムループ構造）をパターンマッチングによって推測しつつ検索し、低分子医薬品開発が行えそうな部位を網羅的に探索し、実際にその部位に対して創薬を行った（特許文献1）。即ち、従来型脂溶性低分子化合物が結合可能な高次構造をヒトcDNAデータベースより網羅的に検索する「手法」プログラム（「multisl.pl」プログラムと命名）を開発した。ただし、本プログラムは、ダイナミ

ック・プログラミングのアルゴリズムを用いて網羅性の向上を意図して探索しているため、大量のデータの中からは望みの特徴をもった二次構造が大量に算出されるため、創薬研究プロセスにおいて効率的でない。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開パンフレット第W02006/054788号

### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：Chem Rev. 2018 Jan 11. [Epub ahead of print] Using Genome Sequence to Enable the Design of Medicines and Chemical Probes. Angelbello AJ, Chen JL, Childs-Disney JL, Zhang P, Wang ZF1, Disney MD.  
非特許文献2：Angew Chem Int Ed Engl. 2014 ;53(50):13746–50. Recognition of nucleic acid junctions using triptycene-based molecules. Barros SA1, Chenoweth DM.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は転写産物、例えば、創薬標的として最も機能が明確となっているmRNAを創薬標的とした場合に、目的のmRNAに低分子化合物が選択的に結合する局所的二次構造（モチーフ）を探索する手段を提供することであり、当該手段を用いて見出されたモチーフにのみ結合する低分子化合物をリアルな系でスクリーニングし、もって所望の機能、たとえばmRNAの翻訳を制御することによって薬効を発揮する低分子医薬品を提供することである。

[0010] 上記の目的を解決するにあたって、mfold (GCG Software ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 7706–10 (1989) 参照) に代表されるような既存のRNA二次構造予測プログラムでは、大きな（例えば、3000塩基以上）RNA鎖を扱う場合には、その精度と信頼性は著しく低下する。その理由は、mfoldがRNA鎖の何ら物理的特性によって高次構造を予測しているのではなく、ただのパターンマッチングを行っているからである。即ち、同一mRNA鎖上で遠距離の分子

内RNA鎖のペアリングによるエントロピー的不利さが軽視され、無理やり遠距離のstemが形成されることが多い。たとえin vitroの系でそのような遠距離のペアリングがあったとしても、生体内でそのペアリングが存在する可能性は少ない。もちろん、そのようなパターンマッチング手法はローカルな構造（100塩基以下）を見積もるには十分に意味がある（ローカルな構造の場合にはペアリングによるエントロピーのロスが少ないため）。しかし、長いmRNAの構造を知りたいときに単純にローカルな構造を扱うにあたってはmfoldを使う意味が少なく、出力の形式が網羅的検索に向かない等、欠点が多い。その理由は、mfoldが二次構造予測に特化された設計のプログラムであるため、創薬研究に必要なモチーフの構造予測結果の解析には別の手法を必要とする。

#### 課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、具体的には、所望のモチーフとしてステムループ構造を選択し、特定のステムループ構造のパラメータを入力し、複数のRNA高次構造解析プログラムを実行して、当該構造を分子内にとり得る配列をmRNAの配列などから検索・抽出し、抽出された配列から、対象疾患等で創薬標的として開発する意義があるmRNA中の該ステムループ構造の分子上の存在位置（例：開始コドン近傍）などを指標として、特定の転写産物（例：SurvivinをコードするmRNA群）および該mRNAにおける特定の標的配列を選択した。さらに、選択された標的配列の特異性を、上記プログラムを実行してmRNAのデータセットから検索して、該標的配列が他のmRNAの翻訳の制御に関わる領域に存在しないことを確認することにより、低分子化合物が特異的に結合し得る標的配列を得ることに成功した。

[0012] 本発明者らはまた、上記のようにして得られた特定の配列を含むRNA鎖を試験化合物と接触させ、試験化合物の存在下および非存在下における該RNA鎖のステムループ構造の安定性の変化を測定・比較することにより、該ステムループ構造を安定化して該配列を有する転写産物の機能、例えばmRNAの翻訳を制御し得る化合物をスクリーニングする評価系を構築することに成功し

た。

[0013] 本発明者は、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0014] 本発明は、遺伝子発現を調節するための核酸を標的とした低分子化合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、遺伝子発現を調節するための低分子化合物の標的となるモチーフ領域の同定、当該低分子化合物の取得を行うためのスクリーニング系とそれに供するプローブの設計を含む。

[0015] 本発明者らは、標的とするmRNAの内在性の部分構造について、それを熱力学的に安定化することにより翻訳反応のイニシエーションコンプレックスの形成の阻害、リボソームのストール、エンドニュークリエースによる切断の惹起、あるいはエキソニュークリエースによる分解の阻害、翻訳伸長反応が途中で停止したmRNAを分解する機構（no-go decay）であるmRNA品質管理機構によって、mRNAが迅速に分解されることを引き起こし、もって標的mRNAからのたんぱく質の発現を調節することを意図した。その熱力学的安定化を低分子化合物との結合によって行うため、適切な位置に低分子化合物が結合しうる適切な部分構造を発見することが最初の工程となる。ついで、その部分構造を適切に安定化することを検出できる系において化学プローブを設計、その特性を確認したうえで評価系に使用し、結合する低分子化合物を取得する。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。

[0016] [態様1]

遺伝子発現を調節することのできる化合物をスクリーニングするための方法であって、

1) 標的RNA配列中に存在しうる局所的二次構造の存在確率を計算する工程

、

2) 所望の存在確率を有する局所的二次構造を選択する工程、

3) 選択した局所的二次構造に対応するスクリーニング用プローブを調製す

る工程、

4) 該プローブを用いて化合物のスクリーニングを行う工程を含む、方法。

[態様2]

局所的二次構造がステムループならびにその5'端および3'端に連続する周辺配列を含む構造である態様1記載の方法。

[態様3]

5'端および3'端に連続する周辺配列がそれぞれ0~10塩基長、好ましくは3~6塩基長である、態様2記載の方法。

[態様4]

ステムループ構造が、単一のループ部位を有する態様2または3記載の方法。

[態様5]

ステムループ構造が2以上のステム部分を有し、ステム間に相補性を有しないバブル部分を有する態様2~4のいずれか一項記載の方法。

[態様6]

遺伝子発現を調節することのできる化合物が、局所的二次構造の部分構造と相互作用し得るものである態様2~5のいずれか一項記載の方法。

[態様7]

遺伝子発現を調節することのできる化合物が、5'端および3'端に連続する周辺配列、ステムループ構造のループ部分もしくはバブル部分、ステム部分、二本鎖のマイナーグループ、またはステムの末端の塩基対のいずれか又は複数と相互作用し得るものである態様2~6のいずれか一項記載の方法。

[態様8]

局所的二次構造をとり得る配列が標的RNA配列中の5'非翻訳領域およびコード領域からなる領域内に存在する態様1~7のいずれか一項記載の方法。

[態様9]

局所的二次構造をとり得る配列が標的RNA配列中の翻訳開始点およびその近



傍からなる領域内に存在する態様1~7のいずれか一項記載の方法。

[態様10]

標的RNA配列が、その翻訳を制御することが1以上の疾患の予防・治療上有効なものである態様1~9のいずれか一項記載の方法。

[態様11]

化合物のスクリーニングを行う工程が、プローブと化合物とを接触させて、該プローブの二次構造の安定性の変化を測定するステップを含む、態様1~10のいずれか一項記載の方法。

[態様12]

プローブがFRETプローブである、態様1~11のいずれか一項記載の方法。

[態様13]

プローブがステムループ構造を有する、態様12記載の方法。

[態様14]

プローブが少なくとも部分的に互いに相補的な2本の核酸鎖から成る、態様12記載の方法。

[態様15]

プローブがステム部分の末端に隣接した相補鎖を形成しない塩基を有する、態様13または14記載の方法。

[態様16]

プローブが1組の蛍光分子とクエンチャー分子を含んでなる、態様13または態様14または15記載の方法。

[態様17]

化合物のスクリーニングを行う工程が、複数のプローブを一つのウェルに入れて、複数のプローブと化合物とを接触させて、該プローブの二次構造の安定性の変化を測定するステップを含む、態様1~16のいずれか一項記載の方法。

[態様18]

複数の化合物を一つのウェルに入れて、化合物のスクリーニングを行う、

態様1~17のいずれか一項記載の方法。

[態様19]

二次構造の安定性の変化がFRETプローブの蛍光を測定することによって測定される、態様12~18のいずれか一項記載の方法。

[態様20]

局所的二次構造の存在確率を計算する工程が、

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<sub>max</sub>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 $\Delta G$ 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m<sub>max</sub>(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、

iii) 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<sub>local</sub>(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<sub>local</sub>(x, p, n) は以下で表され:

[数1]

