

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-535917
(P2024-535917A)

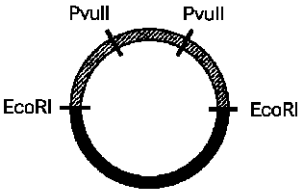
(43)公表日 令和6年10月2日(2024.10.2)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 P	19/34 (2006.01)	C 1 2 P	19/34	A 4 C 0 8 4
A 6 1 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711	4 C 0 8 6
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
		審査請求	未請求	予備審査請求 未請求 (全159頁)
(21)出願番号	特願2024-518929(P2024-518929)	(71)出願人	523089036	
(86)(22)出願日	令和4年9月27日(2022.9.27)		アルデブロン, エル. エル. シー.	
(85)翻訳文提出日	令和6年5月23日(2024.5.23)		アメリカ合衆国 5 8 1 0 4 ノースダコ	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/077108		タ州, サウス ファーゴ 4 1 エスティー	
(87)国際公開番号	WO2023/049937		アベニュー 4 0 5 5	
(87)国際公開日	令和5年3月30日(2023.3.30)	(74)代理人	110000796	
(31)優先権主張番号	63/248,801		弁理士法人三枝国際特許事務所	
(32)優先日	令和3年9月27日(2021.9.27)	(72)発明者	ホ ジン	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 0 2 1 4 0 マサチュー	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(72)発明者	セッツ ケンブリッジ ケンブリッジパー	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		ク ドライブ 1 5 0 スイート 8 0 0	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		ハイアム アイリーン	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		アメリカ合衆国 0 2 1 4 0 マサチュー	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		セッツ ケンブリッジ ケンブリッジパー	
	最終頁に続く		ク ドライブ 1 5 0 スイート 8 0 0	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 環状DNAベクターの合成による生成

(57)【要約】
本明細書において、治療用環状DNAベクターを生成させる改善された方法、かかる方法により生成される医薬組成物、及び医薬組成物を使用する方法が提供される。本発明は、制限消化及びライゲーションのスキームを含む無細胞製造プロセス、例えば、I I S型制限酵素を含む制限消化プロセスに少なくとも部分的に基づく。本明細書において提供される方法は、治療用環状DNAベクターの高純度組成物の大規模生成に適している。

FIG. 1A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療用環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、

(a) 治療用配列及び骨格配列を含むテンプレート DNA ベクターを含む試料を提供することと、

(b) ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して前記テンプレート DNA ベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることと、

(c) 前記直鎖状コンカテマーの単位毎に第 1 の部位及び第 2 の部位を切断する IIS 型制限酵素で前記直鎖状コンカテマーを消化することであって、前記第 1 及び第 2 の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、前記消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、前記直鎖状治療用断片が前記治療用配列を含み、前記直鎖状骨格断片が前記骨格配列またはその一部を含む、前記消化することと、

(d) 前記直鎖状骨格断片及び前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、環状骨格及び IIS 型制限部位を欠く治療用環状 DNA ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

(c) の前記直鎖状骨格断片が IIS 型制限部位を含み、(d) の前記環状骨格が前記 IIS 型制限部位を含み、前記 IIS 型制限酵素が前記環状骨格を切断し、前記治療用環状 DNA ベクターを切断しない、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

治療用環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、

(a) 治療用配列及び骨格配列を含むテンプレート DNA ベクターを含む試料を提供することと、

(b) ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して前記テンプレート DNA ベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることと、

(c) 前記直鎖状コンカテマーの単位毎に少なくとも第 1 の部位、第 2 の部位、及び第 3 の部位を切断する 1 種以上の制限酵素で前記直鎖状コンカテマーを消化することであって、(i) 前記第 1 及び第 2 の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、(ii) 前記第 3 の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、前記治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 2 つの直鎖状骨格断片が生成される、前記消化することと、

30

(d) 前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状 DNA ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

【請求項 4】

前記方法が、ステップ (c) とステップ (d) との間に DNA を希釈することを更に含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (d) の開始時の DNA 濃度が、 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以上であるが、 $160 \mu\text{g} / \text{mL}$ 未満である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 6】

ステップ (d) の開始時の DNA 濃度が約 $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (d) の開始時の DNA 濃度が約 $80 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ (d) におけるリガーゼ濃度が $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり約 10 ～ 約 20 U のリガーゼである、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 9】

前記リガーゼが T4 リガーゼである、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (d) の直後に温度上昇が実行されない、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記直鎖状コンカテマーが、前記第 1 の部位、前記第 2 の部位、及び前記第 3 の部位を切断する単一の制限酵素で消化される、請求項 3～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 種以上の制限酵素が単位毎に前記直鎖状コンカテマーの第 4 の部位を切断し、前記第 4 の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 3 つの直鎖状骨格断片が生成される、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 13】

前記単一の制限酵素が単位毎に前記直鎖状コンカテマーの第 4 の部位を切断し、前記第 4 の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 3 つの直鎖状骨格断片が生成される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記制限酵素が IIS 型制限酵素である、請求項 1、2、4～11、及び 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 15】

前記 IIS 型制限酵素が BsaI である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

制限酵素不活性化ステップがステップ (d) に先行しない、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ (c) と (d) との間に温度上昇が実行されない、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ (d) の直後に温度上昇が実行されない、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 19】

ステップ (c) 及び (d) が同時に行われる、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記治療用環状 DNA ベクターを含有する前記溶液の温度を約 65℃まで上昇させることを更に含む、請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

(e) 前記治療用環状 DNA ベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む、請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 22】

ステップ (e) が約 37℃で実行される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

(f) 前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む、請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

ステップ (f) が約 37℃で実行される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

(e) 前記治療用環状 DNA ベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させ

50

ることと、

(f) 前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることと、を更に含み、酵素不活性化ステップがステップ(e)と(f)との間に実行されない、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

ステップ(e)がステップ(f)の前に行われる、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

ステップ(f)がステップ(d)の前に行われる、請求項25に記載の方法。

【請求項28】

前記制限酵素が約0.5 U/μg～約20 U/μgの濃度で提供される、請求項1～27のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項29】

前記制限酵素が約0.5 U/μg～約2.5 U/μgの濃度で提供される、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記制限酵素が約2.5 U/μgの濃度で提供される、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

ステップ(c)が1～12時間のインキュベーションを含む、請求項1～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

ステップ(c)が1時間以下のインキュベーションを含む、請求項1～30のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項33】

ステップ(c)が約1時間のインキュベーションを含む、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記リガーゼが1 μgのDNA当たり20 U (U/μg) 以下のリガーゼの濃度で提供される、請求項1～33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

前記リガーゼが約10 U/μgの濃度で提供される、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記リガーゼがT4リガーゼである、請求項1～35のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項37】

前記トポイソメラーゼが1 μgのDNA当たり10 U (U/μg) 以下のトポイソメラーゼの濃度で提供される、請求項21～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】

前記トポイソメラーゼがII型トポイソメラーゼである、請求項21～37のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】

前記トポイソメラーゼがギラーゼまたはトポイソメラーゼIVである、請求項21～38のいずれか1項に記載の方法。 40

【請求項40】

前記エキソヌクレアーゼが約0.5 U/μg～約20 U/μgの濃度で提供される、請求項23～39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】

ステップ(f)が2回以上実行される、請求項23～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

ステップ(f)が1時間～18時間のインキュベーションを含む、請求項23～41のいずれか1項に記載の方法。

【請求項43】

ステップ（f）が3～18時間のインキュベーションを含む、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記エキソヌクレアーゼがT5エキソヌクレアーゼである、請求項23～43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項45】

（g）前記治療用環状DNAベクターをカラムに通すこと、及び／または

（h）前記治療用環状DNAベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む、請求項1～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】

ステップ（b）が部位特異的プライマーを使用して実行される、請求項1～45のいずれか1項に記載の方法。

【請求項47】

ステップ（b）がランダムプライマーを使用して実行される、請求項1～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項48】

生成される治療用環状DNAベクターの量が、ステップ（a）の前記試料におけるプラスミドDNAベクターの少なくとも5倍の量である、請求項1～47のいずれか1項に記載の方法。

【請求項49】

ステップ（d）の前にDNA精製またはゲル抽出ステップが実行されない、請求項1～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項50】

ステップ（d）の前記溶液中の前記治療用環状DNAの量が、ステップ（b）における前記直鎖状コンカテマーの量の少なくとも2.0重量%である、請求項1～49のいずれか1項に記載の方法。

【請求項51】

ステップ（d）で生成される前記治療用環状DNAの量が少なくとも1.0mgである、請求項1～50のいずれか1項に記載の方法。

【請求項52】

ステップ（d）後の前記溶液中の前記治療用環状DNAの濃度が、何らの精製または濃縮も実行されることなく少なくとも5μg/mLである、請求項1～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】

ステップ（d）の前記溶液の容量が少なくとも5リットルである、請求項1～52のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】

ステップ（b）～（d）が少なくとも1リットルの容量を有する反応容器で実行される、請求項1～53のいずれか1項に記載の方法。

【請求項55】

ステップ（d）で生成される前記治療用環状DNAの量が、ステップ（a）において提供される前記テンプレートDNAベクターの少なくとも5倍の量である、請求項1～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項56】

DNA分子から骨格配列を除去して、治療用環状DNAベクターを生成させる方法であって、前記DNA分子が骨格配列及び治療用配列を含み、前記方法が、

（a）直鎖状コンカテマーの単位毎に第1の部位及び第2の部位を切断するIIS型制限酵素で前記DNA分子を消化することであって、前記第1及び第2の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、前記消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、前記直鎖状治療用断片が前記治療用配列を含み、前

10

20

30

40

50

記直鎖状骨格断片が前記骨格配列の少なくとも一部及び I I S 型制限部位を含む、前記消化することと、

(b) 前記直鎖状骨格断片及び前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、前記 I I S 型制限部位を含む環状骨格及び I I S 型制限部位を欠く治療用環状 D N A ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

【請求項 57】

D N A 分子から骨格配列を除去して、治療用環状 D N A ベクターを生成させる方法であって、前記 D N A 分子が骨格配列及び治療用配列を含み、前記方法が、

(a) 前記 D N A 分子の単位毎に少なくとも第 1 の部位、第 2 の部位、及び第 3 の部位を切断する 1 種以上の制限酵素で前記 D N A 分子を消化することであって、(i) 前記第 1 及び第 2 の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、

(i i) 前記第 3 の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、前記治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 2 つの直鎖状骨格断片が生成される、前記消化することと、

(b) 前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状 D N A ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

【請求項 58】

前記直鎖状コンカテマーが、前記第 1 の部位、前記第 2 の部位、及び前記第 3 の部位を切断する単一の制限酵素で消化される、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記 1 種以上の制限酵素が前記 D N A 分子の第 4 の部位を切断し、前記第 4 の部位が、前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 3 つの直鎖状骨格断片が生成される、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】

前記単一の制限酵素が前記 D N A 分子の第 4 の部位を切断し、前記第 4 の部位が、前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 3 つの直鎖状骨格断片が生成される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

前記 D N A 分子がテンプレート D N A ベクターの増幅により生成されるコンカテマーである、請求項 57 ～ 60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 62】

前記 D N A 分子がテンプレート D N A ベクターである、請求項 57 ～ 60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 63】

前記テンプレート D N A ベクターがプラスミド D N A ベクターである、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記制限酵素が I I S 型制限酵素である、請求項 56 ～ 63 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 65】

前記 I I S 型制限酵素が B s a I である、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

制限酵素不活性化ステップがステップ (b) に先行しない、請求項 56 ～ 65 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 67】

ステップ (a) と (b) との間に温度上昇が実行されない、請求項 56 ～ 66 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 68】

ステップ（a）及び（b）が同時に行われる、請求項 56～67 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 69】

前記治療用環状 DNA ベクターを含有する前記溶液の温度を約 65℃まで上昇させることを更に含む、請求項 56～68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 70】

（c）前記治療用環状 DNA ベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む、請求項 56～69 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 71】

ステップ（c）が約 37℃で実行される、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

（d）前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む、請求項 56～71 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 73】

ステップ（d）が約 37℃で実行される、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

（c）前記治療用環状 DNA ベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることと、

（d）前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることと、を更に含み、酵素不活性化ステップがステップ（c）と（d）との間に実行されない、請求項 56～73 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 75】

ステップ（c）がステップ（d）の前に行われる、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

ステップ（d）がステップ（c）の前に行われる、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 77】

前記制限酵素が約 0.5 U / μ g ～約 20 U / μ g の濃度で提供される、請求項 56～76 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 78】

前記制限酵素が約 2.5 U / μ g の濃度で提供される、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

ステップ（a）が 1～12 時間のインキュベーションを含む、請求項 56～78 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 80】

ステップ（a）が約 1 時間のインキュベーションを含む、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

前記リガーゼが 1 μ g の DNA 当たり 20 U（U / μ g）以下のリガーゼの濃度で提供される、請求項 56～80 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 82】

前記リガーゼが約 10 U / μ g の濃度で提供される、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記リガーゼが T4 リガーゼである、請求項 56～82 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 84】

前記トポイソメラーゼが 1 μ g の DNA 当たり 10 U（U / μ g）以下のトポイソメラーゼの濃度で提供される、請求項 70～83 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 85】

前記トポイソメラーゼが II 型トポイソメラーゼである、請求項 70～84 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 86】

10

20

30

40

50

前記トポイソメラーゼがギラーゼまたはトポイソメラーゼⅠⅤである、請求項 70～85 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 87】

前記エキソヌクレアーゼが約 0.5 U/μg～約 20 U/μg の濃度で提供される、請求項 70～86 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 88】

ステップ (d) が 2 回以上実行される、請求項 70～87 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 89】

ステップ (d) が 1 時間～12 時間のインキュベーションを含む、請求項 70～88 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 90】

前記エキソヌクレアーゼが T5 エキソヌクレアーゼである、請求項 70～89 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 91】

(e) 前記治療用環状 DNA ベクターをカラムに通すこと、及び／または
(f) 前記治療用環状 DNA ベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む、請求項 56～90 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 92】

前記治療用環状 DNA ベクターがゲル抽出ステップなしに生成される、請求項 56～91 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 93】

治療用スーパーコイル環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、
(a) 治療用配列及び骨格配列を含むテンプレート DNA ベクターを含む試料を提供することと、
(b) ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して前記テンプレート DNA ベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることと、
(c) 前記直鎖状コンカテマーの単位毎に第 1 の部位及び第 2 の部位を切断する IIS 型制限酵素で前記直鎖状コンカテマーを消化することであって、前記第 1 及び第 2 の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、前記消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、前記直鎖状治療用断片が前記治療用配列を含み、前記直鎖状骨格断片が前記骨格配列の少なくとも一部を含む、前記消化することと、

(d) 前記直鎖状治療用断片及び前記直鎖状骨格断片を 20 μg/mL～160 μg/mL の累積 DNA 濃度に希釈することと、

(e) 希釈された前記直鎖状骨格断片及び前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、環状骨格及び IIS 型制限部位を欠く治療用環状 DNA ベクターを生成させることと、

(f) 前記治療用環状 DNA ベクターを 1 μg の DNA 当たり約 1.5 U の濃度のギラーゼと接触させて、治療用スーパーコイル環状 DNA ベクター及び直鎖状骨格断片の混合物を生成させることと、

(g) ステップ (f) 後に前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼで消化することと、を含む、前記方法。

【請求項 94】

治療用スーパーコイル環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、
(a) 治療用配列及び骨格配列を含むテンプレート DNA ベクターを含む試料を提供することと、
(b) ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して前記テンプレート DNA ベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることと、
(c) 前記直鎖状コンカテマーの単位毎に第 1 の部位及び第 2 の部位を切断する IIS 型制限酵素で前記直鎖状コンカテマーを消化することであって、前記第 1 及び第 2 の部位が

10

20

30

40

50

前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、前記消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、前記直鎖状治療用断片が前記治療用配列を含み、前記直鎖状骨格断片が前記骨格配列の少なくとも一部を含む、前記消化することと、

(d) 前記直鎖状治療用断片及び前記直鎖状骨格断片を $20 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 160 \mu\text{g}/\text{mL}$ の累積 DNA 濃度に希釈することと、

(e) 希釈された前記直鎖状骨格断片及び前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、環状骨格及び IIS 型制限部位を欠く治療用環状 DNA ベクターを生成させることと、

(f) 前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼで消化することと、

(g) ステップ (f) 後に $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり 1.5 U 未満の濃度のギラーゼにより前記治療用環状 DNA ベクターをスーパーコイル形成させることと、を含む、前記方法。

10

【請求項 95】

ステップ (e) の前記リガーゼが $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり $10 \sim 20 \text{ U}$ のリガーゼの濃度である、請求項 93 または 94 に記載の方法。

【請求項 96】

ステップ (d) の希釈された前記累積 DNA 濃度が、ステップ (c) 直後の累積 DNA 濃度の約 $10\% \sim 80\%$ である、請求項 93 $\sim$ 95 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 97】

ステップ (c) 直後の前記累積 DNA 濃度が $100 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 300 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 96 に記載の方法。

20

【請求項 98】

前記治療用配列に隣接する前記第 1 または第 2 の切断部位が AAAA または AAC C を含む、請求項 1 $\sim$ 97 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 99】

治療用環状 DNA ベクターの大規模生成のための方法であって、

(a) 治療用配列及び骨格配列を含むプラスミド DNA ベクターの試料を提供することと、

(b) ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して、少なくとも 500 mL の反応容量で前記プラスミド DNA ベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることと、

30

(c) 前記直鎖状コンカテマーの単位毎に少なくとも第 1 の部位、第 2 の部位、及び第 3 の部位を切断する 1 種以上の制限酵素で前記直鎖状コンカテマーを消化することであって、(i) 前記第 1 及び第 2 の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、(ii) 前記第 3 の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、前記治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 2 つの直鎖状骨格断片が生成される、前記消化することと、

(d) 前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状 DNA ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

【請求項 100】

40

ステップ (a) において提供される前記プラスミド DNA ベクターの量が少なくとも 1.0 mg である、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

ステップ (b) により、少なくとも 100 mg の前記直鎖状コンカテマーが生成される、請求項 99 または 100 に記載の方法。

【請求項 102】

ステップ (d) により、少なくとも 2.0 mg の前記治療用環状 DNA ベクターが生成される、請求項 99 $\sim$ 101 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 103】

ステップ (c) 及び (d) が同時に行われる、請求項 99 $\sim$ 102 のいずれか 1 項に記

50

載の方法。

【請求項 104】

DNA 精製がステップ (b)、(c)、及び (d) の間、またはステップ (b) と (c) と (d) との間に実行されない、請求項 99～103 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 105】

ステップ (d) の前記溶液中の前記治療用環状 DNA の量が、ステップ (b) における前記直鎖状コンカテマーの量の少なくとも 2.0 重量%である、請求項 99～104 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 106】

ステップ (d) で生成される前記治療用環状 DNA の量が、ステップ (a) において提供される前記プラスミド DNA ベクターの少なくとも 2 倍の量である、請求項 99～105 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 107】

ステップ (d) の開始時の DNA 濃度が、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であるが、 $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ 未満である、請求項 99～106 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 108】

ステップ (d) の開始時の DNA 濃度が約 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

ステップ (d) の開始時の DNA 濃度が約 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

ステップ (d) の開始時の DNA 濃度が約 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 111】

ステップ (d) におけるリガーゼ濃度が $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり約 10 ～約 20 U のリガーゼである、請求項 99～110 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 112】

前記リガーゼが T4 リガーゼである、請求項 99～111 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 113】

ステップ (d) の直後に温度上昇が実行されない、請求項 99～112 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 114】

治療用環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、
(a) DNA 分子を含む溶液を提供することであって、各 DNA 分子が骨格配列及び治療用配列を含む、前記提供することと、
(b) IIS 型制限酵素を前記溶液に添加して、前記 DNA 分子を消化し、これにより、前記骨格配列を前記治療用配列から分離することと、
(c) リガーゼを前記溶液に添加して、
(i) 前記リガーゼと、
(ii) 前記 IIS 型制限酵素と、
(iii) 各々が単一の治療用配列を含む治療用環状 DNA ベクターであって、各々が IIS 型認識部位を欠く、前記治療用環状 DNA ベクターと、
(iv) 副生成物であって、各副生成物が 1 つ以上の IIS 型制限部位を含む、前記副生成物と、を含む混合物中で反応を発生させることとであって、前記治療用環状 DNA ベクター対 1 つ以上の IIS 型制限部位を含む前記副生成物の比率が前記反応が進行するにつれて増加する、前記発生させることと、を含む、前記方法。

【請求項 115】

前記副生成物の一部または全てが、1 つ以上の骨格配列を含む、請求項 114 に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 1 1 6】

前記副生成物の一部または全てが、2つ以上の治療用配列を更に含む、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記副生成物の一部または全てが環状である、請求項 1 1 4～1 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

(a) の前記 DNA 分子がコンカテマーである、請求項 1 1 4～1 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記方法が、ステップ (a) の前にローリングサークル増幅を使用してテンプレート DNA ベクターを増幅して、コンカテマーを生成させることを更に含む、請求項 1 1 4～1 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記 IIS 型制限酵素が BsaI である、請求項 1 1 4～1 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

制限酵素不活性化ステップがステップ (d) に先行しない、請求項 1 1 4～1 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

ステップ (b) と (c) との間に温度上昇が実行されない、請求項 1 1 4～1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記治療用環状 DNA ベクターを含有する前記溶液の温度を約 65℃まで上昇させることを更に含む、請求項 1 1 4～1 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

(e) 前記治療用環状 DNA ベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む、請求項 1 1 4～1 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

ステップ (e) が約 37℃で実行される、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

(f) 直鎖状副生成物をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む、請求項 1 1 4～1 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

ステップ (f) が約 37℃で実行される、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

(e) 前記治療用環状 DNA ベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることと、

(f) 直鎖状副生成物をエキソヌクレアーゼと接触させることと、を更に含み、酵素不活性化ステップがステップ (e) と (f) との間に実行されない、請求項 1 1 4～1 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

ステップ (e) がステップ (f) の前に行われる、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

ステップ (f) がステップ (e) の前に行われる、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記制限酵素が約 0.5 U/μg～約 20 U/μg の濃度で提供される、請求項 1 1 4～1 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記制限酵素が約 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ ～約 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ の濃度で提供される、請求項 131 に記載の方法。

【請求項 133】

前記制限酵素が約 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ の濃度で提供される、請求項 132 に記載の方法。

【請求項 134】

ステップ (c) が 1 ～ 12 時間のインキュベーションを含む、請求項 114 ～ 133 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 135】

ステップ (c) が約 1 時間のインキュベーションを含む、請求項 134 に記載の方法。

【請求項 136】

前記リガーゼが $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり $20 \text{ U} (\text{U} / \mu\text{g})$ 以下のリガーゼの濃度で提供される、請求項 114 ～ 135 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 137】

前記リガーゼが約 $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ の濃度で提供される、請求項 136 に記載の方法。

【請求項 138】

前記リガーゼが T4 リガーゼである、請求項 114 ～ 137 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 139】

前記トポイソメラーゼが $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり $10 \text{ U} (\text{U} / \mu\text{g})$ 以下のトポイソメラーゼの濃度で提供される、請求項 104 ～ 138 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 140】

前記トポイソメラーゼが II 型トポイソメラーゼである、請求項 104 ～ 139 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 141】

前記トポイソメラーゼがギラーゼまたはトポイソメラーゼ IV である、請求項 104 ～ 140 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 142】

前記エキソヌクレアーゼが約 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ ～約 $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ の濃度で提供される、請求項 104 ～ 141 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 143】

ステップ (f) が 2 回以上実行される、請求項 104 ～ 142 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 144】

ステップ (f) が 1 時間～12 時間のインキュベーションを含む、請求項 104 ～ 143 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 145】

前記エキソヌクレアーゼが T5 エキソヌクレアーゼである、請求項 104 ～ 144 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 146】

(g) 前記治療用環状 DNA ベクターをカラムに通すこと、及び／または
(h) 前記治療用環状 DNA ベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む、請求項 104 ～ 145 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 147】

ステップ (b) が部位特異的プライマーを使用して実行される、請求項 104 ～ 146 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 148】

ステップ (b) がランダムプライマーを使用して実行される、請求項 104 ～ 147 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 149】

ステップ (d) の前にゲル抽出ステップが実行されない、請求項 104 ～ 148 のい

10

20

30

40

50

れか 1 項に記載の方法。

【請求項 150】

ステップ (d) の前記溶液中の前記治療用環状 DNA の量が、ステップ (a) における前記 DNA 分子の量の少なくとも 2.0 重量%である、請求項 104～149 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 151】

ステップ (d) で生成される前記治療用環状 DNA の量が少なくとも 2.0 mg である、請求項 104～150 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 152】

ステップ (d) 後の前記溶液中の前記治療用環状 DNA の濃度が、あらゆる精製または濃縮が実行される前に少なくとも 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である、請求項 104～151 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 153】

ステップ (d) の前記溶液の容量が少なくとも 5.0 リットルである、請求項 104～152 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 154】

ステップ (b)～(d) が少なくとも 1.0 リットルの容量を有する反応容器で実行される、請求項 104～153 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 155】

治療用環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、

20

(a) 複数の直鎖状治療用 DNA 断片及び複数の直鎖状骨格 DNA 断片を含む DNA の混合物を提供することであって、各直鎖状治療用 DNA 断片が治療用配列及び自己相補的末端を含み、前記複数の直鎖状治療用 DNA 断片及び直鎖状骨格 DNA 断片が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の累積 DNA 濃度である、前記提供することと、

(b) 前記 DNA の混合物を 1 μg の DNA 当たり 10～20 U のリガーゼの濃度でリガーゼと接触させることによりライゲーション反応を実行して、治療用環状 DNA ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

【請求項 156】

前記 DNA の混合物が IIS 型制限消化反応により生成され、IIS 型制限酵素が前記直鎖状治療用 DNA 断片を前記直鎖状骨格 DNA 断片から切り離し、前記自己相補的末端が IIS 型オーバーハングである、請求項 155 に記載の方法。

30

【請求項 157】

治療用環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、

(a) 複数の直鎖状治療用 DNA 断片及び複数の直鎖状骨格 DNA 断片を含む DNA の混合物を IIS 型制限消化反応により生成させることであって、IIS 型制限酵素が前記直鎖状治療用 DNA 断片を前記直鎖状骨格 DNA 断片から切り離し、各直鎖状治療用 DNA 断片が治療用配列及び自己相補的 IIS 型オーバーハングを含み、前記複数の直鎖状治療用 DNA 断片及び直鎖状骨格 DNA 断片が 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の累積 DNA 濃度である、前記提供することと、

(b) 前記 DNA の混合物を 1 μg の DNA 当たり 10～20 U のリガーゼの濃度でリガーゼと接触させることによりライゲーション反応を実行して、治療用環状 DNA ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

40

【請求項 158】

ステップ (a) の前記累積 DNA 濃度が、前記 IIS 型制限消化の直後に前記累積 DNA 濃度を調整することにより達成される、請求項 155～157 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 159】

ステップ (a) の前記累積 DNA 濃度を達成するために、前記 IIS 型制限消化の直後に前記累積 DNA 濃度が希釈される、請求項 155～158 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 160】

前記 IIS 型制限消化の直後の前記累積 DNA 濃度が $100 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 300 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項 155～159 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 161】

ステップ (a) の前記累積 DNA 濃度が、前記 IIS 型制限消化の直後の前記累積 DNA 濃度の約 10%～約 80% まで希釈される、請求項 155～160 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 162】

ステップ (a) の前記累積 DNA 濃度が約 $40 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 80 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、請求項 155～161 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 163】

前記 IIS 型制限消化反応における前記 IIS 型制限酵素が $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり約 0.5～約 2.5 U の濃度である、請求項 155～162 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 164】

前記リガーゼが約 $10 \text{U} / \mu\text{g}$ の濃度である、請求項 155～163 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 165】

前記ライゲーション反応が少なくとも 5 時間実行される、請求項 155～164 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 166】

前記ライゲーション反応が 18～24 時間実行される、請求項 165 に記載の方法。

【請求項 167】

前記リガーゼが T4 リガーゼである、請求項 155～166 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 168】

前記 IIS 型制限消化反応における前記 IIS 型制限酵素が $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり約 0.5～約 2.5 U の濃度である、請求項 156～167 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 169】

前記 IIS 型制限消化反応が 2 時間以下の間実行される、請求項 156～168 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 170】

前記 IIS 型制限消化反応が 10 分～1 時間実行される、請求項 169 に記載の方法。

【請求項 171】

前記 IIS 型制限酵素が BsaI である、請求項 156～170 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 172】

前記 IIS 型オーバーハングがそれぞれ 4 個の塩基を含む、請求項 156～171 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 173】

前記 4 個の塩基のうちの 2 個のみが A または T である、請求項 172 に記載の方法。

40

【請求項 174】

前記 IIS 型オーバーハングが AAAA または AAC C を含む、請求項 156～183 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 175】

(c) 前記治療用環状 DNA ベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む、請求項 155～174 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 176】

(d) 前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む、請求項 155～174 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 177】

50

(c) 前記治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることと、

(d) 前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることと、を更に含む、請求項155～174のいずれか1項に記載の方法。

【請求項178】

酵素不活性化ステップがステップ(c)と(d)との間に実行されない、請求項175～177のいずれか1項に記載の方法。

【請求項179】

ステップ(c)がステップ(d)の前に行われる、請求項178に記載の方法。

【請求項180】

ステップ(d)がステップ(c)の前に行われる、請求項178に記載の方法。

【請求項181】

前記トポイソメラーゼが1 μ gのDNA当たり10 U (U/ μ g)以下のトポイソメラーゼの濃度で提供される、請求項175または177～180のいずれか1項に記載の方法。

【請求項182】

前記トポイソメラーゼがII型トポイソメラーゼである、請求項175または177～181のいずれか1項に記載の方法。

【請求項183】

前記トポイソメラーゼがギラーゼまたはトポイソメラーゼIVである、請求項175または177～181のいずれか1項に記載の方法。

【請求項184】

前記エキソヌクレアーゼが約0.5 U/ μ g～約20 U/ μ gの濃度で提供される、請求項176～183のいずれか1項に記載の方法。

【請求項185】

ステップ(d)が2回以上実行される、請求項176～184のいずれか1項に記載の方法。

【請求項186】

ステップ(d)が1時間～18時間のインキュベーションを含む、請求項176～185のいずれか1項に記載の方法。

【請求項187】

ステップ(d)が3～18時間のインキュベーションを含む、請求項186に記載の方法。

【請求項188】

前記エキソヌクレアーゼがT5エキソヌクレアーゼである、請求項176～187のいずれか1項に記載の方法。

【請求項189】

(e) 前記治療用環状DNAベクターをカラムに通すこと、及び／または

(f) 前記治療用環状DNAベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む、請求項155～188のいずれか1項に記載の方法。

【請求項190】

ステップ(b)で生成される前記治療用環状DNAの量が少なくとも1.0 mgである、請求項155～189のいずれか1項に記載の方法。

【請求項191】

ステップ(b)後の前記溶液中の前記治療用環状DNAの濃度が、何らの精製または濃縮も実行されることなく少なくとも5 μ g/mLである、請求項155～190のいずれか1項に記載の方法。

【請求項192】

ステップ(d)の前記溶液の容量が少なくとも5リットルである、請求項155～191のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 193】

ステップ (b) が少なくとも 1 リットルの容量を有する反応容器で実行される、請求項 155～192 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 194】

前記 DNA の混合物がインビトロ増幅の生成物である、請求項 155～193 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 195】

前記インビトロ増幅がポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅である、請求項 194 に記載の方法。

【請求項 196】

前記方法がゲル抽出ステップを含まない、請求項 155～195 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 197】

前記 DNA 混合物が 1 種のための直鎖状骨格 DNA 断片を含む、請求項 155～196 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 198】

治療用スーパーコイル環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、

(a) 弛緩した環状型の治療用環状 DNA ベクターを含む試料を提供することであって、前記治療用環状 DNA ベクターが治療用配列を含む、前記提供することと、

(b) 前記試料をギラーゼと接触させることであって、前記ギラーゼの濃度が 1 mg の治療用環状 DNA ベクター当たり約 1.5 U であり、これにより、治療用スーパーコイル環状 DNA ベクターの組成物が生成される、前記接触させることと、を含む、前記方法。

【請求項 199】

(a) の前記試料が直鎖状 DNA 副生成物を更に含み、前記方法が、(b) の後に、直鎖状 DNA 副生成物を消化するのに適した条件下で前記治療用スーパーコイル環状 DNA ベクターの組成物をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 200】

治療用スーパーコイル環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、

(a) 弛緩した環状型の治療用環状 DNA ベクター及び直鎖状 DNA 副生成物を含む試料を提供することであって、前記治療用環状 DNA ベクターが治療用配列を含む、前記提供することと、

(b) 前記直鎖状 DNA 副生成物を消化するのに適した条件下で前記試料をエキソヌクレアーゼと接触させて、消化された試料を形成することと、

(c) 前記消化された試料をギラーゼと接触させることであって、前記ギラーゼの濃度が、1 mg の治療用環状 DNA ベクター当たり 0.1 U 超であり、かつ 1 mg の治療用環状 DNA ベクター当たり 1.5 U 未満であり、これにより、治療用スーパーコイル環状 DNA ベクターを生成させる、前記接触させることと、を含む、前記方法。

【請求項 201】

前記エキソヌクレアーゼが T5 エキソヌクレアーゼである、請求項 200 に記載の方法。

【請求項 202】

ステップ (a) の前に、直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、前記治療用環状 DNA ベクターを生成させることを更に含む、請求項 198～201 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 203】

前記リガーゼが T4 リガーゼである、請求項 198～201 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 204】

前記直鎖状治療用断片を前記リガーゼと接触させる前に、治療用配列を含む直鎖状コン

10

20

30

40

50

カテマーを制限酵素で消化して、前記直鎖状コンカテマーの単位毎に第 1 の部位及び第 2 の部位を切断することであって、前記第 1 及び第 2 の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、前記消化により、前記直鎖状治療用断片及び前記直鎖状 DNA 副生成物が生成される、前記切断することを更に含む、請求項 202 または 203 に記載の方法。

【請求項 205】

前記治療用スーパーコイル環状 DNA ベクターが治療用環状 DNA ベクターの組成物中に存在し、前記治療用環状 DNA ベクターの少なくとも 70 % がスーパーコイルを形成している、請求項 198 ～ 204 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 206】

前記治療用配列が 5 kb 超である、請求項 1 ～ 205 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 207】

前記治療用配列が 2 つ以上の転写単位を含む、請求項 1 ～ 206 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 208】

前記治療用配列が 1 種以上の治療用タンパク質をコードする、請求項 1 ～ 207 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 209】

前記 1 種以上の治療用タンパク質が多量体タンパク質である、請求項 208 に記載の方法。

【請求項 210】

前記治療用配列が治療用核酸をコードする、請求項 1 ～ 209 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 211】

前記治療用核酸が RNA 分子である、請求項 210 に記載の方法。

【請求項 212】

前記 RNA 分子が、自己複製 RNA 分子、短鎖ヘアピン RNA、またはマイクロ RNA である、請求項 211 に記載の方法。

【請求項 213】

前記治療用環状 DNA ベクターが医薬組成物として製剤化される、請求項 1 ～ 212 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 214】

前記治療用環状 DNA ベクターを薬学的に許容される担体中に製剤化して、医薬組成物を生成させることを更に含む、請求項 1 ～ 213 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 215】

前記医薬組成物が、薬学的に許容される担体中に少なくとも 1.0 mg の前記治療用環状 DNA ベクターを含む、請求項 213 または 214 に記載の方法。

【請求項 216】

前記医薬組成物中の前記治療用環状 DNA ベクターが、少なくとも 70 % がスーパーコイル単量体である、請求項 214 または 215 に記載の方法。

【請求項 217】

前記医薬組成物が 1.0 % 以下の残存タンパク質または骨格配列を含む、請求項 213 ～ 216 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 218】

前記医薬組成物が、1.0 質量%未満のタンパク質含有量、1.0 質量%未満の RNA 含有量、及び 5 EU/mg 未満のエンドトキシンを含む、請求項 213 ～ 217 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 219】

請求項 213 ～ 218 のいずれか 1 項に記載の方法により生成される医薬組成物。

【請求項 220】

個体において治療用配列を発現させる方法であって、請求項 2 1 9 に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 2 1】

疾患または障害を処置する必要がある個体の疾患または障害を処置する方法であって、請求項 2 1 9 に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 2 2】

前記方法がインビボでの電氣的導入を含む、請求項 2 2 0 または 2 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

前記インビボでの電氣的導入が、前記個体の皮膚、骨格筋、腫瘍、眼、または肺における前記治療用配列の発現を誘発する、請求項 2 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 2 4】

3'末端及び5'末端を有する治療用配列を含む治療用環状DNAベクターであって、前記治療用配列の前記3'末端が、少なくとも2個の連続するアデニン(A)を含む4塩基対の配列により前記治療用配列の前記5'末端に連結されている、前記治療用環状DNAベクター。

【請求項 2 2 5】

前記4塩基対の配列がAAAAからなる、請求項 2 2 4 に記載の治療用環状DNAベクター。

【請求項 2 2 6】

前記治療用環状DNAベクターが配列番号1に対する85%の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 2 2 5 に記載の治療用環状DNAベクター。

【請求項 2 2 7】

前記治療用環状DNAベクターが配列番号1を含む、請求項 2 2 6 に記載の治療用環状DNAベクター。

【請求項 2 2 8】

前記4塩基対の配列の2個のみの連続する塩基がAAである、請求項 2 2 4 に記載の治療用環状DNAベクター。

【請求項 2 2 9】

前記4塩基対の配列がAACCからなる、請求項 2 2 8 に記載の治療用環状DNAベクター。

【請求項 2 3 0】

前記治療用環状DNAベクターが配列番号3に対する85%の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項 2 2 9 に記載の治療用環状DNAベクター。

【請求項 2 3 1】

前記治療用環状DNAベクターが配列番号3を含む、請求項 2 3 0 に記載の治療用環状DNAベクター。

【請求項 2 3 2】

請求項 2 2 4 ~ 2 3 1 のいずれか1項に記載の治療用環状DNAベクターを含む医薬組成物。

【請求項 2 3 3】

前記医薬組成物が、薬学的に許容される担体中に少なくとも1.0mgの前記治療用環状DNAベクターを含む、請求項 2 3 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3 4】

前記治療用環状DNAベクターが、少なくとも70%がスーパーコイル単量体である、請求項 2 3 2 または 2 3 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3 5】

前記医薬組成物が1.0%以下の残存タンパク質または骨格配列を含む、請求項 2 3 2 ~ 2 3 4 のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3 6】

前記医薬組成物が、1.0質量%未満のタンパク質含有量、1.0質量%未満のRNA

10

20

30

40

50

含有量、及び 5 E U / m g 未満のエンドトキシンを含む、請求項 2 3 2 ~ 2 3 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3 7】

個体において治療用配列を発現させる方法であって、請求項 2 3 2 ~ 2 3 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 3 8】

眼疾患または障害を処置する必要がある個体の眼疾患または障害を処置する方法であって、請求項 2 3 2 ~ 2 3 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2 3 9】

前記方法が、インビボでの電氣的導入により前記治療用環状 DNA ベクターを前記個体の眼に送達することを含む、請求項 2 3 7 または 2 3 8 に記載の方法。

【請求項 2 4 0】

前記個体がヒトである、請求項 2 2 0 ~ 2 2 3 または 2 3 7 ~ 2 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

相互参照

本国際出願は、米国仮特許出願第 6 3 / 2 4 8 , 8 0 1 号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

概して、本発明は、合成環状 DNA ベクターに関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

遺伝子治療は、ヒト患者の多種多様な疾患または障害を処置するための有望な手法として登場している。組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ベクターは、ヒト患者及び種々のモデル系において高効率遺伝子導入の実績が確立されている。 r A A V ベクターのゲノムは、標的細胞の寿命を通じてインビボで環状エピソームとして存続する能力があるため有利である。一方で、 r A A V ベースのベクターには、限られた最大ペイロード量、免疫原性、及び製造の非効率性などの重大な欠点がある。

【0 0 0 4】

r A A V 技術におけるこれらの課題のうちの幾つかに対処するために、非ウイルス性の代替物が近年勢いを増している。しかしながら、 r A A V の有効性及び持続性を有するスケラブルな非ウイルス性遺伝子治療プラットフォームの開発は、実現が難しいとされている。例えば、従来の細菌プラスミド DNA ベクターは、遺伝子送達における用途の広いツールであるが、それらが細菌起源であることにより制限される。プラスミド DNA ベクターの細菌要素、例えば、抗生物質耐性遺伝子、複製開始点、ならびに細菌宿主由来の不純物、例えば、エンドトキシン、細菌のゲノム DNA 及び RNA 、ならびに宿主細胞タンパク質は、免疫原性及び転写サイレンシングによる遺伝子発現の喪失をもたらす得る。

【0 0 0 5】

部位特異的組換えにより細菌要素を除去することによりプラスミド DNA ベクターの小規模な改善が達成されてきたが、それでもかかるプロセスは細菌宿主細胞での産生に依存しており、本質的にこのことが、得られる医薬組成物における許容できない不純物プロファイルのリスクをもたらす。合成 DNA ベクターは無細胞条件で製造され、これらのリスクが回避されるが、それらの拡張性は、現在のところ、ゲル精製ステップ及び複数種の制限酵素が多くの場合必要とされる非効率的な製造プロセスにより制限される。

【0 0 0 6】

従って、非ウイルス DNA ベクターを高純度かつ高効率で生成させる制御可能な拡張性のある方法の必要性が当該技術分野において存在する。

【発明の概要】

【0007】

本明細書において、治療用環状DNAベクターを生成させる改善された無細胞の方法、かかる方法により生成される医薬組成物、及び医薬組成物を使用する方法が提供される。本発明は、制限消化及びライゲーションのスキームを含む無細胞製造プロセス、例えば、IIS型制限酵素を含む制限消化プロセスの開発に少なくとも部分的に基づく。更に出願人は、合成DNAベクター製造効率の劇的な改善をもたらす条件（例えば、DNA及びリガーゼ濃度）、工程順序、及び高効率のオーバーハング組成を同定した。本明細書において提供される方法及び組成物は、治療用環状DNAベクターの高純度組成物の大規模生成に適している。

【0008】

一態様では、以下のステップを含む、治療用環状DNAベクターを生成させる方法が本明細書において提供される：（a）治療用配列及び骨格配列を含むテンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）を含む試料を提供するステップ；（b）ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅（例えば、Phi29により媒介されるローリングサークル増幅）を使用して当該テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させるステップ；（c）当該直鎖状コンカテマーの単位毎に第1の部位及び第2の部位を切断するIIS型制限酵素で当該直鎖状コンカテマーを消化するステップであって、当該第1及び第2の部位が治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、当該直鎖状治療用断片が当該治療用配列を含み、当該直鎖状骨格断片が当該骨格配列またはその一部を含む、当該ステップ；ならびに（d）当該直鎖状骨格断片及び当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、環状骨格及びIIS型制限部位を欠く治療用環状DNAベクターを生成させるステップ。幾つかの実施形態では、（c）の直鎖状骨格断片は、IIS型制限部位を含み、（d）の環状骨格は、IIS型制限部位を含み、IIS型制限酵素は、環状骨格を切断し、治療用環状DNAベクターを切断しない。

【0009】

別の態様では、以下のステップを含む、治療用環状DNAベクターを生成させる方法が本明細書において提供される：（a）治療用配列及び骨格配列を含むテンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）を含む試料を提供するステップ；（b）ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して当該テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させるステップ；（c）当該直鎖状コンカテマーの単位毎に少なくとも第1の部位、第2の部位、及び第3の部位を切断する1種以上の制限酵素で当該直鎖状コンカテマーを消化するステップであって、（i）当該第1及び第2の部位が当該治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、（ii）当該第3の部位が当該骨格配列内に存在し、当該第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、当該治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が当該骨格配列の一部を含む少なくとも2つの直鎖状骨格断片が生成される、当該ステップ；ならびに（d）当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状DNAベクターを生成させるステップ。

【0010】

上記の態様のいずれかの幾つかの実施形態では、本方法は、ステップ（c）とステップ（d）との間にDNAを希釈することを更に含む。幾つかの実施形態では、ステップ（d）の開始時のDNA濃度は、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であるが、 $160\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満である。幾つかの実施形態では、ステップ（d）の開始時のDNA濃度は、約 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ である。幾つかの実施形態では、ステップ（d）の開始時のDNA濃度は、約 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ である。幾つかの実施形態では、ステップ（d）におけるリガーゼ濃度は、 $1\mu\text{g}$ のDNA当たり約10～約20Uのリガーゼである。幾つかの実施形態では、リガーゼは、T4リガーゼである。幾つかの実施形態では、ステップ（d）の直後に温度上昇が実行されない。

【0011】

幾つかの実施形態では、直鎖状コンカテマーは、第1の部位、第2の部位、及び第3の部位を切断する単一の制限酵素により消化される（例えば、ステップ（b）は、単一（すなわち、1種のみ）の制限酵素（例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI）を必要とする）。幾つかの実施形態では、1種以上の制限酵素が単位毎に直鎖状コンカテマーの第4の部位を切断し、ここで、当該第4の部位は、骨格配列内に存在し、第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、各々が骨格配列の一部を含む少なくとも3つの直鎖状骨格断片が生成される。幾つかの実施形態では、ステップ（b）は、単位毎に直鎖状コンカテマーの第4の部位を切断する単一の制限酵素（例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI）を必要とし、ここで、当該第4の部位は、骨格配列内に存在し、第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、各々が骨格配列の一部を含む少なくとも3つの直鎖状骨格断片が生成される。

10

【0012】

幾つかの実施形態では、制限酵素不活性化ステップは、ステップ（d）に先行しない（例えば、制限酵素の熱不活性化は、ステップ（d）に先行しない）。幾つかの実施形態では、ステップ（c）と（d）との間に温度上昇が実行されない。幾つかの実施形態では、ステップ（c）と（d）との間に温度が低下される。幾つかの実施形態では、ステップ（d）の直後に温度上昇が実行されない。熱不活性化が実行されない幾つかの実施形態では、反応は、高温に適していない使い捨ての容器で実行される。幾つかの実施形態では、ステップ（c）及び（d）は、同時に行われる。

【0013】

幾つかの実施形態では、本方法は、治療用環状DNAベクターを含有する溶液の温度を約65℃まで上昇させることを更に含む。

20

【0014】

幾つかの実施形態では、本方法は、（e）治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む。幾つかの実施形態では、ステップ（e）は、約37℃で実行される。

【0015】

幾つかの実施形態では、本方法は、（f）直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ、例えば、T5エキソヌクレアーゼ）と接触させることを更に含む。幾つかの実施形態では、ステップ（f）は、約37℃で実行される。

30

【0016】

幾つかの実施形態では、本方法は、（e）治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させること、及び（f）直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ、例えば、T5エキソヌクレアーゼ）と接触させることを更に含む、ここで、酵素不活性化ステップがステップ（e）と（f）との間に実行されない。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターのトポイソメラーゼまたはヘリカーゼとの接触は、直鎖状骨格断片のエキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ）との接触前に行われる。他の実施形態では、治療用環状DNAベクターのトポイソメラーゼまたはヘリカーゼとの接触は、直鎖状骨格断片のエキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ）との接触後に行われる。

40

【0017】

上記の方法のいずれかの幾つかの実施形態では、制限酵素は、約0.5U/μg～約20U/μg、例えば、約1U/μg DNA～約10U/μg DNA、例えば、約2U/μg DNA～約5U/μg DNA、例えば、約2.5U/μg DNAの濃度で提供される。例えば、制限酵素は、約0.5U/μg DNA、1.0U/μg DNA、1.5U/μg DNA、2.0U/μg DNA、2.5U/μg DNA、3.0U/μg DNA、3.5U/μg DNA、4.0U/μg DNA、4.5U/μg DNA、5.0U/μg DNA、5.5U/μg DNA、6.0U/μg DNA、6.5U/μg DNA、7.0U/μg DNA、7.5U/μg DNA、8.0U/μg DNA、8.5U/μg DNA、9.0U/μg DNA、9.5U/μg

50

DNA、 $10.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $11\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $12\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $13\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $14\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $15\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $16\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $17\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $18\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $19\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、または $20\text{ U}/\mu\text{g}$ DNAの濃度で提供され得る。幾つかの実施形態では、制限酵素は、約 $0.5\text{ U}/\mu\text{g}$ ～約 $2.5\text{ U}/\mu\text{g}$ の濃度で提供される。

【0018】

幾つかの実施形態では、制限酵素は、約 $2.5\text{ U}/\mu\text{g}$ の濃度で提供される。

【0019】

幾つかの実施形態では、消化（例えば、ステップ（c））は、1～12時間、例えば、約1時間のインキュベーションを含む。幾つかの実施形態では、消化（例えば、ステップ（c））は、1時間以下のインキュベーションを含む。

10

【0020】

幾つかの実施形態では、リガーゼは、 $1\mu\text{g}$ のDNA当たり 50 U （ $\text{U}/\mu\text{g}$ ）以下（例えば、 $40\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $30\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $25\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $20\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $15\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $10\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $4\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $3\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $2.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $2.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $1.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、または $1.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下；例えば、 $0.1\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $20\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA；例えば、 $0.1\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $30\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $0.1\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $20\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $0.2\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $15\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $0.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $12\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、または $1\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $10\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA；例えば、 $0.1\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $0.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $0.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $1.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $1.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $2.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $2.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $3.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $3.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $4.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $4.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $5.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $5.0\sim 6.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $6.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $7.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $7.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $8.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $8.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $9.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $9.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $11\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $11\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $12\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $12\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $15\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $15\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $20\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $20\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $25\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $25\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $30\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $30\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $35\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $35\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $40\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、または $40\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $50\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA）のリガーゼの濃度で提供される。幾つかの実施形態では、リガーゼは、 $20\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下の濃度で提供される。幾つかの実施形態では、リガーゼは、約 $10\text{ U}/\mu\text{g}$ の濃度で提供される。幾つかの実施形態では、リガーゼは、T4リガーゼである。

20

30

【0021】

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、 $1\mu\text{g}$ のDNA当たり 10 U （ $\text{U}/\mu\text{g}$ ）以下（例えば、 $5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $4\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $3\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $2.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $2.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、 $1.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下、または $1.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA以下；例えば、 $0.1\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $10\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、例えば、 $0.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $8\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、または $1\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA；例えば、 $0.1\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $0.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $0.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $1.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $1.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $2.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $2.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $3.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $3.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $4.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $4.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $5.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $5.0\sim 6.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $6.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $7.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $7.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $8.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、 $8.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $9.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA、または $9.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA～ $10\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA）のトポイソメラーゼの濃度で提供される。

40

【0022】

50

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、II型トポイソメラーゼである。幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、ギラーゼである。幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、トポイソメラーゼIVである。

【0023】

幾つかの実施形態では、エキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ、例えば、T5エキソヌクレアーゼ）は、約0.5U/μg～約20U/μg、例えば、約0.5U/μg～約10U/μg、例えば、約1U/μg～約10U/μg、例えば、約2U/μg～約5U/μg、例えば、約2.5U/μg濃度で提供される。例えば、エキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ）は、約0.5U/μg、1.0U/μg、1.5U/μg、2.0U/μg、2.5U/μg、3.0U/μg、3.5U/μg、4.0U/μg、4.5U/μg、5.0U/μg、5.5U/μg、6.0U/μg、6.5U/μg、7.0U/μg、7.5U/μg、8.0U/μg、8.5U/μg、9.0U/μg、9.5U/μg、10.0U/μg、11U/μg、12U/μg、13U/μg、14U/μg、15U/μg、16U/μg、17U/μg、18U/μg、19U/μg、または20U/μgの濃度で提供され得る。

10

【0024】

幾つかの実施形態では、ステップ（f）は、2回以上（例えば、2回、3回、または4回）実行される。幾つかの実施形態では、ステップ（f）は、1時間～12時間のインキュベーションを含む。幾つかの実施形態では、ステップ（f）は、1時間～18時間のインキュベーションを含む。幾つかの実施形態では、ステップ（f）は、3時間～18時間のインキュベーションを含む。幾つかの実施形態では、エキソヌクレアーゼは、末端エキソヌクレアーゼ（例えば、T5エキソヌクレアーゼ）である。

20

【0025】

上記の方法のいずれかの幾つかの実施形態では、本発明の方法は、（g）治療用環状DNAベクターをカラム（例えば、捕捉カラム）に通すこと、及び／または（h）治療用環状DNAベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む。

【0026】

幾つかの実施形態では、ステップ（b）は、部位特異的プライマーを使用して実行される。他の実施形態では、ステップ（b）は、ランダムプライマーを使用して実行される。

【0027】

幾つかの実施形態では、生成される治療用環状DNAベクターの量は、ステップ（a）の試料におけるテンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の少なくとも5倍の量である。

30

【0028】

幾つかの実施形態では、ステップ（d）の前にDNA精製またはゲル抽出ステップが実行されない。

【0029】

幾つかの実施形態では、ステップ（d）の溶液中の治療用環状DNAの量は、ステップ（b）における直鎖状コンカテマーの量の少なくとも2.0重量%（例えば、ステップ（b）における直鎖状コンカテマーの量の少なくとも3.0重量%、少なくとも4.0重量%、少なくとも5.0重量%、少なくとも6.0重量%、少なくとも7.0%、少なくとも8.0重量%、少なくとも9.0重量%、少なくとも10重量%、少なくとも20重量%、少なくとも30重量%、少なくとも40重量%、または少なくとも50重量%）である。

40

【0030】

幾つかの実施形態では、ステップ（d）で生成される治療用環状DNAの量は、少なくとも1.0mg（例えば、1.0mg～10mg、2.0mg～10mg、3.0mg～10mg、4.0mg～10mg、または5.0mg～10mg；例えば、1.0mg～2.5mg、2.5mg～5.0mg、5.0mg～7.5mg、または7.5mg～10mg）である。幾つかの実施形態では、ステップ（d）で生成される治療用環状DNA

50

の量は、少なくとも2.0mgである。例えば、幾つかの実施形態では、ステップ(d)で生成される治療用環状DNAの量は、少なくとも5.0mgである。

【0031】

幾つかの実施形態では、ステップ(d)後の溶液中の治療用環状DNAの濃度は、何らの精製または濃縮も実行されることなく1.0μg/mL~1.0mg/mL(例えば、何らの精製または濃縮も実行されることなく5.0μg/mL~100μg/mLまたは10μg/mL~50μg/mL、例えば、何らの精製または濃縮も実行されることなく1.0μg/mL~10μg/mL、5.0μg/mL~10μg/mL、10μg/mL~50μg/mL、50μg/mL~100μg/mL、またはそれ以上)である。

【0032】

幾つかの実施形態では、ステップ(d)の溶液の容量は、少なくとも5リットル(例えば、5リットル~200リットル、例えば、7リットル~100リットル、10リットル~80リットル、15リットル~75リットル、または20リットル~70リットル、例えば、少なくとも1.0リットル、少なくとも2.0リットル、少なくとも5.0リットル、少なくとも10リットル、少なくとも20リットル、少なくとも50リットル、または少なくとも100リットル)である。

【0033】

幾つかの実施形態では、ステップ(b)は、少なくとも0.5リットル(例えば、少なくとも1.0リットル、少なくとも2.0リットル、少なくとも5.0リットル、少なくとも10リットル、少なくとも20リットル、少なくとも50リットル、少なくとも100リットル、少なくとも150リットル、または少なくとも200リットル)の容量を有する反応容器で実行される。幾つかの実施形態では、ステップ(b)は、少なくとも5リットルの容量を有する反応容器で実行される。追加的または代替的に、ステップ(c)及び(d)は、少なくとも0.5リットル(例えば、少なくとも1.0リットル、少なくとも2.0リットル、少なくとも5.0リットル、少なくとも10リットル、少なくとも20リットル、少なくとも50リットル、少なくとも100リットル、少なくとも150リットル、または少なくとも200リットル)の容量を有する反応容器で実行される。例えば、幾つかの実施形態では、ステップ(c)及び(d)は、少なくとも5リットルの容量を有する反応容器で実行される。幾つかの実施形態では、ステップ(b)~(d)の各々は、少なくとも0.5リットル(例えば、少なくとも1.0リットル、少なくとも2.0リットル、少なくとも5.0リットル、少なくとも10リットル、少なくとも20リットル、少なくとも50リットル、少なくとも100リットル、少なくとも150リットル、または少なくとも200リットル)の容量を有する反応容器で実行される。幾つかの実施形態では、ステップ(b)~(d)の各々は、少なくとも5リットルの容量を有する反応容器で実行される。

【0034】

幾つかの実施形態では、ステップ(d)で生成される治療用環状DNAの量は、ステップ(a)において提供されるテンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドDNAベクター)の量の少なくとも20%(例えば、ステップ(a)において提供されるテンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドDNAベクター)の少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍の量、例えば、ステップ(a)において提供されるテンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドDNAベクター)の少なくとも2倍の量、少なくとも3倍の量、少なくとも5倍の量、少なくとも10倍の量、少なくとも20倍の量、少なくとも30倍の量、少なくとも40倍の量、少なくとも50倍の量、または少なくとも100倍の量)である。特定の実施形態では、ステップ(d)で生成される治療用環状DNAの量は、ステップ(a)において提供されるテンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドDNAベクター)の少なくとも5倍の量である。幾つかの実施形態では、ステップ(d)で生成される治療用環状DNAの量は、ステップ(a)において提供されるテンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドD

10

20

30

40

50

NAベクター)の少なくとも10倍の量である。

【0035】

別の態様では、DNA分子から骨格配列を除去して、治療用環状DNAベクターを生成させる方法であって、当該DNA分子が骨格配列及び治療用配列を含み、当該方法が、(a)直鎖状コンカテマーの単位毎に第1の部位及び第2の部位を切断するIIS型制限酵素で当該DNA分子を消化することであって、当該第1及び第2の部位が当該治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、当該直鎖状治療用断片が当該治療用配列を含み、当該直鎖状骨格断片が当該骨格配列の少なくとも一部及びIIS型制限部位を含む、当該消化すること、ならびに(b)当該直鎖状骨格断片及び当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、当該IIS型制限部位を含む環状骨格及びIIS型制限部位を欠く治療用環状DNAベクターを生成させることを含む、当該方法が本明細書において提供される。

10

【0036】

別の態様では、本方法は、治療用配列を含むテンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドDNAベクター)を含む試料を提供すること、及びポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して当該テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることを含む。直鎖状コンカテマーは、DNAベクターの直鎖化断片を生成させるために、テンプレートDNAベクターの単位毎に直鎖状コンカテマーの少なくとも2つの部位を切断する制限酵素により消化される。本発明の方法は、治療用配列を含むDNAベクターの直鎖化断片をセルフライゲーションさせて、治療用環状DNAベクターを生成させることを更に含む。幾つかの実施形態では、消化させること、及びセルフライゲーションさせることは、同時に実行される。次いで、試料は、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼで処理され得る。幾つかの実施形態では、本方法は、エキソヌクレアーゼ(例えば、末端エキソヌクレアーゼ、例えば、T5エキソヌクレアーゼ)で試料を消化することを更に含む。

