

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-511992

(P2023-511992A)

(43)公表日 令和5年3月23日(2023.3.23)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全52頁)

(21)出願番号	特願2022-545423(P2022-545423)	(71)出願人	522296723
(86)(22)出願日	令和3年1月29日(2021.1.29)		ティリス セラピューティクス, エセ.
(85)翻訳文提出日	令和4年9月8日(2022.9.8)		エレ.
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/052204		TYRIS THERAPEUTICS
(87)国際公開番号	WO2021/152147		, S. L.
(87)国際公開日	令和3年8月5日(2021.8.5)		スペイン王国 モンカーダ 4 6 1 1 3 ,
(31)優先権主張番号	20382063.4		セー. サンタ セシリア ヌーメロ 8 バ
(32)優先日	令和2年1月31日(2020.1.31)		ホ イズキエルダ
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		C. Santa Cecilia no 8
			Bajo izq, 4 6 1 1 3 MONC
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	110000659
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士法人広江アソシエイツ特許事務所
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(72)発明者	オヤルサバル サンタマリナ, フレン
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		スペイン王国 マドリード 2 8 0 0 3 ,
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		最終頁に続く
	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 修飾ヌクレオチドを用いた閉じた直鎖DNA

(57)【要約】

本発明は、本発明はヘアピンループにより両末端にて共有結合的に閉じられた目的の二本鎖DNA配列を含むステム領域からなり、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含む、閉じた直鎖DNA(cLDNA)を提供する。本発明はまた、治療時、特に遺伝子治療時に使用するためのcLDNA、及びcLDNAを含む医薬組成物、及びcLDNAを作製するための方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘアピンループにより両末端にて共有結合的に閉じられた目的の二本鎖 DNA 配列を含むステム領域からなり、少なくとも 2 個の修飾ヌクレオチドを含む、閉じた直鎖 DNA (c l DNA)。

【請求項 2】

－前記少なくとも 2 個の修飾ヌクレオチドが、前記 c l DNA の一方の若しくは両方の一本鎖末端ループに位置するか、

－少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドが前記一本鎖末端ループのうち 1 つに位置し、少なくとも別の修飾ヌクレオチドが前記 c l DNA のアダプタのステム領域を形成する前記鎖のうち 1 つに位置するか、又は代替的には、

－前記少なくとも 2 個の修飾ヌクレオチドが前記 c l DNA のアダプタのステム領域を形成する一方の若しくは両方の鎖に存在する、

請求項 1 に記載の c l DNA。

10

【請求項 3】

前記少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドが前記ステム領域を形成する前記鎖のうち 1 つに存在する場合、前記修飾ヌクレオチドが、

－前記ループを形成する最後のヌクレオチドに対し、1～5 位のヌクレオチドによって定義された鎖領域内に位置するか、又は代替的には、

－前記目的の DNA 配列の一部を形成する最後のヌクレオチドに対し、1～10 位のヌクレオチドによって定義された鎖領域内に位置する、請求項 2 に記載の c l DNA。

20

【請求項 4】

前記少なくとも 2 個の修飾ヌクレオチドが、2-アミノデオキシアデノシン、5-メチルデオキシシチジン、チオホスファートヌクレオチド、イノシンヌクレオチド、ロック核酸 (LNA) ヌクレオチド、L-DNA ヌクレオチド、8-オキソデオキシアデノシンヌクレオチド、及び 5-フルオロデオキシウラシルヌクレオチドからなる群から独立して選択される、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の c l DNA。

【請求項 5】

例えば、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個又は 20 個の修飾ヌクレオチドなど、3～20 個の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の c l DNA。

30

【請求項 6】

少なくとも 2 個の LNA ヌクレオチドを含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の c l DNA。

【請求項 7】

2 個の LNA ヌクレオチドを含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の c l DNA。

【請求項 8】

少なくとも 2 個のチオホスファートヌクレオチドを含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の c l DNA。

【請求項 9】

前記ステム領域が、前記目的の DNA 配列に隣接している 2 つの制限部位を含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の c l DNA。

40

【請求項 10】

前記 c l DNA がプライマーゼ認識部位を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の c l DNA。

【請求項 11】

前記ループのうち少なくとも 1 個がプライマーゼ認識部位を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の c l DNA。

【請求項 12】

前記目的の配列が逆位末端反復 (ITR) を含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記

50

載の c l D N A。

【請求項 13】

前記目的の D N A 配列が発現カセットを含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の c l D N A。

【請求項 14】

治療時、例えば遺伝子治療、遺伝子編集、細胞治療（例えば、C A R - T）、ワクチン及びモノクローナル抗体の発現から選択される、特に D N A に基づく治療時に使用するための、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の c l D N A。

【請求項 15】

治療有効量の請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の c l D N A 及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 16】

請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の少なくとも 2 個の修飾ヌクレオチドを含む c l D N A を作製するためのプロセスであって、

a) 目的の D N A 配列を含む鋳型 D N A を提供する工程；

b) 工程 (a) の前記鋳型 D N A から D N A を増幅させ、前記目的の D N A 配列の反復を含む鎖状体 D N A を作製する工程であって、前記目的の繰り返された D N A のそれぞれ 1 個が制限部位に隣接する、工程；

c) (c1) 前記鎖状体 D N A と少なくとも 1 個の制限酵素とを接触させ、それによって前記目的の D N A 配列をそれぞれ含有している複数の開いた二本鎖 D N A 断片を作製する工程と、(c2) 前記開いた二本鎖 D N A 断片の末端のそれぞれ 1 つでヘアピン D N A アダプタを結合させる工程であって、前記アダプタのそれぞれ 1 個が少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを有するか、又は代替的には前記 D N A 断片に結合した前記アダプタの 1 個のみが、前記少なくとも 2 個の修飾ヌクレオチドを含む、工程と、によって、工程 (b) で作製された前記増幅 D N A を用いて閉じた直鎖 D N A を生成する工程；並びに

d) 工程 (c) で作製された前記閉じた直鎖 D N A を精製する工程を含む、プロセス。

【請求項 17】

目的の D N A 配列を含む前記鋳型 D N A が c l D N A である、請求項 16 に記載のプロセス。

【請求項 18】

前記鋳型 c l D N A がプライマーゼ認識部位を含まない、請求項 17 に記載のプロセス。

【請求項 19】

工程 (b) の増幅が、ランダムサイクル増幅 (R C A) により実施される、請求項 16 ～ 18 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 20】

前記ヘアピン D N A アダプタが、長さにして 6 ～ 600 ヌクレオチドである、請求項 16 ～ 19 のいずれか一項に記載の c l D N A を作製するためのプロセス。

【請求項 21】

前記ヘアピン D N A アダプタが、長さにして 6 ～ 200 ヌクレオチドである、請求項 16 ～ 20 のいずれか一項に記載の c l D N A を作製するためのプロセス。

【請求項 22】

請求項 16 ～ 21 のいずれか一項に記載のプロセスによって得られる、閉じた直鎖 D N A。

【請求項 23】

担体及び請求項 1 ～ 14 又は 22 のいずれか一項に記載の c l D N A を含む組成物。

【請求項 24】

前記担体が遺伝子ベクターである、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記遺伝子ベクターがウイルス性ベクターである、請求項 24 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

前記遺伝子ベクターが非ウイルス性ベクターである、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記非ウイルス性ベクターがポリカチオン性ポリマーである、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

ポリマー及び請求項 1～14 又は 22 のいずれか一項に記載の c l D N A を含むポリプレックス。

【請求項 29】

前記ポリマーがポリカチオン性ポリマーである、請求項 28 に記載のポリプレックス。

10

【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、2020 年 1 月 31 日に出願された欧州特許出願第 20382063.4 号明細書の恩典を主張する。

【0002】

本発明は、核酸の分野に属する。特に、本発明は修飾ヌクレオチドを含有する閉じた直鎖 D N A に関する。本発明の閉じた直鎖 D N A は、治療目的では特に有用である。

【背景技術】

20

【0003】

遺伝子治療は、いくつかの疾患の処置にとって極めて有望である。これは、遺伝物質を標的とするヒト細胞の核に、希望通りに移ることに基づいている。遺伝子送達系は、設計上、ウイルス性又は非ウイルス性であり得る。ウイルス性 D N A ベクターと比較すると、非ウイルス性導入遺伝子送達系は安全な遺伝子導入及びワクチン設計アプローチを提供し、宿主における炎症反応及び免疫応答を誘発する可能性が少なく、より大きな導入遺伝子能力を有し、かつ貯蔵しやすい。

【0004】

ただし、非ウイルス性ベクターの有効性は非常に制限されており、これがクリニックへの導入を妨げている。例えば、遺伝子治療に従来のプラスミド D N A ベクターを使用することで、このベクターが含有する細菌配列によって有害な免疫応答を誘発する可能性があり、それらの分子サイズが大きいことから、バイオアベイラビリティが損なわれる。したがって、新しいタイプの非ウイルス性 D N A 構築物が近年開発されている。

30

【0005】

この点について、免疫原性の大部分の細菌骨格を含まず、目的の D N A 配列のみを運搬する小直鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) の使用が広範囲で研究されている。ただし、ODN は、それらの潜在的な治療能力を大幅に制限する、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによる分解を受けがちである。

【0006】

ODN の安定性を向上させるため、先行技術ではいくつかの戦略に従っている。一方では、開いた直鎖 ODN は、インビボでのそれらの残存を確実にするために化学的に修飾されている。例えば、L-DNA ヌクレオチドは開いた終端に含まれており、核酸分解からこれらを保護する (非特許文献 1)。しかし、試験結果はこれまでのところ穏当なものであり、これらの開いた D N A 構造内に修飾ヌクレオチドを加えることでオフターゲットの副作用を引き起こすことが多い。

40

【0007】

ODN 安定化の別の戦略は、二本鎖領域が 2 本の一本鎖ループと隣接して保護され、それによってダンベル形状の分子を形成する、閉じた直鎖 D N A (c l D N A) 分子の形成からなる。いずれかの開いた末端が c l D N A に存在しないことで、c l D N A は核酸分解に高度に耐性がある状態となる (非特許文献 2)。

50

【0008】

ステム長及びループサイズを修飾することによって、又はステムループ領域内部に配列モチーフを導入することによって、c l DNAの安定性をさらに向上させる試みもまた存在している。例えば、このループを閉じる際にシトシン-グアニン対が存在していることは、ループの安定性の増加に関連している。ただし、CGモチーフは非常に有効性が高い免疫賦活性配列であることが知られており、免疫系の活性化が避けられるべきである遺伝子治療用ベクターの使用を大幅に妨げている。

【0009】

したがって、望ましくない免疫関連の副作用を引き起こすことなく、目的の特定のいずれかの遺伝子をインビボで発現する上で好適である、安定したc l DNAに対する必要性が依然として存在している。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Kapp K et al., "EnanDIM—a novel family of L-nucleotide-protected TLR9 agonists for cancer immunotherapy" 2019, J Immunother Cancer., vol 7 (1), pp. 5

【非特許文献2】Heinrich J. et al., "Linear closed mini DNA generated by the prokaryotic cleaving-joining enzyme TelN is functional in mammalian cells" 2002, J Mol Med, vol. 80 (10), pp. 648-54

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明者らは、遺伝子治療などのDNAに基づく治療での使用に好適である閉じた新規直鎖DNA (c l DNA)を開発した。特に、本発明のc l DNAは、分子の閉じた構造とともに、DNAに基づく治療で 사용되는場合にc l DNAの効率性を向上させる、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含む。

30

【0012】

驚くべきことに、本発明者らは、2個又は複数のヌクレオチド修飾を組み込んだ場合であっても、安定したc l DNAが作製されることを見出した。c l DNAは非常に小さな分子でありその安定性及び機能性はそれらに特有であるダンベル様形状に大きく左右されることから、これは全く予想していなかったことであった。先行技術は、c l DNA構造を維持する脆弱な分子間相互作用を妨害しないよう、c l DNAの安定性を増加させようとするほとんどの試みが、ヌクレオチド配列の同一性の小さな修飾に又は1個のみのヌクレオチド修飾の添加に基づいていることを示している。

【0013】

本発明のc l DNAは、遺伝子治療などのDNAに基づく治療で疾患を処置するため、先行技術にて開示されている構成に対して、非常に有用な代替物を構成する。

40

【課題を解決するための手段】

【0014】

したがって、第1の態様では、本発明はヘアピンループにより両末端にて共有結合的に閉じられた目的の二本鎖DNA配列を含むステム領域からなり、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含む閉じた直鎖DNA (「c l DNA」)を提供する。

【0015】

有利には、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドは、合成されるc l DNAの特性を調節するために、一本鎖ループ又はステムの特定領域などの分子の種々の領域に導入されてもよい。

50

【0016】

少なくとも2個の修飾オリゴヌクレオチドを含む本発明のc l D N Aは、天然に存在するそれらの対応物に対して優位であるいくつかの都合の良い特性を有する。この特性は例えば、トランスフェクション効率性の増加、発現効率性の増加、良好な安定性、バイオアベイラビリティ、機能的残存率、分解に対する耐性の増加、及び中に含有されている目的とする配列の全体的な機能的性能などである。以下の実施例は、目的とする配列の機能的性能に関して、修飾ヌクレオチドを含有するいくつかのc l D N Aが驚くべき程度で向上しており、この場合、概念の実証を提供するためにこの配列がルシフェラーゼ活性を有していたことを実証している。

【0017】

本発明のc l D N Aは、例えば治療又は診断指標のための複数の指標に有用である。第2の態様では、本発明は治療時に使用するための、第1の態様による閉じた直鎖D N Aを提供する。本発明の別の態様では、診断時に使用するための、第1の態様によるc l D N Aを提供する。

【0018】

第3の態様では、本発明は第1の態様による治療有効量の閉じた直鎖D N A、及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【0019】

第4の態様では、本発明はこの第1の態様による少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含む閉じた直鎖D N Aを作製するためのプロセスを提供する。このプロセスは、a) 目的のD N A配列を含む鋳型D N Aを提供する工程；b) 工程a) の鋳型D N AからD N Aを増幅させ、目的の鋳型D N Aの反復を含む鎖状体D N Aを作製する工程であって、目的の繰り返されたD N A配列のそれぞれが制限部位に隣接している、工程；c) (c 1) 鎖状体D N Aと少なくとも1個の制限酵素とを接触させ、それによって目的のD N A配列をそれぞれ含有している複数の開いた二本鎖D N A断片を作製する工程と、(c 2) 開いた二本鎖D N A断片の末端のそれぞれにおいて、ヘアピンD N Aアダプタを結合させる工程であって、アダプタのそれぞれ1個が少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを有するか、又は代替的にはD N A断片に結合したアダプタのうち1個のみが少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含む、工程と、により工程(b) で作製された増幅D N Aを用いて閉じた直鎖D N Aを産生する工程；及びd) 工程c) で作製された閉じた直鎖D N Aを精製する工程、を含む。

【0020】

第5の態様では、本発明は第4の態様によるプロセスで得ることができる閉じた直鎖D N Aを提供する。本発明はまた、治療時又は診断時に使用するための、第4の態様によるc l D N Aを提供する。

【0021】

第6の態様では、本発明は少なくとも1個の修飾ヌクレオチド、リガーゼ、及び任意にはその取扱説明書を含むヘアピンD N Aアダプタを含むc l D N Aを作製するためのキットを提供する。

【0022】

c l D N Aは、それ自体のみで、又は遺伝子ベクター若しくは担体とともに、又は所望の治療効果に寄与する他のD N A分子とともに提供されてもよい。c l D N Aと、ウイルス性ベクター若しくは非ウイルス性ベクター、ナノ粒子、又は他の何らかの担体との組合せは、例えば所望の細胞又は組織を標的とするためには都合が良いものであり得る。実際のところ、ある特定の非ウイルス性ベクターと修飾ヌクレオチドを含有するc l D N Aにより形成された複合体（本明細書ではポリプレックスとも呼ばれる）は、所望の細胞に対するc l D N Aのトランスフェクション効率性又は生理学的条件でのc l D N Aの放出プロファイルなどのある特性をさらに向上させ得る。本発明のc l D N Aを用いてポリプレックスを形成する上で適している非限定的な非ウイルス性ベクターは、ポリカチオン性ポリマーである。

10

20

30

40

50

【0023】

したがって、第7の態様では、本発明は、本発明の第1の態様又は第4の態様に記載のc l DNA及び担体を含む組成物を提供する。

【0024】

第8の態様では、本発明は例えばポリカチオン性ポリマーなどのポリマー、及び本発明の第1の態様又は第4の態様に記載のc l DNAを含むポリプレックスを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1A】目的のDNA配列に隣接している2つのステムループアダプタからなる、本発明による閉じた直鎖DNAの構造を示す。

10

【図1B】本発明のc l DNAを形成するアダプタの構造をより詳細に示し、アダプタのステムは、目的のDNA配列に連結されるステム末端の近位領域(1)、及び一本鎖ループにより閉じられるステム末端の遠位領域(2)を表す。

【図2】カスタマイズされたヘアピンアダプタを用いて調製されたc l DNAの調製スキームを示す。エンドヌクレアーゼ制限部位(例えば、B s a I制限部位)によってそれぞれの側面にて隣接している目的の配列(例えば、ルシフェラーゼ又はG f p)を含むDNA断片(A)を、特異的な制限エンドヌクレアーゼを用いて処理し(B)、所望のヘアピンアダプタ(例えば、イタリック体で示されている5ホスホチオアート(ph o s p h o t h i o a t e d)型ヌクレオチドを含有する配列番号7のオリゴ37)及びエキソヌクレアーゼを用いて結合し、修飾ヌクレオチドを含むc l DNAを得る(C)。

20

【図3A】o DNA 17の品質管理パラメータであって、アガロースゲルの電気泳動(M 1、スーパーコイルDNAラダーマーカ(T A K A R A) : 3 5 8 5 A ; M 2、1 k BのDNAラダー T I A G E N M D 1 1 1 ; レーン11、o DNA 17)を示す。

【図3B】o DNA 17の品質管理パラメータであって、グレイスケール分析を示す。

【図3C】o DNA 17の品質管理パラメータであって、陰イオン交換クロマトグラフィー-H P L Cを示す。

【図3D】o DNA 17の品質管理パラメータであって、サンガー法シーケンシングを示す。

【図4A】o DNA 19の品質管理パラメータであって、アガロースゲルの電気泳動(M 1、スーパーコイルDNAラダーマーカ(T A K A R A) : 3 5 8 5 A ; M 2、1 k BのDNAラダー T I A G E N M D 1 1 1 ; レーン2、o DNA 19)を示す。

