

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6748579号
(P6748579)

(45) 発行日 令和2年9月2日 (2020.9.2)

(24) 登録日 令和2年8月12日 (2020.8.12)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 P 19/34 (2006.01)	C 1 2 P 19/34 Z N A A
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10 Z

請求項の数 20 (全 55 頁)

(21) 出願番号	特願2016-572447 (P2016-572447)	(73) 特許権者	520015807
(86) (22) 出願日	平成27年6月10日 (2015.6.10)		キュアバック リアル エステート ゲゼ
(65) 公表番号	特表2017-517266 (P2017-517266A)		ルシャフト ミット ベシュレンクテル
(43) 公表日	平成29年6月29日 (2017.6.29)		ハフツング
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/001164		ドイツ連邦共和国 7 2 0 7 6 テュービ
(87) 国際公開番号	W02015/188933		ンゲン パウル-エアリッヒ-シュトラ
(87) 国際公開日	平成27年12月17日 (2015.12.17)		セ 1 5
審査請求日	平成30年4月11日 (2018.4.11)	(74) 代理人	100107515
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2014/001577		弁理士 廣田 浩一
(32) 優先日	平成26年6月10日 (2014.6.10)	(74) 代理人	100107733
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 流 良広
		(74) 代理人	100115347
			弁理士 松田 奈緒子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNA生成を強化する方法及び手段

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

所与の配列のキャップmRNA分子を合成する方法であって、

a) 前記キャップmRNA分子における4種のヌクレオチドG、A、C、及びUの各割合(1)を求める工程と、

b) 配列最適化反応ミックス中でインビトロ転写によってRNA分子を合成する工程であって、前記配列最適化反応ミックスが、4種のリボヌクレオシド三リン酸(NTTP) GTP、ATP、CTP、及びUTPを含み、前記配列最適化反応ミックス中の前記4種のリボヌクレオシド三リン酸の各割合(2)が、前記キャップmRNA分子、バッファ、DNAテンプレート、及びRNAポリメラーゼ中の各ヌクレオチドの割合(1)に対応する工程とを含む、

前記インビトロ転写の過程で、前記4種のリボヌクレオシド三リン酸(NTTP) GTP、ATP、CTP、及びUTPを含む配列最適化リボヌクレオシド三リン酸(NTTP) ミックスを前記配列最適化反応ミックスに添加し、前記配列最適化リボヌクレオシド三リン酸(NTTP) ミックス中の前記4種のリボヌクレオシド三リン酸の各割合(2)が、前記キャップmRNA分子中の各ヌクレオチドの割合(1)に対応し、

前記キャップmRNA分子を生成するために、前記インビトロ転写の開始前に、キャップアナログを前記配列最適化反応ミックスに添加する；又は前記キャップmRNA分子を生成するために、前記インビトロ転写の後に、キャッピング酵素が用いられることを特徴

10

20

とする方法。

【請求項 2】

前記インビトロ転写の開始前に、前記キャップmRNA分子の第1のヌクレオチドに対応する出発ヌクレオチドを前記配列最適化反応ミックスに添加する請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記出発ヌクレオチドが、ヌクレオシド一リン酸、ヌクレオシド二リン酸、ヌクレオシド三リン酸、又はジヌクレオシド三リン酸、若しくはキャップアナログである請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記出発ヌクレオチドが、前記キャップmRNA分子の第1の位置にみられる前記キャップmRNA分子におけるヌクレオチドの割合に比べて過剰に添加される請求項2から3のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記キャップmRNA分子の前記第1のヌクレオチドに対応しないヌクレオチドについて、前記割合(1)と前記割合(2)との差が最大10%である請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも1つのリボヌクレオシド三リン酸の一部又は全てが、修飾ヌクレオシド三リン酸によって置換されている請求項1から5のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記修飾ヌクレオシド三リン酸が、シュードウリジン-5'-トリホスフェート、1-メチルシュードウリジン-5'-トリホスフェート、2-チオウリジン-5'-トリホスフェート、4-チオウリジン-5'-トリホスフェート、及び5-メチルシチジン-5'-トリホスフェートからなる群から選択される請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記キャップmRNA分子が、100ヌクレオチドよりも長い、及び／又は所与の配列のRNA分子の合成が、大規模合成で実施される、及び／又は前記NTPの対イオンが、トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン(Tris)である請求項1から7のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

インビトロ転写による前記RNA分子の合成後に、未取り込みNTPを分離及び定量する請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

インビトロ転写による前記RNA分子の合成が、バイオリアクタ(1)内で実施される請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記バイオリアクタ(1)が、固体担体に固定化されているDNAテンプレートを含む請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記バイオリアクタ(1)が、前記配列最適化反応ミックスからヌクレオチドを分離するための濾過膜(21)を含む請求項10から11のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

前記濾過膜(21)が、再生セルロース、変性セルロース、ポリスルホン(PSU)、ポリアクリロニトリル(PAN)、ポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリビニルアルコール(PVA)、及びポリアリールエーテルスルホン(PAES)の群から選択される請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記濾過膜(21)が、10kDa~50kDaの範囲の分子量カットオフを有する請求項12から13のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

前記バイオリアクタ（1）が、反応中のヌクレオチド濃度をリアルタイムに測定するためのセンサユニット（41）を含む請求項 10 から 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記センサユニット（41）が、光分析によって前記ヌクレオチド濃度を測定する請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記バイオリアクタ（1）が、前記配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスの添加を制御する制御モジュール（4）を含む、及び／又は前記バイオリアクタ（1）が、前記配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスを添加するアクチュエータ（43）を含む、及び／又は前記バイオリアクタ（1）が、前記キャップ mRNA 分子を捕捉し、転写反応ミックスの他の成分から前記キャップ mRNA 分子を分離するための樹脂を含む、及び／又は前記バイオリアクタ（1）が、半バッチモード又は連続モードで動作する請求項 10 から 16 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 18】

前記バイオリアクタ（1）が、少なくとも 1 つのイオン選択性電極を含む請求項 10 から 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 つのイオン選択性電極が、前記バイオリアクタ（1）の少なくとも 1 つの区画に含まれる液体中の 1 種以上のイオンの濃度を測定するために用いられる請求項 18 に記載の方法。

20

【請求項 20】

前記イオンが、 H^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^{-} 、及び PO_4^{3-} からなる群から選択される請求項 19 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、所与の配列の RNA 分子を合成する方法、及び前記方法を実施するための反応器に関する。

【背景技術】

30

【0002】

治療用リボ核酸（RNA）分子とは、新たに登場した薬物の分類を表す。RNA に基づく治療は、ワクチンとして使用するための抗原をコードしている mRNA 分子を含む（非特許文献 1）。更に、例えば、成長因子又は酵素等の欠損タンパク質を患者に与える補充療法に RNA 分子を使用することも考えられている（非特許文献 2 及び 3）。更に、非コード免疫賦活性 RNA 分子（特許文献 1）及び他の非コード RNA（例えば、マイクロ RNA 及び長鎖非コード RNA）（非特許文献 4）の治療的使用も検討されている。

【0003】

トランスフェクトされた RNA からのタンパク質発現の成功は、トランスフェクション効率、RNA の安定性、及び翻訳効率に依存する。5' キャップ構造及び 3' ポリ（A）テールは、真核細胞における mRNA の効率的翻訳及びタンパク質合成にとって重要な機構である。新たに合成された mRNA は、転写産物の長さが 20 ヌクレオチド～30 ヌクレオチドに達したとき、キャップ構造によって修飾される。まず、RNA 5' ートリホスファターゼ活性及びグアニリルトランスフェラーゼ活性の両方を有する二機能性キャッピング酵素によって、5' 末端のヌクレオチド pppN が 5' GpppN に変換される。次いで、（グアニン-7）-メチルトランスフェラーゼ活性を有する第 2 の酵素によって GpppN 部分がメチル化されて、モノメチル化 m7GpppN の 0 型キャップ構造を形成する。次いで、0 型キャップは、2'-O-メチル化によって核内で m7GpppN の 1 型構造に変換される（非特許文献 5）。

40

【0004】

50

短いRNA分子は、化学的方法によって合成することができるが、長いRNAは、典型的には、バクテリオファージ由来のプロモータを含む好適なDNAテンプレート、RNAポリメラーゼ（例えば、バクテリオファージSP6、T3、又はT7RNAポリメラーゼ）、及びリボヌクレオシド三リン酸（NTP）を含有するインビトロ転写反応によって生成される。主に、2つのプロトコールによって、インビトロで転写されたRNAに5'キャップ構造を導入することができる。

【0005】

第1のプロトコールでは、キャップ形成は、転写の開始と同時に生じる（同時転写キャップ形成）。このアプローチでは、ジヌクレオチドキャップアナログ（例えば、m7G（5'）ppp（5'）G（m7G））を反応混合物に添加する。DNAテンプレートは、通常、転写される最初のヌクレオチドがグアノシンになるように設計される。キャップアナログは、初期ヌクレオチド（出発ヌクレオチド）としての取り込みについてGTPと直接競合し、任意の他のヌクレオチドと同程度容易に取り込まれる（特許文献2）。キャップアナログを優先的に取り込ませるために、典型的には、GTPに対してモル過剰のキャップアナログを使用し（例えば、4：1の比）、他のリボヌクレオシド三リン酸ATP、CTP、及びUTPに比べてGTP濃度を低くする。これら条件下では、通常、GTPがRNA分子の合成についての律速因子になる。その結果、高比率の他のNTP（通常、40%～70%）がRNA合成に用いられず、無駄になる。このアプローチでは、RNA収量は、典型的には、約1mg/mLに制限される（特許文献2）。

【0006】

第2のプロトコールでは、インビトロ転写後に別の酵素反応においてキャップ形成が行われる（転写後又は酵素的キャップ形成）。ワクチニアウイルスキャッピング酵素（VCE）は、m7Gキャップ構造を合成するために必要な3つの酵素活性全てを有する（RNA5'トリホスファターゼ、グアニリルトランスフェラーゼ、及びグアニン-7-メチルトランスフェラーゼ）。基質としてGTPを用いて、VCE反応によって正確な配向のRNAキャップが得られる。更に、第2のワクチニア酵素である2' Oメチルトランスフェラーゼをキャップ形成反応に添加することによって、1型キャップを作製することができる（非特許文献5）。

【0007】

ファージポリメラーゼによってインビトロで転写されたRNAは、自己相補的3'伸長によって生じる二本鎖RNA分子及び転写開始事象の失敗によって生じる短いRNA分子を含む複数の夾雑物を含有することが報告されている。

【0008】

線状化DNAテンプレートのランオフ転写中にT7RNAポリメラーゼによって合成されるRNA分子は、コードRNAよりも長い場合がある（非特許文献6）。DNAテンプレートから離れた後、RNAポリメラーゼは、3'末端が安定な二次構造の一部ではない場合、転写産物をテンプレート部位に、そして、前記転写産物の3'末端を生成物部位に結合させ、それを伸長させる場合がある（自己相補的3'伸長）。この作用は、特にUTP濃度に対して感受性であると考えられるので、UTP濃度のみを低下させることが忠実な転写につながる。しかし、UTP濃度の低下は、RNA収量にも影響を及ぼす場合がある。特にRNAがポリ（A）テールを含有する場合、mRNA等のRNAにおいて共通であるが、転写反応における過剰の未取り込みUTPによって、ポリA配列の反対側でウリジンヌクレオチドのRNAテンプレート依存性取り込みが生じ、その結果、自然免疫反応を活性化させ且つタンパク質合成を減少させ得る二本鎖RNA分子が生じる（非特許文献7）。

【0009】

所望の完全長RNA分子に加えて、インビトロ転写反応からより小さなオリゴリボヌクレオチドが生じる場合もあるが、これは、転写開始事象の失敗の結果である（非特許文献8）。これらアポーティブ（未成熟）転写産物は、RNAポリメラーゼ、DNAテンプレート、及び新生RNA鎖からなる三元複合体から未成熟のまま放出される短いRNA分子

である。典型的には、大部分のアポーティブ転写産物は、2ヌクレオチド長～8ヌクレオチド長であり、開始中のアポーティブサイクリングに起因して形成される。興味深いことに、NTP濃度が約2mMよりも低いとき、アポーティブ転写の増加が観察された（非特許文献9）。アポーティブ転写産物の合成は、貴重なNTPを消費し、完全長産物の収量を低下させるので、アポーティブ転写産物は望ましくない。

【0010】

RNA治療の開発を成功させるために、活性医薬成分としてのRNA分子の生産は、特に、大規模にRNAを生成し且つ完全長又は完全長キャップRNA分子が必要な場合、収量、品質、安全性、及びコストの点で効率的でなければならない。インビトロ転写によるRNA分子の生成を増加させるための幾つかのアプローチが報告されている。高濃度NTPを使用すると、RNA分子の収量が増大すると予測される。或いは、キャップRNA分子を効率的に合成するために、キャップアナログのGTPに対する比を調整することが提案されている。

10

【0011】

インビトロ転写反応の標準的なヌクレオチド濃度は、典型的には、1.5mM～16mMである（非特許文献10～14）。Mg⁺⁺濃度を適宜調整した場合、最高40mMのNTP濃度が可能であり、その結果、RNA収量が増大したと報告されている（特許文献3）。

【0012】

幾つかの高収量転写キット、例えば、T7 High Yield RNA synthesis kit（New England Biolabs, Ipswich, MA, USA）、TranscriptAid（商標）T7 High Yield Transcription kit（Thermo Scientific, Waltham, MA, USA）、MEGAscript（登録商標）High Yield Transcription Kit（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）、又はAmpliCap-Max（商標）T7 High Message Maker kit（Epicentre, Madison, WI, USA）が市販されている。全てのキットにおいて、標準的な転写反応について30mM～40mMという高い合計NTP作用濃度が提案されている。キャップmRNAを合成する場合、GTP濃度は、1.5mM～2mM GTPである。

20

30

【0013】

インビトロ転写反応のRNA収量を最大化するためには、一般的に、高いヌクレオチド濃度が推奨されるが、高濃度NTPの使用は、不利点も有する。例えば、高い初期NTP濃度及び十分に高いMg⁺⁺濃度（例えば、Mg(OAc)₂）を用いると、高いRNA収量を得ることができる。しかし、これら高濃度では、より高い比率のNTPが短いアポーティブ転写産物に取り込まれる場合がある（非特許文献15）。

【0014】

キャップアナログの存在下でキャップmRNAを同時転写的に生成するためには、経済的な理由からNTPの作用濃度を下げる必要があるが、その理由は、キャップアナログをGTPに対して過剰に用いなければならない、これが主なコスト要因となるためである。キャップアナログのGTPに対する比が高いほど、キャップRNAの比率は高くなるが、収量及び経済的な理由から、通常4：1の比が提案される（New England Biolabs, Capped RNA synthesis（E2040）, <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/capped-rna-synthesis-e2040>）。

40

【0015】

例えば、キャップRNAの転写については、T7 High Yield RNA synthesis kitの製造業者の説明書には、キャップアナログがGTPに対して4：1過剰である、2mM GTPの使用が提案されている。20μLの反応あたりの収量は、RNA40μg～50μg（2mg/mL～2.5mg/mLに相当する）であり

50

、約80%がキャップRNA転写産物であることが示されている(New England Biolabs, Capped RNA synthesis (E2040), <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/capped-rna-synthesis-e2040>)。

【0016】

低濃度GTPから得られる限定された収量を補填するために、GTPのキャップアナログに対する比が1:1~1:50で維持されるように、競合ヌクレオチド(GTP、又はAキャップを用いる場合、ATP)との反応を追加することによって、キャップRNAの収量が増大した。このアプローチを用いると、反応あたりの生成されるキャップRNAの量が二倍になり得る(特許文献2)。

10

【0017】

インビトロ転写反応は、典型的には、全ての成分を合わせ、次いで、インキュベートして、反応が終結するまでRNA分子を合成させるバッチ反応として実施される。更に、インビトロ転写反応の効率を増大させるために、フェドバッチ反応が開発された(非特許文献9及び15)。フェドバッチ系では、全ての成分を合わせるが、次いで、追加量の一部の試薬(例えば、NTP及びマグネシウム)を経時的に添加して、一定の反応条件を維持する。フェドバッチストラテジーでは、非常に短い38塩基対のDNAテンプレートの場合、1単位のRNAポリメラーゼ又はDNAテンプレートあたりのRNA収量が100%改善された。この方法は、5'末端に三リン酸を有する非キャップRNA分子の合成にしか使用されていなかった。

20

【0018】

インビトロ転写によってRNA分子を合成するためのバイオリアクタ(転写反応器)の使用が報告されている(特許文献4)。バイオリアクタは、供給ラインを介してリアクタコアに反応物質を送達し、限外濾過膜(例えば、100,000ダルトンの公称分子量カットオフを有する)を介して流出流に移すことによってRNA産物を除去するような構造になっている。

要約すると、インビトロ転写反応からのキャップRNA分子の収量は、2つの要因、即ち、RNA分子への取り込みに利用可能なNTPの合計濃度及びキャップアナログ:GTP比に主に依存している。同時転写キャップ形成の場合、通常、GTP濃度が他のNTPに比べて低い。この事実により、特に高GC含量のテンプレートにおいて、可能な転写収量が制限される。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

【特許文献1】国際公開第2009/095226号パンフレット

【特許文献2】国際公開第2006/004648号パンフレット

【特許文献3】米国特許第5256555号明細書

【特許文献4】国際公開第1995/08626号パンフレット

【非特許文献】

【0020】

【非特許文献1】Fotin-Mleczek et al. 2012. J. Gene Med. 14(6):428-439

【非特許文献2】Kariko et al., 2012. Mol. Ther. 20(5):948-953

【非特許文献3】Kormann et al., 2012. Nat. Biotechnol. 29(2):154-157

【非特許文献4】Esteller, 2011. Nat. Rev. Genet. 12(12):861-74

【非特許文献5】Tcherepanova et al., 2008. BMC Mol. Biol. 9:90

40

50

【非特許文献6】Triana-Alonso et al., 1995, JBC; 270 (11): 6298-6307

【非特許文献7】Kariko et al., 2011, Nucleic Acids Res.; 39 (21): e142

【非特許文献8】Milligan, et al., 1987. Nucleic Acid Res. 15 (21): 8783-8798

【非特許文献9】Kern et al., 1999. Biotechnol. Prog. 15, 174-184

【非特許文献10】Milligan, et al., 1987. Nucleic Acid Res. 15 (21): 8783-8798

【非特許文献11】Sampson & Uhlenbeck, 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (4): 1033-7

【非特許文献12】Cunningham & Ofengand 1990. Biotechniques 9 (6): 713-4

【非特許文献13】Weitzmann et al. 1990, Nucleic Acids Res. 18 (12): 3515-20

【非特許文献14】Gurevich et al., 1991. Anal. Biochem. 195 (2): 207-13

【非特許文献15】Kern et al., 1997. Biotechnol. Prog. 13, 747-756

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

上記を鑑みて、RNAを生成する、特に、タンパク質に翻訳することができる完全長キップRNA分子を生成するための改善された経済的な手段及び方法が継続して必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明は、特に、所与の配列のRNA分子を合成する方法であって、

a) 前記RNA分子における4種のヌクレオチドG、A、C、及びUの各割合(1)を求める工程と、

b) 配列最適化反応ミックス中でインビトロ転写によって前記RNA分子を合成する工程であって、前記配列最適化反応ミックスが、4種のリボヌクレオチドGTP、ATP、CTP、及びUTPを含み、前記反応ミックス中の前記4種のリボヌクレオチドの各割合(2)が、前記RNA分子、バッファ、DNAテンプレート、及びRNAポリメラーゼ中の各ヌクレオチドの割合(1)に対応する工程とを含む方法に関する。

【0023】

また、本発明は、所与の配列のRNA分子を合成するためのバイオリアクタであって、配列最適化反応ミックス中でインビトロRNA転写反応を実施するための反応モジュールと、転写されたRNA分子を一時的に捕捉するための捕捉モジュールと、前記配列最適化反応ミックスの成分の前記反応モジュールへの送り込みを制御するための制御モジュールとを有し、前記反応モジュールが、前記配列最適化反応ミックスからヌクレオチドを分離するための濾過膜を含み、前記制御モジュールによる前記配列最適化反応ミックスの成分の送り込みの制御が、分離されたヌクレオチドの測定濃度に基づくバイオリアクタに関する。

【0024】

以下に示す図面は、単なる例示であり、本発明を更に説明するものとする。これら図面は、本発明を限定すると解釈すべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】配列番号1に対応する、ヒト前立腺幹細胞抗原 (H s P S C A) をコードしている R 1 8 7 1 の G / C 最適化 m R N A 配列。

【図2】配列番号2に対応する、ホタル (P h o t i n u s p y r a l i s) ルシフェラーゼ (P p L u c) をコードしている R 2 9 8 8 の G / C 最適化 m R N A 配列。

【図3A】配列番号3に対応する、ヒトムチン-1シグナルペプチド/上皮成長因子受容体/ムチン-1融合タンパク質 (E G F R / ムチン-1) をコードしている R 1 6 2 6 の G / C 最適化 m R N A 配列。

【図3B】配列番号3に対応する、ヒトムチン-1シグナルペプチド/上皮成長因子受容体/ムチン-1融合タンパク質 (E G F R / ムチン-1) をコードしている R 1 6 2 6 の G / C 最適化 m R N A 配列。