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

iv)  $P\_local(x, p, n)$  について枠1から $nmax$ まで総和をとった結果を $\Sigma P\_local(x, p, n)$ 、ステムループ $\text{motif}(x, p)$ 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 $\text{motif}(x, p)$ の存在確率 $P\_global(x, p)$ を $\Sigma P\_local(x, p, n) / n\_all(x, p)$ として表すことを含む、存在確率計算ステップ、ここで、 $\text{motif}(x, p)$ 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 $\text{motif}(x, p)$ 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、態様1～19のいずれか一項記載の方法。

[態様21]

所望の存在確率が70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、または95%以上である、態様1～20のいずれか一項記載の方法。

## 図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、本発明において使用可能なプローブの例を示している。Native型プローブはステムループ構造のステム部分の各末端に蛍光分子とクエンチャー分子とが連結されている。Native+型プローブはステムループ構造のステム部分の各末端に、ステムを形成しない複数の塩基を介して蛍光分子とクエンチャー分子とが連結されている。Hetero型プローブはループ部分を有しておらず、末端に蛍光分子とクエンチャー分子とが連結された2本の核酸鎖のハイブリダイゼーションにより形成される（もともとのNative型プローブの5'側にあたるものは、cis5、3'側にあたるものはcis3と称する。）。

[図2]図2は、表4に記載の各プローブ（Alexa Fluor 647標識）のカナマイシン（kanamycin）の存在下および非存在下におけるT<sub>m</sub>測定結果を示すグラフである。

[図3]図3は、表4に記載の各プローブ（Cy5標識）のカナマイシンの存在下および非存在下におけるT<sub>m</sub>測定結果を示すグラフである。

[図4]図4は、表4に記載の各プローブ（6-FAM標識）のカナマイシンの存在下および非存在下におけるT<sub>m</sub>測定結果を示すグラフである。

[図5]図5は、表6に記載の各単一プローブについてのカナマイシンもしくはCPFX（シプロフロキサシン）の存在下または非存在下におけるT<sub>m</sub>測定結果を示すグラフである。

[図6]図6は、表6に記載の4種類のプローブの混合物についてのカナマイシンもしくはCPFXの存在下または非存在下におけるT<sub>m</sub>測定結果を示すグラフである。

[図7]図7は、KG022の化学構造を示している。

### 発明を実施するための形態

[0018] 上述のように、本発明者らは、標的とする転写産物（mRNAなど）の内在性の部分構造について、それを熱力学的に安定化することにより、例えばmRNAに対しては、イニシエーションコンプレックスの形成の阻害、リボソームのストール、エンドニュークリエースによる切断の惹起、あるいはエキソニュークリエースによる分解の阻害、翻訳伸長反応が途中で停止したmRNAを分解する機構（no-go decay）であるmRNA品質管理機構によって、mRNAが迅速に分解されることを引き起こし、もって標的mRNAからのたんぱく質の発現を調節することを意図した。その熱力学的安定化を低分子化合物で行うため、適切な位置に低分子化合物が結合すると想定される適切な部分構造を発見することが最初の工程となる。ついで、その部分構造を適切に安定化することを検出できる系において化学プローブを設計、その特性を確認したうえで評価系に使用し、結合する低分子化合物を取得する。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、以下に、本発明を詳細に説明す

る。

[0019] 1) 標的RNA配列中にある部分構造の存在確率を計算する工程

本発明のいくつかの態様において、標的RNA配列中にある部分構造の存在確率を計算する工程は、

i) 5' 末端からR塩基刻み (Rは1以上の整数であり、例えば1~10、好ましくはコドン塩基数と同じ3) でW塩基の幅 (Wは1以上の整数であり、例えば100~500、好ましくは300) の枠nを設定し (nは1以上の整数)、該枠nは標的RNAからnmax個得られ (nmaxは1以上の整数であり、標的RNAの長さや他のパラメータに依存する)、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 $\Delta G$ 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=ボルツマン統計などに従って算出し、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、

iii) 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]

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

iv)  $P_{\text{local}}(x, p, n)$  について枠1から  $n_{\text{max}}$  まで総和をとった結果を  $\Sigma P_{\text{local}}(x, p, n)$ 、ステムループ  $\text{motif}(x, p)$  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  $n_{\text{all}}(x, p)$  個としたとき、全体の中での  $\text{motif}(x, p)$  の存在確率  $P_{\text{global}}(x, p)$  を  $\Sigma P_{\text{local}}(x, p, n) / n_{\text{all}}(x, p)$  として表すことを含む、存在確率計算ステップ、ここで、 $\text{motif}(x, p)$  についての全体の中での存在確率  $P_{\text{global}}(x, p)$  は以下で表され：

[数4]

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

v) 得られた  $\text{motif}(x, p)$  についての存在確率  $P_{\text{global}}(x, p)$  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ことができる。

[0020] ここで、熱力学的安定性計算は、公知の手法を用いて計算することができ、例えば、以下の文献の記載を参考にして、計算することができる。

- 1: Mathews et al, J. Mol. Biol. (1999) 288, 911-940.
- 2: Xia T et al, Biochemistry (1998) 37, 14719-14735.
- 3: Giese MR et al, Biochemistry (1998) 37, 1094-1100.
- 4: Draper DE et al, Methods in Enzymology (1995) 259, 281-242.
- 5: Serra MJ et al, Methods in Enzymology (1995) 259, 242-261.

[0021] 2) 適切な標的部分構造を選び出す工程

vi) 上記の部分構造の存在確率計算を、2種類以上の構造予測ソフトウェア（アルゴリズム）を用いてそれぞれ別個に行う。この時に使用する構造予測ソフトウェアは、*mfold*、*UNAFold*、*Sfold*、*CentroidFold*、*vsfold*、*RNAfold* などが考えられ、どのようなものであってもよいが、なるべく予測のための

背景理論が異なるものが望ましい。例えば、mfoldの後継ソフトウェアとして歴史あるUNAFold (http://unafold.rna.albany.edu/から入手可能) と、CLE理論を用いて生化学的パラメータを極力排したVsfold (それを連続的に使用するために改良したVswindow) を用いることができる (http://www.rna.it-ciba.ac.jp/で利用可能)。2つ以上の構造予測ソフトウェアを利用して、それぞれから内在性部分構造のリストを得る。

[0022] なお、一般に、構造予測ソフトウェアは、数段階のステップを経て構造を予測する。その最初の段階は、数学的なパターンマッチングである。パターンマッチングの手法には、ダイナミックプログラミング、隠れマルコフモデル、確率的サンプリング、確率文脈自由文法法などがある。本発明の方法においては、これらの手法の任意の組み合わせを用いることができる。

[0023] なお、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.)
- Dawson W, Fujiwara K, Kawai G, Futamura Y, & Yamamoto K. (2006) A method for finding optimal RNA secondary structures using a new entropy model (vsfold). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 25(2):171-89 .
- Ping Ge and Shaojie Zhang, (2015) Computational analysis of RNA structures with chemical probing data. *Methods.*, June 1; 0: 60-66.

[0024] vii) それぞれのリストから、存在確率が十分高い内在性部分構造を抜き出し、それぞれの選抜リストを作成する。この時の存在確率の閾値は、経験的に発明者が用いる85%を用いてもよいし、それより高くても低くてもよい。閾

値は例えば、35～90%の範囲内の値、例えば、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、または90%でありうる。また、それぞれの選抜リストについて、別個の閾値を用いてもよい。

[0025] viii) ここで、それぞれの選抜リストから共通して発見される部分構造を、共通構造としてリスト化する。ここで、共通して発見される構造とは、単一のloopを持つstem loop (Single Stemloop = SSLとも呼ぶ) であって、以下の特徴を持つものを共通した構造とする。

A) それぞれの構造のmRNA上の開始位置と終了位置が一致しているもの

B) 一つの構造が、他の構造の内部にある場合

C) 塩基対構成がほぼ同一で、stemの両末端について若干の相違があるもの。

これらについて、共通する構造は最大公約数的な部分を採用する。

[0026] ix) 共通リストについて、発動させたい発現調節機構に応じて、絞り込みを行い標的リストとする。例えばノックダウンを指向するなら、翻訳のイニシエーションコンプレックスの形成の阻害という観点からスタートコドンの前後50塩基以内にかかる部分構造を抽出して標的リストとする。リボソームのストールからNo-Go decayを惹起することを指向するなら、mRNAの5'末端から終結コドンおよび終結コドンから50塩基下流までにかかる部分構造を抽出して標的リストとする。あるいはエキソニュークリエースによる分解の阻害を引き起こしアップレギュレーションするなら、3' UTR全域にかかる部分構造を抽出して標的リストとする。

[0027] x) 標的リストを、さらに評価して絞り込みを行ってもよい。具体的には、部分構造それぞれについてエネルギー値を予測計算しその熱力学的安定性を指標にしたり、あるいは存在確率値を指標にしたり、他の遺伝子に類似した構造・配列が存在しないことを指標にしたり、他の生物種の同様の遺伝子に類似した構造・配列が存在することを指標にしたりする。