20

【0037】

別の態様では、本方法は、治療用配列を含むテンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドDNAベクター)を含む試料を提供すること、及びポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して当該テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることを含む。本方法は、制限酵素で直鎖状コンカテマーを消化して、DNAベクターの直鎖化断片を生成させることを更に含む。直鎖状コンカテマーは複数コピーのテンプレートDNAベクターを有し、各コピーは単位長を有し、直鎖状コンカテマーは複数のベクターの単位長を有する。制限酵素は、テンプレートDNAベクターの単位毎に直鎖状コンカテマーの少なくとも2つの部位を切断する。本方法は、DNAベクターの直鎖化断片をセルフライゲーションさせて、治療用環状DNAベクターを生成させることを更に含む。本方法は、エキソヌクレアーゼ(例えば、末端エキソヌクレアーゼ、例えば、T5エキソヌクレアーゼ)で試料を消化することをも含む。幾つかの実施形態では、本方法は、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼで試料を処理することを更に含む。幾つかの実施形態では、消化させること、及びセルフライゲーションさせることは、同時に実行される。

30

40

【0038】

別の態様では、本方法は、治療用配列を含むテンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドDNAベクター)を含む試料を提供すること、及びポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して当該テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることを含む。本方法は、制限酵素で直鎖状コンカテマーを消化して、DNAベクターの直鎖化断片を生成させることを更に含む。制限酵素は、テンプレートDNAベクターの単位毎に直鎖状コンカテマーの少なくとも2つの部位を切断する。本方法は、DNAベクターの直鎖化断片をセルフライゲーションさせて、治療用環状DNAベクターを生成させることを更に含む。本方法は、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼで試料を処理すること、及びエキソヌクレアーゼ(例えば、末端エキソヌクレアーゼ)

50

で試料を消化することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、消化させること、及びセルフライゲーションさせることは、（同じ反応条件で）同時に実行される。

【0039】

別の態様では、本発明は、DNA分子から骨格配列を除去して、治療用環状DNAベクターを生成させる方法を提供する。DNA分子は、骨格配列及び治療用配列を含む。本方法は、（a）DNA分子の単位毎に少なくとも第1の部位、第2の部位、及び第3の部位を切断する1種以上の制限酵素でDNA分子を消化するステップであって、（i）当該第1及び第2の部位が治療用配列に隣接しており、自己相補的なオーバーハングを形成し、（ii）当該第3の部位が骨格配列内に存在し、当該第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、当該治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が当該骨格配列の一部を含む少なくとも2つの直鎖状骨格断片が生成される、当該ステップ；ならびに（b）当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状DNAベクターを生成させるステップを含む。

10

【0040】

幾つかの実施形態では、直鎖状コンカテマーは、第1の部位、第2の部位、及び第3の部位を切断する単一の制限酵素で消化される。幾つかの実施形態では、1種以上の制限酵素がDNA分子の第4の部位を切断し、ここで、当該第4の部位は、骨格配列内に存在し、第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、各々が骨格配列の一部を含む少なくとも3つの直鎖状骨格断片が生成される。幾つかの実施形態では、単一の制限酵素がDNA分子の第4の部位を切断し、ここで、当該第4の部位は、骨格配列内に存在し、第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、各々が骨格配列の一部を含む少なくとも3つの直鎖状骨格断片が生成される。

20

【0041】

幾つかの実施形態では、DNA分子は、テンプレートDNAベクターの増幅により生成されるコンカテマーである。幾つかの実施形態では、DNA分子は、テンプレートDNAベクターである。幾つかの実施形態では、テンプレートDNAベクターは、プラスミドDNAベクターである。

【0042】

幾つかの実施形態では、単一の制限酵素は、IIS型制限酵素、例えば、BsaIである。

30

【0043】

幾つかの実施形態では、制限酵素不活性化ステップは、ステップ（b）に先行しない。

【0044】

幾つかの実施形態では、ステップ（a）と（b）との間に温度上昇が実行されない。

【0045】

幾つかの実施形態では、ステップ（a）及び（b）は、同時に行われる。

【0046】

幾つかの実施形態では、本方法は、治療用環状DNAベクターを含有する溶液の温度を約65℃まで上昇させることを更に含む。

【0047】

幾つかの実施形態では、本方法は、（c）治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む。幾つかの実施形態では、ステップ（c）は、約37℃で実行される。幾つかの実施形態では、本方法は、（d）直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ）と接触させることを更に含む。幾つかの実施形態では、ステップ（d）は、約37℃で実行される。

40

【0048】

幾つかの実施形態では、本方法は、（c）治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させること、及び（d）直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ）と接触させることを更に含み、ここで、酵素不活性化ステップがステップ（c）と（d）との間に実行されない。幾つかの実施形態では、ス

50

テップ (c) は、ステップ (d) の前に行われる。

【0049】

幾つかの実施形態では、制限酵素は、約 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ ~ 約 $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ 、例えば、約 $1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ 約 $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、例えば、約 $2 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ 約 $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、例えば、約 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA の濃度で提供される。例えば、制限酵素は、約 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $1.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $3.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $3.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $4.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $4.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $5.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $5.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $6.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $6.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $7.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $7.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $8.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $8.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $9.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $9.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $10.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $11 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $12 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $13 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $14 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $15 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $16 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $17 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $18 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $19 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、または $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA の濃度で提供され得る。幾つかの実施形態では、制限酵素は、約 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ の濃度で提供される。

10

【0050】

幾つかの実施形態では、ステップ (a) は、1 ~ 12 時間 (例えば、約 1 時間) のインキュベーションを含む。

【0051】

幾つかの実施形態では、リガーゼは、 $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり $20 \text{ U} (\text{U} / \mu\text{g})$ 以下 (例えば、 $15 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $4 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $3 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $1.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、または $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下; 例えば、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA; 例えば、 $0.2 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $15 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $12 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、または $1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA; 例えば、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $3.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $3.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $4.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $4.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $5.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $5.0 \sim 6.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $6.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $7.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $7.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $8.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $8.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $9.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $9.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $11 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $11 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $12 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $12 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $15 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、または $15 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA) のリガーゼの濃度で提供される。幾つかの実施形態では、リガーゼは、約 $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA の濃度である。幾つかの実施形態では、リガーゼは、T4 リガーゼである。

20

30

【0052】

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、 $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり $10 \text{ U} (\text{U} / \mu\text{g})$ 以下 (例えば、 $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $4 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $3 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、 $1.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下、または $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA 以下; 例えば、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、例えば、 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $8 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、または $1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA; 例えば、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $3.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $3.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $4.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $4.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $5.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $5.0 \sim 6.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $6.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $7.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $7.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $8.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $8.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $9.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、または $9.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA ~ $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA

40

50

）のトポイソメラーゼの濃度で提供される。

【0053】

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、II型トポイソメラーゼである。幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、ギラーゼまたはトポイソメラーゼIVである。幾つかの実施形態では、エキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ、例えば、T5エキソヌクレアーゼ）は、約0.5 U/μg～約20 U/μg、例えば、約0.5 U/μg～約10 U/μg、例えば、約1 U/μg～約10 U/μg、例えば、約2 U/μg～約5 U/μg、例えば、約2.5 U/μg濃度で提供される。例えば、エキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ）は、約0.5 U/μg、1.0 U/μg、1.5 U/μg、2.0 U/μg、2.5 U/μg、3.0 U/μg、3.5 U/μg、4.0 U/μg、4.5 U/μg、5.0 U/μg、5.5 U/μg、6.0 U/μg、6.5 U/μg、7.0 U/μg、7.5 U/μg、8.0 U/μg、8.5 U/μg、9.0 U/μg、9.5 U/μg、10.0 U/μg、11 U/μg、12 U/μg、13 U/μg、14 U/μg、15 U/μg、16 U/μg、17 U/μg、18 U/μg、19 U/μg、または20 U/μgの濃度で提供され得る。

10

【0054】

幾つかの実施形態では、ステップ（d）は、2回以上実行される。幾つかの実施形態では、ステップ（d）は、1時間～12時間のインキュベーションを含む。幾つかの実施形態では、エキソヌクレアーゼは、末端エキソヌクレアーゼである。幾つかの実施形態では、末端エキソヌクレアーゼは、T5エキソヌクレアーゼである。幾つかの実施形態では、本方法は、（e）治療用環状DNAベクターをカラム（例えば、捕捉カラム）に通すこと、及び／または（f）治療用環状DNAベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む。

20

【0055】

先行実施形態のいずれかの幾つかでは、治療用環状DNAベクターは、ゲル抽出ステップ（例えば、中間ゲル抽出ステップ）なしに生成される。

【0056】

別の態様では、治療用環状スーパーコイルDNAベクターを生成させる方法であって、（a）治療用配列及び骨格配列を含むテンプレートDNAベクターを含む試料を提供すること；（b）ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して当該テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させること；（c）当該直鎖状コンカテマーの単位毎に第1の部位及び第2の部位を切断するIIS型制限酵素で当該直鎖状コンカテマーを消化することであって、当該第1及び第2の部位が治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、当該直鎖状治療用断片が当該治療用配列を含み、当該直鎖状骨格断片が当該骨格配列の少なくとも一部を含む、当該消化すること；（d）当該直鎖状治療用断片及び当該直鎖状骨格断片を20 μg/mL～160 μg/mLの累積DNA濃度に希釈すること；（e）希釈された当該直鎖状骨格断片及び当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、環状骨格及びIIS型制限部位を欠く治療用環状DNAベクターを生成させること；（f）当該治療用環状DNAベクターを1 μgのDNA当たり約1.5 Uの濃度のギラーゼと接触させて、治療用スーパーコイル環状DNAベクター及び直鎖状骨格断片の混合物を生成させること；ならびに（g）ステップ（f）後に当該直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼで消化することを含む、当該方法が提供される。

30

40

【0057】

別の態様では、治療用環状スーパーコイルDNAベクターを生成させる方法であって、（a）治療用配列及び骨格配列を含むテンプレートDNAベクターを含む試料を提供すること；（b）ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して当該テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させること；（c）当該直鎖状コンカテマーの単位毎に第1の部位及び第2の部位を切断するIIS型制限酵素で当該直鎖状コンカテマーを消化することであって、当該第1及び第2の部位が治療用配列

50

に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、当該直鎖状治療用断片が当該治療用配列を含み、当該直鎖状骨格断片が当該骨格配列の少なくとも一部を含む、当該消化すること；（d）当該直鎖状治療用断片及び当該直鎖状骨格断片を $20\mu\text{g}/\text{mL}\sim 160\mu\text{g}/\text{mL}$ の累積DNA濃度に希釈すること；（e）希釈された当該直鎖状骨格断片及び当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、環状骨格及びIIS型制限部位を欠く治療用環状DNAベクターを生成させること；（f）当該直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼで消化すること；ならびに（g）ステップ（f）後に $1\mu\text{g}$ のDNA当たり 1.5U 未満の濃度のギラーゼにより当該治療用環状DNAベクターをスーパーコイル形成させることを含む、当該方法が提供される。幾つかの実施形態では、ステップ（e）のリガーゼは、 $1\mu\text{g}$ のDNA当たり $10\sim 20\text{U}$ のリガーゼの濃度である。幾つかの実施形態では、ステップ（d）の希釈された累積DNA濃度は、ステップ（c）直後の累積DNA濃度の約 $10\%\sim 80\%$ である。幾つかの実施形態では、ステップ（c）直後の累積DNA濃度は、 $100\mu\text{g}/\text{mL}\sim 300\mu\text{g}/\text{mL}$ である。幾つかの実施形態では、治療用配列に隣接する第1または第2の切断部位は、AAAAまたはAACCを含む。

10

20

30

40

50

【0058】

別の態様では、治療用環状DNAベクターの大規模生成のための方法であって、（a）治療用配列及び骨格配列を含むテンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の試料を提供すること；（b）ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して、少なくとも 1.0 リットル（例えば、少なくとも 2.0 リットル、少なくとも 5.0 リットル、少なくとも 10 リットル、少なくとも 20 リットル、少なくとも 50 リットル、少なくとも 100 リットル、少なくとも 150 リットル、または少なくとも 200 リットル）の反応容量で当該テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させること；（c）当該直鎖状コンカテマーの単位毎に少なくとも第1の部位、第2の部位、及び第3の部位を切断する1種以上の制限酵素で当該直鎖状コンカテマーを消化することであって、（i）当該第1及び第2の部位が当該治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、（ii）当該第3の部位が当該骨格配列内に存在し、当該第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、当該治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が当該骨格配列の一部を含む少なくとも2つの直鎖状骨格断片が生成される、当該消化すること；ならびに（d）当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状DNAベクターを生成させることを含む方法が提供される。

【0059】

幾つかの実施形態では、ステップ（a）において提供されるテンプレートDNAベクターの量は、少なくとも 0.5mg 、少なくとも 0.75mg 、または少なくとも 1.0mg （例えば、 $1.0\text{mg}\sim 10\text{mg}$ 、 $2.0\text{mg}\sim 10\text{mg}$ 、 $3.0\text{mg}\sim 10\text{mg}$ 、 $4.0\text{mg}\sim 10\text{mg}$ 、または $5.0\text{mg}\sim 10\text{mg}$ ；例えば、 $1.0\text{mg}\sim 2.5\text{mg}$ 、 $2.5\text{mg}\sim 5.0\text{mg}$ 、 $5.0\text{mg}\sim 7.5\text{mg}$ 、または $7.5\text{mg}\sim 10\text{mg}$ ）である。幾つかの実施形態では、ステップ（a）において提供されるテンプレートDNAベクターの量は、少なくとも 5.0mg である。例えば、幾つかの実施形態では、ステップ（a）において提供されるテンプレートDNAベクターの量は、少なくとも 10.0mg である。

【0060】

幾つかの実施形態では、ステップ（b）により、少なくとも 100mg （例えば、 $100\text{mg}\sim 10\text{g}$ 、 $500\text{mg}\sim 5\text{g}$ 、または $1\text{g}\sim 3\text{g}$ ；例えば、少なくとも 200mg 、少なくとも 300mg 、少なくとも 400mg 、少なくとも 500mg 、少なくとも 1g 、少なくとも 2g 、または少なくとも 3g ；例えば、 $200\text{mg}\sim 10\text{g}$ 、 $300\text{mg}\sim 10\text{g}$ 、 $400\text{mg}\sim 10\text{g}$ 、 $500\text{mg}\sim 10\text{g}$ 、または $1\text{g}\sim 10\text{g}$ ）の直鎖状コンカテマーが生成される。幾つかの実施形態では、ステップ（b）により、 1 リットルの反応容量当たり $0.5\text{g}\sim 2\text{g}$ のDNA（例えば、 1 リットルの反応容量当たり約 1g の

DNA) を含有する溶液が生成される。

【0061】

幾つかの実施形態では、ステップ (d) により、少なくとも 1.0 mg (例えば、1.0 mg ~ 10 mg、2.0 mg ~ 10 mg、3.0 mg ~ 10 mg、4.0 mg ~ 10 mg、または 5.0 mg ~ 10 mg ; 例えば、1.0 mg ~ 2.5 mg、2.5 mg ~ 5.0 mg、5.0 mg ~ 7.5 mg、または 7.5 mg ~ 10 mg) の治療用環状 DNA ベクターが生成される。幾つかの実施形態では、ステップ (d) で生成される治療用環状 DNA の量は、(例えば、大規模生成におけるように) 少なくとも 2.0 mg である。例えば、幾つかの実施形態では、ステップ (d) で生成される治療用環状 DNA の量は、少なくとも 5.0 mg である。

10

【0062】

幾つかの実施形態では、ステップ (c) 及び (d) は、同時に行われる。幾つかの実施形態では、DNA 精製がステップ (b)、(c)、及び (d) の間、またはステップ (b) と (c) と (d) との間に実行されない。

【0063】

幾つかの実施形態では、ステップ (d) の溶液中の治療用環状 DNA の量は、ステップ (b) における直鎖状コンカテマーの量の少なくとも 2.0 重量% (例えば、ステップ (b) における直鎖状コンカテマーの量の少なくとも 3.0 重量%、少なくとも 4.0 重量%、少なくとも 5.0 重量%、少なくとも 6.0 重量%、少なくとも 7.0 %、少なくとも 8.0 重量%、少なくとも 9.0 重量%、少なくとも 10 重量%、少なくとも 20 重量%、少なくとも 30 重量%、少なくとも 40 重量%、または少なくとも 50 重量%) である。

20

【0064】

幾つかの実施形態では、ステップ (d) で生成される治療用環状 DNA の量は、ステップ (a) において提供されるテンプレート DNA ベクター (例えば、プラスミド DNA ベクター) の量の少なくとも 20 % (例えば、ステップ (a) において提供されるテンプレート DNA ベクター (例えば、プラスミド DNA ベクター) の量の少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 100 %、または少なくとも 150 % ; 例えば、ステップ (a) において提供されるテンプレート DNA ベクター (例えば、プラスミド DNA ベクター) の少なくとも 2 倍の量、少なくとも 3 倍の量、少なくとも 5 の倍量、少なくとも 10 倍の量、少なくとも 20 倍の量、少なくとも 30 倍の量、少なくとも 40 倍の量、少なくとも 50 倍の量、または少なくとも 100 倍の量) である。特定の実施形態では、ステップ (d) で生成される治療用環状 DNA の量は、ステップ (a) において提供されるテンプレート DNA ベクター (例えば、プラスミド DNA ベクター) の少なくとも 5 倍の量である。幾つかの実施形態では、ステップ (d) で生成される治療用環状 DNA の量は、ステップ (a) において提供されるテンプレート DNA ベクター (例えば、プラスミド DNA ベクター) の少なくとも 10 倍の量である。

30

【0065】

幾つかの実施形態では、ステップ (d) の開始時の DNA 濃度は、 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以上であるが、 $160 \mu\text{g} / \text{mL}$ 未満である。幾つかの実施形態では、ステップ (d) の開始時の DNA 濃度は、約 $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約 $80 \mu\text{g} / \text{mL}$ である。幾つかの実施形態では、ステップ (d) の開始時の DNA 濃度は、約 $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ である。幾つかの実施形態では、ステップ (d) の開始時の DNA 濃度は、約 $80 \mu\text{g} / \text{mL}$ である。幾つかの実施形態では、ステップ (d) におけるリガーゼ濃度 (例えば、T4 リガーゼ濃度) は、 $1 \mu\text{g}$ の DNA 当たり約 10 ~ 約 20 U のリガーゼである。幾つかの実施形態では、ステップ (d) の直後に温度上昇が実行されない。

40

【0066】

別の態様では、治療用環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、当該方法が、(a) DNA 分子を含む溶液を提供することであって、各 DNA 分子が骨格配列及び治療用配列を含む、当該提供すること ; (b) IIS 型制限酵素を当該溶液に添加して、当該 D

50

NA分子を消化し、これにより、当該骨格配列を当該治療用配列から分離すること；（c）リガーゼを当該溶液に添加して、（i）当該リガーゼ；（ii）当該IIS型制限酵素；（iii）各々が単一の治療用配列を含む治療用環状DNAベクターであって、各々がIIS型認識部位を欠く、当該治療用環状DNAベクター；及び（iv）副生成物を含む混合物中で反応を発生させることであって、各副生成物が1つ以上のIIS型制限部位を含み、当該治療用環状DNAベクター対1つ以上のIIS型制限部位を含む当該副生成物の比率が当該反応が進行するにつれて増加する、当該発生させることを含む、当該方法が提供される。幾つかの実施形態では、副生成物の一部または全てが、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の骨格配列を含む（例えば、IIS型制限部位を介して連結された2つ以上の骨格配列を有する環状DNA及び／またはIIS型制限部位を介して連結された2つ以上の骨格配列を有する直鎖状DNA）。幾つかの実施形態では、副生成物の一部または全てが、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の治療用配列を更に含む（例えば、IIS型制限部位を介して連結された2コピー以上の治療用配列を有する環状DNA及び／またはIIS型制限部位を介して連結された2コピー以上の治療用配列を有する直鎖状DNA）。幾つかの実施形態では、副生成物の一部または全てが環状である。幾つかの実施形態では、（a）のDNA分子は、コンカテマーである。

10

【0067】

幾つかの実施形態では、本方法は、ステップ（a）の前にローリングサークル増幅を使用してテンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）を増幅して、コンカテマーを生成させることを更に含む。

20

【0068】

幾つかの実施形態では、IIS型制限酵素は、BsaIである。

【0069】

幾つかの実施形態では、制限酵素不活性化ステップは、ステップ（c）に先行しない。幾つかの実施形態では、ステップ（b）と（c）との間に温度上昇が実行されない。幾つかの実施形態では、本方法は、治療用環状DNAベクターを含有する溶液の温度を約65℃まで上昇させることを更に含む。幾つかの実施形態では、本方法は、（d）治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む。幾つかの実施形態では、ステップ（d）は、約37℃で実行される。幾つかの実施形態では、本方法は、（e）直鎖状副生成物をエキソヌクレアーゼと接触させることを追加的または代替的に含む。幾つかの実施形態では、ステップ（e）は、約37℃で実行される。

30

【0070】

幾つかの実施形態では、本方法は、（d）治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させること、及び（e）直鎖状副生成物をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む、ここで、酵素不活性化ステップがステップ（d）と（e）との間に実行されない。幾つかの実施形態では、ステップ（d）は、ステップ（e）の前に行われる。

【0071】

幾つかの実施形態では、制限酵素は、約0.5U/μg～約20U/μg、例えば、約1U/μg DNA～約10U/μg DNA、例えば、約2U/μg DNA～約5U/μg DNA、例えば、約2.5U/μg DNAの濃度で提供される。例えば、制限酵素は、約0.5U/μg DNA、1.0U/μg DNA、1.5U/μg DNA、2.0U/μg DNA、2.5U/μg DNA、3.0U/μg DNA、3.5U/μg DNA、4.0U/μg DNA、4.5U/μg DNA、5.0U/μg DNA、5.5U/μg DNA、6.0U/μg DNA、6.5U/μg DNA、7.0U/μg DNA、7.5U/μg DNA、8.0U/μg DNA、8.5U/μg DNA、9.0U/μg DNA、9.5U/μg DNA、10.0U/μg DNA、11U/μg DNA、12U/μg DNA、13U/μg DNA、14U/μg DNA、15U/μg DNA、16U/μg DNA、17U/μg DNA、18U/μg DNA、19U/μg DNA、または20U/μg DNAの濃度で

40

50

提供され得る。幾つかの実施形態では、制限酵素は、約 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ の濃度で提供される。幾つかの実施形態では、制限酵素は、約 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ ~ 約 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ の濃度で提供される。

【0072】

幾つかの実施形態では、消化（例えば、ステップ（b））は、1~12時間、例えば、約1時間のインキュベーションを含む。

【0073】

幾つかの実施形態では、リガーゼは、 $1 \mu\text{g}$ のDNA当たり $50 \text{ U} (\text{U} / \mu\text{g})$ 以下（例えば、 $40 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $30 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $25 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $15 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $4 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $3 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $1.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、または $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下；例えば、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA；例えば、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $30 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $0.2 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $15 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $12 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、または $1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA；例えば、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $3.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $3.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $4.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $4.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $5.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $5.0 \sim 6.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $6.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $7.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $7.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $8.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $8.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $9.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $9.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $11 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $11 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $12 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $12 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $15 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $15 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $25 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $25 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $30 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $30 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $35 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $35 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $40 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、または $40 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $50 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA）のリガーゼの濃度で提供される。幾つかの実施形態では、リガーゼは、 $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、例えば、約 $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNAの濃度で提供される。幾つかの実施形態では、リガーゼは、T4リガーゼである。

【0074】

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、 $1 \mu\text{g}$ のDNA当たり $10 \text{ U} (\text{U} / \mu\text{g})$ 以下（例えば、 $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $4 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $3 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $2.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、 $1.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下、または $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA以下；例えば、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、例えば、 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $8 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、または $1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA；例えば、 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $1.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $2.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $3.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $3.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $4.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $4.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $5.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $5.0 \sim 6.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $6.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $7.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $7.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $8.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、 $8.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $9.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA、または $9.0 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA~ $10 \text{ U} / \mu\text{g}$ DNA）のトポイソメラーゼの濃度で提供される。

【0075】

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、II型トポイソメラーゼである。幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、ギラーゼである。幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、トポイソメラーゼIVである。

【0076】

幾つかの実施形態では、エキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ、例え

10

20

30

40

50

ば、T5エキソヌクレアーゼ)は、約0.5 U/μg~約20 U/μg、例えば、約0.5 U/μg~約10 U/μg、例えば、約1 U/μg~約10 U/μg、例えば、約2 U/μg~約5 U/μg、例えば、約2.5 U/μg濃度で提供される。例えば、エキソヌクレアーゼ(例えば、末端エキソヌクレアーゼ)は、約0.5 U/μg、1.0 U/μg、1.5 U/μg、2.0 U/μg、2.5 U/μg、3.0 U/μg、3.5 U/μg、4.0 U/μg、4.5 U/μg、5.0 U/μg、5.5 U/μg、6.0 U/μg、6.5 U/μg、7.0 U/μg、7.5 U/μg、8.0 U/μg、8.5 U/μg、9.0 U/μg、9.5 U/μg、10.0 U/μg、11 U/μg、12 U/μg、13 U/μg、14 U/μg、15 U/μg、16 U/μg、17 U/μg、18 U/μg、19 U/μg、または20 U/μgの濃度で提供され得る。

10

【0077】

幾つかの実施形態では、ステップ(e)は、2回以上(例えば、2回、3回、または4回)実行される。幾つかの実施形態では、ステップ(e)は、1時間~12時間のインキュベーションを含む。幾つかの実施形態では、エキソヌクレアーゼは、末端エキソヌクレアーゼ(例えば、T5エキソヌクレアーゼ)である。

【0078】

上記の方法のいずれかの幾つかの実施形態では、本発明の方法は、(f)治療用環状DNAベクターをカラム(例えば、捕捉カラムまたはアニオン交換カラム)に通すこと、及び/または(g)治療用環状DNAベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む。

20

【0079】

幾つかの実施形態では、増幅は、部位特異的プライマーを使用して実行される。他の実施形態では、増幅は、ランダムプライマーを使用して実行される。

【0080】

幾つかの実施形態では、ステップ(c)の前に中間ゲル抽出ステップが実行されない。幾つかの実施形態では、ステップ(c)の前に中間DNA精製が実行されない。

【0081】

幾つかの実施形態では、ステップ(c)の溶液中の治療用環状DNAの量は、ステップ(a)におけるDNA分子の量の少なくとも2.0重量%(例えば、ステップ(a)におけるDNA分子の少なくとも3.0重量%、少なくとも4.0重量%、少なくとも5.0重量%、少なくとも6.0重量%、少なくとも7.0重量%、少なくとも8.0重量%、少なくとも9.0重量%、少なくとも10重量%、少なくとも20重量%、少なくとも30重量%、少なくとも40重量%、または少なくとも50重量%)である。

30

【0082】

幾つかの実施形態では、ステップ(c)で生成される治療用環状DNAの量は、少なくとも1.0 mg(例えば、1.0 mg~10 mg、2.0 mg~10 mg、3.0 mg~10 mg、4.0 mg~10 mg、または5.0 mg~10 mg;例えば、1.0 mg~2.5 mg、2.5 mg~5.0 mg、5.0 mg~7.5 mg、または7.5 mg~10 mg)である。幾つかの実施形態では、ステップ(c)で生成される治療用環状DNAの量は、(例えば、大規模生成におけるように)少なくとも2.0 mgである。例えば、幾つかの実施形態では、ステップ(c)で生成される治療用環状DNAの量は、少なくとも5.0 mgである。

40

【0083】

幾つかの実施形態では、ステップ(c)後の溶液中の治療用環状DNAの濃度は、何らの精製または濃縮も実行されることなく1.0 μg/mL~1.0 mg/mL(例えば、何らの精製または濃縮も実行されることなく5.0 μg/mL~100 μg/mLまたは10 μg/mL~50 μg/mL、例えば、何らの精製または濃縮も実行されることなく1.0 μg/mL~10 μg/mL、5.0 μg/mL~10 μg/mL、10 μg/mL~50 μg/mL、50 μg/mL~100 μg/mL、またはそれ以上)である。幾つかの実施形態では、ステップ(c)の溶液の容量は、少なくとも5リットル(例えば、

50

５リットル～２００リットル、例えば、７リットル～１００リットル、１０リットル～８０リットル、１５リットル～７５リットル、または２０リットル～７０リットル、例えば、少なくとも１．０リットル、少なくとも２．０リットル、少なくとも５．０リットル、少なくとも１０リットル、少なくとも２０リットル、少なくとも５０リットル、または少なくとも１００リットル）である。

【００８４】

幾つかの実施形態では、ステップ（ｂ）及び（ｃ）は、少なくとも０．５リットル（例えば、少なくとも１．０リットル、少なくとも２．０リットル、少なくとも５．０リットル、少なくとも１０リットル、少なくとも２０リットル、少なくとも５０リットル、少なくとも１００リットル、少なくとも１５０リットル、または少なくとも２００リットル）の容量を有する反応容器で実行される。幾つかの実施形態では、ステップ（ｂ）及び（ｃ）は、少なくとも５リットル（例えば、５リットル～２００リットル、例えば、７リットル～１００リットル、１０リットル～８０リットル、１５リットル～７５リットル、または２０リットル～７０リットル、例えば、少なくとも１．０リットル、少なくとも２．０リットル、少なくとも５．０リットル、少なくとも１０リットル、少なくとも２０リットル、少なくとも５０リットル、または少なくとも１００リットル）の容量を有する反応容器で実行される。

【００８５】

別の態様では、治療用環状ＤＮＡベクターを生成させる方法であって、当該方法が、（ａ）複数の直鎖状治療用ＤＮＡ断片及び複数の直鎖状骨格ＤＮＡ断片を含むＤＮＡの混合物を提供することであって、各直鎖状治療用ＤＮＡ断片が治療用配列及び自己相補的末端を含み、当該複数の直鎖状治療用ＤＮＡ断片及び直鎖状骨格ＤＮＡ断片が $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $160\mu\text{g}/\text{mL}$ の累積ＤＮＡ濃度である、当該提供すること；ならびに（ｂ）ＤＮＡの混合物を $1\mu\text{g}$ のＤＮＡ当たり $10\sim20\text{U}$ のリガーゼの濃度でリガーゼと接触させることによりライゲーション反応を実行して、治療用環状ＤＮＡベクターを生成させることを含む、当該方法が提供される。幾つかの実施形態では、ＤＮＡの混合物は、ＩＩＳ型制限消化反応により生成され、ここで、ＩＩＳ型制限酵素は、直鎖状治療用ＤＮＡ断片を直鎖状骨格ＤＮＡ断片から切り離し、自己相補的末端は、ＩＩＳ型オーバーハングである。

【００８６】

別の態様では、治療用環状ＤＮＡベクターを生成させる方法であって、当該方法が、（ａ）複数の直鎖状治療用ＤＮＡ断片及び複数の直鎖状骨格ＤＮＡ断片を含むＤＮＡの混合物をＩＩＳ型制限消化反応により生成させることであって、ＩＩＳ型制限酵素が当該直鎖状治療用ＤＮＡ断片を当該直鎖状骨格ＤＮＡ断片から切り離し、各直鎖状治療用ＤＮＡ断片が治療用配列及び自己相補的ＩＩＳ型オーバーハングを含み、当該複数の直鎖状治療用ＤＮＡ断片及び直鎖状骨格ＤＮＡ断片が $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $160\mu\text{g}/\text{mL}$ の累積ＤＮＡ濃度である、当該生成させること；ならびに（ｂ）ＤＮＡの混合物を $1\mu\text{g}$ のＤＮＡ当たり $10\sim20\text{U}$ のリガーゼの濃度でリガーゼと接触させることによりライゲーション反応を実行して、治療用環状ＤＮＡベクターを生成させることを含む、当該方法が提供される。

【００８７】

直前の２つの態様のいずれかの幾つかの実施形態では、ステップ（ａ）の累積ＤＮＡ濃度は、ＩＩＳ型制限消化の直後に累積ＤＮＡ濃度を調整する（例えば、希釈すること）ことにより達成される。幾つかの実施形態では、ステップ（ａ）の累積ＤＮＡ濃度を達成するために、ＩＩＳ型制限消化の直後に累積ＤＮＡ濃度が希釈される。幾つかの実施形態では、ＩＩＳ型制限消化直後の累積ＤＮＡ濃度は、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $300\mu\text{g}/\text{mL}$ である。幾つかの実施形態では、ステップ（ａ）の累積ＤＮＡ濃度は、ＩＩＳ型制限消化直後の累積ＤＮＡ濃度の約１０％～約８０％まで希釈される。幾つかの実施形態では、ステップ（ａ）の累積ＤＮＡ濃度は、約 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ である。幾つかの実施形態では、ＩＩＳ型制限消化反応におけるＩＩＳ型制限酵素は、 $1\mu\text{g}$ のＤＮＡ当たり約０．５～約２．５Ｕの濃度である。幾つかの実施形態では、リガーゼ（例えば、Ｔ４

リガーゼ)は、約10 U / μ gの濃度である。幾つかの実施形態では、ライゲーション反応は、少なくとも5時間、例えば、18~24時間実行される。

【0088】

幾つかの実施形態では、IIS型制限消化反応におけるIIS型制限酵素(例えば、BsaI)は、1 μ gのDNA当たり約0.5~約2.5 Uの濃度である。幾つかの実施形態では、IIS型制限消化反応は、2時間以下、例えば、10分~1時間実行される。

【0089】

幾つかの実施形態では、IIS型オーバーハングは、それぞれ4個の塩基を含む。幾つかの実施形態では、4個の塩基のうちの2個のみがAまたはTである。幾つかの実施形態では、IIS型オーバーハングは、AAAAまたはAACCCを含む。

【0090】

幾つかの実施形態では、本方法は、(c)治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼもしくはヘリカーゼと接触させること、及び/または(d)直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む。

【0091】

幾つかの実施形態では、本方法は、(c)治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させること、及び(d)直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼ(例えば、末端エキソヌクレアーゼ)と接触させることを更に含む。幾つかの実施形態では、酵素不活性化ステップがステップ(c)と(d)との間に実行されない。幾つかの実施形態では、ステップ(c)は、ステップ(d)の前に行われる。他の実施形態では、ステップ(d)は、ステップ(c)の前に行われる。

【0092】

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼ(例えば、ギラーゼ)は、1 μ gのDNA当たり10 U (U / μ g)以下のトポイソメラーゼの濃度で提供される。幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、II型トポイソメラーゼである。幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、ギラーゼまたはトポイソメラーゼIVである。

【0093】

幾つかの実施形態では、エキソヌクレアーゼ(例えば、T5エキソヌクレアーゼ)は、約0.5 U / μ g~約20 U / μ gの濃度で提供される。幾つかの実施形態では、ステップ(d)は、2回以上実行される。幾つかの実施形態では、ステップ(d)は、1時間~18時間のインキュベーションを含む。幾つかの実施形態では、ステップ(d)は、3~18時間のインキュベーションを含む。

【0094】

幾つかの実施形態では、本方法は、(e)治療用環状DNAベクターをカラムに通すこと、及び/または(f)治療用環状DNAベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む。

【0095】

幾つかの実施形態では、ステップ(b)で生成される治療用環状DNAの量は、少なくとも1.0 mgである。幾つかの実施形態では、ステップ(b)後の溶液中の治療用環状DNAの濃度は、何らの精製または濃縮も実行されることなく少なくとも5 μ g / mLである。幾つかの実施形態では、ステップ(d)の溶液の容量は、少なくとも5リットルである。幾つかの実施形態では、ステップ(b)は、少なくとも1リットルの容量を有する反応容器で実行される。

【0096】

幾つかの実施形態では、DNAの混合物は、インビトロ増幅の生成物である。

【0097】

幾つかの実施形態では、インビトロ増幅は、ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅である。

【0098】

幾つかの実施形態では、本方法は、ゲル抽出ステップを含まない。

10

20

30

40

50

【0099】

幾つかの実施形態では、DNA混合物は、1種のみ直鎖状骨格DNA断片を含む（例えば、制限消化により、プラスミドの骨格を有する単一の断片が生成される）。

【0100】

別の態様では、治療用環状スーパーコイルDNAベクターを生成させる方法であって、（a）弛緩した環状型の治療用環状DNAベクターを含む試料を提供することであって、ここで、当該治療用環状DNAベクターが治療用配列を含む、当該提供すること；（b）当該試料をギラーゼと接触させることであって、ここで、当該ギラーゼの濃度が1mgの治療用環状DNAベクター当たり約1.5Uであり、これにより、治療用スーパーコイル環状DNAベクターの組成物を生成させる、当該接触させることを含む、当該方法が提供される。幾つかの実施形態では、（a）の試料は、直鎖状DNA副生成物を更に含み、ここで、本方法は、（b）の後に、直鎖状DNA副生成物を消化するのに適した条件下で治療用スーパーコイル環状DNAベクターの組成物をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む。

10

【0101】

別の態様では、本発明は、治療用スーパーコイル環状DNAベクターを生成させる方法であって、当該方法が、（a）弛緩した環状型の治療用環状DNAベクター及び直鎖状DNA副生成物を含む試料を提供することであって、当該治療用環状DNAベクターが治療用配列を含む、当該提供すること；（b）当該直鎖状DNA副生成物を消化するのに適した条件下で当該試料をエキソヌクレアーゼと接触させて、消化された試料を形成すること；ならびに（c）消化された試料をギラーゼと接触させることであって、当該ギラーゼの濃度が、1mgの治療用環状DNAベクター当たり0.1U超であり、かつ1mgの治療用環状DNAベクター当たり1.5U未満であり、これにより、治療用スーパーコイル環状DNAベクターを生成させる、当該接触させることを含む、当該方法を含む。

20

【0102】

上記の態様のいずれかの幾つかの実施形態では、エキソヌクレアーゼはT5エキソヌクレアーゼであり、及び／またはリガーゼはT4リガーゼである。幾つかの実施形態では、本方法は、ステップ（a）の前に、直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、治療用環状DNAベクターを生成させることを含む。幾つかの実施形態では、本方法は、直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させる前に、治療用配列を含む直鎖状コンカテマーを制限酵素で消化して、直鎖状コンカテマーの単位毎に第1の部位及び第2の部位を切断することであって、当該第1及び第2の部位が当該治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状DNA副生成物が生成される、当該切断することを含む。幾つかの実施形態では、治療用スーパーコイル環状DNAベクターが治療用環状DNAベクターの組成物中に存在し、ここで、治療用環状DNAベクターの少なくとも70%がスーパーコイルを形成している（例えば、治療用環状DNAベクターの少なくとも80%がスーパーコイルを形成している）。

30

【0103】

上記の態様のいずれかの幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、医薬組成物として製剤化される。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、治療用環状DNAベクターの量に対して1.0重量%以下（例えば、0.5重量%以下）の残存タンパク質または骨格配列を含む。幾つかの実施形態では、治療用配列は、5kb超である。幾つかの実施形態では、治療用配列は、5kb～15kbである。幾つかの実施形態では、治療用配列は、5kb～10kbである。幾つかの実施形態では、治療用配列は、10kb～15kbである。幾つかの実施形態では、治療用配列は、2つ以上の転写単位を含む。幾つかの実施形態では、治療用配列は、1種以上の治療用タンパク質をコードする。幾つかの実施形態では、1種以上の治療用タンパク質は、多量体タンパク質である。幾つかの実施形態では、治療用配列は、治療用核酸をコードする。幾つかの実施形態では、治療用核酸は、RNA分子である。幾つかの実施形態では、RNA分子は、自己複製RNA分子、短鎖ヘアピンRNA、またはマイクロRNAである。

40

50

【0104】

上記の態様のいずれかの幾つかの実施形態では、本発明の方法は、治療用環状DNAベクターを薬学的に許容される担体中に製剤化して、医薬組成物を生成させることを更に含む。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体中に少なくとも1.0mgの治療用環状DNAベクターを含む。幾つかの実施形態では、医薬組成物中の治療用環状DNAベクターは、（例えば、ゲル電気泳動のデンストメトリー分析により）少なくとも70%がスーパーコイル単量体である。幾つかの実施形態では、医薬組成物中の治療用環状DNAベクターは、（例えば、ゲル電気泳動のデンストメトリー分析により）少なくとも80%がスーパーコイル単量体である。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、1.0質量%未満のタンパク質含有量、1.0質量%未満のRNA含有量、及び0.5 EU/mg未満のエンドトキシンを含む。

10

【0105】

別の態様では、上記の態様のいずれかの先行実施形態のいずれかの方法により生成される組成物（例えば、医薬組成物）が本明細書において提供される。

【0106】

別の態様では、個体において治療用配列を発現させる方法であって、上記の態様のいずれかの先行実施形態のいずれかの方法により生成される医薬組成物を個体に投与することを含む、当該方法が本明細書において提供される。本明細書に記載される治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物のいずれかの治療用配列は、インビボでの電氣的導入により皮膚、骨格筋、腫瘍（例えば、黒色腫が含まれる）、眼、または肺で発現され得る。

20

【0107】

別の態様では、疾患または障害を処置する必要がある個体の疾患または障害を処置する方法であって、上記の態様のいずれかの先行実施形態のいずれかの方法により生成される医薬組成物を当該個体に投与することを含む、当該方法が本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、本方法は、個体の皮膚、骨格筋、腫瘍（例えば、黒色腫が含まれる）、眼、または肺への治療用環状DNAベクターのインビボでの電氣的導入を含む。

【0108】

別の態様では、3'末端及び5'末端を有する治療用配列を含む治療用環状DNAベクターであって、当該治療用配列の3'末端が、少なくとも2個の連続するアデニン（A）を含む4塩基対の配列により当該治療用配列の5'末端に連結されている、当該治療用環状DNAベクターが提供される。幾つかの実施形態では、4塩基対の配列は、AAAAからなる。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、配列番号1に対する85%の配列同一性を有する核酸配列を含む（例えば、からなる）。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、配列番号1を含む。幾つかの実施形態では、4塩基対の配列の2個のみの連続する塩基は、AAである。幾つかの実施形態では、4塩基対の配列は、AACCからなる。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、配列番号3に対する少なくとも85%の配列同一性（例えば、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性）を有する核酸配列を含む。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、配列番号3を含むか、またはそれからなる。

30

40

【0109】

別の態様では、本発明は、直前の態様の治療用環状DNAベクターを含む医薬組成物を提供する。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体中に少なくとも1.0mgの治療用環状DNAベクターを含む。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、少なくとも70%がスーパーコイル単量体である。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、1.0%以下の残存タンパク質または骨格配列を含む。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、1.0質量%未満のタンパク質含有量、1.0質量%未満のRNA含有量、及び5 EU/mg未満のエンドトキシンを含む。

【0110】

50

別の態様では、本発明は、個体（例えば、ヒト）において治療用配列を発現させる方法であって、直前の態様の任意の実施形態の医薬組成物を当該個体に投与することを含む、当該方法を含む。幾つかの実施形態では、本方法は、インビボでの電氣的導入により治療用環状DNAベクターを個体の眼に送達することを含む。

【0111】

別の態様では、本発明は、眼疾患または障害を処置する必要がある個体（例えば、ヒト）の眼疾患または障害を処置する方法であって、直前の態様の任意の実施形態の医薬組成物を当該個体に投与することを含む、当該方法を含む。幾つかの実施形態では、本方法は、インビボでの電氣的導入により治療用環状DNAベクターを個体の眼に送達することを含む。別の態様では、本明細書に記載される（または本明細書に記載される方法により生成される）治療用環状DNAベクターまたはその組成物（例えば、医薬組成物）のいずれか、及びエレクトロポレーション（例えば、インビトロまたはエクスピボでのエレクトロポレーション）または電氣的導入（例えば、インビボでの電氣的導入）を使用して細胞または細胞の培養物において治療用環状DNAベクターを発現させるための使用説明書を含むキットが本明細書において提供される。

10

【0112】

別の態様では、本明細書に記載される（または本明細書に記載される方法により生成される）治療用環状DNAベクターのいずれかを発現する細胞（例えば、哺乳動物細胞）が本明細書において提供される。幾つかの実施形態では、細胞は、エレクトロポレーション（例えば、インビトロまたはエクスピボでのエレクトロポレーション）によりベクターを電氣的に遺伝子導入されている。

20

【図面の簡単な説明】

【0113】

【図1】A～Eは、2種の制限酵素がc3DNAを生成させる無細胞プロセスに使用される、本明細書に記載される一連の反応ステップを示す模式図を示す。Aは、治療用配列（塗りつぶし）及び骨格配列（斜線塗り）を有するプラスミドDNAベクターを示す。骨格配列は、配列内に2つのPvuII制限部位を有する。2つのEcoRI制限部位は、骨格配列及び治療用配列に隣接する。Bは、プラスミドDNAベクターまたはその増幅されたコンカテマーのEcoRIによる反応の産物を示す。プラスミドDNAまたは直鎖状コンカテマーの各単位に対して直鎖状治療用断片（塗りつぶし）及び直鎖状骨格断片（斜線塗り）が生成される。Cは、直鎖状断片のリガーゼによる反応の環状化産物、すなわち、治療用環状DNAベクター及び環状化した骨格を示す。Dは、Cの環状化産物のPvuIIによる産物を示す。環状化した骨格は直鎖化され、その後エキソヌクレアーゼにより消化可能である。Eは、治療用環状DNAベクターのギラーゼなどのトポイソメラーゼによる反応により得られる治療用スーパーコイル環状DNAベクターを示す。

30

【図2A】プラスミドDNAベクター内の2つの部位を切断するBsaIを使用してプラスミドDNAベクターから骨格を除去するプロセスを示すマップを示す。治療用配列（「C3領域」；そのヌクレオチド塩基は図2Bにおいて例示のためにNとして示される）及び骨格配列（複製起点及び2つのBsaI認識部位を含み、BsaI認識部位は対応するBsaIオーバーハング（切断部位）と比較して治療用配列から遠位に存在する）を含むプラスミドDNAベクターを示す。

40

【図2B】プラスミドDNAベクター内の2つの部位を切断するBsaIを使用してプラスミドDNAベクターから骨格を除去するプロセスを示すマップを示す。図2Aに対応する直鎖状配列を示す。

【図2C】プラスミドDNAベクター内の2つの部位を切断するBsaIを使用してプラスミドDNAベクターから骨格を除去するプロセスを示すマップを示す。図2Aのプラスミドから生じる治療用環状DNAベクターを示す。治療用環状DNAは複製起点を含まず、4塩基対のBsaIオーバーハングのみが残存する。

【図2D】プラスミドDNAベクター内の2つの部位を切断するBsaIを使用してプラスミドDNAベクターから骨格を除去するプロセスを示すマップを示す。図2Cに対応す

50

る直鎖状配列を示す。

【図 2 E】プラスミド DNA ベクター内の 2 つの部位を切断する B s a I を使用してプラスミド DNA ベクターから骨格を除去するプロセスを示すマップを示す。B s a I 切断部位（オーバーハング）により隔てられた B s a I 認識部位を含む、図 2 A のプラスミドから生じる環状化した骨格を示す。

【図 2 F】プラスミド DNA ベクター内の 2 つの部位を切断する B s a I を使用してプラスミド DNA ベクターから骨格を除去するプロセスを示すマップを示す。図 2 F に対応する直鎖状配列を示す。

【図 3】A ~ D は、単一の制限酵素が c 3 DNA を生成させる無細胞プロセスに使用される、本明細書に記載される一連の反応ステップを示す模式図を示す。A は、治療用配列（塗りつぶし）及び骨格配列（斜線塗り）を有するプラスミド DNA ベクターを示す。プラスミド DNA ベクターは 4 つの B s a I 制限部位を含み、2 つが骨格配列内に存在し、2 つが骨格配列及び治療用配列に隣接する。B は、プラスミド DNA ベクターまたはその増幅されたコンカテマーの B s a I による反応の産物を示す。プラスミド DNA または直鎖状コンカテマーの各単位に対して直鎖状治療用断片（塗りつぶし）及び 3 つの直鎖状骨格断片（斜線塗り）が生成される。C は、直鎖状断片のリガーゼによる反応の産物、すなわち、治療用環状 DNA ベクター及びエキソヌクレアーゼにより消化可能である直鎖状骨格断片を示す。D は、治療用環状 DNA ベクターのギラーゼなどのトポイソメラーゼによる反応により得られる治療用スーパーコイル環状 DNA ベクターを示す。

【図 4】A ~ C は、本明細書に記載される方法を使用して生成される 3 つの DNA ベクターを示す図を示す。A は、5' → 3' 方向に配置された CMV プロモーター（ P_{MV} ）、コード配列、及びポリ A 尾部を有する単一転写単位（TU）の DNA ベクター（1103）である。B は、5' → 3' 方向に配置された、第 1 のプロモーター、第 1 のコード配列、及び第 1 のポリ A 尾部を有する第 1 の TU；第 2 のプロモーター、第 2 のコード配列、及び第 2 のポリ A 尾部を有する第 2 の TU；第 3 のプロモーター、第 3 のコード配列、及び第 3 のポリ A 尾部を有する第 3 の TU；ならびに第 4 のプロモーター、第 4 のコード配列、及び第 4 のポリ A 尾部を有する第 4 の TU を有する複合 TU の DNA ベクター（1147）である。C は、単一プロモーター制御下の 3 つのコード配列に続いてポリ A 尾部を有する単一 TU の DNA ベクター（1258）である。

【図 5 A】消化後の DNA 断片に対応するバンドを示す電気泳動ゲルの写真を示す。それぞれ消化後の実際のバンド及び理論的なバンドを示す。

【図 5 B】消化後の DNA 断片に対応するバンドを示す電気泳動ゲルの写真を示す。それぞれ消化後の実際のバンド及び理論的なバンドを示す。

【図 5 C】消化後の DNA 断片に対応するバンドを示す電気泳動ゲルの写真を示す。ライゲーション後のバンドパターンを示す。

【図 5 D】消化後の DNA 断片に対応するバンドを示す電気泳動ゲルの写真を示す。エキソヌクレアーゼ消化後のバンドパターンを示す。

【図 6 A】本明細書に記載される反応ステップのプロセスの 2 つの変形形態を示す模式図を示す。最初の B s a I 消化の後にライゲーション前の熱不活性化が続くプロセス（条件 1）を示す。

【図 6 B】本明細書に記載される反応ステップのプロセスの 2 つの変形形態を示す模式図を示す。B s a I 消化をライゲーションと組み合わせた合理化されたプロセス（条件 2）を示す。

【図 7 A】プラスミド DNA ベクター内の 5 つの部位を切断する B s a I を使用してプラスミド DNA ベクターから骨格を除去するプロセスを示すマップを示す。治療用配列（C3 領域；そのヌクレオチド塩基は図 7 B において例示のために N として示される）及び骨格配列（複製起点及び耐性遺伝子を含む）を含むプラスミド DNA ベクターを示す。

【図 7 B】プラスミド DNA ベクター内の 5 つの部位を切断する B s a I を使用してプラスミド DNA ベクターから骨格を除去するプロセスを示すマップを示す。図 7 A に対応する直鎖状配列を示す。

【図 8】 A 及び B は、図 4 A ～ 4 C に示す 3 つの構築物のエキソヌクレアーゼ消化後の理論的なバンド（A）または実際のバンド（B）を示すゲルを示す。レーン 1 ～ 3 は条件 1 による生成物を含み、一方でレーン 4 ～ 6 は条件 2 による生成物を含む。レーン 1 及び 4 は構築物 1 1 0 3（1 4 3 1 b p）を含み、レーン 2 及び 5 は構築物 1 1 4 7（6 2 9 3 b p）を含み、レーン 3 及び 6 は構築物 1 2 5 8（5 0 6 5 b p）を含む。

【図 9】 T 5 エキソヌクレアーゼ消化後の 1 2 . 7 5 k b の C 3 D N A 構築物の回収を示す電気泳動ゲルの写真を示す。

【図 1 0】 レポーター遺伝子配列を含む直鎖状断片がセルフライゲーションして、閉じた環状 D N A ベクターを形成したライゲーション反応を示す電気泳動ゲルの写真を示す。

【図 1 1】 レポーター遺伝子配列を含む直鎖状断片がセルフライゲーションして、閉じた環状 D N A ベクターを形成したライゲーション反応を示す電気泳動ゲルの写真である。レーン 1 ～ 3 は、それぞれ 1 0 0 U / μ g のリガーゼ、2 0 U / μ g のリガーゼ、及び 5 U / μ g のリガーゼで処理された 2 0 μ g / m L の D N A を示す。レーン 4 ～ 6 は、それぞれ 1 0 0 U / μ g のリガーゼ、2 0 U / μ g のリガーゼ、及び 5 U / μ g のリガーゼで処理された 4 0 μ g / m L の D N A を示す。レーン 7 ～ 9 は、それぞれ 1 0 0 U / μ g のリガーゼ、2 0 U / μ g のリガーゼ、及び 5 U / μ g のリガーゼで処理された 1 0 0 μ g / m L の D N A を示す。

【図 1 2】 0 時間（レーン 2）から 2 時間（レーン 6）または一晩（レーン 1 1）までの T 5 エキソヌクレアーゼ消化の経時変化の結果を示すゲルの写真である。

【図 1 3】 様々なリガーゼ酵素及びライゲーション時の D N A 濃度でのライゲーション後の C ³ D N A のバンド形成プロファイルを示す電気泳動ゲルの写真を示す。黒色のボックスは、目的の C ³ D N A ベクターのバンドを特定する。レーンの番号付けは、表 3 において特定される試料番号に対応する。

【図 1 4】 T 4 リガーゼによる様々な時間のライゲーション後の C ³ D N A のバンド形成プロファイルを示す電気泳動ゲルの写真である。白色のボックスは、目的の C ³ D N A バンドを示す。レーン 1 は、B s a I 処理後の対照試料であり、レーン 2 ～ 5 は、t = 0（レーン 2）、t = 2 時間（レーン 3）、t = 5 時間（レーン 4）、t = 2 1 . 5 時間（レーン 5）での表 3 の試料 1 を示し、レーン 6 ～ 9 は、t = 0（レーン 6）、t = 2 時間（レーン 7）、t = 5 時間（レーン 8）、t = 2 1 . 5 時間（レーン 9）での表 3 の試料 2 を示し、レーン 1 0 ～ 1 3 は、t = 0（レーン 1 0）、t = 2 時間（レーン 1 1）、t = 5 時間（レーン 1 2）、t = 2 1 . 5 時間（レーン 1 3）での表 3 の試料 2 を示す。

【図 1 5】 T 3 リガーゼ（レーン 2 ～ 9）及び T 7 リガーゼ（レーン 1 0 ～ 1 7）による様々な時間のライゲーション後の C ³ D N A のバンド形成プロファイルを示す電気泳動ゲルの写真である。白色のボックスは、目的の C ³ D N A バンドを示す。レーン 1 は、B s a I 処理後の対照試料であり、レーン 2 ～ 5 は、t = 0（レーン 2）、t = 2 時間（レーン 3）、t = 5 時間（レーン 4）、t = 2 1 . 5 時間（レーン 5）での表 3 の試料 4 を示し、レーン 6 ～ 9 は、t = 0（レーン 6）、t = 2 時間（レーン 7）、t = 5 時間（レーン 8）、t = 2 1 . 5 時間（レーン 9）での表 3 の試料 5 を示し、レーン 1 0 ～ 1 3 は、t = 0（レーン 1 0）、t = 2 時間（レーン 1 1）、t = 5 時間（レーン 1 2）、t = 2 1 . 5 時間（レーン 1 3）での表 3 の試料 6 を示し、レーン 1 4 ～ 1 7 は、t = 0（レーン 1 4）、t = 2 時間（レーン 1 5）、t = 5 時間（レーン 1 6）、t = 2 1 . 5 時間（レーン 1 7）での表 3 の試料 7 を示す。

【図 1 6】 表 3 の試料 1 ～ 7 でのライゲーション動態を直鎖状 D N A の経時的な減少として示すグラフを示す。

【図 1 7】 ライゲーション後かつ熱死滅前の様々な C ³ D N A 構築物調製物のバンド形成パターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。レーンは表 4 の試料番号に対応する。白色のボックスは、各構築物サイズでの目的の C ³ D N A 単量体バンドを示す。

【図 1 8】 A 及び B は、ギラーゼ処理によるスーパーコイル形成後の様々な C ³ D N A 構築物調製物のバンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真である。レーンは表 4 の試料番号に対応する。白色のボックスは、各構築物サイズでの目的の C ³ D N A 単量体バンドを示す。

す。

【図 19】 A 及び B は、エキソヌクレアーゼ消化後の様々な C^3DNA 構築物調製物のバンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真である。レーンは表 4 の試料番号に対応する。白色のボックスは、各構築物サイズでの目的の C^3DNA 単量体バンドを示す。

【図 20】 精製後の C^3DNA 構築物調製物の C^3DNA 単量体収量のグラフを示す定量化を示す。各試料における左側のバーは、熱死滅させた試料を示す。

【図 21】 表 6 において特定される条件下でスーパーコイル形成及びエキソヌクレアーゼ消化により生成された、下流のカラム精製前の C^3DNA のバンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真である。レーン番号は表 6 の試料番号に対応する。

【図 22】 図 21 に示す試料での C^3DNA 単量体収量の相対的定量化を示すグラフである。

【図 23】 $160\text{ }\mu\text{g/mL}$ の DNA 濃度の試料を除いて、表 6 において特定される条件下で下流の精製により生成された C^3DNA のバンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真である。

【図 24】 図 23 に示す試料での C^3DNA 単量体収量の相対的定量化を示すグラフである。

【図 25】 表 8 において特定される様々なギラーゼ濃度下で生成された C^3DNA のバンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。

【図 26】 異なる制限処理（オーバーハング配列及び切断部位の数）を使用して、様々な時間の $BsaI$ 消化ステップにより生成された異なるサイズの C^3DNA のバンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。試料番号を表 9 に示す。

【図 27】 A 及び B は、異なる制限処理（オーバーハング配列及び切断部位の数）を使用して、同じ実験の一部として実行された様々な時間のライゲーションステップにより生成された異なるサイズの C^3DNA のバンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。A は、1 時間、3 時間、及び 18 時間の時点を示す。B は、3 時間、18 時間、及び 24 時間の時点を示す。試料番号を表 9 に示す。白色の矢印は目的のバンドを示す。白色のボックスは副生成物バンドを示す。

【図 28】 A は、表 9 に示すような異なる制限処理（オーバーハング配列及び切断部位の数）を使用して生成された異なるサイズの C^3DNA のエキソヌクレアーゼ後のバンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。B は、 $Qubit$ により定量化された、表 9 に記載される各試料でのエキソヌクレアーゼ後の C^3DNA 濃度を示すグラフを示す。

【図 29】 エキソヌクレアーゼ処理の時間経過にわたる副生成物 DNA の DNA 濃度を示すグラフを示す。試料を二重反復で試験した（A 及び B）。

【図 30】 実施例 11 で試験された 2 つの構築物を示す概略図を示す。各構築物は異なる制限処理（AAAA または AACCC オーバーハングのいずれかと、1 つの断片または 4 つの断片のいずれかからなる骨格との組み合わせ）により生成された。

