(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-521992
(P2016-521992A)
(43)公表日　平成28年7月28日(2016.7.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4H045
C07K 2/00	(2006.01)	C07K	2/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 64 頁）

(21)出願番号	特願2016-521431 (P2016-521431)
(86)(22)出願日	平成26年6月5日 (2014.6.5)
(85)翻訳文提出日	平成27年12月24日 (2015.12.24)
(86)国際出願番号	PCT/US2014/041111
(87)国際公開番号	WO2014/204667
(87)国際公開日	平成26年12月24日 (2014.12.24)
(31)優先権主張番号	61/836,833
(32)優先日	平成25年6月19日 (2013.6.19)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	61/838,736
(32)優先日	平成25年6月24日 (2013.6.24)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	61/857,965
(32)優先日	平成25年7月24日 (2013.7.24)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人　515352722
エイピーエスイー　リミテッド　ライアビリティ　カンパニー
アメリカ合衆国　ミズーリ州　セントルイス　フォレスト　パーク　アベニュー　４３２０　スイート　３０３
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒドロラーゼに耐性のあるカプシドを使用する組成物及び方法

(57)【要約】
ｓｉＲＮＡ及びｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、メッセンジャーＲＮＡ等の核酸、小ペプチド、ならびに生物活性分子を含む関心対象の標的カーゴ分子を封入し次に単離及び精製するためのウイルス様粒子を調製するためにヒドロラーゼ耐性ウイルスカプシドタンパク質を使用する、新規のプロセス及び組成物を説明する。
【選択図】図１

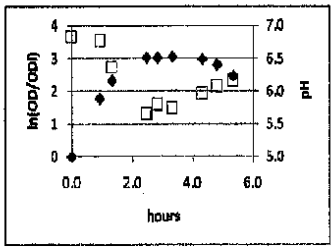


FIGURE 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも１種の異種カーゴ分子を封入しているプロテアーゼ耐性カプシドを含み、前記カーゴ分子が、カプシド特異的パッキング配列をさらに含む、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）。
【請求項２】
前記異種カーゴ分子が、オリゴリボヌクレオチドを含む、請求項１に記載のＶＬＰ。
【請求項３】
請求項２に記載のオリゴリボヌクレオチドをコードする核酸。
【請求項４】
ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、及びｍｉＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡをコードする、請求項３に記載の核酸。
【請求項５】
関心対象のタンパク質のｍＲＮＡをコードする、請求項３に記載の核酸。
【請求項６】
関心対象のタンパク質の前記ｍＲＮＡに隣接するウイルス５′アダプター及び３′キャップ非依存的翻訳エンハンサーをさらに含む、請求項５に記載の核酸。
【請求項７】
関心対象のタンパク質の前記ｍＲＮＡに隣接する、ウイルスまたは細胞の内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）及びポリ（Ａ）シグナルをさらに含む、請求項５に記載の核酸。
【請求項８】
少なくとも１つのリボザイムをさらにコードする、請求項４または５に記載の核酸。
【請求項９】
請求項３に記載の核酸を含むベクター。
【請求項１０】
請求項９に記載のベクターで安定に形質転換された、プロテアーゼ耐性カプシドに自己集合することができるカプシドタンパク質をコードする核酸を含む宿主細胞。
【請求項１１】
宿主細胞内の異種カーゴ分子を単離及び精製するための方法であって、（ａ）ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドを選択することと、（ｂ）前記宿主細胞を、前記カプシドを形成するカプシドタンパク質をコードする核酸を含む第１のベクター、及びパッキング配列に隣接した異種カーゴ分子をコードする核酸を含む第２のベクターを用いて安定にトランスフェクトすることと、（ｃ）形質転換された細胞が前記異種カーゴ分子をカプシド内封入（ｅｎｃａｐｓｉｄａｔｅ）するカプシドを発現させかつ集合させるのに十分な時間及び条件下で、前記細胞を維持することと、（ｄ）前記異種カーゴ分子を含有するプロテアーゼ耐性カプシドを含む複数のウイルス様粒子（ＶＬＰ）を含む宿主細胞溶解物を得ることと、（ｅ）前記宿主細胞溶解物中にあるがカプシドに組み込まれていない１００個の個々のポリペプチドあたり少なくとも６０個、少なくとも７０個、少なくとも８０個、または少なくとも９０個が切断され、一方でそのような加水分解前に前記宿主細胞溶解物中に存在する１００個のカプシドあたり少なくとも６０個、少なくとも７０個、少なくとも８０個、または少なくとも９０個が、加水分解後に無傷のままであるのに十分な時間及び条件下で、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類Ｅ．Ｃ．３．４を使用して前記宿主細胞溶解物を加水分解に供することと、（ｆ）前記ＶＬＰを前記加水分解物から精製することと、（ｇ）前記異種カーゴ分子を前記精製されたＶＬＰから回収することとを含む、前記方法。
【請求項１２】
宿主細胞内の異種カーゴ分子の細胞内産生に続いて、宿主細胞溶解物において加水分解から前記異種カーゴ分子を保護するための方法であって、（ａ）ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドを選択することと、（ｂ）前記宿主細胞を、前記カプシドを形成するカプシドタンパク質をコードする核酸を

含む第１のベクター、及びパッキング配列に隣接した異種カーゴ分子をコードする核酸を含む第２のベクターを用いて安定にトランスフェクトすることと、（ｃ）形質転換された細胞が前記異種カーゴ分子をカプシド内封入するプロテアーゼ耐性カプシドを含むウイルス様粒子（ＶＬＰ）を発現させかつ集合させるのに十分な時間及び条件下で、前記細胞を維持することと、（ｄ）複数のＶＬＰを含む宿主細胞溶解物を得ることと、（ｅ）ＶＬＰに組み込まれたもの以外のポリペプチドを加水分解するのに十分な時間及び条件下で、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類Ｅ．Ｃ．３．４を使用して前記宿主細胞溶解物を加水分解に供して、加水分解物を形成することと、（ｆ）前記加水分解物から前記ＶＬＰを精製することと、（ｇ）前記精製されたＶＬＰから前記異種カーゴ分子を回収することとを含む、前記方法。

【請求項１３】
細菌細胞、植物細胞、哺乳類細胞、または真菌細胞からなる群から選択される、請求項１０、１１、または１２に記載の宿主細胞。

【請求項１４】
ステップ（ｆ）が、（ｉ）硫酸アンモニウムによる第１の沈殿の後に第１の遠心分離を行って、第１の沈殿物及び第１の上清を得ることと、（ｉｉ）前記第１の上清での硫酸アンモニウムによる第２の沈殿の後に第２の遠心分離を行って、少なくとも約９０重量％の前記ＶＬＰを含む第２の沈殿物を得ることとを含む、請求項１１または１２に記載の方法。

【請求項１５】
ステップ（ｆ）が、（ｉ）エタノールによる第１の沈殿の後に第１の遠心分離を行って、第１の沈殿物及び第１の上清を得ることと、（ｉｉ）前記第１の上清での硫酸アンモニウムによる第２の沈殿の後に第２の遠心分離を行って、少なくとも約９０重量％の前記ＶＬＰを含む第２の沈殿物を得ることとを含む、請求項１１または１２に記載の方法。

【請求項１６】
ステップ（ｆ）が、前記加水分解物を超遠心分離して、少なくとも約９０重量％の前記ＶＬＰを含む沈殿物を得ることを含む、請求項１１または１２に記載の方法。

【請求項１７】
前記カプシドが、腸内バクテリオファージＭＳ２カプシドタンパク質のアミノ酸配列（配列番号３）と少なくとも４０％の配列同一性を有するウイルスカプシドタンパク質を含む、請求項１１または１２に記載の方法。

【請求項１８】
前記カプシドが、バクテリオファージＭＳ２カプシドタンパク質（配列番号３）を含む、請求項１１または１２に記載の方法。

【請求項１９】
前記異種カーゴ分子が、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、及びｍｉＲＮＡからなる群から選択され、かつバクテリオファージＭＳ２カプシドをさらに含む、請求項１に記載のＶＬＰを含む組成物。

【請求項２０】
標的細胞の必須遺伝子に対して指向化された請求項１９に記載の異種カーゴ分子を含む、組成物。

【請求項２１】
請求項２０に記載の組成物を前記標的細胞と接触させることを含む、標的細胞を殺滅するための方法。

【請求項２２】
標的植物の必須遺伝子に対して指向化された請求項１９に記載の異種カーゴ分子を含む、組成物。

【請求項２３】
請求項２２に記載の組成物を前記標的植物と接触させることを含む、標的植物を殺滅するための方法。

【請求項２４】
標的動物の必須遺伝子に対して指向化された請求項１９に記載の異種カーゴ分子を含む、組成物。
【請求項２５】
請求項２４に記載の組成物を前記標的動物と接触させることを含む、標的動物を殺滅するための方法。
【請求項２６】
前記標的動物が昆虫である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記異種カーゴ分子が、関心対象の遺伝子をコードするｍＲＮＡを含む、請求項１に記載のＶＬＰを含む組成物。
【請求項２８】
ウイルス５′アダプター及び３′キャップ非依存的翻訳エンハンサーをさらに含む、請求項２７に記載のｍＲＮＡを含む組成物。
【請求項２９】
前記植物細胞を請求項２８に記載の組成物と接触させることを含む、植物細胞内で遺伝子を発現させるための方法。
【請求項３０】
ウイルスまたは細胞の内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）及びポリ（Ａ）シグナルをさらに含む、請求項２７に記載のｍＲＮＡを含む組成物。
【請求項３１】
哺乳類細胞を請求項３０に記載の組成物と接触させることを含む、哺乳類細胞内で遺伝子を発現させるための方法。
【請求項３２】
前記異種カーゴ分子がセンス鎖ＲＮＡを含む、請求項１に記載のＶＬＰを含む組成物。
【請求項３３】
前記異種カーゴ分子がアンチセンス鎖ＲＮＡを含む、請求項１に記載のＶＬＰを含む組成物。
【請求項３４】
（ａ）等量の請求項３２及び３３に記載のＶＬＰを混合することと、（ｂ）それらの前記異種カーゴ分子を単離することと、（ｃ）前記異種カーゴ分子をアニールして二本鎖ＲＮＡ分子を形成することと、（ｄ）前記二本鎖ＲＮＡ分子を単離することとを含む、二本鎖ＲＮＡを産生するための方法。
【請求項３５】
請求項３４に記載の二本鎖ＲＮＡで標的細胞を形質転換することを含む、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、及びｍｉＲＮＡを産生するための方法。
【請求項３６】
１つ以上の相補領域が、それぞれ、
（ａ）センス鎖ｓｉＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｂ）ループを形成することができるＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｃ）前記センス鎖ｓｉＲＮＡに相補的なアンチセンス鎖ｓｉＲＮＡと
を含み、それらが隣接して配置されている、請求項３に記載の核酸。
【請求項３７】
前記相補領域が、１つ以上のリボザイムによって連結されている、請求項３６に記載の核酸。
【請求項３８】
相補領域が、
（ａ）複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｂ）ループを形成することができるＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｃ）前記複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡに相補的な複数の連鎖アンチセンス鎖ｓｉＲ

ＮＡと
を含む、請求項３に記載の核酸。
【請求項３９】
複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡが１～３個の非相補ヌクレオチドによって連結されてバルジＲＮＡを形成する、請求項３８に記載の核酸。
【請求項４０】
相補領域がそれぞれ、
（ａ）複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡと、それぞれのすぐ後に続く、宿主細胞ＲＮＡプロセシングのためのセンス鎖ＲＮＡ配列と、そのすぐ後に
（ｂ）ループを形成することができるＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｃ）前記複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡに相補的な複数の連鎖アンチセンス鎖ｓｉＲＮＡと、それぞれのすぐ後に続く、宿主細胞ＲＮＡプロセシングのための前記センス鎖ＲＮＡに相補的なアンチセンス鎖ＲＮＡと
を含む、請求項３に記載の長鎖ＲＮＡ。
【請求項４１】
宿主細胞ＲＮＡプロセシングのための前記ＲＮＡ配列がＣＲＩＳＰＲである、請求項４０に記載の核酸。
【請求項４２】
宿主細胞ＲＮＡプロセシングのための前記ＲＮＡ配列がＤＩＣＥＲである、請求項４０に記載の核酸。
【請求項４３】
ループを形成することができる前記ＲＮＡ配列が１つ以上のリボザイムを含む、請求項３６、３８、または４０に記載の核酸。
【請求項４４】
配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、及び配列番号２０からなる群から選択される、請求項３に記載の核酸。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１３年６月１９日出願の米国仮出願第６１／８３６，８３３号、２０１３年６月２４日出願の米国仮出願第６１／８３８，７３６号、及び２０１３年７月２４日出願の米国仮出願第６１／８５７，９６５号に対する優先権を主張し、それらの全開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表の組み込み
紙コピーの「配列表」、及び容量が３２キロバイトであり、２０１４年６月３日に作成されたファイル名４５００６１＿ＳｅｑｕｅｎｃｅＬｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２５．ｔｘｔを含む、光ディスク上のコンピューター可読形態の配列表の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
技術分野
本発明は、ウイルス様粒子に関し、特に特定の特徴及び機能を有する異種核酸を産生、単離、及び精製するためのナノコンテナとしてウイルスカプシドを使用する方法及び組成物に関する。
【背景技術】
【０００４】
発明の背景

ウイルス様粒子（ＶＬＰ）は、ウイルスエンベロープ及び／またはカプシドを作り出す特定のウイルス構造タンパク質の発現を介してウイルスから部分的に誘導された粒子であるが、ＶＬＰは、ウイルスゲノムを含まず非感染性である。ＶＬＰは、例えばＢ型肝炎ウイルス及び特定の他のウイルスから誘導され、ウイルス構築を研究するため、及びワクチン開発において使用されている。

【０００５】

ウイルスカプシドは、少なくとも１種のタンパク質で構成され、それの複数の複製が集合してカプシドを形成する。いくつかのウイルスにおいて、ウイルスカプシドはウイルスエンベロープで覆われている。そのようなウイルスエンベロープは、ウイルス糖タンパク質及び感染宿主細胞膜の部分で構成され、保護しない場合ウイルスカプシドと相互作用する巨大分子からウイルスカプシドを保護する。カプシドは典型的に、ウイルスゲノム及び時には自然環境におけるウイルスの存続に必要なタンパク質もコードする核酸をカプシド内封入（ｅｎｃａｐｓｉｄａｔｅ）するといわれている。ウイルスのウイルスゲノムが新規の宿主に侵入するためには、カプシドが分解されなければならない。そのような分解は、宿主自身のならびに外来の成分を分解するために通常は宿主によって使用される条件下で起こり、ほとんどの場合タンパク質分解を伴う。ウイルスは、それらのサイクルの非常に重要な部分、すなわちカプシド分解及びゲノム放出を可能にするために、タンパク質分解等の通常の宿主プロセスを利用する。

【０００６】

そのため、文献がペプチド結合に作用するヒドロラーゼに耐性のあるカプシドについてこれまで説明していなかったことは驚くべきことではない。より広範なタンパク質の一部である非常に限られた数のある種の特定のペプチド配列は、特定のプロテアーゼに対していくらか耐性があることは知られているが、大部分のペプチド配列はそうではない。タンパク質分解に耐えるウイルスが報告されているが、これらは全てエンベロープウイルスであり、カプシドがウイルスエンベロープによって保護されている。そのようなウイルスにおいて、カプシドは、記述されたプロテアーゼと接触しない、すなわち記述されたプロテアーゼから保護されている。したがって、たとえあったとしても、そのような状況においてウイルスカプシドのタンパク質分解安定性の役割は知られていない。

【０００７】

タンパク質等の組み換え分子の大規模製造において、その単離につながる精製ステップにおいて標的タンパク質より小さい分子を除去するために、限外濾過がよく使用される。精製方法は、沈殿、溶媒抽出、及び結晶化技術を伴うことも多い。これらの分離技術は、クロマトグラフィーとは対照的に、それらが表面ではなくバルク相互作用に基づいているため、本質的に単純かつ低コストである。しかしながら、これらの技術は典型的に単純なシステムに対する用途に、かつ各タンパク質及び発現系に対する異なるセットの条件を特定する必要によって、限定されている。しかし各標的組み換えタンパク質は、固有の一組の結合相互作用を示し、それによってその単離プロセスを固有かつ複雑にする。そのため、これらの単純な単離プロセスを使用する組換えタンパク質の分離効率は低い。

【０００８】

ｓｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡを含む核酸は、大部分が化学的合成方法を使用して製造されてきた。これらの方法は、必要とされるステップが多い事、及び技術的困難に影響されやすい反応の複雑性、及び製造システムのコストに起因して、一般的に複雑かつ高コストである。さらに、関係している合成試薬は高価であるため、スケールメリットは単純にバッチサイズを増加させることでは容易に得られない。

【０００９】

化学的及び酵素的に合成されたＲＮＡは、一般にＲＮＡｉ用途に、主にタンパク質の発現の下方制御または抑制に使用される。内因性タンパク質の発現または外因性タンパク質の発現の上方制御のために生物に送達されるＲＮＡの例は極めて限定される。ｍＲＮＡを体に送達するための前述の方法は、合成困難な５′キャップＲＮＡに限定される。改善された費用効果の高いＲＮＡ送達方法、ならびにＲＮＡｉ及びｍＲＮＡ用途の両方のための

方法の必要性が残る。

【発明の概要】

【００１０】

一態様において、本開示は、少なくとも１種の異種カーゴ分子及びパッキング配列を封入しているカプシドを含むＶＬＰを提供する。ＶＬＰは、カプシドによって封入された少なくとも１つのリボザイムをさらに含み得る。異種カーゴ分子は、オリゴヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチドを含み得る。ＶＬＰは、１つ以上のリボザイムを含んでよく、リボザイムは、核酸構築物を形成するためにパッキング配列及びオリゴリボヌクレオチドによって隣接され得る。ＶＬＰは、複数の核酸構築物を含み得る。オリゴリボヌクレオチドを含むＶＬＰにおいて、オリゴリボヌクレオチドは、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、及びｍｉＲＮＡから選択された短いＲＮＡであり得る。ＶＬＰは、２つ以上のリボザイムを含み得、各リボザイムは、短いＲＮＡの一端を切断するために選択される。リボザイムは、例えばハンマーヘッドリボザイム及び肝炎デルタＶリボザイムから選択され得る。ハンマーヘッドリボザイムは、オリゴリボヌクレオチドの少なくとも６つの連続したヌクレオチドに相補的な連続した一組のヌクレオチドを有するハンマーヘッドリボザイム変異体であり得る。代替として、リボザイムは、野生型肝炎デルタＶリボザイムの割合の最大約５０％の割合でオリゴリボヌクレオチドとの接続を切断することができる突然変異体肝炎デルタＶリボザイムであり得る。

【００１１】

本開示によるＶＬＰは、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のある野生型ウイルスカプシドを含むカプシド、または野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）と少なくとも１５％、少なくとも１６％、少なくとも２１％、少なくとも４０％、少なくとも４１％、少なくとも４５％、少なくとも５２％、少なくとも５３％、少なくとも５６％、少なくとも５９％、もしくは少なくとも８６％の配列同一性を有するカプシドタンパク質を含み得る。カプシドは、配列番号３のアミノ酸配列を有する野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質を含み得る。

【００１２】

本開示によるＶＬＰは、ペプチドまたはポリペプチドを含む異種カーゴ分子を含み得る。ＶＬＰは、異種カーゴペプチドまたはポリペプチド分子とウイルスカプシドとを結合するオリゴヌクレオチドリンカーをさらに含み得る。オリゴヌクレオチドリンカーは、リボザイム配列を含むオリゴリボヌクレオチドであり得る。代替として、異種カーゴ分子は、約１，５００Ｄａ以下の分子量を有する生物活性小分子に特異的に結合する第１のアプタマー配列、及びカプシドのパッキング配列に結合するための第２のアプタマー配列を含む二官能性ポリヌクレオチドを含む二分子カーゴ分子を含み得る。ＶＬＰは、第１のアプタマー配列に結合された生物活性小分子をさらに含み得る。生物活性小分子は、例えば、アトラジン、アセタミプリドホレート（ａｃｅｔａｍｉｐｒｉｄｐｈｏｒａｔｅ）、プロフェノホス（ｐｒｏｆｅｎｏｆｏｓ）、イソカルボホス（ｉｓｏｃａｒｂｏｐｈｏｓ）、及びオメトエート（ｏｍｅｔｈｏａｔｅａｓ）から選択され得る、除草剤または殺虫剤を含み得る。

【００１３】

別の態様において、本開示は、短いＲＮＡ、リボザイム、及びパッキング配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物を提供する。短いＲＮＡは、例えばｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡであり得る。核酸構築物は、４～１００ヌクレオチドの連結ヌクレオチド配列をさらに含み得、この連結ヌクレオチド配列は、パッキング配列によって、及び短いＲＮＡ配列によって隣接される。核酸構築物は、４～１００ヌクレオチドの連結ヌクレオチド配列をさらに含み得、この連結ヌクレオチド配列は、リボザイム配列によって、及び短いＲＮＡ配列によって隣接される。リボザイム配列は、短いＲＮＡ及びパッキング配列によって隣接され得る。本開示は、任意のそのような核酸構築物を含むベクター、及びそのようなベクターを含む宿主細胞、ならびにそのようなベクターで安定に形質転換された

宿主細胞も包含する。宿主細胞は、限定されないが大腸菌細胞等の細菌細胞、植物細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、真菌細胞、または酵母細胞であり得る。宿主細胞は、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるウイルスカプシドをコードする第２の核酸配列を含む第２のベクターを用いてさらに安定にトランスフェクトされ得る。第２の核酸配列は、例えばウイルスタンパク質をコードし得、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質のアミノ酸配列（配列番号３）と少なくとも４０％の配列同一性を有するウイルスカプシドをコードする。本明細書に記載される核酸構築物は、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質（配列番号３）もコードし得る。そのような核酸構築物中のリボザイムは、例えば、ハンマーヘッドリボザイムか、短いＲＮＡの少なくとも６つの連続したヌクレオチドに相補的な連続した一組のヌクレオチドを有するハンマーヘッドリボザイム変異体か、肝炎デルタＶリボザイムか、または野生型肝炎デルタＶリボザイムの割合の最大５０％の割合で短いＲＮＡとの接続を切断することができる突然変異体肝炎デルタＶリボザイムであり得る。本開示は、本明細書に記載される核酸構築物を含有するように形質転換された植物または植物組織、及びそのような植物または植物組織の種子または子孫も包含し、その種子または子孫は、核酸構築物を含む。

【００１４】

別の態様において、本開示は、ａ）それぞれ少なくとも１種の異種カーゴ分子を封入しているウイルスカプシドを含む、複数のＶＬＰ、及びｂ）組成物中に存在するカプシド１００グラムあたり４グラム未満の量で存在する１つ以上の細胞溶解産物を含む組成物を提供し、この細胞溶解産物は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、及びそれらの任意の組合せから選択される。組成物中、カプシドは、例えばペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性がある。カプシドは、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）と少なくとも１５％、少なくとも１６％、少なくとも２１％、少なくとも４０％、少なくとも４１％、少なくとも４５％、少なくとも５２％、少なくとも５３％、少なくとも５６％、少なくとも５９％、または少なくとも８６％の配列同一性を有するカプシドタンパク質を含み得、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性がある。カプシドは、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質（配列番号３）を含み得る。組成物中、異種カーゴ分子は、オリゴリボヌクレオチドであり得るオリゴヌクレオチドを含み得る。オリゴリボヌクレオチドは、例えばｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、及びｍＲＮＡから選択され得る。組成物中、各ＶＬＰは、少なくとも１つのリボザイムをさらに含み得、リボザイムは、パッキング配列及びオリゴリボヌクレオチドによって隣接されて核酸構築物を形成し、各ＶＬＰは、複数の核酸構築物を含み得る。そのような組成物のＶＬＰにおいて、リボザイムは、例えばハンマーヘッドリボザイムか、短いＲＮＡの少なくとも６つの連続したヌクレオチドに相補的な連続した一組のヌクレオチドを有するハンマーヘッドリボザイム変異体か、肝炎デルタＶリボザイムか、または野生型肝炎デルタＶリボザイムの割合の最大５０％の割合でその短いＲＮＡとの接続を切断することができる突然変異体肝炎デルタＶリボザイムであり得る。そのような組成物中のＶＬＰは、４～１００ヌクレオチドの連結ヌクレオチド配列をさらに含み得、この連結ヌクレオチド配列は、パッキングコード配列、及び短いＲＮＡコード配列、または４～１００ヌクレオチドの連結ヌクレオチド配列によって隣接され、連結ヌクレオチド配列は、リボザイム及び短いＲＮＡコード配列によって隣接される。リボザイム配列は、短いＲＮＡ及びパッキング配列によって隣接され得る。そのような組成物中のＶＬＰは、ペプチドまたはポリペプチドを含む異種カーゴ分子を含み得る。組成物中のそのようなＶＬＰは、異種カーゴ分子及びウイルスカプシドを結合するオリゴヌクレオチドリンカーをさらに含み得る。オリゴヌクレオチドリンカーは、リボザイム配列を含むオリゴリボヌクレオチドであり得る。そのような組成物中、細胞溶解産物は、０．５グラム未満、０．２グラム未満、または０．１グラム未満の量で存在し得る。

【００１５】

別の態様において、本開示は、標的カーゴ分子を単離及び精製するための方法を提供し

、この方法は、（ａ）それぞれ少なくとも１つの標的カーゴ分子を封入しているカプシドを含む複数のＶＬＰを含む全細胞溶解物を得て、カプシドがペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性があることと、（ｂ）全細胞溶解物中に存在するがカプシドによって封入されていない個々のポリペプチド１００個毎に少なくとも６０個、少なくとも７０個、少なくとも８０個、または少なくとも９０個が切断されるのに十分な時間及び条件下で、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４を使用してＶＬＰを加水分解に供し、一方でそのような加水分解前に全細胞溶解物中に存在するカプシドの１００個毎に少なくとも６０個、少なくとも７０個、少なくとも８０個、または少なくとも９０個が、加水分解の後に無傷のままであることとを含む。この方法において、カプシドは、それぞれ野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質のアミノ酸配列（配列番号３）と少なくとも１５％、少なくとも１６％、少なくとも２１％、少なくとも４０％、少なくとも４１％、少なくとも４５％、少なくとも５２％、少なくとも５３％、少なくとも５６％、少なくとも５９％、または少なくとも８６％の配列同一性を有するウイルスカプシドタンパク質を含み得る。カプシドは、それぞれ野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質（配列番号３）を含む。この方法において、異種カーゴ分子は、オリゴリボヌクレオチドであり得るオリゴヌクレオチド、またはペプチドもしくはポリペプチドを含み得る。オリゴリボヌクレオチドは、例えば、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、及びｍＲＮＡから選択され得る。この方法において、各ＶＬＰは、リボザイムをさらに含み得、リボザイムは、パッキング配列及びオリゴリボヌクレオチドによって隣接されて核酸構築物を形成する。この方法は、加水分解の後にカプシドの精製をさらに含み得る。精製は、液－液抽出ステップ、結晶化ステップ、分別沈殿ステップ、及び限外濾過ステップのうちの少なくとも１つを含み得る。本開示は、そのような方法によって産生された組成物も包含する。

【００１６】

別の態様において、本開示は、宿主細胞中の標的分子の細胞内産生の後に、全細胞溶解物中の加水分解から標的分子を保護するための方法を提供し、この方法は、（ａ）ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるウイルスカプシドを選択することと、（ｂ）ウイルスカプシドを形成するウイルスタンパク質をコードする核酸配列を含む第１のベクター、ならびにパッキング配列及びｓｉＲＮＡ配列によって隣接されるリボザイムを含む核酸配列を含む第２のベクターを用いて宿主細胞を安定にトランスフェクトすることと、（ｃ）パッキング配列及びｓｉＲＮＡ配列によって隣接されたリボザイムをカプシド内封入するカプシドを形質転換された細胞が発現及び集合させるのに十分な時間及び条件下で細胞を維持することとを含む。このプロセスにおいて、カプシドは、それぞれ野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質のアミノ酸配列（配列番号３）と少なくとも１５％、少なくとも１６％、少なくとも２１％、少なくとも４０％、少なくとも４１％、少なくとも４５％、少なくとも５２％、少なくとも５３％、少なくとも５６％、少なくとも５９％、または少なくとも８６％の配列同一性を有するウイルスカプシドタンパク質を含み得る。