[0028] 3) 選り出した部分構造について、スクリーニングに供するプローブを設計する工程

標的リストに記載のRNA部分構造から、それに結合する低分子化合物を見つ



けるためのプローブを用意する。このためには、複数種類のプローブを別個に設計する。

・ Native : 特定のRNA部分構造をそのまま抜き出したもの

・ Native+ : Nativeに加え、5' および3' に標的としているmRNAにおいて特定のRNA部分構造直前のx残基を5' 端に、直後のy残基を3' 端に加えたもの。Native+全体の配列が、mRNA上の特定のRNA部分構造のx塩基前から、特定のRNA部分構造のy塩基後までに対応する。通常は、xとyについて3塩基以上5塩基程度までとする。

・ Stem+ : Native+のうち、loop部分を削除して、削除されて残った部分同士の本鎖。

[0029] これらについて、5' 側に蛍光物質、3' 側にクエンチャー（あるいはこの逆）を付加し、Nativeプローブ、Native+プローブ、Stem+プローブとする。

ここで、Stem+プローブのかわりに、Native+プローブのloop部分を除いて2分子とした、Hetero+プローブを用いてもよい。

[0030] また、蛍光物質とクエンチャーの距離が20塩基に満たない場合には蛍光が非常に弱くなるので、Nativeプローブへの直接の標識は好ましくない。また、Native+プローブにおいては、xとyを適切に長くし、好ましくは全体で20塩基を超えるようにする。

[0031] これらについて、事前に蛍光物質もクエンチャーもついていないダミープローブ（Nativeダミープローブ、Native+ダミープローブ、Stem+ダミープローブ、Hetero+ダミープローブ）を用意し、UV測定にてT<sub>m</sub>値を測定する。この際に主たるT<sub>m</sub>値が1つだけ検出されることを確認しておく。

#### [0032] 4) 低分子化合物のスクリーニングを行う工程

1) プローブ（Nativeプローブ、Native+プローブ、Stem+プローブ、Hetero+プローブ）について、それぞれを化合物と接触させた状態で蛍光物質の出力によってT<sub>m</sub>値を測定する。このT<sub>m</sub>値と、化合物を接触させていないプローブとのT<sub>m</sub>値の差をΔT<sub>m</sub>とし、化合物が安定化に寄与する効果の指標に用いる。あるいは、T<sub>m</sub>値を算出するために使用した温度と蛍光出力のグラフから

、いくつかの仮定を置きつつvan' t Hoffの式とLambertBeer則から、 $T_m$ 値での $\Delta H$ と $\Delta S$ を算出し、室温での $\Delta G$ に換算し、これを化合物を接触させていないプローブとの $\Delta G$ 値の差を $\Delta \Delta G$ として、 $T_m$ 値の多少にかかわらずに統一的に安定化効果の評価の指標に用いてもよい。

[0033] この際、(1) Nativeプローブ、(2) Native+プローブ、(3) Stem+プローブ（あるいはHetero+プローブ）について、(1) (2) の $T_m$ 値を変化させたものは当該部分構造のloop部分に、(2) (3) の $T_m$ 値を変化させたものは当該部分構造の根元の部分に、(1) (2) (3) の $T_m$ 値を変化させたものはステム部分に結合した可能性が高いと判断して、望みの低分子化合物を選択する。

[0034] 2) また、qPCRマシン（例えば、CFX 384 Touch (Bio-Rad社製)）では、各ウエルを同時に4波長の蛍光測定が可能であるため、1ウエルにFRET標識で異なる蛍光波長のプローブを混合して使用することで、スクリーニングを効率化することができる。その場合には、蛍光標識とクエンチャーについて、以下の表からの組み合わせから選択して標識プローブを合成することができる。なお、例えば、プローブ種またはRNA配列の違うプローブを同時に混合することで、4種以上のFRETプローブを混合することも可能である。例えば、同じ波長で検出されるプローブでも、十分に $T_m$ 値が離れており（例えば $20^{\circ}\text{C}$ 以上）、かつ蛍光強度に差異がなければ、混合しても各々の $T_m$ 値が算出可能と考えられる。

[0035]

[表1]

蛍光標識化合物名	クエンチャー化合物名
6-FAM	Iowa Black FQ
MAX (NHS Ester)	Iowa Black RQ
TYE 563	BHQ 1
TEX 615	BHQ 2
TYE 665	Dabcyl
TYE 705	TAMRA
Alexa Fluor 488 (NHS Ester)	
Alexa Fluor 532 (NHS Ester)	
Alexa Fluor 546 (NHS Ester)	
Alexa Fluor 594 (NHS Ester)	
Alexa Fluor 647 (NHS Ester)	
Alexa Fluor 660 (NHS Ester)	
Alexa Fluor 750 (NHS Ester)	
Cy3	
Cy5	
Cy5.5	
6-FAM (Azide)	
6-FAM (NHS Ester)	
Fluorescein dT	
JOE (NHS Ester)	
TET	
HEX	
ATTO 488 (NHS Ester)	
ATTO 532 (NHS Ester)	
ATTO 550 (NHS Ester)	
ATTO 565 (NHS Ester)	
ATTO Rho101 (NHS Ester)	
ATTO 590 (NHS Ester)	
ATTO 633 (NHS Ester)	
ATTO 647N (NHS Ester)	
Rhodamine Green-X (NHS Ester)	
Rhodamine Red-X (NHS Ester)	
TAMRA (NHS Ester)	
TAMRA (Azide)	
ROX (NHS Ester)	
TEXAS RED-X (NHS Ester)	
Lightcycler 640 (NHS Ester)	
Dy750 (NHS Ester)	

[0036] また、その場合に評価する化合物についても、1ウエルに異なる蛍光波長のプローブを複数種を混合して評価することもできる。

#### [0037] 標的となるRNA

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。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を含む。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）である。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mRNA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。

[0038] 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

[0039] 例1：標的RNA配列中にある部分構造の存在確率を計算する工程

SurvivinのmRNAの配列情報（アクセッション番号：NM\_0001168.2）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（ここではまず、UNAFoldとVswindowを用いた。UNAFoldについては、以下の2つの参考文献を参照：1) Markham, N. R. & Zuker, M. (2005) DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.*, 33, W577-W581. 2) 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. Vswindowの中核であるvsfoldについては、以下の参考文献を参照：3) Dawson W, Fujiwara K, Kawai G, Futamura Y, & Yamamoto K. (2006) A method for finding optimal RNA secondary structures using a new entropy model (vsfold). Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 25(2):171-89.)。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 $m_{\max}(n)$ 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。

[0040] 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、両端は塩基対形成しているものとする。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）。さらに、ループ部分が一つであるステムループを、single stem loop（以後、略称としてSSL）とした。

[0041] こうしたSSL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SSLのアイデンティティ) 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SSL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nmaxまで総和をとった結果を $\sum P\_local (x, p, n)$ 、当該SSL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) は、 $\sum P\_local (x, p, n) / n\_all (x, p)$  として表される。

[0042] ここで、UNAFoldによる予測結果からP\_global (x, p) が85%以上であるSSL構造のうち、重複を除いたものは9個あった。ここで重複とは、あるSSLが、他のSSLの部分構造である場合に小さいものを重複として除いた。

[0043] 以下の表1に、9個のSSLを示す。

[0044] [表2]

SSL	START	SEQUENCE	END
1	107	GGUGGCGGCGGCGGCAUGGGUGCCCCGACGUUGCC	141
2	151	GCAGCCUUUCUCAAGGACCACCGCAUCUCUACAUUCAAGAACUGGCCUUUCUUGGAGGGCUGC	214
3	235	GGCCGAGGCUGGCUUCAUCCACUGCCCCACUGAGAACGAGCCAGACUUGGCC	286
4	381	UUUCUGUCAAGAAGCAGUUUGAAGAAUUAACCCUUGGUGAAUUUUUGAAACUGGACAGAGA	441
5	794	GGGGCUCAUUUUUGCUGUUUUGAUUCCC	821
6	1420	GUGGGGGACUGGCUGGGCUGCUGCAGGCCGUGUGUCUGUCAGCCCAACCUUCA CAUCUGUCACGUUCUCCAC	1491
7	1540	GCAGCUCGCCGAGGGCUGAAGUCUGGCGUAAGAUGAUGGAUUUGAUUCGCCCU CCUCCCUGUCAUAGAGCUGC	1612
8	1954	UUUCCUCUAAAACUGGGAGA	1973
9	2241	GGCCUUUCCUAAAAGGCC	2258

[0045] 例2：適切な標的部分構造を選び出す工程

UNAFoldによる予測結果からP\_global (x, p) が85%以上であるSSL構造の

うち、重複を除いたものは9個あった。そのうち、低分子化合物の結合による安定化によつてのノックダウン効率が低いことが示唆されるスタートコドンを含むSSLを探したところ、107番目から141番目にかけて、

```
((UG(((G(((C(((UGGG))))))A)))UG))
GGUGGCGGCGGCGGCAUGGGUGCCCCGACGUUGCC
```

というSSL構造(1)が、存在確率約90%で同定された。「(」、「)」はそれぞれ塩基対の形成を示している。ここで、Vwindowによる予測結果から、P\_global(x, p)が35%以上であるSSL構造のうち、重複を除いたものは53個あった。このうち、101番目から148番目にかけて、



