(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
2023年6月22日(22.06.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/112886 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/11 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/045637

(22) 国際出願日： 2022年12月12日(12.12.2022)

(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 2021-204628 2021年12月16日(16.12.2021) JP

(71) 出願人:国立研究開発法人理化学研究所(**RIKEN**) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 Saitama (JP). 国立大学法人東京大学(**THE UNIVERSITY OF TOKYO**) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 渡邉 力也 (**WATANABE Rikiya**); 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 篠田 肇(**SHINODA Hajime**); 〒3510198 埼玉県和光市広沢２番１号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 西増 弘志(**NISHIMASU Hiroshi**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 石川 潤一郎(**ISHIKAWA Junichiro**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 松沼 泰史, 外(**MATSUNUMA Yasushi et al.**); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 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, 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.

(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, 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,

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING SINGLE-STRANDED RNA

(54) 発明の名称： １本鎖ＲＮＡの製造方法

(57) **Abstract:** A method for producing a single-stranded RNA, said method comprising: a step for transcribing a DNA encoding an RNA represented by formula (1) to obtain a mixture containing the single-stranded RNA and a by-product; a step for contacting the mixture with Cas12a or 13a to cleave the 5'- or 3'-side of the base at the 5'-end of R^1; and a step for purifying the mixture to obtain the single-stranded RNA, wherein the single-stranded RNA is represented by formula (2) or (3) (in the formulae: T^1 and T^2 represent an arbitrary RNA sequence; R^1 represents the recognition sequence of Cas12a or 13a; $T^{1'}$ is the same as T^1 or represents a sequence in which the base at the 5'-end of R^1 is added to the 3'-end of T^1; and $R^{1'}$ is the same as R^1 or represents a sequence in which the base at the 5'-end of R^1 is deleted). (1): 5'-T^1-R^1-T^2-3' (2): 5'-T^1-3' (3): 5'-R^1-T^2-3'

(57) 要約：１本鎖ＲＮＡの製造方法であって、式（１）で表されるＲＮＡをコードするＤＮＡを転写し、１本鎖ＲＮＡ及び副産物を含む混合物を得る工程と、混合物にＣａｓ１２ａ又は１３ａを接触させ、R^1の５'末端の塩基の５'側又は３'側を切断する工程と、混合物を精製し１本鎖ＲＮＡを得る工程とを含み、１本鎖ＲＮＡが、式（２）又は（３）で表される、製造方法（式中、T^1及びT^2は任意のＲＮＡ配列を表し、R^1はＣａｓ１２ａ又は１３ａの認識配列を表し、$T^{1'}$はT^1と同一か又はT^1の３'末端にR^1の５'末端の塩基を付加した配列を表し、$R^{1'}$はR^1と同一か又はR^1の５'末端の塩基が欠失した配列を表す。）。 5'－T^1－R^1－T^2－3'…（１） 5'－T^1－3'…（２） 5'－R^1－T^2－3'…（３）

WO 2023/112886 A1

［続葉有］

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： １本鎖ＲＮＡの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、１本鎖ＲＮＡの製造方法に関する。より詳細には、本発明は、１本鎖ＲＮＡの製造方法及び１本鎖ＲＮＡの集団に関する。本願は、２０２１年１２月１６日に、日本に出願された特願２０２１－２０４６２８号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] １本鎖ＲＮＡは、ワクチン等の医薬品の製造、ゲノム編集におけるガイドＲＮＡ、インビトロ翻訳のためのテンプレート、リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ用のスタンダード等に用いられている。１本鎖ＲＮＡは、ホスホアミダイト試薬を用いた固相合成、インビトロ転写等の方法により製造することができる。

[0003] 固相合成では、例えば２００塩基を超える長鎖のＲＮＡを合成することは実質的に不可能である。また、固相合成では、ＲＮＡを、例えばｇ単位で大量に合成することは困難であり、合成に要するコストも高い傾向にある。これに対し、インビトロ転写では、比較的低コストで大量に１本鎖ＲＮＡを合成することができ、長鎖のＲＮＡの合成も容易である。

[0004] しかしながら、インビトロ転写では、目的の１本鎖ＲＮＡだけでなく副産物も合成されてしまう。副産物としては、目的の１本鎖ＲＮＡよりも短い１本鎖ＲＮＡ、目的の１本鎖ＲＮＡに相補的な１本鎖ＲＮＡ、目的の１本鎖ＲＮＡよりも短い２本鎖ＲＮＡ、目的の１本鎖ＲＮＡ及び目的の１本鎖ＲＮＡに相補的な１本鎖ＲＮＡがハイブリダイズした２本鎖ＲＮＡ等が挙げられる。副産物が生じる原因の一つとして、合成された１本鎖ＲＮＡの末端がプライマーとなって、自身を鋳型とした相補鎖を合成してしまうこと（ｓｅｌｆ－ｐｒｉｍｅｄ　ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ）が知られている。

[0005] ２本鎖ＲＮＡには免疫反応を惹起する活性があるため、ワクチン等の医薬

品に混入することは好ましくない。また、ゲノム編集において、ガイドＲＮＡの相補鎖は標的配列であるため、ガイドＲＮＡに相補的なＲＮＡが混入することは好ましくない。

[0006] このため、インビトロ転写後のＲＮＡから、２本鎖ＲＮＡを除去する技術が検討されている。例えば、非特許文献１には、ＲＮａｓｅＩＩＩ処理により、インビトロ転写後のＲＮＡから、２本鎖ＲＮＡを除去したことが記載されている。また、非特許文献２には、セルロースを用いて、インビトロ転写後のＲＮＡから、２本鎖ＲＮＡを除去したことが記載されている。また、非特許文献３には、合成された１本鎖ＲＮＡの末端に相補的なＤＮＡ断片（Ｃａｐｔｕｒｅ　ＤＮＡ）をインビトロ転写系に添加することにより、ｓｅｌｆ－ｐｒｉｍｅｄ　ｅｘｔｅｎｓｉｏｎを防止できたことが記載されている。

[0007] ところで、発明者らは、以前に、非常に高感度で簡便な核酸検出技術である、ＣＲＩＳＰＲ－ｂａｓｅｄ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ－ｆｒｅｅ　ｄｉｇｉｔａｌ　ＲＮＡ　ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ（ＳＡＴＯＲＩ）法を開発した（非特許文献４を参照。）。

[0008] ＳＡＴＯＲＩ法は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、ガイドＲＮＡ、核酸蛍光レポーターを含む混合液に、ガイドＲＮＡと相補的な核酸断片（検出対象核酸断片）を混合すると、Ｃａｓタンパク質、ガイドＲＮＡ、検出対象核酸断片が３者複合体を形成した後に、Ｃａｓタンパク質がヌクレアーゼ活性を発現する現象を利用した検出方法である。

