

(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7月11日(11.07.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/147331 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/67 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/864 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

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.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/047128

(22) 国際出願日: 2023年12月27日(27.12.2023)

(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 2023-001001 2023年1月6日(06.01.2023) JP

(71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP). 国立大学法人徳島大学 (TOKUSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 Tokushima (JP).

(72) 発明者: 佐々木 隆英 (SASAKI, Takahide); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 前田 博文 (MAEDA, Hirofumi); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 鬼塚 正義 (ONITSUKA, Masayoshi); 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内 Tokushima (JP).

(74) 代理人: 伊東 忠重, 外 (ITO, Tadashige et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号 丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 16階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, 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,

(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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

(54) Title: NUCLEIC ACID FOR ENHANCING PROTEIN EXPRESSION

(54) 発明の名称: タンパク質発現増強用核酸

(57) Abstract: A nucleic acid for enhancing protein expression that includes RNA comprising the base sequence described in SEQ ID NO: 1 or DNA corresponding to said RNA.

(57) 要約: 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含むタンパク質発現増強用核酸である。



WO 2024/147331 A1

明 細 書

発明の名称：タンパク質発現増強用核酸

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質発現増強用核酸、ベクター、組成物、細胞、及びこれらの使用、並びに、タンパク質の製造方法、及びタンパク質の発現増強方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、抗体医薬などのタンパク質医薬や、ウイルスベクターなどを用いた遺伝子治療薬が、多く開発されている。

上記の医薬品に使用される、抗体や、ウイルスベクターなどのタンパク質は、細胞などに当該タンパク質を発現させることにより製造されるが、これらの生産性が低いことを一因として、上記の医薬品の薬価が極めて高額となっている。

[0003] 例えば、hsa-miR-324、hsa-miR-196a1、及びhsa-miR-342のいずれかのmiRNAを含み、かつ、発現しており、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターのウイルス粒子形成に必須な要素を発現する核酸をさらに含む、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター産生細胞は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの生産性を増加させることが知られているが、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター以外の生産性を増加させる方法は知られていない（特許文献1参照）。

[0004] したがって、高効率にタンパク質の発現を増強できる、タンパク質発現増強用核酸が求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第6093358号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、従来における前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、高効率にタンパク質の発現を増強できる、タンパク質発現増強用核酸、前記タンパク質発現増強用核酸を含むベクター及び組成物、前記タンパク質発現増強用核酸が導入された細胞、及びこれらの使用、並びに、前記タンパク質発現増強用核酸を用いたタンパク質の製造方法及びタンパク質の発現増強方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らが、前記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含むタンパク質発現増強用核酸により、高効率にタンパク質の発現を増強できる、タンパク質発現増強用核酸、前記タンパク質発現増強用核酸を含むベクター及び組成物、前記タンパク質発現増強用核酸が導入された細胞、及びこれらの使用、並びに、前記タンパク質発現増強用核酸を用いたタンパク質の製造方法及びタンパク質の発現増強方法が提供できることを知見した。

[0008] 本発明は、本発明者らによる前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては以下のとおりである。即ち、

＜1＞ 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含むことを特徴とするタンパク質発現増強用核酸である。

＜2＞ 前記＜1＞に記載のタンパク質発現増強用核酸を含むベクターである。

＜3＞ 前記＜1＞に記載のタンパク質発現増強用核酸を含む組成物である。

＜4＞ 前記＜1＞に記載のタンパク質発現増強用核酸が導入された細胞である。

＜5＞ 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含むタンパク質発現増強用核酸が導入された細胞を培養する工程を含むことを特徴とするタンパク質の製造方法である。

＜6＞ 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対

応するDNAを含むタンパク質発現増強用核酸を細胞に導入する工程を含むことを特徴とするタンパク質の発現増強方法である。

<7> (a) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸、

(b) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸を含むベクター、

(c) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸を含む組成物、及び

(d) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸が導入された細胞、

のいずれかのタンパク質発現増強のための使用である。

発明の効果

[0009] 本発明によると、従来における前記諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、高効率にタンパク質の発現を増強できる、タンパク質発現増強用核酸、前記タンパク質発現増強用核酸を含むベクター及び組成物、前記タンパク質発現増強用核酸が導入された細胞、これらの使用、並びに、前記タンパク質発現増強用核酸を用いたタンパク質の製造方法及びタンパク質の発現増強方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、miRNA1185、miRNA3148、miRNA4657、及びmiRNA6823のAAV生産性評価結果を示す図である。

[図2]図2は、293F細胞を用いたpRC2-miRNA1185発現用プラスミドの評価結果を示す図である。

[図3]図3は、VPCs2.0細胞を用いたpRC2-miRNA1185発現用プラスミドの評価結果を示す図である。

[図4]図4は、HEK293T細胞を用いたpRC2-miRNA1185発現用プラスミドの評価結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] (タンパク質発現増強用核酸)

前記タンパク質発現増強用核酸は、以下の (i) から (i i i) のいずれかの RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含み、さらにその他の配列を含むことができる。

(i) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA

(i i) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA と 90% 以上の配列同一性を有し、タンパク質発現増強作用を有する RNA

(i i i) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA に対して、2 塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有し、タンパク質発現増強作用を有する RNA

[0012] これらの中でも、前記タンパク質発現増強用核酸は、前記 (i) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含むことが好ましい。

[0013] 前記 RNA はリボ核酸であり、塩基として、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、及びウラシル (U) を含むことができる。

前記 DNA はデオキシリボ核酸であり、塩基として、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、及びチミン (T) を含むことができる。

前記 RNA に対応する DNA とは、前記 RNA の塩基配列中のウラシル (U) をチミン (T) に置き換えた塩基配列を有する DNA を意味する。

[0014] 配列表の配列番号 1 において、記号「t」はウラシルを示す。また、配列表の配列番号 21 において、記号「t」はチミンを示す。したがって、前記配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 及び前記配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA に対応する DNA (即ち、配列番号 21 に記載の塩基配列からなる DNA) は、以下の通りである。

[配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA]

a u a u a c a g g g g g a g a c u c u u a u (配列番号 1)

[配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA に対応する DNA]

a t a t a c a g g g g g a g a c t c t t a t (配列番号 21)

[0015] 前記タンパク質は、目的タンパク質又は標的タンパク質とも言い、宿主（細胞）において、発現を増強させるタンパク質である。

前記タンパク質は、前記タンパク質発現増強用核酸を前記宿主（細胞）に導入することで、発現を増強することができる。

[0016] 前記タンパク質の発現増強としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、宿主（細胞）における前記タンパク質の発現量が、前記タンパク質発現増強用核酸を前記宿主（細胞）に導入しない場合と比較して、前記タンパク質発現増強用核酸を前記宿主（細胞）に導入した場合に、1. 1倍以上増加することが好ましく、1. 2倍以上増加することがより好ましく、1. 5倍以上増加することがさらに好ましく、2倍以上増加することが特に好ましい。

[0017] 前記タンパク質の発現量を確認する方法としては、特に制限はなく、前記タンパク質の種類に応じて、公知の方法の中から適宜選択することができ、ウエスタンブロット法、ELISA法などが挙げられる。前記タンパク質が酵素である場合は、前記タンパク質発現増強用核酸を前記宿主（細胞）に導入した場合と、前記タンパク質発現増強用核酸を前記宿主（細胞）に導入しない場合との酵素活性を、該酵素の種類に応じた基質を使用して公知の方法で比較し、前記タンパク質発現増強用核酸を前記宿主（細胞）に導入した場合の酵素活性の方が高い場合に、前記タンパク質の発現量が増加したと判断してもよい。また、前記タンパク質がウイルスである場合は、前記タンパク質発現増強用核酸を前記宿主（細胞）に導入した場合と、前記タンパク質発現増強用核酸を前記宿主（細胞）に導入しない場合とのウイルスの力価又はウイルスベクターの力価を、定量PCR法等の公知のウイルス力価測定方法で測定して比較し、前記タンパク質発現増強用核酸を前記宿主（細胞）に導入した場合のウイルスの力価又はウイルスベクターの力価が高い場合に、前記タンパク質の発現量が増加したと判断してもよい。