というSSL構造(2)が、存在確率約40%で同定された。SSL(1)はSSL(2)に内包され、最も構造として重要なループ部位とその近辺の塩基対形成は維持されている。加えて107近辺及び141近辺の塩基対形成も維持されている。このことから、SSL(1)とSSL(2)は予測結果として完全一致はしないものの、化合物が最も結合しやすい場所の一つであるinternalループ部位について予測結果が異なるだけで、SSL(1)とSSL(2)は実質的に一致する。つまり、基本的には本部分構造が両方法のどちらにおいてもある程度の存在確率が高いと推測されたことになる。従つて、1) 低分子化合物の結合によつてノックダウンの効率が低いと推測される領域にあり、2) 主要な構造予測ソフトウェアを利用した解析によつて高い存在確率が確認され、3) 副次的な構造予測ソフトウェアによつてもその存在確率が確認されたことで、本SSLをSurvivinにおけるスクリーニングに供するプローブ部位として選択した。

[0046] 例3：選び出した部分構造について、スクリーニングに供するプローブを設計する工程

上記例2で選択したモデルモチーフ（SSL）の配列からそれに結合する低分子化合物を見つけるためのプローブ配列と決定した。このためには、複数種類のプローブを下記のように別個に設計した。

[0047] まずは、Native型として、主要な構造予測ソフトウェアで算出された存在確率が高いSSL(1)の配列を採用した。

Survivin-native GGUGGCGGCGGCGGCAUGGGUGCCCCGACGUUGCC

[0048] 加えて、Nativeについて5'端および3'端にそれぞれSSL(1)の5'端より前にある3塩基と3'より後ろにある3塩基を付加したものを採用した。

Survivin-native+ AGA GGUGGCGGCGGCGGCAUGGGUGCCCCGACGUUGCC CCC

[0049] さらに、Survivin-nativeの配列からステム配列を削除したヘテロ型を調製した。

Survivin-hetero

Survivin-cis5+ 5' -AGAGGUGGCGGCGGCGGCA-3'

Survivin-cis3+ 5' -UGCCCCGACGUUGCCCC-3'

[0050] これらについて、蛍光色素及びクエンチャーを導入していないRNA鎖をダミープローブとしてUV値を指標としてT<sub>m</sub>値を実測したところ、それぞれ69.63°C、72.35°C、53.43°Cとして測定された。T<sub>m</sub>値を算出するためのカーブが素直であり、T<sub>m</sub>値が、80°Cを越さず適切であることが分かったので、これらについて、Native型およびNative+型、ヘテロ型のcis5+の5'側にCy5蛍光色素を、Native型およびNative+型、ヘテロ型のcis3+の3'側にブラックホールクエンチャーを付加させたものを合成した。各プローブのT<sub>m</sub>を以下の方法にて確認した。

[0051] 最終濃度が50nM RNA、20mM リン酸バッファー (pH7.0)、50mM KCl、1% DMSO、0.1μg/μl Bovine Serum Albumin (Takara Bio) あるいは、0.05%~0.1% Tween-20あるいは、0.05%~0.1% Triton X-100、となるように10μl溶液を混合し、10分間室温でインキュベートした。

[0052] 上記溶液を384ウェルプレートに分注したプレートを、qPCRマシン (CFX 384 Touch (Bio-Rad社製)) で95°Cに昇温ののち15秒維持し、4°Cへ急冷し2分維持したのち、25°Cで5分維持させた。その後、約40分かけて95°Cまで上昇させつつ、1°Cごとに10秒保持したのちに蛍光出力を測定した。蛍光出力について、数値微分を行うにあたっては、実測温度Tからプラスマイナス3°Cまでの



計7点を最小二乗法によって直線に近似し、その傾きを実測温度Tの点での傾き (D1) とした。同様に、D1の値をもう一度数値微分を同様に行い、実測温度Tの点での傾き(D2)とした。ここで、D1の値として10以上である部分において、D1が最大である実測温度T\_D1MAXを取得した。この実測温度T\_D1MAXからプラスマイナス3℃までの計7点を用いて、実際にその7点を最小二乗法によって直線に近似した場合に、XをT、YをD2としたときに、Y=0となる数値T\_INFを算出し、これをTm\_N0値とした。ここではそれぞれ、下記に示すように51.8℃～78.2℃となった。通常、Tm値は濃度の影響を受けるため、ダミープローブとのこの程度の差異は問題ないと判断した。

## [0053] [表3]

	蛍光標識	クエンチャー標識	Tm
Survivin-native	Alexa Fluor 647	BHQ2	78.2℃
Survivin-native+	Alexa Fluor 647	BHQ2	74.7℃
Survivin-hetero	Alexa Fluor 647	BHQ2	51.8℃

	蛍光標識	クエンチャー標識	Tm
Survivin-native	Cy5	BHQ2	77.6℃
Survivin-native+	Cy5	BHQ2	77.3℃
Survivin-hetero	Cy5	BHQ2	52.1℃

	蛍光標識	クエンチャー標識	Tm
Survivin-native+	6-FAM	BHQ1	75.4℃

## [0054] 例4：低分子化合物のスクリーニングを行う工程

低分子化合物として、カナマイシンの濃度が100 μM 化合物、50nM RNA、20 mM リン酸バッファー (pH7.0)、50mM KCl、1% DMSO、0.1 μg/μl Bovine Serum Albumin (Takara Bio) あるいは、0.05%～0.1% Tween-20あるいは、0.05%～0.1% Triton X-100、となるように10 μl溶液を混合し、10分間室温でインキュベートした。

[0055] カナマイシンを含む溶液を384ウェルプレートに分注したプレートを、qPCR

マシン (CFX 384 Touch (Bio-Rad社製) ) で95°Cに昇温ののち15秒維持し、4°Cへ急冷し2分維持したのち、25°Cで5分維持させた。その後、約40分かけて95°Cまで上昇させつつ、1°Cごとに10秒保持したのちに蛍光出力を測定した。蛍光出力について、数値微分を行うにあたっては、実測温度Tからプラスマイナス3°Cまでの計7点を最小二乗法によって直線に近似し、その傾きを実測温度Tの点での傾き (D1) とした。同様に、D1の値をもう一度数値微分を同様に行い、実測温度Tの点での傾き (D2) とした。ここで、D1の値として10以上である部分において、D1が最大である実測温度T\_D1MAXを取得した。この実測温度T\_D1MAXからプラスマイナス3°Cまでの計7点を用いて、実際にその7点を最小二乗法によって直線に近似した場合に、XをT、YをD2としたときに、Y=0となる数値T\_INFを算出し、これをカナマイシン存在下のTm値とした。さらに、カナマイシンを含んだウェルについては、それを含まないウェルとのTm値 (Tm\_NO) の差 (Tm-Tm\_NO) を $\Delta Tm$ として獲得した。この作業を、Native型、Native+型、hetero型について行ったところ、 $\Delta Tm$ としてそれぞれ2.4°C~9.0°Cを得た。

[0056]

[表4]

	蛍光標識	クエンチャー標識	Tm (Kanamycin非存在)	Tm (Kanamycin存在)	Tm上昇温度
Survivin-native	Alexa Fluor 647	BHQ2	78.2°C	81.1°C	3.0°C
Survivin-native+	Alexa Fluor 647	BHQ2	74.7°C	78.5°C	3.7°C
Survivin-hetero	Alexa Fluor 647	BHQ2	51.8°C	60.8°C	9.0°C
	蛍光標識	クエンチャー標識	Tm (Kanamycin非存在)	Tm (Kanamycin存在)	Tm上昇温度
Survivin-native	Cy5	BHQ2	77.6°C	80.0°C	2.4°C
Survivin-native+	Cy5	BHQ2	77.3°C	80.4°C	3.1°C
Survivin-hetero	Cy5	BHQ2	52.1°C	60.3°C	8.2°C
	蛍光標識	クエンチャー標識	Tm (Kanamycin非存在)	Tm (Kanamycin存在)	Tm上昇温度
Survivin-native+	6-FAM	BHQ1	75.4°C	78.9°C	3.5°C

[0057] 例5：複数種のプローブを混合してスクリーニングに供する工程

測定装置（Bio-Rad社製CFX384 Touch）で検出可能な4波長に対応する蛍光修飾を施した4種のFRETプローブを調製した。

5' 端にCy5、3' 端にBHQ2修飾を施したFRETプローブ

A-4-G\_Cy5/BHQ2 GGAUGCUUACUCAGCGAUCC

5' 端にFAM、3' 端にBHQ1修飾を施したFRETプローブ

MGA-N\_FAM/BHQ1 GGAUCCCCGACUGGCGAGAGCCAGGUAACGAAUGGAUCC

5' 端にHEX相当のAlexa 532、3' 端にBHQ1修飾を施したFRETプローブ

FMNA\_Alexa532/BHQ1 GGCUGUAGGAUAUGCUUCGGCAGAAGGACACGCC

5' 端にTexas Red、3' 端にBHQ2修飾を施したFRETプローブ

TAR21-G3\_Texas Red/BHQ2 GGGUCUCUCUUCGGGGAACCC

## [0058] [表5]

蛍光色素	FAM	HEX (Alexa532)	Texas Red	Cy5
励起波長 (nm)	495	538 (527)	598	648
蛍光波長 (nm)	520	555 (553)	617	668

