(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-547615
(P2023-547615A)
(43)公表日　令和5年11月13日(2023.11.13)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/10	Ｚ ＺＮＡ	４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｑ	*1/68 (2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/68	１００Ｚ	４Ｃ０５７
Ｃ１２Ｑ	*1/6855(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6855	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6872(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6872	Ｚ	
Ｃ０７Ｈ	*21/04 (2006.01)*	Ｃ０７Ｈ	21/04	Ｚ	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全63頁）

(21)出願番号　特願2023-524597(P2023-524597)
(86)(22)出願日　令和3年10月22日(2021.10.22)
(85)翻訳文提出日　令和5年6月9日(2023.6.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/056334
(87)国際公開番号　WO2022/087475
(87)国際公開日　令和4年4月28日(2022.4.28)
(31)優先権主張番号　63/104,785
(32)優先日　令和2年10月23日(2020.10.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,
最終頁に続く

(71)出願人　501244222
ザ スクリプス リサーチ インスティテュート
アメリカ合衆国９２０３７カリフォルニア州ラ・ホヤ、ノース・トーリー・パインズ・ロード１０５５０
(71)出願人　519050543
シンソークス， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０３７， ラ ホヤ， ノース トリー パインズ ロード １１０９９， スイート ２９０
(74)代理人　100127926
弁理士　結田 純次
(74)代理人　100140132
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　非天然ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドの逆転写

(57)【要約】
本明細書で、非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを逆転写する方法であって、非天然核酸塩基を含む非天然ｄＮＴＰの存在下で逆転写酵素によりポリヌクレオチドを逆転写することを含み、逆転写酵素は非天然ＮＴＰが組み込まれるｃＤＮＡを重合させる方法が開示される。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは約５００ｎＭ未満またはそれに等しい濃度で存在し、および／またはポリヌクレオチドはｔＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＲＮＡアプタマーまたは複数のＲＮＡアプタマー候補のメンバーである。
【選択図】図１

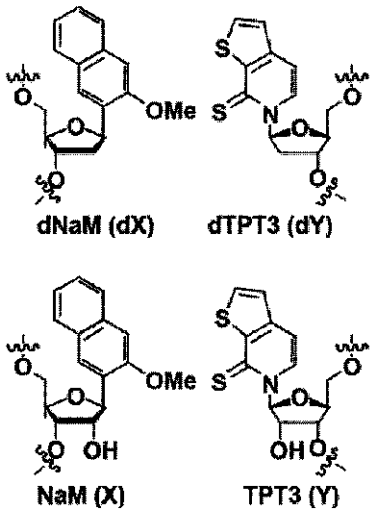
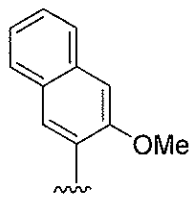


Fig. 1

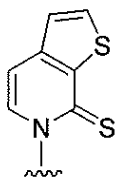
【特許請求の範囲】
【請求項１】
非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを逆転写する方法であって、非天然核酸塩基を含む非天然ｄＮＴＰの存在下で逆転写酵素によりポリヌクレオチドを逆転写することを含み、逆転写酵素は非天然ｄＮＴＰが非天然ヌクレオチドとして取り込まれるｃＤＮＡを重合させる方法。
【請求項２】
（ａ）ポリヌクレオチドは約５００ｎＭ未満またはそれに等しい濃度で存在する；
（ｂ）逆転写酵素はＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩである；
（ｃ）非天然ｄＮＴＰはｄＴＰＴ３ＴＰでない；
（ｄ）方法は、非天然ヌクレオチドを認識する結合パートナーを使用してｃＤＮＡ中の非天然ヌクレオチドの量を測定することをさらに含む；
（ｅ）逆転写酵素は完全長ｃＤＮＡを生成し、完全長ｃＤＮＡの少なくとも２５％は非天然ヌクレオチドを含む；および／または
（ｆ）ポリヌクレオチドはｔＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＲＮＡアプタマーまたは複数のＲＮＡアプタマー候補のメンバーである、
請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ポリヌクレオチドはＲＮＡであり、場合によりＲＮＡはｍＲＮＡまたはｔＲＮＡである、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
ｃＤＮＡ中の非天然ヌクレオチドの量を測定することをさらに含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
非天然ヌクレオチドの組込みを測定する方法であって：
ａ．第１の非天然ヌクレオチドを含むＲＮＡを生成するために第１の非天然核酸塩基を含む非天然ＮＴＰの存在下でＲＮＡポリメラーゼによって非天然デオキシリボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを転写すること；
ｂ．第２の非天然核酸塩基を含む非天然ｄＮＴＰの存在下で逆転写酵素によってＲＮＡを逆転写することであって、逆転写酵素は非天然ＮＴＰが第２の非天然ヌクレオチドとして取り込まれるｃＤＮＡを重合させること；および
ｃ．ｃＤＮＡ中の第２の非天然ヌクレオチドの量を測定すること
を含む方法。
【請求項６】
転写工程はインビボである、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
転写工程は原核生物または細菌の中で起こる、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
転写工程は大腸菌の中で起こる、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
転写工程はインビトロである、請求項５に記載の方法。
【請求項１０】
ｃＤＮＡ分子中の第２の非天然ヌクレオチドの量は、転写前のポリヌクレオチド中の非天然デオキシリボヌクレオチドの量と比較して測定される、請求項５～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
測定することは：
ａ．非天然ヌクレオチドを含有する転写前のポリヌクレオチドの割合を決定するために転写前のポリヌクレオチドに対してビオチンシフトアッセイを実行すること；および
ｂ．非天然ヌクレオチドを含有するｃＤＮＡの割合を決定するためにｃＤＮＡに対してビ

オチンシフトアッセイを実行すること
を含む、請求項５～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
ｃＤＮＡ中の非天然ヌクレオチドまたは第２の非天然ヌクレオチドの量は非天然核酸塩基に結合する結合パートナーを使用して測定される、請求項４～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
ｃＤＮＡ中の非天然ヌクレオチドまたは第２の非天然ヌクレオチドの量を測定することは、ゲルシフトアッセイまたはビオチンシフトアッセイを含む、請求項４～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
ビオチンシフトアッセイは：
ａ．ｃＤＮＡ中の非天然ヌクレオチドと対になるビオチン化核酸塩基を含む非天然ｄＮＴＰの存在下でｃＤＮＡを増幅すること；
ｂ．ビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物をビオチン化ヌクレオチドを含まないＤＮＡ増幅生成物から分離すること；および
ｃ．ビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物およびビオチン化ヌクレオチドを含まないＤＮＡ増幅生成物の量、またはビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物のビオチン化ヌクレオチドを含まないＤＮＡ増幅生成物に対する比、または非天然ヌクレオチドを含有するｃＤＮＡの割合を測定すること
を含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
ビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物をビオチン化核酸塩基を含まないＤＮＡ増幅生成物から分離することはゲル電気泳動を含み、場合によりゲル電気泳動はポリアクリルアミドゲル電気泳動である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
ビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物をビオチン化ヌクレオチドを含まないＤＮＡ増幅生成物から分離することは、増幅生成物をストレプトアビジンとインキュベートすることを含む、請求項１４～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
ＲＮＡまたはポリヌクレオチドは逆転写の間に約１μＭ未満またはそれに等しい濃度で存在する、請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
ＲＮＡまたはポリヌクレオチドは逆転写の間に約１～１０ｎＭ、約１０～２０ｎＭ、約２０～３０ｎＭ、約３０～４０ｎＭ、約４０～５０ｎＭ、約５０～７５ｎＭ、約７５～１００ｎＭ、約１００～１５０ｎＭ、約１５０～２００ｎＭ、約２００～３００ｎＭ、約３００～４００ｎＭまたは約４００～５００ｎＭの範囲の濃度で存在する、請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
逆転写酵素は完全長ｃＤＮＡを生成し、完全長ｃＤＮＡの少なくとも２５％は非天然ヌクレオチドを含む、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
トランケーションされていないｃＤＮＡの少なくとも５０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％または９９％は非天然ヌクレオチドを含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
非天然リボヌクレオチドを含むＲＮＡまたはポリヌクレオチドはｍＲＮＡである、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、ｍＲＮＡのコドンの第１の位置（Ｘ－Ｎ－

ＮまたはＹ－Ｎ－Ｎ）に位置する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２３】
非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、ｍＲＮＡのコドンの中間位置（Ｎ－Ｘ－ＮまたはＮ－Ｙ－Ｎ）に位置する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２４】
非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、ｍＲＮＡのコドンの最後の位置（Ｎ－Ｎ－ＸまたはＮ－Ｎ－Ｙ）に位置する、請求項２０に記載の方法。
【請求項２５】
ｍＲＮＡ中の非天然リボヌクレオチドを含有するコドンは、ＡＸＣ、ＡＹＣ、ＧＸＣ、ＧＹＣ、ＧＸＴ、ＧＹＴ、ＡＸＡ、ＡＸＴ、ＴＸＡまたはＴＸＴである、請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
非天然リボヌクレオチドを含むＲＮＡまたはポリヌクレオチドはｔＲＮＡである、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２７】
非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、ｔＲＮＡのアンチコドンの第１の位置（Ｘ－Ｎ－ＮまたはＹ－Ｎ－Ｎ）に位置する、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、ｔＲＮＡのアンチコドンの中間位置（Ｎ－Ｘ－ＮまたはＮ－Ｙ－Ｎ）に位置する、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】
非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、ｔＲＮＡのアンチコドンの最後の位置（Ｎ－Ｎ－ＸまたはＮ－Ｎ－Ｙ）に位置する、請求項２６に記載の方法。
【請求項３０】
ｔＲＮＡのアンチコドンは、ＧＹＴ、ＧＸＴ、ＧＹＣ、ＧＸＣ、ＣＹＡ、ＣＸＡ、ＡＹＣまたはＡＸＣである、請求項２６～２９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】
非天然リボヌクレオチドはＸであり、Ｘは、
【化１】



を非天然リボヌクレオチドの核酸塩基として含む（ＮａＭ）、請求項１～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
非天然リボヌクレオチドはＹであり、Ｙは、
【化２】



を非天然リボヌクレオチドの核酸塩基として含む（ＴＰＴ３）、請求項１～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】

ＲＮＡはＲＮＡアプタマーである、請求項１～２０または３１～３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
ＲＮＡアプタマー候補をスクリーニングする方法であって：
ａ．少なくとも１つの非天然ヌクレオチドを含む複数の異なるＲＮＡオリゴヌクレオチドを標的とインキュベートすること；
ｂ．標的に結合する複数のＲＮＡオリゴヌクレオチドのために少なくとも１回の選択を実行すること；
ｃ．標的に結合する富化されたＲＮＡオリゴヌクレオチドを単離することであって、単離された富化されたＲＮＡオリゴヌクレオチドはＲＮＡアプタマーを含むこと；および
ｄ．ＲＮＡアプタマーの１つまたはそれ以上を、ＲＮＡアプタマー中の少なくとも１つの非天然ヌクレオチドに相補的な位置で非天然デオキシリボヌクレオチドを含むｃＤＮＡに逆転写し、それによってＲＮＡアプタマーに対応するｃＤＮＡ分子のライブラリーを提供すること
を含む方法。
【請求項３５】
複数の異なるＲＮＡオリゴヌクレオチドはランダム化されたヌクレオチド領域を含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
ランダム化されたヌクレオチド領域は少なくとも１つの非天然ヌクレオチドを含む、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
ＲＮＡオリゴヌクレオチドはバーコード配列および／またはプライマー結合配列を含む、請求項３４～３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
ｃＤＮＡ分子の配列決定をすることをさらに含む、請求項３４～３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３９】
少なくとも１回の選択を実行することは、未結合であるか弱く結合したＲＮＡオリゴヌクレオチドを除去する洗浄工程を含む、請求項３４～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
複数の追加の配列を生成させるためにｃＤＮＡ分子の配列を突然変異させることをさらに含む、請求項３４～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
複数の追加の配列はＲＮＡに転写され、標的に結合するＲＮＡアプタマーのための少なくとも１回の追加の選択にかけられる、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
ｃＤＮＡ分子の配列を突然変異させることは誤りがちのＰＣＲを含む、請求項４０～４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
追加の回の選択で標的への結合のための選択圧を増加させることをさらに含む、請求項３４～４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４４】
選択圧を増加させることは、前の回より高い塩濃度で１回またはそれ以上の洗浄工程を実行すること、および／または選択の間に結合競合者を含ませることを含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
標的に結合するそれらの能力についてＲＮＡアプタマーを分析することをさらに含む、請求項３４～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】

標的に結合するそれらの能力についてＲＮＡアプタマーを分析することは、K_d、k_{on}またはk_{off}を決定することを含む、請求項４５に記載の方法。

【請求項４７】

標的をアゴナイズするそれらの能力についてＲＮＡアプタマーを分析することをさらに含む、請求項３４～４４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４８】

標的をアゴナイズするそれらの能力についてＲＮＡアプタマーを分析することはEC_{50}値を決定することを含む、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

標的に拮抗するそれらの能力についてＲＮＡアプタマーを分析することをさらに含む、請求項３４～４４のいずれか１項に記載の方法。

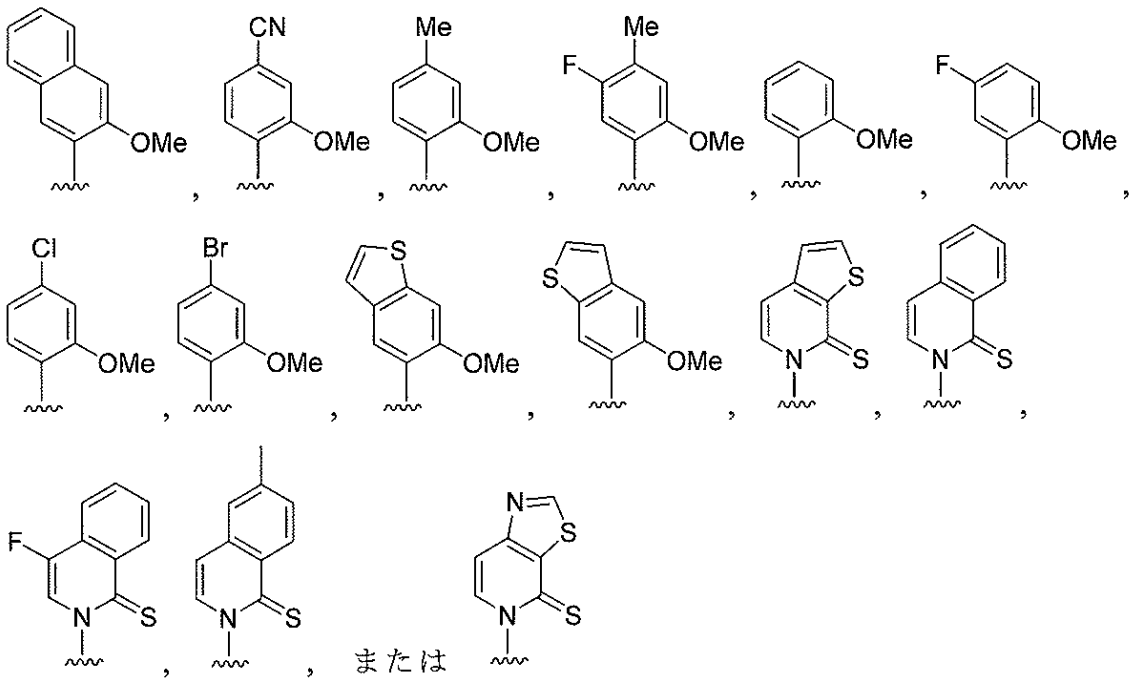
【請求項５０】

標的に拮抗するそれらの能力についてＲＮＡアプタマーを分析することはK_iまたはIC_{50}値を決定することを含む、請求項４９に記載の方法。

【請求項５１】

少なくとも１つの非天然ヌクレオチドは：

【化３】

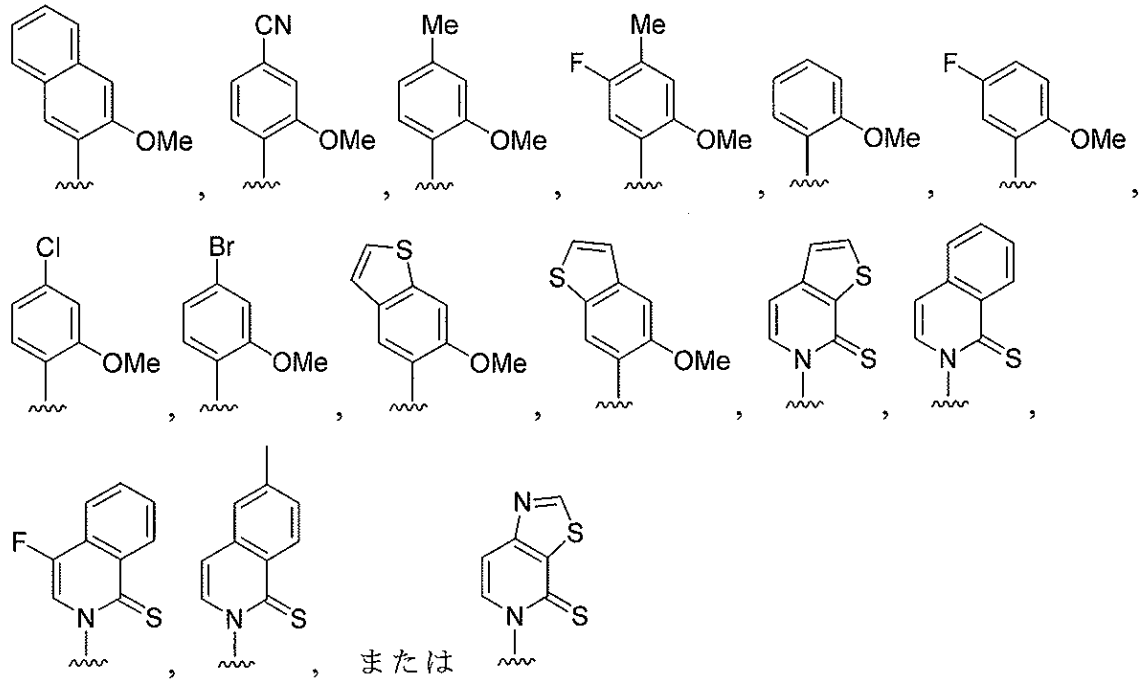


を含む、請求項１～５０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５２】

逆転写を受けるポリヌクレオチド中の少なくとも１つの非天然ヌクレオチドは：

【化４】

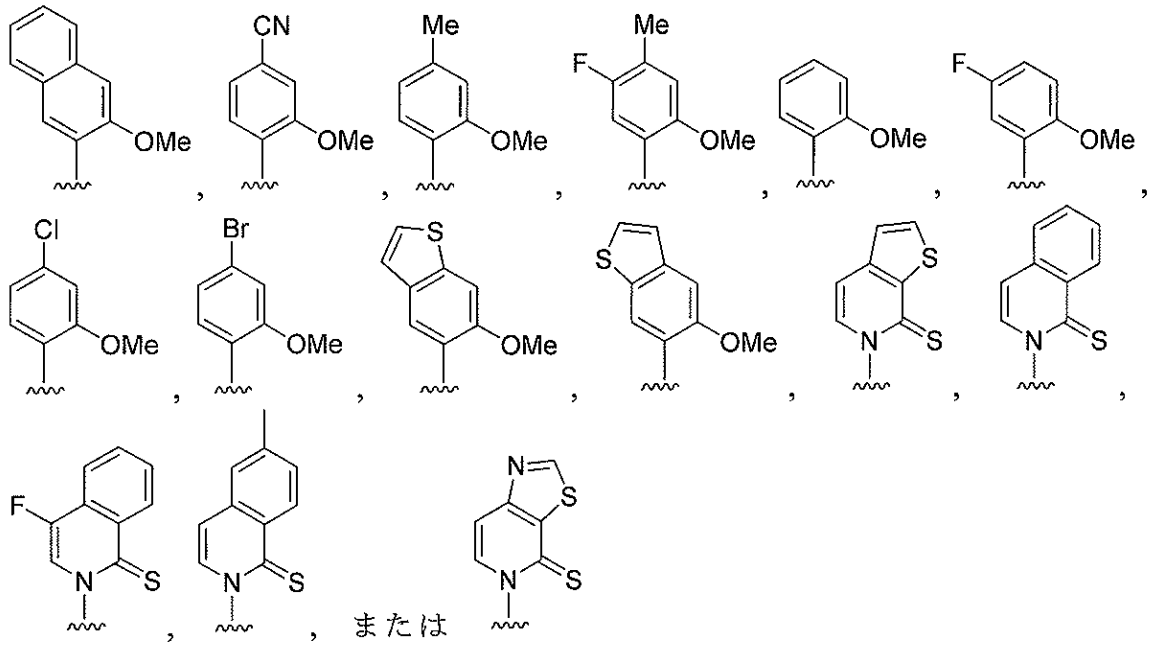


を含む、請求項５１に記載の方法。

【請求項５３】

ｃＤＮＡに組み込まれる少なくとも１つの非天然ヌクレオチドは：

【化５】

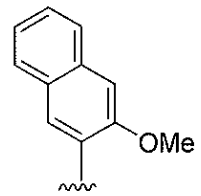


を含み、場合により、非天然ヌクレオチド中の少なくとも１つの非天然核酸塩基は、逆転写を受けるポリヌクレオチド中の少なくとも１つの非天然核酸塩基と異なる、請求項５１または５２に記載の方法。

【請求項５４】

少なくとも１つの非天然ヌクレオチドは：

【化６】

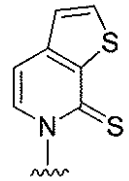


を含む、請求項５１～５３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５５】

少なくとも１つの非天然ヌクレオチドは：

【化７】



を含む、請求項５１～５３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５６】

逆転写酵素はトリ骨髄芽球症ウイルス（ＡＭＶ）逆転写酵素、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭＭＬＶ）逆転写酵素、Ｓｕｐｅｒ　Ｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ（ＳＳ　ＩＩ）逆転写酵素、Ｓｕｐｅｒ　Ｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ（ＳＳ　ＩＩＩ）逆転写酵素、Ｓｕｐｅｒ　Ｓｃｒｉｐｔ　ＩＶ（ＳＳ　ＩＶ）逆転写酵素またはＶｏｌｃａｎｏ　２Ｇ（Ｖ２Ｇ）逆転写酵素である、請求項１～５５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５７】

逆転写酵素はＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩである、請求項１～５６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５８】

非天然ｄＮＴＰはｄＴＰＴ３ＴＰでない、請求項１～５７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５９】

逆転写はインビトロで起こる、請求項１～５８のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願への相互参照

本出願は、全ての目的のために参照により本明細書に完全に組み入れられる、２０２０年１０月２３日に出願の米国特許仮出願第６３／１０４，７８５号の利益を主張する。

【０００２】

連邦政府が後援する研究に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所による助成金番号ＧＭ１１８１７８の米国政府支援により行われた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【０００３】

配列表

本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体はここに参照により組み入れられる。前記ＡＳＣＩＩコピーは２０２１年１０月２２日に作成され、ファイル名は「３６２７１－８１２＿６０１＿ＳＬ．ｔｘｔ」であり、サイズは１２，４９９バイトである。

【背景技術】

【０００４】
序論および概要
６１のセンスコドン／２０のアミノ酸遺伝子コードは、その発見の後、全ての生物体にわたって不変であり、保存されていると考えられた。しかし、徹底的な特徴付けにより、変更されたコドン帰属、および稀な場合には非正規アミノ酸（ｎｃＡＡ）セレノシステインまたはピロリシンを含みさえする拡張による、予想外の柔軟性が明らかになった。（非特許文献１～３。）これらの変更の全ては天然コドンの再帰属から生じ、類似の戦略は、終止コドンおよび再コードされるサプレッサーｔＲＮＡ／アミノアシルｔＲＮＡシンセターゼ（ａａＲＳ）の直交性の対を利用することによって、目的のｎｃＡＡを含むようにコードを拡張するかなりの努力の基礎を形成する。（非特許文献４～５。）これらの再帰属戦略の代替形態は、非天然塩基対（ＵＢＰ）の開発を通して新規コドンの形成に焦点を当てることである。（非特許文献６～７。）最も注目すべきことに、そのＤＮＡ中にＵＢＰを保持し、それらをｍＲＮＡおよびｔＲＮＡに転写し、および非天然のアンチコドンを有するｔＲＮＡをｎｃＡＡで選択的にアミノアシル化するａａＲＳが提供される場合にはそれらを使用してｎｃＡＡを含有するタンパク質を翻訳する大腸菌をベースとした半合成生物体（ＳＳＯ）を作製するために、（ｄ）ＮａＭ－（ｄ）ＴＰＴ３　ＵＢＰ（図１）を含むいくつかのＵＢＰが使用された。
【０００５】
（ｄ）ＮａＭ－（ｄ）ＴＰＴ３　ＵＢＰは非天然タンパク質を生成することができるが、ｎｃＡＡが組み込まれる効率はその配列コンテキストに依存し、そのために一部のコドンは他のものより効率的である。配列コンテキストを調べて、ＤＮＡとして効率的に複製され、次にＲＮＡに効率的に転写され、リボソームで解読されるいくつかのコドンが同定されている。（非特許文献８。）ＳＳＯのＤＮＡ中でのＵＢＰの保持のアッセイが利用可能であるので、より効率的でないコドンのいくつかの低減した忠実度は、劣った転写または劣った翻訳から生じることが知られている。しかし、転写忠実度を測定するアッセイの欠如は、忠実度を損なう特定の工程の同定を阻止した。さらに、異なるＤＮＡポリメラーゼ、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼおよび大腸菌リボソームはＵＢＰを生産的に認識することができることは明白であるが、他の一般的なＤＮＡ／ＲＮＡ相互作用だけを媒介する逆転写酵素の能力は完全には探られておらず、唯一の利用可能なデータはそれらがＵＢＰを生産的に認識しないかもしれないことを示唆する。（非特許文献９。）したがって、非天然ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを逆転写するための方法の、ならびにタンパク質へのＳＳＯ　ｎｃＡＡ組込みの忠実度が転写および翻訳の相対的な寄与に関して理解することができるように転写および逆転写の忠実度を決定することができる方法の必要性がある。
【０００６】
さらに、ＲＮＡオリゴヌクレオチドは、例えば標的を阻害または検出するために、特定の標的を認識するアプタマーとして機能することができる。しかし、オリゴヌクレオチドライブラリー（ヌクレオチドの異なる配列によるオリゴヌクレオチドの大きな混合物）からのＲＮＡアプタマーのスクリーニングおよび選択は、ＲＮＡをｃＤＮＡに変換するための逆転写工程を一般的に含む。したがって、非天然ヌクレオチドを含むＲＮＡアプタマーを開発するために、非天然ヌクレオチドを含むＲＮＡを逆転写する方法の必要性がさらにある。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００７】
【非特許文献１】Ｙｕａｎ、Ｊ．ら、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．２０１０、５８４、３４２～３４９頁
【非特許文献２】Ｈａｏ、Ｂ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２００２、２９６、１４６２～１４６６頁
【非特許文献３】Ｋｒｙｕｋｏｖ、Ｇ．　Ｖ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２００３、３００、１４３９～１４４３頁