[0009] ヌクレアーゼ活性を発現したＣａｓタンパク質は、核酸蛍光レポーターを切断し、その結果蛍光が生じる。この反応を微小ウェルのアレイ内で行い、各ウェルの蛍光シグナルの有無を二値化し、デジタル検出を行うことにより、５ｆＭ以下の濃度の検出対象核酸断片を検出することができる。

先行技術文献

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Mu X., et al., An origin of the immunogenicity of in vit

ro transcribed RNA, Nucleic Acids Research, 46 (10), 5239-5249, 2018.
非特許文献2：Baiersdorfer M., et al., A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA, Molecular Therapy: Nucleic Acids Vol. 15, 26-35, 2019.
非特許文献3：Gholamalipour Y., et al., Efficient inhibition of RNA self-primed extension by addition of competing 3'-capture DNA-improved RNA synthesis by T7 RNA polymerase, Nucleic Acids Research, 47 (19), e118, 2019.
非特許文献4：Shinoda H., et al., Amplification-free RNA detection with CRISPR-Cas13, Commun Biol., 4, 476, 2021.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] しかしながら、長鎖のＲＮＡは様々な２次構造を形成するため、非特許文献１に記載された方法を長鎖のＲＮＡに適用すると、目的外の領域で切断されてしまう。また、発明者らがＳＡＴＯＲＩ法を用いて検討を行った結果、非特許文献１～３に記載された方法では、２本鎖ＲＮＡの除去効率に改善の余地があることを見出した。本発明は、副産物の混入割合が低い１本鎖ＲＮＡの製造技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明は以下の態様を含む。

［１］１本鎖ＲＮＡの製造方法であって、下記式（１）で表されるＲＮＡをコードするＤＮＡを転写し、製造対象の１本鎖ＲＮＡ及び副産物を含むＲＮＡ混合物を得る工程と、前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質を接触させ、下記式（１）におけるＲ[1]の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断する工程と、下記式（１）におけるＲ[1]の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断後の前記ＲＮＡ混合物を精製し、製造対象の１本鎖ＲＮＡを得る工程と、を含み、製造対象の１本鎖ＲＮＡが、下記式（２）又は（３

）で表される１本鎖ＲＮＡである、製造方法。

５’－Ｔ[1]－Ｒ[1]－Ｔ[2]－３’　…（１）

５’－Ｔ[1]’－３’　…（２）

５’－Ｒ[1]’－Ｔ[2]－３’　…（３）

［式（１）～（３）中、Ｔ[1]は任意のＲＮＡ配列を表し、Ｒ[1]はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質が認識するＲＮＡ配列を表し、Ｔ[2]は存在しないか又は任意のＲＮＡ配列を表し、Ｔ[1]’はＴ[1]と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、Ｔ[1]の３’末端にＲ[1]のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基を付加したＲＮＡ配列を表し、Ｒ[1]’はＲ[1]と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、Ｒ[1]のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基が欠失したＲＮＡ配列を表す。］

［２］前記式（１）におけるＲ[1]の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断する工程において、前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質を接触させ、前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質がＬａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６由来のＣａｓ１２ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号１に記載の塩基配列からなるか、前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質がＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．由来のＣａｓ１２ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号２に記載の塩基配列からなるか、前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質がＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　ｓｕｂｓｐ．　ｎｏｖｉｃｉｄａ由来のＣａｓ１２ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号３に記載の塩基配列からなる、［１］に記載の製造方法。

［３］前記式（１）におけるＲ[1]の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断する工程において、前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質を接触させ、前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質がＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ由来のＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号４に記載の塩基配列からなるか、

前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質がＬａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＫ４Ａ１７９由来のＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記式（１）におけるR^1が配列番号５に記載の塩基配列からなるか、前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質がＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｂｕｃｃａｌｉｓ　Ｃ－１０１３－ｂ由来のＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記式（１）におけるR^1が配列番号６に記載の塩基配列からなるか、前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質がＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｔｒｅｖｉｓａｎｉｉ由来のＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記式（１）におけるR^1が配列番号７に記載の塩基配列からなる、［１］に記載の製造方法。

［４］前記副産物が前記式（１）におけるT^2に相補的な塩基配列を有するＲＮＡを含む、［１］～［３］のいずれかに記載の製造方法。

［５］下記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡの集団であって、下記式（１）におけるT^2に相補的な塩基配列を有するＲＮＡの含有量が０．１モル％以下である、１本鎖ＲＮＡの集団。

$5'-T^1-R^1-T^2-3'$　…（１）

$5'-T^1'-3'$　…（２）

$5'-R^1'-T^2-3'$　…（３）

［式（１）～（３）中、T^1は任意のＲＮＡ配列を表し、R^1はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質が認識するＲＮＡ配列を表し、T^2は存在しないか又は任意のＲＮＡ配列を表し、T^1'はT^1と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、T^1の３’末端にR^1のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基を付加したＲＮＡ配列を表し、R^1'はR^1と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、R^1のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基が欠失したＲＮＡ配列を表す。］

［６］前記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡの長さが２００塩基以上である、［５］に記載の１本鎖ＲＮＡの集団。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、副産物の混入割合が低い１本鎖ＲＮＡの製造技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図１（ａ）は、実験例１において、製造したＲＮＡ断片を変性尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ｕｒｅａ　ＰＡＧＥ）した結果を示す透過画像である。図１（ｂ）は、実験例１において、ｕｒｅａ　ＰＡＧＥしたゲルのＵＶ照射画像である。図１（ｃ）は、実験例１において、ｕｒｅａ　ＰＡＧＥしたゲルのバンドを切り出した後の透過画像である。

発明を実施するための形態

[0015] ［１本鎖ＲＮＡの製造方法］

一実施形態において、本発明は、１本鎖ＲＮＡの製造方法であって、１本鎖ＲＮＡの製造方法であって、下記式（１）で表されるＲＮＡをコードするＤＮＡを転写し、製造対象の１本鎖ＲＮＡ及び副産物を含むＲＮＡ混合物を得る工程と、前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質を接触させ、下記式（１）におけるR^1の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断する工程と、下記式（１）におけるR^1の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断後の前記ＲＮＡ混合物を精製し、製造対象の１本鎖ＲＮＡを得る工程と、を含み、製造対象の１本鎖ＲＮＡが、下記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡである、製造方法を提供する。

５’－T^1－R^1－T^2－３’　…（１）

５’－T^1’－３’　…（２）

５’－R^1’－T^2－３’　…（３）

［式（１）～（３）中、T^1は任意のＲＮＡ配列を表し、R^1はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質が認識するＲＮＡ配列を表し、T^2は存在しないか又は任意のＲＮＡ配列を表し、T^1’はT^1と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、T^1の３’末端にR^1のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基を付加したＲＮＡ配列を表し、R^1’

はＲ^{1}と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、Ｒ^{1}のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基が欠失したＲＮＡ配列を表す。］

