

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-504479
(P2025-504479A)

(43)公表日 令和7年2月12日(2025.2.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/10	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/52 (2006.01)	C 1 2 N	15/52	Z Z N A	
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10		
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全34頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-543154(P2024-543154)	(71)出願人	515131390
(86)(22)出願日	令和5年1月20日(2023.1.20)		ヴァーヘニンゲン ユニバーシテイ
(85)翻訳文提出日	令和6年9月19日(2024.9.19)		オランダ国, エヌエル - 6 7 0 8 ピー
(86)国際出願番号	PCT/NL2023/050024		ビー ヴァーヘニンゲン, ドロエベンダー
(87)国際公開番号	WO2023/140731		ールセステーク 4
(87)国際公開日	令和5年7月27日(2023.7.27)	(74)代理人	100079108
(31)優先権主張番号	22152542.1		弁理士 稲葉 良幸
(32)優先日	令和4年1月20日(2022.1.20)	(74)代理人	100109346
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 大貫 敏史
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)	(74)代理人	100117189
	最終頁に続く		弁理士 江口 昭彦
		(74)代理人	100134120
			弁理士 内藤 和彦
		(72)発明者	スティーンズ, アイコ ジュレ
			オランダ国, ヴァーヘニンゲン 6 7 0 1
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 熱安定性RNAポリメラーゼ

(57)【要約】

本発明は、配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質、及びインビトロ転写法におけるその使用に関する。本発明はさらに、タンパク質をコードする核酸分子及びタンパク質を発現する宿主細胞に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鋳型核酸分子を、リボ核酸ヌクレオチド（rNTP）及び好適な緩衝液の存在下で、配列番号 1 と少なくとも 50 % の配列同一性を有するタンパク質とともにインキュベートすることと；

30℃～80℃の温度で転写反応を実施することによって、前記鋳型核酸分子の少なくとも一部をRNA分子に転写することと、
を含む、方法。

【請求項 2】

前記鋳型核酸分子が、デオキシリボ核酸（DNA）鋳型分子である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記緩衝液が、25～200mMのNaClを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記転写反応が、45℃～75℃の温度で実施される、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記鋳型核酸分子が、ブレ増幅反応によって生成されていた、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記転写されたRNA分子が、さらに、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）－CRISPR関連（Cas）タンパク質ベースの核酸検出系とともにインキュベートされる、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記CRISPR－Cas核酸検出系が、

a) III型Casタンパク質及び標的RNA分子に結合する少なくとも1つのCRISPR RNA（crRNA）を含むエフェクター複合体；

b) 環状オリゴアデニル酸（cOA）のレベルを直接的に又は間接的に測定するための手段

を含む、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記ブレ増幅反応、転写反応及び核酸検出系とのインキュベーションが全て、ワンポット反応で実施される、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】

配列番号 1 との少なくとも 50 % の配列同一性を有するタンパク質。

【請求項 10】

好適なタグを含む、請求項 9 に記載のタンパク質。

【請求項 11】

請求項 9 又は 10 に記載のタンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 12】

前記タンパク質の好適な宿主細胞内での発現のため、コドン最適化される、請求項 11 に記載の核酸分子。

40

【請求項 13】

請求項 9 又は 10 に記載のタンパク質を発現する宿主細胞。

【請求項 14】

転写反応を実施して、鋳型核酸分子の少なくとも一部をRNA分子に転写するための、請求項 9 又は 10 に記載のタンパク質の使用。

【請求項 15】

前記転写反応が、30℃～80℃の温度で、好ましくは、45℃～75℃の温度で実施される、請求項 14 に記載の使用。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本発明は、インビトロ転写のため、及び診断方法における、新規な熱安定性RNAポリメラーゼ(thermostable RNA polymerase)、及びその使用を対象とする。

【背景技術】

【0002】

1 はじめに

インビトロ転写(IVT)反応は通常、プロモーターを含む鋳型核酸分子、リボヌクレオチド三リン酸、DTT及びマグネシウムイオンを含む緩衝系、並びに適切なリボ核酸(RNA)ポリメラーゼを必要とする。前記RNAポリメラーゼは、SP6、T3及びT7などの単一サブユニットのバクテリオファージ由来のRNAポリメラーゼから選択されることが多い。転写は、RNAポリメラーゼのそのプロモーター配列への結合によって開始され、続いて、鋳型鎖の活性部位への供与、RNA転写物の生成、及び転写反応の終結がなされる。

【0003】

IVTのためのその使用に加えて、RNAポリメラーゼは、核酸増幅方法において、特に診断を目的として使用されることが多い。例えば、核酸配列ベースの増幅(NASBA; 米国特許第5654142A号)及び転写媒介性増幅(TMA; 国際公開第1991001384A1号)は、RNAポリメラーゼ及び逆転写酵素が等温条件下で相互の鋳型を連続的に生成しているような交互サイクルを含む。増幅後、相補的オリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションは、例えば、定量リアルタイムPCRとも称される定量PCRにおいて使用されると、検出可能な標識を介した検出を可能にし得る。さらに、特定のクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)-CRISPR関連(Cas)タンパク質ベースの核酸検出系では、RNA中間体が利用される(Steens et al., 2021. Nature Comm 12:1-12)。

【0004】

反応温度が増加し、反応速度が改善され得る場合、それは有利となる。例えば、等温増幅の反応温度が増加する場合、二次構造を有するRNAを増幅することは可能であり得る。しかし、野生型バクテリオファージ由来のRNAポリメラーゼより高い熱安定性を示すRNAポリメラーゼ変異体が同定されたとしても(Boulain et al., 2013. Protein Eng Des Sel. 26(11):725-734)、65℃で5分を超えるインキュベーション後に活性を維持するようなRNAポリメラーゼは、現在市販されていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、より高い反応温度で改善された安定性及び活性を有するRNAポリメラーゼが求められている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

2 発明の簡単な説明

本発明は、鋳型核酸分子を、リボ核酸ヌクレオチド(rNTP)及び好適な緩衝液の存在下で、配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質とともにインキュベートすることと; 30℃~80℃の温度で転写反応を実施することによって、前記鋳型核酸分子の少なくとも一部をRNA分子に転写することと、を含む方法を提供する。前記鋳型核酸分子は、好ましくは、デオキシリボ核酸(DNA)鋳型分子であり、一本鎖又は二本鎖DNA鋳型分子のいずれかである。前記緩衝液は、好ましくは、25~200mMのNaClを含む。前記転写反応は、好ましくは、45℃~75℃の温度で実施される。鋳型核酸分子は、任意の手段によって、例えば、プレ増幅反応によって作製されてい

10

20

30

40

50

もよい。

【0007】

転写されたRNA分子は、さらに、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）-CRISPR関連（Cas）タンパク質ベースの核酸検出系とともにインキュベートしてもよい。前記CRISPR-Cas核酸検出系は、好ましくは、a）III型Casタンパク質及び標的RNA分子に結合する少なくとも1つのCRISPR RNA（crRNA）を含むエフェクター複合体；b）環状オリゴアデニル酸（cOA）のレベルを直接的に又は間接的に測定するための手段を含む。本発明の好ましい方法では、プレ増幅反応、転写反応及び核酸検出系とのインキュベーションは全て、ワンポット反応で実施される。

10

【0008】

本発明は、配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質をさらに提供する。前記タンパク質は、好ましくは、好適なタグを含む。

【0009】

本発明は、本発明のタンパク質をコードする核酸分子をさらに提供する。前記核酸分子は、好ましくは、好適な宿主細胞内での前記タンパク質の発現のため、コドン最適化される。

【0010】

本発明は、本発明のタンパク質を発現する宿主細胞をさらに提供する。

【0011】

本発明は、転写反応を実施して、鋳型核酸分子の少なくとも一部をRNA分子に転写するための本発明のタンパク質の使用をさらに提供する。前記転写反応は、好ましくは、30℃～80℃の温度、好ましくは、45℃～75℃の温度で実施される。

20

【図面の簡単な説明】

【0012】

3 図面の簡単な説明

【図1】IVTの場合のPhiFa__44の基質特異性。使用されるマーカーは、NEB低範囲ssRNA（NEB#N0364S）である。

【図2】様々なNaCl濃度及び温度下のPhiPa__44のIVT性能の分析。A：鋳型のみ、デオキシリボヌクレアーゼなし。B：鋳型のみ、デオキシリボヌクレアーゼを伴う。C：PhiFaのみ、デオキシリボヌクレアーゼを伴う。

30

【図3】SARS-CoV-2ワンポット反応。

【図4】一本鎖（ss）DNA鋳型A及びBを使用するインビトロ転写反応。「+」は、PhiFaタンパク質の存在を表す一方で、「-」は、その不在を表す。

【図5】鋳型として5' 蛍光標識（Cy3）一本鎖DNA（50ヌクレオチド）を使用する、インビトロPhiFa-44 RNA転写アッセイ。1つの反応物が、リボヌクレアーゼH処理を受けた。全ての生成物が、天然の4～20%（w/v）ポリアクリルアミドゲルで分析された。蛍光ゲル走査を使用して、核酸が選択的に可視化された。Cy3フィルターのみが、Cy3標識反応生成物を示す（左）一方で、SYBR Gold染色及びそれに続くCy2フィルターによる可視化が、全ての核酸を示す（右）。

40

【発明を実施するための形態】

【0013】

4 発明の詳細な説明

4.1 定義

「PhiFa__44」という用語は、本明細書で使用する場合、配列番号1を有するタンパク質を指す。前記タンパク質は、バクテリオファージPhiFa（GenBank：MH673672.2；分類学ID：1400796）に起源をもち、それは、Sicily, ItalyのEtna山周辺で単離された（Severinov et al., 2014. Bacteriophage 4:e29399, DOI:10.4161/bact.29399）。

【0014】

50

「RNAポリメラーゼ」という用語は、phi Fa__44に関連して本明細書で使用する場合、DNA鋳型からのRNAの相補鎖の合成を触媒するDNA依存性RNAポリメラーゼを指す。

【0015】

「プロモーター」という用語は、本明細書で使用する場合、遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列であって、DNA依存性RNAポリメラーゼなどのRNAポリメラーゼを含む転写開始機構がその上で結合し、転写を開始するヌクレオチド配列を指す。前記プロモーターは、遺伝子の開始コドンの5～100bp上流に位置することが多い。

【0016】

「クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）」という用語は、本明細書で使用する場合、原核微生物のゲノム内のDNAの1つ以上の特殊化された領域を指す。これらの領域は、スペーサー配列が散在しているヌクレオチドリピートの存在によって特徴づけられ、典型的に、約25～約38bpのDNAリピートが、侵入要素との以前の遭遇に由来する、類似長さの固有のスペーサー配列によって分離されるように誘導する(Grissa et al., 2007. BMC Bioinformatics 8:172)。それらは、次の感染時に、これらの侵入者を迅速に攻撃するためのメモリーとして役立つ。ゲノム領域は、CRISPR遺伝子座の近傍に位置する、CRISPR関連（Cas）-エフェクタータンパク質をコードする1つ以上の遺伝子を含む。

10

【0017】

「CRISPR RNA又はcrRNA」という用語は、本明細書で使用する場合、スペーサー配列及び少なくとも5'リピート由来の末端を含む、CRISPR由来のRNA分子を指す。前記crRNAは、好ましくは少なくとも30ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも34ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも40ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも46ヌクレオチドの長さを有する。前記crRNAは、好ましくは1000ヌクレオチド未満、好ましくは200ヌクレオチド未満、好ましくは100ヌクレオチド未満である。前記crRNA分子は、リボ核酸のヌクレオチド類似体、例えば、イノシン、ウリジン、キサンチン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、及び6,8-ジアミノプリンベースのリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドを含んでもよい。

20

【0018】

「CRISPR関連（Cas）エフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、crRNAと会合するタンパク質を指す。CRISPR/Cas系は、ここで2つのクラスに大別される。クラス1系は、マルチサブユニットのCas複合体を使用する一方で、クラス2系は、単一のCasタンパク質を使用することで、その活性を媒介する。クラス1、III型CRISPR-Cas系は、特にRNA配列を標的にするように進化している。これらの系における固有のタンパク質は、クラス1、I型系におけるCas3、クラス2、II型系におけるCas9、クラス1、III型系におけるCas10、クラス2、V型系におけるCas12及びクラス2、VI型系におけるCas13である。