30

【図4B】o DNA 19の品質管理パラメータであって、グレイスケール分析を示す。

【図4C】o DNA 19の品質管理パラメータであって、陰イオン交換クロマトグラフィー-H P L Cを示す。

【図4D】o DNA 19の品質管理パラメータであって、サンガー法シーケンシングを示す。

【図5A】o DNA 41の品質管理パラメータであって、アガロースゲルの電気泳動(M 1、スーパーコイルDNAラダーマーカ(T A K A R A) : 3 5 8 5 A ; M 2、1 k BのDNAラダー T I A G E N M D 1 1 1 ; レーン5、o DNA 41)を示す。

【図5B】o DNA 41の品質管理パラメータであって、グレイスケール分析を示す。

40

【図5D】o DNA 41の品質管理パラメータであって、サンガー法シーケンシングを示す。

【図6A】P E Iを使用し、天然オリゴヌクレオチド(o DNA 15、o DNA 4、又はo DNA 17)又は修飾オリゴヌクレオチド(o DNA 37、o DNA 28、o DNA 19、又はo DNA 22)を含むc l DNAを用いてトランスフェクトしたH a C a T細胞における、トランスフェクションの24時間後のルシフェラーゼ活性を示す。* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、*** p < 0 . 0 0 1、**** p < 0 . 0 0 0 1、天然o DNA対天然o DNAに対応する修飾o DNA(15対37、4対28、及び17対19又は22)、S t u d e n tのt検定(n = 3)。

【図6B】P E Iを使用し、天然オリゴヌクレオチド(o DNA 15、o DNA 4、又は

50

oDNA17)又は修飾オリゴヌクレオチド(oDNA37、oDNA28、oDNA19、又はoDNA22)を用いてトランスフェクトしたHaCaT細胞における、トランスフェクションの48時間後のルシフェラーゼ活性を示す。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 、 $****p<0.0001$ 、天然oDNA対天然oDNAに対応する修飾oDNA(15対37、4対28、及び17対19又は22)、Studentのt検定($n=3$)。

【図7A】PEIを使用し、天然オリゴヌクレオチド又は修飾オリゴヌクレオチドを含むcLDNAを用いてトランスフェクトしたHaCaT細胞についての、ルシフェラーゼ活性レベル対時間の時間発展であり、ペアワイズ比較では天然対修飾はoDNA15対oDNA37を示す。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 、 $****p<0.0001$ 、2日目の値対1日目の値、Studentのt形態($n=3$)。

【図7B】PEIを使用し、天然オリゴヌクレオチド又は修飾オリゴヌクレオチドを含むcLDNAを用いてトランスフェクトしたHaCaT細胞についての、ルシフェラーゼ活性レベル対時間の時間発展であり、ペアワイズ比較では天然対修飾はoDNA4対oDNA28を示す。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 、 $****p<0.0001$ 、2日目の値対1日目の値、Studentのt形態($n=3$)。

【図7C】PEIを使用し、天然オリゴヌクレオチド又は修飾オリゴヌクレオチドを含むcLDNAを用いてトランスフェクトしたHaCaT細胞についての、ルシフェラーゼ活性レベル対時間の時間発展であり、ペアワイズ比較では天然対修飾はoDNA17対oDNA19又はoDNA22を示す。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 、 $****p<0.0001$ 、2日目の値対1日目の値、Studentのt形態($n=3$)。

【図8】天然オリゴヌクレオチド(oDNA15、oDNA4)又は修飾オリゴヌクレオチド(oDNA37、oDNA28、oDNA29)を含む、ポリマーCXP-37及びcLDNAにより形成されたポリプレックスから、複合型cLDNA(ポリマーでの競合)を放出する生理学的条件を再現する、8U/mLのヘパリンを使用した12時間のインキュベーション後のcLDNAカーゴの放出を示す。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 、 $****p<0.0001$ 、天然oDNA対天然oDNAに対応する修飾oDNA(15対37、4対28又は29)、Studentのt検定($n=3$)。

【図9A】PAspDET/DIDPAの合成経路を示す。

【図9B】ポリ(β -ベンジル-L-アスパルタート)(PBLA)の合成を示す。

【図9C】PAsp(DET/DIIPA)-化合物CXP037Aの合成を示す。

【図10】PBLAの ^1H NMRスペクトラムを示す。 ^1H NMR(DMSO- d_6): $\delta=0.79$ (t, $J=7.58\text{ Hz}$, 3H), $1.13-1.37$ (m, 4H), $2.96-2.52$ (m, 2H, CH_2), 4.61 (s, 1H, CH), 5.01 (s, 2H, ベンジル CH_2), 7.27 (s, 5H, アリールCH), 8.15 (s, 1H, NH)。

【図11】CXP037の ^1H NMRスペクトラムを示す。 ^1H NMR(D_2O): $\delta=0.84$ (t, $J=7.68\text{ Hz}$, 3H), 1.32 (m, 3H, CH_3), 2.82 (brs, 2H, CH_2), $3.08-3.79$ (m, 2H, CH_2)。

【図12】MW判定用のCXP037A分析のSEC-MALS-RIを示す。MW=14000Da(1.03)。

【図13】CXP037のpKa判定用の電位差測定滴定曲線を示す。計算されたpKa: 5, 370/8, 952。

【図14】本発明のcLDNAを調製するための目的の配列を含有するeGFPプラスミド(配列番号16を有するプラスミド)の断片の表示を示す。表示された断片は、対応するプロモータ及びエンハンサなどの追加配列とともに、目的の配列(この場合、GFPをコードする配列)を含む。目的の配列は、BsaI制限部位及びプロテオメラーゼ標的配列に隣接している。

10

20

30

40

50

【図 15】本発明の c l D N A を調製するための目的の配列を含有する、L u c - I T R（配列番号 18 を有するプラスミド）の断片の表示を示す。表示された断片は、対応するプロモータ及びエンハンサなどの追加配列、並びに A V V 2 - I T R とともに、目的の配列（この場合、ルシフェラーゼをコードする配列）を含む。目的の配列は、B s a I 制限部位及びプロテオメラーゼ標的配列に隣接している。

【図 16】o D N A 37 I T R のアガロースゲル電気泳動（M, D L 3000 ラダー、レーン 14、o D N A 37 I T R）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

発明の詳細な説明

本出願において本明細書で使用される全ての用語は、特段明記しない限り、当該技術分野で既知である一般的な意味で理解されるものとする。本出願で使用されるある特定の用語についての他のさらに具体的な定義が以下に規定される。また、定義はより広範な定義を提供すると特段明確に説明しない限り、この定義は本明細書及び特許請求の範囲全体を通して一様に適用されることを意図している。

【0027】

本明細書で使用される場合、不定冠詞「a」及び「an」は、「少なくとも 1 つ」又は「1 つ又は複数」と同義である。特段指示しない限り、本明細書で使用される「the」などの定冠詞は、名詞の複数形も含む。

【0028】

本発明は、第 1 の態様にて、本発明はヘアピンループにより両末端にて共有結合的に閉じられた目的の二本鎖 DNA 配列を含むステム領域からなり、少なくとも 2 個の修飾ヌクレオチドを含む、閉じた直鎖 DNA（「c l D N A」）を提供する。

【0029】

本明細書で使用される場合、用語「閉じた直鎖 DNA」又は「c l D N A」は、ヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能とする条件下で「ダンベル」又は「イヌ用の骨」形状の構造を形成する、一本鎖の共有結合的に閉じられた DNA 分子を指す。したがって、一本鎖 DNA 分子により c l D N A が形成されていても、同一分子内の 2 つの相補的配列のハイブリダイゼーションにより「ダンベル」構造を形成することで、2 つの一本鎖ループに隣接する二本鎖中間セグメントからなる構造を産生する。当業者は、通例の分子生物学技術を使用し、開いた又は閉じた二本鎖 DNA から c l D N A を産生する方法を理解している。例えば、当業者は例えばリガーゼの作用によって開いた二本鎖 DNA の両末端にヘアピン DNA アダプタを結合することで c l D N A を産生可能であることを理解している。「ヘアピン DNA アダプタ」は、2 つの相補的配列のハイブリダイゼーションによりステムループ構造を形成する一本鎖 DNA を指す。この形成されたステム領域は、一本鎖ループにより一方の末端で閉じられ、もう一方の末端で開かれている。

【0030】

「目的の配列」は、例えば発現カセットなどの正確な遺伝子発現に必要とされている他の配列とともに、目的の遺伝子をコードする最小限必要な配列を含む、二本鎖 DNA 断片として理解されている。目的の配列は、逆位末端反復（i n v e r t e d t e r m i n a l r e p e a t : I T R）など、発現カセットに隣接している他の配列を追加的に含んでもよい。

【0031】

用語「ヌクレオシド」は、例えばリボース又はデオキシリボースなど、糖の C - 1 ' 炭素に結合する塩基からなる化合物である。用語「ヌクレオチド」は、モノマー単位又はポリヌクレオチド内部のヌクレオシドのリン酸エステルを指す。

【0032】

「修飾ヌクレオチド」は、塩基、糖又はリン酸基の修飾による化学的に修飾された、又はその構造に非天然部分を組み込む、いずれかのヌクレオチド（例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン及びチミジン）である。したがって、修飾ヌクレオチドは、修飾に応

10

20

30

40

50

じて自然発生してもよく、又は自然発生しなくてもよい。

【0033】

本明細書で使用される場合、修飾ヌクレオチドは好ましくは、5-メチル-デオキシシチジン、2-アミノ-デオキシアデノシン、1-メチル-アデノシン、1-メチル-グアノシン、1-メチル-イノシン、2, 2-ジメチル-グアノシン、2, 6-ジアミノプリン、2'-アミノ-2'-デオキシアデノシン、2'-アミノ-2'-デオキシシチジン、2'-アミノ-2'-デオキシグアノシン、2'-アミノ-2'-デオキシウリジン、2-アミノ-6-クロロプリンリボシド、2-アミノプリン-リボシド、2'-アラアデノシン、2'-アラシチジン、2'-アラウリジン、2'-アジド-2'-デオキシアデノシン、2'-アジド-2'-デオキシシチジン、2'-アジド-2'-デオキシグアノシン、2'-アジド-2'-デオキシウリジン、2-クロロアデノシン、2'-フルオロ-2'-デオキシアデノシン、2'-フルオロ-2'-デオキシシチジン、2'-フルオロ-2'-デオキシグアノシン、2'-フルオロ-2'-デオキシウリジン、2'-フルオロチミジン、2-メチル-アデノシン、2-メチル-グアノシン、2-メチル-チオ-N6-イソペネニル-アデノシン、2'-O-メチル-2-アミノアデノシン、2'-O-メチル-2'-デオキシアデノシン、2'-O-メチル-2'-デオキシシチジン、2'-O-メチル-2'-デオキシグアノシン、2'-O-メチル-2'-デオキシウリジン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルイノシン、2'-O-メチルシュードウリジン、2-チオシチジン、2-チオ-シチジン、3-メチル-シチジン、4-アセチル-シチジン、4-チオウリジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)-ウリジン、5, 6-ジヒドロウリジン、5-アミノアリルシチジン、5-アミノアリル-デオキシウリジン、5-プロモウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオ-ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-ウラシル、5-クロロ-アラ-シトシン、5-フルオロ-ウリジン、5-ヨードウリジン、5-メトキシカルボニルメチル-ウリジン、5-メトキシ-ウリジン、5-メチル-2-チオ-ウリジン、6-アザシチジン、6-アザウリジン、6-クロロ-7-デアザ-グアノシン、6-クロロプリンリボシド、6-メルカプト-グアノシン、6-メチル-メルカプトプリン-リボシド、7-デアザ-2'-デオキシ-グアノシン、7-デアザアデノシン、7-メチル-グアノシン、8-アザアデノシン、8-プロモ-アデノシン、8-プロモ-グアノシン、8-メルカプト-グアノシン、8-オキソグアノシン、ベンゾイミダゾール-リボシド、 β -D-マンノシル-キューオシン (queosine)、ジヒドロ-ウリジン、イノシン、N1-メチルアデノシン、N6-([6-アミノヘキシル]カルバモイルメチル)-アデノシン、N6-イソペンテニル-アデノシン、N6-メチル-アデノシン、N7-メチル-キサントシン、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、プロマイシン、キューオシン (queosine)、ウラシル-5-オキシ酢酸、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ワイプトオキソシン、キサントシン、及びキシロ-アデノシンを含む、例えばアセチル化、メチル化、ヒドロキシル化など化学的に変性された、自然発生する又は自然発生しないいずれかのグアノシン、ウリジン、アデノシン、チミジン又はシチジンを含むが何らかの限定を付与しない、グアノシン、ウリジン、アデノシン、チミジン及びシチジンのバリエーションである。かかるバリエーションの調製は、例えば米国特許第4373071号明細書により当業者に知られている。

【0034】

修飾ヌクレオチドはまた、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチルウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1

ーメチルー1ーデアザーシュードウリジン、2ーチオー1ーメチルー1ーデアザーシュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2ーチオージヒドロウリジン、2ーチオージヒドロシュードウリジン、2ーメトキシウリジン、2ーメトキシー4ーチオーウリジン、4ーメトキシーシュードウリジン、及び4ーメトキシー2ーチオーシュードウリジン、5ーアザーシチジン、シュードイソシチジン、3ーメチルーシチジン、N4ーアセチルシチジン、5ーホルミルシチジン、N4ーメチルシチジン、5ーヒドロキシメチルシチジン、1ーメチルーシュードイソシチジン、ピロローシチジン、ピロローシュードイソシチジン、2ーチオーシチジン、2ーチオー5ーメチルーシチジン、4ーチオーシュードイソシチジン、4ーチオー1ーメチルーシュードイソシチジン、4ーチオー1ーメチルー1ーデアザーシュードイソシチジン、1ーメチルー1ーデアザーシュードイソシチジン、ゼブラリン、5ーアザーゼブラリン、5ーメチルーゼブラリン、5ーアザー2ーチオーゼブラリン、2ーチオーゼブラリン、2ーメトキシーシチジン、2ーメトキシー5ーメチルーシチジン、4ーメトキシーシュードイソシチジン、及び4ーメトキシー1ーメチルーシュードイソシチジンも含むが、これらに限定されない。

10

【0035】

修飾ヌクレオチドはまた、2ーアミノプリン、2, 6ージアミノプリン、7ーデアザーアデニン、7ーデアザー8ーアザーアデニン、7ーデアザー2ーアミノプリン、7ーデアザー8ーアザー2ーアミノプリン、7ーデアザー2, 6ージアミノプリン、7ーデアザー8ーアザー2, 6ージアミノプリン、1ーメチルアデノシン、N6ーメチルアデノシン、N6ーイソペンテニルアデノシン、N6ー(シスーヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2ーメチルチオーN6ー(シスーヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6ーグリシニルカルバモイルアデノシン、N6ースレオニルカルバモイルアデノシン、2ーメチルチオーN6ースレオニルカルバモイルアデノシン、N6, N6ージメチルアデノシン、7ーメチルアデニン、2ーメチルチオーアデニン、及び2ーメトキシーアデニンも含むが、これらに限定されない。

20

【0036】

修飾ヌクレオチドはまた、イノシン、1ーメチルーイノシン、ワイオシン、ワイプトシン、7ーデアザーグアノシン、7ーデアザー8ーアザーグアノシン、6ーチオーグアノシン、6ーチオー7ーデアザーグアノシン、6ーチオー7ーデアザー8ーアザーグアノシン、7ーメチルーグアノシン、6ーチオー7ーメチルーグアノシン、7ーメチルイノシン、6ーメトキシーグアノシン、1ーメチルグアノシン、N2ーメチルグアノシン、N2, N2ージメチルグアノシン、8ーオキソグアノシン、7ーメチルー8ーオキソグアノシン、1ーメチルー6ーチオーグアノシン、N2ーメチルー6ーチオーグアノシン、及びN2, N2ージメチルー6ーチオーグアノシンも含むが、これらに限定されない。

30

【0037】

修飾ヌクレオチドはまた、6ーアザーシチジン、2ーチオーシチジン、 α ーチオーシチジン、シュードーイソーシチジン、5ーアミノアリルーウリジン、5ーヨードーウリジン、N1ーメチルーシュードウリジン、5, 6ージヒドロウリジン、 α ーチオーウリジン、4ーチオーウリジン、6ーアザーウリジン、5ーヒドロキシーウリジン、デオキシーチミジン、5ーメチルーウリジン、ピロローシチジン、イノシン、 α ーチオーグアノシン、6ーメチルーグアノシン、5ーメチルーシトジン(cytidine)、8ーオキソグアノシン、7ーデアザーグアノシン、N1ーメチルアデノシン、2ーアミノー6ークロロプリン、N6ーメチルー2ーアミノプリン、シュードーイソーシチジン、6ークロロプリン、N6ーメチルアデノシン、 α ーチオーアデノシン、8ーアジドーアデノシン、7ーデアザーアデノシンも含むが、これらに限定されない。

40

【0038】

修飾ヌクレオチドは、2'位で化学的に修飾されてもよい。好ましくは、修飾ヌクレオチドは2'炭素原子にて置換基を含む。この置換基は、ハロゲン、アルコキシ基、水素、アリールオキシ基、アミノ基及びアミノアルコキシ基からなる群から、好ましくは2'ー水素(2'ーデオキシ)、2'ーOーメチル、2'ーOーメトキシエチル及び2'ーフル

50

オロから選択される。

【0039】

本明細書に説明されているヌクレオチドの2'位に関与する化学修飾は、ロック核酸 (locked nucleic acid: LNA) ヌクレオチド、エチレン架橋核酸 (ethylene bridged nucleic acid: ENA) ヌクレオチド及び(S)-拘束エチルcEtヌクレオチドである。これらの骨格修飾は、修飾ヌクレオチドの糖を好ましいノーザン立体構造にロックする。

【0040】

骨格のリン酸基は、例えば酸素原子のうち1個又は複数を異なる置換基で置換することで修飾され得る。さらには、修飾ヌクレオチドは、本明細書に説明されている修飾リン酸の未修飾のリン酸部分の完全置換を含み得る。修飾リン酸基の例としては、ホスホロチオアート(チオホスファートとしても既知)、ホスホロセレナート、ボラノホスファート、ボラノリン酸エステル、水素ホスホナート、ホスホロアミダート、アルキルホスホナート、アリールホスホナート及びホスホトリエステルからなる群が挙げられるが、これらに限定されない。リン酸を含むリンカーはまた、結合している酸素を窒素(架橋ホスホロアミダート)、硫黄(架橋ホスホロチオアート)及び炭素(架橋メチレンホスホナート)で置換することにより修飾され得る。