【非特許文献４】Ｘｉａｏ、Ｈ．ら、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ．Ｐｅｒｓｐｅｃｔ．Ｂｉｏｌ．２０１６、８
【非特許文献５】Ｗａｎｇ、Ｌ．ら、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｓｔｒｕｃｔ．２００６、３５、２２５～２４９頁
【非特許文献６】Ｍａｌｙｓｈｅｖ、Ｄ．Ａ．ら、Ｎａｔｕｒｅ ２０１４、５０９、３８５～３８８頁
【非特許文献７】Ｚｈａｎｇ、Ｙ．ら、Ｎａｔｕｒｅ ２０１７、５５１、６４４～６４７頁
【非特許文献８】Ｆｉｓｃｈｅｒ、Ｅ．Ｃ．ら、Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２０２０、１６、５７０～５７６頁
【非特許文献９】Ｅｇｇｅｒｔら、Ｔｏｗａｒｄｓ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ａｎ Ｅｘｐａｎｄｅｄ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ａｌｐｈａｂｅｔ。Ｃｈｅｍｂｉｏｃｈｅｍ ２０１９、２０、１６４２～１６４５頁

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００８】
したがって、以下の実施形態が提供される。実施形態１は、非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを逆転写するための方法であって、非天然核酸塩基を含む非天然ｄＮＴＰの存在下で逆転写酵素によりポリヌクレオチドを逆転写することを含み、逆転写酵素は非天然ｄＮＴＰが非天然ヌクレオチドとして取り込まれるｃＤＮＡを重合させる方法である。
【０００９】
実施形態２は実施形態１の方法であり、上記ポリヌクレオチドは約５００ｎＭ未満またはそれに等しい濃度で存在する。
【００１０】
実施形態２．１は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記逆転写酵素はＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＩＩである。
【００１１】
実施形態２．２は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記非天然ｄＮＴＰはｄＴＰＴ３ＴＰでない。
【００１２】
実施形態２．３は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記非天然ヌクレオチドを認識する結合パートナーを使用して上記ｃＤＮＡ中の上記非天然ヌクレオチドの量を測定することをさらに含む。
【００１３】
実施形態２．４は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記逆転写酵素は完全長ｃＤＮＡを生成し、完全長ｃＤＮＡの少なくとも２５％は上記非天然ヌクレオチドを含む。
【００１４】
実施形態２．５は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記ポリヌクレオチドはｔＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＲＮＡアプタマーまたは複数のＲＮＡアプタマー候補のメンバーである。
【００１５】
実施形態３は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記ポリヌクレオチドはＲＮＡであり、場合により上記ＲＮＡはｍＲＮＡまたはｔＲＮＡである。
【００１６】
実施形態４は実施形態１～３のいずれか１つの方法であり、上記ｃＤＮＡ中の上記非天然ヌクレオチドの量を測定することをさらに含む。
【００１７】
実施形態５は非天然ヌクレオチドの組込みを測定する方法であり、以下を含む：

ａ．第１の非天然ヌクレオチドを含むＲＮＡを生成するために第１の非天然核酸塩基を含む非天然ＮＴＰの存在下でＲＮＡポリメラーゼによって非天然デオキシリボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを転写すること；
ｂ．第２の非天然核酸塩基を含む非天然ｄＮＴＰの存在下で逆転写酵素によって上記ＲＮＡを逆転写することであって、上記逆転写酵素は上記非天然ＮＴＰが第２の非天然ヌクレオチドとして取り込まれるｃＤＮＡを重合させること；および
ｃ．上記ｃＤＮＡ中の上記第２の非天然ヌクレオチドの量を測定すること。

【００１８】

実施形態５．１は実施形態５の方法であって、転写および逆転写の複合忠実度を測定する方法である。

【００１９】

実施形態５．２は実施形態５の方法であって、転写および逆転写の間の非天然ヌクレオチドの保持を測定する方法である。

【００２０】

実施形態６は実施形態５～５．２のいずれか１つの方法であり、上記転写工程はインビボである。

【００２１】

実施形態７は直前の実施形態の方法であり、上記転写工程は原核生物または細菌の中で起こる。

【００２２】

実施形態８は直前の実施形態の方法であり、上記転写工程は大腸菌の中で起こる。

【００２３】

実施形態９は実施形態５の方法であり、上記転写工程はインビトロである。

【００２４】

実施形態１０は実施形態５～９のいずれか１つの方法であり、上記ｃＤＮＡ分子中の上記第２の非天然ヌクレオチドの量は、転写前の上記ポリヌクレオチド中の上記非天然デオキシリボヌクレオチドの量と比較して測定される。

【００２５】

実施形態１１は実施形態５～１０のいずれか１つの方法であり、上記測定することは以下を含む：
ａ．上記非天然ヌクレオチドを含有する転写前の上記ポリヌクレオチドの割合を決定するために転写前の上記ポリヌクレオチドに対してビオチンシフトアッセイを実行すること；および
ｂ．上記非天然ヌクレオチドを含有する上記ｃＤＮＡの割合を決定するために上記ｃＤＮＡに対してビオチンシフトアッセイを実行すること。

【００２６】

実施形態１２は実施形態４～１０のいずれか１つの方法であり、上記ｃＤＮＡ中の上記非天然ヌクレオチドまたは上記第２の非天然ヌクレオチドの量は非天然核酸塩基に結合する結合パートナーを使用して測定される。

【００２７】

実施形態１３は実施形態４～１０のいずれか１つの方法であり、上記ｃＤＮＡ中の上記非天然ヌクレオチドまたは上記第２の非天然ヌクレオチドの量を測定することは、ゲルシフトアッセイまたはビオチンシフトアッセイを含む。

【００２８】

実施形態１４は直前の実施形態の方法であり、上記ビオチンシフトアッセイは以下を含む：
ａ．上記ｃＤＮＡ中の上記非天然ヌクレオチドと対になるビオチン化核酸塩基を含む非天然ｄＮＴＰの存在下で上記ｃＤＮＡを増幅すること；
ｂ．上記ビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物を上記ビオチン化ヌクレオチドを含まないＤＮＡ増幅生成物から分離すること；ならびに

ｃ．上記ビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物および上記ビオチン化ヌクレオチドを含まないＤＮＡ増幅生成物の量、または上記ビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物の上記ビオチン化ヌクレオチドを含まないＤＮＡ増幅生成物に対する比、または上記非天然ヌクレオチドを含有するｃＤＮＡの割合を測定すること。

【００２９】

実施形態１５は直前の実施形態の方法であり、上記ビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物を上記ビオチン化核酸塩基を含まないＤＮＡ増幅生成物から分離することはゲル電気泳動を含み、場合により上記ゲル電気泳動はポリアクリルアミドゲル電気泳動である。

【００３０】

実施形態１６は実施形態１４～１５のいずれか１つの方法であり、上記ビオチン化ヌクレオチドを含むＤＮＡ増幅生成物を上記ビオチン化ヌクレオチドを含まないＤＮＡ増幅生成物から分離することは、上記増幅生成物をストレプトアビジンとインキュベートすることを含む。

【００３１】

実施形態１７は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記ＲＮＡまたはポリヌクレオチドは逆転写の間に約１μＭ未満またはそれに等しい濃度で存在する。

【００３２】

実施形態１８は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記ＲＮＡまたはポリヌクレオチドは逆転写の間に約１～１０ｎＭ、約１０～２０ｎＭ、約２０～３０ｎＭ、約３０～４０ｎＭ、約４０～５０ｎＭ、約５０～７５ｎＭ、約７５～１００ｎＭ、約１００～１５０ｎＭ、約１５０～２００ｎＭ、約２００～３００ｎＭ、約３００～４００ｎＭまたは約４００～５００ｎＭの範囲の濃度で存在する。

【００３３】

実施形態１９は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記逆転写酵素は完全長ｃＤＮＡを生成し、上記完全長ｃＤＮＡの少なくとも２５％は上記非天然ヌクレオチドを含む。

【００３４】

実施形態２０は直前の実施形態の方法であり、トランケーションされていないｃＤＮＡの少なくとも５０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％または９９％は上記非天然ヌクレオチドを含む。

【００３５】

実施形態２１は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記非天然リボヌクレオチドを含む上記ＲＮＡまたはポリヌクレオチドはｍＲＮＡである。

【００３６】

実施形態２２は実施形態２０の方法であり、上記非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、上記ｍＲＮＡのコドンの第１の位置（Ｘ－Ｎ－ＮまたはＹ－Ｎ－Ｎ）に位置する。

【００３７】

実施形態２３は実施形態２０の方法であり、上記非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、上記ｍＲＮＡのコドンの中間位置（Ｎ－Ｘ－ＮまたはＮ－Ｙ－Ｎ）に位置する。

【００３８】

実施形態２４は実施形態２０の方法であり、上記非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、上記ｍＲＮＡのコドンの最後の位置（Ｎ－Ｎ－ＸまたはＮ－Ｎ－Ｙ）に位置する。

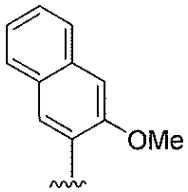
【００３９】

実施形態２５は実施形態５１～２５のいずれか１つの方法であり、ｍＲＮＡ中の非天然リボヌクレオチドを含有するコドンは、ＡＸＣ、ＡＹＣ、ＧＸＣ、ＧＹＣ、ＧＸＴ、ＧＹＴ、ＡＸＡ、ＡＸＴ、ＴＸＡまたはＴＸＴである。

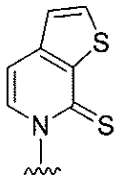
【００４０】

実施形態２６は実施形態１～２０のいずれか１つの方法であり、上記非天然リボヌクレオチドを含む上記ＲＮＡまたはポリヌクレオチドはｔＲＮＡである。

【００４１】
実施形態２７は実施形態２６の方法であり、上記非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、上記ｔＲＮＡのアンチコドンの第１の位置（Ｘ－Ｎ－ＮまたはＹ－Ｎ－Ｎ）に位置する。
【００４２】
実施形態２８は実施形態２６の方法であり、上記非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、上記ｔＲＮＡのアンチコドンの中間位置（Ｎ－Ｘ－ＮまたはＮ－Ｙ－Ｎ）に位置する。
【００４３】
実施形態２９は実施形態２６の方法であり、上記非天然リボヌクレオチド（ＸまたはＹ）は、上記ｔＲＮＡのアンチコドンの最後の位置（Ｎ－Ｎ－ＸまたはＮ－Ｎ－Ｙ）に位置する。
【００４４】
実施形態３０は実施形態２６～２９のいずれか１つの方法であり、上記ｔＲＮＡの上記アンチコドンは、ＧＹＴ、ＧＸＴ、ＧＹＣ、ＧＸＣ、ＣＹＡ、ＣＸＡ、ＡＹＣまたはＡＸＣである。
【００４５】
実施形態３１は実施形態１～３０のいずれか１つの方法であり、上記非天然リボヌクレオチドはＸであり、Ｘは、
【化１】



を上記非天然リボヌクレオチドの核酸塩基として含む（ＮａＭ）。
【００４６】
実施形態３２は実施形態１～３０のいずれか１つの方法であり、上記非天然リボヌクレオチドはＹであり、Ｙは、
【化２】



を上記非天然リボヌクレオチドの核酸塩基として含む（ＴＰＴ３）。
【００４７】
実施形態３３は実施形態１～２０または３１～３２のいずれか１つの方法であり、上記ＲＮＡはＲＮＡアプタマーである。
【００４８】
実施形態３４はＲＮＡアプタマー候補をスクリーニングする方法であって、以下を含む：
ａ．少なくとも１つの非天然ヌクレオチドを含む複数の異なるＲＮＡオリゴヌクレオチドを標的とインキュベートすること；
ｂ．上記標的に結合する複数のＲＮＡオリゴヌクレオチドのために少なくとも１回の選択を実行すること；

ｃ．上記標的に結合する富化されたＲＮＡオリゴヌクレオチドを単離することであって、単離された富化されたＲＮＡオリゴヌクレオチドはＲＮＡアプタマーを含むこと；およびｄ．上記ＲＮＡアプタマーの１つまたはそれ以上を、上記ＲＮＡアプタマー中の少なくとも１つの上記非天然ヌクレオチドに相補的な位置で非天然デオキシリボヌクレオチドを含むｃＤＮＡに逆転写し、それによって上記ＲＮＡアプタマーに対応するｃＤＮＡ分子のライブラリーを提供すること。

【００４９】

実施形態３５は直前の実施形態の方法であり、上記複数の異なるＲＮＡオリゴヌクレオチドはランダム化されたヌクレオチド領域を含む。

【００５０】

実施形態３６は直前の実施形態の方法であり、ランダム化された上記ヌクレオチド領域は少なくとも１つの上記非天然ヌクレオチドを含む。

【００５１】

実施形態３７は実施形態３４～３６のいずれか１つの方法であり、上記ＲＮＡオリゴヌクレオチドはバーコード配列および／またはプライマー結合配列を含む。

【００５２】

実施形態３８は実施形態３４～３７のいずれか１つの方法であり、上記ｃＤＮＡ分子の配列決定をすることをさらに含む。

【００５３】

実施形態３９は実施形態３４～３８のいずれか１つの方法であり、少なくとも１回の選択を実行することは、未結合であるか弱く結合したＲＮＡオリゴヌクレオチドを除去する洗浄工程を含む。

【００５４】

実施形態４０は実施形態３４～３９のいずれか１つの方法であり、複数の追加の配列を生成させるために上記ｃＤＮＡ分子の配列を突然変異させることをさらに含む。

【００５５】

実施形態４１は直前の実施形態の方法であり、上記複数の追加の配列はＲＮＡに転写され、上記標的に結合するＲＮＡアプタマーのための少なくとも１回の追加の選択にかけられる。

【００５６】

実施形態４２は実施形態４０～４１のいずれか１つの方法であり、上記ｃＤＮＡ分子の配列を突然変異させることは、誤りがちのＰＣＲを含む。

【００５７】

実施形態４３は実施形態３４～４２のいずれか１つの方法であり、追加の回の選択で上記標的への結合のための選択圧を増加させることをさらに含む。

【００５８】

実施形態４４は直前の実施形態の方法であり、選択圧を増加させることは、前の回より高い塩濃度で１回またはそれ以上の洗浄工程を実行すること、および／または上記選択の間に結合競合者を含ませることを含む。

【００５９】

実施形態４５は実施形態３４～４４のいずれか１つの方法であり、上記標的に結合するそれらの能力について上記ＲＮＡアプタマーを分析することをさらに含む。

【００６０】

実施形態４６は直前の実施形態の方法であり、上記標的に結合するそれらの能力について上記ＲＮＡアプタマーを分析することは、K_d、k_{on}またはk_{off}を決定することを含む。

【００６１】

実施形態４７は実施形態３４～４４のいずれか１つの方法であり、上記標的をアゴナイズするそれらの能力について上記ＲＮＡアプタマーを分析することをさらに含む。

【００６２】

実施形態４８は直前の実施形態の方法であり、上記標的をアゴナイズするそれらの能力について上記ＲＮＡアプタマーを分析することはＥＣ$_{50}$値を決定することを含む。

【００６３】

実施形態４９は実施形態３４～４４のいずれか１つの方法であり、上記標的に拮抗するそれらの能力について上記ＲＮＡアプタマーを分析することをさらに含む。

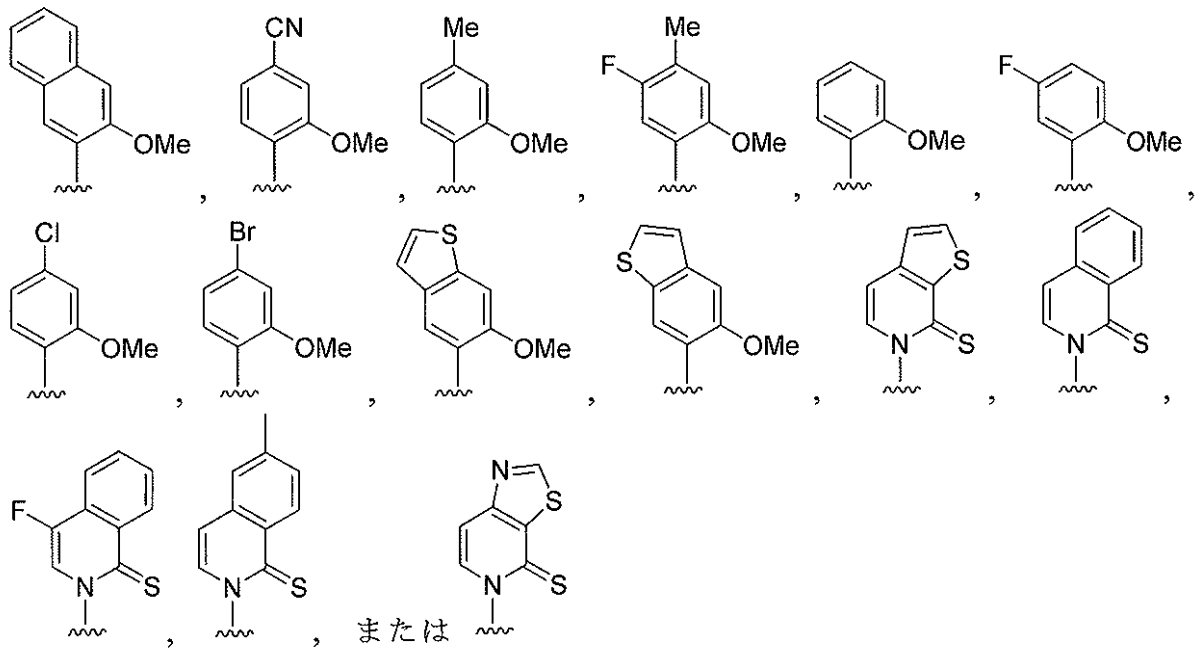
【００６４】

実施形態５０は直前の実施形態の方法であり、上記標的に拮抗するそれらの能力について上記ＲＮＡアプタマーを分析することはＫ$_i$またはＩＣ$_{50}$値を決定することを含む。

【００６５】

実施形態５１は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、少なくとも１つの非天然ヌクレオチドは、

【化３】

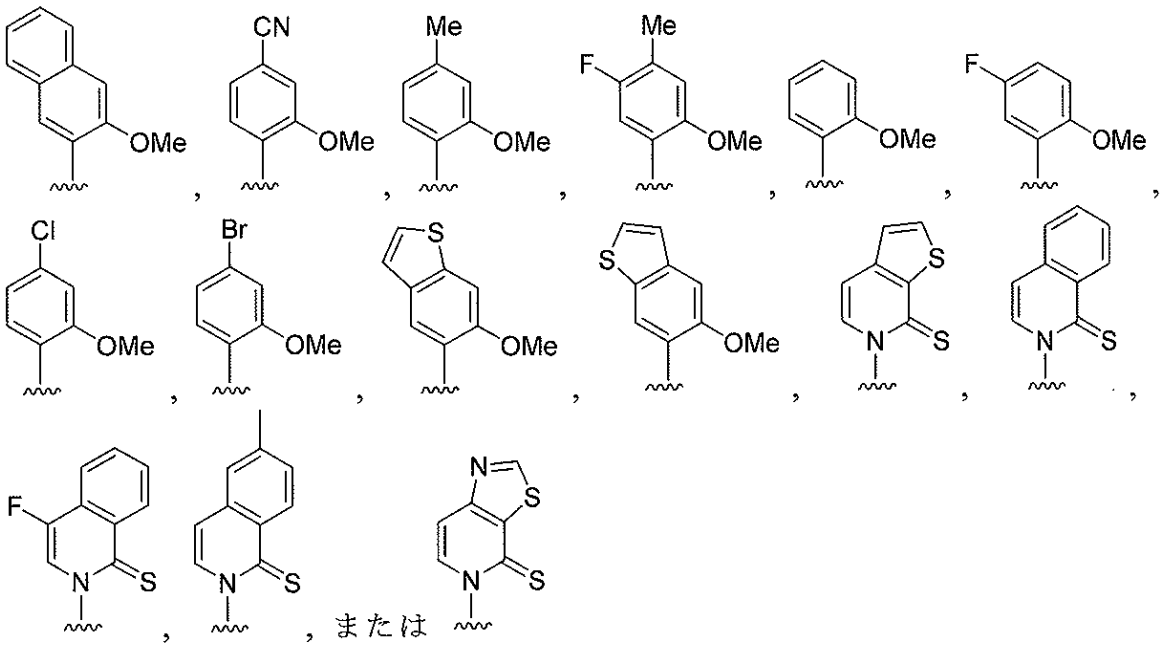


を含む。

【００６６】

実施形態５２は直前の実施形態の方法であり、逆転写を受けるポリヌクレオチド中の少なくとも１つの非天然ヌクレオチドは、

【化４】

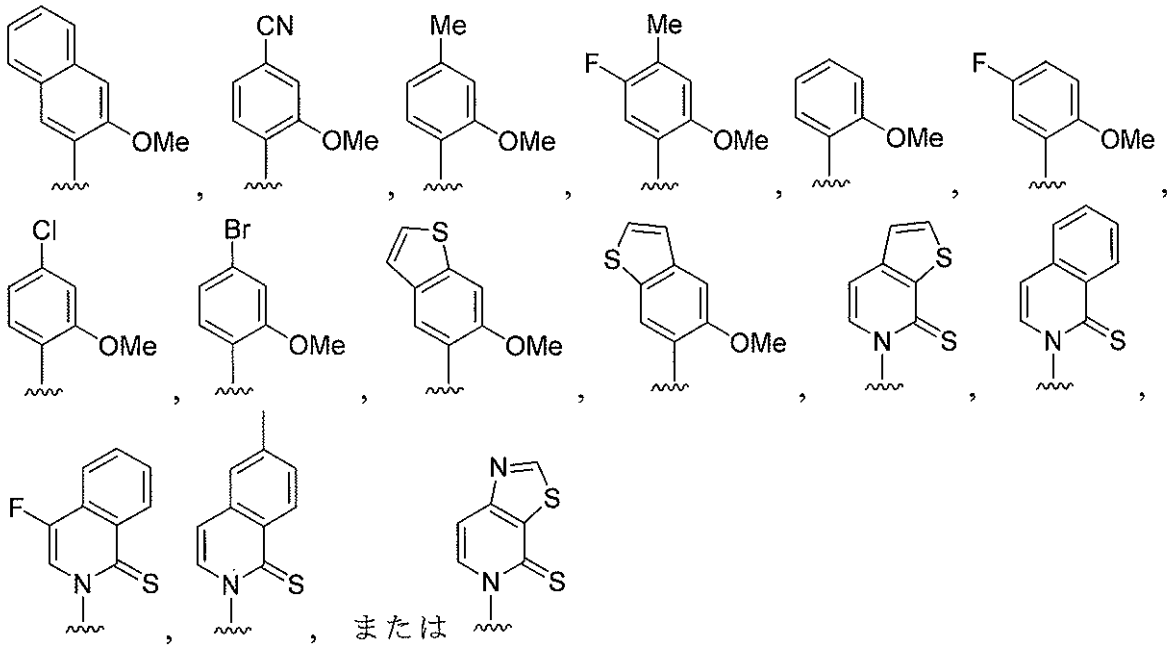


を含む。

【００６７】

実施形態５３は実施形態５１または５２の方法であり、ｃＤＮＡに組み込まれる少なくとも１つの非天然ヌクレオチドは：

【化５】

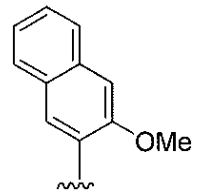


を含み、場合により、上記非天然ヌクレオチド中の少なくとも１つの上記非天然核酸塩基は、逆転写を受ける上記ポリヌクレオチド中の少なくとも１つの上記非天然核酸塩基と異なる。

【００６８】

実施形態５４は実施形態５１～５３のいずれか１つの方法であり、少なくとも１つの上記非天然ヌクレオチドは：

【化６】

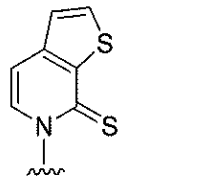


を含む。

【００６９】

実施形態５５は実施形態５１～５３のいずれか１つの方法であり、少なくとも１つの上記非天然ヌクレオチドは：

【化７】



を含む。

【００７０】

実施形態５６は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記逆転写酵素はトリ骨髄芽球症ウイルス（ＡＭＶ）逆転写酵素、モロニ－マウス白血病ウイルス（ＭＭＬＶ）逆転写酵素、Ｓｕｐｅｒ　Ｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ（ＳＳ　ＩＩ）逆転写酵素、Ｓｕｐｅｒ　Ｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ（ＳＳ　ＩＩＩ）逆転写酵素、Ｓｕｐｅｒ　Ｓｃｒｉｐｔ　ＩＶ（ＳＳ　ＩＶ）逆転写酵素またはＶｏｌｃａｎｏ　２Ｇ（Ｖ２Ｇ）逆転写酵素である。

【００７１】

実施形態５７は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記逆転写酵素はＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩである。

【００７２】

実施形態５８は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記非天然ｄＮＴＰはｄＴＰＴ３ＴＰでない。

【００７３】

実施形態５９は上記実施形態のいずれか１つの方法であり、上記逆転写はインビトロで起こる。

【００７４】

本開示の様々な態様が、添付の請求項において詳細に示される。本開示の構成および利点のより深い理解は、本開示の原理が利用される例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明および付随図への参照によって得られる。

【図面の簡単な説明】

【００７５】

【図１】ｄＮＡＭとｄＴＰＴ３の間のおよびＮａＭとＴＰＴ３の間の非天然塩基対を示す図である。

【図２】異なる逆転写（ＲＴ）反応条件におけるｃＤＮＡ検出およびｃＤＮＡの定性的ビオチンシフトのための変性ゲルを示す図である。

【図３】ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩを使用したＲＴ反応におけるＲＮＡ濃度の関数としての完全長ｃＤＮＡ比を示す図である。