30

【0019】

「エフェクター複合体」という用語は、本明細書で使用する場合、（リボ）ヌクレーアゼ活性を有し、crRNAにおけるスペーサー配列に対する相補的配列を含む侵入核酸配列を切断し、不活性化し得るCRISPR-Casリボ核タンパク質複合体を指す。前記複合体は、少なくとも1つのcrRNA及び少なくとも1つのCasエフェクタータンパク質を含む。

40

【0020】

「逆転写」という用語は、本明細書で使用する場合、RNA鋳型からの相補的DNA（cDNA）の生成を指す。レトロウイルス及びいくつかのレトロトランスポゾン、逆転写酵素と称される酵素をコードし、それらのゲノムを複製する。レトロウイルス逆転写酵素は、3つの一連の生化学的活性：RNA依存性DNAポリメラーゼ活性、リボヌクレー

50

ーゼH (RNAse H)、及びDNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する。RNAを逆転写するために使用されることが多い酵素は、モロニー Maus 白血病ウイルス逆転写酵素及びトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素、及び熱安定変異体を含むその変異体である。

【0021】

「等温増幅」という用語は、本明細書で使用する場合、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に要求される、熱循環の不在下での核酸分子の指数関数的増幅を指す。鎖置換活性を有するポリメラーゼは通常、等温的方法において使用される。好ましい単一チューブの等温反応は、核酸配列ベースの増幅 (NASBA)、ループ媒介性等温増幅 (LAMP)、ヘリカーゼ依存性増幅 (HDA)、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (RPA) 反応、及びニッキング酵素増幅反応 (NEAR) を含む。好ましい単一チューブの等温反応は、ループ媒介性等温増幅 (LAMP) である。

10

【0022】

「V型エフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、非標的のデオキシリボ核酸分子であっても切断に必要とされる特定のヌクレアーゼドメインによって特徴づけられる、クラス2のエフェクタータンパク質を指す。少なくとも13のサブタイプが現段階で公知である：V-A、V-BからV-Mまで。V型Casタンパク質は、フランシセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*)、アシダミノコッカス属 (*Acidaminococcus* sp.)、ラクノスピラセアエ属 (*Lachnospiraceae* sp.)、プレボテラ種 (*Prevotella* sp.)、及びいくつかの古細菌 (*archaeobacteria*) などの生物から単離することができる。全ガイドの長さは、好ましくは、42~44ヌクレオチドである。Cas12 V型エフェクタータンパク質のgRNAは、好ましくは、gRNAにおけるプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM)、より好ましくは5'-TTTNモチーフとして、ジヌクレオチドTTを含む。例示的なV型エフェクタータンパク質が、Cpf1 (V-A型) 及びC2c1 (V-B型) である。Cas12及びCas14は、プロトタイプV型エフェクタータンパク質である。

20

【0023】

「VI型エフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、非特異的なリボヌクレアーゼ活性を有するクラス2のエフェクタータンパク質を指す。4つのサブタイプが現段階で公知である：サブタイプVI-A、VI-B、VI-C、及びVI-D。VI型Casタンパク質は、レプトトリキア・ブッカリス (*Leptotrichia buccalis*)、レプトトリキア・シャーイイ (*Leptotrichia shahii*)、ルミノコッカス・フラベファシエンス (*Ruminococcus flavefaciens*)、バージイエラ・ズーヘルカム (*Bergeyella zoohelcum*)、プレボテラ・ブッカエ (*Prevotella buccae*)、及びリステリア・シーリゲリ (*Listeria seeligeri*) などの生物から単離することができる。全ガイドの長さは、好ましくは、52~66ヌクレオチドである。VI型エフェクタータンパク質のPAMモチーフは、当業者に公知のとおり、可変であり、LshCas13aの3'非G、5'非C及び3'NAN若しくはNNA (BzCas13b) を含んでもよく、又は何も含まなくてもよい (RfCas13d)。Cas13は、プロトタイプVI型エフェクタータンパク質である。

30

40

【0024】

「III型Casタンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、少なくともCas10タンパク質を含む、RNAを標的化する複数のサブユニットCRISPR関連複合体を指す。

【0025】

「IIIA型Casタンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、標的RNA分子への結合時、非特異的なデオキシリボヌクレアーゼ活性を有する、RNAを標的化するIII型CRISPR/Casタンパク質複合体を指す。IIIA型Casタンパク質は、例えば、スタフィロコッカス・サーモフィルス (*Staphylococcus thermophilus*)、高度好熱菌 (*Thermus thermophilus*) 及び表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epid*

50

ermis)からのⅠⅠⅠA型Csmタンパク質複合体を含む。

【0026】

「ⅠⅠⅠ-B型Casタンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、サーマス(Thermus)種からのⅠⅠⅠ-B型Casタンパク質を別として、やはり非特異的なデオキシリボヌクレアーゼ活性を有する、RNAを標的化するⅠⅠⅠ型CRISPR-Casタンパク質複合体を指す。前記ⅠⅠⅠ-B型Cas複合体は、6～7つの個別タンパク質からなる。ⅠⅠⅠ-B型Casタンパク質は、例えば、パイロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)、高度好熱菌(Thermus thermophilus)及びスルホロブス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus)からのⅠⅠⅠ-B型Cmrタンパク質複合体を含む。

10

【0027】

「クエンチされた、クエンチャー、及びクエンチング」という用語は、本明細書で使用する場合、所与物質のシグナル強度、好ましくは蛍光強度が低減されるプロセスを指す。蛍光クエンチングは、蛍光分子からの発光を吸収する物理化学的プロセスである。蛍光クエンチングは、フルオロフォア及びクエンチャー分子が一本鎖核酸分子の末端に付着され、互いに近接する場合の、核酸診断における指標として使用することができる。核酸分子がその標的にハイブリダイズする、又はヌクレアーゼによって切断されると、フルオロフォア-クエンチャー複合体が引き離され、フルオロフォアが発光することを可能にする。

【0028】

「ダーククエンチャー」という用語は、本明細書で使用する場合、フルオロフォアからの励起エネルギーを吸収し、エネルギーを熱として消失させるクエンチャーを指す。それ故、ダーククエンチャーは、光自体を発しない。ダーククエンチャーは、分子生物学において、蛍光分子と組み合わせて使用される。

20

【0029】

「環状オリゴアデニル酸(cOA)」という用語は、本明細書で使用する場合、アデノシンリン酸(AMP)の3～6分子を含む環構造を指す。cOAの形成は、ⅠⅠⅠ型CRISPR/Casエフェクター系の一部である、Cas10のシクラーゼドメインによって触媒される。

【0030】

「PPi」という用語又はピロリン酸は、本明細書で使用する場合、ピロリン酸の塩又はエステルを指す。代替名称は、二リン酸塩及びジポリホスフェート(dipolyphosphate)である。

30

【0031】

「無機ピロホスファターゼ」という用語、又は無機ジホスファターゼは、本明細書で使用する場合、1個のピロリン酸塩イオンの2個のリン酸塩イオンへの変換を触媒する酵素を指す。酵素は、酵素クラスEC3.6.1.1に属する。

【0032】

「cOA依存性エフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、活性がcOAの量に依存するタンパク質を指す。例として、HEPN(高真核生物及び原核生物ヌクレオチド結合)活性部位を用いてRNAを非特異的に分解するエンドリボヌクレアーゼなどのリボヌクレアーゼが挙げられる。これらのヌクレアーゼは、1つ以上のcOA分子の、それらのCRISPR関連Rossmann折畳み(CARF)ドメインを用いる結合によって活性化される。こうした非特異的なエフェクター-エンドリボヌクレアーゼの例として、パイロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)のCasアクセサリタンパク質Csx1及び結核菌(Mycobacterium tuberculosis)のCsm6が挙げられる。

40

【0033】

「天然に存在しないタンパク質」という用語は、本明細書で使用する場合、天然状態のタンパク質と異なるアミノ酸配列及び／又は翻訳後修飾パターンを有するタンパク質を指す。例えば、天然に存在しないタンパク質は、タンパク質のN末端、C末端及び／又はN

50

末端とC末端の間に1つ以上のアミノ酸置換、欠失又は挿入を有し得る。「天然に存在しない」タンパク質は、天然に存在するアミノ酸配列と異なるが、天然に存在するアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有し得る。特定の場合、天然に存在しないタンパク質は、N末端メチオニンを含有してもよく、又はそれが異なる（例えば、細菌）細胞によって産生される場合、1つ以上の翻訳後修飾（例えば、グリコシル化、リン酸化など）を欠いていてもよい。さらに、天然に存在しないタンパク質は、遺伝子工学によって1つ以上の特定のタグを含む、タグ化タンパク質である。前記タグとして、限定はされないが、例えば、Chatterjee, 2006 (Chatterjee, 2006, Cur Opin Biotech 17:353-358)に提示されている、c-mycドメイン、ヘマグルチニンタグ、麦芽糖結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、FLAGタグペプチド、ビオチンアクセプターペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド及びカルモデュリン結合ペプチドが挙げられる。

10

【0034】

「天然に存在しない核酸」という用語は、本明細書で使用する場合、（1）天然状態の核酸と異なるヌクレオチドの配列；（2）1つ以上の天然に存在しないヌクレオチド単量体；及び／又は（3）付加された標識若しくは他の部分などの1つ以上の他の修飾、を含有する核酸を指す。

【0035】

「天然に存在しない組成物」という用語は、（1）例えば、異なる位置、異なる細胞若しくは異なる細胞区画に存在することから、元来組み合わせられない成分の組み合わせ；（2）天然に見出されない相対濃度を有する成分の組み合わせ；（3）通常は天然の成分の1つを伴うものを欠いている成分の組み合わせ；（4）天然に見出されない、例えば、乾燥、凍結乾燥、結晶、水性といった形態である成分の組み合わせ；及び／又は（5）天然に存在しない成分を含有する組み合わせ、を含む組成物を指す。例えば、調製物は、天然に存在しない緩衝剤、洗剤、色素、溶媒又は保存剤を含有してもよい。組成物は、例えば、水性又は凍結乾燥といった任意の形態であってもよく、任意の状態、例えば、凍結又は水性形態であってもよい。

20

【0036】

「プライマー」という用語は、本明細書で使用する場合、鋳型核酸分子へのアニーリング及び転写プライミング、例えば、逆転写、又は前記鋳型核酸分子のポリメラーゼによる複製において有効である、好ましくは15～50ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを指す。前記オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、又はその組み合わせ若しくは変異体を含んでもよい。前記変異体は、合成オリゴヌクレオチド類似体、例えば、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、ホスホロチオエート2-アルキル化、及びホスホロアミド酸類似体、2'-フルオロ、O-メチル、若しくはメトキシエチルなどのヌクレオシド糖環の2'位置に修飾を有する類似体、ペプチド核酸、架橋核酸、及び／又はロックド核酸分子を含む。

30

【0037】

4.2 PhiFa__44タンパク質

40

4.2.1 現在、65℃で5分を超えて活性を維持するDNA依存性RNAポリメラーゼは、市販されていない。熱安定性DNA依存性RNAポリメラーゼを求めて、高度好熱菌(*Thermus thermophilus*)などの好熱細菌に感染し得るバクテリオファージが分析された。バクテリオファージPhiFa (GenBank: MH673672.2; 分類学ID: 1400796)が候補ファージとして特定された。PhiFaは、長い非収縮性尾部を有するシホウイルス科(Siphoviridae)ファージに属する、いまだ未分類のOshimavirusである。PhiFaは、「RNAポリメラーゼ」であることが予測された、仮定上のタンパク質「PhiFa__44」(GenBank: QKE11339.1; 配列番号1)をコードする。