【0041】

修飾ヌクレオチドは脱塩基部位であってもよい。本明細書で使用される場合、「脱塩基部位」は有機塩基を欠損しているヌクレオチドである。好ましい実施形態では、脱塩基ヌクレオチドは、リボースの2'位に本明細書に説明されている化学修飾をさらに含む。好ましくは、リボースの2'C原子は、ハロゲン、アルコキシ基、水素、アリールオキシ基、アミノ基及びアミノアルコキシ基からなる群、好ましくは2'-水素(2'-デオキシ)、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル及び2'-フルオロから選択される置換基で置換される。

【0042】

本発明の第1の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドは、2-アミノ-デオキシアデノシン、5-メチル-デオキシシチジン、チオホスファートヌクレオチド、LNAヌクレオチド、イノシン、8-オキソ-デオキシアデノシン及び5-フルオロ-デオキシウラシル及びL-DNAヌクレオチドからなる群から独立して選択される。

【0043】

本発明の第1の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドはL-DNAヌクレオチド、5-プロモウリジン又は5-ヨードウリジンではない。

【0044】

2-アミノ-デオキシアデノシン(2-アミノ-2'-デオキシアデノシン又は2-アミノ-dAとしても知られている)は、デオキシアデノシンに由来する誘導体である。2-アミノ-デオキシアデノシンは、(2R, 3S, 5R)-5-(2, 6-ジアミノプリン-9-イル)-2-(ヒドロキシメチル)オキソラン-3-オールというIUPAC名、及びCAS番号4546-70-7を有する。

【0045】

5-メチル-デオキシシチジン(5-メチル-dCTP)は、デオキシシチジンに由来する誘導体であり、([[(2R, 3S, 5R)-5-(4-アミノ-5-メチル-2-オキソピリミジン-1-イル)-3-ヒドロキシアキソラン-2-イル]メトキシ-ヒドロキシホスホリル]ホスホノ水素ホスファート)というIUPAC名、及びCAS番号22003-12-9を有する。

【0046】

チオホスファートヌクレオチドは、リン酸基としてチオホスファート(ホスホロチオア

10

20

30

40

50

ートとしても知られている)を含有する任意のヌクレオチドである。チオホスファートはCAS番号15181-41-6を有する。

【0047】

LNAヌクレオチドは修飾RNAヌクレオチドであり、中のリボース部分は、2'酸素及び4'炭素を結合している余分な架橋部分で修飾されている。

【0048】

L-DNAヌクレオチドは、リボース又はデオキシリボースのLエナンチオマーを含有するヌクレオチドを指す。

【0049】

本発明の第1の態様のさらに特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、チオホスファート、ロック核酸、2,6-ジアミノプリン、5-メチルデオキシシチジン、イノシン、8-オキソデオキシアデノシン及び5-フルオロデオキシウラシルからなる群から独立して選択されるcLDNAは、少なくとも3個、少なくとも4個、又は少なくとも5個の修飾ヌクレオチド、並びにL-DNAヌクレオチドを含む。

【0050】

本発明の第1の態様のさらに特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、cLDNAは2個のLNAヌクレオチドを含む。

【0051】

本発明の第1の態様のさらに特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドは、cLDNAの一方の又は両方の一本鎖末端ループに位置づけられている。より特定の実施形態では、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドは1つの一本鎖末端ループに位置づけられ、少なくとも別の修飾ヌクレオチドは他の一本鎖末端ループに位置づけられている。

【0052】

本発明の第1の態様のさらに特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドは、一本鎖末端ループのうち1つに位置づけられ、少なくとも別の修飾ヌクレオチドは、cLDNAのステム領域を形成する鎖のうち1つに位置づけられている。

【0053】

本発明の第1の態様のさらに特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドは、cLDNAのステム領域を形成する一方の又は両方の鎖に存在する。

【0054】

本発明の第1の態様のさらに特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドがステム領域を形成している鎖のうち1つに存在する場合、修飾ヌクレオチドは、ループを形成している最後のヌクレオチドに対して1~5位のヌクレオチドにより規定された鎖領域内部に位置づけられている。

【0055】

ループを形成している最後のヌクレオチドに対してステム領域を形成している鎖のうち1つの1位におけるヌクレオチドは、一本鎖ループの最後のヌクレオチド直後の最初のヌクレオチドであり、ループを形成している最後のヌクレオチドに対してステム領域を形成している鎖のうち1個の2位のヌクレオチドは、一本鎖ループの最後のヌクレオチド直後の2番目のヌクレオチドである。同様の推論は、ループを形成している最後のヌクレオチドに対し、3位、4位及び5位のヌクレオチドに当てはまる。

【0056】

本発明の第1の態様のさらに特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供され

10

20

30

40

50

ている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドがステム領域を形成している鎖のうち1つに存在する場合、修飾ヌクレオチドは、目的のDNA配列の一部を形成している最後のヌクレオチドに対し、ヌクレオチド1～10により規定された鎖領域内部に位置づけられている。

【0057】

目的のDNA配列の一部を形成している最後のヌクレオチドに対してステム領域を形成している鎖のうち1つにおいて1位のヌクレオチドは、このDNA配列の最後のヌクレオチド直後の最初のヌクレオチドである。目的のDNA配列の一部を形成している最後のヌクレオチドに対してステム領域を形成している鎖のうち1つにおいて2位のヌクレオチドは、このDNA配列の最後のヌクレオチド直後の2番目のヌクレオチドである。同様の推論は、目的のDNA配列の一部を形成している最後のヌクレオチドに対し、3位～10位のヌクレオチドに当てはまる。

10

【0058】

本発明の第1の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、ステム領域は目的のDNA配列に隣接している2つの制限部位を含む。より特定の実施形態では、制限部位はBsaI制限部位、AflIII制限部位、HindIII制限部位、NheI制限部位、及びEcoRV制限部位からなる群から選択される。さらにより特定の実施形態では、制限部位はBsaI制限部位である。当業者は、制限部位がループと目的のDNA配列との間に任意の距離で位置づけられ得る。

20

【0059】

本発明の第1の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、cLDNAはプライマーゼ／ポリメラーゼプライミング部位を含む。プライマーゼ認識部位は例えばステム内に存在していてもよい。特定の実施形態では、プライマーゼ認識部位は少なくとも1個のループ内に含まれている。本発明の第1の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、cLDNAはプライマーゼ／ポリメラーゼプライミング部位を含まない。

【0060】

プライマーゼ認識部位を含むことにより、本発明のcLDNAの増幅を刺激するため、プライマーゼの使用が促進される。

30

【0061】

本発明の第1の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、cLDNAは目的の遺伝子に隣接している逆位末端反復（ITR）を含む。特定の実施形態では、ITRは発現カセットに隣接している目的の配列内に含まれている。別の特定の実施形態では、ITRはアダプタのステム領域内に含まれている。ITRは、発現カセットから好適ないずれかの距離であり得る。例えば、ITRは発現カセットに直接結合され得る、又は1～50ヌクレオチド、50～200ヌクレオチド、200～1000ヌクレオチドの距離にあり得る。したがって、特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、目的のDNA配列は、1～50ヌクレオチドの距離で逆位末端反復（ITR）に隣接している発現カセットを含む。

40

【0062】

本明細書で使用される場合、「末端反復」又は「TR」は、少なくとも1個の最小限必要とされる複製の開始点及びパリンドロームヘアピン構造を含む領域を含む、任意のウィルス性末端反復又は合成配列を含む。Rep結合配列（Rep-binding sequence：「RBS」）（RBE（Rep-binding element）とも呼ばれている）及び末端解離部位（terminal resolution site：TRS）は、「最小限必要とされる複製の開始点」を構成し、したがって少なくとも1個のRBS及び少なくとも1個のTRSを含む。ポリヌクレオチド配列の所与のストレッチ

50

内部における、互いに逆相補配列である Tr は、「逆位末端反復」又は「ITR」と典型的にはそれぞれ呼ばれる。ウイルスに関しては、ITR は複製、ウイルスパッケージング、組込み及びプロウイルスの救出に関係する。

【0063】

複合型 c l D N A 構成では、3 個又は複数の I T R 又は非対称な I T R 対が存在する可能性があることを当業者は理解するであろう。I T R は、A A V I T R 又は非 A A V I T R であり得、又は A A V I T R 又は非 A A V I T R に由来し得る。例えば、この I T R は、パルボウイルス及びディペンドウイルス（例えば、イヌパルボウイルス、ウシパルボウイルス、マウスパルボウイルス、ブタパルボウイルス、ヒトパルボウイルス B-19）を包含するパルボウイルス科に由来し得る。又は、S V 40 複製の開始点として機能する S V 40 ヘアピンは、I T R として使用され得る。これは、短縮化、置換、欠失、挿入及び／又は付加によりさらに修飾され得る。パルボウイルス科ウイルスは、2 つの亜科からなる。パルボウイルス科は脊椎動物に感染し、デンソウイルス亜科は無脊椎動物に感染する。ディペンドパルボウイルスは、ヒト、霊長類、ウシ、イヌ、ウマ及びヒツジ種を含むがこれらに限定されない脊椎動物の宿主において、複製可能とするアデノ随伴ウイルス（A A V）のウイルスファミリーを含む。本明細書では便宜上、c l D N A ベクターの発現カセット（の上流）に対して 5' に位置づけられた I T R は、「5' I T R」又は「左 I T R」と呼ばれ、c l D N A ベクターの発現カセット（の下流）に対して 3' に位置づけられた I T R は、「3' I T R」又は「右 I T R」と呼ばれる。

【0064】

本発明の第 1 の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、逆位末端反復は、配列番号 4 又は配列番号 5 の配列である。

【0065】

本発明の第 1 の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、閉じた直鎖 D N A は、配列番号 4 の配列の 5' 逆位末端反復、及び／又は配列番号 5 の配列の 3' 逆位末端反復を含む。

本発明の第 1 の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、閉じた直鎖 D N A は少なくとも 1 個の D D-I T R を含む。「D D-I T R」は、X i a o X . e t a l . , “ A n o v e l 165-base-pair terminal repeat sequence is the sole cis requirement for the adenovirus life cycle”, 1997, J V i r o l . , v o l . 71 (2), p p . 941-948 に開示されているように隣接している D 要素を含む I T R である。

【0066】

本発明の第 1 の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、目的の D N A 配列は発現カセットを含む。

【0067】

用語「発現カセット」は、1 個又は複数のプロモータ又はエンハンサ要素と、目的の m R N A、m i R N A、s i R N A 又はタンパク質をコードする遺伝子又はコード配列とを含む D N A 配列を指す。発現カセットは、転写終結部位など、コード配列の発現を調節する他の要素をさらに含んでもよい。

【0068】

本発明の第 1 の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、発現カセットは、m R N A、m i R N A、s i R N A 又はタンパク質をコードする配列に操作可能に結合されている真核生物のプロモータを含む。

【0069】

本発明の第1の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、発現カセットは真核生物の転写終結配列をさらに含む。

【0070】

本発明の第1の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、発現カセットは、

- (i) 細菌性の複製開始点；
- (ii) 細菌性選択マーカ；
- (iii) 非メチル化 CpG モチーフ；

からなる群から選択される1個又は複数の細菌配列又はベクター配列を欠損している。

10

【0071】

本発明の第1の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、c l D N A はインビトロでは細胞を含まない c l D N A である。

【0072】

上で示したように、第2の態様では、本発明は治療時に使用するための、第1の態様による閉じた直鎖 D N A を提供する。

【0073】

本発明の c l D N A は、宿主細胞において、特に D N A ワクチン又は遺伝子治療においてインビトロ発現させるために使用されてもよい。D N A ワクチンは、感染性生物 D N A の修飾形態を通常はコードする。D N A ワクチンは対象に投与されるが、対象ではこうしたワクチンは感染性生物の選択されたタンパク質を発現し、通常は保護性であるそうしたタンパク質に対し、免疫応答を開始させる。D N A ワクチンはまた、がんの免疫療法アプローチにおける腫瘍抗原をコードし得る。

20

【0074】

D N A ワクチンは、真菌類、ヒトパピローマウイルス (H P V)、H I V、H S V 2 / H S V 1、インフルエンザウイルス (A 型、B 型及び C 型)、ポリオウイルス、R S V ウイルス、ライノウイルス、ロタウイルス、A 型肝炎ウイルス、ノーウォークウイルス群、エンテロウイルス、アストロウイルス、麻疹ウイルス、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、アデノウイルス、風疹ウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (H T L V - 1)、B 型肝炎ウイルス (H B V)、C 型肝炎ウイルス (H C V)、D 型肝炎ウイルス、ポックスウイルス、マールブルグ病及びエボラ、S A R S - C o V - 1、S A R S - C o V - 2 を含むウイルス；結核菌、クラミジア、淋菌、細菌性赤痢、サルモネラ菌、コレラ菌、梅毒トレポネマ、シュドモナス、百日咳菌、ブルセラ属菌、野兔病菌、ヘリコバクター・ピロリ、病原性レプトスピラ、レジオネラ・ニューモフィラ、ペスト菌、レンサ球菌属 (A 型及び B 型)、肺炎球菌、髄膜炎菌、ヘモフィルスインフルエンザ菌 (b 型)、トキソプラズマ・ゴンディ、カンピロバクター属菌、モラクセラ・カタラーリス、ドノヴァノシス、及びアクチノマイコーシスを含む細菌；カンジダ症及びアスペルギルス症を含む菌類病原体；条虫類、吸虫類、線虫類、アメーバ赤痢、ジアルジア症、クリプトスポリジウム、住血吸虫症、ニューモシスチス・カリニイ、トリコモナス症及び旋毛虫症を含む寄生性病原体などではあるが、これらに限定されない病原体によるがん、アレルギー、毒性及び感染を含むがこれらに限定されない多数の病状を処置又は予防するための抗原をコードする核酸配列を含み得る。

30

40

【0075】

D N A ワクチンは、アデノウイルス科 (例えば、ヒトアデノウイルスを含む)、ヘルペスウイルス科 (例えば、H S V - 1、H S V - 2、E B V、C M V 及び V Z V を含む)、パポウイルス科 (例えば H P V を含む)、ポックスウイルス科 (例えば天然痘及びワクシニアを含む)、パルボウイルス科 (例えばパルボウイルス B 19 を含む)、レオウイルス科 (例えばロタウイルスを含む)、コロナウイルス科 (例えば S A R S - C o V - 1 及

50

びSARS-CoV-2を含むSARSを含む)、フラビウイルス科(例えば黄熱、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、C型肝炎ウイルス及びダニ媒介性脳炎ウイルスを含む)、ピコルナウイルス科(ポリオウイルス、ライノウイルス及びA型肝炎ウイルスを含む)、トガウイルス科(例えば風疹ウイルスを含む)、フィロウイルス科(例えばマールブルグウイルス及びエボラウイルス)、パラミクソウイルス科(例えばパラインフルエンザウイルス、RSウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス及び麻疹ウイルス)、ラブドウイルス科(例えば狂犬病ウイルスを含む)、ブニヤウイルス科(例えばハンタウイルスを含む)、オルトミクソウイルス科(例えばA型、B型及びC型インフルエンザを含む)、レトロウイルス科(例えばHIV及びHTLVを含む)及びヘパドナウイルス科(例えばB型肝炎ウイルスを含む)の一員に由来する抗原をコードする核酸配列を含み得る。

10

【0076】

抗原は、獣医学的疾患の原因である病原体に由来し得、特に例えばレオウイルス(アフリカ馬疫又はブルータングウイルスなど)及びヘルペスウイルス(ウマヘルペスウイルスを含む)を含む、ウイルス性病原体に由来し得る。抗原は、口蹄疫ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、デングウイルス、SARS、ウエストナイルウイルス及びハンタウイルスに由来する抗原であり得る。抗原は、免疫不全ウイルスに由来し得る。また、例えばSIV又はネコ免疫不全ウイルスに由来し得る。

【0077】

本発明のプロセスにより作製されたcLDNAはまた、腫瘍抗原をコードする核酸配列も含んでもよい。腫瘍関連抗原の例としては、MAGEファミリー(MAGE1、2、3など)、NY-ESO-1及びSSX-2の一員などのがん精巢抗原、チロシナーゼ、gp100、PSA、Her-2及びCEAなどの分化抗原、発がん性HPV型由来のE6及び／又はE7などの変異自己抗原及びウイルス性腫瘍抗原が挙げられるが、これらに限定されない。特定の腫瘍抗原のさらなる例としては、MART-1、Melan-A、p97、 β -HCG、GalNAc、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-4、MAGE-12、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC18、CEA、DDC、P1A、EpCam、メラノーマ抗原gp75、Hker8、高分子量メラノーマ抗原、K19、Tyr1、Tyr2、pMel17遺伝子ファミリー、c-Met、PSM(前立腺ムチン抗原)、PSMA(前立腺特異膜抗原)、前立腺分泌タンパク質、 α -フェトリプロテイン、CA125、CA19.9、TAG-72、BRCA-1及びBRCA-2抗原が挙げられる。

20

30

【0078】

加えて、本発明のプロセスは、例えば遺伝子治療で使用されるcLDNAなど、他のタイプの治療用cLDNAを作製し得る。例えば、対象がその遺伝子の機能不全バージョンにより引き起こされた遺伝性障害を有する場合、機能的遺伝子を発現するためにこうしたDNA分子を使用することができる。こうした疾患の例としては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、嚢胞性線維症、ゴーシェ病、及びアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症が挙げられる。遺伝子治療が有用であり得る他の疾患としては、炎症性疾患、AIDSなどの障害を含む自己免疫性、慢性かつ感染性疾患、がん、神経疾患、心血管疾患(cardiovascular disease)、高コレステロール血症(hypercholesterolemia)、種々の貧血、地中海貧血症及び血友病を含む種々の血液障害、並びに肺気腫が挙げられる。固形腫瘍の処置のため、毒性ペプチド(すなわち、リシン、ジフテリア(diphtheria)毒素及びコブラ毒素因子などの化学療法薬)をコードする遺伝子、p53などの腫瘍抑制遺伝子、トランスフォーミングがん遺伝子に対しアンチセンスであるmRNA配列をコードする遺伝子、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF)などの抗悪性腫瘍ペプチド及び他のサイトカイン、又はトランスフォーミングがん遺伝子のトランスドミナントネガティブ変異体が発現し得る。

40

【0079】

本発明のプロセスにより作製するため、他のタイプの治療用cLDNAもまた企図されている。例えば低分子干渉RNA(siRNA)といった活性RNA形態へと転写される

50

c l D N A は、例えば、本発明のプロセスにより作製され得る。

【0080】

本発明の第2の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、c l D N A は D N A ワクチン又は遺伝子治療で使用するためのものである。