[0016] 実施例において後述するように、本実施形態の製造方法によれば、副産物の混入割合が低い１本鎖ＲＮＡを製造することができる。ここで、副産物としては、上記式（１）で表されるＲＮＡ断片に相補的なＲＮＡ断片が挙げられ、例えば、５’－Ｔ^{1}－Ｒ^{1}－Ｔ^{2}－３’に相補的な塩基配列を有するＲＮＡが挙げられる。副産物は１本鎖ＲＮＡであってもよいし、２本鎖ＲＮＡであってもよい。

[0017] 副産物は、５’－Ｔ^{1}－Ｒ^{1}－Ｔ^{2}－３’に相補的な塩基配列を有するＲＮＡの部分断片を含んでいてもよく、例えば、５’－Ｔ^{1}－３’に相補的な塩基配列を有するＲＮＡを含んでいてもよく、５’－Ｒ^{1}－３’に相補的な塩基配列を有するＲＮＡを含んでいてもよく、５’－Ｒ^{1}－Ｔ^{2}－３’に相補的な塩基配列を有するＲＮＡを含んでいてもよく、５’－Ｔ^{2}－３’に相補的な塩基配列を有するＲＮＡを含んでいてもよい。中でも、５’－Ｒ^{1}－Ｔ^{2}－３’で表されるＲＮＡをガイドＲＮＡとして用いるＳＡＴＯＲＩ法により検出可能である観点から、副産物は、５’－Ｔ^{2}－３’（単にＴ^{2}という場合がある。）に相補的な塩基配列を有するＲＮＡを含んでいてもよい。

[0018] Ｔ^{2}に相補的な塩基配列を有するＲＮＡは、その全長は特に限定されず、５’－Ｔ^{1}－Ｒ^{1}－Ｔ^{2}－３’に相補的な塩基配列を有するＲＮＡであってもよいし、５’－Ｒ^{1}－Ｔ^{2}－３’に相補的な塩基配列を有するＲＮＡであってもよい。

[0019] 本実施形態の製造方法において、副産物の混入割合が低いとは、製造対象の１本鎖ＲＮＡの集団において、Ｔ^{2}に相補的な塩基配列を有するＲＮＡの含有量が０．１モル％以下であることであってもよい。

[0020] 以下、本実施形態の製造方法の各工程について説明する。まず、上記式（１）で表されるＲＮＡをコードするＤＮＡを転写し、製造対象の１本鎖ＲＮＡ及び副産物を含むＲＮＡ混合物を得る。

[0021] 本工程において、転写は、ＲＮＡポリメラーゼを使用して、インビトロで

行うことができる。ＲＮＡポリメラーゼとしては、転写用鋳型ＤＮＡを転写して１本鎖ＲＮＡを合成することができるものであれば特に限定されず、例えば、ファージ由来のＲＮＡポリメラーゼが挙げられる。ファージ由来のＲＮＡポリメラーゼとしては、Ｔ７ポリメラーゼ、Ｔ３ポリメラーゼ、ＳＰ６ポリメラーゼ等が挙げられる。ＲＮＡポリメラーゼには、副産物の混入を低減させる改変が加えられていてもよい。

[0022] 上記式（１）で表されるＲＮＡをコードする転写用鋳型ＤＮＡは、使用するＲＮＡポリメラーゼの特性に応じて、少なくともプロモーター配列が２本鎖ＤＮＡであり、残部が１本鎖ＤＮＡ断片であるＤＮＡ断片であってもよいし、２本鎖ＤＮＡ断片であってもよいし、プラスミド等の環状２本鎖ＤＮＡであってもよい。

[0023] 転写用鋳型ＤＮＡ、ＲＮＡの材料となるリボヌクレオチド三リン酸（ＡＴＰ、ＵＴＰ、ＧＴＰ、ＣＴＰ）、適切なバッファーの存在下でＲＮＡポリメラーゼを作用させることにより、転写用鋳型ＤＮＡを転写し、製造対象の１本鎖ＲＮＡ及び副産物を含むＲＮＡ混合物を得ることができる。目的に応じて、ＵＴＰとして、Ｎ^{1}－Ｍｅｔｈｙｌｐｓｅｕｄｏｕｒｉｄｉｎｅ－５’－ｔｒｉｐｈｏｓｐｈａｔｅ（１ｍΨ）を用いてもよい。これにより、製造した１本鎖ＲＮＡの免疫原性を低減することができることが報告されている。

[0024] 続いて、転写により得たＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質を接触させ、上記式（１）におけるＲ^{1}の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断する。

[0025] 本工程において、前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質を接触させてもよい。本明細書において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質は、Ｃａｓ１２ａタンパク質のオルソログ、Ｃａｓ１２ａタンパク質の改変体等を含む。本実施形態の製造方法で使用可能なＣａｓ１２ａタンパク質としては、例えば、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６由来のＣａｓ１２ａタンパク質（ＬｂＣａｓ１２ａ

、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢアクセッション番号：Ａ０Ａ１８２ＤＷＥ３）、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．由来のＣａｓ１２ａタンパク質（ＡｓＣａｓ１２ａ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢアクセッション番号：Ｕ２ＵＭＱ６）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　ｓｕｂｓｐ．　ｎｏｖｉｃｉｄａ由来のＣａｓ１２ａタンパク質（ＦｎＣａｓ１２ａ、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢアクセッション番号：Ａ０Ｑ７Ｑ２）等が挙げられる。使用するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質に応じてＲ[1]の塩基配列を適宜修正するとよい。ここで、Ｒ[1]は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質が認識するリピート領域の塩基配列である。

[0026] 例えば、Ｃａｓ１２ａタンパク質としてＬｂＣａｓ１２ａを使用する場合、Ｒ[1]の塩基配列としては、5’-aauuucuacuaaguguagau-3’（配列番号１）を使用することができる。また、Ｃａｓ１２ａタンパク質としてＡｓＣａｓ１２ａを使用する場合、Ｒ[1]の塩基配列としては、5’-aauuucuacucuuguagau-3’（配列番号２）を使用することができる。また、Ｃａｓ１２ａタンパク質としてＦｎＣａｓ１２ａを使用する場合、Ｒ[1]の塩基配列としては、5’-aauuucuacuguuguagau-3’（配列番号３）を使用することができる。

[0027] 本工程において、上記式（１）で表される１本鎖ＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質と複合体を形成する。続いて、上記式（１）で表される１本鎖ＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質のｃｒＲＮＡプロセシングにより、Ｒ[1]の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側で正確に切断される。この切断は約５分以内に完了する。

[0028] この結果、上記式（１）で表される１本鎖ＲＮＡは、上記式（２）で表される１本鎖ＲＮＡと、上記式（３）で表される１本鎖ＲＮＡに切断される。一方、副産物にはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質が認識するリピート領域の塩基配列が存在しないため、副産物は切断されない。

[0029] 本工程において、前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質を接触させてもよい。本明細書において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質は、Ｃａｓ１３ａタンパク質のオルソログ、Ｃａｓ１３ａタンパ