【図４】非天然ヌクレオチド保持を測定するための例示的な転写－逆転写（Ｔ－ＲＴ）方法の模式図を示す。

【図５】Ａ～Ｂは、指示されたコドンを含む配列のＴ－ＲＴ保持アッセイにおける忠実度

レベルを示す図である。
【図６】異なるコドンおよびアンチコドンによるｃＤＮＡ検出のための変性ゲルの画像を示す図である。
【図７】Ａ～Ｂは、指示されたコドンを含む配列のためのインビボ翻訳実験からのｍＲＮＡのＴ－ＲＴ保持を示す図である（前に報告されたタンパク質シフト値は利用可能な場合下に示す）。
【図８】Ａ～Ｂは、インビボ翻訳実験におけるＮａＭＴＰ濃度またはＴＰＴ３ＴＰ濃度のそれぞれへのｍＲＮＡ転写忠実度の依存を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００７６】
定義
別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、特許請求される主題が属する当技術分野の技術者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。前述の一般的な説明および以下の詳細な説明は、例示的かつ説明的なものに過ぎず、請求された主題を限定するものではないことを理解されたい。本出願では、特に明記されていない限り、単数形の使用には複数形を含む。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「ａ（不定冠詞）」、「ａｎ（不定冠詞）」および「ｔｈｅ（定冠詞）」は、文脈が明らかに他のことを示さない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。本出願において、「または」の使用は、特に明記しない限り、「および／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（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、および「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」などの他の形式の使用は、限定的ではない。
【００７７】
本明細書で使用される場合、範囲および量は、特定の値または範囲の「約」として表されてもよい。約には正確な量も含まれる。したがって、「約５μＬ」とは「約５μＬ」、また「５μＬ」を意味する。一般に、「約」という用語には、実験誤差の範囲内であると予想される量が含まれる。
【００７８】
化学構造の「アナログ」は、本明細書で使用される用語として、親構造から合成的に容易に導き出されない場合があるが、親構造との実質的な類似性を保持する化学構造を指す。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドアナログは、非天然ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ヌクレオシドアナログは、非天然ヌクレオシドである。親の化学構造から合成的に容易に導き出される関連する化学構造は、「誘導体」と呼ばれる。
【００７９】
ヌクレオチドは、核酸塩基、糖および少なくとも１つのリン酸基で構成される。したがって、ヌクレオチドは、ＤＮＡおよびＲＮＡが構成されるヌクレオシド三リン酸、ＲＮＡおよびＤＮＡポリメラーゼの基質、ヌクレオシド二リン酸またはヌクレオシド一リン酸を指すことができる。ヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチド類似体）を包含する。天然に存在するヌクレオチドには、天然に存在するデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む、天然に存在するＤＮＡまたはＲＮＡで見出されるヌクレオチドが含まれる。非天然ヌクレオチドは、天然に存在するヌクレオチド中の核酸塩基、糖および／またはリン酸部分からのある種の差を含有する。改変されたヌクレオチドは、３’ＯＨもしくは５’ＯＨ基、主鎖、糖成分または核酸塩基の１つまたはそれ以上の改変、および／または天然に存在しないリンカー分子の付加を含む。非天然ヌクレオチドには、ＤＮＡまたはＲＮＡ類似体（例えば、核酸塩基類似体、糖類似体および／または非天然主鎖などを含む）が含まれる。
【００８０】
一部の実施形態では、「ヌクレオシド」は、核酸塩基部分および糖部分を含む化合物である。ヌクレオシドには、天然に存在するヌクレオシド（ＤＮＡおよびＲＮＡで見出されるヌクレオチドに対応する）、改変されたヌクレオシド、ならびに擬似の核酸塩基および

／または糖基を有するヌクレオシドが限定されずに含まれる。ヌクレオシドには、任意の様々な置換基を含むヌクレオシドが含まれる。ヌクレオシドは、核酸塩基と糖の還元基の間でグリコシド結合を通して形成されるグリコシド化合物であってよい。

【００８１】

「核酸塩基」は一般的にヌクレオシドの複素環部分であり、芳香族または部分的に不飽和であってよい。核酸塩基は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの糖成分（例えば、リボース、デオキシリボースまたはその類似体；改変糖とも呼ばれる糖類似体の例は、本明細書の他の場所で記載される）を含まない。核酸塩基は天然に存在してもよく、改変されてもよく、天然核酸塩基と類似性を有していなくてもよく、例えば有機合成によって合成されてもよい。ある特定の実施形態では、核酸塩基は、水素結合の使用の有無にかかわらず別の核酸の核酸塩基と相互作用することが可能な任意の原子または原子群を含む。ある特定の実施形態では、非天然核酸塩基は、天然核酸塩基に由来しない。非天然核酸塩基は塩基特性を有するとは限らない；しかし、単純さのためにそれらは核酸塩基と呼ばれることに注意すべきである。一部の実施形態では、核酸塩基に言及する場合、「（ｄ）」は核酸塩基がデオキシリボースまたはリボースに結合してもよいことを示す。核酸塩基は、一般に塩基とも呼ばれる。

【００８２】

一部の実施形態では、本開示に記載される非天然ｍＲＮＡコドンおよび非天然ｔＲＮＡアンチコドンは、それらのＤＮＡコード配列で書くことができる。例えば、非天然ｔＲＮＡアンチコドンはＧＹＵまたはＧＹＴと書くことができる。

【００８３】

本明細書で使用されるように、用語「ポリヌクレオチド」はＤＮＡ、ＲＮＡ、ＤＮＡ－またはＲＮＡ様ポリマー、例えばペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロック核酸（ＬＮＡ）、ホスホロチオエート、非天然塩基などを指し、これらは当技術分野で周知である。ポリヌクレオチドは、自動合成装置で、例えばホスホロアミダイト化学反応または合成装置使用のために適合させた他の化学的アプローチを使用して合成することができる。

【００８４】

「ＤＮＡ」には、限定されずにｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡが含まれる。ＤＮＡは共有結合または非共有結合の手段によって、ＲＮＡまたはペプチドを限定されずに含む別の生体分子に結合することができる。「ＲＮＡ」には、コードＲＮＡ、例えばメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）が含まれる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡはｒＲＮＡ、ＲＮＡｉ、ｓｎｏＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｅｘＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、長ｎｃＲＮＡ、またはその任意の組合せもしくはハイブリッドである。いくつかの例において、ＲＮＡはリボザイムの成分である。ＤＮＡおよびＲＮＡは、線状、環状、スーパーコイル、一本鎖および二本鎖を限定されずに含む、任意の形態であってもよい。

【００８５】

「ｍＲＮＡ」は、リボソームによる翻訳が可能であるＯＲＦを含むＲＮＡである。

【００８６】

「ｔＲＮＡ」は、天然アミノ酸またはｎｃＡＡを課すこと、およびリボソームによるｍＲＮＡの翻訳に関与することが可能なＲＮＡである。

【００８７】

ペプチド核酸（ＰＮＡ）は、ペプチド様主鎖がＤＮＡまたはＲＮＡの糖－リン酸主鎖を置き換える合成ＤＮＡ／ＲＮＡ類似体である。ＰＮＡオリゴマーは相補的ＤＮＡへの結合でより高い結合強度およびより大きな特異性を示し、ＰＮＡ／ＤＮＡ塩基ミスマッチがＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖での類似のミスマッチよりも不安定にしている。この結合強度および特異性は、ＰＮＡ／ＲＮＡ二重鎖にも適用される。ＰＮＡはヌクレアーゼによってもプロテアーゼによっても容易に認識されず、それらを酵素分解に耐性にしている。ＰＮＡは、広いｐＨ範囲でも安定している。Ｎｉｅｌｓｅｎ　ＰＥ、Ｅｇｈｏｌｍ　Ｍ、Ｂｅｒｇ　ＲＨ、Ｂｕｃｈａｒｄｔ　Ｏ（１９９１年１２月）。「チミン置換ポリアミドを用いた鎖置換によるＤＮＡの配列選択的認識（Ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ　ｒｅｃｏ

gnition of DNA by strand displacement with thymine-substituted polyamide)」、Science 254(5037):1497-500.doi:10.1126/science.1962210.PMID 1962210;ならびにEgholm M、Buchardt O、Christensen L、Behrens C、Freier SM、Driver DA、Berg RH、Kim SK、Norden BおよびNielsen PE(1993)、「PNAはワトソンクリック水素結合規則に従い相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする(PNA Hybridizes to Complementary Oligonucleotides Obeying the Watson-Crick Hydrogen Bonding Rules)」。Nature 365(6446):566～8。doi:10.1038/365566a0。PMID 7692304も参照のこと。

【0088】

ロック核酸(LNA)は、改変されたRNAヌクレオチドであり、LNAヌクレオチドのリボース部分は、2'酸素および4'炭素を接続する追加の架橋で修飾されている。この架橋は、3'-エンド(N)コンフォメーションでリボースを「ロック」し、これは、A形二重鎖でよく見られる。LNAヌクレオチドは、必要に応じてオリゴヌクレオチドのDNAまたはRNA残基と混合することができる。そのようなオリゴマーは化学的に合成されてもよく、市販されている。ロックされたリボースコンフォメーションは、核酸塩基のスタッキングおよび骨格事前組織化を強化する。例えば、Kaur、H;Arora、A;Wengel、J;Maiti、S(2006)、「DNA二重鎖へのロックド核酸ヌクレオチドの取り込みのための熱力学的、対イオン、および水和効果(Thermodynamic、Counterion、and Hydration Effects for the Incorporation of Locked Nucleic Acid Nucleotides into DNA Duplexes)」、Biochemistry 45(23):7347～55。doi:10.1021/bi060307w.PMID 16752924;Owczarzy R.;You Y.、Groth C.L.、Tataurov A.V.(2011)、「ロックド核酸-DNA二重鎖の安定性およびミスマッチの識別(Stability and mismatch discrimination of locked nucleic acid-DNA duplexes)」、Biochem.50(43):9352-9367.doi:10.1021/bi200904e.PMC 3201676.PMID 21928795;Alexei A.Koshkin;Sanjay K.Singh、Poul Nielsen、Vivek K.Rajwanshi、Ravindra Kumar、Michael Meldgaard、Carl Erik Olsen、Jesper Wengel(1998)、「LNA(ロックド核酸):アデニン、シトシン、グアニン、5-メチルシトシン、チミンおよびウラシルビシクロヌクレオシドモノマーの合成、オリゴマー化、ならびに前例のない核酸認識(LNA(Locked Nucleic Acids):Synthesis of the adenine、cytosine、guanine、5-methylcytosine、thymine and uracil bicyclonucleoside monomers、oligomerisation、and unprecedented nucleic acid recognition)」、Tetrahedron 54(14):3607-30.doi:10.1016/S0040-4020(98)00094-5;ならびに、Satoshi Obika;Daishu Nanbu、Yoshiyuki Hari、Ken-ichiro Morio、Yasuko In、Toshimasa Ishida、Takeshi Imanishi(1997)、「2'-O,4'-C-メチレンウリジンおよび-シチジンの合成。固定されたC3'-エンド糖パッカリングを有する新規二環式ヌクレオシド(Synthesis of 2'-O,4'-C-methylene uridine and -cytidine。Novel bi

ｃｙｃｌｉｃ ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ｈａｖｉｎｇ ａ ｆｉｘｅｄ Ｃ３’－ｅｎｄｏ ｓｕｇａｒ ｐｕｃｋｅｒｉｎｇ）」、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３８（５０）：８７３５－８．ｄｏｉ：１０．１０１６／Ｓ００４０－４０３９（９７）１０３２２－７を参照する。

【００８９】

「アプタマー」は、標的に、例えば高い親和性で特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドを指す。アプタマーはＲＮＡを含むことができ、天然または非天然のヌクレオチドを含むことができる。

【００９０】

本明細書で使用されるように、「完全長」は、ｃＤＮＡなどのポリヌクレオチドが、その合成をテンプレート化した相補配列（鋳型ポリヌクレオチド）と比較してトランケーションされていないことを意味する。鋳型ポリヌクレオチドが非天然ヌクレオチドを含む場合、完全長ポリヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチド中の非天然ヌクレオチドに相補的な位置のヌクレオチドを、およびその３’のさらなるヌクレオチドを含む。完全長ポリヌクレオチドは、完了前の、例えば鋳型ポリヌクレオチド中の非天然ヌクレオチドに相補的な位置または相補的な位置のあたりでの合成の終了から生じる、トランケーションされたポリヌクレオチドと対照的である。

【００９１】

本明細書で使用されるセクション見出しは組織的な目的のためだけであり、記載された主題を限定するものとして解釈されるべきでない。

【００９２】

非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを逆転写する方法

本明細書で、非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを逆転写する方法が開示される。そのような方法では、ポリヌクレオチドは、非天然核酸塩基を含む非天然ｄＮＴＰの存在下で逆転写酵素によって逆転写することができる。逆転写酵素は、非天然ＮＴＰが、例えば、ポリヌクレオチド中の非天然リボヌクレオチドの位置に相補的であるｃＤＮＡの位置に組み込まれるｃＤＮＡを重合させる。

【００９３】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは約５００ｎＭ未満またはそれに等しい濃度で存在する。一部の実施形態では、ＲＮＡまたはポリヌクレオチドは逆転写の間に約１～１０ｎＭ、約１０～２０ｎＭ、約２０～３０ｎＭ、約３０～４０ｎＭ、約４０～５０ｎＭ、約５０～７５ｎＭ、約７５～１００ｎＭ、約１００～１５０ｎＭ、約１５０～２００ｎＭ、約２００～３００ｎＭ、約３００～４００ｎＭまたは約４００～５００ｎＭの範囲の濃度で存在する。一部の実施形態では、濃度は約１００ｎＭかまたはそれ未満、例えば約５～１００ｎＭ、例えば約１０～１００ｎＭである。一部の実施形態では、濃度は約５０ｎＭかまたはそれ未満、例えば約５～５０ｎＭ、例えば約１０～５０ｎＭである。一部の実施形態では、濃度は約３０ｎＭかまたはそれ未満、例えば約５～３０ｎＭ、例えば約１０～３０ｎＭである。例で記載されるように、非天然ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを逆転写する以前の試みより低い濃度を使用することは、逆転写反応の性能を向上させることができる。

【００９４】

市販されている逆転写酵素を、開示される方法で使用することができる。一部の実施形態では、逆転写酵素はトリ骨髄芽球症ウイルス（ＡＭＶ）逆転写酵素、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭＭＬＶ）逆転写酵素、Ｓｕｐｅｒ Ｓｃｒｉｐｔ ＩＩ（ＳＳ ＩＩ）逆転写酵素、Ｓｕｐｅｒ Ｓｃｒｉｐｔ ＩＩＩ（ＳＳ ＩＩＩ）逆転写酵素、Ｓｕｐｅｒ Ｓｃｒｉｐｔ ＩＶ（ＳＳ ＩＶ）逆転写酵素またはＶｏｌｃａｎｏ ２Ｇ（Ｖ２Ｇ）逆転写酵素である。一部の実施形態では、逆転写酵素はＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＩＩ（例えばＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから入手可能、カタログ番号１８０８００９３）である。ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＩＩは、低下したＲＮアーゼＨ活性、増加した半減期および向上した熱安定性のためのいくつかの突然変異の導入によ

って作製された、遺伝子操作されたＭＭＬＶ逆転写酵素である。

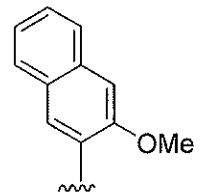
【００９５】

非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、逆転写酵素のための任意の好適な基質、例えば、ＲＮＡ、ＲＮＡ－ＤＮＡ融合またはＤＮＡであってよい。逆転写酵素は、ＲＮＡに加えてＤＮＡまたはＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドを基質として受け入れることが知られている。一部の実施形態では、非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドはＲＮＡである。例えば、ＲＮＡはｍＲＮＡであってよい。別の例では、ＲＮＡはｔＲＮＡであってよい。さらなる例では、ＲＮＡはＲＮＡアプタマーまたは複数のアプタマー候補（しばしば「ライブラリー」と呼ばれる）のメンバーであってよく、例えば、複数のアプタマー候補は同じかまたは異なる反応容器またはチャンバーで逆転写を受ける。上記の実施形態のいずれのポリヌクレオチド（複数可）も、非天然ヌクレオチドに加えて他の改変を含むことができる；例えば、非天然核酸塩基を含む非天然ヌクレオチド、ならびに同じおよび／または他のヌクレオチド位置に核酸塩基または１つまたはそれ以上の糖および／またはリン酸基への改変があってもよい。

【００９６】

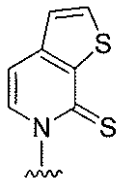
ＲＮＡがｍＲＮＡである場合、非天然リボヌクレオチドはコドンに位置することができる。非天然ヌクレオチドは、コドンの第１、第２または第３の位置に存在することができる。例示的コドンは、ＡＸＣ、ＡＹＣ、ＧＸＣ、ＧＹＣ、ＧＸＴ、ＧＹＴ、ＡＸＡ、ＡＸＴ、ＴＸＡまたはＴＸＴであり、ここで非天然リボヌクレオチドはＸまたはＹによって表すことができる。一部の実施形態では、Ｘは

【化８】



を非天然リボヌクレオチドの核酸塩基として含み（ＮａＭ；ここで、および全体で、明瞭さのために非天然デオキシ－またはリボヌクレオチド／ヌクレオシドの核酸塩基部分だけを示す）、および／または、Ｙは

【化９】

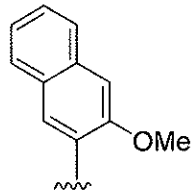


を非天然リボヌクレオチドの核酸塩基として含む（ＴＰＴ３）。

【００９７】

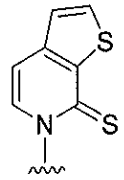
ＲＮＡがｔＲＮＡである場合、非天然リボヌクレオチドはｔＲＮＡのアンチコドンに位置することができる。非天然ヌクレオチドは、アンチコドンの第１、第２または第３の位置に存在することができる。例示的なアンチコドンは、ＧＹＴ、ＧＸＴ、ＧＹＣ、ＧＸＣ、ＣＹＡ、ＣＸＡ、ＡＹＣまたはＡＸＣであり、ここで非天然リボヌクレオチドはＸまたはＹによって表すことができる。一部の実施形態では、Ｘは

【化１０】



を非天然リボヌクレオチドの核酸塩基として含み（ＮａＭ）、および／または、Ｙは

【化１１】

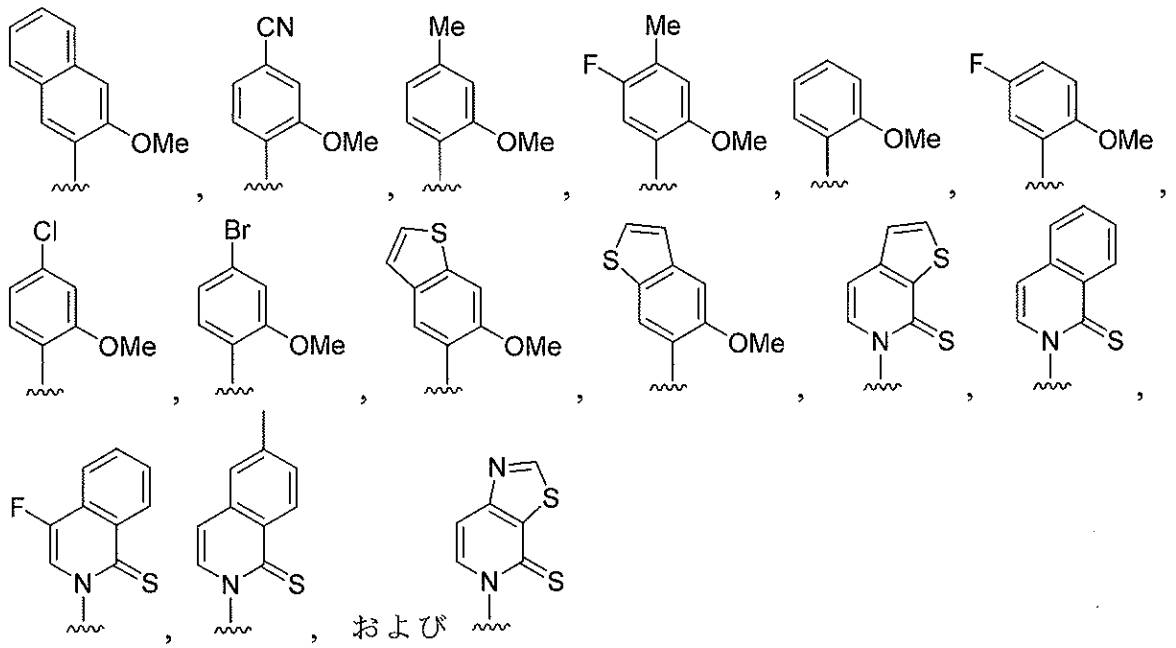


を非天然リボヌクレオチドの核酸塩基として含む（ＴＰＴ３）。

【００９８】

様々な非天然核酸塩基が公知であり、ｄＮＴＰおよび／または非天然リボヌクレオチドの非天然核酸塩基として使用することができる。一部の実施形態では、非天然核酸塩基は以下からなる群から独立して選択される：