【0038】

50

B l a s t P 探索では、大腸菌(*Escherichia coli*)由来の仮定上のタンパク質WP__164703602.1が、p h i F a__44タンパク質の長さの約90%にわたって56.79%の比較的高い同一性マッチを有するものとして同定された。しかし、より徹底的な検査時、WP__164703602.1は、大腸菌(*E. coli*)ゲノムに対するアライメントが可能でなかったことから、配列決定分析における汚染物質であるように思われる。さらに、コードする配列は、別々のコンティグとして、データベースにアップロードされている。WP__164703602.1の真の起源は未知である。p h F a__44とバクテリオファージ由来のRNAポリメラーゼSP6、T3及びT7との間に相同性は見出されなかった。

【0039】

1つのさらなる整列配列は、p h i F a__44タンパク質の長さの56%にわたって約30%のスコアをもつ、プランクトミセテス門細菌(*Planctomycetes bacterium*)由来の仮定上のタンパク質であった(MBI5851759.1)。最終整列配列はやはり、p h i F a__44タンパク質の長さのわずか10%にわたって約47%のスコアをもつ、大腸菌(*E. coli*)由来の仮定上のタンパク質であった(WP__206306715.1)。

【0040】

P h i F a__44アミノ酸配列を有するP f a mデータベース(Mistry et al., 2021. *Nucleic Acids Res* 49:D412-D419)における探索では、257アミノ酸残基の長さ

10

20

【0041】

(<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/>で入手可能である) TeubingenツールキットにおけるHHpredツールを使用する探索では、5 F S W__C及び2 J 7 N__Bという2つの配列が非常に低い配列類似性(それぞれ、25.8%及び17.5%)で同定された。同定された両方のタンパク質は、RNA依存性RNAポリメラーゼであることが予測される。さらにより低い配列類似性(<8%)を有する配列が、マルチサブユニットDNA依存性RNAポリメラーゼとして同定された。

30

【0042】

有意でないスコアのRNA依存性RNAポリメラーゼ及びマルチサブユニットRNAポリメラーゼの両タイプは、p h i F a__44との関連で可能性があると考えられない。

【0043】

インシリコ構造分析を実施して、p h i F a__44タンパク質へのさらなる洞察を得た。初期の結果では、Q D E 1 RNA依存性RNAポリメラーゼとのいくつかの類似性が示され、ここで類似性は、わずか207アミノ酸残基の領域にわたって最高で22%の配列同一性であった。しかし、このドメインは、マグネシウム(Mg)結合ドメインに類似する。予測された3D構造(データは示さず)では、これらの類似性が確認されたが、アミノ残基D366、D368及びD370がMg結合に関与し得るp h i F a__44中の

40

【0044】

バクテリオファージ由来のRNAポリメラーゼSP6、T3及びT7などの既知のRNAポリメラーゼとの有意な配列類似性が存在しないことを考慮して、p h i F a__44を熱安定性RNAポリメラーゼの候補として追及しないことが決定された。しかし、実施されたある最終のIVT実験(実施例1を参照されたい)では、低い配列同一性にもかかわらず、p h i F a__44は、熱安定性RNAポリメラーゼとして機能し得ることが示唆された。

【0045】

4.2.2 本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク

50

質は、好適な発現系から発現させ、精製することができる。

【0046】

異種タンパク質の生成のために一般に使用される発現系は、大腸菌(*E. coli*)、バチルス属(*Bacillus spp.*)、バキュロウイルス、酵母、真菌、糸状菌又は酵母、例えば、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及びピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞及びPER.C6(登録商標)細胞(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、並びに植物を含む。異種系における組換えタンパク質の発現の効率は、転写レベル及び翻訳レベルの両方に関する多くの要素に依存する。

【0047】

本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質は、好ましくは、原核細胞、好ましくは大腸菌(*E. coli*)において生成される。前記タンパク質は、好ましくは、目的の原核細胞、好ましくは大腸菌(*E. coli*)におけるタンパク質の発現クローニングによって生成される。前記発現構築物、好ましくは、DNAは、好ましくは、当業者に公知であるとおり、ポリメラーゼ、制限酵素、及びリガーゼの使用を含む組換え技術によって生成される。或いは、前記発現構築物は、当業者に公知であるとおり、人工遺伝子合成によって、例えば、部分的に若しくは完全にオーバーラップするオリゴヌクレオチドの合成によって、又は有機化学及び組換え技術の組み合わせによって提供される。

10

【0048】

代替として又は追加的に、本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質は、好熱生物から、前記好熱生物における本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタグ化タンパク質の発現及びタグに基づく前記タンパク質の単離によって単離することができる。

20

【0049】

前記発現構築物を、好ましくはコドン最適化することで、目的の原核細胞、好ましくは大腸菌(*E. coli*)における本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質の発現が増強される。さらなる最適化は、潜在性スプライス部位の除去、潜在性ポリAテールの除去及び／又はmRNAの好ましくないフォールディングを引き起こす配列の除去を含んでもよい。さらに、発現構築物は、好ましくは、本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質の、細胞から原核生物のペリプラズムへの分泌のためのタンパク質輸送シグナルをコードし、本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質の効率的精製を可能にする。

30

【0050】

本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質を精製するための方法は、当該技術分野で公知であり、一般に、汚染物質を除去するための、アフィニティークロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーに基づく。汚染物質に加えて、分解生成物及び凝集体などの生成物自体の望ましくない派生物を除去することも必要であり得る。好適な精製プロセスステップは、Berthold and Walter, 1994 (Berthold and Walter, 1994, *Biologicals* 22:135-150)において提示されている。

40

【0051】

代替として又は追加的に、本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有する組換えタンパク質は、遺伝子工学によって、1つ以上の特定のタグでタグ化することができ、タンパク質がタグに特異的なカラムに付着することを可能にし、ひいては不純物から単離することができる。次に、精製されたタンパク質は、デカップリング試薬によって親和性カラムから交換される。その方法は、組換えタンパク質を精製するために適用されることが増加している。タンパク質に対する従来のタグ、例えばヒスチジンタグを、タグを特異的に捕捉する親和性カラム(例えば、ヒスチジンタグ用のNi-IDAカラム)とともに使用して、他の不純物からタンパク質を単離することができる。次に、タンパク質

50

は、特定のタグに従うデカップリング試薬（例えば、ヒスチジンタグのためのイミダゾール）を使用し、カラムから交換される。この方法は、伝統的な精製方法と比較すると、より特異的である。

【0052】

好適なさらなるタグは、Chatterjee, 2006 (Chatterjee, 2006. Cur Opin Biotech 17:353-358) に提示されている、c-myc ドメイン、ヘマグルチニンタグ、麦芽糖結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、FLAG タグペプチド、ビオチンアクセプターペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド及びカルモデュリン結合ペプチドを含む。これらのタグを使用するための方法は、当該技術分野で公知であり、本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質を精製するために使用することができる。

10

【0053】

大腸菌 (E. Coli) においてタンパク質を発現するための方法は、当該技術分野で公知であり、本発明に従う配列番号1と少なくとも50%の配列同一性を有するタンパク質を発現及び精製するために使用することができる。

【0054】

4.3 核酸鋳型を転写する方法

本発明は、インビトロ転写反応を、上昇温度で触媒活性の低下を衰弱させることなく実施することを可能にする、熱安定性のDNA依存性RNAポリメラーゼを提供する。前記上昇温度は、比活性を増加させることができ、得られるRNA分子からの二次構造を緩和することを補助し得る。さらに、熱安定性RNAポリメラーゼの有効性は、LAMP増幅などの上昇温度での増幅、及びRNA鎖の合成を含む核酸検出方法、特に、III型CRISPR-Cas系を含む検出系の場合にワンポット反応を可能にする。

20

【0055】

本発明に従う前記熱安定性RNAポリメラーゼは、配列番号1と少なくとも50%の配列同一性、配列番号1と好ましくは少なくとも60%の配列同一性、好ましくは少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも91%の配列同一性、好ましくは少なくとも92%の配列同一性、好ましくは少なくとも93%の配列同一性、好ましくは少なくとも94%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性、好ましくは少なくとも96%の配列同一性、好ましくは少なくとも97%の配列同一性、好ましくは少なくとも98%の配列同一性、好ましくは少なくとも99%の配列同一性、好ましくは少なくとも99.5%の配列同一性を有する。配列番号1との少なくとも99.5%の配列同一性は、前記熱安定性RNAポリメラーゼと配列番号1との間で1つのアミノ酸残基が異なり得ることを意味する。

30

【0056】

好適な鋳型核酸分子は、デオキシ核酸のヌクレオチドであるか又はそれを含み、且つ一本鎖 (ss) DNA分子、二本鎖 (ds) DNA分子、又はハイブリッドss-ds分子を含む。本発明に従う熱安定性RNAポリメラーゼが一般に、一本鎖又は二本鎖DNA分子のいずれかをRNA分子に転写し得ることが見出された。こうした一般的な低い転写活性は、見かけ上、特定のプロモーター領域を必要としない。図1に示されるとおり、phiFA_44などの熱安定性RNAポリメラーゼによるdsDNA鋳型の転写の開始は、ランダムに起こり、RNA産物のラダーをもたらすように思われる。

40

【0057】

phiFA_44などの本発明に従う熱安定性RNAポリメラーゼが、特に一本鎖DNA分子をRNA分子に特異的に転写することがさらに見出されたが、ここで鋳型鎖は、phiFA_44プロモーター配列として機能し得る、コンセンサス配列GGGGCGG、好ましくはAGGGGCGG、より好ましくはTAGGGGCGG、より好ましくはTAGGGGCGG M、より好ましくはTAGGGGCGG MTAを含み、ここでMは、C又はAのいずれかを表す。コンセンサス配列GGGGCGGを含む配列

50

【化 1】

CAGGGGCGGCAA

は、図 4 に示される I V T 反応のために使用された s s D N A 鋳型 A 中に存在する。前記配列

【化 2】

CAGGGGCGGCAA

は、図 4 に示されるとおり、約 70 ヌクレオチドの R N A 転写物をもたらす、プロモーター配列として機能している可能性がある。関連配列は、図 1 における約 300 n t のより限定された R N A 産物をもたらす、別々の転写開始部位からの転写を駆動している可能性がある。

【0058】

本発明に従う熱安定性 R N A ポリメラーゼを含むインビトロ転写反応は、好適な緩衝剤において実施し、p H がほぼ一定値に維持される。前記緩衝剤は、リン酸塩、ホウ酸塩、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸 (C H E S)、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (M E S)、グリシン、及び／又は [トリス (ヒドロキシメチル) メチルアミノ] プロパンスルホン酸 (T A P S) を含んでもよい。R N A ポリメラーゼにとって好ましい反応 p H は、6~10、好ましくは 7~9、例えば、7.2、7.5、7.8、8.0、8.1、8.5、8.6 又は 8.8 である。

【0059】

転写反応にとって好ましい緩衝剤は、トリス、好ましくは 10~100 m M のトリスであるか又はそれを含む。前記トリスは、好ましくは、酢酸塩及び／又は塩化水素などの酸の添加によって所望の p H で設定される。

【0060】

転写反応に適する緩衝液は、1つ以上の M g ²⁺ 又は M n ²⁺ などの二価金属イオンをさらに含んでもよい。二価金属イオンは、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム及び／又は酢酸マグネシウムなどのその塩として提供してもよい。前記濃度は、好ましくは、0.5~20 m M、例えば、1~10 m M、好ましくは、約 2 m M、約 3 m M、約 5 m M、又は約 7 m M である。

【0061】

前記緩衝液の追加成分は、当該技術分野で公知のとおり、鋳型核酸分子の転写を増強するための、カリウムイオン、例えば塩化カリウム、硫酸アンモニウムなどの他の塩、及び／又はベタイン、エチレングリコール、1,2-プロパンジオール及び／又はスぺルミジン、例えば、2~10% D M S O 又は 2~10% グリセロールを含んでもよい (Cheng e t al., 1994. Proc Natl Acad Sci 91:5695-5699)。

【0062】

好ましくは、追加成分は、ゼラチン、アルブミン、βメルカプトエタノール、ジチオトレイトール (D T T)、及び／又はトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) の 1つ以上などの還元剤、及び／又は例えば T W E E N 20 若しくは T r i t o n - X 100 などの軽度の洗剤を含む、酵素活性を安定化するための反応緩衝液中に含まれる。