ク質の改変体等を含む。本実施形態の製造方法で使用可能なＣａｓ１３ａタンパク質としては、例えば、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ由来のＣａｓ１３ａタンパク質（ＬｗａＣａｓ１３ａ、ＮＣＢＩアクセッション番号：ＷＰ＿０２１７４６７７４．１）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＫ４Ａ１７９由来のＣａｓ１３ａタンパク質（ＬｂａＣａｓ１３ａ、ＮＣＢＩアクセッション番号：ＷＰ＿０２２７８５４４３．１）、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｂｕｃｃａｌｉｓ　Ｃ－１０１３－ｂ由来のＣａｓ１３ａタンパク質（ＬｂｕＣａｓ１３ａ、ＮＣＢＩアクセッション番号：ＷＰ＿０１５７７０００４．１）、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｔｒｅｖｉｓａｎｉｉ由来のＣａｓ１３ａタンパク質（ＬｔｒＣａｓ１３ａ）等が挙げられる。使用するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質に応じてＲ[1]の塩基配列を適宜修正するとよい。ここで、Ｒ[1]は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質が認識するリピート領域の塩基配列である。

[0030] 例えば、Ｃａｓ１３ａタンパク質としてＬｗａＣａｓ１３ａを使用する場合、Ｒ[1]の塩基配列としては、5’-agacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaac-3’（配列番号４）を使用することができる。また、Ｃａｓ１３ａタンパク質としてＬｂａＣａｓ１３ａを使用する場合、Ｒ[1]の塩基配列としては、5’-augagaagagcccaagauagagggcaauaac-3’（配列番号５）を使用することができる。また、Ｃａｓ１３ａタンパク質としてＬｂｕＣａｓ１３ａを使用する場合、Ｒ[1]の塩基配列としては、5’-gaccaccccaaaaaugaaggggacuaaaaca-3’（配列番号６）を使用することができる。また、Ｃａｓ１３ａタンパク質としてＬｔｒＣａｓ１３ａを使用する場合、Ｒ[1]の塩基配列としては、5’-agaguaccccaaaaaugaaggggacuaaaac-3’（配列番号７）を使用することができる。

[0031] 本工程において、上記式（１）で表される１本鎖ＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質と複合体を形成する。続いて、上記式（１）で表される１本鎖ＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質のｃｒＲＮＡプロセシングにより、Ｒ[1]の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側で正確に切断される。この切断は約５分以内に完了する。

[0032] この結果、上記式（１）で表される１本鎖ＲＮＡは、上記式（２）で表される１本鎖ＲＮＡと、上記式（３）で表される１本鎖ＲＮＡに切断される。一方、副産物にはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質が認識するリピート領域の塩基配列が存在しないため、副産物は切断されない。

[0033] 続いて、上記式（１）におけるR^1の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断後の前記ＲＮＡ混合物を精製し、製造対象の１本鎖ＲＮＡを得る。製造対象の１本鎖ＲＮＡは、上記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡである。

[0034] ここで、副産物は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質により切断されないため、副産物と製造対象の１本鎖ＲＮＡは、分子量が相違する。この結果、副産物と製造対象の１本鎖ＲＮＡを分離精製することが容易になり、製造対象の１本鎖ＲＮＡを高純度に精製することができる。

[0035] 上記式（２）で表される１本鎖ＲＮＡには、R^1の塩基配列は残存しない。このため、上記式（２）で表される１本鎖ＲＮＡを製造対象にすることにより、塩基配列に制限なく、副産物の混入割合が低い１本鎖ＲＮＡを製造することができる。また、上記式（３）で表される１本鎖ＲＮＡのうち、５’－R^1－T^2－３’で表される一本鎖ＲＮＡは、ゲノム編集におけるガイドＲＮＡとして利用することができる。この場合、上記式（３）におけるT^2の５’側の約２０塩基は、スペーサー領域として機能する。

[0036] １本鎖ＲＮＡの精製方法としては、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）等が挙げられる。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動の変性剤としては、尿素、ホルムアミド等を用いることができる。

[0037] 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動においては、例えば、ゲル上の目的バンドを切り出して精製してもよいし、ゲルを流れきった１本鎖ＲＮＡを分画しながら回収してもよい。

[0038] これらの精製方法は１種類を単独で実施してもよいし、２種類以上を組み

合わせて実施してもよい。

[0039] 本実施形態の製造方法において、上記式（１）におけるT^2が存在しない場合、本実施形態の製造方法は、５’－T^1－R^1－３’で表されるＲＮＡをコードするＤＮＡを転写し、製造対象の１本鎖ＲＮＡ及び副産物を含むＲＮＡ混合物を得る工程と、前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質を接触させ、５’－T^1－R^1－３’におけるR^1の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断する工程と、５’－T^1－R^1－３’におけるR^1の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断後の前記ＲＮＡ混合物を精製し、製造対象の１本鎖ＲＮＡを得る工程と、を含み、製造対象の１本鎖ＲＮＡが、上記式（２）で表される１本鎖ＲＮＡである、製造方法である。

[0040] つまり、５’－T^1－R^1－３’で表されるＲＮＡも、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質によるｃｒＲＮＡプロセシングにより、R^1の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側で正確に切断される。

[0041] また、上記式（１）におけるT^2が任意のＲＮＡ配列である場合、T^1及びT^2は同一のＲＮＡ配列であってもよいし、異なるＲＮＡ配列であってもよい。

[0042] 発明者らは、ＬｔｒＣａｓ１３ａの構造解析研究の結果から、Ｃａｓ１３ａタンパク質として、ＬｔｒＣａｓ１３ａを使用する場合には、上記式（１）で表される１本鎖ＲＮＡは、Ｃａｓ１３ａタンパク質のｃｒＲＮＡプロセシングにより、Ｒ１の５’末端から第１番目の塩基の３’側で正確に切断されることを明らかにした。

[0043] また、ＬｗａＣａｓ１３ａのアミノ酸配列はＬｔｒＣａｓ１３ａと８８％同一であることから、Ｃａｓ１３ａタンパク質として、ＬｗａＣａｓ１３ａを使用する場合においても、上記式（１）で表される１本鎖ＲＮＡは、Ｃａｓ１３ａタンパク質のｃｒＲＮＡプロセシングにより、Ｒ１の５’末端から第１番目の塩基の３’側で正確に切断されると考えられる。

[0044] ［１本鎖ＲＮＡ］

一実施形態において、本発明は、下記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡの集団であって、下記式（１）におけるＴ^{2}に相補的な塩基配列を有するＲＮＡの含有量が０．１モル％以下である、１本鎖ＲＮＡの集団を提供する。