【0081】

上述されるように、第3の態様では、本発明は第1の態様の治療有効量の閉じた直鎖 D N A、及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む、医薬組成物を提供する。

【0082】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」といった表現は、投与時に、対処される疾患の症状のうち1つ又は複数の発症を予防し、又はこれらのある程度緩和する上で十分な c l D N A の量を指す。本発明により投与される薬剤の特定の量は、投与される c l D N A、投与経路、処置される特定の条件、及び同様の考慮すべき内容を含む事例を取り巻く特定の状況により当然ながら決定される。

【0083】

「医薬組成物」といった表現は、ヒト用組成物及びヒトではない動物用組成物（すなわち、獣医学組成物）に意図されている両方の組成物を包含する。

【0084】

「薬学的に許容される担体又は賦形剤」といった表現は、薬学的に許容される物質、組成物又はビヒクルを指す。各構成成分は、医薬組成物の他の成分と適合しているという意味で、薬学的に許容されなければならない。この構成成分はまた、逸脱した毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性、または妥当なベネフィット／リスク・レシオと釣り合うような他の問題もしくは合併症なしに、ヒトやヒトではない動物の組織または臓器に接触して使用するのに好適でなければならない。

【0085】

好適な薬学的に許容される賦形剤の例は、溶媒、分散媒、希釈剤又は他の液体ビヒクル、分散助剤又は懸濁助剤、界面活性剤、等張化剤、増粘安定剤又は乳化剤、防腐剤、固形結合剤、潤滑剤などである。従来のいずれかの賦形剤媒体が、例えばいずれかの望ましくない生物学的効果を生み出すことで、又は医薬組成物の他のいずれかの構成成分と有害な方式で相互作用することで、物質又はその誘導体と適合しない限りは、その使用は、本発明の範囲内であることが企図される。

【0086】

閉じた直鎖 D N A、薬学的に許容される賦形剤、本発明の医薬組成物中の追加的ないずれかの成分の相対量は、処置される対象の身元、サイズ及び／又は症状に応じて、さらには組成物が投与されることになる経路に応じて変動する。

【0087】

医薬組成物の製造に使用される薬学的に許容される賦形剤としては、不活性希釈剤、分散剤及び／又は顆粒化剤、界面活性剤及び／又は乳化剤、崩壊剤、結合剤、防腐剤、緩衝剤、潤滑剤及び／又は油が挙げられるがこれらに限定されない。着色剤、コーティング剤、甘味料及び香料などの賦形剤は、処方者の判断に従い、組成物中に存在し得る。

【0088】

本発明のプロセスにより作製された閉じた直鎖 D N A を含有する医薬組成物は、例えば固形又は液状といったいずれかの剤形で存在し得る。また、この医薬組成物は、例えば経口、非経口、直腸、局所、鼻腔内又は舌下経路などのいずれかの好適な経路で投与されることができ、例えば、局所製剤（軟膏、クリーム、リポゲル、ヒドロゲルなど）、点眼薬、エアロゾルスプレー、注射可能な溶液、浸透性ポンプなど所望の剤形を処方するのに必要となる薬学的に許容される賦形剤を含む。

【0089】

例示的な希釈剤としては、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸ナトリウム、ラクトー

10

20

30

40

50

例示的な潤滑剤としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、シリカ、タルク、麦芽、ベヘン酸グリセリル (glyceryl behanate)、水素添加植物油、ポリエチレングリコール、ロイシン、ラウリル硫酸ナトリウム、硫酸ラウリル及びこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】

第4の態様では、本発明は、第1の態様による少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含むc l DNAを作製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、a) 目的のDNA配列を含む鋳型DNAを提供する工程、

b) 工程a)の鋳型DNAからDNAを増幅させ、目的の鋳型DNAの反復を含む鎖状体DNAを作製する工程であって、目的の繰り返されたDNA配列のそれぞれが制限部位に隣接している、工程；c) (c1) 鎖状体DNAと、少なくとも1個の制限酵素とを接触させ、それによって目的のDNA配列をそれぞれ含有している、複数の開いた二本鎖DNA断片を作製する工程と、(c2) 開いた二本鎖DNA断片の末端のそれぞれにおいて、ヘアピンDNAアダプタを結合させる工程であって、アダプタのそれぞれ1個が少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを有するか、又は代替的にはDNA断片に結合したアダプタのうち1個のみが、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含む、工程と、により工程(b)で作製された増幅DNAを用いて閉じた直鎖DNAを産生する工程；及びd) 工程c)で作製された閉じた直鎖DNAを精製する工程、を含む。

【0096】

本発明の第4の態様の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、ヘアピンDNAアダプタは、長さにして6～600ヌクレオチドである。より特定の実施形態では、ヘアピンDNAアダプタは、長さにして6～200ヌクレオチドである。より特定の実施形態では、アダプタは、長さにして6～60ヌクレオチドである。別の特定の実施形態では、アダプタは、長さにして10～60ヌクレオチドである。別の特定の実施形態では、アダプタは、長さにして10～40ヌクレオチドである。

【0097】

第4の態様の方法の特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている方法のうちいずれかと組み合わせた状態では、増幅はランダムプライマー又はプライマーゼ／ポリメラーゼ酵素を用いて刺激される。

【0098】

プライミング酵素としてプライマーゼ／ポリメラーゼを使用して鋳型DNAを増幅することで、非常に高い効率性及び忠実性を有する増幅DNAを生成する。この増幅DNAは、後に処理され、治療用途に好適な閉じた直鎖DNAを生成することができる。

【0099】

本明細書で使用される場合、用語「プライミング」は、ポリヌクレオチド鋳型上のオリゴヌクレオチドプライマーの生成を指す。

【0100】

用語「プライマーゼ／ポリメラーゼ酵素」は、考古学的－真核生物プライマーゼ (AEP) スーパーファミリー由来の酵素など、DNA依存性プライマーゼ／ポリメラーゼ酵素を指す。これらの酵素は、dNTPを含む出発DNA鎖の能力を呈する。本発明で使用され得るこのスーパーファミリー由来の酵素は例えば、サーマス・サーモフィラスプライマーゼ／ポリメラーゼ (TthPrimPol) 又はヒトプライマーゼ／ポリメラーゼ (hsPrimPol、CCDC111、FLJ33167、EukPrim2又はhPrimPol1) である。「サーマス・サーモフィラスプライマーゼ／ポリメラーゼ」又は「TthPrimPol」は、配列番号1の配列の細菌サーマス・サーモフィラスのプライマーゼ／ポリメラーゼを指す。ヌクレオチド及びタンパク質配列は、NC_005835及びWP_011173100.1などのNCBI Entrezデータベースで入手可能である。

【0101】

【表 1】

表 1

配列番号	名前	配列
配列番号 1	TthPrimPol	MRPIEHALSYAAQGYGVLPRLRPGGKEPLGKLVPHGLK NASRDPATLEAWWRSCPRCGVGILPGPEVLVLDFFDDP EAWEGLRQEHPALEAAPRQRTPKGGRHVFLRLPEGVR LSASVRAIPGVDLRGMGRAYVVAAPTRLKDGRITYTWE APLTPPEELPPVPQALLLKLPPPPPPRPSWGAVGTAS PKRLQALLQAYAAQVARTPEGQRHLTLIRYAVAAGGLIP HGLDPREAEVVLVAAAMSAGLPEWEARDAVRWGLGV GASRPLVLESSSKPPEPRTYRARVYARMRRWV
配列番号 2	TelN	MSKVKIGELINTLVNEVEAIDASDRPQGDKTKRIKAAA ARYKNALFNDKRKFRGKGLQKRITANTFNAYMSRARK RFDDKLHHSFDKNINKLSEKYPLYSEELSSWLSMPTA NIRQHMSLQSKLKEIMPLAEELSNVRIGSKGSDAKIA RLIKKYPDWSFALSDLNSDDWKERRDYLYKLFQQGSA LLEELHQLKVNHEVLYHLQLSPAERTSIQQRWADVLR EKKRNVVVIDYPTYMQSIYDILNNPATLFSLNTRSGMA PLAFALAAVSGRRMIEIMFQGEFAVSGKYTVNFSGQAK KRSEDKSVTRTIYTLCEAKLFVELLTELRS CSAASDFD EVVKGYGKDDTRSENGRINAILAKAFNPWVKSF FGDD RRVYKDSRAIYARIAYEMFFRVDPRWKNVDEDVFFME ILGHDDENTQLHYKQFKLANFSRTWRPEVG DENTRLV ALQKLDDEMPFGFARGDAGVRLHETVKQLVEQDPSAKI TNSTLRAFKFSP TMISRYLEFAADALGQFVGENGQWQ LKIETPAIVLPDEESVETIDE PDDESQDDELEDEDEIELD EGGGDEPTEEEGPEEHQPTALKPVFKPAKNNGDGTY KIEFEYD GKH YAWSGPADSPMAAMRSAWETYYS
配列番号 3	TelN 標的配列	TATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATG GACTATTGTGTGCTGATA
配列番号 4	5' ITR 配列	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGCGACCTTTG GTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAG AGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCT
配列番号 5	3' ITR 配列	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA GGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

10

20

30

40

50

【0102】

本発明の4番目のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、工程(b)の増幅はTthPrimPol又はhsPrimPolから選択されるプライマーゼ／ポリメラーゼ酵素を用いて刺激される。特定の実施形態では、プライマーゼポリメラーゼ酵素はTthPrimPolである。より特定の実施形態では、プライマーゼポリメラーゼ酵素は、配列番号1に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の配列同一性を有する配列番号1のTthPrimPolであり、又はそのバリエーションである。当業者は、そのプライマーゼ活性を維持するTthPrimPolのいずれかのバリエーションが本発明のプロセスの使用に好適であると理解しているだろう。

【0103】

本発明では、配列が最適に整列される場合には、用語「同一性」は、2つの配列で同一である残基のパーセンテージを指す。最適なアラインメントでは、第1の配列の位置が第2の配列の対応する位置と同様のアミノ酸残基により占められている場合、配列はその位置に対する同一性を表す。2つの配列間の同一性のレベル（又は「パーセント配列同一性」）は、配列のサイズに対し、配列により共有された同一位置の数の比（すなわち、パーセント配列同一性 = (同一位置の数 / 位置の総数) × 100）として測定される。

【0104】

最適なアラインメントを迅速に得て、なおかつ2個又は複数の配列間の同一性を計算するためのいくつかの数学的アルゴリズムが知られており、入手可能ないくつかのソフトウェアプログラムに組み込まれている。こうしたプログラムの例としては、とりわけアミノ酸配列分析のための、MATCH-BOX、MULTAIN、GCG、FASTA及びROBUSTプログラムが挙げられる。好ましいソフトウェア分析プログラムとしては、ALIGN、CLUSTAL W及びBLASTプログラム（例えば、BLAST2.1、BL2SEQ及びそれらの後発バージョン）が挙げられる。

【0105】

アミノ酸配列分析については、BLOSUMマトリックス（例えばBLOSUM45、BLOSUM50、BLOSUM62及びBLOSUM80マトリックス）、Gonnetマトリックス、又はPAMマトリックス（例えば、PAM30、PAM70、PAM120、PAM160、PAM250及びPAM350マトリックス）などの重み行列を同一性の判定に使用する。

【0106】

BLASTプログラムは、データベース（例えば、GenSeq）中の複数の配列に対して、又はBL2SEQを使用し、2つの選択された配列間で選択された配列を整合させることのいずれかによって、少なくとも2個のアミノ酸列の分析を提供する。BLASTプログラムは、BLASTプログラムの操作に好ましくは統合されるDUST又はSEGプログラムなどの低複雑度フィルタリングプログラムにより、好ましくは変更される。ギャップ存在コスト（又はギャップスコア）を使用する場合、ギャップ存在コストは、好ましくは約-5~-15に設定される。同様のギャップパラメータは、他のプログラムを用いて適切に使用され得る。BLASTプログラム及びそれらの基盤となる原理は、例えばAltschulet al., "Basic local alignment search tool", 1990, J. Mol. Biol., v. 215, 403~410ページにさらに説明されている。同一性の特定のパーセンテージは、TthPrimPol酵素を依然として有効にし、それにより好適な配列を刺激可能である1個又は複数のアミノ酸の保存的変異による配列の変異を包含する。タンパク質変異はまた、1個又は複数のアミノ酸の挿入又は欠失に起因する。

【0107】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、プロセスは、閉じた直鎖DNAを作製するための、細胞を含まないインビトロプロセスである。

【0108】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、工程（b）はローリングサークル増幅である。

【0109】

用語「ローリングサークル増幅」又は「RCA」は、c l DNA又は二本鎖環状DNAなどの共有結合的に閉じられたDNA分子の増幅反応に関与している核酸増幅方法を指す。この場合、ポリメラーゼは、閉じたDNA分子周辺のプライマーのエクステンションを実施する。ポリメラーゼはハイブリダイズされたコピーに置き換わり、鋳型周辺のポリヌクレオチドエクステンションを継続し、増幅DNAのタンデム単位を含む鎖状体DNAを

10

20

30

40

50

作製する。これらの直鎖の一本鎖産物は、複数のハイブリダイゼーション、プライマーエクステンション及び鎖の置換事象用の基礎として機能し、鎖状体二本鎖DNA産物の形成をもたらす。したがって、鎖状体二本鎖DNA産物に、増幅された各単一単位DNAの複数のコピーが存在する。当業者は、一般的な知識及び／又は製造業者の指示を使用することで、増幅される鑄型の酵素及び特性に応じて増幅工程の条件をどのように調節するかを理解している。どのように鑄型DNAが生成されるかに応じ、鎖状体DNAは、目的の各増幅DNA配列に隣接している異なる配列を含有する。例えば、鎖状体DNAでは、目的の反復DNA配列は制限部位、プロテロメラーゼ標的配列、リコンビナーゼ認識部位、又はこれらのいずれかの組合せと隣接してもよい。

【0110】

本発明の第1の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、工程(b)の増幅は鎖置換DNAポリメラーゼを用いて実行される。用語「鎖置換DNAポリメラーゼ」は、鑄型DNAの二本鎖部分を除去している間、3'末端伸長反応を実施するDNAポリメラーゼを指す。本発明で使用され得る鎖置換DNAポリメラーゼは、phi29 DNAポリメラーゼ及びBst DNAポリメラーゼなど、鎖置換活性を有する限りは特に限定されてはならない。このようにして選択されたポリメラーゼタイプに応じて、当業者は、3'末端伸長反応のための反応条件が適切に設定され得ることを理解している。例えば、phi29 DNAポリメラーゼが使用される場合、反応は25℃～35℃である、反応向けの最適温度で実施され得る。

【0111】

したがって、特定の実施形態では、鎖置換DNAポリメラーゼは、phi29 DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、Bca (エキソ) DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenow断片、Vent (エキソ) DNAポリメラーゼ、Deep Vent (エキソ) DNAポリメラーゼ、及びKOD DNAポリメラーゼからなる群から選択される。より特定の実施形態では、鎖置換DNAポリメラーゼはphi29 DNAポリメラーゼである。さらにより特定の実施形態では、鎖置換DNAポリメラーゼは、phi29 DNAポリメラーゼを含むキメラタンパク質である。例えば国際公開第20111000997号明細書に開示されているように、当業者は向上した特性を有するキメラDNAポリメラーゼを得る方法を理解している。

【0112】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、鑄型DNAは、閉じた直鎖鑄型DNA又は環状二本鎖鑄型DNAから選択される。

【0113】

本明細書で使用される場合、用語「環状二本鎖DNA」は、共有結合的に閉じられた二本鎖DNA分子を指す。

【0114】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、工程(a)は、
—目的のDNA配列に隣接している少なくとも2個の制限部位を含むプラスミドベクターと少なくとも1個の制限酵素とを接触させ、それによって目的のDNA配列を含む開いた二本鎖DNAを作製し、ヘアピンDNAアダプタを目的のDNA配列を含有する開いた二本鎖DNAの両末端に結合させることで実施され、又は代替的には、工程(a)は、
—目的のDNA配列に隣接している少なくとも2個のプロテロメラーゼ標的配列を含むプラスミドベクターとプロテロメラーゼ（特にTelN）とを接触させ、

これにより、目的のDNA配列を含有している閉じた直鎖鑄型DNAである鑄型DNAを得ることにより、実施される。

【0115】

本明細書で使用される場合、「プラスミドベクター」は、結合されている別の核酸を輸

10

20

30

40

50

送することができ、染色体DNAの細胞内で独立して自律複製可能である環状二本鎖核酸分子を指す。したがって、プラスミドベクターは、細胞、特に細菌細胞における複製に必要とされる要素全てを含有する。

【0116】

制限酵素及びリガーゼの使用（結合目的）は、分子生物学分野で日常的である。したがって当業者は、使用されている酵素に応じて反応の条件を調節する方法、及び標的とされている制限部位に応じ、どの制限酵素が使用されるべきかを理解している。

【0117】

当業者はまた、制限酵素によってはDNAオーバーハングを生成する（付着末端）が、それ以外の他のものはこれを生成しない（平滑末端）ことを理解している。両方のタイプの制限酵素は、本発明の方法で使用され得る。当業者は、付着末端を有するアダプタが付着末端を有する開いた二本鎖DNAに結合され得る（付着末端のライゲーション）ことを理解している。平滑末端を有する開いた二本鎖DNAはまた、例えばTaqポリメラーゼを使用して末端3'デオキシアデノシンヌクレオチドを付加するプロセスによりdAテールされ、次いでオーバーハングTを有するアダプタに結合され得る。

【0118】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、制限酵素は平滑末端又は付着末端を生成する。より特定の実施形態では、目的のDNA配列に隣接している少なくとも2個の制限部位を含むプラスミドベクターと少なくとも1個の制限酵素とを接触させることで、付着末端を有する開いた二本鎖DNA、又は平滑末端を有する開いた二本鎖DNAを生成する。

【0119】

de c l DNAを形成するため、開いた二本鎖DNAの両末端に結合されたアダプタは、同一のアダプタ又は異なるアダプタであり得る。

【0120】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、ヘアピンDNAアダプタは、少なくとも1個の制限部位を含む。より特定の実施形態では、制限部位はB s a I制限部位、A f I I I制限部位、H i n d I I I制限部位、N h e l制限部位、及びE c o R V制限部位からなる群から選択される。さらにより特定の実施形態では、制限部位はB s a I制限部位である。特定の実施形態では、制限部位はB b s l及びB s e R I制限部位から選択される。