【化１２】

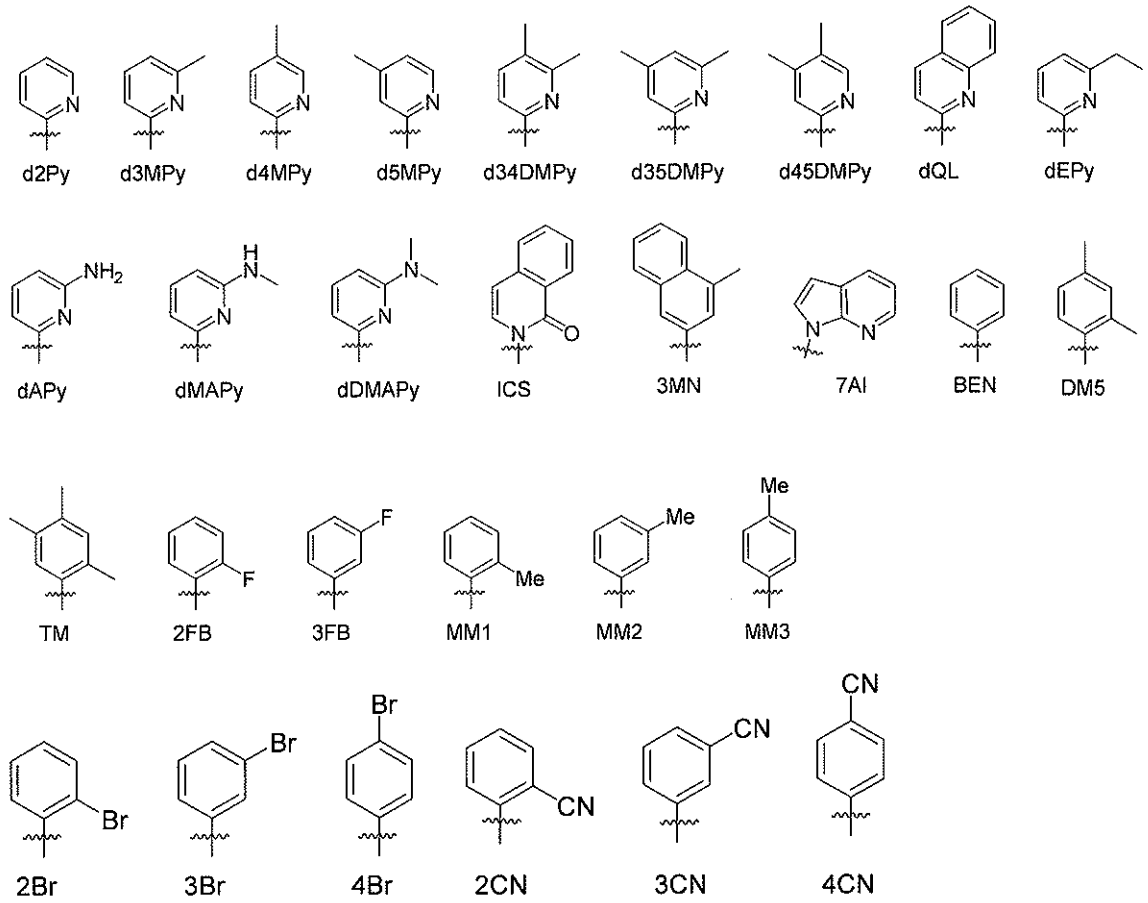


。一部の実施形態では、非天然ｄＮＴＰはｄＴＰＴ３ＴＰでない。

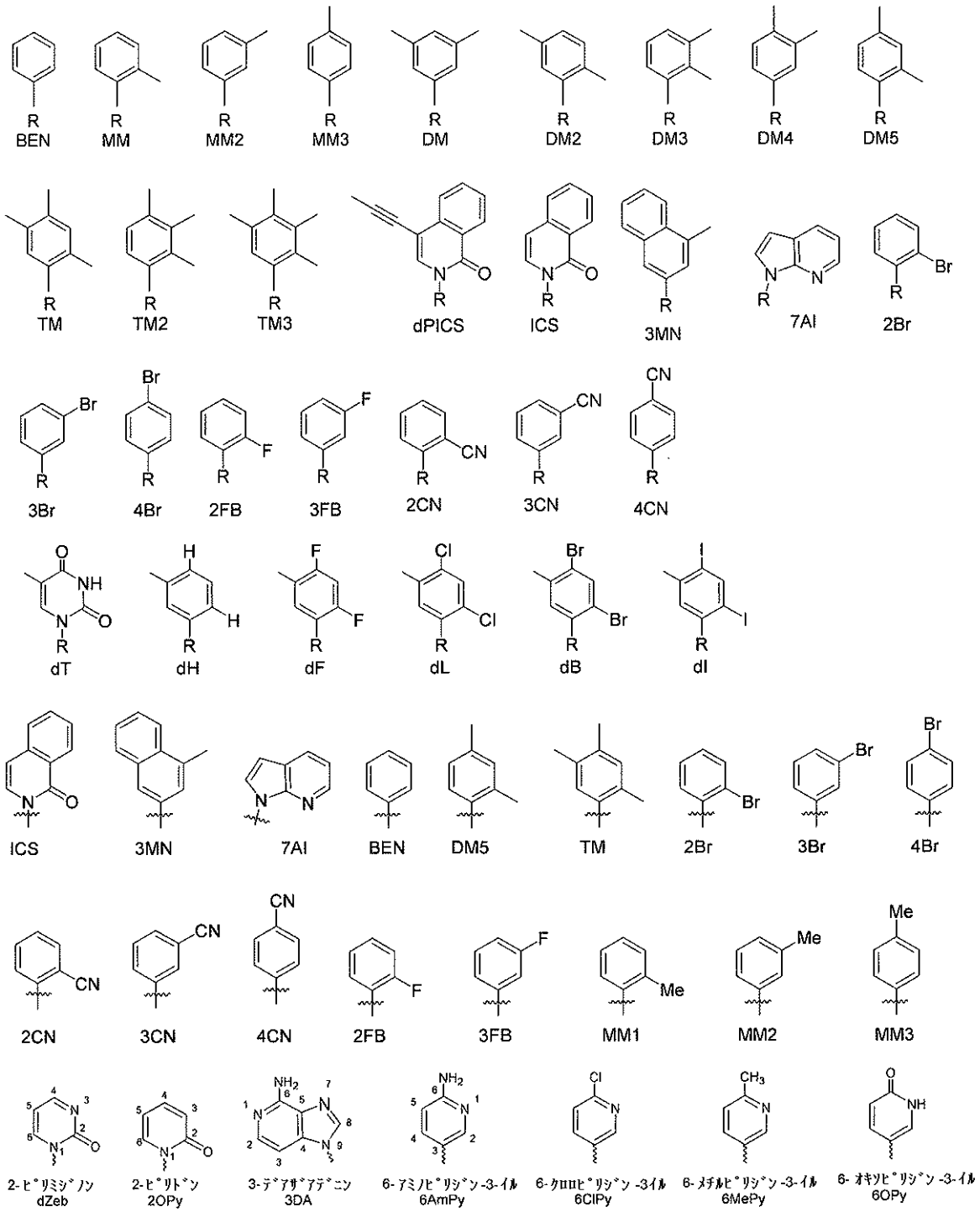
【００９９】

一部の実施形態では、非天然核酸塩基は下に示すものから選択され、ここで、波線またはＲは糖（例えば、デオキシリボースまたはリボース）への結合点を特定する：

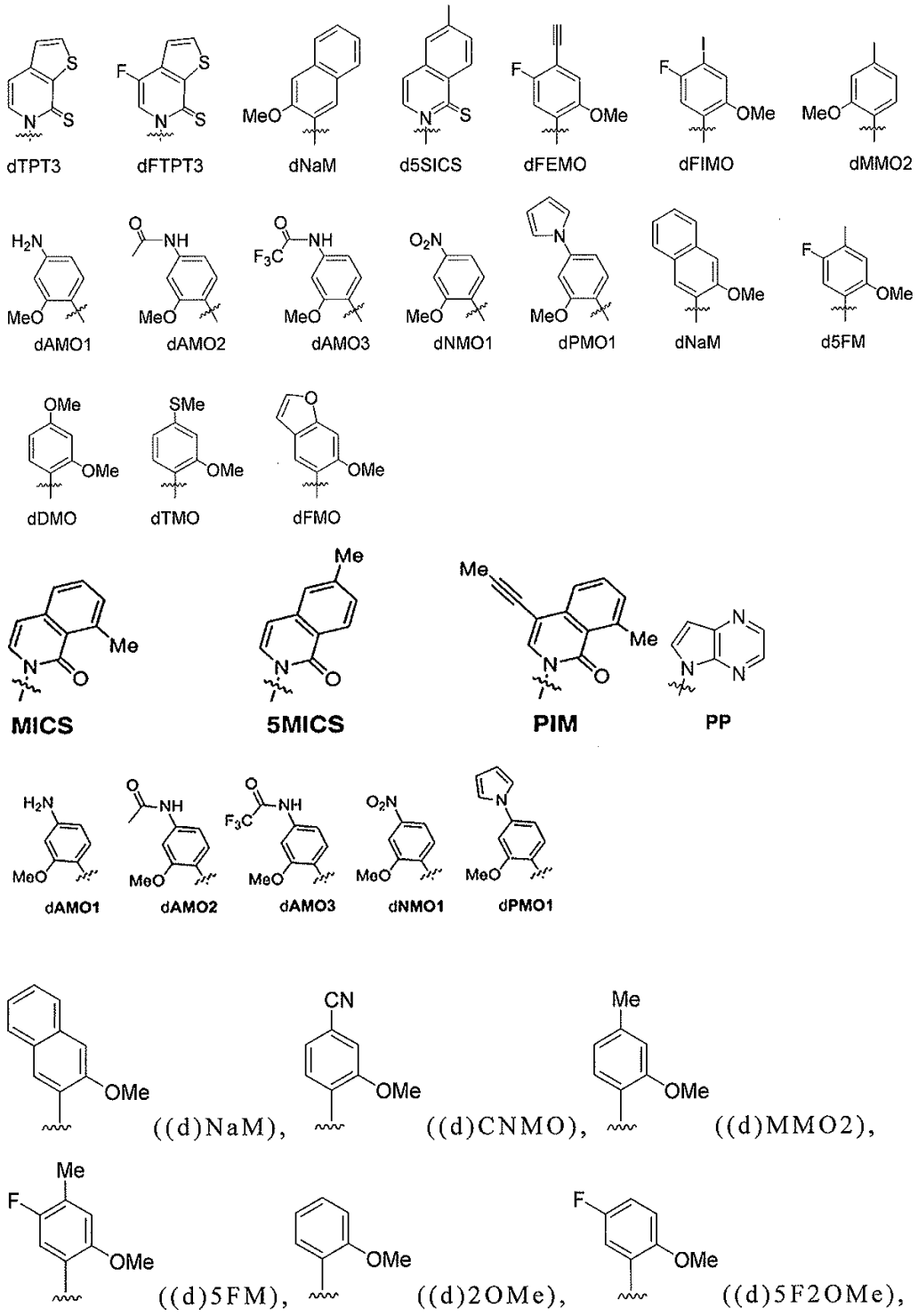
【化１３－１】


d2Py
d3MPy
d4MPy
d5MPy
d34DMPy
d35DMPy
d45DMPy
dQL
dEPy
dAPy
dMAPy
dDMAPy
ICS
3MN
7AI
BEN
DM5
TM
2FB
3FB
MM1
MM2
MM3
2Br
3Br
4Br
2CN
3CN
4CN

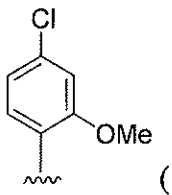
【化１３－２】

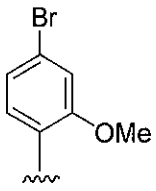

R BEN
R MM
R MM2
R MM3
R DM
R DM2
R DM3
R DM4
R DM5
R TM
R TM2
R TM3
dPICS
ICS
3MN
7AI
2Br
3Br
4Br
2FB
3FB
2CN
3CN
4CN
dT
dH
dF
dL
dB
dI
ICS
3MN
7AI
BEN
DM5
TM
2Br
3Br
4Br
2CN
3CN
4CN
2FB
3FB
MM1
MM2
MM3
2-ﾋﾟﾘﾐｼﾞﾉﾝ dZeb
2-ﾋﾟﾘﾄﾝ 2OPy
3-ﾃﾞｱｻﾞｱﾃﾞﾆﾝ 3DA
6-ｱﾐﾉﾋﾟﾘｼﾞﾝ-3-ｲﾙ 6AmPy
6-ｸﾛﾛﾋﾟﾘｼﾞﾝ-3ｲﾙ 6ClPy
6-ﾒﾁﾙﾋﾟﾘｼﾞﾝ-3-ｲﾙ 6MePy
6-ｵｷｿﾋﾟﾘｼﾞﾝ-3-ｲﾙ 6OPy

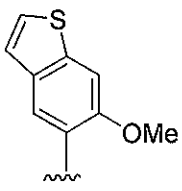
【化１３－３】

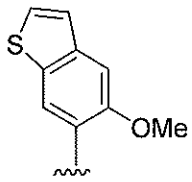

dTPT3
dFTPT3
dNaM
d5SICS
dFEMO
dFIMO
dMMO2
dAMO1
dAMO2
dAMO3
dNMO1
dPMO1
dNaM
d5FM
dDMO
dTMO
dFMO
MICS
5MICS
PIM
PP
dAMO1
dAMO2
dAMO3
dNMO1
dPMO1
((d)NaM),
((d)CNMO),
((d)MMO2),
((d)5FM),
((d)2OMe),
((d)5F2OMe),

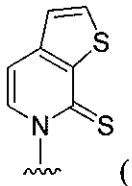
【化１３－４】

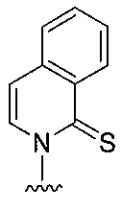


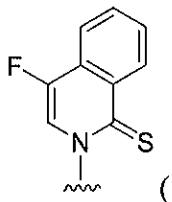
((d)ClMO),


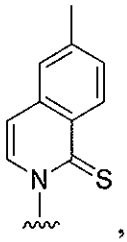
((d)BrMO),


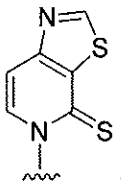
((d)PTMO),


((d)MTMO),


((d)TPT3),


((d)SICS),


((d)FSICS),


, および


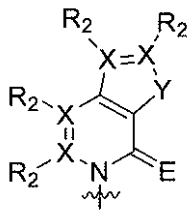
((d)TAT1)

。

【０１００】

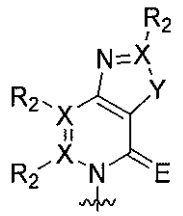
一部の実施形態では、核酸塩基は以下の構造を含み：

【化１４】



式中、各Ｘは独立して炭素または窒素であり；R_2は任意であり、存在する場合は独立して水素、アルキル、アルケニル、アルキニル；メトキシ、メタンチオール、メタンセレノ、ハロゲン、シアノまたはアジド基であり；各Ｙは独立して硫黄、酸素、セレンまたは第二級アミンであり；各Ｅは独立して酸素、硫黄またはセレンであり；波線はリボシル、デオキシリボシルまたはジデオキシリボシル部分またはその類似体への結合点を示し、ここでリボシル、デオキシリボシルまたはジデオキシリボシル部分またはその類似体は遊離型であるか、一リン酸、二リン酸もしくは場合によりα－チオ三リン酸、β－チオ三リン酸もしくはγ－チオ三リン酸基を含む三リン酸基に連結しているか、またはＲＮＡもしくはＤＮＡに、またはＲＮＡ類似体もしくはＤＮＡ類似体に含まれる。一部の実施形態では、R_2は低級アルキル（例えば、C_1～C_6）、水素またはハロゲンである。本明細書に記載される核酸塩基の一部の実施形態では、R_2はフルオロである。本明細書に記載される核酸塩基の一部の実施形態では、Ｘは炭素である。本明細書に記載される核酸塩基の一部の実施形態では、Ｅは硫黄である。本明細書に記載される核酸塩基の一部の実施形態では、Ｙは硫黄である。本明細書に記載される核酸塩基の一部の実施形態では、核酸塩基は以下の構造を有する：

【化１５】



。本明細書に記載される核酸塩基の一部の実施形態では、Ｅは硫黄であり、Ｙは硫黄である。本明細書に記載される核酸塩基の一部の実施形態では、波線はリボシルまたはデオキシリボシル部分への結合点を示す。本明細書に記載される核酸塩基の一部の実施形態では、波線は、三リン酸基に連結しているリボシルまたはデオキシリボシル部分への結合点を示す。

【０１０１】

一部の実施形態では、核酸塩基は核酸ポリマーの成分である。一部の実施形態では、核酸塩基はｔＲＮＡの成分である。一部の実施形態では、核酸塩基はｔＲＮＡ中のアンチコドンの成分である。一部の実施形態では、核酸塩基はｍＲＮＡの成分である。一部の実施形態では、核酸塩基はｍＲＮＡのコドンの成分である。一部の実施形態では、核酸塩基はＲＮＡまたはＤＮＡの成分である。一部の実施形態では、核酸塩基はＤＮＡ中のコドンの成分である。一部の実施形態では、核酸塩基は別の相補的核酸塩基と核酸塩基対を形成する。

【０１０２】

非天然核酸塩基の追加の例には、２－チオウラシル、２’－デオキシウリジン、４－チオウラシル、ウラシル－５－イル、ヒポキサンチン－９－イル（Ｉ）、５－ハロウラシル；５－プロピニル－ウラシル、６－アゾ－ウラシル、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、プソイドウラシル、ウラシル－５－オキサ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキサ酢酸、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、５－メチル－２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、ウラシル－５－オキサ酢酸、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、５－ヒドロキシメチルシトシン、５－トリフルオロメチルシトシン、５－ハロシトシン、５－プロピニルシトシン、５－ヒドロキシシトシン、シクロシトシン、シトシンアラビノシド、５，６－ジヒドロシトシン、５－ニトロシトシン、６－アゾシトシン、アザシトシン、Ｎ４－エチルシトシン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、４－アセチルシトシン、２－チオシトシン、フェノキサジンシチジン（［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾキサジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノキサジンシチジン（９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾキサジン－２（３Ｈ）－オン）、カルバゾールシチジン（２Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－２－オン）、ピリドインドールシチジン（Ｈ－ピリド［３’，２’：４，５］ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－２－オン）、２－アミノアデニン、２－プロピルアデニン、２－アミノ－アデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－プロピル－アデニン、２－アミノ－２’－デオキシアデノシン、３－デアザアデニン、７－メチルアデニン、７－デアザ－アデニン、８－アザアデニン、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキルおよび８－ヒドロキシル置換アデニン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、２－メチルアデニン、２，６－ジアミノプリン、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、６－アザアデニン、２－メチルグアニン、グアニンの２－プロピルおよびアルキル誘導体、３－デアザグアニン、６－チオグアニン、７－メチルグアニン、７－デアザグアニン、７－デアザグアノシン、７－デアザ－８－アザ

グアニン、８－アザグアニン、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキルおよび８－ヒドロキシル置換グアニン、１－メチルグアニン、２，２－ジメチルグアニン、７－メチルグアニン、６－アザグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、１－メチルイノシン、ケオシン、ベーターＤ－ガラクトシルケオシン、イノシン、ベーターＤ－マンノシルケオシン、ウイブトキソシン、ヒドロキシ尿素、（ａｃｐ３）ｗ、２－アミノピリジンまたは２－ピリドンが含まれる。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、非天然核酸塩基は、ウラシル－５－イル、ヒポキサンチン－９－イル（Ｉ）、２－アミノアデニン－９－イル、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの６－メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－ハロウラシルおよびシトシン、５－プロピニルウラシルおよびシトシン、６－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、５－ウラシル（シュードウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシルおよび他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ、特に、５－ブロモ、５－トリフルオロメチルおよび他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデニン、７－デアザグアニンおよび７－デアザアデニン、ならびに３－デアザグアニンおよび３－デアザアデニンから選択される。ある特定の非天然核酸、例えば、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジンおよびＮ－２置換プリン、Ｎ－６置換プリン、Ｏ－６置換プリン、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、５－メチルシトシン、二本鎖形成の安定性を増加させるもの、ユニバーサル核酸、疎水性核酸塩基、乱雑な核酸塩基、サイズが拡大された核酸塩基、フッ素化核酸塩基、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジン、ならびにＮ－２、Ｎ－６およびＯ－６置換プリンは、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシルおよび５－プロピニルシトシン、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの６－メチル、他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－ハロウラシル、５－ハロシトシン、５－プロピニル（－Ｃ≡Ｃ－ＣＨ$_3$）ウラシル、５－プロピニルシトシン、ピリミジン核酸の他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、６－アゾシトシン、６－アゾチミン、５－ウラシル（シュードウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシルおよび他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ、特に、５－ブロモ、５－トリフルオロメチル、他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニン、８－アザアデニン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、３－デアザグアニン、３－デアザアデニン、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン（［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾオキサジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、Ｇ－ｃｌａｍｐｓ、フェノキサジンシチジン（例えば、９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾオキサジン－２（３Ｈ）－オン）、カルバゾールシチジン（２Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－２－オン）、ピリドインドールシチジン（Ｈ－ピリド［３’，２’：４，５］ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－２－オン）、プリンまたはピリミジン核酸塩基が他の複素環で置き換えられたもの、７－デアザ－アデニン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジン、２－ピリドン、アザシトシン、５－ブロモシトシン、ブロモウラシル、５－クロロシトシン、塩素化シトシン、シクロシトシン、シトシンアラビノシド、５－フルオロシトシン、フルオロピリミジン、フルオロウラシル、５，６－ジヒドロシトシン、５－ヨードシトシン、ヒドロキシウレア、ヨードウラシル、５－ニトロシトシン、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－フルオロウ

ラシルおよび５－ヨードウラシル、２－アミノ－アデニン、６－チオ－グアニン、２－チオ－チミン、４－チオ－チミン、５－プロピニル－ウラシル、４－チオ－ウラシル、Ｎ４－エチルシトシン、７－デアザグアニン、７－デアザ－８－アザグアニン、５－ヒドロキシシトシン、２’－デオキシウリジン、２－アミノ－２’－デオキシアデノシン、ならびに米国特許第３，６８７，８０８号；同第４，８４５，２０５号；同第４，９１０，３００号；同第４，９４８，８８２号；同第５，０９３，２３２号；同第５，１３０，３０２号；同第５，１３４，０６６号；同第５，１７５，２７３号；同第５，３６７，０６６号；同第５，４３２，２７２号；同第５，４５７，１８７号；同第５，４５９，２５５号；同第５，４８４，９０８号；同第５，５０２，１７７号；同第５，５２５，７１１号；同第５，５５２，５４０号；同第５，５８７，４６９号；同第５，５９４，１２１号；同第５，５９６，０９１号；同第５，６１４，６１７号；同第５，６４５，９８５号；同第５，６８１，９４１号；同第５，７５０，６９２号；同第５，７６３，５８８号；同第５，８３０，６５３号および同第６，００５，０９６号；国際公開第９９／６２９２３号；Ｋａｎｄｉｍａｌｌａら、（２００１）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．９巻：８０７～８１３頁；Ｔｈｅ Ｃｏｎｃｉｓｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、Ｋｒｏｓｃｈｗｉｔｚ、Ｊ．Ｉ．編、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、１９９０、８５８～８５９頁；Ｅｎｇｌｉｓｃｈら、Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ、１９９１、３０巻、６１３頁；およびＳａｎｇｈｖｉ、第１５章、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、ＣｒｏｏｋｅおよびＬｅｂｌｅｕ編、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、１９９３、２７３～２８８頁に記載のものを含む。追加の核酸塩基修飾は、例えば、米国特許第３，６８７，８０８号；Ｅｎｇｌｉｓｃｈら、Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ、１９９１、３０巻、６１３頁に見ることができる。

【０１０４】

様々な複素環核酸塩基および様々な糖部分（および糖アナログ）を含む非天然核酸は、当技術分野において利用可能であり、いくつかの場合において、核酸は、天然に存在する核酸の主要な５つの核酸塩基構成成分以外の１つまたはいくつかの複素環核酸塩基を含む。例えば、複素環核酸塩基としては、いくつかの場合において、ウラシル－５－イル、シトシン－５－イル、アデニン－７－イル、アデニン－８－イル、グアニン－７－イル、グアニン－８－イル、４－アミノピロロ［２．３－ｄ］ピリミジン－５－イル、２－アミノ－４－オキソピロロ［２、３－ｄ］ピリミジン－５－イル、２－アミノ－４－オキソピロロ［２．３－ｄ］ピリミジン－３－イル基が挙げられ、ここで、プリンは、９位を介して核酸の糖部分に、１位を介してピリミジンに、７位を介してピロロピリミジンに、および１位を介してピラゾロピリミジンに結合する。

【０１０５】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログはまた、ホスフェート部分において修飾される。修飾されたホスフェート部分としては、限定されるものではないが、２つのヌクレオチド間の連結における修飾を有するものが挙げられ、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３’－アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、３’－アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステルならびにボラノホスフェートを含む。２つのヌクレオチド間のこれらのホスフェートまたは修飾されたホスフェートの連結は、３’－５’連結または２’－５’連結によってであり、連結は、３’－５’から５’－３’または２’－５’から５’－２’などの逆の方向性を含むことが理解される。様々な塩、混合塩および遊離酸形態も含まれる。多数の米国特許が、修飾されたホスフェートを含有するヌクレオチドの作製方法および使用方法を教示しており、限定されるものではないが、第３，６８７，８０８号；第４，４６９，８６３号；第４，

４７６，３０１号；第５，０２３，２４３号；第５，１７７，１９６号；第５，１８８，８９７号；第５，２６４，４２３号；第５，２７６，０１９号；第５，２７８，３０２号；第５，２８６，７１７号；第５，３２１，１３１号；第５，３９９，６７６号；第５，４０５，９３９号；第５，４５３，４９６号；第５，４５５，２３３号；第５，４６６，６７７号；第５，４７６，９２５号；第５，５１９，１２６号；第５，５３６，８２１号；第５，５４１，３０６号；第５，５５０，１１１号；第５，５６３，２５３号；第５，５７１，７９９号；第５，５８７，３６１号；および第５，６２５，０５０号が挙げられる。

【０１０６】

いくつかの実施形態において、非天然核酸は、２’，３’－ジデオキシ－２’，３’－ジデヒドロ－ヌクレオシド（ＰＣＴ／ＵＳ２００２／００６４６０号）、５’－置換ＤＮＡおよびＲＮＡ誘導体（ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０３３９６１号；Ｓａｈａら、Ｊ．Ｏｒｇ Ｃｈｅｍ．、１９９５、６０巻、７８８～７８９頁；Ｗａｎｇら、Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｌｅｔｔｅｒｓ、１９９９、９巻、８８５～８９０頁；およびＭｉｋｈａｉｌｏｖら、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ＆ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ、１９９１、１０巻（１～３号）、３３９～３４３頁；Ｌｅｏｎｉｄら、１９９５、１４巻（３～５号）、９０１～９０５頁；およびＥｐｐａｃｈｅｒら、Ｈｅｌｖｅｔｉｃａ Ｃｈｉｍｉｃａ Ａｃｔａ、２００４、８７巻、３００４～３０２０頁；ＰＣＴ／ＪＰ２０００／００４７２０号；ＰＣＴ／ＪＰ２００３／００２３４２号；ＰＣＴ／ＪＰ２００４／０１３２１６号；ＰＣＴ／ＪＰ２００５／０２０４３５号；ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３１５４７９号；ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３２４４８４号；ＰＣＴ／ＪＰ２００９／０５６７１８号；ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０６７５６０号）、または修飾された核酸塩基を用いてモノホスフェートとして作製された５’－置換モノマー（Ｗａｎｇら、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ＆ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ、２００４、２３巻（１および２号）、３１７～３３７頁）を含む。

【０１０７】

いくつかの実施形態において、非天然核酸は、糖の環の５’位および２’位における修飾（ＰＣＴ／ＵＳ９４／０２９９３号）、例えば、５’－CH_2置換２’－Ｏ－保護ヌクレオシド（Ｗｕら、Ｈｅｌｖｅｔｉｃａ Ｃｈｉｍｉｃａ Ａｃｔａ、２０００、８３巻、１１２７～１１４３頁およびＷｕら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１９９９、１０巻、９２１～９２４）を含む。いくつかの場合において、非天然核酸は、オリゴヌクレオチドへの組み込みのために製造されたアミド連結ヌクレオシドダイマーを含み、ここで、ダイマー中の３’連結ヌクレオシド（５’から３’）は、２’－O_3CH_3および５’－（Ｓ）－CH_3（Ｍｅｓｍａｅｋｅｒら、Ｓｙｎｌｅｔｔ、１９９７、１２８７～１２９０頁）を含む。非天然核酸は、２’－置換５’－CH_2（またはＯ）修飾ヌクレオシド（ＰＣＴ／ＵＳ９２／０１０２０号）を含むことができる。非天然核酸は、５’－メチレンホスホネートＤＮＡおよびＲＮＡモノマーおよびダイマー（Ｂｏｈｒｉｎｇｅｒら、Ｔｅｔ．Ｌｅｔｔ．、１９９３、３４巻、２７２３～２７２６頁；Ｃｏｌｌｉｎｇｗｏｏｄら、Ｓｙｎｌｅｔｔ、１９９５、７巻、７０３～７０５頁；およびＨｕｔｔｅｒｓら、Ｈｅｌｖｅｔｉｃａ Ｃｈｉｍｉｃａ Ａｃｔａ、２００２、８５巻、２７７７～２８０６頁）を含むことができる。非天然核酸は、２’－置換を有する５’－ホスホネートモノマー（米国特許出願公開第２００６／００７４０３５号）および他の修飾された５’－ホスホネートモノマー（国際公開第１９９７／３５８６９号）を含むことができる。非天然核酸は、５’－修飾されたメチレンホスホネートモノマー（欧州特許出願公開第６１４９０７号および欧州特許出願公開第６２９６３３号）を含むことができる。非天然核酸は、５’および／もしくは６’位にヒドロキシル基を含む５’または６’－ホスホネートリボヌクレオシドのアナログ（Ｃｈｅｎら、Ｐｈｏｓｐｈｏｒｕｓ，Ｓｕｌｆｕｒ ａｎｄ Ｓｉｌｉｃｏｎ、２００２、７７７巻、１７８３～１７８６頁；Ｊｕｎｇら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、２０００、８巻、２５０１～２５０９頁；Ｇａｌｌｉｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．、２００７、９２５～９３３頁；およびＨａｍｐｔｏｎら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃ

ｈｅｍ．、１９７６、１９巻（８号）、１０２９～１０３３頁）を含むことができる。非天然核酸は、５’－ホスフェート基を有する５’－ホスホネートデオキシリボヌクレオシドモノマーおよびダイマー（Ｎａｗｒｏｔら、Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ、２００６、１６巻（１号）、６８～８２頁）を含むことができる。非天然核酸は、６’－ホスホネート基を有するヌクレオシドを含むことができ、ここで、５’または／および６’位は、無置換、またはチオ－ｔｅｒｔ－ブチル基（ＳＣ（ＣＨ$_3$）$_3$）（およびそのアナログ）；メチレンアミノ基（ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$）（およびそのアナログ）またはシアノ基（ＣＮ）（およびそのアナログ）（Ｆａｉｒｈｕｒｓｔら、Ｓｙｎｌｅｔｔ、２００１、４巻、４６７～４７２頁；Ｋａｐｐｌｅｒら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９８６、２９巻、１０３０～１０３８頁；Ｋａｐｐｌｅｒら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９８２、２５巻、１１７９～１１８４頁；Ｖｒｕｄｈｕｌａら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９８７、３０巻、８８８～８９４頁；Ｈａｍｐｔｏｎら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９７６、１９巻、１３７１～１３７７頁；Ｇｅｚｅら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ、１９８３、１０５巻（２６号）、７６３８～７６４０頁；およびＨａｍｐｔｏｎら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ、１９７３、９５巻（１３号）、４４０４～４４１４頁）で置換される。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、非天然核酸は、糖部分の修飾も含む。いくつかの場合において、核酸は、糖基が修飾された１つまたはそれ以上のヌクレオシドを含有する。そのような糖が修飾されたヌクレオシドは、増強されたヌクレアーゼ安定性、増加した結合親和性、またはいくつかの他の有利な生物学的性質が付与される場合がある。ある特定の実施形態において、核酸は、化学修飾されたリボフラノース環部分を含む。化学修飾されたリボフラノース環の例としては、限定されないが、置換基の付加（５’および／または２’置換基；二環式核酸（ＢＮＡ）を形成する２つの環原子の架橋；リボシル環の酸素原子のＳ、Ｎ（Ｒ）もしくはＣ（Ｒ$_1$）（Ｒ$_2$）（Ｒ＝Ｈ、Ｃ$_1$～Ｃ$_{12}$アルキルまたは保護基）による置き換え；ならびにそれらの組合せを含む）が挙げられる。化学修飾された糖の例は、国際公開第２００８／１０１１５７号、米国特許出願公開第２００５／０１３０９２３号および国際公開第２００７／１３４１８１号に見ることができる。

【０１０９】

いくつかの例において、修飾された核酸は、修飾された糖または糖アナログを含む。したがって、リボースおよびデオキシリボースに加えて、糖部分は、ペントース、デオキシペントース、ヘキソース、デオキシヘキソース、グルコース、アラビノース、キシロース、リキソース、または糖の「アナログ」のシクロペンチル基であることができる。糖は、ピラノシルまたはフラノシルの形態であることができる。糖部分は、リボース、デオキシリボース、アラビノースまたは２’－Ｏ－アルキルリボースのフラノシドであることができ、糖は、［アルファ］または［ベータ］アノマー配置のいずれかのそれぞれの複素環核酸塩基に結合することができる。糖修飾としては、限定されるものではないが、２’－アルコキシ－ＲＮＡアナログ、２’－アミノ－ＲＮＡアナログ、２’－フルオロ－ＤＮＡおよび２’－アルコキシ－またはアミノ－ＲＮＡ／ＤＮＡキメラが挙げられる。例えば、糖修飾としては、２’－Ｏ－メチル－ウリジンまたは２’－Ｏ－メチル－シチジンを挙げることができる。糖修飾としては、２’－Ｏ－アルキル置換デオキシリボヌクレオシドおよび２’－Ｏ－エチレングリコール様リボヌクレオシドが挙げられる。そのような糖または糖アナログが複素環核酸塩基（核酸塩基）に結合する、これらの糖または糖アナログおよびそれぞれの「ヌクレオシド」の製造は、公知である。糖修飾はまた、他の修飾を用いて作製し、それと組み合わせることができる。