装置検出チャネル	1	2	3	4
励起波長 (nm)	450-490	515-535	560-590	620-650
検出波長 (nm)	515-530	560-580	610-650	675-690

[0059] 最終濃度が1プローブにつき50nM RNA、20mM リン酸バッファー (pH6.5)、50mM KCl、1% DMSO、0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l Bovine Serum Albumin (Takara Bio) あるいは、0.05%~0.1% Tween-20あるいは、0.05%~0.1% Triton X-100 となり、さらに、低分子化合物が含まれる場合は100 $\mu$ M 化合物となるように10 $\mu$ l溶液を混合し、10分間室温でインキュベートした。

[0060] 溶液を384ウェルプレートに分注したプレートを、qPCRマシン (CFX 384 Touch (Bio-Rad社製)) で、95 $^{\circ}$ Cに昇温したのち15秒維持し、4 $^{\circ}$ Cへ急冷し2分維持したのち、25 $^{\circ}$ Cで5分維持させた。その後、約40分かけて95 $^{\circ}$ Cまで上昇さ

せつつ、1°Cごとに10秒保持したのちに蛍光出力を測定した。蛍光出力について、数値微分を行うにあたっては、実測温度Tからプラスマイナス3°Cまでの計7点を最小二乗法によって直線に近似し、その傾きを実測温度Tの点での傾き (D1) とした。同様に、D1の値をもう一度数値微分を同様に行い、実測温度Tの点での傾き (D2) とした。ここで、D1の値として10以上である部分において、D1が最大である実測温度T\_D1MAXを取得した。この実測温度T\_D1MAXからプラスマイナス3°Cまでの計7点を用いて、実際にその7点を最小二乗法によって直線に近似した場合に、XをT、YをD2としたときに、Y=0となる数値T\_INFを算出し、これをTm値とした。さらに、化合物を含んだウェルについては、それを含まないウェルとのTm値 (Tm\_NO) の差 (Tm-Tm\_NO) をΔTmとして獲得した。

[0061] この作業を、単一のプローブのウェルと、4種のプローブを混合したウェルそれぞれについて行ったところ、下記表6に示すTm値およびΔTm値を得た。化合物としてカナマイシンが存在するウェルでは単一プローブ、混合プローブともにすべての波長でTmの上昇を得た。4種のプローブの中ではA-4-G\_Cy5/BHQ2のみにTm上昇をきたす化合物CPFXが存在するウェルでは、単一プローブ、混合プローブともにA-4-G\_Cy5/BHQ2に対応する波長のみでTmの上昇を得た (図5)。

[0062] [表6]

単一プローブ	化合物無し		+kanamycin		+CPFX		ΔTm (°C)	
	Tm (°C)	SD	Tm (°C)	SD	Tm (°C)	SD	単一 +kanamycin	単一 +CPFX
A-4-G_Cy5/BHQ2	67.37	0.10	71.66	0.12	68.78	0.04	4.29	1.41
MGA-N_FAM/BHQ1	73.71	0.12	80.33	0.21	74.03	0.19	6.62	0.33
FMNA_Alexa532/BHQ1	77.94	0.08	82.17	0.10	78.03	0.07	4.23	0.09
TAR21-G3_Texas Red/BHQ2	85.72	0.06	90.02	0.07	85.80	0.20	4.30	0.07
4種類プローブ混合	化合物無し		+kanamycin		+CPFX		ΔTm (°C)	
	Tm (°C)	SD	Tm (°C)	SD	Tm (°C)	SD	混合 +kanamycin	混合 +CPFX
Cy5検出	67.50	0.13	71.78	0.11	68.96	0.13	4.28	1.46
FAM検出	74.11	0.06	80.22	0.05	74.22	0.14	6.11	0.11
HEX検出	78.08	0.05	82.23	0.07	78.07	0.01	4.15	-0.02
Texas Red検出	85.77	0.16	89.95	0.10	85.75	0.19	4.18	-0.02

[0063] 例6：複数の化合物を混合してスクリーニングを行う工程

例2と例5で示した、5' 端にCy5、3' 端にBHQ2修飾を施したSurvivin-nativ

e+型プローブと、A-4-G\_Cy5/BHQ2プローブを調製した。A-4-G\_Cy5/BHQ2の $T_m$ 値上昇をきたす化合物KG022と、Survivin-native+、A-4-G\_Cy5/BHQ2ともに $T_m$ 値に変化を与えないNDFX（ナジフロキサシン）、両者の混合を調製した。

[0064] 最終濃度が50nM RNA、20mM リン酸バッファー（pH6.5）、50mM KCl、1% DMSO、0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Bovine Serum Albumin (Takara Bio) あるいは、0.05%~0.1% Tween-20あるいは、0.05%~0.1% Triton X-100 となり、さらに、低分子化合物が含まれる場合は1化合物につき100  $\mu\text{M}$  化合物となるように10  $\mu\text{l}$  溶液を混合し、10分間室温でインキュベートした。

[0065] 溶液を384ウェルプレートに分注したプレートを、qPCRマシン（CFX 384 Touch (Bio-Rad社製)）で、95°Cに昇温したのち15秒維持し、4°Cへ急冷し2分維持したのち、25°Cで5分維持させた。その後、約40分かけて95°Cまで上昇させつつ、1°Cごとに10秒保持したのちに蛍光出力を測定した。蛍光出力について、数値微分を行うにあたっては、実測温度 $T$ からプラスマイナス3°Cまでの計7点を最小二乗法によって直線に近似し、その傾きを実測温度 $T$ の点での傾き（D1）とした。同様に、D1の値をもう一度数値微分を同様に行い、実測温度 $T$ の点での傾き（D2）とした。ここで、D1の値として10以上である部分において、D1が最大である実測温度 $T\_D1MAX$ を取得した。この実測温度 $T\_D1MAX$ からプラスマイナス3°Cまでの計7点を用いて、実際にその7点を最小二乗法によって直線に近似した場合に、 $X$ を $T$ 、 $Y$ をD2としたときに、 $Y=0$ となる数値 $T\_INF$ を算出し、これを $T_m$ 値とした。さらに、化合物を含んだウェルについては、それを含んでいないウェルとの $T_m$ 値（ $T_m\_NO$ ）の差（ $T_m - T_m\_NO$ ）を $\Delta T_m$ として獲得した。

[0066] Survivin-native+プローブの、KG022存在下の $\Delta T_m$ は0.1°C、NDFX存在下の $\Delta T_m$ は0.0°C、KG022とNDFX混在時の $\Delta T_m$ は0.1°Cであった。A-4-G\_Cy5/BHQ2プローブのKG022存在下の $\Delta T_m$ は4.7°C、NDFX存在下の $\Delta T_m$ は0.2°C、KG022とNDFX混在時の $\Delta T_m$ は4.3°Cであった。化合物混在時も単一化合物存在下と同等の $\Delta T_m$ 値を得た（表7、図6）。

[0067]

[表7]

 $\Delta T_m$ 

	KG022	NDFX	KG022+NDFX
A-4-G	4.65	0.15	4.31
SV-NL	0.08	0.01	0.06

[0068] 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

[0069] 本発明の方法は、核酸を標的とした医薬品としての物性においてより有利な低分子化合物をスクリーニングすることを可能とするとともに、タンパク質をターゲットとした創薬とは異なり、リード化合物を得るまでのステップが対象疾患によらずすべて同じであるので、創薬スキームの時間短縮と効率化とコストダウンをも可能にする点できわめて有用である。同時に、製造法および規制当局対応において医薬品として実績のある低分子化合物について、その創薬標的ターゲットを大量に供給することとなり、現在の手法では取得できない医薬品標的について、より安価な医薬品の確実な提供につながる。また、当該方法は、生体内で特異的に作用する構造と機能を有するあらゆるRNAをターゲットとした低分子医薬品の創薬に適用可能であるので、遺伝子発現制御において重要な役割を担っていることが示唆されているmiRNAなどの

機能性RNAに対する創薬にもきわめて有用である。さらに、本発明で用いられる二次構造検索ソフトウェアは、ゲノム上の新規なmiRNAの検出にも適用することが出来る。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] 遺伝子発現を調節することのできる化合物をスクリーニングするための方法であって、
- 1) 標的RNA配列中に存在しうる局所的二次構造の存在確率を計算する工程、
  - 2) 所望の存在確率を有する局所的二次構造を選択する工程、
  - 3) 選択した局所的二次構造に対応するスクリーニング用プローブを調製する工程、
  - 4) 該プローブを用いて化合物のスクリーニングを行う工程を含む、方法。
- [請求項2] 局所的二次構造がステムループならびにその5'端および3'端に連続する周辺配列を含む構造である請求項1記載の方法。
- [請求項3] 5'端および3'端に連続する周辺配列がそれぞれ3~6塩基長である、請求項2記載の方法。
- [請求項4] ステムループ構造が、単一のループ部分を有する請求項2または3記載の方法。
- [請求項5] ステムループ構造が2以上のステム部分を有し、ステム間に相補性を有しないバブル部分を有する請求項2~4のいずれか一項記載の方法。
- [請求項6] 遺伝子発現を調節することのできる化合物が、局所的二次構造の部分構造と相互作用し得るものである態様2~5のいずれか一項記載の方法。
- [請求項7] 遺伝子発現を調節することのできる化合物が、5'端および3'端に連続する周辺配列、ステムループ構造のループ部分もしくはバブル部分、ステム部分、二本鎖のマイナーグループ、またはステムの末端の塩基対のいずれか又は複数と相互作用し得るものである請求項2~6のいずれか一項記載の方法。
- [請求項8] 局所的二次構造をとり得る配列が標的RNA配列中の5'非翻訳領域お