【図4】配列番号4に対応する、R 2 0 2 5 の非コード免疫賦活性 R N A 配列。

【図5】H s P S C A (R 1 8 7 1) 及び E G F R / ムチン-1 をコードしている m R N A (R 1 6 2 6) の経時的 R N A 収量。m R N A は、実施例1に示す通りインビトロ転写によって合成した。(A) 標準的な転写反応の R N A 収量は、約30分間後、E G F R / ムチン-1 をコードしている 5, 3 3 7ヌクレオチド長 R N A (R 1 6 2 6) については約 1. 4 m g / m L R N A、H s P S C A をコードしている 5 8 9ヌクレオチド長 R N A (R 1 8 7 1) については約 1. 8 m g / m L R N A のプラトーに達する。(B) 配列最適化転写反応の R N A 収量は、標準的な転写反応に比べて著しく高い。60分間後 (R 1 6 2 6) 及び120分間後 (R 1 8 7 1)、両 R N A は、約 3. 9 m g / m L R N A の同様のプラトーに達する。トリプリケートの平均及び標準偏差を示す。

【図6】H s P S C A (R 1 8 7 1)、ルシフェラーゼ (P p L u c、R 2 9 8 8)、及び E G F R / ムチン-1 (R 1 6 2 6) をコードしている m R N A における、標準的なヌクレオチドミックス及び配列最適化ヌクレオチド (C a p N T P) ミックスを用いて得られた R N A 収量の比較。実験は、実施例1に記載の通り実施した (反応時間5時間)。異なる長さの3つの異なる R N A 分子の R N A 収量は、各タイプの転写反応について略同じである。しかし、インビトロ転写に用いられるヌクレオチドミックスに依存して異なる収量が得られる。標準的な転写 (各 N T P の N T P 濃度が等しい) からは、約 1. 5 m g / m L R N A が得られ、2倍の濃度のキャップ-N T P ミックス (2 × C a p N T P) を用いた転写からは、約 3. 0 m g / m L R N A、配列最適化 (s e q - o p t) 転写からは、約 3. 9 m g / m L R N A、及び N T P を供給する配列最適化転写からは、約 6. 7 5 m g / m L R N A が得られる。トリプリケートの平均及び標準偏差を示す。

【図7】ホタルルシフェラーゼ (P p L u c) m R N A の標準的なインビトロ転写及び配列最適化インビトロ転写によって得られるキャップ形成効率の分析。実施例2に記載の通り、ハンマーヘッド型リボザイム H H N U H 2 d で R N A を切断し、得られた R N A 断片を、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (d P A G E) によって分離した。キャップ形成されていない (n o c a p) R N A 及び酵素的にキャップ形成された (E - c a p) R N A が、コントロールとして機能した。ホタルルシフェラーゼ (P p L u c) をコードしている m R N A の合成については、標準的な N T P ミックス及び配列最適化 N T P ミックスを用いたとき、同等のキャップ形成効率を得られた。

【図8】ムチン-1シグナルペプチド/上皮成長因子受容体/ムチン-1融合タンパク質 (E G F R / ムチン-1) m R N A (R 1 6 2 6) 及び前立腺幹細胞抗原 (H s P S C A) m R N A (R 1 8 7 1) について、配列最適化 C a p N T P ミックスにおいて U T P 及びシュード U T P を用いた R N A 収量の比較。実験は、実施例3に記載の通り実施した。これらミックスでは、指定通り U T P の 0 %、1 0 %、又は 1 0 0 % をシュード U T P (p s U) で置き換えた。トリプリケートの平均及び標準偏差を示す。

【図9】追加のヌクレオチド (合計 N T P 濃度 1 3. 4 5 m M ; 等量ミックスでは 1 3. 4 5 m M c a p 又は G T P (G T P に対して4倍過剰) ; 配列最適化 N T P ミックスでは 1 1. 2 m M c a p 又は G T P (G T P に対して4倍過剰) の存在下で標準的な (等量) N T P ミックス及び配列最適化 (s e q o p t) N T P ミックスを用いた、非コード

10

20

30

40

50

免疫賦活性RNA R2025の理論RNA収量及び実際RNA収量の比較。白色のバー：実際収量。黒色のバー：理論収量。実験は、実施例4に記載の通り実施した。トリプlicateの平均及び標準偏差を示す。

【図10】追加のヌクレオチド（合計NTP濃度13.45mM；等量ミックスでは13.45mM cap又はGTP（GTPに対して4倍過剰）；配列最適化NTPミックスでは13.7mM cap又はGTP（GTPに対して4倍過剰）の存在下で標準的な（等量）NTP比及び配列最適化NTP比を用いた、ヒト前立腺幹細胞抗原（HsPSCA）（R1871）をコードしているmRNAの理論RNA収量及び実際RNA収量の比較。白色のバー：実際収量。黒色のバー：理論収量。実験は、実施例4に記載の通り実施した。

10

【図11】それぞれの添加された塩（NaCl；Tris/HCl、pH7.5）の存在下でNa-NTP又はTris-NTPの配列最適化NTPミックスを用いた転写効率。実験は、実施例5に記載の通り実施した。

【図12】生成されたRNAの量及びヌクレオチドミックスの消費を測定することによる、配列最適化転写反応の進行のモニタリング。実験は、実施例6に記載の通り実施した。

【図13】cap濃度に依存する、ホタルルシフェラーゼ（PpLuc）をコードしているmRNA（R2988）のRNA収量。様々な濃度のcapアナログの存在下で、合計NTP濃度が4mM及び13.45mMのPpLuc配列最適化NTPミックスを用いたインビトロ転写によってmRNAを合成した。実験は、実施例7に記載の通り実施した。

（A）実際RNA収量[mg/mL]。（B）相対RNA収量[%]。

20

【図14】cap濃度に依存する、ヒト前立腺幹細胞抗原（HsPSCA）をコードしているmRNA（R1871）のRNA収量。様々な濃度のcapアナログの存在下で、合計NTP濃度が2mM、4mM、及び13.45mMのHsPSCA配列最適化NTPミックスを用いたインビトロ転写によってmRNAを合成した。実験は、実施例7に記載の通り実施した。（A）実際RNA収量[mg/mL]。（B）相対RNA収量[%]。

【図15】GTP出発ヌクレオチド濃度に依存する、ヒト前立腺幹細胞抗原（HsPSCA）をコードしているmRNA（R1871）のRNA収量。20mMの濃度になるまでGTP出発ヌクレオチドを添加した合計NTP濃度13.45mMのHsPSCA配列最適化NTPミックスを用いて、インビトロ転写によってmRNAを合成した。実験は、実施例8に記載の通り実施した。（A）実際RNA収量[mg/mL]。（B）相対RNA収量[%]。

30

【図16】GTP出発ヌクレオチド濃度に依存する、ホタルルシフェラーゼ（PpLuc）をコードしているmRNA（R2988）のRNA収量。20mMの濃度になるまでGTP出発ヌクレオチドを添加した合計NTP濃度13.45mMのPpLuc配列最適化NTPミックスを用いて、インビトロ転写によってmRNAを合成した。実験は、実施例8に記載の通り実施した。（A）実際RNA収量[mg/mL]。（B）相対RNA収量[%]。

【図17】GTP出発ヌクレオチド濃度に依存する、EGFR/ムチン-1をコードしているmRNA（R1626）のRNA収量。20mMの濃度になるまでGTP出発ヌクレオチドを添加した合計NTP濃度13.45mMのEGFR/ムチン-1配列最適化NTPミックスを用いて、インビトロ転写によってmRNAを合成した。実験は、実施例8に記載の通り実施した。（A）実際RNA収量[mg/mL]。（B）相対RNA収量[%]。

40

【図18】転写反応のテンプレートとして樹脂固定化線状DNAを用いる、連続又は半バッチプロセス用のモジュールを含むバイオリアクタの概略図。

【図19】標準的な等モルNTPミックスと比較した、配列最適化NTPミックスを用いて合成したRNAによる免疫賦活の低下。細胞上清中のサイトカイン及びケモカイン濃度は、実施例10に記載の通り測定した。

【図20】配列番号6に対応する、A型インフルエンザH1N1亜型（Netherlands、2009）由来のHAをコードしているGC最適化mRNA配列（実施例11）

50

。

【図21】HAをコードしているmRNAの経時的RNA収量（実施例11）。それぞれ、標準的なNTPミックスを用いてバイオリアクタにおけるインビトロ転写によって得られたRNA（TS（1））、供給無しでバイオリアクタにおける配列最適化転写によって得られたRNA（TS（2））、供給有りバイオリアクタにおける配列最適化転写によって得られたRNA（TS（3））、又は低濃度のT7RNAポリメラーゼ及び低濃度のテンプレートをを用いて、バイオリアクタにおける配列最適化転写によって得られたRNA（TS（4））の様々な時点におけるRNA収量を示す。

【図22】フローサイトメトリー分析を用いることによって求めたHAタンパク質の表面発現（実施例11）。それぞれ、標準的なNTPミックスを用いてバイオリアクタにおけるインビトロ転写によって得られたRNA（TS（1））、供給無しでバイオリアクタにおける配列最適化転写によって得られたRNA（TS（2））、供給有りバイオリアクタにおける配列最適化転写によって得られたRNA（TS（3））、又は低濃度のT7RNAポリメラーゼ及び低濃度のテンプレートをを用いて、バイオリアクタにおける配列最適化転写によって得られたRNA（TS（4））をトランスフェクトした細胞について、蛍光強度の幾何平均（GMFI）を求めた。

【図23】それぞれ、標準的なNTPミックスを用いてバイオリアクタにおけるインビトロ転写によって合成されたRNA（TS（1））、供給無しでバイオリアクタにおける配列最適化転写によって合成されたRNA（TS（2））、供給有りバイオリアクタにおける配列最適化転写によって合成されたRNA（TS（3））、又は低濃度のT7RNAポリメラーゼ及び低濃度のテンプレートをを用いて、バイオリアクタにおける配列最適化転写によって合成されたRNA（TS（4））による免疫賦活。細胞上清中のサイトカイン及びケモカイン濃度は、実施例11に記載の通り測定した。

【発明を実施するための形態】

【0026】

定義

明確さ及び読み易さのために、以下の定義を提供する。これら定義において言及する任意の技術的特徴は、本発明の各実施形態及び全ての実施形態において読み取られ得る。更なる定義及び説明は、以下で更に論じ、説明する通り、これら実施形態の状況において具体的に提供され得る。

【0027】

5'キャップ構造：5'キャップは、典型的には、RNA分子の5'末端に付加された修飾ヌクレオチド、特にグアニンヌクレオチドである。好ましくは、5'キャップは、5'-5'-三リン酸結合を用いて付加される。5'キャップは、メチル化される場合もあり、例えば、m⁷GpppN（式中、Nは、5'キャップを有する核酸の末端5'ヌクレオチド、典型的には、RNAの5'末端である）である。自然界に存在する5'キャップは、m⁷GpppNである。

【0028】

5'キャップ構造の更なる例としては、グリセリル、反転型デオキシ非塩基残基（部分）、4'、5'メチレンヌクレオチド、1-（ベーターD-エリスロフラノシル）ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド、アルファ-ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド、非環式3',4'-セコヌクレオチド、非環式3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環式3,5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-反転型ヌクレオチド部分、3'-3'-反転型非塩基部分、3'-2'-反転型ヌクレオチド部分、3'-2'-反転型非塩基部分、1,4-ブタンジオールホスフェート、3'-ホスホロアミデート、ヘキシルホスフェート、アミノヘキシルホスフェート、3'-ホスフェート、3'ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、又は架橋若しくは非架橋メチルホスホネート部分が挙げられる。

【0029】

特に好ましい5'キャップ構造は、CAP1 (m7Gに隣接するヌクレオチドのリボースのメチル化)、CAP2 (m7Gの下流2番目のヌクレオチドのリボースのメチル化)、CAP3 (m7Gの下流3番目のヌクレオチドのリボースのメチル化)、CAP4 (m7Gの下流4番目のヌクレオチドのリボースのメチル化)であり、5'キャップ構造は、キャップアナログによって形成されてもよい。

【0030】

キャップアナログ：キャップアナログとは、キャップ機能を有する（即ち、RNA分子の5'末端に取り込まれたとき、RNA分子の翻訳若しくは局在を促進する、及び／又は分解を防止する）伸長不可能なジヌクレオチドを指す。伸長不可能とは、キャップアナログが5'末端にのみ取り込まれることを意味するが、それは、キャップアナログは5'三リン酸を有していないので、テンプレート依存性RNAポリメラーゼによって3'方向に伸長することができないためである。

【0031】

キャップアナログとしては、m7GpppG、m7GpppA、m7GpppC；非メチル化キャップアナログ（例えば、GpppG）；ジメチル化キャップアナログ（例えば、m2,7GpppG）、トリメチル化キャップアナログ（例えば、m2,2,7GpppG）、ジメチル化対称キャップアナログ（例えば、m7Gpppm7G）、又はアンチリバースキャップアナログ（例えば、ARCA；m7,2'OmeGpppG、m7,2'dGpppG、m7,3'OmeGpppG、m7,3'dGpppG、及びこれらの四リン酸誘導体）からなる群から選択される化学構造が挙げられるが、これらに限定されない（Stepinski et al., 2001. RNA 7(10):1486-95）。キャップアナログの例を表1に示す。

【0032】

【表1】

表1：キャップアナログ（D1及びD2は、対をなすジヌクレオチドを意味する）

三リン酸キャップアナログ	四リン酸キャップアナログ
m ⁷ Gp ₃ G	m ⁷ Gp ₄ G
m ₂ ^{7,3'-O} Gp ₃ G	b ⁷ Gp ₄ G
b ⁷ Gp ₃ G	b ⁷ m ^{3'-O} Gp ₄ G
e ⁷ Gp ₃ G	m ₂ ^{2,7} Gp ₄ G
m ₂ ^{2,7} Gp ₃ G	m ₃ ^{2,2,7} Gp ₄ G
m ₃ ^{2,2,7} Gp ₃ G	b ⁷ m ² Gp ₄ G
m ⁷ Gp ₃ 2'dG	m ⁷ Gp ₄ m ⁷ G
m ⁷ Gp ₃ m ^{2'-O} G	
m ⁷ Gp ₃ m ⁷ G	
m ₂ ^{7,2'-O} Gp ₃ G	
m ₂ ^{7,2'-O} Gppp ₅ G (D1)	
m ₂ ^{7,2'-O} Gppp ₅ G (D2)	
m ₂ ^{7,2'-O} Gpp ₅ pG (D1)	
m ₂ ^{7,2'-O} Gpp ₅ pG (D2)	
m ₂ ^{7,2'-O} Gp ₅ ppG (D1)	
m ₂ ^{7,2'-O} Gp ₅ ppG (D2)	

【0033】

更なるキャップアナログが、既に報告されている（米国特許第7074596号明細書、国際公開第2008/016473号パンフレット、国際公開第2008/157688号パンフレット、国際公開第2009/149253号パンフレット、国際公開第2011/015347号パンフレット、及び国際公開第2013/059475号パンフレット）。

ット)。N⁷-(4-クロロフェノキシエチル)置換ジヌクレオチドキャップアナログの合成が、最近報告された(Kore et al., 2013. Bioorg. Med. Chem. 21(15):4570-4)。

【0034】

特に好ましいキャップアナログは、G[5']ppp[5']G、m⁷G[5']ppp[5']G、m₃^{2',2',7'}G[5']ppp[5']G、m₂^{7',3'-O}G[5']ppp[5']G(3'-ARCA)、m₂^{7',2'-O}GpppG(2'-ARCA)、m₂^{7',2'-O}GppspG D1(β-S-ARCA D1)、及びm₂^{7',2'-O}GppspG D2(β-S-ARCA D2)である。

【0035】

核酸：核酸という用語は、任意のDNA分子又はRNA分子を意味し、ポリヌクレオチドと同義である。更に、本明細書に定義する核酸の修飾又は誘導体は、明示的に「核酸」という総称に含まれる。例えば、ペプチド核酸(PNA)も用語「核酸」に含まれる。

【0036】

単シストロン性RNA：単シストロン性RNAは、典型的に、オープンリーディングフレームを1つしか含まないRNA、好ましくは、mRNAであってよい。この文脈におけるオープンリーディングフレームは、ペプチド又はタンパク質に翻訳することができる幾つかのヌクレオチドトリプレット(コドン)の配列である。

【0037】

二シストロン性RNA：典型的に、2つ(ニシストロン性)又はそれ以上(多シストロン性)のオープンリーディングフレーム(ORF)を有し得るRNA、好ましくは、mRNA。この文脈におけるオープンリーディングフレームは、ペプチド又はタンパク質に翻訳することができる幾つかのヌクレオチドトリプレット(コドン)の配列である。

【0038】

免疫賦活性RNA：本発明の状況における免疫賦活性RNA(isRNA)は、典型的には、自然免疫反応を誘導することができるRNAであってよい。isRNAは、通常、オープンリーディングフレームを有しないので、ペプチド抗原を提供するのではなく、例えば、病原関連分子パターン(PAMP)受容体(例えば、Toll様受容体(TLR))又は他の細胞内RNAセンサ(例えば、RIG-I、MDA-5、又はPKR)に結合することによって自然免疫反応を誘発する。

【0039】

ヌクレオチドアナログ：ヌクレオチドアナログは、リン酸骨格修飾、糖修飾、又はヌクレオ塩基の修飾を含む、自然界に存在するヌクレオチドと構造的に類似するヌクレオチド(アナログ)である。

【0040】

核酸合成：本明細書に定義する本発明に従って用いられる核酸分子は、例えば、固相合成、インビボ増殖(例えば、ウイルスのインビボ増殖)等の合成法に加えて、インビトロ転写反応等のインビトロ法を含む、当技術分野において公知の任意の手段を用いて調製することができる。

【0041】

本発明によれば、RNA分子は、対応するDNA分子のインビトロ転写によって調製される。このDNAテンプレートは、好ましくは、インビトロ転写に好適なプロモータ、例えば、T7又はSP6プロモータを含み、この後に、調製されるRNA分子をコードしている所望のヌクレオチド配列、及びインビトロ転写のための終結シグナルが続く。少なくとも1つの対象RNAのテンプレートを形成するDNA分子は、発酵で増殖させ、次いで、細菌内で複製され得るプラスミドの一部として単離することによって調製してよい。本発明に好適であると述べるができるプラスミドは、例えば、プラスミドpUC18、pUC19、pBR322、pT7Ts(GenBankアクセッション番号U26404; Lai et al., Development 1995, 121:2349 to 2360)、pGEM(登録商標)シリーズ、例えば、pGEM(登録商標)-1(

10

20

30

40

50

GenBankアクセッション番号X65300; Promega製)、及びpSP64 (GenBankアクセッション番号X65327)である。Mezei and Storts, Purification of PCR Products, in: Griffin and Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001も参照されたい。

【0042】

RNA: RNAは、リボ核酸の一般的な略称である。RNAは、核酸分子、即ち、ヌクレオチドからなるポリマーである。これらヌクレオチドは、通常、所謂骨格に沿って互いに結合しているアデノシンーリン酸モノマー、ウリジンーリン酸モノマー、グアノシンーリン酸モノマー、及びシチジンーリン酸モノマーである。骨格は、第1のモノマーの糖、即ち、リボースと、第2の隣接するモノマーのリン酸部分との間のホスホジエステル結合によって形成される。モノマーの特定の連続物をRNA配列と呼ぶ。

10

【0043】

メッセンジャーRNA (mRNA): 真核細胞では、転写は、典型的には、核又はミトコンドリア内部で実施される。インビボでは、DNAの転写によって、通常mRNAと略される、所謂メッセンジャーRNAにプロセッシングしなければならない、所謂未成熟RNAが通常生じる。例えば、真核生物における未成熟RNAのプロセッシングは、スプライシング、5'キャップ形成、ポリアデニル化、核又はミトコンドリアからの輸送等の様々な異なる転写後修飾を含む。これらプロセス全体をmRNAの成熟とも呼ぶ。成熟メッセンジャーRNAは、通常、特定のペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列に翻訳され得るヌクレオチド配列を提供する。典型的には、成熟mRNAは、5'キャップ、5'UTR、オープンリーディングフレーム、3'UTR、及びポリ(A)配列を含む。本発明の状況では、mRNAは、人工分子、即ち、自然界には存在しない分子であってもよい。これは、本発明の状況におけるmRNAが、例えば、5'UTR、オープンリーディングフレーム、3'UTR、及びポリ(A)配列の自然界には存在しない組み合わせを含み得ることを意味する。

20

【0044】

自己複製RNA (レプリコン): 自己複製RNAは、セムリキ森林ウイルス(SFV)、シンドビス(SIN)ウイルス、及びベネズエラウマ脳炎(VEE)ウイルスから開発されたアルファウイルスに基づく送達ベクターである。アルファウイルスは、アルファウイルスの構造遺伝子を対象異種遺伝子に置き換えることができる一本鎖RNAウイルスである。イントランスで構造遺伝子を提供することによって、レプリコンRNAをレプリコン粒子(RP)にパッケージングし、これを遺伝子治療目的又は遺伝子ワクチン接種に用いることができる(例えば、Vander Veen et al., 2012. Alphavirus replicon vaccines. Animal Health Research Reviews, p. 1-9を参照)。宿主細胞に侵入した後、ゲノムウイルスRNAは、先ず、ウイルスRNAの増幅の開始に必要なウイルスの非構造タンパク質(nsp)を翻訳するためのmRNAとして機能する。RNAの複製は、追加のゲノム長RNAを合成するため及び内部プロモータからプラス鎖サブゲノムRNAを転写するためのテンプレートとして用いられる完全長マイナス鎖中間体の合成を介して生じる。次いで、かかるRNAは、自己複製RNAであるとみなすことができるが、その理由は、複製(及び異種遺伝子の転写)に関与する非構造タンパク質が、かかるレプリコン中に依然として存在しているためである。かかるアルファウイルスベクターを「レプリコン」と称する。