【００１７】

別の態様において、本開示は、少なくとも１種の異種カーゴ分子を封入しているＶＬＰを精製するためのプロセスであって、このプロセスは、（ａ）複数のＶＬＰを含む細胞溶解物を得ることと、（ｂ）ＶＬＰ以外の細胞溶解産物を加水分解するのに十分な時間及び条件下で細胞溶解物をプロテアーゼと接触させて、加水分解物を形成することと、（ｃ）ＶＬＰを加水分解物から単離することとを含む。ステップ（ｃ）は、（ｉ）硫酸アンモニウムによる第１の沈殿の後に第１の遠心分離を行って、第１の沈殿物及び第１の上清を得ることと、（ｉｉ）第１の上清での硫酸アンモニウムによる第２の沈殿に続いて第２の遠心分離を行って、少なくとも約７０重量％、８０重量％、または９０重量％のＶＬＰを含む第２の沈殿物を得ることとを含み得る。ステップ（ｃ）は、（ｉ）エタノールによる第１の沈殿の後に第１の遠心分離を行って、第１の沈殿物及び第１の上清を得ることと、（ｉｉ）第１の上清での硫酸アンモニウムによる第２の沈殿の後に第２の遠心分離を行い、

第２の沈殿物を得ることとを含み、第２の沈殿物は、少なくとも約７０重量％、８０重量％、または９０重量％のＶＬＰを含む。ステップ（ｃ）は、加水分解物を超遠心分離し、少なくとも約７０重量％、８０重量％、または９０重量％のＶＬＰを含む沈殿物を得ることを含み得る。このプロセスにおいて、ＶＬＰは、それぞれペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドであって、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質のアミノ酸配列（配列番号３）と少なくとも１５％、少なくとも１６％、少なくとも２１％、少なくとも４０％、少なくとも４１％、少なくとも４５％、少なくとも５２％、少なくとも５３％、少なくとも５６％、少なくとも５９％、または少なくとも８６％の配列同一性を有するウイルスカプシドタンパク質を含み得る、カプシドを含み得る。ＶＬＰは、それぞれ野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質（配列番号３）を含み得る。このプロセスにおいて、ステップ（ｂ）は、約３７℃で少なくとも約３０分間行われ得る。このプロセスは、ステップ（ｂ）の前に、細胞溶解物を、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、及びリパーゼのうちの少なくとも１つと約３７℃で少なくとも約３０分間接触させることをさらに含み得る。このプロセスにおいて、プロテアーゼは、例えばペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４であり得、例えばプロテイナーゼＫ、ストレプトミセス・グリセウス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｇｒｉｓｅｕｓ）からのプロテアーゼ、バチルス・リケニホルミス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）からのプロテアーゼ、ペプシン、及びパパインから選択され得る。このプロセスにおいて、ＶＬＰによって封入される異種カーゴ分子は、オリゴリボヌクレオチドであり得るオリゴヌクレオチド、またはペプチドもしくはポリペプチドを含み得る。オリゴリボヌクレオチドは、例えばｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、及びｍＲＮＡから選択され得る。このプロセスにおいて、ＶＬＰはそれぞれ、パッキング配列及びオリゴリボヌクレオチドによって隣接されて核酸構築物を形成する、本明細書に記載されるようなリボザイムをさらに含み得る。オリゴリボヌクレオチド及びパッキング配列は、少なくとも１～１００ヌクレオチドのリンカー配列によって連結され得る。このプロセスは、ステップ（ａ）の前に、細胞内のＶＬＰの発現の後に細胞を遠心分離することによって、細胞溶解物を調製することと、細胞を再懸濁することと、細胞を溶解することと、細胞溶解物を遠心分離して上清を得ることとをさらに含み得、上清は、ステップ（ａ）のための細胞溶解物として使用される。

【００１８】

別の態様において、本開示は、少なくとも１種の異種カーゴ分子及びパッキング配列を封入しているカプシドを含むＶＬＰを提供し、そのカプシドは、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシド（配列番号３）の変異体であるカプシドタンパク質を含む。カプシドタンパク質は、１位でＡ残基が欠失されることを除いて、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、１位のＡ残基が欠失され、２位のＳ残基が欠失されることを除いて、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、１位のＡ残基が欠失され、２位のＳ残基が欠失され、３位のＮ残基が欠失されることを除いて、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、１２９位のＹ残基が欠失されることを除いて、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するが、１１２～１１７セグメントに単一（１）アミノ酸欠失を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するが、１１２～１１７セグメントに単一（１）アミノ酸欠失を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するが、６５～８３セグメントに１～２個の残基挿入を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するが、４４～５５セグメントに１～２個の残基挿入を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、野生型腸内細菌ファ

ージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するが、３３～４３セグメントに単一（１）残基挿入を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するが、２４～３０セグメントに１～２個の残基挿入を有するものであり得る。カプシドタンパク質は、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）を有するが、１０～１８セグメントに単一（１）残基挿入を有するものであり得る。カプシドは、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドに集合する第２のカプシドモノマー配列と連結されたカプシドタンパク質モノマー配列を含み得る。カプシドは、Ｃ末端が第２のカプシドモノマー配列と連結される０～６残基リンカーセグメントでＣ末端が伸長されるカプシドタンパク質モノマー配列を含み得、それら全ては、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドに集合する。リンカーセグメントは、例えば、－（Ｇｌｙ）$_x$等の配列を有し得、式中、ｘ＝０～６であり、－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、及び－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－を含む。リンカーセグメントは、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ、及び－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－から選択されるＧｌｙ－Ｓｅｒリンカーであり得る。カプシドは、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドに集合する第３のカプシドモノマー配列と連結されたカプシドタンパク質を含み得る。カプシドは、Ｃ末端が第３のカプシドモノマー配列と連結される０～６残基リンカーセグメントでＣ末端が伸長されるカプシドタンパク質を含み得、それら全ては、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドに集合する。カプシドは、カプシドタンパク質を含み得、カプシドは、一方または両方のリンカー配列が－（Ｇｌｙ）$_x$であり、式中、ｘ＝０～６であり、－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、及び－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－を含むカプシドタンパク質を含む。リンカーセグメントは、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－、－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ、及び－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－から選択されるＧｌｙ－Ｓｅｒリンカーであり得る。

【００１９】

そのようなカプシドタンパク質は、例えば、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドに集合する。例えば、カプシドは、一方または両方のリンカー配列が－（Ｇｌｙ）$_x$－、ｘ＝１である、カプシドタンパク質を含み得、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドに集合する。カプシドは、一方または両方のリンカー配列が－（Ｇｌｙ）$_x$－、ｘ＝２であるカプシドタンパク質を含み得、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドに集合する。カプシドは、一方または両方のリンカー配列が－（Ｇｌｙ）$_x$－、ｘ＝３であるカプシドタンパク質を含み得、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドに集合する。カプシドは、１～３個の残基によってＮ末端が切断された１つ以上のカプシドタンパク質配列を含み得、本明細書に記載されるようなリンカーセグメントは、欠失された残基の数によって伸長され、カプシドはペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性がある。カプシドは、１個の残基によってＣ末端が切断された１つ以上のカプシドタンパク質配列を含み得、本明細書に記載されるようなリンカーセグメントは、１個の残基によって伸長され、カプシドはペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性がある。カプシドは、Ｃ末端の１個の残基が切断された連鎖状二量体の状態の第１のカプシドタンパク質配列を含み得、リンカーセグメントは、残基１個分だけ伸長されるか、または連鎖状三量体の状態の第１及び／または第２のカプシドタンパク質配列は、Ｃ末端の１個の残基が切断され、これは、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性がある。カプシドは、Ｎ末端及びＣ末端の切断を有するカプシドタンパク質を含み得る。

【００２０】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載されるようなＶＬＰを使用して、手頃な

価格のｍＲＮＡを生物に送達するための方法も提供する。したがって、そのような方法において、カーゴ分子はｍＲＮＡである。この方法は、５′キャップｍＲＮＡの必要性を克服する。開示される方法は、本明細書にも記載される組成物及び精製方法を使用して製造及び精製された手頃な価格のＲＮＡを使用しながら、例えば内因性タンパク質の発現を増加させるか、または外因性タンパク質の発現を誘導するために使用され得る。宿主における内因性タンパク質（複数可）の発現の増加または外因性タンパク質の発現の誘導は、宿主に応じて異なるｍＲＮＡカーゴ分子（複数可）を使用し、いくつかの代替方法のうちの１つで達成され得る。

【００２１】

例えば、５′キャップＲＮＡが翻訳に必要とされない細菌宿主における内因性タンパク質の発現を増加させるか、または外因性タンパク質（関心対象のタンパク質）の発現を誘導するために、関心対象のタンパク質のｍＲＮＡが、本明細書に記載されるようなＶＬＰ中のカーゴ分子として細菌宿主に導入される。ｍＲＮＡは、本明細書に記載されるようなＶＬＰを使用する精製方法を使用して精製され得る。細菌における発現を増加させるために、カーゴｍＲＮＡ分子は、細菌宿主内のｍＲＮＡの濃度を増加させるために、バクテリオファージレプリカーゼをコードする、随意でレプリカーゼ補助タンパク質もコードするＲＮＡをさらに含み得る。

【００２２】

あるいは、ｍＲＮＡ送達方法は、５′キャップＲＮＡが翻訳に必要とされる植物宿主に適用され得る。関心対象のタンパク質のｍＲＮＡは、植物または植物細胞に導入され、ｍＲＮＡは、ウイルス５′アダプター、及びそのマッチング３′キャップ非依存的翻訳エンハンサー（「３′ＣＩＴＥ」）によって隣接される。

【００２３】

さらに別の例において、ｍＲＮＡ送達方法は、５′キャップＲＮＡが翻訳に必要とされる哺乳類を含む動物に適用され得る。関心対象のタンパク質のｍＲＮＡは、例えば、哺乳類または哺乳類細胞等の動物または動物細胞に導入され、関心対象のタンパク質のｍＲＮＡは、ウイルスまたは細胞の内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）及びポリ（Ａ）シグナルによって隣接される。動物または動物細胞における発現をさらに促進または増加させるために、カーゴｍＲＮＡ分子は、ウイルスレプリカーゼをコードする、随意にレプリカーゼ補助タンパク質もコードするＲＮＡをさらに含み得、動物または動物細胞内部のｍＲＮＡの濃度を増加させる。

【００２４】

あるいは、宿主がウイルスレプリカーゼ、及び随意にその補助タンパク質を用いてもトランスフェクトされる前述の方法のうちのいずれかにおいて、レプリカーゼ（及び随意に補助タンパク質）をコードするｍＲＮＡは、関心対象のタンパク質のｍＲＮＡとは異なる第２のカーゴ分子として１つのＶＬＰに含まれ得るか、または関心対象のタンパク質のｍＲＮＡのみを含有するＶＬＰとの組合せで、その次に宿主生物または細胞に導入される別個のＶＬＰに含まれ得る。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

【図１】大腸菌宿主（ＡＴＣＣ番号１５６６９）中の野生型ＭＳ２バクテリオファージ（ＡＴＣＣ番号１５５９７－Ｂ１、米国培養細胞系統保存機関（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）から）の増殖を示す経時的な光学濃度（ＯＤ、黒菱形）及びｐＨ（白四角）のプロットである。

【図２】大腸菌における増殖の後に得られ、プロテイナーゼＫ及び限外濾過を使用して精製されたＭＳ２バクテリオファージ試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルであり、プロテイナーゼＫ精製が総タンパク質の９９％を超えて精製されたファージを生み出すことを示す（１４ｋＤａでのバンドは、ＭＳ２バクテリオファージカプシドタンパク質に対応する）。

【図３】部分的に精製されたＭＳ２のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルであり、フ

ァージの完全分解及び溶解物の１回または２回限外濾過後に得られた結果を示す（レーン４及び６）。
【図４】限外濾過及びプロテイナーゼＫ処理を使用して精製されたＭＳ２試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。
【図５】プロテイナーゼＫ処理、酸性条件での沈殿、塩基性及び酸性条件でエタノールを使用する沈殿、ならびに限外濾過を使用して精製されたＭＳ２試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。
【図６】プロテイナーゼＫ処理、酸性条件での沈殿、塩基性及び酸性条件でエタノールを使用する沈殿、ならびに限外濾過を使用して精製されたＭＳ２試料のＵＶスペクトルを示すグラフである。
【図７】対照試料（白菱形）及び図５及び６に記載される精製の後のＭＳ２試料（黒四角）で得られた経時的な光学濃度（ＯＤ、黒菱形）のプロットであり、精製された試料が高い感染性を持つファージを含有することを示す。
【図８】ＭＳ２カプシド特異的１９ｍｅｒ　ＲＮＡヘアピンに取り付けられたカプシドタンパク質コードＲＮＡをカプシド内封入するＭＳ２カプシドの発現後のＶＬＰ試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。
【図９】図５及び６に記載される精製の後にＭＳ２試料から得られ、臭化エチジウムで染色された１．５％アガロースゲル中でクロマトグラフ処理されたＰＣＲ産物のクロマトグラフであり（レーン１のプライマーＦ１２０１＿１２２３－Ｒ１９７９＿２００１の場合１．２ｋｂｐ、レーン２のプライマーＦ１２０１＿１２２３－Ｒ１９７９＿２００１の場合８００ｂｐ、及びレーン３のプライマーＦ１４０１＿１４２６－Ｒ１６８０＿１７０５の場合３０４ｂｐ）、無傷のＭＳ２バクテリオファージゲノムの存在と一致する。
【図１０】臭化エチジウムで染色された２％アガロースゲル中でクロマトグラフ処理された、精製後のＭＳ２カプシドセクションの有無についてＭＳ２試料のＰＣＲ照合からのＰＣＲ産物のクロマトグラフであり（レーン１において３０４ｂｐ、左端のレーンは、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからの１ｋｂプラスラダーに対応する）、無傷のＭＳ２カプシド遺伝子と一致する。
【図１１】ＶＬＰの精製のためのエタノールによる単純沈殿後、及びプロテイナーゼＫ（ＰＫ）の使用後のＶＬＰ試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。
【図１２】ＶＬＰの精製のためのエタノールによる単純沈殿後のプロテアーゼ処理（プロテイナーゼＫによる前処理なし）に耐性のあるタンパク質のプロットである。
【図１３】ＶＬＰの精製のための構成的ヒドロラーゼ（ＣＨ）またはプロテイナーゼＫ（ＰＫ）の使用、エタノールによる分別沈殿、及び限外濾過後のＶＬＰ試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。
【図１４】ＶＬＰの精製のための様々なヒドロラーゼの使用、及び硫酸アンモニウムによる分別沈殿後のＶＬＰ試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。
【図１５】図１４において精製されたＶＬＰ中でカプシド内封入されたＲＮＡから得られたＲＮＡのＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。
【図１６】インビトロ転写されたＴ７－Ｒｚ３（レーン１）及びＴ７－Ｒｚ２（レーン３）の自己切断のＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。
【図１７】ｓｈＲＮＡ及びＭＳ２パッキング配列によって隣接されたＨＤＶリボザイムを使用してインビトロ転写中に得られたｓｈＲＮＡ産物のＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。レーン１は、ＲＮＡサイズマーカーである。レーン２は、ｓｈＲＮＡ対照である。レーン３及び４の試料は、インビトロ転写によって産生されたＲＮＡである。レーン３の試料を３７℃で１時間インキュベートし、電気泳動前にさらに１時間氷上に置いた。レーン４の試料を３７℃でインキュベートし、次いでゲル電気泳動前にさらに１時間４２℃でインキュベートした。
【図１８】Ｔ７－Ｒｚ１及びＴ７－Ｒｚ４　ＲＮＡから得られたインビトロＲＮＡ産物のＰＡＧＥ分析の結果を示すゲルである。
【図１９】インビトロ転写及びパッケージ化Ｔ７－Ｒｚ４　ＲＮＡを示すゲルである。レ

ーン１は、一組の分子標準である。レーン２は、化学的に合成されたｓｈＲＮＡ４９ヌクレオチド長を示し、レーン３は、ＶＬＰから回収されたＲＮＡである。
【図２０】ＶＬＰの精製及びＶＬＰからのＲＮＡの単離後に、ＶＬＰ中でカプシド内封入されたＲＮＡから得られたＲＮＡ産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を示す一連のゲルである。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
発明の詳細な説明
本節において使用される節の見出し及び本明細書における全開示は、限定するものではない。本明細書で引用される全ての特許及び刊行物は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。
【００２７】
Ａ．定義
本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈上別段の明らかな指示がない限り、複数の指示対象を含む。本明細書における数値範囲の記載については、その間にあるそれぞれの数が同程度の精度で明確に企図される。例えば、範囲６～９の場合、６及び９に加えて数字７及び８が企図され、範囲６．０～７．０の場合、数字６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、及び７．０が明示的に企図される。
【００２８】
「または」の使用は、別途明記しない限り「及び／または」を意味する。さらに、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語、ならびに「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」及び「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」等の他の形態の使用は限定的なものではない。
【００２９】
本明細書において別途定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。例えば、本明細書に記載される動物及び細胞解剖学、細胞及び組織培養、生化学、分子生物学、免疫学、及び微生物学と関連して使用される任意の命名及び技術は、当該技術分野において周知であり、一般的に使用されている。これらの用語の意味及び範囲は明確でなければならないが、潜在的に曖昧な事象では、本明細書において提供される定義が、いかなる辞書の定義または外部定義にも優先する。さらに、文脈上別途必要とされない限り、単数形の用語は複数を含み、複数形の用語は単数を含むものとする。
【００３０】
化学、生化学、分子生物学、及び免疫学における多種多様な従来技術及び道具が用いられ、本明細書に記載される方法及び組成物を実践するために使用可能であり、当業者の能力の範囲内であって文献に十分に説明されている。そのような技術及び道具には、カーゴ分子（複数可）と一緒に野生型または組換えカプシドを持つものを含むＶＬＰを生成及び精製するため、ならびに宿主生物を形質転換し、本明細書に記載される組換えタンパク質及び核酸を発現するためのものが含まれる。例えば、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ ２ｎｄ ｅｄ．１９８９（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）、及びＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（Ｅｄｓ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌ．Ａｓｓｏｃ．，Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，ＮＹ）１９９５を参照されたい。これらのそれぞれにおける開示は、参照により本明細書に組み込まれる。
【００３１】
本明細書で使用される場合、「カーゴ分子」という用語は、カプシドによって封入されるか、または封入され得るオリゴヌクレオチド、ポリペプチド、またはペプチド分子を意味する。
【００３２】

オリゴヌクレオチドは、オリゴデオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）またはオリゴリボヌクレオチド（ＲＮＡ）であり得、限定されないが、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、及びｍＲＮＡ等のＲＮＡ分子を包含する。特定のＲＮＡ分子は、ＲＮＡｉ、リボザイム、またはパッキング活性を含む機能的活性を持つ任意のＲＮＡを示すことを意味する用語「活性ＲＮＡ」とも称され得る。

【００３３】

本明細書で使用される場合、「ペプチド」という用語は、ペプチド結合によって連結された少なくとも２つのアミノ酸モノマーを最小限含む、好ましくは少なくとも約１０個、及びより好ましくは少なくとも約２０個のアミノ酸のモノマー、ならびにペプチド結合によって連結された約６０個以下のアミノ酸のモノマー、好ましくは約５０個以下のアミノ酸のモノマーを有するポリマー分子を意味する。例えば、この用語は、約１０個、約２０個、約３０個、約４０個、約５０個、または約６０個のアミノ酸残基を有するポリマーを包含する。

【００３４】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸モノマーの少なくとも１つの鎖を含むポリマー分子を意味し、その鎖は、少なくとも約７０個のアミノ酸残基、好ましくは少なくとも約８０個、より好ましくは少なくとも約９０個、及びさらにより好ましくは少なくとも約１００個のアミノ酸残基を含む。本明細書で使用される場合、この用語は、共因子または他のタンパク質にさらに結合され得るか、またはその限りではない１つ以上の連結されたポリペプチド鎖を含み得るタンパク質を包含する。本明細書で使用される場合、「タンパク質」という用語は、「ポリペプチド」という用語と同じ意味で使用される。

【００３５】

本明細書で使用される場合、分子に関して「変異体」という用語は、天然分子または野生型分子の配列と実質的に類似する配列である。ヌクレオチド配列に関して、変異体は、１つ以上の塩基に関して異なり得る配列を含むが、遺伝情報の縮退に起因して、依然として天然タンパク質の同一アミノ酸配列をコードする。変異体は、天然に存在する対立遺伝子、及び分子生物学において周知の技術、例えば、部位特異的突然変異誘発等を使用して操作され、天然タンパク質をコードするヌクレオチド配列、ならびにアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードするものを含む。一般に、本発明のヌクレオチド配列変異体は、天然の（内因性）ヌクレオチド配列と少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、または少なくとも８０％の配列同一性を有する。本開示は、少なくとも約８５％の配列同一性、少なくとも約９０％の配列同一性、少なくとも約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％の配列同一性を有するヌクレオチド配列変異体も包含する。

【００３６】

分子の規定領域内または完全長配列にわたるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列の配列同一性は、当該技術分野において既知であり、本明細書に記載されるような従来の道具及び方法を使用して容易に決定され得る。例えば、２つのアミノ酸配列または２つのヌクレオチド配列の配列同一性の程度は、複数のオンライン情報源から容易に入手可能なＮＣＢＩベーシックローカルアラインメント検索ツール（ＢＬＡＳＴ）（Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，１９９０）等のアラインメントツールを使用して容易に決定される。最適な配列アラインメントのためのアルゴリズムは、当該技術分野において周知であり、例えば、Ｓｍｉｔｈ　ａｎｄ　Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２（１９８１）、Ｐｅａｒｓｏｎ　ａｎｄ　Ｌｉｐｍａｎ　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（Ｕ．Ｓ．Ａ．）８５：２４４４（１９８８）に記載されている。配列分析のためのアルゴリズムも、ｂｌａｓｔｐ、ｂｌａｓｔｎ、ｂｌａｓｔｘ、ｔｂｌａｓｔｎ、及びｔｂｌａｓｔｘ等のプログラムにおいて容易に使用可能である。本開示の目的で、２つのヌクレオチド配列は、それらがストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズす

る場合、「実質的に同一である」と考慮されてもよい。ストリンジェントな条件は、高いハイブリダイゼーション温度及び低塩ハイブリダイゼーション緩衝液を含み、高度に類似する核酸配列間でのみハイブリダイゼーションを許す。ストリンジェントな条件は、配列依存的であり、異なる状況において異なるが、典型的に少なくとも約６０°の温度を含み、これは既定のイオン強度及びｐＨにおける特定配列の熱融点（Ｔｍ）より約１０℃～約１５℃低い。塩濃度は、典型的にｐＨ７で約０．０２モルである。

【００３７】

所与のヌクレオチド配列に関して本明細書で使用される場合、「保存的変異体」という用語は、基準配列のものと同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を意味する。遺伝情報の縮退に起因し、それによってほとんどいつも複数のコドンが各アミノ酸をコードすることができ、非常に密接に関連するタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、高レベルの配列同一性を共有しないことがある。さらに、異なる生物は、多くのアミノ酸に対して好ましいコドンを有し、異なる生物またはさらには同じ生物の異なる系統、例えば、大腸菌株は、同じアミノ酸に対して異なる好ましいコドンを有することができる。したがって、第２のヌクレオチド酸配列と本質的に同じポリペプチドをコードする第１のヌクレオチド酸配列は、それらが最小パーセンテージの配列同一性を共有しないか、またはストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズしない場合でも第２のヌクレオチド配列と実質的に同一であると考慮される。さらに、通常はメチオニンに対する唯一のコドンであるＡＴＧという限られた例外はあるが、任意の配列が標準技術によって修飾されて機能的に同一の分子を生み出し、そのような修飾は本開示によって包含されることを理解されたい。本明細書において以下に記載されるように、本開示は、天然ヌクレオチド配列と少なくとも１５％、少なくとも１６％、少なくとも２１％、少なくとも４０％、少なくとも４１％、少なくとも５２％、少なくとも５３％、少なくとも５６％、少なくとも５９％、または少なくとも８６％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、天然タンパク質のタンパク質変異体を特に企図する。

【００３８】

２つのアミノ酸配列間の配列同一性の程度は、Ｋａｒｌｉｎ及びＡｌｔｓｃｈｕｌ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：２２６４－２２６８，１９９３）のＢＬＡＳＴｐアルゴリズムを使用して決定され得る。配列同一性のパーセンテージは、比較ウィンドウ上で２つの最適に整列された配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウ内のアミノ酸配列の部分は、２つの配列の最適整列に対する基準配列（付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。このパーセンテージは、同一のアミノ酸が両方の配列中に発生する位置の数を決定して一致した位置の数を得ること、一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の合計数で割ること、及びその結果に１００を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

【００３９】

当業者は、ポリペプチドが、アミノ酸が成熟タンパク質の機能に影響することなく類似するアミノ酸残基で置換され得るという点で「実質的に類似」し得ることを認識するであろう。「実質的に類似する」ポリペプチド配列は、同一でない残基位置が保存的アミノ酸変化を有し得ることを除いて上記のような配列を共有する。保存的アミノ酸置換は、類似する側鎖を有する残基の可換性を意味する。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンであり、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリン及びトレオニンであり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギン及びグルタミンであり、芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンであり、塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リシン、アルギニン、及びヒスチジンであり、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システイン及びメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換基には、バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リシン－アルギニン、アラニン－バリン、及びアスパラギン－グルタミンが含まれる。

【００４０】
ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする核酸は、所与のタンパク質の推定アミノ酸配列を使用し、選択されたｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋらに記載されるようなプライマー伸長手順を使用する従来の手順を使用し、前駆体及びプロセシング中間体を検出することができる。
【００４１】
Ｂ．カーゴ分子を封入しているカプシドで構成されたＶＬＰ
本明細書に記載される方法及び組成物は、特定のウイルスカプシドを新規の製造及び精製方法において調製及び／または使用して、核酸の商業化手順を改善できることを部分的に理解した結果である。本明細書に記載される方法は、容易に入手可能なヒドロラーゼに耐性のある組換えウイルスカプシドを使用して、核酸、ペプチド、またはタンパク質を含むポリペプチド等の異種カーゴ分子を封入する。
【００４２】
カプシドは、野生型カプシドまたは野生型カプシドから誘導された突然変異カプシドであり得るが、但しカプシドがヒドロラーゼと接触した場合、ペプチド結合に作用する少なくとも１つのヒドロラーゼによって触媒される加水分解にカプシドが耐性を示すことを条件とする。本明細書で同じ意味で使用される場合、「加水分解に対する耐性」及び「ヒドロラーゼ耐性」という表現は、細胞溶解産物でありカプシドに封入または統合されないポリペプチドも含有する全細胞溶解物中に存在し、溶解物（細胞溶解産物であり、カプシドに封入されていない）中に存在する個々のポリペプチドの１００個毎に少なくとも６０個、少なくとも７０個、少なくとも８０個、または少なくとも９０個が切断される（すなわち、全ての個々の未封入ポリペプチドの少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、または少なくとも９０％が切断される）のに十分な時間及び条件下で、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４を使用して加水分解に供される場合、そのような加水分解前に存在するカプシド１００個毎に少なくとも６０個、少なくとも７０個、少なくとも８０個、または少なくとも９０個が、加水分解の後に無傷のままである、任意のカプシドを意味する。加水分解は、加水分解の後に細胞株から残る細胞タンパク質の平均分子量が、加水分解が行われる前の細胞タンパク質の平均分子量の約３分の２未満、約２分の１未満、約３分の１未満、約４分の１未満、または約５分の１未満であるために十分な期間及び条件下で行われ得る。方法は、加水分解の後に残る無傷のカプシドを精製することと、加水分解及び精製の前及び後のカプシドの重量及び総乾燥細胞物の重量を測定することとをさらに含み得、加水分解及び精製後の総乾燥細胞物の重量で割ったカプシドの重量は、加水分解及び精製前に測定された総乾燥細胞物の重量で割ったカプシドの重量の少なくとも２倍である。加水分解及び精製後の総乾燥細胞物の重量で割ったカプシドの重量は、そのような加水分解及び精製前に測定された総乾燥細胞物の重量で割ったカプシドの重量より少なくとも１０倍多い、好ましくは１００倍多い、より好ましくは１，０００倍多い、及び最も好ましくは１０，０００倍多いことがある。
【００４３】
ヒドロラーゼは、酵素委員会によって識別番号Ｅ．Ｃ．３に分類された加水分解反応を触媒する酵素である。例えば、エステル結合の加水分解を触媒する酵素は、Ｅ．Ｃ．３．１で始まる識別番号を有する。グリコシド結合の加水分解を触媒する酵素は、Ｅ．Ｃ．３．２で始まる識別番号を有する。ペプチド結合の加水分解を触媒する酵素は、Ｅ．Ｃ．３．４で始まる識別番号を有する。タンパク質の加水分解を触媒する酵素であるプロテアーゼは、Ｅ．Ｃ．３．４で始まる識別番号を使用して分類され、プロテイナーゼＫ及びスブチリシンを含むがこれらに限定されない。例えば、プロテイナーゼＫは、識別番号Ｅ．Ｃ．３．４．２１．６４を有する。本開示は、非限定的な例において、プロテイナーゼＫ、ストレプトミセス・グリセウスからのプロテアーゼ、バチルス・リケニホルミスからのプロテアーゼ、ペプシン、及びパパインに耐性のあるＶＬＰ、ならびにそのようなＶＬＰを使用する方法及びプロセスを包含する。

