(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年8月8日(08.08.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/162360 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/11 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/002945

(22) 国際出願日： 2024年1月30日(30.01.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-013290 2023年1月31日(31.01.2023) JP

(71) 出願人：株式会社シンプロジェン(**SYNPLOGEN CO., LTD.**) [JP/JP]；〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目３番７ Hyogo (JP).

(72) 発明者：細田 直(**HOSODA, Nao**)；〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目３番７ 株式会社シンプロジェン内 Hyogo (JP). 林 謙太郎(**HAYASHI, Kentaro**)；〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目３番７ 株式会社シンプロジェン内 Hyogo (JP). 柘植 謙爾 (**TSUGE, Kenji**)；〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目３番７ 株式会社シンプロジェン内 Hyogo (JP).

(74) 代理人：鎌田 光宜，外(**KAMADA, Mitsunori** et al.)；〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル 高島国際特許事務所 Osaka (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)：ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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)）

WO 2024/162360 A1

(54) **Title:** ARTIFICIALLY SYNTHESIZED NUCLEIC ACID FOR INCREASING PROTEIN EXPRESSION

(54) 発明の名称： タンパク質の発現を増強するための人工合成核酸

(57) **Abstract:** The present disclosure provides a nucleic acid construct that can control protein expression. Specifically, the present disclosure provides a nucleic acid construct including a 5' untranslated region (UTR) and a 3' UTR that are at least partially complementary to one another, wherein when at least one UTR includes a non-complementary section and a complementary section with regard to the other UTR and the length of each non-complementary section is one base, the complementarity percentage of the 3' UTR to the 5' UTR is greater than 75%.

(57) 要約：本開示はタンパク質発現を制御することができる核酸構築物を提供する。詳細には、本開示は、互いに少なくとも部分的に相補的である５'非翻訳領域（ＵＴＲ）および３'ＵＴＲを含む核酸構築物であって、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該非相補部分の各々の長さがすべて１塩基である場合、該３'ＵＴＲの該５'ＵＴＲに対する相補率が７５％より高い、核酸構築物を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： タンパク質の発現を増強するための人工合成核酸

技術分野

[0001] 本開示は、タンパク質の発現を増強するための人工合成核酸を提供する。

背景技術

[0002] ｍＲＮＡ医薬は、ＣＯＶＩＤ－１９のワクチンやがんワクチン、疾患治療薬として重要なモダリティである。ｍＲＮＡを細胞内の送達することで有効成分であるタンパク質を発現させることで薬効を発揮する。核内に移行する必要はなく、ゲノムへの挿入リスクが低いことから安全性が高いと考えられている。

[0003] 翻訳効率を高めるためにコドン最適化や配列を最適化する技術が開発されている。目的のｍＲＮＡをコードするプラスミドを原料とし、直鎖化したのち、試験管内で転写、キャップの付加、ＤＮａｓｅでのテンプレートＤＮＡの除去が行われる。ポリＡ鎖を後から酵素的に付加する方法もある。また、ｍＲＮＡを環状化することによる翻訳促進機構が知られている。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0004] 本発明者らは、核酸構築物において、３’非翻訳領域と５’非翻訳領域との間の相補率および相補部分および非相補部分の特定のパターンにより、タンパク質発現を制御できることを新たに見出した。したがって、本開示は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含む核酸構築物であって、特定の相補パターンを有する核酸構築物を提供する。

[0005] したがって、本開示は、以下を提供する。

［項目Ｘ１］

互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含む核酸構築物であって、少なくとも一方のＵＴＲが、他方の

ＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該非相補部分の各々の長さがすべて１塩基の置換である場合、該３’ＵＴＲの該５’ＵＴＲに対する相補率が７５％より高い、核酸構築物。

［項目Ｘ２］

非相補部分の塩基が置換または除去されたものである、上記項目に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ２Ａ］

前記非相補部分がすべて置換である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ２Ｂ］

前記非相補部分がすべて置換であり、かつ、各々の長さがすべて１塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ２Ｃ］

前記非相補部分がすべて除去である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ３］

該非相補部分の少なくとも１つが２塩基以上の長さのものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ４］

少なくとも１つの前記非相補部分の長さがいずれも２塩基または３塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ５］

少なくとも１つの前記相補部分の長さが５塩基以上である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ６］

少なくとも１つの前記相補部分の長さが５～１１塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ７］

前記非相補部分の長さが２塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して５～７塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ８］

前記非相補部分の長さが３塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して８～１１塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ９］

前記非相補部分の各々の長さがすべて１塩基以上であり、前記相補率が７５％より高い、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１０］

前記相補率が、８０％～９０％である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１１］

前記相補率が、８１％～８９％である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１２］

少なくとも１つの前記非相補部分が１塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１３］

前記相補部分の長さがそれぞれ独立して３～１１塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１４］

前記非相補部分が１塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して３～７塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１５］

前記非相補部分の長さが２塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して５～７塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１６］

前記非相補部分の長さが３塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独

立して８～１１塩基である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１７］

互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含む核酸構築物であって、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、前記非相補部分と前記相補部分とが交互に存在することを特徴とする、核酸構築物。

［項目Ｘ１７Ａ］

前記交互に存在する部分以外の部分（端数部分（４）ともいう。）は１塩基以上相補部分の塩基長以下であることを特徴とする、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１７Ｂ］

前記非相補部分（２）が１塩基の場合、前記相補部分（３）は塩基置換の場合３～６塩基長であり、塩基除去の場合、３～９塩基長である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１８］

前記非相補部分が２塩基の場合、前記相補部分（３）は塩基置換の場合５～７塩基長であり、塩基除去の場合５～１１塩基長である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１９］

前記非相補部分が３塩基の場合、前記相補部分は塩基置換の場合８～９塩基長であり、塩基除去の場合８～１１塩基長である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１９Ａ］

前記非相補部分（２）は２塩基もしくは３塩基がである、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１９Ｂ］

前記非相補部分の各々の長さがすべて１塩基以上であり、相補率が７５％より高い、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１９Ｃ］

前記相補率が、８０％～９０％である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ１９Ｄ］

前記相補率が、８１％～８９％である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ２０］

前記５’ＵＴＲまたは前記３’ＵＴＲのいずれか一方が、非相補部分を含まない、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ２１］

自由エネルギー変化（ΔＧ）が所定値またはその範囲である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ２２］

前記所定値またはその範囲が、自由エネルギー変化（ΔＧ）の最大値および最小値の平均値に対する増加率０％～６０％の範囲の自由エネルギー変化の値またはその範囲である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ２３］

前記所定値またはその範囲が、自由エネルギー変化（ΔＧ）の最大値および最小値の平均値に対する増加率１０％～５０％の範囲の自由エネルギー変化の値またはその範囲である、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

［項目Ｘ２４］

核酸構築物を製造する方法であって、該核酸構築物は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含み、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該方法は、複数の候補核酸構築物を設計する工程、設計した該複数の候補核酸構築物について自由エネルギー変化（ΔＧ）を計算する工程、自由エネルギー変化（ΔＧ）が所定値またはその範囲である候補核酸構築物

を選択する工程、および必要に応じて、選択された該候補核酸構築物の細胞における発現量を測定する工程を含む、方法。

［項目Ｘ２５］

核酸構築物を製造する方法であって、該核酸構築物は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含み、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該方法は、複数の候補核酸構築物を設計する工程、設計した該複数の候補核酸構築物について自由エネルギー変化（ΔＧ）を計算する工程、自由エネルギー変化（ΔＧ）の最大値および最小値の平均値に対する増加率０％～６０％の範囲の自由エネルギー変化の値をもつ候補核酸構築物を選択する工程、および必要に応じて、選択された該候補核酸構築物の細胞における発現量を測定する工程を含む、方法。

［項目Ｘ２６］

前記平均値に対する増加率が１０％～５０％である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

［項目Ｘ２７］

上記項目のいずれか一項のいずれか一項に記載の方法に従って製造された、上記項目のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[0006] また、本開示は、以下をも提供する。

（項目１）

互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含む核酸構築物であって、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該非相補部分の各々の長さがすべて１塩基である場合、該３’ＵＴＲの該５’ＵＴＲに対する相補率が７５％より高い、核酸構築物。

（項目２）

該非相補部分の少なくとも１つが２塩基以上の長さのものを含む、項目１に記載の核酸構築物。

（項目３）

少なくとも１つの前記非相補部分の長さがいずれも２塩基または３塩基である、項目１または２に記載の核酸構築物。

（項目４）

少なくとも１つの前記相補部分の長さが５塩基以上である、項目１～３のいずれか一項に記載の核酸構築物。

（項目５）

少なくとも１つの前記相補部分の長さが５～１１塩基である、項目１～３のいずれか一項に記載の核酸構築物。

（項目６）

前記非相補部分の長さが２塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して５～７塩基である、項目１に記載の核酸構築物。

（項目７）

前記非相補部分の長さが３塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して８～１１塩基である、項目１に記載の核酸構築物。

（項目８）

前記非相補部分の各々の長さがすべて１塩基以上であり、前記相補率が７５％より高い、項目１に記載の核酸構築物。

（項目９）

前記相補率が、８０％～９０％である、項目８に記載の核酸構築物。

（項目１０）

前記相補率が、８１％～８９％である、項目８に記載の核酸構築物。

（項目１１）

少なくとも１つの前記非相補部分が１塩基である、項目７に記載の核酸構築物。

（項目１２）

前記相補部分の長さがそれぞれ独立して３～１１塩基である、項目８～１１のいずれか一項に記載の核酸構築物。

（項目１３）

前記非相補部分が１塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して３～７塩基である、項目８に記載の核酸構築物。

（項目１４）

前記非相補部分の長さが２塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して５～７塩基である、項目８に記載の核酸構築物。

（項目１５）

前記非相補部分の長さが３塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して８～１１塩基である、項目８に記載の核酸構築物。

（項目１６）

前記５’ＵＴＲまたは前記３’ＵＴＲのいずれか一方が、非相補部分を含まない、項目１に記載の核酸構築物。

（項目１７）

自由エネルギー変化（ΔＧ）が所定値またはその範囲である、項目１～１６のいずれか一項に記載の核酸構築物。

（項目１８）

前記所定値またはその範囲が、自由エネルギー変化（ΔＧ）の最大値および最小値の平均値に対する増加率０％～６０％の範囲の自由エネルギー変化の値またはその範囲である、項目１７に記載の核酸構築物。

（項目１９）

前記所定値またはその範囲が、自由エネルギー変化（ΔＧ）の最大値および最小値の平均値に対する増加率１０％～５０％の範囲の自由エネルギー変化の値またはその範囲である、項目１７に記載の核酸構築物。

（項目２０）

核酸構築物を製造する方法であって、該核酸構築物は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含み、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該方法は、複数の候補核酸構築物を設計する工程、設計した該複数

の候補核酸構築物について自由エネルギー変化（ΔＧ）を計算する工程、自由エネルギー変化（ΔＧ）が所定値またはその範囲である候補核酸構築物を選択する工程、および必要に応じて、選択された該候補核酸構築物の細胞における発現量を測定する工程を含む、方法。

（項目２１）

核酸構築物を製造する方法であって、該核酸構築物は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含み、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該方法は、複数の候補核酸構築物を設計する工程、設計した該複数の候補核酸構築物について自由エネルギー変化（ΔＧ）を計算する工程、自由エネルギー変化（ΔＧ）の最大値および最小値の平均値に対する増加率０％～６０％の範囲の自由エネルギー変化の値をもつ候補核酸構築物を選択する工程、および必要に応じて、選択された該候補核酸構築物の細胞における発現量を測定する工程を含む、方法。

（項目２２）

前記平均値に対する増加率が１０％～５０％である、項目２１に記載の方法。

（項目２３）

項目２０～２２のいずれか一項に記載の方法に従って製造された、項目１～１９のいずれか一項に記載の核酸構築物。

発明の効果

[0007] 本開示の核酸構築物は、従来の核酸構築物と比べてタンパク質の高い発現量を示す改善された核酸構築物である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図１は、５’ＵＴＲがＧＡＰＤＨ遺伝子配列（図左）、ファイザー配列（Messenger RNA encoding the full-length SARS-CoV-2 spike glycoprotein Sept. 2020 document 11889；第19回厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会　資料（https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000192554

_00004.html）を参照のこと。）（図中央）、ＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子配列（図右）とするｍＲＮＡの発現レベルを検証した結果を示している。いずれも比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図2]図２は、５’ＵＴＲはＧＡＰＤＨ遺伝子配列、３’ＵＴＲはこの５’ＵＴＲと１００％、９４％、もしくは７５％の相補率をもつ配列とするｍＲＮＡの発現レベルを検証した結果を示している。図左上はｍＲＮＡ構造を模式的に示している。図左下は、５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲの塩基配列を示しおり、各配列において、上段は５’ＵＴＲ配列を５’末端が左になるように、下段は３’ＵＴＲ配列を５’末端が右になるように記載している。ＯＲＦの記載は省略している。５’ＵＴＲと３’ＵＴＲが相補する塩基を囲っている。図右は、各ｍＲＮＡについて２９３細胞における発現レベルを検証した結果を示すグラフである。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図3]図３は、５’ＵＴＲはＧＡＰＤＨ遺伝子配列とし、３’ＵＴＲはこの５’ＵＴＲと部分的に相補となるｍＲＮＡ各種の５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲの塩基配列を示している。非相補部分の塩基数毎に類別して示している。各配列において、上段は５’ＵＴＲ配列を５’末端が左になるように、下段は３’ＵＴＲ配列を５’末端が右になるように記載している。ＯＲＦの記載は省略している。５’ＵＴＲと３’ＵＴＲが相補する塩基を囲っている。

[図4]図４は、５’ＵＴＲとしてＧＡＰＤＨ遺伝子配列、３’ＵＴＲとしてこ

の５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した結果を示すグラフである（左）。右図は、左図について相対発現量（Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率）に対して相補率の分布を示したものである。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図5]図５は、５’ＵＴＲはファイザー配列とし、３’ＵＴＲはこの５’ＵＴＲと部分的に相補となるｍＲＮＡ各種の５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲの塩基配列を示している。非相補部分の塩基数毎に類別して示している。各配列において、上段は５’ＵＴＲ配列を５’末端が左になるように、下段は３’ＵＴＲ配列を５’末端が右になるように記載している。ＯＲＦの記載は省略している。５’ＵＴＲと３’ＵＴＲが相補する塩基を囲っている。

[図6]図６は、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した結果を示すグラフである。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図7]図７は、５’ＵＴＲはＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子配列とし、３’ＵＴＲはこの５’ＵＴＲと部分的に相補となるｍＲＮＡ各種の５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲの塩基配列を示している。非相補部分の塩基数毎に類別して示している。各配列において、上段は５’ＵＴＲ配列を５’末端が左になるように、下段は３’ＵＴＲ配列を５’末端が右になるように記載している。ＯＲＦの記

載は省略している。５’ＵＴＲと３’ＵＴＲが相補する塩基を囲っている。

[図8]図８は、５’ＵＴＲとしてＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した結果を示すグラフである。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図9]図９は、５’ＵＴＲはＧＡＰＤＨ遺伝子配列とし、３’ＵＴＲはこの５’ＵＴＲと部分的に相補となるｍＲＮＡ各種の５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲの塩基配列を示している。相補率が高い順に示している。各配列において、上段は５’ＵＴＲ配列を５’末端が左になるように、下段は３’ＵＴＲ配列を５’末端が右になるように記載している。ＯＲＦの記載は省略している。５’ＵＴＲと３’ＵＴＲが相補する塩基を囲いで示している。

[図10]図１０は、５’ＵＴＲとしてＧＡＰＤＨ遺伝子配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した結果を示している。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。縦軸をこの相対発現量、横軸を各ｍＲＮＡの相補率とし、散布図として示している。各ｍＲＮＡに対して３サンプルの測定を行いその平均値をプロットで示している。さらにこれら測定値の標準偏差を算出しプロット上においてエラーバーとして示している。５’ＵＴＲがＧＡＰＤＨ遺伝子配列のｍＲＮＡを黒プロット、ファイザー配列のｍＲＮＡを白プロットで示している。発現量が最大となるｍＲＮＡの相補率は７５％～８０％であった。

[図11]図１１は、３’ＵＴＲが５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつｍＲＮＡ

について、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの相互作用における自由エネルギー変化と各ｍＲＮＡの発現レベルの相関を示している。発現レベルは５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを１として算出した。自由エネルギー変化は２次構造予測プログラムＭｆｏｌｄにより求めた(Michael Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1;31(13):3406-15)。図左、中央、右に、５’ＵＴＲがそれぞれＧＡＰＤＨ遺伝子、ＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子、ファイザー配列のときの結果を示している。各５’ＵＴＲについて、得られた実測値をシグモイド曲線のひとつである４係数ロジスティック曲線ｙ＝ｄ＋（ａ－ｄ）／（１＋（ｘ／ｃ）＾ｂ）にそれぞれフィッティングし、係数ａ、ｂ、ｃ、ｄおよび相関係数を求めた。係数ｃの値がシグモイド曲線上で変曲点となる自由エネルギー変化の値である。グラフ内、各ｍＲＮＡについて複数サンプルの測定を行いその平均値をプロットで、得られたシグモイド曲線を実線で、変曲点となる自由エネルギー変化の値を点線で示している。

[図12]図１２は、最大発現レベルとなるｍＲＮＡにおいて、該当ｍＲＮＡの５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの相互作用における自由エネルギー変化がとりうる値を示している。図左、中央、右に、５’ＵＴＲがそれぞれＧＡＰＤＨ遺伝子、ＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子、ファイザー配列のときの結果を示している。自由エネルギー変化の最小値は、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの相補率が１００％となるｍＲＮＡについて自由エネルギー変化をＭｆｏｌｄにより求めた値とした。自由エネルギー変化の最大値は、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの相補率が１００％となる３’ＵＴＲの全塩基に対して、５’ＵＴＲとミスマッチとなるよう塩基置換を行ったｍＲＮＡについて、その自由エネルギー変化をＭｆｏｌｄにより求めた値とした。相対的な自由エネルギー変化の値は、変曲点からの増加率（右側シフト）を指標とし、変曲点となる値と最大値の差を１００％として算出した。変曲点からの増加率が１０％以上５０％以下の自由エネルギー変化値となるｍＲＮＡにおいて、その発現レベルが最大となった

。

[図13]図１３は、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲ配列からのｍＲＮＡの発現レベルを予測する方法を示している。自由エネルギー変化の最大値と最小値は、図１２と同様に求めた。この自由エネルギーの最大値と最小値の平均値が、シグモイド曲線の変曲点となる自由エネルギー変化の値と一致することを見出した。この平均値をもちいることで、誤差４．９ｋｃａｌ／ｍｏｌ以下もしくは１３．１％以下の精度で、変曲点を予測することができた。この誤差パーセントは、図１２と同様に、変曲点となる値と自由エネルギー変化最大値の差を１００％として算出している。この変曲点の予測に基づき、発現レベルが最大となるｍＲＮＡにおける５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの相互作用の自由エネルギー変化が予測できる。

[図14]図１４は、本開示の核酸構築物の模式図を示す。

[図15]図１５は、図６で用いたｍＲＮＡについて、筋芽細胞株Ｃ２Ｃ１２における発現レベルを検証した結果を示すグラフである。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図16]図１６は、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列、ＯＲＦとしてＳＡＲＳ　ＣｏＶ２　Ｓｐｉｋｅ、Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ融合タンパク質とするｍＲＮＡについて、２９３細胞におけるいて発現レベルを検証した結果を示すグラフである。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図17A]図１７は非相補部分の設計方法に関する置換と除去の概念を模式図化したものである。図１７は図１７Ａおよび図１７Ｂに示す。図１７（１）は

、相補配列においてその塩基を置換することにより非相補配列に変換したｍＲＮＡの模式図を示している。図１７（２）は、相補配列においてその塩基を除去することにより非相補配列に変換したｍＲＮＡの模式図を示している。図１７（３）相補配列において５’ＵＴＲ上の塩基を除去することにより非相補配列に変換したｍＲＮＡの模式図を示している。図１７（４）は相補配列においてその塩基を置換することにより非相補配列に変換した場合と、除去することにより非相補配列に変換した場合が混在するｍＲＮＡの模式図を示している。図１７（４－１）は３’ＵＴＲ上のみにおいて、図１７（４－２）は５’ＵＴＲ上のみにおいて、図１７（４－３）は５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ上いずれにおいて、上記塩基除去と塩基置換が混在しているｍＲＮＡの模式図を示している。

[図17B]図１７Ｂは図１７Ａの続きである。図１７（５）は３’ＵＴＲ上に塩基を追加することにより非相補配列に変換したｍＲＮＡの模式図を示している。図１７（６）は５’ＵＴＲ上に塩基を追加することにより非相補配列に変換したｍＲＮＡの模式図を示している。

[図18A]図１８は、図１８Ａ～Ｃに分けて示し、図１７で示した模式図の（２）～（６）について、具体的な５’ＵＴＲはファイザー配列とし、３’ＵＴＲはこの５’ＵＴＲと部分的に相補となるｍＲＮＡ各種の５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲの塩基配列を示している。図１８（２）は３’ＵＴＲにおいてその塩基を除去することにより非相補配列に変換したｍＲＮＡについて、非相補部分の塩基数毎に類別して示している。

[図18B]図１８Ｂは図１８Ａの続きである。図１８（３）は５’ＵＴＲにおいてその塩基を除去することにより非相補配列に変換したｍＲＮＡを示している。図１８（４）は相補配列においてその塩基を置換することにより非相補配列に変換した場合と、除去することにより非相補配列に変換した場合が混在するｍＲＮＡを示している。図１８（４－１）は３’ＵＴＲ上のみにおいて、図１８（４－２）は５’ＵＴＲ上のみにおいて、図１８（４－３）は５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ上いずれにおいて、上記塩基除去と塩基置換が混在し

ているｍＲＮＡを示している。

[図18C]図１８Ｃは図１８Ｂの続きである。図１８（５）は３’ＵＴＲにおいて塩基を追加することにより非相補配列を作出したｍＲＮＡについて、非相補部分が１塩基、２塩基、３塩基の場合のｍＲＮＡを示している。図１８（６）は５’ＵＴＲにおいて塩基を追加することにより非相補配列を作出したｍＲＮＡについて、非相補部分が１塩基、２塩基、３塩基の場合のｍＲＮＡを示している。各配列において、上段は５’ＵＴＲ配列を５’末端が左になるように、下段は３’ＵＴＲ配列を５’末端が右になるように記載している。下段において－で示している塩基は、相補配列においてその塩基を除去することにより非相補配列に変換した塩基であることを示している。ＯＲＦの記載は省略している。５’ＵＴＲと３’ＵＴＲが相補する塩基を囲っている。

