

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-515216

(P2016-515216A)

(43) 公表日 平成28年5月26日 (2016.5.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 2 4
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 7 5	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 5 S	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 2 5 U	
	G O 1 N 33/543 5 2 5 E	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-502491 (P2016-502491)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014.3.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年8月12日 (2015.8.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/027602
 (87) 国際公開番号 W02014/152673
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014.9.25)
 (31) 優先権主張番号 61/784, 253
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013.3.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507159304
 シャイアー ヒューマン ジェネティック
 セラピーズ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ○
 2 4 2 1 レキシントン シャイアー ウ
 ェイ 3 0 0
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メッセンジャーRNAのキャップ効率の定量的評価

(57) 【要約】

本発明は、とりわけ、mRNA、特にインビトロで合成されたmRNAのキャップ形成効率を定量化する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明に従う方法は、キャップされた及びキャップのないmRNAを含有するmRNAサンプルを提供することと、キャップ特異的結合物質とキャップされたmRNAとの間の複合体の形成を可能にする条件下で、キャップ特異的結合物質を提供することと、対照と比較した複合体の量を定量的に判定し、それによって、mRNAキャップ形成効率を定量化することと、を含む。

【選択図】 図1

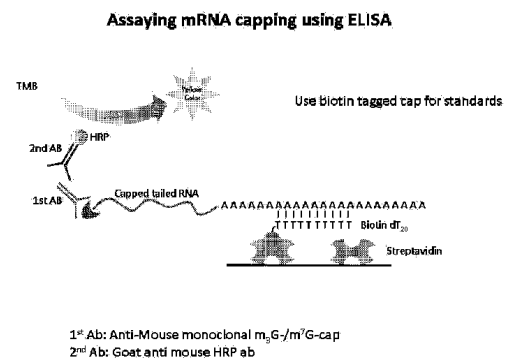


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

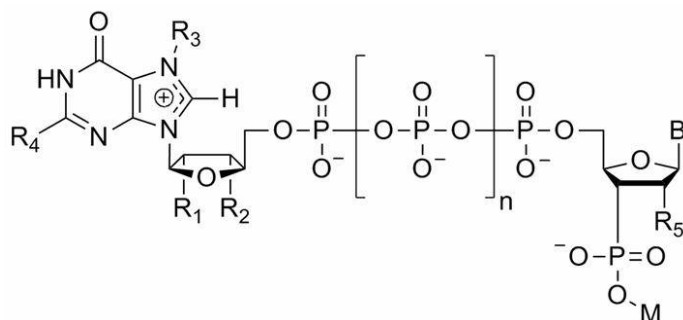
mRNA キャップ形成効率の定量化方法であって、
 キャップされた mRNA を含む mRNA サンプルを提供することと、
 キャップ特異的結合物質と前記キャップされた mRNA との間の複合体の形成を可能にする条件下で、前記キャップ特異的結合物質を提供することと、
 対照と比較した前記複合体の量を定量的に判定し、それによって、mRNA キャップ形成効率を定量化することと、を含む方法。

【請求項 2】

前記キャップが、式 I の構造を有し、

10

【化 9】



20

式中、

B は、核酸塩基であり、

R₁ は、ハロゲン、OH、及び OCH₃ から選択され、

R₂ は、H、OH、及び OCH₃ から選択され、

R₃ は、CH₃、CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₃、または欠失し、

R₄ は、NH₂ であり、

R₅ は、OH、OCH₃、及びハロゲンから選択され、

n は、1、2、または3であり、

M は、前記 mRNA のヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

30

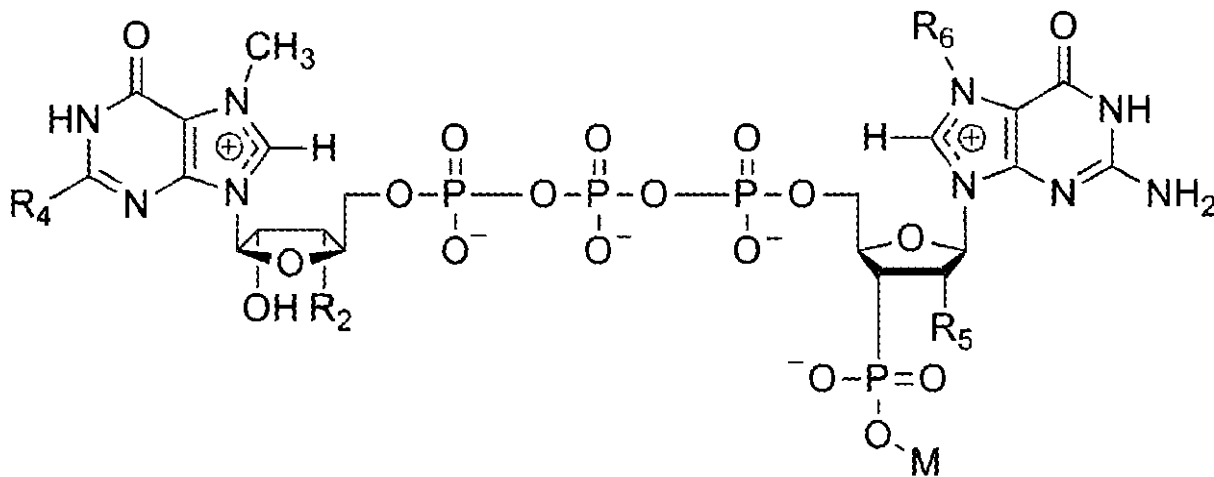
【請求項 3】

前記核酸塩基がグアニンである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記キャップが式 II の構造を持つ m⁷G キャップであり、

【化 10】



40

(II)

式中、

R₂ は、H または CH₃ であり、

50

R₄ は、NH₂ であり、

R₅ は、OH または OCH₃ であり、

R₆ は、H または CH₃ であり、

M は、前記 mRNA のヌクレオチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記キャップ特異的結合物質が、真核生物開始因子 4E (eIF-4E)、核キャップ結合タンパク質亜単位 1、核キャップ結合タンパク質亜単位 2、及び核キャップ結合複合体からなる群から選択されるキャップ特異的結合タンパク質である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記キャップ特異的結合物質が、キャップ特異的抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記キャップ特異的結合物質が、抗 m⁷G 抗体である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 8】

前記複合体の量を定量的に判定する前記ステップが、ELISA アッセイを実施することを含む、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記複合体の量を定量的に判定する前記ステップが、前記複合体と関連する検出可能なシグナルを測定することを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記検出可能なシグナルが、前記キャップ特異的結合物質と直接関連している、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記検出可能なシグナルが、前記キャップ特異的結合物質と結合する二次薬剤を介して、前記キャップ特異的結合物質と間接的に関連している、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記二次薬剤が二次抗体である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記検出可能なシグナルが、蛍光シグナル、比色シグナル、または放射シグナルである、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記蛍光シグナルが、前記キャップ特異的結合物質と直接または間接的に関連する酵素により、酵素基質を発色、化学蛍光 (chemifluorescent)、または化学発光産物へと転換することによって産生される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記酵素基質が、p-ピトロフェニルリン酸二ナトリウム塩 (PNPP)、2,2'-アジノビス [3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ニアンモニウム塩 (ABTS)、o-フェニレンジアミン二塩酸塩 (OPD)、及び 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記酵素が、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記対照が、既定量のキャップされた mRNA を含む mRNA サンプルを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記対照が、既定量の合成されたキャップを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

mRNAキャップ形成効率を定量化することが、前記mRNAサンプル中のキャップされたmRNAの絶対量を定量化することを含む、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

mRNAキャップ形成効率を定量化することが、前記mRNAサンプル中のキャップされたmRNAの割合を定量化することを含む、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記方法が、基質上に前記mRNAを捕捉するステップをさらに含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記mRNAが、前記mRNAのポリA尾部に結合するポリTオリゴによって捕捉される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記mRNAが、ポリA結合タンパク質または抗体によって捕捉される、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

前記基質が、マイクロプレート、磁気ビーズ、粒子、ポリマービーズ、クロマトグラフィー樹脂、濾紙、ニトロセルロース、ジアゾセルロース、ガラス、ラテックス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、プロピレン、ポリエチレン、デキストラン、セファロース、寒天、デンプン、ナイロン、シリカゲル、またはヒドロゲルである、請求項21～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記基質が、アビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされている、請求項21～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記ポリTオリゴまたは前記ポリA結合タンパク質もしくは抗体が、ビオチン化される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記mRNAサンプルが、インビトロで合成される、請求項1～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

mRNAキャップ形成効率を定量化するためのキットであって、
キャップ特異的結合物質と、

前記キャップ特異的結合物質とキャップされたmRNAとの間の複合体を検出するための1つ以上の試薬と、

キャップされたmRNAを定量化するための対照と、を含むキット。

【請求項29】

前記キャップ特異的結合物質が、キャップ特異的抗体である、請求項28に記載のキット。

【請求項30】

前記キャップ特異的抗体が、抗m⁷G抗体である、請求項29に記載のキット。

【請求項31】

前記キットが、RNAを捕捉するための基質をさらに含む、請求項28～30のいずれか1項に記載のキット。

【請求項32】

請求項1～27のいずれか1項に記載の方法に従って、mRNAキャップ形成効率を定量化するステップを含む、mRNAの製造方法。

【請求項33】

前記方法が、mRNAキャップ形成効率を定量化することからの結果に基づいた製造条

10

20

30

40

50

件を調節するステップを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記定量化ステップが、mRNA ロットを解放する前に実行される、請求項 3 2 または 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法に従って製造された mRNA。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

10

本出願は、2013 年 3 月 14 日出願された米国仮特許出願第 61 / 784 , 253 号の優先権を主張し、この開示の全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

メッセンジャー RNA (「mRNA」) 治療は、様々な疾患の処置に対する益々重要な方策となりつつある。効果的な mRNA 治療は、患者への効果的な mRNA の送達及び患者の身体内の mRNA によってコードされたタンパク質の効率的な産生を必要とする。mRNA 送達及びインビボのタンパク質産生を最適化するために、適切なキャップは、典型的には、構築物の 5' 末端で必要とされ、それは、mRNA を分解から保護し、好結果のタンパク質翻訳を促進する。したがって、キャップ形成効率の正確な特性は、治療用途の

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本発明は、mRNA、特に、インビトロで合成された mRNA のキャップ形成効率を正確及び定量的に判定する改善された方法を提供する。上で考察した通り、適切なキャップ形成は、インビボでの好結果のタンパク質産生において重要である。しかしながら、本発明に先立って、ほとんどのキャップアッセイは、定性的であり、それは、mRNA 系治療製品の質及び関連する安全性及びインビボでの使用の有効性を評価するのに十分でない。実際には、本発明に先立って、サンプル中の mRNA の永住的な変化を伴わないキャップ形成効率の定量化を可能にする利用可能な方法はない。下に詳細を記載する通り、本発明は、部分的に、キャップ特異的結合物質（例えば、キャップ特異的抗体）と、ELISA などの単純な技術を使用してキャップされた mRNA との間の複合体の形成及び定量化に基づいている。したがって、本発明は、mRNA キャップ形成効率を評価するための単純で信頼のできる効率的で定量的な方策を提供する。本発明は、mRNA の製造中及び最終治療製品中の活性医薬成分 (API) としての mRNA の特徴付けのための品質管理のために特に有用である。