[0018] 前記タンパク質としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス、パル

ボウイルス、コロナウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、パピローマウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス等のウイルス；全抗体、一本鎖抗体、重鎖抗体、多価抗体、 Fab 、 $F(ab')$ 、 $F(ab')_2$ 、 Fc 、 Fc 融合タンパク質、バイスペシフィック抗体、重鎖（H鎖）、軽鎖（L鎖）、単鎖 $Fv(scFv)$ 、 $sc(Fv)_2$ 、ジスルフィド結合 $Fv(sdFv)$ 、*Diabody*、抗体様分子標的ペプチド（マイクロ抗体）等の抗体；フィターゼ、アミラーゼ、グルコシダーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、グルタミナーゼ、ペプチダーゼ、ヌクレアーゼ、オキシダーゼ、ラクターゼ、キシラナーゼ、トリプシン、ペクチナーゼ、イソメラーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子（*TPA*）、ウロキナーゼ等の酵素；プロテインA、プロテインG、プロテインL等の抗体結合性タンパク質；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；ヒト上皮成長因子等の上皮成長因子；インシュリン、成長ホルモン、レプチン等のホルモン類；エリスロポエチン、インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子（*GM-CSF*）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（*GM-CSF*）、トロンボポエチン、*IL-1*、*IL-6*、幹細胞成長因子（*SCF*）等のサイトカイン又は増殖因子類；血液凝固第 $VIII$ 因子等の血液凝固線溶系因子；フィブロイン；蛍光タンパク質；B型肝炎ウイルス表面抗原；ヒルジンなどが挙げられる。

これらの中でも、前記タンパク質は、ウイルス又は抗体が好ましく、ウイルスがより好ましく、アデノ随伴ウイルス（*AAV*）がさらに好ましい。

前記ウイルスは、ウイルスベクターであってもよい。

[0019] ーアデノ随伴ウイルス（*AAV*）ー

前記アデノ随伴ウイルスは、カプシド中に直鎖状一本鎖DNAを含むパルボウイルス科に属するウイルスである。前記アデノ随伴ウイルスの血清型としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、1型*AAV*（*AAV1*）、2型*AAV*（*AAV2*）、3型*AAV*（*AAV3*）、4型*AAV*（*AAV4*）、5型*AAV*（*AAV5*）、6型*AAV*（*AA*

V6)、7型AAV(AAV7)、8型AAV(AAV8)、9型AAV(AAV9)、及び10型AAV(AAV10)などが挙げられる。

[0020] 前記ウイルスは、ウイルスを構成する一部のポリペプチドであってもよい。

前記アデノ随伴ウイルス(AAV)を構成する一部のポリペプチドとしては、例えば、アデノ随伴ウイルス由来のVP1、アデノ随伴ウイルス由来のVP2、アデノ随伴ウイルス由来のVP3、アデノ随伴ウイルス由来のRep、アデノ随伴ウイルス由来のCap、アデノ随伴ウイルス由来のAAP、アデノ随伴ウイルス由来のMAAPなどが挙げられる。

[0021] 前記宿主(細胞)としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、大腸菌等の細菌、酵母等の真菌、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などが挙げられるが、大腸菌等の細菌、又は動物細胞が好ましく、動物細胞がより好ましい。

[0022] 前記動物細胞としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、293F細胞、VPCs2.0細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、HeLa細胞、CHO細胞、iPS細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。

[0023] これらの中でも、前記宿主(細胞)は、前記動物細胞が好ましく、293F細胞、VPCs2.0細胞、又はHEK293T細胞がより好ましく、293F細胞がさらに好ましい。

[0024] <(i) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA>

前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAは、miRNA(micro-RNA)である。前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAは、後述する実施例の解析3に記載の通り、hsa-miR-1185-1-3pである。

[0025] 前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対応するDNAは、上述の通り、前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAの塩基配列中のウラシル(U)をチミン(T)に置き換えた塩基配列を有するDNAである。

。具体的には、前記配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA に対応する DNA は、配列番号 21 に記載の塩基配列からなる DNA である。配列番号 21 に記載の塩基配列からなる DNA は、例えば、前記配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA から、逆転写酵素を用いた公知の相補的 DNA (cDNA) 合成法により合成することができる。

[0026] <(i i) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA と 90% 以上の配列同一性を有し、タンパク質発現増強作用を有する RNA >

前記配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA と 90% 以上の配列同一性を有する RNA としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。前記配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA に対して、配列同一性が 90% 以上となる範囲で、前記配列番号 1 に記載の塩基配列中の 1 以上の塩基が、置換、付加、及び／又は欠失した RNA であるが、高効率にタンパク質の発現を増強する点から、配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA と 95% 以上の配列同一性を有する RNA が好ましい。

[0027] 前記配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA と 90% 以上の配列同一性を有し、タンパク質発現増強作用を有する RNA に対応する DNA は、前記配列番号 21 に記載の塩基配列からなる DNA と 90% 以上の配列同一性を有する DNA である。前記配列番号 21 に記載の塩基配列からなる DNA と 90% 以上の配列同一性を有する DNA は、前記配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA と 90% 以上の配列同一性を有し、タンパク質発現増強作用を有する RNA から、逆転写酵素を用いた公知の相補的 DNA (cDNA) 合成法により合成することができる。

[0028] 前記タンパク質発現増強作用を有する RNA とは、前記 RNA 及び前記タンパク質を宿主（細胞）に発現させたときに、前記 RNA を発現させない場合と比較して、前記タンパク質の発現量を増加させることのできる RNA を言う。

[0029] 前記タンパク質の発現量の増加としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、宿主（細胞）における前記タンパク質の発現

が、前記RNAを前記宿主（細胞）に導入しない場合と比較して、1. 1倍以上増加することが好ましく、1. 2倍以上増加することがより好ましく、1. 5倍以上増加することがさらに好ましく、2倍以上増加することが特に好ましい。

[0030] 前記タンパク質発現増強作用を有するRNAによる前記タンパク質の発現量の増加は、前記タンパク質の発現増強の説明に記載の方法と同様の方法で確認することができる。

[0031] < (i i i) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有し、タンパク質発現増強作用を有するRNA >

前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有するRNAは、配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、2塩基以内の塩基が、置換、付加、及び／又は欠失したRNAである。

前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有するRNAとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、高効率にタンパク質の発現を増強する点から、前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、1塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有するRNAが好ましい。

[0032] 前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有し、タンパク質発現増強作用を有するRNAに対応するDNAは、前記配列番号21に記載の塩基配列からなるDNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有するDNAである。なお、前記配列番号21に記載の塩基配列からなるDNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失は、前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有し、タンパク質発現増強作用を有するR

NAにおける、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失に対応した塩基の置換、付加、及び／又は欠失である。前記配列番号21に記載の塩基配列からなるDNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有するDNAは、前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有し、タンパク質発現増強作用を有するRNAから、逆転写酵素を用いた公知の相補的DNA（cDNA）合成法により合成することができる。

[0033] 前記タンパク質発現増強作用を有するRNAとは、前記RNA及び前記タンパク質を宿主（細胞）に発現させたときに、前記RNAを発現させない場合と比較して、前記タンパク質の発現量を増加させることのできるRNAを言う。

[0034] 前記タンパク質の発現量の増加としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、宿主（細胞）における前記タンパク質の発現が、前記RNAを前記宿主（細胞）に導入しない場合と比較して、1.1倍以上増加することが好ましく、1.2倍以上増加することがより好ましく、1.5倍以上増加することがさらに好ましく、2倍以上増加することが特に好ましい。

[0035] 前記タンパク質発現増強作用を有するRNAによる前記タンパク質の発現量の増加は、前記タンパク質の発現増強の説明に記載の方法と同様の方法で確認することができる。

[0036] <その他の配列>

前記その他の配列としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0037] （ベクター）

前記ベクターは、前記タンパク質発現増強用核酸を含み、さらにその他の要素を含むことができる。

前記タンパク質発現増強用核酸は、前述の（タンパク質発現増強用核酸）の項目に記載のとおりである。

[0038] 前記ベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、p R C 2 ベクターなどが挙げられる。