【００４４】
国際生化学・分子生物学連合（ＩＵＢＭＢ）の命名法委員会も、触媒する反応による酵素の命名及び分類を推奨している。それらの完全な推奨は自由かつ広く利用可能であり、例えば、中でもｈｔｔｐ：／／ｅｎｚｙｍｅ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ及びｗｗｗ．ｃｈｅｍ．ｑｍｕｌ．ａｃ．ｕｋ／ｉｕｂｍｂ／ｅｎｚｙｍｅ／にオンラインでアクセスできる。ＩＵＢＭＢは、どの部位に対して各酵素が活性であるかを説明するための省略形を開発した。無作為に切断する酵素は、広く特異的と称される。いくつかの酵素は、より包括的な結合要件を有するため、その説明がより複雑になり得る。非常に特異的な反応を触媒する酵素、例えば、プロトロンビンを活性トロンビンに処理する酵素の場合、その活性は切断説明の基礎である。特定の場合において、酵素の正確な活性は明らかでないことがあり、そのような場合、Ｂ鎖インスリン等の標準試験タンパク質に対する切断結果が報告される。

【００４５】
カプシドを使用する単純かつ効果的な精製プロセスの使用は、カプシドが、本明細書において上述されるように、ペプチド結合に作用する少なくとも１つのヒドロラーゼによって触媒される加水分解に耐性を呈するように、特定の野生型カプシドの選択、またはその野生型カプシドを含むタンパク質のアミノ酸配列への修飾によって可能になる。野生型ＭＳ２カプシド等のそのような野生型カプシドを精製プロセスにおいて使用することができ、プロテイナーゼＫまたはスブチリシン等の特定の安価な酵素がタンパク質分解に使用される。非限定的な例は、腸内細菌ファージＭＳ２野生型ゲノム（配列番号１）、ＭＳ２野生型カプシドタンパク質ＤＮＡ配列（配列番号２）、及びＭＳ２野生型カプシドタンパク質アミノ酸配列（配列番号３）である。

【００４６】
驚いたことに、未修飾の、エンベロープを欠く野生型ＭＳ２カプシドは、プロテイナーゼＫ及びスブチリシンを含むがこれらに限定されない様々な分類ＥＣ３．４ヒドロラーゼに耐性があり、カーゴ分子を含有し得るカプシドの高度に精製された組成物が全細胞溶解物から調製され得る。したがって、本開示は、野生型ＭＳ２カプシドタンパク質及び／または野生型ＭＳ２カプシドタンパク質と相同性を共有するカプシドタンパク質を含むウイルスカプシドを含むＶＬＰを提供し、このウイルスカプシドがカーゴ分子をカプシド内封入する。カーゴ分子は、１つ以上の異種核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を含み得る。次いで、これらのＶＬＰは、分類Ｅ．Ｃ．３．４ヒドロラーゼを使用して加水分解ステップの後に全細胞溶解物から単離及び精製され、高純度のＶＬＰ、例えば、少なくとも６０重量％、少なくとも７０重量％、少なくとも８０重量％、または少なくとも８５重量％のＶＬＰの組成物を産生することができる。少なくとも９０重量％、９１重量％、９２重量％、９３重量％、９４重量％、９５重量％、９６重量％、９７重量％、及び９８重量％のＶＬＰの純度を有する組成物が、明示的に企図される。

【００４７】
本開示は、ａ）それぞれ野生型ウイルスカプシド及びその野生型ウイルスカプシドに封入された少なくとも１種の標的異種カーゴ分子を含む複数のＶＬＰと、ｂ）組成物中に存在するカプシド１００グラム毎に４０グラム未満、３０グラム未満、２０グラム未満、１５グラム未満、１０グラム未満、及び好ましくは９、８、７、６、５、４、３グラム未満、より好ましくは２グラム未満、及びさらにより好ましくは１グラム未満の量で存在する１つ以上の細胞溶解産物とを含む組成物を包含し、細胞溶解産物は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、及びそれらの任意の組合せから選択される。次にカーゴ分子は、カプシドから容易に採取され得る。したがって、そのような組成物は、高純度及び／または高産生効率が必要とされる全ての用途に非常に望ましい。

【００４８】
本明細書に記載されるヒドロラーゼ耐性カプシドを使用し、異なる種類のカーゴ分子を封入してＶＬＰを形成することができる。カーゴ分子は、任意の１つ以上のオリゴヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチド（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＬＮＡ、ＰＮＡ、ｓｉＲＮＡ、

ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、もしくはｍＲＮＡ、または任意の種類の天然に存在しない核酸を含む任意のオリゴヌクレオチド）、任意のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質であり得るが、これらに限定されない。オリゴヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチドであるカーゴ分子は、リンカーの使用の有無に関わらずカプシドに封入され得る。カプシドは、例えば、オリゴリボヌクレオチド等のヌクレオチドカーゴの存在下でカプシドタンパク質から自己集合するように誘発され得る。非限定的な例において、本明細書に記載されるようなカプシドは、例えば、腸内細菌ファージＭＳ２からの１９ｍｅｒパッキング配列を含む、合計１，８００～２，２４８リボヌクレオチドを含有する標的異種ＲＮＡ鎖等の標的異種ＲＮＡ鎖を封入してもよく、プラスミドから転写されたそのようなＲＮＡ鎖は、Ｗｅｉ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，（２００８）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４６：１７３４－１７４０によって説明されるように、カプシドタンパク質をコードするプラスミドから分離する。

【００４９】

ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、関心対象の標的遺伝子の選択的抑制に使用され得るｓｉＲＮＡ分子等の短いＲＮＡ分子によって媒介される現象であり、バイオテクノロジー及び医学において多くの用途を有する。例えば、短いＲＮＡ分子を用いて生物において関心対象の特定遺伝子を標的とし、望ましい表現型を得ることができる。しかしながら、ｓｉＲＮＡを含む短いＲＮＡ分子は、ＲＮＡｓｅと呼ばれる偏在性酵素によって容易に分解される。本明細書に記載されるもの等のカプシドは、カプシド内封入されたＲＮＡを酵素分解から保護する。しかしながら、本明細書に記載されるようなカプシドは、リボザイムを自己切断するか（シス作用）、または場合によっては他のＲＮＡにおいて結合を切断することができるか（トランス作用）のいずれかである、１つ以上のリボザイムを含有するＲＮＡ鎖を封入し得る。１つ以上のリボザイムは、例えば、ＲＮＡ配列（複数可）を特異的に切断し、特異的に調整されたＲＮＡ分子、例えば、限定されないがｓｉＲＮＡ分子等を産生するように含まれ得る。例えば、ハンマーヘッド及び肝炎デルタウイルスリボザイムの変異体は既知であり、長いＲＮＡ配列を切断するために使用され得る。本開示は、上記のようなパッキング配列に取り付けられた１つ以上のリボザイム（すなわち、カプシドの内壁に対して強い親和性を持つＲＮＡ配列）をカプシド内封入するカプシドを含む新規のＶＬＰを説明し、それらのリボザイムは、リボザイムに取り付けられたパッキング配列から短いＲＮＡ配列を切断するために使用される。

【００５０】

したがって、本開示は、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＮＡ、及びｍｉＲＮＡ配列等の短いまたは小さいＲＮＡ配列を、それらをカプシド内封入するために使用されるパッキング配列（複数可）から単離するためのリボザイムの新規の使用も包含する。別途明示的に示されない限り、短いＲＮＡという用語は、二本鎖ステム及び一本鎖ループまたはヘアピンを有する短い一本鎖及び短いヘアピン（ステムループ）ＲＮＡ配列を包含することを理解されたい。短いＲＮＡは、３０以下のヌクレオチド、好ましくは２５以下のヌクレオチド、及びより好ましくは２２以下のヌクレオチドを有する任意のＲＮＡ一本鎖、またはステム中に３０ヌクレオチド以下の塩基対、好ましくは２５ヌクレオチド以下の塩基対、及びより好ましくは２２ヌクレオチド以下の塩基対を有するヘアピンＲＮＡである。

【００５１】

パッキング配列からそのような短いＲＮＡ配列を単離するために高度に活性であるリボザイムを使用する際の課題は、ＲＮＡのカプシド形成が達成される前に、リボザイムが速く作用しすぎて短いＲＮＡをパッキング配列から遊離し得ることである。さらに、ｓｉＲＮＡ等の短いＲＮＡの３次元構造、またはヘアピンパッキング配列は、リボザイムの適切な機能性に干渉し得る。これらの問題は、１）短いＲＮＡのカプシド内封入が達成される前の短いＲＮＡのパッキング配列からの遊離を回避するために、より低速の活性を示すリボザイム突然変異体を使用すること、及び／または２）短いＲＮＡを持つワトソン－クリック対を形成するリボザイム中のヌクレオチドの数を増加させることによって克服され得

る。さらに、短いＲＮＡ配列（複数可）が、完全リボザイムではなくむしろ同じＶＬＰに同様にカプシド内封入されたトランス作用リボザイムの標的であるより短い配列によって隣接される場合、トランス作用リボザイムを有利に使用して、短いＲＮＡとしてＶＬＰ内にカプシド内封入されたＲＮＡのパーセンテージを増加させることができる。

【００５２】

１つ以上の短いＲＮＡ配列は、野生型または遺伝子操作型のいずれかであるウイルスカプシドにカプシド内封入することもでき、これは外部ペプチドタグを挿入してタンパク質または薬物分子を特定分類の細胞に送達するように修飾されている。特定の表面タンパク質細胞受容体のリガンドとして作用する外部ペプチド配列を挿入するように遺伝子操作されることもある野生型カプシドを有利に使用して、特定の標的細胞中でＲＮＡｉを誘導することを目的とする短いＲＮＡ配列をカプシド内封入することができる。そのような組成物は、短いＲＮＡ送達のための現在の代替例よりもはるかに単純であり、より安価でより確実に製造される。

【００５３】

調製できる有用なＶＬＰの非限定的な例は、ＲＮＡ鎖を封入しているカプシドを含み、

（ｉ）少なくとも１つのパッキング配列、及び１つの一本鎖（非ハイブリダイズ）ＲＮＡスペーサーによって隣接された１～１００個の同一または異なるｓｉＲＮＡ（全ての一本鎖ＲＮＡスペーサーが４～４０ヌクレオチドを有する）、

（ｉｉ）ｓｉＲＮＡあたり１つ（１）のリボザイム及び１つの一本鎖（非ハイブリダイズ）ＲＮＡスペーサー（全ての一本鎖ＲＮＡスペーサーが４～４０ヌクレオチドを有する）、

（ｉｉｉ）ｓｉＲＮＡあたり２つ（２）のリボザイム、

（ｉｖ）１つの（１）Ｔ７開始部位、１つの（１）リボザイム、１つの（１）パッキング部位、及び１つの（１）転写終結部位、または

（ｖ）１つの（１）Ｔ７開始部位、１つの（１）パッキング部位、及び１つの（１）転写終結部位、

（ｖｉ）ｓｉＲＮＡあたり４つの（４）リボザイム、

を含む。

【００５４】

１つ以上のリボザイムを含むＶＬＰにおいて、本開示は、リボザイムがＲＮＡを切断した後に得られた産物を含有するＶＬＰをさらに企図する。

【００５５】

本開示は、ｍＲＮＡ等の長いＲＮＡ配列を包含するためのカプシドの新規の使用、及びｍＲＮＡ配列をカプシド内封入するために使用されるパッキング配列（複数可）からｍＲＮＡ配列を分離するためのリボザイムの使用も包含する。別途明示的に示されない限り、長いＲＮＡという用語は、全体にわたって配列された二本鎖ステム及び一本鎖ループまたはヘアピンを有し得る長い一本鎖ＲＮＡ配列を包含することを理解されたい。長いＲＮＡは、３０超ヌクレオチド、好ましくは４０超ヌクレオチド、及びより好ましくは５０超ヌクレオチド、ならびにより好ましくは１００超ヌクレオチド塩基対を有する任意の一本鎖ＲＮＡである。最も好ましい実施形態において、ｍＲＮＡは、それが標的とする宿主細胞内でコードするタンパク質を産生するために必要とされる必須翻訳シグナル及び保護的シグナルを含む。本明細書に記載されるようなカプシドは、カプシドパッキング配列で末端タグ付けされたｍＲＮＡを封入することができ、随意にｍＲＮＡをパッキング配列から切断するように設計されたリボザイムを含み得る。

【００５６】

本明細書に記載されるようなＶＬＰは、代替として少なくとも１つの標的ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を封入し得る。標的異種カーゴ分子がペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質である場合、オリゴヌクレオチドリンカーを使用して標的異種カーゴ分子及びウイルスカプシドを連結することができる。ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質であるカーゴ分子は、好ましくはリンカーを使用してカプシドにパッケージ

される。パッケージングプロセスは、短いＲＮＡアプタマー配列からなるリンカーによって促進され、カプシドタンパク質と標的カーゴ分子に融合されたペプチドタグとの間にリンクを形成する（Ｆｉｅｄｌｅｒ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，ＲＮＡ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｐａｃｋａｇｉｎｇ　ｏｆ　Ｅｎｚｙｍｅｓ　ｗｉｔｈｉｎ　Ｖｉｒｕｓ－ｌｉｋｅ　Ｐａｒｔｉｃｌｅｓ，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．４９：９６４８－９６５１（２０１０）を参照）。オリゴヌクレオチドリンカーは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＬＮＡ、ＰＮＡ等からなり得る。リンカーは、例えば、カプシドの内部に対して結合特異性を持つ第１の末端に例えば約２０ｎｔ長の短い配列、及び例えばカーゴペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に対して結合特異性を持つ第２の反対端に約７０ｎｔ長の別の配列を有する５０ｍｅｒ～１００ｍｅｒである。さらに、遅いリボザイムは、ＲＮＡからなるリンカーに組み込まれ得る。例えば、遅いリボザイムは、パッキング配列（カプシドタンパク質に結合する）と、アプタマー（標的タンパク質のタグに結合する）との間に組み込まれ得る。活性化時に、リボザイムは、カプシドタンパク質を標的タンパク質から分離する。あるいは、本明細書に記載されるようなカプシドは、アプタマー含有ＲＮＡ鎖及びカプシドパッキング配列含有ＲＮＡ鎖、例えば、Ｆｉｅｄｌｅｒ，Ｊら（２０１０）によって記載されるようなＮ末端タグならびにアプタマー含有ＲＮＡ鎖及びパッキング配列含有ＲＮＡ鎖に非共有結合することができるペプチドでＮ末端がタグ付けされた少なくとも１つの標的タンパク質を封入し得る。

【００５７】

カーゴ分子は、二分子カーゴ分子であり得、本明細書に記載されるカプシドは、１つ以上のリボザイムを含み得るかまたは含まない二分子カーゴ分子をカプシド内封入することもできる。二分子カーゴ分子は、二官能性ポリヌクレオチドに連結されたアプタマーを含み得る。アプタマーは、生物活性小分子、すなわち、好ましくは１，５００Ｄａより低い低分子量を有する分子への特異的結合を呈するようにＳＥＬＥＸを使用して特異的に選択された配列を有し得る。二官能性ポリヌクレオチドは、低分子量生物活性カーゴ分子に結合するための第１のアプタマー活性、及びカプシドのパッキング配列に結合するための第２のアプタマー活性の両方を有する。生物活性カーゴ分子に連結された二官能性ポリヌクレオチドは、二分子カーゴ分子を形成し、次いで、これはカプシドに連結され得る。そのようなカーゴ分子を使用して生物活性小分子に結合し、したがってＶＬＰに小分子を充填することができる。したがって、本開示は、そのような合成二分子カーゴ分子に連結されたカプシドを含むＶＬＰも包含する。ＲＮＡアプタマーに結合することによってＶＬＰに充填され得る低分子量生物活性体の例は、Ｓｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｏｐｅｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ，１：ｐ．９－１９に記載されるように、アトラジン（除草剤）、アセタミプリドホレート、プロフェノホス、イソカルボホス、及びオメトエート（殺虫剤）を含む。

【００５８】

ＲＮＡアプタマーに結合することによってＶＬＰに充填され得る低分子量生物活性体の例は、例えば、Ｒｏｂｅｒｔｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　Ｐａｔｈｗａｙｓ　ｏｆ　Ａｇｒｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ：Ｐａｒｔ　１：Ｈｅｒｂｉｃｉｄｅｓ　ａｎｄ　Ｐｌａｎｔ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ．Ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　ｂｙ　Ｒｏｙａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　ｏｆ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｇｒｅａｔ　Ｂｒｉｔａｉｎ）ＩＳＢＮ　９７８－１－８４７５５－１３８－２によって列挙される中でも、２，４－Ｄ（２，４－ジクロロフェノキシ酢酸）、デセンバー（Ｄｅｃｅｍｂｅｒ）（（３，６－ジクロロ－２－メトキシ安息香酸）、パラコート（Ｐａｒａｑｕａｔ）（Ｎ，Ｎ′－ジメチル－４，４′－ビピリジニウムジクロリド）、オリザリン（Ｏｒｙｚａｌｉｎ）（４－（ジプロピルアミノ）－３，５－ジニトロベンゼンスルホンアミド）、ＤＣＭＵ（３－（３，４－ジクロロフェニル）－１，１－ジメチルウレア）、トリフルラリン（Ｔｒｉｆｌｕｒａｌｉｎ）（２，６－ジニトロ－Ｎ，Ｎ－ジプロピル－４－（トリフルオロメチル）アニリン）、イマザピック（Ｉｍａｚａｐｉｃ）（－メチル－２－［４－メチル－５－オキソ－４－（プロパン－２－イル）－４，５－ジヒドロ－１Ｈ－イミダゾール－２－

イル］ピリジン－３－カルボン酸）、アミノピラリド（Ａｍｉｎｏｐｙｒａｌｉｄ）（４－アミノ－３，６－ジクロロピリジン－２－カルボン酸）、クロピラリド（Ｃｌｏｐｙｒａｌｉｄ）（３，６－ジクロロ－２－ピリジンカルボン酸）、メトラクロール（Ｍｅｔｏｌａｃｈｌｏｒ）（（ＲＳ）－２－クロロ－Ｎ－（２－エチル－６－メチル－フェニル）－Ｎ－（１－メトキシプロパン－２－イル）アセトアミド）、ペンジメタリン（Ｐｅｎｄｉｍｅｔｈａｌｉｎ）（３，４－ジメチル－２，６－ジニトロ－Ｎ－ペンタン－３－イル－アニリン）、ピクロラム（Ｐｉｃｌｏｒａｍ）（４－アミノ－３，５，６－トリクロロ－２－ピリジンカルボン酸）、プロパニル（Ｐｒｏｐａｎｉｌ）（Ｎ－（３，４－ジクロロフェニル）プロパンアミド）、トリクロピル（Ｔｒｉｃｌｏｐｙｒ）（［（３，５，６－トリクロロ－２－ピリジニル）オキシ］酢酸）、及びアトラジン（Ａｔｒａｚｉｎｅ）（２－クロロ－４－（エチルアミノ）－６－（イソプロピルアミノ）－ｓ－トリアジン）等の除草剤を含む。例えば、アトラジンに結合するＲＮＡアプタマーは、Ｓｉｎｈａ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｎａｔｕｒｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，６：ｐ．４６４－４７０によって記載された。

【００５９】

ＲＮＡアプタマーを使用して、例えば、Ｒｏｂｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｐａｔｈｗａｙｓ ｏｆ Ａｇｒｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ：Ｐａｒｔ ２：Ｉｎｓｅｃｔｉｃｉｄｅｓ ａｎｄ Ｆｕｎｇｉｃｉｄｅｓ．Ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ｒｏｙａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｇｒｅａｔ Ｂｒｉｔａｉｎ）ＩＳＢＮ ９７８－１－８４７５５－１３７－５によって列挙される中でも、プロパルギット（Ｐｒｏｐａｒｇｉｔｅ）（２－（４－ｔｅｒｔ－ブチルフェノキシ）シクロヘキシルｐｒｏｐ－２－ｙｎｅ－１－スルホネート）、クロルピリホス（Ｃｈｌｏｒｐｙｒｉｆｏｓ）（Ｏ，Ｏ－ジエチルＯ－３，５，６－トリクロロピリジン－２－イルホスホロチオエート）、シペルメトリン（Ｃｙｐｅｒｍｅｔｈｒｉｎ）、ホスメット（Ｐｈｏｓｍｅｔ）（２－ジメトキシホスフィノチオイルチオメチル）イソインドリン－１，３－ジオン）、ペルメトリン（Ｐｅｒｍｅｔｈｒｉｎ）（３－フェノキシベンジル（１ＲＳ）－シス、トランス－３－（２，２－ジクロロビニル）－２，２－ジメチルシクロプロパンカルボキシレート）、ジアジノン（Ｄｉａｚｉｎｏｎ）（Ｏ，Ｏ－ジエチルＯ－［４－メチル－６－（プロパン－２－イル）ピリミジン－２－イル］ホスホロチオエート）、メチルパラチオン（Ｍｅｔｈｙｌｐａｒａｔｈｉｏｎ）（Ｏ，Ｏ－ジメチルＯ－（４－ニトロフェニル）ホスホロチオエート）、及びアセタミプリド（Ｎ－［（６－クロロ－３－ピリジル）メチル］－Ｎ′－シアノ－Ｎ－メチル－アセタミジン）等の殺虫剤、及びクロロタロニル（Ｃｈｌｏｒｏｔｈａｌｏｎｉｌ）（２，４，５，６－テトラクロロイソフタロニトリル）、カプタン（Ｃａｐｔａｎ）（（３ａＲ，７ａＳ）－２－［（トリクロロメチル）スルファニル］－３ａ，４，７，７ａ－テトラヒドロ－１Ｈ－イソインドール－１，３（２Ｈ）－ジオン）、ボスカリド（Ｂｏｓｃａｌｉｄ）（２－クロロ－Ｎ－（４′－クロロビフェニル－２－イル）ニコチンアミド）、イプロジオン（Ｉｐｒｏｄｉｏｎｅ）（３－（３，５－ジクロロフェニル）－Ｎ－イソプロピル－２，４－ジオキソイミダゾリジン－１－カルボキシアミド）、アゾキシストロビン（Ａｚｏｘｙｓｔｒｏｂｉｎ）（メチル（２Ｅ）－２－（２－｛［６－（２－シアノフェノキシ）ピリミジン－４－イル］オキシ｝フェニル）－３－メトキシアクリレート）、ピラクロストロビン（Ｐｙｒａｃｌｏｓｔｒｏｂｉｎ）、（メチル２－［１－（４－クロロフェニル）ピラゾール－３－イルオキシメチル］－Ｎ－メトキシカルバニレート）、シプロジニル（Ｃｙｐｒｏｄｉｎｉｌ）（４－シクロプロピル－６－メチル－Ｎ－フェニルピリミジン－２－アミン）等の殺菌剤に結合することもできる。例えば、アプタマーは、Ｓｅｔｔ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｏｐｅｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ，１：ｐ．９－１９によって例示されるように、ＲＮＡアプタマーがＳＥＬＥＸを使用して構築されるのと同様の方法で構築されたＤＮＡアプタマーを使用し、アセタミプリド、ホレート、プロフェノホス、イソカルボホス、及びオメトエートに結合することが記載されている。

【００６０】

これらの除草剤、殺虫剤、または殺菌剤は、生物活性小分子、すなわち、好ましくは１，５００Ｄａより低い低分子量を有する分子である。それらの小さいサイズに起因して、Ｗｕ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｔｏ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｃｅｌｌｓ ｂｙ ＲＮＡ ｂａｃｔｅｒｉｏｐｈａｇｅ ｃａｐｓｉｄｓ，Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ：Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，１：ｐ．６７－７６によって例示されるように、本開示のＶＬＰを形成するカプシドを透過することができる。これらの生物活性小分子は、そのようなＶＬＰが形成された後、精製の前または後のいずれかにＳＥＬＥＸを使用して生物活性小分子に結合するように設計されたアプタマーをカプシド内封入する本開示のＶＬＰに添加される。これらの生物活性小分子の添加は、例えば、それらをＶＬＰの溶液に添加することによって、及び例えば室温で３０分～１０時間のインキュベーションによって行われる。これらの生物活性小分子は、粒子対称軸にある細孔を通り抜ける拡散によってＶＬＰに侵入し、封入されたアプタマーへのそれらの結合に起因して内部に保持される。生物活性小分子をＶＬＰに充填するために使用される適切な溶媒は、水及び水－エタノール混合等の極性のものから例えば、イソオクタン、トルエン、ジクロロメタン、またはクロロホルム等の非極性のものに及ぶ。ＶＬＰの溶解に非極性溶媒を使用することは、例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００６），Ｓｏｌｕｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｓｔａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｂａｃｔｅｒｉｏｐｈａｇｅ ＭＳ２ ｉｎ ｏｒｇａｎｉｃ ｓｏｌｖｅｎｔｓ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２００７．９７（２）：ｐ．２２４－３４によって記載されるように、エアロゾルＯＴのような界面活性剤の助けを借りて行われる。生物活性小分子を充填するための非極性溶媒の使用は、ほとんどの場合、極性溶媒中のそれらの溶解性が不良であるため好ましい。

【００６１】

ｓｉＲＮＡ及び生物活性小分子の両方をカプシド内封入するＶＬＰは、２つの生物活性成分の間に相乗効果が達成される用途において、例えば、標的植物、昆虫、または真菌が生物活性小分子に耐性がある場合において好ましい。そのような場合、ｓｉＲＮＡは、Ｓａｍｍｏｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｉｎ ｐｌａｎｔｓ，ＵＳ２０１１／０２９６５５６によって例示されるように、生物活性小分子に対する耐性を植物、昆虫、または真菌に付与する生物学的経路を標的とするように設計される。

【００６２】

あるいは、二官能性ポリヌクレオチドは、少なくとも１つのｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、またはｍＲＮＡをコードすることができ、カーゴ分子は、小さな（低分子量）タンパク質またはペプチドであり得る。したがって、二分子カーゴ分子は、低分子生物活性タンパク質またはペプチドに結合することが可能であり得る。そのような二分子カーゴ分子は、少なくとも１つのｓｉＲＮＡまたはｓｈＲＮＡまたはｓｓｈＲＮＡまたはｌｓｈＲＮＡまたはｍｉＲＮＡまたはｍＲＮＡをコードし、生物活性タンパク質またはペプチドカーゴ分子に結合するための第１のアプタマー活性、及びカプシドのパッキング配列に結合するための第２のアプタマー活性を有するポリヌクレオチドに連結された生物学的に活性であるタンパク質またはペプチドを含み得る。ポリヌクレオチドは、タンパク質またはペプチドカーゴ分子に連結され、カプシドのパッキング配列に連結することができる。