30

40

【0045】

核酸分子の配列: 核酸分子の配列は、典型的には、そのヌクレオチドの具体的且つ個別の順序、即ち、連続物であると理解される。

【0046】

オープンリーディングフレーム: 本発明の状況におけるオープンリーディングフレーム

50

(ORF)は、典型的には、ペプチド又はタンパク質に翻訳することができる幾つかのヌクレオチドトリプレットの配列であり得る。オープンリーディングフレームは、好ましくは、開始コドン、即ち、通常アミノ酸メチオニンをコードしている3つの後続ヌクレオチドの組み合わせ(ATG又はAUG)をその5'末端に含み、また、通常3ヌクレオチドの倍数の長さを有する後続領域も含む。ORFは、好ましくは、終止コドン(例えば、TAA、TAG、TGA)によって終結する。典型的には、これは、オープンリーディングフレームの唯一の終止コドンである。したがって、本発明の状況におけるオープンリーディングフレームは、好ましくは、3で割り切れる数のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列であり、これは、開始コドン(例えば、ATG又はAUG)で始まり、好ましくは、終止コドン(例えば、それぞれ、TAA、TGA、若しくはTAG、又はUAA、UAG、UGA)で終わる。オープンリーディングフレームは、単離することもでき、又はより長い核酸配列、例えば、ベクター又はmRNAに組み込むこともできる。また、オープンリーディングフレームは、「タンパク質コード領域」又は「コード領域」と呼ばれることもある。

10

【0047】

配列最適化反応ミックス：4種のヌクレオシド三リン酸(NTTP)GTP、ATP、CTP、及びUTPを含む所与の配列のRNA分子のインビトロ転写反応において用いるための反応ミックスであって、配列最適化反応ミックス中の4種のヌクレオシド三リン酸(NTTP)の各割合(2)が、前記RNA分子、バッファ、DNAテンプレート、及びRNAポリメラーゼ中の各ヌクレオチドの割合(1)に対応している反応ミックス。あるリボヌクレオチドが前記RNA分子中に存在しない場合、配列最適化反応ミックス中にも対応するヌクレオシド三リン酸は存在しない。

20

【0048】

配列最適化ヌクレオシド三リン酸(NTTP)ミックス：4種のヌクレオシド三リン酸(NTTP)GTP、ATP、CTP、及びUTPを含む所与の配列のRNA分子のインビトロ転写反応において用いるためのヌクレオシド三リン酸(NTTP)の混合物であって、配列最適化ヌクレオシド三リン酸(NTTP)ミックス中の4種のヌクレオシド三リン酸(NTTP)の各割合(2)が、前記RNA分子中の各ヌクレオチドの割合(1)に対応している混合物。あるリボヌクレオチドが前記RNA分子中に存在しない場合、配列最適化ヌクレオシド三リン酸(NTTP)ミックス中にも対応するヌクレオシド三リン酸は存在しない。

30

【0049】

修飾ヌクレオシド三リン酸：用語「修飾ヌクレオシド三リン酸」とは、本明細書で使用する時、骨格修飾に加えて、糖修飾又は塩基修飾を含む化学修飾を指す。これら修飾ヌクレオシド三リン酸は、本明細書では、(ヌクレオチド)アナログとも呼ばれる。

【0050】

この状況では、本明細書に定義する修飾ヌクレオシド三リン酸は、ヌクレオチドアナログ/修飾、例えば、骨格修飾、糖修飾、又は塩基修飾である。本発明に関連する骨格修飾は、ヌクレオチドの骨格のリン酸が化学的に修飾されている修飾である。本発明に関連する糖修飾は、ヌクレオチドの糖の化学修飾である。更に、本発明に関連する塩基修飾は、ヌクレオチドの塩基部分の化学修飾である。この状況では、ヌクレオチドアナログ又は修飾は、好ましくは、転写及び/又は翻訳に適用可能なヌクレオチドアナログから選択される。

40

【0051】

糖修飾

本発明の状況で用いることができる修飾ヌクレオシド及びヌクレオチドは、糖部分が修飾されていてもよい。例えば、2'ヒドロキシル基(OH)は、多数の異なる「オキシ」又は「デオキシ」置換基で修飾又は置換することができる。「オキシ」-2'ヒドロキシル基修飾の例としては、アルコキシ又はアリールオキシ(-OR、例えば、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、又は糖)；ポリエチレ

50

ングリコール (PEG)、 $-O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; 2' ヒドロキシルが、例えば、メチレン架橋によって、同じリボース糖の 4' 炭素に結合している「ロックス」核酸 (LNA); 及びアミノ基 (アミノ基、例えば、 NR_2 が、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノであってよい O -アミノ)、又はアミノアルコキシが挙げられるが、これらに限定されない。

【0052】

「デオキシ」修飾としては、水素、アミノ (例えば、 NH_2 ; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、又はアミノ酸); 又はリンカーを介して糖に結合することができるアミノ基 (前記リンカーは、原子 C、N、及び O のうちの 1 以上を含む) が挙げられる。

10

【0053】

また、糖基は、リボースにおける対応する炭素とは逆の立体化学配置を有する 1 以上の炭素を含有していてもよい。したがって、修飾ヌクレオチドは、例えば、糖としてアラビノースを含有するヌクレオチドを含んでいてよい。

【0054】

骨格修飾

リン酸骨格は、修飾ヌクレオシド及びヌクレオチドが更に修飾されていてもよい。骨格のリン酸基は、酸素原子のうちの 1 以上を異なる置換基で置換することによって修飾することができる。更に、修飾ヌクレオシド及びヌクレオチドは、非修飾リン酸部分が本明細書に記載する修飾リン酸で完全に置換されていてもよい。修飾リン酸基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、ホスホン酸水素、ホスホロアミデート、アルキル又はアリールホスホネート、及びホスホトリエステルが挙げられるが、これらに限定されない。ホスホロジチオエートは、両方の非結合酸素が硫黄によって置換されている。また、リン酸リンカーは、結合酸素を窒素 (架橋ホスホロアミデート)、硫黄 (架橋ホスホロジチオエート)、及び炭素 (架橋メチレン-ホスホネート) で置換することによって修飾することができる。

20

【0055】

塩基修飾

本発明で用いることができる修飾ヌクレオシド及びヌクレオチドは、ヌクレオ塩基部分が更に修飾されていてもよい。RNA 中にみられるヌクレオ塩基の例としては、アデニン、グアニン、シトシン、及びウラシルが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、本明細書に記載するヌクレオシド及びヌクレオチドは、主溝面が化学的に修飾されていてよい。幾つかの実施形態では、主溝化学修飾は、アミノ基、チオール基、アルキル基、又はハロ基を含んでいてよい。

30

【0056】

本発明の特に好ましい実施形態では、ヌクレオチドアナログ/修飾は、塩基修飾から選択され、これは、好ましくは、2'-アミノ-6'-クロロプリンリボシド-5'-トリホスフェート、2'-アミノプリン-リボシド-5'-トリホスフェート; 2'-アミノアデノシン-5'-トリホスフェート、2'-アミノ-2'-デオキシシチジン-トリホスフェート、2'-チオシチジン-5'-トリホスフェート、2'-チオウリジン-5'-トリホスフェート、2'-フルオロチミジン-5'-トリホスフェート、2'-O-メチルイノシン-5'-トリホスフェート、4'-チオウリジン-5'-トリホスフェート、5'-アミノアリルシチジン-5'-トリホスフェート、5'-アミノアリルウリジン-5'-トリホスフェート、5'-ブロモシチジン-5'-トリホスフェート、5'-ブロモウリジン-5'-トリホスフェート、5'-ブロモ-2'-デオキシシチジン-5'-トリホスフェート、5'-ブロモ-2'-デオキシウリジン-5'-トリホスフェート、5'-ヨードシチジン-5'-トリホスフェート、5'-ヨード-2'-デオキシシチジン-5'-トリホスフェート、5'-ヨードウリジン-5'-トリホスフェート、5'-ヨード-2'-デオキシウリジン-5'

40

50

’-トリホスフェート、5-メチルシチジン-5’-トリホスフェート、5-メチルウリジン-5’-トリホスフェート、5-プロピニル-2’-デオキシシチジン-5’-トリホスフェート、5-プロピニル-2’-デオキシウリジン-5’-トリホスフェート、6-アザシチジン-5’-トリホスフェート、6-アザウリジン-5’-トリホスフェート、6-クロロプリンリボシド-5’-トリホスフェート、7-デアザアデノシン-5’-トリホスフェート、7-デアザグアノシン-5’-トリホスフェート、8-アザアデノシン-5’-トリホスフェート、8-アジダデノシン-5’-トリホスフェート、ベンズイミダゾールリボシド-5’-トリホスフェート、N1-メチルアデノシン-5’-トリホスフェート、N1-メチルグアノシン-5’-トリホスフェート、N6-メチルアデノシン-5’-トリホスフェート、O6-メチルグアノシン-5’-トリホスフェート、シュードウリジン-5’-トリホスフェート、又はピューロマイシン-5’-トリホスフェート、キサントシン-5’-トリホスフェートから選択される。5-メチルシチジン-5’-トリホスフェート、7-デアザグアノシン-5’-トリホスフェート、5-プロモシチジン-5’-トリホスフェート、及びシュードウリジン-5’-トリホスフェートからなる塩基修飾ヌクレオチドの群から選択される塩基修飾のためのヌクレオチドが特に好ましい。

【0057】

幾つかの実施形態では、修飾ヌクレオシドとしては、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザウリジン、2-チオ-5-アザウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、及び4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジンが挙げられる。

【0058】

幾つかの実施形態では、修飾ヌクレオシドとしては、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、及び4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジンが挙げられる。

【0059】

他の実施形態では、修飾ヌクレオシドとしては、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2, 6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N6, N

10

20

30

40

50

6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオーアデニン、及び2-メトキシアデニンが挙げられる。

【0060】

他の実施形態では、修飾ヌクレオシドとしては、イノシン、1-メチルイノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7-デアザグアノシン、7-デアザ-8-アザグアノシン、6-チオグアノシン、6-チオ-7-デアザグアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザグアノシン、7-メチルグアノシン、6-チオ-7-メチルグアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシグアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2、N2-ジメチルグアノシン、8-オキソグアノシン、7-メチル-8-オキソグアノシン、1-メチル-6-チオグアノシン、N2-メチル-6-チオグアノシン、及びN2、N2-ジメチル-6-チオグアノシンが挙げられる。

10

【0061】

幾つかの実施形態では、ヌクレオチドは、主溝面が修飾されていてもよく、ウラシルのC-5におけるハロゲンのメチル基又はハロ基による置換を含んでよい。

【0062】

特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、5'-O-(1-チオホスフェート)-アデノシン、5'-O-(1-チオホスフェート)-シチジン、5'-O-(1-チオホスフェート)-グアノシン、5'-O-(1-チオホスフェート)-ウリジン、又は5'-O-(1-チオホスフェート)-シュードウリジンである。

【0063】

20

更なる特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドとしては、6-アザシチジン、2-チオシチジン、 α -チオシチジン、シュードイソーシチジン、5-アミノアリルウリジン、5-ヨードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、5, 6-ジヒドロウリジン、 α -チオウリジン、4-チオウリジン、6-アザウリジン、5-ヒドロキシウリジン、デオキシチミジン、5-メチルウリジン、ピロロシチジン、イノシン、 α -チオグアノシン、6-メチルグアノシン、5-メチルシチジン、8-オキソグアノシン、7-デアザグアノシン、N1-メチルアデノシン、2-アミノ-6-クロロプリン、N6-メチル-2-アミノプリン、シュードイソーシチジン、6-クロロプリン、N6-メチルアデノシン、 α -チオアデノシン、8-アジドアデノシン、7-デアザアデノシンから選択されるヌクレオシド修飾が挙げられる。

30

【0064】

更なる修飾ヌクレオチドは、既に報告されている（国際公開第2013052523号パンフレット）。

【0065】

収量：収量（反応収量とも称する）は、化学反応又は酵素反応で得られる生成物の量である。絶対収量は、グラム又はモル（モル収量）で重量として表すことができる。相対収量、割合収量、又は百分率収量は、合成手順の有効性を測定する機能を有し、得られた生成物の量を理論収量で除することによって算出される（両方の測定単位は、同じでなければならない）。

相対収量 = (実際収量) / (理論収量)

40

【0066】

実際収量：実際収量は、化学反応において得られる生成物の量を指す。

【0067】

理論収量：理論収量は、完全に効率的な化学反応又は酵素反応において生成することができる生成物の最大量である。実際は、殆どの反応は完全に効率的ではないので、反応の実際収量は、通常、理論収量よりも少ない。理論収量は、反応の化学量論を考慮して、律速反応物質のモル量に基づいて算出される。算出については、通常、関与する反応が1つだけであると仮定する。

【0068】

RNA収量：RNA収量は、インビトロ転写反応で得られたRNA生成物の量である。

50

RNA収量は、RNA濃度（g/mL又はmol/L）として表すことができる。RNA濃度に反応体積を乗じると、RNAの絶対量（グラム又はmol）が得られる。

【0069】

実際RNA収量：実際RNA収量は、所定の時点におけるインビトロ転写反応のRNA生成物の実験的に求められた量、例えば、反応完了後の収量である。例えば、RNA濃度は、分光光度計を用いて260nmにおける吸光度を測定することによって求めることができる（Kollitz et al., 2013. Methods Enzymol. 530:331-6）。260nmにおける1吸光度単位は、40ng/μLのRNAに相当する（1 A260 = 40ng/μL RNA）。

【0070】

理論RNA収量：理論RNA収量は、インビトロ転写反応において利用可能なNTPに基づく最大可能RNA収量である。等濃度の4種のNTP（ATP、GTP、CTP、UTP）を用いた標準的な転写反応では、典型的には、RNA配列において最も高頻度のヌクレオチドに対応するヌクレオチドが、律速因子となる。対象RNA配列用の配列最適化NTPミックスを用いた配列最適化転写反応では、個々のヌクレオチドのいずれも律速因子にならない。

【0071】

転写反応についての理論RNA収量を算出するために、転写反応の開始時に存在する各NTPの量（mol）をRNA分子の配列中に存在するそれぞれのヌクレオチドの数で除して、合成することができる可能RNA分子数（mol）を得る。RNAの分子質量を乗じることにより、質量単位（グラム）の理論RNA収量が得られる。等濃度の各NTPを用いる標準的な転写反応では、典型的には、RNA配列において最も高頻度のヌクレオチドに対応するNTPが、律速因子となる。対照的に、配列最適化転写反応では、全ての種類のNTPがRNA分子の配列中の対応するヌクレオチドと同じ比で存在するので、いずれのNTPも律速因子にならない。

【0072】

相対RNA収量：相対RNA収量、割合RNA収量、又は百分率RNA収量は、インビトロ転写反応の効率を測定する機能を有し、得られたRNA生成物の量（実際RNA収量）を理論RNA収量で除することによって算出される（両方の測定単位は、同じでなければならない）：

相対RNA収量 = （実際RNA収量） / （理論RNA収量）。

【0073】

インビトロ転写反応の効率を表すために、百分率RNA収量を算出することもできる：

RNA収量（%） = （実際RNA収量） / （理論RNA収量） × 100。

【0074】

第1の態様では、本発明は、所与の配列のRNA分子を合成する方法であって、

a) 前記RNA分子における4種のヌクレオチドG、A、C、及びUの各割合（1）を求める工程と、

b) 配列最適化反応ミックス中でインビトロ転写によって前記RNA分子を合成する工程であって、前記配列最適化反応ミックスが、4種のリボヌクレオシド三リン酸（NTP）GTP、ATP、CTP、及びUTPを含み、前記配列最適化反応ミックス中の前記4種のリボヌクレオシド三リン酸（NTP）の各割合（2）が、前記RNA分子、バッファ、DNAテンプレート、及びRNAポリメラーゼ中の各ヌクレオチドの割合（1）に対応する工程とを含む方法に関する。

【0075】

本発明の状況では、また、実施例1並びに図5及び6に示す通り、インビトロ転写によって所与の配列のRNA分子を生成するために4種のリボヌクレオシド三リン酸（NTP）GTP、ATP、CTP、及びUTPを含有する配列最適化反応ミックスを使用することにより、4種全てのNTPを等mol初期濃度で含む非最適化反応ミックスに比べて、よ

10

20

30

40

50

り高いRNA生成物収量が得られるので、取り込まれず無駄になるNTPが少なくすむ。合成が難しいので、高価な修飾ヌクレオチドを用いるとき、この態様が特に有益である。配列最適化NTPミックスでは、GTP、ATP、CTP、及びUTPは、前記RNA配列中に存在する前記ヌクレオチドG、A、C、及びUの割合に対応する割合で表される。配列最適化インビトロ転写反応では、4種のNTPは同程度消費され、NTPを使い果たすまで転写が続くので、無駄になる材料が少なくなると考えられる。

【0076】

更に、配列最適化NTPミックスを用いると、例えば、自己相補的3'伸長 (Triana-Alonso et al., 1995, JBC; 270(11):6298-6307) に起因してコードRNAよりも長いRNA分子が合成される可能性が避けられると予測されるが、その理由は、反応の最後に過剰のUTPが残らないためである。特に、RNAがポリ(A)テールを含有する場合、mRNA等のRNAにおいて共通であるが、転写反応における過剰の未取り込みUTPによって、ポリA配列の反対側でウリジンヌクレオチドのRNAテンプレート依存性取り込みが生じ、その結果、自然免疫反応を活性化させ且つタンパク質合成を減少させ得る二本鎖RNA分子が生じる (Kariko et al., 2011, Nucleic Acids Res.; 39(21):e142)。

【0077】

以下に詳細に説明する通り、インビトロ転写を用いてRNA分子を生成する方法は、当技術分野において公知である。また、例えば、RNA分子の安定性を改善するために、ヌクレオチドアナログを使用することも知られている。本発明は、インビトロ転写反応の反応ミックス中のリボヌクレオシド三リン酸 (NTP) の濃度に関する。

【0078】

したがって、本発明の方法の第1の工程では、前記RNA分子中の4種のヌクレオチドG、A、C、及びUの各割合(1)を求める。これは、例えば、単にヌクレオチド数を数えるか又はコンピュータを利用する方法を用いる等、当技術分野において公知の任意の方法によって実施することができる。

【0079】

次いで、各ヌクレオチドの割合(1)は、数、百分率、モル分率、又はモル百分率を含む任意の好適な用語で表すことができる。モル分率又はモル百分率(x_i)は、構成成分の量(モルで表される) n_i を混合物中の全ての構成成分の合計量 $n_{t.o.t}$ で除したものであると定義される。全てのモル分率の合計は、1に等しい。分母を100として表される同じ概念が、モル百分率(モル%)である。

【0080】

前記RNA分子中の各ヌクレオチドの割合の決定に基づいて、本発明の方法の更なる工程では、前記RNA分子は、配列最適化反応ミックス中でインビトロ転写によって合成され、前記配列最適化反応ミックスは、4種のリボヌクレオシド三リン酸(NTP) GTP、ATP、CTP、及びUTP、又はこれらのアナログを含み、前記配列最適化反応ミックス中の4種のリボヌクレオシド三リン酸(NTP)の各割合(2)は、前記RNA分子中の各ヌクレオチドの割合(1)に対応する。

【0081】

好ましい実施形態では、本発明の方法の工程b)は、

b1) 4種のリボヌクレオシド三リン酸(NTP) GTP、ATP、CTP、及びUTPを含む配列最適化リボヌクレオシド三リン酸(NTP)ミックスを調製する工程であって、前記配列最適化リボヌクレオシド三リン酸(NTP)ミックス中の4種のリボヌクレオシド三リン酸(NTP)の各割合(2)が、前記RNA分子中の各ヌクレオチドの割合(1)に対応する工程と、

b2) 工程(b1)の前記配列最適化リボヌクレオシド三リン酸(NTP)ミックス、バッファ、DNAテンプレート、及びRNAポリメラーゼを含む配列最適化反応ミックス中でインビトロ転写によって前記RNA分子を合成する工程と

を含む。

【0082】

したがって、この好ましい実施形態では、配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスは、割合（1）の決定に基づいて調製され、次いで、反応ミックスに添加される。配列最適化反応ミックスに関して上に示した全ての定義、特に、「割合（1）が割合（2）に対応する」という点に関して行った定義は、配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスにも適用される。

【0083】

この状況において、当業者であれば、前記RNA分子が、それぞれ、全てのヌクレオチドG、A、C、及びUを含有している訳ではない場合、配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックス及び配列最適化反応ミックスにも同じことが当てはまることを理解する。

【0084】

本発明によれば、「割合（1）が割合（2）に対応する」とは、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックス中のリボヌクレオシド三リン酸（NTP）の割合が、RNA分子中のヌクレオチドの割合に合わせて調整されていることを意味する。当業者であれば、割合（2）が割合（1）を正確に反映している必要はないが、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックス中の各リボヌクレオシド三リン酸の個々の割合（2）は、前記RNA分子中の対応するヌクレオチドの割合（1）を反映している必要があることを理解する。

【0085】

割合（1）と割合（2）との関係をより詳細に評価するために、「割合（1）が割合（2）に対応する」という用語の定義については、以下を考慮してよい：

a) 合成されるRNA分子の第1のヌクレオチドに対応する配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックス中のリボヌクレオシド三リン酸の割合に関して、本発明の1つの実施形態によれば、割合（2）が割合（1）の範囲内である、例えば、割合（1）と割合（2）との差が25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、7%以下、5%以下、又は0.1%～5%の値であることが可能である。

b) 前記RNA分子の第1のヌクレオチドに対応していない配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックス中に存在する他のリボヌクレオシド三リン酸に関して、割合（2）は、好ましくは、割合（1）の範囲内であり、例えば、割合（1）と割合（2）との差は、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、7%以下、5%以下、又は0.1%～5%の値である。