[0039] <その他の要素>

前記その他の要素としては、前記タンパク質（目的タンパク質又は標的タンパク質）をコードする核酸、プロモーター配列を有する核酸、ポリ A 付加シグナル配列を有する核酸などが挙げられる。

前記タンパク質は、前述の（タンパク質発現増強用核酸）の項目に記載のとおりである。

これらの中でも、前記タンパク質は、ウイルス又は抗体をコードする核酸を含むものが好ましく、ウイルスをコードする核酸を含むものがより好ましく、アデノ随伴ウイルス（A A V）をコードする核酸を含むものがさらに好ましい。

[0040] （組成物）

前記組成物は、前記タンパク質発現増強用核酸を含み、さらにその他の要素を含むことができる。

前記タンパク質発現増強用核酸は、前述の（タンパク質発現増強用核酸）の項目に記載のとおりである。

[0041] 前記その他の要素としては、前述の（ベクター）に記載のとおりである。
また、前記組成物をトランスフェクションに用いるために、トランスフェクション試薬、エンハンサーなどを含んでもよい。

[0042] （細胞）

前記細胞は、前記タンパク質発現増強用核酸が導入された細胞である。

前記タンパク質発現増強用核酸は、前述の（タンパク質発現増強用核酸）の項目に記載のとおりである。

[0043] 前記導入としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、カチオン性脂質による導入、リン酸カルシウム共沈殿法による導入、D E A E デキストランによる導入、カチオン性ポリマーによる導入、ウイルスによる導入、エレクトロポレーション法による導入、ナノ粒子によ

る導入、マイクロインジェクション法による導入、レーザーによる導入などが挙げられる。

[0044] 前記細胞としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、大腸菌等の細菌、酵母等の真菌、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などが挙げられるが、大腸菌等の細菌、又は動物細胞が好ましく、動物細胞がより好ましい。

前記動物細胞としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、293F細胞、VPCs2.0細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、HeLa細胞、CHO細胞、iPS細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。

これらの中でも、前記細胞は、293F細胞、VPCs2.0細胞、又はHEK293T細胞が好ましく、293F細胞がより好ましい。

[0045] (タンパク質の製造方法)

前記タンパク質の製造方法は、以下の(i)から(iii)のいずれかのRNA又は前記RNAに対応するDNAを含むタンパク質発現増強用核酸が導入された細胞を培養する工程を含み、さらにその他の工程を含むことができる。

(i) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA

(ii) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAと90%以上の配列同一性を有し、タンパク質発現増強作用を有するRNA

(iii) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有し、タンパク質発現増強作用を有するRNA

[0046] 前記タンパク質発現増強用核酸は、前述の(タンパク質発現増強用核酸)の項目に記載のとおりである。

[0047] 前記細胞は、前述の(細胞)の項目に記載のとおりである。

[0048] 前記培養としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、前記細胞を培養培地に播種し、静置、攪拌又は振盪する方法などが挙げ

られる。

前記培養培地に、細胞増殖阻害剤を加えることができる。

[0049] <その他の工程>

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記タンパク質発現増強用核酸を前記細胞に導入する工程、前記培養する工程の後に前記タンパクを精製する工程などが挙げられる。

[0050] 前記 (i) から (i i i) のいずれかの RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含むタンパク質発現増強用核酸が導入された細胞は、前記タンパク質発現増強用核酸を前記細胞に導入する工程により好適に得ることができる。前記導入は、前述の (細胞) の項目に記載のとおりである。

[0051] (タンパク質の発現増強方法)

前記タンパク質の発現増強方法は、以下の (i) から (i i i) のいずれかの RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含むタンパク質発現増強用核酸を細胞に導入する工程を含み、さらにその他の工程を含むことができる。

[0052] 前記タンパク質発現増強用核酸は、前述の (タンパク質発現増強用核酸) の項目に記載のとおりである。

[0053] 前記細胞及び導入は、前述の (細胞) の項目に記載のとおりである。

[0054] 前記その他の工程は、例えば、前記細胞を培養する工程、前記培養する工程の後に前記タンパクを精製する工程などが挙げられる。これらのその他の工程は、前述の (タンパク質の製造方法) の項目に記載のとおりである。

[0055] (タンパク質発現増強のための使用)

前記タンパク質発現増強のための使用は、(a) 以下の (i) から (i i i) のいずれかの RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含む核酸、(b) 以下の (i) から (i i i) のいずれかの RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含む核酸を含むベクター、(c) 以下の (i) から (i i i) のいずれかの RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含む核酸を含む組成物、及び (d) 以下の (i) から (i i i) のいずれかの RNA 又は前記 RNA

Aに対応するDNAを含む核酸が導入された細胞、のいずれかのタンパク質発現増強のための使用である。

(i) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA

(ii) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAと90%以上の配列同一性を有し、タンパク質発現増強作用を有するRNA

(iii) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNAに対して、2塩基以内の塩基の、置換、付加、及び／又は欠失を有し、タンパク質発現増強作用を有するRNA

[0056] これらの中でも、前記タンパク質発現増強のための使用は、(a) 前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸、(b) 前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸を含むベクター、(c) 前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸を含む組成物、及び(d) 前記配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸が導入された細胞、のいずれかのタンパク質発現増強のための使用であることが好ましい。

[0057] 前記(a)核酸は、前述の(タンパク質発現増強用核酸)の項目に記載のとおりである。

[0058] 前記(b)ベクターは、前述の(ベクター)の項目に記載のとおりである。

[0059] 前記(c)組成物は、前述の(組成物)の項目に記載のとおりである。

[0060] 前記(d)細胞は、前述の(細胞)の項目に記載のとおりである。

実施例

[0061] 以下、本発明の実施例を説明するが、本発明は、これらの実施例に何ら限定されるものではない。

[0062] <製造例1 抗体発現CHO細胞の調製>

CHO細胞(CHO-K1株由来)に対して、ヒト化モノクローナル抗体発現遺伝子を導入し、IgG1抗体を安定発現するCHO細胞株を構築した

。具体的には以下のようにして行った。

I g G 1 の軽鎖及び重鎖配列を含むプラスミドDNAを鋳型にしてPCR増幅を行い、軽鎖配列（0.7 kb断片）及び重鎖配列（1.4 kb断片）を得た。得られた断片をMammalian PowerExpress System発現ベクター（東洋紡株式会社）に挿入し、I g G 1 抗体発現プラスミドを構築した。

前記I g G 1 抗体発現プラスミドを制限酵素Ssp Iで処理し直鎖化したDNAを、遺伝子導入試薬Lipofectamine（Thermo Fisher Scientific社）を用いてCHO細胞（CHO-K1株由来）に遺伝子導入し、125-mL Erlenmeyer flask（コーニング社）で培養した。抗生物質ピューロマイシン（ナカライテスク株式会社）を終濃度20 µg/mLで添加し、細胞増殖が安定するまで繰り返し継代培養を実施した。得られたプール細胞の中から、ClonePix 2システム（Molecular Devices社）を用いて、シングルコロニーを単離し、96-ウェルマルチプレートに播種した。Clone Select Imager（Molecular Devices社）を用いて、良好な細胞増殖性を示すクローン細胞を選別し、拡大培養した。

複数のクローン細胞の培養上清の分泌生産抗体濃度をOctet QKe（Sartorius社）によるバイオレイヤー干渉法により測定した。標準I g G 1 サンプルにはCHO細胞で発現させたI g G 1 抗体（アフィニティークロマトグラフィー・サイズ排除クロマトグラフィー精製済、SDS-PAGEによる純度99%以上）を使用した。

以上により、良好な細胞増殖性、抗体生産性を示すI g G 1 抗体を安定発現するCHO細胞株を樹立した。

[0063] I g G 1 抗体を安定発現するCHO細胞株を親細胞とし、細胞クローニングを実施した。親細胞をBalanced CHO Growth A（富士フィルム和光純薬株式会社）を主成分とする半固形培地に播種し、2週間程度培養することでクローン細胞コロニーを形成させた。その後、動物細胞コロ