【図 31】 実施例 11 において例示される AAAA オーバーハングを有する 8.7 kb の構築物のプラスミドマップを示す。 $BsaI$ 認識部位（GGTCTC）を $BsaI$ 切断部位（黒線で線引きした付着末端）近くの黒矢印により示す。治療用配列に隣接する切断部位では、切断部位の両側に治療用配列または骨格配列と記す。

【図 32】 実施例 11 において例示される AACCC オーバーハングを有する 8.7 kb の構築物のプラスミドマップを示す。 $BsaI$ 認識部位（GGTCTC）を $BsaI$ 切断部位（黒線で線引きした付着末端）近くの黒矢印により示す。各切断部位の両側に治療用配列または骨格配列と記す。

【図 33】 表 14 において特定される試料でのライゲーションステップ終了後の 8.7 kb の C^3DNA バンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。白色のボックスは、目的の C^3DNA 単量体バンドを示す。

【図 34】 条件 1、2、及び 4 でのスーパーコイル形成ステップ終了後の 8.7 kb の C^3DNA バンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。白色のボックスは、目的の C^3DNA 単量体バンドを示す。

10

20

30

40

50

【図 3 5】条件 3 でのエキソヌクレアーゼ消化ステップ終了後の 8.7 kb の C³ DNA バンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。白色のボックスは、目的の C³ DNA 単量体バンドを示す。

【図 3 6】条件 1、2、及び 4 でのエキソヌクレアーゼ消化ステップ終了後、ならびに条件 3 でのスーパーコイル形成ステップ終了後の 8.7 kb の C³ DNA バンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。白色のボックスは、目的の C³ DNA 単量体バンドを示す。

【図 3 7】表 1 6 において特定される試料でのライゲーションステップ終了後の 10.3 kb の C³ DNA バンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。白色のボックスは、目的の C³ DNA 単量体バンドを示す。

【図 3 8】条件 1、2、及び 4 でのスーパーコイル形成ステップ終了後の 10.3 kb の C³ DNA バンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。白色のボックスは、目的の C³ DNA 単量体バンドを示す。

【図 3 9】条件 1、2、及び 4 でのエキソヌクレアーゼ消化ステップ終了後、ならびに条件 3 でのスーパーコイル形成ステップ終了後の 10.3 kb の C³ DNA バンドパターンを示す電気泳動ゲルの写真を示す。白色のボックスは、目的の C³ DNA 単量体バンドを示す。

【発明を実施するための形態】

【0114】

本発明は、非ウイルス DNA ベクター、例えば、治療用環状 DNA ベクターを生成させる改善された方法の特徴とする。本発明は、（例えば、細菌発現及び／または部位特異的組換えとは対照的に）ローリングサークル増幅及びライゲーションにより媒介される環状化によって環状 DNA を合成により生成させるための無細胞プロセスの開発に部分的に基づく。本発明の方法は、非ウイルス環状 DNA ベクターの生成における拡張性及び製造効率の改善を可能にし、細菌処理に関連するリスクを低減し得る。本発明は、例えば、標的細胞に形質移入することにより、疾患または障害を処置するために使用され得る治療用配列を有する環状 DNA ベクターの生成を可能にする。

【0115】

本明細書において開示される方法は、従来の方法と比較して目的の生成物の純度及び収率の増強をもたらし得る。特に、ある特定の制限酵素（例えば、IIS 型制限酵素）、エキソヌクレアーゼ、例えば、末端エキソヌクレアーゼ（例えば、T5 エキソヌクレアーゼ）、及び／またはヘリカーゼもしくはトポイソメラーゼ（例えば、II 型トポイソメラーゼ、例えば、ギラーゼ）による処理を含むステップの使用は、細菌配列などの不純物を低減及び／または分解することにより、収率及び純度が増強された生成物をもたらす。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、IIS 型制限酵素を使用することにより制限消化及びライゲーションを同時に実行することによって製造プロセスを合理化する。

【0116】

本発明の方法により生成される治療用環状 DNA ベクター及びその医薬組成物は、幾つかの有利な特性を示す。例えば、細菌プラスミド DNA 配列、例えば、RNAPII の抑制部位を除去または低減することにより、治療用環状 DNA ベクターの転写サイレンシングが低減または除去され得、これにより、個体における治療用配列の持続性がもたらされる。本発明の具体的な実施形態では、免疫原性成分（例えば、細菌内毒素、DNA もしくは RNA、または細菌シグネチャ、例えば、CpG モチーフ）が本発明の治療用環状 DNA ベクターに存在せず、従って、プラスミド DNA ベクターなどの従来の DNA ベクターと比較して宿主免疫応答を刺激するリスクが低減される。

【0117】

従って、本明細書に記載される方法により、細菌プラスミド DNA 配列（例えば、RNAPII の抑制部位、複製開始点、及び／または耐性遺伝子）及び他の細菌シグネチャ（例えば、免疫原性 CpG モチーフ）を実質的に欠いており、及び／または完全にインビトロで増幅及び合成され得る（例えば、細菌の複製が不必要であり、細菌の複製開始点及び

10

20

30

40

50

細菌の耐性遺伝子が不必要であり、組換え部位が不必要である) DNAベクターが生成される。これらの方法及びステップは、以下でより詳細に記載される。

【0118】

I. 定義

特に定義しない限り、本明細書において使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味、及び本出願において使用される多数の用語の一般的な手引きを当業者に提供する出版された教科書を参照することにより理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載される定義と参照される出版物の定義との間で何らかの矛盾がある場合、本明細書において提供される定義が優先するものとする。

10

【0119】

本明細書で使用する場合、用語「環状DNAベクター」は、環状型の核酸分子を指す。かかる環状型は、通常、ローリングサークル増幅によりコンカテマーに増幅されることができる。末端で鎖が連結されている線状二本鎖核酸(例えば、ヘアピンループまたは他の構造により共有結合した骨格)は、本明細書で使用する場合、環状ベクターではない。用語「環状DNAベクター」は、本明細書において、用語「共有結合により閉じた環状DNAベクター」及び「C3DNA」と互換的に使用される。当業者は、かかる環状ベクターが、本明細書に記載されるように、スーパーコイルを形成しており、複雑なDNAトポロジを有する、共有結合により閉じているベクターを包含することを理解するであろう。特定の実施形態では、環状DNAベクターは、スーパーコイル(例えば、単量体スーパーコイル)を形成している。ある特定の例では、環状DNAベクターは細菌の複製開始点を欠く(例えば、環状DNAベクターが自己複製RNA分子をコードする場合、環状DNAベクターは、細菌の複製開始点を欠き、RNA複製開始点をコードする)。

20

【0120】

本明細書で使用する場合、環状DNAベクターを生成させる「無細胞」法は、細菌(例えば、E. coli)宿主細胞などの宿主細胞内になんらのDNAを封じ込めることにも依存することなく、テンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドDNAベクター)の提供から治療用環状DNAベクターの生成までの当該方法のあらゆるステップが容易にされる方法を指す。例えば、無細胞法は、1つ以上の合成容器(例えば、ガラスもしくはプラスチックチューブ、バイオリアクター、槽、タンク、または他の好適な容器)内の適切な溶液(例えば、緩衝液)中で行われ、当該溶液に、DNAの増幅、改変、及び単離を容易にするための酵素及び他の薬剤が添加され得る。無細胞生成方法は、細胞内で生成されたテンプレートDNAを使用し得る。

30

【0121】

本明細書で使用する場合、用語「治療用配列」は、標的細胞における1種以上の治療用部分の転写に必要な任意の遺伝物質を含む、DNA分子(例えば、プラスミドDNAベクターまたはそのコンカテマー)の一部を指し、1つ以上のコード配列、プロモーター、ターミネーター、イントロン、及び/または他の調節エレメントを含み得る。治療用部分は、治療用タンパク質(例えば、代替タンパク質(例えば、標的細胞内の欠陥タンパク質と置き換わるタンパク質)または内因性タンパク質(例えば、サイトカインなどの調節タンパク質))及び/または治療用核酸(例えば、1種以上のマイクロRNA)であり得る。2つ以上の転写単位を有するDNAベクターにおいて、治療用配列は、複数の転写単位を含む。治療用配列は、治療目的で投与される1つ以上の遺伝子(例えば、異種遺伝子または導入遺伝子)を含み得る。

40

【0122】

本明細書で使用する場合、用語「タンパク質」は、ペプチド結合により(すなわち、一次構造として)互いに結合した複数のアミノ酸を指し、非共有結合的に会合している多量体(例えば、二量体、三量体など)タンパク質(例えば、四次構造を有するタンパク質)を包含する。従って、用語「タンパク質」は、ペプチド(例えば、ポリペプチド)、天然タンパク質、組換えタンパク質、及びそれらの断片を包含する。幾つかの実施形態では、

50

タンパク質は、一次構造を有し、生理学的条件下では二次構造、三次構造、または四次構造を有さない。幾つかの実施形態では、タンパク質は、一次構造及び二次構造を有し、生理学的条件下では三次構造または四次構造を有さない。特定の実施形態では、タンパク質は、一次構造、二次構造、及び三次構造を有するが、生理学的条件下では四次構造を有さない（例えば、1つ以上の折り畳まれた α ヘリックス及び／または β シートを有する単量体タンパク質）。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるタンパク質のいずれかは、少なくとも25アミノ酸（例えば、50アミノ酸～1000アミノ酸）の長さを有する。

【0123】

用語「治療用遺伝子」は、（例えば、DNAベクターまたは自己複製RNA分子の一部として）投与される導入遺伝子を指す。治療用遺伝子は、治療用タンパク質をコードする哺乳動物遺伝子であり得る。

10

【0124】

本明細書で使用する場合、用語「治療用タンパク質」は、対象の疾患または障害を処置することができるタンパク質を指す。幾つかの実施形態では、治療用タンパク質は、対象における欠損（例えば、変異型）タンパク質と置き換えるために投与される治療用代替タンパク質である。幾つかの実施形態では、治療用タンパク質は、対象における欠損のない天然タンパク質（例えば、サイトカイン、ケモカイン、または増殖因子）と同一であるか、または機能的に同等である。幾つかの実施形態では、治療用タンパク質は、抗原である。幾つかの実施形態では、治療用タンパク質は、抗原結合タンパク質である。

20

【0125】

本明細書で使用する場合、用語「治療用代替タンパク質」は、正常な（例えば、健常な）個体により内因的に発現されるタンパク質と構造的に類似する（例えば、構造的に同一である）タンパク質を指す。治療用代替タンパク質は、置き換えられるべきタンパク質の機能障害（または欠如）に関連する障害に罹患している個体に投与され得る。幾つかの実施形態では、治療用代替タンパク質は、タンパク質をコードする遺伝子における変異（例えば、点変異、挿入変異、欠失変異、またはスプライスバリエーション変異）に起因するタンパク質の異常を修正する。治療用代替タンパク質は、非内因性タンパク質、例えば、病原体に関連する（例えば、ワクチンの一部としての）タンパク質を含まない。治療用代替タンパク質としては、酵素、増殖因子、ホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、抗アポトーシス因子、抗糖尿病因子、凝固因子、抗腫瘍因子、肝臓分泌タンパク質、または神経保護因子が挙げられ得る。幾つかの例では、治療用代替タンパク質は、単一遺伝子性である。

30

【0126】

本明細書で使用する場合、用語「治療用核酸」は、対象における分子（例えば、タンパク質または核酸）に結合（例えば、ハイブリダイズ）して、（すなわち、必ずしも転写または翻訳されることなく）その治療効果をもたらす核酸を指す。治療用核酸は、DNAまたはRNA、例えば、低分子干渉RNA（siRNA）、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、CRISPR分子（例えば、ガイドRNA（gRNA））、オリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）、アプタマー、またはDNAワクチンであり得る。幾つかの実施形態では、治療用核酸は、非炎症性または非免疫原性の治療用核酸であり得る。他の実施形態では、治療用核酸は、免疫系（例えば、適応免疫系）により認識可能であり、免疫応答（例えば、自然免疫応答）を誘発し得る。かかる治療用核酸としては、トール様受容体（TLR）アゴニストが挙げられる。

40

【0127】

本明細書で使用する場合、用語「IIS型制限酵素」は、DNA分子上の認識部位を認識し、認識部位の外側に存在する切断部位でDNA分子を切断し、これにより、認識部位とは無関係な配列を有するオーバーハング（付着末端）を生じさせる酵素を指す。IIS型制限酵素としては、天然IIS型制限酵素（例えば、BsaI、AclI、AclwI、

50

Bae I、Bbs I、Bbv I、Bcc I、Bce AI、Bcg I、Bci VI、Bco DI、Bfu AI、Bmr I、Bpm I、Bpu EI、Bsa I、Bsa XI、Bse RI、Bsg I、Bsm AI、Bsm BI、Bsm FI、Bsm I、Bsp CNI、Bsp MI、Bsp QI、Bsr DI、Bsr I、Btg ZI、Bts CI、Bts I、Bts IMut I、Csp CI、Ear I、Eci I、Esp 3I、Fau I、Fok I、Hga I、Hph I、Hpy AV、Mbo II、Mly I、Mme I、Mn II、Nme AI I、Paq CI、Ple I、Sap I、及び Sfa NI）及び（例えば、Lippow et al. Nucleic Acids Res. 2009, 37 (9) : 3061-3073（これはその全体が参照により組み込まれる）に記載されるような）合成 IIS 型制限酵素が挙げられる。

10

【0128】

本明細書で使用する場合、用語「骨格配列」は、1つ以上の細菌の複製開始点もしくはその断片、1つ以上の薬剤耐性遺伝子もしくはその断片、1つ以上の組換え部位、またはそれらの任意の組み合わせを含む、治療用配列の外側のプラスミド DNA の一部を指す。幾つかの実施形態では、骨格配列は、1つ以上の細菌の複製開始点を含む。骨格配列は、例えば、機能する複製開始点を含み得る、20塩基対以上（例えば、31～40、例えば、38塩基対）の短縮されたプラスミド骨格を含む。

【0129】

本明細書で使用する場合、用語「組換え部位」は、第1のリコンビナーゼ付着部位の一部に対応する第1の配列、及び第2のリコンビナーゼ付着部位の一部に対応する第2の配列を含む、部位特異的組換えの産物である核酸配列を指す。ハイブリッド組換え部位の一例は att R であり、これは部位特異的組換えの産物であり、att P の一部に対応する第1の配列及び att B の一部に対応する第2の配列を含む。あるいは、組換え部位は、Cre / Lox 組換えにより生成され得る。従って、Cre / Lox 組換えにより生成されたベクター（例えば、Lox P 部位を含むベクター）は、本明細書において使用される組換え部位を含む。組換え部位を生成する他の部位特異的組換え事象には、例えば、λインテグラーゼ、FLP リコンビナーゼ、及び Kw リコンビナーゼが関与する。非部位特異的組換え事象（例えば、ITR により媒介される分子間組換え）により生じる核酸配列は、本明細書で定義されるような組換え部位ではない。

20

【0130】

本明細書で使用する場合、用語「隣接する」、「隣接している」、及び「隣接される」は、核酸分子の基準領域の外側に存在する当該核酸分子（例えば、プラスミド DNA ベクター）上の一对の領域または位置を指す。幾つかの実施形態では、核酸上の基準領域に隣接している一对の領域または位置は、基準領域に近接している（すなわち、接している）（すなわち、基準位置と隣接位置との間に介在する塩基が存在しない）。他の実施形態では、基準領域に隣接する核酸分子上の一对の領域または位置は、1個以上の介在する塩基（例えば、最大1,000個の介在する塩基）により基準領域から隔てられている。例えば、第1の制限部位が治療用配列の200塩基上流に存在し、第2の制限部位が治療用配列の100塩基下流に存在する場合、当該第1及び第2の制限部位は、治療用配列に隣接すると言われる。

30

40

【0131】

幾つかの実施形態では、隣接する領域または位置と基準領域との間の全ての介在配列は、細菌配列を欠く。従って、治療用配列に隣接する制限部位でプラスミド DNA ベクターから切り取られた治療用配列をセルフライゲーションさせることにより生成される環状 DNA ベクターには細菌配列が存在しない。例えば、かかる実施形態では、治療用配列に隣接する部位を切断する IIS 型制限酵素は、治療用配列の5'末端と3'末端との間に配列を有する治療用環状 DNA ベクターを生成し得るが、この領域は細菌配列（例えば、細菌の複製開始点または薬剤耐性遺伝子）を有さない。かかる介在配列は、付着末端ライゲーションによる人為的結果であり得、例えば、IIS 型制限酵素により生じるオーバーハン

50

【0132】

本明細書において使用されるように、ステップが完全にまたは部分的に重なる場合、当該ステップは「同時に」実行される。従って、制限酵素消化及びライゲーションは、以下のシナリオのいずれかにおいて同時に行われる：(i) 制限酵素がリガーゼと同時にDNAに作用し、両方の酵素が同時に不活性化される；(ii) 制限酵素がリガーゼと同時にDNAに作用し、酵素が異なる時点で不活性化される；(iii) 制限酵素がリガーゼの前にDNAに作用し、両方の酵素が同時に不活性化される；または(iv) 制限酵素がリガーゼの前にDNAに作用し、制限酵素が不活性化される前にリガーゼがDNAに作用し、リガーゼが不活性化される前に制限酵素が不活性化される。

【0133】

本明細書において使用されるように、間にある機能的ステップ、例えば、精製（例えば、DNA収率を低下させる精製、例えば、ゲル精製またはカラム精製）、酵素反応、または酵素不活性化ステップ（例えば、熱死滅ステップとも称される熱不活性化ステップ）が存在しない場合、ステップは、前のステップの「直後」に続くと言われる。あるステップから直後のステップに進むときに、条件の遷移、例えば、温度の上昇もしくは低下及び／または試薬濃度の増加または減少が起こり得ることが理解されよう。かかる条件の遷移が瞬時または徐々に（例えば、数秒または数分かけて）起こるかどうかにかわらず、間にある機能的ステップが存在しない場合、それでもその後のステップは、前のステップの「直後に」続くと言われる。例えば、ライゲーション後の65℃での熱不活性化ステップの直後に、温度が65℃から37℃まで低下する2時間の冷却期間後の37℃でのスーパーコイル形成ステップが続いてもよい。

【0134】

本明細書で使用する場合、「大規模生成」は、バッチ当たり少なくとも2mgの治療用環状DNAベクターの生成を意味する。大規模生成は、治療上有効量の治療用環状DNAベクターの1回以上の投与を可能にする。

【0135】

本明細書で使用する場合、用語「自己複製RNA分子」は、1つの複製開始点から自己複製するRNAを含む自己複製する遺伝的エレメントを指す。用語「自己複製RNA」、「レプリコンRNA」、及び「自己増幅レプリコンRNA」は、本明細書において互換的に使用される。

【0136】

本明細書で使用する場合、用語「作動可能に連結された」は、そのように記載された構成要素がそれらの通常の機能を果たすように配置されている、要素の配置を指す。核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれている場合、「作動可能に連結」されている。例えば、プロモーターは、それが1つ以上の異種遺伝子の転写に影響を及ぼす場合、当該1つ以上の異種遺伝子に作動可能に連結されている。更に、コード配列に作動可能に連結された調節エレメントは、コード配列の発現に影響を及ぼすことができる。調節エレメントは、それらがコード配列の発現を誘導するように機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、翻訳されないが転写はされる介在配列がプロモーター配列とコード配列との間に存在し得、プロモーター配列は、コード配列に「作動可能に連結されている」と依然としてみなされ得る。

【0137】

本明細書で使用する場合、用語「単離された」は、人工的に生成され、天然宿主のゲノムに組み込まれていないことを意味する。例えば、単離された核酸ベクターは、脂質エンベロープ（例えば、リポソーム）またはポリマーマトリックスに封入されている核酸ベクターを包含する。幾つかの実施形態では、用語「単離された」は、(i) 例えば、ローリングサークル増幅もしくはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりインビトロで（例えば、無細胞環境で）増幅された；(ii) 分子クローニングにより組換え的に生成された；(iii) 制限エンドヌクレアーゼ切断及びゲル電気泳動分画、もしくはカラムクロマトグラフィーなどにより精製された；または(iv) 例えば、化学合成により合成されたD

10

20

30

40

50

NAベクターを指す。単離された核酸ベクターは、当該技術分野において周知の組換えDNA技術により容易に操作可能なものである。従って、5'及び3'制限部位が公知であるか、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマー配列が開示されているベクターに含まれるヌクレオチド配列は、単離されていると見なされるが、その天然状態でその天然宿主に存在する核酸配列は単離されていると見なされない。単離された核酸ベクターは、実質的に精製されていてもよいが、そうである必要はない。

【0138】

本明細書で使用する場合、用語「裸の」は、脂質エンベロープ（例えば、リポソーム）またはポリマーマトリックスに封入されておらず、個体への投与時に立体構造物（例えば、粒子構造物）と物理的に会合していない（例えば、共有結合的または非共有結合的に結合していない）核酸分子（例えば、環状DNAベクター）を指す。本発明の幾つかの例では、医薬組成物は、裸の環状DNAベクターを含む。

10

【0139】

本明細書で用いられる場合、「ベクター」は、それに連結されている治療用配列を標的細胞に運び込むことができる核酸分子を指し、ここで、当該治療用配列は、次いで、当該標的細胞内で転写、複製、プロセッシング、及び／または発現され得る。標的細胞または宿主細胞がベクターの治療用配列をプロセッシングした後は、治療用配列はベクターとみなされない。ベクターの一種は「プラスミド」であり、これは、追加のDNA断片がライゲーションされ得る、細菌の骨格を含む環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターはファージベクターである。別の種類のベクターは、追加のDNA断片がウイルスゲノムにライゲーションされ得るウイルスベクターである。ある特定のベクターは、それらが導入された宿主細胞内で自己複製が可能である（例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ得、これにより、宿主ゲノムと共に複製される。

20

【0140】

更に、ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結された遺伝子の発現を誘導することができる。かかるベクターは、本明細書において「組換え発現ベクター」（または単に「組換えベクター」または「発現ベクター」と称される。

【0141】

本明細書で使用する場合、用語「個体」及び「対象」は、互換的に使用され、例えば、本明細書に記載される治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物による、治療または予防を必要とする任意の哺乳動物を包含する。幾つかの実施形態では、個体または対象は、ヒトである。他の実施形態では、個体または対象は、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類（例えば、サル）、マウス、ブタ、ウサギ、ネコ、またはイヌ）である。個体または対象は、雄性または雌性であり得る。

30

【0142】

本明細書で使用する場合、治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物の「有効量」または「有効用量」は、例えば、選択された投与形態、経路、及び／またはスケジュールに従って個体に投与される場合に、所望の生物学的効果、薬理学的効果、または治療効果を達成するのに十分な量を指す。当業者によって理解されるように、特定の組成物の有効な絶対量は、所望の生物学的または薬理学的エンドポイント、送達される薬剤、標的組織などのような要因に応じて異なり得る。更に当業者は、「有効量」が単回投与でまたは反復投与を使用することにより、細胞と接触させられ得るか、または対象に投与され得ることを理解するであろう。疾患を処置するための組成物の有効量は、疾患の進行を遅延もしくは停止させ得るか、または参照集団、例えば、未処置の集団もしくはプラセボ集団、もしくは標準治療を受けている集団と比較して部分奏効もしくは完全奏効を増加させ得る。

40

【0143】

本明細書で使用する場合、「処置」（及びその文法的変化形、例えば、「処置する」ま

50

たは「処置すること」）は、予防のために実行され得るか、または臨床病態の経過中に実行され得る、処置されいる個体の自然経過を変化させるための臨床的介入を指す。処置の望ましい効果としては、限定されるものではないが、疾患の発症または再発の予防、症状の緩和、疾患のあらゆる直接的または間接的な病理学的帰結の低減、疾患進行速度の低下、病態の改善または緩和、及び予後の改善が挙げられる。幾つかの実施形態では、本発明の治療用環状DNAベクターは、疾患の発症を遅延させるため、または疾患の進行を遅らせるために使用される。

【0144】

用語「発現のレベル」または「発現レベル」は、互換的に使用され、一般に、生体試料（例えば、網膜）におけるポリヌクレオチド、またはアミノ酸産物もしくはタンパク質の量を指す。「発現」は、通常、遺伝子にコードされる情報が、細胞内で存在し、かつ機能する構造に変換されるプロセスを指す。

【0145】

従って、本発明によれば、「発現」は、ポリヌクレオチドへの転写、タンパク質への翻訳、またはタンパク質の翻訳後修飾を指し得る。転写されたポリヌクレオチド、翻訳されたタンパク質、または翻訳後修飾されたタンパク質の断片も、それらが選択的スプライシングにより生成された転写物もしくは分解された転写物に由来するか、または例えば、タンパク質分解によるタンパク質の翻訳後プロセッシングに由来するかにかかわらず、発現されたとみなされる。「発現される遺伝子」としては、mRNAとしてポリヌクレオチドに転写され、次いで、タンパク質に翻訳されるもの、及び更にRNAに転写されるが、タンパク質に翻訳されないもの（例えば、転移RNA及びリボソームRNA）が挙げられる。

【0146】

本明細書で使用する場合、用語「発現持続性」は、治療用配列またはその機能部分（例えば、治療用DNAベクターの1つ以上のコード配列）が、形質移入された細胞（「細胞内持続性」）において、または形質移入された細胞の任意の子孫（「世代間持続性」）において発現可能である持続期間を指す。治療用配列またはその機能部分は、例えば、DNAメチル化及び／またはヒストンメチル化及び圧縮によりサイレンシングされていない場合、発現可能であり得る。発現持続性は、（i）（例えば、qPCR、RNA-seq、または任意の他の好適な方法により）標的細胞またはその子孫における治療用配列から転写されたmRNA、及び（ii）（例えば、ウェスタンブロット、ELISA、または任意の他の好適な方法により）標的細胞またはその子孫における治療用配列から翻訳されたタンパク質を検出または定量化することにより評価され得る。幾つかの例では、発現持続性は、（i）標的細胞またはその子孫における治療用配列から転写されたmRNA、及び（ii）標的細胞またはその子孫における治療用配列から翻訳されたタンパク質のうちの一方または両方と併せて、標的細胞またはその子孫における治療用DNAを（例えば、標的細胞における治療用環状DNAベクターの存在を、例えば、エピソームDNAコピー数分析により）検出または定量化することにより評価され得る。治療用配列またはその機能部分の発現持続性は、遺伝子発現を特徴付ける当該技術分野において公知の任意の方法を使用して、細菌において生成される対照ベクターなどの参照ベクター（例えば、細菌において生成されるか、または本発明のベクターに存在しない1つ以上の細菌シグネチャを有する環状ベクター（例えば、プラスミド））と比較して定量化され得る。発現持続性は、ベクターの投与後の任意の所与の時点で定量化され得る。例えば、幾つかの実施形態では、本発明の治療用環状DNAベクターの発現は、治療用環状DNAベクターの投与の2週間後に標的細胞またはその子孫において検出可能である場合、投与後少なくとも2週間持続する。幾つかの実施形態では、遺伝子の発現は、投与後1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、1年、またはより長期間、標的細胞において検出可能である場合、標的細胞において「持続する」。幾つかの実施形態では、治療用配列の発現は、所与の期間（例えば、投与後1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、1年、またはより長期間

）後に、元の発現レベルのうちの任意の残存する一部（例えば、元の発現レベルの少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも100%）が検出可能な場合、投与後に当該所与の期間持続すると言われる。

【0147】

本明細書で使用する場合、「細胞内持続性」は、治療用配列またはその機能部分（例えば、治療用DNAベクターの1つ以上のコード配列）が形質移入された細胞（例えば、標的細胞、例えば、有糸分裂後細胞または静止細胞）内で発現可能である持続期間を指す。細胞内持続性は、（i）標的細胞内で治療用配列から転写されたmRNA、及び（ii）標的細胞内で治療用配列から翻訳されたタンパク質を検出または定量化することにより評価され得る。幾つかの例では、細胞内持続性は、（i）標的細胞内で治療用配列から転写されたmRNA、及び（ii）標的細胞内で治療用配列から翻訳されたタンパク質のうち的一方または両方と併せて、標的細胞内の治療用DNA（例えば、標的細胞における治療用環状DNAベクターの存在）を検出または定量化することにより評価される。幾つかの実施形態では、本発明の治療用環状DNAベクターは、参照ベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）と比較して改善された細胞内持続性を示す。

【0148】

本明細書で使用する場合、「継世代持続性」は、遺伝子が形質移入された細胞の子孫（例えば、標的細胞の子孫、例えば、例えば、治療用環状DNAベクターにより遺伝子が形質移入された細胞の第1世代、第2世代、第3世代、または第4世代子孫）において治療用配列またはその機能部分（例えば、治療用DNAベクターの1つ以上のコード配列）が発現可能である持続期間を指す。継世代持続性は、細胞分裂を通じた遺伝子のあらゆる希薄化を説明し、従って、分裂している組織におけるベクターの経時的な持続性を測定するのに有用であり得る。幾つかの実施形態では、本発明の治療用環状DNAベクターは、参照ベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）と比較して改善された継世代持続性を示す。継世代持続性は、（i）標的細胞の子孫において治療用配列から転写されるmRNA、及び（ii）標的細胞の子孫において治療用配列から翻訳されるタンパク質を検出または定量化することにより評価され得る。幾つかの例では、細胞内持続性は、（i）標的細胞の子孫において治療用配列から転写されるmRNA、及び（ii）標的細胞の子孫において治療用配列から翻訳されるタンパク質のうち的一方または両方と併せて、標的細胞の子孫における治療用DNA（例えば、標的細胞の子孫における治療用環状DNAベクターの存在）を検出または定量化することにより評価される。幾つかの実施形態では、本発明の治療用環状DNAベクターは、参照ベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）と比較して改善された継世代持続性を示す。

【0149】

用語「薬学的に許容される」は、ヒトなどの哺乳動物に投与しても安全であることを意味する。幾つかの実施形態では、薬学的に許容される組成物は、動物及びより具体的にはヒトへの使用について、連邦政府もしくは州政府の規制機関により承認されているか、または米国薬局方もしくは他の一般的に認められている薬局方に収載されている。

【0150】

用語「担体」は、本発明のベクターまたは組成物と共に投与される希釈剤、補助剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。好適な薬学的担体の例は、“Remington's Pharmaceutical Sciences” Mack Publishing Co., Easton, PA., 23rd edition, 2020に記載されている。

【0151】

用語「a」及び「an」は、「1つ以上の（one or more of）」を意味する。例えば、「遺伝子（a gene）」は、1つ以上のかかる遺伝子を表すと理解される。従って、用語「a」及び「an」、「1つ以上の（one or more of a（or an））」、ならびに「少なくとも1つの（at least one of a（or an））」は、本明細書において互換的に使用される。

【0152】

本明細書で使用する場合、用語「約」は、特に明記しない限り、基準値から±10%の変動内の値を指す。

【0153】

様々な情報源または参考文献の間で定義に何らかの矛盾がある場合、本明細書において提供される定義が優先するものとする。

【0154】

II. 治療用環状DNAベクターを生成させる方法

本明細書において提供される方法は、細菌細胞による合成に基づく従来の生成方法の代替手段としての治療用環状DNAベクターの無細胞合成を含む。ポリメラーゼを使用した無細胞条件での細菌プラスミドDNAベクターの増幅が可能であるため、環状DNAベクターは、クローニングされたプラスミドの細菌成分から単離され得、単離された生成物のベクターに細菌シグネチャが実質的に存在しない。従って、無細胞合成は、細菌性不純物のリスクを最小限にし、細菌由来のベクター（すなわち、非合成環状DNAベクター）と比較して、得られる環状DNAベクター（すなわち、合成環状DNAベクター）のより純粋な組成物を提供する。本発明の方法は、スケールアップに適しており、製造効率の改善をもたらす。ゲル抽出ステップは必要とされない。従って、幾つかの実施形態では、生成プロセスの一部としてのゲル精製（例えば、アガロースゲル精製）は、実行されない（例えば、ゲル電気泳動は、分析目的で並行して実施され得る）。幾つかの実施形態では、合理化された制限消化スキームが提供される。かかる無細胞プロセスを使用して生成された治療用環状DNAベクターは、テンプレートからのそれらの生成における細菌細胞の欠如を反映して、本明細書において「合成」ベクターと称される。

【0155】

一態様では、本方法は、治療用遺伝子配列を含むテンプレートDNA分子（例えば、テンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター））を含む試料を提供すること、及びポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用してテンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることを含む。直鎖状コンカテマーは、DNAベクターの直鎖化断片を生成させるために、細菌プラスミドDNAベクターの単位毎に直鎖状コンカテマーの少なくとも2つの部位を切断する制限酵素により消化される。本発明の方法は、治療用配列を含むDNAベクターの直鎖化断片をセルフライゲーションさせて、治療用環状DNAベクターを生成させることを更に含む。本方法は、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼで試料を処理することも含む。幾つかの実施形態では、本方法は、エキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ）で試料を消化することを更に含む。幾つかの実施形態では、消化させること、及びセルフライゲーションさせることは、同時に実行される。

【0156】

一態様では、本方法は、治療用配列を含むテンプレートDNA分子（例えば、テンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター））を含む試料を提供すること、及びポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用してテンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることを含む。本方法は、制限酵素（例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI）で直鎖状コンカテマーを消化して、DNAベクターの直鎖化断片を生成させることを更に含む。直鎖状コンカテマーは複数コピーのテンプレートDNAベクターを有し、各コピーは単位長を有し、直鎖状コンカテマーは複数のベクターの単位長を有する。制限酵素は、細菌プラスミドDNAベクターの単位毎に直鎖状コンカテマーの少なくとも2つの部位（例えば、2つの部位のみ、または2つ超の部位（例えば、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の部位））を切断する。本方法は、DNAベクターの直鎖化断片をセルフライゲーションさせて、閉じた環状DNAベクター（例えば、C³DNA）を生成させることを更に含む。本方法は、エキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ、例えば、T5エキソヌクレアーゼ）で試料を消化することも含む。幾つかの実施形態では、本方法は、トポイソメラーゼ（例えば、ギラ

ーゼ) またはヘリカーゼで試料を処理することを更に含む。幾つかの実施形態では、消化させること、及びセルフライゲーションさせることは、同時に実行される。

【0157】

別の態様では、本方法は、治療用配列を含むテンプレートDNA分子(例えば、テンプレートDNAベクター(例えば、プラスミドDNAベクター))を含有する試料を提供すること、及びポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用してテンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることを含む。本方法は、制限酵素(例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI)で直鎖状コンカテマーを消化して、DNAベクターの直鎖化断片を生成させることを更に含む。制限酵素は、テンプレートDNAベクターの単位毎に直鎖状コンカテマーの少なくとも2つの部位(例えば、2つの部位のみ、または2つ超の部位(例えば、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の部位))を切断する。本方法は、DNAベクターの直鎖化断片をセルフライゲーションさせて、閉じた環状DNAベクター(例えば、C³DNA)を生成させることを更に含む。本方法は、トポイソメラーゼ(例えば、ギラーゼ)またはヘリカーゼで試料を処理することを更に含む。本方法は、エキソヌクレアーゼ(例えば、末端エキソヌクレアーゼ、例えば、T5エキソヌクレアーゼ)で試料を消化することも含む。幾つかの実施形態では、消化させること、及びセルフライゲーションさせることは、(同じ反応条件で)同時に実行される。

10

【0158】

幾つかの実施形態では、本方法は、制限消化ステップをライゲーションステップと統合することができるように、オーバーハングを生じさせるために単一の制限酵素を利用する(例えば、制限消化ステップは、ライゲーションステップと重なり得るか、またはライゲーションステップと同時に実行される)。例えば、このような方法の幾つかの実施形態は、(a)治療用配列及び骨格配列を含むテンプレートDNAベクターを含む試料を提供すること；(b)ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して当該テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させること；(c)当該直鎖状コンカテマーの単位毎に少なくとも第1の部位、第2の部位、及び第3の部位を切断する制限酵素(例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI)で当該直鎖状コンカテマーを消化して、これにより、当該治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が当該骨格配列の一部を含む少なくとも2つの直鎖状骨格断片を生成させること；ならびに(d)当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状DNAベクターを生成させることを含む。第1及び第2の部位は、治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、第3の部位は、骨格配列内に存在し、第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成する。

20

30

【0159】

あるいは、IIS型制限酵素は、テンプレートDNA分子を2つの部位で切断し、これにより、単一の骨格断片及び治療用断片を生成させるために使用され得る。IIS型認識部位(例えば、BsaIを必要とする実施形態におけるGGTC TC)が骨格断片に存在し、治療用断片には存在しないようなテンプレートを設計することにより、骨格断片のセルフライゲーションは、環状化した骨格上にIIS型制限部位を再構成するが、治療用断片のセルフライゲーションは、IIS型制限部位を欠く治療用DNAベクターを生成させる。従って、骨格は更なる消化に供されるが、治療用DNAベクターは切断されない。

40

【0160】

幾つかの実施形態では、制限酵素が単位毎に直鎖状コンカテマーの第4の部位を切断し、ここで、当該第4の部位は、骨格配列内に存在し、第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、各々が骨格配列の一部を含む少なくとも3つの直鎖状骨格断片が生成される。

【0161】

幾つかの実施形態では、制限酵素不活性化ステップは、ステップ(d)に先行しない。例えば、ライゲーションの前に制限酵素(例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI

50

）の熱不活性化が実行されない。このことは、オーバーハング設計により可能となる合理化されたDNA生成を可能にし、オーバーハング設計は、制限消化及びライゲーションステップが同時に行われるのを可能にし、これにより、ステップ（c）の制限酵素を不活性化する必要性をなくす。このことは、温度の上昇に適していない使い捨ての容器の使用も可能にする。

【0162】

ステップ（d）の後、治療用環状DNAベクターを含有する溶液の温度は、酵素（例えば、制限酵素及び／またはリガーゼ）を不活性化するために、約65℃まで上げられ得る。あるいは、制限酵素消化及び／またはライゲーションの後（例えば、直後）に熱不活性化は実行されない。

【0163】

別の態様では、本発明は、DNA分子（例えば、テンプレートDNAベクター）から骨格配列を除去して、治療用環状DNAベクターを生成させる方法を提供する。DNA分子（例えば、テンプレートDNAベクター）は、骨格配列及び治療用配列を含む。本方法は、（a）DNA分子の少なくとも第1の部位及び第2の部位を切断する1種以上の制限酵素（例えば、IIS型制限酵素）でDNA分子を消化するステップであって、（i）当該第1及び第2の部位が治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、（ii）認識部位が骨格配列内に存在し、消化により、治療用配列を含む直鎖状治療用断片、ならびに骨格配列及び認識部位（例えば、IIS型認識部位）を含む直鎖状骨格断片が生成される、当該ステップ；ならびに（b）当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状DNAベクターを生成させるステップを含む。

【0164】

別の態様では、本発明は、DNA分子（例えば、テンプレートDNAベクター）から骨格配列を除去して、治療用環状DNAベクターを生成させる方法を提供する。DNA分子（例えば、テンプレートDNAベクター）は、骨格配列及び治療用配列を含む。本方法は、（a）DNA分子の単位毎に少なくとも第1の部位、第2の部位、及び第3の部位を切断する1種以上の制限酵素でDNA分子を消化するステップであって、（i）当該第1及び第2の部位が治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、（ii）当該第3の部位が骨格配列内に存在し、当該第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、当該治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が当該骨格配列の一部を含む少なくとも2つの直鎖状骨格断片が生成される、当該ステップ；ならびに（b）当該直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状DNAベクターを生成させるステップを含む。

【0165】

幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、トポイソメラーゼ（例えば、ギラーゼ）またはヘリカーゼと接触される。かかる反応は、約37℃で実行され得る。追加的または代替的に、治療用環状DNAベクターは、（例えば、約37℃で実行される反応において）エキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ）と接触させられ得る。特定の実施形態では、治療用環状DNAベクター（及びその反応混合物）は、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触され、その後、反応温度を上昇させて、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼを不活性化することなく、治療用環状DNAベクター（及びその反応混合物）は、エキソヌクレアーゼ（例えば、末端エキソヌクレアーゼ）と接触される。あるいは、エキソヌクレアーゼ消化は、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼとの接触前に行われる。

【0166】

幾つかの実施形態では、本方法は、治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼもしくはヘリカーゼ及び／または末端エキソヌクレアーゼと接触させた後に、治療用環状DNAベクターをカラム（例えば、捕捉カラム）に通すことを含む。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、次いで、イソプロピルアルコールで沈殿される。幾つかの実施形態では、本方法は、以下のセクションA～Gに記載されるステップの任意の組み合

わせを使用して、インビトロでテンプレートベクターを増幅すること、増幅されたベクターを制限酵素で消化すること、得られた断片をセルフライゲーションさせること、ならびに末端エキソヌクレアーゼ及び／またはヘリカーゼもしくはトポイソメラーゼで試料を処理することを含む。

【0167】

A. テンプレート

概して、治療用環状DNAベクターの生成は、テンプレートDNA分子（例えば、テンプレートDNAベクター）、例えば、治療用配列及び骨格配列を有するプラスミドDNAベクターを含む試料を提供することから開始される。（例えば、骨格配列内の）治療用配列に隣接する制限部位（例えば、IIS型制限部位、例えば、BsaI制限部位、例えば、GGTCTC）を有するようにテンプレートDNAベクターを設計することにより、骨格配列が治療用配列から分離され得る。次いで、治療用配列は、治療用環状DNAベクターを生成させるために、セルフライゲーションされ得る。制限部位は、ゲル精製などの収率を低下させるステップを実行することなく、更なる制限消化及び／またはエキソヌクレアーゼ消化により生成物からの骨格配列の除去を可能にするために、骨格配列内の位置に設計され得る。例えば、IIS型認識部位は、治療用配列と比較してその対応する切断部位の遠位に配置され得（図2Aを参照のこと）、すなわち、切断部位は、認識部位と治療用配列との間に存在する。

10

【0168】

幾つかの実施形態では、テンプレートは、以下の順に連結された以下のものを含む：第1のIIS型認識部位、当該第1のIIS型認識部位に対応する第1のIIS型切断部位、治療用配列、第2のIIS型切断部位、及び当該第2のIIS型切断部位に対応する第2のIIS型認識部位。第2のIIS型認識部位は、骨格配列（またはその一部（この場合、第1及び第2のIIS型認識部位の一方または両方が骨格配列内に存在する））により第1のIIS型認識部位に連結されていてもよい。幾つかの例では、2つのみ（すなわち、2つ以下）のIIS型認識部位がテンプレートDNA分子に存在する。幾つかの例では、（例えば、図32に示すように）2つのみのBsaI認識部位がテンプレートDNA分子に存在する。このような設計は、両方のIIS型認識部位がIIS型制限酵素消化時に生成される直鎖状骨格配列に配置されるのを可能にし、再ライゲーション時に、IIS型制限酵素は、環状化した骨格配列を切断し得る。幾つかの実施形態では、治療用配列は、IIS型認識部位（例えば、BsaI認識部位、例えば、GGTCTC）を含まない。幾つかの実施形態では、治療用配列は、制限酵素認識部位を含まない。

20

30

【0169】

テンプレートが治療用配列及び骨格配列を有するプラスミドDNAベクターである幾つかの実施形態では、プラスミドDNAは、同じ制限酵素（例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI）により認識される少なくとも3つの制限部位（例えば、少なくとも4つの制限部位または少なくとも5つの制限部位；例えば、3つの制限部位、4つの制限部位、または5つの制限部位）を有する。少なくとも3つの制限部位のうちの2つは、制限酵素（例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI）による制限消化時に、自己相補的オーバーハングを末端に有する直鎖状治療用断片が形成される（例えば、単一の直鎖状治療用断片が形成される）ように、治療用配列に隣接する。少なくとも1つの残りの制限部位は、制限酵素（例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI）によるプラスミドDNAベクターの消化時に、各々が骨格配列の一部を含む少なくとも2つの直鎖状骨格断片が生成されるように、骨格配列内に存在する。少なくとも1つの残りの制限部位は、制限酵素（例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI）によるプラスミドDNAベクターの消化時に、骨格配列内の制限部位により生じるオーバーハングが治療用配列のフランキング末端に生じるオーバーハングに非相補的となるように、骨格配列内に配置される。

40

【0170】

プラスミドDNAがIIS型制限酵素（例えば、BsaI）により認識される4つの制限部位を有する幾つかの実施形態では、骨格配列内の残り2つの制限部位は、IIS型制

50

限酵素（例えば、B s a I）によるプラスミドDNAベクターの消化時に、各々が骨格配列の一部を含む3つの直鎖状骨格断片が生成され、骨格配列内の制限部位により生じるオーバーハングがいずれも、治療用配列のフランキング末端に生じるオーバーハングに非相補的となるように配置される。幾つかのかかる実施形態では、骨格配列内の2つのI I S型制限部位は、互いに非相補的なオーバーハングを生じる。

【0171】

2種の異なる制限酵素が使用される実施形態では、テンプレート（例えば、プラスミドDNAベクター）は、少なくとも3つの制限部位（例えば、少なくとも4つの制限部位または少なくとも5つの制限部位；例えば、3つの制限部位、4つの制限部位、または5つの制限部位）を有し得、ここで、制限部位のうちの2つは、治療用配列に隣接しており、第1の制限酵素により認識される。少なくとも1つの残りの制限部位は、骨格配列内に存在し、異なる第2の制限酵素により認識される。幾つかの実施形態では、治療用配列に隣接する制限部位は、E c o R I制限部位であり、第1の制限酵素は、E c o R Iである。幾つかの実施形態では、治療用配列に隣接する制限部位は、P v u I I制限部位であり、第1の制限酵素は、P v u I Iである。幾つかの実施形態では、骨格配列内の制限部位は、P v u I I制限部位であり、第2の制限酵素は、P v u I Iである。幾つかの実施形態では、骨格配列内の制限部位は、E c o R I制限部位であり、第2の制限酵素は、E c o R Iである。

【0172】

幾つかの実施形態では、テンプレート（例えば、プラスミドDNAベクター）は、4つの制限部位を有し、ここで、2つの制限部位は、治療用配列に隣接しており、第1の制限酵素により認識され、骨格配列内の残り2つの制限部位は、第2の制限酵素により認識される。幾つかの実施形態では、治療用配列に隣接する制限部位は、E c o R I制限部位であり、第1の制限酵素は、E c o R Iである。幾つかの実施形態では、治療用配列に隣接する制限部位は、P v u I I制限部位であり、第1の制限酵素は、P v u I Iである。幾つかの実施形態では、骨格配列内の制限部位は、P v u I I制限部位であり、第2の制限酵素は、P v u I Iである。幾つかの実施形態では、骨格配列内の制限部位は、E c o R I制限部位であり、第2の制限酵素は、E c o R Iである。

【0173】

テンプレートDNAを含有する試料は、テンプレートDNAベクター（例えば、細菌プラスミドDNAベクター）を含む細胞または組織（例えば、哺乳動物細胞もしくは組織または細菌細胞）の可溶化物または他の調製物であり得る。二本鎖環状DNAは、標準的なDNA抽出／単離技術を使用して細胞から採取され得る。幾つかの実施形態では、更なる処理の前にプラスミドDNAベクターを精製するために、直鎖状DNAは、例えば、プラスミドを破壊しないDNアーゼを使用して特異的に分解される。

【0174】

他の実施形態では、テンプレートDNAは、プラスミドDNAベクターの1つ以上の細菌のエLEMENTを欠く。本明細書に記載される方法の幾つかの例では、国際公開第W O 2 0 2 1 / 0 5 5 7 6 0号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される合成DNAベクターがテンプレートDNAとして使用される。かかる合成DNAベクターは、ローリングサークル増幅を使用して増幅され得、制限消化及びライゲーションにより再環状化され得る。骨格配列を欠く合成DNAベクターがテンプレートとして使用される実施形態では、直鎖状骨格断片のエキシヌクレアーゼ消化を含むステップは、不要であり、本発明の生成方法から省略される。

【0175】

B. 増幅

幾つかの例では、環状DNAベクターの無細胞合成は、ファージポリメラーゼ（例えば、P h i 2 9ポリメラーゼ）などのポリメラーゼを使用した効果的な増幅に依存する。本明細書において使用されるポリメラーゼは、例えば、G Cリッチ残基で高い処理能力を有する好熱性ポリメラーゼであり得る。特定の実施形態では、ベクターを増幅するために使

10

20

30

40

50

用されるポリメラーゼは、Phi 29 ポリメラーゼである。

【0176】

幾つかの実施形態では、プラスミドDNAベクターは、DNAをポリメラーゼ（例えば、ファージポリメラーゼ、例えば、Phi 29 DNAポリメラーゼ；TempliPhi キット、GE Healthcare）、プライマー（例えば、部位特異的プライマーまたはランダムプライマー、例えば、ランダムヘキサマープライマー）、及びヌクレオチド混合物（例えば、dNTP、例えば、dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP）とインキュベートすることにより無細胞調製物中でインビトロで増幅される。ポリメラーゼ（例えば、ファージポリメラーゼ、例えば、Phi 29 ポリメラーゼ）は、ローリングサークル増幅（例えば、等温ローリングサークル増幅）によりテンプレートを増幅し、複数コピーの単位長のテンプレートベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）を有する直鎖状コンカテマーを生成させる。好適なポリメラーゼとしては、好熱性ポリメラーゼ及び高い処理能力を特徴とするポリメラーゼを含む。

10

【0177】

好適なポリメラーゼ濃度（例えば、Phi 29 DNAポリメラーゼ濃度）は、10 U/mL ~ 2,000 U/mL（例えば、50 U/mL ~ 1,000 U/mL、100 U/mL ~ 500 U/mL、または150 U/mL ~ 300 U/mL、例えば、10 U/mL ~ 50 U/mL、50 U/mL ~ 100 U/mL、100 U/mL ~ 150 U/mL、150 U/mL ~ 200 U/mL、200 U/mL ~ 250 U/mL、250 U/mL ~ 300 U/mL、300 U/mL ~ 400 U/mL、400 U/mL ~ 500 U/mL、500 U/mL ~ 750 U/mL、750 U/mL ~ 1,000 U/mL、1,000 U/mL ~ 1,500 U/mL、または1,500 U/mL ~ 2,000 U/mL）であり得る。幾つかの実施形態では、ポリメラーゼ（例えば、Phi 29 DNAポリメラーゼ）濃度は、約200 U/mLである。

20

【0178】

テンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の出発濃度は、10 ng/mL ~ 5 mg/mL（例えば、0.1 µg/mL ~ 1 mg/mL、0.2 µg/mL ~ 0.5 mg/mL、0.5 µg/mL ~ 0.1 mg/mL、1.0 µg/mL ~ 50 µg/mL、2.0 µg/mL ~ 25 µg/mL、4.0 µg/mL ~ 10 µg/mL、または約5.0 µg/mL；例えば、10 ng/mL ~ 50 ng/mL、50 ng/mL ~ 100 ng/mL、100 ng/mL ~ 500 ng/mL、500 ng/mL ~ 1 µg/mL、1 µg/mL ~ 2 µg/mL、2 µg/mL ~ 3 µg/mL、3 µg/mL ~ 4 µg/mL、4 µg/mL ~ 5 µg/mL、5 µg/mL ~ 6 µg/mL、6 µg/mL ~ 7 µg/mL、7 µg/mL ~ 8 µg/mL、8 µg/mL ~ 9 µg/mL、9 µg/mL ~ 10 µg/mL、10 µg/mL ~ 20 µg/mL、20 µg/mL ~ 50 µg/mL、50 µg/mL ~ 100 µg/mL、100 µg/mL ~ 500 µg/mL、500 µg/mL ~ 1 mg/mL、または1 mg/mL ~ 5 mg/mL；例えば、約0.5 µg/mL、約1.0 µg/mL、約2 µg/mL、約3 µg/mL、約4 µg/mL、約5 µg/mL、約6 µg/mL、約7 µg/mL、約8 µg/mL、約9 µg/mL、または約10 µg/mL）であり得る。幾つかの実施形態では、テンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の出発濃度は、1.0 µg/mL ~ 10 µg/mL（例えば、約1.0 µg/mL、約5.0 µg/mL、または約10 µg/mL）である。幾つかの実施形態では、テンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の出発濃度は、10 µg/mLである。幾つかの実施形態では、テンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の出発濃度は、1 µg/mLである。幾つかの実施形態では、テンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の出発濃度は、5 µg/mLである。

30

40

【0179】

プライマー（例えば、ランダムプライマーまたは特異的プライマー）の出発濃度は、0.1 µM ~ 1.0 mM（例えば、0.5 µM ~ 500 µM、1.0 µM ~ 250 µM、2

50

・ $0\ \mu\text{M} \sim 200\ \mu\text{M}$ 、 $4\ \mu\text{M} \sim 100\ \mu\text{M}$ 、または $5\ \mu\text{M} \sim 50\ \mu\text{M}$ ；例えば、 $0.1\ \mu\text{M} \sim 0.5\ \mu\text{M}$ 、 $0.5\ \mu\text{M} \sim 1.0\ \mu\text{M}$ 、 $1.0\ \mu\text{M} \sim 2.0\ \mu\text{M}$ 、 $2.0\ \mu\text{M} \sim 5.0\ \mu\text{M}$ 、 $5.0\ \mu\text{M} \sim 10\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M} \sim 50\ \mu\text{M}$ 、 $50\ \mu\text{M} \sim 100\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M} \sim 500\ \mu\text{M}$ 、または $500\ \mu\text{M} \sim 1.0\ \text{mM}$ ；例えば、約 $1\ \mu\text{M}$ 、約 $2\ \mu\text{M}$ 、約 $5\ \mu\text{M}$ 、約 $10\ \mu\text{M}$ 、約 $20\ \mu\text{M}$ 、約 $25\ \mu\text{M}$ 、約 $50\ \mu\text{M}$ 、約 $100\ \mu\text{M}$ 、約 $200\ \mu\text{M}$ 、約 $250\ \mu\text{M}$ 、約 $300\ \mu\text{M}$ 、約 $400\ \mu\text{M}$ 、約 $500\ \mu\text{M}$ 、約 $600\ \mu\text{M}$ 、約 $700\ \mu\text{M}$ 、約 $750\ \mu\text{M}$ 、約 $800\ \mu\text{M}$ 、約 $900\ \mu\text{M}$ 、または約 $1.0\ \text{mM}$ ）であり得る。

【0180】

幾つかの例では、増幅開始時のテンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の出発濃度は、 $1\ \mu\text{g}/\text{mL} \sim 10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、プライマーの出発濃度は、 $1\ \mu\text{M} \sim 100\ \mu\text{M}$ である。幾つかの例では、増幅開始時のプラスミドDNAベクターの出発濃度は、約 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、プライマーの出発濃度は、 $1\ \mu\text{M} \sim 100\ \mu\text{M}$ （例えば、約 $50\ \mu\text{M}$ ）である。

【0181】

当技術分野において公知であるか、または本明細書に記載される任意の好適な増幅用緩衝液が本発明の方法に使用され得る。

【0182】

幾つかの実施形態では、増幅反応は、約1時間～約24時間、例えば、約18時間の間進行する。例えば、増幅反応は、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、または24時間であり得る。幾つかの実施形態では、増幅反応は、約18時間の間進行する。

【0183】

幾つかの実施形態では、増幅反応は、約 $25^\circ\text{C} \sim 42^\circ\text{C}$ （例えば、約 $28^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 、例えば、約 $29^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 、例えば、約 30°C ）の温度で実行される。例えば、増幅ステップは、約 25°C 、 26°C 、 27°C 、 28°C 、 29°C 、 30°C 、 31°C 、 32°C 、 33°C 、 34°C 、 35°C 、 36°C 、 37°C 、 38°C 、 39°C 、 40°C 、 41°C 、または 42°C で実行され得る。幾つかの実施形態では、増幅ステップは、約 30°C で実行される。

【0184】

幾つかの例では、増幅後に存在するDNAの総量は、増幅反応の開始時に存在するテンプレートDNA（例えば、プラスミドDNAベクター）の少なくとも5倍の量（例えば、増幅反応の開始時に存在するテンプレートDNAの少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、または少なくとも50倍の量；例えば、増幅反応の開始時に存在するテンプレートDNAの10倍～50倍、10倍～40倍、10倍～30倍、または10倍～20倍の量；例えば、増幅反応の開始時に存在するテンプレートDNAの20倍～50倍、20倍～40倍、または20倍～30倍の量；例えば、増幅反応の開始時に存在するテンプレートDNAの30倍～50倍または40倍～50倍の量）（例えば、質量）である。

【0185】

幾つかの実施形態では、増幅後に存在するDNAの総量は、増幅反応の開始時に存在するテンプレートDNA（例えば、プラスミドDNAベクター）の少なくとも50倍の量（例えば、増幅反応の開始時に存在するテンプレートDNAの50倍～300倍、例えば、少なくとも82倍、例えば、82倍～236倍の量）（例えば、質量）である。

【0186】

幾つかの例では、制限消化ステップは、増幅ステップの直後に行われる（例えば、テンプレートDNA（例えば、プラスミドDNAベクター）の増幅ステップと制限消化ステップとの間に熱不活性化ステップが存在しない）。

【0187】

他の例では、熱不活性化ステップは、増幅後（例えば、増幅直後）に実行される。熱不

10

20

30

40

50

活性化は、ポリメラーゼ（例えば、ファージポリメラーゼ、例えば、Phi 29 ポリメラーゼ）を不活性化するために、少なくとも 50℃、少なくとも 55℃、少なくとも 60℃、少なくとも 65℃、または少なくとも 70℃まで温度を上昇させることにより実施され得る。幾つかの例では、温度は、少なくとも 65℃まで上昇される。幾つかの例では、増幅後の熱不活性化の温度は、約 65℃である。幾つかの実施形態では、制限消化は、熱不活性化の直後に行われる。

【0188】

本発明の方法の特定の実施形態は、収率を損ない得る介入するステップ、例えば、中間精製（例えば、ゲル精製（例えば、アガロースゲル抽出）またはカラム精製）なしに、製造プロセスが増幅から制限消化に進むことを可能にする。従って、幾つかの実施形態では、増幅と制限消化との間に精製ステップ（例えば、ゲル精製ステップ（例えば、アガロースゲル抽出）またはカラム精製ステップ）は存在しない。追加的または代替的に、幾つかの実施形態では、増幅された DNA 生成物のうちの少なくとも 90% が制限消化に進む（例えば、増幅された DNA 生成物のうちの少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、またはそれ以上が制限消化に進む；例えば、増幅された DNA 生成物のうちの 90%～95%、95%～97%、97%～98%、98%～99%、または 99%～100% が制限消化に進む）。

【0189】

C. 制限消化

ローリングサークル増幅により生成されたテンプレート DNA ベクター（例えば、プラスミド DNA ベクター）及び／またはそのコンカテマーは、制限酵素を使用して消化され得る。幾つかの実施形態では、1 種以上の制限酵素は、テンプレート DNA ベクター（例えば、プラスミド DNA ベクター）の単位毎に少なくとも 2 つの部位（例えば、少なくとも 3 つの部位または少なくとも 4 つの部位）を切断して、DNA の直鎖状断片を生成させ、その一部は治療用遺伝子配列を含む。