【０１１０】

糖部分への修飾は、リボースおよびデオキシリボースの天然修飾、ならびに非天然修飾を含む。糖修飾としては、限定されるものではないが、以下の２位における修飾：ＯＨ；Ｆ；Ｏ－、Ｓ－もしくはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－もしくはＮ－アルケニル；Ｏ－、Ｓ－もしくはＮ－アルキニル；またはＯ－アルキル－Ｏ－アルキルが挙げられ、ここで、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または無置換のＣ$_1$～Ｃ$_{10}$アルキルもしく

はＣ２～Ｃ１０アルケニルおよびアルキニルであってもよい。２’糖修飾としては、限定されるものではないが、－Ｏ［（ＣＨ２）ｎＯ］ｍＣＨ３、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＯＣＨ３、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＮＨ２、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＣＨ３、－Ｏ（ＣＨ２）ｎＯＮＨ２および－Ｏ（ＣＨ２）ｎＯＮ［（ＣＨ２）ｎＣＨ３）］２（式中、ｎおよびｍは、１～約１０である）も挙げられる。

【０１１１】

２’位における他の修飾としては、限定されるものではないが、Ｃ１～Ｃ１０低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、Ｏ－アルカリル、Ｏ－アラルキル、ＳＨ、ＳＣＨ３、ＯＣＮ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、ＣＦ３、ＯＣＦ３、ＳＯＣＨ３、ＳＯ２ＣＨ３、ＯＮＯ２、ＮＯ２、Ｎ３、ＮＨ２、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、ＲＮＡ切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的性質を改善するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的性質を改善するための基、および類似の性質を有する他の置換基が挙げられる。類似の修飾はまた、糖の他の位置、特に、３’末端ヌクレオチドまたは２’－５’連結オリゴヌクレオチドにおける糖の３’位、および５’末端ヌクレオチドの５’位において行うことができる。修飾された糖は、ＣＨ２およびＳなどの架橋している環の酸素において修飾を含有するものも含む。ヌクレオチドの糖アナログは、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖ミメティックを有することもできる。米国特許第４，９８１，９５７号；同第５，１１８，８００号；同第５，３１９，０８０号；同第５，３５９，０４４号；同第５，３９３，８７８号；同第５，４４６，１３７号；同第５，４６６，７８６号；同第５，５１４，７８５号；同第５，５１９，１３４号；同第５，５６７，８１１号；同第５，５７６，４２７号；同第５，５９１，７２２号；同第５，５９７，９０９号；同第５，６１０，３００号；同第５，６２７，０５３号；同第５，６３９，８７３号；同第５，６４６，２６５号；同第５，６５８，８７３号；同第５，６７０，６３３号；同第４，８４５，２０５号；同第５，１３０，３０２号；同第５，１３４，０６６号；同第５，１７５，２７３号；同第５，３６７，０６６号；同第５，４３２，２７２号；同第５，４５７，１８７号；同第５，４５９，２５５号；同第５，４８４，９０８号；同第５，５０２，１７７号；同第５，５２５，７１１号；同第５，５５２，５４０号；同第５，５８７，４６９号；同第５，５９４，１２１号、同第５，５９６，０９１号；同第５，６１４，６１７号；同第５，６８１，９４１号；および同第５，７００，９２０号などの、そのような修飾された糖構造の製造を教示し、核酸塩基修飾の範囲を詳述および記載する多数の米国特許があり、それらのそれぞれは、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

【０１１２】

修飾された糖部分を有する核酸の例としては、限定されないが、５’－ビニル、５’－メチル（ＲまたはＳ）、４’－Ｓ、２’－Ｆ、２’－ＯＣＨ３および２’－Ｏ（ＣＨ２）２ＯＣＨ３置換基を含む核酸が挙げられる。２’位における置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、Ｏ－アリル、Ｏ－（Ｃ１～Ｃ１０アルキル）、ＯＣＦ３、Ｏ（ＣＨ２）２ＳＣＨ３、Ｏ（ＣＨ２）２－Ｏ－Ｎ（Ｒｍ）（Ｒｎ）およびＯ－ＣＨ２－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒｍ）（Ｒｎ）（式中、それぞれのＲｍおよびＲｎは、独立して、Ｈ、または置換もしくは無置換のＣ１～Ｃ１０アルキルである）から選択することもできる。

【０１１３】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載の核酸は、１つまたはそれ以上の二環式核酸を含む。ある特定のそのような実施形態において、二環式核酸は、４’および２’リボシル環原子の間の架橋を含む。ある特定の実施形態において、本明細書に提供される核酸は、１つまたはそれ以上の二環式核酸を含み、ここで、架橋は、４’－２’二環式核酸を含む。そのような４’－２’二環式核酸の例としては、限定されるものではないが、式：４’－（ＣＨ２）－Ｏ－２’（ＬＮＡ）；４’－（ＣＨ２）－Ｓ－２’；４’－（ＣＨ２）２－Ｏ－２’（ＥＮＡ）；４’－ＣＨ（ＣＨ３）－Ｏ－２’および４’－ＣＨ（ＣＨ２ＯＣＨ３）－Ｏ－２’、ならびにそれらのアナログ（米国特許第７，３９９，８４５号を参照されたい

）；４’－Ｃ（ＣＨ$_3$）（ＣＨ$_3$）－Ｏ－２’およびそのアナログ（国際公開第２００９／００６４７８号、国際公開第２００８／１５０７２９号、米国特許出願公開第２００４／０１７１５７０号、米国特許第７，４２７，６７２号、Ｃｈａｔｔｏｐａｄｈｙａｙａら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．、２０９巻、７４号、１１８～１３４頁および国際公開第２００８／１５４４０１号を参照されたい）の１つが挙げられる。例えば、Ｓｉｎｇｈら、Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．、１９９８、４巻、４５５～４５６頁；Ｋｏｓｈｋｉｎら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ、１９９８、５４巻、３６０７～３６３０頁；Ｗａｈｌｅｓｔｅｄｔら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．、２０００、９７巻、５６３３～５６３８頁；Ｋｕｍａｒら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．、１９９８、８巻、２２１９～２２２２頁；Ｓｉｎｇｈら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．、１９９８、６３巻、１００３５～１００３９頁；Ｓｒｉｖａｓｔａｖａら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、２００７、１２９巻（２６号）８３６２～８３７９頁；Ｅｌａｙａｄｉら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｉｎｖｅｎｓ．Ｄｒｕｇｓ、２００１、２巻、５５８～５６１頁；Ｂｒａａｓｃｈら、Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ、２００１、８巻、１～７頁；Ｏｒａｍら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．、２００１、３巻、２３９～２４３頁；米国特許第４，８４９，５１３号：同第５，０１５，７３３号：同第５，１１８，８００号：同第５，１１８，８０２号：同第７，０５３，２０７号：同第６，２６８，４９０号：同第６，７７０，７４８号：同第６，７９４，４９９号：同第７，０３４，１３３号：同第６，５２５，１９１号：同第６，６７０，４６１号：および同第７，３９９，８４５号；国際公開第２００４／１０６３５６号、国際公開第１９９４／１４２２６号、国際公開第２００５／０２１５７０号、国際公開第２００７／０９００７１および国際公開第２００７／１３４１８１号；米国特許出願公開第２００４／０１７１５７０号、同第２００７／０２８７８３１号および同第２００８／００３９６１８号；米国仮出願第６０／９８９，５７４号、同第６１／０２６，９９５号、同第６１／０２６，９９８号、同第６１／０５６，５６４号、同第６１／０８６，２３１号、同第６１／０９７，７８７号および同第６１／０９９，８４４号；ならびに国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００８／０６４５９１号、同第ＰＣＴ　ＵＳ２００８／０６６１５４号、同第ＰＣＴ　ＵＳ２００８／０６８９２２号および同第ＰＣＴ／ＤＫ９８／００３９３号も参照されたい。

【０１１４】

ある特定の実施形態において、核酸は、連結された核酸を含む。核酸は、任意の核酸間の連結を使用して、一緒に連結することができる。核酸間連結基の２つの主なクラスは、リン原子の存在または非存在によって定義される。代表的なリン含有核酸間連結としては、限定されるものではないが、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデートおよびホスホロチオエート（Ｐ＝Ｓ）が挙げられる。代表的なリン不含有核酸間連結基としては、限定されるものではないが、メチレンメチルイミノ（－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｏ－ＣＨ$_2$－）、チオジエステル（－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｓ－）、チオノカルバメート（－Ｏ－Ｃ（Ｏ）（ＮＨ）－Ｓ－）；シロキサン（－Ｏ－Ｓｉ（Ｈ）$_2$－Ｏ－）；およびＮ，Ｎ＊－ジメチルヒドラジン（－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｎ（ＣＨ$_3$））が挙げられる。ある特定の実施形態において、キラル原子を有する核酸間連結は、ラセミ混合物として、別々のエナンチオマー、例えば、アルキルホスホネートおよびホスホロチオエートとして、製造することができる。非天然核酸は、単一の修飾を含有することができる。非天然核酸は、１つの部分内に、または異なる部分の間に、複数の修飾を含有することができる。

【０１１５】

核酸に対する主鎖のホスフェートの修飾としては、限定されるものではないが、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート（架橋または非架橋）、ホスホトリエステル、ホスホロジチオエート、ホスホジチオエートおよびボラノホスフェートが挙げられ、任意の組合せで使用することができる。他の非ホスフェート連結を使用することもできる。

【０１１６】

いくつかの実施形態において、主鎖の修飾（例えば、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロアミデートおよびホスホロジチオエートのヌクレオチド間連結）は、修飾された核酸における免疫調節活性を付与することができ、および／またはインビボでのそれらの安定性を増強することができる。

【０１１７】

いくつかの例において、リン誘導体（または修飾されたホスフェート基）は、糖または糖アナログ部分に結合し、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホルアミデートなどであることができる。修飾されたホスフェート連結または非ホスフェート連結を含有する例示的なポリヌクレオチドは、Ｐｅｙｒｏｔｔｅｓら、１９９６、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２４巻：１８４１～１８４８頁；Ｃｈａｔｕｒｖｅｄｉら、１９９６、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２４巻：２３１８～２３２３頁；およびＳｃｈｕｌｔｚら、（１９９６） Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２４巻：２９６６～２９７３頁；Ｍａｔｔｅｕｃｃｉ、１９９７、「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ａｎａｌｏｇｓ：ａｎ Ｏｖｅｒｖｉｅｗ」ｉｎ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ、（ＣｈａｄｗｉｃｋおよびＣａｒｄｅｗ編）Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ；Ｚｏｎ、１９９３、「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ Ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅｓ」ｉｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｆｏｒ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｓ、Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、１６５～１９０頁；Ｍｉｌｌｅｒら、１９７１、ＪＡＣＳ ９３巻：６６５７～６６６５頁；Ｊａｇｅｒら、１９８８、Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７巻：７２４７～７２４６頁；Ｎｅｌｓｏｎら、１９９７、ＪＯＣ ６２巻：７２７８～７２８７頁；米国特許第５，４５３，４９６号；ならびにＭｉｃｋｌｅｆｉｅｌｄ、２００１、Ｃｕｒｒ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．８巻：１１５７～１１７９頁に見ることができる。

【０１１８】

いくつかの場合において、主鎖の修飾は、アニオン性、中性またはカチオン性基などの代替部分でホスホジエステル連結を置き換えることを含む。そのような修飾の例としては、アニオン性ヌクレオシド間連結；Ｎ３’－Ｐ５’ホスホルアミデート修飾；ボラノホスフェートＤＮＡ；プロオリゴヌクレオチド；中性ヌクレオシド間連結、例えば、メチルホスホネート；アミド連結ＤＮＡ；メチレン（メチルイミノ）連結；ホルムアセタールおよびチオホルムアセタール連結；スルホニル基を含有する主鎖；モルホリノオリゴ；ペプチド核酸（ＰＮＡ）；ならびに正に荷電したデオキシリボ核酸グアニジン（ＤＮＧ）オリゴ（Ｍｉｃｋｌｅｆｉｅｌｄ、２００１、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ８巻：１１５７～１１７９頁）が挙げられる。修飾された核酸は、１つまたはそれ以上の修飾、例えば、ホスホジエステルおよびホスホロチオエート連結の組合せなどのホスフェート連結の組合せを含むキメラまたは混合主鎖を含むことができる。

【０１１９】

ホスフェートについての代替物としては、例えば、短鎖アルキルまたはシクロアルキルのヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルのヌクレオシド間連結、または１つもしくはそれ以上の短鎖ヘテロ原子または複素環のヌクレオシド間連結が挙げられる。これらとしては、モルホリノ連結を有するもの（一部分において、ヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサン主鎖；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン主鎖；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；アルケン含有主鎖；スルファメート主鎖；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ主鎖；スルホネートおよびスルホンアミド主鎖；アミド主鎖；ならびに混合Ｎ、Ｏ、ＳおよびＣＨ$_2$構成部分を有する他のものが挙げられる。多数の米国特許が、これらの種類のホスフェート置き換えの作製方法および使用方法を開示しており、限定されるものではないが、米国特許第５，０３４，５０６号；同第５，１６６，３１５号；同第５，１８５，４４４号；同第５，２１４，１３４号；同第５，２１

６，１４１号；同第５，２３５，０３３号；同第５，２６４，５６２号；同第５，２６４，５６４号；同第５，４０５，９３８号；同第５，４３４，２５７号；同第５，４６６，６７７号；同第５，４７０，９６７号；同第５，４８９，６７７号；同第５，５４１，３０７号；同第５，５６１，２２５号；同第５，５９６，０８６号；同第５，６０２，２４０号；同第５，６１０，２８９号；同第５，６０２，２４０号；同第５，６０８，０４６号；同第５，６１０，２８９号；同第５，６１８，７０４号；同第５，６２３，０７０号；同第５，６６３，３１２号；同第５，６３３，３６０号；同第５，６７７，４３７号；および同第５，６７７，４３９号が挙げられる。ヌクレオチド代替物において、ヌクレオチドの糖およびホスフェート部分の両方を、例えば、アミド型連結（アミノエチルグリシン）（ＰＮＡ）によって置き換えることができることも理解される。米国特許第５，５３９，０８２号；同第５，７１４，３３１号；および同第５，７１９，２６２号は、ＰＮＡ分子の作製方法および使用方法を教示しており、そのそれぞれは、参照によって本明細書に組み入れられる。Ｎｉｅｌｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、１９９１、２５４巻、１４９７～１５００頁も参照されたい。例えば、細胞の取り込みを増強するために、ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログに他の種類の分子を連結する（コンジュゲートする）ことも可能である。コンジュゲートは、ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログに化学的に連結することができる。そのようなコンジュゲートとしては、限定されるものではないが、脂質部分、例えば、コレステロール部分（Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９８９、８６巻、６５５３～６５５６頁）、コール酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ．、１９９４、４巻、１０５３～１０６０頁）、チオエーテル、例えば、ヘキシル－Ｓ－トリチルチオール（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ａｎｎ．ＫＹ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、１９９２、６６０巻、３０６～３０９頁；Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ．、１９９３、３巻、２７６５～２７７０頁）、チオコレステロール（Ｏｂｅｒｈａｕｓｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１９９２、２０巻、５３３～５３８頁）、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基（Ｓａｉｓｏｎ－Ｂｅｈｍｏａｒａｓら、ＥＭ５ＯＪ、１９９１、１０巻、１１１１～１１１８頁；Ｋａｂａｎｏｖら、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．、１９９０、２５９巻、３２７～３３０頁；Ｓｖｉｎａｒｃｈｕｋら、Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ、１９９３、７５巻、４９～５４頁）、リン脂質、例えば、ジ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールもしくはトリエチルアンモニウムｌ－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－Ｓ－Ｈ－ホスホネート（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．、１９９５、３６巻、３６５１～３６５４頁；Ｓｈｅａら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１９９０、１８巻、３７７７～３７８３頁）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ　＆　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ、１９９５、１４巻、９６９～９７３頁）、またはアダマンタン酢酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．、１９９５、３６巻、３６５１～３６５４頁）、パルミチル部分（Ｍｉｓｈｒａら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ、１９９５、１２６４巻、２２９～２３７頁）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分（Ｃｒｏｏｋｅら、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．、１９９６、２７７巻、９２３～９３７）が挙げられる。多数の米国特許が、そのようなコンジュゲートの製造を教示しており、限定されるものではないが、米国特許第４，８２８，９７９号；同第４，９４８，８８２号；同第５，２１８，１０５号；同第５，５２５，４６５号；同第５，５４１，３１３号；同第５，５４５，７３０号；同第５，５５２，５３８号；同第５，５７８，７１７号、同第５，５８０，７３１号；同第５，５９１，５８４号；同第５，１０９，１２４号；同第５，１１８，８０２号；同第５，１３８，０４５号；同第５，４１４，０７７号；同第５，４８６，６０３号；同第５，５１２，４３９号；同第５，５７８，７１８号；同第５，６０８，０４６号；同第４，５８７，０４４号；同第４，６０５，７３５号；同第４，６６７，０２５号；同第４，７６２，７７９号；同第４，７８９，７３７号；同第４，８２４，９４１号；同第４，８３５，２６３号；同第４，８７６，３３５号；同第４，９０

４，５８２号；同第４，９５８，０１３号；同第５，０８２，８３０号；同第５，１１２，９６３号；同第５，２１４，１３６号；同第５，２４５，０２２号；同第５，２５４，４６９号；同第５，２５８，５０６号；同第５，２６２，５３６号；同第５，２７２，２５０号；同第５，２９２，８７３号；同第５，３１７，０９８号；同第５，３７１，２４１号、同第５，３９１，７２３号；同第５，４１６，２０３号、同第５，４５１，４６３号；同第５，５１０，４７５号；同第５，５１２，６６７号；同第５，５１４，７８５号；同第５，５６５，５５２号；同第５，５６７，８１０号；同第５，５７４，１４２号；同第５，５８５，４８１号；同第５，５８７，３７１号；同第５，５９５，７２６号；同第５，５９７，６９６号；同第５，５９９，９２３号；同第５，５９９，９２８号および同第５，６８８，９４１号が挙げられる。

【０１２０】

一部の実施形態では、非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチド（核酸とも呼ばれる）は、任意の供給源または組成物、例えばＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｇＤＮＡ（ゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ（短い阻害性ＲＮＡ）、ＲＮＡｉ、ｔＲＮＡ、ｍＲＮＡまたはｒＲＮＡ（リボソームＲＮＡ）に由来し、例えば、任意の形（例えば、線状、環状、スーパーコイル、一本鎖、二本鎖など）である。一部の実施形態では、核酸は、ヌクレオチド、ヌクレオシドまたはポリヌクレオチドを含む。一部の場合には、核酸は天然および非天然の核酸を含む。一部の場合には、核酸はＤＮＡまたはＲＮＡ類似体（例えば、核酸塩基類似体、糖類似体および／または非天然主鎖などを含む）などの非天然核酸も含む。用語「核酸」はポリヌクレオチド鎖の特定の長さを指しも暗示もしないものと理解され、したがって、ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドもこの定義に含まれる。核酸は、時には、ベクター、プラスミド、ファージミド、自己複製配列（ＡＲＳ）、セントロメア、人工染色体、酵母人工染色体（例えば、ＹＡＣ）、または宿主細胞中で複製することもしくは複製させることができる他の核酸である。一部の場合には、非天然核酸は核酸類似体である。追加の場合には、非天然核酸は細胞外供給源に由来する。他の場合には、非天然核酸は、本明細書で提供される生物体、例えば遺伝子改変生物体の細胞内空間へ利用可能である。一部の実施形態では、非天然ヌクレオチドは天然のヌクレオチドでない。一部の実施形態では、天然の核酸塩基を含まないヌクレオチドは、非天然の核酸塩基を含む。

【０１２１】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは逆転写酵素のための基質として使用されるか、または、少なくとも１つの非天然ヌクレオチドに加えて天然ヌクレオチドを含む逆転写酵素によって合成される。例示的な天然ヌクレオチドには、限定されずに、ＡＴＰ、ＵＴＰ、ＣＴＰ、ＧＴＰ、ＡＤＰ、ＵＤＰ、ＣＤＰ、ＧＤＰ、ＡＭＰ、ＵＭＰ、ＣＭＰ、ＧＭＰ、ｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＡＤＰ、ｄＴＤＰ、ｄＣＤＰ、ｄＧＤＰ、ｄＡＭＰ、ｄＴＭＰ、ｄＣＭＰおよびｄＧＭＰが含まれる。例示的な天然のデオキシリボヌクレオチドには、ｄＡＴＰ、ｄＴＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＡＤＰ、ｄＴＤＰ、ｄＣＤＰ、ｄＧＤＰ、ｄＡＭＰ、ｄＴＭＰ、ｄＣＭＰおよびｄＧＭＰが含まれる。例示的な天然リボヌクレオチドには、ＡＴＰ、ＵＴＰ、ＣＴＰ、ＧＴＰ、ＡＤＰ、ＵＤＰ、ＣＤＰ、ＧＤＰ、ＡＭＰ、ＵＭＰ、ＣＭＰおよびＧＭＰが含まれる。ヌクレオチドの三リン酸型が重合のための基質であること、および発生期のポリヌクレオチド鎖への付加の後にヌクレオチドは一リン酸型のヌクレオチドに変換されることが理解される。

【０１２２】

一般に、ヌクレオチド類似体または非天然ヌクレオチドは、核酸塩基、糖またはリン酸部分へのある種の改変を含有するヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、改変は化学的改変を含む。一部の場合には、改変は３’ＯＨもしくは５’ＯＨ基、主鎖、糖成分または核酸塩基で起こる。一態様では、改変された核酸は、３’ＯＨもしくは５’ＯＨ基、主鎖、糖成分または核酸塩基の１つまたはそれ以上の改変、および／または天然に存在しないリンカー分子の付加を含む。一態様では、改変された主鎖は、ホスホジエステル主鎖以外の主鎖を含む。一態様では、改変された糖は、デオキシリボース以外の（改変されたＤＮＡでは）、またはリボース以外の（改変されたＲＮＡでは）糖を含む。一態様では、改変さ

れた核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシンもしくはチミン以外の核酸塩基（改変されたＤＮＡでは）、またはアデニン、グアニン、シトシンもしくはウラシル以外の核酸塩基（改変されたＲＮＡでは）を含む。

【０１２３】

一部の実施形態では、核酸は少なくとも１つの改変された核酸塩基を含む。一部の場合には、核酸は２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０またはそれ以上の改変された核酸塩基を含む。一部の場合には、核酸塩基部分への改変には、Ａ、Ｃ、ＧおよびＴ／Ｕの天然および合成の改変、ならびに異なるプリンまたはピリミジン核酸塩基が含まれる。一部の実施形態では、改変はアデニン、グアニン、シトシンもしくはチミンの改変型（改変されたＤＮＡでは）、またはアデニン、グアニン、シトシンもしくはウラシルの改変型（改変されたＲＮＡでは）に対してである。改変された核酸塩基は、本明細書の他の場所で具体的に記載される改変された核酸塩基のいずれかであってよい。

【０１２４】

一部の実施形態では、逆転写酵素は完全長ｃＤＮＡを生成する。一部の実施形態では、逆転写酵素は、逆転写を受けるポリヌクレオチドの非天然リボヌクレオチドに相補的な位置のヌクレオチド、および非天然リボヌクレオチド（例えば、少なくとも２、５、１０または２０ヌクレオチド）に相補的な位置のヌクレオチドの３’の複数のヌクレオチドを含み、逆転写を受けるポリヌクレオチドに完全に相補的であるｃＤＮＡを含むｃＤＮＡを生成する。一部の実施形態では、ｃＤＮＡは逆転写を受けるポリヌクレオチドの少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｃＤＮＡは、逆転写を受けるポリヌクレオチドに完全に相補的である。一部の実施形態では、ｃＤＮＡの少なくとも２５％は非天然核酸塩基を含む。一部の実施形態では、ｃＤＮＡの少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７％、９８％または９９％は非天然核酸塩基を含む。

非天然塩基対

【０１２５】

一部の実施形態では、非天然ヌクレオチドは、組込みの間および／または後に、例えば逆転写酵素によって別の非天然ヌクレオチドと塩基対を形成する（非天然塩基対；ＵＢＰ）。一部の実施形態では、安定して統合される非天然ヌクレオチドは、別のヌクレオチド、例えば天然または非天然ヌクレオチドと塩基対を形成することができる非天然ヌクレオチドである。一部の実施形態では、安定して統合される非天然ヌクレオチドは、別の非天然ヌクレオチドと塩基対（非天然塩基対（ＵＢＰ））を形成することができる非天然ヌクレオチドである。例えば、第１の非天然ヌクレオチドは、第２の非天然ヌクレオチドと塩基対を形成することができる。例えば、核酸への組み込みの間、および／またはその後に塩基対形成することができる非天然ヌクレオシド三リン酸の１つの対としては、（ｄ）５ＳＩＣＳのトリホスフェート（（ｄ）５ＳＩＣＳＴＰ）および（ｄ）ＮａＭのトリホスフェート（（ｄ）ＮａＭＴＰ）が挙げられる。他の例としては、限定されるものではないが、（ｄ）ＣＮＭＯのトリホスフェート（（ｄ）ＣＮＭＯＴＰ）および（ｄ）ＴＰＴ３のトリホスフェート（（ｄ）ＴＰＴ３ＴＰ）が挙げられる。そのような非天然ヌクレオチドは、リボースまたはデオキシリボース糖部分（「（ｄ）」によって示される）を有することができる。例えば、核酸に組み込まれたときに塩基対を形成することができる１対の非天然ヌクレオシド三リン酸には、（ｄ）ＴＡＴ１の三リン酸（（ｄ）ＴＡＴ１ＴＰ）および（ｄ）ＮａＭの三リン酸（（ｄ）ＮａＭＴＰ）が含まれる。一部の実施形態では、核酸に組み込まれたときに塩基対を形成することができる１対の非天然ヌクレオシド三リン酸には、（ｄ）ＣＮＭＯの三リン酸（（ｄ）ＣＮＭＯＴＰ）および（ｄ）ＴＡＴ１の三リン酸（（ｄ）ＴＡＴ１ＴＰ）が含まれる。一部の実施形態では、核酸に組み込まれたときに塩基対を形成することができる１対の非天然ヌクレオシド三リン酸には、（ｄ）ＴＰＴ３の三リン酸（（ｄ）ＴＰＴ３ＴＰ）および（ｄ）ＮａＭの三リン酸（（ｄ）ＮａＭＴＰ）が含まれる。一部の実施形態では、非天然ヌクレオチドは天然ヌクレオチド（Ａ、Ｔ、Ｇ、Ｃ、Ｕ）と塩基対を実質的に形成しない。一部の実施形態では、安定して統合される非天