【0121】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、ヘアピンDNAアダプタは、プライマーゼ認識部位を含有しない。より特定の実施形態では、ヘアピンDNAアダプタは配列X T Cを含有しない。

【0122】

より特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、ヘアピンDNAアダプタは、プロテロメラーゼ標的配列を含有する。さらにより特定の実施形態では、ヘアピンDNAアダプタはプロテロメラーゼ標的配列の一部を含有する。

【0123】

本明細書で使用される場合、「プロテロメラーゼ」は、共有結合的に閉じられた直鎖DNA分子を作製するためにプロテロメラーゼ標的部位を含む鑄型を切断及び再結合可能である任意のポリペプチドである。したがって、プロテロメラーゼは、DNA切断及びライゲーション機能を有する。プロテロメラーゼタイプの活性を有する酵素はまた、テロメアリゾルベースとしても説明されている（例えば、ボレリア・ブルグドルフェリ）。プロテロメラーゼの典型的な基質は、環状二本鎖DNAである。このDNAがプロテロメラーゼ

標的部位を含有する場合、酵素はこの部位でDNAを切断し、末端をライゲーションして、直鎖二本鎖の共有結合的に閉じられたDNA分子を生成することが可能である。プロテロメラーゼ標的部位を含む鑄型に由来する閉じた直鎖DNAの作製を触媒する、所与のポリペプチドの能力は、当該技術分野に説明されているいずれかの好適なアッセイを使用して判定され得る。

【0124】

本発明のプロセスで使用するための好適なプロテロメラーゼの例としては、ハロモナス・アクアマリナ由来のp h i H A P - 1、エルシニア・エンテロリティカ由来のP Y 5 4、クレブシエラ・オキシトカ由来のp h i K O 2及びビブリオ種由来のV P 8 8 2、大腸菌由来のN 1 5、又はこれらの任意のバリエーションが挙げられる。

【0125】

本発明の第1の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、プロテロメラーゼは、配列番号2のバクテリオファージN 1 5 T e l N、又は配列番号2に対して少なくとも80%の同一性を有する配列を含むこれらのバリエーションである。

【0126】

「プロテロメラーゼ標的配列」は任意のDNA配列であり、鑄型DNA中にこれが存在することでプロテロメラーゼの酵素活性により閉じた直鎖DNAへの変換が可能となる。言い換えると、プロテロメラーゼ標的配列は、共有結合的に閉じられた直鎖DNAを形成するための、プロテロメラーゼによる二本鎖DNAの切断及び再結合に必要とされる。通常、プロテロメラーゼ標的配列は、2倍大きい回転対称性を有する任意の二本鎖DNA配列であり、完全逆方向反復として本明細書に説明されている任意の完全パリンドローム配列を含む。

【0127】

本発明の第1の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、少なくとも2個のプロテロメラーゼ標的配列は、完全逆方向反復DNA配列を含む。

【0128】

本発明の第1の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、プロテロメラーゼ標的配列は配列番号3の配列、又は配列番号3に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の配列同一性の配列同一性を有する配列を含むこれらのバリエーションを含む。

【0129】

完全逆方向反復の長さは、特定の生物によって異なる。ボレリア・ブルグドルフェリでは、完全逆方向反復は長さにして14塩基対である。種々の中温性バクテリオファージでは、完全逆方向反復は、長さにして22塩基対以上である。また、いくつかの場合（例えば大腸菌N 1 5）、中央の完全逆方向パリンドロームは、完全逆方向配列に隣接している。すなわちより大きな不完全逆方向パリンドロームの一部を形成している。

【0130】

本発明に使用されるプロテロメラーゼ標的配列は、長さにして少なくとも14塩基対の二本鎖パリンドローム（完全逆方向反復）配列を好ましくは含む。

【0131】

完全逆方向反復は、追加の逆方向反復配列に隣接してもよい。隣接している逆方向反復は、完全又は不完全反復であり得る。すなわちこれは、完全に対称又部分的に対称であってもよい。隣接している逆方向反復は、中央のパリンドロームと連続していてもよく、又は不連続であってもよい。プロテロメラーゼ標的配列は、長さにして少なくとも14塩基対の完全逆方向反復を含む、不完全な逆方向反復を含んでもよい。

【0132】

配列番号3の配列を含むプロテロメラーゼ標的配列又はこのバリエーションは、配列番号2

10

20

30

40

50

の大腸菌 N 1 5 T e l N プロテロメラーゼ及びそのバリエーションと組み合わせた使用に好ましい。

【 0 1 3 3 】

上記パリンドローム配列又はプロテロメラーゼ標的配列のいずれかのバリエーションは、ホモログ又はその変異体を含む。変異体は、天然配列に対する短縮化、置換又は欠失を含む。バリエーション配列は任意の配列であり、鑄型 DNA 中にこれが存在することでプロテロメラーゼの酵素活性により閉じた直鎖 DNA への変換が可能となる。これは、閉じた直鎖 DNA を形成するための適切なアッセイを使用することによって容易に判定され得る。当該技術分野における任意の好適なアッセイが使用されてもよい。好ましくは、このバリエーションにより、プロテロメラーゼ結合及び天然配列を用いて観察される活性に匹敵するその活性が可能となる。本明細書に説明されるパリンドローム配列の好ましいバリエーションの例としては、完全反復構造を保存し、かつ閉じた直鎖 DNA の形成が可能な状態を維持する、切断されたパリンドローム配列が挙げられる。ただし、バリエーションプロテロメラーゼ標的配列は、プロテロメラーゼ活性用の基質として作用可能である場合、完全なパリンドロームをそれ以上保存することがないように改変されてもよい。

10

【 0 1 3 4 】

当業者は、上で要約された構造原理に基づき、本発明で使用する上で好適なプロテロメラーゼ標的配列を容易に同定可能であることを理解されたい。候補プロテロメラーゼ標的配列は、上記アッセイを使用して閉じた直鎖 DNA の形成を促進させるため、それらの能力についてスクリーニングされ得る。

20

【 0 1 3 5 】

本発明の第 4 の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、鑄型 DNA が目的の DNA 配列を含有する環状二本鎖鑄型 DNA である場合、工程 (a) は、目的の DNA 配列に隣接している少なくとも 2 個のリコンビナーゼ認識部位を含むプラスミドベクターと部位特異的リコンビナーゼ (より特定のには Cre リコンビナーゼ) とを接触させることで実施される。

【 0 1 3 6 】

プラスミドベクター上の部位特異的リコンビナーゼの作用により、2 つのリコンビナーゼ認識部位の組換えを引き起こし、それによってプラスミドベクター中のリコンビナーゼ認識部位間に位置していた目的の DNA 配列を含有する小さな環状二本鎖 DNA が生成される。

30

【 0 1 3 7 】

「部位特異的リコンビナーゼ」は、本明細書で使用される場合、リコンビナーゼ認識部位として知られている酵素により認識された特異的な DNA 配列間の部位特異的組換えを媒介する酵素のファミリーを指す。部位特異的なリコンビナーゼの例としては、Cre リコンビナーゼ、Flp リコンビナーゼ、λ インテグラーゼ、γ-δ リゾルベース、Tn3 リゾルベース、Sin リゾルベース、Gin インベルターゼ、Hin インベルターゼ、Tn5044 リゾルベース、Tn3 トランスポザーゼ、sleeping beauty トランスポザーゼ、IS607 トランスポザーゼ、Bxb1 インテグラーゼ、wBeta インテグラーゼ、BL3 インテグラーゼ、phiR4 インテグラーゼ、Al18 インテグラーゼ、TGE インテグラーゼ、MRU インテグラーゼ、phi370 インテグラーゼ、SPBc インテグラーゼ、SV1 インテグラーゼ、TP901-1 インテグラーゼ、phiRV インテグラーゼ、FC1 インテグラーゼ、K38 インテグラーゼ、phiBT1 インテグラーゼ及び phiC31 インテグラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 1 3 8 】

「リコンビナーゼ認識部位」は、部位特異的リコンビナーゼにより認識されるヌクレオチド配列を指し、組換え事象向けの基質として機能し得る。リコンビナーゼ認識部位の非限定的な例としては、FRT、FRT11、FRT71、attP、att、rox 及び

50

l o x P、l o x 5 1 1、l o x 2 2 7 2、l o x 6 6、l o x 7 1、l o x M 2 及び l o x 5 1 7 1 などの l o x 部位が挙げられる。

【0139】

当業者は、自身の一般的な知識を使用し、部位特異的リコンビナーゼは特定のリコンビナーゼ認識部位を認識し、それによってプラスミドベクター内に含有された認識配列に応じて、プラスミドベクターから環状二本鎖鋳型DNAを生成するためには異なるリコンビナーゼを使用しなければならないことを理解している。

【0140】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、部位特異的リコンビナーゼはCreリコンビナーゼである。より特定の実施形態では、リコンビナーゼ認識部位はl o x Pである。さらにより特定の実施形態では、部位特異的リコンビナーゼはCreリコンビナーゼであり、リコンビナーゼ認識部位はl o x Pである。

【0141】

したがって、本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、工程(b)から得られた増幅DNAは、目的のDNA配列の反復を含む鎖状体DNAであり、目的の繰り返されたDNA配列のうちそれぞれ1つは、制限部位、プロテロメラーゼ標的配列、及び／又はリコンビナーゼ認識部位に隣接している。

【0142】

当業者は、鋳型c l DNAを作製するために制限酵素を使用する場合、工程(b)で作製された増幅DNAからc l DNAを生成するために同様の制限酵素を後に使用することができる。鋳型c l DNAを生成するために工程(a)で使用されるヘアピンDNAアダプタは、工程(c)で使用されたものと同様又は異なり得る。アダプタは好ましくは異なっている。

【0143】

本発明の第1の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、プロセスは閉じた直鎖発現カセットDNAを作製するためのプロセスである。

【0144】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、工程(a)は、目的のDNA配列に隣接している少なくとも2個の制限部位を含むプラスミドベクターと少なくとも1個の制限酵素とを接触させ、それにより目的のDNA配列を含む開いた二本鎖DNAを作製し、ヘアピンDNAアダプタを目的のDNA配列を含有する開いた二本鎖DNAの両方の末端に結合させることで実施され、かつ工程(c)は、(c1)鎖状体DNAと少なくとも1個の制限酵素とを接触させ、それによって目的のDNA配列をそれぞれ含有している複数の開いた二本鎖DNA断片を作製する工程と、(c2)本発明の第1の態様に記載のヘアピンDNAアダプタを、開いた二本鎖DNA断片の両末端に結合する工程と、により実施される。より特定の実施形態では、制限酵素は付着末端又は平滑末端を生成する。制限酵素が平滑末端を生成する場合には、得られた断片は、平滑末端を含有するアダプタに結合可能であり、又は代替的には、上で説明したようにこれはd Aテールされ、オーバーハング(overhang) Tを用いてアダプタに結合可能である。

【0145】

本発明の第4の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、鋳型DNAは、制限部位に隣接する目的のDNA配列を含有している環状二本鎖鋳型DNAであり、工程(a)は、目的のDNA配列に隣接している少なくとも2個の制限部位に隣接している少なくとも2個のリコンビナーゼ認識部位を含むプラスミドベクターと部位特異的リコンビナーゼ(より特定のにはCreリコンビナーゼ)とを接触させることで実施され、工程(c)は、(

c 1) 鎖状体 DNA と少なくとも 1 個の制限酵素とを接触させ、それによって目的の DNA 配列をそれぞれ含有している複数の開いた二本鎖 DNA 断片を作製し、(c 2) 第 1 の態様に記載のヘアピン DNA アダプタを、開いた二本鎖 DNA 断片の両末端に結合する、ことにより実施される。

【0146】

本発明の第 1 の態様のプロセスの特定の実施形態では、任意には上記又は下記にて提供されている実施形態のうちいずれかと組み合わせた状態では、工程 (a) は、目的の DNA 配列に隣接している少なくとも 2 個の制限部位に隣接している、少なくとも 2 個のプロテオメラーゼ標的配列を含むプラスミドベクターとプロテオメラーゼ（より特定的には T e l N）とを接触させることで実施され、工程 (c) は、(c 1) 鎖状体 DNA と、少なくとも 1 個の制限酵素とを接触させ、それによって目的の DNA 配列をそれぞれ含有する複数の開いた二本鎖 DNA 断片を作製し、(c 2) 第 1 の態様によるヘアピン DNA アダプタを、開いた二本鎖 DNA 断片の両末端に結合する、ことにより実施される。

【0147】

第 5 の態様では、本発明は第 4 の態様によるプロセスで得ることができる閉じた直鎖 DNA を提供する。

【0148】

第 7 の態様及び第 8 の態様は、少なくとも 2 個の修飾オリゴヌクレオチド及び担体を含有する本発明の c l DNA を含む組成物を指している。担体はウイルス性ベクター又は非ウイルス性ベクターであってもよい。「ウイルス性ベクター」は、外因性遺伝物質を細胞の核に導入するためのビヒクルとして機能する改変されたウイルスである。本発明の意味では、「非ウイルス性ベクター」は、c l DNA を送達するための担体として機能する、ウイルス由来以外の任意の物質である。非ウイルス性ベクターとしては、ナノ粒子、リポソーム、小胞及びポリマーが挙げられる。

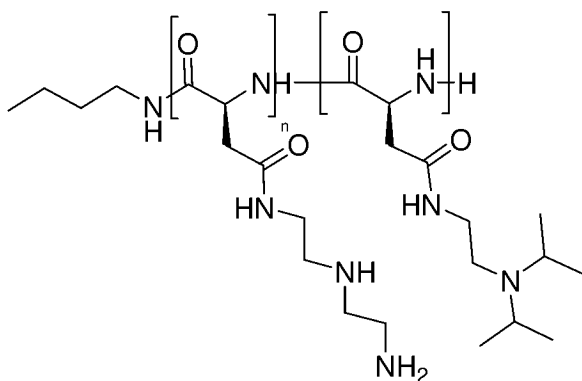
【0149】

非ウイルス性ベクターがポリマー（例えば、ポリカチオン性ポリマー）である場合、c l DNA により形成された複合体及びポリマーは「ポリプレックス」と呼ばれる。「ポリプレックス」は、DNA とカチオン性ポリマー（カチオマー）との間の静電相互作用により形成され、ウイルス性ベクターに対する安全で汎用的な代替物として多くの注目を集めている。

【0150】

本発明の意味で特に好適なポリマーは、欧州特許第 1 8 5 9 8 1 2 号明細書に開示されるものといったポリカチオン性ポリマーである。これらのポリマーのうち一部は、ポリエチレングリコール系のポリカチオン性ポリマーである。特定の実施形態では、本発明の第 8 の態様のポリプレックスは、式 I を伴うポリマーを含有する。

【化 1】



式 I

【0151】

本発明はまた、治療又は診断時に使用するための、上に記載の本発明の c l D N A 及び担体、又はポリプレックスを含む組成物を提供する。

【0152】

本発明の目的のため、「得られる」、「得られた」といった表現および同等の表現は互換的に使用され、いずれの場合でも「得られる」という表現は、「得られた」という表現を包含する。本発明の第1の態様及び第4の態様の下で提供される全ての実施形態は、本発明の第5の態様の閉じた直鎖DNAの実施形態でもある。

【0153】

第6の態様では、本発明は少なくとも1個の修飾ヌクレオチド、リガーゼ、及び任意にはその取扱説明書を含むヘアピンDNAアダプタを含む c l D N A を作製するためのキットを提供する。

【0154】

このキットは、リガーゼ酵素の作用を通じて、任意の所与の目的のDNA配列に提供された中にあるアダプタをライゲーションすることにより、本発明の c l D N A を製造するために使用され得る。本発明の第4の態様のアダプタに関する全ての実施形態はまた、本発明の第6の態様のキットのアダプタにも適用されることを意味する。

【0155】

本明細書及び特許請求の範囲全体を通し、用語「含む」及びこの用語の変形は、他の技術的特徴、添加剤、成分、又は工程を排除することを意図しない。さらには、用語「含む」は、「からなる」の事例を包含する。本発明の更なる目的、利点及び特徴は、この説明の審査時に当業者に明らかとなる、又は本発明の実践により理解され得る。以下の実施例及び図面は例示として提供され、本発明を限定することを意図するものではない。図面に関連し、特許請求の範囲中の括弧に記載されている参照符号は、特許請求の範囲の理解度を増加させようと単純に試みるものであり、特許請求の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。さらには、本発明は本明細書に説明される特定のかつ好ましい実施形態の考えられる全ての組合せを網羅する。

【実施例】

【0156】

実施例1：少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを用いた c l D N A の合成

【0157】

ヘアピンDNAアダプタの合成

標準的なホスホラミダイト化学 (Beaucage S. L. et al, 1981) に従い、8-オキソデオキシアデノシン (8-オキソ-dA)、5-フルオロデオキシウラシル (5FU)、イノシン、チオホスファートヌクレオチド、又はロック核酸 (LNA) ヌクレオチドといった修飾ヌクレオチドのうち少なくとも2個を含むヘアピンDNAアダプタを合成した。

【0158】

簡潔には、ホスホラミダイト合成は、最も離れた3'ヌクレオチドから開始し、最も離れた5'ヌクレオチドが結合するまで、繰り返される4段階の工程から構成される一連のサイクルを通り進行する。これらの工程は、脱保護 (i)、カップリング (ii)、酸化 (iii) 及びキャッピング (iv) である。

【0159】

このサイクルは、配列中の各ヌクレオチドについて繰り返される。合成の最後には、オリゴヌクレオチドは例えば、CPGに依然として結合されている3'末端及びトリチル基で保護された5'末端を有する25量体として存在している。加えて、塩基の環構造の統合性を維持するため、保護基は4個の塩基のうち3個に残留する。保護基は、A及びC上のベンゾイルであり、G上のN-2イソブチリルである。チミジンは保護基を一切必要としない。完全合成を脱トリチル化し、制御された多孔質ガラスを切断し、3'末端及び5'末端にヒドロキシルを残す。この時点で、高温の水酸化アンモニウムを使用して塩基加水分解させることでオリゴ (塩基及びリン酸) を脱保護する。最終産物は機能性一本鎖D

10

20

30

40

50

NA分子である。

【0160】

【表2】

表2：ヘアピンDNAアダプタを合成するための保護ヌクレオチド及び修飾ヌクレオチド

AC-dC-CE ホスホラミダイト	Dmf-dG-CE ホスホラミダイト	dA-CE ホスホラミダイト
dT-CE ホスホラミダイト	T-LNA	5-F-dU-CE ホスホラミダイト
Bz-A-LNA	5-Me-Bz-C-LNA	dmf-G-LNA
リン酸アミダイト	8-オキソ-dA-CE ホスホラミダイト	dI-CE ホスホラミダイト
DDTT		