よびコード領域からなる領域内に存在する請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

- [請求項9] 局所的二次構造をとり得る配列が標的RNA配列中の翻訳開始点およびその近傍からなる領域内に存在する請求項1~7のいずれか一項記載の方法。
- [請求項10] 標的RNA配列が、その翻訳を制御することが1以上の疾患の予防・治療上有効なものである請求項1~9のいずれか一項記載の方法。
- [請求項11] 化合物のスクリーニングを行う工程が、プローブと化合物とを接触させて、該プローブの二次構造の安定性の変化を測定するステップを含む、請求項1~10のいずれか一項記載の方法。
- [請求項12] プローブがFRETプローブである、請求項1~11のいずれか一項記載の方法。
- [請求項13] プローブがステムループ構造を有する、請求項12記載の方法。
- [請求項14] プローブが少なくとも部分的に互いに相補的な2本の核酸鎖から成る、請求項12記載の方法。
- [請求項15] プローブがステム部分の末端に隣接した相補鎖を形成しない塩基を有する、請求項13または14記載の方法。
- [請求項16] プローブが1組の蛍光分子とクエンチャー分子を含んでなる、請求項13または14または15記載の方法。
- [請求項17] 化合物のスクリーニングを行う工程が、複数のプローブを一つのウェルに入れて、複数のプローブと化合物とを接触させて、該プローブの二次構造の安定性の変化を測定するステップを含む、請求項1~16のいずれか一項記載の方法。
- [請求項18] 複数の化合物を一つのウェルに入れて、化合物のスクリーニングを行う、請求項1~17のいずれか一項記載の方法。
- [請求項19] 二次構造の安定性の変化がFRETプローブの蛍光を測定することによって測定される、請求項11~18のいずれか一項記載の方法。
- [請求項20] 局所的二次構造の存在確率を計算する工程が、

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 $\Delta G$ 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) とすることを含む、構造解析ステップと、

iii) 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]

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

iv)  $P\_local(x, p, n)$  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  $\Sigma P\_local(x, p, n) / n\_all(x, p)$  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]

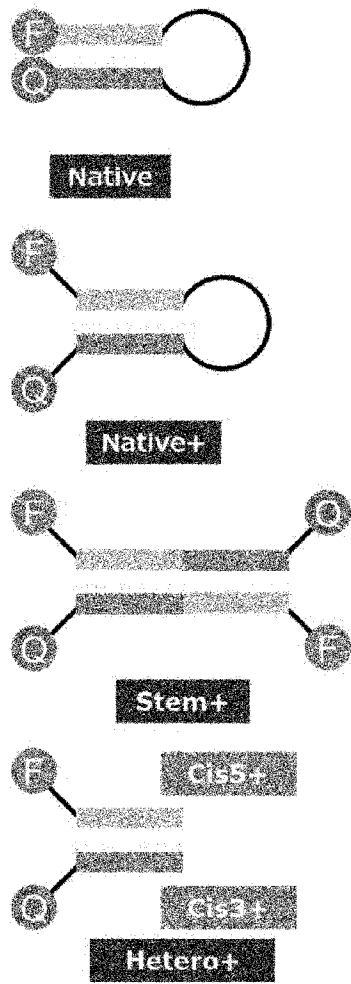
$$P\_global(x, p) = \sum_{n=1}^{nmax} \frac{P\_local(x, p, n)}{n\_all(x, p)}$$

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、請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

[請求項21] 所望の存在確率が85%以上である、請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

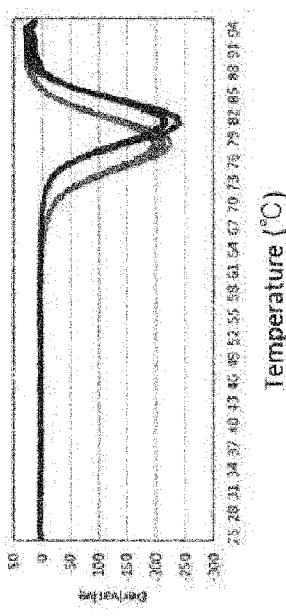
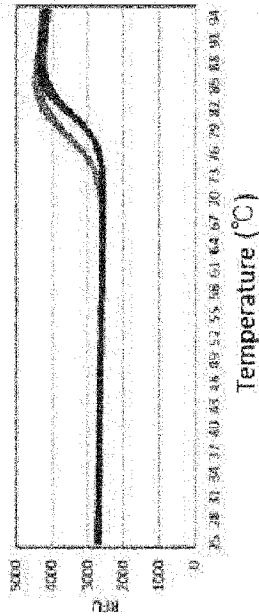
[図1]



【図2】

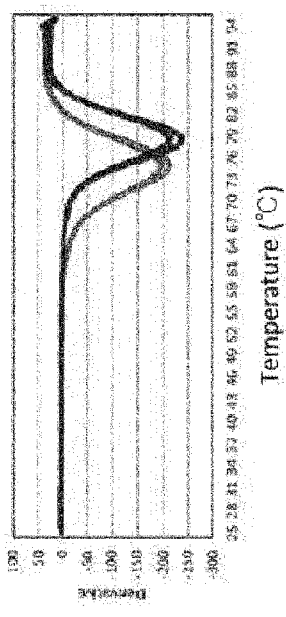
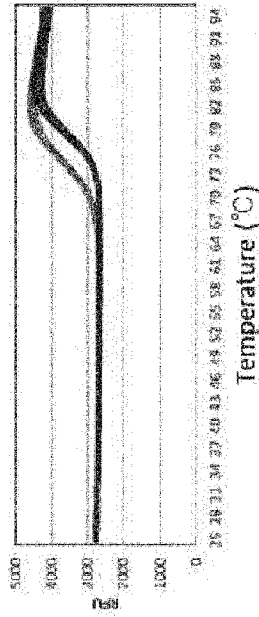
灰: - Kanamycin  
 黒: + Kanamycin

SV-N\_Alexa647/BHQ2



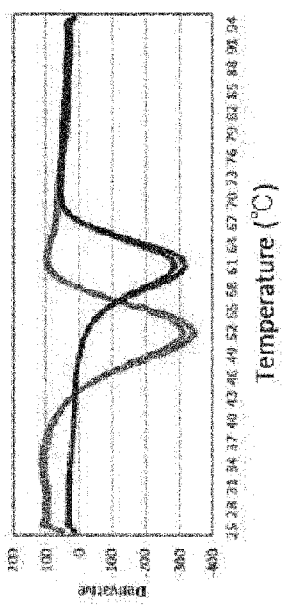
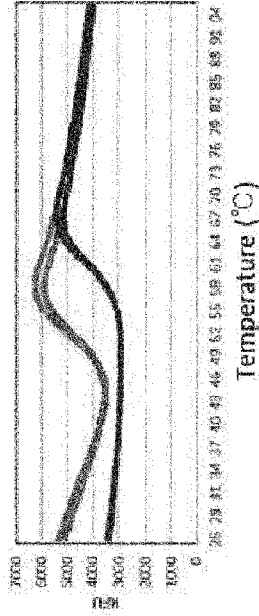
- Kanamycin	78.2 °C
+ Kanamycin	81.1 °C
	3.0 °C

SV-NL\_Alexa647/BHQ2



- Kanamycin	74.7 °C
+ Kanamycin	78.5 °C
	3.7 °C

SV-HL\_Alexa647/BHQ2

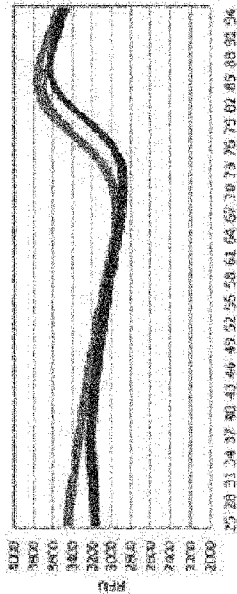


- Kanamycin	51.8 °C
+ Kanamycin	60.8 °C
	9.0 °C

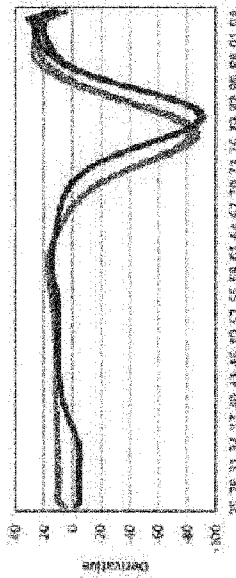
[図3]