30

【0004】

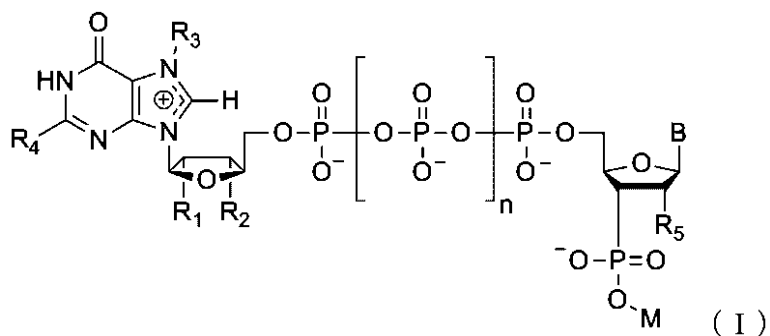
一態様において、本発明は、mRNA キャップ形成効率の定量化方法であって、キャップされた及びキャップのない mRNA を含有する mRNA サンプルを提供するステップを含むことと、キャップ特異的結合物質と、キャップされた mRNA との間の複合体の形成を可能にする条件下で、キャップ特異的結合物質を提供することと、対照と比較した複合体の量を定量的に判定し、それによって、mRNA キャップ形成効率を定量化することと、を含む方法を提供する。

40

【0005】

いくつかの実施形態において、本発明の発明的方法を使用して、式 I の構造を有するキャップを定量化し得、

【化 1】



10

式中、

B は、核酸塩基であり、

R₁ は、ハロゲン、OH、及び OCH₃ から選択され、

R₂ は、H、OH、及び OCH₃ から選択され、

R₃ は、CH₃、CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₃、または欠失し、

R₄ は、NH₂ であり、

R₅ は、OH、OCH₃、及びハロゲンから選択され、

n は、1、2、または3であり、

M は、mRNA のヌクレオチドである。

20

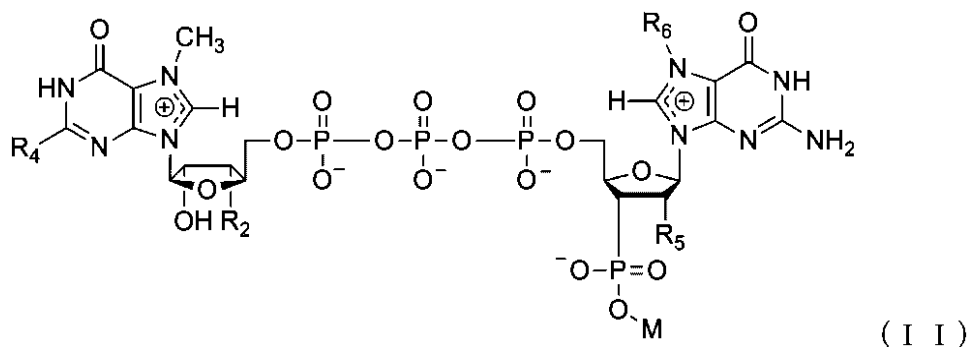
【0006】

いくつかの実施形態において、核酸塩基はグアニンである。

【0007】

いくつかの実施形態において、本発明の発明的方法を使用して、式 I I の構造を持つ m⁷G キャップを定量化し得、

【化 2】



30

式中、

R₂ は、H または CH₃ であり、

R₄ は、NH₂ であり、

R₅ は、OH または OCH₃ であり、

R₆ は、H または CH₃ であり、

M は、mRNA のヌクレオチドである。

40

【0008】

いくつかの実施形態において、好適なキャップ特異的結合物質は、キャップ特異的結合タンパク質である。いくつかの実施形態において、好適なキャップ特異的結合物質は、キャップ特異的抗体である。いくつかの実施形態において、好適なキャップ特異的抗体は、抗 m⁷G 抗体である。

【0009】

いくつかの実施形態において、本発明に従う発明的方法は、ELISA アッセイを実施することによって、キャップ特異的結合物質とキャップされた mRNA との間の複合体の量を定量的に判定するステップを伴う。

【0010】

50

いくつかの実施形態において、複合体と関連する検出可能なシグナルを測定することによって、複合体の量を定量的に判定するステップ。いくつかの実施形態において、検出可能なシグナルは、キャップ特異的結合物質に直接関連している。いくつかの実施形態において、検出可能なシグナルが、キャップ特異的結合物質を結合する二次薬剤を介して、キャップ特異的結合物質と間接的に関連している。いくつかの実施形態において、好適な二次薬剤は、二次抗体である。

【0011】

いくつかの実施形態において、好適な検出可能なシグナルは、蛍光シグナル、比色シグナル、または放射シグナルである。いくつかの実施形態において、好適な蛍光シグナルは、キャップ特異的結合物質と直接または間接的に関連する酵素により、酵素基質を、発色、化学蛍光 (chemifluorescent)、または化学発光産物へと転換することによって、産生される。いくつかの実施形態において、好適な酵素基質は、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム塩 (PNPP)、2, 2'-アジノビス [3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ニアンモニウム塩 (ABTS)、o-フェニレンジアミン二塩酸塩 (OPD)、及び3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB) からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、好適な酵素は、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼである。

10

【0012】

いくつかの実施形態において、定量的な判定に好適な対照は、既定量のキャップされた mRNA を含む mRNA サンプルである。いくつかの実施形態において、定量的な判定に好適な対照は、既定量の合成されたキャップを含む。

20

【0013】

いくつかの実施形態において、mRNA キャップ形成効率を定量化することは、mRNA サンプル中のキャップされた mRNA の絶対量を定量化することを含む。いくつかの実施形態において、mRNA キャップ形成効率を定量化することは、mRNA サンプル中のキャップされた mRNA の割合を定量化することを含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、本発明に従う発明的方法は、基質上に mRNA を捕捉するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、mRNA は、mRNA のポリ A 尾部に結合するポリ T オリゴによって捕捉される。いくつかの実施形態において、mRNA は、ポリ A 結合タンパク質または抗体によって捕捉される。いくつかの実施形態において、好適な基質は、マイクロプレート、磁気ビーズ、粒子、ポリマービーズ、クロマトグラフィー樹脂、濾紙、ニトロセルロース、ジアゾセルロース、ガラス、ラテックス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、プロピレン、ポリエチレン、デキストラン、セファロース、寒天、デンプン、ナイロン、シリカゲル、またはヒドロゲルである。いくつかの実施形態において、基質は、アビジンまたはストレプトアビジンでコーティングされる。いくつかの実施形態において、mRNA を捕捉するために使用されるポリ T オリゴまたはポリ A 結合タンパク質もしくは抗体は、ビオチン化される。

30

【0015】

いくつかの実施形態において、本発明に従う発明的方法を使用して、インビトロで合成された mRNA サンプルの mRNA キャップ形成効率を定量化する。

40

【0016】

とりわけ、本発明は、本明細書に記載される本発明の方法を実施するための組成物及びキットを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、mRNA キャップ形成効率を定量化するためのキットであって、キャップ特異的結合物質と、キャップ特異的結合物質とキャップされた mRNA との間の複合体を検出するための 1 つ以上の試薬と、キャップされた mRNA を定量化するための対照と、を含むキットを提供する。いくつかの実施形態において、好適なキャップ特異的結合物質は、キャップ特異的抗体である。いくつかの実施形態において、好適なキャップ特異的抗体は、抗 m⁷G 抗体である。いくつかの実施形態において、本発明のキットは、mRNA を捕捉するために基質をさらに含有する。

50

【 0 0 1 7 】

本出願で使用される場合、用語「約」及び「およそ」は、等価物として使用される。約 / およそを伴いまたは伴わずに、本出願で使用される任意の数字は、関連技術分野の当業者によって理解される任意の正常な変動を網羅することを意味する。

【 0 0 1 8 】

他の特徴、目的、及び本発明の利点は、以下の詳細な記載において明らかである。しかしながら、本発明の実施形態を示しながら、詳細な記載が、限定ではなく、例示としてのみ、与えられることを理解するべきである。本発明の範囲内での様々な変更及び修正は、詳細な記載から当業者に明らかになるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 9 】

図面は、例示目的のためであり、決して制限するものではない。

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】一次マウスモノクローナル抗 m⁷ G キャップ抗体が、mRNA のキャップに特異的に結合する、本発明のサンドイッチ ELISA に基づく実施形態の例示的な図解を示す。mRNA は、ビオチン化されたオリゴ - dT プライマーとそのポリ (A) 尾部のハイブリダイゼーションを介して、固体基質上に間接的に捕捉され、これが、ストレプトアビジンをコーティングした固体基質に直接結合される。

【 図 2 】本発明の様々な実施形態に存在する例示的な mRNA のキャップされた構造及びキャップのない構造の図表である。

【 図 3 】ELISA を介して測定される、分泌ヒト - ガラクトシダーゼ (GLA) タンパク質レベルの定量化を実証する棒グラフである。検出されたタンパク質は、投与の 6 時間後、脂質ナノ粒子 (GLA mRNA をカプセル化した 30 ug) の単回投与を介して、静脈内に送達される GLA mRNA からその産生の結果である。

【 図 4 】ELISA によって測定される、キャップされた及びキャップのない mRNA の様々な量におけるキャップ形成の定量化を実証する例示的なグラフを示す。検出されたシグナルは、RNA サンプル中のキャップ構造を有する抗キャップ抗体の相互作用から生じる。

【 図 5 】ELISA によって測定される、標準 N⁷メチルキャップされた RNA と共に、社内でのキャップ形成及び商業的に合成されたキャップされた mRNA の定量化を実証する例示的な棒グラフを示す。検出されたシグナルは、RNA サンプル中のキャップ構造を有する抗キャップ抗体の相互作用から生じる。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 1 】

定義

本発明が、より容易に理解されるために、特定の用語を最初に定義する。以下の用語及び他の用語のさらなる定義は、本明細書全体にわたって記載される。

【 0 0 2 2 】

親和性：当該技術分野において既知の通り、「親和性」は、特定のリガンドが結合する (例えば、非共有結合的に関連する) 機密度の尺度及び / またはそれがそのパートナーから分離する速度または頻度である。当該技術分野において既知の通り、任意の様々な技術を利用して、親和性を判定し得る。多くの実施形態において、親和性は、特異的結合の尺度を表す。

【 0 0 2 3 】

アニールまたはハイブリダイゼーション：本明細書で使用する場合、用語「アニール」、「ハイブリダイゼーション」、及び文法的等価物は、ワトソン - クリック塩基対または非標準塩基対を介して、複合体を形成するために十分相補的であるヌクレオチド配列の間の複合体 (二重鎖またはハイブリッドとも称される) の形成を指す。アニールまたはハイブリッド形成配列は、安定したハイブリッドを提供するために完全に相補的である必要はないと理解されるであろう。多くの場合、安定したハイブリッドは、塩基の約 10 %

10

20

30

40

50

未満が不適正塩基対である場合に形成されるであろう。したがって、本明細書で使用する場合、用語「相補的」は、約90%以上の相同性（例えば、約95%以上、約98%以上、または約99%以上の相同性）がある場合に、特定の条件下で、その補体を伴い安定した二重鎖を形成する核酸分子を指す。当業者は、より低い相補性を有するものはハイブリタイズしないが、少なくとも所望のレベルの相補性を有する配列が、安定してハイブリダイズするようなハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーの推定及び調節の仕方を理解する。ハイブリダイゼーション条件及びパラメータの例については、例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, Second Edition, Cold Spring Harbor Press: Plainview, NY及びAusubel, "Current Protocols in Molecular Biology", 1994, John Wiley & Sons: Secaucus, NJを参照されたい。2つの核酸分子の間の相補性は、全ての核酸の塩基が一致した場合に、「完全」、「絶対的」、「完璧」であると言われ、それ以外は、「部分的」であると言われる。