10

20

30

40

【0161】

天然オリゴヌクレオチドを含有している対応するヘアピンDNAアダプタもまた比較のために合成した。合成したアダプタの一覧を表3に提供する。

合成終了時、オリゴヌクレオチドを支持体から切断し、保護基を除去した。次いで標準的な精製工程（例えば、PAGE、HPLC及び／又はRNaseフリーのHPLC）を使用し、切断された配列から完全長の産物を分離させた。

【0162】

50

【表 3】

表 3：天然ヌクレオチド及び修飾ヌクレオチドを含有するヘアピン DNA アダプタ

サンプル名	オリゴ配列	配列番号
オリゴ 15	AGGGATCCACTCAGGAT	配列番号 6
オリゴ 37	AGGGATCC*A*C*T*C*AGGAT	配列番号 7
オリゴ 4	AGGGCTAACCACTCAGGTTAG	配列番号 8
オリゴ 28	AGGGCTAACCXCTCXGGTTAG	配列番号 9
オリゴ 29	AGGGCTAACCA/i5F・dU/T/i5FdU/AGGTTAG	配列番号 10
オリゴ 17	AGGGATAACATGGCCACTCAGGCCATGTTAT	配列番号 11
オリゴ 19	AGGGATAACA+T+G+G+C+CACTCAGGCCATGTTAT	配列番号 12
オリゴ 22	AGGGATAACATGGCC/i8・オキソ・dA/CTC/i8・オキソ・dA/GGCCATGTTAT	配列番号 13
オリゴ 21	AGGGATAACATGGCC/I/CTC/I/GGCCATGTTAT	配列番号 14
オリゴ 41	AGGGCTTACG*C*G*C*GTAAG	配列番号 15

＊、右方向に向かってホスホロチオエート型ヌクレオチド（例えば、オリゴ 37 において、ホスホロチオエート型ヌクレオチドは A C T C A）＋であり、右方向に向かって L N A ヌクレオチド（例えば、オリゴ 19 において、L N A ヌクレオチドは T G G C C）であり、
／ I ／はイノシンヌクレオチドである

i 8－オキソ－d A、8－オキソ－デオキシアデノシンヌクレオチド

i 5 F－d U、5－フルオロ－デオキシウラシルヌクレオチド

【0163】

修飾オリゴヌクレオチドを含有する c l D N A の調製

次に、上記セクションで得られた配列番号 6～15 のヘアピン DNA アダプタを、リガーゼの作用により目的の配列を含む二本鎖 DNA 断片に結合させることで c l D N A を調製した（図 1 を参照されたい）。図 2 は、上記ヘアピンアダプタを用いて調製された c l D N A 用の調製スキームを示す。図に示されるように、エンドヌクレアーゼ制限部位（A）により両側に隣接する目的の配列を含む DNA 断片を特異的な制限エンドヌクレアーゼ（B）を用いて処理し、所望のヘアピンアダプタ（C）を用いて結合させた。

【0164】

これら特定の実施例における目的の配列は、（配列番号 6～13 のアダプタを用いてライゲーションするための）ルシフェラーゼ酵素をコードする配列、又は制限部位、これらの実施例では B s a I 制限部位に隣接する（配列番号 14 及び 15 のアダプタを用いてライゲーションするための）緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein：GFP）を含んだ。したがって、本実施例で調製された全ての構築物に関して、ヘアピンアダプタを結合する DNA 断片は、B s a I オーバーハングに両側で隣接している（対応するプロモータ及びエンハンサなどの追加配列とともに）ルシフェラーゼ又は GFP をコードする配列を含んだ。図 2 では、両側の例示的なヘアピンアダプタはオリゴ 37（配列番号 7）であり、これは 5 ホスホロチオエート型ヌクレオチドを含有する（図 2 ではイタリック体で示されている）。アダプタのライゲーション後、エキソヌクレアーゼを用いてサンプルを処理し、トリトン－114 を用いてエンドトキシンを除去し、精製した。

【0165】

このスキームは、異なるヘアピンアダプタ（配列番号 6～15 のオリゴ）を、図 2 に示されるように B s a I オーバーハングに両側で隣接している（対応するプロモータ及びエンハンサなどの追加配列とともに）ルシフェラーゼ又は GFP をコードする配列を含む二本鎖 DNA 断片を結合することでそれぞれ得られた、実施例の全ての c l D N A に適用した。各 c l D N A は、二本鎖 DNA 断片の両側の同一のヘアピンアダプタを含有した。得られた c l D N A を o D N A と命名し、それらの調製に使用されたヘアピンアダプタに続

き、番号を付けた（表 3 を参照されたい）。これはすなわち、oDNA 15、oDNA 37、oDNA 4、oDNA 28、oDNA 29、oDNA 17、oDNA 19、oDNA 22、oDNA 21 及び oDNA 41 である。oDNA 37、oDNA 28、oDNA 29、oDNA 19、oDNA 22、oDNA 21 及び oDNA 41 は、修飾ヌクレオチドを含有する。oDNA 15 は oDNA 37 の天然に存在するそれらの対応物である。oDNA 4 は、oDNA 28 及び oDNA 29 の天然に存在するそれらの対応物である。oDNA 17 は oDNA 19 及び oDNA 22 の天然に存在するそれらの対応物である。

【0166】

カスタマイズされたアダプタを用いて cDNA を調製するためのプロトコール

上記 oDNA を得るために踏まえられ得る特定のプロトコールの一例を以下に提供する。このプロトコールは、プラスミド DNA（pDNA）から出発した修飾ヌクレオチド（oDNA）を含有し得る cDNA の調製を示す。簡潔には、pDNA は例えば、プロテロメラーゼを用いて、BsaI 制限部位に隣接している（対応するプロモータ及びエンハンサなど、追加配列とともに GFP をコードする配列を同様に含む）目的の配列を含む配列番号 16 の eGFP プラスミド、及びプロテロメラーゼ標的配列（図 14 を参照されたい）を処理し、エンドヌクレアーゼ制限部位に隣接している目的の配列を含む cDNA を得た。TthPrimPol 及び Phi29 を使用するローリングサークル増幅（RCA）により、この cDNA を増幅させた。得られたコンカテマーを精製し、対応する制限酵素（例えば、BsaI）を用いて処理し、修飾ヌクレオチドを含有するヘアピンアダプタと結合させた。

【0167】

A プラスミド DNA から cDNA を得るためのプロトコール

【表 4】

表 4：実験用機器の概要

機器	ブランド／製造業者	モデル
天秤	Mettler Toledo	ME4002E
pH メータ	INSEA	PHSJ-5
遠心機	ThermoFisher	Heraeus(商標)Pico(商標)21
クリーンベンチ	AIRTECH	SW-CJ-2FD

【表 5】

表 5：材料情報の概要

番号	材料名	ブランド又は製造業者	カタログ番号
1	エキソヌクレアーゼ III	NEB	M0206
2	NE 緩衝液 1	NEB	M0206
3	トリトン X-114	Solarbio	T8210
4	イソプロピルアルコール	Sinopharm Chemical Reagent Co.,Ltd.	67-63-0
5	KpnI	NEB	R3142L
6	HindIII	NEB	R3104S
7	CutSmart 緩衝液	NEB	B7204S
8	TelN	GenScript	N A
9	TelN 緩衝液	GenScript	N A

【0168】

1.1 TelN 消化

30℃で2時間、TelN 酵素によって eGFP プラスミドを消化し、75℃で10分間不活性化させた。いくつかの反応を同時に実施した場合、それに応じてスケールアップ

する。

【表 6】

表 6 : T e l N 酵素消化反応

成分	20m L の反応
10 倍の緩衝液	2mL
プラスミド	10 mg、10 mL
TelN	実際の添加：1.0×10 ⁶ U(2mL、50U/μL)
滅菌水	20mL になるまで添加

10

【0169】

1.2 骨格の除去

1.2.1 K p n I 及び H i n d I I I 消化

37℃で1時間、K p n I 及び H i n d I I I を用いて最終工程の産物を消化した。続いてサンプルを65℃で15分間不活性化させた。いくつかの反応を同時に実施した場合、それに応じてスケールアップする。

【表 7】

表 7 : K p n I 及び H i n d I I I 消化反応

成分	25mL の反応
10 倍の Cutsmart	2.5 mL
最終工程のプラスミド	20 ml
Kpn I	実際の添加：10000U(500μL、20U/μL)
Hind III	実際の添加：10000U(500μL、20U/μL)
滅菌水	25mL になるまで添加

20

【0170】

1.2.2 E x o I I I 消化

37℃で1時間 E x o I I I 消化し、75℃で10分間不活性化させた。いくつかの反応を同時に実施した場合、それに応じてスケールアップする。

【表 8】

表 8 : E x o I I I 消化反応

成分	28mL の反応
10 倍の N E 緩衝液 1	2.8 mL
最終工程のプラスミド	25 mL
Exo III	実際の添加：30000U(300μL、100U/μL)

30

【0171】

1.3 ゲルろ過クロマトグラフィー及びイソプロパノールを用いて c l D N A を精製する

40

1.3.1 ゲルろ過クロマトグラフィー

緩衝液 A：10mM の トリス-HCl、pH 7.5

カラム：ベスタローズ 6 F F 153 mL

サンプル：28 mL

フロー：60 cm/h

回収画分 20 mA U - 20 mA U、40 mL

CIP：1M の NaOH + 純水

貯蔵：純水

【0172】

1.3.2 エンドトキシン除去及びイソプロパノール沈殿

50

表 6 に示されるように、3 M の酢酸ナトリウム及び 15 % のトリトン 114 を最終工程からのサンプルに添加し、ボルテックスすることで混合させる。サンプルを 4℃で 5 分間維持する。続いて、12000 g で 20 分間、25℃で遠心分離する。遠心分離後、上清を回収し、等しい体積のイソプロパノールを上清に添加し、完全に混合する。室温で 5 分間、サンプルを維持する。その後、12000 g で 20 分間、遠心分離にかけ、上清を除去する。最終的に、10 mM のトリス-HCl (pH 7.5) で沈殿を懸濁させる。

【表 9】

表 9：トリトン 114 系

材料	添加量 (A は、cDNA の体積)
cDNA	A(40mL、~100µg/mL)
15% のトリトン 114	0.1A(4mL)

10

【0173】

酵素消化、ゲルクロマトグラフィー、トリトン 114 処理及びイソプロパノール沈殿の 3 工程後、eGFP__BSaI__cDNA を首尾良く作製した。HPLC クロマトグラムによるサンプルの DNA 均一性 (パーセント) は 97 % であった。サンプルのエンドトキシンは 10 EU / mg 未満である。

【0174】

B RCA による cDNA からの oDNA (修飾ヌクレオチドを含む cDNA) の取得
この実験を、Trueprime-RCA キット (DNA プライマーゼとして TthP
rimPol、及び Phi29 DNA ポリメラーゼといった 2 つの酵素に基づく) 及び T
eLN により、上記セクションで得られた eGFP__BSaI__cDNA 由来のカスタ
マイズされたアダプタを含有する cDNA を作製するために設計する。

20

【表 10】

表 10：実験用機器の概要

機器	ブランド／製造業者	モデル
天秤	Mettler Toledo	ME4002E
pH メータ	INSEA	PHSJ-5
遠心機	ThermoFisher	Heraeus(商標)Pico(商標)21
クリーンベンチ	AIRTECH	SW-CJ-2FD

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1 : 材料情報の概要

番号		材料名	ブランド又は製造業者	カタログ番号
1		エキソヌクレアーゼ III	NEB	M0206
2		NE 緩衝液 1	NEB	M0206
3		トリトン X-114	Solarbio	T8210
4		イソプロピルアルコール	Sinopharm Chemical Reagent Co.,Ltd.	67-63-0
5		KpnI	NEB	R3142L
6		HindIII	NEB	R3104S
7		CutSmart 緩衝液	NEB	B7204S
8		4BBTM TruePrime (登録商標)RCA キット	4basebio	390100
9		緩衝液 D	4basebio	390100
10		緩衝液 N	4basebio	390100
11		反応緩衝液	4basebio	390100
12		酵素 1 (TthPrimPol)	4basebio	390100
13		酵素 2 (Phi29 DNA ポリメラーゼ)	4basebio	390100
14		TelN	GenScript	N A
15		TelN 緩衝液	GenScript	N A
16		AxyPrep DNA ゲル抽出 キット	Axygen	AP・GX・250
17		緩衝液 DE・B	Axygen	AP・GX・250
18		緩衝液 W1	Axygen	AP・GX・250
19		緩衝液 W2	Axygen	AP・GX・250
20		T4 リガーゼ	NEB	M0202T
21		T4 リガーゼ緩衝液	NEB	M0202T
22		BsaI	NEB	R3733L
23		T4 PNK	NEB	M0201L
24		T4 PNK 緩衝液	NEB	M0201L

10

20

30

【0 1 7 5】

1. 1 R C A

- ◇ ピペティングにより常に混合する。ボルテックスしてはならない。
- ◇ 10 μ L の c l D N A (≥ 1 n g / μ L) を清浄な試験管に移す。
- ◇ 10 μ L の緩衝液 D を添加し、室温で 3 分間インキュベートする。
- ◇ 10 μ L の緩衝液 N を各試験管に添加することで反応を中和する。
- ◇ 使用するまでサンプルを室温で維持する*。
- ◇ 以下の表に列挙された順で成分を添加し、増幅ミックスを調製する。
- ◇ 30 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートする**。65 $^{\circ}$ C で 10 分間、反応を不活性化させる。
- ◇ 4 $^{\circ}$ C に冷却する。短期間の貯蔵用として 4 $^{\circ}$ C で、又は長期間の貯蔵用としては -20 $^{\circ}$ C で増幅 DNA を貯蔵する。

40

(*) サンプルを変性させた直後に増幅反応を実施することを強く推奨する。

(**) より高い増幅収率を必要とする場合、インキュベーション時間は 6 時間まで増

50

加させることができる。

【0176】

いくつかの反応を同時に実施した場合、それに応じてスケールアップする。

【表12】

表12：RCA-100 μ L系

材料	添加量	コメント
clDNA	10 μ L	(>1 μ g/mL、合計 80ng)
緩衝液 D	10 μ L	室温で 3 分
緩衝液 N	10 μ L	中和
H ₂ O	37.2 μ L	増幅ミックス
反応緩衝液	10 μ L	
dNTPs	10 μ L	
酵素 1(TthPrimPol)	10 μ L	
酵素 2(Phi29 DNA ポリメラーゼ)	2.8 μ L	

10

【0177】

1.2 (上記のように) イソプロパノールを用いて RCA 産物 (コンカテマー) を精製する

20

【0178】

1.3 Axygenキットを用いて RCA 産物 (コンカテマー) を精製する (任意)。

【0179】

サンプルが 100 μ L 以下の場合、clDNA を精製するため、Axygenキットもまた使用可能である。プロトコルは以下に説明されており、緩衝液を含有するボトルは以下に説明されるように分類されている：

1) 2 倍のサンプル体積の緩衝液 DE-B を添加し、混合する。

2) Miniprepカラムを 2 mL のマイクロフュージ管へと入れる。最終工程からのサンプルをカラムに移す。12,000 x g で 1 分間遠心分離させる。

30

3) 2 mL のマイクロフュージ管のろ液を廃棄する。Miniprepカラムを 2 mL のマイクロフュージ管に戻し、500 μ L の緩衝液 W1 を添加する。12,000 x g で 30 秒間遠心分離させる。

4) 2 mL のマイクロフュージ管のろ液を廃棄する。Miniprepカラムを 2 mL のマイクロフュージ管に戻し、700 μ L の緩衝液 W2 を添加する。12,000 x g で 30 秒間遠心分離させる。

5) 2 mL のマイクロフュージ管のろ液を廃棄する。Miniprepカラムを 2 mL のマイクロフュージ管に戻し入れる。緩衝液 W2 の第 2 の 700 μ L のアリコートを追加し、12,000 x g で 1 分間遠心分離する。

6) Miniprepカラムを (提供された) 清浄な 1.5 mL のマイクロフュージ管に導入する。DNA を溶出するため、50 μ L の 10 mM のトリス-HCl (pH 7.5) を膜の中央に添加する。室温で 1 分間、これを放置する。12,000 x g で 1 分間遠心分離させる。

40

【0180】

1.4 オリゴ変性及びアニーリング

オリゴ (例えば、表 3 のオリゴ 21 又はオリゴ 41) を 95 $^{\circ}$ C で 10 分間変性させ、室温で 30 分、自然にアニーリングさせた。いくつかの反応を同時に実施した場合、それに応じてスケールアップする。

50

【表 1 3】

表 1 3 : オリゴ変性及びアニーリング

材料	添加量
リン酸化オリゴ	95 μ L
20X SSC	5 μ L

【0 1 8 1】

1. 5 オリゴリン酸化（任意、オリゴが既にリン酸化されている場合にはこの工程を省略する）

10

3 7 °C で 1 時間、オリゴリン酸化

【表 1 4】

表 1 4 : オリゴリン酸化

材料	添加量
リン酸化なしのオリゴ	80 μ L
T4 PNK 緩衝液	10 μ L
T4 PNK	10 μ L

【0 1 8 2】

20

1. 6 B s a I 消化

3 7 °C で 2 時間 B s a I 消化及び 7 5 °C で 1 0 分間不活性化

【表 1 5】

表 1 5 : 1 0 0 μ L の B s a I の消化系

材料	添加量
精製 RCA 産物	85 μ L (~100ng/ μ L)
CutSmart 緩衝液	10 μ L
BsaI	20U/ μ L, 1 μ L
滅菌水	0.1mL まで添加する

30

【0 1 8 3】

1. 7（上記のように）イソプロパノールを用いて B s a I 消化した R C A 産物を精製

【0 1 8 4】

1. 8 A x y g e n キットを用いて B s a I 消化した R C A 産物を精製（上記のように、任意でサンプルは 1 0 0 μ L 以下である）

【0 1 8 5】

1. 9 T 4 ライゲーション

1 6 °C で一晩 T 4 ライゲーションし、7 5 °C で 1 0 分不活性化させる。

【表 1 6】

40

表 1 6 : 1 0 0 μ L の T 4 ライゲーション系

材料	添加量
オリゴ	5 μ L (~1 μ g/ μ L)
BsaI 消化した cIDNA	85 μ L (~100ng/ μ L)
T4 リガーゼ緩衝液	10 μ L
T4 リガーゼ	20000U, 1 μ L
滅菌水	0.1mL まで添加する