[図19]図１９は、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した結果を示すグラフである。これら３’ＵＴＲにおいては、塩基を除去することにより非相補配列としている。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図20]図２０は、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもちかつ非相補部分が３塩基の各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した結果を示すグラフである。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図21]図２１は、図１９で用いたｍＲＮＡについて、筋芽細胞株Ｃ２Ｃ１２におけるいて発現レベルを検証した結果を示すグラフである。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図22]図２２は、図２０で用いたｍＲＮＡについて、筋芽細胞株Ｃ２Ｃ１２において発現レベルを検証した結果を示すグラフである。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図23]図２３は、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列、ＯＲＦとしてＳＡＲＳ　ＣｏＶ２　Ｓｐｉｋｅ、Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ融合タンパク質とするｍＲＮＡについて、２９３細胞におけるいて発現レベルを検証した結果を示すグラフである。これら３’ＵＴＲにおいては、塩基を除去することにより非相補配列としている。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。

[図24]図２４は、５’ＵＴＲはファイザー配列とし、３’ＵＴＲはこの５’ＵＴＲと部分的に相補となるｍＲＮＡ各種の５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲの塩基配列を示している。図２４（１）は非相補部分の塩基数が５’ＵＴＲと３’ＵＴＲにおいて同じである場合を、図２４（２）は非相補部分の塩基数が５’ＵＴＲと３’ＵＴＲにおいて異なる場合を示している。各配列において、上段は５’ＵＴＲ配列を５’末端が左になるように、下段は３’ＵＴＲ配列を５’末端が右になるように記載している。下段において－で示してい

る塩基は、相補配列においてその塩基を除去することにより非相補配列に変換した塩基であることを示している。ＯＲＦの記載は省略している。５’ＵＴＲと３’ＵＴＲが相補する塩基を囲っている。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本開示を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「ａ」、「ａｎ」、「ｔｈｅ」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0010] 以下に本明細書において特に使用される用語の定義および／または基本的技術内容を適宜説明する。

[0011] 本明細書において、「約」は、示された値プラスまたはマイナス１０％を指す。

[0012] 本明細書において、用語「非翻訳領域（ＵＴＲ）」とは、タンパク質をコードする部分を含むｍＲＮＡ等の核酸において、タンパク質に翻訳されるコード領域の前後に存在するタンパク質に翻訳されない領域を指す。核酸の５’側に存在するＵＴＲを５’ＵＴＲ、３’側に存在するＵＴＲを３’ＵＴＲという。

[0013] 本明細書において、用語（互いに）「相補的」または「相補性」とは、核酸の塩基配列において、アデニンとチミンまたはウラシル、グアニンとシトシンまたはウラシル（ゆらぎ塩基対）とが特異的に対合することを指す。「非相補部分」とは、塩基配列において、相補的ではない部分を指し、「相補部分」とは、塩基配列において、相補的である部分を指す。本明細書では相

補部分および非相補部分は１塩基単位で特定され得る。「非相補部分の各々の長さがすべて１塩基」であるとは、対象となる核酸の部分において、相補部分と非相補部分とを特定した場合に、非相補部分が単数の場合は、それが１塩基の長さであり、複数ある場合は、その複数あるすべての非相補部分の長さがいずれも１塩基であることをいう。また、非相補部分においては、５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲのいずれか一方が、０塩基であり得る。この場合、本明細書において「除去」ということがある（他方側からみると、「追加」とも称することができるが、本明細書では特に断らない限り「除去」を採用し、広義には「除去」は狭義の除去と追加を含むと理解される。）。また、非相補部分において、５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲに１塩基以上の非相補的な塩基が存在する場合は「置換」と称することがある。なお、非相補部分において、一方の側の塩基数と他方の側の塩基数が異なる場合、同数の部分は「置換」に該当し、異なる数の部分は、多いほうの側の塩基に対して少ないほうの側が「除去」に該当する。例えば、

５’－ＮＮＮＡＧＮＮＮ

３’－ＮＮＮＡＯＮＮＮ

（Ｎは相補鎖、Ｏは塩基なし）

のような場合、５‘側のＡに対してＵＡは、相補鎖であればＵであるところの置換であるが、５’側のＧに対してＯは除去に該当する。

[0014] また、

５’－ＮＮＮＡＧＮＮＮＵＯＮＮＮ

３’－ＮＮＮＡＯＮＮＮＵＧＮＮＮ

のような場合、５’側のＡＧ部分は、上記と同様であるが、ＵＯに対応する部分は、Ｇは「追加」とみることもできるが、本明細書では、広義には、「除去」と記載することがある。

[0015] なお、本明細書では特に断らない限り、除去、置換、追加は、５’側から順番に核酸を比較して判断することとする。

[0016] 本明細書において「部分的に相補的」とは、対象となる塩基配列のうち、

少なくとも一部（好ましくは、２塩基以上）にわたり、相補的であることをいう。好ましい相補部分の塩基数は、３塩基以上であり、かつ１１塩基以下である。

[0017] 本明細書において、用語「核酸構築物」とは、少なくとも一部が核酸から構成される構築物を言い、代表的に組換えＤＮＡ技術の使用の結果生じる（非天然の）核酸分子（例えば組換え核酸）を指す。代表的に、核酸構築物は、天然では見られない様式で組み合わされ配置されている核酸配列のセグメントを含有するように修飾されている、一本鎖または二本鎖の核酸分子である。核酸構築物は、「ベクター」（例えば、プラスミド、ｒＡＡＶベクターゲノム、発現ベクターなど）、すなわち、外因的に生成されたＤＮＡを宿主細胞に送達するように設計された核酸分子であり得る。

[0018] 本明細書において、用語「相補率（％）」とは、基準配列の相補配列の塩基配列に対する一本鎖核酸の塩基配列の一致率を指す。相補率は、基準配列の長さを基準に計算される。基準配列の相補配列と一本鎖核酸の塩基配列が完全に一致する場合、相補率は１００％である。本開示における非相補領域を除去した実施形態においては、非相補領域が存在していると仮定して、上記一致率が算出される。 本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、天然または人工的に改変されたポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）が包含される。アミノ酸は、本開示において、一般に知られている三文字記号又はＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名委員会（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎ）によって推奨される一文字記号で表される場合がある。同様に、ヌクレオチドは、一般に受け入れられて

いる一文字コードによって表される場合がある。なお、本明細書では、ヌクレオチドの表示は、配列表の規則に従うため、ＲＮＡの場合でもＴと表示することがあるが、当業者はＴとの表示がＲＮＡの場合にはＵを意味するものと理解する。

[0019] 本明細書において「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。核酸の例として、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ＩｎｃＲＮＡが挙げられる。この用語はまた、「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチド誘導体を含むか、またはヌクレオチド間結合が通常とは異なるポリヌクレオチドをいう。「ヌクレオチド誘導体」とは、天然のＤＮＡまたはＲＮＡにおいて使用される通常のヌクレオチドとは異なる構造を有するヌクレオチドをいい、例えば、ロックト核酸（ＬＮＡ）、２’－Ｏ，４’－Ｃ－エチレン架橋核酸(2’-O,4’-C-ethylene bridged nucleic acid、ENA)などのエチレン核酸、その他の架橋核酸（bridged nucleic acid、BNA)、ヘキシトール核酸（hexitol nucleic acid、HNA）、アミド架橋核酸（Amido-bridged nucleic acid、AmNA）、モルホリノ核酸、トリシクロ-DNA（tcDNA）、ポリエーテル核酸（例えば、米国特許第5,908,845号参照）、シクロヘキセン核酸（CeNA）などが挙げられる。ヌクレオチド間結合が通常とは異なる例として、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド間結合、リン酸ジエステル結合がＮ３’－Ｐ５’ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド間結合、リボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド間結合などが挙げられる。

[0020] 本明細書において「遺伝子」とは、一定の生物学的機能を果たす核酸部分を指す。この生物学的機能として、ポリペプチドまたはタンパク質をコードすること、タンパク質非コード機能性ＲＮＡ（ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ＩｎｃＲＮＡなど）をコードすること、ポリペプ

チド、タンパク質またはタンパク質非コード機能性ＲＮＡの生産を制御すること、特定のタンパク質に特異的に結合されること、核酸の切断または複製を制御することが挙げられる。

[0021] 本明細書において「キット」とは、通常２つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分（例えば、核酸構築物、説明書など）が提供されるユニットをいう。安定性等のため、混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分をどのように使用するか、あるいは、試薬をどのように処理すべきかを記載する指示書または説明書を備えていることが有利である。本明細書においてキットが試薬キットとして使用される場合、キットには、通常、核酸構築物等の使い方などを記載した指示書などが含まれる。

[0022] 本明細書において「指示書」は、本開示を使用する方法を使用者に対して説明したものである。この指示書は、本開示の核酸構築物の使用方法を指示する文言が記載されている。この指示書は、通常は紙媒体で提供され得るが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

[0023] 本明細書において「（ギブスの）自由エネルギー変化（ΔＧ）」は、熱力学的また統計力学的に以下の式（１）および（２）で記述される。

[0024] ΔＧ＝ΔＨ－ＴΔＳ （１）

ΔＧ＝ΔＧ° ＋ＲＴｌｎＫ （２）

ここで、Ｋは平衡定数、ΔＧ°は標準状態（１ ａｔｍ、２５℃）のギブズの自由エネルギー変化量とする。核酸の平衡定数を考える場合、二つの鎖ＡとＢ（例えば、３’ＵＴＲおよび５’ＵＴＲ）が１：１で会合する平衡反応として記述できる（式（３））。

[0025] Ａ＋Ｂ⇔ＡＢ （３）

二本鎖の状態モル分率をα、核酸の全濃度をＣとすると、完全解離したときのＡおよびＢの濃度［Ａ］、［Ｂ］はＣ／２になるため、平衡定数は以下

の式（４）で表すことができる。

[0026] Ｋ＝２α／（（１－α）^{2}×Ｃ） （４）

核酸が５０％乖離した平衡状態であるとき、

α＝１／２、ΔＧ＝０ （５）

となるため、式（２）に式（４）および（５）を代入すると、

ΔＧ°＝－ＲＴｍｌｎ（４／Ｃ） （６）

となる。

式（１）に式（６）を代入することで、以下の式（７）が得られる。

[0027] １／Ｔｍ＝（Ｒ／ΔＨ°）ｌｎ（Ｃｔ／４）＋ΔＳ°／ΔＨ° （７）

１／Ｔｍとｌｎ（Ｃ／４）の２つの関数として測定値をプロットすると、切片と傾きから標準状態のエンタルピー変化量ΔＨ°およびエントロピー変化量ΔＳ°が求められる。

[0028] （好ましい実施形態）

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

[0029] 一態様において、本開示は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含む核酸構築物であって、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該非相補部分の各々の長さがすべて１塩基である場合、該３’ＵＴＲの該５’ＵＴＲに対する相補率が７５％より高い、核酸構築物を提供する。本開示の核酸構築物は、タンパク質発現を制御することができる。好ましくは、本開示の核酸構築物は、タンパク質発現を増加させることができる。

[0030] いくつかの実施形態において、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも

７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個の非相補部分の長さがそれぞれ２塩基または３塩基であり得る。好ましい実施形態では、すべての非相補部分の長さが、２塩基または３塩基である。

[0031] 別の実施形態において、非相補部分の各々の長さがすべて１塩基であってもよく、この場合、３’ＵＴＲの５’ＵＴＲに対する相補率が７５％より高く、例えば、７５％より高く９０％以下、７５％より高く８９％以下、８０％以上９０％以下、８１％以上８９％以下であり得る。

[0032] いくつかの実施形態において、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個の相補部分の長さは、５塩基以上、例えば、５塩基、６塩基、７塩基、８塩基、９塩基、１０塩基、１１塩基、１２塩基、１３塩基、１５塩基、または２０塩基であり得る。好ましい実施形態において、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個の相補部分の長さは、５～１１塩基であり得る。相補部分の長さは、すべて同じであっても、異なっていてもよいが、すべて同じであるのが好ましい。

[0033] いくつかの実施形態において、非相補部分の長さが２塩基であり、相補部分の長さがそれぞれ独立して５～７塩基であり得る。

[0034] いくつかの実施形態において、非相補部分の長さが３塩基であり、相補部分の長さがそれぞれ独立して８～１１塩基であり得る。

[0035] 一つの実施形態において本開示は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含む核酸構築物であって、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分（２）および相補部分（３）を含み、前記非相補部分と前記相補部分とが交互に存在することを特徴とする。

[0036] 一つの実施形態において交互に存在する部分以外の部分（端数部分（４）ともいう。）は１塩基以上相補部分の塩基長以下であることを特徴とする。

[0037] 一つの実施形態において、非相補部分（２）が１塩基の場合、相補部分（３）は塩基置換の場合３～６塩基長であり、塩基除去の場合　３～９塩基長である。

[0038] 一つの実施形態において、前記非相補部分（２）が２塩基の場合、相補部分（３）は塩基置換の場合５～７塩基長であり、塩基除去の場合５～１１塩基長である。

[0039] 一つの実施形態において、相補部分（２）が３塩基の場合、相補部分（３）は塩基置換の場合８～９塩基長であり、塩基除去の場合８～１１塩基長である。

[0040] 一つの実施形態において非相補部分（２）は、０～３塩基が通常であり、２塩基もしくは３塩基が好ましい。

[0041] このように、置換・除去によって、適切な塩基長は、変動し得るが、本明細書の記載に基づいて当業者は適宜設計することができる。

[0042] 一つの実施形態において非相補部分（２）は、非翻訳領域中に、２種類上の長さが混在してもよい。この場合、上記好ましい塩基長は、少なくとも１つが満たすことが有利であり、すべてが満たすことが有利である。

[0043] 一つの実施形態において非相補部分（２）は、非翻訳領域中に、置換と除去が混在してもよい。この場合、この場合、上記好ましい塩基長は、少なくとも１つが満たすことが有利であり、すべてが満たすことが有利である。

[0044] いくつかの実施形態において、非相補部分の各々の長さがすべて２塩基または３塩基である場合、前記相補率は、少なくとも６０％以上、少なくとも６５％以上、少なくとも７０％以上、少なくとも７５％以上、少なくとも８０％以上、少なくとも８５％以上、少なくとも９０％以上であり得る。特定の実施形態において、非相補部分の各々の長さがすべて２塩基または３塩基である場合、相補率は、７５％より高く、例えば、７５％より高く９０％以下、７５％より高く８９％以下、８０％以上９０％以下、８１％以上８９％

以下であり得る。

[0045] 相補部分および非相補部分の長さは、所望の相補率に応じて適宜決定することができるが、典型的には、非相補部分の長さはそれぞれ独立して１～３塩基であり、相補部分の長さはそれぞれ独立して３～１１塩基であり得る。

[0046] 特定の実施形態において、非相補部分がすべて１塩基である場合、相補部分の長さがそれぞれ独立して３～７塩基であり得る。

[0047] 特定の実施形態において、非相補部分がすべて２塩基である場合、相補部分の長さがそれぞれ独立して５～７塩基であり得る。

[0048] 特定の実施形態において、非相補部分がすべて３塩基である場合、相補部分の長さがそれぞれ独立して８～１１塩基であり得る。

[0049] 特定の実施形態において、５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲのいずれか一方は、非相補部分が取り除かれていてもよい。

[0050] いくつかの実施形態において、ＵＴＲは、ＧＡＰＤＨ、ＨＳＤ１７Ｂ４、ＰＳＭＢ３、ＲＰＬ３１、ＲＰＬ３２、ＲＰＬ３５、ＲＰＬ２１、Ａｌｂｕｍｉｎ７、ＬＤＨＢ、ＡＣＡＴ２、ＡＴＰ５Ａ１、Ｎｄｕｆａ４、Ｍｐ６８、ＮＯＳＩＰ、ＳＬＣ７Ａ３、ＴＵＢＢ４Ｂ、ＵＢＱＬＮ２、ｍＲＰＬ３５Ａ、ｍＲＰＬ２１、ＡＩＧ１、ＣＯＸ６Ｃ、α－ｇｌｏｂｉｎ、β－ｇｌｏｂｉｎ、ＲＰＳ８、ＴＯＰ、ＭＣＰ－１、ＲＰＬ１２ｓ.ｃ.、Ａｎｇ－２、ＨＳＰ７０、Ｈ３．３．、Ｇａｌｅｃｔｉｎ－９、ＧＡＤＤ３４、ＥＤＮ１、ＨＳＰ７０ｍ５、Ｅ－ｓｅｌｅｃｔｉｎ、ＩＣＡＭ－１、ＩＬ－６、またはｖＷＦのＵＴＲから選択され得る。その他のＵＴＲの例は、特表2021-501572、特表2015-517803、および特開2022-164843に開示されている。

[0051] 別の態様において、本開示の核酸構築物はキットとして提供されてもよい。

[0052] さらなる態様において、本開示は、核酸構築物を製造する方法であって、核酸構築物は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含み、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、方法は、複数の候補核酸構築物

を設計する工程、設計した複数の候補核酸構築物の二次構造の自由エネルギー変化（ΔＧ）を計算する工程、自由エネルギー変化が所定値またはその範囲（例えば、最大値（ΔG_{max}）および最小値（ΔG_{min}）の平均値に対する増加率０％～６０％）である候補核酸構築物を選択する工程、および必要に応じて、選択された候補核酸構築物の細胞における発現量を測定する工程を含む、方法を提供する。

[0053] いくつかの実施形態において、自由エネルギー変化（ΔＧ（ｋｃａｌ／ｍｏｌ））は、核酸二次構造予測プログラム、例えば、ｍｆｏｌｄ（ＧＣＧ Ｓｏｆｔｗａｒｅ）、ＩＰｋｎｏｔ、CentroidFold (https://www.ncrna.org/)、ViennaRNA (http://rna.tbi.univie.ac.at/)、RNALOSS (P Clote, RNALOSS: a web server for RNA locally optimal secondary structures, Nucleic Acids Res. 2005 Jul 1; 33: W600-4.)、またはRNA Secondary structure prediction (http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html)によって計算され得る。

[0054] 自由エネルギー変化が所定値またはその範囲は、当業者であれば、実施例６および７を参照して、適宜決定することができる。具体的には、種々の相補率を有する核酸構築物を作製して、核酸構築物によるタンパク質発現量と自由エネルギー変化とを相関させることによって、発現量が最大となる自由エネルギー変化の所定値またはその範囲を決定することができる。

[0055] いくつかの実施形態において、本開示の核酸構築物の二次構造の自由エネルギーは、

$((\Delta G_{max}+\Delta G_{min})/2)\times t$

であり得る。ここで、ｔ＝０．９～１．７、好ましくはｔ＝１～１．６、最も好ましくはｔ＝１．１～１．５であり得る。

[0056] いくつかの実施形態において、自由エネルギー変化は、核酸構築物における３’ＵＴＲと５’ＵＴＲとの相互作用の自由エネルギー変化であり得る。

[0057] いくつかの実施形態において、自由エネルギー変化の最大値（ΔG_{max}）は、３’ＵＴＲまたは５’ＵＴＲ全塩基と、これの相補鎖においてミスマッチ

置換を行った５’ＵＴＲまたは３’ＵＴＲ配列（すなわち相補率０％の配列）との相互作用についての自由エネルギー変化であり、自由エネルギー変化の最小値（ΔG_{min}）は、５’－３’ＵＴＲ相補率１００％の配列の５’ＵＴＲと３’ＵＴＲとの相互作用についての自由エネルギー変化であり得る。

[0058] 特定の実施形態において、前記平均値に対する増加率は、０％～６０％であり、好ましくは１０％～５０％であり得る。

[0059] 本開示は、核酸技術の応用分野（例えば医薬）において応用され得る。例えば本開示の核酸構築物であるｍＲＮＡはｍＲＮＡ医薬の原薬として用いることもできる。また本開示の核酸構築物であるプラスミドＤＮＡはｍＲＮＡ原薬の製造に用いるセルバンクを作成するのに用いることができる。また、本開示の核酸構築物である直鎖状鋳型ＤＮＡは原材料としてｍＲＮＡ原薬の製造工程中に用いることもできる。

[0060] 本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも１つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「２つの値」の「範囲内」と明記した場合、その範囲には２つの値自体も含む。

[0061] 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

[0062] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0063] 試薬類は具体的には実施例中に記載した製品を使用したが、他メーカー（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、和光純薬、ナカライ、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、ＵＳＣＮ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ＩＮＣ等）の同等品でも代用可

能である。

[0064] （分子生物学実験操作）

一般的なＤＮＡ、ＲＮＡ、遺伝子組換えの実験操作については、標準プロトコル（Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989)）に従って行った。

[0065] （製造実施例）

（低融点アガロースゲルを用いたＤＮＡ断片の精製）

ＤＮＡ断片は、２－ヒドロキシエチルアガロース（シグマアルドリッチ）および１×ＴＡＥバッファー（ナカライ）を用い作製した０．７％の低融点アガロースゲルにより、電圧１００Ｖで１時間の電気泳動により分離した。泳動後のゲルは、ＧｅｌＲｅｄ　核酸ゲル染色液（富士フイルム和光純薬）を含む１×ＴＡＥバッファーにより３０分間染色し、長波長の紫外線（３６６ｎｍ）で可視化することにより、目的のＤＮＡ断片をアガロースゲルから回収した。ＤＮＡ断片を含むアガロースゲルは、Ｔｈｅｒｍｏｓｔａｂｌｅ β－Ａｇａｒａｓｅ（ニッポンジーン）存在下で、６３℃で５分間インキュベートしさらに６０℃で１０分間インキュベートすることにより溶解したのち、ＴＥ飽和フェノール（ナカライ）を添加し十分混合した。遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）によりフェノール相と水相に分離し、水相は新しいチューブに回収した。回収した水相は、１－ブタノールを添加し十分混合したのち遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）により１－ブタノール相と水相に分離し、分離した１－ブタノール相を除去する一連の操作を３回繰り返すことにより、フェノールを除去するとともに水相の体積を減少させた。この水相に３M酢酸カリウム－酢酸緩衝液（ｐＨ５．２）、エタノールを添加し十分混合したのち遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）することによりＤＮＡ断片を沈殿させた。沈殿したＤＮＡ断片は７０％エタノールで洗浄したのちＴＥバッファー（ナカライ）に溶解させた。

[0066] （合成オリゴヌクレオチドのアニーリング）

５μｌずつ混合した２種類の１００μM合成オリゴヌクレオチドを、ＴａＫａＲａ ＰＣＲ Ｔｈｅｒｍａｌ Ｃｙｃｌｅｒ Ｄｉｃｅ Ｔｏｕｃｈ（タカラバイオ）をもちいて９９℃１０秒間インキュベーションののち４０℃まで９０分間かけて徐々に冷却することにより、５０μMの２本鎖オリゴヌクレオチドを形成させた。この２本鎖オリゴヌクレオチドは蒸留水により０．５μMに希釈した。