10

【0024】

抗体：本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって実質的にコードされる1つ以上のポリペプチドからなるポリペプチドを指す。認識される免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、及びミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、典型的には、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、典型的には、順番に免疫グロブリンクラス、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEそれぞれを規定する、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類される。典型的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、テトラマーを含むことで知られる。各テトラマーは、各対が1つの「軽」鎖（約25kD）及び1つの「重」鎖（約50～70kD）を有する、2つの同一の対のポリペプチド鎖から構成される。各鎖のN末端は、抗原認識を主に担う約100～110個以上のアミノ酸の可変領域を規定する。用語「可変軽鎖」（VL）及び「可変重鎖」（VH）は、これらの軽鎖及び重鎖それぞれを指す。抗体は、特定の抗原（例えば、 m^7 GmRNAキャップ）に対して特異的であり得る。抗体またはその抗原は、分析物または結合パートナーのいずれかであり得る。抗体は、無傷の免疫グロブリンとして、または様々なペプチダーゼでの消化によって産生されるよく特徴付けられたいくつかのフラグメントとして存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合の下で抗体を消化して、それ自体が、ジスフィルド結合によってVH-CH1と連結される軽鎖である、F(ab)'₂、Fabのダイマーを産生する。F(ab)'₂は、穏やかな条件下で、還元されて、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合を破壊し得、それによって(Fab')₂ダイマーをFab'モノマーへと転換する。Fab'モノマーは、本質的に、ヒンジ領域の一部を有するFabである（他の抗体フラグメントのより詳細な記載のために、Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993)を参照されたい）。様々な抗体フラグメントが、無傷の抗体の消化の観点から規定されるが、当業者は、かかるFab'フラグメントが、化学的にまたは組み換えDNA方法論を利用することによってのいずれかでデノボ合成され得ることを理解するであろう。したがって、用語「抗体」は、本明細書で使用する通り、全体の抗体の改変または組み換えDNA方法論を使用する合成されたデノボのいずれかによって産生される抗体フラグメントも含む。いくつかの実施形態において、抗体は、単鎖抗体、例えば、可変重鎖及び可変軽鎖が、共に連結して（直接またはペプチドリinkerを介して）、連続ポリペプチドを形成する単鎖Fv(scFv)抗体である。単鎖Fv('scFv')ポリペプチドは、直接連結されるか、ペプチドコードしているリンカーによって連結されるかのいずれかのVH-及びVL-コードしている配列を含む核酸から発現され得る共有結合的に結合したVH::VLヘテロダイマーであり、例えば、Huston, et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879 -

20

30

40

50

5883を参照、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる)。いくつかの構造は、抗体V領域からの、化学的に分離されるが自然に凝集した軽及び重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造に実質的に類似する三次元構造に折り畳まれるscFv分子へ転換するために存在する。例えば、米国特許第5,091,513号及び同第5,132,405号及び同第4,956,778号を参照されたい。

【0025】

およそ：本明細書で使用する場合、1つ以上の対象の値に適用される通り、用語「およそ」または「約」は、述べられた基準値と類似する値を指す。特定の実施形態において、用語「およそ」または「約」は、別途記載のない限りまたは別途内容から明らかでない限り（かかる数が可能な値の100%を超え得る場合を除く）、述べられた基準値のいずれかの方向（上回るまたは下回る）において、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下に含まれる値の範囲を指す。

10

【0026】

結合物質：本明細書で使用する場合、用語「結合物質」は、任意の分子、例えば、タンパク質（例えば、ペプチド、抗体など）、核酸、オリゴヌクレオチド、標的に結合する化学化合物（例えば、抗原、ヌクレオチド、ペプチド、ポリヌクレオチドなど）を含む。結合物質は捕捉剤とも称される。

【0027】

化合物及び薬剤：用語「化合物」及び「薬剤」は、本明細書において互換的に使用される。それらは、任意の天然に存在するまたは天然に存在しない（すなわち、合成または組み換え）分子、例えば、生体高分子（例えば、核酸、ポリペプチド、またはタンパク質）、有機もしくは無機分子、または生物材料から作製された抽出物、例えば、細菌、植物、真菌、または動物（特に、ヒトを含む哺乳類）細胞もしくは組織を指す。化合物は、単一の分子または少なくとも2つの分子の混合物または複合体であり得る。

20

【0028】

対照：本明細書で使用する場合、用語「対照」は、結果が比較される標準であるという当該技術分野で既知の意味を有する。典型的には、対照は、変数についての結論を出すためにかかる変数を分離することによって実験における完全性を増強するために使用される。いくつかの実施形態において、対照は、比較器を提供するための試験反応またはアッセイと同時に実施される反応またはアッセイである。1つの実験において、「試験」（すなわち、試験される変数）が適用される。第2の実験において、「対照」は、試験される変数が適用されない。いくつかの実施形態において、対照は、既存対照（すなわち、既に実施された試験もしくはアッセイ、または既に知られている量もしくは結果の）である。いくつかの実施形態において、対照は、印刷または別の方法で保存された記録であるか、またはそれを含む。対照は、正の対照または負の対照であり得る。

30

【0029】

検出可能なシグナル：本明細書で使用する場合、用語「検出可能なシグナル」は、人間または機械によって検出または測定され得るシグナルを指す。いくつかの実施形態において、検出可能なシグナルは、シグナルの強度が、シグナルに関連する化合物の量に関連する（例えば、比例する）ように、定量化され得る。信号の性質によって、検出可能なシグナルは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的手段によって、検知、測定、または定量化され得る。「検出可能なシグナル」は、本出願において「検出可能な薬剤」または「検出可能な部分」とも称される。

40

【0030】

キット：本明細書で使用する場合、用語「キット」は、材料を送達するための任意の送達系を指す。かかる送達系は、ある場所から別の場所への様々な診断もしくは治療試薬（例えば、適切な容器におけるオリゴヌクレオチド、抗体、酵素など）、及び/または支持材料（例えば、緩衝液、アッセイを実施するための指示書など）の保存、輸送、または送達を可能にする系を含み得る。例えば、キットは、関連性のある試薬及び/または支持材

50

料を含有する1つ以上の同封物（例えば、箱）を含む。本明細書で使用する場合、用語「フラグメント化キット」は、それぞれが全キット構成要素のサブ部分を含有する2つ以上の別個の容器を含む送達系を指す。容器は、意図される受容者に一緒にまたは別々に送達され得る。例えば、第1の容器は、アッセイにおいて使用するための酵素を含有し得、第2の容器は、オリゴヌクレオチドを含有する。用語「フラグメント化キット」は、米連邦食品医薬品化粧品法の第520(e)節に規定される分析物特異的試薬(A S R ' s)を含有するキットを包含することが意図されるが、それに限定されない。実際、それぞれが全キット構成要素のサブ部分を含有する2つ以上の別個の容器を含む送達系は、用語「フラグメント化キット」に含められる。その一方、「複合キット」は、単一容器（例えば、所望の構成要素それぞれを収容する単一箱中に）中に全ての構成要素を含有する送達系を指す。用語「キット」は、フラグメント化キット及び複合キットの両方を含む。

10

【0031】

標識付き：本明細書で使用する場合、用語「標識付き」は、検出可能なシグナル、薬剤、または部分の化合物への付着を指す。検出可能なシグナルの定義を参照されたい。

【0032】

ヌクレオシド：用語「ヌクレオシド」または「核酸塩基」は、本明細書で使用する場合、アデニン（「A」）、グアニン（「G」）、シトシン（「C」）、ウラシル（「U」）、チミン（「T」）、及び炭水化物のアノマー炭素（炭水化物の1'-炭素原子）と核酸塩基との間のN-グリコシド結合によって炭水化物に結合するそれらの類似体、例えば、D-リボース（RNAにおける）または2'-デオキシ-D-リボース（DNAにおける）を指す。核酸塩基がプリン、例えば、AまたはGであるとき、リボース糖は、一般的に、プリンの複素環のN9位置に付着している。核酸塩基がピリミジン、例えば、C、T、またはUであるとき、糖は、一般的に複素環のN1位置に付着している。炭水化物は置換または非置換であり得る。置換リボース糖は、炭素原子のうちの1つ以上、例えば、2'-炭素原子が、各Rが、独立して、H、C₁~C₆アルキル、またはC₅~C₁₄アリールである、同じもしくは異なるC₁、F、-R、-OR、-NR₂またはハロゲン基のうちの1つ以上で置換されるものを含むが、これらに限定されない。リボースの例としては、リボース、2'-デオキシリボース、2',3'-ジデオキシリボース、2'-ハオリボース、2'-フルオリボース、2'-クロロリボース、及び2'-アルキルリボース、例えば、2'-O-メチル、4'-アノマーヌクレオチド、1'-アノマーヌクレオチド(Asse line et al., Nuc l . A c i d s R e s . , 19:4067-74[1991])、2'-4'-及び3'-4'-結合及び他の「ロックされた」または「LNA」、二環式糖修飾が挙げられる(WO98/22489、WO98/39352、WO99/14226)。

20

30

【0033】

ヌクレオチド：用語「ヌクレオチド」は、本明細書で 사용되는場合、モノマー単位として、またはポリヌクレオチドポリマー内で、リン酸化形態（ヌクレオシドのリン酸エステル）におけるヌクレオシドを意味する。「ヌクレオチド5'-三リン酸」は、5'位置に三リン酸エステル基を有するヌクレオチドを指し、リボース糖の構造的特徴を具体的に指摘するために、時折、「NTP」、または「dNTP」、及び「ddNTP」として示される。三リン酸エステル基は、様々な酸素の部分のための硫黄置換、例えば、-チオ-ヌクレオチド5'-三リン酸を含み得る。ヌクレオチドは、モノ-、ジ-、またはトリ-リン酸化形態において存在し得る。ヌクレオチド中に存在するリボースの炭素原子は、塩基の骨格鎖番号と区別するためにプライム記号(')で示される。ポリヌクレオチド及び核酸の化学的性質の概説について、Shabarova, Z. and Bogdanov, A. Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, VCH, New York, 1994を参照されたい。

40

【0034】

核酸：用語「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」、または「オリゴヌクレオチド」は、本明細書において、互換的に使用され得る。それらは、ヌクレオチドモノマー

50

のポリマー、またはその類似体、例えば、デオキシリボ核酸 (DNA) 及びリボ核酸 (RNA)、ならびにそれらの組み合わせを指す。ヌクレオチドは、起源が、ゲノム、合成または半合成であり得る。別途記載のない限り、用語は、合成骨格鎖を有する核酸様構造、ならびに増幅産物を包含する。当業者によって理解されるであろう通り、これらのポリマーの長さ (すなわち、それが含有するヌクレオチドの数) は、しばしば、これらの意図された機能や用途に応じて、広く変化し得る。ポリヌクレオチドは、直鎖状、分枝状直鎖状、または環状分子であり得る。ポリヌクレオチドはまた、関連した対イオン、例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、トリアルキルアンモニウム、 Mg^{2+} 、 Na^+ などを有する。ポリヌクレオチドは、全てデオキシリボヌクレオチドから、全てリボヌクレオチドから、またはそれらのキメラ混合物から構成され得る。ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド間核酸塩基及び糖類似体から構成され得る。

10

【0035】

いくつかの実施形態において、用語「オリゴヌクレオチド」は、約5～約150ヌクレオチド、例えば、約10～約100ヌクレオチド、約15～約75ヌクレオチド、または約15～約50ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを指すように本明細書で使用される。本明細書全体を通して、オリゴヌクレオチドが、文字の配列 (例えば、アデノシン、グアノシン、及びチミジンそれぞれを指す4つの基礎文字、A、C、G、及びTから選択される) によって表されるときはいつでも、ヌクレオチドは、左から右に5'～3'の順序で表される。「ポリヌクレオチド配列」は、ポリマーに沿ったヌクレオチドモノマーの配列を指す。別途示されない限り、ポリヌクレオチド配列が表されるときはいつでも、ヌクレオチドが、左から右に5'～3'の方向にあることが理解されるであろう。