５’－Ｔ^{1}－Ｒ^{1}－Ｔ^{2}－３’　…（１）

５’－Ｔ^{1}’－３’　…（２）

５’－Ｒ^{1}’－Ｔ^{2}－３’　…（３）

［式（１）～（３）中、Ｔ^{1}は任意のＲＮＡ配列を表し、Ｒ^{1}はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質が認識するＲＮＡ配列を表し、Ｔ^{2}は存在しないか又は任意のＲＮＡ配列を表し、Ｔ^{1}’はＴ^{1}と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、Ｔ^{1}の３’末端にＲ^{1}のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基を付加したＲＮＡ配列を表し、Ｒ^{1}’はＲ^{1}と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、Ｒ^{1}のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基が欠失したＲＮＡ配列を表す。］

[0045] 式（１）～（３）において、Ｔ^{1}、Ｔ^{1}’、Ｔ^{2}、Ｒ^{1}、Ｒ^{1}’、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質については上述したものと同様である。

[0046] 本実施形態の１本鎖ＲＮＡの集団は、上述した１本鎖ＲＮＡの製造方法により製造することができる。

[0047] 本実施形態の１本鎖ＲＮＡの集団において、上記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡの長さは２００塩基以上であってもよい。

[0048] 長さが２００塩基以上であるＲＮＡは固相合成で製造することは実質的に不可能である。これに対し、上述した製造方法によれば、長さが２００塩基以上であり、Ｔ^{2}に相補的な塩基配列を有するＲＮＡの含有量が０．１モル％以下である１本鎖ＲＮＡの集団を製造することができる。ここで、Ｔ^{2}に相補的な塩基配列を有するＲＮＡの含有量は、例えばＳＡＴＯＲＩ法により、測定することができる。

[0049] 上述したように、発明者らは、Ｃａｓ１３ａタンパク質として、ＬｔｒＣａｓ１３ａを使用する場合には、上記式（１）で表される１本鎖ＲＮＡは、Ｃａｓ１３ａタンパク質のｃｒＲＮＡプロセシングにより、R^1の５’末端から第１番目の塩基の３’側で正確に切断されることを明らかにした。また、上述したように、Ｃａｓ１３ａタンパク質として、ＬｗａＣａｓ１３ａを使用する場合においても同様であると考えられる。

[0050] したがって、Ｃａｓ１３ａタンパク質として、ＬｗａＣａｓ１３ａ又はＬｔｒＣａｓ１３ａを使用して本実施形態の１本鎖ＲＮＡの集団を製造した場合、本実施形態の１本鎖ＲＮＡの集団は、下記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡの集団であって、下記式（１）におけるT^2に相補的な塩基配列を有するＲＮＡの含有量が０．１モル％以下である、１本鎖ＲＮＡの集団であるということができる。

５’－T^1－R^1－T^2－３’　…（１）

５’－T^1’－３’　…（２）

５’－R^1’－T^2－３’　…（３）

［式（１）～（３）中、T^1は任意のＲＮＡ配列を表し、R^1はＬｗａＣａｓ１３ａ又はＬｔｒＣａｓ１３ａが認識するＲＮＡ配列を表し、T^2は存在しないか又は任意のＲＮＡ配列を表し、T^1’はT^1の３’末端にR^1のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基を付加したＲＮＡ配列を表し、R^1’はR^1のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基が欠失したＲＮＡ配列を表す。］

実施例

[0051] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0052] ［実験例１］

（Ｃａｓ１３ａタンパク質のｃｒＲＮＡプロセシングを利用した高純度１本鎖ＲＮＡの製造）

Ｃａｓ１３ａタンパク質のｃｒＲＮＡプロセシングを利用して、２本鎖Ｒ

ＮＡ断片の混入が減少した、高純度１本鎖ＲＮＡを製造した。Ｃａｓ１３ａタンパク質としてＬｗａＣａｓ１３ａを使用した。

[0053] 《転写用鋳型ＤＮＡの調製》

以下の塩基配列を有する１本鎖ＤＮＡ断片を用意した。

5’-ggatcctaatacgactcactata-3’（名称「Ｔ７Ｐ－Ｆｗ」、配列番号８）

5’-tctcactcaacatggcaaggaagaccttgttttagtccccttcgttttttggggtagtctaaattttttttttcctatagtgagtcgtattaggatcc-3’（名称「Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔ－ｒ」、配列番号９）

5’-tctcactcaacatggcaaggaagaccttgttttagtccccttcgttttttggggtagtctaaattttttttttttttttttttttttttttttttttttttttcctatagtgagtcgtattaggatcc-3’（名称「Ｌｗａ－Ｎ１－４０ｔ－ｒ」、配列番号１０）

[0054] １μＭのＴ７Ｐ－Ｆｗ　１μＬ、１μＭのＬｗａ－Ｎ１－１０ｔ－ｒ　１μＬ及びミリＱ水４８μＬを混合し、ヒートブロック上で、９５℃２分間、続いて３７℃５分間処理し、アニーリングした。同様に、１μＭのＴ７Ｐ－Ｆｗ　１μＬ、１μＭのＬｗａ－Ｎ１－４０ｔ－ｒ　１μＬ及びミリＱ水４８μＬを混合し、ヒートブロック上で、９５℃２分間、続いて３７℃５分間処理し、アニーリングした。

[0055] 《インビトロ転写》

下記表１に示す試薬を混合し、３７℃で１時間インキュベートしてインビトロ転写反応を行った。

[0056] [表1]

試薬	容量（μL）
ミリQ水	20
10×バッファー	10
10×NTPs	10
0.2M　GMP	10
0.5U/μL ピロホスファターゼ	0.2
30mg/mL T7ポリメラーゼ	0.5
転写用鋳型DNA	50
合計	100

[0057] 《Ｃａｓ１３ａ処理》

Ｃａｓ１３ａ処理を行う場合には、以下の操作を行った。まず、インビトロ転写の反応液に、バッファーＦ（２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ６．８）、６０ｍＭ　ＮａＣｌ、６ｍＭ　$MgCl_2$）５０μＬを添加した。続いて、チューブを卓上遠心機で５秒間スピンダウンした。続いて、２０μＭのＣａｓ１３ａタンパク質を２０μＬ添加した。続いて、ピペットマンで十分にピペッティングした。続いて、卓上遠心機でスピンダウンした。続いて、ヒートブロック上、３７℃で３０分間反応させた。続いて、氷上で反応を停止させた。

[0058] 《ＲＮＡ精製》

ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（キアゲン）を用いて、インビトロ転写後又はＣａｓ１３ａ処理後の反応液からＲＮＡを精製した。この結果、以下の塩基配列を有する１本鎖ＲＮＡ断片が得られた。

5’-ggaaaaaaaaaaauuuagacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaacaaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（名称「Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔ」、配列番号１１）

5’-ggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaauuuagacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaacaaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（名称「Ｌｗａ－Ｎ１－４０ｔ」、配列番号１２）