【0 1 8 6】

50

1.10 高機能 Golden Gate アセンブリ (任意)

従来のライゲーション方法は、目的の構築物を生成するためにいくつかのクローニング工程を通常は必要とする。各工程では、単一の DNA 断片を、ドナープラスミド又は PCR 産物からレシピエントベクターに移す。

【0187】

Golden Gate クローニング中、レシピエントプラスミド中で一度に最大 15 個の断片を組み立てることが可能である。単一の試験管中、全てのプラスミドドナー、レシピエントベクター、IIS 型制限酵素及びリガーゼをピペティングし、サーマルサイクラーでミックスをインキュベートすることでクローニングを実施する。したがって、本発明者らは Golden Gate アセンブリを用いて oDNA を作製することもまた提案している。システム及び条件を表 14 及び表 15 のそれぞれで説明する。いくつかの反応を同時に実施した場合、それに応じてスケールアップする。

10

【0188】

【表 17】

表 17：高機能 Golden Gate アセンブリ系

材料	添加量
10 倍の T4 リガーゼ緩衝液	10µL
clDNA(RCA により増幅)	24µg
オリゴ	72µg
BsaI	(100U) 5uL
T4 DNA リガーゼ	(20000U) 1uL
ヌクレアーゼフリー水	最大 200µL

20

【表 18】

表 18：高機能 Golden Gate アセンブリ条件

温度	時間	
37°C	3 分	25 サイクル
22°C*	5 分	
22°C	60 分	
50°C	5 分	
80°C	10 分	
4°C	使用まで 4°C でサンプルを貯蔵	

30

*NEB の T4 リガーゼの最適温度は、ThermoFisher 製の T4 リガーゼについては 16°C 及び 22°C である。

【0189】

1.11 予期せぬ DNA の消化

40

37°C で 1 時間 Exo III 消化し、75°C で 10 分間不活性化させた。いくつかの反応を同時に実施した場合、それに応じてスケールアップする。

50

【表 19】

表 19 : E x o I I I 消化反応

成分	0.3mL の反応
10 倍の NE 緩衝液 1	30 μ L
最終工程のプラスミド	0.2 mL
Exo III	200 U(2 μ L, 100U/ μ L)
ヌクレアーゼフリー水	最大 300 μ L

10

【0190】

1. 12 (上記のように) イソプロパノールを用いて oDNA を精製する

【0191】

1. 13 A x y g e n キットを用いて oDNA を精製 (上記のように、任意でサンプルは 100 μ L 以下である)。

オリゴ 21 及び 41 を用いて e G F P _ B S a I _ oDNA を首尾良く作製した：

【表 20】

表 20 :

サンプル	濃度 (ng/ μ L)	体積 (ml)	合計 (μ g)	均一性 (%)
oDNA 21	119.6	0.05	6.0	95.6
oDNA 41	130.0	0.05	6.5	96.2

20

【0192】

同様の手順を使用し、配列番号 17 を有する L u c プラスミド (B s a I 制限部位に隣接するルシフェラーゼをコードする配列を含む) 及びオリゴ 15、37、4、28、29、17、22、37、28、29、19 及びオリゴ 22 (表 3 を参照されたい) から開始する c l DNA を調製した。再び同様の手順を使用し、配列番号 18 を有する L u c - I T R プラスミド (目的の配列が B s a I 制限酵素に隣接するルシフェラーゼをコードする配列に隣接している I T R、及びプロテオメラーゼ標的配列を追加的に含む、図 15 を参照されたい)、並びにオリゴ 37 から開始する c l DNA を調製した。こうすることで、oDNA 37 I T R (合計 5.6 μ g) が得られた (図 16 (アガロースゲル電気泳動) を参照されたい)。

30

【0193】

作製された c l DNA の安定性を、医薬品規制調和国際会議 (I n t e r n a t i o n a l C o n f e r e n c e o n H a r m o n i z a t i o n、I C H) に従い、36 ヶ月にわたり -20℃ で試験した。修飾ヌクレオチドを含む全ての合成 c l DNA は、遺伝子治療に使用する上で好適である、安定した値を示した。

40

【0194】

標準的な手順 (特にアガロースゲル電気泳動、グレイスケール分析、陰イオン交換クロマトグラフィー- H P L C 及びサンガー法シーケンシング) により、得られた c l DNA の品質を判定した。全ての c l DNA は、純度、ピーク分離度及び配列検証といった点で品質上良好な特徴を示すことが見出された。例示のため、oDNA 17、oDNA 19 及び oDNA 41 に関する品質管理結果を図 3、図 4 及び図 5 にそれぞれ示す。

【0195】

実施例 2 : 少なくとも 2 個の修飾ヌクレオチドを含有する c l DNA の機能的性能

【0196】

50

実施例 1 で得られた oDNA 15、oDNA 37、oDNA 4、oDNA 28、oDNA 29、oDNA 17、oDNA 22、oDNA 37、oDNA 28、oDNA 29、oDNA 19 及び oDNA 22 と称する c lDNA を HaCaT 細胞上でトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を判定した。

【0197】

トランスフェクション：10%のウシ胎児血清（Hyclone、番号SV30160・03HI）を含有するDMEM高グルコース（Gibco 番号61965-059）を使用し、HaCaT細胞（#EP-CL-0090, Elabscience、バッチ番号8300C282208）を培養した。トランスフェクション前日に細胞をトリプシン処理し、96ウェルプレート（Greiner Bio-one番号655090）に、最終体積100μL／ウェルでウェルあたり6,000個の細胞を入れた。翌日までプレートを5%のCO₂及び37℃で静置した。トランスフェクション直前に培地を吸引により除去し、90μL／ウェルで添加した。トランスフェクション用のビヒクルとしてPEI（jetPEI（登録商標）Polyplyus番号101-10N）又はCXP037（以下の実施例4を参照されたい）をそれぞれ5～30のN／P比で使用し、100ng DNA／ウェルでトランスフェクションを実施した。jetPEI製造業者からの説明書に従い、DPBS（Hyclone、番号SH30028.02、Thermo Fisher）トランスフェクション混合物を調製した。より具体的には、100ngのDNAを、N／P比（式：N／P比＝7.5×jetPETのμg／3×DNAのμgといった式に従った、DNA中のリン酸（P）あたりのjetPET中の窒素残基（N）の数）5であるjetPETと組み合わせた。CXP037を用いてトランスフェクションする場合、30のNP比を使用した（CXP037の15.8μg／DNAのμg）。

10

20

【0198】

ルシフェラーゼ活性：示されたインキュベーション時間にて、100μL／ウェルの市販の試薬であるBrightGlo（Promega 番号E2620）を直接ウェルに添加することで、ルシフェラーゼ活性を判定した。室温、暗所で5分間インキュベートした後、VictorNivo（PerkinElmer）プレートリーダーを使用し、発光を定量した。1日目時点での対照pDNA（Luc）を使用し、個々のウェルの発光を正規化した。

【0199】

結果を図6及び図7に示す。図6は、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含有するc lDNAでトランスフェクトされた細胞は、天然ヌクレオチドを含む対応するc lDNAと比較した場合、有意に高いルシフェラーゼ活性を示したことを示す。このことは、目的の配列（この場合ルシフェラーゼ）の機能的性能が、少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含有するc lDNA内でトランスフェクトされた場合よりもはるかに高い（統計的に有意である）ことを実証している。図7は、アッセイされたc lDNAに関して、時間に対するルシフェラーゼ活性のレベルが漸次的に向上したことを示す。修飾ヌクレオチドを含有するこうしたc lDNAのみが、24時間での結果に対する48時間時点でのルシフェラーゼ活性のレベルで統計的に有意に増加したと観察された。

30

【0200】

実施例3：ポリプレックスからの少なくとも2個の修飾ヌクレオチドを含有するc lDNAの放出

40

【0201】

このアッセイは、この分子が遊離二本鎖DNAに結合した場合に生じたピコグリーンフルオロフォアの蛍光に基づいている。形成されたポリプレックスをPBSで10倍に希釈し、最終体積40μL／ウェルで10μL／ウェルを384ウェルプレートに添加した。生理学的条件で、それぞれ希釈したポリプレックスに8U／mLの濃度のヘパリンを添加した。ピコグリーンを添加した後、12時間経過してから蛍光シグナルを取得した。プレートに含有される標準DNA曲線を使用し、蛍光シグナルをDNA量に変換した。このアッセイにより、最大濃度のヘパリン（8U／mL）が存在しない状態で、及びこれが存在

50

する状態でのDNA濃度の差として定義される放出DNAの量を決定することが可能である。

【0202】

結果を図8に示す。ポリマーCXP037により形成されたポリプレックス、並びに天然ヌクレオチド及び修飾ヌクレオチドを有する異なるoDNAを生理学的条件（8U/mLのヘパリンでインキュベート）（Engelberg et al, 1961）12時間モニタリングし、DNA放出を定量した。カーゴとして使用されているDNAによっては、異なる挙動を観察した。したがって、修飾ヌクレオチドを有するカーゴDNAとして含有しているポリプレックスは、「放出DNA」の量に統計学的に有意な影響を示し、天然DNAを有するポリプレックスよりも大きなDNAアベイラビリティを得る。

10

【0203】

したがって、生理学的環境でこれらのポリプレックスを12時間インキュベートした結果によれば、修飾ヌクレオチドを含むこれらのoDNAを使用すると、DNAバイオアベイラビリティはより高いものとなる。

【0204】

実施例4：ポリマーCXP037の合成及び特性評価

【0205】

CXP037は、細胞トランスフェクション用のclDNAを用いてポリプレックスミセルを形成する、ポリカチオン性ポリマービヒクルである。

【0206】

一般論 特段記載しない限り、窒素雰囲気下で反応を実施した。NMP（1-メチル-2ピロリジノン、99%超）、無水CH₂Cl₂及び無水DMFを含む溶媒をAldrichから購入し、記載通りに使用した。全ての試薬を商業的製造業者から入手し、さらに精製することなく使用した。重合反応をIR（CARY 630 ATR-FTIR分光光度計）を用いてモニタリングした。ビバスピ3000 MWCOPESを使用し、遠心式限外ろ過によりアミノリシス反応を精製した。

20

【0207】

NMR分光法：300MHzのBruker Advance AC-300分光計で¹Hスペクトルを記録した。

【0208】

SEC-MALS：UV-RIRALS-MALSを搭載したTDALVERN 305検出器を備えたMALVERN GPC MAXを使用し、多角度光散乱光度計（SEC-MALS）測定に連結したサイズ排除クロマトグラフィーを実施した。1mL/分の流量で0.005%のNaN₃を含む0.1MのNaNO₃溶液のプレカラムとともにTSKgel G3000PWXL-CPカチオン性カラムを連続して使用し、室温で分離を実施した。カラムに注入されたサンプルの質量は通常2～5mgであったが、溶液の濃度は10～20mg/mLであった。データ取得及び評価用のOMNISEC 5.12ソフトウェア。

30

【0209】

pKa決定手順：酸-塩基滴定によりカチオン性ポリマーのpKaを決定し、プロセス全体を通じた溶液のpHを測定する。続いて、滴定グラフからpKaを得る。この測定を実施するため、1mg/mLのカチオン性ポリマー溶液をMilli-Q水で調製し、溶液のpHがおよそ2になるまで既知の品質のHCl（0.1M）を添加する。この時点で、Dosino 800ディスペンサを備えたMethrom 916電位差自動滴定装置を使用し、NaOH（0.2M）で滴定を実施する。50mV/分のシグナルドリフトを用いて滴定速度を0.1mL/分に設定する。pHが12に到達した時に滴定を完了する。機器により存在する化学種のpKaを測定し、.txtレポートを生成する。機器が化合物の化学的性質に対応しない多くの当量点を同定する場合、グラフを用いる方法を使用し、pKaを手動で判定する。

40

【0210】

50

P A s p D E T / D I I P A - 化合物 C X P 0 3 7 A の合成経路 (図 9 A を参照)

ポリ (β - ベンジル L - アスパルタート) (P B L A) の合成 (図 9 B を参照) n - ブチルアミンを開始剤として使用し、N C A の開環重合のための一般的な手順に従って P B L A を合成した。窒素雰囲気下にて、加熱乾燥した S c h l e n k フラスコ内で合成反応を実施した。最初に、B L A N C A (3 g、12 mmol) を乾燥ジクロロメタン (120 mL) と D M F (10 mL) の混合物に溶解させた。続いて、D M F (2 mL) 中の開始剤溶液 (n - ブチルアミン、11.89 μL、0.12 mmol) を反応混合物に添加した。混合物を 50 °C で 16 時間攪拌させた。完了時には反応混合物は透明になった。I R によりモノマーの完全変換を検出することができた。反応混合物をジエチルエーテルに注ぎ入れ、産物を沈殿させた。遠心分離 (3750 rpm、4 分) により沈殿を単離し、真空下で乾燥させた。P B L A を白色固体として単離した (1.5 g、η = 60%) P B L A の ¹H N M R スペクトラムを図 10 A に示す。

10

【0211】

P A s p (D E T / D I I P A) - 化合物 C X P 0 3 7 A の合成 (図 9 C を参照) D E T 及び D I I P A を用いた P B L A のアミノリシス反応により P A s p (D E T / D I I P A) を調製した。P B L A (D P = 67, 60 mg) を N M P (3 mL) に溶解し、4 °C に冷却した。この溶液を D E T (A s p 単位に対し 50 当量の D E T、1.58 mL) と D I I P A (アスパラギン酸単位に対し 100 当量の D I I P A、5.18 mL) の混合物容器に滴下し、これを 4 °C に冷却し、混合物を同じ温度で 4 時間攪拌した。4 時間経過した後、中和のため、反応混合物を冷 H C l (6 M) に滴下した (p H : 3.5)。遠心式限外ろ過により、ポリマー生成物を精製した。ろ過後、得られたポリマー水溶液を凍結乾燥させ、最終生成物を得た (42 mg, η = 64%)。図 12 は、M W 判定用の C X P 0 3 7 A 分析の S E C - M A L S - R I を示す。M W = 14000 Da (1.03) であることを観察した。図 11 は、C X P 0 3 7 の ¹H N M R スペクトラムを示す。

20

【0212】

引用文献リスト

Kapp K et al., "EnanDIM - a novel family of L-nucleotide-protected TLR9 agonists for cancer immunotherapy" 2019, J Immunother Cancer., vol 7(1), pp. 5

Heinrich J. et al., "Linear closed mini DNA generated by the prokaryotic cleaving-joining enzyme TelN is functional in mammalian cells" 2002, J Mol Med, vol. 80(10), pp. 648-54

30

Xiao X. et al., "A novel 165-base-pair terminal repeat sequence is the sole cis requirement for the adeno-associated virus life cycle", 1997, J Virol., vol. 71(2), pp. 941-948.

Altschul et al., "Basic local alignment search tool", 1990, J. Mol. Biol, vol. 215, pp. 403-410.

WO2011000997

US4373071

EP1859812

40

Engelberg H. Plasma heparin levels in normal man. Circulation. 1961;23:578-581. doi: 10.1161/01.CIR.23.4.578.

Beaucage S. L. et al, Deoxynucleoside phosphoramidites-A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. Tetrahedron Letters, Volume 22, Issue 20, 1981, Pages 1859-1862

【図面】

【図 1】

Drawings

A



B

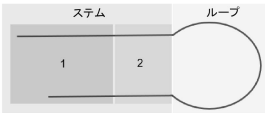


FIG. 1

【図 2】

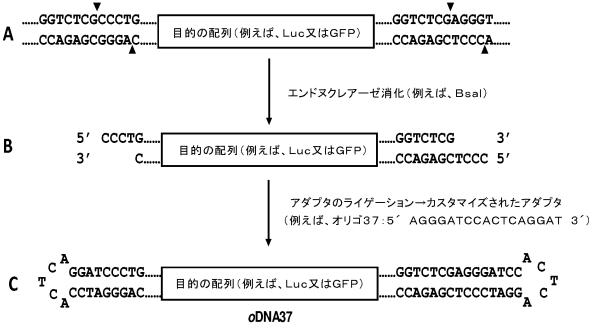


FIG. 2

【図 3 - 1】

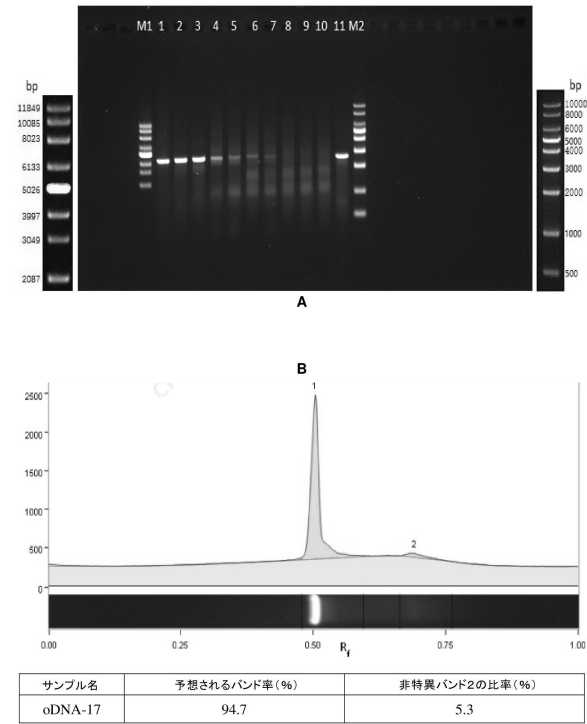


FIG. 3

【図 3 - 2】

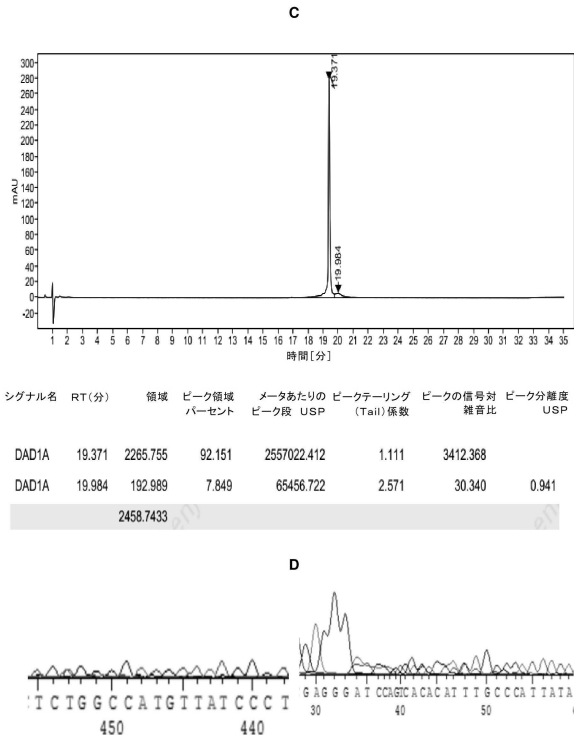


FIG. 3 (cont.)