20

【0036】

核酸、ポリヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチドは、標準ヌクレオチド塩基からなり得るか、またはイソ-C及びイソ-G塩基を含むがこれらに限定されないヌクレオチドアイソフォーム類似体で置換され得、それは、標準塩基よりも多少許されて、ハイブリダイズされ得、相補的アイソフォーム類似体塩基と優先的にハイブリダイズされる。多くのかかるアイソフォーム塩基は、例えば、Benner et al., (1987) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 52, 53-63に記載される。天然に存在するヌクレオチドモノマーの類似体は、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、7-デアザ-8-アザアデニン、7-メチルグアニン、イノシン、ネブラリン、ニトロピロール (Bergstrom, J. Amer. Chem. Soc., 117:1201-1209 [1995])、ニトロインドール、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、プソイドウリジン、擬似シトシン、擬似イソシトシン、5-プロピニルシトシン、イソシトシン、イソグアニン (See1a、米国特許第6,147,199号)、7-デアザグアニン (See1a、米国特許第5,990,303号)、2-アザプリン (See1a、WO01/16149)、2-チオピリミジン、6-チオグアニン、4-チオチミン、4-チオウラシル、0-6-メチルグアニン、N-6-メチルアデニン、O-4-メチルチミン、5,6-ジヒドロチミン、5,6-ジヒドロウラシル、4-メチルインドール、ピラゾロ [3,4-D]ピリミジン、「PPG」 (Meyer、米国特許第6,143,877号及び同第6,127,121号、Gall、WO01/38584)、及びエテノアデニン (Fasman (1989) in Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla.) を含む。

30

40

【0037】

用語「3'」は、同じポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドにおける別の領域または位置から、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド3' (すなわち、下流) における領域または位置を指す。用語「5'」は、同じポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドにおける別の領域または位置から、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド5

50

′（すなわち、上流）における領域または位置を指す。用語「3′末端」及び「3′終端」は、核酸分子に関連して本明細書で使用される場合、終端ペントース糖の3′炭素に付着する遊離ヒドロキシル基を含有する核酸の末端を指す。用語「5′末端」及び「5′終端」は、核酸分子に関連して本明細書で使用される場合、終端ペントース糖の5′炭素に付着する遊離ヒドロキシル基またはリン酸基を含有する核酸分子の末端を指す。本発明のいくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマーは、その5′終端にポリアデノシンの管を含む。

【0038】

一次及び二次抗体：本明細書で使用する場合、用語「一次抗体」は、典型的には、対象の標的に直接結合する抗体を指す。用語「二次抗体」は、本明細書で使用する場合、同じく、対象の標的に結合している、別の（一次）抗体と結合する抗体を指す。

10

【0039】

標的：本明細書で使用する場合、用語「標的」は、対象の分子を指す。

【0040】

（発明を実施するための形態）

本発明は、とりわけ、mRNAキャップ形成効率を定量化するための改善された方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、キャップ特異結合物質（例えば、キャップ特異的抗体）とキャップされたmRNAとの間の複合体の形成及び定量的判定に基づいたmRNAキャップ形成効率の定量化方法を提供する。

20

【0041】

本発明の様々な実施形態は、インビトロのmRNA合成のキャップ形成効率を定量化するのに有用である。したがって、本発明は、mRNAを製造するため、及び、特に、治療用途でのmRNAの安全性、有効性、及び商業的実行可能性を評価するための重要な品質管理方策を提供する。

【0042】

本発明の様々な態様は、以下の節において詳細に記載される。節の使用は、本発明を限定するものではない。各節は、本発明の任意の態様に適用できる。本出願において、「または」の使用は、別途記載のない限り、「及び/または」を意味する。

【0043】

mRNAキャップ形成及び/またはメチル化

30

典型的には、真核生物のmRNAは、それらの5′終端で「キャップ」構造を有し、それは翻訳において重要な役割を果たす。例えば、キャップは、mRNA代謝において重要な役割を果たしており、核内のRNA転写物の処理及び成熟、核から細胞質へのmRNAの輸送、mRNA安定性、及びタンパク質へのmRNAの効率的な翻訳の様々な度合を変えるために必要とされる。5′キャップ構造は、真核生物細胞及び真核生物ウイルスmRNAのタンパク質合成の開始及びインビボでのmRNA処理及び安定性に関与する（例えば、Shatkin, A. J., Cell, 9: 645 - 653 (1976); Furuichi, et al., Nature, 266: 235 (1977); Federation of Experimental Biologists Society Letter 96: 1 - 11 (1978); Sonenberg, N., Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol., 35: 173 - 207 (1988)を参照されたい）。mRNAの翻訳の開始に必要な仕組みの構成要素である特異的キャップ結合タンパク質が存在する（例えば、Shatkin, Cell, 40: 223 - 24 (1985); Sonenberg, N., Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol., 35: 173 - 207 (1988)を参照されたい）。mRNAのキャップは、翻訳開始因子eIF4Eによって認識される（Gingras, et al., Ann. Rev. Biochem. 68: 913 - 963 (1999); Rhoads, R. E., J. Biol. Chem. 274: 30337 - 3040, (1999)）。5′キャップ構造はまた、5′-エクソヌクレアーゼ活性への耐性を提供し、その不在はmRNAの急速分解をもたらす（例えば、Ross, J., Mol. Biol. Med. 5: 1 - 14

40

50

(1988); Green, M. R. et al., Cell, 32: 681-694 (1983)を参照されたい)。多くの真核細胞遺伝子及び真核生物ウイルス遺伝子の一次転写物は、これらの転写物のコード領域内に介在配列(イントロン)を除去するための処理を必要とするので、キャップの利点はまた、かかるプレmRNAの安定化にも及ぶ。

【0044】

インビトロで、キャップされたRNAは、ウサギ網状赤血球溶解物またはコムギ胚芽翻訳系などの様々なインビトロの翻訳系におけるキャップのない転写物より効率的に翻訳されると報告された(例えば、Shimotohno, K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 2734-2738 (1977); Paterson and Rosenberg, Nature, 279: 692 (1979)を参照されたい)。この作用はまた、ある程度、インビトロの翻訳系に存在するエキソリボヌクレアーゼからのRNAの保護、ならびに他の要因に起因すると考えられる。

10

【0045】

天然に存在するキャップ構造は、三リン酸架橋を介して第1の転写されたヌクレオチドの5'-末端に結合される7-メチルグアノシンを含み、Nが任意のヌクレオシドである $m^7G(5')ppp(5')N$ のジヌクレオチドキャップをもたらす。インビボで、キャップは酵素的に付加される。キャップは、核に付加され、酵素のグアニリルトランスフェラーゼによって触媒される。RNAの5'末端末端へのキャップの付加は、転写の開始直後に起こる。末端ヌクレオシドは、典型的には、グアノシンであり、全ての他のヌクレオチド、すなわち、 $G(5')ppp(5')GpNpNp$ に対して逆方向である。

20

【0046】

インビトロの転写によって産生されるmRNAの一般的なキャップは、 $m^7G(5')ppp(5')G$ であり、それは、その5'末端におけるキャップ構造を有するRNAを得るためにインビトロのT7またはSP6 RNAポリメラーゼでの転写におけるジヌクレオチドキャップとして使用された。キャップされたmRNAのインビトロの合成のための一般的な方法は、転写の開始剤としての形態 $m^7G(5')ppp(5')G$ (「 m^7GpppG 」)の予め形成されたジヌクレオチドを用いる。 $m^7G(5')ppp(5')G$ 、擬対称性ジヌクレオチドを使用する欠点は、転写伸長のために、Gまたは m^7G 部分のいずれかの3'-OHの開始求核剤として機能する性質である。言い換えると、 m^7G 及びG部分の両方上の3'-OHの存在は、不適切な方向における最大半分のキャップを組み込むmRNAを引き起こす。これは、転写反応のイオン条件に応じて、およそ同等な比率における、形態 $m^7G(5')pppG(pN)_n$ 及び $G(5')pppm^7G(pN)_n$ の2つの異性体のRNAの合成を引き起こす。異性体形態における変化は、インビトロの翻訳に悪影響を及ぼし得、均質な治療製品には望ましくない。

30

【0047】

現在までに、インビトロの翻訳実験において使用される合成ジヌクレオチドキャップの通常形態は、アンチリバースキャップ類似体(「ARCA」)であり、それは、一般的に、2'または3'OH基が $-OCH_3$ で置換される修飾されたキャップ類似体である。ARCA及び三重メチル化キャップ類似体は、正方向に組み込まれる。リボース環の2'または3'OH基のいずれかでの m^7G の化学修飾は、2'OH基がホスホジエステル結合に関与しないにも関わらず、キャップが単独で、正方向に組み込まれることをもたらす。(Jemielity, J. et al., "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003))。N7でのグアノシンのメチル化及び3'-O-メチル化及び5'ニリン酸合成のための選択的な手順が確立された(Kore, A. and Parmar, G. Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, 25: 337-340, (2006)及びKore, A. R., et al. Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids 25(3): 307-14, (2006))。

40

50

【0048】

RNAの転写は、通常、ヌクレオシド三リン酸（通常、プリン、A、またはG）で開始する。インビトロの転写は、典型的には、T7、T3、またはSP6などのファージRNAポリメラーゼ、ファージポリメラーゼプロモーターを含有するDNAテンプレート、ヌクレオチド（ATP、GTP、CTP、及びUTP）、及びマグネシウム塩を含有する緩衝液を含む。キャップされたRNAの合成は、転写反応におけるキャップ類似体（例えば、 m^7GpppG ）の組み込みを含み、いくつかの実施形態において、それは、組み換えグアニリルトランスフェラーゼの付加によって組み込まれる。過剰な m^7GpppG 対GTP（4：1）は、各転写物が5'キャップを有するであろう機会を増加させる。インビトロで転写されたmRNAのキャップ形成のためのキットは、市販されており、mMESS SAGE mMACHINE（登録商標）キット（Ambion, Inc., Austin, Tex.）を含む。GTPが、転写物の伸長のために必要とされるときに、GTP濃度が比率を制限するようになるので、合計RNA収率は、低い、これらのキットは、典型的には、20%のキャップのないRNAに80%のキャップされたRNAを与えるであろう。しかしながら、現在、サンプル中のmRNAの永久的な変化を伴わないキャップ形成効率の定量化を可能にする利用可能な技術/方法はない。

10

【0049】

キャップ形成効率を推定する方法は当該技術分野において既知である。例えば、T7 RNAポリメラーゼは、ジヌクレオチド、全ての4つのリボヌクレオチド三リン酸、 $[- ^{32}P]GTP$ 、及びGが、プロモーターの後に特定された第1のリボヌクレオチドである短いDNAテンプレートと共にインキュベートされ得る（Grudzien, E. et al. "Novel Cap analogs for in vitro synthesis of mRNA with high translation efficiency", RNA, 10:1479-1487 (2004)を参照されたい）。G残基の5'側上の任意のヌクレオチドは、最近接の転移によるリボヌクレアーゼT2消化後に、 ^{32}P -標識付き3'-リン酸基を得る。次いで、陰イオン交換クロマトグラフィーは、5'-末端産物から、RNAにおける内部位置に起因する標識付きヌクレオチド3'-リン酸を溶解するために、使用される。5'-末端産物は、2つの種類がある。キャップのないRNAは、標識付きグアノシン5'-三リン酸3'-リン酸を生じさせる（ $p3Gp^*$ 、*は標識付きリン酸基を示す）。キャップされたRNAは、使用されるキャップ類似体の性質に応じて、様々な5'-末端構造を生じさせる（キャップ類似体が m^7Gp3G であるとき、 m^7Gp3Gp^* 及び $Gp3m^7Gp^*$ ）。