[0059] Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔ又はＬｗａ－Ｎ１－４０ｔとＣａｓ１３ａタンパク質が接触すると、Ｃａｓ１３ａタンパク質のｃｒＲＮＡプロセッシングにより、Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔ又はＬｗａ－Ｎ１－４０ｔにおける、配列番号４に記載の塩基配列の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側でＲＮＡ断片が切断される。

[0060] 本実験例では、Ｃａｓ１３ａタンパク質としてＬｗａＣａｓ１３ａを使用したため、ｃｒＲＮＡプロセッシングにより、Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔ又はＬｗａ－Ｎ１－４０ｔにおける、配列番号４に記載の塩基配列の５’末端から第１番目の塩基の３’側でＲＮＡ断片が切断される。

[0061] その結果、Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔは、配列番号１３及び１４に示す以下の

２つの１本鎖ＲＮＡに切断される。

5’-ggaaaaaaaaaaauuua-3’（配列番号１３）

5’-gacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaacaaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（配列番号１４）

[0062] また、Ｌｗａ－Ｎ１－４０ｔは、配列番号１５及び１４に示す以下の２つの１本鎖ＲＮＡに切断される。

5’-ggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaauuua-3’（配列番号１５）

5’-gacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaacaaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（配列番号１４）

[0063] Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔを上記式（１）に当てはめると、式（１）におけるT^1は5’-ggaaaaaaaaaaauuu-3’（配列番号１６）であり、式（１）におけるR^1は5’-agacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaac-3’（配列番号４）であり、式（１）におけるT^2は、5’-aaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（配列番号１７）である。

[0064] また、Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔの切断物を上記式（２）及び式（３）に当てはめると、式（２）における$T^{1'}$は5’-ggaaaaaaaaaaauuua-3’（配列番号１３）であり、式（３）における$R^{1'}$は5’-gacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaac-3’（配列番号１８）である。

[0065] 同様に、Ｌｗａ－Ｎ１－４０ｔを上記式（１）に当てはめると、式（１）におけるT^1は5’-ggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaauuu-3’（配列番号１９）であり、式（１）におけるR^1は5’-agacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaac-3’（配列番号４）であり、式（１）におけるT^2は、5’-aaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（配列番号１７）である。

[0066] また、Ｌｗａ－Ｎ１－４０ｔの切断物を上記式（２）及び式（３）に当てはめると、式（２）における$T^{1'}$は5’-ggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaauuua-3’（配列番号１５）であり、式（３）における$R^{1'}$は5’-gacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaac-3’（配列番号１８）である。ここで、5’-aga

cuaccccaaaaacgaaggggacuaaaac-3’（配列番号４）は、Ｃａｓ１３ａタンパク質（ＬｗａＣａｓ１３ａ）が認識するリピート領域の配列の一部である。

[0067] 《ＲＮＡ断片の変性尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びゲル切り出し精製》

インビトロ転写し、カラム精製後のＲＮＡ断片を変性尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ｕｒｅａ　ＰＡＧＥ）し、ＵＶを照射してＲＮＡ断片のバンドの位置を撮影した。また、目的のバンドを切り出し、切り出した後のゲルも撮影した。

[0068] 図１（ａ）～（ｃ）は、それぞれ、ｕｒｅａ　ＰＡＧＥ後のゲルの透過画像、ＵＶ照射画像、バンドを切り出した後のゲルの透過画像である。図１（ａ）～（ｃ）中、５’付加配列長１０ｎｔは、Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔを示し、５’付加配列長４０ｎｔは、Ｌｗａ－Ｎ１－４０ｔを示す。また、Ｃａｓ処理「無」は、Ｃａｓ１３ａ処理を行わなかったことを示し、Ｃａｓ処理「有」は、Ｃａｓ１３ａ処理を行ったことを示す。

[0069] その結果、Ｃａｓ１３ａ処理により、１本鎖ＲＮＡが切断され、バンドの位置がシフトしたことが明らかとなった。図１（ａ）中、Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔにおいては、５’側の断片（配列番号１３）はゲルを流れきって写真に写っていないと考えられる。Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔ、Ｌｗａ－Ｎ１－４０ｔのいずれにおいても、バンドの位置の違いにより、切断された１本鎖ＲＮＡの各バンドを切り出すことができた。

[0070] 続いて、切り出したゲルをそれぞれ新しい１．５ｍＬチューブに移した。続いて、切り出したゲルに４００μＬのＲＮａｓｅフリー水を加えて軽くボルテックス処理し、４℃で一晩インキュベートした。続いて、エタノール沈殿によりＲＮＡを濃縮し、５０μＬのＲＮａｓｅフリー水に溶解した。

[0071] ［実験例２］

（副産物の存在量の測定）

実験例１で製造した5’-gacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaacaaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（配列番号１４）の１本鎖ＲＮＡに含まれる副産物の存在量

を測定した。副産物として、Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔ及びＬｗａ－Ｎ１－４０ｔに含まれる塩基配列である、5’-aaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（配列番号１７）に相補的な塩基配列を含むＲＮＡ断片を検出した。副産物の存在量の測定には、ＳＡＴＯＲＩ法を使用した（非特許文献４を参照）。なお、5’-gacuaccccaaaaacgaaggggacuaaaacaaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（配列番号１４）の１本鎖ＲＮＡは、Ｃａｓ１３ａタンパク質のガイドＲＮＡとして機能することができる。

[0072] ＳＡＴＯＲＩ法に用いる試料としては、Ｌｗａ－Ｎ１－１０ｔ及びＬｗａ－Ｎ１－４０ｔのそれぞれについて、（ｉ）インビトロ転写したＲＮＡをｕｒｅａ　ＰＡＧＥで精製した試料、（ｉｉ）インビトロ転写したＲＮＡをｕｒｅａ　ＰＡＧＥで精製した後、更にｕｒｅａ　ＰＡＧＥで精製した試料、（ｉｉｉ）インビトロ転写したＲＮＡをｕｒｅａ　ＰＡＧＥで精製した後、Ｃａｓ１３ａ処理を行い、更にｕｒｅａ　ＰＡＧＥで精製した試料を使用した。

[0073] ＳＡＴＯＲＩ法により、副産物を検出した結果を下記表２に示す。表２中、「１０ｎｔ」はＬｗａ－Ｎ１－１０ｔを示し、「４０ｎｔ」はＬｗａ－Ｎ１－４０ｔを示す。また、「ＰＡＧＥ」は、ｕｒｅａ　ＰＡＧＥを示し、「Ｃａｓ１３ａ」はＣａｓ１３ａ処理を行ったことを示す。また、「［ｔｇＲＮＡ］＝０ｆＭ」は、試料中に標的ＲＮＡ、すなわち、5’-aaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（配列番号１７）に相補的なＲＮＡ断片を添加しなかったことを示し、「［ｔｇＲＮＡ］＝３００ｆＭ」は、試料中に、5’-aaggucuuccuugccauguugagugaga-3’（配列番号１７）に相補的なＲＮＡ断片を３００ｆＭの終濃度で添加したことを示す。また、表２中の数値は、ＳＡＴＯＲＩ法により、蛍光が検出されたウェルの数を示す。