[0067] （ライゲーション、大腸菌形質転換、プラスミド調製）

１～２０ｎｇ／μｌの制限酵素処理を行ったプラスミド溶液１μｌ、０．１～２０ｎｇ／μｌのＤＮＡ断片溶液１μｌもしくは０．５μMの２本鎖オリゴヌクレオチド溶液１μｌおよびＤＮＡ Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｋｉｔ ＜Ｍｉｇｈｔｙ Ｍｉｘ＞（タカラバイオ）２μｌを混合し、１６℃で１～４時間インキュベーションすることによりライゲーション反応を行った。この反応液１μｌと大腸菌ＪＭ１０９コンピテントセル（タカラバイオ）１０μｌを混合し、氷上に１時間静置後、４２℃の湯浴で１分間インキュベーションした。インキュベーション後の大腸菌は、氷上で２分静置後、ＳＯＣ培地を５０μｌ添加し、小型回転培養機ＲＴ－５０（タイテック）により回転速度３０ｒｐｍで３７℃１時間培養した。培養後の大腸菌は１０μｇ／ｍｌカルベニシリンを含むＬＢ培地寒天プレートに塗抹し３７℃で一晩培養した。寒天プレート上に形成した大腸菌コロニーは、１０μｇ／ｍｌカルベニシリンを含む２ｍｌのＬＢ液体培地に植菌し、中型恒温振とう培養機ＢＲ－５３ＦＰ（タイテック）により回転速度２２０ｒｐｍで３７℃下一晩振とう培養を行った。培養後の大腸菌は、遠心分離（２０，０００×ｇ、１分間）により回収し、ＱＩＡｐｒｅｐ Ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐ Ｋｉｔおよび核酸抽出精製装置ＱＩＡｃｕｂｅ（キアゲン）により製造元の使用説明書に従ってプラスミドを調製した。

[0068] （ＲＮＡ合成の鋳型となるプラスミドの構築）

Ｔ７プロモーター配列、コザック配列、終止コドンおよび１０１塩基長のポリＡ連続配列から構成されるＤＮＡ断片は、3’末端が一部相補となって

いる配列番号１、２に示す合成オリゴヌクレオチドをアニールさせその一本鎖部分をＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｖｅｒ.２（東洋紡）の５’から３’方向へのポリメラーゼ伸長反応により二本鎖とした産物を鋳型として、プライマーCommon-FとCommon-R（配列番号３、４）およびＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｖｅｒ.２を用いたＰＣＲにより増幅した。このＤＮＡ断片には、Ｔ７プロモーター配列とコザック配列の間に５’ＵＴＲを挿入するためのＢｓａＩサイト、コザック配列と終止コドンの間に翻訳領域（ＯＲＦ）を挿入するためのＢｓｐＱＩサイト、終止コドンとポリＡ配列の間に３’ＵＴＲを挿入するためのＰａｑＣＩサイトおよびポリＡ連続配列の下流に鋳型ＤＮＡ直鎖化のためのＢｓｍＢＩサイトを付加している。この増幅したＤＮＡ断片は、ＭｉｎＥｌｕｔｅ ＰＣＲ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（キアゲン）により精製したのち、pBR322_ΔtypeIISプラスミドのＸｃｍＩサイトに挿入することにより、pT7_TL_pA100プラスミド（配列番号１３５）を構築した。

[0069] 蛍光タンパク質Ｅ２ＣｒｉｍｓｏｎをコードするＤＮＡ断片は、３’末端が一部相補となっている配列番号５、６、配列番号７、８および配列番号９、１０の合成オリゴヌクレオチドをそれぞれアニールさせ、これら一本鎖部分をＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｖｅｒ.２（東洋紡）の５’から３’方向へのポリメラーゼ伸長反応により二本鎖とした産物を鋳型として、プライマーCommon-FとCommon-R（配列番号３、４）およびＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｖｅｒ.２を用いたPCRにより増幅した。増幅したＤＮＡ断片はpBR322_ΔtypeIISプラスミドのＸｃｍＩサイトに挿入することによりpBR_E2Crimsonプラスミドを構築した。pBR_E2CrimsonをＢｓｐＱＩ処理することにより得たE2CrimsonＤＮＡ断片を、pT7_TL_pA100のＰａｑＣＩサイトに挿入することにより、pT7_TL_E2Crimson_pA100プラスミドを構築した。ＳＡＲＳ ＣｏＶ２ Ｓｐｉｋｅタンパク質をコードするＤＮＡ断片は、Messenger RNA encoding the full-length SARS-CoV-2 spike glycoprotein Sept. 2020 document 11889；第19回厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会 資料（https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000192554_00004.html）に記載された配列とした。このＤＮＡ断片をpT7_TL

_E2Crimson_pA100プラスミド内Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎをコードする領域の上流に挿入することにより、pT7_TL_Spk_E2Crimson_pA100プラスミドを構築した。

[0070] ファイザー社５’ＵＴＲ配列は、配列番号１３、１４に示す合成オリゴヌクレオチドをアニールすることにより得た。このＤＮＡ断片をpT7_TL_E2Crimson_pA100もしくはpT7_TL_Spk_E2Crimson_pA100のＢｓａＩサイトに挿入することによりpT7_TL_5Pf_E2Crimson_pA100プラスミドもしくはpT7_TL_5Pf_Spk_E2Crimson_pA100プラスミドを構築した。ファイザー社３’ＵＴＲ配列は、３’末端が一部相補となっている配列番号１１、１２に示す合成オリゴヌクレオチドをアニールさせその一本鎖部分をＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｖｅｒ.２（東洋紡）の５’から３’方向へのポリメラーゼ伸長反応により二本鎖とした産物を鋳型として、プライマーCommon-FとCommon-R（配列番号３、４）およびＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｖｅｒ.２を用いたPCRにより増幅した。このＰＣＲ断片をpBR322_ΔtypeIISプラスミドのＸｃｍＩサイトにクローニングすることによりpBR-3Pfプラスミドを構築した。このpBR-3PfプラスミドをＢｓａＩ処理することにより得たファイザー社３’ＵＴＲ配列を、pT7_TL_5Pf_E2Crimson_pA100もしくはpT7_TL_5Pf_Spk_E2Crimson_pA100のＰａｑＣＩサイトに挿入することによりpT7_TLpA_5Pf_E2Crimson_3Pf_pA100（配列番号１３６）もしくはpT7_TL_5Pf_Spk_E2Crimson_3Pf_pA100（配列番号３００）を構築した。

[0071] ＧＡＰＤＨ遺伝子の５’ＵＴＲ配列は、配列番号１５、１６に示す合成オリゴヌクレオチドをアニールすることにより得た。このＤＮＡ断片をpT7_TL_E2Crimson_pA100のＢｓａＩサイトに挿入することによりpT7_TL_5GAP_E2Crim_pA100プラスミドを構築した。ＧＡＰＤＨ遺伝子の５’ＵＴＲ配列と部分的に相補となる３’ＵＴＲ配列は、以下に記載する合成オリゴヌクレオチドをアニールさせることにより得た。このＤＮＡ断片をpT7_TL_5GAP_E2Crim_pA100のＰａｑＣＩサイトに導入することにより、pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR_pA100プラスミドを構築した。合成オリゴヌクレオチドの配列番号および構築されたプラスミドの組み合わせは以下の表１に記載する。

[0072] [表1]

表１

合成オリゴヌクレオチドの配列番号	プラスミドの配列番号	プラスミドの名称
１７、１８	137	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-100_pA100
１９、２０	138	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR94-2_pA100
２１、２２	139	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR75-4_pA100
２３、２４	140	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR75-5_pA100
２５、２６	141	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR75-6_pA100
２７、２８	142	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR75-7_pA100
２９、３０	143	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-10-1_pA100
３１、３２	144	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-9-1_pA100
３３、３４	145	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-8-1_pA100
３５、３６	146	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-7-1_pA100
３７、３８	147	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-6-1_pA100
３９、４０	148	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-5-1_pA100
４１、４２	149	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-4-1_pA100
４３、４４	150	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-3-1_pA100
４５、４６	151	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-13-2_pA100
４７、４８	152	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-10-2_pA100
４９、５０	153	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-9-2_pA100
５１、５２	154	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-8-2_pA100
５３、５４	155	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-6-2_pA100
５５、５６	156	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-20-3_pA100
５７、５８	157	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-14-3_pA100
５９、６０	158	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR-11-3_pA100

[0073] ファイザー社５’ＵＴＲ配列と部分的に相補となる３’ＵＴＲ配列は、以下に記載する合成オリゴヌクレオチドをアニールさせることにより得た。このＤＮＡ断片をpT7_TL_5Pf_E2Crimson_pA100のＰａｑＣＩサイトに導入することにより、pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-100_pA100プラスミドを構築した。合成オリゴヌクレオチドの配列番号および構築されたプラスミドの組み合わせを以下に記載する。

[0074] [表2-1]

Table 2-1

合成オリゴヌクレオチドの配列番号	プラスミドの配列番号	プラスミドの名称
６１、６２	159	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-100_pA100
６３、６４	160	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-1_pA100
６５、６６	161	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-1_pA100
６７、６８	162	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-7-1_pA100
６９、７０	163	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-6-1_pA100
７１、７２	164	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-5-1_pA100
７３、７４	165	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-4-1_pA100
７５、７６	166	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-3-1_pA100
７７、７８	167	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-11-2_pA100
７９、８０	168	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-10-2_pA100
８１、８２	169	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-2_pA100
８３、８４	170	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2_pA100
８５、８６	171	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-7-2_pA100
８７、８８	172	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-6-2_pA100
８９、９０	173	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-5-2_pA100
９１、９２	174	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-12-3_pA100
９３、９４	175	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-10-3_pA100
９５、９６	176	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-3_pA100
９７、９８	177	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-3_pA100
２１６、２１７	２５８	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M1-9-1_pA100
２１８、２１９	２５９	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M2-8-1_pA100
２２０、２２１	２６０	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M3-7-1_pA100
２２２、２２３	２６１	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M4-6-1_pA100
２２４、２２５	２６２	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M5-5-1_pA100
２２６、２２７	２６３	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M6-4-1_pA100
２２８、２２９	２６４	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M7-3-1_pA100
２３０、２３１	２６５	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M8-11-2_pA100
２３２、２３３	２６６	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M9-10-2_pA100

[0075]

[表2-2]

Table 2-2

234、235	267	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M10-9-2_pA100
236、237	268	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M11-8-2_pA100
238、239	269	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M12-7-2_pA100
240、241	270	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M13-6-2_pA100
242、243	271	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M14-5-2_pA100
244、245	272	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M15-12-3_pA100
246、247	273	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M16-11-3_pA100
248、249	274	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M17-10-3_pA100
250、251	275	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M18-9-3_pA100
252、253	276	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M19-8-3_pA100
254、255	277	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M20-14-3_pA100
256、257	278	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M21-13-3_pA100
216、217	279	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M1-9-1_pA100
218、219	280	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M2-8-1_pA100
220、221	281	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M3-7-1_pA100
222、223	282	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M4-6-1_pA100
224、225	283	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M5-5-1_pA100
226、227	284	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M6-4-1_pA100
228、229	285	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M7-3-1_pA100
230、231	286	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M8-11-2_pA100
232、233	287	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M9-10-2_pA100
234、235	288	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M10-9-2_pA100
236、237	289	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M11-8-2_pA100
238、239	290	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M12-7-2_pA100
240、241	291	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M13-6-2_pA100
242、243	292	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M14-5-2_pA100
244、245	293	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M15-12-3_pA100
246、247	294	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M16-11-3_pA100
248、249	295	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M17-10-3_pA100
250、251	296	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M18-9-3_pA100
252、253	297	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M19-8-3_pA100
254、255	298	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M20-14-3_pA100
256、257	299	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M21-13-3_pA100
216、217	258	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M1-9-1_pA100
218、219	259	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M2-8-1_pA100

[0076]

[表2-3]

Table2-3

220、221	260	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M3-7-1_pA100
222、223	261	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M4-6-1_pA100
224、225	262	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M5-5-1_pA100
226、227	263	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M6-4-1_pA100
228、229	264	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M7-3-1_pA100
230、231	265	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M8-11-2_pA100
232、233	266	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M9-10-2_pA100
234、235	267	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M10-9-2_pA100
236、237	268	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M11-8-2_pA100
238、239	269	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M12-7-2_pA100
240、241	270	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M13-6-2_pA100
242、243	271	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M14-5-2_pA100
244、245	272	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M15-12-3_pA100
246、247	273	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M16-11-3_pA100
248、249	274	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M17-10-3_pA100
250、251	275	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M18-9-3_pA100
252、253	276	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M19-8-3_pA100
254、255	277	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M20-14-3_pA100
256、257	278	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M21-13-3_pA100
216、217	279	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M1-9-1_pA100
218、219	280	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M2-8-1_pA100
220、221	281	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M3-7-1_pA100
222、223	282	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M4-6-1_pA100
224、225	283	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M5-5-1_pA100
226、227	284	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M6-4-1_pA100
228、229	285	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M7-3-1_pA100
230、231	286	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M8-11-2_pA100
232、233	287	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M9-10-2_pA100
234、235	288	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M10-9-2_pA100
236、237	289	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M11-8-2_pA100
238、239	290	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M12-7-2_pA100
240、241	291	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M13-6-2_pA100
242、243	292	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M14-5-2_pA100
244、245	293	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M15-12-3_pA100
246、247	294	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M16-11-3_pA100

[0077] [表2-4]

Table2-4

２４８、２４９	２９５	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M17-10-3_pA100
２５０、２５１	２９６	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M18-9-3_pA100
２５２、２５３	２９７	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M19-8-3_pA100
２５４、２５５	２９８	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M20-14-3_pA100
２５６、２５７	２９９	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M21-13-3_pA100
２５２、２５３	２７６	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M19-8-3_pA100
２５４、２５５	２７７	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M20-14-3_pA100
２５６、２５７	２７８	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR_M21-13-3_pA100
２１６、２１７	２７９	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M1-9-1_pA100
２１８、２１９	２８０	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M2-8-1_pA100
２２０、２２１	２８１	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M3-7-1_pA100
２２２、２２３	２８２	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M4-6-1_pA100
２２４、２２５	２８３	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M5-5-1_pA100
２２６、２２７	２８４	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M6-4-1_pA100
２２８、２２９	２８５	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M7-3-1_pA100
２３０、２３１	２８６	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M8-11-2_pA100
２３２、２３３	２８７	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M9-10-2_pA100
２３４、２３５	２８８	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M10-9-2_pA100
２３６、２３７	２８９	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M11-8-2_pA100
２３８、２３９	２９０	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M12-7-2_pA100
２４０、２４１	２９１	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M13-6-2_pA100
２４２、２４３	２９２	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M14-5-2_pA100
２４４、２４５	２９３	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M15-12-3_pA100
２４６、２４７	２９４	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M16-11-3_pA100
２４８、２４９	２９５	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M17-10-3_pA100
２５０、２５１	２９６	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M18-9-3_pA100
２５２、２５３	２９７	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M19-8-3_pA100
２５４、２５５	２９８	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M20-14-3_pA100
２５６、２５７	２９９	pT7_TL_5Pf_Spk_E2Crim_3UTR_M21-13-3_pA100

[0078] ＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子の５’ＵＴＲ配列は、配列番号９９、１００に示す合成オリゴヌクレオチドをアニールすることにより得た。このＤＮＡ断片をpT7_TL_E2Crimson_pA100のＢｓａＩサイトに挿入することによりpT7_TL_5HSD_

E2Crim_pA100プラスミドを構築した。ＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子の５’ＵＴＲ配列と部分的に相補となる３’ＵＴＲ配列は、以下に記載する合成オリゴヌクレオチドをアニールさせることにより得た。このＤＮＡ断片をpT7_TL_5HSD_E2Crim_pA100のＰａｑＣＩサイトに導入することにより、pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR_pA100プラスミドを構築した。合成オリゴヌクレオチドの配列番号および構築されたプラスミドの組み合わせは以下の通りである。

[0079] [表3]

表３

合成オリゴヌクレオチドの配列番号	プラスミドの配列番号	プラスミド名称
101,102	178	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-9-1_pA100
103,104	179	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-8-1_pA100
105,106	180	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-7-1_pA100
107,108	181	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-6-1_pA100
109,110	182	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-5-1_pA100
111,112	183	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-4-1_pA100
113,114	184	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-3-1_pA100
115,116	185	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-9-2_pA100
117,118	186	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-8-2_pA100
119,120	187	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-7-2_pA100
121,122	188	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-6-2_pA100
123,124	189	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-5-2_pA100
125,126	190	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-12-3_pA100
127,128	191	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-11-3_pA100
129,130	192	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-10-3_pA100
131,132	193	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-9-3_pA100
133,134	194	pT7_TL_5HSD_E2Crim_3UTR-8-3_pA100

[0080] （Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼによるｉｎ ｖｉｔｒｏ転写）

鋳型ＤＮＡからＲＮＡポリメラーゼが解離することによりＲＮＡ合成を停止させ、かつ合成したＲＮＡの３’末端をＡヌクレオチド連続配列とするために、鋳型ＤＮＡとなるプラスミドは制限酵素ＢｓｍＢＩ（Ｎｅｗ Ｅｎｇ

ｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂ）により直鎖化した。ＢｓｍＢＩ処理後のプラスミドは、ＴＥ飽和フェノールを添加し十分混合したのち、遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）により有機相と水相とに分離させ、水相は新しいチューブに回収した。回収した水相は、１－ブタノールを添加し十分混合したのち遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）により１－ブタノール相と水相に分離し、分離した１－ブタノール相を除去した。この操作を３回繰り返すことによりフェノールを完全に除去するとともに水相の体積を減少させた。この水相に３M酢酸ナトリウム溶液（ｐＨ５．２）（ナカライ）、エタノールを添加し十分混合したのち遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）することによりＤＮＡ断片を沈殿させた。沈殿したＤＮＡ断片は、７０％エタノールで洗浄したのち、蒸留水に溶解し直鎖鋳型ＤＮＡを得た。２５ｎｇ／μｌ直鎖鋳型ＤＮＡ、１×Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ添付バッファー（タカラバイオ）、５mM　ＤＴＴ、１．６mM　ＣｌｅａｎＣａｐ（ＴｒｉＬｉｎｋ）、０．４mM　ＧＴＰ、２．０mM　ＡＴＰ、２．０mM　ＣＴＰおよび２．０mM　Ｎ１―メチルシュードＵＴＰ（ＴｒｉＬｉｎｋもしくはヤマサしょう油）、１Ｕ／μｌ　Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ＲＮａｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（タカラバイオ）２Ｕ／ｍｌ無機ピロフォスファターゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂ）、２．５Ｕ／μｌ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ（タカラバイオ）の条件下、４２℃で３時間インキュベーションすることによりｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写反応を行った。この反応後、残存する直鎖鋳型ＤＮＡを除去するために、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　ＤＮａｓｅＩ（タカラバイオ）を終濃度０．１２５Ｕ／μｌとなるように添加し、さらに３７℃で１５分間インキュベーションした。反応後のＲＮＡを含む溶液は、クエン酸飽和フェノール（ｐＨ４．３）（ナカライ）とクロロホルム（ナカライ）の１：１混合溶液を添加し十分混合したのち、遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）により有機相と水相とに分離させた。回収した水相にクロロホルムを添加し十分混合したのち、遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）によりクロロホルム相と水相に分離させた。この操作を２回繰り返すこと

で水相に含まれるフェノールを完全に除去した。この水相に３M酢酸ナトリウム溶液（ｐＨ５．２）およびエタノールを添加し、十分混合したのち遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）することによりＲＮＡを沈殿させた。沈殿したＲＮＡは７０％エタノールで洗浄したのち５０μｌの蒸留水に溶解した。このＲＮＡ溶液は、あらかじめ７００×ｇで１分間遠心分離したＭｉｃｒｏＳｐｉｎ　Ｓ－２００　Ｃｏｌｕｍｎ（Ｃｙｔｉｖａ）にアプライし、７００×ｇで２分間の遠心分離ののちさらに蒸留水５０μｌ添加後７００×ｇで２分間の遠心分離を行い、このＲＮＡ溶液に含まれる未反応のヌクレオチドを除去した。この溶出液に３M酢酸ナトリウム溶液（ｐＨ５．２）およびエタノールを添加し、十分混合したのち遠心分離（２０，０００×ｇ、１０分間）することによりＲＮＡを沈殿させた。沈殿したＲＮＡは７０％エタノールで洗浄したのち２０μｌの蒸留水に溶解した。ＲＮＡ濃度は微量分光光度計Ｎａｎｏ　ｄｒｏｐ　Ｏｎｅ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）およびＱｕｂｉｔ　ＲＮＡ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅ　Ａｓｓａｓｙ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）により製造元の使用説明書に従い定量した。

[0081]　（定量実施例）

（培養細胞へのＲＮＡトランスフェクションおよび蛍光タンパク質発現量の定量）

２９３細胞は１０％　ＦＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液（ナカライ）を添加したＤＭＥＭ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒもしくはナカライ）中において５％CO_2存在下３７℃で培養した。６ウェル培養プレート１ウェルあたり１．５ｍｌの培地中に1×10^5細胞となるように播種し、３７℃で２４時間培養したのちＲＮＡトランスフェクションを行った。１ウェルあたりＯｐｔｉ－ＭＥＭ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）４８．５μｌとＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ｍｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）１．５μｌの混合物および５０ｎｇのＲＮＡを含むＯｐｔｉ－ＭＥＭ５０μｌをそれぞれあらかじめ調製したのち、これらを混合し室温で１０分間インキュベーションした。この溶液を培

養ウェルに添加しさらに３７℃で２４時間培養した。ＲＮＡトランスフェクション後の２９３細胞は、１ウェルあたり１ｍｌのＤＰＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ）で洗浄後、０．５ｍｌのトリプシン－ＥＤＴＡ（ナカライ）により培養プレート底面から解離させた。解離後の細胞は１ｍｌのＤＰＢＳを添加するとともに１．５ｍｌチューブに移したのち、３０００×ｇで３分間の遠心分離により回収した。回収した細胞は１００μｌのＤＰＢＳに再度懸濁し、そのうち３０μｌを３８４ウェル・マイクロプレート・平底・黒（グライナー）に分注した。各ウェルに含まれるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対量を、プレートリーダーＩｎｆｉｎｉｔｅ　２００　ＰＲＯ（ＴＥＣＡＮ）による励起波長６０６ｎｍ、蛍光波長６５１ｎｍの蛍光測定により算出した。さらに、上記蛍光測定ののち、各ウェルに分注した細胞懸濁液に５μｇ／ｍｌのＣａｌｃｅｉｎ－ＡＭ（同仁化学）を含むＤＰＢＳを３μｌ添加し混合し、３７℃で３０分間インキュベートした。各ウェルに含まれる相対生細胞数を、細胞内エステラーゼによるＣａｌｃｅｉｎ－ＡＭの加水分解産物であるＣａｌｃｅｉｎが示す励起波長４８０ｎｍ、蛍光波長５３３ｎｍの蛍光測定により算出した。なお、Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の示す蛍光が、Ｃａｌｃｅｉｎの示す蛍光に干渉しないことを別途確認している。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。

[0082] （実施例１：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：非相補２および３塩基の有用性）

本実施例では、５’ＵＴＲがＧＡＰＤＨ遺伝子配列、ファイザー配列、ＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子配列とするｍＲＮＡの発現レベルを検証した。いずれも比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。構築物の製造および発現量の定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0083] （結果）

結果を図１に示す。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光

測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。（相補塩基数）／（非相補塩基数）＝３の場合、５’ＵＴＲがＧＡＰＤＨまたはＨＳＤ１７Ｂ４の場合は、非相補２塩基または３塩基がより、高い発現量を示した。５’ＵＴＲがファイザーの場合は、非相補１～３塩基においてほぼ同等であった。