【0063】

前記転写反応は、核酸塩基及び三リン酸塩基にカップリングされているリボース糖基を含むリボヌクレオチド (N T P) の存在下で実施される。前記核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、及びその任意の修飾を含む。リボヌクレオチドという用語は、蛍光分子などのリボヌクレオチドの類似体、例えば、1,3-ジアザ-2-オキソフ

10

20

30

40

50

エノチアジン—リボース—5'—三リン酸 (tCTP)、及び／又はイノシン、キサントシン、N4—ヒドロキシシトシン、N4—メトキシシトシン及び6H, 8H—3, 4—ジヒドロピリミド [4, 5—c] [1, 2] オキサジン—7—オンなどの他の類似体に対する参照を含む (Suzuki et al., 2005. Nucleic Acids Symp Series 49:97-98)。

【0064】

前記転写反応は、30℃～80℃、好ましくは45℃～75℃、例えば、50℃～70℃、例えば、55℃、60℃及び65℃の温度で実施される。

【0065】

前記転写反応は、好ましくは、10～50mM、好ましくは20mMのトリス—HCl pH 8.8、100～1000ナノモル濃度 (nM)、好ましくは約500nMの本発明に従う熱安定性RNAポリメラーゼ、1～5mM、好ましくは約2.5mMのNTP混合物 (NEB # N0466S)、1～10mM、好ましくは約2mMのMgCl₂、10～250mM、好ましくは約50mMのNaCl及びDNA鋳型、好ましくは1～100ng、例えば約25ngのdsDNA鋳型の存在下、20μLの総体積、45℃～75℃、例えば、50℃～70℃、例えば、55℃、60℃及び65℃の温度で実施される。

【0066】

前記IVT反応は、DNA鋳型、好ましくは前記二本鎖DNA鋳型を転写するのに好適な期間をかけて実施される。前記期間は、好ましくは、0.01～1時間、より好ましくは0.1～0.5時間、より好ましくは0.2～0.4時間である。

【0067】

4.4 診断アッセイ

4.4.1 本発明の方法は、特に人間のヘルスケア及び動物の診断において使用可能である特定の核酸配列を検出することを可能にする。こうした目的のため、DNA及び／又はRNAを含む核酸材料は、好ましくは、サンプルから単離される。このため、前記核酸材料は、例えば、物理的及び化学的方法の組み合わせを用いて精製してもよい。好ましくは、NucliSENS (登録商標) easyMAG (登録商標) 又はNucliSENS (登録商標) miniMAG (登録商標) 核酸抽出システム (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)、又はMagNA Pure 96システム (Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands) などの核酸単離用の市販システムが使用される。

【0068】

前記サンプルは、生体液、例えば、唾液、鼻咽頭スワブなどの上気道検体、痰、鼻咽頭分泌物、中咽頭分泌物、汗、尿、便、又は血液などの下気道検体を含んでもよい。「血液」という用語は、赤血球及び白血球を例えば遠心分離によって除去することによって調製されている血漿、並びに血塊の形成、及び例えば遠心機の使用による血餅の除去によって調製されている血清を含む。核酸材料を生体液、特にスワブから単離するための方法及び組成物では、好ましくは、水性溶媒が使用され、有機溶媒及びカオトロピック塩は使用されない。

【0069】

このため、RNAは、限定はされないが、Trizol (Invitrogen; Carlsbad, California)、RNAqueous (登録商標) (Applied Biosystems/Ambion, Austin, Tx)、Qiazol (登録商標) (Qiagen, Venlo, The Netherlands)、Agilent Total RNA Isolation Kits (Agilent; Santa Clara, California)、RNA-Bee (登録商標) (Tel-Test, Friendswood, Texas)、RNeasyミニキット (Qiagen, Venlo, The Netherlands)、及びMaxwell (商標) 16 Total RNA精製キット (Promega; Madison, Wisconsin) などの好適な市販のRNA単離キットを含む、当該技術分野で公知の任意の技術によって、サンプルから単離してもよい。

【0070】

単離されたRNAは、好ましくは、当業者に公知の方法を用いて、RNA依存性DNAポリメラーゼの支援を受けて、一本鎖又は二本鎖の相補性DNA (cDNA) に逆転写される。逆転写は、ユニバーサルプライマー、例えば、ランダム六量体若しくは九量体によ

10

20

30

40

50

って、又はウイルス特異的なプライマー若しくはさらに遺伝子特異的なプライマーなどの1つ以上の特異的なプライマーによってプライムされ得る。

【0071】

ゲノムDNAを含むDNAは、限定はされないが、Quick-DNAウイルスキット(Zymo Research; Irvine, CA)、NucleoSpin Dx Virus(Macherey-Nagel, Dueren, Germany)、QIAamp DNA血液ミニキット(Qiagen, Venlo, The Netherlands)、及びEasyPure (登録商標) ウイルスDNA/RNAキット(Transgen Biotech, Beijing, China)などの好適な市販のDNA単離キットを含む、当該技術分野で公知の任意の技術によって、サンプルから単離してもよい。

【0072】

4.4.2 得られたRNA、DNA又はcDNAは、本発明に従う診断用のCRISPR/Casエフェクタータンパク質ベースのアッセイにおいて直接的に使用してもよいが、好ましくは、検出前に増幅することで、検出レベルが増加する。増幅は、例えば、リガーゼ連鎖反応(LCR)、等温リボ核酸増幅系、例えば、核酸配列ベースの増幅(NASBA)、切断ベースのRNAのシグナル増幅(Zhao et al., 2013, Nature Comm 4:1493)、転写媒介性増幅、鎖置換増幅、及びポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む、任意の好適な増幅系によって実施してもよい。

【0073】

好ましい増幅反応は、NASBA、ループ媒介性等温増幅(LAMP)、ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)、ローリングサークル増幅(RCA)、多重置換増幅(MDA)、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)反応、及びニックング酵素増幅反応(NEAR)などの単一チューブでの等温反応である。好ましい単一チューブの等温反応は、ループ媒介性等温増幅(LAMP)又はリコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)反応である。

【0074】

LAMPでは、通常、鑄型鎖上の異なる標的配列を認識する6つのプライマーが使用される。これらプライマーの4つは、新しいDNA鎖を合成するように設計されている「内部プライマー」(LF、LB、FIP及びBIP)である。外部プライマー(F3及びB3)は、鑄型鎖にアニールし、やはり新しいDNAを生成する。これらのプライマーは、鎖置換を支援し、新しく形成されたDNA鎖を放出するDNAポリメラーゼを伴う。この増幅は、60～65℃の等温条件下で、1時間経ずに、例えば20分経ずになされる。

【0075】

RPAプロセス(TwistDx Ltd., Cambridge, UK)では、リコンビナーゼ、一本鎖DNA結合タンパク質(SSB)及び鎖置換ポリメラーゼが、好ましくは逆転写酵素、より好ましくは逆転写酵素及びT7ポリメラーゼなどのDNA依存性RNAポリメラーゼが添加されて使用される。この増幅は、37～42℃の等温条件下で、1時間経ずになされる。

【0076】

4.4.3 本発明に従う熱安定性RNAポリメラーゼは、NASBA、切断ベースのRNAのシグナル増幅(Zhao et al., 2013, Nature Comm 4:1493)、転写媒介性増幅、又はRPAなどの増幅反応においてDNA依存性RNAポリメラーゼを置換し、それにより、より高い温度での前記増幅反応を可能にし得る。

【0077】

4.5 CRISPR/Casベースの検出系

4.5.1 本発明に従う熱安定性RNAポリメラーゼは、さらに、CRISPR関連エフェクタータンパク質(Cas)及び標的核酸分子に結合する少なくとも1つのCRISPR RNA(crRNA)を含む、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)核酸検出系において使用することができる。

【0078】

前記CRISPR/Casベースの検出系は、好ましくは、本発明に従うCRISPRベースの核酸系を含む検知装置、又は「バイオセンサー」として提供される。CRISPR

10

20

30

40

50

Rベースの核酸系がc r RNAに対して相補的である核酸分子と相互作用するときに生成されるシグナル、例えば、比色定量、蛍光定量、蛍光又は生物発光シグナルは、トランスデューサーと共役することで、シグナルの定量化を可能にし得る。シグナルは、直接的に可視化可能であり、又は、代替として若しくは追加的に、好適なトランスデューサーを用いて、電流又は電位などの測定可能な電気パラメータに変換可能である。

【0079】

4.5.2 c r RNAの標的配列への結合は、C a sエフェクタータンパク質の活性化をもたらす。前記C a sエフェクタータンパク質の活性化は、例として、例えば、C a s 12、C a s 13及びC a s 14によって媒介される、レポーター分子のコラテラル切断によって、及び／又は、例えば、C a s 10のシクラーゼドメインによって触媒される、環状オリゴアデニル酸(c O A)の生成によって検出することができる。

10

【0080】

C r i s p r / C a sクラス1系は、マルチタンパク質エフェクター複合体を使用し(Koonin et al.,2017.Curr Opin Microbiol 37:67-78)、I型系、C a s 10などのI I I型系及びI V型系を含む。C r i s p r / C a sクラス2系は、単一タンパク質エフェクターを使用し、C a s 9などのI I型C R I S P R系、C a s 12(c p f 1としても知られる)及びC a s 14(Harrington et al.,2019,Science 362:839-842)などのV型系、及びC a s 13(Makarova et al.,2017.Cell 168:328-328)などのV I型系を含む。

【0081】

4.5.3 c r RNAのその標的核酸配列への結合が、V型又はV I型C R I S P R / C a sエフェクタータンパク質のコラテラルなトランス作用ヌクレアーゼ活性を活性化する。このコラテラルなトランス作用ヌクレアーゼ活性は、V型又はV I型C R I S P R / C a sエフェクタータンパク質の活性化をスコア化するための一本鎖「レポーター」分子の使用を可能にする。

20

【0082】

活性化されたV型又はV I型C a sのためのレポーターは、好ましくは、少なくとも9ヌクレオチドの一本鎖核酸分子であり、活性化されたV型又はV I型C a sによるその切断は、検出され得る。前記一本鎖核酸分子は、好ましくは9~50ヌクレオチド、より好ましくは10~25ヌクレオチド又はさらに11~20ヌクレオチド、例えば、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、又は19ヌクレオチドを含む。前記レポーターの最適な長さは、約12ヌクレオチドである。

30

【0083】

前記レポーターは、活性化されたC a s 12若しくはC a s 14エフェクタータンパク質を検出するための一本鎖DNA、又は活性化されたC a s 13エフェクタータンパク質を検出するための一本鎖RNAのいずれかを含む。前記レポーターは、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド類似体、例えば、イノシン、ウリジン、キサンチン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、及び6,8-ジアミノプリンベースのリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドを含んでもよい。

40

【0084】

レポーター切断の検出は、当該技術分野で公知の任意の方法によって実施してもよい。例えば、検出は、質量分析、例えば、陽性エレクトロスプレーイオン化モードでタンデム質量分析と共役される超高性能液体クロマトグラフィー(U H P L C)(L C - M S / M S)によって直接的に実施してもよい。L C - M S / M S分析は、例えば、三重-四重極質量分光計と共役されるハイエンドU H P L Cクロマトグラフィーシステムを使用することによって実施してもよい。検出は、液体-液相分離(L L P S;Spoelstra et al.,2018.BioRxiv,CSHL(doi.org/10.1101/471482)によって、又は当業者に公知である比色定量、蛍光定量、蛍光若しくは生物発光検出方法によって、さらに実施してもよい。

【0085】

50

適切なレポーターは、一方の末端での蛍光標識及びもう一方の末端でのクエンチャーでタグ化されている一本鎖RNA (Cas13) 又はDNA (Cas12及びCas14) 分子である。レポーターとクエンチャーとの接近性から、その蛍光の検出が阻止される。V型又はVI型CRISPR/Casエフェクタータンパク質のコラテラルなトランス作用ヌクレアーゼ活性の活性化後の基質の切断は、レポーター-クエンチャーの接近性を破壊し、それ故、蛍光の非クエンチ放射を可能にし、それはレーザーでの励起後に検出することが可能である。