【図 4 - 1】

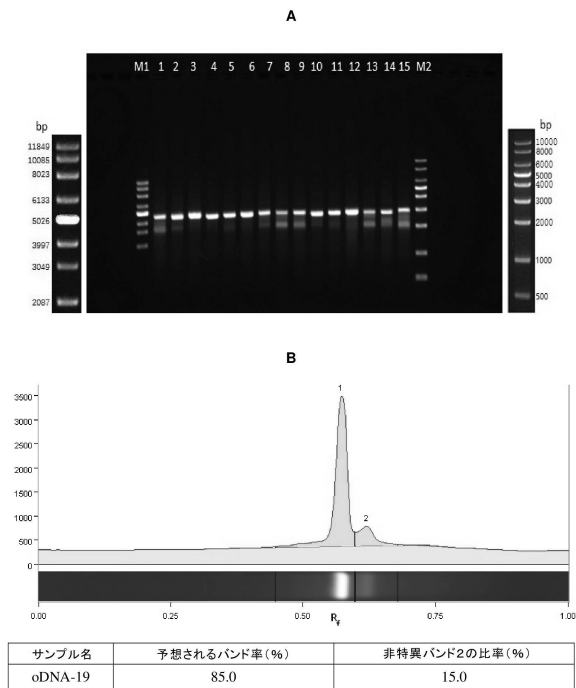


FIG. 4

【図 4 - 2】

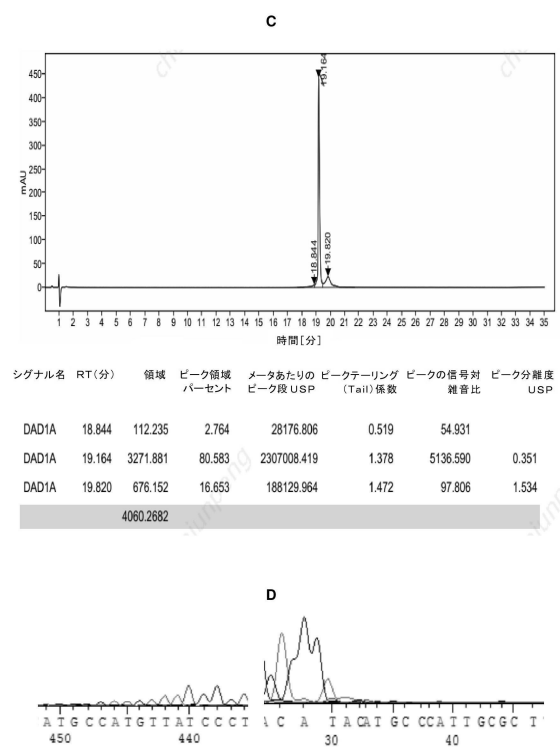


FIG. 4 (cont.)

【図 5】

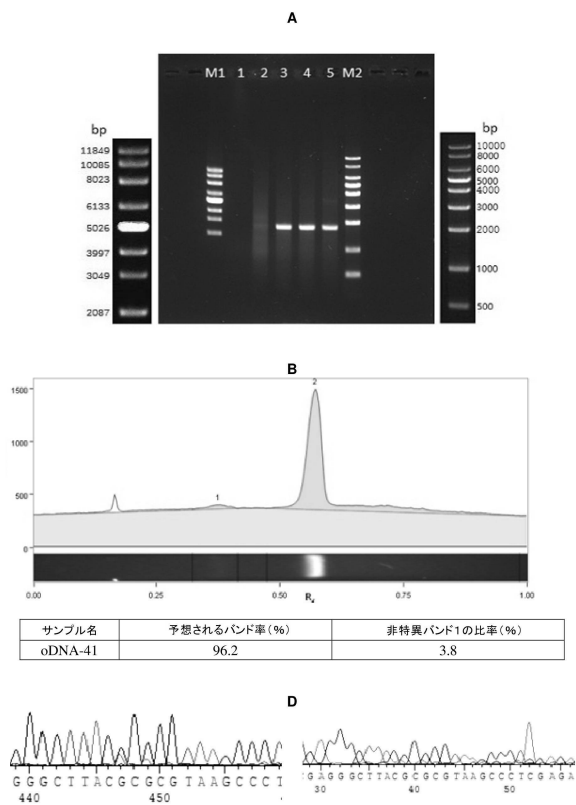


FIG. 5

【図 6】

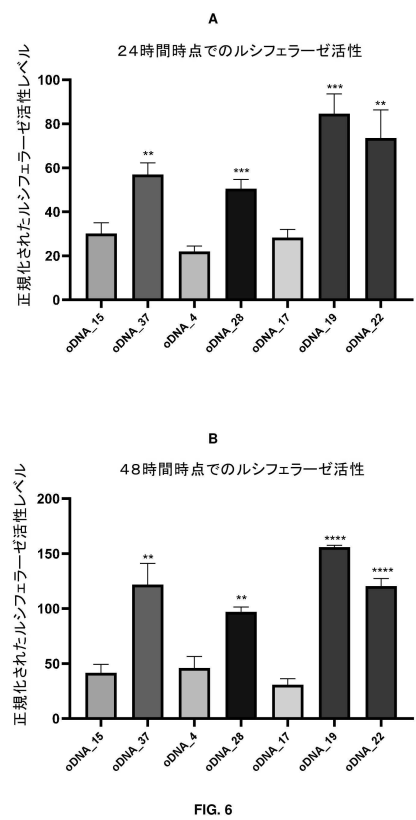
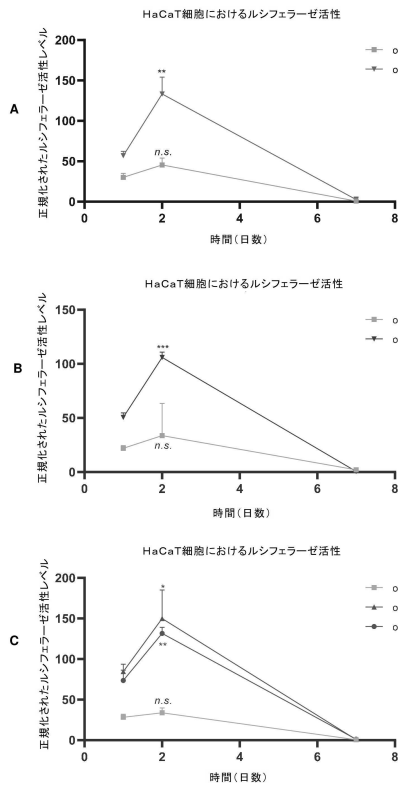
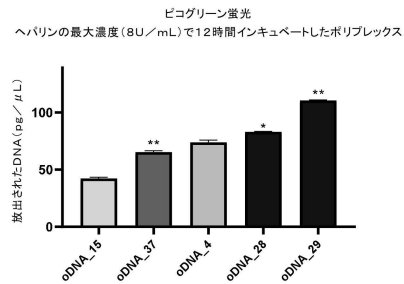


FIG. 6

【図 7】



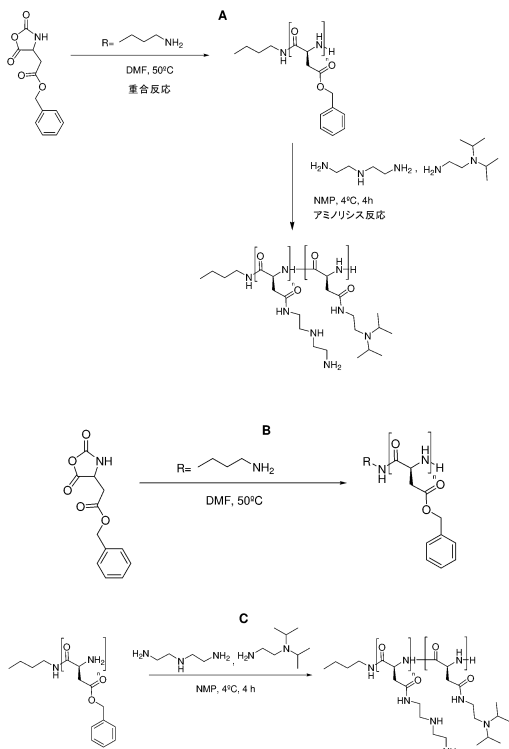
【図 8】



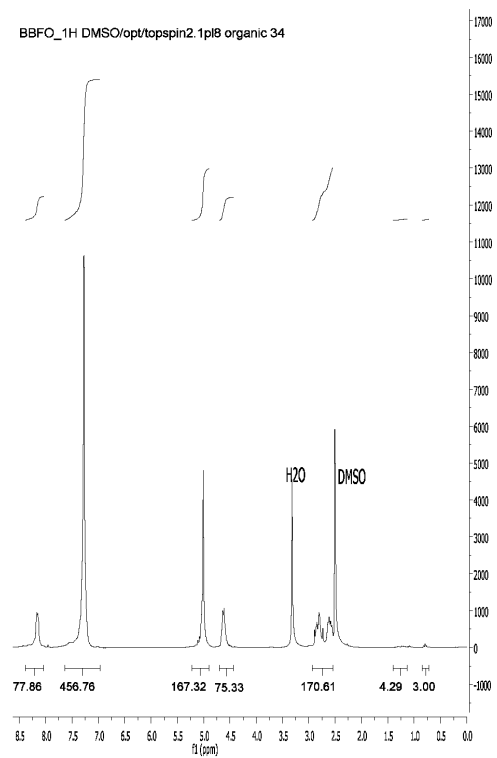
10

20

【図 9】



【図 10】



30

40

50

【図 1 1】

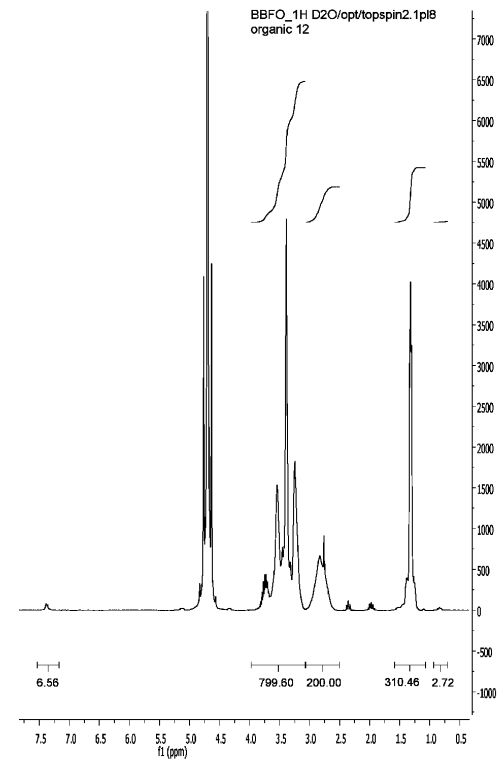


FIG. 11

【図 1 2】

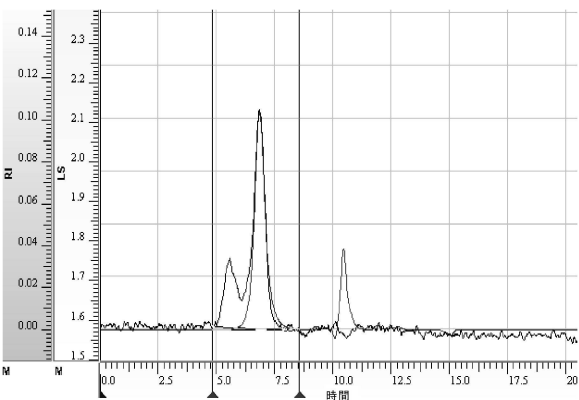


FIG. 12

【図 1 3】

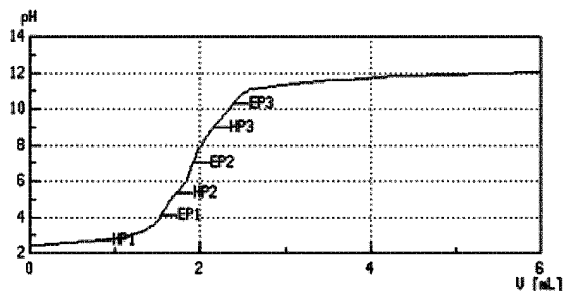


FIG. 13

【図 1 4】

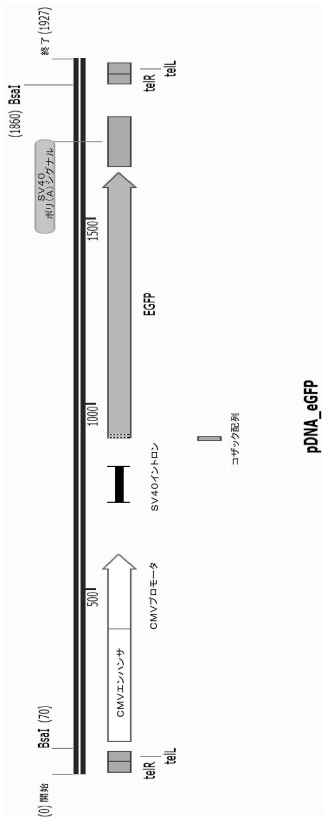
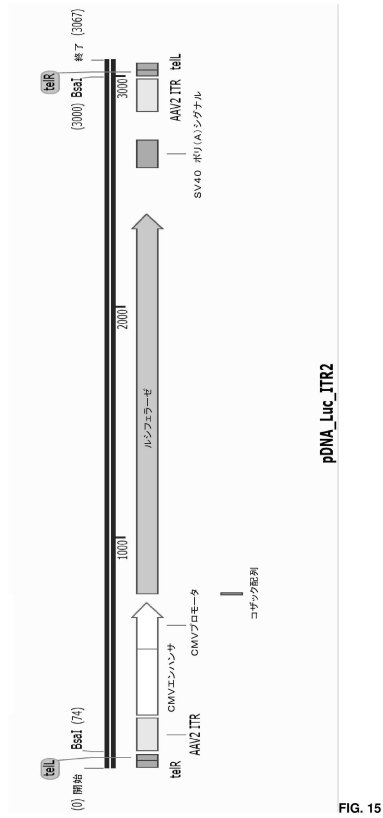


FIG. 14

【図 15】



【 図 1 6 】

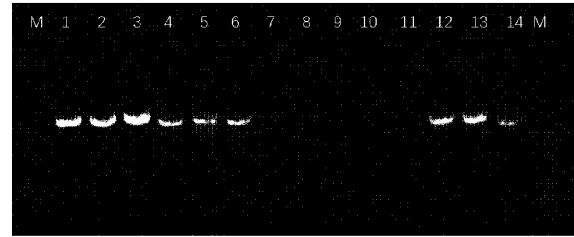


FIG. 16

【配列表】

2023511992000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/052204

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/6844 A61K38/00 C12N15/113 C12P19/34 ADD.		
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) C12Q C12P A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/213460 A1 (HELIX NANOTECHNOLOGIES INC [US]) 22 November 2018 (2018-11-22) the whole document	1-29
X	US 2007/049546 A1 (BRZEZICHA BERNADETTE [DE] ET AL) 1 March 2007 (2007-03-01) the whole document	1-29
X	WO 2015/157747 A1 (REDVAULT BIOSCIENCES LP [US]) 15 October 2015 (2015-10-15) the whole document	1-29
X	WO 2015/124614 A1 (MOLOGEN AG [DE]) 27 August 2015 (2015-08-27) the whole document	1-29
	----- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 April 2021		Date of mailing of the international search report 11/05/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bradbrook, Derek

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/052204

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KERSTIN KAPP ET AL: "Distinct immunological activation profiles of dSLIM? and ProMune? depend on their different structural context : dSLIM? versus ProMune?", IMMUNITY, INFLAMMATION AND DISEASE, vol. 4, no. 4, 18 October 2016 (2016-10-18), pages 446-462, XP055416104, ISSN: 2050-4527, DOI: 10.1002/iid3.126 the whole document -----	1-29
X	MORENO S ET AL: "DNA immunisation with minimalistic expression constructs", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 22, no. 13-14, 16 April 2004 (2004-04-16), pages 1709-1716, XP004500425, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2003.09.051 the whole document -----	1-29
A	FARSHBAF MASOUD ET AL: "Significant role of cationic polymers in drug delivery systems", ARTIFICIAL CELLS, NANOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY, vol. 46, no. 8, 6 November 2017 (2017-11-06), pages 1872-1891, XP055799126, US ISSN: 2169-1401, DOI: 10.1080/21691401.2017.1395344 the whole document -----	27-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/052204

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/052204

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018213460 A1	22-11-2018	US 2020172914 A1 WO 2018213460 A1	04-06-2020 22-11-2018
US 2007049546 A1	01-03-2007	CN 1918293 A DK 1716234 T3 EP 1716234 A1 US 2007049546 A1 WO 2005080567 A1	21-02-2007 20-01-2014 02-11-2006 01-03-2007 01-09-2005
WO 2015157747 A1	15-10-2015	AU 2015243130 A1 CA 2945358 A1 CN 106460065 A EP 3129505 A1 JP 2017512071 A JP 2020188774 A KR 20160138579 A SG 10201808952W A SG 11201608486S A US 2017067097 A1 WO 2015157747 A1	03-11-2016 15-10-2015 22-02-2017 15-02-2017 18-05-2017 26-11-2020 05-12-2016 29-11-2018 29-11-2016 09-03-2017 15-10-2015
WO 2015124614 A1	27-08-2015	AU 2015220911 A1 BR 112015025748 A2 CA 2908522 A1 CN 105264074 A DK 2999787 T3 EP 2999787 A1 ES 2634002 T3 GB 2523187 A HK 1216758 A1 JP 6067893 B2 JP 2016526373 A KR 20150130425 A RU 2015140720 A SG 11201508108Y A US 2016348114 A1 WO 2015124614 A1	15-10-2015 10-10-2017 27-08-2015 20-01-2016 07-08-2017 30-03-2016 26-09-2017 19-08-2015 02-12-2016 25-01-2017 05-09-2016 23-11-2015 29-03-2017 29-10-2015 01-12-2016 27-08-2015

10

20

30

40

50

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

7 デー, セー. ホセ アバスカル 5 8

F ターム (参考) 4C084 AA13 NA10 ZC80
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA10 ZC80