[0084] 図２は、５’ＵＴＲはＧＡＰＤＨ遺伝子配列、３’ＵＴＲはこの５’ＵＴＲと１００％、９４％、もしくは７５％の相補率をもつ配列とするｍＲＮＡの発現レベルを検証した結果を示している。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。非相補部分が２塩基（＃２）の場合において最も高い発現量を示し、非相補部分が１塩基および４塩基の場合において発現量は同等であった。相補性が９０％を超えると、発現量が低下した。また、非相補部分が４塩基を超えると、発現量が低下した。

[0085] （実施例２：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：５’ＵＴＲ　ＧＡＰＤＨ）

本実施例では、５’ＵＴＲとしてＧＡＰＤＨ遺伝子配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した。構築物の製造および定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0086] （結果）

図３は、本実施例で使用した３’ＵＴＲおよび５’ＵＴＲの各塩基配列を示す。図４に結果を示す。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍ

ｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。非相補部分が１塩基の場合、相補率７５～８９％および相補部分３～７塩基において、高い発現量を示した。相補部分が７塩基を超えると、発現量が低下した。また、非相補部分が２塩基かつ相補部分が６塩基の場合、非相補部分が３塩基かつ相補部分が１１塩基の場合、高い発現量を示した。

[0087] （実施例３：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：５’ＵＴＲ　ファイザー配列）

本実施例では、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した。構築物の製造および定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0088] （結果）　図５は、本実施例で使用した３’ＵＴＲおよび５’ＵＴＲの各塩基配列を示す。結果を図６に示す。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。相補－非相補：４－１、３－１、６－２、５－２、９－３のｍＲＮＡにおいて、ファイザー配列より発現レベルが亢進し、最大で約５０％増大した。相補塩基数が短いと発現量が高い傾向にあった。

[0089] （実施例４：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：５’ＵＴＲ　ＨＳＤ１７Ｂ４配列）

本実施例では、５’ＵＴＲとしてＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した。構築物の製造および定量

は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0090] （結果）

図７は、本実施例で使用した３’ＵＴＲおよび５’ＵＴＲの各塩基配列を示し、結果は図８を示す。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。相補－非相補：４－１、３－１、６－２、５－２、９－３、８－３のｍＲＮＡにおいて、ファイザー配列より発現レベルが亢進した。

[0091] 以上をまとめると、非相補部分が１塩基の場合、相補部分は３～７塩基であることが好ましく、非相補部分が２塩基の場合、相補部分は５～７塩基であることが好ましく、非相補部分が３塩基の場合、相補部分は８～１１塩基が好ましい。

[0092] （実施例５：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：相補率７５～８０％での臨界的意義）

本実施例では、５’ＵＴＲとしてＧＡＰＤＨ遺伝子配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した。構築物の製造および定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。合成オリゴヌクレオチドの配列番号および構築されたプラスミドの組み合わせは以下の通りである。

[0093]

[表4]

表４

合成オリゴヌクレオチドの配列番号	プラスミドの配列番号	プラスミド名称
195、196	209	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR_24-4/3-1_pA100
197、198	210	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR_25-4/3-1_pA100
199、200	211	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR_26-4/3-1_pA100
201,202	212	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR_27-4/3-1_pA100
203,204	213	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR_28-4/3-1_pA100
205,206	214	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR_29-4/3-1_pA100
207、208	215	pT7_TL_5GAP_E2Crim_3UTR_30-4/3-1_pA100

[0094] （結果）

図９は、本実施例で使用した３’ＵＴＲおよび５’ＵＴＲの各塩基配列を示し、結果を図１０に示す。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して３サンプルの測定を行いその平均値をプロットで示している。図１０は、相補率が７５％～８０％の間で最大値となり、７５％またはそれより高い相補率が好ましいことを示している。

[0095] （実施例６：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：自由エネルギー変化）

本実施例では、３’ＵＴＲが５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつｍＲＮＡについて、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの相互作用における自由エネルギー変化と各ｍＲＮＡの発現レベルの相関を調べた。構築物の製造および定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0096] （結果）

結果を図１１に示す。発現レベルは５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもフ

ァイザー配列のｍＲＮＡを１として算出した。自由エネルギー変化は２次構造予測プログラムＭｆｏｌｄにより求めた(Michael Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1;31(13):3406-15)。図左、中央、右に、５’ＵＴＲがそれぞれＧＡＰＤＨ遺伝子、ＨＳＤ１７Ｂ４遺伝子、ファイザー配列のときの結果を示している。各５’ＵＴＲについて、得られた実測値をシグモイド曲線のひとつである４係数ロジスティック曲線ｙ＝ｄ＋（ａ－ｄ）／（１＋（ｘ／ｃ）＾ｂ）にそれぞれフィッティングした。図１１は、自由エネルギー変化と発現量とが相関しており、自由エネルギー変化から発現量をある程度予測することができることが明らかとなった。

[0097] 図１２を示す。自由エネルギー変化の最大値は、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの相補率が１００％となる３’ＵＴＲの全塩基に対して、５’ＵＴＲとミスマッチとなるよう塩基置換を行ったｍＲＮＡについて、その自由エネルギー変化をＭｆｏｌｄにより求めた値とした。相対的な自由エネルギー変化の値は、変曲点からの増加率（右側シフト）を指標とし、変曲点となる値と最大値の差を１００％として算出した。変曲点からの増加が１０％以上５０％以下の自由エネルギー変化値となるｍＲＮＡにおいて、その発現レベルが最大となった。

[0098] 図１３は、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲ配列からのｍＲＮＡの発現レベルを予測する方法を示している。自由エネルギー変化の最大値と最小値は、図１２と同様に求めた。この自由エネルギーの最大値と最小値の平均値が、シグモイド曲線の変曲点となる自由エネルギー変化の値と一致することを見出した。この平均値をもちいることで、誤差４．９ｋｃａｌ／ｍｏｌ以下もしくは１３．１％以下の精度で、変曲点を予測することができた。この誤差パーセントは、図１２と同様に、変曲点となる値と自由エネルギー変化最大値の差を１００％として算出している。この変曲点の予測に基づき、発現レベルが最大となるｍＲＮＡにおける５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの相互作用の自由エネルギー変化が予測できる。

[0099] （実施例７：自由エネルギー変化を用いた発現量の予測）

１．５’ＵＴＲの候補配列を設計する。

２．５’ＵＴＲと部分的に相補（相補率４０～９０％）となる３’ＵＴＲの候補配列を、非相補１，２もしくは３塩基でありかつ相補４～１４塩基となるように設計する。このとき相補塩基数は連続した数とする。例えば、相補７～１０塩基を選択するのであれば相補７、８、９、１０塩基とする配列をすべて設計する。５’ＵＴＲ１種につき１０～２０種類設計する。

３．設計した配列について、２次構造予測プログラムＭｆｏｌｄにより自由エネルギー変化を求める。

４．自由エネルギー変化の最大値および最小値の平均を基準値とする。ここで、自由エネルギー変化の最大値は、３’ＵＴＲ全塩基についてミスマッチ置換を行った配列に基づき、自由エネルギー変化の最小値は、５’－３’ＵＴＲ相補率１００％の配列に基づく。

５．基準値に対する増加率０％～６０％の範囲の自由エネルギー変化の値をもつ候補配列を選択する。

６．必要に応じて、選択した候補配列のタンパク質発現量を確認し、発現量が高い配列を選択する。

[0100] （実施例８：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：筋芽細胞株Ｃ２Ｃ１２）

本実施例では、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、Ｃ２Ｃ１２細胞における発現レベルを検証した。構築物の製造および定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0101] （結果）

図５は、本実施例で使用した３’ＵＴＲおよび５’ＵＴＲの各塩基配列を示す。結果を図１５に示す。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉ

ｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。相補－非相補：４－１、３－１、６－２、５－２、９－３のｍＲＮＡにおいて、ファイザー配列より発現レベルが亢進し、最大で約６０％増大した。図６に示した２９３細胞における結果と同等であったことから、部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲがもたらす効果は、細胞種に限定されないことが明らかとなった。

[0102] （実施例９：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：長鎖ｍＲＮＡ）

本実施例では、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列、ＯＲＦとしてＳＡＲＳ　ＣｏＶ２　Ｓｐｉｋｅ、Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ融合タンパク質をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した。構築物の製造および定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0103] （結果）

図５は、本実施例で使用した３’ＵＴＲおよび５’ＵＴＲの各塩基配列を示す。結果を図１６に示す。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。相補－非相補：６－１、３－１、１１－２、８－２、７－２、６－２、５－２、１２－３、１１－３、１０－３、９－３、８－３において、ファイザー配列より発現レベルが亢進し、最大で約２倍増大した。図６に示したＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質をＯＲＦとするｍＲＮＡにおける結果と同等であった。ＳＡＲＳ　ＣｏＶ２　Ｓｐｉｋｅ、Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ融合タンパク質のＯＲＦは４．５　ｋｂｐ、Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質のＯＲＦは０．７　ｋｂｐであることから部分的に相補的である５’非翻

訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲがもたらす効果は、ＯＲＦ種別およびその鎖長に限定されないことが明らかとなった。

[0104] （実施例１０：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：非相補部分を塩基除去）

本実施例では、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、２９３細胞における発現レベルを検証した。これら３’ＵＴＲにおいて塩基を除去することにより非相補配列としている。構築物の製造および定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0105] （結果）

図１７（２）に本実施例で使用したｍＲＮＡについて模式図として示す。図１８は、本実施例で使用した３’ＵＴＲおよび５’ＵＴＲの各塩基配列を示す。図１８（２）に示す３’ＵＴＲ上の非相補部位を除去したｍＲＮＡの結果を図１９および図２０に示す。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。相補－非相補：９－１、５－１、４－１、３－１、９－２、８－２、７－２、６－２、５－２、１１－３、１０－３、９－３、８－３において、ファイザー配列より発現レベルが亢進し、最大で約６０％増大した。図６に示す非相補部分を塩基置換とした場合においては、相補－非相補：４－１、３－１、６－２、５－２、９－３、８－３のｍＲＮＡにおいてファイザー配列より発現レベルが亢進したことから、塩基除去の場合は相補鎖が長くかつ高相補率のｍＲＮＡにおいて発現レベルが高くなる傾向が認められた。さらに図１８（３）に示す５’ＵＴＲ上の非相補部位を除去したｍＲＮＡ、図１８（４）に示す塩基置換と塩基除去が混在するｍＲＮＡ、図１８（５）に示す３’ＵＴＲにおいて塩基を追加することにより非相

補配列を作出したｍＲＮＡ、図１８（６）に示す５’ＵＴＲにおいて塩基を追加することにより非相補配列を作出したｍＲＮＡの発現レベルも同様の方法で確認する。配列番号３０１-３１５、３３４－３３９にｍＲＮＡ合成に用いるプラスミドの配列を示す。図１８（２）に示す３’ＵＴＲ上の非相補部位を除去したｍＲＮＡと同様に発現レベルが制御されうる。

[0106] [表5-1]

表５

配列番号	名前
301	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-1_pA100
302	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-2_pA100
303	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-3_pA100
304	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-4_pA100
305	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-5_pA100
306	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-6_pA100
307	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-7_pA100
308	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-8_pA100
309	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-9_pA100
310	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-10_pA100
311	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-11_pA100
312	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-12_pA100
313	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-13_pA100
314	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-14_pA100
315	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-15_pA100
316	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-3-1/6-2-1_pA100
317	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-3-1/6-2-2_pA100
318	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-6-2/9-3-1_pA100
319	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-6-2/9-3-2_pA100

[0107]

[表5-2]

320	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-3-1/9-3-1_pA100
321	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-3-1/9-3-2_pA100
322	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-3/9-2-1_pA100
323	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-3/9-2-2_pA100
324	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-3/9-1-1_pA100
325	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-3/9-1-2_pA100
326	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2/8-1-1_pA100
327	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2/8-1-2_pA100
328	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-3/9-2-3_pA100
329	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-3/9-2-4_pA100
330	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-3/9-1-3_pA100
331	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-9-3/9-1-4_pA100
332	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2/8-1-3_pA100
333	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2/8-1-4_pA100
334	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-1-A1_pA100
335	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-A2_pA100
336	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-3-A3_pA100
337	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-1-B1_pA100
338	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-2-B2_pA100
339	pT7_TL_5Pf_E2Crim_3UTR-8-3-B3_pA100

[0108] （実施例１１：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：非相補部分を塩基除去・筋芽細胞株Ｃ２Ｃ１２）

本実施例では、５’ＵＴＲとしてファイザー配列、３’ＵＴＲとしてこの５’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、Ｃ２Ｃ１２細胞における発現レベルを検証した。これら３’ＵＴＲにおいて塩基を除去することにより非相補配列としている。構築物の製造および定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0109] （結果）

図１９および図２０において使用したｍＲＮＡにより得られた結果を図２１および図２２に示す。比較対象として５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓ

ｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。相補－非相補４－１、３－１、８－２、７－２、６－２、５－２、１１－３、１０－３、９－３、８－３において、ファイザー配列より発現レベルが亢進し、最大で約５０％増大した。図１５に示す非相補部分を塩基置換とした場合においては、相補－非相補：４－１、３－１、６－２、５－２、９－３のｍＲＮＡにおいてファイザー配列より発現レベルが亢進したことから、２９３細胞の場合と同様に、塩基除去の場合は相補鎖が長くかつ高相補率のｍＲＮＡにおいて発現レベルが高くなる傾向が認められた。

[0110] （実施例１２：5’－3’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：非相補部分を塩基除去・筋芽細胞株Ｃ２Ｃ１２・長鎖ｍＲＮＡ）

本実施例では、5’ＵＴＲとしてファイザー配列、3’ＵＴＲとしてこの5’ＵＴＲと部分的に相補性をもつ各種配列をもつｍＲＮＡについて、Ｃ２Ｃ１２細胞における発現レベルを検証した。これら3’ＵＴＲにおいて塩基を除去することにより非相補配列としている。またＯＲＦはＳＡＲＳ　ＣｏＶ２　Ｓｐｉｋｅ、Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ融合タンパク質としている。構築物の製造および定量は、上記製造実施例および定量実施例に基づき行った。

[0111] （結果）

結果を図２３に示す。比較対象として5’ＵＴＲ、3’ＵＴＲがいずれもファイザー配列のｍＲＮＡを用いた。Ｅ２Ｃｒｉｍｓｏｎ蛍光測定値のＣａｌｃｅｉｎ蛍光測定値に対する比率を、各ｍＲＮＡにおけるＥ２Ｃｒｉｍｓｏｎタンパク質の相対発現量とした。各ｍＲＮＡに対して複数サンプルについて測定を行い、その平均値を棒グラフで、各サンプルの個別値を黒プロットで示している。相補－非相補：９－１，６－１、５－１、１１－２、１０－２、９－２、８－２、７－２、１１－３、１０－３、８－３において、ファイザー配列より発現レベルが亢進し、最大で約４０％増大した。図１６に示す非相補部分を塩基置換とした場合においては、相補－非相補：６－１、１１－２、８－２、７－２、６－２、５－２、１２－３、１１－３、１０－

３、９－３、８－３のｍＲＮＡにおいてファイザー配列より発現レベルが亢進したことから、長鎖ｍＲＮＡでも同様に塩基除去の場合は相補鎖が長くかつ高相補率のｍＲＮＡにおいて発現レベルが高くなる傾向が認められた。

[0112] （実施例１３：５’－３’非翻訳領域間の相補性による発現効率化：塩基数の異なる非相補部分が混在する場合）

図２４は、本実施例で使用する３’ＵＴＲおよび５’ＵＴＲの各塩基配列を示す。配列番号３１６-３３３にｍＲＮＡ合成に用いるプラスミドの配列を示す。図２４（１）は非相補部分がすべて置換、すなわち非相補部分の塩基数が５’ＵＴＲと３’ＵＴＲにおいて同じ場合である。これらについて前記実施例記載の方法でタンパク質の発現を確認する。図５に示すｍＲＮＡと同様に発現レベルが制御しうる。さらに、図２４（２）は非相補部分の塩基が置換または除去されたもの、すなわち非相補部分の塩基数が５’ＵＴＲと３’ＵＴＲで異なる場合である。これらについて前記実施例記載の方法でタンパク質の発現を確認する。図１８（２）に示す３’ＵＴＲ上の非相補部位を除去したｍＲＮＡと同様に発現レベルが制御されうる。

[0113] （注記）

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本出願は、２０２３年１月３１日に日本国特許庁に出願した特願２０２３－０１３２９０に対して優先権主張をともなうものであり、その内容は本出願において必要に応じてすべてが本明細書を構成するものとして引用される。

産業上の利用可能性

[0114] 本開示は、核酸技術の応用分野（例えば医薬）において応用され得る。

配列表フリーテキスト

[0115] 配列番号１～３３９：明細書中の表1を参照。

請求の範囲

[請求項1] 互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含む核酸構築物であって、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該非相補部分の各々の長さがすべて１塩基の置換である場合、該３’ＵＴＲの該５’ＵＴＲに対する相補率が７５％より高い、核酸構築物。

[請求項2] 非相補部分の塩基が置換または除去されたものである、請求項１に記載の核酸構築物。

[請求項3] 該非相補部分の少なくとも１つが２塩基以上の長さのものを含む、請求項１～２のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項4] 少なくとも１つの前記非相補部分の長さがいずれも２塩基または３塩基である、請求項１～３のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項5] 少なくとも１つの前記相補部分の長さが５塩基以上である、請求項１～４のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項6] 少なくとも１つの前記相補部分の長さが５～１１塩基である、請求項１～５のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項7] 前記非相補部分の長さが２塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して５～７塩基である、請求項１～６のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項8] 前記非相補部分の長さが３塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して８～１１塩基である、請求項１～６のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項9] 前記非相補部分の各々の長さがすべて１塩基以上であり、前記相補率が７５％より高い、請求項１～８のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項10] 前記相補率が、８０％～９０％である、請求項９に記載の核酸構築物。

[請求項11] 前記相補率が、８１％～８９％である、請求項９または１０に記載

の核酸構築物。

[請求項12] 少なくとも１つの前記非相補部分が１塩基である、請求項１～１１に記載の核酸構築物。

[請求項13] 前記相補部分の長さがそれぞれ独立して３～１１塩基である、請求項９～１２のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項14] 前記非相補部分が１塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して３～７塩基である、請求項９に記載の核酸構築物。

[請求項15] 前記非相補部分の長さが２塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して５～７塩基である、請求項９に記載の核酸構築物。

[請求項16] 前記非相補部分の長さが３塩基であり、前記相補部分の長さがそれぞれ独立して８～１１塩基である、請求項９に記載の核酸構築物。

[請求項17] 互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含む核酸構築物であって、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、前記非相補部分と前記相補部分とが交互に存在することを特徴とする、核酸構築物。

[請求項18] 前記非相補部分が２塩基の場合、前記相補部分は塩基置換の場合５～７塩基長であり、塩基除去の場合５～１１塩基長である、請求項１７に記載の核酸構築物。

[請求項19] 前記非相補部分が３塩基の場合、前記相補部分は塩基置換の場合８～９塩基長であり、塩基除去の場合８～１１塩基長である、請求項１７に記載の核酸構築物。

[請求項20] 前記５’ＵＴＲまたは前記３’ＵＴＲのいずれか一方が、非相補部分を含まない、請求項１～１９のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項21] 自由エネルギー変化（ΔＧ）が所定値またはその範囲である、請求項１～２０のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[請求項22] 前記所定値またはその範囲が、自由エネルギー変化（ΔＧ）の最大値および最小値の平均値に対する増加率０％～６０％の範囲の自由エ

ネルギー変化の値またはその範囲である、請求項２１に記載の核酸構築物。

[請求項23] 前記所定値またはその範囲が、自由エネルギー変化（ΔＧ）の最大値および最小値の平均値に対する増加率１０％～５０％の範囲の自由エネルギー変化の値またはその範囲である、請求項２２に記載の核酸構築物。

[請求項24] 核酸構築物を製造する方法であって、該核酸構築物は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含み、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該方法は、複数の候補核酸構築物を設計する工程、設計した該複数の候補核酸構築物について自由エネルギー変化（ΔＧ）を計算する工程、自由エネルギー変化（ΔＧ）が所定値またはその範囲である候補核酸構築物を選択する工程、および必要に応じて、選択された該候補核酸構築物の細胞における発現量を測定する工程を含む、方法。

[請求項25] 核酸構築物を製造する方法であって、該核酸構築物は、互いに少なくとも部分的に相補的である５’非翻訳領域（ＵＴＲ）および３’ＵＴＲを含み、少なくとも一方のＵＴＲが、他方のＵＴＲに対する非相補部分および相補部分を含み、該方法は、複数の候補核酸構築物を設計する工程、設計した該複数の候補核酸構築物について自由エネルギー変化（ΔＧ）を計算する工程、自由エネルギー変化（ΔＧ）の最大値および最小値の平均値に対する増加率０％～６０％の範囲の自由エネルギー変化の値をもつ候補核酸構築物を選択する工程、および必要に応じて、選択された該候補核酸構築物の細胞における発現量を測定する工程を含む、方法。

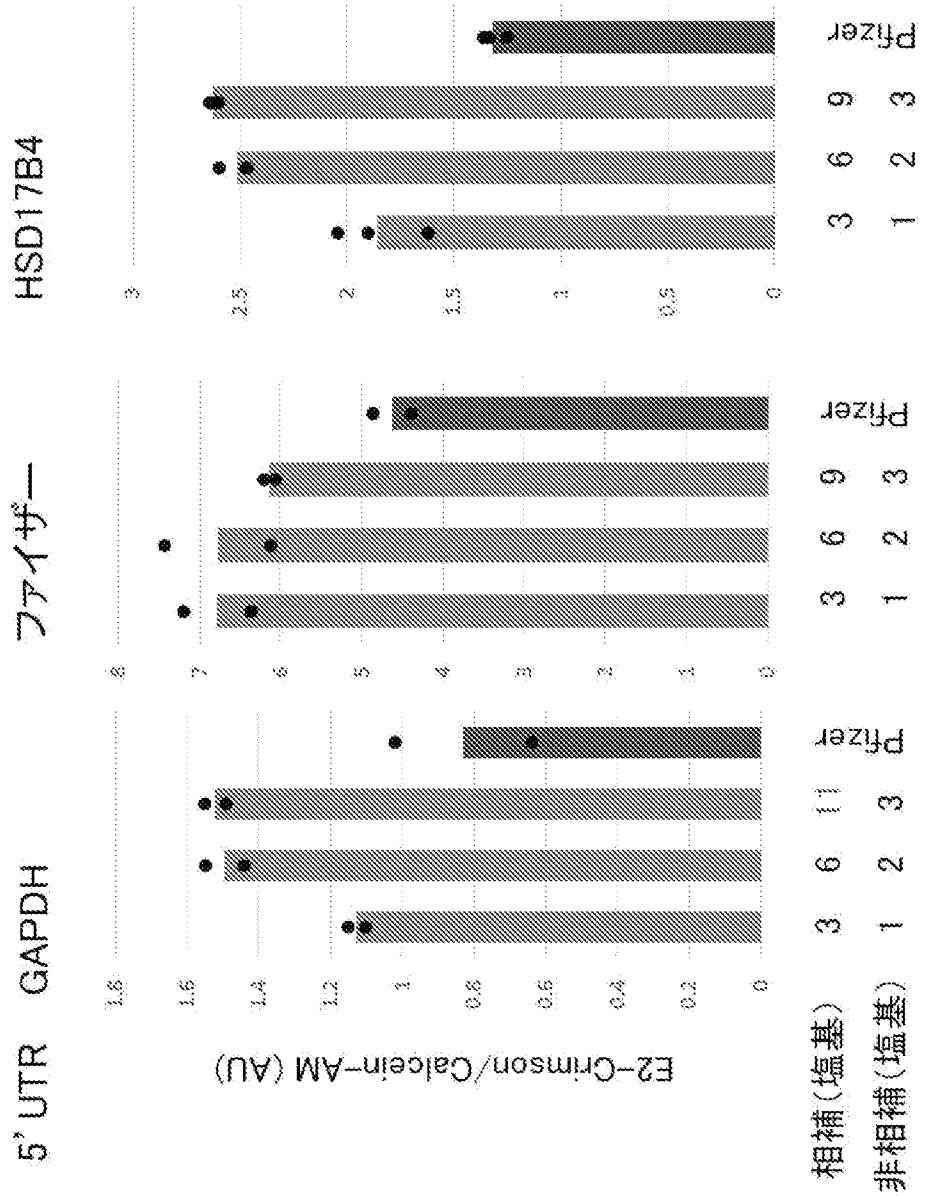
[請求項26] 前記平均値に対する増加率が１０％～５０％である、請求項２５に記載の方法。