【0190】

幾つかの実施形態では、複数種の制限酵素が使用される（例えば、2 種の制限酵素が使用される）。かかる例では、第 1 の制限酵素は、（例えば、第 1 の制限部位が治療用遺伝子配列に隣接するプラスミド DNA ベクターを設計することにより）骨格配列から治療用遺伝子配列を切断するために使用され得る。第 2 の制限酵素は、骨格配列を 1 つ以上（例えば、2 つ、3 つ、またはそれ以上）の直鎖状骨格断片に切断するために使用され得、次いで、これらはエキソヌクレアーゼ（例えば、T5 エキソヌクレアーゼまたは Plasmid-Safe）を使用して分解され得る。かかる方法に適した制限酵素としては、例えば、EcoRI 及び PvuII（例えば、第 1 の制限酵素としての EcoRI、及び第 2 の制限酵素としての PvuII）が挙げられる。

【0191】

特定の実施形態では、単一の制限酵素が使用される（すなわち、このステップは 1 種のみの制限酵素の使用を含む）。かかる例では、IIS 型制限酵素は、単一の制限酵素として好適である。IIS 型制限酵素は、切断部位の外側に存在する制限部位を認識するため、特に有用であり得る。従って、切断及びライゲーションの後に、制限部位は、ライゲーションした生成物（例えば、治療用環状 DNA ベクター）にもはや存在しない。このことは、DNA 断片の制限酵素及びリガーゼでの同時処理を可能にする。

【0192】

幾つかの例では、本明細書において述べるように、IIS 型制限部位は、リガーゼ及び IIS 型制限酵素を含有する反応物が IIS 型制限部位を有する副生成物（例えば、1 つ以上の骨格配列及び IIS 型制限部位を有する副生成物）に対する治療用環状 DNA ベクターの相対濃度を増加させるように反応を推進するように、DNA 分子（例えば、テンプレート DNA ベクター、例えば、プラスミド DNA ベクター）の治療用配列の外側に配置される。

【0193】

幾つかの実施形態では、かかる実施形態で使用されるIIS型制限酵素は、BsaIである。本明細書に記載される方法と共に使用され得る他の好適なIIS型制限酵素としては、例えば、AclI、AlwI、BaeI、BbsI、BbvI、BccI、BceAI、BcgI、BciVI、BcoDI、BfuAI、BmrI、BpmI、BpuEI、BsaI、BsaXI、BseRI、BsgI、BsmAI、BsmBI、BsmFI、BsmI、BspCNI、BspMI、BspQI、BsrDI、BsrI、BtgZI、BtsCI、BtsI、BtsIMutI、CspCI、EarI、EciI、Esp3I、FauI、FokI、HgaI、HphI、HpyAV、MboII、MlyI、MmeI、MnII、NmeAIII、PacCI、PleI、SapI、及びSfaNIが挙げられる。

10

【0194】

幾つかの実施形態では、制限酵素は、約0.5U/μg DNA～約20U/μg DNA、例えば、約1U/μg DNA～約10U/μg DNA、例えば、約2U/μg DNA～約5U/μg DNA、例えば、約2.5U/μg DNAの濃度で提供される。例えば、制限酵素は、約0.5U/μg DNA、1.0U/μg DNA、1.5U/μg DNA、2.0U/μg DNA、2.5U/μg DNA、3.0U/μg DNA、3.5U/μg DNA、4.0U/μg DNA、4.5U/μg DNA、5.0U/μg DNA、5.5U/μg DNA、6.0U/μg DNA、6.5U/μg DNA、7.0U/μg DNA、7.5U/μg DNA、8.0U/μg DNA、8.5U/μg DNA、9.0U/μg DNA、9.5U/μg DNA、10.0U/μg DNA、11U/μg DNA、12U/μg DNA、13U/μg DNA、14U/μg DNA、15U/μg DNA、16U/μg DNA、17U/μg DNA、18U/μg DNA、19U/μg DNA、または20U/μg DNAの濃度で提供され得る。幾つかの実施形態では、制限酵素は、約2.5U/μg DNAの濃度のBsaIである。

20

【0195】

幾つかの実施形態では、制限消化ステップは、約1時間～約24時間、例えば、約1時間～約12時間である。例えば、消化ステップは、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、または24時間であり得る。幾つかの実施形態では、消化ステップは、約2時間である。幾つかの実施形態では、消化ステップは、約1時間以下、例えば、約30分以下である。

30

【0196】

幾つかの実施形態では、制限消化後に存在するDNAの総量は、増幅反応の開始時に存在するテンプレートDNA（例えば、プラスミドDNAベクター）の少なくとも50倍の量（例えば、増幅反応の開始時に存在するテンプレートDNAの50倍～300倍、例えば、少なくとも82倍、例えば、82倍～236倍の量）（例えば、質量）である。

【0197】

制限酵素消化は、約30℃～約42℃（例えば、約32℃～約40℃、例えば、約35℃～約40℃、例えば、約37℃）の反応温度で実行され得る。例えば、幾つかの例では、制限酵素消化ステップは、約30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、または42℃で実行される。幾つかの実施形態では、制限酵素消化ステップは、約37℃で実行される。

40

【0198】

本発明の方法の幾つかの実施形態は、収率を損ない得る介在するステップ、例えば、精製（例えば、ゲル精製（例えば、アガロースゲル抽出）またはカラム精製）なしに、製造プロセスが制限消化からライゲーションに進むことを可能にする。従って、幾つかの実施形態では、制限消化とライゲーションとの間に精製ステップ（例えば、ゲル精製ステップ

50

(例えば、アガロースゲル抽出) またはカラム精製ステップ) は存在しない。追加的または代替的に、幾つかの実施形態では、制限消化時または制限消化後に存在する全 DNA (消化された直鎖状断片 (例えば、骨格及び／または治療用配列) 及び任意の消化されていないか、または環状の DNA が含まれる) のうちの少なくとも 90 % がライゲーションに進む (例えば、制限消化時または制限消化後に存在する全 DNA のうちの少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、またはそれ以上がライゲーションに進み、例えば、制限消化時または制限消化後に存在する全 DNA (消化された直鎖状断片 (例えば、骨格及び／または治療用配列) 及び任意の消化されていないか、または環状の DNA が含まれる) のうちの 90 % ~ 95 %、95 % ~ 97 %、97 % ~ 98 %、98 % ~ 99 %、または 99 % ~ 100 % がライゲーションに進む) 。

10

【0199】

幾つかの例では、熱不活性化ステップは、制限消化後かつライゲーション前に実行される (例えば、1 種以上の非 II 型制限酵素、例えば、EcoRI 及び／または PvuII を必要とする制限消化)。熱不活性化は、制限酵素 (例えば、非 II 型制限酵素、例えば、EcoRI 及び／または PvuII) を不活性化するために、少なくとも 50 °C、少なくとも 55 °C、少なくとも 60 °C、少なくとも 65 °C、または少なくとも 70 °C まで温度を上昇させることにより実施され得る。幾つかの例では、温度は、少なくとも 65 °C まで上昇される。幾つかの例では、増幅後の熱不活性化の温度は、約 65 °C である。幾つかの実施形態では、ライゲーションは、制限酵素 (複数可) の熱不活性化の直後に行われる。

20

【0200】

あるいは、熱不活性化ステップは、ライゲーションの後 (例えば、直後) に実行されない (例えば、熱不活性化ステップは、プロセス全体を通して実行されない) 。

【0201】

BsaI などの II 型制限酵素を必要とする幾つかの実施形態では、ライゲーション前の制限酵素の不活性化 (例えば、熱不活性化) は必要とされない。幾つかの実施形態では、ライゲーションは、制限消化の直後に行われる (例えば、制限消化ステップ (例えば、II 型制限酵素、例えば、BsaI による制限消化) とライゲーションステップとの間に熱不活性化ステップが存在しない) 。幾つかの実施形態では、ライゲーションは、完全にまたは部分的に制限消化の間に行われる。例えば、ライゲーション反応は、制限消化の開始時またはその間に開始され得る (例えば、リガーゼは、制限酵素 (例えば、II 型制限酵素、例えば、BsaI) が添加されると同時に、または制限酵素が添加された後に (例えば、制限酵素が添加された後の 1 分以内に、制限酵素が添加された後の 5 分以内に、制限酵素が添加された後の 10 分以内に、制限酵素が添加された後の 30 分以内に、制限酵素が添加された後の 60 分以内に、制限酵素が添加された後の 90 分以内に、または制限酵素が添加された後の 120 分以内に) DNA に添加され得る。あるいは、ライゲーション反応は、制限消化が完了した後に (例えば、制限酵素が添加されてから 2 時間後に) 開始され得る。

30

【0202】

制限消化後 (例えば、制限消化の直後、または実行される場合、熱不活性化の直後) に、反応温度は、上述のライゲーション反応 (例えば、25 °C) の温度に一致するように調整され得る。

40

【0203】

D. ライゲーション

治療用配列を有する直鎖状治療用断片のセルフライゲーションは、治療用環状 DNA ベクター (例えば、単量体治療用環状 DNA ベクター) をもたらす。幾つかの実施形態では、セルフライゲーションステップは、消化された DNA 試料にリガーゼ (例えば、DNA リガーゼ) を提供して、ライゲーション溶液を得ることを含む。リガーゼは、例えば、T3 リガーゼ、T4 リガーゼ、または T7 リガーゼであり得る。特定の実施形態では、T4 リガーゼが使用される。ライゲーション溶液は、追加の成分、例えば、当該技術分野にお

50

いて公知であるか、または本明細書に記載される好適な濃度のATP（例えば、リボATP）または他の緩衝剤を含有し得る。例えば、本発明の方法の幾つかの例は、CutSmart（登録商標）もしくは組換えCutSmart（登録商標）（rCutSmart（登録商標））緩衝液または同等の緩衝液中にリガーゼをリボATPと共に含有するライゲーション溶液を調製することを含み、ここで、当該リボATPは、0.1～100mM（例えば、約10mM）の濃度である。

【0204】

幾つかの実施形態では、リガーゼと接触されるDNAの総量は、増幅終了時の生成されたDNAの総量のうちの90%以上（例えば、増幅終了時の生成されたDNAの総量のうちの少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれ以上；例えば、増幅終了時の生成されたDNAの総量のうちの90%～99%、91%～99%、92%～99%、93%～99%、94%～99%、95%～99%、96%～99%、97%～99%、98%～99%、90%～98%、91%～98%、92%～98%、93%～98%、94%～98%、95%～98%、96%～98%、97%～98%、90%～97%、91%～97%、92%～97%、93%～97%、94%～97%、95%～97%、96%～97%、90%～96%、91%～96%、92%～96%、93%～96%、94%～96%、95%～96%、または90%～95%）である。

【0205】

リガーゼ（例えば、T4リガーゼ）は、約0.5U/μg DNA～約200U/μg DNA、例えば、約0.5U/μg DNA～約10U/μg DNA、例えば、約1U/μg DNA～約5U/μg DNA、例えば、約1.5U/μg DNA、約2.0U/μg DNA、または約2.5U/μg DNAの濃度でライゲーション溶液中に存在し得る。例えば、リガーゼ（例えば、T4リガーゼ）は、約0.5U/μg DNA、1.0U/μg DNA、1.5U/μg DNA、2.0U/μg DNA、2.5U/μg DNA、3.0U/μg DNA、3.5U/μg DNA、4.0U/μg DNA、4.5U/μg DNA、5.0U/μg DNA、5.5U/μg DNA、6.0U/μg DNA、6.5U/μg DNA、7.0U/μg DNA、7.5U/μg DNA、8.0U/μg DNA、8.5U/μg DNA、9.0U/μg DNA、9.5U/μg DNA、10.0U/μg DNA、11U/μg DNA、12U/μg DNA、13U/μg DNA、14U/μg DNA、15U/μg DNA、16U/μg DNA、17U/μg DNA、18U/μg DNA、19U/μg DNA、または20U/μg DNAの濃度で提供され得る。幾つかの実施形態では、リガーゼは、1μgのDNA当たり50U（U/μg）以下（例えば、40U/μg DNA以下、30U/μg DNA以下、25U/μg DNA以下、20U/μg DNA以下、15U/μg DNA以下、10U/μg DNA以下、5U/μg DNA以下、4U/μg DNA以下、3U/μg DNA以下、2.5U/μg DNA以下、2.0U/μg DNA以下、1.5U/μg DNA以下、または1.0U/μg DNA以下；例えば、0.1U/μg DNA～20U/μg DNA；例えば、0.1U/μg DNA～30U/μg DNA、0.1U/μg DNA～20U/μg DNA、0.2U/μg DNA～15U/μg DNA、0.5U/μg DNA～12U/μg DNA、または1U/μg DNA～10U/μg DNA；例えば、0.1U/μg DNA～0.5U/μg DNA、0.5U/μg DNA～1.0U/μg DNA、1.0U/μg DNA～2.0U/μg DNA、2.0U/μg DNA～3.0U/μg DNA、3.0U/μg DNA～4.0U/μg DNA、4.0U/μg DNA～5.0U/μg DNA、5.0～6.0U/μg DNA、6.0U/μg DNA～7.0U/μg DNA、7.0U/μg DNA～8.0U/μg DNA、8.0U/μg DNA～9.0U/μg DNA、9.0U/μg DNA～11U/μg DNA、1

1 U/μg DNA~12 U/μg DNA、12 U/μg DNA~15 U/μg DNA、15 U/μg DNA~20 U/μg DNA、20 U/μg DNA~25 U/μg DNA、25 U/μg DNA~30 U/μg DNA、30 U/μg DNA~35 U/μg DNA、35 U/μg DNA~40 U/μg DNA、または40 U/μg DNA~50 U/μg DNA) のリガーゼの濃度で提供される。幾つかの実施形態では、リガーゼ (例えば、T4リガーゼ) は、20 U/μg DNA以下 (例えば、15 U/μg DNA以下、10 U/μg DNA以下、5 U/μg DNA以下、4 U/μg DNA以下、3 U/μg DNA以下、2.5 U/μg DNA以下、2.0 U/μg DNA以下、1.5 U/μg DNA以下、または1.0 U/μg DNA以下; 例えば、0.1 U/μg DNA~20 U/μg DNA; 例えば、0.2 U/μg DNA~15 U/μg DNA、0.5 U/μg DNA~12 U/μg DNA、または1 U/μg DNA~10 U/μg DNA; 例えば、0.1 U/μg DNA~0.5 U/μg DNA、0.5 U/μg DNA~1.0 U/μg DNA、1.0 U/μg DNA~2.0 U/μg DNA、2.0 U/μg DNA~3.0 U/μg DNA、3.0 U/μg DNA~4.0 U/μg DNA、4.0 U/μg DNA~5.0 U/μg DNA、5.0~6.0 U/μg DNA、6.0 U/μg DNA~7.0 U/μg DNA、7.0 U/μg DNA~8.0 U/μg DNA、8.0 U/μg DNA~9.0 U/μg DNA、9.0 U/μg DNA~11 U/μg DNA、11 U/μg DNA~12 U/μg DNA、12 U/μg DNA~15 U/μg DNA、または15 U/μg DNA~20 U/μg DNA) の濃度で提供される。

10

20

【0206】

特定の実施形態では、直鎖状治療用断片は、5.0 U/μg DNA~15 U/μg DNA (例えば、約10 U/μg DNA) の濃度でT4リガーゼと接触される。

【0207】

幾つかの実施形態では、ライゲーションステップは、約30分~約24時間、例えば、約1時間~約12時間である。例えば、ライゲーションステップは、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、または24時間であり得る。幾つかの実施形態では、ライゲーションステップは、約2時間である。幾つかの実施形態では、ライゲーションステップは、約18~約24時間 (例えば、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、または約24時間) である。

30

【0208】

ライゲーションは、約20℃~約42℃ (例えば、約20℃~約37℃、約22℃~約30℃、または約25℃) の反応温度で実行され得る。例えば、幾つかの例では、ライゲーションステップは、約20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、または30℃で実行される。幾つかの実施形態では、ライゲーションステップは、約25℃で実行される。

【0209】

熱不活性化ステップは、ライゲーション後にリガーゼを不活性化するために実行され得る。II型制限酵素を必要とするプロセス (例えば、制限消化と同時または制限消化直後のライゲーション) において、このライゲーション後の熱不活性化ステップは、II型制限酵素 (例えば、BsaI) 及びリガーゼ (例えば、T4リガーゼ) の両方を不活性化し得る。熱不活性化は、少なくとも50℃、少なくとも55℃、少なくとも60℃、少なくとも65℃、少なくとも70℃、または少なくとも80℃まで温度を上昇させることにより実施され得る。幾つかの例では、温度は、少なくとも65℃まで上昇される。幾つかの例では、増幅後の熱不活性化の温度は、約65℃である。幾つかの実施形態では、ライゲーションは、制限酵素 (複数可) の熱不活性化の直後に行われる。熱不活性化は、10分間~2時間 (例えば、30分~90分、40分~60分、または約45分) の間進行し得

40

50

る。幾つかの実施形態では、熱不活性化は、ライゲーション後の約 65℃で約 45 分間のインキュベーションを含む。

【0210】

幾つかの実施形態では、本方法は、ライゲーション後の熱不活性化後に、溶液の温度を 50℃未満（例えば、20℃～40℃、25℃～37℃、または約 37℃）に低下させることを含む。

【0211】

他の例では、ライゲーション後（例えば、ライゲーション直後）に熱不活性化ステップが実行されない。幾つかの例では、ライゲーション後（例えば、ライゲーション直後）の反応温度は、50℃未満または 45℃未満である。幾つかの例では、温度は、ライゲーション反応温度の（+/-）10℃以内（例えば、ライゲーション反応温度の（+/-）8℃以内、（+/-）5℃以内、または（+/-）2℃以内）に維持される。

10

【0212】

本発明の方法の幾つかの実施形態は、収率を損ない得る介在するステップ、例えば、精製（例えば、ゲル精製（例えば、アガロースゲル抽出）またはカラム精製）なしに、製造プロセスがライゲーションからスーパーコイル形成及び／またはエキソヌクレアーゼ消化に進むことを可能にする。従って、幾つかの実施形態では、ライゲーションとスーパーコイル形成及び／またはエキソヌクレアーゼ消化との間に精製ステップ（例えば、ゲル精製ステップ（例えば、アガロースゲル抽出）またはカラム精製ステップ）は存在しない。追加的または代替的に、幾つかの実施形態では、ライゲーション時またはライゲーション後に存在する全 DNA（治療用環状 DNA、直鎖状骨格断片、及び任意のライゲーションしていない治療用断片が含まれる）のうちの少なくとも 90% がスーパーコイル形成及び／またはエキソヌクレアーゼ消化に進む（例えば、ライゲーション時またはライゲーション後に存在する全 DNA のうちの少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、またはそれ以上がスーパーコイル形成及び／またはエキソヌクレアーゼ消化に進み、例えば、ライゲーション時またはライゲーション後に存在する全 DNA のうちの 90%～95%、95%～97%、97%～98%、98%～99%、または 99%～100% がスーパーコイル形成及び／またはエキソヌクレアーゼ消化に進む）。

20

30

【0213】

E. スーパーコイル形成

スーパーコイルを形成している治療用環状 DNA ベクター（及びその医薬組成物）を生成させる無細胞法は、弛緩した環状の DNA ベクターがスーパーコイル形成に適した条件下でトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触されるステップを含み得る。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法により生成される治療用環状 DNA ベクターは、正のスーパーコイルを形成している。本明細書に記載される方法は、効果的なスーパーコイル形成を促進するために、当技術分野において公知であるか、または本明細書に記載される任意の試薬及び条件を含む。

【0214】

例えば、スーパーコイル形成反応に適した例示的な緩衝液は、35 mM の Tris-HCl、24 mM の KCl、4 mM の MgCl₂、1 mM の ATP、2 mM の DTT、1.8 mM のスペルミジン、32% のグリセロール（w/v）、及び 100 µg/mL の BSA を含有する。

40

【0215】

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触される DNA の総量は、増幅終了時またはライゲーション終了時の生成された DNA の総量のうちの 90% 以上（例えば、増幅終了時またはライゲーション終了時の生成された DNA の総量のうちの少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%

50

、またはそれ以上；例えば、増幅終了時またはライゲーション終了時の生成されたDNAの総量のうちの90%～99%、91%～99%、92%～99%、93%～99%、94%～99%、95%～99%、96%～99%、97%～99%、98%～99%、90%～98%、91%～98%、92%～98%、93%～98%、94%～98%、95%～98%、96%～98%、97%～98%、90%～97%、91%～97%、92%～97%、93%～97%、94%～97%、95%～97%、96%～97%、90%～96%、91%～96%、92%～96%、93%～96%、94%～96%、95%～96%、または90%～95%）である。

【0216】

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼは、II型トポイソメラーゼである。II型トポイソメラーゼは、例えば、ギラーゼまたはトポイソメラーゼIVであり得る。

10

【0217】

幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼ（例えば、II型トポイソメラーゼ、例えば、トポイソメラーゼIVまたはギラーゼ）またはヘリカーゼは、約0.5U/μg DNA～約20U/μg DNA、例えば、約0.5U/μg DNA～約10U/μg DNA、例えば、約1U/μg DNA～約10U/μg DNA、例えば、約1U/μg DNA～約5U/μg DNA、例えば、約1.5U/μg DNA、約2.0U/μg DNA、または約2.5U/μg DNAの濃度で提供される。例えば、トポイソメラーゼ（例えば、II型トポイソメラーゼ、例えば、トポイソメラーゼIVまたはギラーゼ）またはヘリカーゼは、約0.5U/μg DNA、1.0U/μg DNA、1.5U/μg DNA、2.0U/μg DNA、2.5U/μg DNA、3.0U/μg DNA、3.5U/μg DNA、4.0U/μg DNA、4.5U/μg DNA、5.0U/μg DNA、5.5U/μg DNA、6.0U/μg DNA、6.5U/μg DNA、7.0U/μg DNA、7.5U/μg DNA、8.0U/μg DNA、8.5U/μg DNA、9.0U/μg DNA、9.5U/μg DNA、10.0U/μg DNA、11U/μg DNA、12U/μg DNA、13U/μg DNA、14U/μg DNA、15U/μg DNA、16U/μg DNA、17U/μg DNA、18U/μg DNA、19U/μg DNA、または20U/μg DNAの濃度で提供され得る。幾つかの実施形態では、トポイソメラーゼ（例えば、II型トポイソメラーゼ、例えば、トポイソメラーゼIVまたはギラーゼ）またはヘリカーゼは、10U/μg DNA以下（例えば、5U/μg DNA以下、4U/μg DNA以下、3U/μg DNA以下、2.5U/μg DNA以下、2.0U/μg DNA以下、1.5U/μg DNA以下、または1.0U/μg DNA以下；例えば、0.1U/μg DNA～10U/μg DNA；例えば、0.5U/μg DNA～8U/μg DNAまたは1U/μg DNA～5U/μg DNA；例えば、0.1U/μg DNA～0.5U/μg DNA、0.5U/μg DNA～1.0U/μg DNA、1.0U/μg DNA～2.0U/μg DNA、2.0U/μg DNA～3.0U/μg DNA、3.0U/μg DNA～4.0U/μg DNA、4.0U/μg DNA～5.0U/μg DNA、5.0～6.0U/μg DNA、6.0U/μg DNA～7.0U/μg DNA、7.0U/μg DNA～8.0U/μg DNA、8.0U/μg DNA～9.0U/μg DNA、または9.0U/μg DNA～10U/μg DNA）の濃度で提供される。

20

30

40

【0218】

特定の実施形態では、弛緩した環状のDNAベクターは、1.0U/μg DNA～2.5U/μg DNA（例えば、約1.0U/μg DNA、約1.5U/μg DNA、または約2.0U/μg DNA）の濃度のギラーゼと接触される。末端エキソヌクレアーゼ消化（例えば、T5エキソヌクレアーゼ消化）後にギラーゼがDNAと接触される実施形態では、ギラーゼは、0.1U/μg DNA～1.5U/μg DNA（例えば、0.2U/μg DNA～1.5U/μg DNA、0.5U/μg DNA～1.5U/μg DNA、0.5U/μg DNA～1.0U/μg DNA、または1.0U

50

／ $\mu\text{g DNA} \sim 1.5 \text{ U} / \mu\text{g DNA}$ 、例えば、約 $0.1 \text{ U} / \mu\text{g DNA}$ 、約 $0.2 \text{ U} / \mu\text{g DNA}$ 、約 $0.3 \text{ U} / \mu\text{g DNA}$ 、約 $0.4 \text{ U} / \mu\text{g DNA}$ 、約 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g DNA}$ 、約 $1.0 \text{ U} / \mu\text{g DNA}$ 、または約 $1.5 \text{ U} / \mu\text{g DNA}$)の濃度である。

【0219】

幾つかの実施形態では、環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼ（例えば、II型トポイソメラーゼ、例えば、トポイソメラーゼIVまたはギラーゼ）と接触させるステップは、約1時間～約24時間、例えば、約1時間～約12時間である。例えば、環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼ（例えば、II型トポイソメラーゼ、例えば、トポイソメラーゼIVまたはギラーゼ）と接触させるステップは、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、または24時間である。幾つかの実施形態では、環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼ（例えば、II型トポイソメラーゼ、例えば、トポイソメラーゼIVまたはギラーゼ）と接触させるステップは、約12時間である。

10

【0220】

幾つかの実施形態では、環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼ（例えば、II型トポイソメラーゼ、例えば、トポイソメラーゼIVまたはギラーゼ）と接触させるステップは、約 $30^\circ\text{C} \sim 42^\circ\text{C}$ （例えば、約 $32^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 、例えば、約 $35^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 、例えば、約 37°C)の温度で実行される。例えば、消化ステップは、約 30°C 、 31°C 、 32°C 、 33°C 、 34°C 、 35°C 、 36°C 、 37°C 、 38°C 、 39°C 、 40°C 、 41°C 、または 42°C で実行され得る。幾つかの実施形態では、環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼ（例えば、II型トポイソメラーゼ、例えば、トポイソメラーゼIVまたはギラーゼ）と接触させるステップは、約 37°C で実行される。

20

【0221】

F. 末端エキソヌクレアーゼ

本明細書に記載される治療用環状DNAベクターの無細胞生成の方法のいずれかは、望ましくないDNA（例えば、細菌配列、直鎖状または切れ目の入ったDNA副生成物など）が酵素により分解されるクリーンアップステップを含み得る。具体的な例では、制限酵素消化により生成される直鎖状骨格断片は、当技術分野において公知であるか、または本明細書に記載される任意の好適な条件下で末端エキソヌクレアーゼを使用して、環状化された治療用断片（例えば、弛緩した環状の治療用DNAベクターまたは治療用スーパーコイルDNAベクター）を含有する溶液中で選択的に分解され得る。幾つかの実施形態では、末端エキソヌクレアーゼは、T5エキソヌクレアーゼである。

30

【0222】

本明細書に記載される方法は、効果的な末端エキソヌクレアーゼ活性を促進するために、当技術分野において公知であるか、または本明細書に記載される任意の試薬及び条件を含む。例えば、末端エキソヌクレアーゼ反応に適した例示的な緩衝液は、酢酸カリウム緩衝液（例えば、 $10 \text{ mM} \sim 100 \text{ mM}$ の酢酸カリウム、例えば、約 50 mM の酢酸カリウム）であり得る。

40

【0223】

幾つかの実施形態では、末端エキソヌクレアーゼと接触されるDNAの総量は、増幅終了時またはライゲーション終了時の生成されたDNAの総量のうちの90%以上（例えば、増幅終了時またはライゲーション終了時の生成されたDNAの総量のうちの少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれ以上；例えば、増幅終了時またはライゲーション終了時の生成されたDNAの総量のうちの90%～99%、91%～99%、92%～99%、93%～99%、94%～99%、95%～99%、96%～99%、97%～99%、98%～99%、90%～98

50

%、91%～98%、92%～98%、93%～98%、94%～98%、95%～98%、96%～98%、97%～98%、90%～97%、91%～97%、92%～97%、93%～97%、94%～97%、95%～97%、96%～97%、90%～96%、91%～96%、92%～96%、93%～96%、94%～96%、95%～96%、または90%～95%)である。

【0224】

幾つかの実施形態では、末端エキソヌクレアーゼ（例えば、T5エキソヌクレアーゼ）は、約0.5U/μg～約20U/μg、例えば、約0.5U/μg～約10U/μg、例えば、約1U/μg～約10U/μg、例えば、約2U/μg～約5U/μg、例えば、約2.5U/μgの濃度で提供される。例えば、末端エキソヌクレアーゼは、約0.5U/μg、1.0U/μg、1.5U/μg、2.0U/μg、2.5U/μg、3.0U/μg、3.5U/μg、4.0U/μg、4.5U/μg、5.0U/μg、5.5U/μg、6.0U/μg、6.5U/μg、7.0U/μg、7.5U/μg、8.0U/μg、8.5U/μg、9.0U/μg、9.5U/μg、10.0U/μg、11U/μg、12U/μg、13U/μg、14U/μg、15U/μg、16U/μg、17U/μg、18U/μg、19U/μg、または20U/μgの濃度で提供される。

10

【0225】

幾つかの実施形態では、末端エキソヌクレアーゼでの消化ステップは、約1時間～約24時間、例えば、約1時間～約12時間である。例えば、消化ステップは、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、または24時間である。幾つかの実施形態では、消化ステップは、2時間～12時間（例えば、2～5時間、2～4時間、または2～3時間）である。

20

【0226】

幾つかの実施形態では、末端エキソヌクレアーゼでの試料の消化は、約30℃～約42℃（例えば、約32℃～約40℃、例えば、約35℃～約40℃、例えば、約37℃）で実行される。例えば、消化ステップは、約30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、または42℃で実行され得る。幾つかの実施形態では、末端エキソヌクレアーゼでの試料の消化は、約37℃で実行される。

30

【0227】

幾つかの例では、エキソヌクレアーゼ消化の直後に末端エキソヌクレアーゼの熱不活性化が実行されない。

【0228】

幾つかの例では、末端エキソヌクレアーゼ消化は、スーパーコイル形成後（例えば、スーパーコイル形成直後）に実施される。あるいは、末端エキソヌクレアーゼ消化は、スーパーコイル形成前（例えば、スーパーコイル形成直前）に実施される。幾つかの実施形態では、末端エキソヌクレアーゼ消化は、スーパーコイル形成と同時に実施される。

40

【0229】

G. 精製／沈殿

本明細書に記載の方法のいずれかの幾つかの実施形態では、本方法は、例えば、イソプロパノール沈殿により、治療用環状DNAベクターを沈殿させることを更に含む。

【0230】

幾つかの実施形態では、沈殿の前に、治療用環状DNAベクター（例えば、スーパーコイル環状DNAベクター）を含有する溶液は、例えば、0.22μmのフィルターを通して、無菌濾過される。溶液は、当技術分野において公知であり、かつ本明細書に記載される方法によりIPAを含有する緩衝液中に再構成され得る。幾つかの実施形態では、上記のセクションFからの無菌濾液は、760mMのNaCl、50mMのMOPS、15%

50

のイソプロピルアルコール（IPA）、及び0.15%のTriton X-100（v/v）の最終濃度でIPA緩衝液中に再構成される。平衡化したQIAGEN-tipカラム（Qiagenプラスミドキット）にIPA緩衝液中の治療用環状DNAベクター（例えば、スーパーコイル環状DNAベクター）が添加され、カラムが洗浄され、内容物が溶出される。35mLの溶出当たり24.5mLのIPA緩衝液が添加される。次いで、試料が4℃にて15,000gで30分間遠心分離されるIPA沈殿が実行され得る。乾燥させたペレットは、水または目的の最終緩衝液中に再懸濁され得る。

【0231】

幾つかの実施形態では、精製／沈殿（例えば、単回の精製／沈殿ステップ、例えば、1回以下の精製／沈殿ステップ）後の得られた治療用環状DNAベクターの量は、治療用配列の少なくとも2倍の数（例えば、治療用配列の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍；例えば、2倍～1,000倍、2倍～500倍、2倍～100倍、2倍～50倍、2倍～40倍、2倍～30倍、2倍～20倍、または2倍～10倍；例えば、5倍～1,000倍、5倍～500倍、5倍～100倍、5倍～50倍、5倍～40倍、5倍～30倍、5倍～20倍、または5倍～10倍；例えば、10倍～1,000倍、10倍～500倍、10倍～100倍、10倍～50倍、10倍～40倍、10倍～30倍、または10倍～20倍；例えば、2倍～5倍、5倍～10倍、10倍～20倍、20倍～30倍、30倍～40倍、40倍～50倍、50倍～60倍、60倍～70倍、70倍～80倍、80倍～90倍、90倍～100倍、100倍～200倍、200倍～500倍、または500倍～1,000倍；例えば、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、または約100倍の数）、それが生成されたテンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の量である。幾つかの実施形態では、精製／沈殿（例えば、単回の精製／沈殿ステップ、例えば、1回以下の精製／沈殿ステップ）後の得られた治療用環状DNAベクターの量は、それが生成されたテンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の少なくとも3倍の量である。追加的または代替的に、精製／沈殿（例えば、単回の精製／沈殿ステップ、例えば、1回以下の精製／沈殿ステップ）後の得られた治療用環状DNAベクターの量は、少なくとも1.0mg（例えば、1.0mg～10g、1.0mg～5.0g、1.0mg～1.0g、1.0mg～500mg、1.0mg～200mg、1.0mg～100mg、1.0mg～50mg、1.0mg～25mg、1.0mg～20mg、1.0mg～15mg、1.0mg～10mg、1.0mg～5.0mg、2.0mg～10g、2.0mg～5.0g、2.0mg～1.0g、2.0mg～500mg、2.0mg～200mg、2.0mg～100mg、2.0mg～50mg、2.0mg～25mg、2.0mg～20mg、2.0mg～15mg、2.0mg～10mg、2.0mg～5.0mg、5.0mg～10g、5.0mg～5.0g、5.0mg～1.0g、5.0mg～500mg、5.0mg～200mg、5.0mg～100mg、5.0mg～50mg、5.0mg～25mg、5.0mg～20mg、5.0mg～15mg、5.0mg～10mg、10mg～10g、10mg～5.0g、10mg～1.0g、10mg～500mg、10mg～200mg、10mg～100mg、10mg～50mg、10mg～25mg、10mg～20mg、または10mg～15mg）である。幾つかの実施形態では、精製／沈殿（例えば、単回の精製／沈殿ステップ、例えば、1回以下の精製／沈殿ステップ）後の得られた治療用環状DNAベクターの量は、少なくとも2.0mgである。

【0232】

幾つかの例では、本発明の方法により生成される治療用環状DNAベクターの量（質量）は、生成における増幅時のテンプレートDNA（例えば、プラスミドDNAベクター）

投入量の少なくとも2倍の量（質量）（例えば、生成における増幅時のテンプレートDNA（例えば、プラスミドDNAベクター）投入量の少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、または少なくとも10倍の質量；例えば、生成における増幅時のテンプレートDNA（例えば、プラスミドDNAベクター）投入量の2倍～20倍、2倍～15倍、2倍～13倍、3倍～10倍、または4倍～8倍の質量；例えば、生成における増幅時のテンプレートDNA（例えば、プラスミドDNAベクター）投入量の約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約11倍、約12倍、または約13倍の質量）である。

【0233】

10

IV．治療用環状DNAベクター

本明細書において、本明細書に記載される生成方法のいずれかにより生成された治療用環状DNAベクターが提供される。幾つかの例では、かかる治療用環状DNAベクターは、例えば、AAVベクターと同様の様式で、細胞内で（例えば、分裂細胞または静止細胞、例えば、有糸分裂後細胞内で）エピソームとして持続する。本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、治療用環状DNAベクターは、非組み込み型ベクターであり得る。本明細書において提供される治療用環状DNAベクターは、ウイルスベクター（例えば、ウイルスタンパク質）及び細菌プラスミドDNAに固有の構成要素、例えば、免疫原性成分（例えば、免疫原性細菌シグネチャ（例えば、CpGアイランドまたはCpGモチーフ））、または追加的にもしくは別様に持続性の低減に関連する成分（例えば、CpGアイランドまたはCpGモチーフ）を欠く裸のDNAベクターであり得る。本明細書に記載されるように生成される治療用環状DNAベクターは、1つ以上の治療用配列を特徴とし、プラスミド骨格エレメント（例えば、細菌のエレメント、例えば、（i）細菌の複製開始点及び／または（ii）薬剤耐性遺伝子）及び組換え部位を欠いてもよい。

20

【0234】

本明細書において提供される治療用環状DNAベクターは、ウイルスベクター（例えば、ウイルスタンパク質）及び細菌プラスミドDNAに固有の構成要素、例えば、免疫原性成分（例えば、免疫原性細菌シグネチャ（例えば、CpGアイランド））、または追加的にもしくは別様に持続性の低減に関連する成分（例えば、CpGアイランド）を欠く裸のDNAベクターであり得る。例えば、幾つかの実施形態では、ベクターは、DNAのうちの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または本質的に全て）が細菌プラスミドDNAの1つ以上のエレメント、例えば、免疫原性成分（例えば、免疫原性細菌シグネチャ（例えば、CpGのモチーフ））、または追加的にもしくは別様に持続性の低減に関連する成分（例えば、CpGアイランド）を欠くDNAを含む。幾つかの実施形態では、DNAのうちの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または本質的に全て）がCpGメチル化を欠く。幾つかの実施形態では、ベクターは、DNAのうちの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または本質的に全て）が細菌メチル化シグネチャ、例えば、Damメチル化及びDcmメチル化を欠くDNAを含む。例えば、幾つかの実施形態では、ベクターは、GATC配列のうちの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または本質的に全て）が（例えば、Damメチラーゼにより）メチル化されていないDNAを含む。追加的または代替的に、ベクターは、CCAGG配列及び／またはCCTGG配列のうちの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または本質的に全て）が（例えば、Dcmメチラーゼにより）メチル化されていないDNAを含む。

30

40

50

【0235】

幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、インビボで持続的である（例えば、治療用環状DNAベクターは、参照ベクター、例えば、細菌において生成されるか、または本発明のベクターに存在しない1つ以上の細菌シグネチャを有する環状DNAベクター、例えば、プラスミドDNAと比較して改善された発現持続性（例えば、細胞内持続性及び／または継世代持続性）及び／または治療持続性を示す）。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターの発現持続性は、参照ベクターと比べて5%～50%高いか、50%～100%高いか、1倍～5倍、または5倍～10倍（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれ以上）高い。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターの細胞内持続性は、参照ベクターと比べて5%～50%高いか、50%～100%高いか、1倍～5倍、または5倍～10倍（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれ以上）高い。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターの継世代持続性は、参照ベクターと比べて5%～50%高いか、50%～100%高いか、1倍～5倍、または5倍～10倍（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれ以上）高い。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターの治療持続性は、参照ベクターと比べて5%～50%高いか、50%～100%高いか、1倍～5倍、または5倍～10倍（例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれ以上）高い。幾つかの実施形態では、参照ベクターは、（a）それと比較される治療用環状DNAベクターと同じ治療用配列を有し、（b）細菌において生成され、及び／またはそれと比較される治療用環状DNAベクターに存在しない1つ以上の細菌シグネチャを有する環状ベクターまたはプラスミドであり、当該シグネチャとしては、例えば、抗生物質耐性遺伝子または細菌の複製開始点が挙げられ得る。

【0236】

幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターの発現は、投与後1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月、1年、またはより長期間持続する。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、投与後1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月、1年、またはより長期間の細胞内持続性及び／または継世代持続性を示す。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターの治療持続性は、投与後1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月、1年、またはより長期間持続する。

【0237】

幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターの発現及び／または治療効果は、1週間～4週間、1ヵ月～4ヵ月、または4ヵ月～1年（例えば、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも1月、またはより長期間）持続する。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターの発現レベルは、形質移入後1週間以上、例えば、2週間、3週間、5週間、7週間、9週間以上、13週間以上、18週間以上、最初の1、2、または3日以内に観察されるレベルから90%超、50%超、または10%超の減少を示さない。

【0238】

治療用環状DNAベクターは、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体などであり得る。幾つかの好ましい実施形態では、環状DNAベクターは、単量体である。幾つかの実施形態では、DNAベクターは、例えば、トポイソメラーゼ（例えば、ギラーゼ）での処理後に、スーパーコイルを形成している。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、単量体のスーパーコイル環状DNA分子である。幾つかの実施形態では

、治療用環状DNAベクターは、切れ目が入っている。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、開環状である。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、二本鎖環状である。

【0239】

治療用配列

本明細書に記載される治療用環状DNAベクターは、1つ以上のタンパク質コードドメイン及び／または1つ以上の非タンパクコードドメインを含み得る治療用配列（例えば、治療用核酸）を有する。

【0240】

治療用タンパク質をコードする治療用ドメインを含む具体的な実施形態では、治療用配列は、5'→3'方向に連結された以下を含む：プロモーター及び単一の治療用タンパク質コードドメイン（例えば、単一の転写単位）；プロモーター及び2つ以上の治療用タンパク質コードドメイン（例えば、多シストロン性の単位）；または第1の転写単位及び1つ以上の追加の転写単位（例えば、複数の転写単位）。タンパク質をコードする任意のかかる治療用配列は、非タンパク質コードドメイン、例えば、ポリアデニル化部位、調節エレメント、エンハンサー、DNAを標識するための配列（例えば、抗体認識配列）、PCR増幅部位、制限酵素部位を規定する配列、部位特異的リコンビナーゼ認識部位、核酸に結合し、及び／またはこれを修飾するタンパク質により認識される配列、リンカー、スプライス部位、プレmRNA結合ドメイン、調節配列、及び／または治療用核酸（例えば、マイクロRNAをコードする配列）を更に含み得る。治療用タンパク質コードドメインは、（例えば、天然遺伝子またはその天然のバリエーションに対応する）全長タンパク質またはその機能部分をコードするドメイン、例えば、切断型タンパク質をコードするドメイン（例えば、ミニ遺伝子）であり得る。

【0241】

幾つかの実施形態では、治療用配列は、単量体タンパク質（例えば、生理的条件下で二次構造を有する単量体タンパク質、例えば、生理的条件下で二次及び三次構造を有する単量体タンパク質、例えば、生理的条件下で二次、三次、及び四次構造を有する単量体タンパク質）をコードする。追加的または代替的に、治療用配列は、多量体タンパク質（例えば、二量体タンパク質（例えば、ホモ二量体タンパク質またはヘテロ二量体タンパク質）、三量体タンパク質など）をコードし得る。

【0242】

幾つかの実施形態では、治療用配列は、抗体、またはその一部、断片、もしくはバリエーションをコードする。抗体は、抗原に結合することができる断片、例えば、Fv、単鎖Fv（scFv）、Fab、Fab'、ジscFv、sdAb（単ドメイン抗体）、（Fab'）₂（化学的に連結されたF（ab'）₂が含まれる）、及びナノボディを包含する。抗体のパイン消化は、「Fab」断片と称され、各々が単一の抗原結合部位を有する2つの同一の抗原結合断片及び残りの「Fc」断片を生じさせ、「Fc」断片の名称は、容易に結晶化する能力を反映している。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋させることができるF（ab'）₂断片を生じさせる。抗体は、キメラ抗体及びヒト化抗体も包含する。更に、本明細書において揭示される全ての抗体構築物について、他の生物由来の配列を有するバリエーションも意図される。従って、抗体のヒトバージョンが開示される場合、当業者は、ヒト配列ベースの抗体をマウス、ラット、ネコ、イヌ、ウマなどの配列に変換する方法を理解するであろう。抗体断片は、いずれの配向性の単鎖scFv、タンデム型ジscFv、ダイアボディ、タンデム型トリsd c F v、ミニボディ、ナノボディなども包含する。幾つかの実施形態では、例えば、抗体がscFvである場合、治療用遺伝子配列の単一のポリヌクレオチドは、互いに連結された重鎖及び軽鎖を含む単一のポリペプチドをコードする。抗体断片は、ナノボディ（例えば、sdAb、単一の単量体ドメインを有する抗体、例えば、軽鎖のない対の重鎖可変ドメイン）も包含する。多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、三重特異性抗体など）は、当技術分野において公知であり、本発明の治療用遺伝子配列の発現産物として意図される。

【0243】

幾つかの例では、治療用配列は、各々が少なくとも25アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも100アミノ酸、少なくとも200アミノ酸、少なくとも500アミノ酸、少なくとも1,000アミノ酸、少なくとも1,500アミノ酸、少なくとも2,000アミノ酸、少なくとも2,500アミノ酸、少なくとも3,000アミノ酸、またはそれ以上（例えば、25～5,000アミノ酸から、50～5,000アミノ酸、100～5,000アミノ酸、200～5,000アミノ酸、500～5,000アミノ酸、1,000～5,000アミノ酸、1,500～5,000アミノ酸、または2,000～5,000アミノ酸；例えば、25～4,000アミノ酸、50～4,000アミノ酸、100～4,000アミノ酸、200～4,000アミノ酸、500～4,000アミノ酸、1,000～4,000アミノ酸、1,500～4,000アミノ酸、または2,000～4,000アミノ酸；例えば、25～3,000アミノ酸、50～3,000アミノ酸、100～3,000アミノ酸、200～3,000アミノ酸、500～3,000アミノ酸、1,000～3,000アミノ酸、1,500～3,000アミノ酸、または2,000～3,000アミノ酸）の長さを有する1種以上のタンパク質（例えば、単一のタンパク質、2種のタンパク質、3種のタンパク質、4種のタンパク質、またはそれ以上）をコードする。かかる治療用配列が2種以上のタンパク質をコードする実施形態では、治療用配列は、多シストロン性治療用配列または複数の転写単位の治療用配列であり得る。

10

【0244】

幾つかの実施形態では、治療用配列は、眼タンパク質をコードする。特定の実施形態では、眼タンパク質は、ABCA4である。例示的なヒトABCA4配列は、NCBI参照配列：NG_009073またはNM_000350として提供される。

20

【0245】

タンパク質をコードしない治療用配列を含む実施形態では、治療用配列は、タンパク質コードドメイン（例えば、治療用タンパク質コードドメイン）を欠く。例えば、幾つかの実施形態では、治療用配列は、タンパク質をコードしない治療用核酸、例えば、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）コード配列または免疫を活性化する治療用核酸（例えば、TLRアゴニスト）を含む。

【0246】

幾つかの実施形態では、治療用配列は、0.1Kb～100Kbの長さである（例えば、治療用遺伝子配列は、0.2Kb～90Kb、0.5Kb～80Kb、1.0Kb～70Kb、1.5Kb～60Kb、2.0Kb～50Kb、2.5Kb～45Kb、3.0Kb～40Kb、3.5Kb～35Kb、4.0Kb～30Kb、4.5Kb～25Kb、4.6Kb～24Kb、4.7Kb～23Kb、4.8Kb～22Kb、4.9Kb～21Kb、5.0Kb～20Kb、5.5Kb～18Kb、6.0Kb～17Kb、6.5Kb～16Kb、7.0Kb～15Kb、7.5Kb～14Kb、8.0Kb～13Kb、8.5Kb～12.5Kb、9.0Kb～12.0Kb、9.5Kb～11.5Kb、または10.0Kb～11.0Kbの長さ、例えば、0.1Kb～0.5Kb、0.5Kb～1.0Kb、1.0Kb～2.5Kb、2.5Kb～4.5Kb、4.5Kb～8Kb、8Kb～10Kb、10Kb～15Kb、15Kb～20Kb、またはそれ以上の長さ、例えば、0.1Kb～0.25Kb、0.25Kb～0.5Kb、0.5Kb～1.0Kb、1.0Kb～1.5Kb、1.5Kb～2.0Kb、2.0Kb～2.5Kb、2.5Kb～3.0Kb、3.0Kb～3.5Kb、3.5Kb～4.0Kb、4.0Kb～4.5Kb、4.5Kb～5.0Kb、5.0Kb～5.5Kb、5.5Kb～6.0Kb、6.0Kb～6.5Kb、6.5Kb～7.0Kb、7.0Kb～7.5Kb、7.5Kb～8.0Kb、8.0Kb～8.5Kb、8.5Kb～9.0Kb、9.0Kb～9.5Kb、9.5Kb～10Kb、10Kb～10.5Kb、10.5Kb～11Kb、11Kb～11.5Kb、11.5Kb～12Kb、12Kb～12.5Kb、12.5Kb～13Kb、13Kb～13.5Kb、13.5Kb～14Kb、14Kb

30

40

50

～14.5 Kb、14.5 Kb～15 Kb、15 Kb～15.5 Kb、15.5 Kb～16 Kb、16 Kb～16.5 Kb、16.5 Kb～17 Kb、17 Kb～17.5 Kb、17.5 Kb～18 Kb、18 Kb～18.5 Kb、18.5 Kb～19 Kb、19 Kb～19.5 Kb、19.5 Kb～20 Kb、20 Kb～21 Kb、21 Kb～22 Kb、22 Kb～23 Kb、23 Kb～24 Kb、24 Kb～25 Kb、またはそれ以上の長さ、例えば、約4.5 Kb、約5.0 Kb、約5.5 Kb、約6.0 Kb、約6.5 Kb、約7.0 Kb、約7.5 Kb、約8.0 Kb、約8.5 Kb、約9.0 Kb、約9.5 Kb、約10 Kb、約11 Kb、約12 Kb、約13 Kb、約14 Kb、約15 Kb、約16 Kb、約17 Kb、約18 Kb、約19 Kb、約20 Kb、またはそれ以上の長さである）。幾つかの実施形態では、治療用配列は、少なくとも10 Kb（例えば、10 Kb～15 Kb、15 Kb～20 Kb、または20 Kb～30 Kb；例えば、10 Kb～13 Kb、10 Kb～12 Kb、または10 Kb～11 Kb；例えば、10～11 Kb、11～12 Kb、12～13 Kb、13～14 Kb、または14～15 Kb）である。幾つかの実施形態では、治療用配列は、少なくとも1,100 bpの長さ（例えば、1,100 bp～10,000 bp、1,100 bp～8,000 bp、または1,100 bp～5,000 bpの長さ）である。幾つかの実施形態では、治療用配列は、少なくとも2,500 bpの長さ（例えば、2,500 bp～15,000 bp、2,500 bp～10,000 bp、または2,500 bp～5,000 bpの長さ；例えば、2,500 bp～5,000 bp、5,000 bp～7,500 bp、7,500 bp～10,000 bp、10,000 bp～12,500 bp、または12,500 bp～15,000 bp）である。幾つかの実施形態では、治療用配列は、少なくとも8,000 bp、少なくとも9,000 bp、少なくとも10,000 bp、少なくとも11,000 bp、少なくとも12,000 bp、少なくとも13,000 bp、少なくとも14,000 bp、少なくとも15,000 bp、少なくとも16,000 bp（例えば、11,000 bp～16,000 bp、12,000 bp～16,000 bp、13,000 bp～16,000 bp、14,000 bp～16,000 bp、または15,000 bp～16,000 bp）である。特定の実施形態では、治療用配列は、タンパク質をコードするほど十分に長く、オリゴヌクレオチド療法ではない（例えば、アンチセンス、siRNA、shRNA療法などではない）。

10

20

30

40

50

【0247】

幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターにおける治療用配列の3'末端は、30 bp以下（例えば、3 bp～24 bp、4 bp～18 bp、5 bp～12 bp、または6 bp～10 bp；例えば、3 bp～5 bp、4 bp～6 bp、8 bp～12 bp、12 bp～18 bp、18 bp～24 bp、または24 bp～30 bp；例えば、3 bp、4 bp、5 bp、6 bp、7 bp、または8 bp）の非細菌配列により治療用配列の5'末端に連結されている。例えば、本明細書に記載されるIIS型制限酵素を使用して生成される治療用環状DNAベクターのいずれかにおいて、治療用配列の3'末端は、IIS型制限酵素切断部位の付着末端またはオーバーハング（例えば、TTTT、AAAA、またはAACC）に対応する非細菌配列により治療用配列の5'末端に連結されていてもよい。幾つかの例では、IIS型制限酵素切断部位の付着末端またはオーバーハングは、4個の塩基を含み（またはそれからなる）、ここで、当該4個の塩基のうちの2個のみがAまたはTである（例えば、AACCまたはTTGG）。幾つかの例では、IIS型制限酵素切断部位の付着末端またはオーバーハングは、4個の塩基を含み（またはそれからなる）、ここで、当該4個の塩基のうちの2個のみがAである（例えば、AACC）。幾つかの例では、IIS型制限酵素切断部位の付着末端またはオーバーハングは、4個の塩基を含み（またはそれからなる）、ここで、当該4個の塩基のうちの2個のみがTである（例えば、TTGG）。

【0248】

幾つかの実施形態では、治療用配列は、治療用タンパク質をコードするドメインまたは治療用タンパク質をコードしないドメインに加えてレポーター配列を含む。かかるレポ-

ター遺伝子は、例えば、特定の細胞及び組織における、治療用遺伝子配列の発現を確認するのに有用であり得る。導入遺伝子に加えられ得るレポーター配列としては、限定されるものではないが、 β -ラクタマーゼ、 β -ガラクトシダーゼ (LacZ)、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、及び当該技術分野において周知の他のものをコードするDNA配列が挙げられる。発現を駆動する調節エレメントと連結されている場合、レポーター配列は、酵素学的アッセイ、放射線アッセイ、比色アッセイ、蛍光アッセイ、または他の分光学的アッセイ、蛍光活性化セルソーティングアッセイ、及び免疫学的アッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、放射免疫測定法 (RIA)、及び免疫組織染色が含まれる従来手段により検出可能なシグナルをもたらす。例えば、マーカー配列がLacZ遺伝子である場合、シグナルをもたらすベクターの存在は、 β -ガラクトシダーゼ活性のアッセイにより検出される。導入遺伝子が緑色蛍光タンパク質またはルシフェラーゼである場合、シグナルをもたらすベクターは、ルミノメーターでの色生成または光生成により視覚的に測定され得る。

10

【0249】

幾つかの実施形態では、治療用配列は、レポーター配列を欠く。

【0250】

本発明の治療用環状DNAベクターは、標的細胞にける転写、翻訳、及び／または発現を調節または改善する従来調節エレメントを治療用配列の一部として含み得る。好適な調節エレメントは、国際公開第WO2021/055760号に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0251】

幾つかの例では、本発明の治療用環状DNAベクターのいずれかは、自己複製RNA分子をコードする。かかる自己複製RNA分子は、標的細胞への送達後にレプリカーゼ（またはレプリカーゼ／トランスクリプターゼ）に翻訳されるプラス鎖レプリコンを有することを特徴とする、アルファウイルスに由来するレプリカーゼ配列を含む。レプリカーゼは、ポリタンパク質として翻訳され、ポリタンパク質は自己切断して、複製複合体を生じ、複製複合体は送達されたプラス鎖RNAのマイナス鎖ゲノムコピーを作成する。これらのマイナス鎖転写物は、それ自体が転写されて、プラス鎖親RNAの更なるコピーを生じ得、更にサブゲノム転写物（例えば、調節配列）も生じ得る。これにより、サブゲノム転写物の翻訳は、感染細胞による調節タンパク質の生体内原位置での発現をもたらす。

30

【0252】

本発明のレプリカーゼコード配列が由来し得るアルファウイルスの非限定的な例としては、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEE)、セムリキ森林ウイルス (SF)、シンドビスウイルス (SIN)、東部ウマ脳炎ウイルス (EEE)、西部ウマ脳炎ウイルス (WEE)、エバングレーズウイルス (EVE)、ムカンボウイルス (MUC)、ピクスナウイルス (Pixunavirus) (PIX)、セムリキ森林ウイルス (SF)、ミデルブルグウイルス (MID)、チクングンヤウイルス (CHIK)、オニョンニョンウイルス (ONN)、ロスリバーウイルス (RR)、バーマ森林ウイルス (BF)、ゲタウイルス (GET)、サギヤマウイルス (SAG)、ベバルウイルス (BEB)、マヤロウイルス (MAY)、ウナウイルス (UNA)、アウラウイルス (AURA)、ババンキウイルス (BAB)、ハイランズJウイルス (HJ)、及びフォートモーガンウイルス (FM) が挙げられる。本発明の具体的な例では、自己複製RNA分子は、VEEレプリカーゼまたはそのバリエーションを含む。

40

【0253】

変異型または野生型ウイルス配列が使用され得る。例えば、幾つかの例では、自己複製RNAは、VEEレプリカーゼの減弱されたTC83変異型を含む。例えば、Yingzhong et al., Sci Rep. 2019, 9:6932（この方法論は参照により本明細書に組み込まれる）により教示されるような、インビトロ進化法により得られる変異型レプリカーゼ（例えば、変異型VEEレプリカーゼ）が含まれる、レプリカー

50

ぜにおける他の変異が本明細書において意図される。

【0254】

幾つかの例では、自己複製RNA分子は、(i)レプリカーゼコード配列(例えば、自己複製RNA分子からRNAを転写することができるRNA依存性RNAポリメラーゼをコードするRNA配列)及び(ii)異種の調節遺伝子を含む。ポリメラーゼは、アルファウイルスレプリカーゼ、例えば、1つ、2つ、3つ、または4つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質であるnsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4を含むアルファウイルスレプリカーゼであり得る。幾つかの例では、ポリメラーゼは、VEEレプリカーゼ、例えば、1つ、2つ、3つ、または4つ全てのアルファウイルス非構造タンパク質であるnsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4を含むVEEレプリカーゼである。

10

【0255】

本発明の幾つかの例では、自己複製RNA分子は、アルファウイルス構造タンパク質(例えば、カプシドタンパク質)をコードしない。かかる自己複製RNAは、細胞内でそれ自身のゲノムRNAコピーの生成を引き起こすことができるが、RNAを含有するウイルス粒子の生成を引き起こすことはできない。これらのウイルス粒子を生成できないことは、自己複製RNA分子が、野生型アルファウイルスとは異なり、それ自身を感染型で永続させることができないことを意味する。アルファウイルス構造タンパク質は、サブゲノム転写物がアルファウイルス粒子の構造タンパク質ではなく異種調節タンパク質(複数可)をコードするように、関心対象の異種調節タンパク質(複数可)をコードする遺伝子(複数可)と置き換えられ得る。

20

【0256】

従って、幾つかの例では、本発明の自己複製RNA分子は、2つのオープンリーディングフレームを有し得る。第1の(5')オープンリーディングフレームはレプリカーゼをコードし、第2の(3')オープンリーディングフレームは1種以上(例えば、2種または3種)の治療用タンパク質をコードする。幾つかの実施形態では、RNAは、例えば、更なる遺伝子をコードするための、または付属ポリペプチドをコードするための、追加の(例えば、下流の)オープンリーディングフレームを有し得る。

【0257】

好適な自己複製RNA分子は、様々な長さを有し得る。本発明の幾つかの実施形態では、自己複製RNA分子の長さは、5,000~50,000ヌクレオチド(すなわち、5kb~50kb)である。幾つかの例では、自己複製RNA分子は、5kb~20kbの長さ(例えば、6kb~18kb、7kb~16kb、8kb~14kb、または9kb~12kbの長さ、例えば、5kb~6kb、6kb~7kb、7kb~8kb、8kb~9kb、9kb~10kb、10kb~11kb、11kb~12kb、12kb~13kb、13kb~14kb、14kb~15kb、15kb~16kb、16kb~18kb、または18kb~20kbの長さ、例えば、約5kb、約6kb、約7kb、約8kb、約9kb、約10kb、約10.5kb、約11kb、約11.5kb、約12kb、約12.5kb、約13kb、約14kb、約15kb、約16kb、約17kb、約18kb、約19kb、または約20kbの長さ)である。