灰: - Kanamycin  
 黒: + Kanamycin

SV-N\_Cy5/BHQ2



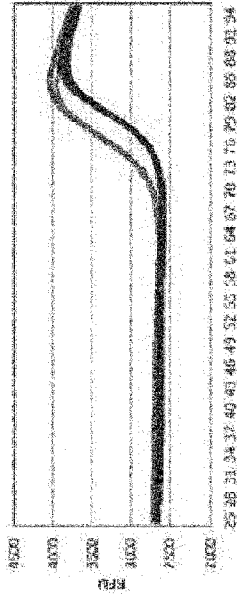
Temperature (°C)



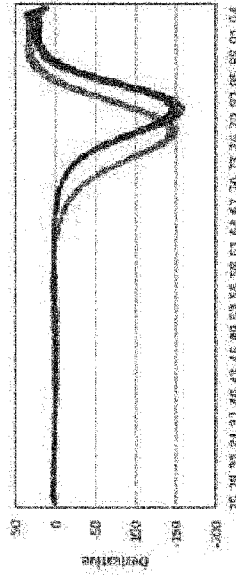
Temperature (°C)

- Kanamycin	77.6 °C
+ Kanamycin	80.0 °C
	2.4 °C

SV-NL\_Cy5/BHQ2



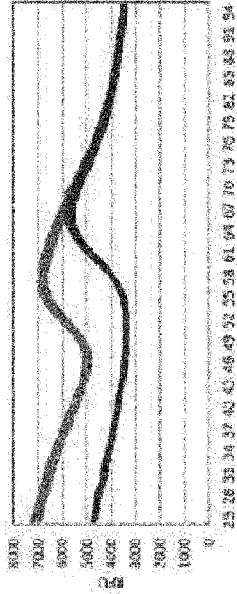
Temperature (°C)



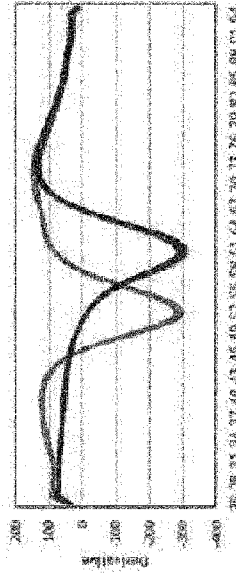
Temperature (°C)

- Kanamycin	77.3 °C
+ Kanamycin	80.4 °C
	3.1 °C

SV-HL\_Cy5/BHQ2



Temperature (°C)



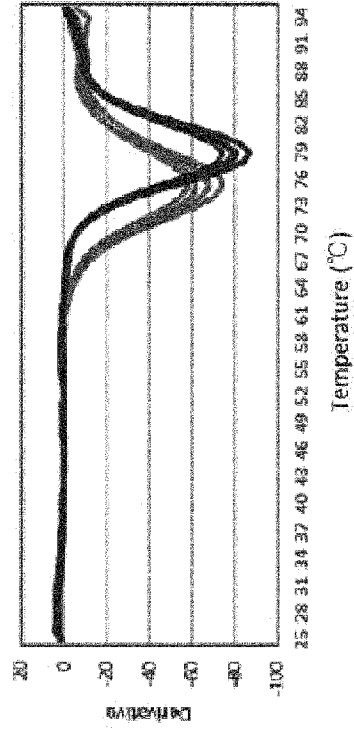
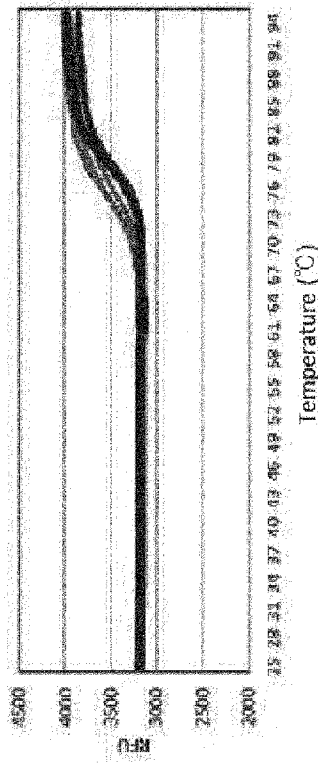
Temperature (°C)

- Kanamycin	52.1 °C
+ Kanamycin	60.3 °C
	8.2 °C

[図4]