[請求項27] 請求項２４～２６のいずれか一項に記載の方法に従って製造された

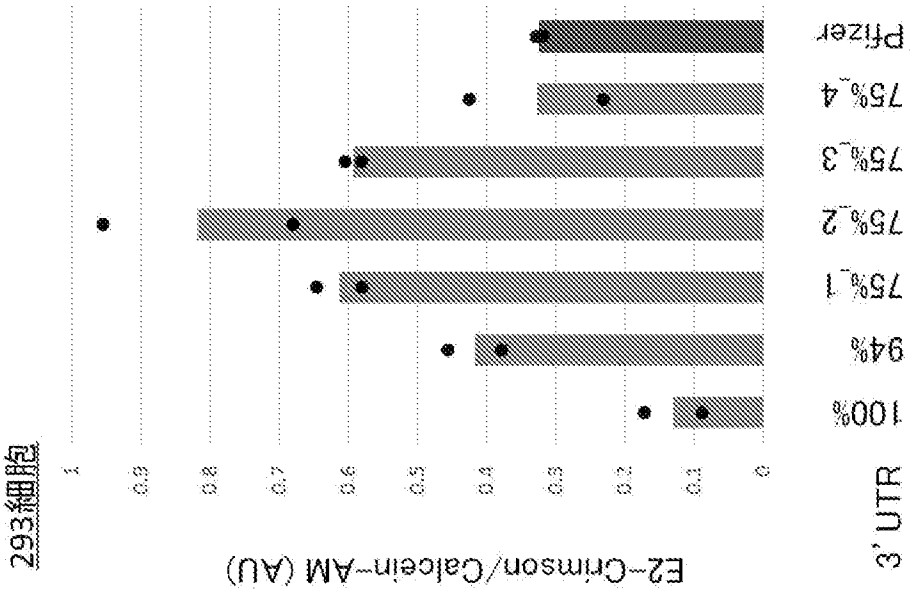
、請求項１～２３のいずれか一項に記載の核酸構築物。

[図1]

Fig. 1


5' UTR
GAPDH
ファイザー
HSD17B4
E2-Crimson/Calcein-AM (AU)
相補(塩基)
非相補(塩基)
Pfizer
3 6 11 3
1 2 3
3 6 9 3
1 2 3

[図2]


293細胞
E2-Crimson/Calcein-AM (AU)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
3' UTR
100%
94%
75%_1
75%_2
75%_3
75%_4
Pfizer

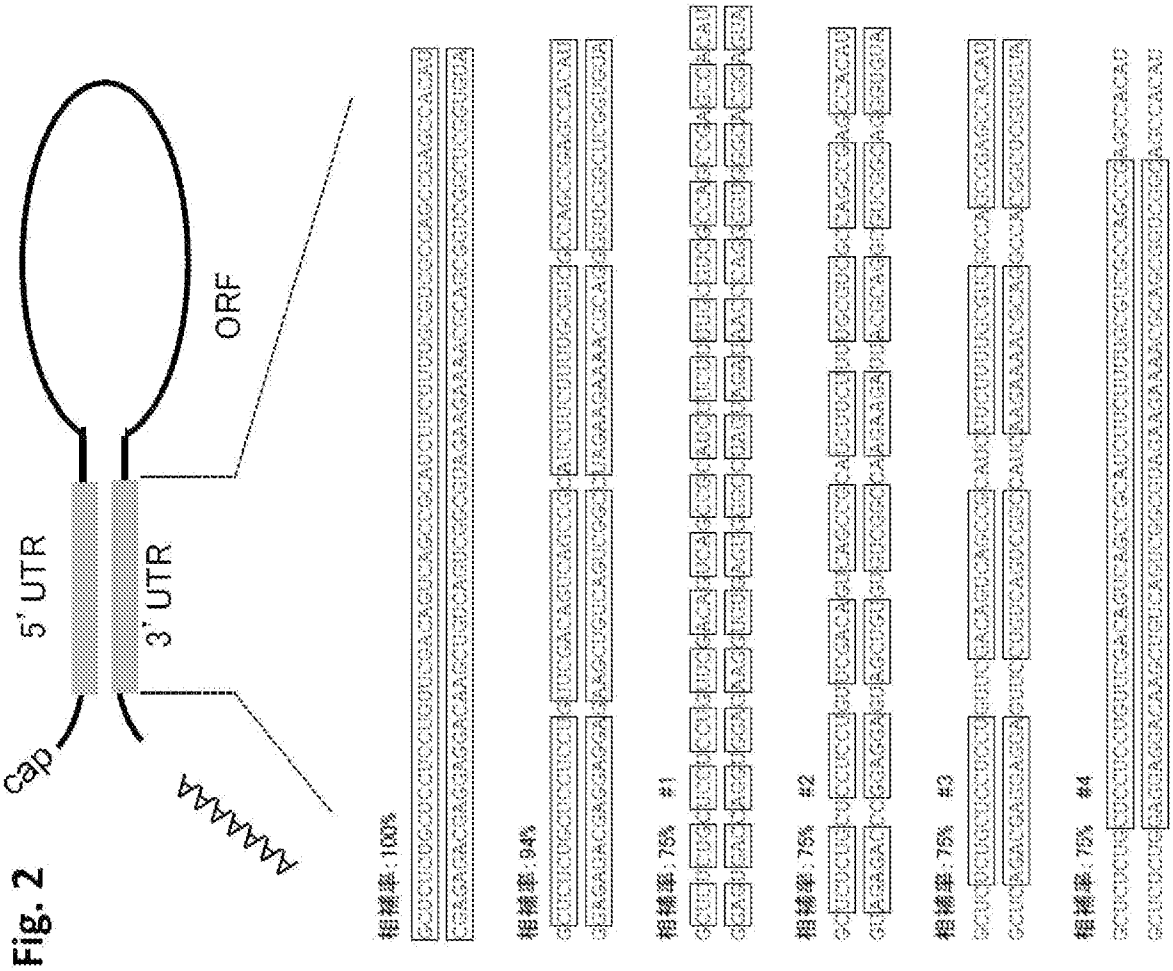
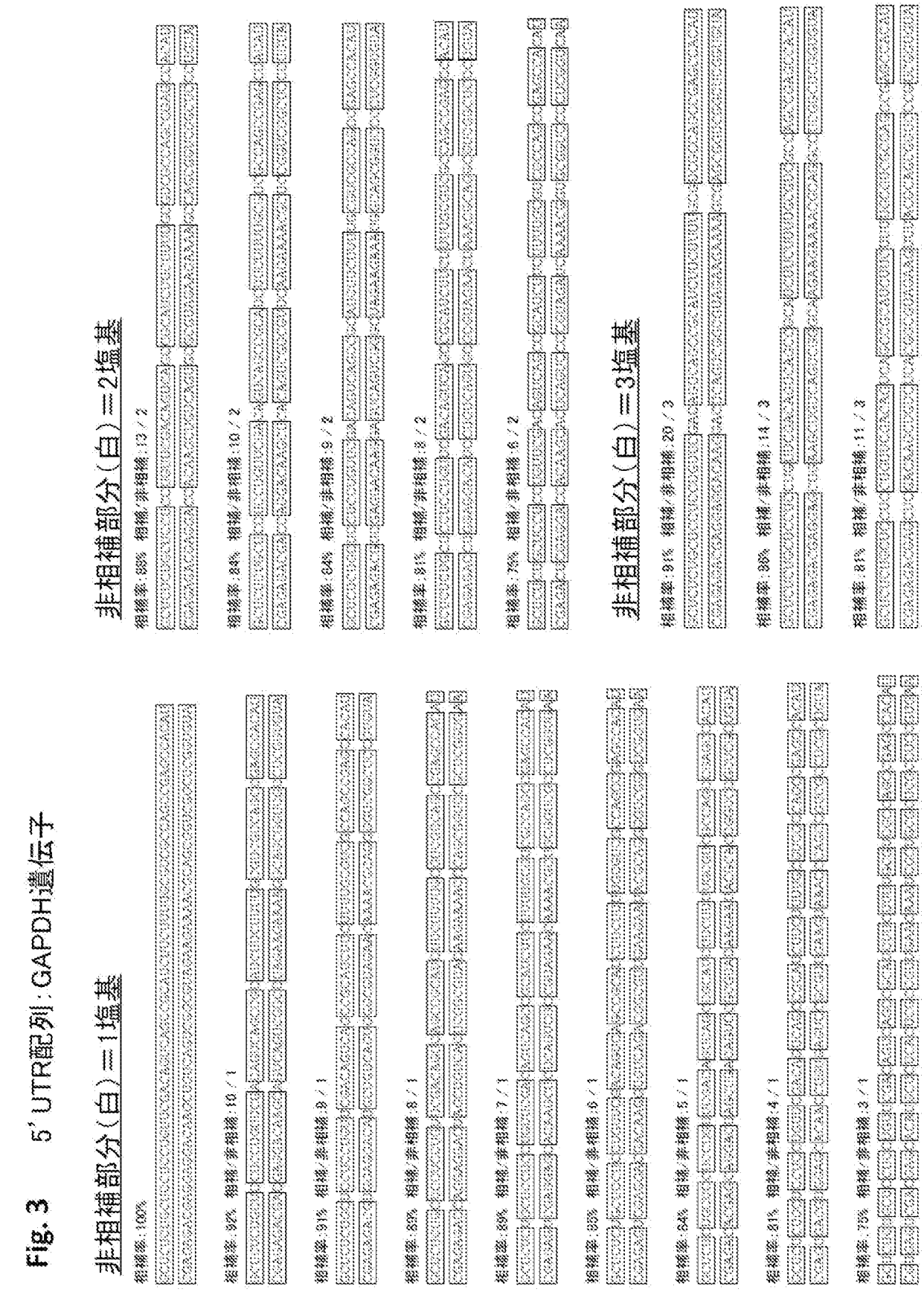

Cap
5' UTR
3' UTR
ORF
AAAAAA
相補率：100%
相補率：94%
相補率：75% #1
相補率：75% #2
相補率：75% #3
相補率：75% #4

Fig. 2

[図3]

Fig. 3 5' UTR配列：GAPDH遺伝子



[図4]

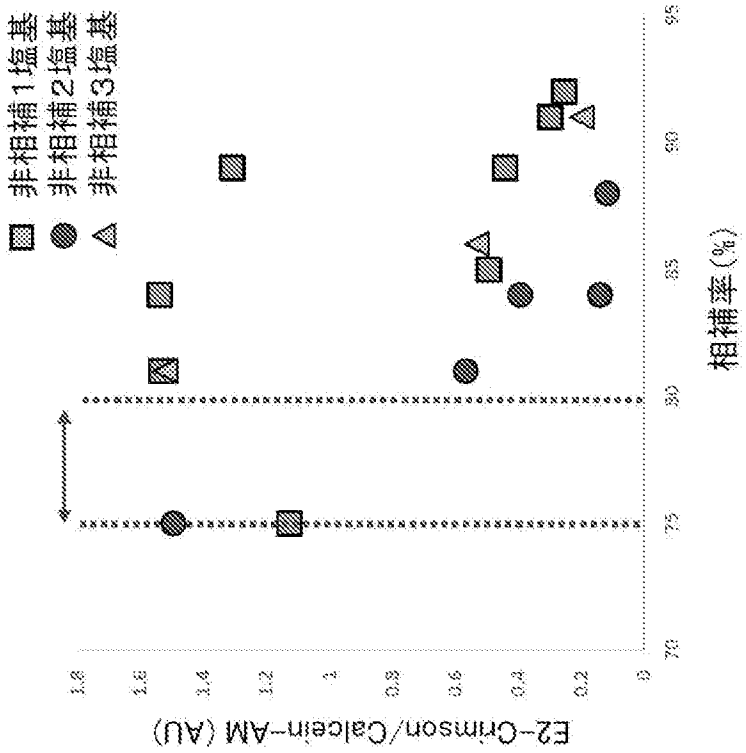
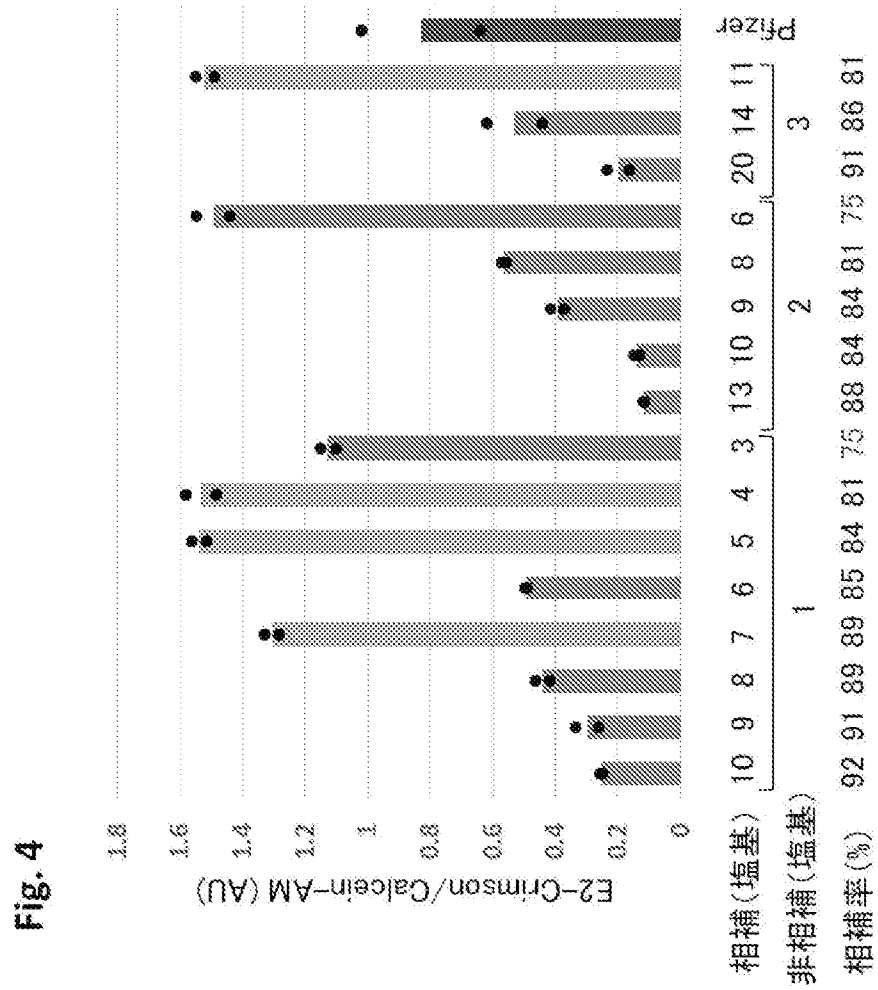
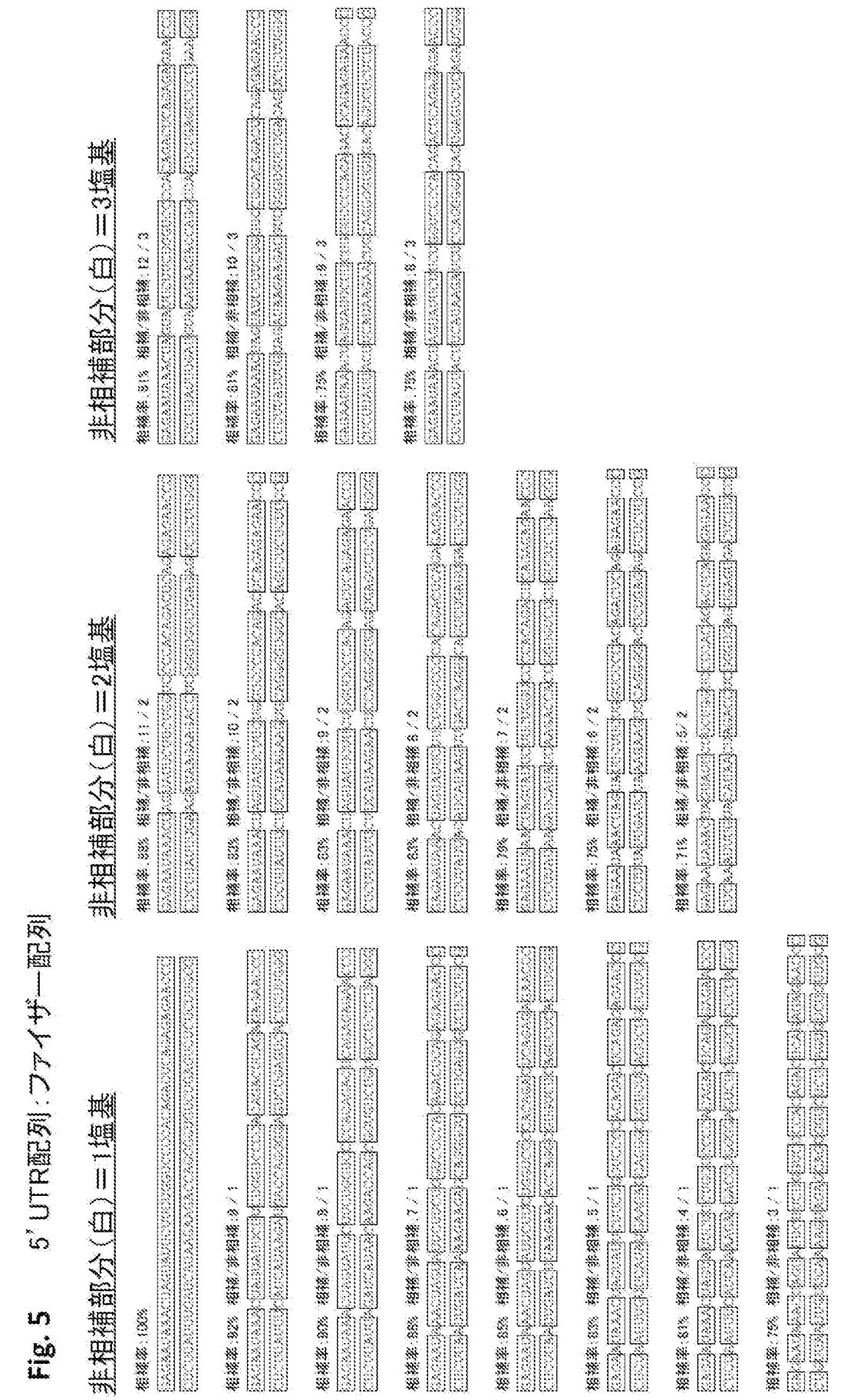

非相補1塩基
非相補2塩基
非相補3塩基
E2-Crimson/Calcein-AM (AU)
相補率(%)

Fig. 4


E2-Crimson/Calcein-AM (AU)
相補(塩基)
非相補(塩基)
相補率(%)
Pfizer

[図5]

Fig. 5 5' UTR配列：ファイザー配列



[図6]