然ヌクレオチドは、天然ヌクレオチドと塩基対を形成することができる。

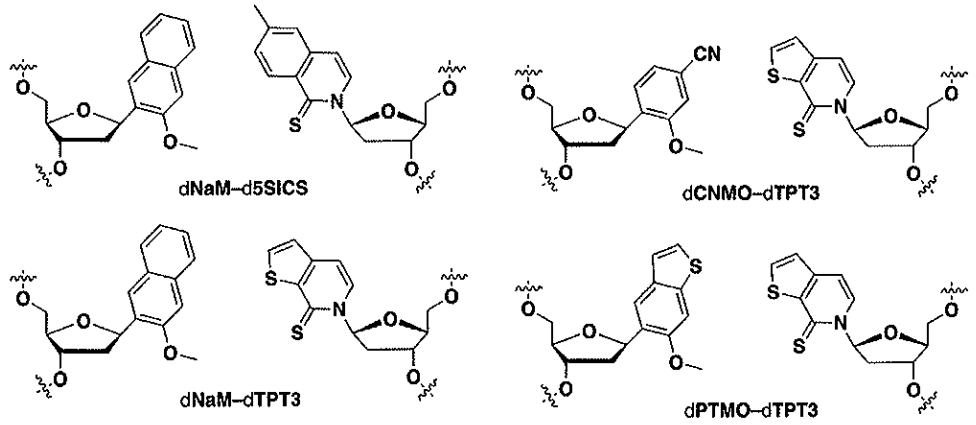
【０１２６】

いくつかの実施形態において、安定に組み込まれた非天然（デオキシ）リボヌクレオチドは、ＵＢＰを形成することができる非天然（デオキシ）リボヌクレオチドであるが、実質的に、それぞれの天然（デオキシ）リボヌクレオチドのいずれかと塩基対を形成しない。いくつかの実施形態において、安定に組み込まれた非天然（デオキシ）リボヌクレオチドは、ＵＢＰを形成することができる非天然（デオキシ）リボヌクレオチドであるが、実質的に、１つまたはそれ以上の天然核酸と塩基対を形成しない。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、Ａ、ＴおよびＣと塩基対を形成することができないが、Ｇと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、Ａ、ＴおよびＧと塩基対を形成することができないが、Ｃと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、Ｃ、ＧおよびＡと塩基対を形成することができないが、Ｔと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、Ｃ、ＧおよびＴと塩基対を形成することができないが、Ａと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、ＡおよびＴと塩基対を形成することができないが、ＣおよびＧと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、ＡおよびＣと塩基対を形成することができないが、ＴおよびＧと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、ＡおよびＧと塩基対を形成することができないが、ＣおよびＴと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、ＣおよびＴと塩基対を形成することができないが、ＡおよびＧと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、ＣおよびＧと塩基対を形成することができないが、ＴおよびＧと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、ＴおよびＧと塩基対を形成することができないが、ＡおよびＧと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、Ｇと塩基対を形成することができないが、Ａ、ＴおよびＣと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、Ａと塩基対を形成することができないが、Ｇ、ＴおよびＣと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、Ｔと塩基対を形成することができないが、Ｇ、ＡおよびＣと塩基対を形成することができる。例えば、安定に組み込まれた非天然ヌクレオチドは、実質的に、Ｃと塩基対を形成することができないが、Ｇ、ＴおよびＡと塩基対を形成することができる。

【０１２７】

非天然ＤＮＡまたはＲＮＡ塩基対（ＵＢＰ）を形成することが可能である例示的な非天然ヌクレオチドには、限定されずに、（ｄ）５ＳＩＣＳ、（ｄ）５ＳＩＣＳ、（ｄ）ＮａＭ、（ｄ）ＮａＭ、（ｄ）ＴＰＴ３、（ｄ）ＭＴＭＯ、（ｄ）ＣＮＭＯ、（ｄ）ＴＡＴ１およびその組合せが含まれる。一部の実施形態では、非天然ヌクレオチド塩基対には、限定されずに以下のものが含まれる：

【化１６】



。一部の実施形態では、例えばＲＮＡが逆転写を受けた場合、非天然核酸塩基が上に示されるかまたは本明細書の他の場所で記載されるものであり、糖の１つはリボースまたはその改変形である（しかし、デオキシリボースでない）ＵＢＰが形成される。

【０１２８】

オリゴヌクレオチド中の非天然ヌクレオチド含有量を測定する

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、例えばｃＤＮＡ中の非天然ヌクレオチドの量を測定することを含む。ｃＤＮＡがＤＮＡ分子から転写されたＲＮＡから生成された場合、そのようなアプローチは、翻訳と独立して、転写の間の非天然ヌクレオチドの保持の忠実度のために下限を決定するために使用することができる。一部の実施形態では、本方法は転写および逆転写の複合的忠実度を測定するためのものである。一部の実施形態では、本方法は転写および逆転写の間の非天然ヌクレオチドの保持を測定するためのものである。

【０１２９】

一部の実施形態では、測定工程は非天然核酸塩基を認識する結合パートナーを使用することができる。非天然核酸塩基がビオチン部分を含む場合、結合パートナーはビオチン結合剤（例えば、ストレプトアビジン、アビジン、ニュートラアビジンまたは抗ビオチン抗体）であってよい。一部の実施形態では、ビオチン結合剤はビーズなどの固体支持体と会合している（例えば、共有結合などで結合している）。一部の実施形態では、結合パートナーはストレプトアビジンである。結合パートナーの結合は、結合パートナーに結合したポリヌクレオチド（非天然核酸塩基を含むと理解される）は未結合のポリヌクレオチド（非天然核酸塩基を欠くと理解される）と異なる電気泳動移動度を示すという点で、ゲルシフトアッセイまたは移動度シフトアッセイで調査することができる。逆転写酵素によって組み込まれるヌクレオチドの非天然核酸塩基がビオチン部分も結合パートナーの他の標的もそれ自体含まない場合、例えば以下の通り、結合パートナーは非天然核酸塩基の量を測定するためになお使用することができる。ビオチン化非天然核酸塩基を含むｃＤＮＡから相補的分子またはアンプリコンを生成させることができ（例えば、実施例で実行されるビオチンシフトアッセイのために記載される通り）、それは、計算を適当に調整してｃＤＮＡの代用として次に分析することができる。一部の実施形態では、ｃＤＮＡの増幅はＰＣＲによる。ｄＭＭＯ２ｂｉｏＴＰ（ｄＮａＭＴＰのビオチン化類似体）およびｄ５ＳＩＣＳＴＰ（複製の間にｄＴＰＴ３ＴＰ自体より良好にｄＭＭＯ２ｂｉｏと対になるｄＴＰＴ３ＴＰの類似体）を使用して、例示的なビオチン化非天然核酸塩基を相補的分子またはアンプリコンに組み込むことができる（Ｍａｌｙｓｈｅｖら、Ａ Ｓｅｍｉ－Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｏｒｇａｎｉｓｍ ｗｉｔｈ ａｎ Ｅｘｐａｎｄｅｄ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ａｌｐｈａｂｅｔ。Ｎａｔｕｒｅ ２０１４、５０９、３８５～３８８頁）。ビオチン化非天然核酸塩基を含有する相補的分子またはアンプリコンが生成されるそのようなアプローチは、語句「非天然ヌクレオチドを認識する結合パートナーを使用してｃＤＮＡ中の非天然

ヌクレオチドの量を測定する」などに包含されると考えられる。
【０１３０】
一部の実施形態では、非天然核酸塩基を認識する結合パートナーを使用してｃＤＮＡ中の非天然ヌクレオチドの量を測定することは、ビオチンシフトアッセイを含む。ビオチンシフトアッセイは、ストレプトアビジンなどのビオチン結合剤への差別的移動性結合または非結合に基づいて、ビオチン化生成物を非ビオチン化生成物から区別する任意のアッセイを包含する。移動性は、例えば、電気泳動移動性（例えば、ゲル電気泳動移動性または細管電気泳動移動性）またはクロマトグラフィー移動性（例えば、ゲル濾過、イオン交換または疎水性相互作用クロマトグラフィーを使用する）であってよい。
【０１３１】
ｃＤＮＡがＤＮＡ分子から転写されたＲＮＡから生成された場合、転写はインビトロまたはインビボであってよい。一部の実施形態では、転写は大腸菌などの細菌または原核生物で起こる。一部の実施形態では、ＲＮＡが転写されるＤＮＡ分子は、ｓｓＤＮＡまたはｄｓＤＮＡである。
【０１３２】
一部の実施形態では、本方法は転写－逆転写（Ｔ－ＲＴ）忠実度（転写および逆転写工程の全体的忠実度）を計算することを含む。例えば、Ｔ－ＲＴ忠実度は、（ａ）非天然ヌクレオチドを含有するｃＤＮＡの割合の（ｂ）非天然ヌクレオチドを含有する転写前のＤＮＡの割合に対する比として決定することができる。増幅などのさらなる合成工程がビオチン化ＤＮＡを調製するために使用される場合、この比は、さらなる合成工程で非天然塩基対喪失を補償する因子によって調整することができる。例で示すように、１．０６がこの因子の例示的な値である。
【０１３３】
ＲＮＡアプタマー候補をスクリーニングする方法
本明細書で、ＲＮＡアプタマー候補をスクリーニングする方法も開示される。一部の実施形態では、本方法は、少なくとも１つの非天然ヌクレオチドを含む複数の異なるＲＮＡオリゴヌクレオチド（「ライブラリー」）を標的とインキュベートすることを含む。一部の実施形態では、本方法は、標的に結合する複数のＲＮＡオリゴヌクレオチドのために少なくとも１回の選択を実行することを含む。一部の実施形態では、本方法は、標的に結合する富化されたＲＮＡオリゴヌクレオチドを単離することであって、単離された富化されたＲＮＡオリゴヌクレオチドはＲＮＡアプタマーを含むことを含む。一部の実施形態では、本方法は、ＲＮＡアプタマーの１つまたはそれ以上を、ＲＮＡアプタマー中の非天然核酸塩基に相補的な位置で非天然デオキシリボヌクレオチドを含むｃＤＮＡに逆転写し、それによってＲＮＡアプタマーに対応するｃＤＮＡ分子のライブラリーを提供することを含む。
【０１３４】
一部の実施形態では、複数の異なるＲＮＡオリゴヌクレオチドはランダム化されたヌクレオチド領域を含む。これは、例えば、ヌクレオチド合成手順のある特定のサイクルでヌクレオチドの混合プールを使用して、または、ＤＮＡ鋳型からオリゴヌクレオチドを転写する前に突然変異誘発ＰＣＲを実行することによって生成することができる。ランダム化されたヌクレオチド領域は、ランダム化された位置の１つまたは複数を含むことができる。複数のランダム化された位置がある場合、それらは連続的であるか、または１つまたはそれ以上の非ランダム化ヌクレオチドもしくは非ランダム化ヌクレオチドのセグメントによって遮断されてもよい。一部の実施形態では、非天然核酸塩基は、ランダム化された領域（例えば、第１のランダム化された位置の３’および第２のランダム化された位置の５’）の中にある。一部の実施形態では、非天然核酸塩基は、少なくとも１つのランダム化された位置から５ヌクレオチドまたは１０ヌクレオチドの範囲内である。一部の実施形態では、非天然核酸塩基はランダム化された位置の直ぐ隣にあるか、または２つのランダム化された位置の直ぐ隣にある。
【０１３５】

一部の実施形態では、ＲＮＡオリゴヌクレオチドはバーコード配列および／またはプライマー結合配列を含む。実施例７で例示されるように、バーコード配列は非天然核酸塩基の位置を特定するために使用することができ、プライマー結合配列は選択の後の活性配列の下流分析のために使用することができる。

【０１３６】

一部の実施形態では、ＲＮＡアプタマーから生成されるｃＤＮＡが配列決定をされる。一部の実施形態では、ＲＮＡアプタマーから生成されるｃＤＮＡを突然変異させて複数の追加の配列を生成させ、それらはさらなる少なくとも１回の選択を実行するためにＲＮＡに次に転写することができる。ｃＤＮＡを突然変異させることは、例えば誤りがちのＰＣＲによって実行することができる。

【０１３７】

一部の実施形態では、選択は、未結合であるか弱く結合したＲＮＡオリゴヌクレオチドを除去する洗浄工程を含む。例えば方法の進行に伴ってより多くの選択圧を提供するためにストリンジェンシーが増加する、一連の洗浄工程を用いることができる。

【０１３８】

本方法によって特定されるＲＮＡアプタマーは、標的に結合するか、アゴナイズするかまたは拮抗するそれらの能力について、例えば個々に分析することができる。一部の実施形態では、標的に結合するそれらの能力についてＲＮＡアプタマーを分析することは、K_d、k_{on}またはk_{off}を決定することを含む。一部の実施形態では、標的をアゴナイズするそれらの能力についてＲＮＡアプタマーを分析することはEC_{50}値を決定することを含む。一部の実施形態では、標的に拮抗するそれらの能力についてＲＮＡアプタマーを分析することはK_iまたはIC_{50}値を決定することを含む。

【０１３９】

ポリヌクレオチドの追加の特徴

本明細書に記載される特徴は、実行可能な限り、任意の開示される実施形態と組み合わせることができる。一部の実施形態では、非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、少なくとも１５ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは少なくとも２０、２５、３０、３５、４０、５０、６０、７０、８０、９０または１００ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、非天然リボヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、１つまたはそれ以上のＯＲＦを含む。ＯＲＦは、任意の適切な供給源、時にはゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡ、逆転写ＲＮＡまたは相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、または前述の１つまたはそれ以上を含む核酸ライブラリーに由来し得、そして目的の核酸配列、目的のタンパク質、または目的の活性を含む任意の生物種に由来する。ＯＲＦを得ることができる生物の非限定的な例としては、例えば、細菌、酵母、真菌、ヒト、昆虫、線虫、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ラットまたはマウスが挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のヌクレオチドおよび／または核酸試薬または他の試薬は、単離または精製される。公開されているインビトロの方法により、非天然ヌクレオチドを含むＯＲＦを作製し得る。場合によっては、ヌクレオチドまたは核酸試薬は、非天然核酸塩基を含む。

【０１４０】

ポリヌクレオチドは、ＯＲＦと併せて翻訳され、アミノ酸タグをコードする、ＯＲＦに隣接するヌクレオチド配列を含む場合がある。タグをコードするヌクレオチド配列は、核酸試薬中のＯＲＦの３’および／または５’に位置し、それにより、ＯＲＦによってコードされるタンパク質またはペプチドのＣ末端またはＮ末端でタグをコードしている。インビトロでの転写および／または翻訳を無効にしない任意のタグを利用してもよく、技術者によって適切に選択されてもよい。タグは、培養または発酵培地からの所望のＯＲＦ産物の単離および／または精製を容易にし得る。場合によっては、核酸試薬のライブラリーが、本明細書に記載の方法および組成物と共に使用される。例えば、少なくとも１００、１０００、２０００、５０００、１０，０００、または５０，０００超の固有のポリヌクレオチドのライブラリーが、ライブラリーに存在し、各ポリヌクレオチドは、少なくとも１つの非天然核酸塩基を含む。

【０１４１】
ポリヌクレオチドは、特定のエレメント、例えば、核酸の使用目的に従ってしばしば選択される調節エレメントを含み得る。以下のエレメントのいずれかを核酸試薬に含めてもよいし、除外してもよい。例えば、ポリヌクレオチドは、以下のヌクレオチドエレメントの１つまたはそれ以上または全てを含み得る：１つまたはそれ以上のプロモーターエレメント、１つまたはそれ以上の５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、標的ヌクレオチド配列が挿入され得る１つまたはそれ以上の領域（「挿入エレメント」）、１つまたはそれ以上の標的ヌクレオチド配列、１つまたはそれ以上の３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）、および１つまたはそれ以上の選択エレメント。ポリヌクレオチドは、そのようなエレメントの１つまたはそれ以上を提供されてもよく、核酸が所望の生物に導入される前に、他のエレメントを核酸に挿入してもよい。いくつかの実施形態では、提供される核酸試薬は、プロモーター、５’ＵＴＲ、任意の３’ＵＴＲ、および標的ヌクレオチド配列がヌクレオチド酸試薬に挿入される（すなわち、クローニングされる）挿入エレメントを含む。特定の実施形態では、提供される核酸試薬は、プロモーター、挿入エレメント、および任意の３’ＵＴＲを含み、そして５’ＵＴＲ／標的ヌクレオチド配列は、任意の３’ＵＴＲと共に挿入される。エレメントは、選択された発現系での発現（例えば、選択された生物での発現、または例えば、無細胞系での発現）に適した任意の順序で配置されてもよく、いくつかの実施形態では、核酸試薬は、５’→３’の方向で以下のエレメントを含む：（１）プロモーターエレメント、５’ＵＴＲ、および挿入エレメント；（２）プロモーターエレメント、５’ＵＴＲ、および標的ヌクレオチド配列；（３）プロモーターエレメント、５’ＵＴＲ、挿入エレメントおよび３’ＵＴＲ；ならびに（４）プロモーターエレメント、５’ＵＴＲ、標的ヌクレオチド配列および３’ＵＴＲ。いくつかの実施形態では、ＵＴＲは、完全に天然であるか、または非天然ヌクレオチドを含む、ＯＲＦの転写または翻訳を変更または増大させるように最適化され得る。

【０１４２】
ポリヌクレオチド、例えば、発現カセットおよび／または発現ベクターは、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始配列、転写終結配列および他のエレメントを含む様々な調節エレメントを含んでもよい。「プロモーター」とは、一般に、転写開始部位に関して比較的固定された位置にあるときに機能するＤＮＡの配列である。例えば、プロモーターは、ヌクレオチド三リン酸輸送体核酸セグメントの上流にあり得る。「プロモーター」は、ＲＮＡポリメラーゼおよび転写因子の基本的な相互作用に必要なコアエレメントを含み、かつ上流エレメントおよび応答エレメントを含んでもよい。「エンハンサー」とは、一般に、転写開始部位から固定でない距離で機能し、転写ユニットに対して５’または３’’のいずれかであり得るＤＮＡの配列を指す。さらに、エンハンサーは、イントロン内およびコード配列自体内に存在してもよい。それらは通常長さが１０～３００ヌクレオチドの間であり、シスで機能することができる。エンハンサーは、近くのプロモーターからの転写を増大するように機能する。プロモーターと同様、エンハンサーも、転写の調節を媒介する応答エレメントを含む場合が多い。エンハンサーはしばしば発現の調節を決定し、完全に天然であるかまたは非天然ヌクレオチドを含むＯＲＦなどの、ＯＲＦ発現を変更または最適化するために使用され得る。

【０１４３】
上記のように、ポリヌクレオチドはまた、１つまたはそれ以上の５’ＵＴＲ、および１つまたはそれ以上の３’ＵＴＲを含んでもよい。例えば、真核生物の宿主細胞（例えば、酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは有核細胞）および原核生物の宿主細胞（例えば、ウイルス、細菌）で使用される発現ベクターは、ｍＲＮＡの発現に影響を与え得る、転写の終了についてシグナル伝達する配列を含んでもよい。これらの領域は、組織因子タンパク質をコードするｍＲＮＡの非翻訳部分のポリアデニル化セグメントとして転写され得る。３’の非翻訳領域には、転写終結部位も含まれる。いくつかの好ましい実施形態では、転写ユニットは、ポリアデニル化領域を含む。この領域の利点の１つは、転写されたユニットがｍＲＮＡのように処理および輸送される可能性が高くなるということである。

発現構築物におけるポリアデニル化シグナルの同定および使用は、十分に確立されている。いくつかの好ましい実施形態では、相同なポリアデニル化シグナルは、導入遺伝子構築物において使用され得る。

【０１４４】

５’ＵＴＲは、それが由来するヌクレオチド配列に内因性の１つまたはそれ以上のエレメントを含み得、時には１つまたはそれ以上の外因性エレメントを含む。５’ＵＴＲは、ゲノムＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、ＲＮＡまたはｍＲＮＡなどの任意の適切な核酸から、例えば、任意の適切な生物（例えば、ウイルス、細菌、酵母、真菌、植物、昆虫または哺乳動物）から由来し得る。技術者は、選択された発現系（例えば、選択された生物での発現、または、例えば、無細胞系での発現）に基づいて、５’ＵＴＲにとって適切なエレメントを選択し得る。５’ＵＴＲは、技術者に公知の以下のエレメントの１つまたはそれ以上を含む場合がある：エンハンサー配列（例えば、転写または翻訳）、転写開始部位、転写因子結合部位、翻訳調節部位、翻訳開始部位、翻訳因子結合部位、アクセサリータンパク質結合部位、フィードバック調節剤結合部位、Ｐｒｉｂｎｏｗボックス、ＴＡＴＡボックス、－３５エレメント、Ｅ－ｂｏｘ（ヘリックス－ループ－ヘリックス結合エレメント）、リボソーム結合部位、レプリコン、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）、サイレンサーエレメントなど。いくつかの実施形態では、プロモーターエレメントは、適切な条件付き調節に必要な全ての５’ＵＴＲエレメントが、プロモーターエレメントフラグメント内に、またはプロモーターエレメントフラグメントの機能的部分配列内に含まれるように分離されてもよい。

【０１４５】

ポリヌクレオチド中の５’ＵＴＲは、翻訳エンハンサーヌクレオチド配列を含んでもよい。翻訳エンハンサーヌクレオチド配列は、多くの場合、ポリヌクレオチドのプロモーターと標的ヌクレオチド配列の間に位置している。翻訳エンハンサー配列は、しばしばリボソームに結合し、１８Ｓ ｒＲＮＡ結合リボヌクレオチド配列（すなわち、４０Ｓリボソーム結合配列）である場合もあり、内部リボソーム侵入配列（ＩＲＥＳ）である場合もある。ＩＲＥＳは一般に、多数の特定の分子間相互作用を介して４０Ｓリボソームサブユニットと接触する正確に配置されたＲＮＡ三次構造を有するＲＮＡ足場を形成する。リボソームエンハンサー配列の例は公知であり、技術者によって同定され得る（例えば、Ｍｉｇｎｏｎｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ３３：Ｄ１４１－Ｄ１４６（２００５）；Ｐａｕｌｏｕｓら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ３１：７２２－７３３（２００３）；Ａｋｂｅｒｇｅｎｏｖら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ３２：２３９－２４７（２００４）；Ｍｉｇｎｏｎｅら、Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３（３）：ｒｅｖｉｅｗｓ０００４．１－０００１．１０（２００２）；Ｇａｌｌｉｅ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ３０：３４０１－３４１１（２００２）；Ｓｈａｌｏｉｋｏら、ＤＯＩ：１０．１００２／ｂｉｔ．２０２６７；およびＧａｌｌｉｅら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １５：３２５７－３２７３（１９８７））。

【０１４６】

翻訳エンハンサー配列は、コザックコンセンサス配列または他の配列（例えば、ヒドロ虫ポリプ配列、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号Ｕ０７１２８）などの真核生物配列である場合がある。翻訳エンハンサー配列は、シャイン・ダルガルノコンセンサス配列などの原核生物配列である場合がある。特定の実施形態では、翻訳エンハンサー配列は、ウイルスヌクレオチド配列である。翻訳エンハンサー配列は、例えば、タバコモザイクウイルス（ＴＭＶ）、アルファルファモザイクウイルス（ＡＭＶ）；タバコエッチウイルス（ＥＴＶ）；ジャガイモウイルスＹ（ＰＶＹ）；カブモザイク（ポティ）ウイルスおよびエンドウ種子伝染モザイクウイルスなどの植物ウイルスの５’ＵＴＲに由来する場合がある。特定の実施形態では、ＴＭＶから約６７塩基の長さのオメガ配列は、翻訳エンハンサー配列としてポリヌクレオチドに含まれる（例えば、グアノシンヌクレオチドを欠き、２５ヌクレオチド長のポリ（ＣＡＡ）中央領域を含む）。

【０１４７】
３’ＵＴＲは、それが由来するヌクレオチド配列に内因性の１つまたはそれ以上のエレメントを含んでもよく、１つまたはそれ以上の外因性エレメントを含む場合もある。３’ＵＴＲは、ゲノムＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、ＲＮＡまたはｍＲＮＡなどの任意の適切な核酸から、例えば、任意の適切な生物（例えば、ウイルス、細菌、酵母、真菌、植物、昆虫または哺乳動物）から由来し得る。技術者は、選択された発現系に基づいて、３’ＵＴＲに適切なエレメントを選択し得る（例えば、選択された生物での発現など）。３’ＵＴＲは、技術者に公知の以下のエレメントの１つまたはそれ以上を含む場合がある：転写調節部位、転写開始部位、転写終結部位、転写因子結合部位、翻訳調節部位、翻訳終結部位、翻訳開始部位、翻訳因子結合部位、リボソーム結合部位、レプリコン、エンハンサーエレメント、サイレンサーエレメントおよびポリアデノシンテール。３’ＵＴＲにはポリアデノシンテールが含まれることが多く、含まれない場合もあり、ポリアデノシンテールが存在する場合は、１つまたはそれ以上のアデノシン部分が追加されても、またはそれから削除されてもよい（例えば、約５、約１０、約１５、約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５または約５０のアデノシン部分を追加してもまたは削除してもよい）。
【０１４８】
いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲおよび／または３’ＵＴＲの改変を用いて、プロモーターの活性を変更する（例えば、増加、追加、減少、または実質的に排除する）。プロモーター活性の変更は、次いで、改変された５’または３’ＵＴＲを含む作動可能に連結されたプロモーターエレメントからの目的のヌクレオチド配列の転写の変化によって、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の活性（例えば、酵素活性）を変更し得る。例えば、微生物を、新規の活性（例えば、宿主生物には通常見られない活性）を加え得る、または特定の実施形態では、目的のヌクレオチド配列（例えば、目的の相同または異種ヌクレオチド配列）に作動可能に連結された同種または異種プロモーターからの転写を増大させることによって既存の活性の発現を増大し得る改変５’または３’ＵＴＲを含むポリヌクレオチドを発現するように遺伝子改変によって操作してもよい。いくつかの実施形態では、微生物を、特定の実施形態では、目的のヌクレオチド配列に対して作動可能に連結された同種または異種プロモーターからの転写を減少または実質的に排除することによって、活性の発現を減少し得る改変５’または３’ＵＴＲを含む核酸試薬を発現するように遺伝子改変によって操作してもよい。
【０１４９】
キットおよび製造品
特定の実施形態では、本明細書に開示されるのは、本明細書に記載される１つまたはそれ以上の方法で使用するためのキットおよび製造品である。そのようなキットとしては、バイアル、チューブなどのような１つまたはそれ以上の容器を受け入れるように区画化された担体、パッケージ、または容器を含み、その容器のそれぞれは、本明細書に記載の方法で使用される別個のエレメントの１つを含んでいる。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、注射器、および試験管が挙げられる。一実施形態では、容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成される。
【０１５０】
いくつかの実施形態では、キットは、キットの内容物を収容するための適切な包装材料を備える。場合によっては、包装材料は、好ましくは無菌で夾雑物のない環境を提供するために、周知の方法によって構築される。本明細書で使用される包装材料としては、例えば、核酸配列決定システムで使用するために販売されている市販のキットで慣習的に利用されているものが挙げられる。例示的な包装材料としては、限定するものではないが、本明細書に記載の構成成分を一定の範囲内に保持し得るガラス、プラスチック、紙、ホイルなどが挙げられる。
【０１５１】
包装材料は、構成成分の特定の用途を示すラベルを備えてもよい。このラベルで示されているキットの使用は、そのキットに存在する構成成分の特定の組合せに適切な、本明細