【0086】

本発明の好ましい実施形態では、インビトロ転写を開始する前に、出発ヌクレオチドを配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックスに添加する。出発ヌクレオチドは、前記RNA分子の第1のヌクレオチドに対応するヌクレオチドである（+1位）。出発ヌクレオチドは、特に、RNAポリメラーゼの初期速度を増大させるために添加してよい。また、前記出発ヌクレオチドは、当技術分野において公知であり、ヌクレオシド一リン酸、ヌクレオシド二リン酸、ヌクレオシド三リン酸を含む。出発ヌクレオチドは、モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、又はトリヌクレオチドであってよい。前記RNA分子の第1のヌクレオチドがGである場合、出発ヌクレオチドは、好ましくは、GTP又はGMPである。

【0087】

本発明の好ましい実施形態では、前記出発ヌクレオチドは、ジヌクレオチドである。更により好ましい実施形態では、出発ヌクレオチドは、キャップアナログである。

【0088】

好ましい実施形態では、キャップアナログは、 $G[5']ppp[5']G$ 、 $m^7G[5']ppp[5']G$ 、 $m_3^{2',2',7}G[5']ppp[5']G$ 、 $m_2^{7,3'}-^0G[5']ppp[5']G(3'-ARCA)$ 、 $m_2^{7,2'}-^0GpppG(2'$

10

20

30

40

50

—ARCA)、 $m_2^{7,2'-O}GppspG$ D1 (β -S-ARCA D1)、及び
 $m_2^{7,2'-O}GppspG$ D2 (β -S-ARCA D2) からなる群から選択さ
 れる。

【0089】

しかし、別の好ましい実施形態によれば、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反
 応ミックスにおいて、前記RNA分子の第1のヌクレオチドに対応する出発ヌクレオチド
 は、前記RNA分子の第1の位置にみられる前記RNA分子中のヌクレオチドの割合に比
 べて、過剰に添加される。

【0090】

好ましくは、出発ヌクレオチドは、約1mM～約20mM、約1mM～約17.5mM
 、約1mM～約15mM、約1mM～約12.5mM、約1mM～約10mM、約1mM
 ～約7.5mM、約1mM～約5mM、又は約1mM～約2.5mMの範囲の初期濃度で
 添加される。更により好ましくは、出発ヌクレオチドは、約5mM～約20mM又は約7
 .5mM～約17.5mMの初期濃度で添加される。

【0091】

上記好ましい例示的な実施形態では、RNA分子の第1のヌクレオチドは、Gであり、
 出発ヌクレオチドは、Gのキャップアナログであり、対応するリボヌクレオシド三リン酸
 は、GTPである。この実施形態では、キャップアナログは、GTPに比べて反応ミッ
 ス中に過剰に存在する。好ましくは、キャップアナログは、約1mM～約20mM、約1
 mM～約17.5mM、約1mM～約15mM、約1mM～約12.5mM、約1mM～
 約10mM、約1mM～約7.5mM、約1mM～約5mM、又は約1mM～約2.5m
 Mの範囲の初期濃度で添加される。更により好ましくは、キャップアナログは、約5mM
 ～約20mM、約7.5mM～約20mM、約10mM～約20mM、又は約12.5m
 M～約20mMの初期濃度で添加される。

【0092】

インビトロ転写の方法は、当技術分野において公知である (Geall et al.
 , 2013. Semin. Immunol. 25 (2) : 152-159 ; Brunel
 le et al. , 2013. Methods Enzymol. 530 : 101-1
 4)。前記方法で用いられる試薬としては、典型的には、以下が挙げられる：

1) バクテリオファージにコードされているRNAポリメラーゼ等のそれぞれのRNA
 ポリメラーゼに対して高い結合親和性を有するプロモータ配列を含む線状化DNAテンプ
 レート；

2) 4種の塩基 (アデニン、シトシン、グアニン、及びウラシル) についてのリボヌク
 レオシド三リン酸 (NTP) ；

3) 上に定義したキャップアナログ (例えば、 $m_7G(5')ppp(5')G(m_7G)$) ；

4) DNA依存性RNAポリメラーゼ (例えば、T7、T3、又はSP6 RNAポリ
 メラーゼ) ；

5) 任意の夾雑RNaseを不活化するためのリボヌクレアーゼ (RNase) 阻害剤
 ；

6) 転写を阻害し得るピロリン酸を分解するためのピロホスファターゼ；

7) ポリメラーゼの補因子として Mg^{2+} を供給する $MgCl_2$ ；

8) 最適濃度の酸化防止剤及びポリアミン (例えば、スペルミジン) を含有していても
 よい、好適なpH値を維持するためのバッファ。

【0093】

好ましい実施形態によれば、所与の配列のRNA分子を合成するための本発明の方法に
 用いられる配列最適化反応ミックスは、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジン
 エタンスルホン酸 (HEPES) 及びトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris)
 からなる群から選択されるバッファを含む。好ましくは、バッファは、10mM～1
 00mM、10mM～75mM、10mM～50mM、10mM～40mM、10mM～

10

20

30

40

50

30 mM、又は10 mM～20 mMの濃度で用いられる。バッファのpH値は、例えば、NaOH、KOH、又はHClで調整することができる。好ましくは、バッファは、6～8.5、6.5～8.0、7.0～7.5のpH値を有し、更に好ましくは、7.5である。最も好ましくは、バッファは、80 mM HEPES/KOH、pH 7.5及び40 mM Tris/HCl、pH 7.5からなる群から選択される。

【0094】

本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化反応ミックスに含まれるRNAポリメラーゼは、T3、T7、及びSP6 RNAポリメラーゼからなる群から選択される。好ましくは、RNAポリメラーゼの濃度は、約1 nM～約100 nM、約1 nM～約90 nM、約1 nM～約80 nM、約1 nM～約70 nM、約1 nM～約60 nM、約1 nM～約50 nM、約1 nM～約40 nM、約1 nM～約30 nM、約1 nM～約20 nM、又は約1 nM～約10 nMである。更により好ましくは、RNAポリメラーゼの濃度は、約10 nM～約50 nM、約20 nM～約50 nM、又は約30 nM～約50 nMである。最も好ましくは、RNAポリメラーゼ濃度は、約40 nMである。この状況では、500 U/mL～10,000 U/mLのRNAポリメラーゼ濃度が好ましい。RNAポリメラーゼ濃度は、より好ましくは、1,000 U/mL～7,500 U/mL、最も好ましくは、2,500 U/mL～5,000 U/mLである。当業者であれば、RNAポリメラーゼ濃度の選択が、DNAテンプレートの濃度に影響を受けることを理解する。

10

【0095】

本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化反応ミックスに含まれるDNAテンプレートの濃度は、約1 nM～約50 nM、約1 nM～約40 nM、約1 nM～約30 nM、約1 nM～約20 nM、又は約1 nM～約10 nMの範囲である。更により好ましくは、DNAテンプレートの濃度は、約10 nM～約30 nMである。最も好ましくは、DNAテンプレートの濃度は、約20 nMである。この状況では、DNAテンプレートの濃度は、約1 µg/mL～約200 µg/mLが特に好ましく、約10 µg/mL～約100 µg/mLがより好ましく、約20 µg/mL～約50 µg/mL（例えば、25 µg/mL又は50 µg/mL）が最も好ましい。

20

【0096】

本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化反応ミックスは、ピロホスファターゼを含む。好ましくは、ピロホスファターゼの濃度は、約1 ユニット/mL～約20 ユニット/mL、約1 ユニット/mL～約15 ユニット/mL、約1 ユニット/mL～約10 ユニット/mL、約1 ユニット/mL～約5 ユニット/mL、又は約1 ユニット/mL～約2.5 ユニット/mLである。更により好ましくは、ピロホスファターゼの濃度は、約1 ユニット/mL又は約5 ユニット/mLである。

30

【0097】

本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化反応ミックスは、Mg⁺⁺イオンを含む。好ましくは、Mg⁺⁺イオンは、MgCl₂又はMg(OAc)₂の形態で提供される。好ましくは、初期遊離Mg⁺⁺濃度は、約1 mM～約100 mM、約1 mM～約75 mM、約1 mM～約50 mM、約1 mM～約25 mM、又は約1 mM～約10 mMである。更により好ましくは、初期遊離Mg⁺⁺濃度は、約10 mM～約30 mM又は約15 mM～約25 mMである。最も好ましくは、初期遊離Mg⁺⁺濃度は、約24 mMである。当業者であれば、Mg⁺⁺濃度の選択が、初期合計NTP濃度に影響を受けることを理解する。

40

【0098】

本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化反応ミックスは、RNAポリメラーゼをその活性状態で維持するために還元剤を含む。好ましくは、還元剤は、ジチオトレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、及びβ-メルカプトエタノールからなる群から選択される。好ましくは、還元剤の濃度は、約1 mM～約50 mM、約1 mM～約40 mM、約1 mM～約30 mM、又は約1 mM～約20 mM、又は約1 mM～約10 mMである。更により好ま

50

しくは、還元剤の濃度は、10 mM～50 mM又は20 mM～40 mMである。最も好ましくは、配列最適化反応ミックスは、40 mM DTTを含む。

【0099】

本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化反応ミックスは、ポリアミンを含む。好ましくは、ポリアミンは、スペルミン及びスペルミジンからなる群から選択される。好ましくは、ポリアミンの濃度は、約1 mM～約25 mM、約1 mM～約20 mM、約1 mM～約15 mM、約1 mM～約10 mM、約1 mM～約5 mM、又は約1 mM～約2.5 mMである。更により好ましくは、ポリアミンの濃度は、約2 mMである。最も好ましくは、配列最適化反応ミックスは、2 mMスペルミジンを含む。

【0100】

本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化反応ミックスは、リボヌクレアーゼ阻害剤を含む。好ましくは、リボヌクレアーゼ阻害剤の濃度は、約1 ユニット/mL～約500 ユニット/mL、約1 ユニット/mL～約400 ユニット/mL、約1 ユニット/mL～約300 ユニット/mL、約1 ユニット/mL～約200 ユニット/mL、又は約1 ユニット/mL～約100 ユニット/mLである。更により好ましくは、リボヌクレアーゼ阻害剤の濃度は、約200 ユニット/mLである。

【0101】

本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックス中の初期合計NTP濃度は、20 mM未満、15 mM未満、10 mM未満、7.5 mM未満、5.0 mM未満、又は2.5 mM未満である。

【0102】

本発明によれば、初期合計ヌクレオチド濃度という用語は、配列最適化反応ミックスの様々な成分がインビトロ転写反応を実施するための最終体積にまとめられている場合、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックス中に最初に存在するNTPの合計濃度、例えば、ATP、GTP、CTP、及び/又はUTPの濃度の合計を意味する。自然界では、反応が進行するにつれて、ヌクレオチドがRNA分子に取り込まれ、その結果、合計ヌクレオチド濃度は、初期値から次第に低下する。

【0103】

本発明の重要な態様は、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックスの使用によって、初期合計ヌクレオチド濃度が低い（例えば、2 mM）場合でさえも、RNA合成の効率を増大させることである。対照的に、RNA収量を増大させるためには、高濃度の合計ヌクレオチド（約12 mM～約40 mM）が必要であることが既に示唆されている（米国特許第6586218号明細書）。

【0104】

更に、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックス中の初期合計ヌクレオチド濃度が低い（例えば、2.5 mM）場合、短いアポリープRNA分子の合成が減少すると予測される。対照的に、標準的な等モルNTPミックスのNTP濃度を約2 mM未満まで下げた場合、アポリープ転写の増加が観察された（Kern et al., 1999. Biotechnol. Prog. 15, 174-184）。

【0105】

本発明の別の好ましい実施形態は、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックスにNTPを添加する形態に関する。リボヌクレオシド三リン酸（NTP）GTP、ATP、CTP、及びUTP、又はこれらのアナログは、対イオンとして一価又は二価カチオンを備え得る。好ましくは、一価カチオンは、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、又はトリス（ヒドロキシメチル）-アミノメタン（Tris）からなる群から選択される。好ましくは、二価カチオンは、 Mg^{++} 、 Ba^{++} 、及び Mn^{++} からなる群から選択される。

【0106】

本発明の最も好ましい実施形態によれば、NTP対イオンは、トリス（ヒドロキシメチル）-アミノメタン（Tris）である。

10

20

30

40

50

【0107】

バクテリオファージRNAポリメラーゼは、塩阻害に対して感受性であることが知られている。RNA収量に対する高濃度NaClの負の影響が報告されている（例えば、Kern & Davis, 1997, Biotechnol. Prog., 13, 747-756；米国特許第6,586,218号明細書）。したがって、特にNTP供給ストラテジーを押し進めた結果Na-NTPが高濃度になると、RNA収量が減少する場合がある。この制約は、Trisヌクレオチドを使用することによって回避できるが、その理由は、RNAポリメラーゼ活性が、高濃度Naに比べて高濃度Trisにはそれ程影響を受けないためである。実施例5及び図12に示す通り、RNA収量は、Trisに比べてNaの添加に対して感受性が高い。

10

【0108】

例えば、RNAの安定性を高めるために、それぞれ、リボヌクレオシド三リン酸GTP、ATP、GTP、及びUTPの代わりに、修飾リボヌクレオシド三リン酸（アナログ）をインビトロ転写反応において用いてもよいことが当技術分野において公知である。実施例3及び図8に示す通り、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックスにおけるUTPの一部又は全てをシュードUTPに置き換えてもよい。

【0109】

その結果、本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックスにおける少なくとも1つのヌクレオシド三リン酸の一部又は全てが、修飾ヌクレオシド三リン酸に置き換えられる。

20

【0110】

本発明の好ましい実施形態では、前記修飾ヌクレオシド三リン酸は、シュードウリジン-5'-トリホスフェート、1-メチルシュードウリジン-5'-トリホスフェート、2-チオウリジン-5'-トリホスフェート、4-チオウリジン-5'-トリホスフェート、及び5-メチルシチジン-5'-トリホスフェートからなる群から選択される。

【0111】

当業者であれば、配列最適化NTPミックス又は配列最適化反応ミックスの個々の成分の濃度を正確に確立することは、インビトロ転写の開始前にしかできないことを理解する。したがって、本発明の好ましい実施形態では、上に定義した数及び割合は、転写開始前の配列最適化反応ミックス又は配列最適化NTPミックス中に存在する初期濃度を反映する。

30

【0112】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、インビトロ転写の過程で、本明細書に定義する配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスを配列最適化反応ミックスに補充する。

【0113】

本発明の状況では、追加量の配列最適化NTPミックスをインビトロ転写反応に供給する（NTP供給）ことによって、RNA収量を更に増大させ得ることが見出された。実施例1及び図6に示す通り、追加の配列最適化NTPミックスを添加することによって、RNA収量が著しく増大する。

40

【0114】

新たな配列最適化NTPミックスは、キャップアナログの対応するヌクレオチド（例えば、GTP）に対する所望の比（例えば、4：1）が維持されるように添加する。好ましくは、配列最適化反応ミックス中の全てのヌクレオチドが消費されたとき、インビトロ転写反応の最後に新たな配列最適化NTPミックスを添加する。残りのキャップアナログの新たに添加された対応するヌクレオチド（例えば、GTP）に対する比（例えば、4：1）は、略維持することができるが、その理由は、RNA 1分子当たり1つのキャップアナログしか取り込むことができないので、転写反応の最後にキャップアナログが略100%残存しているためである。このストラテジーによって、同じキャップ形成効率が得られ、収量は増大し（>4.5倍、RNA配列に依存）、且つコストは著しく低下する。更に、

50

NTP含量の増大は、転写中のRNA分子の沈殿を防ぐが、これは、標準的なNTP濃度でも共通してみられる（標準的な反応及び配列最適化反応のいずれにおいても）。

【0115】

また、NTPの配列依存性取り込みによって、インビトロ転写反応の進行をモニタリングすることもできる。実施例6及び図13に示す通り、インビトロ転写反応の進行は、インビトロ転写反応から未取り込みヌクレオチドを分離し、260nmで吸光度を測定することによってモニタリングすることができる。この理由は、4種全てのNTPの合計濃度の低下が、合成されるRNA量と直接関連しているためである。同じ比のヌクレオシド三リン酸を含む標準的なNTPミックスを用いた場合、このアプローチは容易に可能ではない。例えば、低分子量カットオフ膜で濾過することによって干渉を避けるためにRNA及びDNAからNTPを分離する場合、260nmにおける吸光度の低下は、生成されるRNA分子に直接転換することができる。

10

【0116】

核酸及びヌクレオチドを定量する方法は、当技術分野において公知である。核酸を定量するための分光学的方法としては、従来の吸光度測定（Kollitz et al., 2013. *Methods Enzymol.* 530: 331-6）、並びに蛍光色素（例えば、エチジウムブロマイド）及び好適な励起波長（例えば、302nm又は546nm）の蛍光光度計を用いるより感度の高い蛍光技術（Gallagher, 2011. *Current Protocols in Molecular Biology*. 93: A.3D.1-A.3D.14）が挙げられる。したがって、本発明の好ましい実施形態では、インビトロ転写による前記RNA分子の合成の後に、未取り込みNTPの分離及び定量を行う。

20

【0117】

本発明の好ましい実施形態によれば、前記RNA分子は、非コードRNA分子及びコードRNA分子からなる群から選択される。

【0118】

非コードRNA（ncRNA）分子は、ペプチド又はタンパク質には翻訳されない機能的RNA分子である。非コードRNA分子としては、非常に大量の且つ機能的に重要なRNA、例えば、トランスファーRNA（tRNA）及びリボソームRNA（rRNA）に加えて、snRNA、microRNA、siRNA、snRNA、exRNA、及びpiRNA、並びに長鎖ncRNA（例としては、Xist及びHOTAIR等が挙げられる）等のRNAが挙げられる（Esteller, 2011. *Nat. Rev. Genet.* 12(12): 861-74）。更に、非コードRNA分子としては、免疫賦活性RNA（isRNA）分子が挙げられる。

30

【0119】

好ましくは、免疫賦活性RNAは、線状一本鎖RNAであってよい。更により好ましくは、免疫賦活性RNAは、長鎖線状一本鎖非コードRNAであってよい。この状況では、isRNAがその5'末端に三リン酸を有することが特に好ましい。

【0120】

免疫賦活性RNA（isRNA）は、好ましくはヒトファミリーメンバーTLR1～TLR10又はマウスファミリーメンバーTLR1～TLR13から選択され、より好ましくはヒトファミリーメンバーTLR1～TLR10から選択され、更により好ましくはTLR7及びTLR8から選択されるTLRのリガンド、RNAの細胞内受容体（例えば、RIG-I、MDA-5、又はPKR）のリガンド（Meylan and Tschopp, 2006. *Mol. Cell* 22, 561-569）、又は任意の他の免疫賦活性RNA配列を表す及び／又はコードするRNA配列が挙げられるがこれらに限定されない、免疫賦活性であることが知られている任意のRNA配列を含んでいてよい。更に、免疫賦活性RNA分子は、自然免疫反応を誘発することができる任意の他のRNAを含んでいてもよい。限定するものではないが、かかる免疫賦活性RNAは、リボソームRNA（rRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、

40

50

及びウイルスRNA (vRNA) を含んでいてよい。好ましくは、免疫賦活性RNAは、非コードRNAである。かかる免疫賦活性RNAは、1, 000ヌクレオチド長～5, 000ヌクレオチド長、500ヌクレオチド長～5, 000ヌクレオチド長、5ヌクレオチド長～5, 000ヌクレオチド長、5ヌクレオチド長～1, 000ヌクレオチド長、5ヌクレオチド長～500ヌクレオチド長、5ヌクレオチド長～250ヌクレオチド長、5ヌクレオチド長～100ヌクレオチド長、5ヌクレオチド長～50ヌクレオチド長、又は5ヌクレオチド長～30ヌクレオチド長を含んでいてよい。

【0121】

更なる特に好ましい実施形態によれば、かかる免疫賦活性RNA分子は、式(I)：

$(N_u G_l X_m G_n N_v)_a$ 、(式(I))

10

(式中、

Gは、グアノシン(グアニン)、ウリジン(ウラシル)、又はグアノシン(グアニン)若しくはウリジン(ウラシル)のアナログ、好ましくは、グアノシン(グアニン)又はそのアナログであり；

Xは、グアノシン(グアニン)、ウリジン(ウラシル)、アデノシン(アデニン)、チミジン(チミン)、シチジン(シトシン)、又はこれらヌクレオチド(ヌクレオシド)のアナログ、好ましくは、ウリジン(ウラシル)又はそのアナログであり；

Nは、約4核酸長～約50核酸長、好ましくは約4核酸長～約40核酸長、より好ましくは約4核酸長～約30核酸長、又は約4核酸長～約20核酸長を有する核酸配列であり、各Nは、独立して、グアノシン(グアニン)、ウリジン(ウラシル)、アデノシン(アデニン)、チミジン(チミン)、シチジン(シトシン)、又はこれらヌクレオチド(ヌクレオシド)のアナログから選択され；

20

aは、1～20、好ましくは1～15、最も好ましくは1～10の整数であり；

lは、1～40の整数であり、

l=1であるとき、Gは、グアノシン(グアニン)又はそのアナログであり、

l>1であるとき、これらヌクレオチド(ヌクレオシド)のうちの少なくとも50%が、グアノシン(グアニン)又はそのアナログであり；

mは、整数であり且つ少なくとも3であり；

m=3であるとき、Xは、ウリジン(ウラシル)又はそのアナログであり、

m>3であるとき、少なくとも3つの連続するウリジン(ウラシル)又はウリジン(ウラシル)のアナログが存在し；

30

nは、1～40の整数であり、

n=1であるとき、Gは、グアノシン(グアニン)又はそのアナログであり、

n>1であるとき、これらヌクレオチド(ヌクレオシド)のうちの少なくとも50%が、グアノシン(グアニン)又はそのアナログであり；

u、vは、互いに独立して、0～50の整数であってよく、

好ましくは、u=0であるとき、v≥1であるか、又は

v=0であるとき、u≥1である)