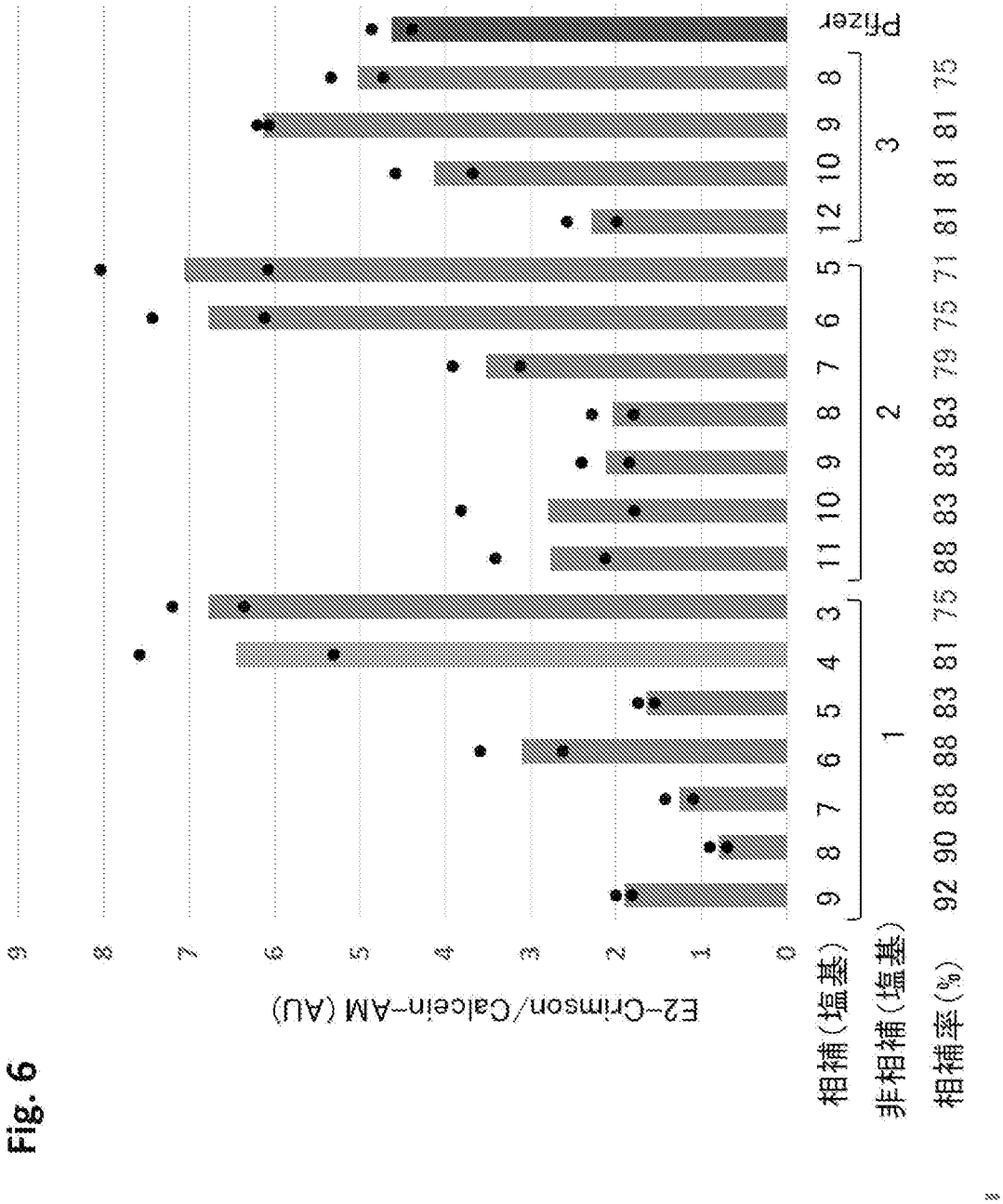
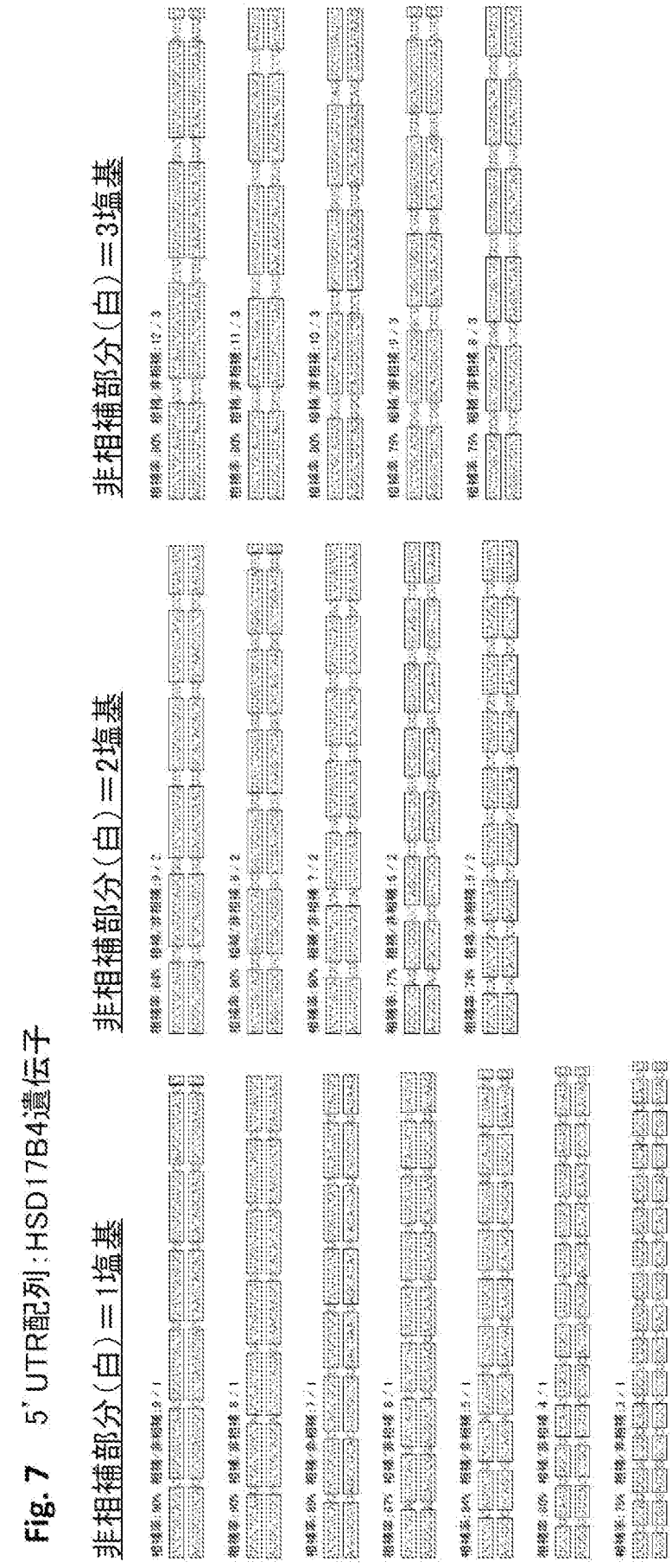

E2-Crimson/Calcein-AM (AU)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
相補(塩基)
非相補(塩基)
相補率(%)
9 8 7 6 5 4 3 11 10 9 8 7 6 5 12 10 9 8
92 90 88 88 83 81 75 88 83 83 79 75 71 81 81 81 75
1
2
3
Pfizer

Fig. 6

[図7]

Fig. 7 5'UTR配列：HSD17B4遺伝子



[図8]

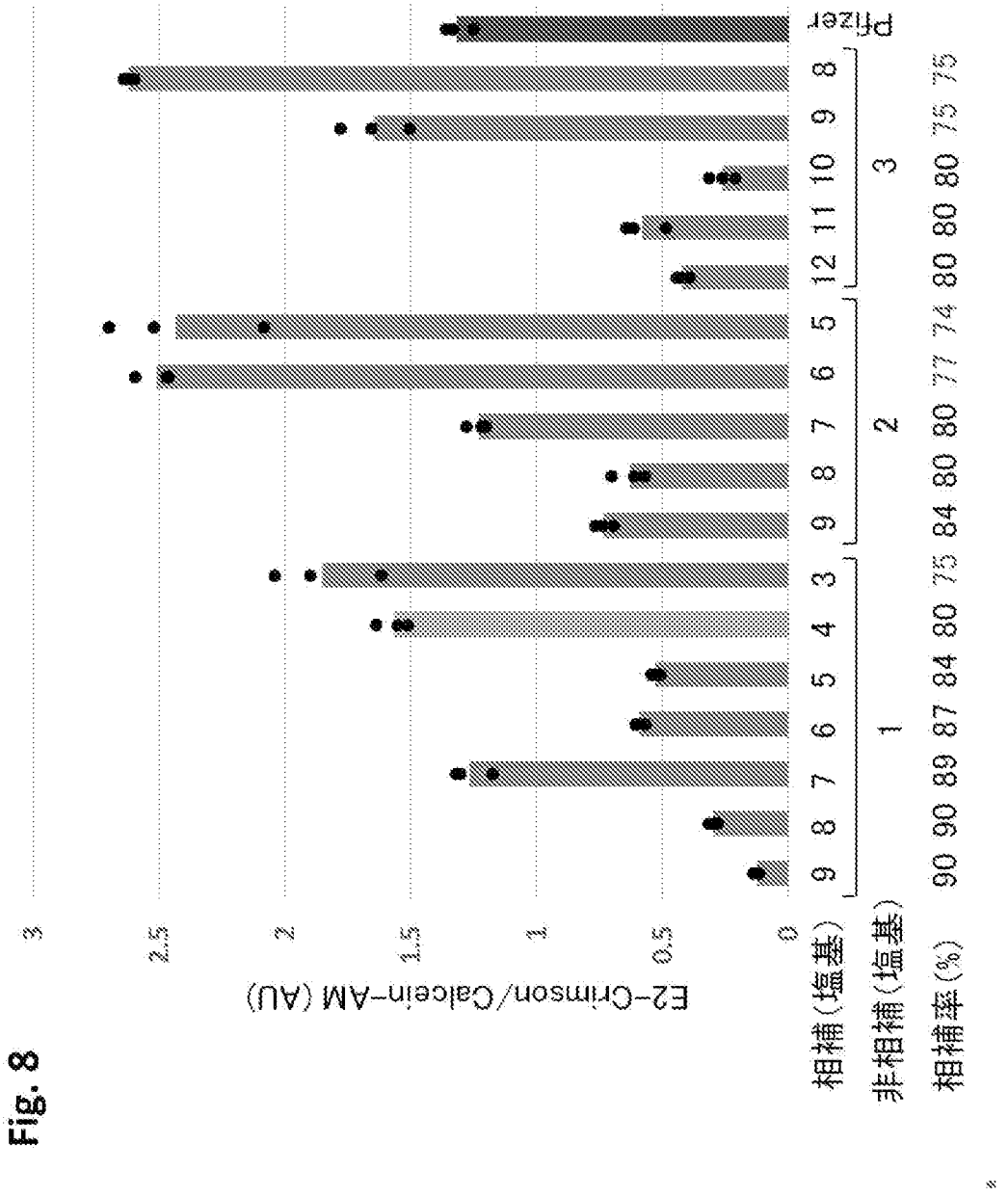
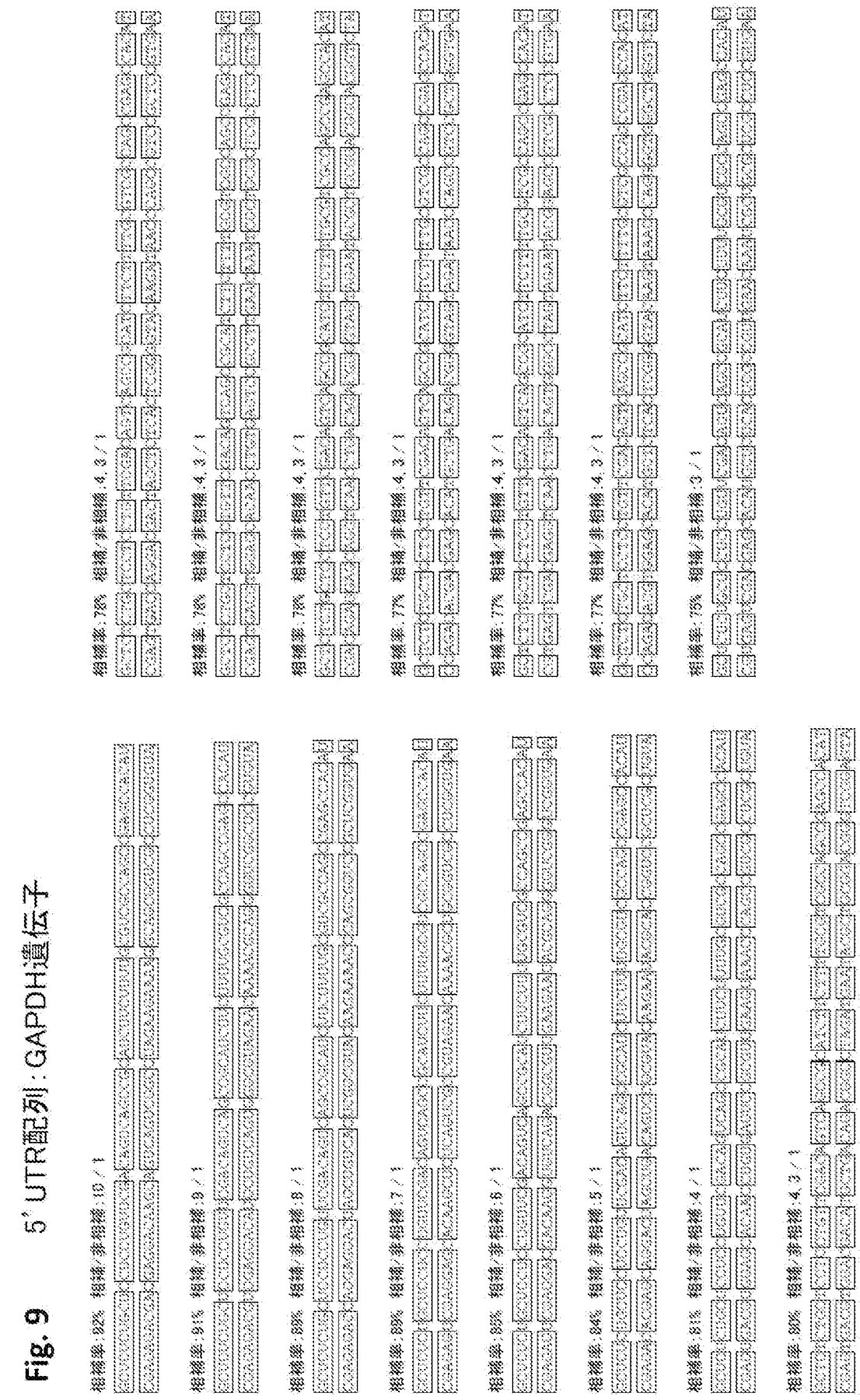

E2-Crimson/Calcein-AM (AU)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
相補(塩基)
非相補(塩基)
相補率(%)
9 8 7 6 5 4 3 9 8 7 6 5 2 9 8 7 6 5 4 3 2 1
90 90 89 87 84 80 75 84 80 80 77 74 80 80 80 75 75
Finger

Fig. 8

[図9]

Fig. 9 5'UTR配列:GAPDH遺伝子



[図10]

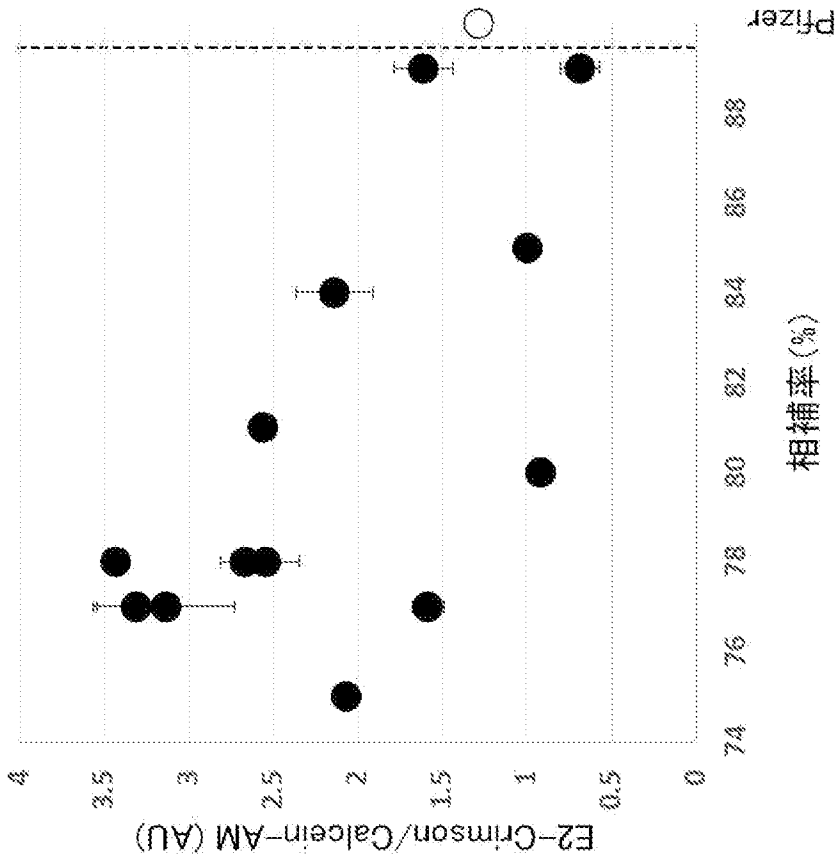
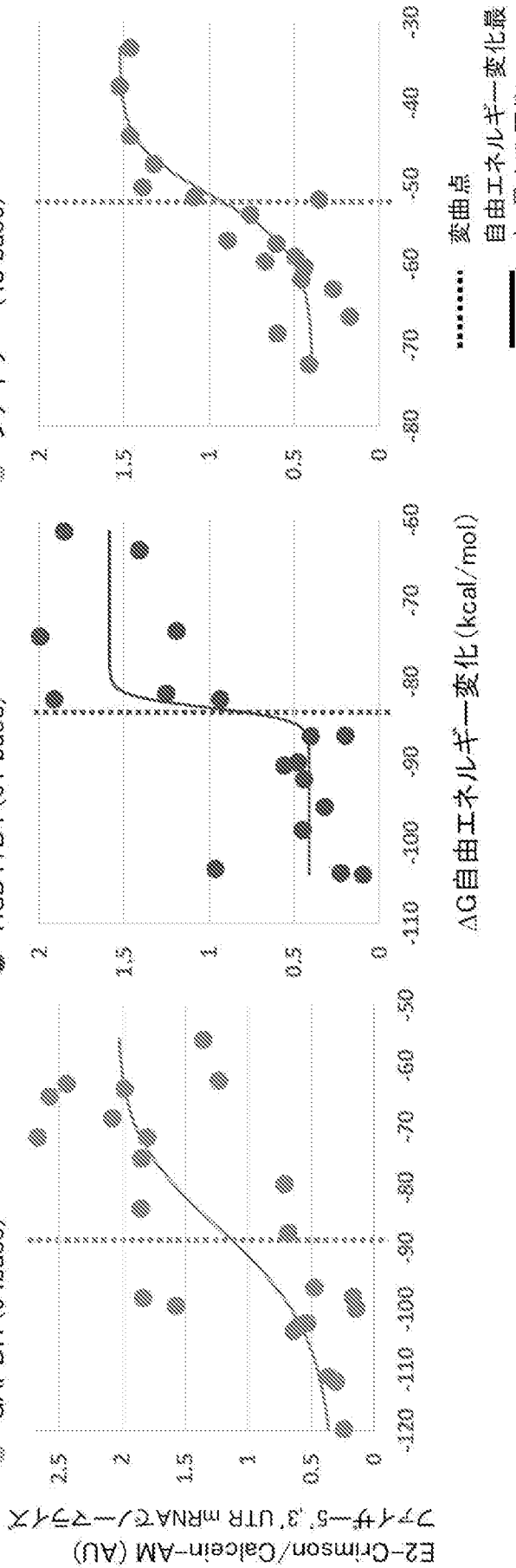

Pfizer
相補率(%)
74
76
78
80
82
84
86
88
E2-Crimson/Calcein-AM (AU)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4

Fig. 10

[図11]

Fig. 11 シグモイド曲線へのフィッティング



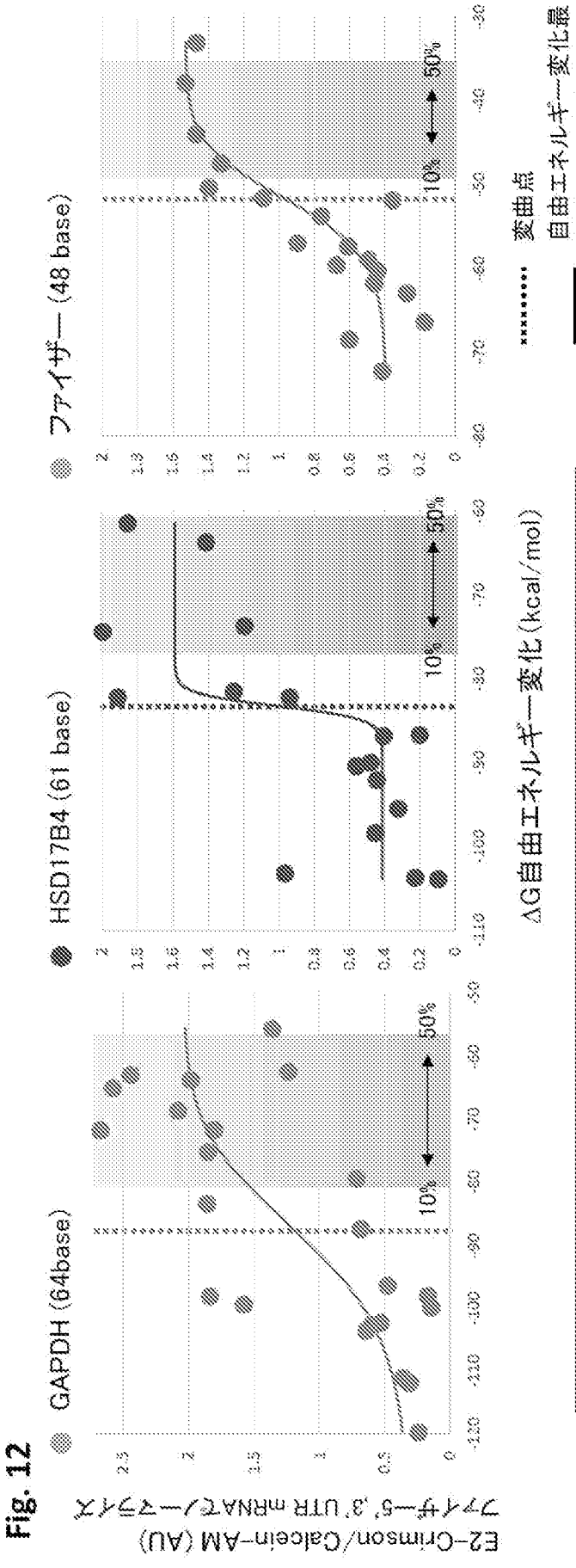
5'UTR		GAPDH	HSD17B4	ファイザー
係数	a	2.03827	1.58691	1.52629
	b	10.45743	108.51179	15.34508
	c	-88.0351	-83.27308	-51.79991
	d	0.29640	0.41246	0.38911

5' UTR	R2相関係数
GAPDH	0.5935
HSD17B4	0.7697
ファイザー	0.8009

係数c：
シグモイド曲線の変曲点となる自由エネルギー（x軸）の値

[図12]

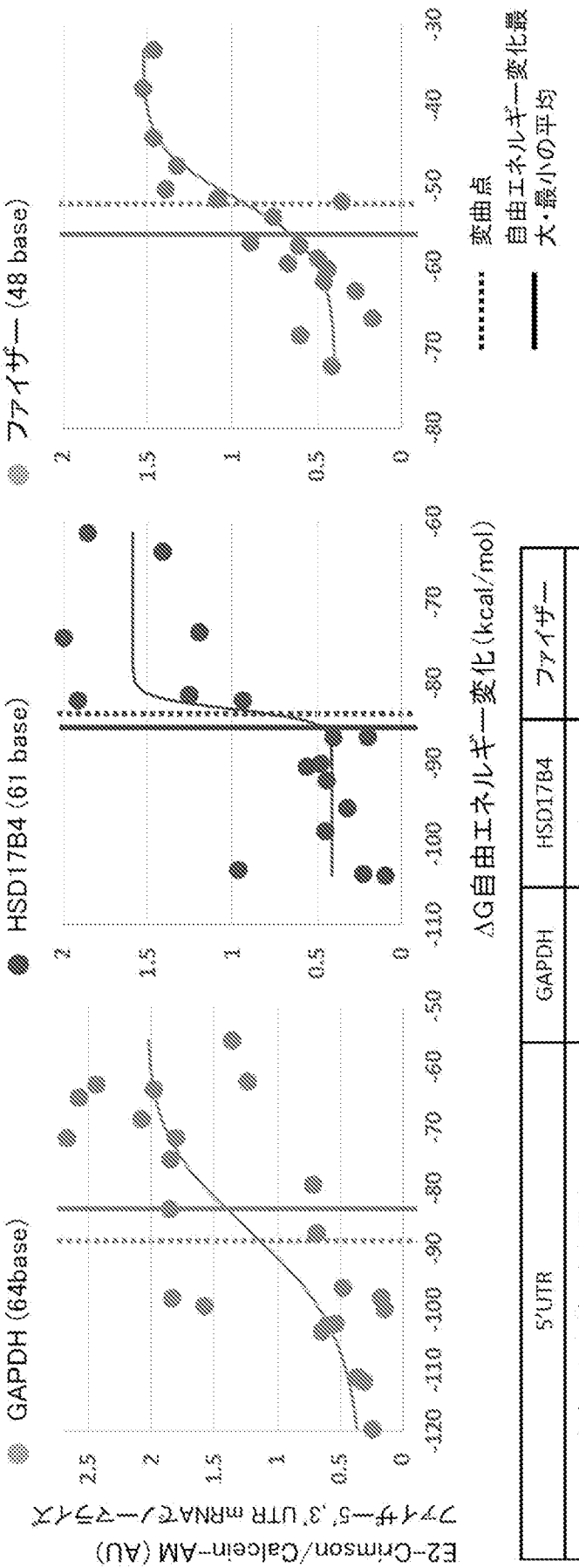
Fig. 12



5'UTR		GAPDH	HSD17B4	ファイザー
自由エネルギー変化最小＊		-141.6	-134.4	-92.3
自由エネルギー変化最大＊＊		-24.6	-36.9	-19.7
自由エネルギー変化最小・最大の平均		-83.1	-85.65	-56.0
シグモイド変曲点		-88.0	-83.4	-51.8
変曲点-最小自由エネルギー変化区間	10%	-81.7	-78.6	-48.6
	50%	-56.3	-60.1	-35.8
発現レベル	最大値	-71.7	-74.4	-37.9
	2nd	-65	-82.2	-33.1
	3rd	-62.9	-61.4	-44