【0086】

好ましい蛍光標識は、Atto425(ATTO-TEC GmbH,Siegen,Germany)、Atto647N(ATTO-TEC GmbH,Siegen,Germany)、YakimaYellow(Epoch Biosciences Inc,Bothell,WA,USA)、Cal610(BioSearch Technologies,Petaluma,CA,USA)、Cal635(BioSearch Technologies,Petaluma,CA,USA)、FAM(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)、TET(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)、HEX(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)、Cy5、Cy5.5、Cy3、Cy3.5、Cy7などのシアニン色素(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)、Alexa色素(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)、Tamra(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)、ROX(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)、JOE(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)、フルオレセインイソチオシアナート(FITC, Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)、Yakima Yellow (登録商標)(YY;Epoch Biosciences,Bothell,Washington)及びテトラメチルローダミン(TRITC,Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)から選択してもよい。前記基質は、好ましくは、5'末端で、検出可能な標識、好ましくは蛍光標識で標識される。

【0087】

クエンチャー、例えば、テトラメチルローダミンTAMRA、ジヒドロシクロピロロインドールトリペプチド小溝結合剤は、当該技術分野で公知である。好ましいクエンチャーは、Black Hole Quencher (登録商標)-1 (BHQ1) 及びBHQ2(Biosearch Technologies,Petaluma,CA,USA)を含む。BHQ1ダーククエンチャーは、480nm〜580nmで強力な吸収を有し、この範囲内で蛍光を発するフルオロフォアのクエンチングを提供し、例えば、FAM、TET、CAL Fluor (登録商標) Gold 540、JOE、HEX、CAL Fluor Orange 560、及びQuasar (登録商標) 570色素が挙げられる。BHQ2ダーククエンチャーは、599nm〜670nmで強力な吸収を有し、この範囲内で蛍光を発するフルオロフォアのクエンチングを提供し、例えば、Quasar (登録商標) 570、TAMRA、CAL Fluor (登録商標) Red 590、CAL Fluor Red 610、ROX、CAL Fluor Red 635、Pulsar (登録商標) 650、Quasar 670及びQuasar 705色素が挙げられる。BHQ1及びBHQ2は、FRET及び静的クエンチング機構の両方によって、蛍光をクエンチすることができる。

【0088】

さらに好ましいレポーターは、側方流動アッセイ(LFA)における検出を可能にする。LFAの原理は、反応生成物、この場合における未反応レポーターが、コントロールラインと称される第1ポイントで固定化される一方で、切断されたレポーターが、テストラインと称される第2ポイントで固定化されることである。LFAは、典型的に、ニトロセルロース膜、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、吸湿又は吸収パッド及びバックイングパッドから構成される(Jauset-Rubio et al.,2016.Sci Rep 6:37732)。ニトロセルロース膜は、捕捉生体分子、例えば抗体が、ニトロセルロース上に堆積されて、静電相互作用、水素結合及び／又は疎水性相互作用の組み合わせを介して、テストライン及びコントロールラインが形成される場合、反応及び検出の両方に使用可能な支持を容易にすることから、最も一般的に使用される(Jauset-Rubio et al.,2016.Sci Rep 6:37732)。

【0089】

4.5.4 代替として、*crRNA*のその標的核酸配列への結合により、*Cas10*などのIII型エフェクター系のシクラーゼドメインが活性化される。*Cas10*ベースのリボ核酸検出系は、好ましくは、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)又は高度好熱菌(*Thermus thermophilus*)などの好熱生物に由来する。この系の場合、標的DNA分子は、例えば、本発明に従う熱安定性RNAポリメラーゼによって標的RNA分子に転写される必要があり、それにより、より高い温度での前記転写反応を可能にする。さらなる利点は、増幅、転写及び検出の3つ全てのステップを上昇温度、例えば約65℃で使用し、全てのステップをワンポット反応に適合させ得る点である。

【0090】

好熱生物からのCRISPR/Casベースのリボ核酸検出系のさらなる利点は、検出を、上昇温度、例えば、40℃～80℃、好ましくは50℃～70℃、例えば、55℃～65℃、好ましくは約65℃で実施できる点である。この温度でのインキュベーションにより、より低い温度でのインキュベーションと比較すると、cOA合成反応が促進され得る。さらに、前記上昇温度により、サンプル中に存在する、ヌクレアーゼ、例えば、デオキシリボヌクレアーゼ若しくはリボヌクレアーゼ、又はプロテアーゼが不活性化され得る。

【0091】

さらに、好熱生物からのCRISPR/Casベースのリボ核酸検出系の利点によると、系に、中温生物からのCRISPR/Casベースのリボ核酸検出系と比較すると、より長期間にわたって貯蔵できるなどの増加した安定性が提供され得る。

【0092】

最近の結果は、cOAの存在が、Csm6又はCsx1ファミリーメンバーによるリボヌクレアーゼ活性の大きな増加を引き起こすことを示す。これらのタンパク質は、III型遺伝子座においてコードされることが多いが、リボ核タンパク質複合体と直接的に会合しない。代わりに、インベーターRNA転写物の認識は、標的化されたCas7によるRNA分解、クラスI、IIIA型Cas10による非特異的なDNA分解、及びCsm6又はCsx1の活性化を引き起こすcOAの生成をもたらす、それにより他の近傍の一本鎖RNA分子のコラテラル切断を引き起こし得る。

【0093】

4.5.5 cOAのレベルを直接的に測定する方法は、好ましくは、ピロリン酸又はPPiのレベルを測定するための方法を含む。ピロリン酸の形成は、Cas10などのCRISPR/Cas関連タンパク質による、ATPからのcOAの形成と共役される。3～6個のAMP単位からなるcOAの形成は、PPiの3～6個の分子の同時形成をもたらす。

【0094】

4.5.6 代替として、本発明に従う検出系は、PPiの分解及び各PPi分子に対する2個の無機リン酸塩分子の形成をもたらす、無機ピロホスファターゼを含んでもよい。それ故、無機リン酸塩のレベルを測定することによって、検出可能な分子の数は、cOAの1分子からPiの6～12分子へと増幅される。

【0095】

好ましい無機ピロホスファターゼは、III型CRISPR/CasベースのRNA検出系と同一又は類似温度で活性である酵素である。さらに、無機ピロホスファターゼは、III型CRISPR/CasベースのRNA検出系と同一又は類似条件下、例えば、同一又は類似のpH及び同一又は類似の塩濃度で活性であることが好ましい。例えば、III型CRISPR/CasベースのRNA検出系が50℃で最適な活性を有する場合、無機ピロホスファターゼは、この温度で活性であることが好ましい。好ましくは、50℃での無機ピロホスファターゼの活性は、本質的に全てのPPi分子が無機リン酸塩分子に分解される程度である。前記分解は、好ましくは瞬時になされる。同様に、選択されたpH及び塩濃度での無機ピロホスファターゼの活性は、本質的に全てのPPi分子が無機リン

10

20

30

40

50

酸塩分子に分解される程度である。前記分解は、好ましくは瞬時になされる。

【0096】

好ましい無機ピロホスファターゼは、同時的な等温検出を可能にする、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)及び高度好熱菌(*Thermus thermophilus*)などの好熱(thermophilic)生物に由来する。このように、c O Aのレベルは、P iのレベルを測定することによって、直接的に測定することができる。

【0097】

4.5.7 P P i及びP iは、比色定量、蛍光定量、蛍光又は生物発光ベースのアッセイを含む、当該技術分野で公知の方法を用いて検出することができる。

【0098】

P P iのレベルを測定するのに適した方法は、蛍光定量及び／又は比色定量用のピロリン酸(P P i)アッセイキット(Biovision Inc., Milpitas, CA); 蛍光用のEnzChek(登録商標)ピロリン酸検出キット(ThermoFisher Scientific; Waltham, MA); 蛍光定量用のピロリン酸アッセイキット(SigmaAldrich, Saint Louis, MO); 及び発光用のP P iLight(商標)アッセイ(Lonza Group A.G., Basel, Switzerland)を含む。

【0099】

無機リン酸又はP iのレベルを測定するのに適した方法は、比色定量のPiColorLock(商標)アッセイ(Expedeon, Cambridge, UK); 比色定量のマラカイトグリーンリン酸アッセイキット(SigmaAldrich, Saint Louis, MO); 蛍光リン酸センサー(ThermoFisher Scientific; Waltham, MA); A D PのA T Pへの変換後の発光読み取り(米国特許出願公開第20140273036A号); 蛍光ケモセンサ(Meng et al., 2015. RSC Advances 5:53189-53197); 及びユーロピウムイオンと組み合わせたフォトルミネセンスグラフェン量子ドット(Bai et al., 2013. Chemistry 19:3822-3826)を含む。

【0100】

環状オリゴアデニル酸(c O A)のレベルを直接的に測定するための方法及び手段は、好ましくは、少なくとも1つの基質と、必要な場合の、P P i又はP iに対する指定された検出方法の少なくとも1つを可能にする酵素とを含む。

【0101】

好ましい方法は、c O Aのレベルの直接的測定として、P P i又はP iのレベルの迅速な測定を可能にする、マラカイトグリーンリン酸アッセイキットなどの比色定量方法である。

【0102】

4.5.8 c O Aのレベルを間接的に測定する方法は、好ましくは、C R I S P R補助ヌクレアーゼ1(Can1)又はCan2などのc O A依存性の非特異的なエフェクターヌクレアーゼの活性を測定するための方法、及び好ましくは、C s x 1などのc O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの活性を測定するための方法を含む。このため、本発明のいずれかに従う検出系は、好ましくは、C s x 1などのc O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼを含む。

【0103】

前記c O A依存性の非特異的なエフェクターヌクレアーゼは、好ましくは、I I I型C R I S P R/C a sベースのRNA検出系と同一又は類似温度で活性である酵素である。さらに、c O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼは、I I I型C R I S P R/C a sベースのRNA検出系と同一又は類似条件下、例えば、同一又は類似のp H及び同一又は類似の塩濃度で活性であることが好ましい。例えば、I I I型C R I S P R/C a sベースのRNA検出系が65℃で最適な活性を有する場合、c O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼがこの温度で活性であることが好ましい。好ましくは、65℃でのc O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの活性は、c O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼのc O A誘導活性が、前記c O A依存性の非特異的なエフェ

10

20

30

40

50

クターエンドリボヌクレアーゼの基質の反応生成物の検出可能な量での生成をもたらす程度である。同様に、選択された pH 及び塩濃度での c O A 依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの活性は、c O A 依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの c O A 誘導活性が、前記 c O A 依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの基質の反応生成物の検出可能な量での生成をもたらす程度である。

【0104】

c O A 依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの基質は、好ましくは、RNA 分子であり、その切断は検出することができる。検出は、当該技術分野で公知の任意の方法によって実施してもよい。例えば、検出は、質量分析、例えば、陽性エレクトロスプレーイオン化モードでタンデム質量分析と共役される超高性能液体クロマトグラフィー (U H P L C) (L C - M S / M S) によって直接的に実施してもよい。L C - M S / M S 分析は、例えば、三重-四重極質量分光計と共役されるハイエンド U H P L C クロマトグラフィーシステムを使用することによって実施してもよい。

【0105】

検出は、液体-液相分離 (L L P S ; Spoelstra et al., 2018. BioRxiv, CSHL (doi.org/10.1101/471482)) によって、さらに実施してもよい。

【0106】

c O A 依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼにとって好ましい基質は、一方の末端での蛍光レポーター分子及びもう一方の末端でのクエンチャーでタグ化されている RNA 分子である。レポーターとクエンチャーとの接近性から、その蛍光の検出が阻止される。c O A 依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの活性化による基質の切断は、レポーター-クエンチャーの接近性を破壊し、それ故、蛍光の非クエンチ放射を可能にし、それはレーザーでの励起後に検出することが可能である。したがって、c O A 依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの活性の増加は、基質の切断及び蛍光レポーターをクエンチするクエンチャーの除去に起因して、蛍光の比例的増加を引き起こす。