【００６３】

上述の二官能性ポリヌクレオチドは、１つ以上のリボザイム配列を任意に含み得る。上述の二官能性ポリヌクレオチドを含む二分子カーゴ分子を含むＶＬＰは、随意に１つ以上のリボザイムを含み得る。本開示はカプシド及び、少なくとも１つのリボザイムが二分子カーゴ分子と反応してカーゴ分子をアプタマーを含む構成要素に切断した後の二分子カーゴ反応産物を含むＶＬＰも包含する。

【００６４】

本明細書に記載されるようなＶＬＰは、任意の使用可能な方法（複数可）によって集合され得、この方法は、１つ以上のカーゴ分子（複数可）、及び随意に任意のリンカー、パッキング配列、１つ以上のリボザイム、またはタグをカプシド内封入する集合ヒドロラーゼ耐性カプシドを持つＶＬＰを産生する。例えば、カプシド及びカーゴ分子は、任意の発現系において共発現され得る。１つ以上のカプシドタンパク質、１つ以上のカーゴ分子（複数可）、及び随意に任意のリンカー、パッキング配列、リボザイム（複数可）、またはタグをコードする組換えＤＮＡは、そのようなベクターを特定の細胞に導入し、かつ該細胞を安定にトランスフェクトして組換え配列（複数可）を発現する細胞を生み出すために有用な任意の手順によって、１つ以上の発現ベクターを用いたトランスフェクションにより宿主細胞、例えば、細菌細胞、植物細胞、酵母細胞、真菌細胞、及び動物細胞（昆虫及び哺乳類を含む）に容易に導入され得る。

【００６５】

宿主細胞は、好ましくは真核起源、例えば、植物、哺乳類、昆虫、酵母、または真菌起源であるが、非真核宿主細胞が使用されてもよい。適切な発現系は、ＶＬＰ要素のコード配列を含有する組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、またはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌）等の微生物を含むがこれに限定されない。非限定的な例において、ＭＳ２カプシドタンパク質を使用するＶＬＰの場合、大腸菌における発現が適切な発現系である。

【００６６】

本開示は、本明細書に記載されるような核酸構築物を使用して形質転換され、カプシドタンパク質、カーゴ分子、及び随意に任意のリンカー、パッキング配列、１つ以上のリボザイム、またはタグを発現する植物細胞を明示的に企図する。植物細胞を含む細胞を形質転換し、トランスジェニック細胞を調製するための手段は、当該技術分野において周知である。ベクター、プラスミド、コスミド、ＹＡＣ（酵母人工染色体）、及びＤＮＡ断片は細胞を形質転換するために使用することができ、かつ一般に認識されるように、プロモーター、エンハンサー、及び／またはポリリンカーを含む。トランスジェニック細胞は、限定されないが、トウモロコシ、大豆、小麦、野菜、穀物、マメ科植物、果樹等、または本明細書に記載されるようなＶＬＰの導入から利益を得る任意の植物から得られた細胞を含むトランスジェニック植物細胞を含むことを特に企図する。植物、本明細書に記載されるように形質転換された細胞から得られた植物組織、及び植物または植物組織の種子または子孫も企図される。

【００６７】

集合ＶＬＰの発現は、例えば、ＶＬＰの全要素をコード化する配列を含む少なくとも１つの発現ベクターを構築することによって得ることができる。２つのベクターが使用されるときがあり、第１のベクターはカーゴ分子（複数可）及び随意に任意のリンカー、パッキング配列、１つ以上のリボザイム、またはタグをコード化する配列を含み、第２のベクターは、カプシドタンパク質をコードする配列を含む。例示的なＶＬＰを生成するための例示的なプロセスにおいて、２つのベクターは、実施例においてさらに詳述されるように、ＶＬＰの生成のために宿主細胞において共発現され得る。コード配列ならびに転写及び翻訳制御配列を含有するそのような発現ベクターを構築するための方法及び道具は、当該技術分野において周知である。一旦構築されたベクター（複数可）は、当該技術分野において周知の技術を使用して宿主細胞に移され、次いで細胞は、従来の技術の全てを使用してＶＬＰの発現及び集合が起こるのに十分な時間培養条件下で維持される。したがって、本開示は、任意のそのようなベクターを含有する宿主細胞、及びそのようなベクターによって形質転換された細胞、ならびにＶＬＰを含有する細胞を包含する。

【００６８】

ＶＬＰが宿主細胞中で発現され、集合された場合、それらはウイルス精製のための当該技術分野において既知の任意の方法を使用して単離及び精製され得る。例えば、細胞は、従来の細胞溶解技術及び薬剤を使用して溶解され得、細胞溶解物は、限定されないが、プロテイナーゼＫまたはスブチリシン等の少なくとも１つのペプチド結合ヒドロラーゼ分類

Ｅ．Ｃ．３．４を使用して加水分解に供される。加水分解の後に細胞溶解物中に残留する無傷のカプシドは、従来のタンパク質単離技術を使用して除去され、精製され得る。

【００６９】

カプシド、ＶＬＰ、またはタンパク質の精製は、当該技術分野において一般に知られている方法も含み得る。例えば、カプシド発現及び細胞溶解の後に、得られた溶解物は、１つ以上の単離または精製ステップに供され得る。そのようなステップは、例えば、酵素脂肪分解、ＤＮＡ加水分解、及びタンパク質分解ステップを含み得る。タンパク質分解ステップは、例えば、エンドプロテアーゼ及びエキソプロテアーゼの混合を使用して行われ得る。例えば、大部分の細胞成分の細胞溶解及び加水分解の後、それらのカーゴ分子を持つそのようなカプシドは、例えば、適切な非極性水不混和溶媒への抽出によって、または適切な溶媒からの結晶化によって周囲のマトリックスから分離され得る。例えば、加水分解及び／またはタンパク質分解ステップは、溶解物マトリックス中に含有されるカプシド由来の汚染物質を小さい水溶性分子に変換する。次に疎水性カプシドは、１，３－ビス（トリフルオロメチル）ベンゼン等の有機相に抽出され得る。カプシド、ＶＬＰ、またはタンパク質の精製は、例えば、少なくとも１つの液－液抽出ステップ、少なくとも１つの分別沈殿ステップ、少なくとも１つの限外濾過ステップ、または少なくとも１つの結晶化ステップを含み得る。液－液抽出は、例えば、限定されないが、ベンゼン、トルエン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、クロロホルム、ジクロロメタン、または四塩化炭素等の非混和性、非水性、非極性の溶媒の使用を含み得る。精製は、少なくとも１つの結晶化ステップを含み得る。１つ以上の加水分解ステップの使用、及び特に１つ以上のタンパク質分解ステップの使用は、カーゴ分子とそれらが産生された細胞培養から誘導された成分との間に起こる多数かつ異なる程度の結合相互作用から主に生じる、カーゴ分子に使用される現在の分離プロセスで観察される特定の問題を排除する。本明細書に記載のカプシドは、周囲マトリックスから任意のカーゴ分子を安全に分ける無傷のカプシドを加水分解後のマトリックスが含むように加水分解ステップに耐え、それによって現在の精製プロセスを妨害する厄介な結合相互作用を遮断する。

【００７０】

精製の後に、カプシドを開き、本明細書に記載されるようなタンパク質もしくはポリペプチド、ペプチド、または核酸分子であり得るカーゴ分子を得ることができる。カプシドは、例えば、５０℃超の水性溶液中で加熱すること、凍結融解を繰り返すこと、ホルムアミド等の変性剤でインキュベートすること、１つ以上のプロテアーゼでインキュベートすることによる、または任意のこれらの手順の組合せを含む、当該技術分野において既知のいくつかの可能な手順のうちのいずれか１つを使用して開くことができる。

【００７１】

ヒドロラーゼに耐性があり、本開示によるＶＬＰ及び方法において有用なカプシドタンパク質は、野生型ＭＳ２カプシドタンパク質の変異体でもあり得るか、またはそれから誘導され得る。カプシドタンパク質は、例えば、野生型ＭＳ２カプシドアミノ酸配列と比較してアミノ酸残基の少なくとも１つの置換、欠失、または挿入を含み得る。そのようなカプシドタンパク質は、天然に存在する変異体であり得るか、または従来の技術を使用してＭＳ２カプシドタンパク質を遺伝子操作することによって得ることができるが、但し変異体または修飾カプシドタンパク質が、本明細書に記載されるようなペプチド結合ヒドロラーゼ分類Ｅ．Ｃ．３．４によって触媒される加水分解に耐性のある非エンベロープカプシドを形成することを条件とする。

【００７２】

本明細書に記載されるような加水分解に耐性のあるカプシドに集合することができる遺伝子操作されたＭＳ２カプシドタンパク質は、物理化学及び生化学における従来の周知の原理に従ってアミノ酸配列に選択修飾を行うことによって操作され、本明細書及び以下の実施例に記載されるような加水分解に耐性を保持するタンパク質を産生することができる。

【００７３】

例えば、機能タンパク質の形状またはグローバルフォールドが、タンパク質のアミノ酸配列によって決定されること、及びこの折畳みがタンパク質の機能を定義することは一般知識である。グローバルフォールドは、１つ以上の折畳みドメインからなる。複数の折畳みドメインがグローバルフォールドに存在する場合、これらのドメインは、一般にドメイン界面に沿って一緒に、ゆるくまたはきつく結合する。ドメインのフォールドは、主にドメイン形状に関与する、密集し、十分に定義された二次構造要素の折畳みコアと、配座が折畳みコアとの相互作用ならびに近くのドメイン及び他の分子（溶媒及び他のタンパク質を含む）との相互作用によって影響される旋回構造及びループ構造からなるより可動性の外層とに分解され得る。タンパク質折畳みの包括的パブリックドメインデータベースである、パブリックドメインにおける溶解したタンパク質構造のＳｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（ＳＣＯＰ）データベース（Ａｌｅｘｅｙ Ｇ Ｍｕｒｚｉｎ，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ（１９９６）６，３８６－３９４）は、ｈｔｔｐ：／／ｓｃｏｐ．ｂｅｒｋｅｌｅｙ．ｅｄｕにオンラインで維持されており、新しい解析された構造がパブリックドメインデータベース（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ（Ｆ．Ｃ．Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ，Ｔ．Ｆ．Ｋｏｅｔｚｌｅ，Ｇ．Ｊ．Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｅ．Ｅ．Ｍｅｙｅｒ Ｊｒ．，Ｍ．Ｄ．Ｂｒｉｃｅ，Ｊ．Ｒ．Ｒｏｄｇｅｒｓ，Ｏ．Ｋｅｎｎａｒｄ，Ｔ．Ｓｈｉｍａｎｏｕｃｈｉ，Ｍ．Ｔａｓｕｍｉ，＂Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ：Ａ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ－ｂａｓｅｄ Ａｒｃｈｉｖａｌ Ｆｉｌｅ Ｆｏｒ Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ，＂Ｊ．ｏｆ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１１２（１９７７）：５３５）、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ）に入ると、定期的に拡張される。進化的に離れているが同じ形状及び非常に類似した機能を有している族のメンバーは、一般にわずか３０％の同一残基を位相的及び／または機能的に等価位置で保持する。いくつかの族において、離れたメンバーの配列は、互いに関してそれらの残基のわずか２０％が未変化である（例えば、ｌｅｖｉ－及びａｌｌｏｌｅｖｉｖｉｒｉｄａｅカプシドタンパク質）。さらに、タンパク質の折畳み及び／または機能を維持するために重要な残基が残る限り、タンパク質の折畳み及び機能は、コア残基の定向またはランダム変異による変化（Ｐｅｔｅｒ Ｏ．Ｏｌｉｎｓ‡，Ｓ．Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒ Ｂａｕｅｒ，Ｓａｒａｈ Ｂｒａｆｏｒｄ－Ｇｏｌｄｂｅｒｇ，Ｋｒｉｓ Ｓｔｅｒｂｅｎｚ，Ｊｏｓｅｐｈ Ｏ．Ｐｏｌａｚｚｉ，Ｍａｉｒｅ Ｈ．Ｃａｐａｒｏｎ，Ｂａｒｂａｒａ Ｋ．Ｋｌｅｉｎ，Ａｌａｎ Ｍ．Ｅａｓｔｏｎ，Ｋｕｍｎａｎ Ｐａｉｋ，Ｊｏｎ Ａ．Ｋｌｏｖｅｒ，Ｂａｒｒｅｔｔ Ｒ．Ｔｈｉｅｌｅ，ａｎｄ Ｊｏｈｎ Ｐ．ＭｃＫｅａｒｎ（１９９５）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７０，２３７５４－２３７６０、Ｙｉｑｉｎｇ Ｆｅｎｇ，Ｂａｒｂａｒａ Ｋ．Ｋｌｅｉｎ ａｎｄ Ｃｈａｒｌｅｓ Ａ．ＭｃＷｈｅｒｔｅｒ（１９９６），Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２５９，５２４－５４１、Ｄａｌｅ Ｒｅｎｎｅｌｌ，Ｓｕｚａｎｎｅ Ｅ．Ｂｏｕｖｉｅｒ，Ｌａｒｒｙ Ｗ．Ｈａｒｄｙ ａｎｄ Ａｎｔｈｏｎｙ Ｒ．Ｐｏｔｅｅｔｅｌ（１９９１）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２２２，６７－８７）、１つ以上の残基の挿入／欠失（Ｙｉｑｉｎｇ Ｆｅｎｇ，Ｂａｒｂａｒａ Ｋ．Ｋｌｅｉｎ ａｎｄ Ｃｈａｒｌｅｓ Ａ．ＭｃＷｈｅｒｔｅｒ（１９９６），Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２５９，５２４－５４１）、配列の置換（Ｍｕｌｔｉ－ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｆｕｓｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｂｅｔｗｅｅｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｒｅａｒｒａｎｇｅｄ ｃ－ｍｐｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｇｏｎｉｓｔｓ ａｎｄ ｏｔｈｅｒ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｆａｃｔｏｒｓ，ＵＳ６０６６３１８）、Ｎ末端もしくはＣ末端または両方を介した連結（それ自身の複製または他のペプチドもしくはタンパク質に対する）（Ｍｕｌｔｉ－ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｆｕｓｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｂｅｔｗｅｅｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｒｅａｒｒａｎｇｅｄ ｇ－ｃｓｆ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｇｏｎｉｓｔｓ ａｎｄ ｏｔｈｅｒ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｆａｃｔｏｒｓ，ＵＳ２００４０１７１１１５、Ｐｌｅｖｋａ，Ｐ．，Ｔａｒｓ，Ｋ．，Ｌｉｌｊａｓ，Ｌ．（２００８）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．１７：１７３）もしくは共有結合

修飾、例えば、グリコシル化、ＰＥＧ化、ＳＵＭＯ化、またはペプチジルもしくは非ペプチジル親和性タグの添加に顕著な耐性がある。

【００７４】

したがって、本開示によるＶＬＰ及び方法及びプロセスのいずれかに使用されるようなＶＬＰは、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質のアミノ酸配列（配列番号３）と少なくとも１５％、１６％、２１％、４０％、４１％、５２％、５３％、５６％、５９％、または少なくとも８６％の配列同一性を有するカプシドタンパク質を含むものを包含する。そのようなＶＬＰは、例えば、上述のように配列番号３と少なくとも５２％の配列同一性を有するカプシドタンパク質を含むＶＬＰを含む。また配列番号３に対して少なくとも５３％の配列同一性を有するカプシドタンパク質を含むＶＬＰも含まれ、これは上述のように実質的に得ることができるが、ＦＲカプシド配列を無視せず、野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドタンパク質（配列番号３）に対して５３％の配列同一性を示している。また構造が１ＡＱ３（ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｗｏｒｍ，Ｓ．Ｈ．，Ｓｔｏｎｅｈｏｕｓｅ，Ｎ．Ｊ．Ｖａｌｅｇａｒｄ，Ｋ．，Ｍｕｒｒａｙ，Ｊ．Ｂ．，Ｗａｌｔｏｎ，Ｃ．，Ｆｒｉｄｂｏｒｇ，Ｋ．，Ｓｔｏｃｋｌｅｙ，Ｐ．Ｇ．，Ｌｉｌｊａｓ，Ｌ．（１９９８）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２６：１３４５－１３５１）、１ＧＡＶ（Ｔａｒｓ，Ｋ．，Ｂｕｎｄｕｌｅ，Ｍ．，Ｆｒｉｄｂｏｒｇ，Ｋ．，Ｌｉｌｊａｓ，Ｌ．（１９９７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７１：７５９－７７３）、１ＦＲＳ（Ｌｉｌｊａｓ，Ｌ．，Ｆｒｉｄｂｏｒｇ，Ｋ．，Ｖａｌｅｇａｒｄ，Ｋ．，Ｂｕｎｄｕｌｅ，Ｍ．，Ｐｕｍｐｅｎｓ，Ｐ．（１９９４）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４４：２７９－２９０）、及び２ＶＴＵ（Ｐｌｅｖｋａ，Ｐ．，Ｔａｒｓ，Ｋ．，Ｌｉｌｊａｓ，Ｌ．（２００８）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．１７：１７３１）（上記のＰｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ識別子）として特定された場合に、３つの配列を全て一緒に考慮した際配列位置の５６％のみがバックボーンオーバーレイと比較して同一配列及び位相的に等価位置を有すると考えられる場合、配列番号３に対して少なくとも５６％の配列同一性を有するカプシドタンパク質を含むＶＬＰも含まれる。またＧＡウイルスカプシドタンパク質の配列と比較してＭＳ２ウイルスカプシドタンパク質の配列が５９％であると考えられる場合、配列番号３に対して少なくとも５９％の配列同一性を有するカプシドタンパク質を含むＶＬＰも含まれる。またＦＲカプシドタンパク質の配列と比較してＭＳ２ウイルスカプシドタンパク質の配列が８６％であると考えられる場合、配列番号３に対して少なくとも８６％の配列同一性を有するカプシドタンパク質を含むＶＬＰも含まれる。したがって、本開示によるＶＬＰは、アラインメントに係留された有効な構造に基づいて野生型腸内細菌ファージＭＳ２カプシドのアミノ酸配列（配列番号３）と少なくとも１５％、１６％、または２１％の配列同一性を有するカプシドタンパク質を含むものを包含し、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ３．４によって触媒される加水分解に耐性がある。

【００７５】

したがって、ＶＬＰは本明細書に記載されるようなＭＳ２カプシドタンパク質変異体のいずれかを含む。本明細書に記載されるものと一致する遺伝子操作されたカプシドタンパク質は、例えば、野生型ＭＳ２カプシドタンパク質のアミノ酸配列と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する少なくとも１つのカプシドタンパク質をコードする少なくとも１つのＤＮＡプラスミドを構築すること、各プラスミドの複数の複製を作ること、プラスミドで細胞株を形質転換すること、核酸をカプシド内封入するカプシドを形質転換細胞が発現及び集合させるのに十分な時間及び条件下で細胞を維持すること、細胞を溶解して細胞溶解物を形成すること、少なくとも１つのペプチド結合ヒドロラーゼ、分類ＥＣ３．４を使用して細胞溶解物を加水分解に供すること、及び野生型カプシドタンパク質と比べて少なくとも１種類のヒドロラーゼに対する増加した耐性を有するカプシドを得るために加水分解後に細胞溶解物に残留する無傷のカプシドを取り出すことによって産生され得る。得られた無傷のカプシドの精製の後に、各カプシドタンパク質に対するアミノ酸配列は、当該技術分野において周知の方法に従って決定され得る。

【００７６】

両方の設定で使用される精製プロセスは同じマトリックス組成を有するため、本明細書に記載される特殊なカプシドは、改善された収率を提供するために研究開発及び産業製造施設において使用され得る。そのような同じ組成を有することは、主に研究開発及び製造プロセスの両方において同じ細胞株を使用することに依存する。しかしながら、研究開発及び製造段階の両方において使用されるタンパク質分解ステップの後、異なる細胞株を使用することに起因するマトリックス組成の差は大きく減少する。この特徴は、最小限の製造収率ペナルティとともに、両方の段階での異なる細胞株の使用を可能にする。

【実施例】

【００７７】

以下の非限定的な実施例は、本開示の様々な態様を例示するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において十分に機能するために本出願人によって発見された技術を表し、したがって、その実施のための好ましい様式を構成するために考慮され得ることは当業者に理解されるであろう。しかしながら、本開示を考慮すると、当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、記載された特定の実施例において多くの変更を行うことができる一方、依然として同様もしくは類似する結果を得ることを理解すべきである。したがって、実施例は単なる例示であり、いかなる方法においても本発明を限定するものと解釈されるべきではない。本発明を可能にし、説明するために必要な程度で、引用される全ての文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【００７８】

実施例Ａ

ＭＳ２バクテリオファージの増殖

ＭＳ２バクテリオファージ（ＡＴＣＣ番号１５５９７－Ｂ１、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤから）及びその大腸菌宿主（ＡＴＣＣ番号１５６６９）は、ＡＴＣＣから得られ、Ｓｔｒａｕｓｓ ａｎｄ Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ ７：４３－５４ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ ７：４３－５４によって記載される方法を使用して増殖させた。結果を図１に表す。６００ｎｍでの光学濃度（ＯＤ）及びｐＨは、反応の間追跡した。ＯＤｉは、宿主への接種後すぐのＯＤを表している。感染は、２．３時間で行われた。Ｌｎ（ＯＤ／ＯＤｉ）は、左軸（黒菱形）で表し、ｐＨは右軸（白四角）で表した。この実験は、宿主への接種後５．３時間で終了した。得られた溶解物を２，０００ｇで遠心分離し、０．２μｍの膜を通して濾過し、残りの細菌及び細菌の破片を除去した。

【００７９】

実施例Ｂ

プロテイナーゼＫを使用したＭＳ２バクテリオファージの精製、及び限外濾過

ＭＳ２バクテリオファージの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図２に示す。実施例Ａの終わりに得られた８ミリリットルの溶解物（図２、レーン１の試料）を３００ｋＤａの膜（Ｖｉｖａｓｐｉｎ ２、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ Ｓｔｅｄｉｍ，Ｂｏｈｅｍｉａ，ＮＹから）を通して濾過し、濾液を１００ｋＤａの膜を通して濾過し、そこから１ｍＬの濃縮水を得た（図２、レーン２の試料）。この濃縮水を二等分に分割した。半分（対照）に、２０６μＬ、２０ｍＭのＣａＣｌ$_2$水溶液（ｐＨ＝７．５）を添加した。残りの半分（プロテイナーゼ）に、２０６μＬ、２０ｍＭのＣａＣｌ$_2$水溶液（ｐＨ＝７．５）に溶解した０．１５ｍｇのプロテイナーゼＫ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を添加した。両方の管を３７℃でインキュベートし、１時間後にそれらを氷水浴に入れた。次いで、試料を採取し、分析した。図２、レーン３の対照試料及び図２、レーン５のプロテイナーゼ試料。次いで、各産物を脱イオン（ＤＩ）水で２ｍＬに希釈し、１００ｋＤａの膜を通して濾過した。各濃縮水（１５０μＬ）をＤＩ水で２ｍＬに希釈し、同じ膜を通して再び濾過した。各産物に対して希釈及び限外濾過をもう一度繰り返した。次いで、各濃縮水の試料を採取し、分析した。図２、レーン４の対照試料及び図２、レーン６のプロテイナーゼ試料。１４ｋＤａでのバンドは、ＭＳ２バクテリオファージのカプシドタンパク

質に対応する。３０ｋＤａでのバンドは、プロテイナーゼＫに対応する。対照実験からの産物は、非常に不純なファージを生み出す。プロテイナーゼ実験からの産物は、９９％より高い純度のファージを含有する産物を生み出す。

【００８０】

実施例Ｃ

ＭＳ２バクテリオファージの分解

ＭＳ２バクテリオファージの処理は次の通り行った。処理中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図３に示す。実施例Ａの終わりに得られた４ミリリットルの溶解物は、硫酸アンモニウムを使用した沈殿及びＳｔｒａｕｓｓ　＆　Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ　７：４３－５４によって記載されるようなトリクロロフルオロメタン（フレオン１１）を使用した抽出によって部分的に精製された。フレオン１１を用いた抽出後の水溶液の試料を採取し、分析した（図３、レーン１の試料）。部分的に精製されたファージ溶液（１３０μＬ）に、３７０μＬの２０ｍＭ　$CaCl_2$水溶液を添加した。混合物を３７℃でインキュベートし、１時間後にそれを氷水浴に入れた。次いで、試料を採取し、分析した。図３、レーン２の試料。インキュベーション産物を脱イオン（ＤＩ）水で２ｍＬに希釈し、１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（１５０μＬ）をＤＩ水で２ｍＬに希釈し、同じ膜を通して再び濾過した。濃縮水の希釈及び限外濾過をもう一度繰り返した。次いで、濃縮水の試料を採取し、分析した。図３、レーン３の試料。１０ｋＤａより低い弱いバンドのみが観察され、ファージの完全分解を示している。

【００８１】

実施例Ｄ

限外濾過を使用したＭＳ２バクテリオファージの精製

ＭＳ２バクテリオファージの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図３に示す。実施例Ａの終わりに得られた４ミリリットルの溶解物は、硫酸アンモニウムを使用した沈殿及びＳｔｒａｕｓｓ　＆　Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ　７：４３－５４によって記載されるようなトリクロロフルオロメタン（フレオン１１）を使用した抽出によって部分的に精製された。部分的に精製されたファージを含有する水溶液を、脱イオン水で２ｍＬに希釈し、３００ｋＤａの膜を通して濾過し、濾液を１００ｋＤａの膜を通して濾過し、そこから１５０μＬの濃縮水を得た。次いで、濃縮水を脱イオン（ＤＩ）水で２ｍＬに希釈し、同じ１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（１５０μＬ）の希釈及び限外濾過をもう一度繰り返した。次いで、濃縮水の試料を採取し、分析した。図３、レーン４の試料。３７０μＬの２０ｍＭ　$CaCl_2$水溶液を濃縮水（１３０μＬ）に添加した。混合物を３７℃でインキュベートし、１時間後にそれを氷水浴に入れた。次いで、試料を採取し、分析した。図３、レーン５の試料。次いで、産物を脱イオン（ＤＩ）水で２ｍＬに希釈し、１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（１５０μＬ）をＤＩ水で２ｍＬに希釈し、同じ膜を通して再び濾過した。濃縮水の希釈及び限外濾過をもう一度繰り返した。次いで、濃縮水の試料を採取し、分析した。図３、レーン６の試料。１００ｋＤａ未満の分子量を持つタンパク質が透過する膜によって維持された１４ｋＤａのＭＳ２のカプシドタンパク質は明確に視認でき、無傷のＭＳ２カプシドの存在を示している。得られた産物は、９９％より高い純度のファージを含有した。

【００８２】

実施例Ｅ

プロテイナーゼＫを使用したＭＳ２バクテリオファージの精製、及び限外濾過

ＭＳ２バクテリオファージの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図４に示す。実施例Ａの終わりに得られた４ミリリットルの溶解物は、硫酸アンモニウムを使用した沈殿及びＳｔｒａｕｓｓ　＆　Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ　７：４３－５４によって記載されるようなトリクロロフルオロメタン（フレオン１１）を使用した抽出によっ

て部分的に精製された。部分的に精製されたファージを含有する水溶液を、脱イオン水で２ｍＬに希釈し、１００ｋＤａの膜を通して濾過し、そこから１５０μＬの濃縮水を得た。次いで、濃縮水を脱イオン（ＤＩ）水で２ｍＬに希釈し、同じ１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（１５０μＬ）の希釈及び限外濾過をもう一度繰り返した。次いで、濃縮水の試料を採取し、分析した。図４、レーン１の試料。３７０μＬの２０ｍＭ $CaCl_2$ 水溶液に溶解された０．１５ｍｇのプロテイナーゼＫを、濃縮水（１３０μＬ）に添加した。混合物を３７℃でインキュベートし、１時間後にそれを氷水浴に入れた。次いで、試料を採取し、分析した。図４、レーン２の試料。次いで、産物を脱イオン（ＤＩ）水で２ｍＬに希釈し、１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（１５０μＬ）をＤＩ水で２ｍＬに希釈し、同じ膜を通して再び濾過した。濃縮水の希釈及び限外濾過をもう一度繰り返した。次いで、濃縮水の試料を採取し、分析した。図４、レーン３の試料。得られた産物は、９９％より高い純度を持つファージを含有した。