20

30

【0050】

しかしながら、これらの方法の主な欠点は、全サンプルは、放射性にされるか、または別途破壊され、したがって、その後の治療用途には使用できない。理論的には別個の定量化反応は治療合成反応と共に実行され得るが、かかる取り合わせは不適切である。同時であるが、別個のサンプルは、内部オペレーターエラー及び反応条件における微小な変化のため、本質的に可変である。これは、ある所与の日の標準曲線上の点の値が翌日のものと同じでない可能性がある標準曲線を使用する定量化において特に当てはまる。キャップ形成効率を計算することにおいて正確な結果を得るために、治療合成反応から得られた代表的なサンプル、キャップ形成効率が対照と比較して評価され得るサンプルを使用するのが望ましく、それは、治療合成反応におけるキャップ形成効率を表す。

40

【0051】

したがって、本発明は、サンプル中のmRNAキャップ形成効率を直接定量化する改善された方法を提供する（例えば、インビトロの合成反応からの代表的な一定分量サンプル）。本発明のいくつかの実施形態は、キャップ特異的結合物質とキャップされたmRNAとの間の複合体の形成を可能にする条件下での、キャップ特異的結合物質の使用を含む。キャップ特異的結合物質とキャップされたmRNAとの間の複合体の形成は、キャップされた産物の正の対照またはキャップのない産物の負の対照に対して、複合体の量の定量的判定を可能にする（すなわち、キャップされたmRNA）。言い換えると、結合は、サン

50

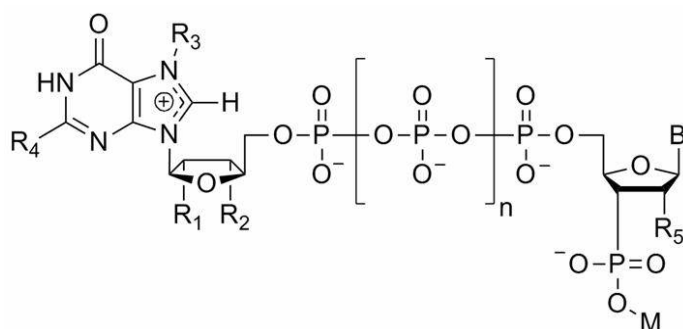
プル中のキャップされた mRNA 標的の量及びサンプルが得られる反応におけるキャップ形成効率を示す。したがって、いくつかの実施形態において、複合体の量を定量的に判定するステップは、キャップ特異的結合物質が抗体または mRNA キャップと特異的に結合する他のタンパク質である E L I S A 型アッセイを実施することを含む。(図 1 参照) 複合体形成は、キャップ特異的結合物質(例えば、マウス抗 m⁷G 抗体と結合するヤギ抗マウス抗体)に対して特異的な検出剤の添加によって定量化され得、それは、キャップされた mRNA の量に直接比例して、シグナルを産生する。本発明の実施形態を使用して、インビトロの転写された mRNA、単離された真核生物 mRNA、及びウイルス RNA を含む幅広い種類の RNA 種のキャップ形成効率を定量化し得る。本発明の実施形態を使用して、キャップ構造及び本明細書に記載のキャップ類似体のいずれかを定量化し得る。

10

【0052】

本明細書に記載の本発明の方法は、一般的に、mRNA キャップのいかなる種類の定量化に適している。いくつかの実施形態において、キャップは、式 I の構造を有し、

【化 3】



20

【0053】

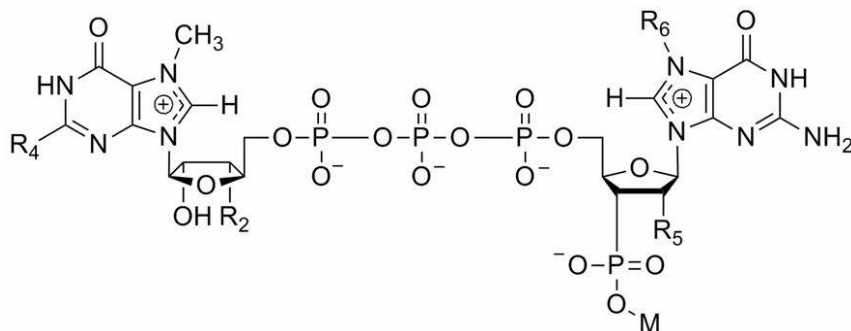
式中、B は核酸塩基であり、R₁ は、ハロゲン、OH、及び OCH₃ から選択され、R₂ は、H、OH、及び OCH₃ から選択され、R₃ は、CH₃、CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₃、または欠失し、R₄ は NH₂ であり、R₅ は、OH、OCH₃、及びハロゲンから選択され、n は、1、2、または 3 であり、M はヌクレオチド、すなわち、mRNA の第 3 の塩基である。特定の実施形態において、B はグアニンであるが、任意の核酸塩基であり得る。いくつかの実施形態において、キャップは、2'-O-メチル残基が、塩基 1 のリボース環の 2' OH 基に(すなわち、式 I の R₅ 位置に)存在する m⁷G(5')ppp(5')G である。

30

【0054】

いくつかの実施形態において、キャップは、式 II の構造を有し、

【化 4】



40

式中、R₂ は H または CH₃ であり、R₄ は NH₂ であり、R₅ は OH または OCH₃ であり、R₆ は H または CH₃ であり、M は mRNA のヌクレオチドである。

【0055】

キャップ類似体は、m⁷GpppG、m⁷GpppA、m⁷GpppC からなる群から選択される化学的構造、非メチル化キャップ類似体(例えば、GpppG)、ジメチル化

50

キャップ類似体（例えば、 $m^{2,7}GpppG$ ）、トリメチル化キャップ類似体（例えば、 $m^{2,2,7}GpppG$ ）、ジメチル化対称的キャップ類似体（例えば、 m^7Gpppm^7G ）、またはアンチリバーシキャップ類似体（例えば、ARCA、 $m^{7,2'}OmeGpppG$ 、 $m^{7,2'}dGpppG$ 、 $m^{7,3'}OmeGpppG$ 、 $m^{7,3'}dGpppG$ 、及びそれらの四リン酸誘導体）（例えば、Jemielity, J. et al., "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003) を参照されたい）を含むが、これらに限定されない。

【0056】

好ましい実施形態において、キャップは、三リン酸架橋を介して第1の転写されたヌクレオチドの5'-末端に結合される7-グアニル酸メチル（「 m^7G 」）であり、Nが任意のヌクレオシドである $m^7G(5')ppp(5')N$ をもたらす。本発明の実施形態において使用される m^7G キャップの好ましい実施形態は、 $m^7G(5')ppp(5')G$ である。

【0057】

いくつかの実施形態において、mRNAはキャップがない。（図2A）キャップのないmRNAは、サンプル中に存在し得（すなわち、インビトロの転写反応における不完全なキャップ形成の結果として）、かつ/または使用され得、サンプル中のキャップのない種の定量的レベルに対する対照。いくつかの実施形態において、キャップは、キャップ0構造である。（図2B）。キャップ0構造は、塩基1及び2に付着されたりボースの2'-O-メチル残基を欠いている。いくつかの実施形態において、キャップはキャップ1構造である。（図2C）キャップ1構造は塩基1に2'-O-メチル残基を有する。いくつかの実施形態において、キャップはキャップ2構造である。キャップ2構造は、塩基1及び2に付着された2'-O-メチル残基を有する。

【0058】

様々な m^7G キャップ類似体は、当該技術分野において既知であり、その多くは市販されている。これらは、上述の m^7GpppG 、ならびにARCA 3'-OCH₃及び2'-OCH₃キャップ類似体を含む（Jemielity, J. et al., RNA, 9: 1108-1122 (2003)）。本発明の実施形態において使用される追加のキャップ類似体は、N7-ベンジル化ジヌクレオシド四リン酸類似体（Grudzien, E. et al., RNA, 10: 1479-1487 (2004) に記載）、ホスホロチオエートキャップ類似体（Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13: 1745-1755 (2007) に記載）、及び参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,093,367号及び同第8,304,529号に記載されるキャップ類似体（ビオチン化されたキャップ類似体を含む）を含む。

【0059】

キャップされたmRNAの産生

本明細書に記載される定量的方法に好適なキャップされたmRNAは、当該技術分野において既知の任意の方法によって産生され得る。

【0060】

いくつかの実施形態において、キャップされたmRNAは、インビトロの転写によって産生され、本来、RNAファージポリメラーゼを使用するRNAの合成のため、Krieg及びMelton (Methods Enzymol., 1987, 155: 397-415) によって開発された。典型的には、これらの反応は、少なくともファージRNAポリメラーゼ（T7、T3、またはSP6）、ファージポリメラーゼプロモーターを含有するDNAテンプレート、ヌクレオチド（ATP、CTP、GTP、及びUTP）、及びマグネシウム塩を含有する緩衝液を含む。RNA合成収率は、ヌクレオチド濃度を増加させ、マグネシウム濃度を調節し、無機ピロホスファターゼを含めることによって最適化され得る（米国特許第5,256,555号；Gurevich, et al., Anal. Biochem. 195: 207-213 (1991)；Sampson, J. R. a

10

20

30

40

50

nd Uhlenbeck, O. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 85, 1033 - 1037 (1988); Wyatt, J. R., et al., Biotechniques, 11: 764 - 769 (1991)). いくつかの実施形態は、インビトロの転写物の大規模合成のための市販のキットを使用する(例えば、MEGA script (登録商標) Ambion)。これらの反応で合成されたRNAは、通常、リボースの5'位置に三リン酸を有する5'末端ヌクレオチドを特徴とする。典型的には、RNAポリメラーゼ及び使用されるプロモーターの組み合わせに応じて、このヌクレオチドは、グアノシンであるが、アデノシンではあり得ない(例えば、Coleman, T. M., et al., Nucleic Acids Res., 32: e14 (2004)を参照されたい)。これらの反応において、全ての4つのヌクレオチドは、典型的に、等モル濃度で含まれ、それらのいずれも制限されない。

【0061】

本発明のいくつかの実施形態は、回分式反応であり、つまり、全ての構成要素を組み合わせ、次いで、反応が終了するまでRNAの重合を促進するために、約37℃でインキュベートする。典型的には、回分式反応は便宜上使用され、それらの実験のために、かかる反応から必要な量のRNAを得る。いくつかの実施形態において、「供給回分式」システム(例えば、Jeffrey A. Kern, Batch and Fed-batch Strategies for Large-scale Production of RNA by in Vitro Transcription (University of Colorado) (1997)を参照されたい)を使用して、インビトロの転写反応の効率を増加させる。全ての構成要素を組み合わせ、しかしまた一方で、ヌクレオチド及びマグネシウムなどの追加量のいくつかの試薬を経時的に添加して、一定の反応条件を維持しようと試みる。その上、いくつかの実施形態において、反応のpHは、それを経時的に監視し、必要に応じてKOHを添加することによって7.4に保持され得る。