【0107】

また、非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの活性化と別に、又はそれに加えて、標的認識のレベルの測定は、I I I A 型 C R I S P R / C a s エフェクター複合体中に存在する非特異的なエフェクターデオキシリボヌクレアーゼ活性の活性化の、前記ヌクレアーゼの適切な基質を使用する測定によって実施してもよい。前記適切な基質は、好ましくは、一方の末端での蛍光標識及びもう一方の末端でのクエンチャーでタグ化されている DNA 分子である。好適な蛍光標識及びクエンチャーの例が、本明細書で上掲されている。レポーターとクエンチャーとの接近性から、その蛍光の検出が阻止される。c O A 依存性の非特異的なエフェクターデオキシリボヌクレアーゼの活性化による基質の切断は、レポーター-クエンチャーの接近性を破壊し、それ故、蛍光の非クエンチ放射を可能にし、それはレーザーでの励起後に検出することが可能である。したがって、c O A 依存性の非特異的なエフェクターデオキシリボヌクレアーゼの活性の増加は、基質の切断及び蛍光レポーターをクエンチするクエンチャーの除去に起因して、蛍光の比例的増加を引き起こす。非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの活性化及び非特異的なエフェクターデオキシリボヌクレアーゼの活性化の両方を用いることで、2つの独立したリボ核タンパク質複合体であって、その一方が非特異的なエフェクターデオキシリボヌクレアーゼを特異的に活性化する一方で、他方が c O A レベルの間接的又は直接的測定を特異的に可能にするリボ核タンパク質複合体が使用されるという条件で、1つの単一アッセイにおける2つの独立した標的 RNA 分子の存在又は不在の判定が可能になる。当業者は、この場合、c O A 依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの活性化及び非特異的なエフェクターデオキシリボヌクレアーゼの活性化による基質上に存在する蛍光標識が十分に異なり、c O A のレベルを測定するための尺度としての各活性のレベルの測定を可能にするはずであることを理解するであろう。

【0108】

好適な市販の基質は、RNaseAlert(登録商標)Labテストキットv2(ThermoFisher Scientific;Waltham,MA)によって提供される。

【0109】

好ましいc O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼは、パイロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)、スルホロブス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus)及び高度好熱菌(Thermus thermophilus)などの好熱(thermophylic)生物に由来し、c O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの活性の同時的な等温検出が可能になる。

【0110】

環状オリゴアデニル酸(c O A)のレベルを間接的に測定するための方法及び手段は、好ましくは、c O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼ及び前記c O A依存性の非特異的なエフェクターエンドリボヌクレアーゼの基質を含む。

【0111】

明確性及び簡潔な説明を目的として、同じ又は別々の実施形態の一部として、特徴が本明細書に記載されるが、本発明の範囲が記載されている特徴の全部又は一部の組み合わせを有する実施形態を含んでもよいことは理解されるであろう。

【実施例】

【0112】

5 実施例

実施例 1

材料及び方法

タンパク質の精製

目的のタンパク質のヌクレオチド配列を、大腸菌(E.Coli)についてコドン最適化して(表1を参照)、N末端にStrep-tagを含有するバイシストロニック発現プラスミド(Nieuwkoop et al.,2019.Microbiol Biotechnol 12:173-179)に配置した。発現プラスミドを、大腸菌(E.Coli)株B l 2 1 (D E 3)に形質転換して、所望の培養体積(2~12L)、37℃で約0.6のOD600に達するまで増殖させた。次に、培養物を氷上に1時間配置し、その後、IPTGを0.5mMの最終濃度に添加した。次に、培養物を20℃で約16時間(一晚)インキュベートした。細胞を収集し、超音波処理によって緩衝液A(100mMトリス-HCl、150mM NaCl、pH8)に溶解し、続いて30.000gで45分間遠心沈殿した。清澄化ライセートを濾過し(0.45µM)、StrepTrap FPLCカラムを使用して精製した。目的のタンパク質を、緩衝液B(100mMトリス-HCl、150mM NaCl及び2.5mMデスチオビチン(desthiobitin)、pH8.0)を使用して溶出させた。その後、ヘパリン精製ステップを、緩衝液C(100mMトリス-HCl、125mM NaCl、pH8)を結合及び洗浄緩衝液として使用して実施した。それに続く勾配溶出を、緩衝液D(100mMトリス-HCl、1M NaCl、pH8)を使用して実施した。最後に、サイズ排除クロマトグラフィーを、緩衝液A中、Superdex 200増加10/300 GLカラム(Cytiva;Marlborough,MA)を使用して実施した。

【0113】

I V Tアッセイ

I V Tアッセイを、20µLの総体積中、1倍等温増幅緩衝液(NEB#B0537S)、250nM phiFa__44、1.875mM r N T P / d N T P、80ngのdsDNA鑄型の基礎組成を用いて実施した。これらの反応物を、65℃で1時間インキュベートし、続いて95℃で10分間インキュベートした。その後、2.3µLのデオキシリボヌクレアーゼI緩衝液及び1µLのデオキシリボヌクレアーゼI酵素(それぞれ、NEB#B0303、#M0303)を添加し、反応物を37℃で30分間インキュベートした。反応混合物を、10%尿素-PAGEゲル上で分解し、SybrGold(Thermo #S11494)で染色した。

【0114】

温度及びNaCl濃度の最適分析

I V Tアッセイを、20 μ Lの総体積中、20 mM トリス-HCl pH 8.8、500 nM phiFa__44、2.5 mM rNTP混合物(NEB#N0466S)、2 mM MgCl₂、50 mM NaCl及び25 ngのdsDNA鑄型の基礎組成を用いて実施した。最適なNaCl濃度を判定するため、反応混合物を、単に変化するNaCl濃度と一致させた。反応物を、65℃で1時間インキュベートし、その後、反応物を、Zymo RNAクリーン及びコンセントレーターキット(Zymo#R1017)で徹底洗浄した。それに続くデオキシリボヌクレアーゼ処理を、20 μ Lの総反応体積中、37℃で1時間実施した(NEB#M0303S)。反応混合物を、10%尿素-PAGEゲル上で分解し、SybrGold(Thermo #S11494)で染色した。

10

【0115】

ScopeDxアッセイ

ScopeDxアッセイ混合物は、1倍Warmstart LAMPマスターミックス(NEB#E1700)、プライマー(FIP/BIP 1.6 μ M、F3/B3 0.2 μ M、LoopF/LoopB 0.4 μ M)、E-gene crRNAとの62.5 nMの再構成されたTtCmr46複合体(Steens et al., 2021. Nature Comm 12:1-12)、1 μ M TtHB144(Steens et al., 2021. Nature Comm 12:1-12)、250 nM rNTP混合物(NEB#N0466)、500 nM RNaseAlert V2(Thermo #4479769)及び175 nM phiFa__44からなる。様々な量のTwist SARS-CoV-2合成ゲノムMN908947.3を、反応混合物に添加し、65℃でインキュベートした一方で、FAMチャンネルに対する時点測定値を取得した。

20

【0116】

結果

インビトロ転写アッセイ

dsDNAが好適な鑄型であるか否かを判定するため、phiFaファージゲノムからの区間を合成遺伝子として指定した。phiFa-45の終結の遺伝子間領域及びphiFa__44遺伝子の開始を含有する領域を選択した(表1を参照)。ポリメラーゼにおいて基質としてrNTP又はdNTPのいずれが使用されるか、及びDNA又はRNAのいずれが生成されるかを判定するように設計された、インビトロ転写アッセイを、図1に示すように実施した。

30

【0117】

これらの結果から、発明者は、使用される鑄型がdsDNAであり、それをrNTP基質とともに使用することで、RNA産物が生成されることを結論づけた(図1のレーン10~13を参照されたい)。

【0118】

温度及びNaCl濃度の最適分析

様々なNaCl濃度及び温度を用いて実施したI V Tアッセイは、最適なNaCl濃度が25~200 mMであり、最適な温度範囲が45~75℃であることを示す。

【0119】

ワンポットScopeDx

40

Steens et al., 2021. Nature Comm 12:1-12に記載のScopeDx 1.0ツールにおいて、発明者は、LAMPプレ増幅(65℃)をCRISPR読み出し(65℃)と関連づけることができた。しかし、65℃で拡張されたインキュベーションで使用された市販のHi-T7 RNAポリメラーゼの不適合性が原因で、発明者は、プロトコル内にあるステップを追加しなければならなかった。第1に、LAMPプレ増幅を65℃で約30分間実施し、次にHi-T7+CRISPR混合物を、反応物に添加し、65℃でさらに10~20分間インキュベートした。このように、Hi-T7 RNAポリメラーゼは、活性のその持続時間が制限されるが、プレ増幅によって作出されたdsDNAをRNAに転写することができ、次にRNAは、CRISPR系によって検出することができる。

【0120】

50

p h i F a _ 4 4 が 6 5 ° C で D N A を R N A に 転 写 可 能 で あ る こ と か ら 、 発 明 者 は 、 こ れ を ワ ン ボ ッ ト の 1 ス テ ッ プ ア ッ セ イ で あ る S c o p e D x 2 . 0 に お い て 試 験 す る こ と を 決 定 し た 。 ア ッ セ イ は 、 合 成 S A R S - C o V - 2 R N A ゲ ノ ム に 対 し て 、 6 5 ° C で の 単 一 ス テ ッ プ と し て 実 施 し た (図 2) 。 こ の 新 た な ア ッ セ イ の 場 合 、 2 5 分 経 過 せ ず に 2 0 0 コ ピ ー の 検 出 限 界 に 達 し 、 時 間 対 シ グ ナ ル に お け る 著 し い 改 善 が 示 さ れ た 。 さ ら に 、 こ こ で そ れ が 1 ス テ ッ プ プ ロ ト コ ル で あ る と い う 事 実 は 、 汚 染 リ ス ク を 大 幅 に 低 減 し 、 そ れ は 、 ス テ ッ プ 間 で チ ュ ー ブ を 開 く こ と が 求 め ら れ る 場 合 に 行 う こ と が で き 、 ハ イ ス ル ー プ ト 及 び 自 動 化 能 力 を 改 善 す る 。

【 0 1 2 1 】

インシリコ構造分析

インシリコ構造分析を実施し、p h i F a _ 4 4 タ ン パ ク 質 に つ い て の よ り 多 く の 洞 察 を 得 た 。 初 期 の 結 果 は 、 Q D E 1 ポ リ メ ラ ー ゼ 様 酵 素 と の 類 似 性 を 示 す 。 Q D E 1 の 二 量 体 化 挙 動 の 場 合 、 p h i F a _ 4 4 の 作 用 様 式 に 同 様 に 類 似 し 得 る 。 現 段 階 で は 、 ア ミ ノ 酸 ア ラ イ メ ン ト (図 4 を 参 照 さ れ た い) に 基 づ く と 、 マ グ ネ シ ウ ム 結 合 ド メ イ ン を 同 定 す る こ と が で き る 。 予 測 さ れ た 3 D 構 造 に よ る と 、 こ れ ら の 類 似 性 が 確 認 さ れ 、 M g 結 合 に 関 与 す る p h i F a _ 4 4 中 の 残 基 と し て 、 D 3 6 6 、 D 3 6 8 及 び D 3 7 0 が 示 さ れ る 。

【 0 1 2 2 】

実施例 2

材料及び方法

I V T ア ッ セ イ

インビトロ転写 (I V T) ア ッ セ イ を 、 2 0 μ L の 総 体 積 中 、 1 倍 等 温 増 幅 緩 衝 液 (N E B # B 0 5 3 7 S) 、 2 5 0 ナ ノ モ ル 濃 度 の P h i F a - 4 4 、 1 . 8 7 5 m M r N T P / d N T P 、 8 0 n g の 二 本 鎖 (d s) D N A 鋳 型 又 は 1 0 0 n M (最 終 濃 度) の 一 本 鎖 (s s) D N A オ リ ゴ の 基 礎 組 成 を 用 い て 実 施 し た 。 こ れ ら の 反 応 物 を 、 6 5 ° C で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し 、 続 い て 9 5 ° C で 1 0 分 間 イ ン キュベートした。デオキシリボヌクレアーゼ I 緩衝液及びデオキシリボヌクレアーゼ I 酵素 (N E B # B 0 3 0 3 、 # M 0 3 0 3) の 全 部 で 2 . 3 μ L 及 び 1 μ L を そ れ ぞ れ 添 加 し 、 反 応 物 を 3 7 ° C で 3 0 分 間 イ ン キュベートした。反応混合物を、10%尿素-PAGEゲル上で分解し、SybrGold (Thermo # S 1 1 4 9 4) で 染 色 し た 。