【００８３】

実施例Ｆ

プロテイナーゼＫを使用したＭＳ２バクテリオファージの精製、酸性条件下での沈殿物、塩基性及び酸性条件でエタノールを使用した沈殿、及び限外濾過

ＭＳ２バクテリオファージの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図５に示す。実施例Ａの終わりに得られた５０ミリリットルの溶解物は、硫酸アンモニウムを使用した沈殿及びＳｔｒａｕｓｓ　＆　Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ　７：４３－５４によって記載されるようなトリクロロフルオロメタン（フレオン１１）を使用した抽出によって部分的に精製された。フレオン１１での抽出後、水溶液の試料を採取し、分析した（図５、レーン１の試料）。１．２４ｍＬの２０ｍＭ　ＣａＣｌ２水溶液に溶解された０．９ｍｇのプロテイナーゼＫを部分的に精製されたファージ溶液（１．２ｍＬ）に添加した。混合物を３７℃でインキュベートし、１時間後に６０μＬのエタノール中の０．２Ｍフッ化フェニルメタンスルホニル（ＰＭＳＦ）溶液を添加し、プロテイナーゼＫを不活性化した。次いで、混合物を氷水浴に入れた。試料を採取し、分析した。図５．０、レーン２の試料。６８０μＬの０．１％リン酸水溶液を、氷／水浴中で激しく撹拌しながらゆっくり添加し、液体のｐＨを４にした。液体を０℃で３０分間保ち、４℃で３０分間，１６，０００ｇで遠心分離した。上清を室温に到達させ、１３０μＬの１％　ＮａＯＨを添加し、液体のｐＨを８にした。０．８１ｍＬのエタノールを室温で激しく撹拌しながらゆっくり添加し、液体中のエタノール濃度を２０％にした。液体を室温で３０分間保ち、室温で３０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。上清を氷／水浴に１５分間入れ、１．３ｍＬの１％酢酸を０℃で激しく撹拌しながらゆっくり添加し、液体のｐＨを４にした。１．５ｍＬのエタノールを０℃で激しく撹拌しながらゆっくり添加し、液体中のエタノール濃度を３４％にした。液体を０℃で３０分間保ち、４℃で３０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。ペレットを２００μＬのＤＩ水に再懸濁し、２０μＬの試料を採取して分析した。図５、レーン３。残り（１８０μＬ）をＤＩ水で２ｍＬに希釈し、１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（１５０μＬ）をＤＩ水で２ｍＬに希釈し、同じ膜を通して再び濾過した。濃縮水の希釈及び限外濾過をもう一度繰り返した。次いで、濃縮水の試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図５、レーン４の試料。１００ｋＤａ未満の分子量を持つタンパク質が透過することができる膜によって維持された１４ｋＤａのＭＳ２カプシドタンパク質は、明確に視認でき、無傷のＭＳ２カプシドの存在と一致する。同じ濃縮水上のＵＶスペクトルを図６に示し、これはＭＳ２ファージについてＧ．Ｆ．Ｒｏｈｒｍａｎｎ　ａｎｄ　Ｒ．Ｇ．Ｋｒｕｅｇｅｒ，（１９７０）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ，６（３）：２６によって公開された結果と一致する。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）サイズ排除クロマトグラフィーを、ｐＨ７．４のトリス緩衝食塩水及び１５０ｍＭのＮａＣｌを使用し、同じ濃縮水で行った。カラムの空隙容量においてのみ２８０ｎｍの吸光度を示した。６００ｋＤａ～２ｋＤａのタンパク質に対する溶出量において吸光度はなかった。この試験は、無傷のファージ粒子と

一致する。ＲＮＡをＱＩＡａｍｐ　Ｖｉｒａｌ　ＲＮＡミニキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）及びＤＮＡ－ｆｒｅｅキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）を使用して同じ濃縮水の別の試料から単離し、大容量ｃＤＮＡ逆転写キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して逆転写した。次いで、ＭＳ２ゲノムの３つの異なる部分の有無をＰＣＲ実験で識別した。次の一対のプライマーを使用し、各プライマーはＭＳ２ゲノムの最初と最後の塩基の位置を、それぞれ順方向（Ｆ）及び逆方向（Ｒ）と指定した。Ｆ１００１＿１０２１－Ｒ２１８０＿２２０１、Ｆ１２０１＿１２２３－Ｒ１９７９＿２００１、Ｆ１４０１＿１４２６－Ｒ１６８０＿１７０５。Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　Ｈｉｇｈ　Ｆｉｄｅｌｉｔｙ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を増殖に使用した。臭化エチジウムで染色された１．５％のアガロースゲル中で分析された、図９に示されるようなＰＣＲ産物（レーン１のプライマーＦ１２０１＿１２２３－Ｒ１９７９＿２００１に対して１．２ｋｂｐ、レーン２のプライマーＦ１２０１＿１２２３－Ｒ１９７９＿２００１に対して８００ｂｐ、レーン３のプライマーＦ１４０１＿１４２６－Ｒ１６８０＿１７０５に対して３０４ｂｐ）は、無傷のＭＳ２バクテリオファージゲノムと一致した。また感染性試験を以下の通り同じ濃縮水で行った。５マイクロリットルの濃縮水を使用して、それがＯＤ（６００ｎｍ）＝０．２２に到達した時点で、実施例Ａに記載されるような１ｍＬの細菌培養物を感染させた。図７に示されるように、ＯＤ（６００ｎｍ）は、感染後１時間は０．８２であり、さらに２時間後は０．２１に低下したが、同じ時間中、対照試料は、感染後１時間はＯＤ（６００ｎｍ）が０．８２であり、さらに２時間後は１．２であった。この試験は、濃縮水中の高い感染性のファージを示し、したがってそれを単離するために使用された精製プロセスは、その完全性を損なわなかったことを証明した。結論として、得られた産物は、９９％より高い純度を持つＭＳ２バクテリオファージを含有した。

【００８４】

実施例Ｇ

異なる外因性プロテイナーゼを使用したＭＳ２バクテリオファージの精製、及び限外濾過

異なる外因性プロテイナーゼを使用したＭＳ２バクテリオファージの精製は、プロテイナーゼＫ以外のプロテアーゼを使用したことを除いて、実質的に実施例Ｅに記載の通り試行した。バチルス・リケニホルミスからのプロテアーゼ（Ｐ５３８０，Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）によって促進されたタンパク質分解後に、ＭＳ２バクテリオファージを正常に精製した。しかしながら、ブタ胃粘膜からのペプシン（Ｐ６８８７，Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）をｐＨ６で使用したタンパク質分解反応は、ＭＳ２バクテリオファージを著しく分解することが見出された。一方、パパイヤラテックスからのパパイン（Ｐ３１２５，Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）をｐＨ６で使用したタンパク質分解反応は、ＭＳ２バクテリオファージを広範囲にわたって分解しなかった。

【００８５】

実施例Ｈ

特異的１９ｍｅｒ　ＲＮＡヘアピンに取り付けられたそのカプシドタンパク質コードＲＮＡをカプシド内封入するＭＳ２カプシドの産生

ＭＳ２カプシドの産生は次の通り行った。発現の経過中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行い、カプシド産生を監視した。得られた結果を図８に示す。ＭＳ２のカプシドタンパク質及びその特異的ＲＮＡ１９ｍｅｒパッキング配列をコードするＤＮＡ配列（配列番号４）は、ＳｆｉＩ制限断片としてエントリープラスミドにクローン化され、次にＧａｔｅｗａｙ組換えによってｐＤＥＳＴ１４（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にサブクローン化された。

【００８６】

Ｏｎｅ　Ｓｈｏｔ　ＢＬ２１／ＤＥ３化学的コンピテント大腸菌（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）細胞を、そのようなプラスミドを使用して形質転換した。プラスミドを含有するＢＬ２１／ＤＥ３は、アンピシリンを含有する７５０ｍＬのＬＢ培地中、３７℃でＯＤ（６００ｎｍ）＝０．８まで増殖させた。次いで、誘導前試料を採取し、分析し

た。図８、レーン１の試料。次いで、イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）（ＩＰＴＧ）を、最終濃度１ｍＭまで添加した。誘導の４時間後に、３，０００ｇ及び４℃で４０分間の遠心分離によって細胞を採取した。次いで、試料を採取し、分析した。図８、レーン２の試料。

【００８７】

実施例Ｉ

特異的１９ｍｅｒ　ＲＮＡヘアピンに取り付けられたそのカプシドタンパク質コードＲＮＡをカプシド内封入するＭＳ２カプシドの精製及び特性評価

ＭＳ２カプシドの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図８に示す。１１５ｍＬの培養物と同等の実施例Ｈからのペレットの画分を、１０ｍＭのＭｇＣｌ$_2$を含有する２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５に再懸濁し、音波処理して細胞を溶解した。細胞残屑を、１６，０００ｇでの遠心分離によって除去した。得られた細胞溶解物は、硫酸アンモニウムを使用した沈殿及びＳｔｒａｕｓｓ　＆　Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ　７：４３－５４によって記載されるようなトリクロロフルオロメタン（フレオン１１）を使用した抽出によって部分的に精製された。部分的に精製されたＭＳ２カプシド溶液（１．０５ｍＬ）に、１．０５ｍＬの２０ｍＭ　ＣａＣｌ２水溶液に溶解された０．３ｍｇのプロテイナーゼＫを添加した。混合物を３７℃でインキュベートし、２．５時間後にそれを氷水浴に入れた。次いで、試料を採取し、分析した。図８、レーン３の試料。１５分後、０．１４ｍＬの１％リン酸水溶液を氷／水浴中で激しく撹拌しながらゆっくり添加し、液体のｐＨを４．１にした。液体を０℃で３０分間保ち、４℃で２０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。０℃で保持された上清に、１００μＬの１％　ＮａＯＨを添加し、液体のｐＨを７．９にした。次いで、５００マイクロリットルのエタノールを０℃で激しく撹拌しながらゆっくり添加し、液体中のエタノール濃度を２０％にした。液体を０℃で３０分間保ち、４℃で２０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。１％の酢酸を添加して溶液のｐＨを７に調整した後、上清をＶｉｖａｓｐｉｎ　２（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）３００ｋＤａの膜を通して濾過し、濾液を１００ｋＤａの膜を通して濾過し、そこから１５０μＬの濃縮水を得た。次いで、濃縮水をリン酸緩衝生理食塩水で２ｍＬに希釈し、同じ１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（１５０μＬ）の希釈及び限外濾過をさらに４回繰り返した。次いで、濃縮水の試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。レーン４の試料（図８）。１００ｋＤａ未満の分子量を持つタンパク質が透過することができる膜によって維持された１４ｋＤａのＭＳ２のカプシドタンパク質は、明確に視認でき、無傷のＭＳ２カプシドの存在と一致する。ＲＮＡをＱＩＡａｍｐ　Ｖｉｒａｌ　ＲＮＡミニキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）及びＤＮＡ－ｆｒｅｅキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）を使用して同じ濃縮水の別の試料から単離し、大容量ｃＤＮＡ逆転写キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して逆転写した。次いで、ＭＳ２カプシドセクションの有無をＰＣＲ実験で識別した。順方向（Ｆ）及び逆方向（Ｒ）のそれぞれに、次の一対のプライマー（各プライマーの名前はＭＳ２ゲノムにおけるその最初及び最後の塩基の位置に由来）を使用した：Ｆ１４０１＿１４２６－Ｒ１６８０＿１７０５。Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　Ｈｉｇｈ　Ｆｉｄｅｌｉｔｙ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を増殖に用いた。図１０に示されるように（レーン１では３０４ｂｐ、最左のレーンはＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからの１ｋｂ＋ラダーに相当する）、臭化エチジウムで染色された２％のアガロースゲルにおいて分析されたＰＣＲ産物は、無傷のＭＳ２カプシド遺伝子と一致した。結論として、得られた産物は、９９％より高い純度を持つＭＳ２カプシドを含有した。

【００８８】

実施例Ｊ

ＶＬＰの精製のためのエタノールを用いた単純沈殿

ＶＬＰの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡ

ＧＥ分析を行った。得られた結果を図１１に示す。実施例Ｈと同一の実験から得られたペレットの６分の１を、１０ｍＭのＭｇＣｌ$_2$を含有する２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５に再懸濁し、音波処理して細胞を溶解した。細胞残屑を、１６，０００ｇでの遠心分離によって除去した。得られた細胞溶解物は、硫酸アンモニウムを用いた沈殿及びＳｔｒａｕｓｓ　＆　Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ　７：４３－５４によって記載されるようなトリクロロフルオロメタン（フレロン１１）を用いた抽出によって部分的に精製された。試料を採取し、分析した。図１１、レーン１の試料。ＭＳ２ファージのカプシドタンパク質と一致する約１４ｋＤａの強いバンドが見出された。他のバンド、より高い分子量の不純物は、試料重量の約２７％を示す。部分的に精製されたＶＬＰ溶液（１．３５ｍＬ）に、１．３６ｍＬの２０ｍＭ　ＣａＣｌ$_2$水溶液を添加し、氷水浴に入れた。１５分後、５０μＬの１０％の酢酸水溶液を添加し、液体のｐＨを４．１にした。次いで、同じ温度及び激しい撹拌で、１．４４ｍＬのエタノールをゆっくり添加した。液体を０℃で３０分間保ち、４℃で２０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。ペレットを、２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ及び１０ｍＭのＭｇＣｌ$_2$からなるｐＨ７．５に調整した２ｍＬの水性緩衝液に懸濁させた。試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１１、レーン２の試料。この試料中の不純物は、試料重量の約２４％を表した。希釈した試料を、Ｖｉｖａｓｐｉｎ２（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）１００ｋＤａの膜を通して濾過し、そこから２００μＬの濃縮水を得た。次いで、濃縮水を同じ緩衝液で２ｍＬに希釈し、同じ１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（２００μＬ）の希釈及び限外濾過をさらに４回繰り返した。次いで、濃縮水の試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１１、レーン３の試料。この試料中の不純物は、試料重量の約９．７％を表した。結論として、得られた産物は、９０％より高い純度を持つＶＬＰを含有した。

【００８９】

実施例Ｋ

ＭＳ２　ＶＬＰの精製のためのプロテイナーゼＫ（ＰＫ）の使用及びエタノールによる単純沈殿

ＶＬＰの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図１１に示す。実施例Ｈと同一の実験から得られたペレットの６分の１を、１０ｍＭのＭｇＣｌ$_2$を含有する２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５に再懸濁し、音波処理して細胞を溶解した。細胞残屑を、１６，０００ｇでの遠心分離によって除去した。得られた細胞溶解物は、硫酸アンモニウムを使用した沈殿及びＳｔｒａｕｓｓ　＆　Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ７：４３－５４によって記載されるようなトリクロロフルオロメタン（フレロン１１）を使用した抽出によって部分的に精製された。試料を採取し、分析した。図１１、レーン１の試料。ＭＳ２ファージのカプシドタンパク質と一致する、約１４ｋＤａの強いバンドが見出された。他のバンド、より高い分子量の不純物は、試料重量の約２６％を示す。部分的に精製されたＶＬＰ溶液（１．３５ｍＬ）に、１．３６ｍＬの２０ｍＭ　ＣａＣｌ$_2$の水溶液に溶解された０．６ｍｇのプロテイナーゼＫを添加した。混合物を３７℃でインキュベートし、２．５時間後に氷水浴に入れた。試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１２、レーン２の試料。この試料の不純物は試料重量の約１４％を表した。１５分後、約５０μＬの１０％酢酸水溶液を氷／水浴中で添加し、液体のｐＨを４．１にした。次いで、同じ温度で激しく撹拌しながら、１．５４ｍＬのエタノールをゆっくり添加した。液体を０℃で３０分間保ち、４℃で２０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。ペレットを、２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ及び１０ｍＭのＭｇＣｌ$_2$からなるｐＨ７．５に調整した２ｍＬの水性緩衝液に懸濁させた。試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１２、レーン３の試料。この試料中の不純物は、試料重量の約１０％を表した。希釈した試料を、Ｖｉｖａｓｐｉｎ２（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）１００ｋＤａの膜を通して濾過し、そこから２００μＬの濃縮水を得た。次いで、濃縮水を同じ緩衝液で２ｍＬに希釈し、同じ１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（２００μＬ）の希釈及び限外濾過をさらに４回繰り返した。次いで、濃縮水の試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した

。図１２、レーン４の試料。この試料中の不純物は、試料重量の約５．１％を表した。結論として、得られた産物は、約９５％の純度を持つＶＬＰを含有した。

【００９０】

実施例Ｌ

選択的プロテアーゼを使用してＭＳ２　ＶＬＰを分解する

実施例Ｋにおいて得られた精製ＶＬＰのアリコートを（１．９ｍｇのカプシドタンパク質を含有する１．１７ｍＬの懸濁液になる）、１０ｍＭ酢酸ナトリウム及び５ｍＭ酢酸カルシウムの１．８３ｍＬの水溶液で希釈した。この溶液のｐＨを、０．１％水酸化ナトリウムを使用して７．５に調整した。ストレプトミセス・グリセウス（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）からの０．６ｍｇのプロテアーゼを添加し、次いで、０．７ｍＬの試料を採取した。残りの混合物を３７℃で２時間インキュベートし、第２の０．７ｍＬ試料を採取した。６時間のインキュベーション及び２３時間のインキュベーションの後、さらに２つの試料を採取した。４つの０．７ｍＬ試料のそれぞれを、１００ｋＤａ限外濾過膜（Ｖｉｖａｓｐｉｎ　２，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｓｔｅｄｉｍ，Ｂｏｈｅｍｉａ，ＮＹから）を通して濾過し、２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ及び１０ｍＭの$MgCl_2$からなるｐＨ７．５に調整した水性緩衝液で洗浄した。限外濾過後に得られた４つの濃縮水のそれぞれにおいて回収された総タンパク質（Ｐｉｅｒｃｅ（登録商標）ＢＣＡタンパク質アッセイキット，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬを使用して測定された濃度）は、限外濾過前に存在するタンパク質に関連していた。第１の試料（インキュベーションを開始する前）に対して１０５％の回収が計算された。２時間のインキュベーション後、３７％の回収が計算された。６時間のインキュベーション後、３０％の回収が計算された。２３時間のインキュベーション後、２８％の回収が計算された。タンパク質濃度対時間を図１２にプロットする。

【００９１】

これらの結果は、事前の異種プロテアーゼ処理なしに細胞溶解物の直接沈殿によって回収されたタンパク質が、未集合のカプシドタンパク質または部分的に集合したカプシドを含むことを示し、これは完全に集合したカプシドとは異なり、異種プロテアーゼに対する感受性を残す。したがって、異種プロテアーゼによる細胞溶解物の前処理は、完全に集合したカプシドに組み込まれるものを除いて、全ての形態のカプシドタンパク質を除去することができる。

【００９２】

実施例Ｍ

ＭＳ２　ＶＬＰの精製のための構成的ヒドロラーゼ（ＣＨ）の使用、エタノールによる分別沈殿、及び限外濾過

ＶＬＰの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図１３に示す。実施例Ｈと同一の実験から得られたペレットの６分の１を、１０ｍＭの$MgCl_2$を含有する２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５に再懸濁し、音波処理して細胞を溶解した。細胞残屑を、１６，０００ｇでの遠心分離によって除去した。得られた細胞溶解物は、Ｓｔｒａｕｓｓ　＆　Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ７：４３－５４に記載されるように、硫酸アンモニウムを使用した沈殿及びトリクロロフルオロメタン（Ｆｒｅｏｎ　１１）を使用した抽出によって部分的に精製された。部分的に精製されたＭＳ２ＶＬＰ溶液（１．３５ｍＬ）に、１．３６ｍＬの２０ｍＭ　$CaCl_2$水溶液を添加した。混合物を（構成的ヒドロラーゼが作用することを可能にするため）３７℃で２．５時間インキュベートし、その後、氷水浴に入れた。試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１３、レーン１の試料。この試料中の不純物は、試料重量の約１２％を表した。１５分後、約１２０μＬの１％水酸化ナトリウム水溶液を氷／水浴中で添加し、液体のｐＨを７．８６にした。次に、同じ温度で激しく撹拌しながら、０．８１ｍＬのエタノールをゆっくり添加した。液体を０℃で３０分間保持し、４℃で２０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。約１００の１０％酢酸水溶液を、氷／水浴中で激しく撹拌しながら上清にゆっくり添加し、液体の

ｐＨを４．０にした。次に、同じ温度で激しく撹拌しながら、１．３ｍＬのエタノールをゆっくり添加した。液体を０℃で３０分間保持し、４℃で２０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。ペレットを、２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ及び１０ｍＭの$MgCl_2$からなるｐＨ７．５に調整された２ｍＬの水性緩衝液に懸濁した。希釈された試料をＶｉｖａｓｐｉｎ　２（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）１００ｋＤａ膜を通して濾過し、２００μＬの濃縮水を得た。次に濃縮水を同じ緩衝液で２ｍＬに希釈し、同じ１００ｋＤａ膜を通して濾過した。濃縮水（２００μＬ）の希釈及び限外濾過をさらに４回繰り返した。濃縮水の試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１３、レーン３の試料。この試料中の不純物は、試料重量の約４．７％を表した。結論として、得られた産物は、約９５％より高い純度を持つＭＳ２　ＶＬＰを含有した。

【００９３】

実施例Ｎ

ＭＳ２　ＶＬＰの精製のためのプロテイナーゼＫ（ＰＫ）の使用、エタノールによる分別沈殿、及び限外濾過

ＶＬＰの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図１３に示す。実施例Ｈと同一の実験から得られたペレットの６分の１を、１０ｍＭの$MgCl_2$を含有する２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５に再懸濁し、音波処理して細胞を溶解した。細胞残屑を、１６，０００ｇでの遠心分離により除去した。得られた細胞溶解物は、Ｓｔｒａｕｓｓ　＆　Ｓｉｎｓｈｅｉｍｅｒ（１９６３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ　７：４３－５４に記載されるように、硫酸アンモニウムの使用による沈殿及びトリクロロフルオロメタン（Ｆｒｅｏｎ　１１）の使用による抽出によって部分的に精製された。部分的に精製されたＶＬＰ溶液（１．３５ｍＬ）に、１．３６ｍＬの２０ｍＭ　$CaCl_2$水溶液に溶解した０．３ｍｇのプロテイナーゼＫを添加した。混合物を３７℃で２．５時間インキュベートし、その後、氷水浴の中に入れた。試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１３、レーン２の試料。この試料中の不純物は、試料重量の約８．１％を表した。１５分後、約１２０μＬの１％水酸化ナトリウム水溶液を氷／水浴に添加し、液体のｐＨを７．８６にした。次いで、同じ温度で激しく撹拌しながら、０．８１ｍＬのエタノールをゆっくり添加した。液体を０℃で３０分間保持し、４℃で２０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。約１００μＬの１０％酢酸水溶液を、氷／水浴中で上清に添加し、液体のｐＨを４．０にした。次いで、同じ温度で激しく撹拌しながら、１．３ｍＬのエタノールをゆっくり添加した。液体を０℃で３０分間保持し、４℃で２０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。ペレットを、２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ及び１０ｍＭの$MgCl_2$からなるｐＨ７．５に調整された２ｍＬの水性緩衝液に懸濁した。希釈された試料を、Ｖｉｖａｓｐｉｎ　２（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）１００ｋＤａ膜を通して濾過し、２００μＬの濃縮水を得た。次いで、濃縮水を同じ緩衝液で２ｍＬに希釈し、同じ１００ｋＤａの膜を通して濾過した。濃縮水（２００μＬ）の希釈及び限外濾過をさらに４回繰り返した。濃縮水の試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１３、レーン４の試料。この試料中の不純物は、試料重量の約０．９％を表した。結論として、得られた産物は、約９９％より高い純度を持つＶＬＰを含有した。

【００９４】

実施例Ｏ

ＶＬＰの精製のための様々なヒドロラーゼの使用、及び硫酸アンモニウムによる分別沈殿

ＶＬＰの精製は次の通り行った。精製中に試料を採取し、それらの試料でＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を行った。得られた結果を図１４に示す。実施例Ｈの方法から得られたペレットの６分の１を、１０ｍＭの$MgCl_2$を含有する２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５に再懸濁し、音波処理して細胞を溶解した。細胞残屑を、１６，０００ｇでの遠心分離によって除去した。上清の試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１４、レーン１の試料。この試料中の不純物は、試料重量の約７０％を表した。実施例Ｈと同一のそのような実験から得られたペレットの他の４つの同一画分を、同じ方法で処理した。

【００９５】
体積がそれぞれ３．７ｍＬである得られた５つの遠心分離細胞溶解物を、以下のように５つの異なる方法でさらに処理した。第１の遠心分離細胞溶解物を、氷水浴に１５分間入れ、０．１グラムの硫酸アンモニウムを添加した。混合物を、硫酸アンモニウムの完全な溶解が達成されるまで渦動させた。液体を０℃で２時間保持し、４℃で３０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。０．４グラムの硫酸アンモニウムを上清に添加し、硫酸アンモニウムの完全な溶解が達成されるまで渦動させた。液体を０℃で２時間保持し、４℃で３０分間、１６，０００ｇで遠心分離した。精製されたＶＬＰペレットを、２０ｍＭのトリス－ＨＣｌ及び１０ｍＭの$MgCl_2$からなるｐＨ７．５に調整された０．２ｍＬの水性緩衝液に懸濁した。第２遠心分離細胞溶解物を、３７℃で５時間インキュベートし、氷水浴に第１遠心分離細胞溶解物と同じ時間にわたって入れ、続いて第１遠心分離細胞溶解物と同様の方法で処理した。１５０μｇのプロテイナーゼＫ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を第３遠心分離細胞溶解物に添加し、次にこれを３７℃で５時間インキュベートし、氷水浴に第１遠心分離細胞溶解物と同じ時間にわたって入れ、続いて第１遠心分離細胞溶解物と同様の方法により処理した。第４遠心分離細胞溶解物を３７℃で２時間インキュベートした。次に０．１５ｍｇのプロテイナーゼＫを添加した。この試料を３７℃でさらに３時間インキュベートし、氷水浴に第１遠心分離細胞溶解物と同じ時間にわたって入れ、続いて第１遠心分離細胞溶解物と同一の方法で処理した。

【００９６】
５００単位のＢｅｎｚｏｎａｓｅ（登録商標）ヌクレアーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）及び３５単位のカンジダルゴサのリパーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を、第５遠心分離細胞溶解物に添加し、３７℃で１時間インキュベートした。次に１５単位の、バチルス属のα－アミラーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を添加し、３７℃でさらに１時間インキュベートした。次に０．１５ｍｇのプロテイナーゼＫを添加した。混合物を３７℃でさらに３時間インキュベートし、氷水浴に第１遠心分離細胞溶解物と同じ時間にわたって入れ、続いて第１遠心分離細胞溶解物と同一の方法で処理した。

【００９７】
５時間のインキュベーションの後、第２遠心分離細胞溶解物から試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１４、レーン２の試料。５時間のインキュベーションの後、第３遠心分離細胞溶解物から試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１４、レーン３の試料。５時間のインキュベーションの後、第４遠心分離細胞溶解物から試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。レーン４の試料（図１４）。５時間のインキュベーションの後、第５遠心分離細胞溶解物から試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１４、レーン５の試料。

【００９８】
第１遠心分離細胞溶解物の精製されたＶＬＰ懸濁液から試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１４、レーン６の試料。得られた産物は、約８８％の純度を持つＶＬＰを含有した。この試料のタンパク質濃度（Ｐｉｅｒｃｅ（登録商標）ＢＣＡタンパク質アッセイキット，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）は、１８．５ｍｇ／ｍＬであった。１ｃｍのセルにおいて２６０ｎｍで測定された、２００：１希釈のこの試料の光学濃度（ＯＤ－２６０ｎｍ）は、０．５５３であり、ＯＤ－２８０ｎｍは０．３０３であった。これらの測定値は、培養物１リットルあたり約９ｍｇのＲＮＡ収量と一致している。

【００９９】
第２遠心分離細胞溶解物の精製されたＶＬＰ懸濁液から試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１４、レーン７の試料。得られた産物は、約７５％の純度を持つＶＬＰを含有した。この試料のタンパク質濃度は２５．４ｍｇ／ｍＬであった。２００：１希釈のこの試料のＯＤ－２６０ｎｍは、０．７８４であり、ＯＤ－２８０ｎｍは０．４５３であった。これらの測定値は、培養物１リットルあたり約１１ｍｇのＲＮＡ収量と一