30

【0258】

自己複製RNA分子は、3'ポリA尾部を有し得る。加えて、自己複製RNA分子は、ポリAポリメラーゼ認識配列(例えば、AAUAAA)を含み得る。

40

【0259】

特定の実施形態では、本発明によるRNAは、レポーター分子、例えば、ルシフェラーゼまたは蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードしない。

【0260】

幾つかの実施形態では、自己複製RNAによりコードされるレプリカーゼは、本明細書に記載されるレプリカーゼのいずれかのバリエーションであり得る。幾つかの実施形態では、バリエーションは、機能断片(例えば、タンパク質と機能的に類似しているか、または機能的に同等であるタンパク質断片)である。

50

【0261】

V. 医薬組成物

効率の改善により、本発明の方法は、治療用環状DNAベクターを含有する医薬組成物のスケラブルな製造に特に適したものになる。本明細書に記載される治療用環状DNAベクターを生成させる方法のいずれかは、薬学的に許容される担体中に治療用環状DNAベクターを含有する医薬組成物の生成に適してもよい。

【0262】

本明細書において、治療用環状DNAベクター（例えば、治療用スーパーコイル環状DNAベクター）を含有する医薬製剤を生成させる方法が提供される。幾つかの実施形態では、かかる方法は、以下のステップを含む。最初に、治療用遺伝子配列及び骨格配列を有するプラスミドDNAベクターを含有する試料が提供される。プラスミドDNAベクターは、直鎖状コンカテマーを生成させるために、ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して増幅される。次に、直鎖状コンカテマーは、単位毎に直鎖状コンカテマーの少なくとも第1の部位及び第2の部位を切断する制限酵素により消化され、ここで、当該第1及び第2の部位は、治療用配列に隣接している。この消化により、治療用配列を有する直鎖状治療用断片及び骨格配列を有する直鎖状骨格断片が生成される。次いで、直鎖状治療用断片は、弛緩した環状のDNAベクターを生成させるためにセルフライゲーションされ、次いで、これはスーパーコイル環状DNAベクターを生成させるためにトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触される。幾つかの実施形態では、直鎖状細菌断片は、末端エキソヌクレアーゼにより消化される。

【0263】

ある特定の例では、治療用環状DNAベクターを含有する医薬製剤を生成させる方法は、以下のステップを含む。治療用配列及び骨格配列を有するプラスミドDNAベクターを含有する試料が提供される。プラスミドDNAベクターは、直鎖状コンカテマーを生成させるために、ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して増幅される。次に、直鎖状コンカテマーは、単位毎に直鎖状コンカテマーの少なくとも第1の部位及び第2の部位を切断する制限酵素により消化され、ここで、当該第1及び第2の部位は、治療用配列に隣接している。この消化により、治療用配列を有する直鎖状治療用断片及び骨格配列を有する直鎖状骨格断片が生成される。次いで、直鎖状治療用断片は、環状DNAベクターを生成させるためにセルフライゲーションされ、直鎖状骨格断片は、末端ヌクレアーゼにより消化される。幾つかの実施形態では、環状DNAベクターは、スーパーコイル環状DNAベクターを生成させるためにトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触される。

【0264】

幾つかの例では、治療用環状DNAベクターを含有する医薬製剤を生成させる方法は、以下のステップを含む。治療用配列及び骨格配列を含むプラスミドDNAベクターを含む試料が提供される。プラスミドDNAベクターは、直鎖状コンカテマーを生成させるために、ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して増幅される。次に、直鎖状コンカテマーは、直鎖状コンカテマーの単位毎に少なくとも第1の部位、第2の部位、及び第3の部位を切断する制限酵素（例えば、IIS型制限酵素、例えば、BsaI）により消化される。第1及び第2の部位は、治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、第3の部位は、骨格配列内に存在し、第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成する。消化により、治療用配列を有する直鎖状治療用断片及び各々が骨格配列の一部を含む少なくとも2つの直鎖状骨格断片が生成される。直鎖状治療用断片は、溶液中に治療用環状DNAベクターを生成させるためにリガーゼと接触される。

【0265】

幾つかの実施形態では、制限酵素が単位毎に直鎖状コンカテマーの第4の部位を切断し、ここで、当該第4の部位は、骨格配列内に存在し、第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、消化により、各々が骨格配列の一部を含む少なくとも3つの直

鎖状骨格断片が生成される。

【0266】

幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触される。かかる反応は、約37℃で実行され得る。追加的または代替的に、治療用環状DNAベクターは、（例えば、約37℃で実行される反応において）末端エキソヌクレアーゼと接触され得る。特定の実施形態では、治療用環状DNAベクターは、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触され、その後、反応温度を上昇させて、トポイソメラーゼまたはヘリカーゼを不活性化することなく、治療用環状DNAベクターは、末端エキソヌクレアーゼと接触される。

【0267】

幾つかの実施形態では、本方法は、治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼもしくはヘリカーゼ及び／または末端エキソヌクレアーゼと接触させた後に、治療用環状DNAベクターをカラム（例えば、捕捉カラム）に通すことを含む。幾つかの実施形態では、治療用環状DNAベクターは、次いで、イソプロピルアルコールで沈殿される。

【0268】

上述の方法は、多量かつ高純度の治療用環状DNAベクター（例えば、治療用スーパーコイル環状DNAベクター）を含有する医薬製剤を生成させることができる。従って、本発明は、本明細書に記載される医薬製剤のいずれかを含む。幾つかの実施形態では、本発明の医薬製剤は、治療用配列が生成されるプラスミドDNAベクターの試料と比べて少なくとも2倍の数の治療用配列を含有する。幾つかの実施形態では、医薬製剤は、プラスミドDNAベクターの試料と比べて少なくとも5倍の数の治療用配列を含有する。幾つかの実施形態では、医薬製剤は、プラスミドDNAベクターの試料と比べて少なくとも10倍の数の治療用配列を含有する。

【0269】

特定の実施形態では、本発明の医薬製剤（例えば、本明細書に記載される方法のいずれかにより生成される医薬組成物）は、治療用配列が生成されるテンプレートDNAベクター（例えば、プラスミドDNAベクター）の試料と比べて少なくとも2倍の数の治療用配列（例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍；例えば、2倍～1,000倍、2倍～500倍、2倍～100倍、2倍～50倍、2倍～40倍、2倍～30倍、2倍～20倍、または2倍～10倍；例えば、5倍～1,000倍、5倍～500倍、5倍～100倍、5倍～50倍、5倍～40倍、5倍～30倍、5倍～20倍、または5倍～10倍；例えば、10倍～1,000倍、10倍～500倍、10倍～40倍、10倍～30倍、または10倍～20倍；例えば、2倍～5倍、5倍～10倍、10倍～20倍、20倍～30倍、30倍～40倍、40倍～50倍、50倍～60倍、60倍～70倍、70倍～80倍、80倍～90倍、90倍～100倍、100倍～200倍、200倍～500倍、または500倍～1,000倍；例えば、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、または約100倍の数の治療用配列）を含有する。

【0270】

幾つかの実施形態では、本発明の医薬製剤（例えば、本明細書に記載される方法のいずれかにより生成される医薬組成物）は、薬学的に許容される担体中の少なくとも1.0mgの治療用環状DNAベクターを含有する（例えば、1.0mg～10g、1.0mg～5.0g、1.0mg～1.0g、1.0mg～500mg、1.0mg～200mg、1.0mg～100mg、1.0mg～50mg、1.0mg～25mg、1.0mg～20mg、1.0mg～15mg、1.0mg～10mg、1.0mg～5.0mg、2

・ 0 mg ~ 10 g、2. 0 mg ~ 5. 0 g、2. 0 mg ~ 1. 0 g、2. 0 mg ~ 500 mg、2. 0 mg ~ 200 mg、2. 0 mg ~ 100 mg、2. 0 mg ~ 50 mg、2. 0 mg ~ 25 mg、2. 0 mg ~ 20 mg、2. 0 mg ~ 15 mg、2. 0 mg ~ 10 mg、2. 0 mg ~ 5. 0 mg、5. 0 mg ~ 10 g、5. 0 mg ~ 5. 0 g、5. 0 mg ~ 1. 0 g、5. 0 mg ~ 500 mg、5. 0 mg ~ 200 mg、5. 0 mg ~ 100 mg、5. 0 mg ~ 50 mg、5. 0 mg ~ 25 mg、5. 0 mg ~ 20 mg、5. 0 mg ~ 15 mg、5. 0 mg ~ 10 mg、10 mg ~ 10 g、10 mg ~ 5. 0 g、10 mg ~ 1. 0 g、10 mg ~ 500 mg、10 mg ~ 200 mg、10 mg ~ 100 mg、10 mg ~ 50 mg、10 mg ~ 25 mg、10 mg ~ 20 mg、または10 mg ~ 15 mg)。

10

【0271】

幾つかの実施形態では、本発明の医薬製剤（例えば、本明細書に記載される方法のいずれかにより生成される医薬組成物）は、薬学的に許容される担体中の少なくとも2. 0 mgの治療用環状DNAベクターを含有する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法のいずれかにより生成される医薬製剤は、薬学的に許容される担体中の少なくとも5. 0 mgの治療用環状DNAベクターを含有する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法のいずれかにより生成される医薬製剤は、薬学的に許容される担体中の少なくとも10. 0 mgの治療用環状DNAベクターを含有する。

【0272】

幾つかの実施形態では、本発明の医薬製剤（例えば、本明細書に記載される方法（例えば、治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを含む方法）により生成される医薬組成物）は、少なくとも60%がスーパーコイル単量体であるか、少なくとも70%がスーパーコイル単量体であるか、少なくとも80%がスーパーコイル単量体であるか、または少なくとも90%がスーパーコイル単量体である治療用環状DNAベクター（例えば、60%~80%のスーパーコイル単量体、60%~90%のスーパーコイル単量体、60%~95%のスーパーコイル単量体、60%~99%のスーパーコイル単量体、60%~99. 5%のスーパーコイル単量体、60%~99. 9%のスーパーコイル単量体、65%~80%のスーパーコイル単量体、65%~90%のスーパーコイル単量体、65%~95%のスーパーコイル単量体、65%~99%のスーパーコイル単量体、65%~99. 5%のスーパーコイル単量体、65%~99. 9%のスーパーコイル単量体、70%~80%のスーパーコイル単量体、70%~90%のスーパーコイル単量体、70%~95%のスーパーコイル単量体、70%~99%のスーパーコイル単量体、70%~99. 5%のスーパーコイル単量体、70%~99. 9%のスーパーコイル単量体、75%~80%のスーパーコイル単量体、75%~90%のスーパーコイル単量体、75%~95%のスーパーコイル単量体、75%~99%のスーパーコイル単量体、75%~99. 5%のスーパーコイル単量体、75%~99. 9%のスーパーコイル単量体、80%~85%のスーパーコイル単量体、80%~90%のスーパーコイル単量体、80%~95%のスーパーコイル単量体、80%~99%のスーパーコイル単量体、80%~99. 5%のスーパーコイル単量体、80%~99. 9%のスーパーコイル単量体、85%~90%のスーパーコイル単量体、85%~95%のスーパーコイル単量体、85%~99%のスーパーコイル単量体、85%~99. 5%のスーパーコイル単量体、85%~99. 9%のスーパーコイル単量体、90%~95%のスーパーコイル単量体、90%~99%のスーパーコイル単量体、90%~99. 5%のスーパーコイル単量体、90%~99. 9%のスーパーコイル単量体、95%~99%のスーパーコイル単量体、95%~99. 5%のスーパーコイル単量体、95%~99. 9%のスーパーコイル単量体、98%~99%のスーパーコイル単量体、98%~99. 5%のスーパーコイル単量体、または98%~99. 9%のスーパーコイル単量体；例えば、約60%のスーパーコイル単量体、約65%のスーパーコイル単量体、約70%のスーパーコイル単量体、約75%のスーパーコイル単量体、約80%のスーパーコイル単量体、約85%のスーパーコイル単量体、約90%のスーパーコイル単量体、約95%のスーパーコイル単量体

20

30

40

50

、約 96% のスーパーコイル単量体、約 97% のスーパーコイル単量体、約 98% のスーパーコイル単量体、約 99% のスーパーコイル単量体、または約 99.9% のスーパーコイル単量体) を含有する。これらの例のいずれかにおいて、スーパーコイル単量体は、(例えば、以下の実施例 5 に記載されるように) ゲル電気泳動のデンシトメトリー分析を使用して算出される。

【0273】

他の実施形態では、本発明の医薬製剤(例えば、本明細書に記載される方法(例えば、治療用環状 DNA ベクターがトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触されない方法)により生成される医薬組成物)は、スーパーコイルを形成していない(すなわち、弛緩した環状の DNA である)治療用環状 DNA ベクターを含有する。

【0274】

幾つかの実施形態では、スーパーコイル単量体百分率は、アガロースゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動により決定される。追加的または代替的に、スーパーコイル単量体百分率は、陰イオン交換 HPLC により決定される。

【0275】

幾つかの実施形態では、本発明の医薬製剤(例えば、本明細書に記載される方法により生成される医薬組成物)は、不純物を実質的に欠く。例えば、幾つかの実施形態では、医薬製剤は、1.0 質量%未満のタンパク質含有量(例えば、0.9 質量%未満、0.8 質量%未満、0.7 質量%未満、0.6 質量%未満、0.5 質量%未満、0.4 質量%未満、0.3 質量%未満、0.2 質量%未満、0.1 質量%未満、0.05 質量%未満、または 0.01 質量%未満のタンパク質含有量)を有する。幾つかの例では、タンパク質含有量は、ビシンコニン酸アッセイにより決定される。追加的または代替的に、タンパク質含有量は、ELISA により決定される。

【0276】

幾つかの例では、本発明の医薬製剤(例えば、本明細書に記載される方法により生成される医薬組成物)は、1.0 質量%未満の RNA 含有量(例えば、0.9 質量%未満、0.8 質量%未満、0.7 質量%未満、0.6 質量%未満、0.5 質量%未満、0.4 質量%未満、0.3 質量%未満、0.2 質量%未満、0.1 質量%未満、0.05 質量%未満、または 0.01 質量%未満の RNA 含有量)を有する。幾つかの実施形態では、RNA 含有量は、アガロースゲル電気泳動により決定される。幾つかの実施形態では、RNA 含有量は、定量 PCR により決定される。幾つかの実施形態では、RNA 含有量は、蛍光アッセイ(例えば、Ribogreen)により決定される。

【0277】

幾つかの実施形態では、本発明の医薬製剤(例えば、本明細書に記載される方法により生成される医薬組成物)は、1.0 質量%未満の gDNA 含有量(例えば、0.9 質量%未満、0.8 質量%未満、0.7 質量%未満、0.6 質量%未満、0.5 質量%未満、0.4 質量%未満、0.3 質量%未満、0.2 質量%未満、0.1 質量%未満、0.05 質量%未満、または 0.01 質量%未満の gDNA 含有量)を有する。幾つかの実施形態では、gDNA 含有量は、アガロースゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動により決定される。幾つかの実施形態では、gDNA 含有量は、定量 PCR により決定される。幾つかの実施形態では、gDNA 含有量は、サザンブロットにより決定される。

【0278】

幾つかの実施形態では、本発明の医薬製剤(例えば、本明細書に記載される方法により生成される医薬組成物)は、40 EU/mg 未満のエンドトキシンを含有する。幾つかの実施形態では、医薬製剤は、20 EU/mg 未満のエンドトキシンを含有する。幾つかの実施形態では、医薬製剤は、10 EU/mg 未満のエンドトキシンを含有する。幾つかの実施形態では、医薬製剤は、例えば、カプトガニ血球抽出物(LAL)アッセイにより測定されるように、5 EU/mg 未満のエンドトキシン(例えば、4 EU/mg 未満のエンドトキシン、3 EU/mg 未満のエンドトキシン、2 EU/mg 未満のエンドトキシン、1 EU/mg 未満のエンドトキシン、0.5 EU/mg 未満のエンドトキシン)を含有す

10

20

30

40

50

る。

【0279】

本明細書において提供される医薬組成物は、用いられる投与量及び濃度で処置される個体（例えば、ヒト患者）に対して無毒性である1種以上の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤及び／または安定剤を含み得る。幾つかの実施形態では、薬学的に許容される担体は、pH緩衝水溶液である。薬学的に許容される担体の例としては、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸が含まれる抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンが含まれる単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；及び／またはTween、ポリエチレングリコール（PEG）、及びプルロニックなどの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

10

【0280】

医薬組成物が液体形態で提供される場合、薬学的に許容される担体は、水（例えば、発熱物質を含まない水）、等張食塩水、または緩衝水溶液、例えば、リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液であり得る。水または緩衝液、例えば、ナトリウム塩（例えば、少なくとも50mMのナトリウム塩）、カルシウム塩（例えば、少なくとも0.01mMのカルシウム塩）、もしくはカリウム塩（例えば、少なくとも3mMのカリウム塩）を含有する水性緩衝液中の医薬組成物の注射が実行され得る。特定の実施形態によれば、ナトリウム塩、カルシウム塩、またはカリウム塩は、それらのハロゲン化物、例えば、塩化物、ヨウ化物、または臭化物の形態、それらの水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩、または硫酸塩などの形態で存在し得る。限定されるものではないが、ナトリウム塩の例としては、NaCl、NaI、NaBr、Na₂CO₂、NaHCO₂、及びNa₂SO₄が挙げられる。カリウム塩の例としては、例えば、KCl、KI、KBr、K₂CO₂、KHCO₂、及びK₂SO₄が挙げられる。カルシウム塩の例としては、例えば、CaCl₂、CaI₂、CaBr₂、CaCO₂、CaSO₄、及びCa(OH)₂が挙げられる。更に、上述のカチオンの有機アニオンが緩衝液中に含有され得る。特定の実施形態によれば、上記に記載される注射目的に適した緩衝液は、塩化ナトリウム（NaCl）、塩化カルシウム（CaCl₂）、または塩化カリウム（KCl）から選択される塩を含有し得、ここで、更なるアニオンが存在し得る。CaCl₂がKClなどの別の塩と交換されてもよい。幾つかの実施形態では、注射緩衝液中の塩は、少なくとも50mMの塩化ナトリウム（NaCl）、少なくとも3mMの塩化カリウム（KCl）、及び少なくとも0.01mMの塩化カルシウム（CaCl₂）の濃度で存在する。注射緩衝液は、特定の参照媒体を基準にして高張、等張、または低張であってもよく、すなわち、緩衝液は、特定の参照媒体を基準にして、より高いか、同じであるか、またはより低い塩含有量を有していてもよく、好ましくは、浸透圧または他の濃度効果による細胞の損傷を引き起こさない、上述の塩のかかる濃度が使用され得る。参照媒体は、血液、リンパ液、細胞質液、他の体液、または一般的な緩衝液などの液体であり得る。かかる一般的な緩衝液または液体は、当業者に公知である。乳酸リンゲル液が液体基剤として特に好ましい。

20

30

40

【0281】

1種以上の適合可能な固体または液体の充填剤、希釈剤、またはカプセル化材料が人間への投与に適していてもよい。本発明による医薬組成物の構成成分は、典型的な使用条件下で本発明による（医薬）組成物の薬学的有効性を実質的に低減する相互作用が生じないような様式で、本明細書に記載される本発明による核酸ベクターと混合することが可能である。薬学的に許容される担体、充填剤、及び希釈剤は、処置される個体への投与に適したものとなるように、十分に高い純度かつ十分に低い毒性を有し得る。薬学的に許容される担体、充填剤、またはそれらの構成成分として使用され得る化合物の幾つかの例は、ラクトース、グルコース、トレハロース、及びスクロースなどの糖；トウモロコシデンプン

50

もしくはジャガイモデンプンなどのデンプン；デキストロース；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、酢酸セルロースなどのセルロース及びその誘導体；トラガント末；麦芽；ゼラチン；獣脂；ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウムなどの固体グリダント；硫酸カルシウム；落花生油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及びカカオ由来の油などの植物油；ポリプロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、マンニトール、及びポリエチレングリコールなどのポリオール；またはアルギン酸である。

【0282】

薬学的に許容される担体の選択は、医薬組成物が投与される方法に応じて決定され得る。

10

【0283】

注射に適した単位剤形としては、水、生理食塩水、及びそれらの混合物の無菌溶液が挙げられる。かかる溶液のpHは、約7.4に調整され得る。注射に適した担体としては、ハイドロゲル、制御放出または遅延放出のためのデバイス、ポリ乳酸、及びコラーゲンマトリックスが挙げられる。局所適用に適した薬学的に許容される担体としては、ローション、クリーム、ゲルなどへの使用に適したものが挙げられる。医薬組成物が経口投与される場合、錠剤、カプセルなどが好ましい単位剤形である。

【0284】

医薬組成物に含まれ得る更なる添加剤は、Tweenなどの乳化剤；ラウリル硫酸ナトリウムなどの湿潤剤；着色剤；薬学的担体；安定剤；抗酸化剤；及び防腐剤である。

20

【0285】

本発明による医薬組成物は、液体または乾燥（例えば、凍結乾燥）形態で提供され得る。特定の実施形態では、医薬組成物の核酸ベクターは、凍結乾燥形態で提供される。本発明の核酸ベクターを含む凍結乾燥組成物は、投与前に、有利には水性担体をベースとする好適な緩衝液、例えば、乳酸リンゲル液、リンゲル液、またはリン酸緩衝液中に再構成され得る。

【0286】

本発明のある特定の実施形態では、本発明の治療用環状DNAベクターのいずれかは、1種以上のカチオン性またはポリカチオン性の化合物、例えば、カチオン性もしくはポリカチオン性のポリマー、カチオン性もしくはポリカチオン性のペプチドもしくはタンパク質、例えば、プロタミン、カチオン性もしくはポリカチオン性の多糖類、及び／またはカチオン性もしくはポリカチオン性の脂質と複合体化され得る。

30

【0287】

特定の実施形態によれば、本発明の治療用環状DNAベクターは、1種以上のリポソーム、リポブックス、または脂質ナノ粒子を形成させるために、脂質と複合体化され得る。従って、一実施形態では、医薬組成物は、治療用環状DNAベクターを含むリポソーム、リポブックス、及び／または脂質ナノ粒子を含む。

【0288】

脂質ベースの製剤は、その生体適合性及びその大規模製造の容易さのために、核酸ベクターの効果的な送達系であり得る。カチオン性脂質は、核酸の送達のための合成材料として広く研究されている。混合後、核酸はカチオン性脂質により凝縮されて、リポブックスとして公知の脂質／核酸複合体を形成する。これらの脂質複合体は、ヌクレアーゼの作用から遺伝物質を保護することができ、負に荷電した細胞膜と相互作用することにより遺伝物質を細胞内に送達することができる。リポブックスは、生理的pHで正に荷電した脂質を負に荷電した核酸と直接混合することにより調製され得る。

40

【0289】

従来のリポソームは、カチオン性、アニオン性、または中性のリン脂質及びコレステロールから構成され得る脂質二重層からなり、脂質二重層は水性コアを取り囲んでいる。脂質二重層及び水性空間の両方に、それぞれ疎水性または親水性の化合物が組み込まれ得る。リポソームの特性及びインビボでの挙動は、親水性ポリマーコーティング、例えば、ポ

50

リエチレングリコール（PEG）をリポソーム表面に付加して、立体安定化をもたらすことによって改変され得る。更に、リポソームは、リガンド（例えば、抗体、ペプチド、及び炭水化物）をその表面または結合させたPEG鎖の末端に結合させることによって特異的標的化に使用され得る。

【0290】

リポソームは、水性区画を取り囲むリン脂質二重層から構成されるコロイド脂質ベースかつ界面活性剤ベースの送達系である。リポソームは、球状の小胞として存在し得、サイズは20nm～数ミクロンの範囲であり得る。カチオン性脂質ベースのリポソームは、負に荷電した核酸と静電的相互作用により複合体を形成することができ、これにより、インビボでの臨床適用に必要とされる生体適合性、低毒性、及び大規模製造の実現性を示す複合体をもたらす。リポソームは、取り込みのために形質膜と融合することができる。細胞内に入ると、リポソームがエンドサイトーシス経路によりプロセッシングされ、次いで、遺伝物質がエンドソーム／担体から細胞質に放出される。

10

【0291】

カチオン性リポソームは、治療用環状DNAベクターの送達系として機能し得る。カチオン性脂質、例えば、MAP、（1，2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン）、及びDOTMA（N-[1-（2，3-ジオレオイルオキシ）プロピル]-N，N，N-トリメチルアンモニウムメチルスルファート）は、静電的相互作用により負に荷電した核酸と複合体またはリポプレックスを形成して、ナノ粒子を形成することができ、これにより、インビトロでの高い形質移入効率をもたらす。更に、核酸ベクター送達のための中性脂質ベースのナノリポソーム、例えば、中性1，2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスファチジルコリン（DOPC）ベースのナノリポソームが利用可能である。

20

【0292】

従って、本発明の一実施形態では、本発明の治療用環状DNAベクターは、カチオン性脂質及び／または中性脂質と複合体を形成し、これにより、本発明の医薬組成物中でリポソーム、脂質ナノ粒子、リポプレックス、または中性脂質ベースのナノリポソームを形成する。

【0293】

特定の実施形態では、本発明による医薬組成物は、カチオン性もしくはポリカチオン性の化合物及び／またはポリマー担体と共に製剤化されている本発明の治療用環状DNAベクターを含む。従って、本発明の更なる実施形態では、本明細書に記載される治療用環状DNAベクターは、任意により、約5：1（w/w）～約0.25：1（w/w）、例えば、約5：1（w/w）～約0.5：1（w/w）、例えば、約4：1（w/w）～約1：1（w/w）、もしくは約3：1（w/w）～約1：1（w/w）、例えば、約3：1（w/w）～約2：1（w/w）の範囲から選択される核酸ベクター対カチオン性もしくはポリカチオン性の化合物及び／またはポリマー担体の重量比で、または任意により、約0.1～10の範囲、例えば、約0.3～4もしくは0.3～1の範囲、例えば、約0.5～1もしくは0.7～1の範囲、例えば、約0.3～0.9もしくは0.5～0.9の範囲の核酸ベクター対カチオン性もしくはポリカチオン性の化合物及び／またはポリマー担体の窒素／リン酸（N/P）比で、カチオン性もしくはポリカチオン性の化合物またはポリマー担体と会合しているか、または複合体を形成している。例えば、治療用環状DNAベクター対1種以上のポリカチオンのN/P比は、約0.3～4、約0.5～2、約0.7～2、及び約0.7～1.5の範囲が含まれる、約0.1～10の範囲である。

30

40

【0294】

本明細書に記載される核酸ベクターは、形質移入効率及び／または本発明による調節遺伝子の発現を増加させるために、ビヒクル、トランスフェクション剤、または複合体形成剤と会合していてもよい。

【0295】

幾つかの例では、本発明による治療用環状DNAベクターは、1種以上のポリカチオン

50

、好ましくは、プロタミンまたはオリゴフェクタミンと複合体を形成している。トランスフェクション剤または複合体形成剤として使用され得る更なるカチオン性またはポリカチオン性の化合物としては、カチオン性多糖類、例えば、キトサン、ポリブレン、カチオン性ポリマー、例えば、ポリエチレンジイミン（PEI）、カチオン性脂質、例えば、DOTMA：[1-（2，3-ジオレイルオキシ）プロピル]-N，N，N-トリメチルアンモニウムクロリド、DMRIE、ジ-C14-アミジン、DOTIM、SAINT、DC-Chol、BGT C、CTAP、DOPE、LEAP、DOPE：ジオレイルホスファチジルエタノールアミン、DOSPA、DODAB、DOIC、DMEPC、DOGS：ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン、DIMRI：ジミリストオキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、MAP：ジオレオイルオキシ-3-（トリメチルアンモニオ）プロパン、DC-6-14：O，O-ジテトラデカノイル-N-（ α -トリメチルアンモニオアセチル）ジエタノールアミンクロリド、CLIP1：rac-[（2，3-ジオクタデシルオキシプロピル）（2-ヒドロキシエチル）]-ジメチルアンモニウムクロリド、CLIP6：rac-[2（2，3-ジヘキサデシルオキシプロピル-オキシメチルオキシ）エチル]トリメチルアンモニウム、CLIP9：rac-[2（2，3-ジヘキサデシルオキシプロピル-オキシスクシニルオキシ）エチル]-トリメチルアンモニウム、オリゴフェクタミン、またはカチオン性もしくはポリカチオン性のポリマー、例えば、修飾ポリアミノ酸、例えば、 β -アミノ酸ポリマーもしくは逆ポリアミド（reversed polyamide）など、修飾ポリエチレン、例えば、PVP（ポリ（N-エチル-4-ビニルピリジニウムブロミド））など、修飾アクリレート、例えば、pDMAEMA（ポリ（ジメチルアミノエチルメチルアクリレート））など、修飾アミドアミン、例えば、pAMAM（ポリ（アミドアミン））など、修飾ポリ β -アミノエステル（PBAE）、例えば、ジアミン末端修飾1，4-ブタンジオールジアクリレート-co-5-アミノ-1-ペンタノールポリマーなど、デンドリマー、例えば、ポリプロピルアミンデンドリマーまたはpAMAM系デンドリマーなど、ポリイミン（類）、例えば、PEI：ポリ（エチレンジイミン）、ポリ（プロピレンジイミン）など、ポリアリルアミン、糖骨格系ポリマー、例えば、シクロデキストリン系ポリマー、デキストラン系ポリマー、キトサンなど、シラン骨格系ポリマー、例えばPMOXA-PDMSコポリマーなど、1つ以上のカチオン性ブロック（例えば、上記のようなカチオン性ポリマーから選択される）及び1つ以上の親水性または疎水性ブロック（例えばポリエチレングリコール）の組み合わせからなるブロックポリマーなどが挙げられ得る。

【0296】

特定の実施形態によると、本発明の医薬組成物は、ポリマー担体内に封入されるか、またはポリマー担体に付着した核酸ベクター（例えば、環状DNAベクター）を含む。本発明に従って使用されるポリマー担体は、ジスルフィド架橋されたカチオン性成分により形成されるポリマー担体であり得る。ジスルフィド架橋されるカチオン性成分は、互いに同じであっても異なってもよい。ポリマー担体は、更なる成分を含有してもよい。本発明に従って使用されるポリマー担体が、本明細書に記載されるようにジスルフィド結合により架橋されている、カチオン性のペプチド、タンパク質、またはポリマー、及び任意に本明細書に記載される更なる成分の混合物を含むことも特に好ましい。この文脈において、WO2012/013326の開示が参照により本明細書に組み込まれる。この文脈において、ジスルフィド架橋によりポリマー担体の基礎を形成するカチオン性成分は、通常、この目的に適した任意の好適なカチオン性またはポリカチオン性のペプチド、タンパク質、またはポリマー、特に本明細書に記載される核酸ベクターまたは組成物に含まれる更なる核酸を複合体化させ、これにより、好ましくは核酸ベクターを凝縮させることができる任意のカチオン性またはポリカチオン性のペプチド、タンパク質、またはポリマーから選択される。カチオン性またはポリカチオン性のペプチド、タンパク質、またはポリマーは、直鎖状分子であってもよいが、分岐したカチオン性またはポリカチオン性のペプチド、タンパク質、またはポリマーが使用されてもよい。

【0297】

本発明の医薬組成物の一部として含まれる本発明による治療用環状DNAベクターを複合体形成させるために使用され得る、ポリマー担体のジスルフィド架橋している全てのカチオン性またはポリカチオン性のタンパク質、ペプチド、またはポリマーは、凝縮の際に本明細書において言及されるようなポリマー担体のカチオン性成分としての少なくとも1つの更なるカチオン性またはポリカチオン性のタンパク質、ペプチド、またはポリマーとジスルフィド結合を形成することができる少なくとも1つのSH部分（例えば、少なくとも1つのシステイン残基、またはSH部分を示す任意の更なる化学基）を含有し得る。

【0298】

本発明の治療用環状DNAベクターを複合体化させるために使用されるかかるポリマー担体は、ジスルフィド架橋されたカチオン性（またはポリカチオン性）成分により形成されていてもよい。特に、少なくとも1つのSH部分を含むか、または少なくとも1つのSH部分を含むように更に修飾されている、ポリマー担体のかかるカチオン性またはポリカチオン性のペプチドまたはタンパク質またはポリマーは、複合体形成剤としてタンパク質、ペプチド、及びポリマーから選択され得る。

【0299】

他の実施形態では、好適な緩衝液中の本発明による治療用環状DNAベクターは、なんらの更なるビヒクル、トランスフェクション剤、または複合体形成剤と会合させることなく裸で投与され得る。

【0300】

VI. 使用方法

本明細書において、（例えば、遺伝子治療レジメンの一部として）治療用配列の発現（例えば、持続的発現）を誘発する必要がある対象に、本明細書に記載される治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物のいずれかを投与することにより、当該対象における治療用配列の発現（例えば、持続的発現）を誘発する方法が提供される。送達された治療用配列の存在（例えば、持続性）を検出または定量化するために、例えば、サザンブロットティングまたはPCR分析により、宿主細胞の核酸配列（例えば、RNA配列、例えば、mRNA配列）を検査することにより、対象の標的細胞または組織が特徴付けられ得る。あるいは、治療用配列の送達により処置されている（例えば、治療用配列により標的とされる欠損または変異に関連する）疾患の進行をモニタリングすることにより対象における治療用配列の発現が（例えば、定量的または質的に）特徴付けられ得る。幾つかの実施形態では、治療用配列の転写または発現（例えば、持続的転写または持続的発現）は、疾患に関連する1つ以上の症状の減退を観察することにより確認される。

【0301】

従って、本発明は、本明細書に記載される治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物のいずれかを対象に投与することにより当該対象の疾患を処置する方法を提供する。本明細書に記載される治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物のいずれかは、1 μ g ~ 10 mg のDNA（例えば、5 μ g ~ 5.0 mg、10 μ g ~ 2.0 mg、または100 μ g ~ 1.0 mg のDNA、例えば、10 μ g ~ 20 μ g、20 μ g ~ 30 μ g、30 μ g ~ 40 μ g、40 μ g ~ 50 μ g、50 μ g ~ 75 μ g、75 μ g ~ 100 μ g、100 μ g ~ 200 μ g、200 μ g ~ 300 μ g、300 μ g ~ 400 μ g、400 μ g ~ 500 μ g、500 μ g ~ 1.0 mg、1.0 mg ~ 5.0 mg、または5.0 mg ~ 10 mg のDNA、例えば、約10 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、約100 μ g、約150 μ g、約200 μ g、約250 μ g、約300 μ g、約350 μ g、約400 μ g、約450 μ g、約500 μ g、約600 μ g、約700 μ g、約750 μ g、約1.0 mg、約2.0 mg、約2.5 mg、約5.0 mg、約7.5 mg、または約10 mg のDNA）の投与量で対象に投与され得る。

【0302】

幾つかの実施形態では、本発明の治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物の投与は、他の遺伝子治療ベクター（例えば、プラスミドDNAベクター及びウイルスベクター

一) の投与と比較して対象における免疫応答を誘発する可能性が低い。

【0303】

幾つかの例では、本明細書において提供される治療用環状DNAベクター及びその医薬組成物は、上記のように、免疫応答を引き起こすことなく、またはプラスミドDNAベクターもしくはAAVベクターなどの参照ベクターと比較して低減された免疫応答を誘発して、標的細胞を形質移入するそれらの能力に起因して反復投与に適している。従って、本発明は、本明細書に記載される治療用環状DNAベクター及び医薬組成物を反復投与する方法を提供する。上述の投与量のいずれかが、好適な頻度及び期間で繰り返され得る。幾つかの実施形態では、対象は、約1日2回、約1日1回、約週5回、約週4回、約週3回、約週2回、約週1回、約月2回、約月1回、約6週間毎に1回、約2ヵ月毎に1回、約3ヵ月毎に1回、約4ヵ月毎に1回、年2回、年1回、またはより低い頻度で投与を受ける。幾つかの実施形態では、投与回数及び頻度は、標的細胞のターンオーバー速度と一致する。本明細書に記載されるベクターを使用して形質移入された有糸分裂後の長命の標的細胞では、ベクターの単回投与が標的細胞内での異種遺伝子の発現を長期間維持するのに十分であり得ることが理解されよう。従って、他の実施形態では、本明細書において提供される治療用環状DNAベクターは、単回投与で対象に投与され得る。治療用環状DNAベクターが対象に送達される機会の回数は、臨床効果（例えば、治療効果）を維持するために必要とされる回数であり得る。

10

【0304】

本発明の方法は、任意の好適な経路による治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物の投与を含む。治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物は、全身的または局所的に、例えば、静脈内に、眼に（例えば、硝子体内に、網膜下に、点眼により、眼内に、眼窩内に）、筋肉内に、硝子体内に（例えば、硝子体内注射により）、皮内に、肝内に、大脳内に、筋肉内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、クモ膜下腔内に、鼻腔内に、腔内に、直腸内に、腫瘍内に、皮下に、結膜下に、膀胱内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、経口的に、局所的に、経皮的に、吸入により、エアロゾル投与により、注射により（例えば、ジェット注射により）、エレクトロポレーションにより、移植により、注入により（例えば、持続注入により）、標的細胞を直接浸す局所灌流により、カテーテルにより、洗浄により、クリームにより、または脂質組成物により投与され得る。

20

30

【0305】

本明細書に記載される治療用環状DNAベクターは、インビボでの電氣的導入（例えば、インビボでのエレクトロポレーション）により細胞に送達され得る。インビボでのエレクトロポレーションは、ある特定の組織、例えば、眼、皮膚、骨格筋、ある特定の腫瘍型、及び肺上皮において実証されている。インビボでのエレクトロポレーションによる細胞への裸のDNAの送達は、標的組織にDNAを投与し、続いて、電場を印加して、細孔を生じさせることにより組織内の細胞膜透過性を一時的に増加させ、これにより、DNA分子が細胞膜を通過するのを可能にすることを含む。一例として、インビボでのエレクトロポレーションを使用した皮膚への送達は、Cha & Daud Hum. Vaccin. Immunother. 2012, 8 (11): 1734-1738（これはその全体が参照により組み込まれる）に記載されている。骨格筋のインビボでのエレクトロポレーションは、Sokolowska & Blachnio-Zabiel ska, Int. J. Molecular Sci. 2019, 20: 2776（これはその全体が参照により組み込まれる）に記載されている。インビボでのエレクトロポレーションを使用した腫瘍内送達は、Aung et al. Gene Therapy 2009, 16: 830-839（これはその全体が参照により組み込まれる）に記載されている。インビボでの肺細胞へのDNAエレクトロポレーションは、Pringle et al. J. Gene Med. 2007, 9: 369-380（これはその全体が参照により組み込まれる）に記載されている。眼の細胞（例えば、網膜細胞及び／または光受容細胞）への環状DNAベクターのインビボでの電氣的導入は、国際特許公開第WO2022/198

40

50

138号（これはその全体が参照により組み込まれる）に記載されている。幾つかの例では、眼への環状DNAベクターの投与後に、電極が眼内（例えば、網膜から約1mm以内）に配置され得、標的細胞への環状DNAベクターの電氣的導入に好適な条件で（例えば、各々が10～100Vの6～10パルスを印加することにより）電極を通して電界が標的組織に伝達され得る。哺乳動物組織に電界を伝達するのに適した電極を備えたデバイス及びシステムは市販されており、本明細書において開示される方法において有用であり得る。幾つかの例では、電界は、ニードル（例えば、ガラス体液内または網膜下腔内に配置されたニードル）を備えた電極を介して伝達される。好適なニードル電極としては、IGE A（商標）により販売されるCLINIPORATOR（商標）電極及びAMBU（商標）により販売されるニードル電極が挙げられる。本発明の方法は、本明細書に記載される治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物のいずれかのインビボでの電氣的導入による皮膚、骨格筋、腫瘍（例えば、黒色腫が含まれる）、眼、及び肺への投与を含む。

10

【0306】

追加的または代替的に、治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物は、例えば、個々の患者から細胞を体外培養し、続いて、例えば、ベクターを取り込んだ細胞を選択した後に、宿主細胞を患者に再移植することにより、エクスピボで宿主細胞に投与され得る。従って、幾つかの態様では、本開示は、疾患を処置するための形質移入された宿主細胞及びその投与方法を提供する。

【0307】

追加的または代替的に、本発明は、疾患または障害を有する対象に本発明の単離DNAベクター（またはその組成物）を投与することにより当該対象を処置する方法を含む。

20

【0308】

本明細書に記載される治療用環状DNAベクターのいずれかの形質移入効率の評価は、当該技術分野において公知であるか、または本明細書に記載される任意の方法を使用して実行され得る。形質移入細胞の単離は、標準的な技術によっても実行され得る。例えば、治療用遺伝子を含む細胞は、可視マーカー、例えば、異種遺伝子を含む細胞または複数の細胞の同定及び単離を補助する、異種遺伝子の配列によりコードされる蛍光タンパク質（例えば、GFP）または他のレポータータンパク質を発現し得る。治療用遺伝子を有する細胞は、例えば、サザンブロッティングまたはPCR分析により宿主細胞の核酸配列（例えば、RNA配列、例えば、mRNA配列）を検査して、ベクターに含まれる異種遺伝子の存在を分析することによっても特徴付けられ得る。

30

【0309】

従って、本発明の方法は、本明細書に記載される治療用環状DNAベクターのいずれかを対象に投与した後、続いて、対象における異種遺伝子の発現を検出することを含む。発現は、投与の1週間～4週間後、投与の1ヵ月～4ヵ月後、投与の4ヵ月～1年後、投与の1年～5年後、または投与の5年～20年後（例えば、投与の少なくとも1週間後、少なくとも2週間後、少なくとも1ヵ月後、少なくとも4ヵ月後、少なくとも1年後、少なくとも2年後、少なくとも5年後、少なくとも10年後）に検出され得る。これらの検出時点のいずれかで、DNAベクターの持続（例えば、エピソームの持続）が観察され得る。幾つかの実施形態では、環状DNAベクターの持続性は、参照ベクター（例えば、細菌において生成されるか、または本発明のベクターに存在しない1つ以上の細菌シグネチャを有する環状ベクター）と比べて5%～50%高い、50%～100%高い、1倍～5倍高い、または5倍～10倍高い（例えば、少なくとも5%高い、10%高い、20%高い、30%高い、40%高い、50%高い、75%高い、1倍高い、2倍高い、3倍高い、4倍高い、5倍高い、6倍高い、7倍高い、8倍高い、9倍高い、10倍高い、またはそれ以上に高い）。

40

【0310】

追加的または代替的に、本発明の治療用環状DNAベクターのいずれかは、例えば、個々の患者から細胞を体外培養し、続いて、例えば、ベクターを取り込んだ細胞を選択した

50

後に、宿主細胞を患者に再移植することにより、エキスピボで宿主細胞に投与され得る。従って、幾つかの態様では、本開示は、形質移入宿主細胞（例えば、電氣的に形質移入された宿主細胞）、宿主細胞に形質移入する方法、及び例えば、対象の疾患を処置するために、宿主細胞を対象に投与する方法を提供する。幾つかの例では、本明細書に記載される治療用環状DNAベクターのいずれかは、既知の方法及びデバイスを使用したエレクトロポレーションにより（例えば、NEONTランスフェクション（Thermo Fisher）または（例えば、各々が参照により組み込まれる、米国特許第9,546,350号または米国特許出願公開第2020/0131500号に記載されるような）フローエレクトロポレーションチャンバーにより）宿主細胞に形質移入され得る。

【0311】

VII. キット及び製造物品

本発明の別の態様では、本明細書に記載される治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物のいずれかを含む製造物品またはキット。製造物品は、容器及び当該容器上のまたは当該容器に付随するラベルまたは添付文書を含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV用溶液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成されていてもよい。容器は、組成物であって、それ自体が状態を処置、予防、及び／または診断するのに有効であるか、または状態を処置、予防、及び／または診断するのに有効である別の組成物と組み合わせられる、当該組成物を保持し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針により貫通可能な栓を有する静脈注射用溶液バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1種の活性薬剤は、本発明の治療用環状DNAベクターまたは当該治療用環状DNAベクターを含む医薬組成物である。ラベルまたは添付文書は、組成物がその内容物により処置可能な状態を処置するために使用されることを示す。更に、製造物品は、（a）組成物が中に収容された第1の容器であって、当該組成物が治療用環状DNAベクターまたはその医薬組成物を含む、当該第1の容器；及び（b）組成物が中に収容された第2の容器であって、当該組成物が追加の治療薬を含む、当該第2の容器を含み得る。製造物品は、組成物を特定の状態を処置するために使用することができることを示す添付文書を更に含み得る。代替的にまたは追加的に、製造物品は、薬学的に許容される担体、例えば、注射用滅菌水（BWF）、リン酸緩衝食塩水、リンガー液、デキストロース溶液、または上記に開示される薬学的に許容される担体のいずれかを含まない第2（または第3）の容器を更に含み得る。製造物品は、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、または他の送達デバイスが含まれる、商業的観点及び利用者の観点から望ましい他の物質を更に含み得る。

【0312】

幾つかの例では、本明細書において提供されるキットは、本明細書に記載される（または本明細書に記載される方法により生成される）治療用環状DNAベクターまたはその組成物（例えば、医薬組成物）のいずれか、及びエレクトロポレーション（例えば、インビトロまたはエキスピボでのエレクトロポレーション）または電氣的導入（例えば、インビボでの電氣的導入）を使用して細胞または細胞の培養物において治療用環状DNAベクターを発現させるための使用説明書を含む。

【実施例】

【0313】

実施例1. 2種の制限酵素を使用した閉じた環状DNAの生成及び精製

治療用環状DNAベクターは、ローリングサークル増幅によりコンカテマーに増幅され得るプラスミドDNAベクターをテンプレートとして使用して、無細胞プロセスにより生成され得る。この実施例は、消化されたDNAのゲル抽出を含むプロセスと、ゲル抽出が必要とされない合理化されたプロセスとを比較するものである。合理化されたプロセスでは、制限酵素消化の直後に（すなわち、ゲル抽出なしに）ライゲーションが続き、望ましくない生成物は、ゲル抽出の代わりに第2の制限酵素を使用して精製される。

【0314】

この実施例に記載されるプロセスは、以下の２種の異なる制限酵素を必要とする：プラスミド骨格と所望のDNA配列との間に存在する２つの部位を切断する第１の制限酵素、及びプラスミド骨格内で少なくとも１回切断して、プラスミド骨格を消化するための第２の制限酵素。

【０３１５】

図１Ａ～１Ｅは、このような二酵素併用プロセスを示す。最初に、閉じた環状DNAの配列に隣接する２つのEcoRI制限部位、及びプラスミドDNA配列内の２つのPvuII制限部位を有するプラスミドDNAをPhi29によるローリングサークル増幅反応で増幅する。試料を65℃で熱不活性化する。次に、EcoRIを試料に添加して、目的の閉じた環状DNA挿入断片を切り取り、これをプラスミドDNA骨格から分離する。この反応を65℃での別の熱不活性化ステップにより停止させる。次に、T4リガーゼを使用して両方の直鎖状生成物を分子内セルフライゲーションさせ、更に別の熱不活性化ステップを65℃で実行する。次いで、試料をPvuIIと接触させて、プラスミド骨格を消化し、閉じた環状DNAをそのままにしておく。ギラーゼを使用して閉じた環状DNAにスーパーコイルを形成させてもよく、エキソヌクレアーゼ、例えば、T5エキソヌクレアーゼまたはPlasmid-Safe (Lucigen)を使用して閉じた環状DNAをプラスミド骨格断片から精製してもよい。

10

【０３１６】

実施例２．テンプレートDNA上の２つの部位を切断する単一のIIS型制限酵素を使用した閉じた環状DNAの生成及び精製のためのプロセス

20

治療用環状DNAベクターは、治療用配列に隣接する２つの部位を切断する単一のIIS型制限酵素を使用してプラスミドDNAから生成される。図２Ａ～２Ｆは、このような単一酵素プロセスを示す。

【０３１７】

プラスミドDNAをテンプレートとして使用する。プラスミドは、治療用配列（C3領域／ペイロードとして図２Ａ及び２Ｂに示される）及び骨格配列（複製開始点、耐性遺伝子、及びBsaI認識部位を有する配列として図２Ａ及び２Ｂに示される）を有する。制限消化前に、（例えば、Phi29ポリメラーゼを使用した）ローリングサークル増幅によりテンプレートを増幅してもよい。

【０３１８】

30

次に、BsaI及びリガーゼを添加する。BsaI酵素は、骨格内の２つのBsaI認識部位を認識し、各々が治療用配列と認識部位との間の切断部位でテンプレート（環状のテンプレートまたはローリングサークル増幅により得られた増幅されたコンカテマーであり得る）を切断して、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片を生成させる。直鎖状治療用断片は治療用配列を有し、直鎖状骨格断片は骨格配列及び２つのBsaI認識部位を有する。ライゲーションにより、直鎖状治療用断片は、図２Ｃ及び２Ｄに示すような治療用環状DNAベクターに環状化し、直鎖状骨格断片は、図２Ｅ及び２Ｆに示すように環状化する。環状骨格断片がBsaI部位を有し、BsaI酵素の存在下でライゲーションが起これるため、BsaIが骨格を切断することができ、治療用環状DNAベクターを切断することはできないことにより、より純粋な治療用環状DNAが生成されるように反応が推進される。エキソヌクレアーゼを添加して、残存する直鎖状骨格を消化し、ギラーゼを添加して、治療用環状DNAベクターにスーパーコイルを形成させる。

40

【０３１９】

実施例３．テンプレートDNA上の４つの部位を切断する単一のIIS型制限酵素を使用した閉じた環状DNAの生成及び精製のためのプロセス

治療用環状DNAベクターを、（１）所望のDNA配列に隣接する２つの部位を切断し、（２）プラスミド骨格内で２回切断して、プラスミド骨格を消化するための単一のIIS型制限酵素を使用して、プラスミドDNAから生成させた。

【０３２０】

図３Ａ～３Ｄは、このような単一酵素プロセスを示す。最初に、閉じた環状DNAの配

50

列に隣接する2つのBsaI制限部位、及びプラスミドDNA配列内の2つのPvuII制限部位を有するプラスミドDNAをPhi29によるローリングサークル増幅反応で増幅した。試料を65℃で熱不活性化した。次に、各単位複製配列内の4つの部位を切断するためにBsaIを試料に添加して、目的の閉じた環状DNA挿入断片を切り取り、これをプラスミドDNA骨格から分離し、プラスミド骨格を消化した。反応を80℃での熱不活性化により停止させた。T4リガーゼを添加して、閉じた環状DNAをセルフライゲーションした。閉じた環状DNAのセルフライゲーションの間に、プラスミドDNAの断片がセルフライゲーションする。そのため、ライゲーション反応の65℃での熱不活性化後、最終BsaI消化ステップを実行して、プラスミド骨格を消化した。次いで、ギラーゼを使用して閉じた環状DNAにスーパーコイルを形成させ、Plasmid-Safeを使用してプラスミド骨格断片から閉じた環状DNAを精製した。

10

【0321】

図4A～4Cは、上記のように生成された3つの閉じた環状DNA構築物を示す。構築物1103は、単一のCMVプロモーター(pCMV)、導入遺伝子、及びポリA尾部を含む1431bpの単一転写単位(TU)ベクターである。構築物1147は、各々がプロモーター及びポリA尾部により挟まれた4つの導入遺伝子を含む6293bpの複合TUベクターである。構築物1258は、単一のプロモーター及び単一のポリA尾部に挟まれた3つの導入遺伝子を含む5065bpの多シストロン性ベクターである。

【0322】

様々な反応条件を3つの構築物で試験した。アニマルフリーBsaI(New England Biolabs)を標準的なBsaIと比較した。加えて、ランダムヘキサマープライマーを特異的プライマーと平行して試験したが、プライマー量は等量ではなかった(特異的プライマーより多量のランダムプライマーを使用した)。閉じた環状DNA導入遺伝子内にPvuII切断部位が含まれる消化対照を含めた(レーン7及び10)。以下の表1は、各ウェルの反応条件を記載する。

20

【表1】

表1. 反応条件

レーン	構築物ID	プライマー	酵素
1	1103	ランダム	標準的なBsaI
2	1103	ランダム	アニマルフリーBsaI
3	1103	特異的	標準的なBsaI
4	1103	特異的	アニマルフリーBsaI
5	1147	ランダム	標準的なBsaI
6	1147	ランダム	アニマルフリーBsaI
7*	1147	ランダム	EcoRI
8	1147	特異的	標準的なBsaI
9	1147	特異的	アニマルフリーBsaI
10*	1147	特異的	EcoRI
11	1258	ランダム	標準的なBsaI
12	1258	ランダム	アニマルフリーBsaI

30

40

【0323】

消化ステップ後の理論的なバンドを示すシミュレーションゲルを図5Bに示し、その対応する実際のゲルを図5Aに示す。シミュレーションのレーン1は、実際のゲルのレーン1～4において予想されるバンドパターンに対応し、実際のゲルのレーン5、6、8、及

50

び 9 において予想されるシミュレーションゲルのレーン 2 は、バンドパターンに対応し、シミュレーションゲルのレーン 3 は、実際のゲルのレーン 7 及び 10 において予想されるバンドパターンに対応し、シミュレーションゲルのレーン 4 は、実際のゲルのレーン 11 及び 12 において予想されるバンドパターンに対応する。全てのバンドパターンは予想通りのようであった。

【0324】

インビトロでのライゲーション後のバンドパターンを示すゲルを図 5 C に示す。ライゲーション中間生成物が各ウェルで観察された。

【0325】

図 5 D は、エキソヌクレアーゼ消化後のバンドパターンを示す。レーン 1 ～ 4 の各々は、試料 1103 の閉じた環状 DNA の予想されるサイズである 1431 bp の DNA サイズに対応する単一の顕著なバンドを有していた。レーン 5 及び 6 の各々は、試料 1147 の閉じた環状 DNA の予想されるサイズである 6293 bp の DNA サイズに対応する単一の顕著なバンドを有していた。レーン 11 及び 12 の各々は、試料 1258 の閉じた環状 DNA の予想されるサイズである 5065 bp の DNA サイズに対応する単一の顕著なバンドを有していた。レーン 7 及び 10 の消化対照は、閉じた環状 DNA 導入遺伝子内の PvuII 切断部位の存在により予想されるように、単一の顕著なバンドを有さなかった。

10

【0326】

実施例 4. 単一の IIS 型制限酵素を使用した c3 DNA の生成及び精製のための合理化されたプロセス

20

実施例 3 に記載されるように、単一の IIS 型制限酵素を使用して閉じた環状 DNA をプラスミド DNA から生成させ（この実施例において「条件 1」と称される）、BsaI 制限消化をライゲーションステップと組み合わせた合理化された変形例のプロセス（「条件 2」）と比較した。条件 1 及び 2 を図 6 に示す。

【0327】

合理化されたプロセスは、IIS 型制限酵素（BsaI）を使用して、認識配列の外側で切断するその能力を利用することにより達成した。出願人はこの特性を利用して、閉じた環状 DNA のセルフライゲーション時に、閉じた環状 DNA に認識部位が確実に存在しないようにした。このようなプロセスのための例示的なテンプレートプラスミド DNA ベクターを図 7 A 及び 7 B に示す。プラスミド骨格のセルフライゲーション時、BsaI 部位は骨格副生成物に限定されており、これにより、プラスミド骨格の酵素切断がもたらされる。その結果、消化／ライゲーション反応の組み合わせは、プラスミド骨格を消化するように進行する一方で、セルフライゲーションした閉じた環状 DNA は、更に消化されることなく蓄積する。

30

【0328】

この合理化されたプロセスは、ライゲーション前に制限消化を熱不活性化する必要性を排除する。代わりに、熱不活性化はライゲーション後に実行した。T4 リガーゼを不活性化するのに十分であるが、BsaI を不活性化するには不十分である 65℃ まで反応温度を上昇させることにより、T4 リガーゼを不活性化した一方で、BsaI 活性はそのままにした。

40

【0329】

本実験では、ランダムプライマー及びアニマルフリー BsaI を使用した。熱不活性化は 10 分間実行し、続いて、DTT を添加して 1 mM の最終濃度にし、T5 エキソヌクレアーゼを添加した。図 8 A はバンドパターンのシミュレーションを示し、図 8 B は実際のゲルを示す。レーン 1 ～ 3 は条件 1 による生成物を含有し、一方でレーン 4 ～ 6 は条件 2 による生成物を含有する。レーン 1 及び 4 は構築物 1103（1431 bp）を含有し、レーン 2 及び 5 は構築物 1147（6293 bp）を含有し、レーン 3 及び 6 は構築物 1258（5065 bp）を含有する。1 Kb Plus DNA ラダー（左のマーカー、Invitrogen、Waltham、MA）及びスーパーコイル DNA ラダー（右の

50

マーカ、New England Biolabs、Ipswich、MA)を使用した。両方の条件が、試験された3つ全ての構築物で正しいサイズのc3DNAの生成をもたらした。従って、BsaIなどのIIS型制限酵素に特有の性質を利用することにより、スーパーコイル形成前のc3DNA生成が緩衝液を交換することなく単一の反応容器で実行されたことが確認された。このことは、c3DNA生成をより単純にし、より高いスループットを可能にする。

【0330】

実施例5. 単回の制限消化を使用したc3DNAの無細胞生成

A. 方法

以下の試薬を1xPhi29緩衝液(New England Biolabs)中で混合して、ローリングサークル増幅(RCA)溶液を調製した: プラスミドDNA(5 µg/mLの最終濃度); ランダムプライマー(50 µMの最終濃度); NaOH(10 mMの最終濃度); dNTP(2 mMの最終濃度); ウシ血清アルブミン(BSA)(0.2 mg/mLの最終濃度); Phi29 DNAポリメラーゼ(200 U/mLの最終濃度); 及びピロホスファターゼ原液(New England Biolabs; 0.4 mU/mLの最終濃度)。RCA溶液を30°Cで18時間混合し続けた。

【0331】

インキュベーション後、65°Cまで温度を上昇させることによりRCA溶液を45分間熱不活性化した。次いで、不活性化したRCA溶液の温度を25°Cまで低下させた。

【0332】

BsaI溶液を作製するために、不活性化したRCA溶液(0.2 mg DNA/mLの最終濃度)を、BsaI(2.5 U/µg DNAの最終濃度)を含有するrCutSmart緩衝液(New England Biolabs; 1x最終濃度)に添加した。BsaI溶液を37°Cで2時間混合し続けた。BsaI溶液に対しては熱不活性化を実行しなかった。消化したBsaI溶液の温度を25°Cまで低下させた。

【0333】

ライゲーション溶液を作製するために、消化したBsaI溶液(40 µg DNA/mLの最終濃度)を、T4リガーゼ(1 µgのDNA当たり10 UのT4リガーゼ)及びリボATP(1 mMの最終濃度)を含有するrCutSmart緩衝液に添加した。ライゲーション溶液を25°Cで2時間インキュベートした。

【0334】

インキュベーション後、65°Cまで温度を上昇させることによりライゲーション溶液を45分間熱不活性化した。次いで、不活性化したライゲーション溶液の温度を37°Cまで低下させた。