[0074]

[表2]

試料		[tgRNA]=0fM	[tgRNA]=300fM
10nt	PAGE	366841	423095
	PAGE>PAGE	183257	211377
	PAGE>Cas13a>PAGE	62	140
40t	PAGE	434638	420208
	PAGE>PAGE	146749	143907
	PAGE>Cas13a>PAGE	40	101

[0075] その結果、インビトロ転写したＲＮＡ中には、副産物として、転写目的のＲＮＡ断片に相補的なＲＮＡ断片が大量に混入していることが明らかとなった。この副産物は、１回又は２回のｕｒｅａ　ＰＡＧＥによる精製では十分に除去することができなかった。これに対し、Ｃａｓ１３ａ処理を行うことにより、Ｃａｓ１３ａ処理を行わなかった場合と比較して、副産物の存在量を３，０００分の１以下に減少させることができることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0076] 本発明によれば、副産物の混入割合が低い１本鎖ＲＮＡの製造技術を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] １本鎖ＲＮＡの製造方法であって、

下記式（１）で表されるＲＮＡをコードするＤＮＡを転写し、製造対象の１本鎖ＲＮＡ及び副産物を含むＲＮＡ混合物を得る工程と、

前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質を接触させ、下記式（１）におけるＲ^{1}の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断する工程と、

下記式（１）におけるＲ^{1}の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断後の前記ＲＮＡ混合物を精製し、製造対象の１本鎖ＲＮＡを得る工程と、を含み、

製造対象の１本鎖ＲＮＡが、下記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡである、製造方法。

５’－Ｔ^{1}－Ｒ^{1}－Ｔ^{2}－３’　…（１）

５’－Ｔ^{1}’－３’　…（２）

５’－Ｒ^{1}’－Ｔ^{2}－３’　…（３）

［式（１）～（３）中、Ｔ^{1}は任意のＲＮＡ配列を表し、Ｒ^{1}はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質が認識するＲＮＡ配列を表し、Ｔ^{2}は存在しないか又は任意のＲＮＡ配列を表し、Ｔ^{1}’はＴ^{1}と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、Ｔ^{1}の３’末端にＲ^{1}のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基を付加したＲＮＡ配列を表し、Ｒ^{1}’はＲ^{1}と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、Ｒ^{1}のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基が欠失したＲＮＡ配列を表す。］

[請求項2] 前記式（１）におけるＲ^{1}の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断する工程において、前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質を接触させ、

前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質がＬａｃｈｎｏｓｐｉ

ｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６由来のＣａｓ１２ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号１に記載の塩基配列からなるか、

前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質がＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．由来のＣａｓ１２ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号２に記載の塩基配列からなるか、

前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質がＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　ｓｕｂｓｐ．　ｎｏｖｉｃｉｄａ由来のＣａｓ１２ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号３に記載の塩基配列からなる、

請求項１に記載の製造方法。

[請求項3] 前記式（１）におけるＲ[1]の５’末端から第１番目の塩基の５’側又は３’側を切断する工程において、前記ＲＮＡ混合物にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質を接触させ、

前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質がＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉ由来のＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号４に記載の塩基配列からなるか、

前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質がＬａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＫ４Ａ１７９由来のＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号５に記載の塩基配列からなるか、

前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質がＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｂｕｃｃａｌｉｓ　Ｃ－１０１３－ｂ由来のＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号６に記載の塩基配列からなるか、

前記ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質がＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｔｒｅｖｉｓａｎｉｉ由来のＣａｓ１３ａタンパク質であり、前記式（１）におけるＲ[1]が配列番号７に記載の塩基配列からなる、

請求項１に記載の製造方法。

[請求項4] 前記副産物が前記式（１）におけるT^2に相補的な塩基配列を有するＲＮＡを含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項5] 下記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡの集団であって、下記式（１）におけるT^2に相補的な塩基配列を有するＲＮＡの含有量が０．１モル％以下である、１本鎖ＲＮＡの集団。

５’－T^1－R^1－T^2－３’　…（１）

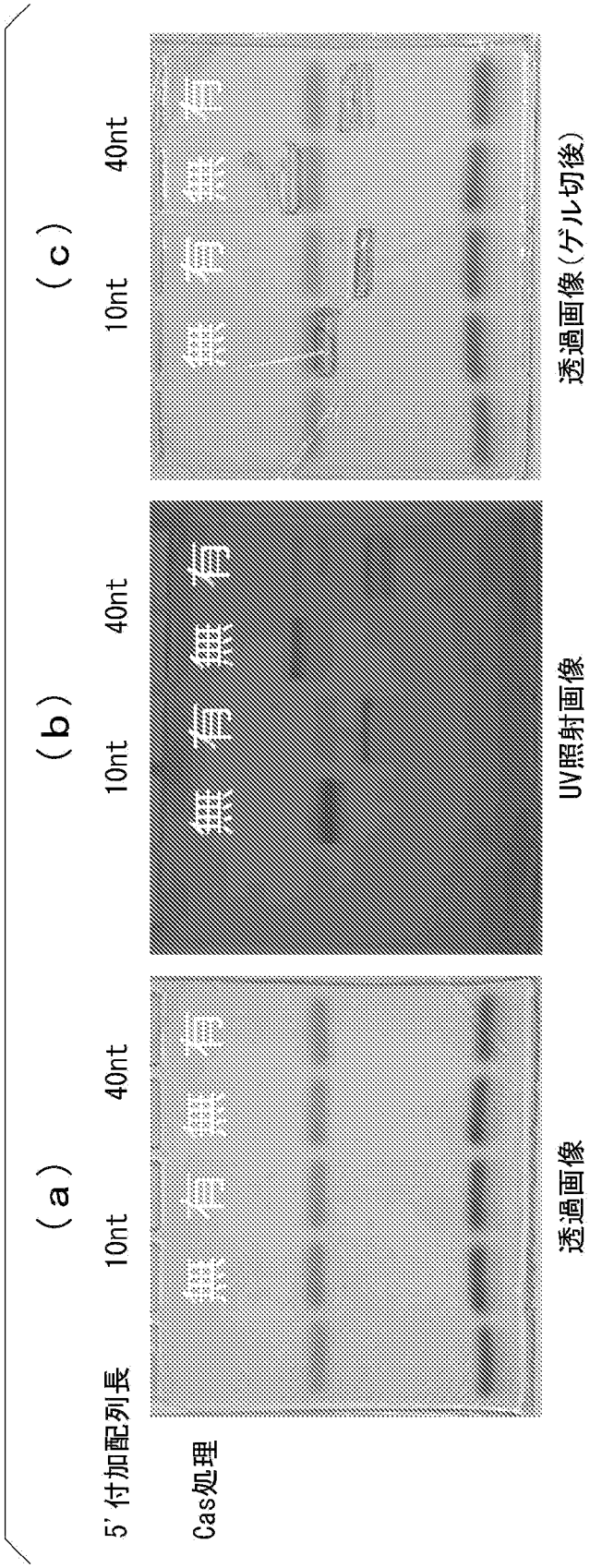
５’－T^1’－３’　…（２）

５’－R^1’－T^2－３’　…（３）

［式（１）～（３）中、T^1は任意のＲＮＡ配列を表し、R^1はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａタンパク質又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａタンパク質が認識するＲＮＡ配列を表し、T^2は存在しないか又は任意のＲＮＡ配列を表し、T^1’はT^1と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、T^1の３’末端にR^1のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基を付加したＲＮＡ配列を表し、R^1’はR^1と同一のＲＮＡ配列を表すか、又は、R^1のＲＮＡ配列の５’末端から第１番目の塩基が欠失したＲＮＡ配列を表す。］