致している。
【０１００】
第３遠心分離細胞溶解物の精製されたＶＬＰ懸濁液から試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥにより分析した。図１４、レーン８の試料。得られた産物は、約９４．３％の純度を持つＶＬＰを含有した。この試料のタンパク質濃度は２１．０ｍｇ／ｍＬであった。２００：１希釈のこの試料のＯＤ－２６０ｎｍは、０．６３２であり、ＯＤ－２８０ｎｍは０．３２１であった。これらの測定値は、培養物１リットルあたり約１０ｍｇのＲＮＡ収量と一致している。
【０１０１】
第４遠心分離細胞溶解物の精製されたＶＬＰ懸濁液から試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１４、レーン９の試料。得られた産物は、約９５．６％の純度を持つＶＬＰを含有した。この試料のタンパク質濃度は１９．４ｍｇ／ｍＬであった。２００：１希釈のこの試料のＯＤ－２６０ｎｍは、０．６６６であり、ＯＤ－２８０ｎｍは０．３５３であった。これらの測定値は、培養物１リットルあたり約１１ｍｇのＲＮＡ収量と一致している。
【０１０２】
第５遠心分離細胞溶解物の精製されたＶＬＰ懸濁液から試料を採取し、ＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。図１４、レーン１０の試料。得られた産物は、約９６％の純度を持つＶＬＰを含有した。この試料のタンパク質濃度は１９．８ｍｇ／ｍＬであった。２００：１希釈のこの試料のＯＤ－２６０ｎｍは、０．６６１であり、ＯＤ－２８０ｎｍは０．３５４であった。これらの測定値は、培養物１リットルあたり約１１ｍｇのＲＮＡ収量と一致している。
【０１０３】
実施例Ｐ
実施例ＯのＶＬＰにおいてカプシド内封入されたＲＮＡの単離
実施例Ｏに記載されるように精製されたＭＳ２カプシドにおいてカプシド内封入されたＲＮＡは、製造者（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）によって供給されるプロトコルに従い、ＴＲＩｚｏｌ（登録商標）試薬を使用して各実験から抽出された。得られたＲＮＡは、ホルムアミド中９５℃で５分間加熱することによって変性させ、８％のポリアクリルアミド、８モルの尿素、１．０８％のトリス塩基、０．５５％のホウ酸、及び０．０９３％のＥＤＴＡからなる１７．６ｃｍ×３８ｃｍ×０．０４ｃｍ（Ｗ，Ｌ，Ｔ）中の電気泳動によって分析した。ランニング緩衝液は、同じ濃度のトリス塩基、ホウ酸、及びＥＤＴＡをゲルとして有した。電力は約４０Ｗで送達された。ゲルを、２５％ホルムアミド、１９％イソプロパノール、及び１５ｍＭトリスをｐＨ８で含有する水性混合物中のＳｔａｉｎｓ－Ａｌｌ染料（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）の０．０２５％溶液を使用して染色した。結果を図１５に示す。図１５のＲＮＡ電気泳動のレーン番号は、図１４のタンパク質電気泳動と同じレーン番号を指す。各レーンに単一のＲＮＡバンドを観察することができ、各例で回収された高純度のＲＮＡと一致し、特定の無傷のＲＮＡ分子がＶＬＰにパッケージされ、プロテアーゼ処理した細胞溶解物から効率的に精製され得ることを証明する。
【０１０４】
実施例Ｑ
ＨＤＶリボザイムはインビトロ転写によってｓｈＲＮＡを産生した
リボザイム等の活性ＲＮＡ種がＶＬＰに有効にパッケージされ、単純プロテアーゼ及び沈殿処理によって精製され得るかを試験するために、リボザイム及びｓｈＲＮＡと関連付けられたＭＳ２パッキング配列を含有するという理由でパッケージングに適した一連の試験構築物が設計され、インビトロで試験された。理想的には、活性ＲＮＡは、パッケージされたＲＮＡ分子自身内に含有されるリボザイムによる、パッキング配列及びスペーサーまたは転写ターミネーター等の任意の他の配列からの活性ＲＮＡの切断によって生成される。そのような配列を表す構築物Ｔ７－Ｒｚ２（配列番号５）及びＴ７－Ｒｚ３（配列番

号６）は、インビトロ転写によって産生され、それらが自己切断によってｓｉＲＮＡを産生する能力について試験された。これらの構築物のＤＮＡ配列は、Ｔ７プロモーターの後に、ｓｈＲＮＡヘアピンの５′末端を切断するように設計されたハンマーヘッドリボザイム（Ｔ７－Ｒｚ３にはあるが、Ｔｚ－Ｒｚ２にはない）、ｓｈＲＮＡヘアピン、ｓｈＲＮＡヘアピンの３′末端を切断するように設計された肝炎デルタウイルス（ＨＤＶ）リボザイム、ＡＴスペーサー、ＶＬＰへの構築物の組込みに必要なＭＳ２特異的ＲＮＡ１９ｍｅｒコードパッキング配列、及びＮｃｏＩ制限部位をコードする。Ｔ７－Ｒｚ３及びＴ７－Ｒｚ２は、それぞれ５′ハンマーヘッドリボザイムの有無によってのみ互いに異なる。

【０１０５】

これらの構築物の両方は、ｐＭＡ（ａｍｐＲ）プラスミド（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）へのＢａｍＨＩ－ＰａｃＩ制限断片としてクローン化された。Ｏｎｅ　Ｓｈｏｔ　ＢＬ２１／ＤＥ３化学的コンピテント大腸菌（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）細胞は、各プラスミドを使用して形質転換された。各プラスミドを含有するＢＬ２１（ＤＥ３）細胞は、アンピシリンを含有するＬＢ培地中、３７℃でＯＤ（６００ｎｍ）＝０．８まで別個に増殖させた。ＱＩＡｐｒｅｐ（登録商標）Ｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用し、製造者の指示に従ってプラスミドを単離した。ＮｃｏＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用し、単離されたプラスミドをＭＳ２パッキング配列に続く制限部位で切断した。消化後、直鎖ＤＮＡテンプレートを、１．５％のアガロースゲル上で電気泳動によって精製し、ＰｕｒｅＬｉｎｋ（商標）Ｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ抽出キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用し、製造者の指示に従って単離した。逆転写は、ＭＡＸＩｓｃｒｉｐｔ（登録商標）Ｔ７キットを製造者の指示に従って使用した。ＲＮＡ産物を、８Ｍ尿素、１．０８％トリス塩基、０．５５％ホウ酸、及び０．０９３％　ＥＤＴＡを含有する８％ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。ゲルは厚さ０．４ｍｍ、幅１８ｃｍ、長さ３８ｃｍであった。Ｓｔａｉｎｓ－Ａｌｌ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用してＲＮＡバンドを視覚化した。ゲル撮像及びバンド定量は、Ｉｍａｇｅ　Ｌａｂ４．０．１ソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して行った。

【０１０６】

テンプレートＴ７－Ｒｚ２：

テンプレートは、合計１６５ｎｔを有した。配列中最初の１８個のヌクレオチドは、Ｔ７プロモーターであり、最後の５個は、直鎖テンプレートが調製される場合、ＮｃｏＩによる消化時に除去される。Ｔ７－Ｒｚ２の全長転写物は、１６５ｎｔ－１８ｎｔ－５ｎｔ＝１４２ｎｔである。転写は、配列５′ＧＣＴＴＧＴ（これはｓｈＲＮＡの開始である）を有するヌクレオチド１９で開始する。ＨＤＶリボザイムが切断する場合、ｓｉＲＮＡが４９ヌクレオチド長であるため、第２の断片の予想される長さは９３ｎｔである。

【０１０７】

結果を図１６、レーン３に示す。最大バンド（１４２ｎｔ）は、未切断転写物である。第２のバンドは、ＨＤＶリボザイム、ＡＴリンカー、及びＭＳ２パッキング配列（９３ｎｔ）を含有する断片であり、第３のバンドはｓｉＲＮＡ（４９ｎｔ）である。

【０１０８】

テンプレートＴ７－Ｒｚ３：

このテンプレートは、合計２２１個のヌクレオチド（ｎｔ）を有し、最初の１８個のヌクレオチドはＴ７プロモーターである。転写はヌクレオチド１９で開始する。ＮｃｏＩによる消化がテンプレートの最後の５個のヌクレオチドを除去するため、全長転写物は２２１ｎｔ－１８ｎｔ－５ｎｔ＝１９８ｎｔである。ハンマーヘッドリボザイム（転写物の５′末端から最初のリボザイム）は、配列５′－ＧＴＣＧＣＴ－３′中の第３ヌクレオチドと第４ヌクレオチドの間を切断するように設計されているため、第１の断片は５６ヌクレオチド長であることが予想される。ＨＤＶリボザイム（転写物の３′末端から最初のリボザイム）は、転写物の残りからｓｈＲＮＡクローンを解放するように設計され、４９ヌクレオチド長のｓｈＲＮＡを産生する。そのため、全長転写物が１９８ヌクレオチドであり

、第１の断片（切除されたハンマーヘッドリボザイムを含有する）が５６ヌクレオチドであり、ｓｈＲＮＡが４９ヌクレオチドである場合、ＨＤＶリボザイム、ＡＴリンカー、及びＭＳ２パッキング配列からなる第３の断片は、９３ヌクレオチドであるはずである。この結果は、両方のリボザイムが切断する場合に予想される。ハンマーヘッドリボザイムのみが切断する場合、予想される結果は、１つの断片が５６ヌクレオチド長であり、第２の断片が１４２ヌクレオチド長である。３′ＨＤＶリボザイムのみが切断する場合、予想される結果は、１つの断片が１０４ヌクレオチド長であり、第２の断片が９４ヌクレオチド長である。

【０１０９】

結果を図１６のレーン１に示す。５′ハンマーヘッドリボザイムは、転写物を効率的に切断するが、３′ＨＤＶリボザイムは、あまり効率的に切断しない。第１のバンド（１９８ヌクレオチド）は、未切断の転写物である。第２のバンド（１４２ヌクレオチド）は、ｓｉＲＮＡ、３′ＨＤＶリボザイム、ＡＴリンカー、及びＭＳ２パッキング配列を含有する転写物断片である。５′ハンマーヘッドリボザイム断片（５６ｎｔ）は存在するが、良好に染色しなかった。

【０１１０】

これらの結果は、Ｔ７－Ｒｚ３構築物中の５′ハンマーヘッドリボザイムが、テンプレートを予想通り切断するが、Ｔ７－Ｒｚ３転写物内の３′ＨＤＶリボザイムは、ハンマーヘッドリボザイムと比較して活性でなかったか、またはほんのわずかに活性であったことを示す。対照的に、５′ハンマーヘッドリボザイムの非存在下、Ｔ７－Ｒｚ２構築物中に存在するＨＤＶリボザイムは、適切に切除されたｓｉＲＮＡ断片を産生した。したがって、Ｔ７－Ｒｚ２の基本設計は、パッキング配列を担持するより大きなＲＮＡ分子からｓｉＲＮＡを産生することができる。そのような転写物におけるパッキング配列の存在は、構築物が、前記実施例に記載されるようにＶＬＰ中で効率的にパッケージされ、精製され得ることを意味する。

【０１１１】

実施例Ｒ

緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）とＭＳ２　１９ｍｅｒ　ＲＮＡヘアピンに取り付けられたＨＤＶリボザイムとを標的とするｓｈＲＮＡをカプシド内封入するＭＳ２カプシドの産生

実施例Ｑに記載されるものに類似する活性ＲＮＡが実際にインビボでＶＬＰにパッケージされるかどうかを試験するために、以下の実験を行った。

【０１１２】

ＢａｍＨＩ制限部位をコードする構築物Ｔ７－Ｒｚ６（配列番号７）、ＧＦＰとそれに続いてｓｉＲＮＡヘアピンの３′末端を切断するように設計された肝炎デルタウイルス（ＨＤＶ）リボザイムとを標的とするｓｈＲＮＡヘアピンの発現を駆動するＴ７プロモーター、及び構築物をＶＬＰに続いてＮｃｏＩ制限部位に組み込むために必要なパッキング配列をコードするＭＳ２特異的ＲＮＡ１９ｍｅｒは、ＢａｍＨＩ－Ｂｓｐ１９Ｉ制限断片としてプラスミドｐＡＣＹＣ１８４にクローン化された。

【０１１３】

ＭＳ２カプシドの産生に必要なカプシドタンパク質は、Ｇａｔｅｗａｙ組換え方法（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によってｐＤＥＳＴ１４にクローン化されるＭＳ２カプシドタンパク質遺伝子をコードするＤＮＡ配列（配列番号２）を含むプラスミドから発現される。

【０１１４】

Ｏｎｅ　Ｓｈｏｔ　ＢＬ２１／ＤＥ３化学的コンピテント大腸菌（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）細胞は、クロラムフェニコール及びアンピシリン耐性形質転換体を選択する２つのプラスミドで形質転換された。ＶＬＰ産生の場合、これらの形質転換体を、アンピシリン及びクロラムフェニコールの両方を含有する３２ｍＬ　ＬＢ培地中、３７℃で増殖させた。培養密度がＯＤ（６００ｎｍ）＝０．８に到達した場合、次いでＩＰＴＧ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を最終濃度１ｍＭまで添加した。４℃で４０分間、３，

０００ｇでの遠心分離による誘導の４時間後に細胞を採取した。実施例Ｐに記載されるように、精製されたＶＬＰからＲＮＡを抽出し、実施例Ｑに記載されるように分析した。図１７のレーンｓｈＲＮＡにおいて観察されるように、コードされたｓｈＲＮＡに予想されるものと同じ分子量のバンドが観察された。

【０１１５】

無傷のパッケージ化Ｔ７－Ｒｚ６転写物は、約１５０塩基長である。切断された分子は、２つの断片を産生するように設計され、１つはリボザイム及びパッキング配列を含む約１００塩基であり、もう１つは約５０塩基の無傷のｓｈＲＮＡである。図１７は、未切断のＲＮＡ分子は、ほぼ３００塩基長であるように思われることを示す。しかしながら、この分子には考慮すべき潜在的二次構造があり、より高い見掛けの分子量はそのような構造に起因する可能性がある。

【０１１６】

実施例Ｓ

ｓｈＲＮＡ及びＭＳ２　１９ｍｅｒ　ＲＮＡヘアピンに取り付けられた長いハンマーヘッドリボザイムをコードする転写物の産生

それぞれが異なるカーゴをカプシド内封入するＭＳ２カプシドを産生するいくつかの実験は、実施例Ｏに記載されるように行われる。これらの実験の意図は、修飾されたハンマーヘッドリボザイムが、実施例ＱのＴ７－Ｒｚ３のハンマーヘッドリボザイムとは異なり、カーゴ分子を有効に切断するように修飾され得るかどうかを決定することである。結果（図示せず）は、ｓｈＲＮＡ標的の折畳みに対して、適切に折り畳まれたリボザイムの熱力学的安定性を改善することは、リボザイム切断の有用性を改善することを示す。リボザイム安定性を改善するための１つの潜在的方法は、カーゴ分子の標的部分にハイブリダイズするリボザイムの領域を増加させることであり、そのような構築物は、長いハンマーヘッドと称される。長いハンマーヘッドリボザイムの例示的な配列は、次の実施例に提示される。

【０１１７】

実施例Ｔ

それぞれが５′末端の長いハンマーヘッドリボザイム及び３′末端のＨＤＶリボザイムによって隣接される、ＭＳ２　１９ｍｅｒ　ＲＮＡヘアピンに取り付けられたＧＦＰを標的とするｓｉＲＮＡの２つの鎖をコードする転写物を含有するＭＳ２カプシドの産生

ＭＳ２カプシドは、ＭＳ２バクテリオファージゲノムのサイズである少なくとも３，６００塩基のＲＮＡ分子を含有し得る。したがって、はるかに長い異種カーゴ分子は、それらがカプシド内封入に必要なパッキング配列を含有することを条件としてパッケージされ得る。本明細書に記載される前述の実施例は、ｓｈＲＮＡヘアピンと、カーゴ分子全体を含まないｓｈＲＮＡ配列を正確に切断するように設計されたリボザイムとの組合せを含有する活性ＲＮＡが、単一の短いＲＮＡ転写物から産生され得る事を示す。この実験は、ｓｉＲＮＡの個々の鎖が、複数の特異的リボザイムによって単一転写物から独立して切断され得るかどうかを試験する。

【０１１８】

ＭＳ２カプシドは、ｐＤＥＳＴ１４（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）プラスミドにクローン化されたＭＳ２のカプシドタンパク質をコードするプラスミドからインビボで産生される。

【０１１９】

ＤＮＡ配列Ｔ７－Ｒｚ８（配列番号８）は、ＢａｍＨＩ制限部位、続いてＴ７プロモーター、続いてＥＦＧＰに対して標的指向化されたｓｉＲＮＡのセンス鎖（ＥＧＦＰは強化された緑色蛍光タンパク質である）の５′末端を切断するように設計されたハンマーヘッドリボザイム、続いてＥＧＦＰに対して標的指向化されたｓｉＲＮＡのセンス鎖、続いてｓｉＲＮＡのセンス鎖の３′末端を切断するように設計されたＨＤＶリボザイム、続いてＡＴスペーサー、次いでＥＧＦＰに対して標的指向化されたｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の５′側を切断するように設計されたハンマーヘッドリボザイム、続いてｓｉＲＮＡのア

ンチセンス鎖、続いてｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の３′側を切断するように設計されたＨＤＶリボザイム、続いて７塩基スペーサー、及びＭＳ２パッキング配列、及びＮｃｏＩ制限部位をコードする。Ｔ７－Ｒｚ８は、ＢａｍＨＩ－ＮｃｏＩ制限断片としてプラスミドｐＡＣＹＣ１８４にクローン化され、転写ターミネーターが次にＴ７－Ｒｚ８の３′末端に挿入される。

【０１２０】

Ｏｎｅ Ｓｈｏｔ ＢＬ２１／ＤＥ３化学的コンピテント大腸菌（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）細胞は、２個のプラスミドで形質転換され、１つはカプシドタンパク質を発現し、もう１つはＴ７－Ｒｚ８を含有し、クロラムフェニコール及びアンピシリン耐性形質転換体を選択する。カプシド産生の場合、これらの形質転換体は、アンピシリン及びクロラムフェニコールの両方を含有する７５０ｍＬのＬＢ培地中、３７℃で増殖させた。培養密度がＯＤ（６００ｎｍ）＝０．８に到達した場合、ＩＰＴＧ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を最終濃度１ｍＭまで添加した。３，０００ｇ、４℃で４０分間の遠心分離による誘導の４時間後に細胞を採取した。細胞を溶解し、前記実施例に記載される手順によってＶＬＰを回収し、ＲＮＡを実施例Ｑ及びＲと同様に分析する。そのような分析は、活性ＲＮＡが長いハンマーヘッド及びＨＤＶリボザイムの組合せによってパッケージ化ＲＮＡから効率的に産生されることを示す。

【０１２１】

実施例Ｕ

長い隣接するハンマーヘッドリボザイムは、短い隣接するハンマーヘッドリボザイムよりも、インビトロ転写中著しく高い程度まで切断する

構築物Ｔ７－Ｒｚ１（配列番号９）及びＴ７－Ｒｚ４（配列番号１０）を、インビトロ転写のテンプレートとして使用した。Ｔ７－Ｒｚ１は、一般的なリボザイム、すなわち６個未満のハイブリダイジングヌクレオチドのｓｉＲＮＡ標的とハイブリダイズしているステムを有するリボザイムを含む。Ｔ７－Ｒｚ４は、切断中のｓｉＲＮＡとハイブリダイズする長いステム、すなわち６個より多くハイブリダイジングヌクレオチドを有するステムを持つ隣接するリボザイムを含む。

【０１２２】

構築物Ｔ７－Ｒｚ１は、Ｔ７プロモーターと、ｓｉＲＮＡ標的に相補的な５個のヌクレオチドを持つ、ｓｉＲＮＡヘアピンの５′末端を切断するように設計されたハンマーヘッド（ＨＨ）リボザイムと、ｓｉＲＮＡヘアピンと、ｓｉＲＮＡ標的に相補的な５個のヌクレオチドを持つ、ｓｉＲＮＡヘアピンの３′末端を切断するように設計されたＨＨリボザイムと、ＮｃｏＩ制限部位とをコードする。

【０１２３】

構築物Ｔ７－Ｒｚ４は、Ｔ７プロモーターと、ｓｉＲＮＡ標的に相補的な１２個のヌクレオチドを持つ、ｓｉＲＮＡヘアピンの５′末端を切断するように設計されたＨＨリボザイムと、ｓｉＲＮＡヘアピンと、ｓｉＲＮＡ標的に相補的な２３個のヌクレオチドを持つ、ｓｉＲＮＡヘアピンの３′末端を切断するように設計されたＨＨリボザイムとをコードする。

【０１２４】

インビトロ転写実験及び分析は、これらの構築物を用いて実施例Ｑに記載されるものに類似する方法で行った。図１８に示されるように、構築物Ｔ７－Ｒｚ１を用いて得られた結果は、短い相補配列を持つリボザイムが良好に切断しなかったという観察と一致したが、構築物Ｔ７－Ｒｚ４を用いて得られた結果は、より長い相補配列を持つリボザイムが標的をより効率的に切断するという仮説と一致した。

【０１２５】

実施例Ｖ

その５′末端にある長いハンマーヘッドリボザイム及びその３末端にあるＭＳ２ １９ｍｅｒ ＲＮＡヘアピンに取り付けられた別の長いハンマーヘッドリボザイムによって隣接される、ＥＧＦＰに対するｓｈＲＮＡをコードする転写物を使用したＶＬＰの産生

ＭＳ２カプシドの産生は次の通り行った。ＭＳ２カプシドタンパク質をコードする配列番号２は、ｐＤＥＳＴ１４（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）プラスミドにクローン化された。

【０１２６】

Ｔ７－Ｒｚ４のＤＮＡ配列は、ＢａｍＨＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ断片としてプラスミドｐＡＣＹＣ１８４にクローン化された。転写ターミネーターは、次に構築物Ｔ７－Ｒｚ４の３'末端においてクローン化された。

【０１２７】

Ｏｎｅ　Ｓｈｏｔ　ＢＬ２１／ＤＥ３化学的コンピテント大腸菌（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）細胞は、２個のプラスミドで形質転換され、１つはカプシドタンパク質を発現することができ、もう１つはＴ７－Ｒｚ４を含有し、クロラムフェニコール及びアンピシリン耐性形質転換体を選択する。ＶＬＰ産生の場合、これらの形質転換体は、アンピシリン及びクロラムフェニコールの両方を含有する７５０ｍＬのＬＢ培地中、３７℃で増殖させた。培養密度がＯＤ（６００ｎｍ）＝０．８に到達した場合、ＩＰＴＧ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を最終濃度１ｍＭまで添加した。４℃で４０分間、３，０００ｇでの遠心分離による誘導の４時間後に細胞を採取した。誘導前及び採取時に、分析のための試料を採取した。試料を溶解し、ＶＬＰを実施例Ｏに記載されるように精製した。

【０１２８】

精製されたＶＬＰ中でカプシド内封入されたＲＮＡは、ＴＲＩｚｏｌ（登録商標）試薬を使用し、製造者（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）によって供給されたプロトコルに従って抽出した。得られたＲＮＡは、ホルムアミド中９５℃で５分間加熱することによって変性させ、７０℃で実行されるＮｏｖｅｘ（登録商標）変性１５％ポリアクリルアミドＴＢＥ－尿素ゲル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中の電気泳動によって分析した。１ｍＬの水溶液あたり０．５μｇの臭化エチジウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を使用して、ＲＮＡバンドを視覚化した。得られた結果を図１９に示し、レーン１は一組の分子標準である。レーン２は、化学的に合成されたｓｈＲＮＡ４９ヌクレオチド長さであり、レーン３は、ＶＬＰから回収されたＲＮＡである。

【０１２９】

実施例Ｗ

実施例Ｖにおいて得られたＭＳ２カプシドを含むＶＬＰは、エンジオドンティウム・アルブム（Ｅｎｇｙｏｄｏｎｔｉｕｍ　ａｌｂｕｍ）、バチルス・リケニホルミスからのプロテアーゼ、ブタ胃粘膜からのペプシン、及びパパイヤラテックスからのパパインに耐性がある

２５０ｍＬの培養物から得られ、実施例Ｖに記載されるように精製されたＭＳ２カプシドを含むＶＬＰを、４００μＬの２０ｍＭ　$CaCl_2$水溶液中にｐＨ７．５で懸濁した。

【０１３０】

６６μＬアリコートのこの懸濁液を、２０ｍＭの$CaCl_2$水溶液（ｐＨ７．５）で０．２５ｍＬに希釈し、３７℃でインキュベートした。タンパク質濃度（Ｐｉｅｒｃｅ（登録商標）ＢＣＡタンパク質アッセイキット，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析のためにインキュベーションの１時間後、及び４時間後に試料を採取した。これら２つの試料中のタンパク質濃度は、それぞれ３０８６ｍｇ／Ｌ及び４６５６ｍｇ／Ｌであった。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を、図２０のレーン１Ｂ及び６にそれぞれ示す。同量のタンパク質を各レーン（４μｇ）に充填した。この一連の実験を負の対照として使用した。

【０１３１】

ストレプトミセス・グリセウスからの２μｇのプロテアーゼ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を、２０ｍＭの$CaCl_2$水溶液（ｐＨ７．５）で０．２５ｍＬに希釈し、３７℃でインキュベートした。インキュベーションの１時間後、及び

４時間後に、タンパク質濃度及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析のために試料を採取した。これら２つの試料中のタンパク質濃度は、それぞれ３６１ｍｇ／Ｌ及び３２４ｍｇ／Ｌであった。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析は、図２０のレーン１及び７にそれぞれ示す。同量のタンパク質を各レーン（４μｇ）に充填した。この一連の実験を別の負の対照として使用した。

【０１３２】

ストレプトミセス・グリセウスからの２μｇのプロテアーゼを、ＭＳ２カプシド懸濁液を含む、ＶＬＰの別の６６μＬアリコートに添加し、２０ｍＭの$CaCl_2$水溶液（ｐＨ７．５）で０．２５ｍＬに希釈し、３７℃でインキュベートした。インキュベーションの１時間後、及び４時間後に、タンパク質濃度及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析のために試料を採取した。これら２つの試料中のタンパク質濃度は、それぞれ２９４０ｍｇ／Ｌ及び３０１２ｍｇ／Ｌであった。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を、図２０のレーン２及び８にそれぞれ示す。同量のタンパク質を各レーン（４μｇ）に充填した。この一連の実験を使用して、ＶＬＰを形成するＭＳ２カプシドのストレプトミセス・グリセウスからのプロテアーゼに対するタンパク質分解安定性を試験した。１０％未満の分解が観察された。

【０１３３】

ＭＳ２カプシド懸濁液を含む、２０ｍＭの$CaCl_2$水溶液（ｐＨ７．５）で０．２５ｍＬに希釈したＶＬＰの別の６６μＬアリコートを、９５℃まで１０分間加熱し、濡れた氷上で１０分間冷却する３回のサイクルに供し、ＶＬＰの分解を達成した。次いで、ストレプトミセス・グリセウスからの２μｇのプロテアーゼをこの懸濁液に添加し、３７℃でインキュベートした。インキュベーションの１時間後及び４時間後に、タンパク質濃度及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析のために試料を採取した。これら２つの試料中のタンパク質濃度は、それぞれ２６０１ｍｇ／Ｌ及び３０３３ｍｇ／Ｌであった。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を、図２０のレーン３及び９にそれぞれ示す。同量のタンパク質を各レーン（４μｇ）に充填した。分解された粒子は、ストレプトミセス・グリセウスからのプロテアーゼによって著しく分解された。この一連の実験は、正の対照として使用した。

【０１３４】

０．００２ｍＬの２０ｍＭ　$CaCl_2$水溶液（ｐＨ７．５）に溶解したストレプトミセス・グリセウスからの２μｇのプロテアーゼを、実施例Ｖからの４１ｍＬの細胞培養物から得られた０．２４８ｍＬの細菌細胞溶解物に添加し、３７℃でインキュベートした。インキュベーションの１時間後及び４時間後に、タンパク質濃度及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析のために試料を採取した。これら２つの試料中のタンパク質濃度は、それぞれ３１９２ｍｇ／Ｌ及び４８３７ｍｇ／Ｌであった。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を、図２０のレーン４及び１０にそれぞれ示す。Ｌと表示される図２０の最後のレーンは、未処理の細菌細胞溶解物を示す。各レーンに同量のタンパク質を充填した（４μｇ）。ＭＳ２カプシドタンパク質以外のタンパク質の９０％超がストレプトミセス・グリセウスからのプロテアーゼによって分解された。この一連の実験は、別の正の対照として使用された。