[図13]

Fig. 13



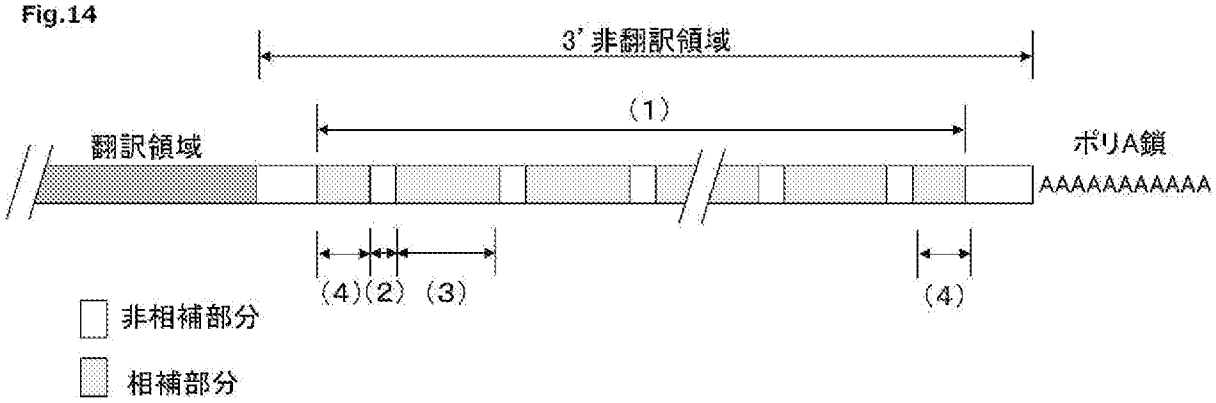
5'UTR		GAPDH	HSD17B4	ファイザー
自由エネルギー変化最小＊		-141.6	-134.4	-92.3
自由エネルギー変化最大＊＊		-24.6	-36.9	-19.7
自由エネルギー変化最小・最大の平均		-83.1	-85.7	-56.0
シグモイド変曲点		-88.0	-83.4	-51.8
誤差		4.9	2.3	4.2
発現レベル	1st	-71.7	-74.4	-37.9
	2nd	-65	-82.2	-33.1
	3rd	-62.9	-61.4	-44

＊ 自由エネルギー最小： 相補率100%

＊＊ 自由エネルギー最大： 3'UTR全塩基についてミスマッチ置換を行った配列

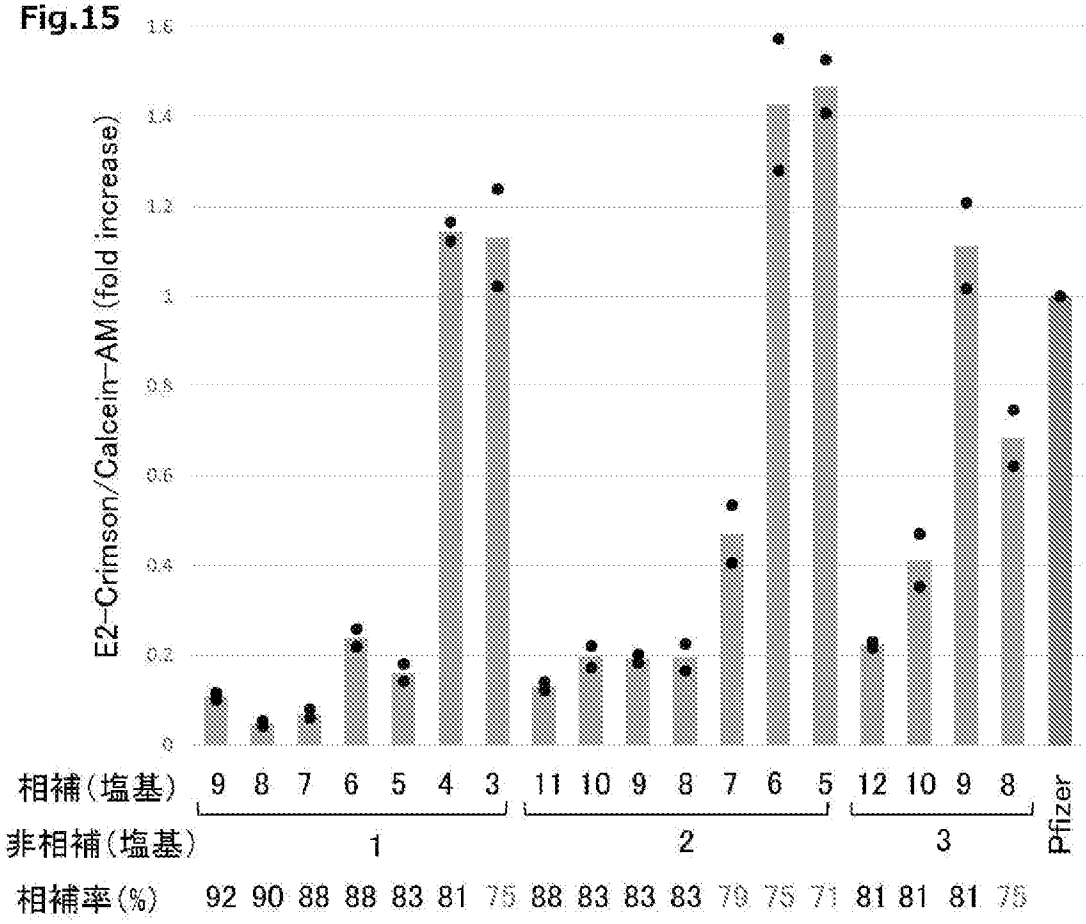
[図14]

Fig.14



[図15]

Fig.15



[図16]

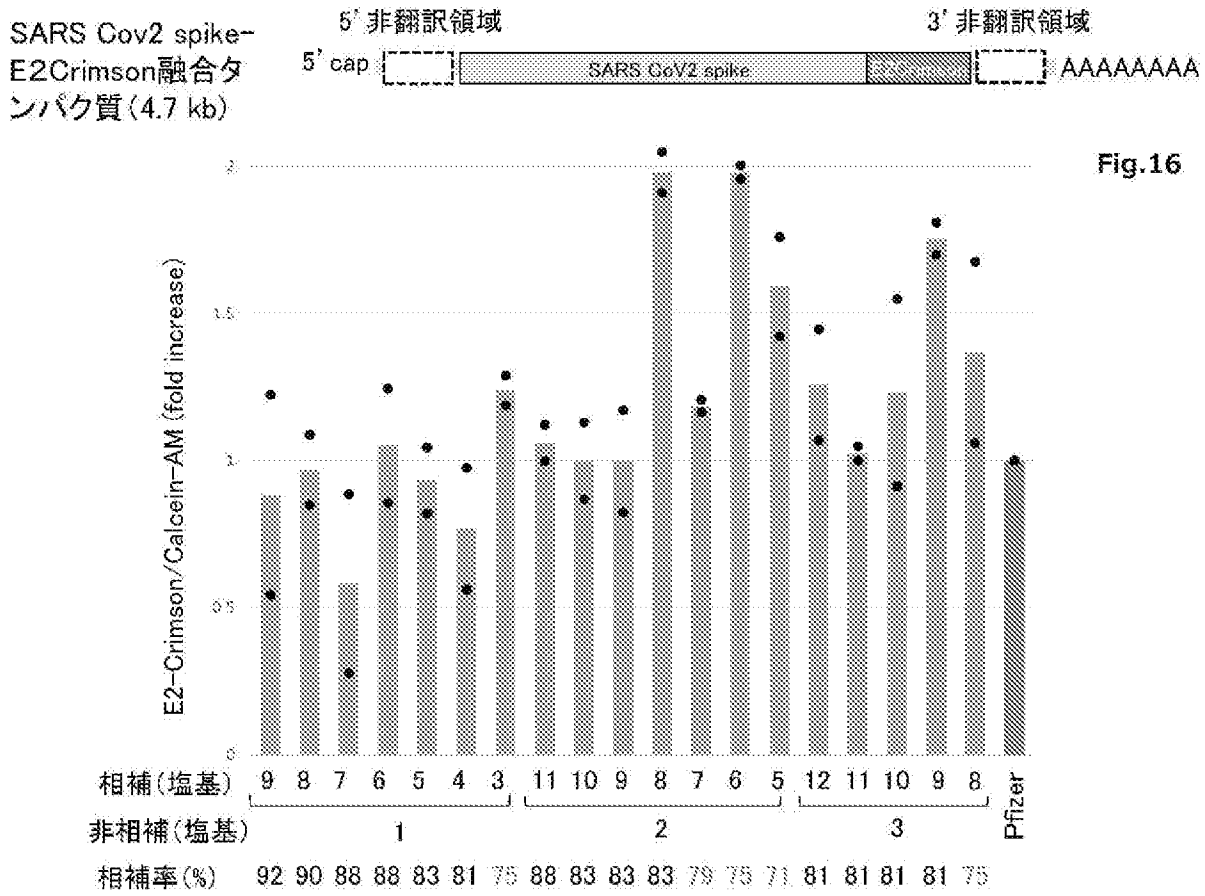
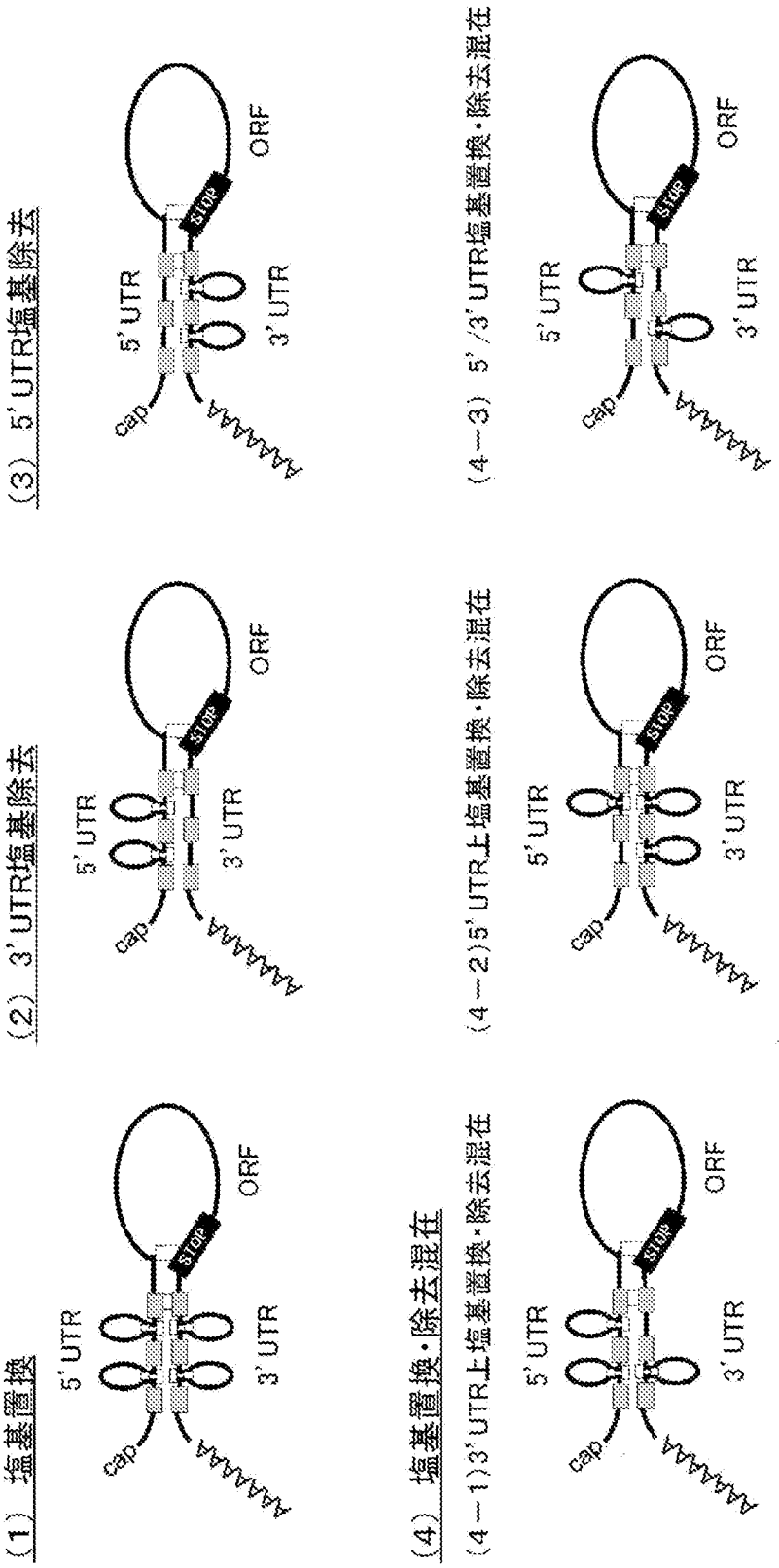
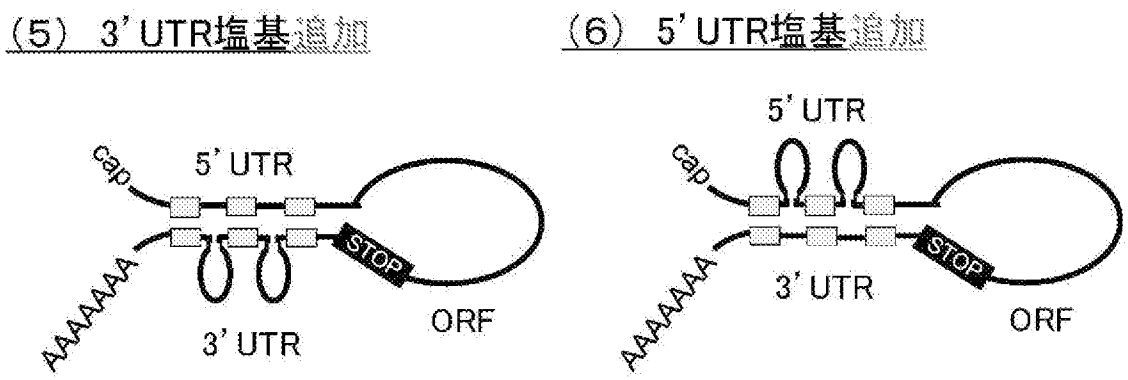

SARS Cov2 spike-E2Crimson融合タンパク質(4.7 kb)
5' 非翻訳領域
3' 非翻訳領域
5' cap
SARS CoV2 spike
AAAAAAAA
E2-Crimson/Calcein-AM (fold increase)
相補(塩基)
非相補(塩基)
相補率(%)
9 8 7 6 5 4 3 11 10 9 8 7 6 5 12 11 10 9 8
1
2
3
Pfizer
92 90 88 88 83 81 75 88 83 83 83 79 75 71 81 81 81 81 75

Fig.16

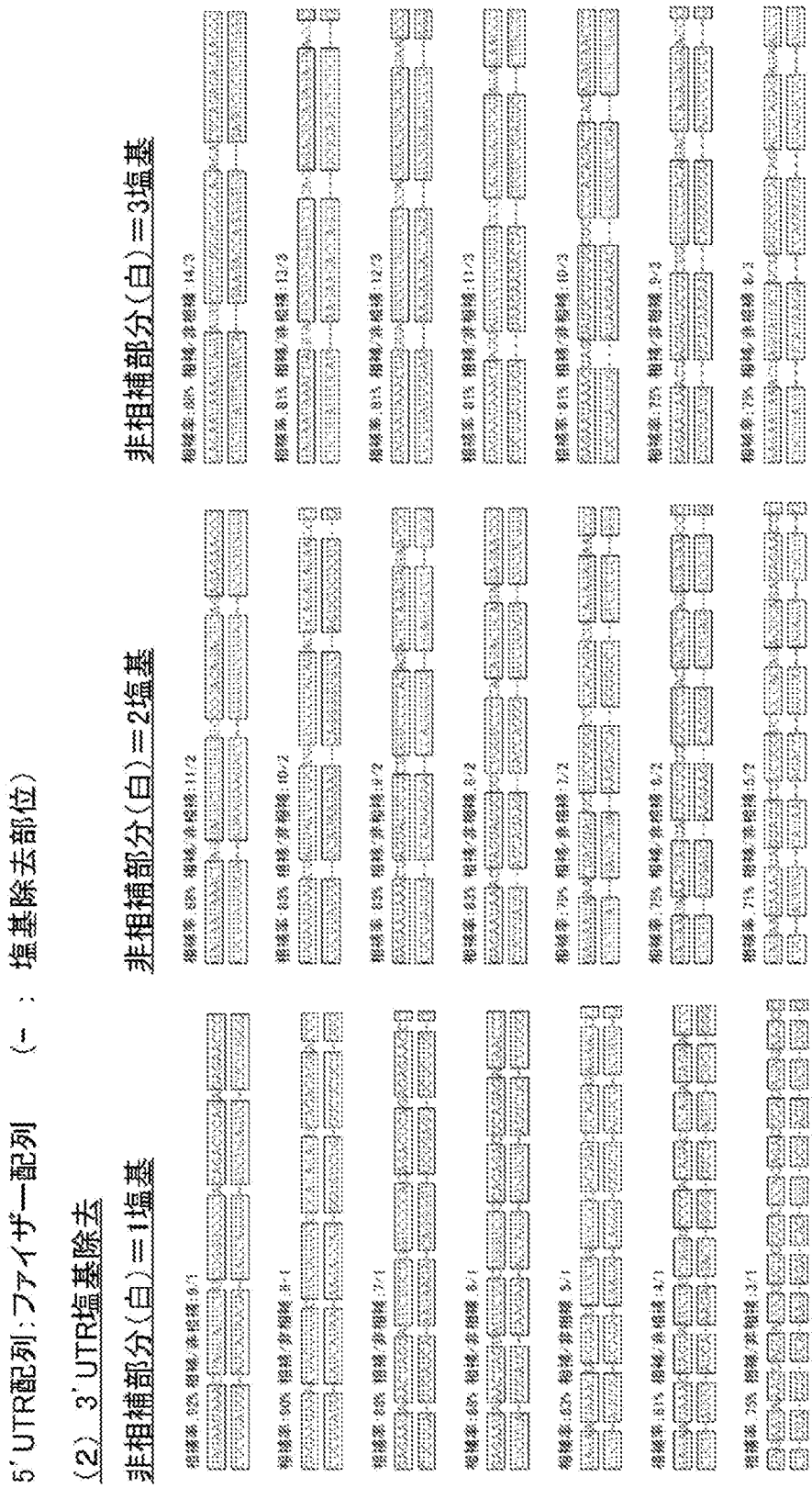
[図17A]


(1) 塩基置換
(2) 3'UTR塩基除去
(3) 5'UTR塩基除去
(4) 塩基置換・除去混在
(4－1)3'UTR上塩基置換・除去混在
(4－2)5'UTR上塩基置換・除去混在
(4－3) 5'/3'UTR塩基置換・除去混在
5'UTR
3'UTR
ORF
STOP
cap
AAAAAA

[図17B]


(5) 3'UTR塩基追加
cap
5' UTR
STOP
AAAAAAA
3' UTR
ORF
(6) 5'UTR塩基追加
5' UTR
cap
STOP
AAAAAAA
3' UTR
ORF

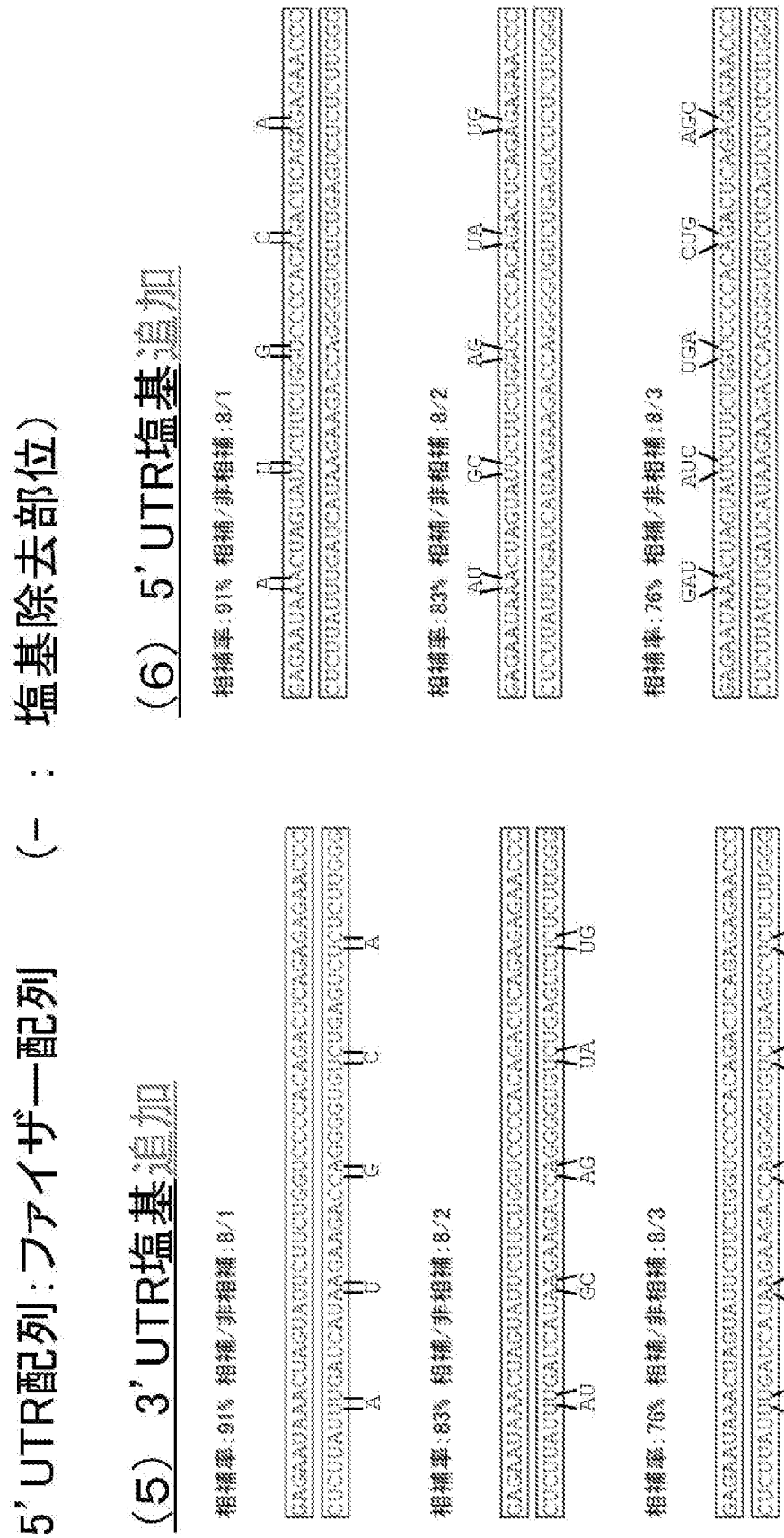
[図18A]