書に記載されている方法の１つまたはそれ以上であり得る。例えば、ラベルは、キットがポリヌクレオチドを合成する方法にとって、または核酸の配列を決定する方法にとって有用であることを示し得る。

【０１５２】

パッケージングされた試薬または構成成分の使用説明書もキットに含まれてもよい。この説明書には通常、混合されるキット成分およびサンプルの相対量、試薬／サンプル混合物のメンテナンス期間、温度、緩衝液条件などの反応パラメーターを説明する具体的な表現が含まれる。

【０１５３】

特定の反応に必要な全ての構成成分が特定のキットに存在する必要があるわけではないことが理解される。そうではなく、１つまたはそれ以上の追加の構成成分を他の供給源から提供され得る。キットに付属の説明書で、提供される追加の構成成分、およびそれらを入手できる場所が特定され得る。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、例えば、遺伝子操作された細胞を調製するための本開示によって提供される方法を使用して、非天然核酸を細胞核酸に安定に組み込むために有用なキットが提供される。一実施形態では、本明細書に記載のキットは、遺伝子操作された細胞および１つまたはそれ以上の非天然核酸を含む。

【０１５５】

追加の実施形態では、本明細書に記載のキットは、細胞および細胞に導入するための異種遺伝子を含む核酸分子を提供し、それにより、この段落で説明されている上記の任意の実施形態の核酸を含む発現ベクターなどの遺伝子操作された細胞を提供する。

【実施例】

【０１５６】

インビトロおよびインビボ転写および逆転写実験のための材料、方法および実験手順

実施例１～５で適用可能な場合は、以下の実験手順を使用した。

【０１５７】

材料。この研究で使用したプラスミドおよびプライマーの完全なリストは、表４および５で提供される。プライマーおよび天然オリゴヌクレオチドは、ＩＤＴ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ、Ｉｏｗａ）から購入した。シークエンシングは、Ｇｅｎｅｗｉｚ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）によって実行された。プラスミドは、市販のミニプレップキット（Ｄ４０１３、Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ；Ｉｒｖｉｎｅ、ＣＡ）を使用して精製した。ＰＣＲ生成物は、市販のＤＮＡ精製キット（Ｄ４０５４、Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して精製し、Ｉｎｆｉｎｉｔｅ Ｍ２００ Ｐｒｏプレートリーダー（ＴＥＣＡＮ）を使用してＡ２６０／Ａ２８０吸収によって定量化した。ＲＮＡ種を含む全ての実験は、汚染を回避するために無ＲＮアーゼ試薬、ピペットチップ、管および手袋で実行した。

【０１５８】

ｄＮａＭ、ｄＴＰＴ３、ＮＡＭ、ＴＰＴ３、ｄ５ＳＩＣＳおよびｄＭＭＯ２^{bio}のヌクレオシドは商業的に合成され（ＷｕＸｉ ＡｐｐＴｅｃ；Ｓｈａｎｇｈａｉ、Ｃｈｉｎａ）、三リン酸化された（ＴｒｉＬｉｎｋ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ＬＬＣ；Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡおよびＭｙＣｈｅｍ ＬＬＣ；Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）。全ての非天然オリゴヌクレオチドはＢｉｏｓｅａｒｃｈ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｐｅｔａｌｕｍａ、ＣＡ）によって合成され、ＨＰＬＣ精製された。非天然塩基対を含有する全てのＤＮＡ試料は、－２０℃で保存した。全てのＲＮＡ試料は、－８０℃で保存した。

【０１５９】

【表１】

表 4. プライマー。表４は、配列番号１～１２をそれぞれ出現順に開示する。

プライマー	配列
AZ01	GACAAATTAATACGACTCACTATAGGAAACCTGATCATGTAGATCGAAC
AZ38	CCCCAGGCTTTACACTTTATG
AZ87	TmGGCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATT
AZ172	GGAATCTAACCCGGCTGAAC
AZ188	GGAATCTAACCCGGCTGAACCCTCGATGTTGTGGCGGATC
AZ189	GATTCCATTCTTTTGTTTGTCTGCTGGCGGAAACCCCGGGAATC
AZ200	GGAATCTAACCCGGCTGAACGATTCCATTCTTTTGTTTGTCTGC
YZ73	ATGGGTCTCACACAAACTCGAGTACAACTTTAACTCACAC
YZ74	ATGGGTCTCGATTCCATTCTTTTGTTTGTCTGC
YZ435	ATGGGTCTCGAAACCTGATCATGTAGATCGAACGG
YZ436	ATGGGTCTCATCTAACCCGGCTGAACGG
ED101	TAATACGACTCACTATAGG

【０１６０】

【表２】

表 5. オリゴヌクレオチド。表５は、配列番号１３～３４をそれぞれ出現順に開示する。

オリゴヌクレオチド	配列
GFP_Y151_TAC	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_TAG	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAGTAATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_AXC	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAAXCATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_AYC	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAAYCATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_GXC	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAGXCATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_GYC	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAGYCATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_GXT	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAGXTATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_GYT	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAGYTATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_AXA	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAAXAATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_AXT	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAAXTATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_TXA	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTATXAATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_TXT	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTATXTATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
GFP_Y151_GXA	CTCGAGTACAACTTTAACTCACACAATGTAGXAATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
Mm_tRNA_GTA	CCTGATCATGTAGATCGAACGGACTGTAAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTC
Mm_tRNA_CTA	CCTGATCATGTAGATCGAACGGACTCTAAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTC
Mm_tRNA_GYT	CCTGATCATGTAGATCGAACGGACTGYTAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTC
Mm_tRNA_GXT	CCTGATCATGTAGATCGAACGGACTGXTAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTC
Mm_tRNA_GYC	CCTGATCATGTAGATCGAACGGACTGYCAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTC
Mm_tRNA_GXC	CCTGATCATGTAGATCGAACGGACTGXCAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTC
Mm_tRNA_AYC	CCTGATCATGTAGATCGAACGGACTAYCAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTC
Mm_tRNA_AXC	CCTGATCATGTAGATCGAACGGACTAXCAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTC
Mm_tRNA_TYC	CCTGATCATGTAGATCGAACGGACTTYCAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTC

【０１６１】

非天然塩基対によるＰＣＲ反応。簡潔には、各々１００ｎＭのｄＮａＭＴＰおよびｄＴＰＴ３ＴＰを加えて、ＯｎｅＴａｑのための製造業者の使用説明書（ＯｎｅＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｍ０４８０Ｌ、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（ＮＥＢ））に従った。伸長工程は、全ての場合に４分間に調整した。

【０１６２】

ＥＧＦＰおよびｔＲＮＡ鋳型の構築。ＥＧＦＰ鋳型プラスミド、ｐＵＣＣＳ２＿ＥＧＦＰ（ＮＮＮ）およびｐＵＣＣＹＢＡ＿ＥＧＦＰ（ＮＮＮ）は、ＥＧＦＰ配列コンテキストによるＧｏｌｄｅｎ ＧａｔｅアセンブリでＧｏｌｄｅｎ ＧａｔｅアセンブリＹＺ７３およびＹＺ７４で生成されたＰＣＲ生成物であった（表６）。Ｇｏｌｄ

ｅｎ　Ｇａｔｅアセンブリの後にプラスミドｐＵＣＣＳ２＿ＥＧＦＰ（ＮＮＮ）およびｐＵＣＣＹＢＡ＿ＥＧＦＰ（ＮＮＮ）を精製し、Ｑｕｂｉｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用して定量化した。ｐＵＣＣＳ２＿ＥＧＦＰ（ＮＮＮ）の場合はプライマーＥＤ１０１およびＡＺ３８、ｐＵＣＣＹＢＡ＿ＥＧＦＰ（ＮＮＮ）の場合はプライマーＥＤ１０１およびＡＺ８７による鋳型生成ＰＣＲ反応で、ＥＧＦＰ鋳型プラスミド（２ｎｇ）を使用した。ＰＣＲ生成物をＤｐｎＩ消化にかけ、次に精製してインビトロ転写のためのＥＧＦＰ鋳型を与えた。

【０１６３】

【表３】

表 6. プライマー使用

標的遺伝子	RT反応プライマー	Bioプライマー PCR プライマー	cDNAビオチンシフトプライマー
EGFP	AZ188	bio-YZ73/YZ74	YZ73/AZ172
sfGFP	AZ200	bio-YZ73/YZ74	YZ73/AZ172
mmel tRNA in vivo	AZ189	bio-YZ435/YZ546	YZ435/YZ74

【０１６４】

ｔＲＮＡ鋳型は、合成されたｄＮａＭ含有オリゴヌクレオチドからプライマーＡＺ０１およびＡＺ６７による直接ＰＣＲによって作製した。ＰＣＲ生成物を精製してインビトロ転写のためのｔＲＮＡ鋳型を与えた。

【０１６５】

ＳＳＯインビボ翻訳実験で使用したｐＳｙｎ＿ｓｆＧＦＰ（ＮＮＮ）＿ｍｍ（ＮＮＮ）プラスミドは、Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅアセンブリで作製した。全てのＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅアセンブリで使用した挿入断片は、合成されたｄＮａＭ含有オリゴヌクレオチドと、ｍＲＮＡコドン挿入断片の場合はプライマーセットＹＺ７３／ＹＺ７４により、またはｔＲＮＡアンチコドン挿入断片の場合はプライマーセットＹＺ４３５／ＹＺ４３６により生成されたＰＣＲ生成物であった。Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅアセンブリの後にプラスミドｐＳｙｎ＿ｓｆＧＦＰ（ＮＮＮ）＿ｍｍ（ＮＮＮ）を精製し、Ｑｕｂｉｔを使用して定量化した。

【０１６６】

ビオチンシフトアッセイ。ＲＮＡ種の鋳型の非天然塩基対の保持は、ｄ５ＳＩＣＳＴＰおよびｄＭＭＯ２ｂｉｏ－ＴＰを対応するプライマーセットと使用して試験した。バンド強度は、Ｉｍａｇｅ　Ｌａｂ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して定量化した。非天然塩基対保持は、ＥＧＦＰプラスミドの構築時に各試料のパーセンテージ生シフトをＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅアセンブリで使用した合成されたｄＮａＭ含有オリゴヌクレオチド鋳型のパーセンテージ生シフトによって割ることによって正規化した。ビオチンシフトアッセイは、Ｍａｌｙｓｈｅｖら、Ａ　Ｓｅｍｉ－Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　Ｏｒｇａｎｉｓｍ　ｗｉｔｈ　ａｎ　Ｅｘｐａｎｄｅｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ａｌｐｈａｂｅｔ。Ｎａｔｕｒｅ　２０１４、５０９、３８５～３８８頁で詳細に議論される。

【０１６７】

ＥＧＦＰ　ｍＲＮＡのインビトロ転写。鋳型（５００～１０００ｎｇ）は、１．２５ｍＭの非天然リボヌクレオ三リン酸の有る無しでそれに応じて各インビトロ転写反応（ＨｉＳｃｒｉｂｅ　Ｔ７　ＡＲＣＡ　ｗｉｔｈ　Ｔａｉｌｉｎｇ、Ｅ２０６０Ｓ、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（ＮＥＢ））で、続いて精製（Ｄ７０１０、ＺｙｍｏＲｅｓｅａｒｃｈ）で使用した。ｍＲＮＡ生成物をＱｕｂｉｔによって定量化し、その後－８０℃の溶液中で５μｇアリコートで保存した。

【０１６８】

ｔＲＮＡのインビトロ転写。鋳型（５００～１０００ｎｇ）は、２ｍＭの非天然リボヌクレオシド三リン酸の有る無しでそれに応じて各インビトロ転写反応（Ｔ７　ＲＮＡポリ

メラーゼ、Ｅ０２５１Ｌ、ＮＥＢ）で、続いて精製（Ｄ７０１０、Ｚｙｍｏ）で使用した。ｔＲＮＡ生成物をＱｕｂｉｔによって定量化し、その後リフォールディング（９５℃で１分間、３７℃で１分間、１０℃で２分間）にかけた。全てのｔＲＮＡは、１８００ｎｇアリコートで－８０℃で保存した。

【０１６９】

逆転写。逆転写反応は、各逆転写酵素の製造業者の使用説明書に従って、以下の変更を加えて実行した。特に明記しない限り、全ての逆転写反応で２０μＬの反応につき１μｇのｍＲＮＡまたは２０ｎｇのｔＲＮＡ、０．５ｍＭのｄＮＴＰおよび０．２ｍＭのｄＮａＭＴＰまたはｄＴＰＴ３ＴＰを使用した。ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＩＩ（１８０８００４４、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）の場合、反応を５５℃で４５分間インキュベートし、７０℃で１５分間不活性化し、その後ＲＮアーゼＨ（Ｍ０２９７Ｓ、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（ＮＥＢ））およびＲＮアーゼＡ（Ｒ１２５３、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）消化が続いた。ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＶ（１８０９００１０、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）の場合、反応を５５℃で２０分間インキュベートし、８０℃で１０分間不活性化し、その後ＲＮアーゼＨ、ＲＮアーゼＡおよびプロテイナーゼＫ（Ｐ８１０７Ｓ、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（ＮＥＢ））消化が続いた。ＡＭＶ逆転写酵素（Ｍ０２７７Ｓ、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（ＮＥＢ））の場合、反応を４２℃で６０分間インキュベートし、８０℃で５分間不活性化し、その後ＲＮアーゼＨおよびＲＮアーゼＡ消化が続いた。消化の後、各反応混合液の１０μＬをＲＮＡ投入色素（Ｂ０３６３Ｓ、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（ＮＥＢ））で変性させ、ｃＤＮＡ検出のために８Ｍ尿素（ＣＡＳ５７－１３－６、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）による１０％変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。反応混合液の他の１０μＬは市販のＲＮＡ精製キット（Ｄ７０１１、Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ；Ｉｒｖｉｎｅ、ＣＡ）を使用して精製し、生成物ｃＤＮＡはＱｕｂｉｔを使用して定量化した。

【０１７０】

一本鎖ＤＮＡ単離。ａｓＤＮＡは、ＩＶＴ反応のために使用したｄｓＤＮＡ鋳型から、ビオチン化５’プライマーによるＰＣＲ増幅を通して調製した。生成物ビオチン化ｄｓＤＮＡ（ｂｉｏ－ｄｓＤＮＡ）は、製造業者の使用説明書によりＤｙｎａｂｅａｄｓ（商標）ＭｙＯｎｅ（商標）ストレプトアビジンＣ１（６５００１、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用した親和性一本鎖単離プロトコールにかけた。簡潔には、ビーズ（２０μＬ）をＷＢバッファーで３回前洗浄し、次に精製されたｂｉｏ－ｄｓＤＮＡ（２０μＬ、約５０ｎｇ／μＬ）と混合した。軽く振盪させながら混合液を３７℃で２時間インキュベートした。ビーズは、磁気スタンドを使用してバッファーから分離した。次にビーズをＷＢバッファーで３回洗浄し、非ビオチン化鎖を０．１ＭのＮａＯＨ １００μＬを使用して溶出させた（洗浄時間＜３０秒）。溶出した非ビオチン化ａｓＤＮＡは、カラム精製を使用して次に精製した。

【０１７１】

ＳＳＯインビボ翻訳。５０ｍＭリン酸カリウム（ＣＡＳ７７７８－７７－０、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）、５μｇ／ｍＬクロラムフェニコール（ＣＡＳ５６－７５－７、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）および１００μｇ／ｍＬカルベニシリン（Ｃ１６１３、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）を追加した２×Ｙｔ（Ｙ２３７７、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）（本明細書で、以後このセクションでは「培地」と呼ぶ）中のＹＺ３＋ｐＧＥＸ－ＭｂＰｙｌＲＳ ＴｅｔＲ細胞の２ｍＬの一晩培養物を、同じ培地で０．０３のＯＤ６００に希釈し、０．３～０．４のＯＤ６００へ増殖させた。培養物は振盪させながら氷水浴中で５分間急冷却させ、次に１０分間の３，２００×ｇでペレットにした。細胞は、次に前冷却した加圧滅菌Ｍｉｌｌｉ－Ｑ Ｈ２Ｏの１培養容量で２回洗浄した。細胞は次に５０～６０のＯＤ６００まで、追加の冷却H_2Oに再懸濁させた。各試験試料のために、生じたエレクトロコンピテント細胞の５０μＬを、ｓｆＧＦＰおよびｔＲＮＡ^{Pyl}遺伝子の中に埋め込まれたＵＢＰを含有する０．５ｎｇのＧｏｌｄｅｎ Ｇａｔｅアセンブル化プラスミドと合わせ、次に、前冷却エレクトロポレーションキュベット（０．２ｃｍギャッ

プ）に移した。細菌のための製造業者の使用説明書により細胞をエレクトロポレーションし（ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＩＩ；Ｂｉｏ－Ｒａｄ）（２５ｋＶ、２．５μＦおよび２００Ω抵抗）、次に予熱した培地の９５０μＬに直ちに希釈した。この希釈溶液の１０μＬを次に予熱した培地で５０μＬの最終容量まで希釈し、１５０ｍＭのｄＮａＭＴＰおよび１０μＭのｄＴＰＴ３ＴＰを追加した。形質転換は、３７℃で１時間回復させた。回復培養物は、５０μｇ／ｍＬゼオシン（Ｒ２５００１、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、１５０μＭ　ｄＮａＭＴＰ、１０μＭ　ｄＴＰＴ３ＴＰおよび２％ｗ／ｖ寒天を追加した固体培地の上に平板培養し、その後３７℃で一晩増殖させた。

【０１７２】

単一のコロニーを単離して、５０μｇ／ｍＬゼオシンを追加した３００μＬの液体培地（本明細書で、以後このセクションで「増殖培地」と呼ぶ）を接種するために使用し、１５０μＭのｄＮａＭＴＰおよび１０μＭのｄＴＰＴ３ＴＰを提供し、次に、５９０／２０ｎｍフィルターによるＥｎｖｉｓｉｏｎ　２１０３　Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して、ＯＤ６００を通して細胞増殖のためにモニタリングした。細胞を約０．７のＯＤ６００で収集し、次にアリコート（１００μＬ）をミニプレップにかけた。単離したプラスミドは、ＵＢＰ保持を決定するためにビオチンシフトアッセイにかけた。ＵＢＰを保持したことが示されたコロニーは、１５０μＭ　ｄＮａＭＴＰおよび１０μＭ　ｄＴＰＴ３ＴＰを追加した３００μＬの増殖培地中で約０．１～０．２のＯＤ６００に戻し希釈した。特に明記しない限り、０．４～０．６のＯＤ６００で、培養に２５０μＭ　ＮａＭＴＰおよび３０μＭ　ＴＰＴ３ＴＰ、ならびに１０ｍＭのｎｃＡＡ　Ｎ６－（２－アジドエトキシ）－カルボニル－Ｌ－リシン（ＡｚＫ）を追加した。培養は次に追加の２０分間増殖させ、その後ＩＰＴＧ（ＣＡＳ３６７－９３－１、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を１ｍＭの濃度まで加え、１時間増殖させてＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ、ｔＲＮＡ^{Ｐｙｌ}およびＰｙｌＲＳの転写を誘導した。細胞は、増殖（ＯＤ６００）およびＧＦＰ蛍光のために３０分ごとにモニタリングした。次に、１００ｎｇ／ｍＬのアンヒドロテトラサイクリン（ＣＡＳ　１３８０３－６５－１、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）で、ｓｆＧＦＰの発現を誘導した。追加の３時間の増殖の後、細胞培養物を収集して氷上で冷却した。ＵＢＰ保持（ビオチンシフトアッセイ）を決定するために、プラスミド単離のために培養物の５０μＬを使用し；培養物の残りの２５０μＬは、Ｔ－ＲＴ保持を測定するために全ＲＮＡ抽出のために使用した。

【０１７３】

全ＲＮＡ抽出。インビボ翻訳実験の後、大腸菌培養を収集し、１０，０００ｒｐｍで３０秒間遠心分離にかけ（Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅ　５４１５Ｃ、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）、上清を廃棄した。１ｍＬのＴＲＩｚｏｌ（１５５９６０２６、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を次に各試料に加えた。混合液をホモジナイズし、室温で５分間インキュベートした。２００μＬのクロロホルム（ＣＡＳ６７－６６－３、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を各試料に加え、混合液をホモジナイゼーションのために撹拌し、その後相分離を可能にするために３分間の室温でのインキュベーションが続いた。次に、４℃で試料を１５分間１２，０００ｒｐｍで遠心分離し、無色水性相を新規の管に収集し、５００μＬのイソプロピルアルコール（ＣＡＳ６７－６３－０、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を水性相に加えた。１０分間の室温でのインキュベーションの後、４℃で試料を１０分間７，０００ｒｐｍで遠心分離し、上清を廃棄した。試料は、次に２´１ｍＬの７５％エタノールで洗浄した。室温で３０分間試料を乾燥させるために管のふたを空いたままにし、生じた全ＲＮＡを２０μＬの無ＲＮアーゼ水で溶解した。全ＲＮＡの濃度は、Ｑｕｂｉｔを使用して測定した。

【０１７４】

実施例１。連続したインビトロ転写（ＩＶＴ）および逆転写

ＵＢＰを含有するＲＮＡを生産的に認識する逆転写酵素の能力を探るために、連続したインビトロ転写（ＩＶＴ）および逆転写を、市販されている逆転写酵素：ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＶおよびＡＭＶ逆転写酵素で実行した。

コドン１５１の第２のヌクレオチドをコードする位置に置かれるｄＮａＭまたはｄＴＰＴ３を有するＥＧＦＰ遺伝子を含有するＤＮＡをＰＣＲ増幅させ、対応する非天然リボヌクレオシド三リン酸を追加したがそれ以外は製造業者の使用説明書通りであったＩＶＴ反応のための鋳型として使用した。ＲＮＡを精製し、その後非天然デオキシリボヌクレオシド三リン酸の有る無しで実行したＲＴ反応のための鋳型として使用した（さらに、プライマーは分析を促進するために３’－伸長を装置した、以下の段落を参照する）。１時間後、完全長のおよびトランケーションされた生成物の存在を定性的に調査するために、ＲＴ反応の半分をＰＡＧＥゲル電気泳動にかけ、残りの半分は非天然ヌクレオチドの保持の以降の特徴付けのために精製した。

【０１７５】

ＡＭＶ逆転写酵素では、ＮａＭまたはＴＰＴ３を含有するＲＮＡ鋳型は、ｄＴＰＴ３ＴＰまたはｄＮａＭＴＰの非存在下ではトランケーションされたｃＤＮＡ生成物だけを主に与え、ｄＴＰＴ３ＴＰまたはｄＮａＭＴＰが提供されたときは完全長生成物だけを主に与えた（図２）。対照的に、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＩＩまたはＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＶでは、非天然三リン酸が加えられたか否かを問わず、完全長ｃＤＮＡ生成物がいずれの鋳型でも観察された（図２）。基本的にＭａｌｙｓｈｅｖら、Ａ Ｓｅｍｉ－Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｏｒｇａｎｉｓｍ ｗｉｔｈ ａｎ Ｅｘｐａｎｄｅｄ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ａｌｐｈａｂｅｔ。Ｎａｔｕｒｅ ２０１４、５０９、３８５～３８８頁に記載されているように実行されたビオチンシフトアッセイを使用して、ＲＴ生成物中の非天然ヌクレオチドの存在を検出した。精製されたｃＤＮＡは、各天然ｄＮＴＰならびにｄＭＭＯ２ｂｉｏＴＰ（ｄＮａＭＴＰのビオチン化類似体）およびｄ５ＳＩＣＳＴＰ（複製の間にｄＴＰＴ３ＴＰ自体より良好にｄＭＭＯ２ｂｉｏと対になるｄＴＰＴ３ＴＰの類似体）の存在下でＰＣＲによって増幅させた。ＲＴプライマーによって装置した配列へアニーリングする３’－プライマーの使用（上を参照する）は、元のＩＶＴ反応からの残りの任意のＤＮＡ鋳型の増幅を阻止した（図３）。ＰＣＲ生成物は、次にストレプトアビジンとインキュベートし、ＰＡＧＥ電気泳動にかけ、ここでシフトしたバンドのシフトしていないバンドに対する生じた比は、非天然ヌクレオチドを含有するｃＤＮＡのパーセンテージを示す。予想されたように、非天然三リン酸がＲＴ反応から制止されたとき、シフトした生成物は観察されなかった。対照的に、相補的非天然三リン酸がＲＴ反応に加えられたとき、実質的なシフトが観察され、全ての３つの逆転写酵素で、ｃＤＮＡ生成物の有意な量が非天然ヌクレオチドを含有したことを示した（図２）。

【０１７６】

実施例２。ｔＲＮＡ鋳型濃度の影響の試験

アンチコドンの第２のヌクレオチドに対応する位置にｄＮａＭまたはｄＴＰＴ３を含有する合成オリゴヌクレオチドからのＰＣＲ生成物のＩＶＴによって生成されるｔＲＮＡ鋳型を使用して、非天然核酸塩基の逆転写の効率に及ぼすｔＲＮＡ鋳型濃度の影響を試験した。ｔＲＮＡの最も高い濃度（２５ｎｇ／μＬ）で、それらの対応する非天然デオキシリボ三リン酸の存在下におけるＮａｍまたはＴＰＴ３鋳型の逆転写は、それぞれ８８％および４４％の完全長生成物をもたらした。興味深いことに、より低いｔＲＮＡ鋳型濃度で、完全長生成物のパーセンテージは増加した。０．５μｇ／ｍＬの鋳型では、逆転写はＮａｍまたはＴＰＴ３鋳型でそれぞれ９７％および９２％の完全長生成物をもたらした（図３、表１）。

【０１７７】

【表４】

表 1. NaMまたはTPT3を含有するRNAを使用したSuperScript III RT 反応完全長cDNA生成物比のRNA濃度依存性のための生データ。

RNA (ng/反応)	RNA含有NaM 完全長生成物比			TPT3含有RNA 完全長生成物比		
	#1	#2	#3	#1	#2	#3
500	0.8789	0.9028	0.8818	0.4423	0.5734	0.5148
250	0.9009	0.9155	0.9186	0.5226	0.5589	0.6222
100	0.9247	0.9477	0.9489	0.7157	0.6153	0.7373
50	0.9567	0.9688	0.9747	0.8543	0.8374	0.8786
25	0.9651	0.9759	0.9844	0.9061	0.9217	0.8854
10	0.9731	0.9757	0.9918	0.9167	0.9401	0.9065