ニーピッキングシステムClonePix2システム (Molecular Devices 社) を用いて、シングルコロニーを単離した。単離した複数のクローン細胞コロニーを96-ウェルプレートに播種した。プレートへの播種後、静置培養しながら細胞増殖プレートイメージャーClone Select Imager (Molecular Devices 社) を利用して細胞増殖性の優れたクローン細胞を24-ウェルプレートに拡大培養した。以降、同様に6-ウェルプレートに拡大培養した。最終的に125-mL Erlenmeyer flask (コーニング社) を用いて5% CO₂、37℃条件下で振盪培養を行い、良好な細胞増殖性を示すCHO細胞株を複数株樹立した。樹立した細胞のうち、IgG1-A細胞及びIgG1-B細胞について、以下のとおり、細胞増殖及び抗体生産量を解析した。

[0064] <<解析1 IgG1-A細胞及びIgG1-B細胞における細胞増殖解析>>

IgG1-A細胞及びIgG1-B細胞を125-mL Erlenmeyer flask (コーニング社) を用いて振盪培養を実施した。Climoshaker ISF1-X (Kuhner 社) を用いて温度37℃、湿度80%、炭酸ガス濃度5%、回転数80rpmの条件下で振盪培養を行った。CHO細胞用無血清培地としてBalanced CHO Growth A (富士フィルム和光純薬株式会社、4mM L-グルタミン含有) を用いてバッチ培養を実施した。細胞密度 0.3×10^6 cells/mLで播種し、播種後から214時間後まで、適宜、セルカウンターCountess II (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて細胞数測定を実施した。培養は各細胞3フラスコ (n=3) で実施した。

その結果、IgG1-A細胞及びIgG1-B細胞における細胞増殖率は同等であった。

[0065] <<解析2 IgG1-A細胞及びIgG1-B細胞における抗体生産量解析>>

培養4日目以降、培養液をサンプリングし除細胞した上清液を用いて培養

液中の抗体濃度をバイオレイヤー干渉法により実施した。測定にはOctet QKe (Sartorius社)を使用した。標準IgG1サンプルにはCHO細胞で発現させたIgG1抗体(アフィニティークロマトグラフィー・サイズ排除クロマトグラフィー精製済、SDS-PAGEによる純度99%以上)を使用した。

その結果、IgG1-B細胞は、IgG1-A細胞と比較して、214時間後のIgG1の生産量が約1.4倍であった。

[0066] <<解析3 IgG1-A細胞及びIgG1-B細胞におけるmiRNA発現解析>>

培養6日目のサンプルを一部採取し、セルカウンターCountess II (Thermo Fisher Scientific社)による細胞数測定後、 1×10^7 cells程度の細胞を遠心分離により調製し細胞ペレットを -80°C で凍結保存した。

フィルジェン株式会社に委託し、次の解析を行った。RNA抽出キットmiRNeasy Mini kit (QIAGEN社)を用いて、前記凍結保存したIgG1-A細胞及びIgG1-B細胞からsmall RNAを含むtotal RNAを抽出した。次に、FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いて前記total RNAをビオチン標識した。その後、GeneChip (登録商標) Hybridization Oven (Thermo Fisher Scientific社)を用いてビオチン標識RNAとGeneChip (登録商標) miRNA 4.0 Array (Thermo Fisher Scientific社)をハイブリダイゼーションさせ、GeneChip (登録商標) Fluidics station (Thermo Fisher Scientific社)を用いてアレイの洗浄を行った。アレイ調製後、GeneChip (登録商標) Scanner 3000 7G (Thermo Fisher Scientific社)を用いてスキャニングを実施し

、lgG1-A細胞－lgG1-B細胞間の発現比較を行った。

lgG1-A細胞及びlgG1-B細胞におけるmiRNA発現解析結果の一部を表1に示した。

[0067] [表1]

lgG1-B	lgG1-A	Ratio	Log2	Transcript ID(Array Design)
24.34328	3.02572	8.04545	3.00817	hsa-miR-1185-1-3p
6.95992	2.18150	3.19042	1.67375	hsa-miR-3148
6.51865	2.25637	2.88900	1.53057	hsa-miR-4657
18.46734	4.10295	4.50099	2.17024	hsa-miR-6823-3p

[0068] 表1の結果より、lgG1-B細胞におけるhsa-miR-1185-1-3p（以下、「miRNA1185」と称することがある）の発現は、lgG1-A細胞の約8.0倍であり、lgG1-B細胞におけるhsa-miR-3148（以下、「miRNA3148」と称することがある）の発現は、lgG1-A細胞の約3.2倍であり、lgG1-B細胞におけるhsa-miR-4657（以下、「miRNA4657」と称することがある）の発現は、lgG1-A細胞の約2.9倍であり、lgG1-B細胞におけるhsa-miR-6823-3p（以下、「miRNA6823」と称することがある）の発現は、lgG1-A細胞の約4.5倍であった。

[0069] <製造例2 miRNA発現用プラスミドの構築>

以下のとおり、pRC2-mi342（タカラバイオ株式会社）を改変して、各miRNA発現用プラスミド（pRC2-miRNA1185発現用プラスミド、pRC2-miRNA3148発現用プラスミド、pRC2-miRNA4657発現用プラスミド、及びpRC2-miRNA6823発現用プラスミド）を構築した。

[0070] <<製造例2-1 バックボーンプラスミドDNA断片の調製>>

pRC2-mi342をSnaBI（New England社）とSmaI（New England社）で消化し、hsa-miR-342発現カセットを含む約0.6kbの配列（配列番号2）が欠落したバックボーンプラスミドDNA断片を得た。

前記約0.6kbの配列（配列番号2）は、SnaBIサイト、CMVプ

ロモーター配列、h s a - m i R - 3 4 2 の配列を含む h s a - m i R - 3 4 2 発現カセット、ポリ A シグナル、及び S m a l サイトを含む。

[0071] <<製造例 2 - 2 C M V プロモーター領域、及びポリ A 付加シグナル領域の調製>>

p R C 2 - m i 3 4 2 を鋳型として、C M V プロモーター領域とポリ A 付加シグナル領域を P C R によりそれぞれ増幅した。C M V プロモーター領域の増幅にはプライマーとして、配列番号 3 に記載の塩基配列からなる C M V プロモーター用フォワードプライマー及び配列番号 4 に記載の塩基配列からなる C M V プロモーター用リバースプライマーを用い、ポリ A 付加シグナル領域の増幅にはプライマーとして、配列番号 5 に記載の塩基配列からなるポリ A シグナル用フォワードプライマー及び配列番号 6 に記載の塩基配列からなるポリ A シグナル用リバースプライマーを用いた。これらのプライマーには、P C R 断片及びバックボーンプラスミド D N A 断片を連結するための、バックボーンプラスミド D N A 及び各 m i R N A 発現カセットに対する相同領域を約 2 0 b p 程度付加した。

配列番号 4 及び配列番号 5 において、3' 末端の 1 7 塩基が、バックボーンプラスミド D N A に対する相同領域であり、5' 末端の 2 3 塩基が各 m i R N A に対する相同領域である。

P C R は、P r i m e S T A R M A X D N A P o l y m e r a s e (タカラバイオ株式会社)を用い、反応条件は添付のマニュアルに記載の方法で行った。以下、プラスミド作製のための全ての P C R に同様の酵素を用いた。

[0072] <<製造例 2 - 3 各 m i R N A の調製>>

各 m i R N A (m i R N A 1 1 8 5、m i R N A 3 1 4 8、m i R N A 4 6 5 7、及び m i R N A 6 8 2 3) の配列は、m i R N A のデータベースである m i R B a s e (<https://mirbase.org/>) から取得した。m i R N A 1 1 8 5 の m i R B a s e における A c c e s s i o n は M I M A T 0 0 2 2 8 3 8 であり、m i R N A 3 1 4 8 の m i R B a s e