【０１３５】

この一連の５つの実験は、本開示のＶＬＰを形成するＭＳ２カプシドが、ストレプトミセス・グリセウスからのプロテアーゼによるタンパク質分解に耐性があることを証明した。

【０１３６】

バチルス・リケニホルミス（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）からの２μｇのプロテアーゼを１０ｍＭのＮａ酢酸塩及び５ｍＭのＣａ酢酸塩水溶液（ｐＨ７．５）で０．２５ｍＬに希釈し、３７℃でインキュベートした。インキュベーションの１時間後、及び４時間後に、タンパク質濃度及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析のために試料を採取した。これら２つの試料中のタンパク質濃度は、それぞれ９７６ｍｇ／Ｌ及び１００３ｍｇ／Ｌであった。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を、図２０のレーン２Ｂ及び７Ｂにそれぞれ示す。各レーンに同量のタンパク質を充填した（４μｇ）。この一連の実験は、別の負の対照として使用された。

【０１３７】

バチルス・リケニホルミスからの２μｇのプロテアーゼを、ＭＳ２カプシド懸濁液を含む、ＶＬＰの別の６６μＬアリコートに添加し、１０ｍＭのＮａ酢酸塩及び５ｍＭのＣａ酢酸塩水溶液（ｐＨ７．５）で０．２５ｍＬに希釈し、３７℃でインキュベートした。インキュベーションの１時間後及び４時間後に、タンパク質濃度及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析のために試料を採取した。これら２つの試料中のタンパク質濃度は、それぞれ３１４４ｍｇ／Ｌ及び３７２７ｍｇ／Ｌであった。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を、図２０のレーン３Ｂ及び８Ｂにそれぞれ示す。各レーンに同量のタンパク質を充填した（４μｇ）。この一連の実験を使用して、ＶＬＰを形成するＭＳ２カプシドのバチルス・リケニホルミスからのプロテアーゼに対するタンパク質分解安定性を試験した。１０％未満の分解が観察された。

【０１３８】

ＭＳ２カプシド懸濁液を含む、１０ｍＭのＮａ酢酸塩及び５ｍＭのＣａ酢酸塩水溶液（ｐＨ７．５）で０．２５ｍＬに希釈したＶＬＰの別の６６μＬアリコートを、９５℃まで１０分間加熱し、濡れた氷上で１０分間冷却する３回のサイクルに供し、ＶＬＰの分解を達成した。次いで、バチルス・リケニホルミスからの２μｇのプロテアーゼをこの懸濁液に添加し、３７℃でインキュベートした。インキュベーションの１時間後及び４時間後に、タンパク質濃度及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析のために試料を採取した。これら２つの試料中のタンパク質濃度は、それぞれ１７６９ｍｇ／Ｌ及び１７８５ｍｇ／Ｌであった。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を、図２０のレーン４Ｂ及び９Ｂにそれぞれ示す。各レーンに同量のタンパク質を充填した（４μｇ）。分解された粒子は、バチルス・リケニホルミスからのプロテアーゼによって著しく分解された。この一連の実験は、正の対照として使用した。

【０１３９】

０．００２ｍＬの１０ｍＭのＮａ酢酸塩及び５ｍＭのＣａ酢酸塩水溶液（ｐＨ７．５）に溶解したバチルス・リケニホルミスからの２μｇのプロテアーゼを、実施例ＣＣからの４１ｍＬの細胞培養物から得られた０．２４８ｍＬの細菌細胞溶解物に添加し、３７℃でインキュベートした。インキュベーションの１時間後及び４時間後に、タンパク質濃度及びＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析のために試料を採取した。これら２つの試料中のタンパク質濃度は、それぞれ３６９６ｍｇ／Ｌ及び４０７８ｍｇ／Ｌであった。ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を、図２０のレーン６Ｂ及び１０Ｂにそれぞれ示す。Ｌと表示される図２１の最後のレーンは、未処理の細菌細胞溶解物を示す。各レーンに同量のタンパク質を充填した（４μｇ）。ＭＳ２カプシドタンパク質以外のタンパク質の９０％超がバチルス・リケニホルミスからのプロテアーゼによって分解された。この一連の実験は、別の正の対照として使用された。

【０１４０】

この一連の４つの実験は、本開示のＶＬＰを形成するＭＳ２カプシドが、バチルス・リケニホルミスからのプロテアーゼによるタンパク質分解に耐性があることを証明した。

【０１４１】

さらに３組の同等の実験は、本開示のＶＬＰを形成するＭＳ２カプシドが、次の３つのプロテアーゼ：エンジオドンティウム・アルブムからのプロテイナーゼＫ、ブタ胃粘膜からのペプシン（ＣＡＳ番号９００１－７５－６）、及びパパイヤラテックスからのパパイン（ＣＡＳ番号９００１－７３－４）（全てはＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯから供給される）のうちのいずれによるタンパク質分解にも耐性があることを証明した。各プロテアーゼは、製造者の指示に従って使用した。プロテイナーゼＫはｐＨ７．５で使用し、ペプシンはｐＨ１．６で使用し、パパインはｐＨ６．６で使用した。

【０１４２】

実施例Ｘ

長いＲＮＡを持つ組成物

最大約３，６００個のヌクレオチドの長い一本鎖ＲＮＡ分子をＭＳ２カプシドにパッケージする能力は、ｍｉＲＮＡ等の二本鎖ＲＮＡ分子、またはＣＲＩＳＰＲ（細菌中）、ＤＩＣＥＲ（動物中）、もしくはＤｉｃｅｒ様タンパク質（植物中）等のＲＮＡ処理系のための基質を産生するための単純かつ効率的な方法を潜在的に提供する。ある方法において

、所望の長い二本鎖ＲＮＡ分子の各鎖は、パッキング配列と長い鎖を正確な点で切断するように設計されたリボザイムとを含有する転写物として産生されて、所望のＲＮＡ配列をパッキング配列及びリボザイム配列から分離する。別の方法において、リボザイムは必要とされず、相補配列はパッキング配列に取り付けられたままである。これらの実施例に記載される方法によって、各鎖は別個にパッケージ及び精製されることが可能であり、これらの鎖のうちの１つを含む等モル量の各精製ＶＬＰを一緒に混合し、各ＶＬＰからの一本鎖ＲＮＡを回収し、アニールして所望の二本鎖ＲＮＡを形成する。ある方法において、各ＲＮＡ分子のリボザイムは、それ自身の鎖に特異的であるため、その同種標的のみを切断する。長い相補ＲＮＡ鎖は、アニールすることができ、物理的方法、またはリボザイム及びパッキング配列等の一本鎖ＲＮＡを優先的に分解するＲＮＡｓｅ　Ａでの処理によって混合物から回収される。リボザイムのないＲＮＡ分子の場合、パッキング配列は、長い相補配列がアニールした後も一本鎖のままであり、ＲＮＡｓｅ　Ａでの処理によって除去され得る。

【０１４３】

証明するために、ＢａｍＨＩ制限部位、続いてアナサ・トリスティス（Ａｎａｓａ　ｔｒｉｓｔｉｓ）（一般にハラビロヘリカメムシとして知られる、主な農業害虫）のアルギニンキナーゼを標的とするｓｉＲＮＡを産生するように設計された長いセンス鎖ＲＮＡの発現を駆動するＴ７ポリメラーゼプロモーター、続いて高親和性ＭＳ２パッキング配列及びＴ７ターミネーターをコードするＤＮＡ挿入断片（配列番号１１）が、ｐＡＣＹＣ１８４にクローン化される。

【０１４４】

同様に、アナサ・トリスティスのアルギニンキナーゼを標的とするｓｉＲＮＡを産生するように設計された長いアンチセンス鎖ＲＮＡの発現を駆動するＴ７ポリメラーゼプロモーター、続いて高親和性ＭＳ２パッキング配列及びＴ７ターミネーターをコードするＤＮＡ挿入断片（配列番号１２）もｐＡＣＹＣ１８４にクローン化される。

【０１４５】

各プラスミドは、ｐＤＥＳＴ１４のＴ７プロモーターからＭＳ２カプシドタンパク質を発現するプラスミドを含有する大腸菌株ＢＬ２１／ＤＥ３に別個に形質転換され、それぞれの培養物が増殖され、Ｔ７ポリメラーゼは、ＩＰＴＧによって誘導され、細胞は、追加の期間インキュベートされ、ＶＬＰは実施例に記載されるように回収される。各沈殿からの等量のＶＬＰを混合し、ＲＮＡカーゴ分子を実施例Ｐに記載されるように回収した。

【０１４６】

センス及びアンチセンスＲＮＡ分子を、所望の二本鎖ＲＮＡの計算された融解温度とほぼ等しいか、それより高い温度まで加熱する。次いで、水性混合物を１０℃冷却する。加熱し、同じ温度まで冷却する追加のサイクルを行い、センス鎖とアンチセンス鎖との間により完全なハイブリダイゼーションを達成する。二本鎖ＲＮＡは、一本鎖ＲＮＡを優先的に分解してアニールされていないパッキング配列及び存在し得る任意のリボザイム配列を除去するＲＮＡｓｅ　Ａで処理することができる。

【０１４７】

そのような方法を使用して昆虫を殺滅することを目的とする試験実験において、対照ＶＬＰが設計され、ここでランダムＲＮＡ配列が対照実験で使用された。試験実験において、少なくとも１０匹の昆虫にアルギニンキナーゼを指向するＲＮＡを注入し、対照実験において、同数の昆虫にランダムＲＮＡを注入する。注入後７日に試験実験において、対照実験よりも著しく多い数の昆虫が死滅した。

【０１４８】

実施例Ｙ

長いバルジＲＮＡを持つ組成物

ＭＳ２カプシドは、約３，６００ヌクレオチドの一本鎖ＲＮＡをカプシド内封入することができるが、二本鎖ＲＮＡを直接カプシド内封入する能力は、そのようなＲＮＡが、二本鎖らせんに沿って比較的剛性の軸を有するため、高度に制約され、カプシド内径を超え

るらせんは、効率的にパックされることができない。しかしながら、相補配列の長さに沿ってミスマッチ（バルジ）を戦略的に置くことによって、カプシドの内径より長い二本鎖ＲＮＡはパックされることが可能である。

【０１４９】

これを証明するために、配列番号１３を持つＤＮＡを含有するｐＡＣＹＣ１８４を構築した。配列番号１３は、ｓｉＲＮＡ前駆体の長いセンス鎖及びアンチセンス鎖が２５塩基の非相補配列によって分離されて、センス及び相補的アンチセンス配列が互いにアニールし得るよう分子がそれ自身の上にループするのを可能にするような方法で配列された、実施例Ｘのアルギニンキナーゼを指向するｓｉＲＮＡ前駆体の長いセンス鎖及びアンチセンス鎖の変異体をコードするＤＮＡテンプレートの発現を駆動するＴ７プロモーターをコードする。構築物は、転写された配列の５′末端に位置するパッキング配列、及びテンプレートを切断してそれ自身及び下流終了配列を除去することができるＨＤＶリボザイムも含む。アニールされた分子のアンチセンス鎖は、標的とされた宿主アルギニンキナーゼメッセンジャーＲＮＡのｓｉＲＮＡ阻害のための活性剤であるため、センス鎖は、１９～２８個のヌクレオチドあたり１～３個の連続するヌクレオチドがセンスＲＮＡ鎖に付加されて、それらがもはやアンチセンス配列に完璧に相補的ではなくなるように修飾される。そのようなバルジ領域は、全ＲＮＡ転写物がカプシド内にパッケージされ得る構造全体に十分な柔軟性を付与するように思われる。さらに、二本鎖（バルジ）ＲＮＡは、一本鎖ＲＮＡよりもＲＮＡｓｅ　Ａによる分解に耐性がある。重要なことに、１９～２８個のヌクレオチドあたり１～３個の塩基ミスマッチを欠く類似の構築物は、効率的にパッケージしない。

【０１５０】

プラスミドは、ｐＤＥＳＴ１４のＴ７プロモーターからＭＳ２カプシドタンパク質を発現するプラスミドを含有する大腸菌株ＢＬ２１／ＤＥ３に別個に形質転換され、培養物は適切な密度まで増殖され、Ｔ７ポリメラーゼは、ＩＰＴＧによって誘導され、細胞は、追加の期間インキュベートされ、ＶＬＰは前述の実施例に記載されるように回収される。ＲＮＡは、実施例Ｐに記載されるようにＶＬＰから抽出される。

【０１５１】

ＲＮＡ分子は、ＲＮＡの所望の二本鎖領域の融解温度とほぼ等しいか、それより高い温度まで加熱される。次いで、水性混合物を１０℃冷却する。加熱し、同じ温度まで冷却する追加のサイクルを行い、センス鎖とアンチセンス鎖との間により完全なハイブリダイゼーションを達成することができる。バルジした二本鎖ＲＮＡは、一本鎖ＲＮＡを優先的に分解してアニールされていないパッキング配列及び存在し得る任意のリボザイム配列を除去するＲＮＡｓｅ　Ａで処理することができる。

【０１５２】

そのような方法を使用して昆虫を殺滅することを目的とする試験実験において、対照ＶＬＰが設計され、ここでランダム相補的バルジＲＮＡ配列が対照実験で使用された。試験実験において、少なくとも１０匹の昆虫にアルギニンキナーゼを指向するバルジＲＮＡを注入し、対照実験において、同数の昆虫にランダムバルジＲＮＡを注入する。注入後７日に試験実験において、対照実験よりも著しく多い数の昆虫が死滅した。

【０１５３】

実施例Ｚ

複数のｓｈＲＮＡを持つ組成物

次のＲＮＡ鎖、５′－ＰＡＣ－ｓｈＲＮＡ－リボザイム－３′が発現され、式中、ＰＡＣは、高親和性ＭＳ２パッキング配列であり、ｓｈＲＮＡは、センスＲＮＡ－ループ－アンチセンスＲＮＡである。センスＲＮＡは、ＲＮＡｉを介する切断のために標的とされる内因性ＲＮＡ鎖のセクションと同じ配列を持つ１９～２４ｎｔで構成されるＲＮＡ鎖である。アンチセンスＲＮＡは、切断のために標的とされる内因性ＲＮＡ鎖のセクションの逆相補物からなる配列を持つ２１～２６ｎｔで構成されるＲＮＡ鎖である。得られるＲＮＡは、ＭＳ２カプシドにパックされてＶＬＰを形成する。

【０１５４】
場合によって、アンチセンスＲＮＡ鎖は、ＲＮＡｉを介して、そのようなＲＮＡをＶＬＰ内に取り込む宿主の生存に必須の内因性ＲＮＡ鎖を標的とするように設計される。例えば、一例において、アンチセンスＲＮＡ２１ヌクレオチド長は、そのような試験ＶＬＰを使用してそのような昆虫を殺滅することを目的とする試験実験において、アナサ・トリスティスアルギニンキナーゼｍＲＮＡのセクションを標的とするように設計される。ＲＮＡ２１ヌクレオチド長のランダム配列が使用される対照ＶＬＰ実験が行われる。試験実験において、１０匹超の昆虫に試験ＶＬＰを注入する。対照実験において、同数の昆虫に対照ＶＬＰを注入する。注入後７日に試験実験において、対照実験よりも著しく多い数の昆虫が死滅した。

【０１５５】
本明細書に記載される転写物をコードするＤＮＡ挿入断片（配列番号１４）は、高親和性ＭＳ２パッキング配列、続いてセンス鎖ｓｉＲＮＡ、ループ、アンチセンス鎖ｓｉＲＮＡ及びＨＤＶリボザイムを含む。

【０１５６】
そのようなＲＮＡ構築物（配列番号１５）の別の実施形態は、高親和性ＭＳ２パッキング配列の後にＡＴスペーサー、第１の宿主ｍＲＮＡ配列を標的とするセンス鎖ｓｉＲＮＡ、ループ、第１の宿主ｍＲＮＡ配列を標的とするアンチセンス鎖ｓｉＲＮＡ、第２のＡＴスペーサー、第２の宿主ｍＲＮＡ配列を標的とする別のセンス鎖ｓｉＲＮＡ、ループ、第２の宿主ｍＲＮＡ配列を標的とするアンチセンスｓｉＲＮＡ、別のＡＴスペーサー、及びＨＤＶリボザイムを含む。標的とされる第１及び第２の宿主ｍＲＮＡ配列が、同じｍＲＮＡの異なる部分、または異なるｍＲＮＡの部分、またはさらには異なる生物からのｍＲＮＡに特異的な配列であり得ることは当業者には明らかである。最初の例において、第１及び第２のｓｉＲＮＡは、アナサ・トリスティスアルギニンキナーゼ等の単一種内の単一の転写遺伝子の異なる配列に対して標的指向化され得る。あるいは、第１及び第２のｓｉＲＮＡは、単一種内の転写遺伝子を分離するように標的指向化され得、例えば、第１のｓｉＲＮＡはアナサ・トリスティスアルギニンキナーゼを標的とし、第２のｓｉＲＮＡはアナサ・トリスティスシチンシンターゼを標的とする。同様に、第１のｓｉＲＮＡは、アナサ・トリスティスアルギニンキナーゼ（またはシチンシンターゼ、もしくはいくつかの他の必須遺伝子）を標的とし得るが、第２のｓｉＲＮＡは、例えば、エンドウヒゲナガアブラムシ（Ａｃｙｒｔｈｏｓｉｐｈｏｎ　ｐｉｓｕｍ）等の異なる宿主内の同じ遺伝子を標的とする。最後に、第１及び第２のｓｉＲＮＡは、異なる宿主内の異なる必須宿主遺伝子を標的とし得る。これらの組成物のそれぞれを拡張し、ＡＴスペーサー－センス鎖ｓｉＲＮＡ－ループ－アンチセンス鎖ｓｉＲＮＡ－リボザイムモチーフの多くの複製を一緒に連鎖させることによって複数のｓｉＲＮＡを包含することができ、それを使用して単一ＶＬＰ調製物によって１つ以上の種の害虫を制御することができる。

【０１５７】
実施例ＡＡ
半ループｓｈＲＮＡを持つ組成物
いくつかの例において、複数のＭＳ２パッキング配列を含有するＲＮＡテンプレートを発現及びパッキングすることによって、パッキング収量の著しい改善が得られる。そのような構築物の例である配列番号１６は、ＭＳ２パッキング配列の後にセンス鎖ｓｉＲＮＡ配列、続いて短い「半ループ」配列、続いて第２のＭＳ２パッキング配列、続いて別の「半ループ」、続いてアンチセンスｓｉＲＮＡ配列を含む。この配置では、「半ループ」及びＭＳ２パッキング配列の切断は、ＤＩＣＥＲまたは標的宿主生物内の他の処理系によって除去される。

【０１５８】
いくつかの例において、アンチセンスＲＮＡ鎖は、ＲＮＡｉを介して、そのようなＲＮＡを含有するＶＬＰを取り込む宿主の生存に必須の内因性ＲＮＡ鎖を標的とするように設計される。例えば、一例において、アンチセンスＲＮＡ２１塩基長は、そのような試験Ｖ

ＬＰを使用してそのような昆虫を殺滅することを目的とする試験実験において、アナサ・トリスティスアルギニンキナーゼｍＲＮＡのセクションを標的とするように設計される。モックアンチセンスＲＮＡ２１塩基長のランダムＲＮＡ配列が対照実験において使用される、対照ＶＬＰが設計される。試験実験において、１０匹超の昆虫にそのような試験ＶＬＰを注入する。対照実験において、同数の昆虫にそのような対照ＶＬＰを注入する。注入後７日に試験実験において、対照実験よりも著しく多い数の昆虫が死滅した。

【０１５９】

実施例ＡＢ

バルジ及び半ループｓｈＲＮＡを持つ組成物

当業者は、本明細書に記載される配列が、相互に排他的ではなく、様々な構成で組み合わされ得ることを認識するであろう。例えば、実施例Ｙに記載される長い二本鎖ＲＮＡのバルジ構成は、複数のＭＳ２パッキング配列及び／または実施例Ｚ及びＡＡに記載される半ループ構成と組み合わされ得る。そのような構成は、リボザイムを含み得るか、もしくは含まないことがあり、またはそれらはカーゴ分子を処理するＣＲＩＳＰＲもしくはＤＩＣＥＲ等の宿主機能にのみ依存し得る。そのような組成物のひとまとまりの特徴は、それらがインビボで産生及びＶＬＰにパッケージされ得ること、ならびに細胞溶解物をプロテアーゼ、及びアミラーゼ、リパーゼ、及びヌクレアーゼ等の他の酵素で処理して、本明細書に記載されるＲＮＡを含有するＶＬＰを精製するために単純な濾過または沈殿を可能にすることによって容易に精製され得ることである。

【０１６０】

実施例ＡＣ

タンパク質発現のためのＶＬＰの使用

前述の実施例は、様々な形態のＲＮＡｉを介して標的宿主遺伝子発現をサイレンシングまたは低減するための組成物及び方法に焦点を当てた。次の実施例は、ＶＬＰを使用するメッセンジャーＲＮＡの効率的な産生によって標的宿主生物における発現を増加させるための組成物及び方法を開示する。

【０１６１】

細菌（大腸菌）内のタンパク質発現：

自身をＭＳ２カプシドにパッキングするために設計され、トランスフェクション後、大腸菌細胞においてＥＧＦＰを発現することを目的とする構築物は、配列番号１７に表される。このＤＮＡ構築物は、ＢａｍＨＩ制限部位、ＭＳ２パッキング配列変異体の発現を駆動するＴ７プロモーター、続いて（ステムを伸長するために）最初のＣがＧに変更された１０塩基のＭＳ２レプリカーゼ領域、続いてマチュラーゼ遺伝子の最初の９塩基以外の全て、ならびに全カプシドタンパク質がＥＧＦＰのコード配列で置換されたＭＳ２バクテリオファージゲノムの５′末端、続いて１５塩基スペーサー、ＭＳ２パッキング配列の第２の複製、及びそれ自身の５′末端で切断するように設計されたＨＤＶリボザイム、続いてＮｏｔＩ制限部位を含む。ＤＮＡ構築物は、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ部位を介して適合プラスミドにクローン化され、ＭＳ２カプシドタンパク質を（前述の実施例に記載されるように）発現することができるプラスミドを既に含有する大腸菌ＢＬ２１／ＤＥ３宿主細胞に形質転換され得る。細胞をＩＰＴＧで処理し、Ｔ７ポリメラーゼによる転写を誘導し、配列番号１７から産生された９５０塩基転写物を含有するＶＬＰを産生する。ＶＬＰは、実施例Ｏに記載される方法によって精製される。

【０１６２】

大腸菌のナイーブ株がそのようなＶＬＰに曝露される場合、ＶＬＰの取込み及びその後のＥＧＦＰ配列を含有するカーゴ分子の翻訳は、ＥＧＦＰタンパク質に起因する蛍光によって検出され得る。当業者は、関心対象の他の遺伝子がＥＧＦＰの代わりに使用され得ること、及びそれらを含有するＶＬＰを取り込む任意の細菌におけるこれらの遺伝子の発現が、ノーザンブロット分析、もしくはウェスタンブロットによるそのような遺伝子から産生されるタンパク質の検出等の多くの方法によって、または関心対象の遺伝子によってコードされたタンパク質に特異的な酵素活性もしくは他の活性によって証明され得ることを

認識するであろう。ＭＳ２カプシドＶＬＰを直接取り込むことができない細菌において、ＶＬＰのＲＮＡカーゴは、当該技術分野において周知の標準方法によって単離され、標的細菌に別個に形質転換され得る。

【０１６３】

実施例ＡＤ

植物におけるタンパク質発現のためのＶＬＰの使用

同様に、植物における遺伝子発現を指向することができるＶＬＰは、関心対象の遺伝子ならびに１つ以上のＭＳ２パッキング配列を含有するように適切な植物ウイルスを操作することによって構築され得る。

【０１６４】

双子葉植物

双子葉植物の場合、イタリアンカーネーションリングスポットウイルスの特徴を組み込んでいる構築物は、遺伝子発現を指向するためのプラットフォームを提供することができる。そのようなＤＮＡ構築物は、配列番号１８によって表され、ＢａｍＨＩ制限部位の後に、ＭＳ２パッキング配列の発現を駆動するＴ７プロモーター、続いて（ステムを伸長するために）最初のＣがＧに変更された１０塩基のＭＳ２レプリカーゼ領域、続いてウイルス５′アダプターを含有するイタリアンカーネーションリングスポットウイルス（ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００３５００．２）の最初の７７塩基、続いてＥＧＦＰのコード配列、続いて３′キャップ非依存的翻訳エンハンサー（３′ＣＩＴＥ）をコードするウイルスゲノム（ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００３５００．２の塩基４４１０で開始する）の最後の３５１塩基、１５塩基スペーサー、ＭＳ２パッキング配列の第２の複製、ならびにそれ自身の５′末端で切断するように設計されたＨＤＶリボザイム、続いてＮｏｔＩ制限部位を含む。ＤＮＡ構築物は、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ部位を介して適合プラスミドにクローン化され、ＭＳ２カプシドタンパク質を（前述の実施例に記載されるように）発現することができるプラスミドを既に含有する大腸菌ＢＬ２１／ＤＥ３宿主細胞に形質転換され得る。細胞をＩＰＴＧで処理し、Ｔ７ポリメラーゼによる転写を誘導し、配列番号１８から生成された１，２３６塩基転写物を含有するＶＬＰを産生する。ＶＬＰは、実施例Ｏに記載される方法によって精製される。

【０１６５】

双子葉植物がそのようなＶＬＰに曝露される場合、ＶＬＰの取込み及びその後のＥＧＦＰ配列を含有するカーゴ分子の翻訳は、発現されたＥＧＦＰタンパク質の存在に起因する蛍光によって検出され得る。当業者は、関心対象の他の遺伝子がＥＧＦＰの代わりに使用され得ること、及びそれらを含有するＶＬＰを取り込む任意の双子葉植物におけるこれらの遺伝子の発現が、ノーザンブロット分析、もしくはウェスタンブロットによるそのような遺伝子から産生されるタンパク質の検出等の多くの方法によって、または関心対象の遺伝子によってコードされたタンパク質に特異的な酵素活性もしくは他の活性によって証明され得ることを認識するであろう。ＭＳ２カプシドＶＬＰを直接取り込むことができない双子葉植物において、ＶＬＰのＲＮＡカーゴは、当該技術分野において周知の標準方法によって単離され、標的細胞に別個に形質転換され得る。

【０１６６】

単子葉植物

単子葉植物の場合、イタリアンカーネーションリングスポットウイルス及びトウモロコシ壊死性線条ウイルスの３′－ＣＩＴＥの特徴を組み込んでいる構築物は、遺伝子発現を指向するためのプラットフォームを提供することができる。そのようなＤＮＡ構築物は、配列番号１９によって表され、ＢａｍＨＩ制限部位の後に、ＭＳ２パッキング配列変異体の発現を駆動するＴ７プロモーター、続いて（ステムを伸長するために）最初のＣがＧに変更されたＭＳ２レプリカーゼ領域の１０塩基、続いてウイルス５′アダプターを含有するイタリアンカーネーションリングスポットウイルス（ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００３５００．２）の最初の７７塩基、続いてＥＧＦＰのコード配列、続いてトウモロコシ壊死性線条ウイルスの３′－ＣＩＴＥ配列の１１２塩基（Ｎｉｃｈｏｌｓｏｎ，ｅｔ

ａｌ．（２０１３）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ８７（３）：１８７２－８３によって記載されるようなＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００７７２９．１の塩基３８９２～４００３に対応する）、イタリアンカーネーションリングスポットウイルスゲノム（ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００３５００．２の塩基４６７４～４７６０）の最後の８７塩基、１５塩基スペーサー、ＭＳ２パッキング配列の第２の複製、ならびにそれ自身の５′末端で切断するように設計されたＨＤＶリボザイム、続いてＮｏｔＩ制限部位を含む。ＤＮＡ構築物は、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ部位を介して適合プラスミドにクローン化され、ＭＳ２カプシドタンパク質を（前述の実施例に記載されるように）発現することができるプラスミドを既に含有する大腸菌ＢＬ２１／ＤＥ３宿主細胞に形質転換され得る。細胞をＩＰＴＧで処理し、Ｔ７ポリメラーゼによる転写を誘導し、配列番号１９から生成された１，０８４塩基転写物を含有するＶＬＰを産生する。ＶＬＰは、実施例Ｏに記載される方法によって精製される。