【0335】

スーパーコイル形成溶液を作製するために、ライゲーション溶液を、DNAギラーゼ(1 µgのDNA当たり1.5 Uのギラーゼ)を含有するギラーゼ緩衝液に添加した。ギラーゼ緩衝液は、35 mMのTris-HCl、24 mMのKCl、4 mMのMgCl₂、1 mMのATP、2 mMのDTT、1.8 mMのスペルミジン、6.5%のグリセロール(w/v)、及び100 µg/mLのBSAを含有する。スーパーコイル形成溶液を37°Cで少なくとも2時間混合し続けた。スーパーコイル形成溶液に対しては熱不活性化を実行しなかった。

【0336】

次に、スーパーコイル形成溶液を、T5エキソヌクレアーゼ(1 µgのDNA当たり2.5 UのT5エキソヌクレアーゼ)を含有する酢酸カリウム緩衝液(50 mM最終濃度の酢酸カリウム)に添加して、クリーンアップ溶液を作製した。クリーンアップ溶液を37°Cで少なくとも2時間混合し続けた。クリーンアップ溶液に対しては熱不活性化を実行しなかった。

【0337】

次いで、クリーンアップ溶液を0.22 µmのフィルターを通して無菌濾過し、1.5

10

20

30

40

50

MのNaCl、100mMのMOPS、30%のイソプロピルアルコール（IPA）、及び0.3%のTriton X-100（v/v）を含有する緩衝液中に1：1で希釈して、750mMのNaCl、50mMのMOPS、15%のイソプロピルアルコール（IPA）、及び0.15%のTriton X-100（v/v）の最終濃度を得た。希釈したクリーンアップ溶液をQiagenプラスミド分取カラムに添加し、DNAをQC緩衝液で洗浄し、DNAをQN緩衝液で溶出させた。溶出液をIPA（40v/v%）で希釈し、4℃にて15,000gで30分間遠心分離した。ペレットを70%のEtOHで洗浄し、再び4℃にて15,000gで30分間遠心分離した。2回目の遠心分離後、ペレットを1.0mg/mL～2.0mg/mLの濃度でPBS中に再懸濁した。

【0338】

以下で述べるスケールアップされたc3DNA生成では、Image Labソフトウェア（BIO-RAD（登録商標））を使用した電気泳動ゲル試料のデンストメトリー分析によりスーパーコイル単量体を算出した。200ngのc3DNA試料をトリス酢酸-EDTAゲルにロードし、電気泳動を110Vで40分間実行し、その後、1%のEtBrで20分間染色した。各c3DNA試料について、標的バンドをスーパーコイルラダーと比較したそのサイズにより同定し、「Detection Settings」における「Band Detection Sensitivity」は、「Custom Sensitivity」として50の値に設定した。

【0339】

B. 結果

12.75kbのc3DNAの生成

上記の方法を、0.15mgのテンプレートから出発する12.75kbのc3DNA構築物のベンチスケール生成に適用させ、ここでは2ロットのギラーゼを試験した。図9は、両方のギラーゼのロットについて、T5エキソヌクレアーゼ消化後に回収された12.75kbのc3DNAに対応するバンドを示す（レーン1及び2）。

【0340】

c3DNAの大規模生成

本明細書において開示される実施形態の合理化された無細胞プロセス、例えば、中間ゲル抽出を含まないものの1つの利点は、それらが治療用環状DNAベクターの大規模生成（すなわち、バッチ当たり少なくとも2mgの環状DNAベクターを生成する）への拡張性に適していることである。大規模生成方法における反応容量は、少なくとも100mL、少なくとも1L、少なくとも10L、少なくとも100L、少なくとも500L、またはそれ以上であり得、治療用環状DNAベクターの収量は、最初の反応容量（例えば、ローリングサークル増幅溶液）の1リットル当たり少なくとも2mgであり得る。

【0341】

上記の実施例5Aに記載された方法を、種々の治療用配列を有し、サイズ、転写単位の数、及び調節エレメントの数が異なるより多量のc3DNAを生成させるためにスケールアップした。例示的な大規模生成は、150mLの容量のRCA溶液、500mLの容量のBsaI溶液、2.5Lの容量のライゲーション溶液、約3.2Lの容量のスーパーコイル形成溶液、約3.2Lの容量のクリーンアップ溶液、及び2～20mLの容量のc3DNA生成物を伴う。

【0342】

単一の精製ステップ後の各ロットにおけるc3DNAの量は、2mgを超過し、c3DNAが生成されたプラスミドDNAベクターと比較して少なくとも3倍多い量のc3DNA生成物に相当する。各ロットのc3DNAを、インビトロでタンパク質が発現すること（データ非表示）、エンドトキシンレベルが0.5EU/mL以下であること、及びスーパーコイル単量体百分率が70%以上であることを確認した。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：単回の制限消化を使用する無細胞生成により生成される c 3 DNA 構築物の概要

組成	サイズ (b p)
[P] - [RD]	2 7 4 4
[P] - [RD]	3 6 7 7
[P] - [RD]	2 3 8 3
[P] - [TD]	8 4 8 2
[P] - [TD]	7 9 8 5
[P] - [TD] - [TD] - [T D]	4 5 3 7
[P] - [TD] - [A] - [P] - [TD] - [A] - [P] - [TD]	8 0 3 5
[P] - [TD]	3 4 6 6
[P] - [TD]	8 6 5 6
[P] - [RD] - [TD] - [R]	1 0 9 2 7
[P] - [RD] - [TD] - [R]	8 4 2 5
[R] - [P] - [R] - [RD] - [R] - [A]	5 1 6 2
[P] - [R] - [RD] - [A]	2 9 9 1

10

20

[P] = プロモーター；[TD] = 治療用タンパク質コードドメイン；[RD] = レポータータンパク質コードドメイン；[A] = ポリアデニル化部位；[R] = 調節エレメント

【0343】

実施例 6．異なるライゲーション条件の影響

制限酵素による消化後に、直鎖状 DNA に対してライゲーション反応を実行した。この反応における全 DNA 濃度は、 $40 \text{ ng} / \mu\text{L} \sim 100 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の範囲であった。図 10 に示すように、参照として $20 \text{ ng} / \mu\text{L}$ のプラスミド DNA (pDNA) をリガーゼで処理し (レーン 2 及び 3)、参照として $20 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の閉じた環状 DNA をリガーゼで処理した (レーン 4 及び 5)。レーン 6 及び 7 は $40 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の直鎖状 DNA を示し、レーン 8 及び 9 は $100 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の直鎖状 DNA を示し、レーン 10 及び 11 は緩衝液を含有しない $40 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の直鎖状 DNA を示す。レーン 8 及び 9 に示すように、大きな望ましくないバンドが出現し、望ましくない分子間ライゲーションを示す。対照的に、レーン 6 及び 7 は、より少ない望ましくない生成物を示し、直鎖状 DNA 濃度の低減が、(望ましくない) 分子間ライゲーションを低減し、(望ましい) 分子内セルフライゲーションを増加させたことを示す。

30

40

【0344】

図 11 は、リガーゼ酵素の量に変更された別のライゲーション実験を示す。ゲルの左側はマーカー及び事前に制限酵素で処理された直鎖状 DNA の対照反応物である。レーン 1 ～ 3 は、それぞれ $100 \text{ U} / \mu\text{g}$ のリガーゼ、 $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ のリガーゼ、及び $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ のリガーゼで処理された $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ の DNA を示す。レーン 4 ～ 6 は、それぞれ $100 \text{ U} / \mu\text{g}$ のリガーゼ、 $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ のリガーゼ、及び $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ のリガーゼで処理された $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ の DNA を示す。レーン 7 ～ 9 は、それぞれ $100 \text{ U} / \mu\text{g}$ のリガーゼ、 $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ のリガーゼ、及び $5 \text{ U} / \mu\text{g}$ のリガーゼで処理された $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ の DNA を示す。レーン 1 ～ 9 の全てが同量的全 DNA を含有するように、試料をロードする前に試料 4 ～ 9 を $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ に希釈した。レーン 3、6、及び 9 に示すように、5

50

U / μ g リガーゼへのリガーゼ濃度の減少が、目的のバンドとして示される、最も多い量の目的の分子内ライゲーション生成物をもたらした。

【0345】

実施例7．リガーゼ組成の比較

この研究において、合成 C³ DNA 生成のための試薬として比較するために、3種の異なるリガーゼ酵素（T3、T4、及びT7）をNew England Biolabsから購入した。BsaI消化を、1 μ gのDNA当たり2.5 U BsaIのBsaI濃度（500 U / mL）で3時間42分の間実行した。ライゲーション反応を、ATP（1 mM）を含有し、ポリエチレングリコール（PEG）を含有しないrCutSmart（登録商標）緩衝液中のBsaI消化したDNA試料（9,542 bpの構築物サイズ）に

10

【表3】

表3：リガーゼ比較研究の試料条件

試料番号	リガーゼ	DNA濃度	リガーゼ濃度
1	T4	40 μ g / mL	10 U / μ g DNA
2	T4	80 μ g / mL	5 U / μ g DNA
3	T4	80 μ g / mL	10 U / μ g DNA
4	T3	40 μ g / mL	10 U / μ g DNA
5	T3	80 μ g / mL	5 U / μ g DNA
6	T7	40 μ g / mL	10 U / μ g DNA
7	T7	80 μ g / mL	5 U / μ g DNA

20

【0346】

各試料について、リガーゼ反応を様々な時間経過にわたって実行し、ライゲーション終了後に試料を酵素熱不活性化に供した。試料を様々な時点で、かつギラーゼ処理及びその後のT5エキソヌクラーゼ消化後の分析のために回収した。

30

【0347】

図13は、ライゲーション後の各試料のゲルプロファイルを示す。目的の治療用ベクター（C³ DNA）のバンドを黒色のボックス内に示す。試料1～5（T3リガーゼ及びT4リガーゼ）は、同様のゲルプロファイルを示したが、試料6及び7（T7リガーゼ）は、より少ないバンド及びほぼ見えない目的のバンドを示す。

【0348】

図14及び15は、T4リガーゼ（図14）ならびにT3及びT7リガーゼ（図15）での経時変化実験のゲルプロファイルを示す。各試料でのライゲーション動態を経時的な直鎖状DNAの減少として示すように結果を図16の曲線で表す。この研究は、T4リガーゼが最も速いライゲーション動態を示し、T7リガーゼが最小のライゲーション活性を示したことを示唆する。T3は、T4リガーゼより遅い動態を有するが、効果的なリガーゼ活性を示した。総合すると、これらの結果は、T3及びT4の両方が合成環状DNAのセルフライゲーションに適したリガーゼであったことを示す。

40

【0349】

実施例8．合理化修正による高効率ライゲーションの維持

反応容量を低減し、プロセス所要時間を減少させることにより製造効率を改善する試みとして、出願人は、以下の2つのプロセス修正によりもたらされる生成物収量に対する影響を系統的に研究した：（1）ライゲーション反応におけるDNA濃度の増加、及び（2）ライゲーション後の熱不活性化の除去。具体的には、出願人は、（1）より少ないライゲーション反応容量でDNAの濃度を増加させることによりライゲーション反応の容量を

50

低減すること、及び（２）ライゲーション後の熱不活性化ステップ（最長２時間を要する時間のかかるステップ）を除去することによりプロセスを早めることを試みた。これらの２つのプロセス修正の各々は、ライゲーションされたDNAの収量に悪影響を及ぼすと予想された。驚くべきことに、これらのプロセス修正の両方の適用は、収量に対して大きな悪影響を及ぼさなかった。このことは、両方の修正を組み込んだプロセスにより、効率を犠牲にすることなく製造容易性が大きく改善され得ることを示す。研究の詳細を以下に示す。

【 0 3 5 0 】

この研究の最初の実験では、ライゲーション後の熱死滅が以下の異なるサイズの構築物に及ぼす影響を評価した：5，065 kb及び8，656 kb（配列番号1）。要約すると、生成を以下の通りに実行した。Phi29ローリングサークル増幅を使用して、5 μg/mLの濃度のプラスミドDNA、200 U/mLのPhi29、及び2 mMのdNTPから出発して、18時間14分の間、DNAを増幅した。2.5 U/μg（500 U/mL）の濃度のBsaIを用いて2時間10分の間、BsaI消化を実行し、10 U/μgのT4リガーゼを使用して40 μg/mLのDNAに対してライゲーションを実行した。示される試料のみに対してライゲーション後に熱不活性化を実行した。次いで、ギラーゼを用いて全ての試料をスーパーコイル形成させ、続いて、上記の方法に従ってT5エキソヌクレアーゼ消化及び精製を行った。各構築物をライゲーション直後の熱死滅有り無し両方で試験し、試料を二重反復で試験した。試料識別情報を以下の表4に要約する。

【表4】

表4：熱死滅除去での試料概要

試料番号	構築物サイズ	熱死滅
1	5，065	有り
2	5，065	有り
3	5，065	無し
4	5，065	無し
5	8，656	無し
6	8，656	無し
7	8，656	有り
8	8，656	有り

【 0 3 5 1 】

図17は、ライゲーション後、熱死滅前のバンドパターンを示すゲルである。目的のバンドをボックスにより示す。予想されるように、各構築物の種類間で差は観察されなかった。

【 0 3 5 2 】

ギラーゼ後のゲルを、試料1～4について図18A及び試料5～8について図18Bに示し、エキソヌクレアーゼ後のゲルを、試料1～4について図19A及び試料5～8について図19Bに示す。精製後のゲルの結果を定量化した。これを以下の表5及び図20に示す。収率は、C³DNA全生成物の質量をBsaI消化後の全DNAの質量で除算することにより算出した。

【表 5】

表 5：熱死滅除去実験の結果

試料番号	収量 (mg)	リガーゼ後の熱死滅	%収率
1	0.515	有り	7.0
2	0.518	有り	7.1
3	0.843	無し	11.5
4	0.805	無し	10.9
5	0.687	無し	9.3
6	0.410	無し	5.6
7	0.290	有り	3.9
8	0.284	有り	3.9

10

【0353】

20

熱死滅の排除は、収量に対して悪影響を及ぼさなかった。実際には、収量は、熱死滅が排除された全ての試料で予想外に改善した。具体的には、（二重反復の平均値をとって）5, 065 bp 構築物の収率は59%改善し、8, 656 bp 構築物の収率は91%改善した。この結果は、合成C³ DNA生成プロセスからの熱死滅の排除が、プロセス時間を有意義に低減することにより製造効率を改善し得ることを示す（以前は熱死滅に1.5～2時間かかっていた）。

【0354】

次に、ライゲーション反応におけるDNA濃度増加（ライゲーション強化）の影響を、8, 656 kbの構築物をモデル構築物として使用して評価した。ギラーゼによるスーパーコイル形成及びT5エキソヌクレアーゼによるエキソヌクレアーゼ消化の相対順序（すなわち、T5エキソヌクレアーゼ前のギラーゼ対ギラーゼ前のT5エキソヌクレアーゼ）も各DNA濃度で比較した。他の条件（増幅、BsaI消化、及びライゲーション）は、ライゲーション時のDNA濃度を除いて、熱死滅排除実験と同じであった。各試料での条件を以下の表6に示す。DNAは、Qubitにより測定されたBsaI消化直後のDNA濃度である133 µg/mLから所与の各濃度に希釈した。

30

40

50

【表 6】

表 6：DNA濃縮での試料識別情報

試料番号	リガーゼ反応でのDNA濃度	リガーゼ後の熱死滅	T 5／ギラーゼの順序
1	40 μ g / mL	有り	ギラーゼ→T 5
2	40 μ g / mL	無し	ギラーゼ→T 5
3	40 μ g / mL	無し	T 5→ギラーゼ
4	80 μ g / mL	無し	ギラーゼ→T 5
5	80 μ g / mL	無し	T 5→ギラーゼ
6	160 μ g / mL	無し	ギラーゼ→T 5
7	160 μ g / mL	無し	T 5→ギラーゼ

10

【0355】

試料でギラーゼ／エキソヌクレアーゼ処理まで生成を実行し、試料を精製前にゲル上で泳動した。エキソヌクレアーゼ後／精製前に測定された各試料のスーパーコイル単量体百分率を以下の表 7 に示す。

20

【表 7】

表 7：精製前に測定された純度

試料番号	%スーパーコイル単量体
1	86%
2	78%
3	78%
4	78%
5	84%
6	77%
7	83%

30

【0356】

ゲルプロファイル（図 2 1）及び収率の相対的定量化（図 2 2）に示すように、ライゲーションステップ時の DNA 濃度の 40 μ g / mL から 80 μ g / mL への倍増は、試料 1 と比較して収率及び純度に対して軽微な影響しかもたらさなかったが、DNA 濃度の 160 μ g / mL への 2 回目の倍増は、収率に対してより大きな（悪）影響を及ぼした（図 2 2 の試料 6 及び 7 を参照のこと）。更に、T 5 エキソヌクレアーゼ消化のギラーゼの前への配置は、収率に対して軽微な影響を及ぼした一方で（図 2 2）、純度を増加させた（表 7）。

40

【0357】

次に、選択された試料で下流の精製を実行して、原薬を生成させた。ゲルプロファイル（図 2 3）及び収率の相対的定量化（図 2 4）に示すように、熱不活性化の排除は、原薬の収率の大きな増加をもたらした。ギラーゼにより媒介されるスーパーコイル形成前に T 5 エキソヌクレアーゼステップを実行することにより、以前の純度が維持されると共に低分子量種が完全に除去された。

【0358】

50

総合すると、これらの結果は、驚くべきことに、（a）必要な反応容量を低減するためのライゲーション反応におけるDNA濃度の増加、及び（b）ライゲーション後の時間のかかる熱不活性化ステップの排除にもかかわらず、純度及び収率が維持され得ることを示す。従って、これらの修正（及び任意に、スーパーコイル形成前のエキソヌクレアーゼ消化の実行）を含むプロセスは、生成物品質を犠牲にすることなく、製造容易性の利点（例えば、必要とされる反応器がより小さいこと、及び処理時間がより短いこと、ならびに熱死滅に不適合な使い捨ての容器を使用できること）を提供し、合成DNA製造における大きな改善を示す。

【0359】

実施例9．ギラーゼ効率の改善

エキソヌクレアーゼ消化前のスーパーコイル形成を含む上記のプロセスにおいて、ギラーゼの使用された最も低い濃度は、 $1.5\text{ U}/\mu\text{g}$ であった。この実施例は、スーパーコイル形成前のエキソヌクレアーゼ消化の実行などの新たなプロセス修正の観点から、より低濃度のギラーゼが可能であるかどうかを決定することを目的とするタイトレーション実験を記載する。

【0360】

生成を以下の通りに実行した。Phi29ローリングサークル増幅を使用し、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のプラスミドDNA出発濃度、 $200\text{ U}/\text{mL}$ のPhi29濃度、 2 mM のdNTP濃度、及び18時間49分の時間を使用して増幅DNAを生成させた。BsaI消化を $2.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA（ $500\text{ U}/\text{mL}$ ）のBsaI濃度及び $200\mu\text{g}/\text{mL}$ のDNA濃度を使用して、4時間5分の間、実行した。ライゲーションを $10\text{ U}/\mu\text{g}$ のT4リガーゼを使用して $80\mu\text{g}/\text{mL}$ のDNAに対して実行された。ライゲーション後に熱不活性化を実施しなかった。代わりに、ライゲーション直後にT5エキソヌクレアーゼを $2.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNAの濃度で添加した。次に、以下の3つの濃度のギラーゼを試験した： $1.5\text{ U}/\mu\text{g}$ 、 $1.0\text{ U}/\mu\text{g}$ 、及び $0.5\text{ U}/\mu\text{g}$ 。結果をゲル電気泳動により観察した（相対的定量化及びQubitによる平均補正後濃度）。

【0361】

注目すべきことに、目的生成物の強度または純度における大きな変化は、減少させたギラーゼ濃度では観察されなかった（図25及び表8）。加えて、望ましくないバンドの強度の軽微な変化が3つの試料にわたって観察された（図25）。このことは、より低いギラーゼ濃度の生成物品質への軽微な影響を示唆する。

【表8】

表8．ギラーゼ実験の結果

レーン	ギラーゼ濃度	相対量	Qubitによる平均補正後濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）	純度（%C ³ DNA単量体バンド）
1	$1.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA	1.00	2.96	92.4
2	$1.0\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA	1.17	2.97	90.5
3	$0.5\text{ U}/\mu\text{g}$ DNA	1.02	3.11	89.3

【0362】

重要なことに、これらの結果は、エキソヌクレアーゼ消化がスーパーコイル形成前に実行される場合に、ギラーゼ使用の最小有効量を低減することによりプロセス効率が有意義に改善され得ることを示唆する。

【0363】

実施例 10．IIS 型オーバーハング配列及び切断部位の数の影響

前の実施例では、オーバーハング配列 A A A A を、治療用配列に隣接する B s a I オーバーハング配列として使用した。オーバーハング配列 A A A A は、その低効率性により選択され、低効率性は、理論に拘束されるものではないが、分子間ライゲーション（別の治療用配列とのライゲーション（望ましくない））ではなく、分子内ライゲーション（セルフライゲーション（望ましい））の方向に動態を傾向付けるのに有利であると仮定された。しかしながら、本明細書に記載される IIS 型制限プロセスは、望ましいオーバーハング配列の選択を可能にする。従って、出願人は、第 2 のオーバーハング配列 A A C C を試験した。

【0364】

本試験は、テンプレートプラスミド内の B s a I 切断部位数の影響の評価（すなわち、テンプレートプラスミドが、治療用配列に隣接する 2 つの B s a I 切断部位のみを有していたか、または代替的に 2 つ超の B s a I 切断部位（ここで、追加の切断部位は骨格内に存在する）を有していたか）も含んでいた。

【0365】

2 つの異なるサイズを有する構築物を試験した。実験デザインを以下の表 9 に示す。

【表 9】

表 9：実験デザイン

試料番号	構築物サイズ	オーバーハング配列	切断部位の数
1	10, 927 bp	A A A A	5
2	10, 927 bp	A A C C	2
3	8, 425 bp	A A A A	5
4	8, 425 bp	A A A A	2
5	8, 425 bp	A A C C	2

【0366】

この実験では、生成を概して以下の通りに実行した：P h i 29 増幅（5 μ g / mL の出発 DNA 濃度、200 U / mL の P h i 29 濃度、2 mM の d N T P 濃度、及び 50 μ M のプライマー濃度、18 時間 55 分の所要時間）→ B s a I 消化（2.5 U / μ g（500 U / mL）、200 μ g / mL の出発 DNA 濃度、4 時間 18 分の所要時間）→ ライゲーション（40 μ g / mL の DNA 濃度、10 U / μ g DNA の T4 リガーゼ濃度）→ 熱死滅→ スーパーコイル形成→ T5 エキソヌクレアーゼ消化→ カラム精製。試料を B s a I 消化ステップ、ライゲーションステップ、及び T5 エキソヌクレアーゼステップの様々な時点で留めて、試料間で反応率を比較した。生成終了後に、最終生成物のスーパーコイル単量体百分率を上記のゲル分析法を使用して定量化した。

【0367】

B s a I 消化の経時変化実験の結果は、30 分、60 分、及び 120 分時点の間で同様のバンド形成プロファイル及び強度を示す（図 26）。このゲルから消化動態の差は観察されなかった。これらの結果は、B s a I による反応が非常に効率的であり、主として反応開始の 30 分以内に起きたことを示す。

【0368】

ライゲーションの経時変化実験の結果（図 27 A 及び 27 B）は、2 つの B s a I 切断部位及び A A C C オーバーハングを有する構築物が、18 時間の時点でより強い目的の単量体バンド（白矢印により示される）を示したことを示す（図 27 A）。試料 5 は、高いライゲーション効率を示し、1 時間、3 時間、及び 18 時間時点の間でバンド形成プロファイルは同様であった（図 27 A）。試料 4 は、試料 3 と同様のバンド形成プロファイル

及びライゲーション効率を示した（図 2 7 A）。試料 1、3、及び 4 は、3 時間から 2 4 時間まで C³ DNA 単量体バンド強度の増強を示した（図 2 7 B）。A A C C オーバーハングを有する試料は、両方の構築物サイズで、A A A A 試料である 1、3、及び 4 と比べてより速いセルフライゲーション動態をもたらした。A A C C オーバーハングを有するいずれの試料でも 3 時間時点と 2 4 時間時点との間で差は視覚的に観察されなかった。これらの結果は、A A C C オーバーハングが実質的により速いセルフライゲーション動態をもたらしたことを示し、このことは、プロセス時間全体の短縮及び C³ DNA 単量体収量の増加を可能にし得る。

【0369】

オーバーハング配列よりも程度は小さいが、切断部位の数の影響も観察された。図 2 7 B の試料 4 の白色ボックス内のより下方のバンドは、8.4 kb の直鎖状 C³ DNA に相当する。試料 4（2 つの切断部位を有する A A A A）では、3 時間から 1 8 時間、2 4 時間まで反応が進行するにつれて、より下方のバンドの強度は減少する。対照的に、試料 3（5 つの切断部位を有する A A A A）の対応するバンドは、2 4 時間の時間経過全体を通して変わらなかった。これらの結果は、試料 4 の反応動態が試料 3 よりも速かったことを示す。試料 5（2 つの切断部位を有する A A C C）では、対応するバンドはどの時点でも見えず、試料 3 または 4 のいずれかよりも速いセルフライゲーション動態を示す。

【0370】

以下の表 1 0 は、1 8 時間時点のライゲーション後の C³ DNA 単量体バンドの相対的定量化を示す。相対的定量化は、5 つの切断部位の参照配列を参照として利用して C³ DNA 単量体バンドに対して実行した（試料は試料 2 のための参照であり、試料 3 は試料 4 及び 5 のための参照であった）。

【表 1 0】

表 1 0：リガーゼ後の C³ DNA 単量体バンドの相対的定量化（1 8 時間）

試料番号	構築物サイズ	オーバーハング配列	切断部位の数	相対的定量化
1	1 0, 9 2 7 b p	A A A A	5	1. 0 0
2	1 0, 9 2 7 b p	A A C C	2	1. 6 0
3	8, 4 2 5 b p	A A A A	5	1. 0
4	8, 4 2 5 b p	A A A A	2	1. 5 6
5	8, 4 2 5 b p	A A C C	2	1. 9 0

【0371】

これらの結果は、ライゲーション反応の最初の 1 8 時間において、（i）2 つの B s a I 切断部位への低減が C³ DNA セルフライゲーションを僅かに改善し、（i i）オーバーハングの A A A A から A A C C への変更がセルフライゲーション形成を大きく促進したという目視観察を確かにする。

【0372】

図 2 8 A は、T 5 エキソヌクレアーゼ処理後の試料 1 ～ 5 のゲルプロファイルを示す。ここでは、試料 2（2 つの切断部位を有する A A C C）が試料 1（5 つの切断部位を有する A A A A）と比べてかなり強い C³ DNA 単量体バンド（各レーンの最も黒いバンド）を有していた。試料 3 ～ 5の間では、視覚的な差があまり顕著でなかった。相対的定量化をエキソヌクレアーゼ後の試料に対して実行した。これを以下の表 1 1 に示す。参照は上記のように行った。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1：エキソヌクレアーゼ後のC³DNA単量体バンドの相対的定量化

試料番号	構築物サイズ	オーバーハング配列	切断部位の数	反復試験 1	反復試験 2
1	1 0, 9 2 7 b p	A A A A	5	1. 0 0	1. 0 0
2	1 0, 9 2 7 b p	A A C C	2	1. 2 3	1. 4 8
3	8, 4 2 5 b p	A A A A	5	1. 0 0	1. 0 0
4	8, 4 2 5 b p	A A A A	2	0. 8 5	0. 9 6
5	8, 4 2 5 b p	A A C C	2	1. 0 6	1. 0 2

10

【0 3 7 3】

A A C C オーバーハング配列は、両方の構築物で A A A A オーバーハングと比較してより高い収量をもたらした。

【0 3 7 4】

エキソヌクレアーゼ後の時点で、結果を Q u b i t により更に定量化し、異なる操作者が各反復試験の結果をもたらした（図 2 8 B）。結果は操作者間で同程度であり、再現性を示した。ゲルでの定量化と同様に、Q u b i t による結果も、オーバーハングの A A A A から A A C C への変更が、1 8 時間のエキソヌクレアーゼ消化後の実質的により高いカウント数をもたらしたことを示した。加えて、オーバーハングを変化させることなく B s a I 切断部位数を 5 つから 2 に低減することにより（試料 4 対試料 3）、Q u b i t により測定されるように同程度のカウント数をもたらされた。

20

【0 3 7 5】

図 2 9 は、2 人の操作者 A 及び B により再現された、1 8 時間にわたるエキソヌクレアーゼ処理後の Q u b i t による結果を示す。理論に拘束されるものではないが、経時的なカウント数の減少は、エキソヌクレアーゼによる非スーパーコイル DNA（直鎖状 DNA 及び切れ目が入った DNA）のヌクレオチドへの消費を反映する。傾向線は、エキソヌクレアーゼ消化の速度が 3 時間～1 8 時間の間に減速した（または横ばいになった）ことを示唆する（最初の 3 時間以内の 3 6. 7 %～4 8. 7 %（1 つの異常値を除く）のカウント数の減少対 1 8 時間までの 8 8 % 超の減少）。全操作者での 1 8 時間のエキソヌクレアーゼ消化時の総カウント数の減少を以下の表 1 2 に示す。

30

【表 1 2】

表 1 2：1 8 時間のエキソヌクレアーゼ消化時の直鎖状 DNA 及び切れ目が入った DNA の減少効率

試料番号	構築物サイズ	オーバーハング配列	切断部位の数	操作者 A での % 減少	操作者 B での % 減少
1	1 0, 9 2 7 b p	A A A A	5	9 1. 2	9 1. 9
2	1 0, 9 2 7 b p	A A C C	2	8 7. 2	8 7. 2
3	8, 4 2 5 b p	A A A A	5	8 9. 6	8 8. 9
4	8, 4 2 5 b p	A A A A	2	8 8. 0	8 6. 1
5	8, 4 2 5 b p	A A C C	2	8 5. 2	8 7. 6

40

50

【0376】

2人の操作者での最終生成物収量を測定した。各試料での平均及び標準偏差を以下の表13に示す。

【表13】

表13：最終生成物の総収量

試料番号	構築物サイズ	オーバーハング配列	切断部位の数	平均C ³ DNA収量(mg)	標準偏差
1	10, 927bp	AAAA	5	0.465	0.092
2	10, 927bp	AACC	2	0.61	0.028
3	8, 425bp	AAAA	5	0.68	0.014
4	8, 425bp	AAAA	2	0.68	0.014
5	8, 425bp	AACC	2	0.71	0.042

10

【0377】

両方の構築物サイズで、2つの切断部位を有するAACCオーバーハングを有する試料において、5つの切断部位を有するAAAAオーバーハングと比較してC³DNA生成物の総収量が増加した。この効果は、8, 425bp構築物と比べて10, 927bp構築物においてより顕著であった(4.4%の増加に対して30%の増加)。

20

【0378】

総合すると、これらの結果は、AACCオーバーハング配列を有するC³DNAが、AAAAオーバーハングを含むC³DNAと比較して、予想外により速い動態及び改善された生成物収量で生成され得ることを示す。切断部位数の低減も製造容易性を改善し得るが、この修正の効果は、この実験ではAACCオーバーハングほど大きくないようであった。

【0379】

実施例11．様々な条件でのAAAA+5つの切断部位対AACC+2つの切断部位の一对一比較

30

この実験では、異なるサイズの2つの構築物の各々を2つの異なる制限処理により生成させ、各制限処理を4つの異なる条件で試験した。2つの構築物は、8, 656bp(「8.7kbの構築物」)及び10, 300bp(「10.3kbの構築物」)のC³DNAベクターのサイズに対応する。両方の構築物がCAGプロモーター及びABCA4コード配列を有し、10.3kbの構築物は、ABCA4コード配列の下流に追加の調節エレメントを含む(図30)。各構築物を以下の2つの制限処理を用いて作製した：(1)AAAAのBsaIオーバーハングと4つの骨格断片との組み合わせ(AAAA)及び(2)AACCのBsaIオーバーハングと1つの骨格断片との組み合わせ(AACC)。構築物及び制限処理を図30に示す。AAAA制限処理を用いる8.7kbの構築物(図31；配列番号2)及びAACC制限処理を用いる8.7kbの構築物(図32；配列番号4)のプラスミドマップを示す。AAAA制限処理(配列番号1)及びAACC制限処理(配列番号3)を用いる8.7kbの構築物での最終的な治療用環状C³DNAベクターの核酸配列を示す。

40

【0380】

4つの条件は以下の通りであった：

(1)Phi29増幅→BsaI消化→ライゲーション(40µg/mLのT4リガーゼ)→熱死滅→スーパーコイル形成→T5エキソヌクレアーゼ消化→カラム精製；

(2)Phi29増幅→BsaI消化→ライゲーション(80µg/mLのT4リガーゼ

50

) (熱死滅無し) →スーパーコイル形成 → T5 エキソヌクレアーゼ消化 → カラム精製 ;
 (3) P h i 2 9 増幅 → B s a I 消化 → ライゲーション (40 μg / mL の T4 リガーゼ)
) (熱死滅無し) → T5 エキソヌクレアーゼ消化 → スーパーコイル形成 → カラム精製 ; 及
 び
 (4) P h i 2 9 増幅 → B s a I 消化 → ライゲーション (40 μg / mL の T4 リガーゼ)
) (熱死滅無し) → スーパーコイル形成 → T5 エキソヌクレアーゼ消化 → カラム精製。

【0381】

各条件について、P h i 2 9 増幅を、5 μg / mL の濃度の出発プラスミドDNA (各
 試料中90 μg の出発プラスミドDNA)、50 μM のランダムヘキサマープライマー、
 2 mM の d N T P、200 U / mL の P h i 2 9 ポリメラーゼを用いて約19時間の間、
 実施し、B s a I 消化を2.5 U / μg DNA (500 U / mL) の B s a I 濃度で約
 3時間の間、実施し、スーパーコイル形成を、1 μg のDNA 当たり1.5 U のギラーゼ
 、3 ~ 10 μg / mL の濃度のDNA を用いて4時間実施し、T5 エキソヌクレアーゼ消
 化を、1 μg のDNA 当たり2.5 U の T5 エキソヌクレアーゼを用いて約18時間実施
 した。

【0382】

上記の差異に加えて、条件4は、条件1 ~ 3と比較してより小規模の増幅ステップ (増
 幅開始時に1 / 3の量のDNA テンプレート) を含み、代替的な緩衝液条件を含んでいた
 (条件1 ~ 3は実施例5に記載したような緩衝液を含む)。試料をライゲーション、ギラ
 ーゼ、及びT5 エキソヌクレアーゼステップ後に採取し、ゲル上で泳動して、収量を定量
 化した。

【0383】

8. 7 kb の構築物

リガーゼ処理終了時 (E O R) の8, 656 bp 構築物のゲルプロファイルを図33に
 、条件1、2、及び4でのギラーゼE O Rを図34に、条件3でのT5 エキソヌクレアー
 ゼE O Rを図35に、条件1、2、及び4でのT5 エキソヌクレアーゼE O Rならびに条
 件3でのギラーゼE O Rを図36に示す。各E O Rにおいて、A A C Cでの目的のバンド
 は、全ての条件下でA A A Aと比べてより強いようである (図33 ~ 36)。図36にバ
 ンド強度を定量化し、収量を以下の表14に示す。

【表14】

表14：各制限処理及び条件での8. 7 kb の構築物の収量 (目的のバンド (単量体) の強度)

レーン	試料	C ³ バンドの補正後ボリューム値	A A C C収量改善度
1	A A A A 条件1	20170925	該当せず
2	A A C C 条件1	31481195	1.56
3	A A A A 条件2	13265610	該当せず
4	A A C C 条件2	22332305	1.68
5	A A A A 条件3	35522180	該当せず
6	A A C C 条件3	44448710	1.25
7	A A A A 条件4	23671225	該当せず
8	A A C C 条件4	47154175	1.99

【0384】

各試料について収量の結果をQ u b i tアッセイでも定量化した。Q u b i tにより定

量化した質量値を表 1 4 のバンド % で乗算して、以下の表 1 5 に示すように（目的の生成物の）改善度を算出した。

【表 1 5】

表 1 5：各制限処理及び条件での 8. 7 k b の構築物の収量 (Q u b i t)

レーン	試料	質量 (u g)	質量*目的のバンド%	収量改善度
1	A A A A 条件 1	4 7 5	4 5 1	該当せず
2	A A C C 条件 1	6 9 5	5 9 5	1. 3 2
3	A A A A 条件 2	4 5 3	4 5 3	該当せず
4	A A C C 条件 2	6 6 3	5 5 0	1. 2 2
5	A A A A 条件 3	6 9 2	6 4 7	該当せず
6	A A C C 条件 3	1 0 8 2	8 9 8	1. 3 9
7	A A A A 条件 4	5 9 7	5 9 7	該当せず
8	A A C C 条件 4	1 5 0 7	1 2 4 5	2. 0 8

10

20

【0 3 8 5】

表 1 5 に示すように、収量の改善は、Q u b i t アッセイによっても捕捉され、A A A A の制限処理と A A C C の制限処理との間で同程度の範囲で改善された。A A C C の制限処理は、4 つ全ての条件で目的生成物 (C³ D N A) の収量増加を示した。全体として、A A C C は、全ての条件で A A A A と比較して 2 0 ~ 4 0 % の収量改善を示した。

【0 3 8 6】

1 0 . 3 k b の構築物

リガーゼ E O R の 1 0 . 3 k b の構築物のゲルプロファイルを図 3 7 に、条件 1、2、及び 4 でのリガーゼ E O R を図 3 8 に、条件 1、2、及び 4 での T 5 エキソヌクレアーゼ E O R ならびに条件 3 でのリガーゼ E O R を図 3 9 に示す。概して、A A C C での目的のバンドは、A A A A より強いようである。図 3 9 にバンド強度を定量化し、収量を以下の表 1 6 に示す。

30

40

50

【表 1 6】

表 1 6：各制限処理及び条件での 10.3 kb の構築物の収量（目的のバンド（単量体）の強度）

レーン	試料	C ³ バンドの補正後ボリューム値	AACC 収量改善度
1	AAAA 条件 1	1 6 9 6 9 8 4 8	該当せず
2	AACC 条件 1	3 7 0 9 6 2 4 8	2. 1 9
3	AAAA 条件 2	9 1 7 2 2 9 6	該当せず
4	AACC 条件 2	1 7 8 7 6 3 7 6	1. 9 5
5	AAAA 条件 3	1 1 7 4 0 7 6 4	該当せず
6	AACC 条件 3	2 8 9 1 5 3 2 0	2. 4 6
7	AAAA 条件 4	4 2 8 3 2 4 4 0	該当せず
8	AACC 条件 4	1 5 4 9 8 9 2 4	0. 3 6

10

【0387】

20

Qubit アッセイを 10.3 kb の各試料で実行した。Qubit により定量化した質量値を表 1 6 のバンド%で乗算して、以下の表 1 7 に示すように（目的の生成物の）改善度を算出した。

【表 1 7】

表 1 7：各制限処理及び条件での 8.7 kb の構築物の収量（Qubit）

レーン	試料	質量（ug）	質量*目的のバンド%	収量改善度
1	AAAA 条件 1	2 8 5	2 8 5	該当せず
2	AACC 条件 1	1 1 9 8	1 0 7 6	3. 7 7
3	AAAA 条件 2	2 7 0	2 7 0	該当せず
4	AACC 条件 2	7 9 0	6 6 0	2. 4 4
5	AAAA 条件 3	2 2 3	1 8 9	該当せず
6	AACC 条件 3	9 1 9	7 7 8	4. 1 2
7	AAAA 条件 4	8 8 3	7 4 7	該当せず
8	AACC 条件 4	4 0 1	4 0 1	0. 5 4

30

40

【0388】

表 1 7 に示すように、また 8.7 kb の構築物と同様に、10.3 kb の構築物収量の改善は、Qubit アッセイによっても捕捉され、AAAA の制限処理と AACC の制限処理との間で同程度の範囲で改善された。AACC の制限処理は、条件 1～3 で目的生成物（C³DNA）の収量増加を示した。

【0389】

各構築物及び条件での DNA 量を生成プロセスに沿った種々の時点で定量化した。各試料は、90 μg の初期 DNA 量（プラスミド DNA）を有した。プロセス終了時の C³DNA 質量を測定し、C³DNA 生成物対初期量の比率を示すために、C³DNA 質量を初

50

期プラスミドDNA質量で除算した。結果を以下の表18に示す。

【表18】

表18：DNA量の概要

構築物	条件	初期DNA (mg)	B s a I 消化 後のDNA (mg)	C ³ DNA (mg)	C ³ DN A：初期プ ラスミドD NA (質量 ／質量)
8.7kb AAAA	1	0.090	12.2	0.45	5.01
	2	0.090	12.9	0.45	5.03
	3	0.090	12.0	0.65	7.19
	4	0.090	18.7	0.60	6.64
8.7kb AACC	1	0.090	9.9	0.59	6.61
	2	0.090	9.6	0.55	6.11
	3	0.090	9.7	0.90	9.98
	4	0.090	14.0	1.24	13.83
10.3kb AAAA	1	0.090	11.4	0.29	3.17
	2	0.090	11.3	0.27	3.01
	3	0.090	9.5	0.19	2.1
	4	0.090	21.3	0.75	8.3
10.3kb AACC	1	0.090	9.5	1.08	11.95
	2	0.090	8.9	0.66	7.34
	3	0.090	8.9	0.78	8.65
	4	0.090	7.4	0.40	4.45

10

20

30

【0390】

総合すると、8.7kb及び10.3kbの両方の構築物ならびに本明細書全体を通して記載された様々な条件にわたるこれらの結果は、実施例10の観察結果と一貫しており、AACCの制限処理（AACCオーバーハングと1つの骨格断片との組み合わせ）がC³DNA収量を増加させ得ることを更に示唆し、合成環状DNAの製造容易性の予想外かつ有用な改善を提供する。

【0391】

番号付き項目

40

1. 治療用環状DNAベクターを生成させる方法であって、

(a) 治療用配列及び骨格配列を含むテンプレートDNAベクターを含む試料を提供することと、

(b) ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して前記テンプレートDNAベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることと、

(c) 前記直鎖状コンカテマーの単位毎に第1の部位及び第2の部位を切断するIIS型制限酵素で前記直鎖状コンカテマーを消化することであって、前記第1及び第2の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、前記消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、前記直鎖状治療用断片が前記治療用配列を含み、前記直鎖状骨格断片が前記骨格配列の少なくとも一部及びIIS型制限部位を

50

含む、前記消化することと、

(d) 前記直鎖状骨格断片及び前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、前記 I I S 型制限部位を含む環状骨格及び I I S 型制限部位を欠く治療用環状 D N A ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

【0392】

2. 前記 I I S 型制限酵素が前記環状骨格を切断し、前記治療用環状 D N A ベクターを切断しない、項目 1 に記載の方法。

【0393】

3. 治療用環状 D N A ベクターを生成させる方法であって、

(a) 治療用配列及び骨格配列を含むテンプレート D N A ベクターを含む試料を提供することと、

(b) ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して前記テンプレート D N A ベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることと、

(c) 前記直鎖状コンカテマーの単位毎に少なくとも第 1 の部位、第 2 の部位、及び第 3 の部位を切断する 1 種以上の制限酵素で前記直鎖状コンカテマーを消化することであって、(i) 前記第 1 及び第 2 の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、(i i) 前記第 3 の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、前記治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 2 つの直鎖状骨格断片が生成される、前記消化することと、

(d) 前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状 D N A ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

【0394】

4. 前記直鎖状コンカテマーが、前記第 1 の部位、前記第 2 の部位、及び前記第 3 の部位を切断する単一の制限酵素で消化される、項目 3 に記載の方法。

【0395】

5. 前記 1 種以上の制限酵素が単位毎に前記直鎖状コンカテマーの第 4 の部位を切断し、前記第 4 の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 3 つの直鎖状骨格断片が生成される、項目 3 に記載の方法。

【0396】

6. 前記単一の制限酵素が単位毎に前記直鎖状コンカテマーの第 4 の部位を切断し、前記第 4 の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 3 つの直鎖状骨格断片が生成される、項目 5 に記載の方法。

【0397】

7. 前記制限酵素が I I S 型制限酵素である、項目 1、2、4、及び 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0398】

8. 前記 I I S 型制限酵素が B s a I である、項目 7 に記載の方法。

【0399】

9. 制限酵素不活性化ステップがステップ (d) に先行しない、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0400】

10. ステップ (c) と (d) との間に温度上昇が実行されない、項目 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0401】

11. ステップ (c) 及び (d) が同時に行われる、項目 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0402】

10

20

30

40

50

12. 前記治療用環状DNAベクターを含有する前記溶液の温度を約65℃まで上昇させることを更に含む、項目1～11のいずれか1項に記載の方法。

【0403】

13. (e) 前記治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む、項目1～12のいずれか1項に記載の方法。

【0404】

14. ステップ(e)が約37℃で実行される、項目13に記載の方法。

【0405】

15. (f) 前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む、項目1～14のいずれか1項に記載の方法。

【0406】

16. ステップ(f)が約37℃で実行される、項目15に記載の方法。

【0407】

17.

(e) 前記治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることと、

(f) 前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることと、を更に含み、酵素不活性化ステップがステップ(e)と(f)との間に実行されない、項目1～12のいずれか1項に記載の方法。

【0408】

18. ステップ(e)がステップ(f)の前に行われる、項目17に記載の方法。

【0409】

19. 前記制限酵素が約0.5 U/μg～約20 U/μgの濃度で提供される、項目1～18のいずれか1項に記載の方法。

【0410】

20. 前記制限酵素が約2.5 U/μgの濃度で提供される、項目19に記載の方法。

【0411】

21. ステップ(c)が1～12時間のインキュベーションを含む、項目1～20のいずれか1項に記載の方法。

【0412】

22. ステップ(c)が約1時間のインキュベーションを含む、項目21に記載の方法。

【0413】

23. 前記リガーゼが1 μgのDNA当たり20 U (U/μg) 以下のリガーゼの濃度で提供される、項目1～22のいずれか1項に記載の方法。

【0414】

24. 前記リガーゼがT4リガーゼである、項目1～23のいずれか1項に記載の方法。

【0415】

25. 前記トポイソメラーゼが1 μgのDNA当たり10 U (U/μg) 以下のトポイソメラーゼの濃度で提供される、項目13～24のいずれか1項に記載の方法。

【0416】

26. 前記トポイソメラーゼがII型トポイソメラーゼである、項目13～25のいずれか1項に記載の方法。

【0417】

27. 前記トポイソメラーゼがギラーゼまたはトポイソメラーゼIVである、項目13～26のいずれか1項に記載の方法。

【0418】

28. 前記エキソヌクレアーゼが約0.5 U/μg～約20 U/μgの濃度で提供される、項目15～27のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0419】

29. ステップ (f) が2回以上実行される、項目15～28のいずれか1項に記載の方法。

【0420】

30. ステップ (f) が1時間～12時間のインキュベーションを含む、項目15～29のいずれか1項に記載の方法。

【0421】

31. 前記エキソヌクレアーゼがT5エキソヌクレアーゼである、項目15～30のいずれか1項に記載の方法。

【0422】

32.

(g) 前記治療用環状DNAベクターをカラムに通すこと、及び／または

(h) 前記治療用環状DNAベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む、項目1～31のいずれか1項に記載の方法。

【0423】

33. ステップ (b) が部位特異的プライマーを使用して実行される、項目1～32のいずれか1項に記載の方法。

【0424】

34. ステップ (b) がランダムプライマーを使用して実行される、項目1～33のいずれか1項に記載の方法。

【0425】

35. 生成される治療用環状DNAベクターの量が、ステップ (a) の前記試料におけるプラスミドDNAベクターの少なくとも5倍の量である、項目1～34のいずれか1項に記載の方法。

【0426】

36. ステップ (d) の前にDNA精製またはゲル抽出ステップが実行されない、項目1～35のいずれか1項に記載の方法。

【0427】

37. ステップ (d) の前記溶液中の前記治療用環状DNAの量が、ステップ (b) における前記直鎖状コンカテマーの量の少なくとも2.0重量%である、項目1～36のいずれか1項に記載の方法。

【0428】

38. ステップ (d) で生成される前記治療用環状DNAの量が少なくとも1.0mgである、項目1～37のいずれか1項に記載の方法。

【0429】

39. ステップ (d) 後の前記溶液中の前記治療用環状DNAの濃度が、何らの精製または濃縮も実行されることなく少なくとも5μg/mLである、項目1～38のいずれか1項に記載の方法。

【0430】

40. ステップ (d) の前記溶液の容量が少なくとも5リットルである、項目1～39のいずれか1項に記載の方法。

【0431】

41. ステップ (b) ～(d) が少なくとも1リットルの容量を有する反応容器で実行される、項目1～40のいずれか1項に記載の方法。

【0432】

42. ステップ (d) で生成される前記治療用環状DNAの量が、ステップ (a) において提供される前記テンプレートDNAベクターの少なくとも5倍の量である、項目1～41のいずれか1項に記載の方法。

【0433】

43. DNA分子から骨格配列を除去して、治療用環状DNAベクターを生成させる方

10

20

30

40

50

法であって、前記DNA分子が骨格配列及び治療用配列を含み、前記方法が、

(a) 直鎖状コンカテマーの単位毎に第1の部位及び第2の部位を切断するIIS型制限酵素で前記DNA分子を消化することであって、前記第1及び第2の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、前記消化により、直鎖状治療用断片及び直鎖状骨格断片が生成され、前記直鎖状治療用断片が前記治療用配列を含み、前記直鎖状骨格断片が前記骨格配列の少なくとも一部及びIIS型制限部位を含む、前記消化することと、

(b) 前記直鎖状骨格断片及び前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、前記IIS型制限部位を含む環状骨格及びIIS型制限部位を欠く治療用環状DNAベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

10

【0434】

44. DNA分子から骨格配列を除去して、治療用環状DNAベクターを生成させる方法であって、前記DNA分子が骨格配列及び治療用配列を含み、前記方法が、

(a) 前記DNA分子の単位毎に少なくとも第1の部位、第2の部位、及び第3の部位を切断する1種以上の制限酵素で前記DNA分子を消化することであって、(i) 前記第1及び第2の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、

(ii) 前記第3の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、前記治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも2つの直鎖状骨格断片が生成される、前記消化することと、

20

(b) 前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状DNAベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

【0435】

45. 前記直鎖状コンカテマーが、前記第1の部位、前記第2の部位、及び前記第3の部位を切断する単一の制限酵素で消化される、項目44に記載の方法。

【0436】

46. 前記1種以上の制限酵素が前記DNA分子の第4の部位を切断し、前記第4の部位が、前記骨格配列内に存在し、前記第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも3つの直鎖状骨格断片が生成される、項目44に記載の方法。

30

【0437】

47. 前記単一の制限酵素が前記DNA分子の第4の部位を切断し、前記第4の部位が、前記骨格配列内に存在し、前記第1または第2の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも3つの直鎖状骨格断片が生成される、項目45に記載の方法。

【0438】

48. 前記DNA分子がテンプレートDNAベクターの増幅により生成されるコンカテマーである、項目44～47のいずれか1項に記載の方法。

【0439】

49. 前記DNA分子がテンプレートDNAベクターである、項目44～47のいずれか1項に記載の方法。

40

【0440】

50. 前記テンプレートDNAベクターがプラスミドDNAベクターである、項目49に記載の方法。

【0441】

51. 前記制限酵素がIIS型制限酵素である、項目43～50のいずれか1項に記載の方法。

【0442】

52. 前記IIS型制限酵素がBsaIである、項目51に記載の方法。

【0443】

50

53. 制限酵素不活性化ステップがステップ (b) に先行しない、項目 43～52 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0444】

54. ステップ (a) と (b) との間に温度上昇が実行されない、項目 43～53 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0445】

55. ステップ (a) 及び (b) が同時に行われる、項目 43～54 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0446】

56. 前記治療用環状 DNA ベクターを含有する前記溶液の温度を約 65℃まで上昇させることを更に含む、項目 43～55 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0447】

57. (c) 前記治療用環状 DNA ベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む、項目 43～56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0448】

58. ステップ (c) が約 37℃で実行される、項目 57 に記載の方法。

【0449】

59.

(d) 前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む、項目 43～58 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0450】

60. ステップ (d) が約 37℃で実行される、項目 59 に記載の方法。

【0451】

61.

(c) 前記治療用環状 DNA ベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることと、

(d) 前記直鎖状骨格断片をエキソヌクレアーゼと接触させることと、を更に含み、酵素不活性化ステップがステップ (c) と (d) との間に実行されない、項目 43～60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0452】

62. ステップ (c) がステップ (d) の前に行われる、項目 61 に記載の方法。

【0453】

63. 前記制限酵素が約 0.5 U/μg～約 20 U/μg の濃度で提供される、項目 43～62 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0454】

64. 前記制限酵素が約 2.5 U/μg の濃度で提供される、項目 63 に記載の方法。

【0455】

65. ステップ (a) が 1～12 時間のインキュベーションを含む、項目 43～64 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0456】

66. ステップ (a) が約 1 時間のインキュベーションを含む、項目 65 に記載の方法。

【0457】

67. 前記リガーゼが 1 μg の DNA 当たり 20 U (U/μg) 以下のリガーゼの濃度で提供される、項目 43～66 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0458】

68. 前記リガーゼが T4 リガーゼである、項目 43～67 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0459】

69. 前記トポイソメラーゼが 1 μg の DNA 当たり 10 U (U/μg) 以下のトポイ

10

20

30

40

50

ソメラゼの濃度で提供される、項目 57～68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0460】

70. 前記トポイソメラーゼが II 型トポイソメラーゼである、項目 57～69 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0461】

71. 前記トポイソメラーゼがギラーゼまたはトポイソメラーゼ IV である、項目 57～70 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0462】

72. 前記エキソヌクレアーゼが約 $0.5 \text{ U} / \mu\text{g}$ ～約 $20 \text{ U} / \mu\text{g}$ の濃度で提供される、項目 59～71 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0463】

73. ステップ (d) が 2 回以上実行される、項目 59～72 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0464】

74. ステップ (d) が 1 時間～12 時間のインキュベーションを含む、項目 59～73 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0465】

75. 前記エキソヌクレアーゼが T5 エキソヌクレアーゼである、項目 59～74 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0466】

76.

(e) 前記治療用環状 DNA ベクターをカラムに通すこと、及び／または

(f) 前記治療用環状 DNA ベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む、項目 43～75 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0467】

77. 前記治療用環状 DNA ベクターがゲル抽出ステップなしに生成される、項目 43～76 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0468】

78. 治療用環状 DNA ベクターの大規模生成のための方法であって、

(a) 治療用配列及び骨格配列を含むプラスミド DNA ベクターの試料を提供することと

、

(b) ポリメラーゼにより媒介されるローリングサークル増幅を使用して、少なくとも 500 mL の反応容量で前記プラスミド DNA ベクターを増幅して、直鎖状コンカテマーを生成させることと、

(c) 前記直鎖状コンカテマーの単位毎に少なくとも第 1 の部位、第 2 の部位、及び第 3 の部位を切断する 1 種以上の制限酵素で前記直鎖状コンカテマーを消化することであって、(i) 前記第 1 及び第 2 の部位が前記治療用配列に隣接しており、自己相補的オーバーハングを形成し、(ii) 前記第 3 の部位が前記骨格配列内に存在し、前記第 1 または第 2 の部位に非相補的なオーバーハングを形成し、前記消化により、前記治療用配列を含む直鎖状治療用断片及び各々が前記骨格配列の一部を含む少なくとも 2 つの直鎖状骨格断片

が生成される、前記消化することと、(d) 前記直鎖状治療用断片をリガーゼと接触させて、溶液中に治療用環状 DNA ベクターを生成させることと、を含む、前記方法。

【0469】

79. ステップ (a) において提供される前記プラスミド DNA ベクターの量が少なくとも 1.0 mg である、項目 78 に記載の方法。

【0470】

80. ステップ (b) により、少なくとも 100 mg の前記直鎖状コンカテマーが生成される、項目 78 または 79 に記載の方法。

【0471】

10

20

30

40

50

81. ステップ (d) により、少なくとも 2.0 mg の前記治療用環状 DNA ベクターが生成される、項目 78～90 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0472】

82. ステップ (c) 及び (d) が同時に行われる、項目 78～81 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0473】

83. DNA 精製がステップ (b)、(c)、及び (d) の間、またはステップ (b) と (c) と (d) との間に実行されない、項目 78～82 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0474】

84. ステップ (d) の前記溶液中の前記治療用環状 DNA の量が、ステップ (b) における前記直鎖状コンカテマーの量の少なくとも 2.0 重量%である、項目 78～83 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【0475】

85. ステップ (d) で生成される前記治療用環状 DNA の量が、ステップ (a) において提供される前記プラスミド DNA ベクターの少なくとも 2 倍の量である、項目 78～84 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0476】

86. 治療用環状 DNA ベクターを生成させる方法であって、

(a) DNA 分子を含む溶液を提供することであって、各 DNA 分子が骨格配列及び治療用配列を含む、前記提供することと、

20

(b) IIS 型制限酵素を前記溶液に添加して、前記 DNA 分子を消化し、これにより、前記骨格配列を前記治療用配列から分離することと、

(c) リガーゼを前記溶液に添加して、

(i) 前記リガーゼと、

(ii) 前記 IIS 型制限酵素と、

(iii) 各々が単一の治療用配列を含む治療用環状 DNA ベクターであって、各々が IIS 型認識部位を欠く、前記治療用環状 DNA ベクターと、

(iv) 副生成物であって、各副生成物が 1 つ以上の IIS 型制限部位を含む、前記副生成物と、を含む混合物中で反応を発生させることとであって、

前記治療用環状 DNA ベクター対

30

1 つ以上の IIS 型制限部位を含む前記副生成物の比率が前記反応が進行するにつれて増加する、前記発生させることと、を含む、前記方法。

【0477】

87. 前記副生成物の一部または全てが、1 つ以上の骨格配列を含む、項目 86 に記載の方法。

【0478】

88. 前記副生成物の一部または全てが、2 つ以上の治療用配列を更に含む、項目 87 に記載の方法。

【0479】

89. 前記副生成物の一部または全てが環状である、項目 86～88 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【0480】

90. (a) の前記 DNA 分子がコンカテマーである、項目 86～89 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0481】

91. 前記方法が、ステップ (a) の前にローリングサークル増幅を使用してテンプレート DNA ベクターを増幅して、コンカテマーを生成させることを更に含む、項目 86～90 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0482】

92. 前記 IIS 型制限酵素が BsaI である、項目 86～91 のいずれか 1 項に記載

50

の方法。

【0483】

93. 制限酵素不活性化ステップがステップ（d）に先行しない、項目86～92のいずれか1項に記載の方法。

【0484】

94. ステップ（b）と（c）との間に温度上昇が実行されない、項目86～93のいずれか1項に記載の方法。

【0485】

95. 前記治療用環状DNAベクターを含有する前記溶液の温度を約65℃まで上昇させることを更に含む、項目86～94のいずれか1項に記載の方法。

【0486】

96. （e）前記治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることを更に含む、項目86～95のいずれか1項に記載の方法。

【0487】

97. ステップ（e）が約37℃で実行される、項目96に記載の方法。

【0488】

98. （f）直鎖状副生成物をエキソヌクレアーゼと接触させることを更に含む、項目86～97のいずれか1項に記載の方法。

【0489】

99. ステップ（f）が約37℃で実行される、項目98に記載の方法。

【0490】

100.