におけるAccessionはMIMAT0015021であり、miRNA4657のmiRBaseにおけるAccessionはMIMAT0019724であり、miRNA6823のmiRBaseにおけるAccessionはMIMAT0027547である。ヒトゲノム情報を参照して、各miRNAの上流及び下流の約50bpから100bp付近にプライマーを設計した。miRNA1185はプライマーとして、配列番号7に記載の塩基配列からなるhsa-miR-1185用フォワードプライマー及び配列番号8に記載の塩基配列からなるhsa-miR-1185用リバースプライマーを用いた。miRNA3148はプライマーとして、配列番号9に記載の塩基配列からなるhsa-miR-3148用フォワードプライマー及び配列番号10に記載の塩基配列からなるhsa-miR-3148用リバースプライマーを用いた。miRNA4657はプライマーとして、配列番号11に記載の塩基配列からなるhsa-miR-4657用フォワードプライマー及び配列番号12に記載の塩基配列からなるhsa-miR-4657用リバースプライマーを用いた。miRNA6823はプライマーとして、配列番号13に記載の塩基配列からなるhsa-miR-6823用フォワードプライマー及び配列番号14に記載の塩基配列からなるhsa-miR-6823用リバースプライマーを用いた。これらのプライマーには、PCR断片やバックボーンプラスミドDNA断片と連結するための、バックボーンプラスミドDNAに対する相同領域を約20bp程度挿入した。

配列番号7、配列番号9、配列番号11、及び配列番号13において、5'末端の17塩基が、バックボーンプラスミドDNAに対する相同領域であり、配列番号8、配列番号10、配列番号12、及び配列番号14において、5'末端の18塩基が、バックボーンプラスミドDNAに対する相同領域である。

鋳型には、HEK293細胞(ATCC)から抽出したゲノムを用いた。ゲノム抽出にはDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN社)を用いた。反応条件は添付のマニュアルに記載の方法で行っ

た。

前記各プライマーと前記HEK293細胞から抽出したゲノムを用いて、各miRNA（miRNA1185、miRNA3148、miRNA4657、及びmiRNA6823）の発現カセットを含むDNA断片をPCR増幅した。

[0073] <<製造例2-4 pRC2-miRNA1185発現用プラスミド、pRC2-miRNA3148発現用プラスミド、pRC2-miRNA4657発現用プラスミド、及びpRC2-miRNA6823発現用プラスミドの構築>>

製造例2-1で調製したバックボーンプラスミドDNA断片と、製造例2-2及び製造例2-3で調製した3種類のPCR増幅断片（CMVプロモーター領域、ポリA付加シグナル領域、及び各miRNAの発現カセットを含むDNA断片）と、をNEB Builder（New England社）を用いて連結し、E. coli NEB Stable competent cells（New England社）を形質転換し、pRC2-miRNA1185発現用プラスミド、pRC2-miRNA3148発現用プラスミド、pRC2-miRNA4657発現用プラスミド、及びpRC2-miRNA6823発現用プラスミド（以下、これらの4種をまとめて「pRC2-miRNA発現用プラスミド」と略記することがある）を得た。得られた形質転換体から抽出したpRC2-miRNA発現用プラスミドのDNAのシーケンス配列を確認して、想定通りの配列であることを確認した。

[0074] <試験例1 miRNAの定量>

<<試験例1-1 miRNA発現用プラスミドの調製>>

製造例2で構築したpRC2-miRNA発現用プラスミドを1種類ずつ用いて、E. coli NEB Stable competent cellsを形質転換してから培養して、各プラスミドを大量調製した。各プラスミドの精製にはNucleobond Xtra Midi EF（マッ

ハライナーゲル社)を用いた。

[0075] <<試験例1-2 293F細胞の調製>>

浮遊HEK293細胞(Thermo Fisher Scientific社; FreeStyle (商標) 293F細胞)を、4mM Glutamax (Thermo Fisher Scientific社)を含むF17培地(Thermo Fisher Scientific社)に 1×10^6 cells/mLとなるように懸濁した。この懸濁液5mLを50mLフィルターキャップ付遠沈管に播種した。8%CO₂雰囲気下、37℃のインキュベーター内に入れて、200rpmで1時間振盪培養してトランスフェクションに供した。

[0076] <<試験例1-3 293F細胞へのプラスミド導入(トランスフェクション)>>

試験例1-1で調製した各pRC2-miRNA発現用プラスミド(1μg/μL、4μL)をOpti-MEM(Thermo Fisher Scientific社)中でPEI MAX(1μg/μL、12μL、PolySciences社)と混合し、試験例1-2で調製した293F細胞に前記プラスミドを導入した。8%CO₂雰囲気下、37℃のインキュベーター内に入れて、200rpmで3日間培養した。

陰性対照として、pRC2-mi342をSnaBI(New England社)とSmaI(New England社)で消化して調製した、miRNA発現カセットを有さないプラスミドpRC2も同様にプラスミドを調製して、トランスフェクション及び培養を実施した。

[0077] <<試験例1-4 RNAの抽出と定量>>

トランスフェクションした293F細胞を回収して、miRNeasy Minikit(QIAGEN社)を用いてtotal RNAを抽出し、Mir-X(商標) miRNA qRT-PCR TB Green(登録商標) Kit(タカラバイオ株式会社)を用いて、miRNAを定量した。操作は、キットに記載の方法に従った。抽出したtotal RNAに、

m R Q E n z y m eを用いてポリAを付加してから、逆転写した後に、m R Q 3' P r i m e r及び各m i R N Aに特異的なプライマーを用いて定量P C R法で測定した。m i R N A 1 1 8 5はプライマー（各m i R N Aに特異的なプライマー）として、配列番号15に記載の塩基配列からなるm i R N A 1 1 8 5定量用プライマーを用いた。m i R N A 3 1 4 8はプライマー（各m i R N Aに特異的なプライマー）として、配列番号16に記載の塩基配列からなるm i R N A 3 1 4 8定量用プライマーを用いた。m i R N A 4 6 5 7はプライマー（各m i R N Aに特異的なプライマー）として、配列番号17に記載の塩基配列からなるm i R N A 4 6 5 7定量用プライマーを用いた。m i R N A 6 8 2 3はプライマー（各m i R N Aに特異的なプライマー）として、配列番号18に記載の塩基配列からなるm i R N A 6 8 2 3定量用プライマーを用いた。結果を表2に示した。

表2の、「c o n t r o l」は陰性対照（プラスミドp R C 2）をトランスフェクションした293F細胞のC t値を示しており、「s a m p l e」は各m i R N Aを発現するプラスミド（p R C 2－m i R N A発現用プラスミド）をトランスフェクションした293F細胞のC t値を示している。 $\Delta\Delta C t$ は閾値に達したサイクル数であるC t値のc o n t r o lとs a m p l eの差分を示している。全てのs a m p l eにおいて閾値に達するC t値が早くなっており、m i R N Aが増加していることが分かった。「倍率」はc o n t r o lに対するs a m p l eの増加率を示している。

[0078] [表2]

	control	sample	$\Delta\Delta C t$	倍率
miRNA1185	24.3	15.7	8.8	444.1
miRNA3148	22.3	16.2	6.1	67.6
miRNA4657	24.4	14.0	10.8	1798.3
miRNA6823	21.5	16.5	5.4	41.3

表2の結果より、全てのm i R N Aが増加していることが確認できた。

[0079] <試験例2 m i R N AのA A V生産性評価>

<<試験例 2-1 293F細胞の調製>>

試験例 1-2と同様に293F細胞を調製した。

[0080] <<試験例 2-2 293F細胞へのプラスミド導入（トランスフェクション）>>

試験例 1-1で調製した各pRC2-miRNA発現用プラスミド（1 μ g/ μ L、4 μ L）及びpAAV-Venus（1 μ g/ μ L、1 μ L）、pHelper（1 μ g/ μ L、1 μ L）、及びPEI MAX（1 μ g/ μ L、12 μ L）をOpti-MEM中で混合して静置した。プラスミドDNA-PEI混合液を試験例 2-1で調製した293F細胞培養液に添加することにより細胞内にプラスミドを導入した。8%CO₂雰囲気下、37℃のインキュベーター内に入れて、200rpmで4時間培養した後に、DMSOを用いて50 μ Mに調製したノコダゾール（Cayman Chemical社）を50 μ L添加し、同様の条件で更に3日間培養した。