で表されるRNAからなるか又は含み、

前記式(I)で表される核酸分子は、少なくとも50ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも100ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも150ヌクレオチド長、更により好ましくは少なくとも200ヌクレオチド長、最も好ましくは少なくとも250ヌクレオチド長を有する。

40

【0122】

最も好ましい実施形態によれば、式(I)に係るRNA分子は、例えば、以下の配列から選択してよい：

GGGAGAAAGCUC AAGCUUAUCCAAGUAGGCGUGGUCACCCUG
UACAACGUAGCCGGUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUGA
CCGUCUCAAGGUCCAAGUUAGUCUGCCUAUAAAGGUGCGG
AUC CACAGCUGAUGAAAGACUUGUGCGGUACGGUUA AUCU

50

10

【 0 1 2 3 】

20

この状況では、コードRNA分子は、1つ（単シストロン性）、2つ（ニシストロン性）、又はそれ以上（多シストロン性）のオープンリーディングフレーム（ORF）を含んでよい。コードRNA分子は、メッセンジャーRNA（mRNA）分子、ウイルスRNA分子、又は自己複製RNA分子（レプリコン）であってよい。好ましくは、RNA分子は、mRNAである。

本発明の好ましい実施形態によれば、前記RNA分子は、100ヌクレオチドよりも長い。RNAが、100ヌクレオチド長～15,000ヌクレオチド長、100ヌクレオチド長～12,500ヌクレオチド長、100ヌクレオチド長～10,000ヌクレオチド長、100ヌクレオチド長～7,500ヌクレオチド長、100ヌクレオチド長～5,000ヌクレオチド長、100ヌクレオチド長～2,500ヌクレオチド長、100ヌクレオチド長～1,500ヌクレオチド長、又は100ヌクレオチド長～1,000ヌクレオチド長であることが、同様に好ましい。

30

本発明によれば、用語「大規模」とは、前記RNA分子の反応収量が、ミリグラムオーダーの量、好ましくは少なくとも1グラムであることを指す。

本発明の好ましい実施形態によれば、インビトロ転写反応は、RNAの大規模合成用の転写反応器又はRNA反応器とも呼ばれるバイオリアクタ内で実施される。したがって、バイオリアクタは、本発明の上記方法を実施するようにされていてもよい。

40

本発明によれば、好ましくは大規模に、所与の配列のRNA分子を合成するためのかかるバイオリアクタは、配列最適化反応ミックス中でインビトロRNA転写反応を実施するための反応モジュールと、転写されたRNA分子を一時的に捕捉するための捕捉モジュールと、前記配列最適化反応ミックスの成分の前記反応モジュールへの送り込みを制御するための制御モジュールとを含む、モジュール式に設計されがインビトロ転写反応器システムである。ここで、反応モジュールは、反応ミックスからヌクレオチドを分離するための濾過膜を含み、制御モジュールによる配列最適化反応ミックスの成分の送り込みの制御は、分離されたヌクレオチドの測定濃度に基づく。

50

タは、特定の温度、通常、4℃～40℃を正確に維持するために熱的に調節してよい。バイオリアクタは、流入又は供給ラインと流出口とを備えるようになっていてよい。バイオリアクタは、可変速度で攪拌できる攪拌セルであってよい。

【0130】

本発明によれば、バイオリアクタは、反応ミックスからヌクレオチドを分離するため、特に、配列最適化反応ミックスからヌクレオチド及び他の低分子量成分を分離するための濾過膜を含む。かかる流動システムにおける濾過膜、例えば、超濾過膜は、低分子量成分（例えば、ヌクレオチド）から高分子量成分（例えば、タンパク質及び／又はポリヌクレオチド）を分離するために導入される。濾過膜は、固定化DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、及び合成されたRNA分子を反応モジュールのリアクタコアに選択的に保持する機能を有するが、ヌクレオチド（NTP）等のより小さな分子は、前記濾過膜を通過して、反応モジュールの別のより小さな区画、即ち、濾過区画に入り得る。次いで、例えば、低分子量成分を含む分離された流体中で分光分析によって、ヌクレオチド濃度を測定してよい。或いは、ヌクレオチド濃度は、オンラインHPLCシステムによって測定してもよい。この反応器システムに配列最適化NTPミックスを適用することによって、インビトロ転写反応中のヌクレオチド濃度をリアルタイムに測定して、前記インビトロ転写反応の進行をモニタリングすることが可能になる。

【0131】

好適な濾過膜は、当業者に公知の様々な材料からなっていてよい（van der Merbel, 1999, J. Chromatogr. A 856 (1-2): 55-82）。例えば、膜は、再生若しくは変性セルロース、又は合成材料からなっていてよい。後者としては、ポリスルホン（PSU）；ポリアクリロニトリル（PAN）；ポリメチルメタクリレート（PMMA）；ポリアリールエーテルスルホン、ポリビニルピロリドン、及びポリアミドの混合物（Polyamix, RTM.）が挙げられる。例えば、ポリスルホンとしては、ポリエーテルスルホン〔ポリ（オキシ-1,4-フェニルスルホン-1,4-フェニル）、PESと略される〕が挙げられる。幾つかの例示的な実施形態では、ポリエーテルスルホンは、本開示に従って使用するための半透膜として利用することができる。一部の例では、PES膜は、PSU膜に比べて親水性が高い（及び／又は水による膜の濡れ性が改善されている）。幾つかの実施形態では、PES膜の濡れ性は、例えば、水溶性ポリマーであるポリビニルピロリドンを含むことによって更に高めることができる。

【0132】

濾過膜を通過する分子の流れに影響を与える重要なパラメータは、孔径又は孔径分布である。濾過膜は、通常、分子量カットオフ（MWCO）値、即ち、90%超が保持される最小化合物の分子質量と定義される特定のサイズ限界によって特徴付けられる。各用途について、高分子量化合物は十分に保持されるが、同時に、アナライトの迅速な輸送も確保されるように、適切なMWCO値を選択する必要がある。本発明のバイオリアクタの濾過膜は、10kDa～100kDa、10kDa～75kDa、10kDa～50kDa、10kDa～25kDa、又は10kDa～15kDaの範囲のMWCOを有し得る。更により好ましくは、濾過膜は、約10kDa～約50kDaの範囲のMWCOを有する。好ましくは、濾過膜は、再生セルロース、変性セルロース、ポリスルホン（PSU）、ポリアクリロニトリル（PAN）、ポリメチルメタクリレート（PMMA）、ポリビニルアルコール（PVA）、及びポリアリールエーテルスルホン（PAES）の群から選択される。

【0133】

本発明の好ましい実施形態によれば、バイオリアクタは、RNA転写反応の基礎として、固体担体に固定化されたDNAテンプレートを含む。DNAテンプレートを固定化することによって、テンプレートを繰り返し使用し、且つ残存DNAのRNA生成物への夾雑を低減することができるようになる。更に、固定化によって、最終RNA生成物からDNAテンプレートを除去するためにDNaseを使用しなくてもよくなる。好ましくは反応モジュールの反応コアにおいて固体担体に固定化されているDNAテンプレートは、化学

的に合成されたDNA分子、単離されたDNA制限酵素断片、プラスミド、又は例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）等の増幅プロセスによって増幅されたDNA分子を表し得る。DNAテンプレートは、二本鎖デュプレックス、又は一本鎖RNAコード領域の上流に二本鎖プロモータ領域を含むユニットであってよい。DNAテンプレートは、DNA鎖の5'末端、3'末端、又は内部ヌクレオチドを固体担体に固定化するためのリガンドで修飾されていてよい。

【0134】

本発明によれば、用語「固体担体」は、その表面上にDNA分子を固定化することができる全ての未溶解担体に関する。固体担体は、アガロース、変性アガロース、セファロース、ポリスチレン、ラテックス、セルロース、及び強磁性又はフェリ磁性の粒子からなる群から選択してよい。適切な固体担体を選択し、前記固体担体にDNA分子をカップリングするための方法及びストラテジーは、当技術分野において公知である（例えば、Arndt-Jovin et al. 1975. Eur. J. Biochem. 54 (2): 411-8; Kerrigan et al., 2001. Current Protocols in Molecular Biology. 24:12.10.1-12.10.18; 国際公開第1995/08626号パンフレット）。固体担体上へのDNAテンプレートの固定化は、共有結合を介していてもよく、非共有結合を介していてもよい。好ましくは、DNAテンプレートの固定化は、非共有結合を介して行われる。例えば、DNAテンプレートの固体担体への固定化は、非共有結合性ビオチン-ストレプトアビジン相互作用を介して行ってよい。DNAテンプレートの非コード鎖を、ストレプトアビジンタンパク質を含む固体担体マトリクスにDNA鎖を固定化する機能を有する5'末端ビオチン基で修飾してもよい。DNAテンプレートの相補的RNAコード鎖は、固定化されていないままであってよい。また、他の種類の非共有結合、例えば、ポリ（A）-ポリ（T）及びポリ（G）-ポリ（C）相互作用を介して固体担体にDNAテンプレートを固定化することも可能である。共有結合、例えば、エステル結合又はその誘導体を介してDNAテンプレートを固定化することも同様に好ましい。一般的に、カップリング前、固体担体は、DNA分子とのカップリング反応を可能にするために、NHS、カルボジイミド等の活性基を含有していてよい。DNA分子は、直接カップリングによって（例えば、アミノ基、スルフヒドリル基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、アルデヒド基、及びケトン基等の官能基を用いて）固体担体にカップリングしてもよい。固体担体材料への結合は、DNAテンプレートの前記担体からの空間的分離を最適化するためにスペーサを含んでもよい。スペーサは、DNAテンプレートの5'末端に追加のヌクレオチドを挿入することによって提供することができる。

【0135】

本発明の好ましい実施形態によれば、バイオリアクタの捕捉モジュールは、転写RNA分子を捕捉し、配列最適化転写反応ミックスの他の可溶性成分から前記転写RNA分子を分離するために樹脂/固相を含む。好ましくは、捕捉モジュールは、例えば、洗浄プロセス等によって、捕捉された転写RNA分子を精製するための手段を含む。更に好ましくは、捕捉モジュールは、好ましくは溶出バッファを用いて、捕捉された転写RNA分子を溶出するための手段を含む。

【0136】

更に好ましい実施形態によれば、バイオリアクタは、転写RNA分子を捕捉した後、濾過後の残存配列最適化反応ミックス、即ち、転写RNA分子を除く配列最適化転写反応ミックスの他の可溶性成分を捕捉モジュールから反応モジュールに戻すための逆流モジュールを更に含み、好ましくは、濾過後の残存配列最適化反応ミックスを戻すための手段は、ポンプである。ここで、逆流モジュールは、好ましくは、破壊成分（例えば、ホスフェート）を捕捉するために、固定化されている酵素（例えば、ピロホスファターゼ）又は樹脂を含む。

【0137】

好ましい実施形態では、バイオリアクタは、少なくとも1つのイオン選択性電極を含む

。本発明の状況では、用語「イオン選択性電極」とは、溶液に溶解している特定のイオンの活量を電位に変換する変換器（例えば、センサ）に関し、前記電位は、例えば、電圧計又はpH計を用いることによって測定することができる。特に、用語「イオン選択性電極」は、本明細書で使用する時、選択的透過性を有する膜を含むか又はからなるシステムであって、典型的には、2つの電極が前記膜によって分離されているシステムを含む。イオン選択性電極は、本明細書で使用する時、典型的には、好ましくは選択的透過性を有する膜と参照電極とを含む感知部を含む。膜は、典型的には、イオン選択性膜であり、これは、異なる種類のイオンに対して異なる透過性を有することを特徴とする。好ましくは、バイオリアクタの少なくとも1つのイオン選択性電極は、ガラス膜、固体膜、液体系膜、及び化合物膜からなる群から選択される膜を含む。

10

【0138】

好ましい実施形態では、本明細書に記載するバイオリアクタは、少なくとも1つのイオン選択性電極を含み、前記少なくとも1つのイオン選択性電極は、異なる種類のイオンに対して異なる透過性を有する膜、好ましくは本明細書に記載する膜、より好ましくは電気化学的膜を含むシステムを含むか又はからなり、好ましくは、2つの電極が、前記膜、好ましくは本明細書に記載する膜、より好ましくは電気化学的膜によって分離される。1つの実施形態では、膜は、固体電解質の層、又は電解質の非水相溶性溶媒溶液を含むか又はからなる。膜は、好ましくは、片側又は両側において電解質溶液と接触する。好ましい実施形態では、イオン選択性電極は、内部参照電極を含む。幾つかの実施形態では、かかる内部参照電極を、例えば、金属接触、又は絶縁体及び半導体層によって置き換えてもよい。

20

【0139】

イオン選択性電極によって、様々な媒体においてイオン活量又はイオン濃度を高感度、迅速、正確、且つ非破壊的に測定することができるようになる。イオン活量又はイオン濃度の直接測定とは別に、イオン選択性電極は、剤の投与量を制御するための要素として、又は電位差滴定における非常に正確な指示電極として、特に、検量線を用いることによって濃度変化を連続してモニタリングする機能を有し得る。

【0140】

好ましい実施形態では、バイオリアクタは、前記バイオリアクタの少なくとも1つの区画において1種以上のイオンの濃度を測定するために、好ましくは本明細書に記載する少なくとも1つのイオン選択性電極を含む。例えば、少なくとも1つのイオン選択性電極は、バイオリアクタの反応モジュール、制御モジュール、又は逆流モジュールにおける1種以上のイオンの濃度を測定するために用いることができる。好ましくは、少なくとも1つのイオン選択性電極は、反応モジュール、より好ましくは反応コア又は濾過区画における1種以上のイオンの濃度を測定するために用いられる。更に、少なくとも1つのイオン選択性電極は、好ましくは本明細書に記載するバイオリアクタのセンサユニットに含まれ得る。イオン選択性電極は、バイオリアクタ自体、バイオリアクタ上、又はバイオリアクタの外部（例えば、バイパスによってバイオリアクタに接続されている）に配置してよい。したがって、本発明の状況では、「バイオリアクタは、少なくとも1つのイオン選択性電極を含む」というフレーズは、少なくとも1つのイオン選択性電極がバイオリアクタの一部である状態、又は少なくとも1つのイオン選択性電極がバイオリアクタとは別の物理的実体であるが、バイオリアクタと接続して用いられる状態を指し得る。

30

40

【0141】

幾つかの実施形態によれば、バイオリアクタは、前記バイオリアクタの少なくとも1つの区画内に含まれる液体中の1種以上のイオンの濃度を測定するために、好ましくは本明細書に記載する少なくとも1つのイオン選択性電極を含み、前記イオンは、好ましくは、 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、及び PO_4^{3-} からなる群から選択される。

【0142】

幾つかの実施形態によれば、バイオリアクタは、電位差計、好ましくは、多重チャネル

50

ル電位差計（例えば、CIT Sens Ion Potentiometer 6-channel, high-resolution; C-CIT Sensors AG, Switzerland）に接続されている、好ましくは本明細書に記載する少なくとも1つのイオン選択性電極を含む。

【0143】

好ましい実施形態では、バイオリアクタは、少なくとも1つのイオン選択性電極を含み、前記少なくとも1つのイオン選択性電極は、好ましくは、管電極であり、より好ましくは、 Mg^{2+} 選択性管電極、 Na^{+} 選択性管電極、 Cl^{-} 選択性管電極、 PO_4^{3-} 選択性管電極、pH選択性管電極、及び Ca^{2+} 選択性管電極からなる群から選択され、電位差計に接続して用いられることが好ましい。更により好ましくは、バイオリアクタは、少なくとも1つのイオン選択性電極を含み、前記少なくとも1つのイオン選択性電極は、好ましくは、CIT Sens Ion Mg^{2+} 選択性ミニ管電極、CIT Sens Ion Na^{+} 選択性ミニ管電極、CIT Sens Ion Cl^{-} 選択性ミニ管電極、CIT Sens Ion PO_4^{3-} 選択性ミニ管電極、CIT Sens Ion pH選択性ミニ管電極、及びCIT Sens Ion Ca^{2+} 選択性ミニ管電極（全てC-CIT Sensors AG, Switzerland製）からなる群から選択され、好ましくは、電位差計、より好ましくは、多重チャンネル電位差計（例えば、CIT Sens Ion Potentiometer 6-channel, high-resolution (C-CIT Sensors AG, Switzerland)）と接続される。

【0144】

イオン選択性電極は、実用上多数の利点を有する。例えば、イオン選択性電極は、試験溶液に影響を与えないので、非破壊的測定が可能になる。更に、イオン選択性電極は、可動式であり、直接測定及び滴定センサに好適であり、且つコスト効率が高い。バイオリアクタ（例えば、転写反応器）においてイオン選択性電極を使用することの主な利点は、サンプルを回収することなしにその場で且つ非破壊的に測定できることである。

【0145】

本発明の好ましい実施形態によれば、バイオリアクタ、又はより正確にはバイオリアクタの制御モジュールは、pH値、伝導性、及び配列最適化反応ミックス中のヌクレオチド濃度等の重要なプロセスパラメータを分析するためのセンサユニットを含む。好ましくは、バイオリアクタのセンサユニットは、インビトロ転写反応中のヌクレオチド濃度をリアルタイムに測定するための、UV260/280nm用のUVフローセル等のセンサを含む。好ましくは、センサユニットのセンサは、光分析によって、プロセスパラメータとしてヌクレオチド濃度を測定する。

【0146】

本発明の好ましい実施形態によれば、バイオリアクタは、制御モジュールを含む。制御モジュールによってデータを収集し、解析することにより、配列最適化NTPミックスの成分又は配列最適化反応ミックスの成分、例えば、バッファ成分、RNAポリメラーゼ、又はヌクレオチドを繰り返し供給するために一体型ポンプシステム（アクチュエータ）を制御できるようになる。厳格に制御及び管理を行うことにより、最適な定常状態条件下でインビトロ転写反応を実施して、高い生成物収量を得ることができる。好ましくは、制御モジュールは、配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスの配列最適化反応ミックスへの添加を制御し、好ましくは、前記バイオリアクタは、配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスを配列最適化反応ミックスに添加するためのアクチュエータを含む。更に、アクチュエータは、配列最適化反応ミックスの他の反応成分、例えば、バッファ成分又は Mg^{++} をインビトロ転写反応ミックスに添加することもできる。本発明の更に好ましい実施形態によれば、バイオリアクタは、半バッチモード又は連続モードで動作する。半バッチという用語は、本明細書で使用するとき、一連の転写反応の繰り返しとしてインビトロ転写反応を操作することを指す。例えば、有限時間反応を進行させ、その時点における生成物を除去し、新たな反応物質を添加し、完全な反応を繰り返

す。連続流という用語は、本明細書で使用する時、流入供給ラインを通じて補充反応物質が常に添加され、流出口を通じて生成物が常に除去されるバイオリアクタコアにおいて連続的に実施される反応を指す。連続流反応器は、装置流量を制御することによって試薬の送達及び生成物の除去を制御し、これは、試薬の制約及び阻害生成物のある反応において有利である。

【0147】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示する本発明の方法によって得ることができるRNA分子に関する。好ましくは、本発明の方法によって得られるRNAは、従来技術の方法によって得られるRNAと比べて、特に、NTPミックスが転写産物の配列に対して最適化されていないインビトロ転写法、例えば、標準的な等モルNTPミックスを用いる方法によって得られるRNAと比べて、免疫賦活活性が低いことを特徴とする。

10

【0148】

更なる態様では、本発明は、RNA分子を合成するために所与の配列のRNA分子について最適化された配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスの使用に関する。本発明の方法に関連して上に記載した配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスに関する全ての定義及び具体的な実施形態は、本発明の前記使用にも適用される。

【0149】

特に、本発明の好ましい実施形態によれば、配列最適化NTPミックスは、

a) 前記RNA分子中の4種のヌクレオチドG、A、C、及びUの各割合（1）を求める工程と、

20

b) 4種のリボヌクレオシド三リン酸（NTP）GTP、ATP、CTP、及びUTPを含む配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスを調製する工程であって、前記配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックス中の前記4種のリボヌクレオシド三リン酸の各割合（2）が、前記RNA分子中の各ヌクレオチドの割合（1）に対応する工程と

を含む方法によって最適化されている。

【0150】

更なる態様では、本発明は、また、4種のリボヌクレオシド三リン酸GTP、ATP、CTP、及びUTPを含む所与の配列のRNA分子を合成するための配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスであって、前記配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックス中の前記4種のリボヌクレオシド三リン酸の各割合（2）が、前記RNA分子中の各ヌクレオチドの割合（1）に対応するミックスに関する。

30

【0151】

更なる態様では、本発明は、また、上に定義した所与の配列のRNA分子に対して最適化された配列最適化リボヌクレオシド三リン酸（NTP）ミックスを含むキットに関する。配列最適化NTPミックスは、4種全てのNTP（GTP、ATP、CTP、及びUTP）を含む1本のチューブで提供されてもよく、又は各NTPを別々のチューブに入れてもよい。本発明の方法に関連して上に記載した全ての定義及び具体的な実施形態は、本発明の前記キットにも適用される。

40

【実施例】

【0152】

以下に示す実施例は、単なる例示であり、本発明を更に説明するものとする。これら実施例は、本発明を限定すると解釈すべきではない。

【0153】

実施例1：mRNAの調製

1. DNA及びmRNAコンストラクトの調製

本実施例では、ヒト前立腺幹細胞抗原（HsPSCA）mRNA（R1871）、ホタルルシフェラーゼ（PpLuc）mRNA（R2988）、及びムチン-1シグナルペプチド／上皮成長因子受容体／ムチン-1融合タンパク質（EGFR／ムチン-1）（R1