【 0 1 2 3 】

s s D N A 鋳 型 A は 、

【 化 3 】

5'-GCGCTCCAAAAGCAGGGGCGGCAAGTCCAGTCT
CCAGACTTGCCGCCGAGTGTACCTGCTTGCTACAGCCCTAATTATACCACAAA
CGCC 3'

であつた。

【 0 1 2 4 】

s s D N A 鋳 型 B は 、

【 化 4 】

5'-GGCGTTTGTGGTATAATTAGGGCTGTAGCAAGC
AGGTACACTCGGCGGCAAGTCTGGAGACTGGACTTGCCGCCCTGCTTTTGA
GCGC 3'

であつた。

【 0 1 2 5 】

d s D N A 鋳 型 は 、 ア ニ ー ル さ れ た s s D N A 鋳 型 A 及 び s s D N A 鋳 型 B か ら 構 成 さ

れた。

【0126】

結果

Ph i F a I V T s s D N A 鋳型

I V T 反応を、90 nt の長さの s s D N A 鋳型を使用して実施し、鋳型 B は鋳型 A に対して相補的であった（図 4 を参照されたい）。Ph i F a ゲノムのこの領域を、それが目的の候補モチーフを含有することから選択した。その結果から、s s D N A 鋳型 A が約 75 ~ 80 nt の明瞭な s s R N A 転写物をもたらした一方で、s s D N A 鋳型 B は、明瞭な転写物をもたらさなかったことは明確に理解することができる。この結果は、s s D N A 鋳型 A が、Ph i F a 44 ポリメラーゼによる好ましい目的のモチーフを含有すること

10

【0127】

ファージ Ph i F A がその遺伝子を発現する様式については、ほとんど未知である。典型的に、ファージは、宿主 R N A ポリメラーゼを使用して、それらを発現するが、ファージ Ph i F A がそれ自身の R N A ポリメラーゼをコードすることから、その遺伝子の（少なくとも）一部が（Ph i F A _ 44 遺伝子によってコードされる）この特定のポリメラーゼによって発現されると仮定することは合理的である。

【0128】

実施例 3

材料及び方法

インビトロ R N A 転写アッセイ

Ph i F a - 44 を、50 mM Na C l、100 mM トリス - H C l p H 8.0 に
おいて（His）6 タグで精製し、一本鎖 D N A 鋳型（50 nt；配列番号 12）は、C y 3 蛍光色素での 5' 標識を指示した。s s D N A 鋳型を、「Z R S m a l l - R N A P A G E R e c o v e r y K i t」（ZymoResearch, R1070）を使用して、変性 P A G E から精製した。インビトロ R N A 転写アッセイを、Ph i F a - 44 反応緩衝液（35 mM Na C l、20 mM トリス - H C l p H 8.8、2 mM M g C l 2、及び 25 mM r N T P）中で実施し、ミリ Q を 20 μ l の最終体積まで添加した。必要な場合、s s D N A 鋳型及び Ph i F a - 44 を、反応混合物に、それぞれ 62 μ M 及び 1 μ M の最終濃度まで添加した。

20

30

【0129】

全ての反応物を、65 °C で 2 時間インキュベートし、続いて「R N A c l e a n & C o n c e n t r a t o r k i t」（ZymoResearch, R1017）を使用して、R N A / D N A をクリーンアップした。リボヌクレアーゼ H（NEB、5 U / μ l）を選択された精製サンプルに添加後、全ての反応物を 37 °C で 30 分間インキュベートした。反応生成物を分析するため、2 倍 R N A ロードイングダイ（200 mM トリス - H C l p H 8.0、30 % グリセロール、900 mM Na C l）を全てのインキュベーションサンプルに添加し、その後、それらを天然 4 ~ 20 %（w / v）勾配のポリアクリルアミドゲル上にロードした。蛍光ゲル走査（GE Amersham Typhoon）を使用して、ゲルを可視化した。C y 3 フィルター（560 ~ 580 nm）を使用して、C y 3 標識反応生成物を可視化した一方で、SYBR Gold による染色及び C y 2 フィルター（515 ~ 535 nm）の適用により、全ての核酸がゲル上に存在することが示された。

40

【0130】

結果

図 5 に示すとおり、Ph i F a - 44 及び鋳型としての s s D N A を使用するインビトロ転写の結果、相補的 R N A が形成され、それは s s D N A 鋳型バンドの変化によって示される。M g C l が添加されず、インキュベーションが実施されなかった場合（陰性対照）、変化は認められなかった。同様に、リボヌクレアーゼ H の添加、R N A : D N A 二本鎖における R N A の酵素的切断の結果、s s D N A 鋳型バンドの変化が抑止された。

【0131】

50

これらの結果は、Phifa-44が一本鎖鋳型DNAをRNAに転写できることを示す。

【0132】

【表1】

配列番号	名称	配列
1	QKE11 339.1 [サーマス (Thermus) ファージ phiFa]	MNKTELVKKLIEEKTAELAVRPVYTGRIDEEGQWTP TSLHERYQDK VLVVPAPEEGEFVQTIGEYEFVGGNSNRIVYIHRSI IKQWLEVAGG DSHWGAADVLRPGKLASHNAVFSWEGYQLEESDEGLLATMDERDWK VLLEAYDLDPVRLVQVT VFDLEQGVSAKGT LRKVL PGERPVVFPN SWKKFGNLR TQFMSILTTDVHYNPRASVNLQELTY YVQEAPAQWVF DALDEEIERI INLKTSPWLTTGYLTRLGFSPAWNSTLTALKESLCG ELKKLLRRRIKLSGKYGLRAKSTSSHLLRDGELLLPAYAKKHVKVGD FVTVSRNPALPSQGWAKYRVTFIDGNMVVFPQGDYAWSAILGGDH DGDDAVVFYRAPVEGYELPDDTLDLQAIKP VARKLDANTVEARIQR WQNEVSVNIGQFDLAARRLLAANKLHREEAKLLSVAIQTAISLKKR VARLEDQSWWPRVAELLEESKKLAGTTWVDMIR DGREPVGAPDWVL TIYQKVHEAIKKVQKLEPRLWLTEAKVREFAKGATVPASCEALIQY REKLLKAKAIAVQ NEDGDTVARLNKELKEFIHVEAPKHL LGIDEED WKQFSRWAIGNTHISEWVFWCHPAILEELYDRFGKQTIKAIALGGT PNLAESEVIELEDQELIDRVFEVEGVKYALLDETGYLKAGRLKVTK VRKSVVEFEYA
2	大腸菌 (E. coli) 調和化 Phifa_44	ATGAACAAAACCGAGTTAGTTAAGAACTCATAGAGGAAAAAACTG CAGAACTCGCTGTACGTCCTGTTTATACCGGGAGGATCGATGAGGA GGGGCAGTGGACTCCTACTTCGCTGCACGAACGTTATCAGGATAAG GTTCTGGTAGTACCTGCACCTGAAGAAGGGGAGCCGGTTCAGACCA TCGGTGAGTATGAGTTTGTGGGGGGAACCGAACAGGATCGTTTA TATCCATCGTTCGATCATCAAACAATGGCTGGAGGTTGCAGGGGGT GACAGCCACTGGGGGGCAGCAGTAGTACTGCGTCCGGGTAAACTCG CTAGCCATAACGCAGTTTTTTTCGTGGGAGGGTTATCAGTTAGAGGA ATCGGATGAGGGTCTGCTGGCAACTATGGACGAACGTGATTGGAAA GTACTGCTGGAGGCTTATGATCTGGATCCTGAAGTACGTCTCGTTC AGGTTACTGTTTTCGATCTGGAGCAGGGTGTAGCGCAAAAGGTAC TCTGCGTAAAGTTCTCCCTGGGGAGCGTCTGTAGTTTTTTCCTAAC TCGTGGAAAAAATTTGGTAACCTCCGTACTCAATTTATGAGCATCC TGACCACTGACGTTCACTATAACCCCCGTGCTAGCGTTAACCTACA AGAGCTCACCTATTATGTT CAGGAGGCTCCCGCTCAGTGGGTTTTT GACGCTCTGGATGAAGAGATCGAACGTATCATAAACCTGAAAACCA GCCCTTGGCTGACTACTGGTTATCTGACCCGTCTCGGTTTCAGCCC TGCTTGGAACCTCGACCCCTCACCCTCTCAAGGAAAGCCTGTGCGGT GAACTGAAGAACTACTGCGTCGTATAAACTGTGGGTAAATATG GTCTGCGTGCAAAATCGACTTCGAGCCACCTCCTGCGTGATGGTGA ATTACTGTTACCTGCATACGCAAAAAACACGTTAAGGTTGGTGAT TTCGTTACTGTTTCGCGTAACCTGCACTACCTTCGCAGGGGTGGG CAAAATATCGTGTAACCTGGGTTTATAGATGGTAACATGGTAGTTTT TCCTCAGGGGGATTATGCATGGAGCGCTATCCTGGGTGGTGATCAT GATGGTGACGACGCAGTTGTATTTTATCGTGCTCCGGTTGAAGGTT ATGAACTCCCGGACGACACTCTGGATCTGCAGGCAATAAAACCCGT AGCACGTAAACTCGACGCAAAACACCGTAGAGGCAAGGATACAACGT TGGCAAAACGAGGTAAGCGTTAACATCGGTCAAGTTCGATCTGGCTG CTAGGCGTCTCCTAGCAGCAACAAGCTGCATCGTGAGGAGGCAAA ACTACTGTGCGTAGCAATACAGACTGCAATCAGCCTCAAAAAACGT GTAGCTCGTCTAGAAGATCAGAGCTGGTGGCCCGCTGTAGCTGAGC