[0081] <<試験例 2-3 AAVの回収>>

得られた培養液を遠心し、上清と細胞ペレットを分離し、上清に対して、終濃度が10%となるように培養液に対して1/4容量の40%PEG8000（Sigma-Aldrich社）溶液を加えてAAVを沈殿させた。残渣に1mLの0.1%Triton X-100（Sigma-Aldrich社）溶液を加えて細胞破碎処理した後、1 μ Lのカネカエンドヌクレアーゼ（株式会社カネカ）を加えてDNAを分解した。15 μ LのEDTA（株式会社ニッポンジーン）を加えて遠心分離し、上清を回収した（上清由来サンプル）。

細胞ペレットに対しては、1mLの0.1%Triton X-100溶液を加えて細胞破碎処理した後、1 μ Lのカネカエンドヌクレアーゼを加えてDNAを分解した。15 μ LのEDTA（株式会社ニッポンジーン）を加えて遠心分離し、上清を回収した（細胞由来サンプル）。定量PCRに供するまで4℃又は-20℃にて保存した。

[0082] <<試験例 2-4 AAVのゲノム力価測定>>

試験例 2-3 で調製したサンプルに含まれる AAV ベクターの力価を、プライマー（配列番号 19 に記載の塩基配列からなる AAV タイター測定用フォワードプライマー及び配列番号 20 に記載の塩基配列からなる AAV タイター測定用リバースプライマー）を用いた定量 PCR 法（Quant Studio 3、SYBR-Green 法）で測定した。

前記定量 PCR には、12.5 μ L の Power Up（商標）SYBR（登録商標）Green Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）、各 0.125 μ L のプライマー（50 μ M、配列番号 19 及び配列番号 20）、11.25 μ L の滅菌水、及び 1 μ L の標準品又は 5000 倍希釈したサンプルからなる試料（合計 25 μ L）を用い、上記試料に対して Quant Studio 3（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて、94℃/15 秒（熱変性）、60℃/30 秒（アニーリング）、72℃/30 秒（伸長反応）を 30 サイクル繰り返すことにより PCR 反応を行った。

上記標準品は、pAAV-MCS Expression Vector（0.67 μ g/ μ L、TE 溶液、Cell Biolabs 社）を Pvu II（タカラバイオ株式会社）で 37℃、2 時間消化して直鎖化することにより作製した。定量 PCR の結果（AAV 生産量）を図 1 に示す。

図 1 の、vg/L は培養液量当たりの Vector Genome 量を示している。図 1 の bar は標準偏差を示している。

この中で最も AAV を生産していたのが、pRC2-miRNA1185 発現用プラスミドを用いたときであり、hsa-miR-1185 の効果で AAV 生産量が増加したと考えられた。

[0083] <実施例 1 293F 細胞を用いた pRC2-miRNA1185 発現用プラスミドの評価>

293F 細胞を用いて miRNA1185 による AAV 生産性の向上を検証した。

[0084] <<実施例 1-1 293F 細胞の調製>>

試験例 1-2 と同様に 293F 細胞を調製した。

[0085] <<実施例 1-2 293F 細胞へのプラスミド導入（トランスフェクション）>>

試験例 1-1 で調製した pRC2-miRNA1185 発現用プラスミド（ $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $3\mu\text{L}$ ）、pAAV-Venus（ $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1\mu\text{L}$ ）、pHelper（ $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $2\mu\text{L}$ ）、及び PEI MAX（ $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $12\mu\text{L}$ ）を Opti-MEM 中で混合して静置した。プラスミド DNA-PEI 混合液を実施例 1-1 で調製した 293F 細胞培養液に添加することにより細胞内にプラスミドを導入した。8%CO₂ 雰囲気下、37℃ のインキュベーター内に入れて、200rpm で 4 時間培養した後に、DMSO を用いて 50μM に調製したノコダゾールを 50μL 添加し、同様の条件で更に 3 日間培養した。

[0086] 陰性対照として、pRC2-mi342 を SnaBI（New England 社）と SmaI（New England 社）で消化して調製した、miRNA 発現カセットを有さないプラスミド pRC2 も同様にプラスミドを調製して、トランスフェクション及び培養を実施した。

[0087] <<実施例 1-3 AAV の回収>>

試験例 2-3 と同様の方法で回収した。

[0088] <<実施例 1-4 AAV のゲノム力価測定>>

試験例 2-4 と同様の方法で測定した。

定量 PCR の結果を図 2 に示す。

図 2 の、vg/L は培養液量当たりの Vector Genome 量を示しており、「control」は陰性対照（プラスミド pRC2）の結果を示している。

pRC2-miRNA1185 発現用プラスミドを用いたときに、陰性対照と比較して、生産性が増加した。

[0089] <実施例 2 VPCs 2.0 細胞を用いた pRC2-miRNA1185 発現用プラスミドの評価>

より生産性が高いとされる、VPCs 2.0細胞 (Thermo Fisher Scientific社) を用いてmiRNA1185によるAAV生産性の向上を検証した。

[0090] <<実施例2-1 VPCs 2.0細胞の調製>>

VPCs 2.0細胞を4mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific社) を含むViral Production培地 (Thermo Fisher Scientific社) に 3×10^6 cells/mLとなるように懸濁した。この懸濁液5mLを50mLフィルターキャップ付遠沈管に播種した。8%CO₂雰囲気下、37℃のインキュベーター内に入れて、200rpmで1時間振盪培養してトランスフェクションに供した。

[0091] <<実施例2-2 VPCs 2.0細胞へのプラスミド導入 (トランスフェクション)>>

試験例1-1で調製したpRC2-miRNA1185発現用プラスミド ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $5 \mu\text{L}$)、pAAV-Venus ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.25 \mu\text{L}$)、pHelper ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.25 \mu\text{L}$)、及びPEI MAX ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $15 \mu\text{L}$) をOpti-MEM中で混合して静置した。プラスミドDNA-PEI混合液を実施例2-1で調製したVPCs 2.0細胞培養液に添加することにより細胞内にプラスミドを導入した。8%CO₂雰囲気下、37℃のインキュベーター内に入れて、200rpmで4時間培養した後に、DMSOを用いて50μMに調製したノコダゾールを50μL添加し、同様の条件で更に3日間培養した。

[0092] 陰性対照として、pRC2-mi342をSnaBI (New England社) とSmaI (New England社) で消化して調製した、miRNA発現カセットを有さないプラスミドpRC2も同様にプラスミドを調製して、トランスフェクション及び培養を実施した。

[0093] <<実施例2-3 AAVの回収>>

試験例2-3と同様の方法で回収した。

[0094] <<実施例2-4 AAVのゲノム力価測定>>

試験例2-4と同様の方法で測定した。

定量PCRの結果を図3に示す。

図3の、vg/Lは培養液量当たりのVector Genome量を示しており、「control」は陰性対照（プラスミドpRC2）の結果を示している。

VPCs2.0細胞を用いたときも293F細胞を用いた時と同様に、陰性対照と比較して、pRC2-miRNA1185発現用プラスミドの効果で生産性が増加した。

[0095] <実施例3 HEK293T細胞を用いたpRC2-miRNA1185発現用プラスミドの評価>

接着細胞である、HEK293T細胞（ATCC）を用いてmiRNA1185によるAAV生産性の向上を検証した。

[0096] <<実施例3-1 HEK293T細胞の調製>>

HEK293T細胞を、5%ウシ胎児血清（Thermo Fisher Scientific社）、4mM GlutaMAX、及び0.5%ペニシリンストレプトマイシン混合液（ナカライテスク株式会社）を含むAdvanced D-MEM培地（Thermo Fisher Scientific社）に 5.3×10^4 cells/mLとなるように懸濁した。この懸濁液12mLを細胞培養用9cmディッシュ（住友ベークライト株式会社、57cm²）に播種し、5%CO₂雰囲気下、37℃インキュベーターで3日間培養した。

[0097] <<実施例3-2 HEK293T細胞へのプラスミド導入（トランスフェクション）>>

トランスフェクション当日に培養液を除去し、4mM GlutaMAX、及び0.5%ペニシリンストレプトマイシン混合液を含むAdvanced D-MEM培地（Thermo Fisher Scientific社）19mLに交換した。

試験例 1-1 で調製した pRC2-miRNA1185 発現用プラスミド ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $16\mu\text{L}$)、pAAV-Venus ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$)、pHelper ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $4\mu\text{L}$)、及び PEI MAX ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $48\mu\text{L}$) を Opti-MEM 中で混合して静置した。プラスミド DNA-PEI 混合液を実施例 3-1 で調製した HEK293T 細胞培養液に添加することにより細胞内にプラスミドを導入した。