【0062】

キャップされたRNAをインビトロの転写によって合成するために、キャップ類似体(例えば、N⁷-メチルGpppG、すなわち、m⁷GpppG)は、転写反応に含められる。いくつかの実施形態において、RNAポリメラーゼは、他のヌクレオチドのいずれかのように容易にキャップ類似体を組み込み、つまり、キャップ類似体に対する偏りはない。いくつかの実施形態において、キャップ類似体は、酵素グアニリルトランスフェラーゼによって、5'末端に組み込まれるであろう。いくつかの実施形態において、キャップ類似体は、5'三リン酸を有しないので、5'末端のみに組み込まれるであろう。T7、T3、及びSP6 RNAポリメラーゼを使用するいくつかの実施形態において、それらのそれぞれのプロモーターの+1ヌクレオチドは、通常G残基であり、GTP及びm⁷GpppGの両方が転写反応において同等の濃度存在する場合、それらは、それぞれ+1位置に組み込まれる同等の機会を有する。いくつかの実施形態において、m⁷GpppGは、GTPよりも数倍高い濃度でこれらの反応において存在して、転写物が5'キャップを有するであろう機会を増加させる。いくつかの実施形態において、mMESSAGE mMACHINE (登録商標)キット(Cat. # 1344, Ambion, Inc.)は、製造業者の指示に従って使用され、そこでは、キャップとGTPとの比率が4:1(6 mM: 1.5 mM)であることが推奨される。いくつかの実施形態において、反応におけるキャップ類似体とGTPとの比率が増加するにつれ、キャップされたRNAとキャップのないRNAとの比率も比例して増加する。キャップ形成効率の考慮事項は、収率の考慮事項と均衡をとらなければならない。転写反応におけるキャップ類似体とGTPとの比率の増加は、キャップ及びGTP定数の合計濃度を保持するときにGTPの濃度が制限されるので、合計RNAのより低い収率をもたらす。したがって、最終RNA収率は、転写物の伸長に必要なGTP濃度に依存する。他のヌクレオチド(ATP、CTP、UTP)は過剰に存在する。

【0063】

特定の実施形態において、mRNAは、選択の遺伝子をコードするプラスミドDNAテ

ンプレートからのインビトロの転写によって合成される。いくつかの実施形態において、インビトロの転写は、グアニリルトランスフェラーゼを介したGTPの酵素共役によって、塩基1のリボース環の2'OH基に2'-O-メチル残基を有する5'キャップ構造、キャップ1(図2C)の付加を含む。いくつかの実施形態において、インビトロの転写は、グアニリルトランスフェラーゼを介したGTPの酵素共役によって、2'-O-メチル残基を欠いている5'キャップ構造、キャップ0(図2B)の付加を含む。いくつかの実施形態において、インビトロの転写は、グアニリルトランスフェラーゼを介したGTPの酵素共役によって、本明細書に記載されるキャップ構造のいずれかの5'キャップの付加を含む。いくつかの実施形態において、およそ200ヌクレオチド長の3'ポリ(A)尾部(ゲル電気泳動法によって判定される)は、ポリAポリメラーゼと共にATPの付加によって組み込まれた。いくつかの実施形態において、ポリ(A)尾部はおよそ100~250ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、ポリ(A)尾部は約50~300ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、インビトロの転写産物は、5'及び3'非翻訳領域を含む。

【0064】

mRNAを捕捉するための固体基質

いくつかの実施形態において、キャップされたmRNAは、キャップ特異的結合物質と接触させる前に、固体基質上に捕捉される。これらの実施形態は、固体基質の種類によって限定されない。かかる実施形態の唯一の必要条件は、固体基質がキャップされたmRNAと、いくつかの実施形態においては、キャップのないmRNAとも直接または間接的に結合することができなければならないことである。基質は、マイクロプレート、磁気ビーズ、粒子、ポリマービーズ、クロマトグラフィー樹脂、濾紙、ニトロセルロース、ジアゾセルロース、ガラス、ラテックス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、プロピレン、ポリエチレン、デキストラン、セファロース、寒天、デンプン、ナイロン、シリカゲル、またはヒドロゲルであり得る。

【0065】

いくつかの実施形態において、固体担体は、キャップされたまたはキャップのないmRNAに結合する第1の捕捉剤を含む。いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤は、一本鎖のmRNA中の配列に対応する(すなわち、と相補的な)一本鎖のポリヌクレオチド配列である。したがって、固体担体に結合するとき、ポリヌクレオチドの第1の捕捉剤は、mRNAとハイブリダイズされ得る。特定の例において、第1の捕捉剤は、mRNAのポリA尾部にハイブリダイズすることができるポリチミジン管(例えば、オリゴ-dT)である。いくつかの実施形態において、非翻訳3'の領域が第1の捕捉剤によって標的化され得る(例えば、相補的な配列のオリゴヌクレオチド)。いくつかの実施形態において、mRNAの遺伝子特異的コード領域は標的化され得る。捕捉オリゴヌクレオチドは、約10~50ヌクレオチド長、例えば、約10ヌクレオチド長、約15ヌクレオチド長、約20ヌクレオチド長、約25ヌクレオチド長、約30ヌクレオチド長、またはそれ以上であり得る。

【0066】

幅広い種類の核酸配列は、捕捉を促進するために、固体担体に結合され得る。同様に、ポリヌクレオチド捕捉剤が固体担体に直接または間接的に付着される方式は、いかなる方法においても制限されるべきではない。例えば、いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド捕捉剤は、合成担体からの切断ではなく、脱保護に好適な方式で、表面上で合成され得る(例えば、Weiler et al., Nucleic Acids Res., 25(14):2792-2799(1997)を参照されたい)。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド捕捉剤は、単離機能上の好適な官能基の表面の官能基との反応によって表面に、共有結合的に結合され得る(例えば、Geiger et al., Nucleosides & Nucleotides 17(9-11):1717-1724(1998)を参照されたい)。

【0067】

特定の実施形態において、ポリチミジン管オリゴヌクレオチドは、ビオチン化され、それにより、アビジンまたはストレプトアビジンコーティングされた固体担体と結合することができる。ビオチン化されたポリチミジン管オリゴヌクレオチドは市販されている（例えば、Promega, Invitrogen）。あるいは、ポリチミジン管オリゴヌクレオチドまたは任意の他のポリヌクレオチド捕捉剤は、特注合成され得、当業者に既知の方法に従ってビオチン化される。例えば、ビオチン-11-dUTP残基は、終末デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを使用して、合成オリゴヌクレオチドの3'末端に酵素的に付加され得る（例えば、Riley, L. K. et al., DNA, 5:333-337 (1986)を参照されたい）。幅広い種類のアビジン及びストレプトアビジンコーティングされた固体担体も市販されている（例えば、Pierce 96-ウェルストレプトアビジンコーティングされたマイクロプレート、Thermo Scientific）。

10

【0068】

オリゴヌクレオチドは、従来手段によって、例えば、市販のDNA合成機上で、ホスホラミダイト化学を介して、合成され得る。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、Gryaznov and Letsinger, Nucleic Acids Research, 20:3403-3409 (1992)に記載される固相担体上で合成される。手短に言えば、脱保護後、スクシニル結合を介して担体に結合されるデオキシチミジンの5'ヒドロキシルは、ジクロロメタン/ジイソプロピルエチルアミンなどの適切な溶媒におけるクロロ-（ジイソプロポレチルアミノ）-メトキシホスフィンとの反応によって、ホスフィチル化（phosphitylated）される。テトラゾールで活性化した後、5'-ホスフィチル化（phosphitylated）チミジンは、5'-トリチル-O-3'-アミノ-3'-デオキシヌクレオシドと反応して、ヌクレオシド部分がホスホロアミド酸結合によって共有結合的に連結されるヌクレオシド-チミジンダイマーを形成する。オリゴヌクレオチドの残部は標準ホスホラミダイト化学によって合成される。スクシニル結合を切断した後、3'末端アミノ基を有するオリゴヌクレオチドは、酸処理、例えば、室温で18~20時間の80%の水性酢酸により、ホスホロアミド酸連結を切断することによって産生される。

20

【0069】

いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤はタンパク質である。mRNAと選択的に結合する任意のタンパク質が使用され得る。いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤タンパク質は、mRNAの3'末端と結合する（例えば、ポリ（A）結合タンパク質）。他の実施形態において、第1の捕捉剤タンパク質は、mRNAの5'末端に結合する（例えば、抗-m⁷G抗体）。第1の捕捉剤として機能し得る例示的なタンパク質は、ポリ（A）結合タンパク質（「PABP」）、抗m⁷G抗体、及びそれらの抗原結合フラグメント、及び真核生物開始因子4E（eIF-4E）を含む。キャップ依存性mRNAキャップ依存性捕捉の方法は、以前に記載され（Edery, I. et al., Mol Cell Biol, 15:3363-3371 (1995)）；米国付与前公開第2007/0281336号）、本発明の実施形態に適応され得る。

30

【0070】

固体担体表面への第1の捕捉剤の化学付着の方法（タンパク質または核酸のいずれか）は、固定化されるために、固体担体表面上での求電子基との捕捉剤の求核基（例えば、アミンまたはチオール）の反応を伴い得る。あるいは、求核剤は、担体上に存在し得、求電子（例えば、活性化カルボン酸）は、抗単離機能上に存在し得る。いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤は、クリック化学によって固体担体に付着され得る。いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤は、随意に銅触媒の存在下で、アルキンとアジドの1,3-付加環化を介して付着される。クリック化学を使用する方法は、当技術分野で既知であり、Rostovtsev et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-99 (2002)及びSun et al., Bioconjugate Chem., 17:52-57 (2006)に記載されるものを含む。

40

50

【0071】

本発明いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤は、標準N-エチル-N'-（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド/N-ヒドロキシスクシンイミド（EDC/NHS）アミン結合手順によって固体基質に直接付着される。アミン結合は、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）及びN-エチル-N'-（ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド（EDC）の混合物でのカルボキシメチル基の修飾によって、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを表面マトリックス内へ導入する。次いで、これらのエステルは、アミン及び捕捉部分上の他の求核基と自発的に反応して、共有結合を形成する。これは非常に安定しており、一般的な表面官能基化技術である。いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤は、50 mMのNaHCO₃、pH 9.6のコートイング緩衝液を使用して、固体基質に直接結合される。

10

【0072】

アミノ基、カルボン酸基、イソシアント、イソチオシアネート、及びマレイミド基で誘導体化された固体担体の多数の種類は、市販されており、第1の捕捉剤の基質への結合を促進し得る。

【0073】

第1の捕捉剤がタンパク質であるいくつかの実施形態において、タンパク質は、既知の方法に従ってビオチン化され得、その後、アビジンまたはストレプトアビジンコートイングされた固体基質に結合される。ストレプトアビジン検出のための、特異的にビオチン化された抗体及び他のタンパク質または一次アミンにビオチン標識を伴うペプチド（リジン及びN-末端）、タンパク質の表面上の最も豊富な反応基に対する標識試薬及びキットは、市販されている。例えば、ストレプトアビジンコートイングされたELISAマイクロプレートは、ビオチン化されたポリA結合タンパク質相互作用タンパク質（PAIP2）でコートイングされ得る。いくつかの実施形態において、市販のヒト組み換え型PAIP2は、カルボジイミド架橋剤EDC（EDAC）を使用して、C-末端を特異的にビオチン化するためにアミン修飾ビオチン標識によってビオチン化される。

20

【0074】

いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤は、タグを付けられるか、または別途修飾されて、基質への結合を促進する。例えば、第1の捕捉剤がタンパク質（例えば、PABP）である実施形態において、タンパク質は、組み換えで産生され得、タグ付けされ得る。例えば、いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤タンパク質は、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）でタグ付けされる。いくつかの実施形態において、第1の捕捉剤は、FLAGタグ付け、HAタグ付け、Hisタグ付けまたはmycタグ付けされる。