【０１７８】

実施例３。連続インビトロ転写（ＩＶＴ）および逆転写の後のＵＢＰ保持のためのアッセイ

連続したＴ７　ＲＮＡポリメラーゼによるインビトロ転写（ＩＶＴ）ならびに市販の逆転写酵素：ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＶおよびＡＭＶ逆転写酵素による逆転写（ＲＴ）の後のＵＢＰ保持を定量的に測定するためにアッセイを開発した。ＩＶＴおよびＲＴの間だけ起こる非天然ヌクレオチド喪失に焦点を当てるために（すなわち、ＩＶＴ鋳型のＰＣＲ調製の間に起こるいかなる喪失も排除するために）、アッセイはアンチセンスＤＮＡ鋳型（Ｒ（ａｓＤＮＡ）の非天然ヌクレオチド含有量も分析した（図４）。複合的Ｔ－ＲＴ忠実度を以下の通りに計算し：

【数１】

$$\text{T-RT 保持} = \alpha \frac{R(cDNA)}{R(asDNA)},$$

ここで定数α＝１．０６は、ｂｉｏ－ｄｓＤＮＡを調製するために必要とした追加のＰＣＲ工程におけるＵＢＰ喪失の寄与を説明するために含まれる。Ｔ－ＲＴ保持は転写および逆転写の間の非天然ヌクレオチド喪失に対応するので、それは、Ｔ－ＲＴ反応のいずれの工程の間の非天然ヌクレオチド保持の下限を提供する。

【０１７９】

Ｔ－ＲＴ忠実度アッセイは、ＡＸＣ、ＡＹＣ、ＧＸＣ、ＧＹＣ、ＧＸＴまたはＧＹＴ（Ｘ＝ＮａＭおよびＹ＝ＴＰＴ３）を含む非天然第１５１コドンを含有するＥＧＦＰ　ｍＲＮＡによるＩＶＴ転写忠実度の下限を決定するために先ず適用し、その各々は哺乳動物細胞で非天然タンパク質を発現させるために使用されている。注目すべきことに、ＮａＭまたはＴＰＴ３を有する全ての配列は、９０％～１００％の複合的Ｔ－ＲＴ保持を有する主生成物として完全長ｃＤＮＡを生成した（図５Ａ、図６）。少なくともこの配列コンテキストで、非天然塩基対は理にかなった忠実度によりインビトロで転写された（および逆転写された）。

【０１８０】

次に、アンチコドンＧＹＴ、ＧＸＴ、ＧＹＣ、ＧＸＣ、ＣＹＡおよびＣＸＡによるＭ．マゼイ（Ｍ．ｍａｚｅｉ）ｔＲＮＡのＴ－ＲＴを探った。それがＮａＭまたはＴＰＴ３を含有するか否かにかかわらず、各ｔＲＮＡ遺伝子は完全長ｃＤＮＡを主生成物として、および９０％～１００％の非天然ヌクレオチド保持で再び与えた（図５Ｂ、図６）。ｔＲＮ

Ａの増加した構造は、非天然アンチコドンによるそのインビトロ転写および逆転写を見かけ上阻止しなかった。

【０１８１】

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、ｎｃＡＡＡｚＫを含有するＥＧＦＰタンパク質を生成するためにＥＧＦＰ（ＧＸＣ）ｍＲＮＡおよびＭ．マゼイ（Ｍ．ｍａｚｅｉ）ｔＲＮＡ（ＧＹＣ）を使用することができると、前に報告された。（Ｚｈｏｕら、Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｔｏｗａｒｄ Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｓｅｍｉｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｏｒｇａｎｉｓｍｓ：Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｕｎｎａｔｕｒａｌ Ｃｏｄｏｎｓ。Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１９、１４１、２０１６６～２０１７０頁。）それらの以前の実験では、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞にＡｚＫを提供し、非天然コドンおよびアンチコドンをそれぞれ含有するｍＲＮＡおよびｔＲＮＡで、ならびにｍａｚｅｉ ｔＲＮＡにＡｚＫを課すキメラＰｙｌＲＳをコードするＤＮＡプラスミドでトランスフェクトした。ｍＲＮＡを調製するために使用したＤＮＡ鋳型の８０％は非天然ヌクレオチドを含有し、インビボで発現されたタンパク質の７０％はＡｚＫを含有した。ＥＧＦＰ（ＧＸＣ）遺伝子の最小転写忠実度の上の分析で、真核生物のリボソームの翻訳忠実度は以下の通りに推定される：

【数２】

$$F(\text{翻訳}) = \frac{F(\text{タンパク質シフト})}{F(\text{複製}) \times F(\text{転写})} = 91\%.$$

【０１８２】

ＡＸＡ、ＡＸＴ、ＴＸＡおよびＴＸＴを含むいくつかの非天然コドンは、ＤＮＡ複製の間に保持された大腸菌ＳＳＯでも以前に同定されたが、ｎｃＡＡではタンパク質を非効率的に生成するだけだった。（Ｆｉｓｃｈｅｒら、Ｎｅｗ Ｃｏｄｏｎｓ ｆｏｒ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｕｎｎａｔｕｒａｌ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｉｎ ａ Ｓｅｍｉｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｏｒｇａｎｉｓｍ。Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２０２０、１６、５７０～５７６頁。）これは、それらがＳＳＯでＴ７ＲＮＡＰによって良好に転写されないこと、および／またはそれらがリボソームで良好に解読されないことを示唆する。各コドンを個々に含有するＤＮＡは、開発されたインビトロＴ－ＲＴアッセイにかけた。各鋳型は、完全長ｃＤＮＡを概ね９０％の非天然ヌクレオチド保持により主生成物として生成することが再び示された（図５Ａ）。このデータは、転写が比較的効率的であることを実証し、これらのコドンは翻訳に効率的に関与することができないことを示す。

【０１８３】

実施例４。大腸菌ＳＳＯにおけるインビボ転写の特徴付け

大腸菌ＳＳＯから単離されたＲＮＡを特徴付けるために、実施例３で開発されたＴ－ＲＴ保持アッセイを使用した。ＭＬ２細胞は、第１５１コドンＡＸＣ、ＧＸＣまたはＧＸＴを含有するｓｆＧＦＰ遺伝子をコードするｐＳｙｎプラスミドで、および対応するアンチコドンＧＹＴ、ＧＹＣまたはＡＹＣをそれぞれ含有するＭ．マゼイ（Ｍ．ｍａｚｅｉ）ｔＲＮＡ遺伝子で形質転換した。各場合で、ＳＳＯは高い忠実度で非天然タンパク質を生成することが前に示された（Ｆｉｓｃｈｅｒ、Ｅ．Ｃ．ら、Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２０２０、１６、５７０～５７６頁）。ここで、ａｓＤＮＡならびに各ｍＲＮＡおよびｔＲＮＡの中での非天然ヌクレオチドの保持は、のように分析した。データは、Ｎａｍコドンの転写は事実上非天然ヌクレオチドの喪失なしでＳＳＯ中で進行したことを明らかにした。ｔＲＮＡの場合、ＴＰＴ３アンチコドンの保持は８５％～１００％の範囲内だった（図７Ａ～Ｂ、表２）。

【０１８４】

【表５】

表2. SSOインビボ翻訳実験から抽出したmRNAおよびtRNAのT-RT保持および標準偏差の生データ。($n=3$)。

	T-RT保持	標準偏差
Codon AXC	1.06	0.02
Codon AYC	1.04	0.06
Codon GXC	1.07	0.09
Codon GYC	0.88	0.03
Codon GXT	1.07	0.04
Codon GYT	0.96	0.07
Codon GXA	0.80	0.05
Anticodon GYT	0.91	0.04
Anticodon GXT	0.86	0.03
Anticodon GYC	0.93	0.11
Anticodon GXC	1.06	0.03
Anticodon AYC	1.00	0.03
Anticodon AXC	1.09	0.07
Anticodon TYC	0.82	0.03

【０１８５】

データはＮａＭを含有するｍＲＮＡの転写忠実度が高いこと、およびＴＰＴ３を含有するｔＲＮＡの転写忠実度は若干低いが、これはｎｃＡＡ組込みの忠実度の低減をもたらさないことを示す。

【０１８６】

上で試験したコドンと対照的に、大腸菌ＳＳＯは、ＴＰＴ３コドンＡＹＣ、ＧＹＣまたはＧＹＴを使用してｓｆＧＦＰタンパク質を効率的に生成することができないことが前に示された（再びコドン１５１の、および対応する非天然アンチコドンを含有するＭ．マゼイ（Ｍ．ｍａｚｅｉ）ｔＲＮＡによる）（Ｆｉｓｃｈｅｒ、Ｅ．Ｃ．ら、Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２０２０、１６、５７０～５７６頁）。ここで、対応するｍＲＮＡおよびｔＲＮＡのＳＳＯ転写を試験した（図７Ａ～Ｂ、表２）。データは、より機能的でないコドン／アンチコドン対の各々を含有するｍＲＮＡおよびｔＲＮＡが、高いレベルのｎｃＡＡ組込みを媒介した前に分析した対から区別できない効率および忠実度で生成されることを明らかにした。これは、ＳＳＯ中のＡＹＣ、ＧＹＣまたはＧＹＴコドンの劣った性能が、大腸菌リボソームによる低減した翻訳効率からもたらされることを示す。すなわち、大腸菌ＳＳＯでは、ＵＢＰ配列コンテキストに対して翻訳は転写より一般的に感受性である。

【０１８７】

良好に翻訳されないＴＰＴ３コドンに加えて、１つのＮａＭコドンＧＸＡは、ＤＮＡ中での高い保持にもかかわらず、若干損なわれたｎｃＡＡ組込み忠実度（５０～６０％）でｓｆＧＦＰを生成した。このコドン／アンチコドン対を持っているＳＳＯで生成されるＲＮＡを試験したとき、ｔＲＮＡおよび特にｍＲＮＡは、両方の場合で若干より低い忠実度、概ね８０％で生成されることが見出された（図７Ａ～Ｂ、表２）。天然ｍＲＮＡの非線形寄与の可能性（より効率的な翻訳のために）を考慮すると、このデータは、他のコドンと対照的に、ＳＳＯでのＧＸＡコドンの低減したｎｃＡＡ組込み忠実度への有意な寄与が転写の低減した忠実度から生じることを示唆する。

【０１８８】

実施例５。ＳＳＯでの転写に及ぼす非天然リボヌクレオチド三リン酸濃度の影響

非天然リボヌクレオチド三リン酸濃度への転写忠実度の依存を探るために、上記のＴ－ＲＴ忠実度アッセイをさらに使用した。ｓｆＧＦＰ（ＧＸＴ）およびＭ．マゼイ（Ｍ．ｍａｚｅｉ）ｔＲＮＡ（ＡＹＣ）を持っているＳＳＯを、ＮａＭＴＰまたはＴＰＴ３ＴＰの

様々な量を提供したこと以外、上記のように増殖させた。ＴＰＴ３ＴＰの濃度を２５０ｍＭで一定に保ち、ＮａＭＴＰの濃度を減少させたとき、ｍＲＮＡでのＮａＭの保持は、濃度が５０μＭ未満へ低下するまで高いままだった（図８Ａ～Ｂ、表３）。ＮａＭＴＰの濃度を２５０ｍＭで一定に保ち、ＴＰＴ３ＴＰの濃度を変化させたとき、ｔＲＮＡでのＴＰＴ３の保持は、試験した最低濃度（１０μＭ）の時でさえ高いままであった（図８Ａ～Ｂ、表３）。したがって、ＳＳＯはＮａＭＴＰより低いＴＰＴ３ＴＰ濃度を許容することができる。

【０１８９】

【表６】

表 3. SSO インビボ翻訳実験における NaMTP または TPT3TP 濃度への T-RT 保持の依存性の生データ。($n=3$)。

	NaMTP 濃度 (mM)	T-RT 保持	標準偏差
mRNA	250	0.93	0.07
	125	0.94	0.03
	50	0.88	0.07
	25	0.81	0.11
	12.5	0.70	0.10
	TPT3TP 濃度 (mM)	T-RT 保持	標準偏差
tRNA	250	0.94	0.05
	125	0.95	0.09
	50	0.98	0.04
	25	0.97	0.03
	12.5	0.93	0.06

【０１９０】

実施例７。転写および逆転写を使用してＲＮＡアプタマー選択の拡張を可能にする

目的のタンパク質を標的にするＲＮＡアプタマーを開発するために、ＩＶＴによってＲＮＡのライブラリーをＤＮＡから先ず作成し、所望のＲＮＡでライブラリーを富化する選択にかけ、ＰＣＲ増幅のためにＲＴによってＤＮＡに戻し変換し、次に分析するかＩＶＴによってＲＮＡに戻し変換し、追加の回の選択にかけた。したがって、非天然ヌクレオチドを含むＲＮＡアプタマーを開発するために、非天然ヌクレオチドを含有するＤＮＡを、非天然ヌクレオチドを含むＲＮＡに効率的に逆転写しなければならない。この実施例では、非天然ヌクレオチドを有する一連の関連したＤＮＡオリゴヌクレオチドを、対応する非天然ヌクレオチドを有するＲＮＡに変換し、それを、次に阻害能力についての選択にかける。オリゴヌクレオチドは、長さが約１００塩基であってよい。初期のＤＮＡオリゴヌクレオチド中の約４０ヌクレオチドの領域をランダム化し、単一のｄＮａＭを、バーコード配列（非天然ヌクレオチド位置を同定するために）およびプライマー結合配列に連なる領域の複数（例えば、３つ）の異なる位置に組み込む。複数（例えば、３つ）の関連したＤＮＡライブラリーが、このように生成される。複数のランダム化されたオリゴヌクレオチドライブラリーの等モル混合物を、ｄＴＰＴ３ＴＰおよびｄＮａＭＴＰを含む反応の中でＰＣＲ増幅させる。ｄＴＰＴ３ヌクレオチドの合成を初回刺激するプライマーは、ジスルフィドまたは他の切断可能部分を通してその５’末端に結合しているビオチンタグを含み、それらは市販されていて、一般的に使用される。増幅の後、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズに結合させ、ビーズをバッファー洗浄工程にかけ、次に０．１ｍＭ　ＮａＯＨで洗浄してｄＮａＭ含有ｓｓＤＮＡライブラリーを溶出させることによってｄｓＤＮＡを精製する。ｄＴＰＴ３含有ｓｓＤＮＡライブラリーは、３０ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）（または、任意の他の好適な試薬）を使用した還元的切断によってビーズから放出させることができる。いずれのｓｓＤＮＡライブラリーも、適当な非天然リボ三リン酸（ＴＰＴ３ＴＰまたはＮａＭＴＰ）を追加したＴ７ＲＮＡポリメラーゼ媒介ＩＶＴ反応のための鋳型として次に使用することができる。ＤＮＡを核溶解的に分解し、ライブラリーを精製する（例えば、Ｚｙｍｏ　ｓｓＤＮＡ／ＲＮ

Ａ精製キットなどの遠心カラムによって）。

【０１９１】

ライブラリーを折りたたむ。生じた折りたたまれたライブラリーは、目的のタンパク質への結合のための選択に次にかける。ライブラリーは目的の標的タンパク質とインキュベートし、例えば高タンパク吸着ＥＬＩＳＡプレートの上に固定化し、洗浄し、次にホルムアミドで３回洗浄することによって溶出させる。目的のタンパク質への結合のための選択圧は、洗浄バッファー中の塩濃度を上昇させるかまたは酵母ｔＲＮＡを結合バッファー中の結合競合者として追加する以降の回の選択で徐々に増加させることを含む、様々な方法を通して増加させる。各回の選択の後、目的のタンパク質に結合するＲＮＡを単離し、ＲＮＡオリゴヌクレオチドを溶出させる。本明細書に記載される方法によって、ＲＮＡオリゴヌクレオチドをｃＤＮＡに逆転写させる。ｃＤＮＡは、ｄＴＰＴ３ＴＰおよびｄＮａＭＴＰで、ならびに同じビオチン化プライマーでＰＣＲ増幅させ、所望により追加の回の選択にかけ、それによってアプタマーの富化セットを提供する。

【０１９２】

上記の工程の後の数回の選択の後、富化された個々のＲＮＡアプタマーをｃＤＮＡに逆転写させ、ＰＣＲ増幅し、配列決定をする（例えば、非天然ヌクレオチドをシークエンシングのために天然ヌクレオチドで置き換え、非天然ヌクレオチド位置の特定のためにバーコード配列に頼る）。富化されたＲＮＡオリゴヌクレオチドの間の配列相同性を試験し、さらなる特徴付けのために配列のサブセットを選択する。選択されたＲＮＡアプタマーを次に合成し、折りたたむ。標的タンパク質に結合する（または、標的タンパク質が酵素である場合はその活性を阻害する）その能力について、各アプタマーを次に個々に分析する。アプタマーの阻害力価は、K_dまたはK_i値として定量化する。場合により、最も有望なＲＮＡオリゴヌクレオチドをｃＤＮＡに逆転写させ、誤りがちのＰＣＲを通してその配列をさらにランダム化して、さらなる回の選択のために追加のライブラリーを作成することができる。

【０１９３】

本開示の好ましい実施形態が本明細書で示され、記載されたが、そのような実施形態が例としてだけ提供されていることは当業者に明らかになる。本開示を逸脱しない範囲で、当業者は多くの変異形、変更および代替を思いつくだろう。本明細書に記載される本開示の実施形態への様々な代替物を本開示の実施で採用することができることを理解すべきである。以下の特許請求の範囲は本開示の範囲を規定するものであり、これらの請求項の範囲内の方法および構造ならびにそれらの均等物はそれらに含まれるものである。

【図面】

【図１】

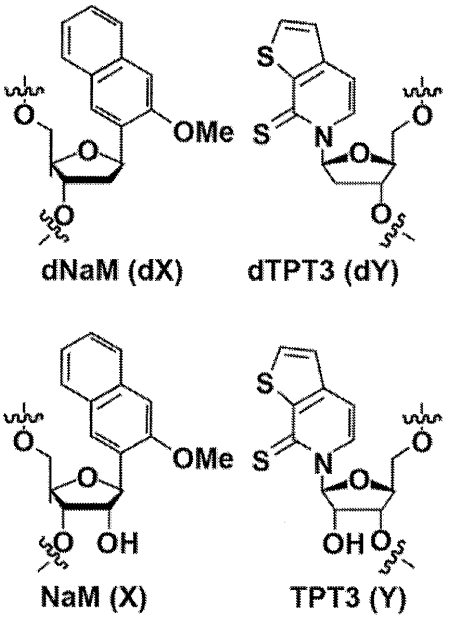


Fig. 1

【図２】

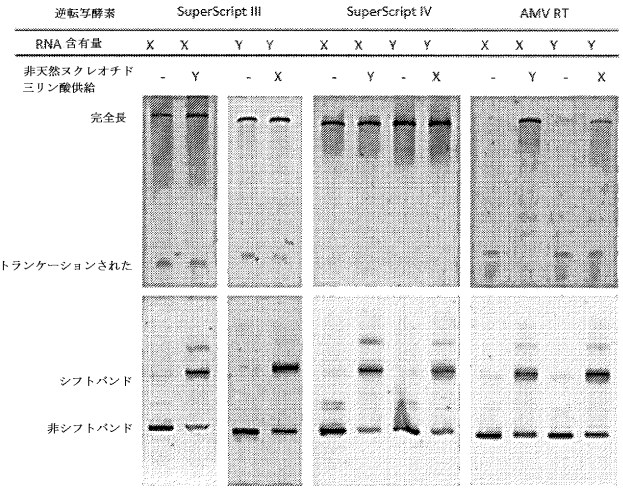


Fig. 2

【図３】

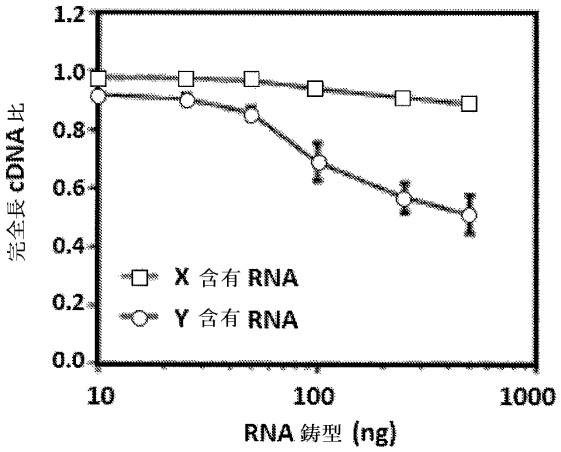


Fig. 3

【図４】

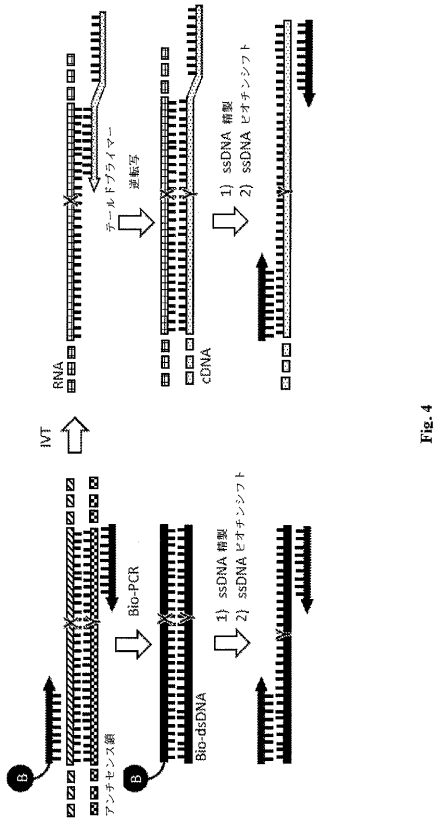


Fig. 4

【図５】

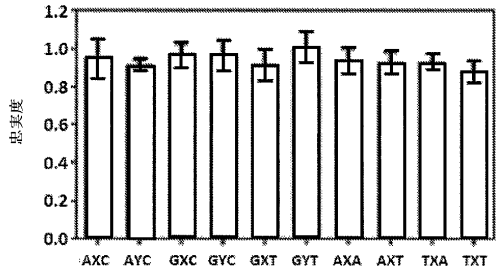


Fig. 5A

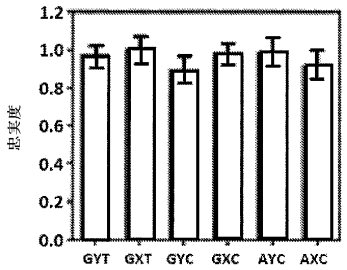


Fig. 5B

【図６】

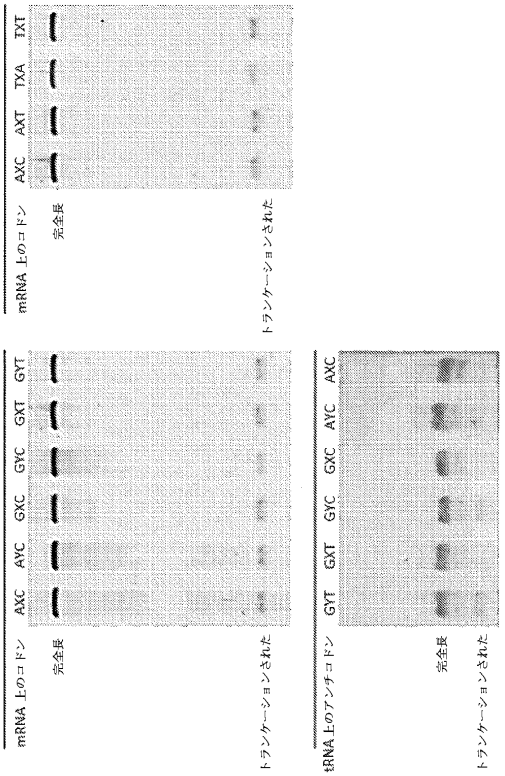


Fig. 6

【図７】

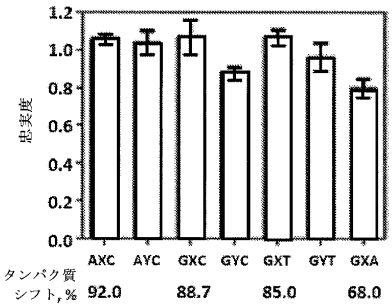


Fig. 7A

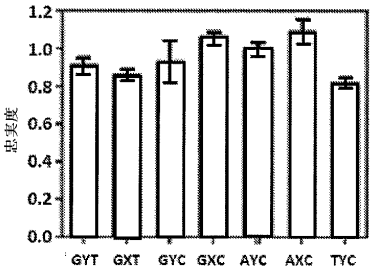


Fig. 7B

【図８】

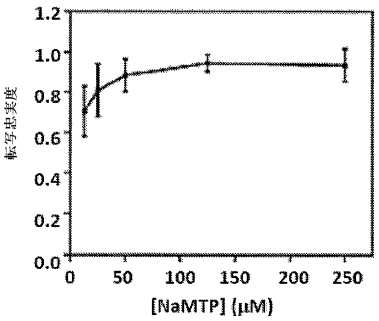


Fig. 8A

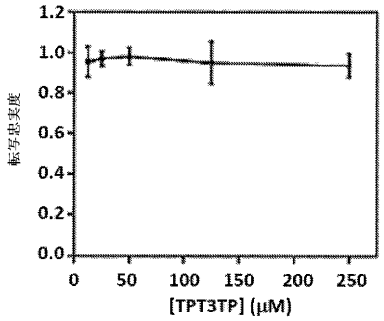


Fig. 8B

【配列表】
20235476150000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/056334

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/056334

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.: 4, 11-33, 38-59
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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/056334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 9/12; C12N 15/10; C12N 15/115 (2021.01)
CPC - C12N 9/1276; C12N 15/1048; C12N 15/115; C12N 2310/16; C12N 2310/30; C12N 2310/35 (2021.08)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
see Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
see Search History document

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2011/0098461 A1 (YING et al) 28 April 2011 (28.04.2011) entire document	1-3 — 9
X — Y	US 2017/0101675 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK et al) 13 April 2017 (13.04.2017) entire document	5-7 — 8-10
X	US 2016/0069889 A1 (CARIS SCIENCE INC.) 10 March 2016 (10.03.2016) entire document	34-37
Y	US 2017/0029791 A1 (ROCHE MOLECULAR SYSTEMS INC.) 02 February 2017 (02.02.2017) entire document	8
Y	US 2005/0187180 A1 (LOEB et al) 25 August 2005 (25.08.2005) entire document	10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 December 2021	JAN 21 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Harry Kim Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

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,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,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,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　竹林 則幸

(74)代理人　100216105

弁理士　守安 智

(72)発明者　フロイド・イー・ロムズバーグ

アメリカ合衆国カリフォルニア州９２０３７．ラ・ホーヤ．スイート１９０．ノース・トーリー・パインズ・ロード１１０９９

(72)発明者　シユ・ドン

アメリカ合衆国カリフォルニア州９２０３７．ラ・ホーヤ．ノース・トーリー・パインズ・ロード１０５５０

(72)発明者　アン・シャオシュウ・シュウ

アメリカ合衆国カリフォルニア州９２０３７．ラ・ホーヤ．ノース・トーリー・パインズ・ロード１０５５０

Ｆターム（参考）　4B063　QA20 QQ52 QR08 QR32 QS16 QS25

4C057　CC01 DD03 MM01 MM09