[0098] 陰性対照として、pRC2-mi342 を SnaBI (New England 社) と SmaI (New England 社) で消化して調製した、miRNA 発現カセットを有さないプラスミド pRC2 も同様にプラスミドを調製して、トランスフェクション及び培養を実施した。

[0099] <<実施例 3-3 AAV の回収>>

培養した HEK293T 細胞をアキュターゼ (Innovative Cell Technologies 社) を用いてディッシュから剥離後、遠心し上清と細胞ペレットを分離し、試験例 2-3 と同様の方法で回収した。

[0100] <<実施例 3-4 AAV のゲノム力価測定>>

試験例 2-4 と同様の方法で測定した。

定量 PCR の結果を図 4 に示す。

図 4 の、 vg/dish (9cm) は 9cm ディッシュ当たりの Vector Genome 量を示しており、「control」は陰性対照 (プラスミド pRC2) の結果を示している。

接着細胞である HEK293T 細胞を用いたときも浮遊細胞である、293F 細胞や VPCs 2.0 細胞を用いた時と同様に、陰性対照と比較して、pRC2-miRNA1185 の効果で生産性が増加した。

[0101] 本発明の態様としては、例えば、以下のものなどが挙げられる。

<1> 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA に対応する DNA を含むことを特徴とするタンパク質発現増強用核酸である。

<2> 前記<1>に記載のタンパク質発現増強用核酸を含むベクターである。

<3> ウイルスをコードする核酸を含む、前記<2>に記載のベクターである。

<4> 前記ウイルスがアデノ随伴ウイルスである、前記<3>に記載のベクターである。

<5> 前記<1>に記載のタンパク質発現増強用核酸を含む組成物である。

<6> ウイルスをコードする核酸を含む、前記<5>に記載の組成物である。

<7> 前記ウイルスがアデノ随伴ウイルスである、前記<6>に記載の組成物である。

<8> 前記<1>に記載のタンパク質発現増強用核酸が導入された細胞である。

<9> 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含むタンパク質発現増強用核酸が導入された細胞を培養する工程を含むことを特徴とするタンパク質の製造方法である。

<10> 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含むタンパク質発現増強用核酸を細胞に導入する工程を含むことを特徴とするタンパク質の発現増強方法である。

<11> (a) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸、

(b) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸を含むベクター、

(c) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸を含む組成物、及び

(d) 配列番号1に記載の塩基配列からなるRNA又は前記RNAに対応するDNAを含む核酸が導入された細胞、
のいずれかのタンパク質発現増強のための使用である。

<12> 前記ベクターが、ウイルスをコードする核酸を含む、前記<1

1>に記載のベクターのタンパク質発現増強のための使用である。

<13> 前記ウイルスがアデノ随伴ウイルスである、前記<12>に記載のベクターのタンパク質発現増強のための使用である。

<14> 前記組成物が、ウイルスをコードする核酸を含む、前記<11>に記載の組成物のタンパク質発現増強のための使用である。

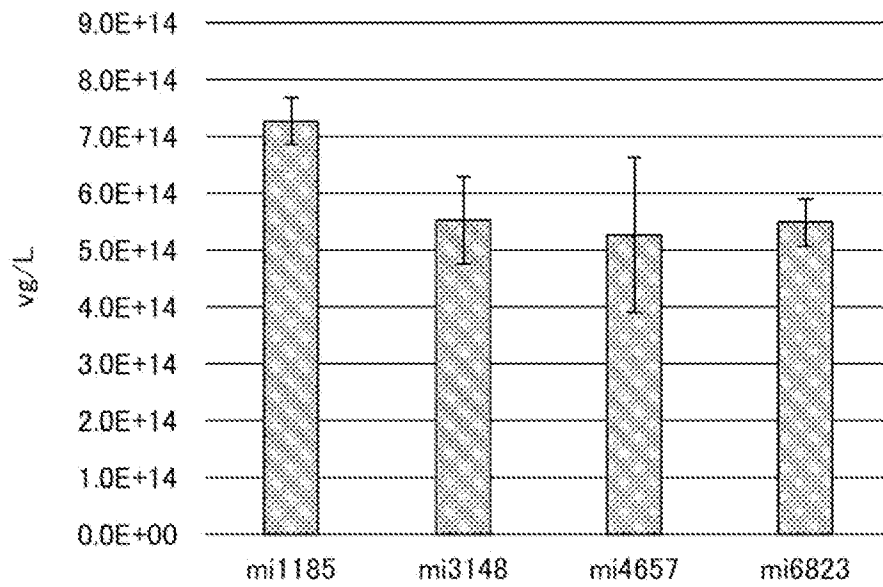
<15> 前記ウイルスがアデノ随伴ウイルスである、前記<14>に記載の組成物のタンパク質発現増強のための使用である。

[0102] 本国際出願は、2023年1月6日に出願した日本国特許出願第2023-001001号に基づく優先権を主張するものであり、日本国特許出願第2023-001001号の全内容を参照することにより本国際出願に援用する。

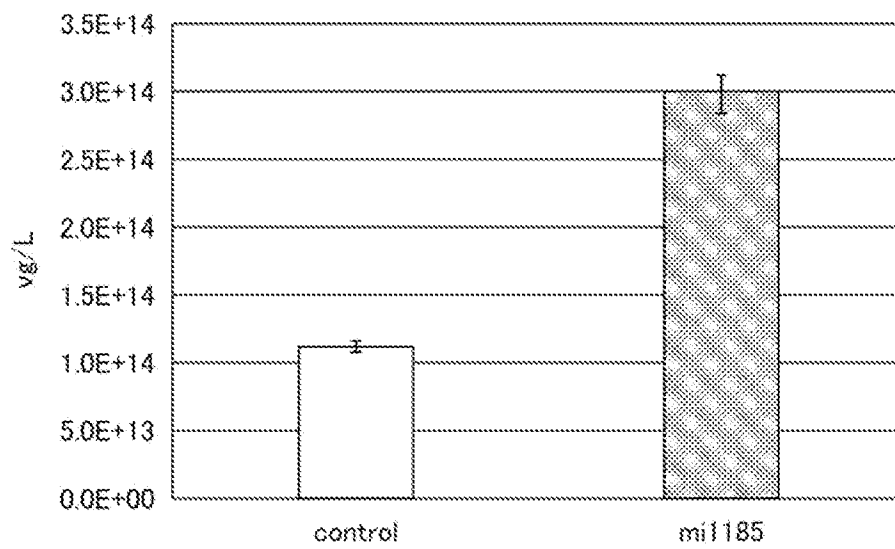
請求の範囲

- [請求項1] 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含むことを特徴とするタンパク質発現増強用核酸。
- [請求項2] 請求項 1 に記載のタンパク質発現増強用核酸を含むベクター。
- [請求項3] ウイルスをコードする核酸を含む、請求項 2 に記載のベクター。
- [請求項4] 前記ウイルスがアデノ随伴ウイルスである、請求項 3 に記載のベクター。
- [請求項5] 請求項 1 に記載のタンパク質発現増強用核酸を含む組成物。
- [請求項6] ウイルスをコードする核酸を含む、請求項 5 に記載の組成物。
- [請求項7] 前記ウイルスがアデノ随伴ウイルスである、請求項 6 に記載の組成物。
- [請求項8] 請求項 1 に記載のタンパク質発現増強用核酸が導入された細胞。
- [請求項9] 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含むタンパク質発現増強用核酸が導入された細胞を培養する工程を含むことを特徴とするタンパク質の製造方法。
- [請求項10] 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含むタンパク質発現増強用核酸を細胞に導入する工程を含むことを特徴とするタンパク質の発現増強方法。
- [請求項11] (a) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含む核酸、
(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含む核酸を含むベクター、
(c) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含む核酸を含む組成物、及び
(d) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる RNA 又は前記 RNA に対応する DNA を含む核酸が導入された細胞、
のいずれかのタンパク質発現増強のための使用。