50

626) をコードしている DNA 配列を調製し、その後、インビトロ転写反応に用いた。

【0154】

第1の調製によれば、T7プロモータに続いて上記タンパク質をコードしている配列を有するインビトロ転写用のベクターを構築した。安定化のためのGC最適化配列に続いて、アルファグロビン-3'-UTP (m u a g (変異型アルファグロビン-3'-UTP)) 由来の安定化配列、64アデノシン伸長(ポリA配列)、30シトシン伸長(ポリC配列)、及びヒストンステムループを導入することによって、野生型コード配列を改変することによって、前記コンストラクトを調製した。

【0155】

更に、T7プロモータに続いて、タンパク質をコードしていない免疫賦活性RNA (R 2025) をコードしている配列を有するインビトロ転写用のベクターを構築した。

【0156】

RNAコンストラクト及びそのヌクレオチド組成を、それぞれ、表1及び表2に示す。

【0157】

【表2】

表1. RNA

説明	識別子 (R番号)	配列	配列番号
HsPSCA mRNA	R1871	図1	1
PpLuc mRNA	R2988	図2	2
EGFR/ΔF-1 mRNA	R1626	図3	3
非コードRNA	R2025	図4	4

【0158】

【表3】

表2: RNAのヌクレオチド組成

RNA	長さ(nt)	G	C	A	U
HsPSCA	589	150 (25.5%)	205 (34.8%)	154 (26.1%)	80 (13.6%)
PpLuc	1870	571 (30.5%)	604 (32.3%)	428 (22.9%)	267 (14.3%)
EGFR/ ΔF-1	5337	1630 (30.5%)	1967 (36.9%)	1086 (20.3%)	654 (12.3%)
非コード RNA	547	114 (20.8%)	111 (20.2%)	112 (20.5%)	210 (38.4%)

【0159】

2. インビトロ転写

段落1に従って調製したそれぞれのDNAプラスミドを、T7ポリメラーゼを用いてインビトロで転写した。次いで、mRNAをPure Messenger (登録商標) (CureVac, Tuebingen, Germany; 国際公開第2008/077592号パンフレット) を用いて精製した。

【0160】

標準的な転写反応体積は、20 µLであった。例えば、キャップ分析の場合、後続のmRNAのHPLC精製については、反応を1 mLに設定した。

【0161】

80 mM HEPES/KOH、pH 7.5、24 mM MgCl₂、2 mM スペル

ミジン、40 mM DTT、5 U/mL ピロホスファターゼ (Thermo Fisher Scientific)、200 U/mL Ribolock RNase 阻害剤 (Thermo Fisher Scientific)、5,000 U/mL T7 RNA ポリメラーゼ (Thermo Fisher Scientific) 中 37℃ で 3 時間 (又は指定の通り)、線状 DNA プラスミドテンプレート (50 µg/mL) を転写させた。リボヌクレオシド三リン酸 (NTP) を、それぞれ、以下の第 3～7 節に従って添加した。転写後、DNase I digestion (Roche) (100 U/mL、1 mM CaCl₂、37℃ で 30 分間) によって、DNA テンプレートを除去した。

【0162】

10

RNA を -20℃ で 16 時間、反応体積の 3.45 倍の 2.86 M LiCl に沈殿させ、次いで、遠心分離した (30 分間、16,000 g、4℃)。ペレットを 5 転写反応体積の 75% エタノールで洗浄し (倒立チューブ、5 分間、16,000 g、4℃ で遠心分離)、乾燥させ、2.5 転写反応体積の H₂O に再溶解させた。

NanoDrop (登録商標) 分光光度計を用いて 260 nm における吸光度を測定することによって、RNA 収量を求めた。260 nm における 1 吸光度単位は、40 ng/µL RNA に相当する ($1 A_{260} = 40 \text{ ng}/\mu\text{L RNA}$)。

【0163】

取り込まれたヌクレオチドの数を求めるために、分子質量で除することによって、生成された RNA の合計量を生成された分子数に変換した。配列中に存在するそれぞれのヌクレオチドの数を乗じることによって、取り込まれたヌクレオチドが得られる。転写反応の最後における残存ヌクレオチド (%) を求めるために、以下の式に従って、この数を利用可能なヌクレオチド数で除した。

20

【0164】

【数 1】

式(1):

$$\text{NTP(残存)}[\%] = \left[1 - \frac{\text{RNA収量} \times \text{mRNA中のNTP数}}{[\text{NTP(出発)}] \times \text{反応体積}} \right] \times 100$$

30

【0165】

RNA 収量とは、1 反応当たりの生成されるモル数 (nmol) を意味する。NTP 出発濃度 [NTP (出発)] は、mM で示し、反応体積は、µL で示す。

それぞれのヌクレオチドの残存濃度を算出するために、以下の式に従って、反応の開始時に利用可能な NTP に、転写反応の最後における残存 NTP の百分率 (上記を参照) を乗じた。

【0166】

【数 2】

式(2):

$$\text{NTP(残存)}[\text{mM}] = \text{NTP(出発)}[\text{mM}] \times \text{NTP(残存)}[\%]$$

40

【0167】

3. キャップアナログの存在下における標準的なインビトロ転写

キャップアナログを用いた 5' キャップ RNA の生成については、5.8 mM m7G (5') ppp (5') G キャップアナログ、4 mM ATP、4 mM CTP、4 mM UTP、及び 1.45 mM GTP (全て Thermo Fisher Scientific) (表 3 を参照) を用いて標準的な転写を実施した。キャップアナログ及び GTP は、4:1 の比で用いた。

【0168】

50

【表 4】

表 3：標準的なインビトロ転写反応のヌクレオチド濃度 (mM)

RNA	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	5.8	1.45	4	4	4
PpLuc	5.8	1.45	4	4	4
EGFR/ムチン-1	5.8	1.45	4	4	4

【0169】

【表 5】

表 4：標準的な転写反応の最後に残存しているヌクレオチドの量
(2.5時間後、反応開始時のヌクレオチドに対する百分率)

RNA	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	99,86	17,35	59,05	69,24	84,02
PpLuc	99,96	16,39	67,94	77,28	85,83
EGFR/ムチン-1	99,99	16,37	63,42	79,80	87,84

【0170】

【表 6】

表 5：標準的なインビトロ転写反応の最後に残存している
ヌクレオチド濃度(mM)(2.5時間後)

RNA	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	5,79	0,25	2,36	2,77	3,36
PpLuc	5,80	0,24	2,72	3,09	3,43
EGFR/ムチン-1	5,80	0,24	2,54	3,19	3,51

【0171】

標準的な転写における RNA 転写産物の典型的な収量は、約 1.5 mg/mL (反応) である。

【0172】

4. 2 倍の濃度のキャップアナログ及び NTP を用いる、キャップアナログの存在下におけるインビトロ転写 (2×CapNTP)

キャップアナログ及び NTP 濃度を標準的な転写反応に比べて 2 倍にして、11.6 mM m7G (5') ppp (5') G キャップアナログ、8 mM ATP、8 mM CTP、8 mM UTP、及び 2.9 mM GTP (全て Thermo Fisher Scientific) (表 3 を参照) 中で反応を実施した。キャップアナログ及び GTP は、4:1 の比で用いた。

【0173】

【表 7】

表 6：2×CapNTP インビトロ転写反応のヌクレオチド濃度(mM)

RNA	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	11.6	2.9	8	8	8
PpLuc	11.6	2.9	8	8	8
EGFR/ムチン-1	11.6	2.9	8	8	8

【0174】

10

20

30

40

【表 8】

表 7：2×CapNTP転写反応の最後に残存しているヌクレオチドの量
(2.5時間後、反応開始時のヌクレオチドに対する百分率)

RNA	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	99,87	23,45	62,08	71,51	85,20
PpLuc	99,96	17,93	68,53	77,70	86,09
EGFR/Δ77-1	99,99	20,15	65,07	80,72	88,39

【0175】

2 倍の濃度のキャップアナログ及び N T P を用いる転写の典型的な収量は、約 3 m g / m L (反応) である。

【0176】

5. キャップアナログの存在下における配列最適化インビトロ転写

配列最適化インビトロ転写反応については、全ての N T P の合計濃度が標準的な転写反応と同様 1 3 . 4 5 m M になるように、配列のヌクレオチド組成 (表 2) に従って各個々の配列についてのリボヌクレオシド三リン酸 (N T P) の濃度を算出した。キャップ / G T P 比が 4 : 1 になるように、キャップアナログの濃度を G T P の算出濃度よりも 4 倍高くした。

【0177】

【表 9】

表 8：配列最適化インビトロ転写のヌクレオチド濃度(mM)

RNA	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	13.6	3.4	4.7	3.5	1.8
PpLuc	16.4	4.1	4.3	3.1	1.9
EGFR/Δ77-1	16.4	4.1	5.0	2.7	1.7

【0178】

【表 10】

表 9：配列最適化転写の最後に残存しているヌクレオチドの量
(2.5時間、反応開始時のヌクレオチドに対する百分率)

RNA	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	99,86	14,83	14,71	14,57	14,83
PpLuc	99,96	14,62	14,72	14,76	14,85
EGFR/Δ77-1	99,99	14,60	14,82	14,51	15,04

【0179】

【表 11】

表 10：配列最適化インビトロ転写反応の最後に残存している
ヌクレオチド濃度(mM)(2.5時間後)

RNA	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	13,58	0,51	0,69	0,51	0,27
PpLuc	16,39	0,60	0,64	0,45	0,29
EGFR/Δ77-1	16,40	0,60	0,74	0,40	0,25

【0180】

配列最適化キャップアナログ及び N T P を用いる転写の典型的な R N A 収量は、約 3 . 9 m g / m L (反応) である。

10

20

30

40

50

【0181】

6. NTPを供給するキャップアナログの存在下における配列最適化インビトロ転写

配列最適化インビトロ転写反応については、全てのNTPの合計濃度が標準的な転写反応と同様13.45mMになるように、配列のヌクレオチド組成（表2）に従って各個々の配列についてのリボヌクレオシド三リン酸（NTP）の濃度を算出した。キャップ/GTP比が4:1になるように、キャップアナログの濃度をGTPの算出濃度よりも4倍高くした（表7参照）。

NTP供給については、2.5時間後、キャップアナログを含まない13.45mM NTP（体積2.69μL）を反応ミックスに添加した。この時点で、キャップアナログの>99%が転写反応中に依然として存在していたので、4:1 キャップ/GTP比を保持することができた。

10

【0182】

【表12】

表11：NTPを供給する配列最適化転写の最後に残存しているヌクレオチドの量(5時間後、反応開始時のヌクレオチドに対する百分率)

RNA	CAP	G	C	A	U
HsPSCA	99,75	26,3	26,2	26,1	26,3
PpLuc	99,94	26,1	26,2	26,2	26,3
EGFR/EGFR-1	99,98	26,1	26,3	26,0	26,5

20

【0183】

配列最適化キャップアナログ及びNTPを用い、続いてNTPを供給する転写の典型的なRNA収量は、約6.75mg/mL（反応）である。

【0184】

7. 非キャップRNAの標準的なインビトロ転写

非キャップ5'トリリン酸RNAの生成については、各4mM ATP、GTP、CTP、及びUTP（全てThermo Fisher Scientific）の存在下で転写を実施した。非キャップRNAを、キャップ形成分析アッセイのコントロールとして用いた（図7）。

30

【0185】

8. mRNAの酵素的キャップ形成

製造業者の説明書に従ってScriptCap（商標）m⁷G Capping System（Cellscript, Madison, WI, USA）を用いて酵素的キャップ形成を実施した。簡潔に述べると、1反応あたり非キャップRNA60μgを68.5μLの体積で熱変性（10分間、65℃）し、次いで、直ちに氷冷（5分間）した。反応成分（1×ScriptCapキャップ形成バッファ、1mM GTP、0.1mM SAM、1,000U/mL ScriptGuard RNase阻害剤、400U/mL ScriptCapキャップ形成酵素）を最終体積が100μLになるように添加した後、反応物を37℃で1時間インキュベートした。RNAを-20℃で16時間、反応体積の3.45倍の2.86M LiClに沈殿させ、次いで、遠心分離した（30分間、16,000g、4℃）。ペレットを0.5転写反応体積の75%エタノールで洗浄し（倒立、5分間、16,000g、4℃で遠心分離）、乾燥させ、H₂Oに再溶解させた。酵素的にキャップ形成されたRNAをキャップ形成分析アッセイのコントロールとして用いた（図7）。

40

【0186】

9. 結果

標準的なインビトロ転写反応及び配列最適化インビトロ転写反応のRNA収量を、上記の通り（段落2）2時間の所定の時点で求めた。

【0187】

50

図5Aから分かる通り、約30分間後、標準的な転写反応のRNA収量は、EGFR／ムチン-1をコードしている5,337ヌクレオチド長のRNA(R1626)については約1.4mg/mL、HsPSCAをコードしている589ヌクレオチド長のRNA(R1871)については約1.8mg/mLのプラトーに達する。

図5Bから分かる通り、配列最適化転写反応のRNA収量は、標準的な転写反応に比べて著しく高い。それぞれ、60分間後(R1626)及び120分間後(R1626)、両RNAは、約3.9mg/mLの類似のプラトーに達する。

【0188】

図6から分かる通り、異なる長さの3つの異なるRNA分子のRNA収量は、5時間後、各種転写反応について略同じである。

10

標準的な転写(等濃度NTP)では、約1.5mg/mL RNA、2倍の濃度のキャップ-NTPミックス(2×CapNTP)を用いた転写では、約3.0mg/mL RNA、配列最適化転写では、約3.9mg/mL RNA、そして、NTPを供給する配列最適化転写では、約6.75mg/mL RNAが得られる。

したがって、配列最適化転写反応からは、標準的な転写反応に比べて約3倍多いRNA収量が得られる。この収量は、NTPとの反応を補充することによって(NTP供給)更に約2倍増加し得る。

【0189】

実施例2：キャップ分析アッセイ

1. アッセイの原理

20

ハンマーヘッド型リボザイムHHNUH2d(5'-GCAUGGCUGAUGAGGCCUCGACCGAUAGGUCGAGGCGCGAAAAGCUUUCUCCCC-3') (配列番号5)を実施例1のインビトロ転写されたRNAと共にインキュベートし、切断産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(dPAGE)によって分離した。

【0190】

2. リボザイム切断反応

1反応当たりHHNUH2d 10pmol及び4種それぞれのRNA生成物10pmolを、合計体積6μLの0.625mM EDTA中でアニーリングさせた(95℃で2分間、0.1℃/秒で25℃に、25℃で10分間)。100mM MgCl₂ 4μL、125mM Tris/HCl、pH7.5を添加した後(最終濃度：40mM MgCl₂、50mM Tris/HCl)、反応物を25℃で1時間インキュベートした。PAGEを介した分析については、1×反応を95%ホルムアミド30μL、20mM EDTAで停止させた。

30

【0191】

3. ゲル分離、切断産物の定量、及びキャップ形成度の算出

停止させた反応物を熱変性(2分間で80℃まで加熱、直ちに5分間氷冷)し、10cm×8cm×1.0mmの20%変性ポリアクリルアミドゲル(8M尿素(Applichem)、20%アクリルアミド：ビスアクリルアミド19:1(Applichem)、1×TBE、1%APS(Applichem)、0.1% TEMED(Applichem);180V、2時間、Mini-PROTEAN(登録商標)Tetra Cell(BioRad))で分離した。1:10,000のSYBR Gold(Invitrogen)及びTBE中で10分間ゲルを染色し、312nm-UVトランスイルミネータを備えるE-BOX VX2ゲル撮影システム(Peqlab)で撮影した(SYBR Goldの励起極大：~300nm、発光：~537nm)。

40

mRNA調製物におけるキャップ形成比率を求めるために、それぞれ13mer(非キャップ形成画分由来)又は14mer(キャップ形成画分由来)の切断産物のバンドを、Quantity One 1-D分析ソフトウェア(BioRad)を用いて定量した。

それぞれ、キャップRNA及び非キャップRNAの程度を、以下に従って算出した：

【0192】

50

【数 4】

式(4):

$$\text{キャップRNA (\%)} = \frac{\text{シグナル強度 14mer}}{\Sigma \text{シグナル強度(13mer+14mer)}} \times 100$$

【0193】

【数 5】

式(5):

$$\text{非キャップRNA (\%)} = \frac{\text{シグナル強度 13mer}}{\Sigma \text{シグナル強度(13mer+14mer)}} \times 100$$

10

【0194】

4. 結果

図7から分かる通り、ホタルルシフェラーゼ (P p L u c) m R N A については、標準的な N T P ミックス及び配列最適化 N T P ミックスで同等のキャップ形成効率が得られた。

【0195】

実施例3：配列最適化ヌクレオチドミックスにおける U T P 及びシュード U T P を用いた R N A 収量の比較

4種のヌクレオチド A T P、G T P、C T P、及び U T P のうちの1以上をヌクレオチドアナログで置換することによって、インビトロ転写反応を実施することができる。かかる修飾 N T P の例は、シュードウリジン (p s U 又は Ψ) 三リン酸及び5-メチルシチジン (5 m C) 三リン酸である。ミックス中の修飾ヌクレオチドの割合は、置き換えられる天然ヌクレオチドの0%~100%で変動し得る。

20

【0196】

配列最適化ヌクレオチドミックスにおいてシュードウリジン (p s U) 三リン酸等の修飾ヌクレオチドを使用することが可能かどうかを試験するために、U T P を10%及び100%シュードウリジン三リン酸で置き換えた。対照反応では、100% U T P を用いた。

【0197】

キャップアナログの存在下における配列最適化インビトロ転写

配列最適化インビトロ転写反応については、全ての N T P の合計濃度が標準的な転写反応と同様 13.45 mM になるように、配列のヌクレオチド組成 (表2) に従って各個々の配列についてのリボヌクレオシド三リン酸 (N T P) の濃度を算出した。キャップ/G T P 比が4:1になるように、キャップアナログの濃度を G T P の算出濃度よりも4倍高くした。

30

【0198】

結果

図8から分かる通り、キャップアナログを含む配列最適化ヌクレオチドミックス (C a p N T P ミックス) 中で U T P 及びシュード U T P を用いると、配列最適化ヌクレオチドミックス中のシュード U T P の割合とは関係なく同等の R N A 収量が得られる。これは、それぞれ、ムチン-1シグナルペプチド/上皮成長因子受容体/ムチン-1融合タンパク質 (E G F R/ムチン-1) (R1626) 及び前立腺幹細胞抗原 (H s P S C A) m R N A (R1871) をコードしている2つの異なる m R N A について立証された。

40

【0199】

実施例4：標準的なヌクレオチドミックス及び配列最適化ヌクレオチドミックスを用いた理論 R N A 収量及び実際 R N A 収量の比較

実施例1の第2節に記載の通り、転写反応を組み立てた。N T P は、等しく分布していた (等モル) か又は実施例1の第5節に記載の通り、生成される R N A の配列に従って分布していた。幾つかの理由から、G T P に対して4:1の比で追加のヌクレオチド (G T

50

P又はキャップアナログ)を添加した。

【0200】

結果

図9から分かる通り、R2025の実際RNA収量は、標準的なNTPミックス(等NTPミックス)と比べて配列最適化NTPミックスにおいて増加し得る。

【0201】

図10から分かる通り、ヒト前立腺幹細胞抗原をコードしているmRNA(HsPSCA; R1871)の実際RNA収量は、標準的なNTPミックス(等NTPミックス)と比べて配列最適化NTPミックスにおいて増加し得る。

【0202】

実施例5: RNA収量に対するNTP対イオンの影響

RNA収量に対するNTP対イオンの影響を、例としてヒトムチン-1シグナルペプチド/上皮成長因子受容体/ムチン-1融合タンパク質をコードしているmRNA(EGFR/ムチン-1、R1626)を用いて調べた。配列最適化NTP比及び合計NTP濃度13.45mMを用いて、実施例1の第2節に記載の通り転写反応を組み立てた。NTPは、対イオンとしてNa⁺又はTris⁺(いずれもThermo Scientific)を含有していた。更に、Na-NTP反応には、様々な濃度のNaCl、Tris-NTP反応には、Tris/HClを補充した。2.5時間の反応時間後、RNAを精製し、実施例1の第2節に記載の通り、その濃度を求めた。

【0203】

結果

図11から分かる通り、配列最適化NTPミックスを用いたヒトムチン-1シグナルペプチド/上皮成長因子受容体/ムチン-1融合タンパク質(EGFR/ムチン-1、R1626)のRNA収量は、Tris-HCl濃度150mMまで略同じであった。対照的に、NaCl濃度が75mMを超えると、RNA収量が減少し始めた。

【0204】

RNA収量に対する高濃度NaClの負の影響が報告されている(例えば、Kern et al., 1997. Biotechnol. Prog., 13, 747-756; 米国特許第6, 586, 218号明細書)。したがって、特にNTP供給ストラテジーを押し進めた結果Na-NTPが高濃度になると、RNA収量が減少する場合がある。この制約は、Tris-NTPによって回避できるが、その理由は、ポリメラーゼ活性が高濃度Trisにはそれ程影響を受けないためである。

【0205】

実施例6: 転写反応の進行のモニタリング

配列最適化NTP比及び合計NTP濃度13.45mMを用いて、実施例1の第2節に記載の通りヒト前立腺幹細胞抗原(HsPSCA; R1871)の大規模転写反応(350μL)を組み立てた。キャップアナログは、GTPに比べて4:1過剰に存在していた。所定の時点(反応開始の15分間後/30分間後/60分間後/90分間後/120分間後)で、サンプル20μLを採取し、RNAを精製し、その260nmにおける吸光度を実施例1の第2節に記載の通り求めた。同時点で第2のサンプル40μLを採取し、Microcon YM10デバイス(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)(16,000×g、5分間、17℃)で濾過した。未取り込みのキャップアナログ及びNTPに対応する、260nmにおけるフロースルーの吸光度を、製造業者の説明書に従ってNanoDrop(登録商標)分光光度計を用いて求めた(T009-Technical Bulletin NanoDrop 1000% 8000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA)。