5'UTR配列:ファイザー配列 (－ ；塩基除去部位)
(2) 3'UTR塩基除去
非相補部分(白)＝1塩基
非相補部分(白)＝2塩基
非相補部分(白)＝3塩基

[図18B]

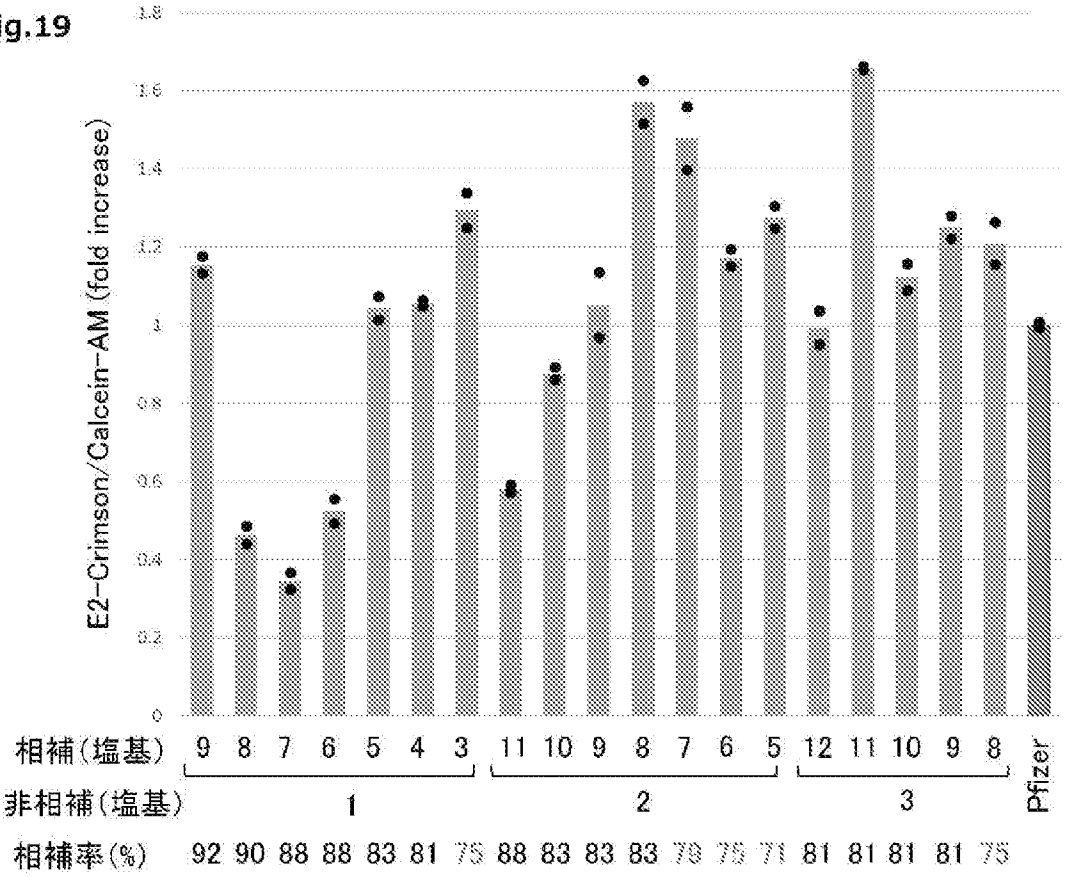
5'UTR配列:ファイザー配列 (~ : 塩基除去部位)
(3) 5'UTR塩基除去
(4) 塩基置換・除去混在
(4−1)3'UTR上塩基置換・除去混在
(4−2)5'UTR上塩基置換・除去混在
(4−3) 5'/3'UTR塩基置換・除去混在

[図18C]


5'UTR配列:ファイザー配列 (－ : 塩基除去部位)
(5) 3'UTR塩基追加
相補率:91% 相補/非相補:8/1
相補率:83% 相補/非相補:8/2
相補率:76% 相補/非相補:8/3
(6) 5'UTR塩基追加
相補率:91% 相補/非相補:8/1
相補率:83% 相補/非相補:8/2
相補率:76% 相補/非相補:8/3

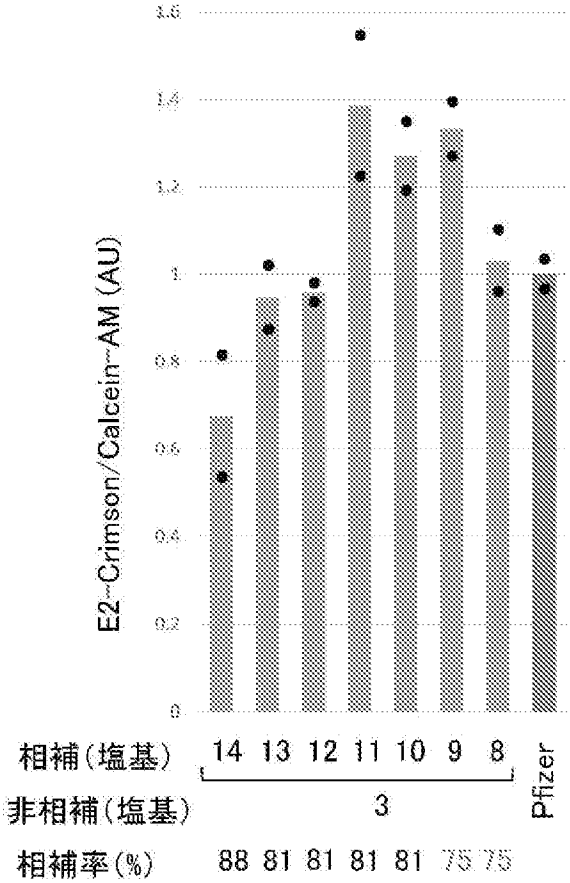
[図19]

Fig.19



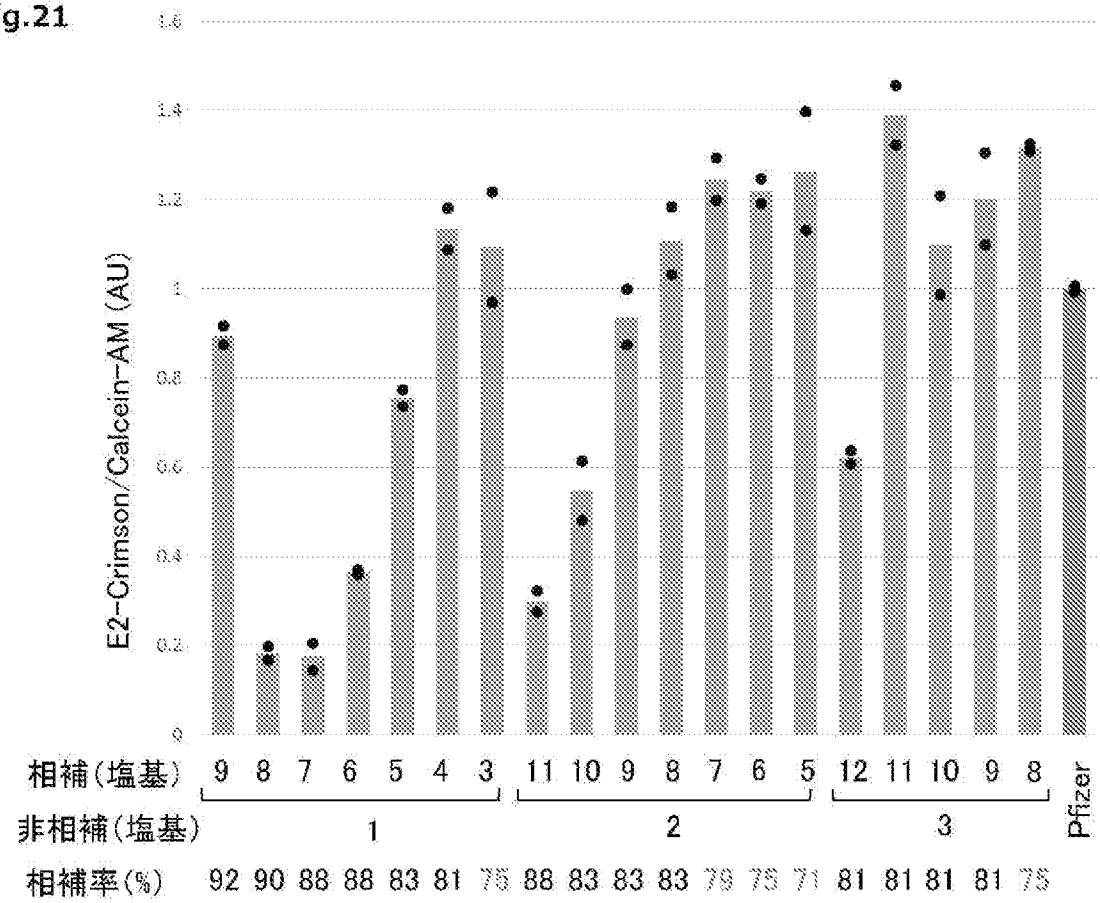
[図20]

Fig.20



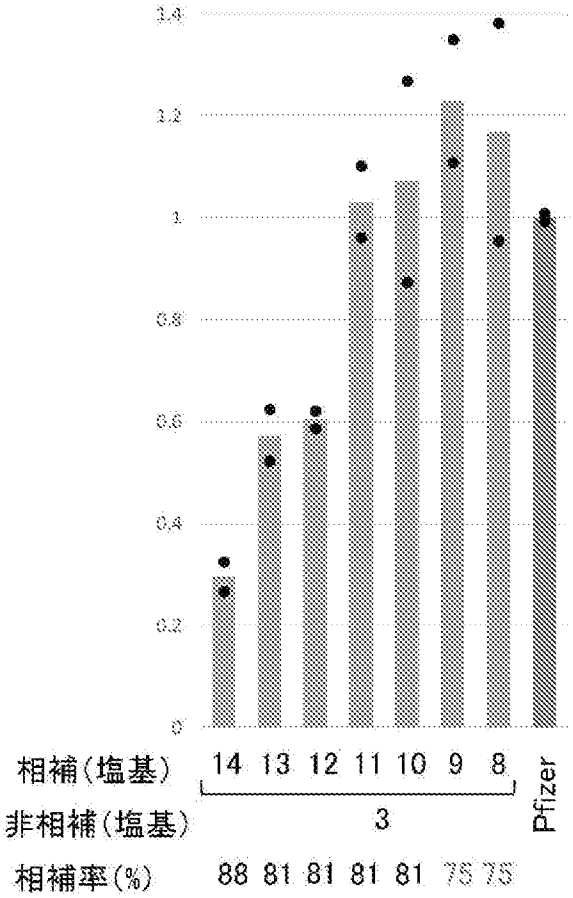
[図21]

Fig.21


E2-Crimson/Calcein-AM (AU)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
相補(塩基) 9 8 7 6 5 4 3 11 10 9 8 7 6 5 12 11 10 9 8
非相補(塩基) 1 2 3
相補率(%) 92 90 88 88 83 81 75 88 83 83 83 79 75 71 81 81 81 81 75
Pfizer

[図22]

Fig.22


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
相補(塩基) 14 13 12 11 10 9 8 Pfizer
非相補(塩基) 3
相補率(%) 88 81 81 81 81 75 75

[図23]

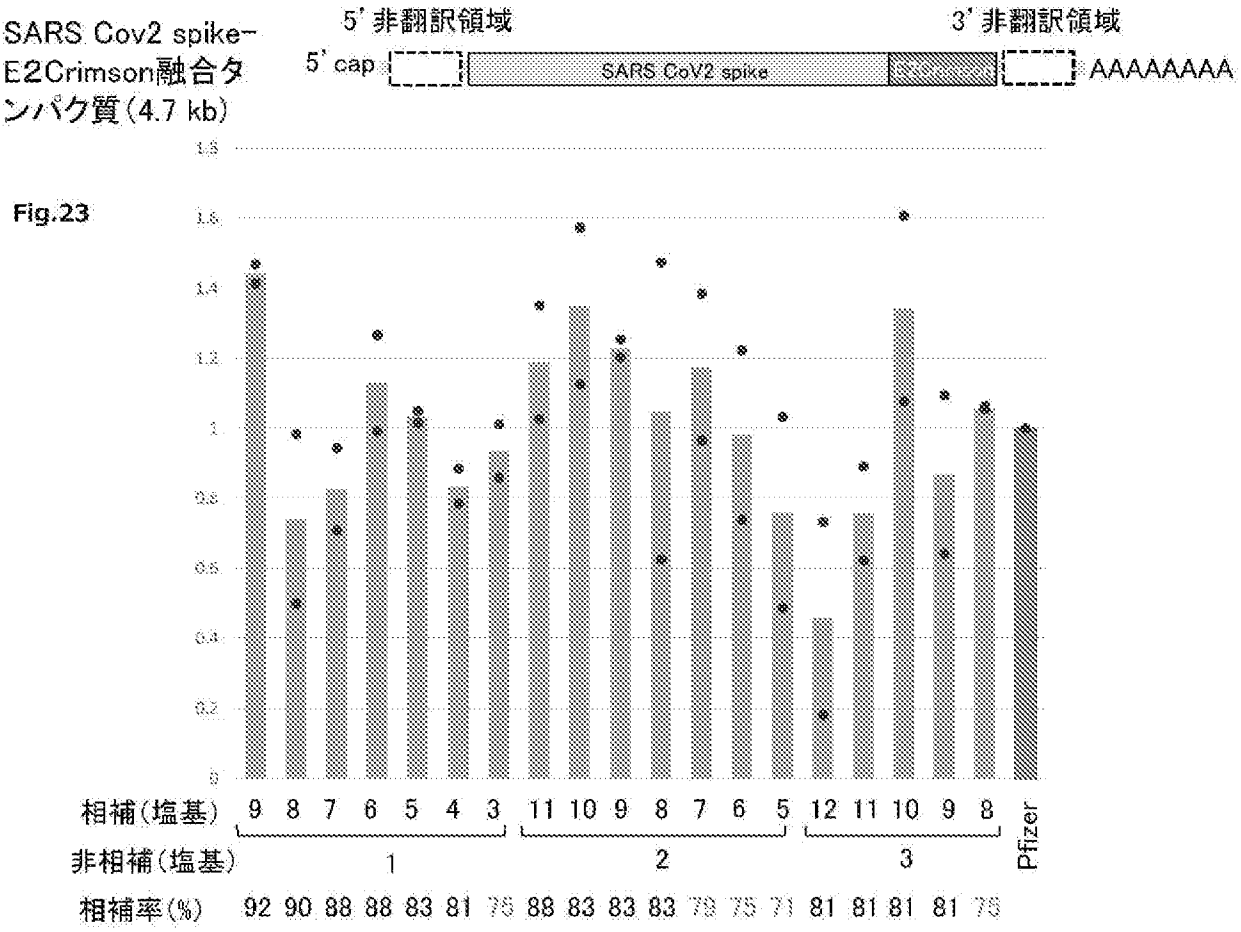
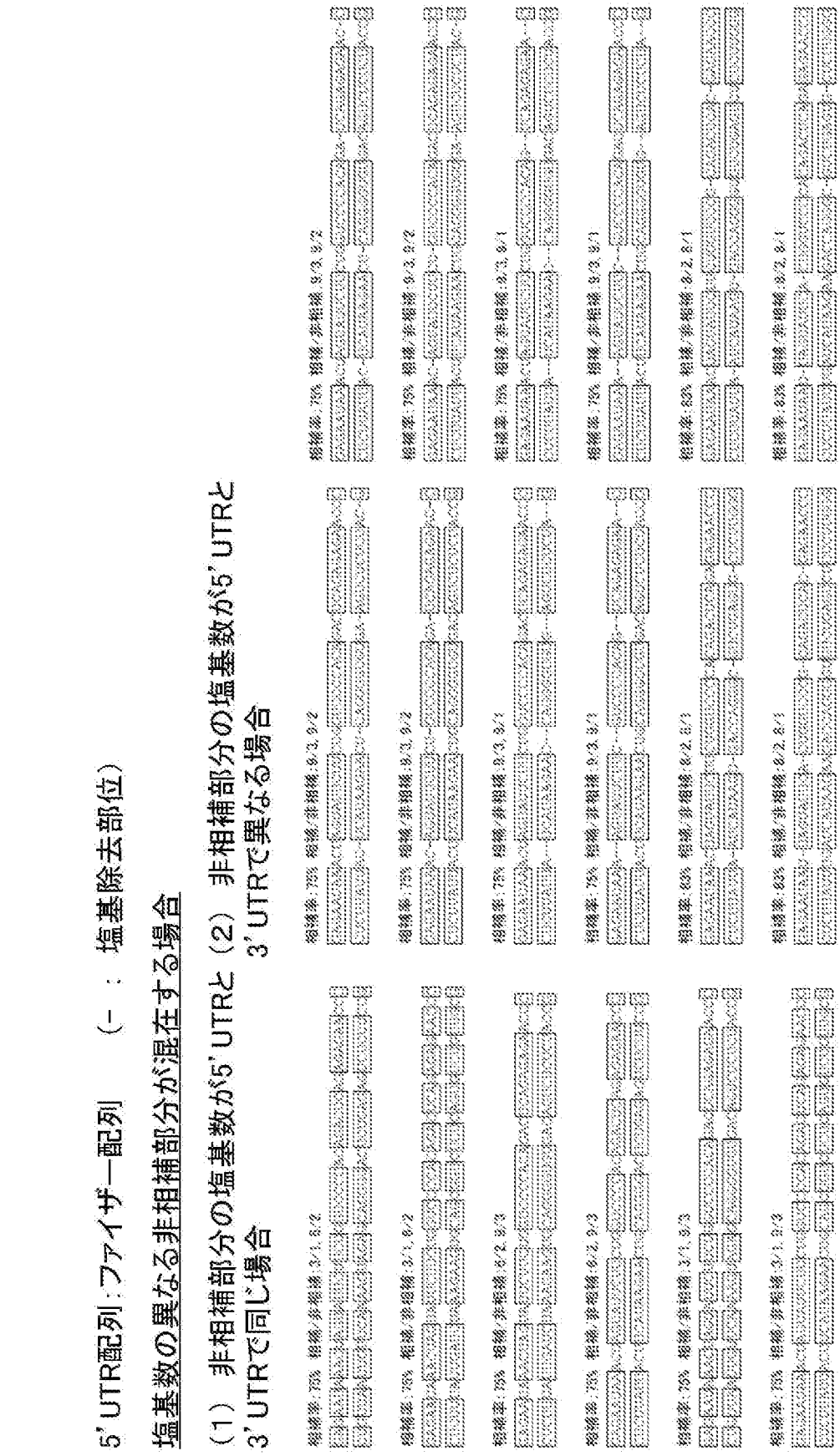

SARS Cov2 spike-E2Crimson融合タンパク質(4.7 kb)
5' 非翻訳領域
3' 非翻訳領域
5' cap
SARS CoV2 spike
AAAAAAAA
相補(塩基) 9 8 7 6 5 4 3 11 10 9 8 7 6 5 12 11 10 9 8
非相補(塩基) 1 2 3
相補率(%) 92 90 88 88 83 81 78 88 83 83 83 79 75 71 81 81 81 81 78
Pfizer

Fig.23

[図24]


5'UTR配列：ファイザー配列 （－ ： 塩基除去部位）
塩基数の異なる非相補部分が混在する場合
（1） 非相補部分の塩基数が5'UTRと3'UTRで同じ場合
（2） 非相補部分の塩基数が5'UTRと3'UTRで異なる場合

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/002945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/11(2006.01)i
FI: C12N15/11 Z ZNA

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)

C12N15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/075567 A1 (NAGOYA CITY UNIVERSITY) 22 April 2021 (2021-04-22) claims, examples	1-20, 27
Y	claims, examples	21-27
Y	田中宏昌他. R-STEINER: mRNA高翻訳化のための5'UTR生成手法. DEIM Forum 2018. 2018, F5-4, non-official translation (TANAKA, Hiromasa et al. R-STEINER: 5'UTR Generation Method for High mRNA Translation.) "4.R-STEINER" column	21-27
A	"4.R-STEINER" column	1-20
A	稲垣雅仁他. 翻訳反応を最大化するための合成mRNAの分子設計. Drug Delivery System. 2022, vol. 37, no. 3, pp.196-208, (INAGAKI, Masahito et al. Design of Synthetic mRNAs for Highly Efficient Translation.)	1-27

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 March 2024	**02 April 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/002945

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/002945

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021/075567 A1	22 April 2021	EP 4047084 A1 claims, examples	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/002945

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/11(2006.01)i
FI: C12N15/11 Z ZNA

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））

C12N15/11

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	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

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); CAplus/MEDLINE/EMBASE/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	WO 2021/075567 A1 (公立大学法人名古屋市立大学) 22.04.2021 (2021-04-22) 特許請求の範囲、実施例	1-20,27
Y	特許請求の範囲、実施例	21-27
Y	田中　宏昌他, R-STEINER: mRNA 高翻訳化のための５’UTR生成手法, DEIM Forum 2018 , 2018, F5-4 「4.R-STEINER」の欄	21-27
A	「4.R-STEINER」の欄	1-20
A	稲垣　雅仁他, 翻訳反応を最大化するための合成mRNAの分子設計, Drug Delivery System, 2022, 37-3, p.196-208	1-27

☐ 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
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
19.03.2024	02.04.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

松原　寛子 4B 4154

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/002945

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/002945

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2021/075567 A1	22.04.2021	EP 4047084 A1 claims, examples	

様式 PCT/ISA/210（パテントファミリー用別紙）（２０２２年７月）