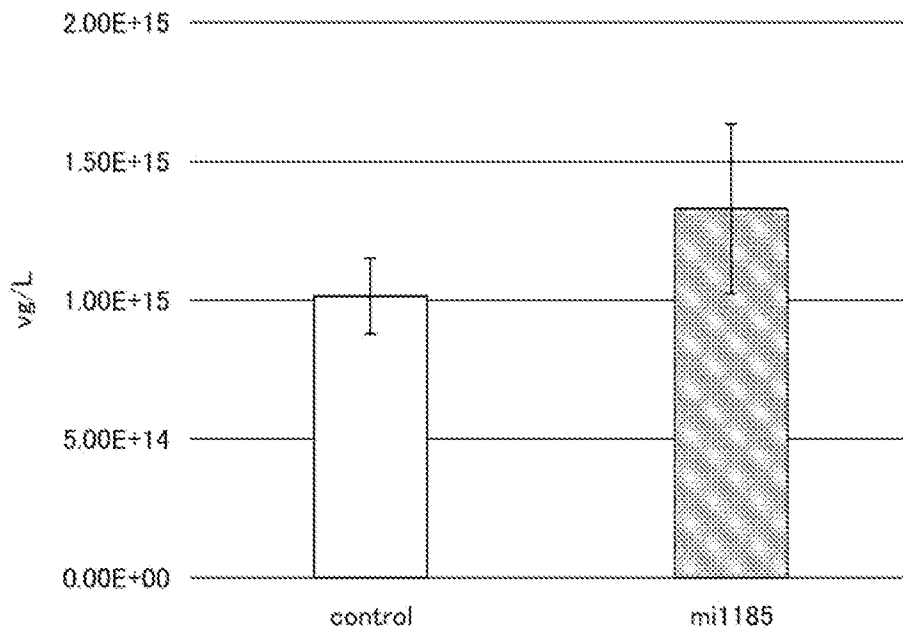
[図1]



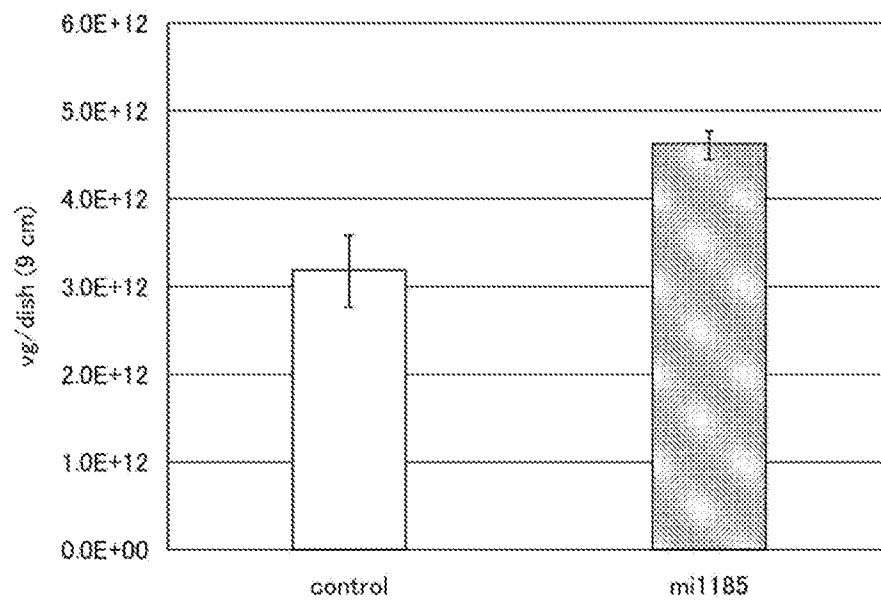
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/047128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; *C12N 1/15*(2006.01)i; *C12N 1/19*(2006.01)i; *C12N 1/21*(2006.01)i; *C12N 5/10*(2006.01)i;
C12N 15/13(2006.01)i; *C12N 15/67*(2006.01)i; *C12N 15/864*(2006.01)i; *C12P 21/00*(2006.01)i; *C12P 21/02*(2006.01)i;
C12P 21/08(2006.01)i

FI: C12N15/113 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/00 C; C12P21/02 C; C12N15/864 100Z;
C12P21/08; C12N15/13; C12N15/67 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)

C12N15/113; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/13; C12N15/67; C12N15/864; C12P21/00; C12P21/02;
C12P21/08

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	WANG, T.-W. et al., SIRT1-mediated expression of CD24 and epigenetic suppression of novel tumor suppressor miR-1185-1 increases colorectal cancer stemness, Cancer Research, 2020, vol. 80, no. 23, pp. 5257-5269	1-9
A	p. 5258, left column, p. 5259, right column, p. 5265, fig. 5	10, 11
X	DENG, H. et al., MicroRNA-1185 induces endothelial cell apoptosis by targeting UVRAG and KRIT1, Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, vol. 41, pp. 2171-2182	1-11
	p. 2175, fig. 2	
A	WO 2014/007120 A1 (TAKARA BIO INC.) 09 January 2014 (2014-01-09)	1-11
	claims, examples	

☐ 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

05 March 2024

Date of mailing of the international search report

12 March 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/047128

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/047128

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2014/007120	A1	09 January 2014	US 2015/0291980 A1 claims, examples	
				EP 2871239 A1	
				KR 10-2015-0027803 A	
				CN 104603272 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/113(2010.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/67(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i FI: C12N15/113 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/00 C; C12P21/02 C; C12N15/864 100Z; C12P21/08; C12N15/13; C12N15/67 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）） C12N15/113; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/13; C12N15/67; C12N15/864; C12P21/00; C12P21/02; C12P21/08 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2024年</td> </tr> </table> 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			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							
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																
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WANG, T.-W. et al., SIRT1-mediated expression of CD24 and epigenetic suppression of novel tumor suppressor miR-1185-1 increases colorectal cancer stemness, Cancer Research, 2020, Vol.80, No.23, pp.5257-5269 第5258頁左欄、第5259頁右欄、第5265頁Figure 5</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>10, 11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>DENG, H. et al., MicroRNA-1185 induces endothelial cell apoptosis by targeting UVRAG and KRIT1, Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, Vol.41, pp.2171-2182 第2175頁Figure 2</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014/007120 A1 (タカラバイオ株式会社) 09.01.2014 (2014-01-09) 特許請求の範囲、実施例</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>			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	WANG, T.-W. et al., SIRT1-mediated expression of CD24 and epigenetic suppression of novel tumor suppressor miR-1185-1 increases colorectal cancer stemness, Cancer Research, 2020, Vol.80, No.23, pp.5257-5269 第5258頁左欄、第5259頁右欄、第5265頁Figure 5	1-9	A		10, 11	X	DENG, H. et al., MicroRNA-1185 induces endothelial cell apoptosis by targeting UVRAG and KRIT1, Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, Vol.41, pp.2171-2182 第2175頁Figure 2	1-11	A	WO 2014/007120 A1 (タカラバイオ株式会社) 09.01.2014 (2014-01-09) 特許請求の範囲、実施例	1-11
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	WANG, T.-W. et al., SIRT1-mediated expression of CD24 and epigenetic suppression of novel tumor suppressor miR-1185-1 increases colorectal cancer stemness, Cancer Research, 2020, Vol.80, No.23, pp.5257-5269 第5258頁左欄、第5259頁右欄、第5265頁Figure 5	1-9															
A		10, 11															
X	DENG, H. et al., MicroRNA-1185 induces endothelial cell apoptosis by targeting UVRAG and KRIT1, Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, Vol.41, pp.2171-2182 第2175頁Figure 2	1-11															
A	WO 2014/007120 A1 (タカラバイオ株式会社) 09.01.2014 (2014-01-09) 特許請求の範囲、実施例	1-11															
☐ 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、一般的技术水準を示すもの “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 05.03.2024		国際調査報告の発送日 12.03.2024															
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） 上村 直子 4B 4508 電話番号 03-3581-1101 内線 3448															

第 I 欄 ス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ス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ス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：

国際出願番号
PCT/JP2023/047128

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2014/007120	A1	09.01.2014	US	2015/0291980	A1	
				特許請求の範囲、実施例			
				EP	2871239	A1	
				KR	10-2015-0027803	A	
				CN	104603272	A	