【0206】

結果

図12から分かる通り、配列最適化リボヌクレオシドミックスを使用すると、所定の時

10

20

30

40

50

点における合計残存ヌクレオチド濃度を求めることによって、インビトロ転写反応の進行を測定することが可能になる。合計NTP濃度の低下は、合成されるRNA量と直接関連している。

【0207】

したがって、転写反応の進行は、所与の時点において測定された合計NTP濃度及び消費されたNTPのモル数の算出の関数として正確に求めることができる。この情報に基づいて、合成されたRNAの量を算出することができるようになる。

【0208】

この手順は、例えば、転写反応器において、転写反応の進行を連続的にモニタリングするために特に有用である。標準的なNTPミックスを用いた場合、これは不可能であるが、その理由は、NTPの消費が、合成されるRNAの量を容易には反映しないからである。

10

【0209】

実施例7：キャップ濃度の関数としての配列最適化ヌクレオチドミックスのRNA収量

実施例1の第2節に記載の通り転写反応を組み立て、図14及び15に示す通り、2 mM、4 mM、及び13.45 mM NTPの合計NTP濃度で実施した。NTPは、実施例1の第5節に記載の通り、生成されたRNAの配列に従って分布していた（PpLuc及びHsPSCAについての配列最適化リボヌクレオチドミックス）。図14及び15に示す通り、様々な濃度（0 mM、0.25 mM、2.0 mM、10 mM、16 mM、及び20 mM）のキャップアナログ（m7G（5'）ppp（5'）G）で反応を実施した。

20

【0210】

結果

図13Aから分かる通り、キャップアナログ濃度が高いほど、PpLuc mRNAの実際RNA収量も増加する。合計NTP濃度が4 mMの場合に比べて13.45 mMの方が、実際RNA収量が高い。図13Bは、キャップアナログ濃度約16 mMまでPpLuc mRNAの相対RNA収量が増加することを示す。相対RNA収量の増加は、高NTP濃度（13.45 mM）よりも低NTP濃度（4 mM）の方が大きい。

【0211】

図14Aから分かる通り、キャップアナログ濃度が高いほど、HsPSCA mRNAの実際RNA収量も増加する。合計NTP濃度が4 mM及び2 mMの場合に比べて13.45 mMの方が、実際RNA収量が高い。図14Bは、キャップアナログ濃度約16 mMまでHsPSCA mRNAの相対RNA収量が増加することを示す。相対RNA収量の最も大きな増加は、試験した中で最低のNTP濃度（2 mM）においてみられる。

30

【0212】

これら結果は、配列最適化リボヌクレオチドミックスの使用は、初期合計ヌクレオチド濃度が低い場合（例えば、2 mM）でさえも、キャップRNA合成の効率を増大させることを示す。対照的に、RNA収量を増大させるためには、高濃度の合計ヌクレオチド（約12 mM～約40 mM）が必要であることが既に示唆されている（米国特許第6586218号明細書）。

【0213】

PpLuc mRNA（1,870ヌクレオチド）とHsPSCA mRNA（589ヌクレオチド）との比較は、相対RNA収量が、所定の合計NTP濃度においてRNA長さとは無関係であることを示す。

40

【0214】

実施例8：GTP出発ヌクレオチド濃度の関数としての配列最適化ヌクレオチドミックスのRNA収量

実施例1の第2節に記載の通り転写反応を組み立て、P625、P1040、及びP532について配列最適化ヌクレオチドミックスの合計NTP濃度13.45 mMで実施した。

NTPは、実施例1の第5節に記載の通り、生成されたRNAの配列に従って分布して

50

いた（P p L u c、H s P S C A、及びE G F R／ムチン－1の配列最適化リボヌクレオチドミックス）。図16～18に示す通り、所定の濃度（0 mM、0.25 mM、2.0 mM、10 mM、16 mM、及び20 mM）のG T P出発ヌクレオチドを配列最適化N T Pミックスに添加することによって、反応を実施した。

【0215】

結果

図15A及び15Bから分かる通り、H s P S C A mRNAの実際RNA収量及び相対RNA収量は、G T P出発ヌクレオチド濃度約10 mMまで増加し、それよりも高いG T P濃度では減少する。

【0216】

図16A及び16Bから分かる通り、P p L u c mRNAの実際RNA収量及び相対RNA収量は、G T P出発ヌクレオチド濃度約10 mMまで僅かに増加し、次いで、それよりも高いG T P濃度では減少する。

【0217】

図17A及び17Bから分かる通り、E G F R／ムチン－mRNAの実際RNA収量及び相対RNA収量は、G T P出発ヌクレオチド濃度約10 mMまで増加し、それよりも高いG T P濃度では減少する。

【0218】

これら結果は、配列最適化リボヌクレオチドミックス及び追加量の出発ヌクレオチドG T Pの使用により、G T P出発ヌクレオチド濃度約10 mMまでRNA合成の効率が增大

【0219】

実施例9：バイオリアクタ

図18は、本発明に係るバイオリアクタ1の好ましい実施形態の概略図を示す。図18から、バイオリアクタ1のモジュラー構造が明らかになる。ここでは、バイオリアクタ1は、幾つかのバイオリアクタモジュール2、3、4、5からなる。反応モジュール1は、所与の配列のRNA分子を合成するための連続プロセス又は半バッチプロセスに用いられる反応容器である。反応モジュール2は、RNA転写反応のテンプレートとして用いられる樹脂固定化DNAを含有する。ここでは、DNAを固定化することによって、テンプレートを繰り返し使用し、且つ任意の種類の残存DNAの所望のRNA生成物への夾雑を低減することができるようになる。更に、DNAテンプレートの固定化によって、末端DNAを分解するための酵素D N A s eの使用が不要になる。転写後、生成されたRNA分子をバッチ毎に又は連続的に捕捉モジュール3に放出することができる。捕捉モジュール3は、RNA分子を捕捉し、転写反応の他の可溶性成分からRNAを分離するための樹脂／固相を含む。その後、流出ライン等（不図示）を用いてバイオリアクタ1から受容ユニット等にRNA分子を分配することができ、前記受容ユニットにおいて、更なるRNAの溶出及び精製を実施することができる。反応モジュール2と捕捉モジュール3との間の移行領域に接続されているそれぞれの洗浄及びバッファタンク31を用いて、捕捉モジュール3に洗浄流体及び／又は溶出バッファを提供することができる

【0220】

反応モジュール2における転写プロセスをモニタリング及び制御することができるようにするために、低分子量成分（例えば、ヌクレオチド）から高分子量成分（例えば、タンパク質及びポリヌクレオチド）を分離するための超濾過膜21が反応モジュール2に提供されている。RNA転写反応が実施される反応コア22は、濾過された反応ミックスが受容される濾過区画23から膜によって分離される。重要なプロセスパラメータとして用いられる、反応モジュール2の濾過区画23における濾過された反応ミックス中のヌクレオチド濃度に基づいて、供給タンク24から反応モジュール2へのヌクレオチド、バッファ成分、及び／又は酵素の供給を、供給ポンプ43を用いて制御及び調節することができ、これによって、最適な定常状態条件でRNA転写反応を実施して高い転写性能を得ることが可能になる。測定手段として、反応ミックス中の反応パラメータを測定するためのセン

サユニット41が提供されている。ここで、センサユニット41は、低分子量成分を含有する濾過された流体中に、UV260/280nm用UVフローセル等の光分析用のセンサを少なくとも含み、前記濾過された流体は、濾過区画23から抽出され、再循環ポンプ25によって循環し、濾過区画23に戻る。循環ラインでは、濾過区画23内部の濾過された流体をリアルタイムにモニタリングするために、センサユニット41のセンサが提供されている。バイオリアクタ1に配列最適化リボヌクレオチドミックスを適用することによって、反応モジュール2の反応コア22におけるRNA転写反応中に、濾過区画23におけるヌクレオチド濃度をリアルタイムで測定することができるようになる。センサユニット41は、コントローラ42と供給ポンプ43の形態のアクチュエータとを更に含む制御モジュール4の一部である。コントローラ42に測定シグナルを提供し、コントローラ42から命令シグナルを受信するために、センサユニット41及び供給ポンプ43がコントローラ42に接続されている。更に、濾過された流体のpH値又は濾過された流体の伝導性等の他の重要なプロセスパラメータは、センサユニット41の更なる好適なセンサによって分析することができる。通常コンピュータを利用するシステム等の形態であるコントローラ42によりデータを収集し、解析することによって、ヌクレオチド、バッファ成分、及び/又は酵素を反応モジュール2に繰り返し供給するためのアクチュエータとしての供給ポンプ43を制御できるようになると共に、最適な定常状態条件における重要なプロセスパラメータを調整するために、バイオリアクタ1における更なるポンプを制御できるようになる。

10

【0221】

20

浪費を防ぐために、好ましい実施形態のバイオリアクタ1は、捕捉モジュール3に接続されている逆流モジュール5を更に含み、前記逆流モジュール5は、未使用の原材料（例えば、ヌクレオチド及び酵素）を回収し、逆流ポンプ51を用いてそれを反応モジュール2に再循環させる。逆流モジュール5は、破壊成分（例えば、ホスフェート）を捕捉するための固定化酵素（例えば、ピロホスファターゼ）又は樹脂を含む。

【0222】

本発明の上記実施形態及び添付図面は、単なる例示を意図するものであり、限定するものと解釈すべきではないが、その理由は、本発明の範囲から逸脱することなしに添付の特許請求の範囲内で、記載した本発明を改変することができるためである。

【0223】

30

実施例10：RNA分子の免疫賦活活性

この実施例では、配列最適化NTPミックス及び標準的な等モルNTPミックスを用いて合成したRNA分子の免疫賦活性を比較した。免疫賦活は、mRNAをトランスフェクトした細胞の上清中のサイトカイン及びケモカインのレベルを測定することによって求めた。

【0224】

ルシフェラーゼmRNA（pPluc）について、標準的なインビトロ転写反応及び配列最適化インビトロ転写反応を実施例1に記載の通り実施した。

次いで、前記mRNAをLiCl沈殿によって精製した。

【0225】

40

免疫賦活アッセイ

6ウェルプレートの、25mM HEPES、2mM L-グルタミン、及び100IU/mL ペニシリン/ストレプトマイシン（全てLonza, Basel, Switzerland）並びに10%ウシ胎児血清（Perbio Science, Bonn, Germany）を添加したGibco（登録商標）RPMI1640培地からなるHeLa細胞培養培地2mLに、 4×10^5 細胞/ウェルの密度でHeLa細胞を播種した。次の日、Lipofectamine（登録商標）2000（Life Technologies, Darmstadt, Germany、カタログ番号11668-027）を用いて、細胞にRNA 2µg又はネガティブコントロールとしての注射用水（WFI）をトランスフェクトした。簡潔に述べると、Lipofectamine（登録商標）及

50

びRNAを、それぞれOpti-MEM（登録商標）培地（Life Technologies）で希釈し、1：1.5のRNA：Lipofectamine（登録商標）比で合わせ、室温で20分間インキュベートした。ネガティブコントロールは、Lipofectamine（登録商標）と混合したRNAの代わりにWFIを含有していた。一方、細胞を25mM HEPES及び2mM L-グルタミンを添加したGibco（登録商標）RPMI 1640培地（無血清且つペニシリン／ストレプトマイシン不含培地）2mLで1回洗浄し、無血清且つペニシリン／ストレプトマイシン不含培地2mLを前記細胞に添加し、次いで、RNA：Lipofectamine（登録商標）トランスフェクションミックス0.5mLを添加した。37℃及び5%CO₂で4時間インキュベートした後、トランスフェクションミックスを含有する培地をHeLa細胞培養培地2mLに置き換えた。

10

24時間後、無細胞上清を回収し、以下のキットを用いて製造業者の説明書（BD Biosciences）に従ってサイトメトリックビーズアレイ（CBA）によりIL-6、CXCL10、及びCCL5の濃度を測定した：Human Soluble Protein Master Buffer Kit（カタログ番号558264）、Assay Diluent（カタログ番号560104）、Human IL-6 Flex Set（カタログ番号558276）、Human CXCL10 Flex Set（カタログ番号558280）、及びHuman CCL5 Flex Set（カタログ番号558324）（全てのキットはBD Biosciences製）。FCAP Array v3.0ソフトウェア（BD Biosciences）を用いてデータを解析した。

20

【0226】

結果

図19から分かる通り、分泌されたIL-6、CXCL10、及びCCL5のレベルは、標準的な等モルNTPミックスを用いて合成されたRNAに比べて、配列最適化NTPミックスを用いて合成された同RNAの方が低かった。これは、配列最適化NTPミックスから得られたRNAの免疫賦活活性の方が低いことを示す。

【0227】

実施例11：バイオリアクタにおけるインビトロ転写

インビトロ転写に用いられるDNAの調製（P1140）：

30

以下のエレメントをDNAベクター（pCV32（Kan^R））に挿入することによってインビトロ転写用のDNAベクター（P1140）を調製した：

5' UTR：32L4（Top-UTR）

ORF：H1N1（Netherlands 2009）由来のHA（GCリッチ）

3' UTR：Albumin7。

【0228】

得られたDNAベクターのインビトロ転写から、2,083ヌクレオチド長を有するRNA分子が得られる。それぞれのRNA配列（配列番号6）を図20に示す。

【0229】

RNAコンストラクトは、以下のヌクレオチド組成を特徴とする：

40

G = 540（25，92%）

C = 676（32，45%）

A = 541（25，97%）

U = 326（15，65%）

G/C = 58，37%。

【0230】

DNAベクターの線状化：

以下の条件を用いてプラスミドP1140を線状化した：

0.5 μg プラスミドDNA

1.5 μL 10×反応バッファ

50

1 μ L EcoRI

15 μ LになるまでWFI（注射用水）を添加。

【0231】

反応物を37℃で3時間インキュベートした。次いで、フェノール／クロロホルム抽出及びイソプロパノール沈殿を実施した。

【0232】

インビトロ転写：

標準的なキャップ／NTPミックス

【表13】

標準的なキャップ／NTPミックス

標準的なキャップ/NTPミックス	4 μ L	最終濃度 [mM]
Cap (100 mM)	1,16	5.8
ATP (100 mM)	0,8	4
CTP (100 mM)	0,8	4
UTP (100 mM)	0,8	4
GTP (100 mM)	0,29	1.45
WFI	0,15	

(キャップを除く最終NTP濃度は、13.45 mMである)

【0233】

NTP及びキャップの算出：

標準的な転写反応で用いたのと同じ合計NTP濃度13.45 mMを配列最適化転写にも用いる。キャップアナログについてはGTPの4倍量を用いる。

【0234】

【表14】

P1140	G	C	A	U	キャップ	合計
2083 nt	540	676	541	326		2083
%	25,9	32,5	26,0	15,7		100
各mM (合計13,45 mM NTP)	3,5	4,4	3,5	2,1		13,45
キャップアナログ (4x GTP)					13,9	13,9
合計キャップ/NTP濃度 [mM]						27,4

【0235】

P11040用の配列最適化キャップ／NTPミックスの調製：

【表15】

P1140	G	C	A	U	キャップ	H ₂ O (ad 7 μ l)	最終体積 [μ l]
1反応当たり (μ l 100 mM NTP)	0,70	0,87	0,70	0,42	2,79	1,52	7,00

【0236】

5×転写バッファ：

400 mM HEPES

120 mM MgCl₂

10 mM スペルミジン

200 mM DTT

25 U/mL 無機ピロホスファターゼ。

【0237】

4つの異なる転写反応をバイオリアクタ内で試験した：

バイオリアクタとして、Dasgip製のDasBox Bioreactorを用いた。反応物を50 rpmで攪拌した。指定の時点で、サンプルをそれぞれ20 μ L取り出した。LiCl沈殿後、260 nmにおける吸収を求めることによってRNA濃度を測定した。

【0238】

インビトロ転写に4つの異なる条件を用いた：

【0239】

1. 標準的なNTPミックスを用いる転写

【表16】

試薬	ad 80000 μ L
線状化プラスミドDNA (P1140) [0,48 μ g/ μ L] (μ L)	8300
5×転写バッファ(μ L)	16000
標準的な γ PP ^o /NTPミックス(μ L)	16000
RNAse阻害剤[40U/ μ L] (μ L)	400
T7 RNA ^o リメラーゼ ^e [200 U/ μ L] (μ L)	2000
WFI (μ L)	37300
最終体積	80000

10

20

【0240】

転写反応を37℃で3時間インキュベートした。

【0241】

次いで、DNAse I (1 mg/mL) 6 μ L及びCaCl₂溶液(0.1 M) / μ g (DNAテンプレート) 0.2 μ Lを転写反応に添加し、37℃で2時間インキュベートした。

【0242】

2. 配列最適化転写(1.5時間、供給無し)

【表17】

試薬	ad 80000 μ
線状化プラスミドDNA (P1140) [0,48 μ g/ μ L] (μ L)	8300
5×転写バッファ(μ L)	16000
配列最適化 γ PP ^o /NTPミックス(μ L)	28000
RNAse阻害剤[40U/ μ L] (μ L)	400
T7 RNA ^o リメラーゼ ^e [200 U/ μ L] (μ L)	2000
WFI (μ L)	25300
最終体積	80000

30

40

【0243】

転写反応を37℃で1.5時間インキュベートした。

【0244】

次いで、DNAse I (1 mg/mL) 6 μ L及びCaCl₂溶液(0.1 M) / μ g (DNAテンプレート) 0.2 μ Lを転写反応に添加し、37℃で2時間インキュベートした。

【0245】

3. 配列最適化転写(供給有り)

50

【表 1 8】

試薬	ad 80000 μ L
線状化プラスミドDNA (P1140) [0,48 μ g/ μ L] (μ L)	8300
5×転写バッファ(μ L)	16000
配列最適化キャップ°/NTPミックス (μ L)	28000
RNAse阻害剤[40U/ μ L] (μ L)	400
T7 RNAポリメラーゼ°[200 U/ μ L] (μ L)	2000
WFI (μ L)	25300
最終体積	80000

10

【 0 2 4 6 】

転写反応を 3 7 °C で 1 . 5 時間インキュベートした。

【 0 2 4 7 】

1 . 5 時間後、配列最適化キャップ°/N T P ミックス 1 2 9 3 4 . 6 μ L 及び 5 × 転写バッファを添加した。転写反応を 3 7 °C で更に 1 . 5 時間インキュベートした。

【 0 2 4 8 】

次いで、D N A s e I (1 m g / m L) 6 μ L 及び C a C l 2 溶液 (0 . 1 M) / μ g (D N A テンプレート) 0 . 2 μ L を転写反応に添加し、3 7 °C で 2 時間インキュベートした。

20

【 0 2 4 9 】

4 . T 7 R N A ポリメラーゼ濃度及びテンプレート濃度を低下させた配列最適化転写

【表 1 9】

試薬	ad 80000 μ L
線状化プラスミドDNA (P1140) [0,48 μ g/ μ L] (μ L)	4200
5×転写バッファ(μ L)	16000
配列最適化キャップ°/NTPミックス (μ L)	28000
RNAse阻害剤[40U/ μ L] (μ L)	400
T7 RNAポリメラーゼ°[200 U/ μ L] (μ L)	1000
WFI (μ L)	30400
最終体積	80000

30

【 0 2 5 0 】

結果：

配列最適化転写ミックスにおける転写によって、標準的な条件下における転写と比べて高濃度の転写 R N A が得られる (図 2 1 、 T S (1)) 。ヌクレオチド及び転写バッファを更に供給すると、転写 R N A 量が更に増加した (図 2 1 、 T S (3)) 。

40

【 0 2 5 1 】

【表 20】

収量:

サンプルID	[RNA] (mg)
P1140-TS(1)	130,6
P1140-TS(2)	317,1
P1140-TS(3)	656,4
P1140-TS(4)	312,6

10

【0252】

発現及び免疫賦活:

6 ウェルプレート、25 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、及び100 IU/mL ペニシリン/ストレプトマイシン（全てLonza, Basel, Switzerland）並びに10%ウシ胎児血清（Perbio Science, Bonn, Germany）を添加したGibco（登録商標）RPMI 1640培地からなるHeLa細胞培養培地2 mLに、 4×10^5 細胞/ウェルの密度でHeLa細胞を播種した。次の日、Lipofectamine（登録商標）2000（Life Technologies, Darmstadt, Germany、カタログ番号11668-027）を用いて、細胞に様々な濃度のRNA 2 µg又はネガティブコントロールとしての注射用水（WFI）をトランスフェクトした。簡潔に述べると、Lipofectamine試薬及びRNAを、それぞれOpti-MEM（登録商標）培地（Life Technologies）で希釈し、1:1.5のRNA:Lipofectamine（登録商標）比で合わせ、室温で20分間インキュベートした。ネガティブコントロールは、Lipofectamine 2000と混合したRNAの代わりにWFIを含有していた。一方、細胞を25 mM HEPES及び2 mM L-グルタミンを添加したGibco（登録商標）RPMI 1640培地（血清及びペニシリン/ストレプトマイシン不含培地）2 mLで1回洗浄し、血清及びペニシリン/ストレプトマイシン不含培地2 mLを前記細胞に添加し、次いで、RNA:Lipofectamine（登録商標）トランスフェクションミックス0.5 mLを添加した。37℃及び5%CO₂で4時間インキュベートした後、トランスフェクションミックスを含有する培地を除去し、HeLa細胞培養培地2 mLを添加した。

20

30

【0253】

24時間後、上清及び細胞を回収した。

【0254】

タンパク質発現:

フローサイトメトリー分析を用いてHAタンパク質の表面発現を決定した。付着しているHeLa細胞をPBS 1 mLで1回洗浄し、トリプシン不含分離バッファ（40 mM Tris HCl pH 7.5; 150 mM NaCl、1 mM EDTA）を用いて収集した。前記細胞をマウスモノクローナル抗HA（H1N1）抗体（Immune Technology, New York, USA）と共にインキュベートし、次いで、二次抗マウスFITCコンジュゲート抗体（Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany）と共にインキュベートした。前記細胞をBD FACS Cantoで測定し、FlowJo Software Version 10.6を用いて分析した。Graph Pad Prism Software, Version 5.01を用いて統計解析を実施した。

40

【0255】

結果:

配列最適化反応ミックス中で転写されたRNA（図22、TS（2）、TS（3）、TS（4））からは、標準的な条件下で転写されたRNAよりも、コードHAタンパク質が

50

【 0 2 5 6 】

以下のキットを用いて製造業者の説明書（BD Biosciences）に従ってサイトメトリックビーズアレイ（CBA）により、無細胞上清中のIL-6、CXCL10、及びCCL5の濃度を測定した：

【 0 2 5 7 】

【表 2 1】

試薬	カタログ番号
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	558264
Assay Diluent	560104
Human IL-6 Flex Set	558276
Human CXCL10 Flex Set	558280
Human CCL5 Flex Set	558324

10

【 0 2 5 8 】

FCAP Array v3.0ソフトウェア (BD Biosciences) を用いてデータを解析した。Graph Pad Prism Software, Version 5.01を用いて統計解析を実施した。

20

【 0 2 5 9 】

結果：

標準的な条件下で転写されたRNA（図23、TS1）は、配列最適化反応ミックス中で転写されたRNA（図23、TS2、TS3、TS4）と比べて、HeLa細胞においてより高レベルのサイトカインIL-6、CXCL10、及びCCL5を誘導した。

【図 1】

【图 3 A】

配列番号 1: R1871 HsPSCA

配列番号 3: R1626 EGFR/ムチン-1

[illegible][illegible]

【图 2】

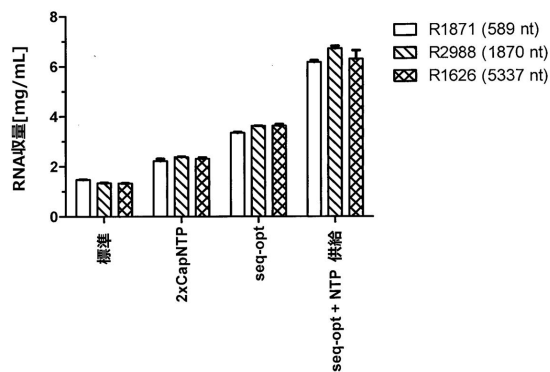
配列番号 2: R2988 PpLuc

[illegible]

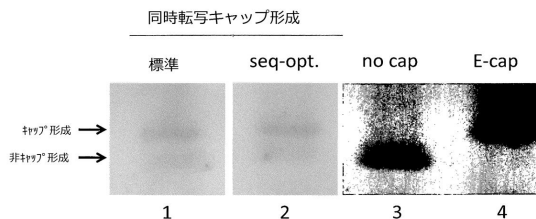
【図 3 B】

AAGGGCAAGCAUACUCCUAGGGACGCGCGCUGGUGACCGGGACUCCGCGCGCGGACAGUCUUGUGAAGACG
 CCGCAGCGCGGAGUAAGUACCGGACUUCGGGCGCGGACGAGCUGGGCGCGGAGGAAAGAGUACCGACCGGAG
 GCGGCAGUGGUGCCCAUAGUAGGUGCCUGCGAGGAGACUACUCCAGCGGUAUCCGACCCAGGACUGGUG
 UGAGGACUACGGCGGACGCGUUGAGGCGAGUAGCGUUCGGGACGAGCGGACCGGAGGUAUCCGCGCGGACG
 UACAGCAGCAUUCUGAAGGAGGCGAGCGUCCGCGGACCGCGCAUCGACUACUAGCGGUACUAUAGUACUAG
 GUGAAGUGCUGGAUGAUGACGCGGACUCGCGGCCCAAGUUCGCGACUGAUAUCGAGUUCAGCAAGAUGGCC
 CGGACCCCGGACGAGUACUGGUGAUCAGGGCAGACGGCGAGUACGACUCCCGGACCGCGACGACCAACUCC
 UUGCGGGCCGCGUAGUAGGAGGAGGAGGAGGAGGUGGUGACGCGGACGAGUACUAGUACUCCGACGAGGCG
 UUCUUCACGACCGCGUGACACGCGGACCCCGUCGUGACGACGCUAGACGCCACCACGACCAACUACGACGGC
 CGUGCAUACGCGCAGCGCCGCGUCAGAGUCCGCGCCACUAGGAGGAGGACGUCUUCGACGCGGUAACGACGCG
 CGCAGCGCGCGCGUAGCGGAGACGUAUCGACGACCAUCCUUCGCGGUGCGGAGGUAUACCAACGUGCGUG
 CCGAAGCGCGCCCGCGGGAGCGUGCAGAAACCGGUGUACCAACAACGCGCGUGAACCGGCCCGGACGCGGAC
 CCGACUACACGAGGACCCCGGACCGCGCGGCGGACCCGGAGUACUUGAACACCGGUCGACGAGCGUGCG
 AACGCAACUUCGACGAGCGCGGCCACUGGGCCGACGAGGUGUCGACAGACGACUCCGACGACCGGACGCUAC
 CAGCAGGACUUCUCCGACGAGGAGGCGAAGCCGACGGAUACUAGAGGCGACGCGCGGACGAGCGCGGUAUC
 CGCGGGUGUGCCCGCGACGAGCAGGUUACUAGCGCGCGUCGCGCAGCGACGUCUCCCGCGCGGCGGAGGAG
 GAGACGAGCGCCACCGACGCGGUCAGCGGCCUACGACCGAGAAAGACGCGUCCUAGACACGCGUCGUG
 CUGAGUCCUCCACGCGCGCGCGCGGCGAGCUCUACGACCGACGGCGCAGGACGUGACUCCUGCCCGCGCGACG
 CCGCGCAGCGGUGUCCCGCGCGAGCGGGGACGUAUCGACGAGGACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGAGGAG
 CCGACGCGCGCGCGCGCAGACGUCACUCCGCGCCCGCAGCAACAGCGCCGCGCGCGGACGACGCCCGCCCCCG
 CACGGGUGGACUCCGCGCGCGACACGCGCGCGCGCCCGCGGACGACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGACUCC
 CGCGCGGACACGCGCGCGCGCGCGCGCGAGACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGAGUACGCGCGCGG
 CGCGCGCGCGCGAGCAGCAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGGAGUACGUGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 ACGCGCGCGCGCGUACGCGCGAGCUCGACG
 GGCAGCUGCGCGCGGCGCACACACCGCGCGCGCAGCAGUUCAGCGCCUUCAGCAUCCGCGUCCACACGACGAC
 ACCTCCCGACACACCGCGGCGUCCACAGCAGGAGACGCGGCGUCCAGACACCCACACUCCAGCGUGCGCGCGCG
 ACAGCUCUCAAACACAGACUCCCGCGAGUCAGCAGCGGCGUGUUCUUCUUCUUCGAGUUCUCCAUUCCU
 AACCUGCAGUUCACAGCAGUCCUCCGAGGACCCAGCAGCAGUACUACACGAGGACUGCAGCGGACAUUCGCGAG
 AUGUUCUUCGAGUACUUCGCGGCGCGGCGUUCUUCGCGGUGAGCAGCAUAGUUCUCCCGCGCGCGUUCGUG
 GUGAGUAGCAGUCCUCCGCGUUCGCGGAGGAGCAUACUAGUCCACAGUUGGAGGACCGUACUACCAAGUACUAG
 CACGAGCGCGCGCGCGCGUACACUAGCAUACUUCGAGUGGAGGCGUCCGACGUGCGUCCUUCGCGUUCAGCGCG
 ACGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGCGUGGUGCAGUGCGCGCGCGCAAGAACGCGGACUGCAUACUUCUCC
 GCGCGGACAGUACACCGUAGGAGGAGUACCGCAGCUACACACACGCGCGUACGUCGCGCGCGCGCGCGCG
 ACACGACCGGAGCGGUGUACGAGAGGUGGUGCGCGGACGCGCGGAGUCCUUGAGCAGUACACCAACCGCGGAG
 GCGCGCGCGUCCGCAACUUCGAGGAGCAGGUGAACCCCGCGUUCGAGUACGAGCGUAGGAGGACUGUUAUAG
 CUGACUAGCCCGGCGUCCUCCACAGGCGCCUUCUCCUCCUUCGACCGAGAUUAUUAUUUUUUUUUUUUUUUU
 AAAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
 CCCCCUUUUAU

【図 6】



【图 7】

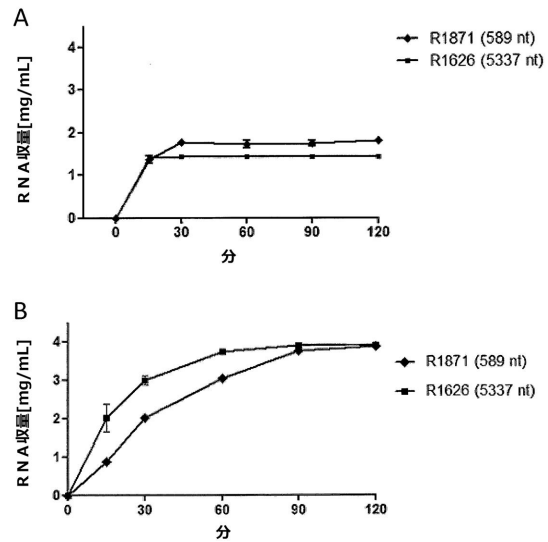


【図 4】

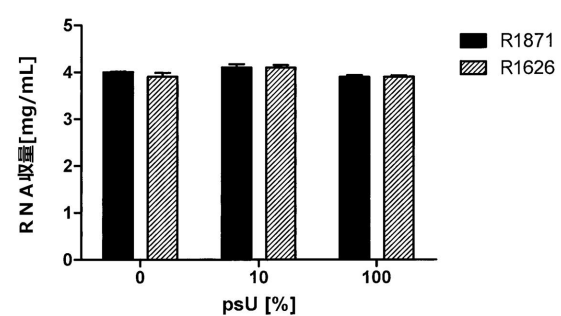
配列番号 4: R2025

[illegible]

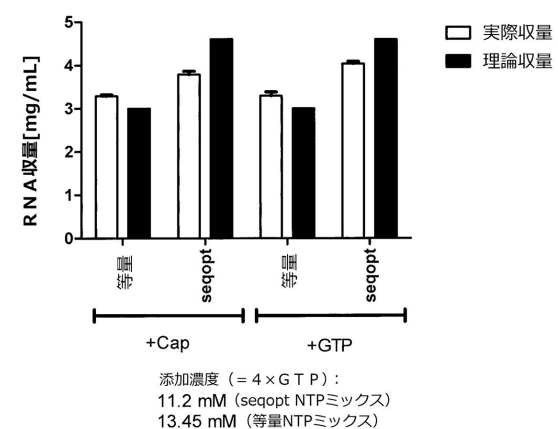
【図 5】



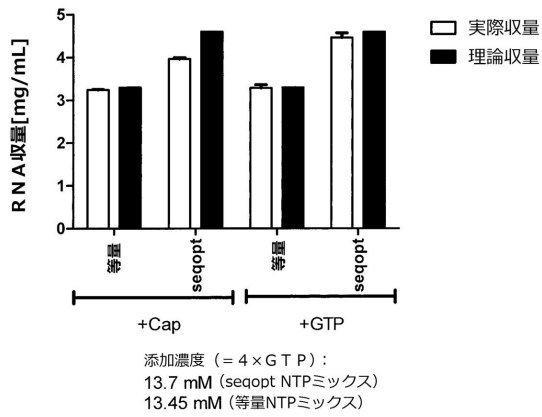
【図 8】



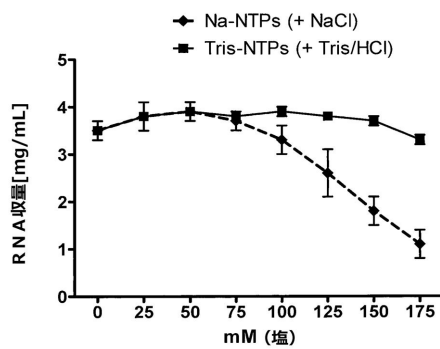
【図 9】



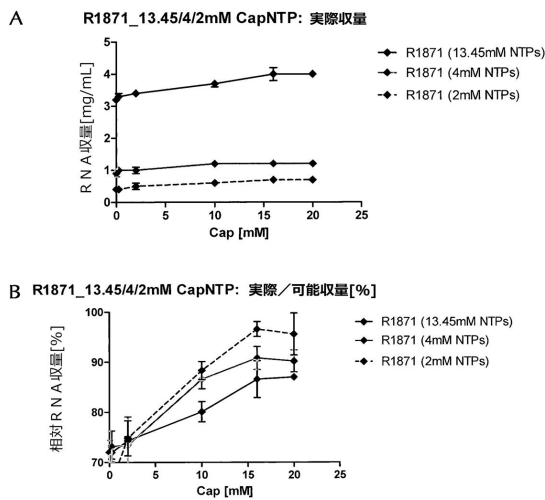
【図 10】



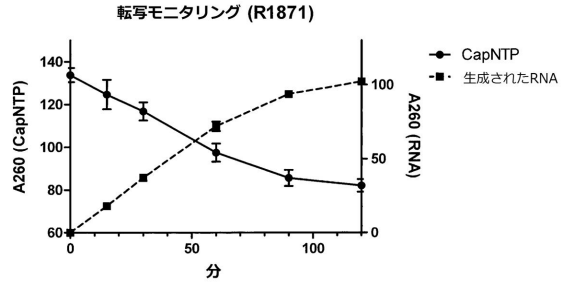
【図 11】



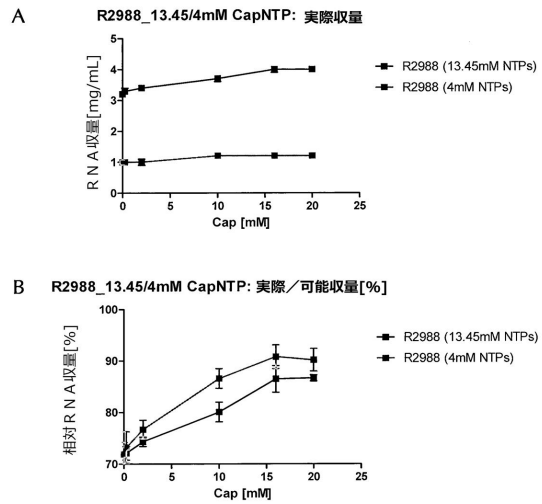
【図 14】



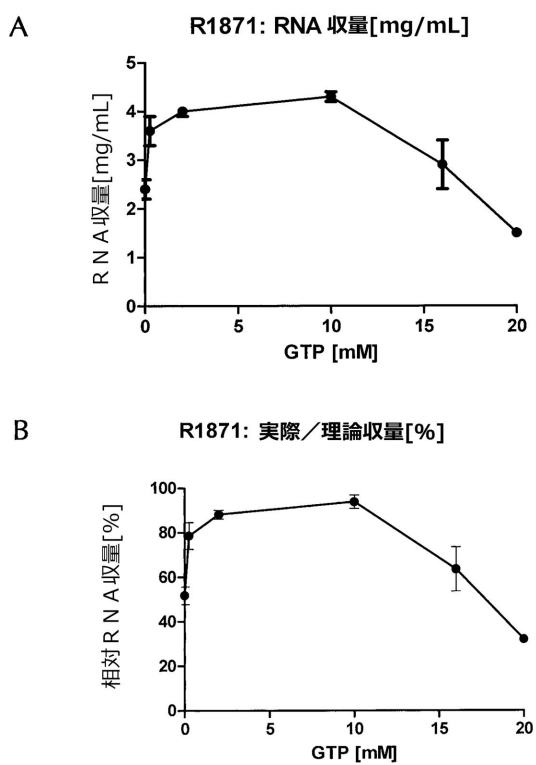
【図 12】



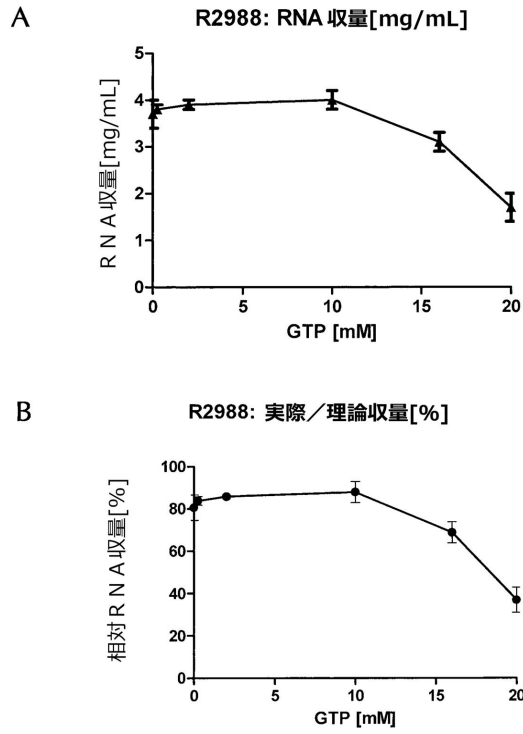
【図 13】



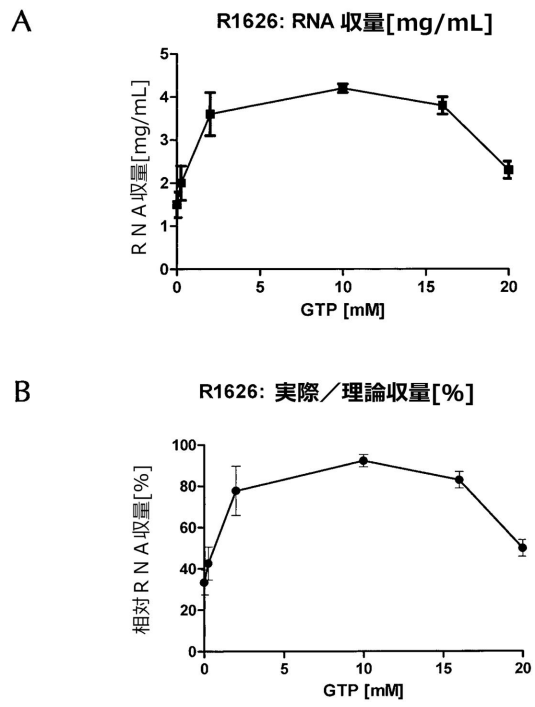
【図 15】



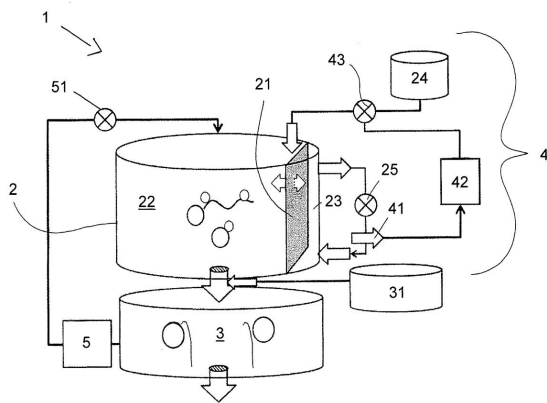
【図 16】



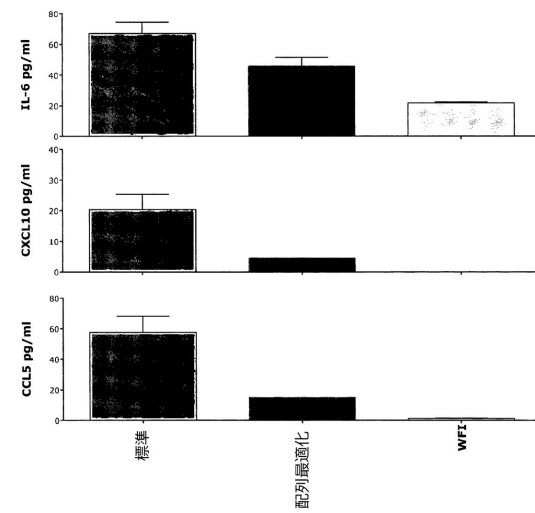
【図 17】



【図 18】



【図 19】

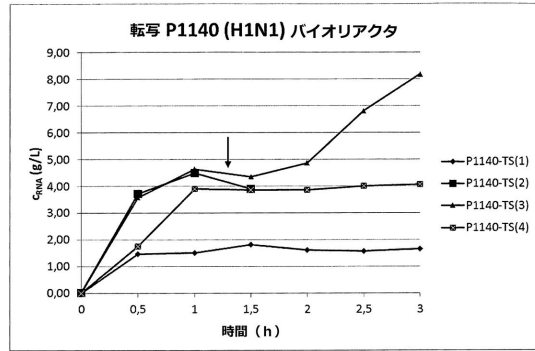


【図 20】

配列番号 6 :

[illegible]

【図 2 1】



【配列表】

0006748579000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 アニエラ・ヴォホナー

ドイツ連邦共和国 72070 テュービンゲン ブルクシュタイゲ 3

(72)発明者 ティルマン・ルース

ドイツ連邦共和国 72127 クスターディンゲン キルヒエンテリンスフルターシュトラッセ
16

(72)発明者 トーマス・ケッテラー

ドイツ連邦共和国 72810 ゴマリンゲン バッハシュトラッセ 43

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 Handbook of RNA Biochemistry, Second Edition, 2014年 3月, pp.3-27

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS (STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

PubMed