灰: - Kanamycin  
 黒: + Kanamycin

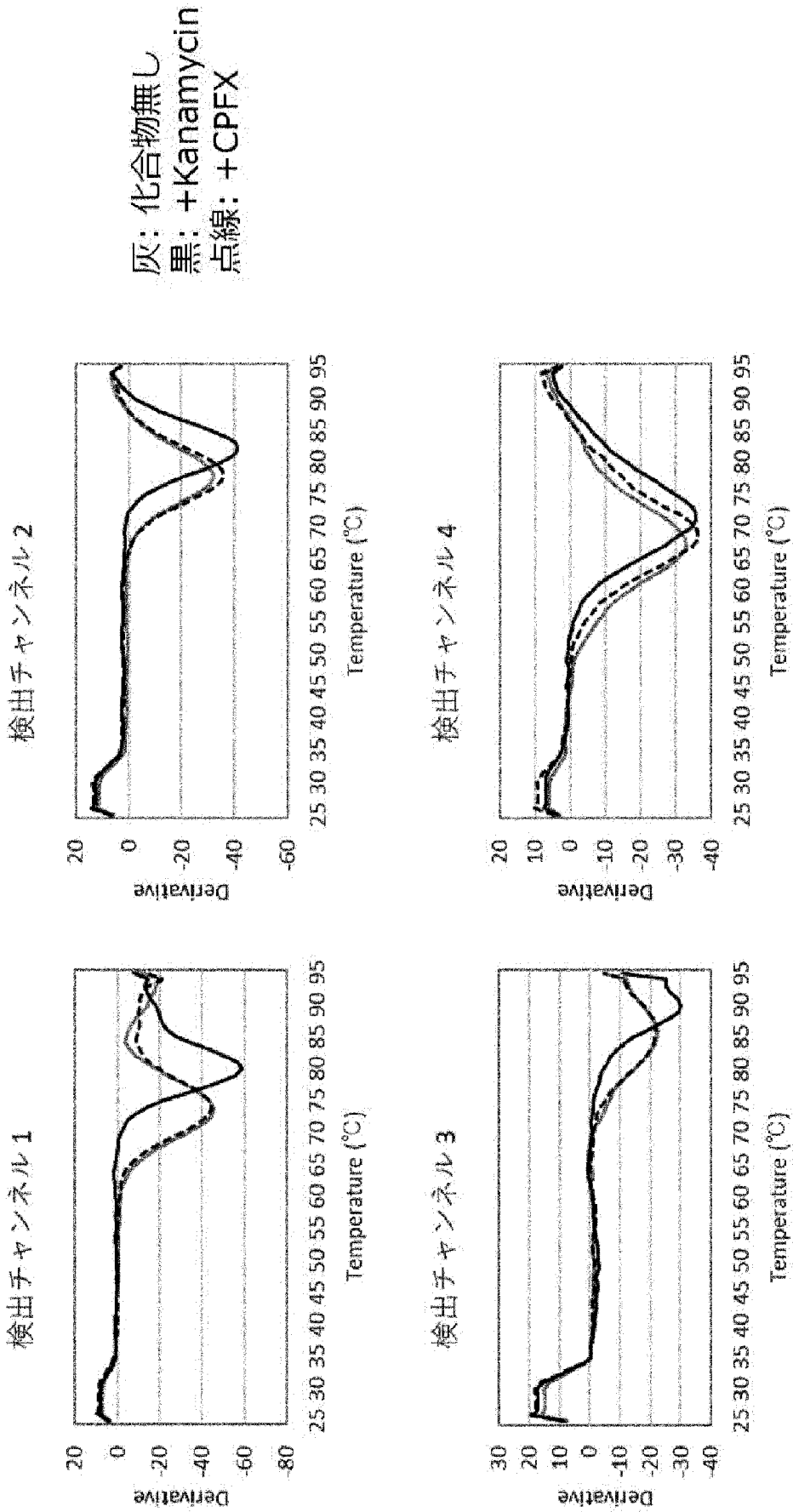
### SV-NL\_FAM/BHQ1



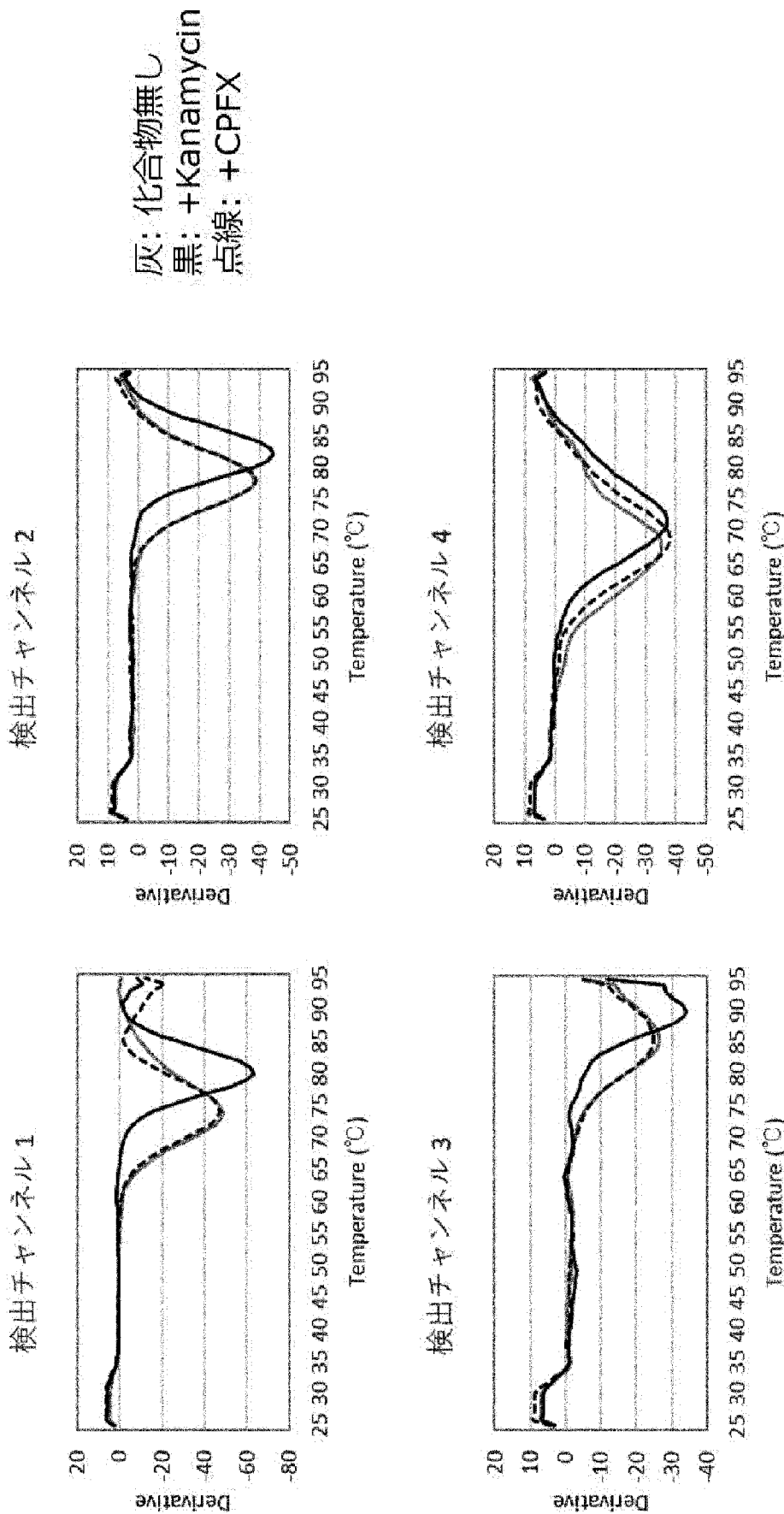
- Kanamycin	75.4 °C
+ Kanamycin	78.9 °C
	3.5 °C



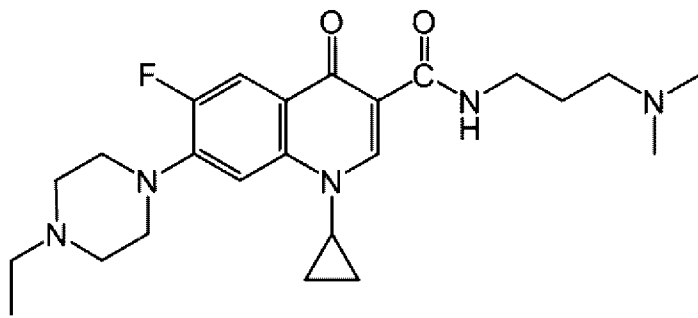
[図5]



[図6]



[図7]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/010571

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. C12Q1/6806(2018.01) i, C12Q1/6818(2018.01) i, G16B30/00(2019.01) i, C12N15/09(2006.01) n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC										
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12Q1/68-1/6897, G16B5/00-99/00, C12N15/00-15/90 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table style="width:100%; border: none;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Published examined utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">1922-1996</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Published unexamined utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">1971-2019</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Registered utility model specifications of Japan</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">1996-2019</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Published registered utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">1994-2019</td> </tr> </table> Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)			Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019	Registered utility model specifications of Japan	1996-2019	Published registered utility model applications of Japan	1994-2019
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996									
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019									
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019									
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019									
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>										
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.								
Y	WO 2006/054788 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 26 May 2006, claims 1-8, 10-12, page 40, lines 17-24, example 8 & US 2009/0019042 A1, claims 1-8, 10-12, paragraph [0085], example 8 & EP 1816191 A1 & CA 2587719 A & JP 6-54788 A1	1-21								
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <span style="margin-left: 200px;"><input type="checkbox"/> See patent family annex.</span>										
<table style="width:100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 2px;">                     * 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                 </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 2px;">                     "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                      "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                      "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art                      "&amp;" document member of the same patent family                 </td> </tr> </table>			* 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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family						
* 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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family									
Date of the actual completion of the international search 29 May 2019 (29.05.2019)	Date of mailing of the international search report 11 June 2019 (11.06.2019)									
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/JP2019/010571

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAMURA, Shingo, "A novel virtual spectrometry: Visualized regulatory motifs on ADM, rPol B and CD83 mRNAs in human-friendly manners", J. Biochem., 2009, vol. 146, pp. 251-261, page 252, left column, line 26 to page 256, right column, line 2, fig. 2-7	1-21
Y	WO 2008/072713 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 19 June 2008, claims, examples, fig. 1, 5-21 US 2010/0063745 A1, claims, examples, fig. 1, 5-21 & EP 2096567 A1 & CA 2672163 A & JP 8-72713 A1	1-21
Y	WO 2011/062166 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 26 May 2011, claims, examples (Family: none)	1-21
P, A	WO 2019/044974 A1 (VERITAS IN SILICO INC.) 07 March 2019 (Family: none)	1-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/010571

<Regarding the subject of the search>

Claim 6 includes the wording "method of any one of modes 2-5". However, in consideration of the previous statement, said wording of claim 6 is considered to be a typographical error for "method of any one of claims 2-5".

Thus, claim 6 and claims 7-21 referring thereto do not satisfy the requirements of clarity stipulated in PCT Article 6.

Thus, a search was carried out on the assumption that the wording "method of any one of modes 2-5" of claim 6 is "method of any one of claims 2-5".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/6806(2018.01)i, C12Q1/6818(2018.01)i, G16B30/00(2019.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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. C12Q1/68-1/6897, G16B5/00-99/00, C12N15/00-15/90

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	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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
Y	WO 2006/054788 A1 (武田薬品工業株式会社) 2006.05.26, 請求項1-8、10-12、第40頁第17-24行、実施例8 & US 2009/0019042 A1、Claims 1-8、10-12、[0085]、Example 8 & EP 1816191 A1 & CA 2587719 A & JP 6-54788 A1	1-21

C欄の続きにも文献が列挙されている。

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                                 | 「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     |
| 「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                         | 「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                     |
| 「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) | 「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 |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                      | 「&」 同一パテントファミリー文献                                                   |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                   |                                                                     |

国際調査を完了した日

29.05.2019

国際調査報告の発送日

11.06.2019

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)

西 賢二

4N

5803

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
Y	NAKAMURA, Shingo, A novel virtual spectrometry: Visualized regulatory motifs on ADM, rPol $\beta$ and CD83 mRNAs in human-friendly manners, J. Biochem., 2009, Vol. 146, pp. 251-261 第252頁左欄第26行—第256頁右欄第2行、図2—7	1-21
Y	WO 2008/072713 A1 (武田薬品工業株式会社) 2008.06.19, 請求の範囲、実施例、図1、5—21 US 2010/0063745 A1、C l a i m s、E x a m p l e s、F I G. 1、5—21 & EP 2096567 A1 & CA 2672163 A & JP 8-72713 A1	1-21
Y	WO 2011/062166 A1 (武田薬品工業株式会社) 2011.05.26, 請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-21
P, A	WO 2019/044974 A1 (株式会社 V e r i t a s I n S i l i c o) 2019.03.07, (ファミリーなし)	1-21



## 〈調査の対象について〉

請求項6には「態様2～5のいずれか一項記載の方法。」と記載されているが、それよりも前の記載からみて、請求項6の上記記載は「請求項2～5のいずれか一項記載の方法。」の誤記であると認められる。

したがって、請求項6及びそれを引用する請求項7-21は、PCT第6条に規定される明確性に関する要件を満たしていない。

よって、請求項6については、「態様2～5のいずれか一項記載の方法。」という記載を「請求項2～5のいずれか一項記載の方法。」と解して、調査を行った。