30

【0075】

特定の実施形態において、第1の捕捉剤を使用する必要はない。上で参照した通り、本発明の実施形態は、定量化されるために、インピトロの合成されたmRNAのサンプル内へのビオチン化されたキャップ類似体の組み込みを含む。例えば、Koreらに対する米国特許第8,344,118号を参照し、参照により本明細書に組み込まれる。ビオチン化されたキャップされたmRNAサンプルは、アビジンまたはストレプトアビジンコートイングされた固体基質に直接結合され得る。

40

【0076】

いくつかの実施形態において、第2の捕捉剤は、同様に第1の捕捉剤と結合する固体基質に直接結合される。いくつかの実施形態において、第2の捕捉剤はストレプトアビジンまたはアビジンであり、それはビオチン化された第1の捕捉剤と結合し得る（例えば、ビオチン化されたポリ（A）結合タンパク質）。いくつかの実施形態において、第2の捕捉剤はプロテインAまたはプロテインGである。いくつかの実施形態において、第2の捕捉剤はグルタチオンである。いくつかの実施形態において、第2の捕捉剤は、ニッケルコートイングされた基質、例えば、Niセファロース、NTA-アガロース、His60 Ni、His Pur樹脂、またはTALON樹脂である。いくつかの実施形態において、第

50

2の捕捉剤は、第1の捕捉剤に対して特異的である抗体、例えば、抗HAまたは抗myc抗体である。

【0077】

本明細書に記載の方法の正確さは、部分的には、それらの順応性によることが理解されるであろう。上述の取り合わせの全ての構成が、本開示によって意図される。例えば、いくつかの実施形態において、mRNAはその3'末端によって（例えば、固定化されたオリゴ-dTまたはポリA結合タンパク質のポリA尾部へのハイブリダイゼーションによって）捕捉され、キャップの存在は、キャップ特異的結合物質とキャップされたmRNAとの間の複合体の形成によって定量化される。しかしながら、他の実施形態において、その5'末端によって、例えば、またはキャップが、ストレプトアビジンコーティングされたプレートとの相互作用によってビオチン化される場合、キャップされたmRNAと固体担体上に固定化されたキャップ特異的結合物質との間の複合体の形成によって、キャップされたmRNAを補足することが可能である）。次いで、キャップされたmRNAの存在は、露出されたポリA尾部に直接結合する第1の検出剤の添加によって定量化され得る（すなわち、ポリA結合タンパク質が捕捉剤ではなく、検出剤として機能し得る）。ポリA尾部への第1の捕捉剤の結合は、検出可能なシグナルを産生する第2の捕捉剤の添加によって可視化され得る（例えば、HRP接合抗PABP抗体）。

10

【0078】

キャップ特異的結合物質

「キャップ特異的結合物質」は、本明細書で使用する場合、上述の通りmRNAキャップまたはキャップ類似体を選択的に結合する任意の物質（タンパク質、小分子など）を指す。本発明に好適なキャップ特異的結合物質は、mRNAキャップまたはキャップ類似体（例えば、本明細書に記載のもの）に、特異的にまたは選択的に結合し、結合事象は検出可能であることが望ましい。

20

【0079】

いくつかの実施形態において、キャップ特異的結合物質はタンパク質である。特定の実施形態において、タンパク質は真核生物開始因子4E（「eIF-4E」）である。eIF-4Eは、キャップ系mRNA精製において使用され（例えば、Edery, I. et al., "An efficient strategy to isolate full-length cDNAs based on an mRNA cap retention procedure (CAPture)", Mol. Cell. Biol., 15:3363-3371 (1995)を参照されたい）、そのキャップ特異的結合特性は、本発明での使用に適応できる。

30

【0080】

いくつかの実施形態において、キャップ特異的結合物質は、 m^7G 、 m^7GpppG 、 m^7GpppA 、 m^7GpppC に特異的に結合する抗体、非メチル化キャップ類似体（例えば、 $GpppG$ ）、ジメチル化キャップ類似体（例えば、 $m^{2,7}GpppG$ ）、トリメチル化キャップ類似体（例えば、 $m^{2,2,7}GpppG$ ）、ジメチル化対称的キャップ類似体（例えば、 m^7Gpppm^7G ）、またはアンチリバースキャップ類似体（例えば、 $ARCA$ 、 $m^{7,2,0}meGpppG$ 、 $m^{7,2,d}GpppG$ 、 $m^{7,3,0}meGpppG$ 、 $m^{7,3,d}GpppG$ 、及びそれらの四リン酸誘導体）を含むが、これらに限定されないキャップ特異的抗体である。キャップ特異的抗体は、標準方法を使用して産生され得る。例示的な抗 m^7G 抗体は、以下に詳細が記載される。

40

【0081】

他のキャップ特異的結合タンパク質が、本発明の実施形態で使用されてもよい。これらは、核キャップ結合タンパク質亜単位1、核キャップ結合タンパク質亜単位2、核キャップ結合複合体などを含む。

【0082】

いくつかの実施形態において、キャップ特異的結合タンパク質は、修飾されて（例えば、ビオチン化されるかまたはタグ付けされる）、固体担体への結合を促進する。例えば、

50

G S T - e I F - 4 E に基づくキャップ結合アッセイは、当該技術分野において既知である（例えば、McKracken, S. et al., "5'-capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II", Genes & Dev., 11:3306-3318 (1997) を参照されたい）。

【0083】

上述のように、キャップ特異的結合物質とキャップされた mRNA との間の複合体の量の定量的判定は、複合体の形成に関連した検出可能なシグナルを測定することを含む。いくつかの実施形態において、検出可能なシグナルは、キャップ特異的結合物質に直接関連している。いくつかの実施形態において、そこでは、キャップ特異的結合物質と結合する二次薬剤を介して、検出可能なシグナルがキャップ特異的結合物質に間接的に関連している（例えば、二次薬剤がキャップ特異的結合物質に対する抗体である以下の ELISA 考察）。検出可能なシグナルが直接または間接的にキャップ特異的結合物質に関連しているかどうかに関わらず、検出可能なシグナルは、蛍光シグナル、比色シグナル、または放射シグナルであり得る。一般的に、シグナルの強度は、サンプル中のキャップされた mRNA 標的のおよその量に直接比例する。シグナルはまた、フィコエリトリン、アレクサ 532、ストレプトアビジン - フィコエリトリン、及びストレプトアビジン - アレクサ 532 の群から選択され得る。いくつかの実施形態において、シグナルは、酵素活性（すなわち、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）、化学発光、放射能、赤外線放射、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、または当業者に既知の任意の他の方法によって検知される。

10

20

【0084】

抗 m⁷G キャップ抗体

いくつかの実施形態において、キャップ特異的結合タンパク質は抗 m⁷G 抗体である。抗 m⁷G 抗体は当該技術分野において既知であり、市販されている。本発明の実施形態で使用するための抗 m⁷G 抗体は、参照により本明細書に組み込まれる Meredith, R. D. and Erlanger, B. F., "Isolation and characterization of rabbit anti-m⁷G-5'P antibodies of high apparent affinity", Nucleic Acids Res., 6:2179-2191 (1979) に記載されるものを含む。特定の実施形態において、抗体は、マウスモノクローナル抗 m⁷G-cap 抗体である（例えば、Synaptic Systems から市販される）。

30

【0085】

m⁷G キャップ及びキャップ類似体に対する追加の抗体は、本発明の範囲内に包含され、当業者に周知の方法によって産生され得る。本明細書で使用する場合、抗 m⁷G 抗体は、mRNA m⁷G キャップの任意のエピトープに特異的に結合する任意の抗体またはそのフラグメント抗体を含む。本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、所定のタンパク質もしくはペプチド、またはそれらのフラグメントに特異的に反応する免疫グロブリン及びそのフラグメントを含むと意図される。例えば、用語「抗体」は、それらが所望の生物学的活性を示す限り、無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一ドメイン抗体（例えば、サメ単一ドメイン抗体（例えば、IgNAR またはそのフラグメント））、及び抗体フラグメントを含む。好適な抗体はまた、マウス抗体、ヤギ抗体、ウサギ抗体、ヒト抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、接合抗体（すなわち、他のタンパク質、放射性標識、細胞毒に接合または融合する抗体）、及び抗体フラグメントを含むが、これらに限定されない。

40

【0086】

本明細書で使用する場合、「抗体フラグメント」は、例えば、抗体の抗原 - 結合または可変領域などの無傷の抗体の一部を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及び Fv フラグメント、三量体 (triabody)、四量体 (

50

t e t r a b o d y)、線状抗体、単鎖抗体分子が挙げられる。用語「抗体フラグメント」は、複合体を形成するために、特異的抗原に結合することによって抗体のように働く任意の合成されたまたは遺伝子組み換えされたタンパク質も含む。例えば、抗体フラグメントは、単離されたフラグメント、重鎖及び軽鎖の可変領域からなる「Fv」フラグメント、軽鎖及び重鎖可変領域がペプチドリンカー(「ScFvタンパク質」)によって結合される組み換え型単鎖ポリペプチド分子、及び超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位を含む。

【0087】

抗m⁷G抗体は、当該技術分野において周知の方法を使用して生成され得る。例えば、抗体生成のためのプロトコルは、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, (1988)に記載される。典型的には、抗体は、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ラクダ、ラマ、サメ、または他の適切な宿主内で生成され得る。あるいは、抗体は、ニワトリ内で作製され得、IgY分子を生成する(Schad et al., ALTEX 13(5): 80-85 (1996))。いくつかの実施形態において、本発明に好適な抗体は、類人猿抗体である。例えば、ヒヒにおいて治療的に有用な抗体を産生するための一般的な技術は、例えば、Goldenberg et al., 国際特許公開第WO91/11465号(1991), 及びLosman et al., Int. J. Cancer, 46: 310 (1990)で見出され得る。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、ハイブリードーマ法を使用して調製され得る(Milstein and Cuello, Nature, 305: 537-40 (1983))。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体はまた、組み換え法によって作製され得る(例えば、米国特許第4,166,452号を参照されたい)。

【0088】

B細胞の不死化によってモノクローナル抗体を産生することに関連する多くの困難は、ファージディスプレイ法を使用して、大腸菌内の抗体フラグメントを操作及び発現することによって克服され得る。高親和性モノクローナル抗体の回収を確実にするために、組み合わせの免疫グロブリンライブラリーは、典型的に、大きいレパートリーサイズを含まなければならない。典型的な方略は、逆転写酵素を用いてcDNAを合成するために、免疫化したマウスのリンパ球または脾臓細胞から得たmRNAを使用する。重鎖及び軽鎖遺伝子はPCRによって別々に増幅され、ファージクローニングベクター内に連結される。1つが重鎖遺伝子を含むし、1つが軽鎖遺伝子を含む2つの異なるライブラリーが産生される。ファージDNAは、各ライブラリーから単離され、重鎖及び軽鎖配列は、共に連結され、一括されて、組み合わせのライブラリーを形成する。各ファージは、ランダムな一組の重鎖及び軽鎖cDNAを含むし、大腸菌感染の際に、感染細胞中の抗体鎖の発現を導く。対象の抗原を認識する抗体を識別するために、ファージライブラリーは、プレティングされ、プレート中に存在する抗体分子はフィルターに転移される。フィルターは、標識付き抗原と共に放射活性を持ってインキュベートされ、次いで、洗浄されて、過剰な非結合リガンドを除去する。オートラジオグラム上の放射性スポットは、抗原と結合する抗体を含むプレートを確認する。ヒト免疫グロブリンファージライブラリーを産生するのに有用なクローニング及び発現ベクターは、例えば、STRATAGENEクローニングシステム(La Jolla, Calif.)から得られ得る。