（e）前記治療用環状DNAベクターをトポイソメラーゼまたはヘリカーゼと接触させることと、

（f）直鎖状副生成物をエキソヌクレアーゼと接触させることと、を更に含み、酵素不活性化ステップがステップ（e）と（f）との間に実行されない、項目86～95のいずれか1項に記載の方法。

【0491】

101. ステップ（e）がステップ（f）の前に行われる、項目100に記載の方法。

【0492】

102. 前記制限酵素が約0.5 U/μg～約20 U/μgの濃度で提供される、項目86～101のいずれか1項に記載の方法。

【0493】

103. 前記制限酵素が約2.5 U/μgの濃度で提供される、項目102に記載の方法。

【0494】

104. ステップ（c）が1～12時間のインキュベーションを含む、項目86～103のいずれか1項に記載の方法。

【0495】

105. ステップ（c）が約1時間のインキュベーションを含む、項目104に記載の方法。

【0496】

106. 前記リガーゼが1 μgのDNA当たり20 U（U/μg）以下のリガーゼの濃度で提供される、項目86～105のいずれか1項に記載の方法。

【0497】

107. 前記リガーゼがT4リガーゼである、項目86～106のいずれか1項に記載の方法。

【0498】

108. 前記トポイソメラーゼが1 μgのDNA当たり10 U（U/μg）以下のトポイソメラーゼの濃度で提供される、項目96～107のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0499】

109. 前記トポイソメラーゼがⅡ型トポイソメラーゼである、項目96～108のいずれか1項に記載の方法。

【0500】

110. 前記トポイソメラーゼがギラーゼまたはトポイソメラーゼⅣである、項目96～109のいずれか1項に記載の方法。

【0501】

111. 前記エキソヌクレアーゼが約0.5 U/μg～約20 U/μgの濃度で提供される、項目98～110のいずれか1項に記載の方法。

【0502】

112. ステップ(f)が2回以上実行される、項目98～111のいずれか1項に記載の方法。

【0503】

113. ステップ(f)が1時間～12時間のインキュベーションを含む、項目98～112のいずれか1項に記載の方法。

【0504】

114. 前記エキソヌクレアーゼがT5エキソヌクレアーゼである、項目98～113のいずれか1項に記載の方法。

【0505】

115.
(g) 前記治療用環状DNAベクターをカラムに通すこと、及び／または
(h) 前記治療用環状DNAベクターをイソプロピルアルコールで沈殿させることを更に含む、項目86～114のいずれか1項に記載の方法。

【0506】

116. ステップ(b)が部位特異的プライマーを使用して実行される、項目86～115のいずれか1項に記載の方法。

【0507】

117. ステップ(b)がランダムプライマーを使用して実行される、項目86～116のいずれか1項に記載の方法。

【0508】

118. ステップ(d)の前にゲル抽出ステップが実行されない、項目86～117のいずれか1項に記載の方法。

【0509】

119. ステップ(d)の前記溶液中の前記治療用環状DNAの量が、ステップ(a)における前記DNA分子の量の少なくとも2.0重量%である、項目86～118のいずれか1項に記載の方法。

【0510】

120. ステップ(d)で生成される前記治療用環状DNAの量が少なくとも2.0 mgである、項目86～119のいずれか1項に記載の方法。

【0511】

121. ステップ(b)後の前記溶液中の前記治療用環状DNAの濃度が、あらゆる精製または濃縮が実行される前に少なくとも5.0 μg/mLである、項目86～120のいずれか1項に記載の方法。

【0512】

122. ステップ(d)の前記溶液の容量が少なくとも5.0リットルである、項目86～121のいずれか1項に記載の方法。

【0513】

123. ステップ(b)～(d)が少なくとも1.0リットルの容量を有する反応容器で実行される、項目86～122のいずれか1項に記載の方法。

【0514】

- 1 2 4 . 前記治療用配列が 5 k b 超である、項目 1 ～ 1 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 5 1 5 】
- 1 2 5 . 前記治療用配列が 2 つ以上の転写単位を含む、項目 1 ～ 1 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 5 1 6 】
- 1 2 6 . 前記治療用配列が 1 種以上の治療用タンパク質をコードする、項目 1 ～ 1 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 5 1 7 】
- 1 2 7 . 前記 1 種以上の治療用タンパク質が多量体タンパク質である、項目 1 2 6 に記載の方法。 10
- 【 0 5 1 8 】
- 1 2 8 . 前記治療用配列が治療用核酸をコードする、項目 1 ～ 1 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 5 1 9 】
- 1 2 9 . 前記治療用核酸が R N A 分子である、項目 1 2 8 に記載の方法。
- 【 0 5 2 0 】
- 1 3 0 . 前記 R N A 分子が、自己複製 R N A 分子、短鎖ヘアピン R N A、またはマイクロ R N A である、項目 1 2 9 に記載の方法。
- 【 0 5 2 1 】 20
- 1 3 1 . 前記治療用環状 D N A ベクターが医薬組成物として製剤化される、項目 1 ～ 1 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 5 2 2 】
- 1 3 2 . 前記治療用環状 D N A ベクターを薬学的に許容される担体中に製剤化して、医薬組成物を生成させることを更に含む、項目 1 ～ 1 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 5 2 3 】
- 1 3 3 . 前記医薬組成物が、薬学的に許容される担体中に少なくとも 1 . 0 m g の前記治療用環状 D N A ベクターを含む、項目 1 3 1 または 1 3 2 に記載の方法。
- 【 0 5 2 4 】
- 1 3 4 . 前記医薬組成物中の前記治療用環状 D N A ベクターが、少なくとも 7 0 % がスーパーコイル単量体である、項目 1 3 2 または 1 3 3 に記載の方法。 30
- 【 0 5 2 5 】
- 1 3 5 . 前記医薬組成物が 1 . 0 % 以下の残存タンパク質または骨格配列を含む、項目 1 3 1 ～ 1 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 5 2 6 】
- 1 3 6 . 前記医薬組成物が、1 . 0 質量 % 未満のタンパク質含有量、1 . 0 質量 % 未満の R N A 含有量、及び 5 E U / m g 未満のエンドトキシンを含む、項目 1 3 1 ～ 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 5 2 7 】
- 1 3 7 . 項目 1 3 1 ～ 1 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法により生成される医薬組成物。 40
- 【 0 5 2 8 】
- 1 3 8 . 個体において治療用配列を発現させる方法であって、項目 1 3 7 に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。
- 【 0 5 2 9 】
- 1 3 9 . 疾患または障害を処置する必要がある個体の疾患または障害を処置する方法であって、項目 1 3 7 に記載の医薬組成物を前記個体に投与することを含む、前記方法。
- 【 0 5 3 0 】
- 1 4 0 . 前記方法がインビボでの電氣的導入を含む、項目 1 3 8 または 1 3 9 に記載の方法。 50

【 0 5 3 1 】

1 4 1 . 前記インビボでの電氣的導入が、前記個体の皮膚、骨格筋、腫瘍、眼、または肺における前記治療用配列の発現を誘発する、項目 1 4 0 に記載の方法。

【 0 5 3 2 】

他の実施形態

本明細書に記載の全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個別の刊行物または特許出願が参照により組み込まれることが具体的に、かつ個々に示されているかのような程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 5 3 3 】

本発明がその特定の実施形態に関して記載されたが、それは更に改変することができ、本出願は、一般に本発明の原理に従ったいかなる変形形態、用途、または改変も包含するものであり、これには、本発明が属する技術分野の範囲内の公知のまたは慣習的な実施に含まれ、また上記の基本的特徴に当てはまってもよく、特許請求の範囲の範囲に従う、本発明からの逸脱が含まれることが理解されよう。

【 0 5 3 4 】

他の実施形態は、特許請求の範囲内である。

【 0 5 3 5 】

【表 1 9】

配列

配列番号	説明	配列
1	AAAA オーバーハン グを有する 8, 6 5 6 b p の C ³ DNA	AAAACTCTTCGGTATCACAGGAGAATTCAGGGAGACAT TGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATA ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA CCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAT GTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG GAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAA GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGA CCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCT GCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATT TTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGG GGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGG GGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGT GCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTT CCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAA AAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGACGCT GCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCG CCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTG AGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG CGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCG TGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGG

10

20

30

40

50

40

	CTGATCCAGAGCCTGGAAAGCAACCCTCTGACCAAGATC GCTTGGAGGGCCGCCAAACCTCTGCTGATGGGAAAGATC CTGTACACCCCTGACAGCCCTGCCGCCAGAAGAATCCTG AAGAACGCCAACAGCACCTTCGAGGAACTGGAACACGTG CGCAAGCTGGTCAAGGCCTGGGAAGAAGTGGGACCTCAG ATTTGGTACTTCTTCGACAATAGCACCCAGATGAACATGA TCAGAGACACCCTGGGCAACCCTACCGTGAAGGACTTCC TGAACAGACAGCTGGGCGAAGAGGGCATTACCGCCGAG GCCATCCTGAACTTTCTGTACAAGGGCCCCAGAGAGTCC CAGGCCGACGACATGGCCAACTTCGATTGGCGGGACATC TTCAACATCACCGACAGAACCCTGCGGCTGGTCAACCAG TACCTGGAATGCCTGGTGCTGGACAAGTTCGAGAGCTAC AACGACGAGACACAGCTGACCCAGAGAGCCCTGTCTCTG CTGGAAGAGAATATGTTCTGGGCTGGCGTGGTGTTCCT GACATGTACCCTTGGACAAGCAGCCTGCCTCCTCACGTG AAGTACAAGATCCGGATGGACATCGACGTGGTCGAAAAG ACCAACAAGATCAAGGACCGGTACTGGGACAGCGGCCCT AGAGCTGATCCCGTGGAAAGATTTTCGGTACATCTGGGGC GGATTTCGCATACCTGCAGGACATGGTGGAAACAGGGAATC ACACGGTCCCAGGTGCAGGCTGAAGCTCCTGTGGGAATC TACCTGCAGCAGATGCCTTATCCTTGCTTCGTGGACGACA GCTTCATGATCATCCTGAATCGGTGCTTCCCCATCTTCAT GGTGCTGGCCTGGATCTACTCCGTGTCTATGACCGTGAAG TCCATCGTGCTGGAAAAAGAGCTGCGGCTGAAAGAGACA CTGAAGAACCAGGGCGTGTCCAATGCCGTGATCTGGTGC ACCTGGTTTCTGGACAGCTTCTCCATTATGAGCATGAGCA TCTTTCTGCTGACGATCTTCATCATGCACGGCCGAATCCT GCACTACAGCGACCCCTTTATCCTCTTCCTGTTCTCTGCTG GCCTTCAGCACCGCTACAATCATGCTGTGTTTTCTGCTGT CCACCTTCTTCAGCAAGGCCTCTCTGGCCGCTGCTTGTAG CGGCGTGATCTACTTCACCCTGTACCTGCCTCACATCCTG TGCTTCGCATGGCAGGACAGAATGACCGCCGAGCTGAAG AAAGCTGTGTCCCTGCTGAGCCCTGTGGCCTTTGGCTTTG GCACCGAGTACCTCGTCAGATTTGAGGAACAAGGACTGG GACTGCAGTGGTCCAACATCGGCAATAGCCCTACAGAGG GCGACGAGTTCAGCTTCCTGCTGTCTATGCAGATGATGCT GCTGGACGCCGCCGTGTATGGACTGCTGGCTTGGTATCTG GACCAGGTGTTCCCAGGCGATTACGGCACTCCTCTGCCTT GGTATTTCTGCTGCAAGAGAGCTACTGGCTCGGCGGCG AGGGATGTAGCACCAGAGAAGAAAGAGCCCCTGGAAAAG ACCGAGCCTCTGACCGAGGAAACAGAGGACCTGAACAC CCAGAGGGCATCCACGATAGCTTTTTTCGAGAGAGAACAC CCCGGCTGGGTGCCAGGCGTGTGTGTGAAGAATCTGGTC AAGATTTTCGAGCCCTGCGGCAGACCTGCCGTGGACAGA CTGAACATCACCTTCTACGAGAACCAGATTACCGCCTTTC TGGGCCACAACGGCGCTGGCAAGACAACCACATTGAGCA TCCTCACAGGCCTGCTGCCTCCAACAAGCGGCACAGTTCT CGTTGGCGGCAGAGACATCGAGACAAGCCTGGATGCCGT CAGACAGTCCCTGGGCATGTGCCCTCAGCACAAACATCCT GTTTACCACCTGACCGTGGCCGAGCACATGCTGTTTTAT
--	--

10

20

30

40

50

50

		GGTGGCCATCTGCGTGATCTTCAGCATGAGCTTCGTGCCC GCCTCCTTCGTGCTGTACCTGATTCAAGAGAGAGTGAAC AAGAGCAAGCACCTCCAGTTCATCTCCGGGGTGTCCCA ACCACCTACTGGGTCACCAATTTTCTGTGGGACATCATGA ACTACAGCGTGTACAGCCGGCCTGGTCGTGGGCATCTTTAT CGGCTTTCAGAAGAAGGCCTACACGAGCCCCGAGAACCT GCCTGCTTTGGTTGCTCTGCTGCTCCTGTATGGCTGGGCC GTGATTCCCATGATGTACCCCGCCAGCTTTCGTGTTGACG TGCCCAGCACAGCCTACGTGGCCCTGTCTTGCGCCAATCT GTTTCATCGGCATCAACAGCAGCGCCATCACATTCATCCTG GAACTGTTTCGAGAACAACAGGACCCTGCTGCGGTTCAAC GCCGTGCTGCGGAAACTGCTGATCGTGTTCCCTCACTTCT GTCTCGGCAGAGGCCTGATCGACCTGGCTCTGTCTCAGGC CGTGACCGATGTGTACGCCAGATTGCGCGAGGAACACTC CGCCAATCCATTCCACTGGGACCTGATCGGCAAGAACCT GTTTCGCCATGGTGGTGGAAAGGCGTCGTGTACTTCCTGCTC ACTCTGCTGGTGCAGAGACACTTTTTTCTGTCCCAATGGA TCGCCGAGCCTACCAAAGAACCATTGTGGACGAGGACG ACGATGTGGCCGAGGAAAGACAGAGAATCATCACCGGC GGCAACAAGACCGATATCCTGAGACTGCACGAGCTGACA AAGATTTACCCCGGCACAAGCTCCCCAGCCGTGGATAGG CTTTGTGTGGGAGTTAGACCCGGCGAGTGCTTTGGCCTGC TGGGAGTTAATGGCGCCGGAAGACCACCTTCAAGA TGCTGACCGGCGACACCACAGTGACAAGCGGAGATGCTA CAGTGGCCGGCAAGAGCATCCTGACCAACATCAGCGAAG TGCATCAGAACATGGGCTACTGCCCTCAGTTCGACGCCAT CGACGAACTGCTGACAGGCCGCGAACACCTGTATCTGTA TGCCAGACTGAGAGGCGTGCCCGCTGAAGAGATCGAGAA GGTGGCCAACTGGTCCATCAAGTCTCTGGGCCTGACAGT GTACGCCGACTGTCTGGCCGGAACATACAGCGGAGGAAA CAAGCGGAAGCTGAGCACCGCCATTGCTCTGATCGGATG CCCACCTCTGGTCTCTGCTGGATGAACCCACCACCGGAAT GGACCCCCAGGCTAGAAGAATGCTCTGGAACGTGATCGT GTCTATCATCCGCGAGGGCAGAGCTGTGGTGCTGACCTCT CACAGCATGGAAGAGTGCGAGGCTCTGTGTACCCGGCTG GCCATTATGGTCAAGGGCGCCTTCAGATGCATGGGCACC ATTACAGCATCTGAAAAGCAAGTTCGGCGACGGCTACATC GTGACAATGAAGATCAAGAGCCCCAAGGACGACCTCCTG CCTGATCTGAACCCCGTGGAACAGTTTTTTCAGGGCAACT TCCCCGGCTCCGTGCAGCGGGAAAGACACTATAACATGC TGCAGTTTCAGGTGTCTCCTCCAGCCTGGCTCGGATCTT TCAACTGCTGCTCTCTCACAAGGACAGCCTGCTGATTGAA GAGTACAGCGTGACACAGACCACACTCGACCAGGTTTTTC GTGAACTTCGCCAAGCAGCAGACCGAGAGCCACGACCTG CCTCTGCATCCTAGAGCCGCTGGTGCCTCTAGACAAGCTC AGGACTAAGCTTCCACTGGATTGTACAATTACATAAAAT AAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTT GTGTGCGCTACT	10
		TGGGAGTTAATGGCGCCGGAAGACCACCTTCAAGA TGCTGACCGGCGACACCACAGTGACAAGCGGAGATGCTA CAGTGGCCGGCAAGAGCATCCTGACCAACATCAGCGAAG TGCATCAGAACATGGGCTACTGCCCTCAGTTCGACGCCAT CGACGAACTGCTGACAGGCCGCGAACACCTGTATCTGTA TGCCAGACTGAGAGGCGTGCCCGCTGAAGAGATCGAGAA GGTGGCCAACTGGTCCATCAAGTCTCTGGGCCTGACAGT GTACGCCGACTGTCTGGCCGGAACATACAGCGGAGGAAA CAAGCGGAAGCTGAGCACCGCCATTGCTCTGATCGGATG CCCACCTCTGGTCTCTGCTGGATGAACCCACCACCGGAAT GGACCCCCAGGCTAGAAGAATGCTCTGGAACGTGATCGT GTCTATCATCCGCGAGGGCAGAGCTGTGGTGCTGACCTCT CACAGCATGGAAGAGTGCGAGGCTCTGTGTACCCGGCTG GCCATTATGGTCAAGGGCGCCTTCAGATGCATGGGCACC ATTACAGCATCTGAAAAGCAAGTTCGGCGACGGCTACATC GTGACAATGAAGATCAAGAGCCCCAAGGACGACCTCCTG CCTGATCTGAACCCCGTGGAACAGTTTTTTCAGGGCAACT TCCCCGGCTCCGTGCAGCGGGAAAGACACTATAACATGC TGCAGTTTCAGGTGTCTCCTCCAGCCTGGCTCGGATCTT TCAACTGCTGCTCTCTCACAAGGACAGCCTGCTGATTGAA GAGTACAGCGTGACACAGACCACACTCGACCAGGTTTTTC GTGAACTTCGCCAAGCAGCAGACCGAGAGCCACGACCTG CCTCTGCATCCTAGAGCCGCTGGTGCCTCTAGACAAGCTC AGGACTAAGCTTCCACTGGATTGTACAATTACATAAAAT AAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTT GTGTGCGCTACT	20
		GTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAG TATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTG	30
2	AAAAオー バーハングを	GTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAG TATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTG	40

	有する 8, 656bp のC ³ DNAの ための プラスミド テンプレート	GACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGT TGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCA AGGTAGTCGGCAAATAACCTTAATGAGACCAACTCAATG AGACCGATCTGTTGATCAGCAGTTCAACCTGTTGATAGTA CGTACTAAGCTCTCATGTTTCACGTACTAAGCTCTCATGT TTAACGTACTAAGCTCTCATGTTTAACGAACTAAACCCTC ATGGCTAACGTACTAAGCTCTCATGGCTAACGTACTAAG CTCTCATGTTTCACGTACTAAGCTCTCATGTTTGAACAAT AAAATTAATATAAATCAGCAACTTAAATAGCCTCTAAGG TTTTAAGTTTTATAAGAAAAAAGAATATATAAGGCTTT TAAAGCTTTTAAGGTTTAACGGTTGTGGACAACAAGCCA GGGATGTAACGCACTGAGAAGCCCTTAGAGCCTCTCAAA GCAATTTTGAGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGACAT GGGAATTAGCCATGGGCCCCGTGCGAATCACTATATGAGA CCGCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTCGATTTATTCAA CAAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTG CACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAATAAACTGT CTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCC ATATTCAACGGGAAACGTTCGAGGCCGCGATTAAATTCCA ACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCG ATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGT ATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATG GCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGG TCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGAC CATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTA CTCACCCTGCGATCCCCGAAAAACAGCATTCCAGGTA TTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATG CGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGTTGCATTCGATTCCTGT TTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTC GCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGAT GCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTT GAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATT TCACCGGATTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTCTCTATG ATAACCTTATTTTACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTAT TGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGA TCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTT CATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAA TCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGAT GAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACT GGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGAGAATTCGGTCT CAAAAACCTCTTCGGTATCACAGGAGAATTTACGGGAGAC ATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG GTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACA TAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC GACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGG TGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCA AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG ACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTAT	10 20 30 40
--	---	---	---

	TAGTCATCGCTATTACCATGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCCTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTA GCGCTTGTTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGGGCGCGTCGGTTCGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCC TCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTTCGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCCGACCCCCCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGCTCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCCTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTC TGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGACAATTGTACTAACCTTCTTCTTTCTCTCCTGACAGGGAGTTTAAACAGATAAGTTTGTACAAAAAGAGAGGTGCCACCATGGGCTTTGTGCGACAGATTGAGCTGCTGCTGTGGAAGAACTGGACCTGCGGAAGCGGCAGAAAATCAGATTGCTGGTGGAAGCTGCTGTGGCCCCTGAGCCTGTTTCTGGTGCTGATCTGGCTGCGGAA CGCCAATCCTCTGTACAGCCACCACGAGTGTCACCTTCCCCACAAGGCCATGCCTTCTGCCGGAATGCTGCCTTGGCTGAGGGCATCTTCTGCAACGTGAACAACCCCTGCTTTCAGAGCCCCACACCTGGCGAAAGCCCTGGCATCGTGTCCAACACAACAACAGCATCCTGGCCAGAGTGTAACGGGACTTCC AAGAGCTGCTGATGAACGCCCCCTGAGTCTCAGCACCTGGGCAGAACTCTGGACCGAGCTGCACATCCTGAGCCAGTTCA TGGACACCCTGAGAACACACCCCCGAGAGAATCGCCGGCA GGGGCATCAGAAATCCGGGACATCCTGAAGGACGAGGAA ACCCTGACACTGTTCTCATCAAGAACATCGGCCTGAGCGACAGCGTGGTGACCTGCTGATCAACAGCCAAGTGCGGCCGAGCAGTTTGCTCATGGCGTGCCGGATCTCGCCCTGA	10
		20
		30
		40

50

50

50

		CTACATCGTGACAATGAAGATCAAGAGCCCCAAGGACGA CCTCCTGCCTGATCTGAACCCCGTGGAACAGTTTTTTCAG GGCAACTTCCCCGGCTCCGTGCAGCGGGAAAGACACTAT AACATGCTGCAGTTTCAGGTGTCTCCTCCAGCCTGGCTC GGATCTTTCAACTGCTGCTCTCTCACAAGGACAGCCTGCT GATTGAAGAGTACAGCGTGACACAGACCACACTCGACCA GGTTTTCGTGAACCTTCGCCAAGCAGCAGACCGAGAGCCA CGACCTGCCTCTGCATCCTAGAGCCGCTGGTGCCTCTAGA CAAGCTCAGGACTAAGCTTCCACTGGATTGTACAATTAC ATAAAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTT GGTTTTTTGTGTGCGCTACTAAAATGAGACCGAATTCCCCA TCCAGCTGATATCCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTC ATAGCTGTTTCCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAATC TCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATG CCTCCTCTAGACCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTC GCTGCTGCCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGA ACGGATGAAGGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTC GGTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACG CAACTGGTCCAGAACCCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAA CGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTT TTTGGGGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAGCAA GCGCGTTACGCCGTGGGTGCGATGTTTGATGTTATGGAGCA GCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAA AGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTAT CGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCC ATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTC CGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGATATTGA TTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAAC GCGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAACCTTCGGCT TCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTC ACCATTTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATC CAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCA ATGACATTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGA CATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAACA TAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACTCTTT GATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAAT GAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCCGACTGGGCT GGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTT GGTACAGCGCAGTAACCGGCAAAATCGCGCCGAAGGAT	10
			20
3	AACCオーバー ハングを有 する8,656 bpのC3 DNA	AACC CTCTTCGGTATCACAGGAGAATTTACGGGAGACATTGATT ATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTA GTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTA CGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC GCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA TTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGAT CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTAT GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT	30
			40

[illegible]

40

40

40

		GTGACAATGAAGATCAAGAGCCCCAAGGACGACCTCCTG CCTGATCTGAACCCCGTGGAACAGTTTTTTCAGGGCAACT TCCCCGGCTCCGTGCAGCGGGAAAGACACTATAACATGC TGCAGTTTCAGGTGTCTCTCCAGCCTGGCTCGGATCTT TCAACTGCTGCTCTCTCACAAGGACAGCCTGCTGATTGAA GAGTACAGCGTGACACAGACCACACTCGACCAGGTTTTTC GTGAACTTCGCCAAGCAGCAGACCGAGAGCCACGACCTG CCTCTGCATCCTAGAGCCGCTGGTGCCTCTAGACAAGCTC AGGACTAAGCTTCCACTGGATTGTACAATTACATAAAAT AAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTT GTGTGCGCTACT	10
4	A A C C オーバ ーハングを有 する 8, 6 5 6 b p の C 3 D N A のための プラスミドテン プレート	GGTATCACAGGAGAATTTTCAGGGAGACATTGATTATTGAC TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAA ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACG GTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG CCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGG CCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACT TTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT TACCATGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCC CCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTT ATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGG GGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAG GGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGC CAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCG AGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGC GCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCG TGCCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCT CTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGA CGGCCCTTCTCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAA TGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTG AGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCT CGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCG CGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCG GGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCG AGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTTGCCCCGCGGTGCGGG GGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGT GTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGCT CGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCT GAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGG CGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGG CAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCC GGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGGCGGCGGCCCCCGGAG CGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTG CCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGAATTCCT TTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGC CGCCGCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGC GGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCG	20 30 40

10

20

30

40

50

	CAAGGACCGGTACTGGGACAGCGGCCCTAGAGCTGATCC CGTGGAAGATTTTCGGTACATCTGGGGCGGATTTCGATA CCTGCAGGACATGGTGGAACAGGGAATCACACGGTCCCA GGTGCAGGCTGAAGCTCCTGTGGGAATCTACCTGCAGCA GATGCCTTATCCTTGCTTCGTGGACGACAGCTTCATGATC ATCCTGAATCGGTGCTTCCCCATCTTCATGGTGCTGGCCT GGATCTACTCCGTGTCTATGACCGTGAAGTCCATCGTGCT GGAAAAAGAGCTGCGGCTGAAAGAGACACTGAAGAACC AGGGCGTGTCCAATGCCGTGATCTGGTGCACCTGGTTTCT GGACAGCTTCTCCATTATGAGCATGAGCATCTTTCTGCTG ACGATCTTCATCATGCACGGCCGAATCCTGCACTACAGC GACCCCTTTATCCTCTTCCTGTTCTGCTGGCCTTCAGCAC CGCTACAATCATGCTGTGTTTTCTGCTGTCCACCTTCTTCA GCAAGGCCTCTCTGGCCGCTGCTTGTAGCGGCGTGATCTA CTTCACCCTGTACCTGCCTCACATCCTGTGCTTCGCATGG CAGGACAGAATGACCGCCGAGCTGAAGAAAGCTGTGTCC CTGCTGAGCCCTGTGGCCTTTGGCTTTGGCACCGAGTACC TCGTCAGATTTGAGGAACAAGGACTGGGACTGCAGTGGT CCAACATCGGCAATAGCCCTACAGAGGGGCGACGAGTTCA GCTTCCTGCTGTCTATGCAGATGATGCTGCTGGACGCCGC CGTGTATGGACTGCTGGCTTGGTATCTGGACCAGGTGTTT CCAGGCGATTACGGCACTCCTCTGCCTTGGTATTTCTGCTG TGCAAGAGAGCTACTGGCTCGGCGGCGAGGGATGTAGCA CCAGAGAAGAAAGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCTCTG ACCGAGGAAACAGAGGACCCTGAACACCCAGAGGGCAT CCACGATAGCTTTTTTCGAGAGAGAACACCCCGGCTGGGT GCCAGGCGTGTGTGTGAAGAATCTGGTCAAGATTTTCGA GCCCTGCGGCAGACCTGCCGTGGACAGACTGAACATCAC CTTCTACGAGAACCAGATTACCGCCTTTCTGGGCCACAAC GGCGCTGGCAAGACAACCACATTGAGCATCCTCACAGGC CTGCTGCCTCCAACAAGCGGCACAGTTCTCGTTGGCGGC AGAGACATCGAGACAAGCCTGGATGCCGTCAGACAGTCC CTGGGCATGTGCCCTCAGCACAAACATCCTGTTTACCACC TGACCGTGGCCGAGCACATGCTGTTTTATGCCAGCTGAA GGGCAAGAGCCAAGAAGAGGCTCAGCTGGAAATGGAAG CCATGTTGGAGGACACCGGCCTGCACCACAAGAGAAATG AGGAAGCCCAGGATCTGAGCGGCGGCATGCAGAGAAAA CTGAGCGTGGCCATTGCCTTCGTGGGCGACGCCAAGGTT GTGATCCTGGATGAGCCTACAAGCGGCGTGGACCCTTAC AGCAGAAGATCCATCTGGGATCTGCTGCTGAAGTACAGA TCAGGCCGACCATCATCATGAGCACCCACCACATGGAC GAGGCCGATCTGCTCGGAGACAGAATCGCCATCATTGCT CAGGGCAGACTGTACTGCAGCGGCACCCCACTGTTTCTG AAGAACTGTTTCGGCACCGGACTGTATCTGACCCTCGTG GGAAGATGAAGAACATCCAGTCTCAGCGGAAGGGCAGC GAGGGCACCTGTAGCTGTTCTAGCAAGGGCTTTAGCACC ACCTGTCCAGCTCACGTGGACGATCTGACCCCTGAACAG GTGCTGGATGGCGACGTGAACGAGCTGATGGACGTGGTG CTGCACCATGTGCCTGAGGCCAAGCTGGTGAATGCATC GGCCAAGAACTGATTTTTCTGCTCCCGAACAAGAACTTCA	10 20 30 40
--	---	---

50

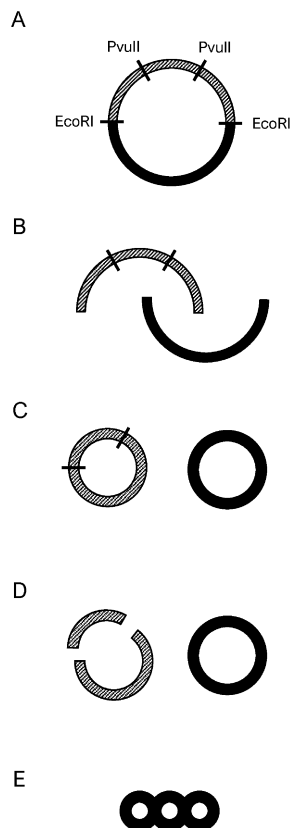
50

		GACCATCAAGCATT TTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGG T TACTCACCAC T GCGATCCCCGGAAAAACAGCATTCCAG GTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTG ATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCC TGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTTCGTC TCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGTTG ATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTG TTGAACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAACTTTTGCCAT TCTCACCGGATTTCAGTCGTCAC T CATGGTGATTTCTCACT TGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGT ATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAG GATCTTGCCATCCTATGGAAC T GCCTCGGTGAGTTTTCTC CTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGA TAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTC GATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAAC AGGTCTCAAACC
--	--	--

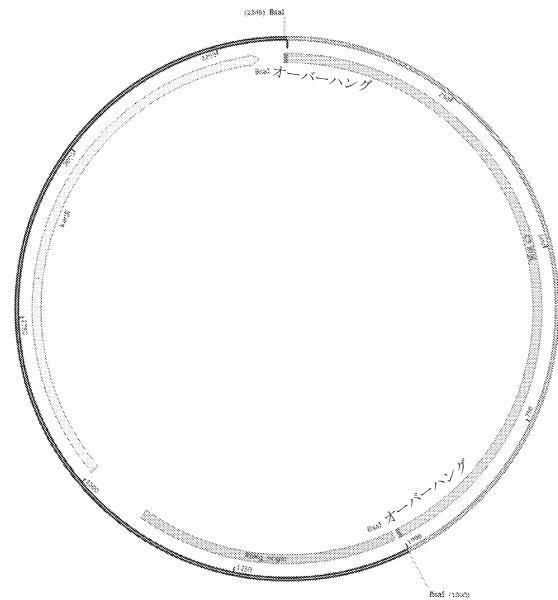
10

【図面】

【図 1】



【図 2 A】



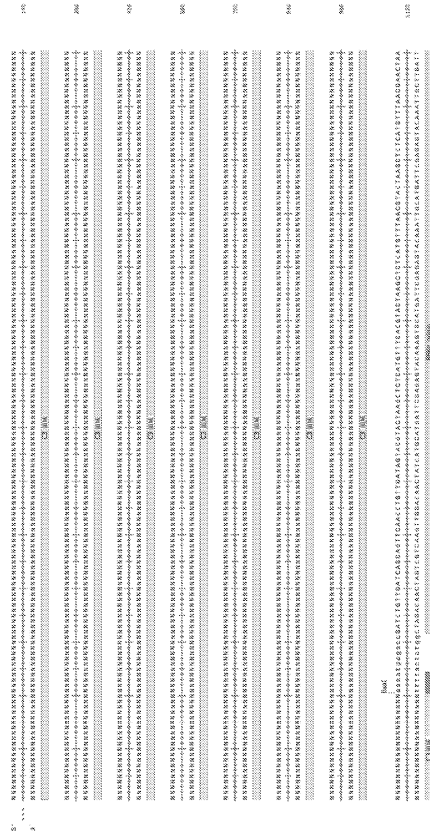
20

30

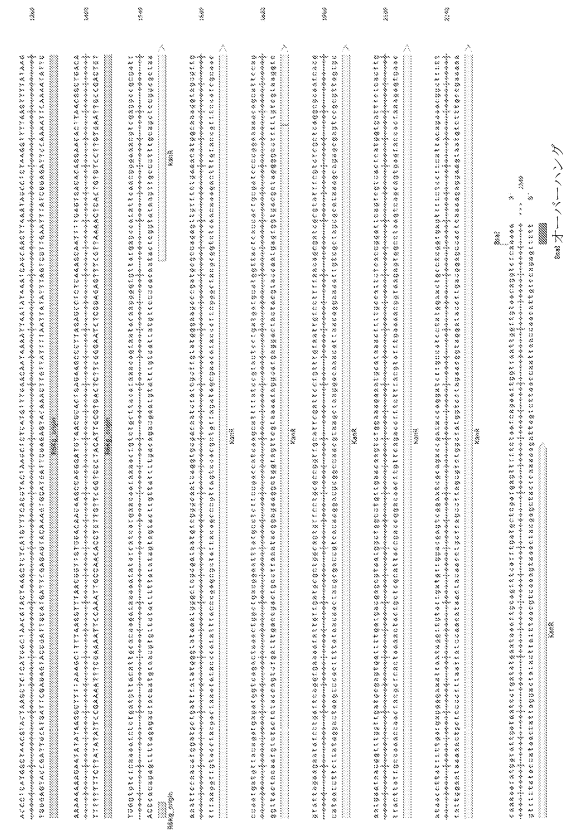
40

50

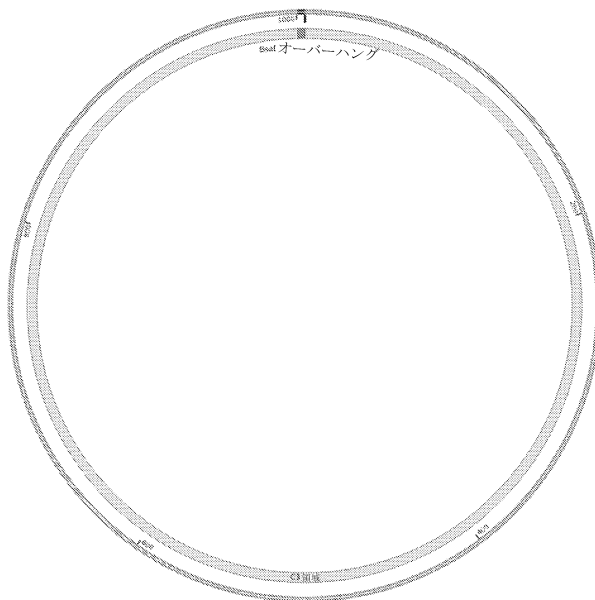
【 図 2 B - 1 】



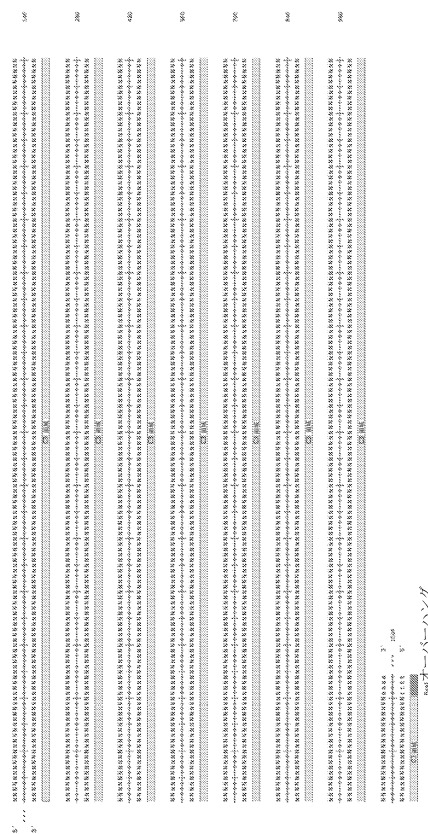
【圖 2 B - 2】



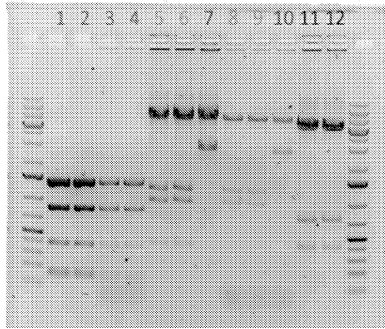
【図 2 C】



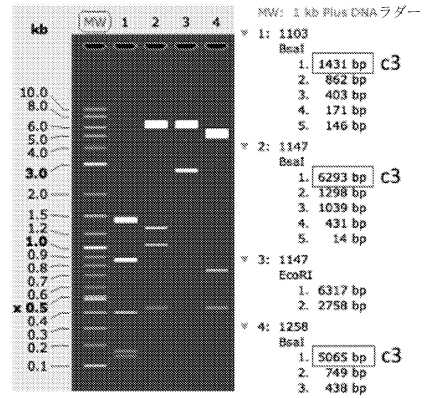
【図 2 D】



【図 5 A】

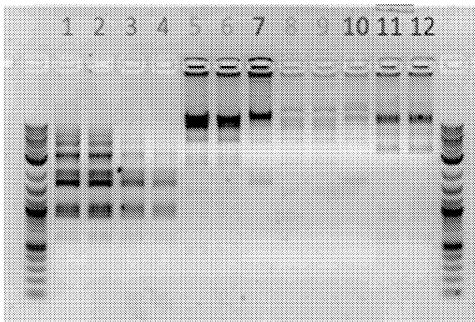


【図 5 B】

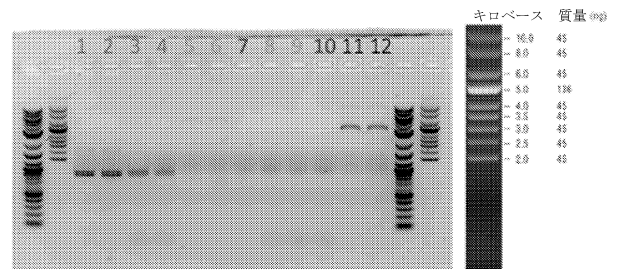


10

【図 5 C】



【図 5 D】



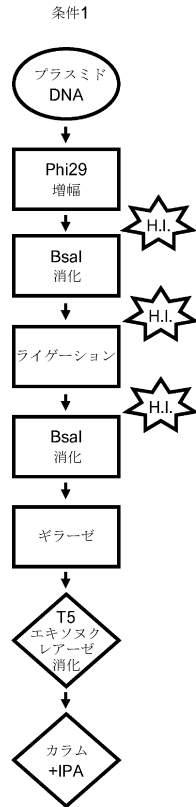
20

30

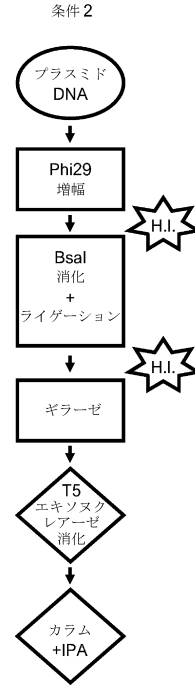
40

50

【図 6 A】



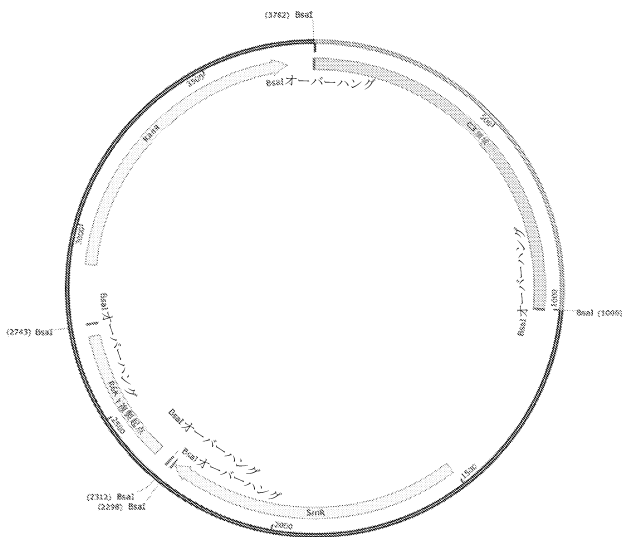
【図 6 B】



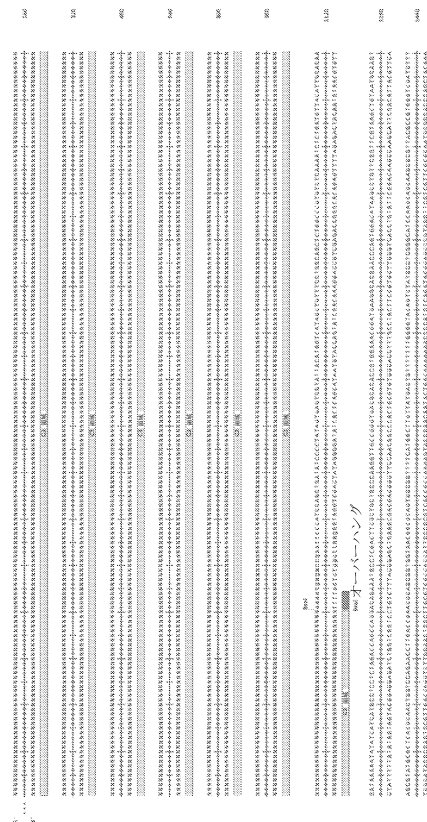
10

20

【図 7 A】



【図 7 B - 1】

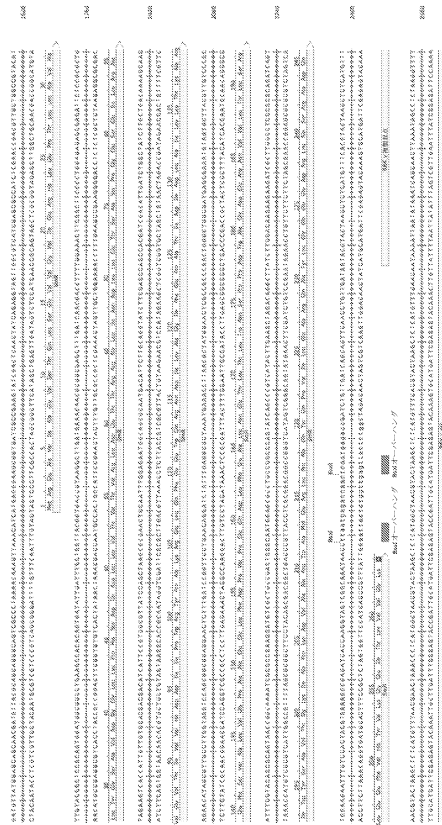


30

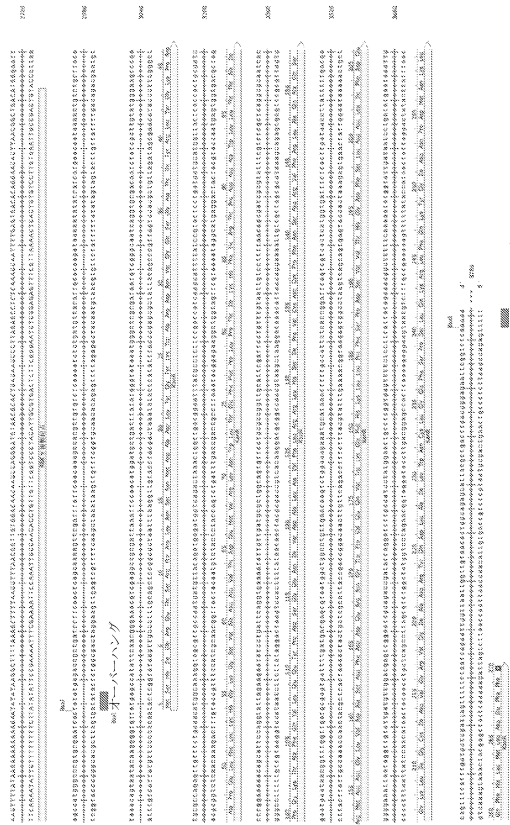
40

50

【図 7 B - 2】

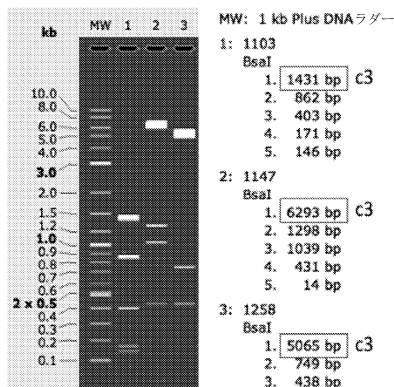


【図 7 B - 3】

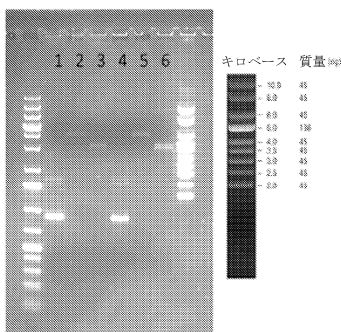


【図 8】

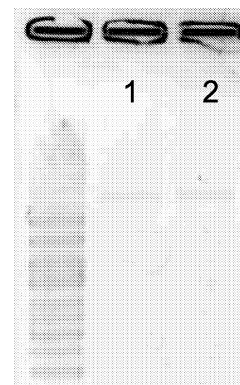
A



B



【図 9】



10

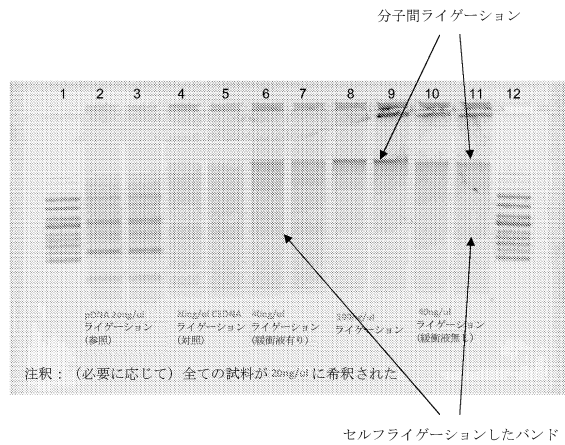
20

30

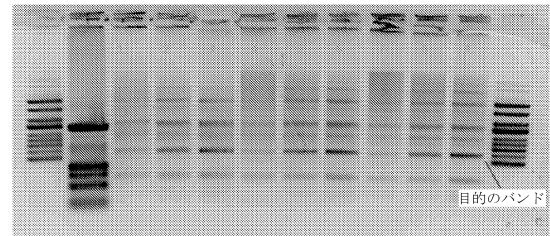
40

50

【図 10】

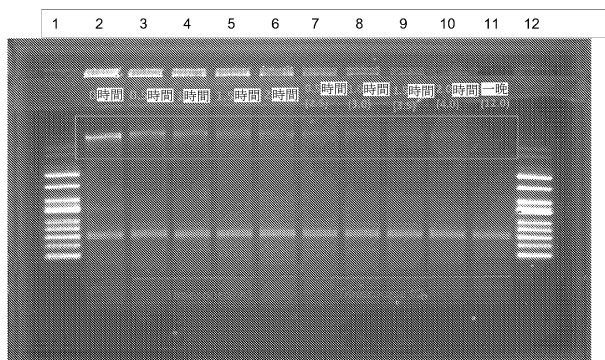


【図 11】

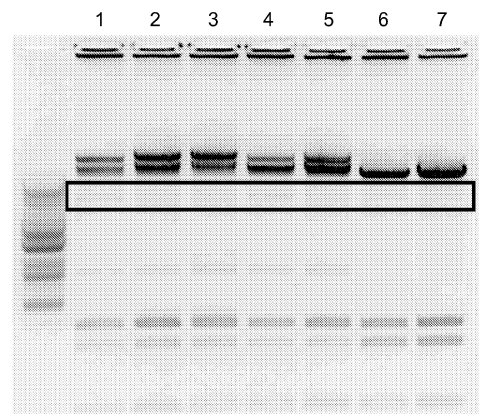


10

【図 12】



【図 13】



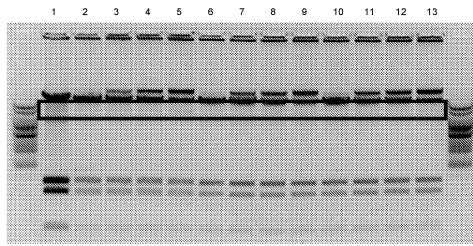
20

30

40

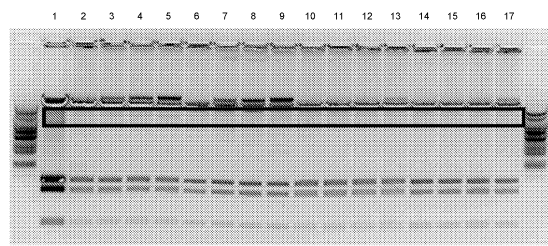
50

【図 14】



1: Bsa1で維持
2～5: 試料 1、t=0、t=2時間、t=5時間、t=21.5時間
6～9: 試料 2、t=0、t=2時間、t=5時間、t=21.5時間
10～13: 試料 3、t=0、t=2時間、t=5時間、t=21.5時間

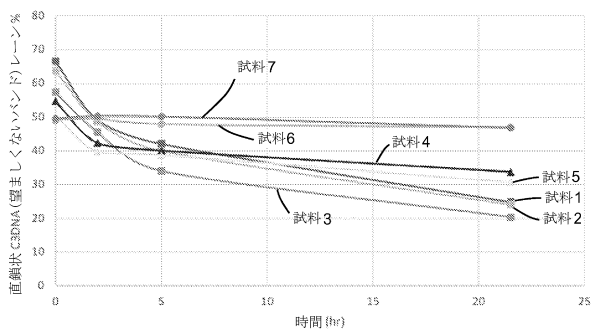
【図 15】



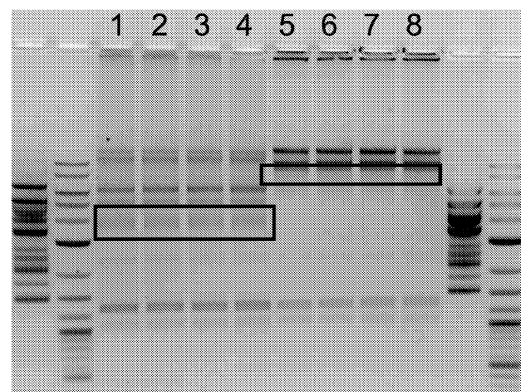
1: Bsa1で維持
2～5: 試料 4、t=0、t=2時間、t=5時間、t=21.5時間
6～9: 試料 5、t=0、t=2時間、t=5時間、t=21.5時間
10～13: 試料 6、t=0、t=2時間、t=5時間、t=21.5時間
14～17: 試料 7、t=0、t=2時間、t=5時間、t=21.5時間