10

20

30

40

【0133】

【表 2】

		<p>TGCTCGAAGAGAGCAAAAACTCGCTGGTACCACTTGGGTTGATAT GATACGTGATGGTCTGTGAGCCGGTAGGGGCACCCGACTGGGTTCTC ACCATCTATCAGAAAGTTCATGAAGCAATCAAGAAAGTTCAGAAGC TGGAACCCCGTCTGTGGCTCACTGAAGCAAAAGTACGTGAATTTCGC AAAGGGGGCAACTGTACCTGCAAGCTGCGAGGCTCTAATCCAGTAT CGTGAAAACTCCTGAAAGCTAAAGCAATCGCAGTTCAGAACGAGG ATGGTGATACTGTTGCACGTTTAAACAAAGAACTGAAGGAGTTTAT CCACGTAGAGGCACCGAAACATCTGCTGGGGATAGATGAAGAAGAT TGGAAACAGTTTGTAGCAGGTGGGCAATCGGGAACACCCATATCAGCG AATGGGT'TTTTGGTGCCACCCCGCTATCCTAGAAGAACTGTATGA TCGTTTCGGGAAACAAACCATCAAAGCTATCGCACTGGGTGGGACT CCGAACCTAGCAGAAAGCGAGGTAATCGAGCTGGAAGATCAGGAAC TAATAGATCGTGTATTTGAAGTTGAAGGTGTAAATATGCTCTGTT AGATGAAACCGGTTATCTCAAGGCAGGGCGTCTGAAAGTTACTAAG GTTTCGTAAATCGGTTGTAGAATTTGAATATGCTTGA</p>	10
3	PhiFa ファージ 鋳型	<p>AATTCCTAATACGACTCACTATAGtatccggtgggccagccagcgta ccgtccctcgaggctgtggattgcgcggcttcccgcccgagccgcg catctagtcctcccgccaccaccacctctgcaggaagaggtgggcg aagagacgaagagaggtgaaagagagaagaggcgaaaggccgggtgt cccgcgcccggctcgccctacggtgccacgccaccccgctcgcgca aggctccgcgcggagcgcgcccttcgggcttacggccttgcgct cgcggggaccccggcgtggcagggctccgccccgagccgggcgcgt agaggacacccggctcaaggaggtcaaagatgaacaagaccgaact tgtcaaaaagttagttgaagagaagacggcgaggttggtgttagg ccggtgtacaccggtcgaatcgacgaagaaggtcagtggaactccga cttctctg</p>	20
4	鋳型	<p>ctgtggacgctgacttcatcgacgtactggaagatgtcaaaaattg aggcgtttgtggtataattagggctgtagcaagcaggtacactcgg cggcaagtctggagactggacttgccgccctgcttttgagcgcc gggtggtttggcgcggtttatgtttcgcccatggggggagccac ccggctttatcctccccgactggaggctagatgcagcttcgcaag attgcgccgaacgccaacttcttccgcctccttgaggagaacttca gcgcggaactggaagacatggacgctctgcccactagggaggttg atgaacatccgagatgcccccaagctgttccctcgagctttcgggc tttcgaccccagctacgtggctgcggtggagagcatcgcgaaagcg aagctctgagaggtgaagcatggcgaggttactggatttagcaag gtcttctcggtcggcaagacgctggagaaccaccgcatcaagttct tcagctacgctaccgtctagaccgcgtaagggtgaggaggggag tcttccccaccacctgttacctggaggtgaacgtgcgagtgcggt ttgcgtaaggcggtgtacgctagcggcaaaactccatgcggcgggga gtgttcaaggtagtttctggccttggttcttccgcgtgtgaggtg agagatggcgatttttgagctgaacgctggttccgaccttcgcttc cccaccaggaagga</p>	30
5	LAMP E-gene F3	AGCTGATGAGTACGAACTT	
6	LAMP E-gene B3	TTCAGATTTTAAACACGAGAGT	

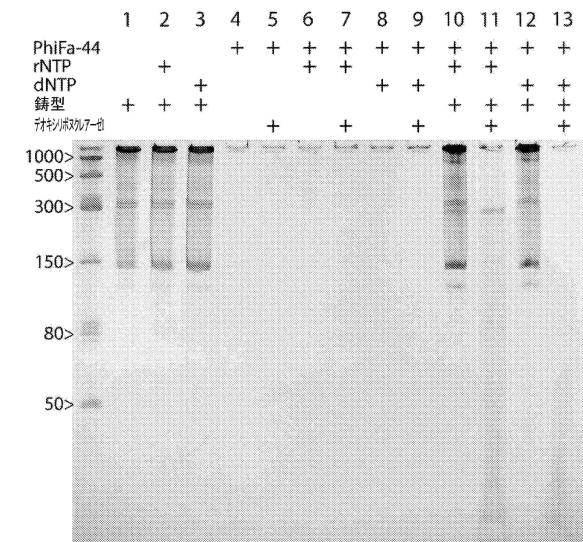
【 0 1 3 4 】

【表 3】

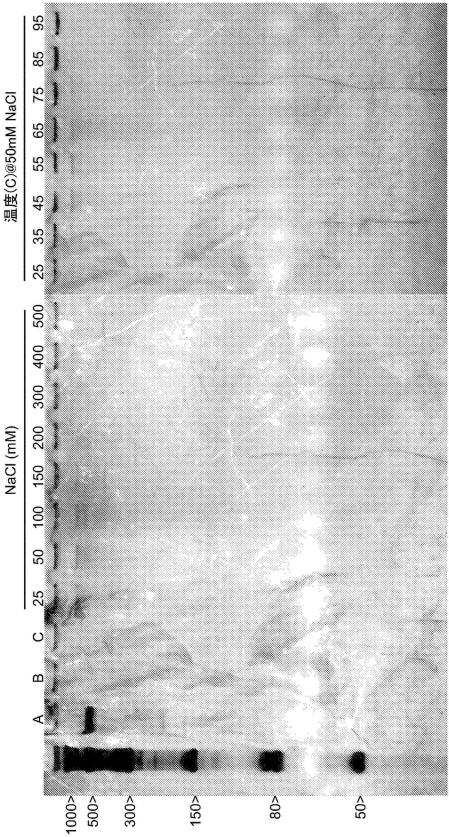
7	LAMP E-gene FIP	ACCACGAAAGCAAGAAAAAGAAGTATTCGTTTCGGAAGAGACAG
8	LAMP E-gene BIP	TTGCTAGTTACACTAGCCATCCTTAGGTTTACAAGACTCACGT
9	LAMP E-gene Loop	CTGCGCTTCGATTGTGTGCGT
10	LAMP E-gene F3	AGCTGATGAGTACGAACTT
11	E-gene crRNA	AUUGCGACACAAUAUUGCAGCAGUACGCACACAAUCGAAGCGCAGA
12	鋳型	5' Cy3- CGATGGCCGTAGATAAGGCGCCCGGGGACGACCACGTCAAGGCGCA GTTC

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

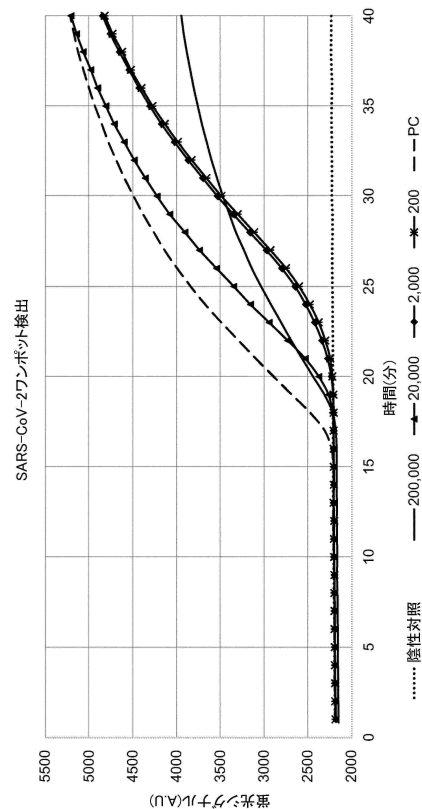
20

30

40

50

【図 3】



【図 4】

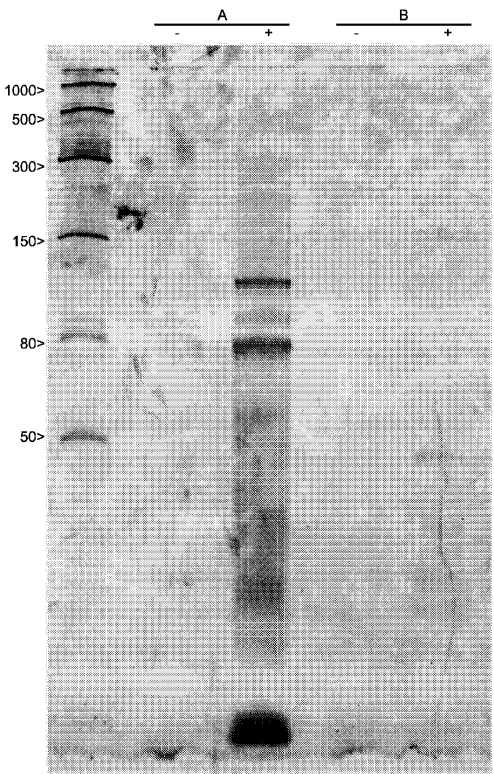
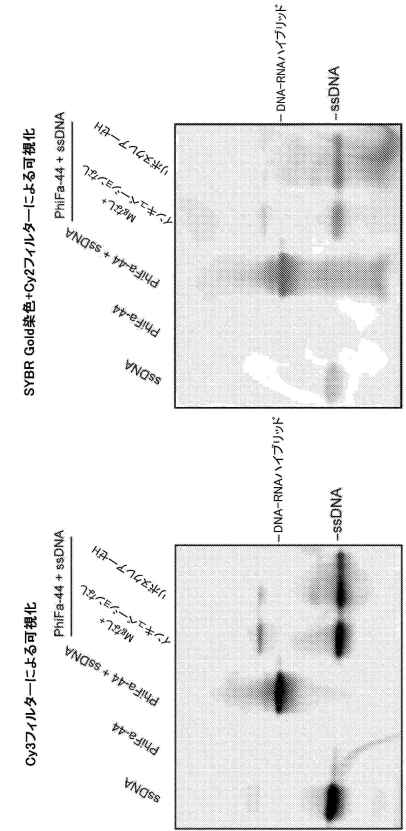


Fig. 4

【図 5】



【配列表】

2025504479000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2023/050024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/12 C12Q1/6816 ADD.		
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) C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 30 May 2020 (2020-05-30), "Thermus phage phiFa, RNA polymerase", XP002806766, retrieved from EBI accession no. EM_STD:MH673672 Database accession no. MH673672.2 the whole document	9, 11, 12
Y		1-5, 10,
A		13-15
		6-8
	----- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 17 March 2023		Date of mailing of the international search report 28/03/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gurdjian, Didier

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2023/050024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XUE YU ET AL: "Purification and Initial Characterization of RNA Polymerase from <i>Thermus thermophilus</i> Strain HB8", BIOCHEMISTRY, vol. 39, no. 46, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 14356-14362, XP093031662, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi0012538 abstract -----	1-5,10, 13-15
Y	XIA G ET AL: "DIRECTED EVOLUTION OF NOVEL POLYMERASE ACTIVITIES: MUTATION OF DNA POLYMERASE INTO AN EFFICIENT RNA POLYMERASE", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 99, no. 10, 14 May 2002 (2002-05-14), pages 6597-6602, XP001111463, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.102577799 abstract; table 3 -----	1-5,10, 13-15
A	WO 2020/256553 A1 (UNIV WAGENINGEN [NL]) 24 December 2020 (2020-12-24) abstract page 22, paragraph 2 - page 23, paragraph 2 page 27, paragraph 4; claims 1-17 -----	6-8
A	ARTAMONOVA DARIA ET AL: "Spacer acquisition by Type III CRISPR-Cas system during bacteriophage infection of <i>Thermus thermophilus</i> ", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 48, no. 17, 25 September 2020 (2020-09-25), pages 9787-9803, XP055929511, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkaa685 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7515739/pdf/gkaa685.pdf> abstract page 9800, left-hand column, paragraph 1 ----- -/--	6-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2023/050024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STEENS JURRE A. ET AL: "SCOPE enables type III CRISPR-Cas diagnostics using flexible targeting and stringent CARF ribonuclease activation", NATURE COMMUNICATIONS , vol. 12, no. 1 19 August 2021 (2021-08-19), XP055871892, DOI: 10.1038/s41467-021-25337-5 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41467-021-25337-5.pdf cited in the application abstract page 5 - page 6 -----</p>	6-8
A	<p>Lopatina Anna S ET AL: "royalsocietypublishing Natural diversity of CRISPR spacers of Thermus: evidence of local spacer acquisition and global spacer exchange", , 13 May 2019 (2019-05-13), XP055929476, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6452258/pdf/rstb20180092.pdf [retrieved on 2022-06-09] abstract; figure 3b -----</p>	6-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NL2023/050024

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 13ter.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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No PCT/NL2023/050024	
Information on patent family members					
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2020256553 A1		24-12-2020	CN 114207145 A		18-03-2022
			EP 3987058 A1		27-04-2022
			JP 2022538010 A		31-08-2022
			KR 20220038668 A		29-03-2022
			US 2022325328 A1		13-10-2022
			WO 2020256553 A1		24-12-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 Q 1/6806(2018.01)	C 1 2 Q 1/6806	Z

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

ディーダブル ヴェアストラート 3 4

(72)発明者 スタールズ, レイモンド ヒューバート ジョセフ

オランダ国 エーデ 6 7 1 1 エヌゼット デ ハルテ 3 4 9

(72)発明者 ヴァン デル オースト, ジョン

オランダ国 レンクム 6 8 7 1 エイチゼット ブラム ストレーフランドウェグ 1 1 6

F ターム (参考) 4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 AC14 BA02 CA29 CA46 CA60