【０１６７】

単子葉植物がそのようなＶＬＰに曝露される場合、ＶＬＰの取込み及びその後のＥＧＦＰ配列を含有するカーゴ分子の翻訳は、発現されたＥＧＦＰタンパク質の存在に起因する蛍光によって検出され得る。当業者は、関心対象の他の遺伝子がＥＧＦＰの代わりに使用され得ること、及びそれらを含有するＶＬＰを取り込む任意の単子葉植物におけるこれらの遺伝子の発現が、ノーザンブロット分析、もしくはウェスタンブロットによるそのような遺伝子から産生されるタンパク質の検出等の多くの方法によって、または関心対象の遺伝子によってコードされたタンパク質に特異的な酵素活性もしくは他の活性によって証明され得ることを認識するであろう。ＭＳ２カプシドＶＬＰを直接取り込むことができない単子葉植物において、ＶＬＰのＲＮＡカーゴは、当該技術分野において周知の標準方法によって単離され、標的細胞に別個に形質転換され得る。

【０１６８】

実施例ＡＥ

哺乳類におけるタンパク質発現のためのＶＬＰの使用

哺乳類における遺伝子発現を指向することができるＶＬＰは、関心対象の遺伝子ならびに１つ以上のＭＳ２パッキング配列を含有するように適切なウイルスを操作することによって構築され得る。

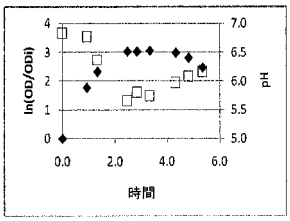
【０１６９】

この実施例において、脳心筋炎ウイルス（ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号Ｍ８１８６１．１）及びｐＲＬ－ＣＭＶ（ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＡＦ０２５８４３．２）の特徴を組み込んでいる構築物は、遺伝子発現を指向するためのプラットフォームを提供することができる。そのようなＤＮＡ構築物は、配列番号２０によって表され、ＢａｍＨＩ制限部位の後に、ＭＳ２パッキング配列変異体の発現を駆動するＴ７プロモーター、続いて（ステムを伸長するために）最初のＣがＧに変更されたＭＳ２レプリカーゼ領域の１０塩基、ウイルスＩＲＥＳを含有する脳心筋炎ウイルスの５６１塩基（Ｂｏｃｈｋｏｖ ａｎｄ Ｐａｌｍｅｎｂｅｒｇ（２００６）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４１：２８３－２９２によって記載される、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号Ｍ８１８６１．１の塩基２７３～８３３に対応する）、続いてＥＧＦＰ及びＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＡＦ０２５８４３．２の塩基２００４～２２４６に対応するＳＶ４０遅延ポリ－ＡシグナルをコードするｐＲＬ－ＣＭＶの２４８塩基、１５塩基スペーサー、ＭＳ２パッキング配列の第２の複製、ならびにそれ自身の５′末端で切断するように設計されたＨＤＶリボザイム、続いてＮｏｔＩ制限部位を含む。ＤＮＡ構築物は、ＢａｍＨＩ及びＮｏｔＩ部位を介して適合プラスミドにクローン化され、ＭＳ２カプシドタンパク質を（前述の実施例に記載されるように）発現することができるプラスミドを既に含有する大腸菌ＢＬ２１／ＤＥ３宿主細胞に形質転換され得る。形質転換された細胞をＩＰＴＧで処理し、Ｔ７ポリメラーゼによる転写を誘導し、配列番号２０から生成された１，６１２塩基転写物を含有するＶＬＰを産生する。ＶＬＰは、実施例Ｏに記載される方法によって精製される。

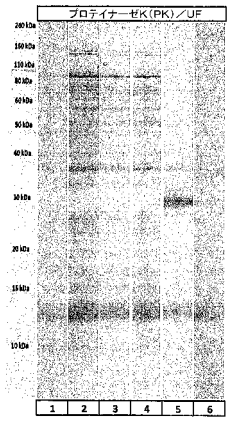
【０１７０】

哺乳類細胞がそのようなＶＬＰに曝露される場合、ＶＬＰの取込み及びその後のＥＧＦＰ配列を含有するカーゴ分子の翻訳は、発現されたＥＧＦＰタンパク質の存在に起因する蛍光によって検出され得る。当業者は、関心対象の他の遺伝子がＥＧＦＰの代わりに使用され得ること、及びそれらを含有するＶＬＰを取り込む任意の哺乳類細胞におけるこれらの遺伝子の発現が、ノーザンブロット分析、もしくはウェスタンブロットによるそのような遺伝子から産生されるタンパク質の検出等の多くの方法によって、または関心対象の遺伝子によってコードされたタンパク質に特異的な酵素活性もしくは他の活性によって証明され得ることを認識するであろう。ＭＳ２カプシドＶＬＰを直接取り込むことができない哺乳類細胞において、ＶＬＰのＲＮＡカーゴは、当該技術分野において周知の標準方法によって単離され、標的細胞に別個に形質転換され得る。

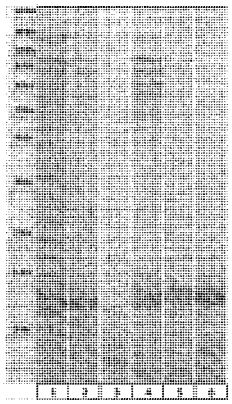
【図１】



【図２】



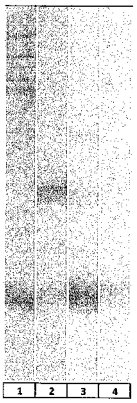
【図３】



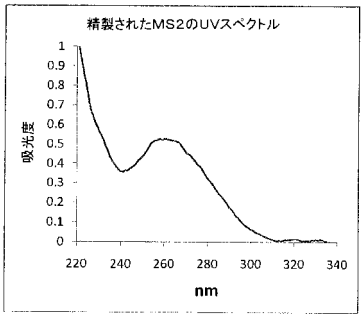
【図４】



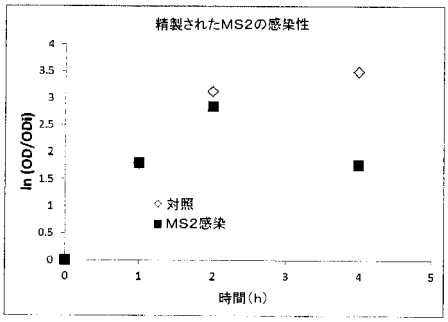
【図５】



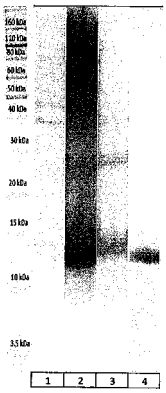
【図６】



【図７】



【図８】



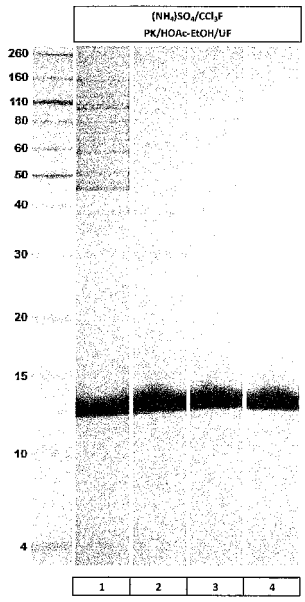
【図９】



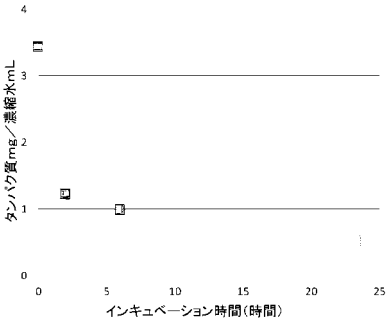
【図１０】



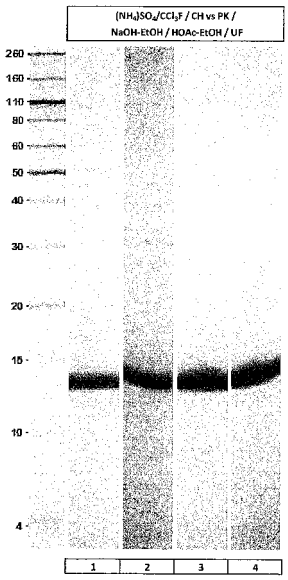
【図１１】



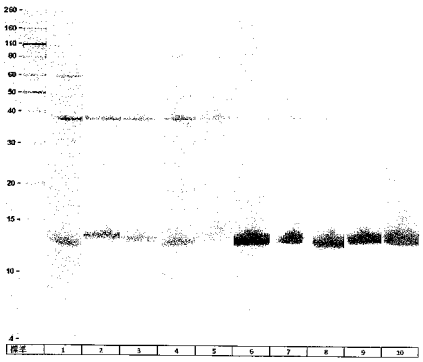
【図１２】



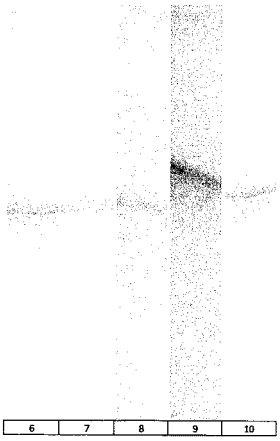
【図１３】



【図１４】



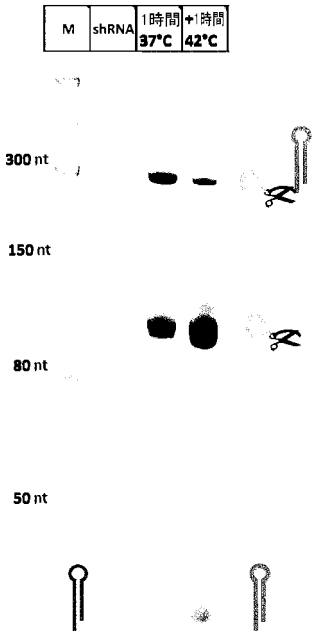
【図１５】



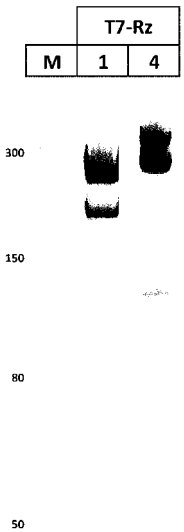
【図１６】



【図１７】



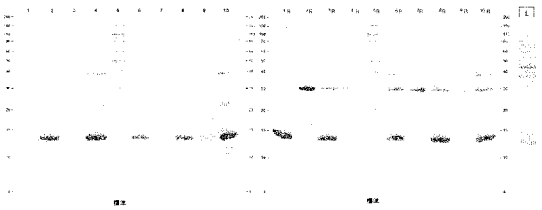
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【配列表】
2016521992000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成28年2月19日(2016.2.19)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも１種の異種カーゴ分子を封入しているプロテアーゼ耐性カプシドを含み、前記カーゴ分子が、カプシド特異的パッキング配列をさらに含む、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）。
【請求項２】
前記異種カーゴ分子が、オリゴリボヌクレオチドを含む、請求項１に記載のＶＬＰ。
【請求項３】
請求項２に記載のオリゴリボヌクレオチドをコードする核酸。
【請求項４】
（ａ）等量の請求項２に記載の第１のＶＬＰ及び請求項２に記載の第２のＶＬＰを混合することと、（ｂ）それらの前記異種カーゴ分子を単離することと、（ｃ）前記異種カーゴ分子をアニールして二本鎖ＲＮＡ分子を形成することと、（ｄ）前記二本鎖ＲＮＡ分子を単離することとを含む、二本鎖ＲＮＡを産生するための方法。
【請求項５】
請求項４に記載の二本鎖ＲＮＡで標的細胞を形質転換することを含む、ｓｉＲＮＡ、ｓ

ｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、及びｍｉＲＮＡを産生するための方法。
【請求項６】
１つ以上の相補領域が、それぞれ、
（ａ）センス鎖ｓｉＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｂ）ループを形成することができるＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｃ）前記センス鎖ｓｉＲＮＡに相補的なアンチセンス鎖ｓｉＲＮＡと
を含み、それらが隣接して配置されている、請求項３に記載の核酸。
【請求項７】
前記相補領域が、１つ以上のリボザイムによって連結されている、請求項６に記載の核酸。
【請求項８】
１つ以上の相補領域が、それぞれ、
（ａ）複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｂ）ループを形成することができるＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｃ）前記複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡに相補的な複数の連鎖アンチセンス鎖ｓｉＲＮＡと
を含み、それらが隣接して配置されている、請求項３に記載の核酸。
【請求項９】
複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡが１～３個の非相補ヌクレオチドによって連結されてバルジＲＮＡを形成する、請求項８に記載の核酸。
【請求項１０】
１つ以上の相補領域がそれぞれ、
（ａ）複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡと、それぞれのすぐ後に続く、宿主細胞ＲＮＡプロセシングのためのセンス鎖ＲＮＡ配列と、そのすぐ後に
（ｂ）ループを形成することができるＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｃ）前記複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡに相補的な複数の連鎖アンチセンス鎖ｓｉＲＮＡと、それぞれのすぐ後に続く、宿主細胞ＲＮＡプロセシングのための前記センス鎖ＲＮＡに相補的なアンチセンス鎖ＲＮＡと
を含み、それらが隣接して配置されている、請求項３に記載の核酸。
【請求項１１】
宿主細胞ＲＮＡプロセシングのための前記ＲＮＡ配列がＣＲＩＳＰＥＲである、請求項１０に記載の核酸。
【請求項１２】
宿主細胞ＲＮＡプロセシングのための前記ＲＮＡ配列がＤＩＣＥＲである、請求項１０に記載の核酸。
【請求項１３】
ループを形成することができる前記ＲＮＡ配列が、１つ以上のリボザイムを含む、請求項６、８、または１０に記載の核酸。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２４】
あるいは、宿主がウイルスレプリカーゼ、及び随意にその補助タンパク質を用いてもトランスフェクトされる前述の方法のうちのいずれかにおいて、レプリカーゼ（及び随意に補助タンパク質）をコードするｍＲＮＡは、関心対象のタンパク質のｍＲＮＡとは異なる第２のカーゴ分子として１つのＶＬＰに含まれ得るか、または関心対象のタンパク質のｍＲＮＡのみを含有するＶＬＰとの組合せで、その次に宿主生物または細胞に導入される別個のＶＬＰに含まれ得る。

[本発明1001]
少なくとも1種の異種カーゴ分子を封入しているプロテアーゼ耐性カプシドを含み、前記カーゴ分子が、カプシド特異的パッキング配列をさらに含む、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）。
[本発明1002]
前記異種カーゴ分子が、オリゴリボヌクレオチドを含む、本発明1001のＶＬＰ。
[本発明1003]
本発明1002のオリゴリボヌクレオチドをコードする核酸。
[本発明1004]
ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、及びｍｉＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡをコードする、本発明1003の核酸。
[本発明1005]
関心対象のタンパク質のｍＲＮＡをコードする、本発明1003の核酸。
[本発明1006]
関心対象のタンパク質の前記ｍＲＮＡに隣接するウイルス5′アダプター及び3′キャップ非依存的翻訳エンハンサーをさらに含む、本発明1005の核酸。
[本発明1007]
関心対象のタンパク質の前記ｍＲＮＡに隣接する、ウイルスまたは細胞の内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）及びポリ（Ａ）シグナルをさらに含む、本発明1005の核酸。
[本発明1008]
少なくとも1つのリボザイムをさらにコードする、本発明1004または1005の核酸。
[本発明1009]
本発明1003の核酸を含むベクター。
[本発明1010]
本発明1009のベクターで安定に形質転換された、プロテアーゼ耐性カプシドに自己集合することができるカプシドタンパク質をコードする核酸を含む宿主細胞。
[本発明1011]
宿主細胞内の異種カーゴ分子を単離及び精製するための方法であって、（ａ）ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ3．4によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドを選択することと、（ｂ）前記宿主細胞を、前記カプシドを形成するカプシドタンパク質をコードする核酸を含む第1のベクター、及びパッキング配列に隣接した異種カーゴ分子をコードする核酸を含む第2のベクターを用いて安定にトランスフェクトすることと、（ｃ）形質転換された細胞が前記異種カーゴ分子をカプシド内封入（ｅｎｃａｐｓｉｄａｔｅ）するカプシドを発現させかつ集合させるのに十分な時間及び条件下で、前記細胞を維持することと、（ｄ）前記異種カーゴ分子を含有するプロテアーゼ耐性カプシドを含む複数のウイルス様粒子（ＶＬＰ）を含む宿主細胞溶解物を得ることと、（ｅ）前記宿主細胞溶解物中にあるがカプシドに組み込まれていない100個の個々のポリペプチドあたり少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、または少なくとも90個が切断され、一方でそのような加水分解前に前記宿主細胞溶解物中に存在する100個のカプシドあたり少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、または少なくとも90個が、加水分解後に無傷のままであるのに十分な時間及び条件下で、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類Ｅ．Ｃ．3．4を使用して前記宿主細胞溶解物を加水分解に供することと、（ｆ）前記ＶＬＰを前記加水分解物から精製することと、（ｇ）前記異種カーゴ分子を前記精製されたＶＬＰから回収することとを含む、前記方法。
[本発明1012]
宿主細胞内の異種カーゴ分子の細胞内産生に続いて、宿主細胞溶解物において加水分解から前記異種カーゴ分子を保護するための方法であって、（ａ）ペプチド結合ヒドロラーゼ分類ＥＣ3．4によって触媒される加水分解に耐性のあるカプシドを選択することと、（ｂ）前記宿主細胞を、前記カプシドを形成するカプシドタンパク質をコードする核酸を含む第1のベクター、及びパッキング配列に隣接した異種カーゴ分子をコードする核酸を含

む第2のベクターを用いて安定にトランスフェクトすることと、（ｃ）形質転換された細胞が前記異種カーゴ分子をカプシド内封入するプロテアーゼ耐性カプシドを含むウイルス様粒子（ＶＬＰ）を発現させかつ集合させるのに十分な時間及び条件下で、前記細胞を維持することと、（ｄ）複数のＶＬＰを含む宿主細胞溶解物を得ることと、（ｅ）ＶＬＰに組み込まれたもの以外のポリペプチドを加水分解するのに十分な時間及び条件下で、ペプチド結合ヒドロラーゼ分類Ｅ．Ｃ．３．４を使用して前記宿主細胞溶解物を加水分解に供して、加水分解物を形成することと、（ｆ）前記加水分解物から前記ＶＬＰを精製することと、（ｇ）前記精製されたＶＬＰから前記異種カーゴ分子を回収することとを含む、前記方法。

[本発明1013]

細菌細胞、植物細胞、哺乳類細胞、または真菌細胞からなる群から選択される、本発明1010、1011、または1012の宿主細胞。

[本発明1014]

ステップ（ｆ）が、（ｉ）硫酸アンモニウムによる第1の沈殿の後に第1の遠心分離を行って、第1の沈殿物及び第1の上清を得ることと、（ｉｉ）前記第1の上清での硫酸アンモニウムによる第2の沈殿の後に第2の遠心分離を行って、少なくとも約90重量％の前記ＶＬＰを含む第2の沈殿物を得ることとを含む、本発明1011または1012の方法。

[本発明1015]

ステップ（ｆ）が、（ｉ）エタノールによる第1の沈殿の後に第1の遠心分離を行って、第1の沈殿物及び第1の上清を得ることと、（ｉｉ）前記第1の上清での硫酸アンモニウムによる第2の沈殿の後に第2の遠心分離を行って、少なくとも約90重量％の前記ＶＬＰを含む第2の沈殿物を得ることとを含む、本発明1011または1012の方法。

[本発明1016]

ステップ（ｆ）が、前記加水分解物を超遠心分離して、少なくとも約90重量％の前記ＶＬＰを含む沈殿物を得ることを含む、本発明1011または1012の方法。

[本発明1017]

前記カプシドが、腸内バクテリオファージＭＳ2カプシドタンパク質のアミノ酸配列（配列番号3）と少なくとも40％の配列同一性を有するウイルスカプシドタンパク質を含む、本発明1011または1012の方法。

[本発明1018]

前記カプシドが、バクテリオファージＭＳ2カプシドタンパク質（配列番号3）を含む、本発明1011または1012の方法。

[本発明1019]

前記異種カーゴ分子が、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、及びｍｉＲＮＡからなる群から選択され、かつバクテリオファージＭＳ2カプシドをさらに含む、本発明1001のＶＬＰを含む組成物。

[本発明1020]

標的細胞の必須遺伝子に対して指向化された本発明1019の異種カーゴ分子を含む、組成物。

[本発明1021]

本発明1020の組成物を前記標的細胞と接触させることを含む、標的細胞を殺滅するための方法。

[本発明1022]

標的植物の必須遺伝子に対して指向化された本発明1019の異種カーゴ分子を含む、組成物。

[本発明1023]

本発明1022の組成物を前記標的植物と接触させることを含む、標的植物を殺滅するための方法。

[本発明1024]

標的動物の必須遺伝子に対して指向化された本発明1019の異種カーゴ分子を含む、組成

物。
[本発明1025]
本発明1024の組成物を前記標的動物と接触させることを含む、標的動物を殺滅するための方法。
[本発明1026]
前記標的動物が昆虫である、本発明1025の方法。
[本発明1027]
前記異種カーゴ分子が、関心対象の遺伝子をコードするｍＲＮＡを含む、本発明1001のＶＬＰを含む組成物。
[本発明1028]
ウイルス5′アダプター及び3′キャップ非依存的翻訳エンハンサーをさらに含む、本発明1027のｍＲＮＡを含む組成物。
[本発明1029]
前記植物細胞を本発明1028の組成物と接触させることを含む、植物細胞内で遺伝子を発現させるための方法。
[本発明1030]
ウイルスまたは細胞の内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）及びポリ（Ａ）シグナルをさらに含む、本発明1027のｍＲＮＡを含む組成物。
[本発明1031]
哺乳類細胞を本発明1030の組成物と接触させることを含む、哺乳類細胞内で遺伝子を発現させるための方法。
[本発明1032]
前記異種カーゴ分子がセンス鎖ＲＮＡを含む、本発明1001のＶＬＰを含む組成物。
[本発明1033]
前記異種カーゴ分子がアンチセンス鎖ＲＮＡを含む、本発明1001のＶＬＰを含む組成物。
[本発明1034]
（ａ）等量の本発明1032及び1033のＶＬＰを混合することと、（ｂ）それらの前記異種カーゴ分子を単離することと、（ｃ）前記異種カーゴ分子をアニールして二本鎖ＲＮＡ分子を形成することと、（ｄ）前記二本鎖ＲＮＡ分子を単離することとを含む、二本鎖ＲＮＡを産生するための方法。
[本発明1035]
本発明1034の二本鎖ＲＮＡで標的細胞を形質転換することを含む、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｓｓｈＲＮＡ、ｌｓｈＲＮＡ、及びｍｉＲＮＡを産生するための方法。
[本発明1036]
1つ以上の相補領域が、それぞれ、
（ａ）センス鎖ｓｉＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｂ）ループを形成することができるＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｃ）前記センス鎖ｓｉＲＮＡに相補的なアンチセンス鎖ｓｉＲＮＡと
を含み、それらが隣接して配置されている、本発明1003の核酸。
[本発明1037]
前記相補領域が、1つ以上のリボザイムによって連結されている、本発明1036の核酸。
[本発明1038]
相補領域が、
（ａ）複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｂ）ループを形成することができるＲＮＡと、そのすぐ後に
（ｃ）前記複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡに相補的な複数の連鎖アンチセンス鎖ｓｉＲＮＡと
を含む、本発明1003の核酸。
[本発明1039]

複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡが1～3個の非相補ヌクレオチドによって連結されてバルジＲＮＡを形成する、本発明1038の核酸。

[本発明1040]

相補領域がそれぞれ、

（ａ）複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡと、それぞれのすぐ後に続く、宿主細胞ＲＮＡプロセシングのためのセンス鎖ＲＮＡ配列と、そのすぐ後に

（ｂ）ループを形成することができるＲＮＡと、そのすぐ後に

（ｃ）前記複数の連鎖センス鎖ｓｉＲＮＡに相補的な複数の連鎖アンチセンス鎖ｓｉＲＮＡと、それぞれのすぐ後に続く、宿主細胞ＲＮＡプロセシングのための前記センス鎖ＲＮＡに相補的なアンチセンス鎖ＲＮＡと

を含む、本発明1003の長鎖ＲＮＡ。

[本発明1041]

宿主細胞ＲＮＡプロセシングのための前記ＲＮＡ配列がＣＲＩＳＰＲである、本発明1040の核酸。

[本発明1042]

宿主細胞ＲＮＡプロセシングのための前記ＲＮＡ配列がＤＩＣＥＲである、本発明1040の核酸。

[本発明1043]

ループを形成することができる前記ＲＮＡ配列が1つ以上のリボザイムを含む、本発明1036、1038、または1040の核酸。

[本発明1044]

配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、及び配列番号20からなる群から選択される、本発明1003の核酸。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/041111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K9/50 (2014.01)
CPC - C12N2770/28134 (2014.09)
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)
IPC(8) - A61K 9/50, 31/7088, 39/12 (2014.01)
USPC - 424/189.1; 435/320.1; 536/23.72

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - C07K 16/10; C12N 2770/28122, 2770/28134 (2014.09)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, Google Scholar, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	WO 2012/061445 A2 (FINN et al) 10 May 2012 (10.05.2012) entire document	11-14, 16 15, 17, 18
Y	US 2012/0174263 A1 (SAUNDERS et al) 05 July 2012 (05.07.2012) entire document	1-10,19-33, 36-38, 40, 43
Y	US 2012/0301494 A1 (CHENG et al) 29 November 2012 (29.11.2012) entire document	1-10, 19-33, 36, 37, 40, 43
Y	US 2005/0260758 A1 (RASOCHOVA et al) 24 November 2005 (24.11.2005) entire document	15
Y	WO 02/056905 A2 (RENNER et al) 25 July 2002 (25.07.2002) entire document	17, 18
Y	US 2008/0312178 A1 (BAULCOMBE et al) 18 December 2008 (18.12.2008) entire document	20-26, 32, 33
Y	WO 2012/051152 A2 (RYAN et al) 19 April 2012 (19.04.2012) entire document	8
Y	US 2008/0171361 A1 (SCHEETS et al) 17 July 2008 (17.07.2008) entire document	6, 28
Y	CASTANOTTO et al. "Functional siRNA expression from transfected PCR products," RNA, 01 November 2002, (01.11.2002), Vol. 8, Pgs. 1454-1460. entire document	36, 37, 43
Y	SASAKI et al. "Translation Initiation at the CUU Codon Is Mediated by the Internal Ribosome Entry Site of an Insect Picorna-Like Virus In Vitro," Journal of Virology, Vol. 73, No. 2, Pgs. 1219-1226. entire document	7, 30, 31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 October 2014	10 NOV 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/041111

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2013/096866 A2 (ARHANCET et al) 27 June 2013 (27.06.2013) entire document	44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/041111

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.: 34, 35
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:

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.:

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.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 アーハンセット ジュアン ペドロ ハンベルト
アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス フォレスト パーク アベニュー ４３２０ スイート ３０３
(72)発明者 アーハンセット ジュアン ピー.
アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス フォレスト パーク アベニュー ４３２０ スイート ３０３
(72)発明者 デラニー キンバリー
アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス フォレスト パーク アベニュー ４３２０ スイート ３０３
(72)発明者 ホール キャスリーン ビー.
アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス フォレスト パーク アベニュー ４３２０ スイート ３０３
(72)発明者 サマーズ ニーナ
アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス フォレスト パーク アベニュー ４３２０ スイート ３０３
(72)発明者 オーツ エドワード
アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス フォレスト パーク アベニュー ４３２０ スイート ３０３

Ｆターム(参考) 4H045 AA10 AA30 CA01 EA20 FA74