10

【図 16】

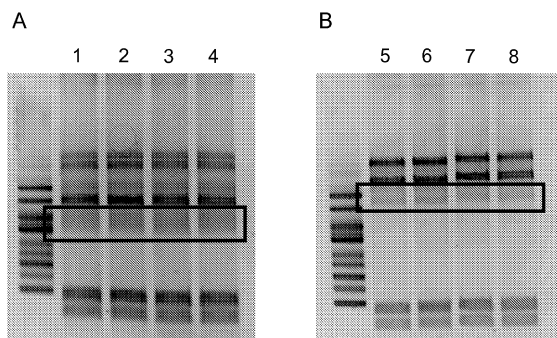


【図 17】

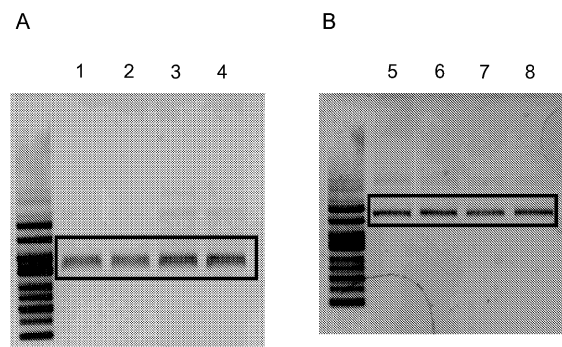


20

【図 18】



【図 19】

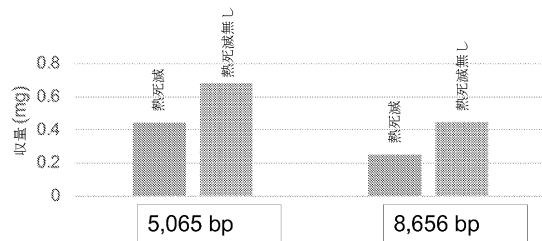


30

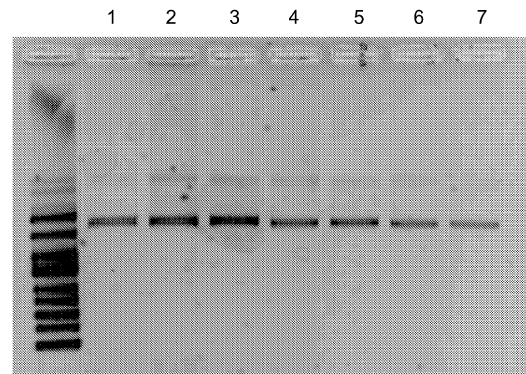
40

50

【図 2 0】

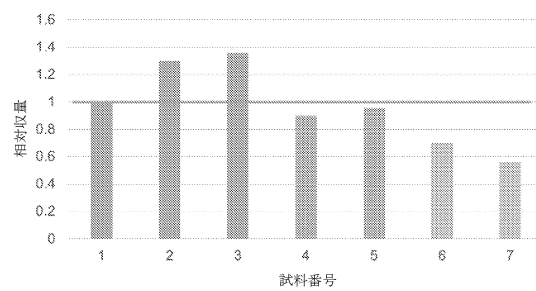


【図 2 1】

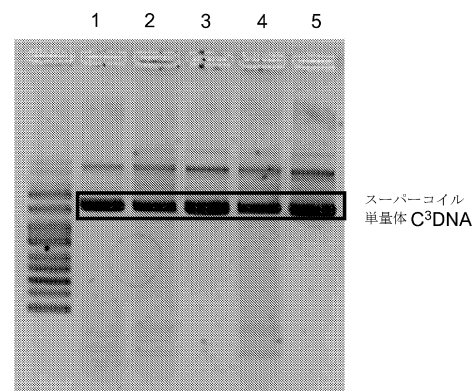


10

【図 2 2】

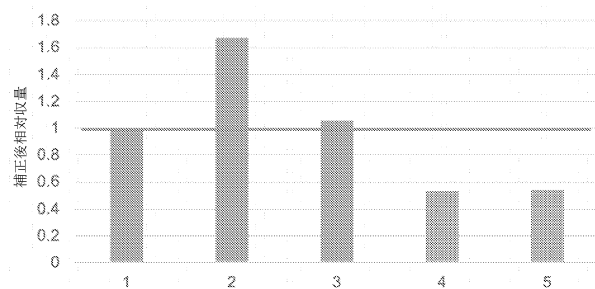


【図 2 3】

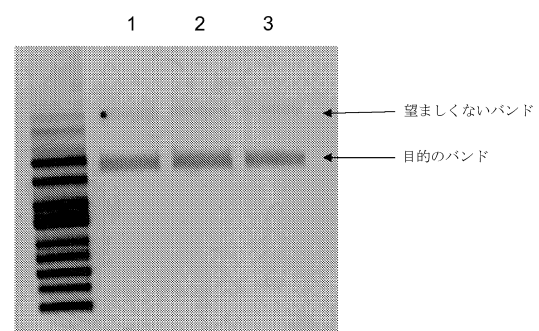


20

【図 2 4】



【図 2 5】

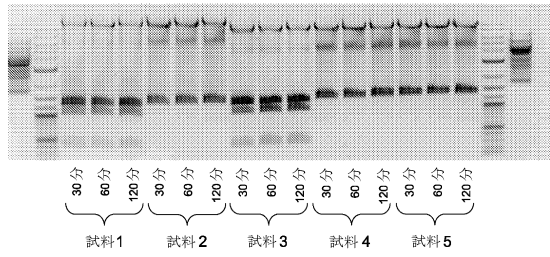


30

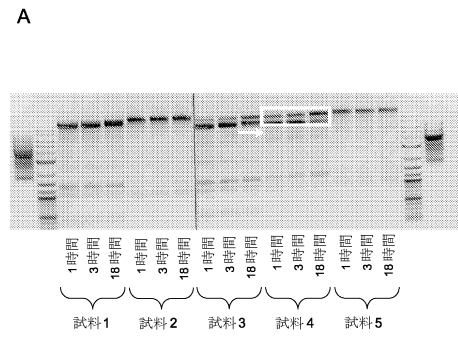
40

50

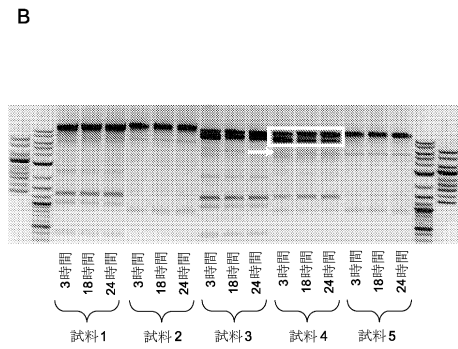
【図 2 6】



【図 2 7】

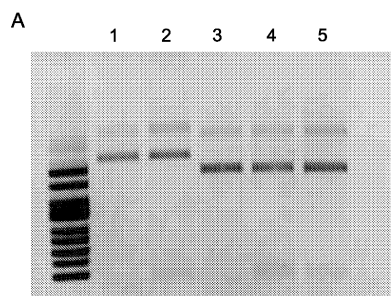


10

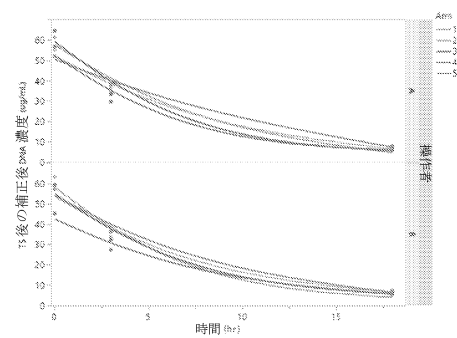


20

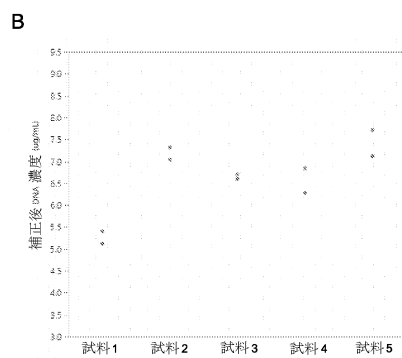
【図 2 8】



【図 2 9】



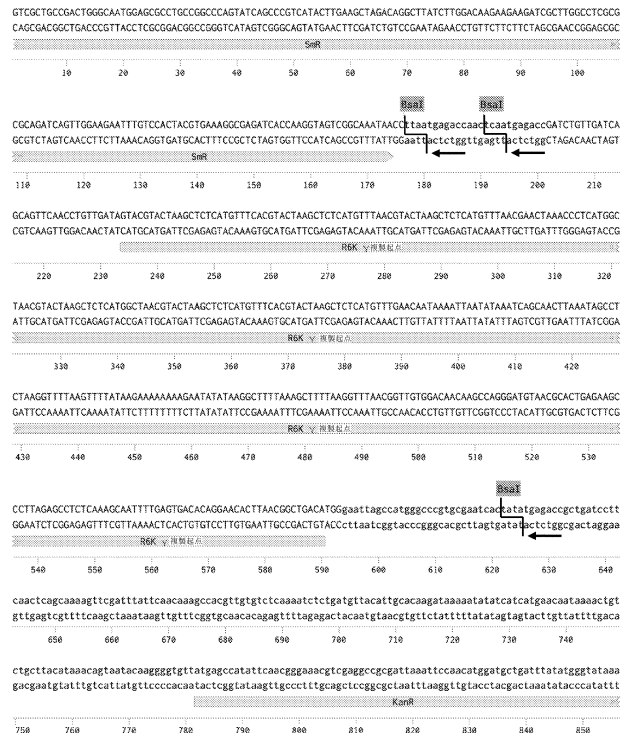
30



40

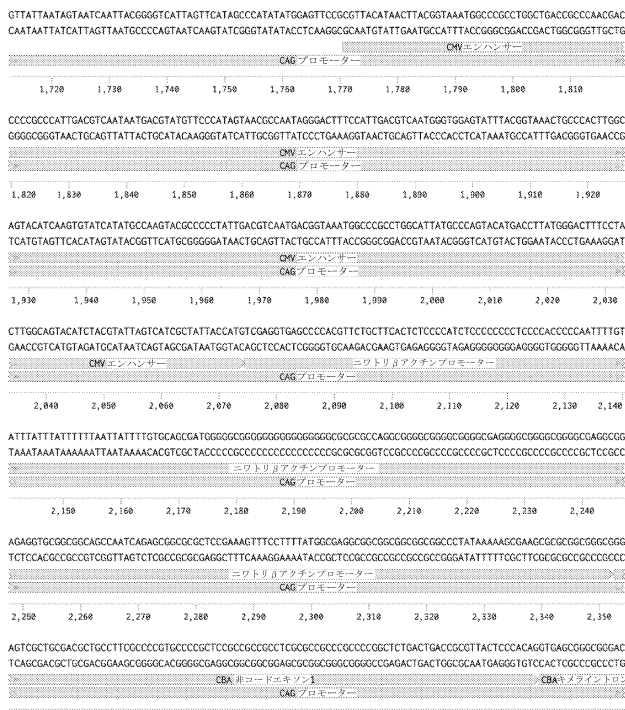
50

【図 3 1 - 1】



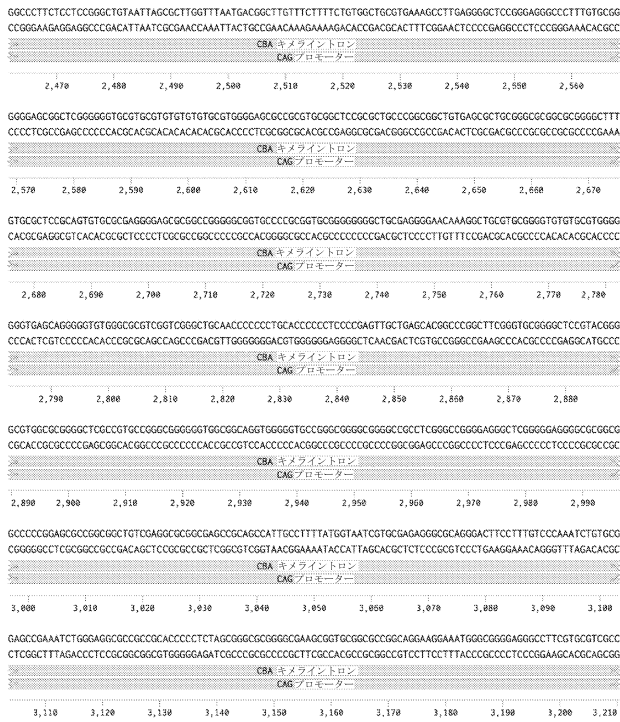
20

【図 3 1 - 3】

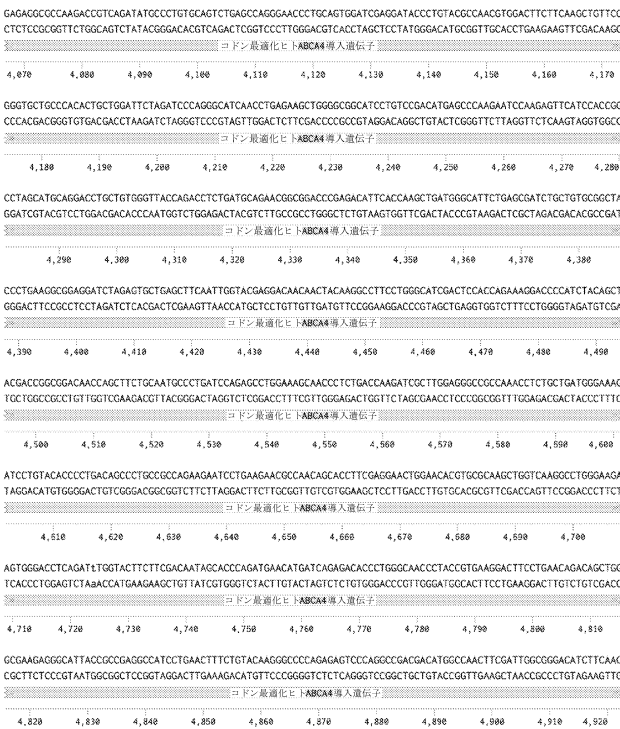


40

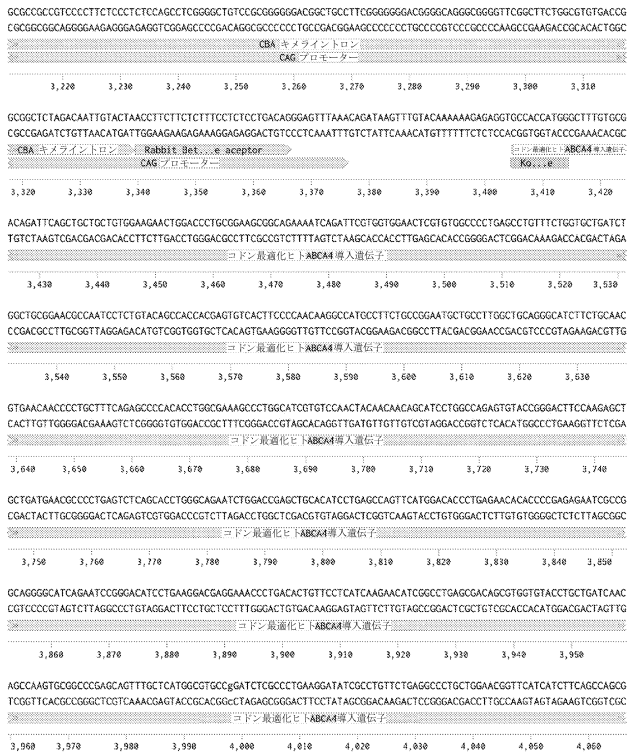
【図 3 1 - 4】



【図 3 1 - 6】



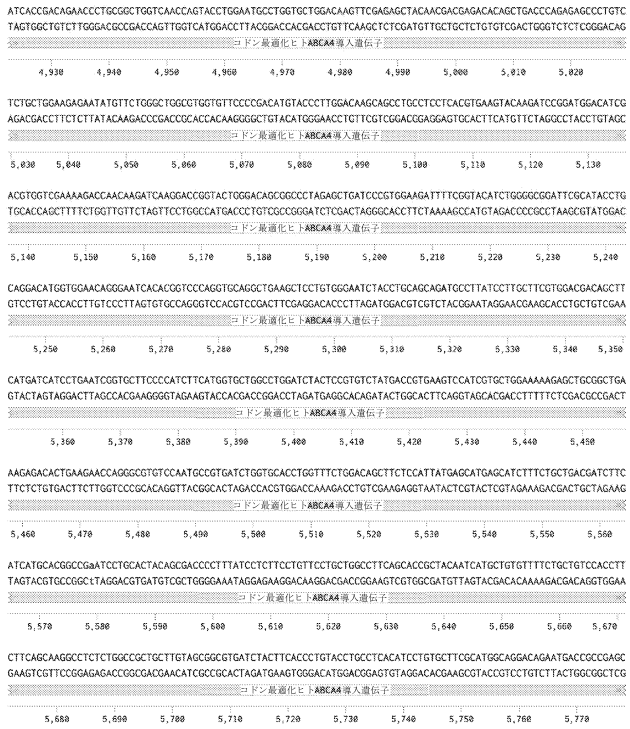
【図 3 1 - 5】



10

20

【圖 3 1 - 7】



30

40

【図 3 1 - 8】

CGAAGAAAGCTGTGCTCCTCTGACCCCTTGGCCCTTTGGCAGGAGTACTGTCTGAGATTGAGGACACAGGACTGGGACTGCAGTGTCCCAACTGCG
ACTCTTCTTGACACAGGACGACTGCGGACACGGAAACGAAGCTGGTCTGTATCTGACAGCACTTAACCTGTCTTCCCTGACCCTGACGTCCACAGGTGTGATCGG

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

5,780 5,790 5,800 5,810 5,820 5,830 5,840 5,850 5,860 5,870 5,880

AATAGCCCTACAGAGCGCAGCAGTTCAGCTTCTGCTCTATGCAAGATGATGCTGGACGCCCTGTATGCACTGCTGGTGGTATCTGGACACAGGTGTT
TTATCGGACTGTCTCCCTGCTCTCAAGTGGAAAGCAGACATGCTACTGATCTACGACAGCTGGCGGCGCACTACCTGACGACCAACAGCTGTGTCACAA

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

5,890 5,900 5,910 5,920 5,930 5,940 5,950 5,960 5,970 5,980 5,990

CCGAGCGATTACGGCACTCTCTGCTTGGTATTTCTGCTGCAAGAGTACTGCTGGCGGCGGAGGATGTAGCACCAGAGAAGAACGCTTGGAAAGA
GGGTCCGCTAATGCCGTGAGGACGGAACCAAAAGACCAAGTCTCTGTATGACCAAGCGCCCTCCCTACATCGTGCTCTTTCTTCTGGGACATTTCT

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,000 6,010 6,020 6,030 6,040 6,050 6,060 6,070 6,080 6,090

CCGAGCCTCTGACCAGGAAACAGAGGACCTGAAACCCAGAGGCACTCCACGATAGCTTTTCGAGAGAACACCCCGCTGGGTGCCAGGCGTGTGTGGAAG
GGCTCGGACAGTGGCTCTTTGCTTGTCTGGCACTGTGGGTCTCGGCTAGGTGCTTCTGTATGAAAGAGCTCTCTTGTGGGGCGCCACACGCTGCACACCACT

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,100 6,110 6,120 6,130 6,140 6,150 6,160 6,170 6,180 6,190 6,200

ATCTGTGTCAAGATTTCAGGCTCTGCGGAGCACTGCGCTGGAGACAGTGAACATCTCTACGAGACAGAGTATCCGCTTCTGGGCGACACAGGCGCT
TTAGACCAAGTTCTAAAGCTCGGGACCGGCTGTGGACGGACGACTCTGCACTGTAGTGGAGATGCTCTTGGTCTTAATGGCGGAAAGACCCGGTGTTCGCCGAC

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,210 6,220 6,230 6,240 6,250 6,260 6,270 6,280 6,290 6,300 6,310

CAGACACACACATGAGCATCTCAAGGCTCTGCTGCCCTCAACACAGGCAAGCTTCCTGTTGGCGGACAGACATCAGACACAGCTGGATGCTCTCAGACAGT
GTCTCTTGGTGACTGTAGGAGTCTCCGAGACAGAGGTTGTTCCCGCTGTCAAGAGCAACCGGCTCTCTGAGCTCTGTGGACATCGGCACTCTGTA

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,320 6,330 6,340 6,350 6,360 6,370 6,380 6,390 6,400 6,410 6,420

CCTTGGGCACTGTCCCTCAGCAACAATCTGTGTTCAACACTGACCTGGCGGACATCTGTTTATGTCACAGTGAAGGCAAGCAGCAAGAGGCTCAG
GGGACCGCTACACGGGAGTGTGTTGTAGCAAAAGTTGGTGAAGCTGGCAAGCTCGGTATGACGCAAAATACGGGTGACTCCCTGCTCGGTCTCTTCCGAGTG

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,430 6,440 6,450 6,460 6,470 6,480 6,490 6,500 6,510 6,520

CTGAGATGGAAGCCATGtTgGAGCACACGGCTGCACCAACAAGAAATGAGAAACCCAGCATCTGAGCGCGGCATCGACAGAAATCAGCGTGGCATTG
GACCTTTAACTCTGGTACaAcCTCTGTGGCGAGCTGGTGTGTTCTTACTCTCGGGTCTAGACTCGCGCGTACGTCTCTTTGACTCGCGCATCGGTAACTC

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,530 6,540 6,550 6,560 6,570 6,580 6,590 6,600 6,610 6,620 6,630

【図 3 1 - 1 0】

[illegible]

【圖 3 1 - 9】

CTGTGGGGGACGCCAAGGTTGTGATCTGGATGGAACCAACAAAGCGGATGGCCATCTACAGACAGAATCATCTGGGATCTGCTGCTGAAGTACATAGACGGC
GAGACCGCTCGCTGGCTTCCAACTAGAACATCTCGATGTTGCTGGCCACTGGGATGTTCTCTAGGTAGACCTAGACGACGACTTCTGTCTAggtCCGC

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,640 6,650 6,660 6,670 6,680 6,690 6,700 6,710 6,720 6,730 6,740

GGACCATCATCATGAGCACCACCACTGGACGAGGCCGCTCTGCTCGAGACAGAATGCCATCATGCTCAGGCGACGACTGTCTGACGGGACCCCACTGTTCT
CTGTGGTAGTAGTACTGCTGGGTGGTGAATCTGCTCGGCGATAGCAGGCTCTGTCTGTAGGCTAGTAAAGCTCGCTCCCGCTGCCGTGAGACCATGACCAAGATCAAA

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,750 6,760 6,770 6,780 6,790 6,800 6,810 6,820 6,830 6,840

CTGAAGAACTTTTCGGACCGAGCTGTATCTGACCTGTGGCGGAATGAAGAACAATCAAGTCTCAGCGAAAGGCGAGGCGACCTGTAAGTCTTACGAA
GACTTCTGCAAAAGCTGGGCCATGACATAGTGGTGGTGAATGCTGATCTGTTAGGTCAGTAAGTCTGCTCTGACATGACGTGCCGTGGGATGACCATGAACTGAA

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,850 6,860 6,870 6,880 6,890 6,900 6,910 6,920 6,930 6,940 6,950

GGGCTTTAGACACGCTCTGCAAGTCAAGTGAGCAATCTGACCCGTAACAGGCTCGATAGCGACGAACGAGCTATGAGAGTGTGTGTGACATATGTGCTC
CCGAAATCTGTGTGGACAGGTGCAAGTGCATCTGCTAGCTGGGAGTTCTCCACAGCTACCGCTGCACTTCTGCATACTGCAACAGCAAGTGTGACAGGAA

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

6,960 6,970 6,980 6,990 7,000 7,010 7,020 7,030 7,040 7,050 7,060

AGGCCCAAGCTGTGGTAGTATCGGCCAAGACTGTAATTTCTGCTCCGCAAGAGCAATCAAGCAGGGCCTAGCCGACAGCTGTTCAGAGAGTGGAAAGAA
TCGGTTCGACCACTTACGTAGCCGGTCTTCTGACTAAAAGACGAGGGCTGTTCTTGAAATGTGTGGCCCGGACGCGTGGCAAGTCTCTGCACCTTTCTTG

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

7,070 7,080 7,090 7,100 7,110 7,120 7,130 7,140 7,150 7,160

CTGGCCCACTCTGGCCGTGTCTAGCTTTGGCATGACGACGACCCCTCTCGAAGAGATTTCTCGAAGTACAGAGGACAGGATAGCGCCGCTCTGTTCTGTGGCG
GACCGCTGGACCCCGACAGATGCAAAACGATGCTGCTGTGGGAGAGATCTCTAAAGAGACTTCTCACTGCTCTCTGCTATCGCGGGAGACCAAGCAGCGC

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

7,170 7,180 7,190 7,200 7,210 7,220 7,230 7,240 7,250 7,260 7,270

AGCACAGCAAAAGCGAGACGTAACCTTAGACACCCCTCTGTGGCCCAAGAGAGAAAGGCCGACAGACCCCTCAGBACAGCAATGTGTGCTCTCTGTTGCTG
TCGTGCTGTTTGGCGCTCTGCACTGGGATCTGTGGGACAGACCGGGTGTCTTCTTGCGGCTCTGGGAGTCTGTCTACACAGBAGAGACCAGACAG

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

7,280 7,290 7,300 7,310 7,320 7,330 7,340 7,350 7,360 7,370 7,380

CTGCGGCTCATCTCAGGGACCACTCCACTGAACCTGAGTGTCTGCACTCACTGACGACCAAGCGGAACAGCTGTTCTGCAGCAGCTGAGCGTCTCTGCTGCT
GACGGCGACAGCACTCCCTGTGGAGTGACTTGGATCACAGAGCTGGAGTGCACTGGTGGCTGTGTGTGCACCAAGCTGTGCACCTCCGAGCAGGACGAC

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

7,390 7,400 7,410 7,420 7,430 7,440 7,450 7,460 7,470 7,480 7,490

【図 3 1 - 1 1】

ACGACGGCCTGAGGAATACGGCATACCGTGATCTCCACGGCTCTGTAATCTGACCAAAAGACACCTGAGCGAGATACACGCTGCTGACCACTCTGTGGATCGCTGTGCTCTCGGAGCTCCTTAGTTCGCCGTAGGCGCATAGGCGTGGAGACTGATGCTTCTCTCGCGACCTGCTTAGTGGCACGACTGCTGGAGACACCTACGACAC

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

8,350 8,360 8,370 8,380 8,390 8,400 8,410 8,420 8,430 8,440 8,450

GTGGCCATCTGGGTGATCTTACGATGAGCTTCTGGCCGCTCTCTGTGCTGATCTGATTCAAGAGAGATGAACAAGACAAGCACTCCAGTTCATCTCCGC

CACCGGTAGACGCATAGAGTGTACTGGAAGCAGGCGCGAGGAAGACAGCATAGACTAGTACTTCTCTCACTTGTCTCTGCTGGAGTCAAGTAGAGCGG

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

8,460 8,470 8,480 8,490 8,500 8,510 8,520 8,530 8,540 8,550 8,560

GGTGTCCTCCCAACCACCTAGGTCACCAATTTCTGGGGACATCAAGTAACAGCGCTGCACCGCGCTGGTCTGGGCATCTTTATCGGCTTTCAAGAAGAG

CCACAGGGTCTGGTGATGACCGAGTGTAAAGAGAGCTGTAGTACTGATGTGGCAAGTCGGCCGACGACCGCTAGAAATAGAGGAGCTTCTTCTCC

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

8,570 8,580 8,590 8,600 8,610 8,620 8,630 8,640 8,650 8,660 8,670

CTCTACAGAGCCCGCAAGAACTGCTCTGTTTGGTGTCTCTGCTCTGCTGTATGCTGGCTGGCGTGTATCCCATGATGATACCCGCCAGCTTGTGTGTAGCTGCC

GGAATGCTCTGGGCGCTTTGGACGACGAACCAACGACGACGAGCATACCGCCGCGCATAGGAGTACTACATGGGCGGTGAAAGACAACATGCACGG

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

8,670 8,680 8,690 8,700 8,710 8,720 8,730 8,740 8,750 8,760 8,770

AGCAGCACTAGTGGCGCTGTTCTGGGCAATCTGTTCTACGGCATCAACACAGCGGCATCACATTCATCTGGAAGTGTGTGGAGAACACAGGACCGCTGGG

TCGCTGCGGATGACCCGGGACGAACCGGTTGACAGATAGCCGTAGTGTGCTGCGGTAGTGAATAGGACCTTGACAGCTCTGTTGTTCTGGGACGACG

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

8,780 8,790 8,800 8,810 8,820 8,830 8,840 8,850 8,860 8,870 8,880

GTTCACGCCGTGCTCGGAAACTGCTGATCGTGTTCCTCACTCTGTCTGCTGGCAGAGGCGCTGATGACCTGGCTCTGTCTACGGCGTGACCGATGTGTACGCCA

CAGTGTCCGCGACGACGCTTTGACGACTAGCAAGGAGTGAAGACAGAGCGCTCTCCGACATAGCTGGACGAGACAGATCCGCGCATGGCTACACATCGCGT

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

8,890 8,900 8,910 8,920 8,930 8,940 8,950 8,960 8,970 8,980 8,990

GATTTGGCGAGGAACACTCCGCAATCCATCCATCTGGAACGTGATCGGCAAGCACTGTTGCCATGGTGGTGAAGCGGTGCTGTACTCTGCTCACTCTGCTG

CTAAACCGCTCTTGTGAGCGCGTTAGTAGAGTGACCTGGAGCTAGCGCTCTGTGCACAGCGGATACACCACTCTCCGACGACATGAAGACAGCTGAGACGAC

コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

8,990 9,000 9,010 9,020 9,030 9,040 9,050 9,060 9,070 9,080 9,090

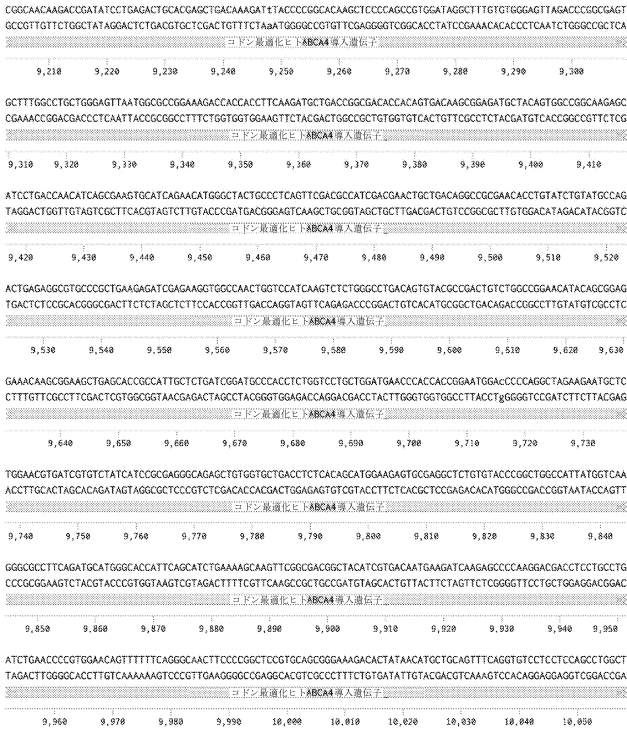
GTGACGACACATTTTCTGTCCCATGTGATCGGCGACCTACCAAGAACCATCTGTGAGCGAGGACGACGATGTGGCGGAGAAAGACAGAGATCATCACCG

CACGCTCTGTGAAAAAGACAGGTTAGCTACCGCTCGGATGGTTTGTGGTAAAGAGCTTCTCTGCTGCTACACCGGCTCCTTCTGTCTCTAGTAGTGGCG

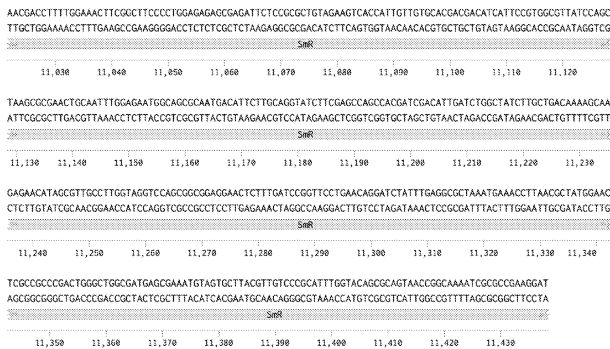
コドン最適化ヒトABCA4導入遺伝子

9,100 9,110 9,120 9,130 9,140 9,150 9,160 9,170 9,180 9,190 9,200

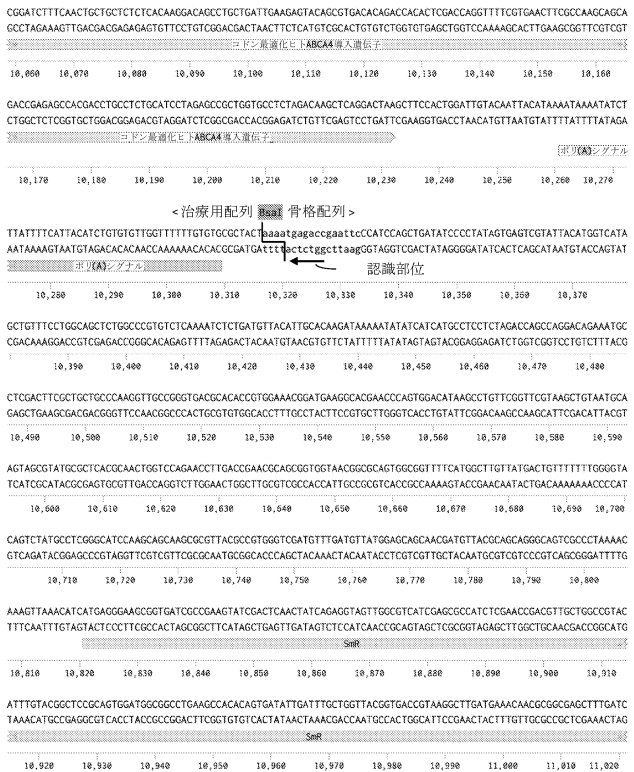
【図 3 1 - 1 2】



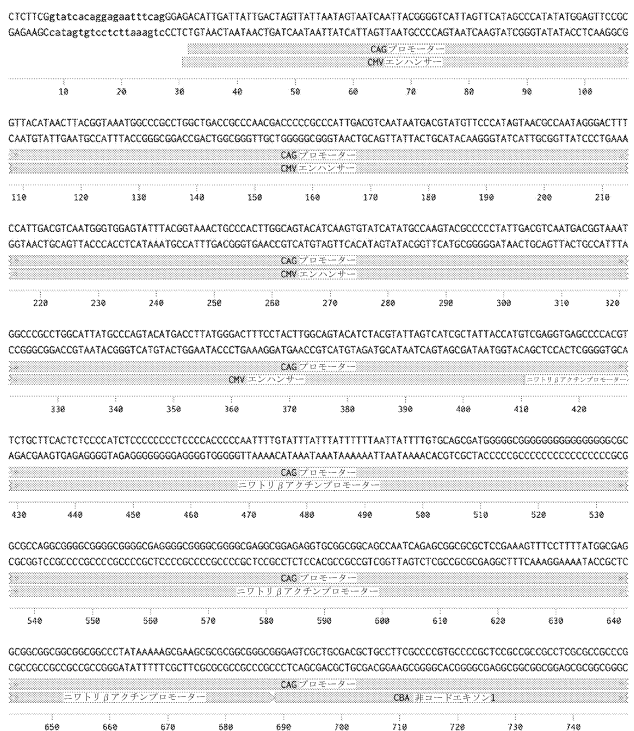
【図 3 1 - 1 4】



【図 3 1 - 1 3】



【図 3 2 - 1】



10

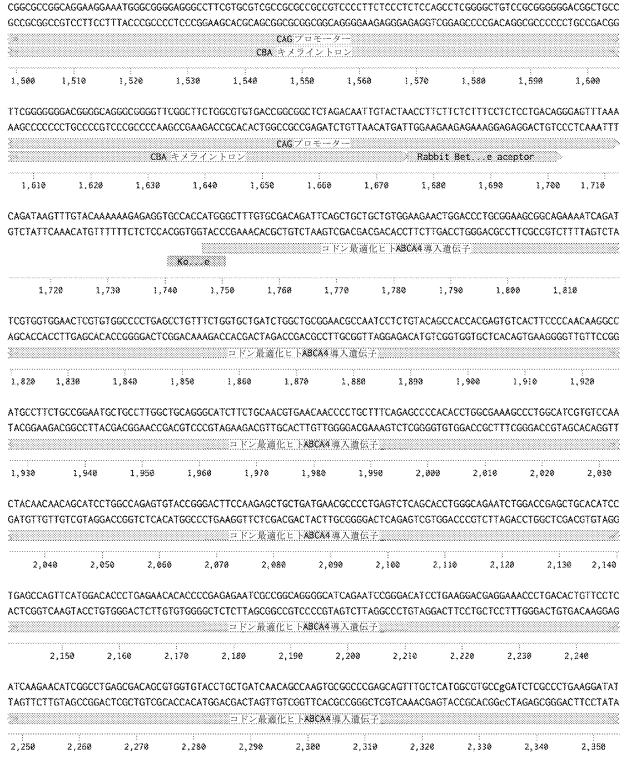
20

30

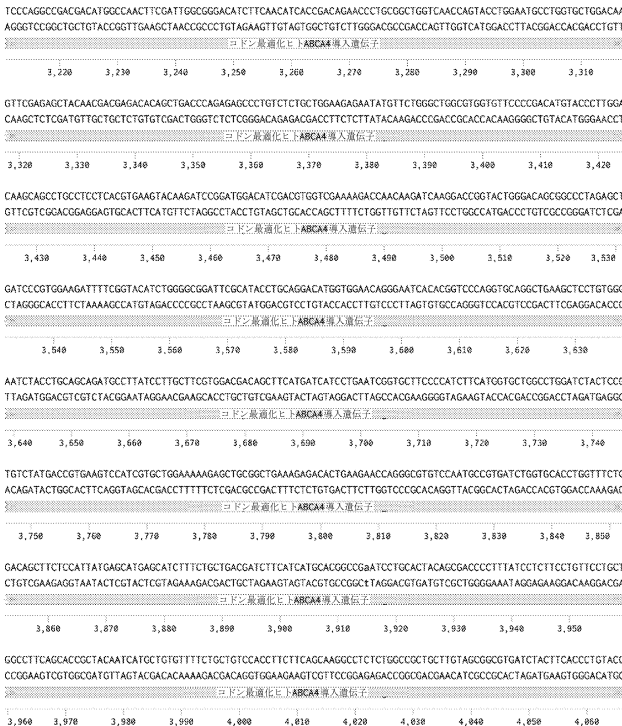
40

50

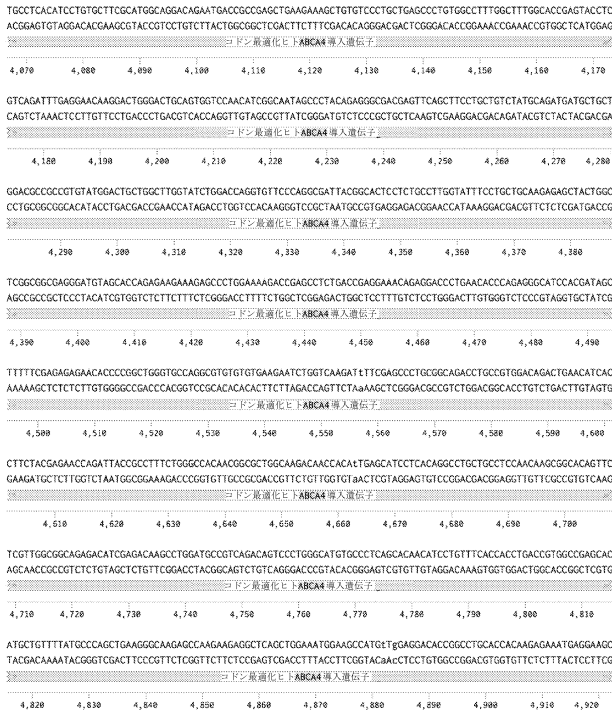
【圖 3 2 - 3】



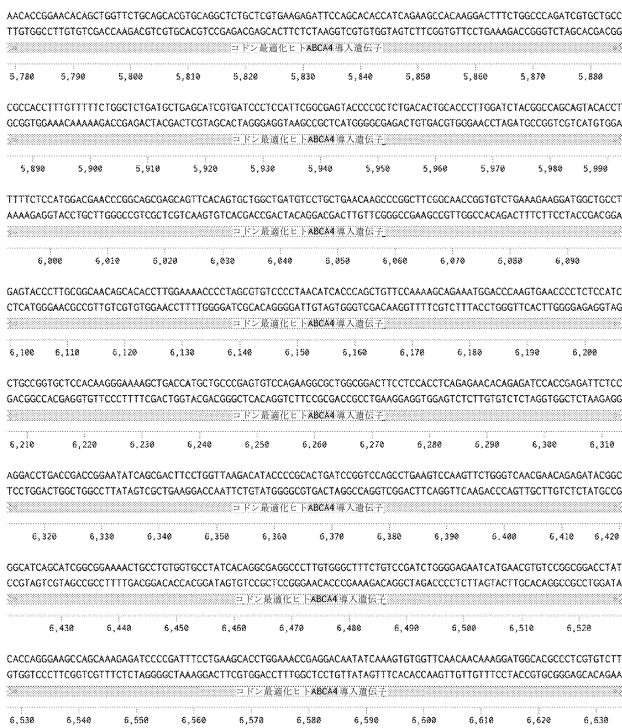
【圖 3 2 - 5】



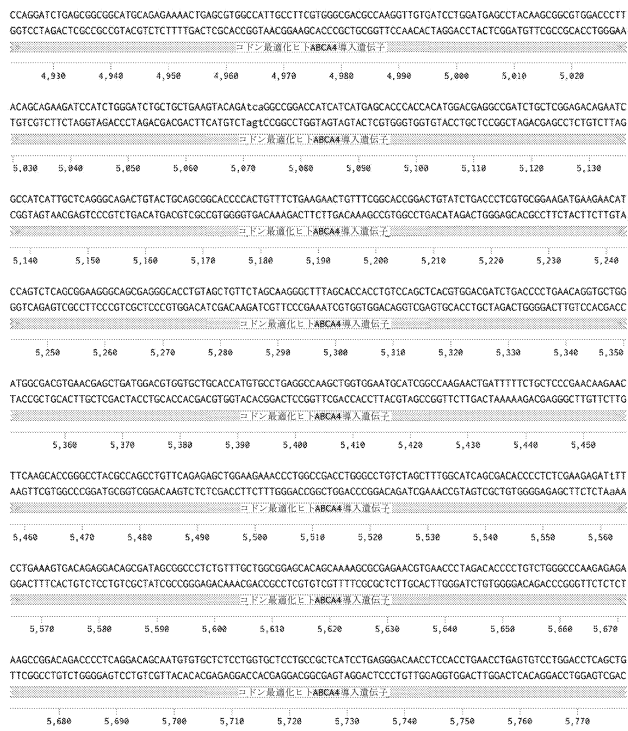
【図 3 2 - 6】



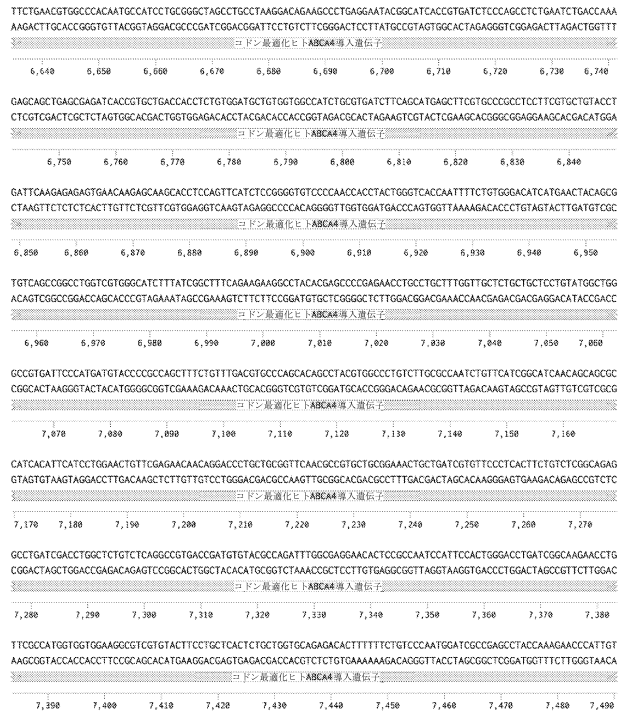
【図 3 2 - 8】



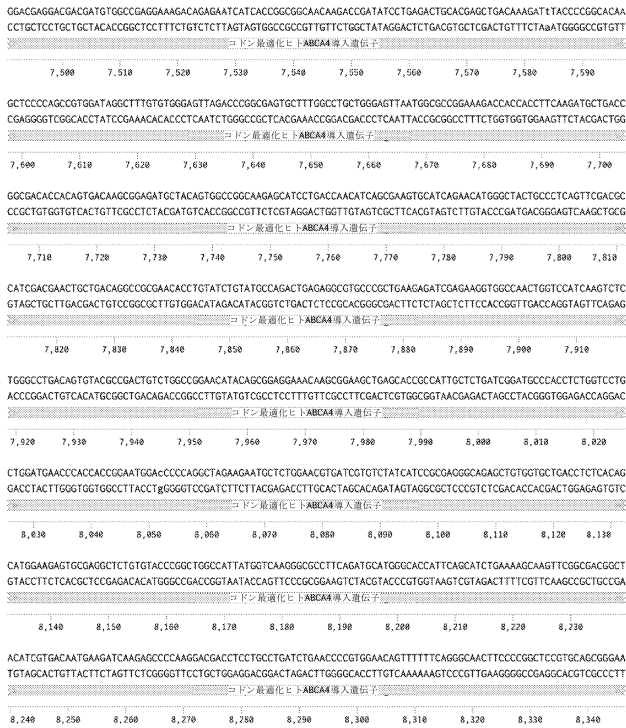
【図 3 2 - 7】



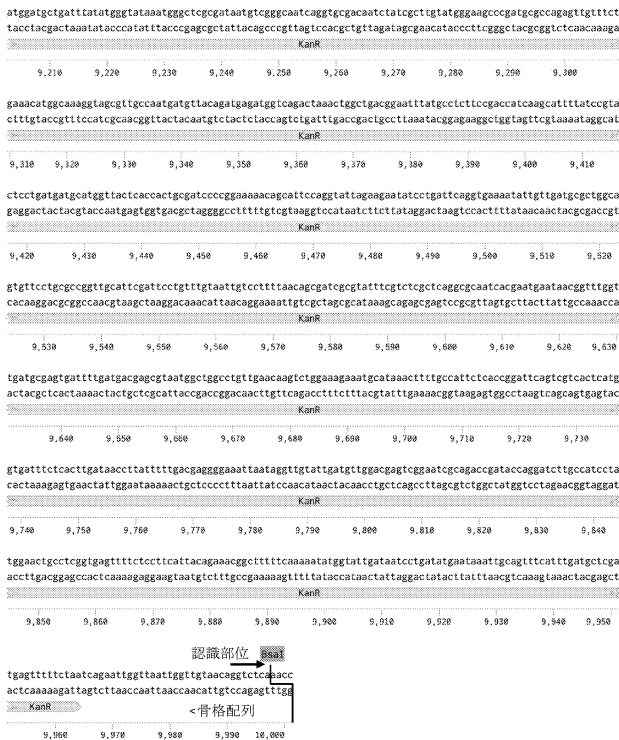
【図 3 2 - 9】



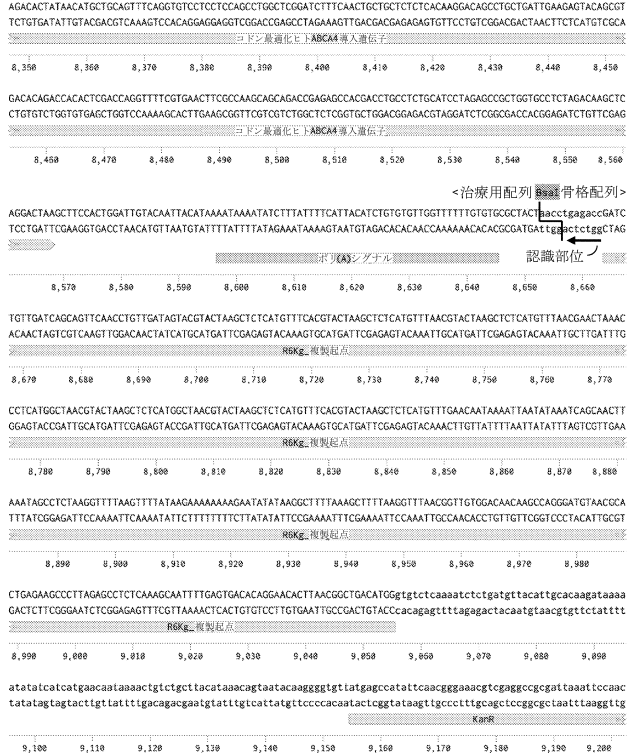
【図 3 2 - 1 0】



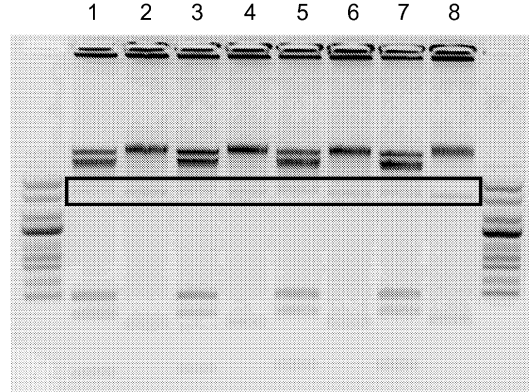
【図 3 2 - 1 2】



【図 3 2 - 1 1】

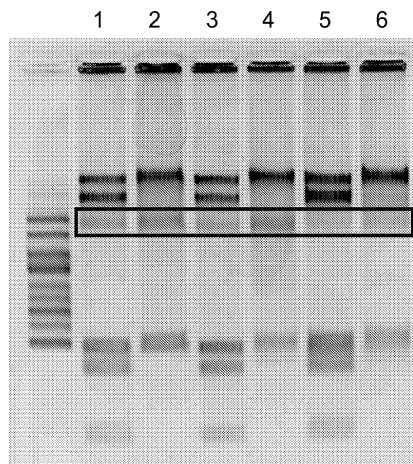


【図 3 3】



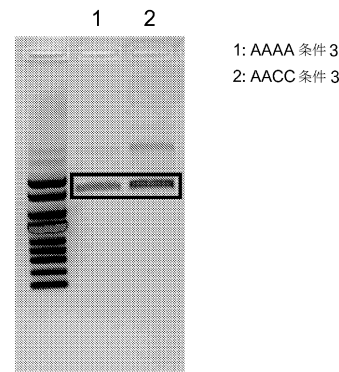
- 1: AAAA 条件 1
- 2: AACC 条件 1
- 3: AAAA 条件 2
- 4: AACC 条件 2
- 5: AAAA 条件 3
- 6: AACC 条件 3
- 7: AAAA 条件 4
- 8: AACC 条件 4

【図 3 4】



1: AAAA 条件 1
2: AACC 条件 1
3: AAAA 条件 2
4: AACC 条件 2
5: AAAA 条件 4
6: AACC 条件 4

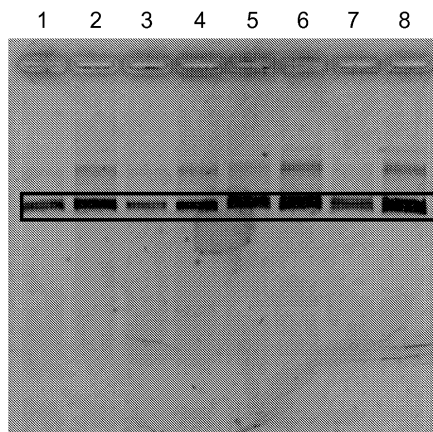
【図 3 5】



1: AAAA 条件 3
2: AACC 条件 3

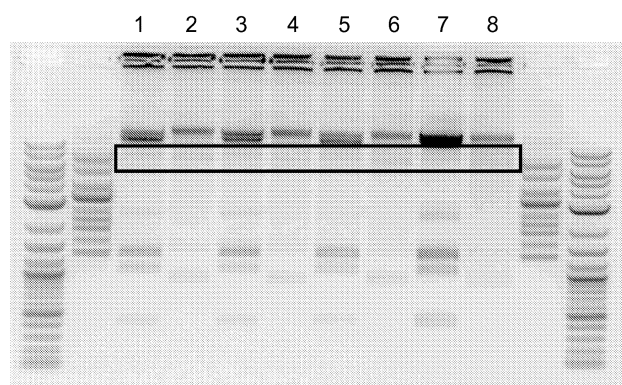
10

【図 3 6】



1: AAAA 条件 1
2: AACC 条件 1
3: AAAA 条件 2
4: AACC 条件 2
5: AAAA 条件 3
6: AACC 条件 3
7: AAAA 条件 4
8: AACC 条件 4

【図 3 7】



1: AAAA 条件 1
2: AACC 条件 1
3: AAAA 条件 2
4: AACC 条件 2
5: AAAA 条件 3
6: AACC 条件 3
7: AAAA 条件 4
8: AACC 条件 4

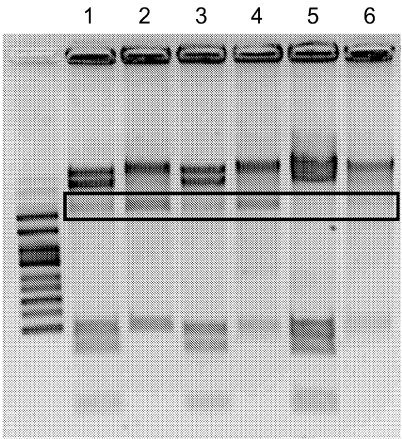
20

30

40

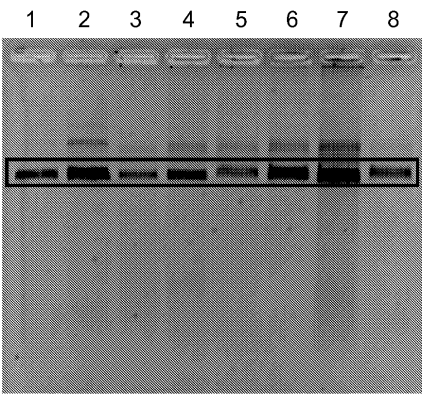
50

【図 3 8】



- 1: AAAA 条件1
- 2: AACC 条件1
- 3: AAAA 条件 2
- 4: AACC 条件 2
- 5: AAAA 条件 4
- 6: AACC 条件 4

【図 3 9】



- 1: AAAA 条件1
- 2: AACC 条件1
- 3: AAAA 条件 2
- 4: AACC 条件 2
- 5: AAAA 条件 3
- 6: AACC 条件 3
- 7: AAAA 条件 4
- 8: AACC 条件 4

【配列表】

2024535917000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/077108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(8) - INV. - C12N 9/22; A61P 27/02; C12N 15/113; C12N 15/64; C12P 19/34 (2023.01) ADD.		
CPC - INV. - C12N 15/64; C12N 15/66; C12Q 1/6844; A61P 27/02; C12N 9/22; C12N 9/93; C12N 15/113; C12P 19/34 (2023.02) ADD. - C12N 2310/532; C12N 2800/00; C12Q 2531/125 (2023.02)		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/0231974 A1 (GENOVIE AB) 23 July 2020 (23.07.2020) entire document	114-117
X	WO 2020/257590 A1 (ASKLEPIOS BIOPHARMACEUTICAL INC.) 24 December 2020 (24.12.2020) entire document	155
Y		158-158
Y	WO 2021/055760 A1 (INTERGALACTIC THERAPEUTICS INC.) 25 March 2021 (25.03.2021) entire document	1-4, 99-101
Y	US 2018/0257991 A1 (Q-LINEA AB) 08 September 2016 (08.09.2016) entire document	1, 2, 4
Y	US 2009/0123973 A1 (REED) 14 May 2009 (14.05.2009) entire document	3, 99-101
Y	US 2017/0067097 A1 (REDAVULT BIOSCIENCES LP) 09 March 2017 (09.03.2017) entire document	4
Y	US 2019/0040397 A1 (UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE 1 et al.) 07 February 2019 (07.02.2019) entire document	156-158
☐ 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 28 April 2023		Date of mailing of the international search report JUN 06 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/077108

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*:I(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

International application No.

PCT/JS2022/077108

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-55, 64-92, 96-98, 102-113, 118-154, 159-197, 204-223, 234-240
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 99-101, 114-117, 155-158

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/077108

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I: claims 1-4, 99-101, 114-117, 155-158 are drawn to methods of producing a therapeutic circular DNA vector, and methods for large-scale production of a therapeutic circular DNA vector.

Group II: claims 58-63 are drawn to methods of removing a backbone sequence from a DNA molecule to produce a therapeutic circular DNA vector, wherein the DNA molecule comprises the backbone sequence and a therapeutic sequence.

Group III: claims 93-95 and 188-203 are drawn to methods of producing a supercoiled therapeutic circular DNA vector.

Group IV: claims 224-233 are drawn to therapeutic circular DNA vectors comprising a therapeutic sequence having a 3' end and 5' end, wherein the 3' end of the therapeutic sequence is connected to the 5' end of the therapeutic sequence by a four-base pair sequence comprising at least two consecutive adenines (A's), and pharmaceutical compositions comprising the same.

The inventions listed in Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I, methods of producing a therapeutic circular DNA vector, and methods for large-scale production of a therapeutic circular DNA vector, are not present in Groups II-IV; the special technical features of Group II, methods of removing a backbone sequence from a DNA molecule to produce a therapeutic circular DNA vector, wherein the DNA molecule comprises the backbone sequence and a therapeutic sequence, are not present in Groups I, II, and IV; the special technical features of Group III, methods of producing a supercoiled therapeutic circular DNA vector, are not present in Groups I, II, and IV; and the special technical features of Group IV, therapeutic circular DNA vectors comprising a therapeutic sequence having a 3' end and 5' end, wherein the 3' end of the therapeutic sequence is connected to the 5' end of the therapeutic sequence by a four-base pair sequence comprising at least two consecutive adenines (A's), and pharmaceutical compositions comprising the same, are not present in Groups I-III.

Additionally, even if Groups I-IV were considered to share the technical features of methods comprising (a) providing a sample comprising a template DNA vector comprising a therapeutic sequence and a backbone sequence; (b) amplifying the template DNA vector using a polymerase-mediated rolling-circle amplification to generate a linear concatemer; methods comprising digesting the linear concatemer with a type IIs restriction enzyme that cuts a first site and a second site per unit of the linear concatemer, wherein the first and second sites flank the therapeutic sequence and form self-complementary overhangs, thereby producing a linear therapeutic fragment and a linear backbone fragment, wherein the linear therapeutic fragment comprises the therapeutic sequence and the linear backbone fragment comprises the backbone sequence; methods comprising contacting the linear backbone fragment and the linear therapeutic fragment with a ligase to produce a circular backbone and a therapeutic circular DNA vector lacking a type IIs restriction site; methods comprising digesting the linear concatemer with one or more restriction enzymes that cut at least a first site, a second site, and a third site per unit of the linear concatemer, wherein: (i) the first and second sites flank the therapeutic sequence and form self-complementary overhangs, and (ii) the third site is within the backbone sequence and forms an overhang that is non-complementary to the first or second site, thereby producing a linear therapeutic fragment comprising the therapeutic sequence and at least two linear backbone fragments each comprising a portion of the backbone sequence; and (d) contacting the linear therapeutic fragment with a ligase to produce a therapeutic circular DNA vector; and therapeutic circular DNA vectors, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2021/055760 A1 to Intergalactic Therapeutics Inc. teaches methods comprising (a) providing a sample comprising a template DNA vector comprising a therapeutic sequence and a backbone sequence; (b) amplifying the template DNA vector using a polymerase-mediated rolling-circle amplification to generate a linear concatemer (a method of producing the isolated DNA vector of any of the embodiments by: (i) providing a sample including a circular DNA vector including an AAV genome, wherein the AAV genome includes the heterologous gene; (ii) amplifying the AAV genome using polymerase-mediated rolling-circle amplification to generate a linear concatemer, Pg. 10, Lns. 5-8); methods comprising digesting the linear concatemer with a restriction enzyme that cuts a first site and a second site per unit of the linear concatemer, wherein the first and second sites flank the therapeutic sequence and form self-complementary overhangs, thereby producing a linear therapeutic fragment and a linear backbone fragment, wherein the linear therapeutic fragment comprises the therapeutic sequence and the linear backbone fragment comprises the backbone sequence (iii) digesting the concatemer using a restriction enzyme to generate multiple AAV genomes; and (iv) allowing each of the multiple AAV genomes to self-ligate to produce an isolated DNA vector including the heterologous gene, Pg. 10, Lns. 8-10; FIG. 5 is a schematic diagram showing a rolling-circle amplification reaction for detection of rAAV circular genomes.... The linear arrays were subsequently digested into unit-length monomeric AAV genomes by restriction enzyme digestion with EcoRI, which cleaves the AAV genome at a single point, Pg. 21, Lns. 34-41; FIG. 5 discloses first and second restriction enzyme sites flanking a therapeutic sequence; methods comprising contacting the linear backbone fragment and the linear therapeutic fragment with a ligase to produce a circular backbone and a therapeutic circular DNA vector lacking a type IIs restriction site (Self-ligation of this linear DNA molecule (e.g., by the addition of a DNA ligase) results in a circular, synthetic DNA vector of the invention, Pg. 42, Lns. 38-39); methods comprising digesting the linear concatemer with one or more restriction enzymes that cut at least a first site, a second site, and a third site per unit of the linear concatemer, wherein: (i) the first and second sites flank the therapeutic sequence and form self-complementary overhangs, and (ii) the third site is within the backbone sequence and forms an overhang that is non-complementary to the first or second site, thereby producing a linear therapeutic fragment comprising the therapeutic sequence and at least two linear backbone fragments each comprising a portion of the backbone sequence (FIG. 5 is a schematic diagram showing a rolling-circle amplification reaction for detection of rAAV circular genomes.... The linear arrays were subsequently digested into unit-length monomeric AAV genomes by restriction enzyme digestion with EcoRI, which cleaves the AAV genome at a single point, Pg. 21, Lns. 34-41; FIG. 5 discloses first, second, and third restriction enzyme sites with the first and second restriction enzyme sites flanking a therapeutic sequence forming linear fragments); and (d) contacting the linear therapeutic fragment with a ligase to produce a therapeutic circular DNA vector (Self-ligation of this linear DNA molecule (e.g., by the addition of a DNA ligase) results in a circular, synthetic DNA vector of the invention, Pg. 42, Lns. 38-39); and therapeutic circular DNA vectors (the invention provides an isolated circular DNA vector including one or more heterologous genes encoding a therapeutic replacement protein, Pg. 2, Lns. 1-2).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/077108

US 2016/0257991 A1 to Q-Linea Ab teaches nucleic acid sequences comprising Type IIS restriction enzyme sites that are self-complementary (the present invention provides a method for performing a rolling circle amplification (RCA) reaction comprising at least two rounds of RCA, said method comprising: - (a) providing a concatemeric first RCA product comprising a multiplicity of monomer repeats, each repeat representing a complementary copy of a first RCA template (a "first" RCA template "circle"); - (b) cleaving the first RCA product into monomer units, wherein the monomer unit is reduced in size as compared to the monomer repeat of the first RCA product; - (c) circularising monomer units resulting from said cleavage to form second RCA templates ("second circles"), wherein the second RCA template is smaller than the first RCA template; - (d) performing a second RCA reaction using said second RCA template of (c) and a primer for said second RCA, to form a second RCA product, Paras. [0017]-[0021]; it may be useful to utilise a type II restriction endonuclease recognition sequence, and optionally a cleavage domain. Some type II restriction endonucleases, e.g. type IIS enzymes, may find particular utility in the methods of the invention, Para. [0093]; the first RCP contains a nicking site within a self-complementary duplex structure, Para. [0094]).

The inventions listed in Groups I-IV therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

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,N
E,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,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,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. TRITON

2. TWEEN

3. プルロニック

(72)発明者 ローラ ホセ

アメリカ合衆国 02140 マサチューセッツ ケンブリッジ ケンブリッジパーク ドライブ 1
50 スイート 800

(72)発明者 ケネディ ジョディ

アメリカ合衆国 02140 マサチューセッツ ケンブリッジ ケンブリッジパーク ドライブ 1
50 スイート 800

(72)発明者 マグワイア アンネ

アメリカ合衆国 02140 マサチューセッツ ケンブリッジ ケンブリッジパーク ドライブ 1
50 スイート 800

(72)発明者 バクシュイシュ メイサム

アメリカ合衆国 02140 マサチューセッツ ケンブリッジ ケンブリッジパーク ドライブ 1
50 スイート 800

(72)発明者 ドーンブッシュ エライザ

アメリカ合衆国 02140 マサチューセッツ ケンブリッジ ケンブリッジパーク ドライブ 1
50 スイート 800

F ターム (参考) 4B064 AF27 CA21 CB04 DA01

4C084 AA13 MA58 NA14 ZA331 ZA332

4C086 AA01 AA04 EA16 MA01 MA04 MA58 NA14 ZA33