[請求項6] 前記式（２）又は（３）で表される１本鎖ＲＮＡの長さが２００塩基以上である、請求項５に記載の１本鎖ＲＮＡの集団。

[図1]


（a）
（b）
（c）
5'付加配列長
10nt
40nt
10nt
40nt
10nt
40nt
Cas処理
無
有
透過画像
UV照射画像
透過画像（ゲル切後）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/045637

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-15/90

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 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/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	EAST-SELETSKY, Alexandra et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. Nature. 2016, vol. 538, no. 7624, pp. 270-273, DOI: 10.1038/nature19802 in particular, section "METHODS", fig. 1, extended data table 1	5
A		1-4, 6
X	JP 2019-522472 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 15 August 2019 (2019-08-15) examples, paragraph [0324]	5
A		1-4, 6
X	WO 2018/111967 A1 (MODERNATX, INC.) 21 June 2018 (2018-06-21) claims, p. 4, 6th paragraph to p. 6, 1st paragraph	5-6
A		1-4
X	JP 2019-533476 A (MODERNATX, INC.) 21 November 2019 (2019-11-21) claims, paragraph [0162]	5-6
A		1-4

☑ 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	Date of mailing of the international search report
08 February 2023	**21 February 2023**
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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2018-532402 A (CRISPA THERAPEUTICS AG) 08 November 2018 (2018-11-08) claims, paragraphs [0046], [0182], [0301], examples	5
A		1-4, 6
X	FONFARA, Ines et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. Nature. 2016, vol. 532, no. 7600, pp. 517-521, DOI: 10.1038/nature17945 in particular, abstract	5
A		1-4, 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/045637

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:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/045637

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2019-522472 A	15 August 2019	US 2017/0362644 A1 examples, paragraph [0439]	
		US 2018/0208976 A1	
		US 2018/0208977 A1	
		US 2019/0177775 A1	
		US 2020/0010878 A1	
		US 2020/0010879 A1	
		GB 2557153 A	
		WO 2017/218573 A1	
		EP 3471749 A1	
		EP 4036249 A1	
		DE 212017000056 U	
		DE 212017000061 U	
		DE 212017000062 U	
		CA 3024883 A1	
		AU 2017283538 A1	
		CN 109641026 A	
		DK 3471749 T	
		ES 2908484 T	
WO 2018/111967 A1	21 June 2018	US 2020/0071689 A1	
		US 2022/0290125 A1	
		EP 3555289 A1	
JP 2019-533476 A	21 November 2019	US 2018/0363019 A1 claims, paragraph [0216]	
		JP 2022-458 A	
		US 2019/0247417 A1	
		US 2022/0096521 A1	
		US 2022/0096522 A1	
		WO 2018/053209 A1	
		EP 3512944 A1	
		CA 3036831 A1	
		AU 2017326423 A1	
		SG 11201901941Y A	
		CN 109937253 A	
		MX 2019002904 A	
		MA 46240 A	
JP 2018-532402 A	08 November 2018	US 2019/0048340 A1 claims, paragraphs [0046], [0203], [0337], examples	
		WO 2017/064546 A1	
		EP 3353297 A1	
		CA 2998287 A1	
		AU 2016339053 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/045637

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

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

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	EAST-SELETSKY, Alexandra et al., “Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection”, Nature, 2016, Vol. 538, No. 7624, p.270-273, DOI: 10.1038/nature19802 特に、ＭＥＴＨＯＤＳの項、Ｆｉｇ．１、Ｅｘｔｅｎｄｅｄ　Ｄａｔａ　Ｔａｂｌｅ　１	5
A		1-4, 6
X	JP 2019-522472 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 15.08.2019 (2019-08-15) 実施例、［０３２４］	5
A		1-4,6
X	WO 2018/111967 A1 (MODERNATX, INC.) 21.06.2018 (2018-06-21) 請求の範囲、４頁第６段落－６頁第１段落	5-6
A		1-4

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
08.02.2023	21.02.2023

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）

竹内　祐樹 4B 5082

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2019-533476 A (モデルナティーエックス, インコーポレイテッド) 21.11.2019 (2019-11-21) 特許請求の範囲、［０１６２］	5-6
A		1-4
X	JP 2018-532402 A (クリスパー セラピューティクス アーゲー) 08.11.2018 (2018-11-08) 特許請求の範囲、［００４６］、［０１８２］、［０３０１］、実施例	5
A		1-4,6
X	FONFARA, Ines et al., "The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA", Nature, 2016, Vol. 532, No. 7600, p.517-521, DOI: 10.1038/nature17945 特に、要約	5
A		1-4,6

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/045637

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

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

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/045637

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2019-522472 A	15.08.2019	US 2017/0362644 A1 実施例、［０４３９］ US 2018/0208976 A1 US 2018/0208977 A1 US 2019/0177775 A1 US 2020/0010878 A1 US 2020/0010879 A1 GB 2557153 A WO 2017/218573 A1 EP 3471749 A1 EP 4036249 A1 DE 212017000056 U DE 212017000061 U DE 212017000062 U CA 3024883 A1 AU 2017283538 A1 CN 109641026 A DK 3471749 T ES 2908484 T	
WO 2018/111967 A1	21.06.2018	US 2020/0071689 A1 US 2022/0290125 A1 EP 3555289 A1	
JP 2019-533476 A	21.11.2019	US 2018/0363019 A1 請求の範囲、［０２１６］ JP 2022-458 A US 2019/0247417 A1 US 2022/0096521 A1 US 2022/0096522 A1 WO 2018/053209 A1 EP 3512944 A1 CA 3036831 A1 AU 2017326423 A1 SG 11201901941Y A CN 109937253 A MX 2019002904 A MA 46240 A	
JP 2018-532402 A	08.11.2018	US 2019/0048340 A1 請求の範囲、［００４６］、［０２０３］、［０３３７］、実施例 WO 2017/064546 A1 EP 3353297 A1 CA 2998287 A1 AU 2016339053 A1	