【0089】

同様の方略が高親和性scFvを得るために用いられ得る。例えば、Vaughn et al., Nature Biotech., 14: 309-314 (1996)を参照されたい。大きいレパートリーを有するscFvライブラリーは、全ての既知のV_H、V_K、及びV_L遺伝子ファミリーに応じたPCRプライマーを使用して、V_H遺伝子を非免疫化ヒトドナーから単離することによって構築され得る。増幅後、V_K及びV_L プールは、1つのプールを形成するために組み合わせられる。これらのフラグメントは、ファージミドベクター内に連結される。次いで、scFvリンカー、(Gly₄, Ser)₃は、V

10

20

30

40

50

Ｌフラグメントのファージミド上流内に連結される。V_H及びリンカーV_Lフラグメントは、増幅され、JH領域上に集められる。結果として生じるV_HリンカーV_Lフラグメントは、ファージミドベクター内に連結される。ファージミドライブラリーは、上述の通りフィルターを使用して、または免疫チューブ(Nunc; Maxi sorp)を使用して、洗浄され得る。同様の結果は、免疫化ウサギのリンパ球または脾臓細胞から組み合わせの免疫グロブリンライブラリーを構築することによって、かつピキアパストリス(P. pastoris)中のscFv構築物を発現することによって、達成され得る。例えば、Ridder et al., BIOTECHNOLOGY, 13:255-260(1995)を参照されたい。さらに、適切なscFvの単離後、より高い結合親和性及びより遅い解離速度を有する抗体フラグメントは、CDR3変異誘発及び鎖シャフリング(chain shuffling)などの親和性成熟過程によって得られ得る。例えば、Jackson et al., BR. J. CANCER, 78:181-188(1998); Osbourn et al., IMMUNOTECHNOLOGY, 2:181-196(1996)を参照されたい。

10

【0090】

抗体フラグメントの別の形態は、単一CDRをコードするペプチドである。CDRペプチド(「最小認識単位」)は、対象の抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。かかる遺伝子は、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成するために、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって、調製される。例えば、Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106(1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), p. 166-179(Cambridge University Press 1995); 及びWard et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al. (eds.), p. 137-185(Wiley-Liss, Inc. 1995)を参照されたい。

20

30

【0091】

いくつかの実施形態において、本発明に好適な抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。非ヒト抗体のヒト化形態は、非ヒトIgに由来する最小配列を含有するキメラIg、Ig鎖、またはフラグメント(Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、またはAbの他の抗原-結合部分配列など)である。一般的には、ヒト化抗体は、非ヒト起源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的に「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列をげっ歯類相補性判定領域(CDR)またはCDR配列に置換することによって達成される(Riechmann et al., Nature, 332:323-7(1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-6, (1988))。かかる「ヒト化」抗体は、実質的に無傷のヒト可変ドメイン未満が、非ヒト種からの対応する配列によって置換されたキメラAb(米国特許第4,816,567号)である。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、典型的に、いくつかのCDR残基及び恐らくいくつかのFR残基が、げっ歯類Abs中の類似部位からの残基によって置換されるヒト抗体である。ヒト化抗体は、レシビエントのCDRからの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種のCDRからの残基(ドナー抗体)によって置き換えられるヒトIg(レシビエント抗体)を含む。場合によっては、対応する非ヒト残基は、ヒトIgのFvフレームワーク残基に取って代わる。ヒト化抗体は、レシビエント抗体、または移入されたCDR

40

50

もしくはフレームワーク配列におけるいずれにも見出されない残基を含み得る。一般的に、ヒト化抗体は、全てとは言えないにしてもほとんどのCDR領域が、非ヒトIgのものに対応し、全てとは言えないにしてもほとんどのFR領域がヒトIg共通配列のものである少なくとも1つ、及び典型的に2つの可変ドメインの全てを実質的に含む。

【0092】

高親和性抗 m^7G 抗体の使用は、定量的特異性にとって重要である。したがって、いくつかの実施形態において、本発明に好適な抗 m^7G 抗体またはそのフラグメントは、およそ500 nM以上、100 nM、10 nM、1 nM、500 pM、100 pM、50 pM、10 pM、1 pM、500 fM、400 fM、300 fM、200 fM、100 fM、50 fM、10 fM、1 fMの結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、本発明に好適な抗 m^7G 抗体またはそのフラグメントは、およそ500 nM~1 fM、500 nM~10 fM、500 nM~100 fM、500 nM~1 pM、10 nM~1 fM、10 nM~100 fM、10 nM~1 pM、1 nM~1 fM、1 nM~100 fM、1 nM~500 fM、1 nM~1 pM、1 nM~10 pM、1 nM~50 pM、1 nM~100 pMの範囲の結合親和性を有する。

【0093】

ELISAに基づくmRNAキャップ定量化

本発明のいくつかの実施形態は、固体基質（例えば、ストレプトアビジンコーティングされた96ウェルプレートまたは384ウェルまたはその他）に結合する第1の捕捉剤（例えば、ビオチン標識付きポリ-dTオリゴ）を使用するELISAに基づくアッセイを含むメッセンジャーRNA（mRNA）合成の間のキャップ形成効率の定量化のための発明の方法を必要とする。第1の捕捉剤は、インビトロの合成されたmRNAと結合するために使用される。一旦結合すると、キャップ特異的結合物質は、その抗原として、 m^7G キャップ部分を標的とする。いくつかのELISAに基づく実施形態において、一次キャップ特異的結合物質は、抗 m^7G 抗体（例えば、マウスモノクローナル抗 m^7G 抗体）である。二次標識付き抗体は、可視化/定量化のために使用される（図1参照）。いくつかの実施形態において、キャップ特異的結合物質は、別のキャップ特異的タンパク質（例えば、eIF-4E）であり、二次抗体は、キャップ特異的タンパク質に対して特異的である。いくつかの実施形態において、二次抗体は、検出剤であるか、またはそれを提供し、例えば、検出可能な基質を産生するために酵素活性を有する。様々な発色/蛍光剤が置換及び適用され得る。特注合成されたビオチン化されたキャップ（ m^7G pppG-ビオチン）は、正の対照として使用され得る。これは、適切な特徴付けに不可欠である、新たに合成されたmRNA構造物上のキャップ形成部分を直接定量化するための新たな方法を表す。ELISAアッセイ及び条件の最適化のためのプロトコルは、当該技術分野において既知であり、例えば、参照により本明細書に組み込まれるThermo Scientific, "Elisa technical guide and protocols", TECH TIP #65 (2010) (www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdfで入手可能)を参照されたい。

【0094】

したがって、本発明のELISAに基づく実施形態において、二次薬剤は、選択的なキャップ結合物質に対して特異的な抗体である。いくつかの実施形態において、二次薬剤は、放射性または蛍光で標識付けされる。好ましい実施形態において、二次薬剤は、基質を検出可能産物に変換する酵素を含む。いくつかの実施形態において、酵素はアルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼである。産物は、発色、化学蛍光（chemifluorescent）、または化学発光であり得る。特定の実施形態において、基質は、p-ピトロフェニルリン酸二ナトリウム塩（PNPP）、2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ニアンモニウム塩（ABTS）、o-フェニレンジアミン二塩酸塩（OPD）、または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）からなる群から選択される。特定の実施形態において、産物は、発色性であり、370~652ナノメートルの光を吸収する。上述の通り、シグナルの強度は

、基質上に捕捉されたおよその量のキャップされたRNA標的に比例する。

【0095】

対照を使用して、キャップされたmRNAの量を定量化し得る。いくつかの実施形態において、対照は、既定量のキャップされたmRNAを有するmRNAサンプルを含む。いくつかの実施形態において、対照は、所定量の合成されたキャップを含む。いくつかの実施形態において、特注合成されたビオチン化されたキャップ(m^7GpppG -ビオチン)は、正の対照として使用される。

【0096】

いくつかの実施形態において、アッセイは、当業者に周知の方法による較正曲線を確立することによって定量的になされる。言い換えると、免疫反応の度合は、既知の標準と未知のサンプルの光学密度との目視比較によって定性的にもしくは半定量的に、または既知のキャップ濃度のいくつかのサンプルを使用して調製された標準曲線との分光光度的な比較によって定量的に判定され得る。例えば、定量化は、一次抗体のエピトープを保持し、固体基質によって結合され得る m^7G キャップ標準または標準物質一式を作製することによって実施され得る。これらの標準または標準物質は連続的に希釈され、標準または標準物質の試験された濃度それぞれからの結果として生じるシグナル値は、標準曲線を生成するために使用され、キャップされた標準または標準物質の濃度対結果として生じるシグナル値を図示する。一旦標準定量的曲線が、確立されると、アッセイは、標準曲線上に結果として生じるシグナルを示すことによって、サンプル中のキャップされたmRNAのレベルを判定するために使用される。

10

20

【0097】

キット

本発明は、本発明に従い本発明の方法を実行するのに有用な様々な試薬及び材料を含むキットをさらに提供する。本明細書に記載される定量的な手順は、診断研究所、実験室、または民間試験所によって実施され得る。本発明は、これらの異なる設定で使用する事ができるキットを提供する。

【0098】

例えば、本発明の方法に従ってキャップ特異的結合物質を提供することによって、mRNAサンプル中のmRNAキャップ形成効率を定量化するための材料及び試薬は、キット中に共に集められる。特定の実施形態において、発明のキットは、mRNAキャップと複合体を特異的に形成する少なくとも1つ以上の試薬、随意に複合体の形成を検出するための薬剤、及び本発明の方法に従ってキットを使用するための指示書を含む。

30

【0099】

各キットは、好ましくは、手順を特異的にさせる試薬を含む。したがって、mRNAキャップ形成効率を検出/定量化するために、キャップを有する複合体を特異的に形成する試薬は、抗体であり得る。キットは、複合体の形成を検出する検出剤または二次薬剤(例えば、HRP-接合抗体)も含み得る。キットは、mRNA(例えば、ビオチン化された96ウェルプレート)の単離のために随意に第2の捕捉剤と接合する固体基質も含み得る。キットは、第1の捕捉剤、例えば、mRNAと特異的に相互作用するタンパク質またはオリゴヌクレオチドも含み得る。

40

【0100】

本発明に従うキットまたは他の製造品は、様々な試薬を保持するために1つ以上の容器を含み得る。好適な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ(例えば、プレフィルドシリンジ)、アンプルを含む。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得る。

【0101】

いくつかの実施形態において、本発明のキットは、本明細書に記載される対照レベルを判定するための好適な対照レベルまたは対照サンプルを含み得る。いくつかの実施形態において、本発明のキットは、本発明の1つ以上の方法に従ってキットを使用するための指示書を含み得、インビトロの転写及びキャップ形成のための指示書を含み得る。

50

【実施例】

【0102】

実施例1：mRNAの合成

ホタルルシフェラーゼ（FFL）及びヒトエリスロポエチン（EPO）mRNAを、それぞれの遺伝子をコードするプラスミドDNAテンプレートからインビトロ転写によって合成した。インビトロの転写は、グアニリルトランスフェラーゼを介したGTPの酵素的接合によって、塩基1のリボース環の2'OH基に2'-O-メチル残基を有する5'キャップ構造、キャップ1の付加を含んだ。およそ200ヌクレオチド長の3'ポリ（A）尾部（ゲル電気泳動法によって判定される）を、ポリAポリメラーゼと共に、ATPの付加によって組み込んだ（以下の詳細な反応条件を参照されたい）。インビトロの転写産物は、以下の配列において、それぞれ、X及びYとして表される5'及び3'非翻訳領域を含んだ。

10

【0103】

ヒトエリスロポエチン（EPO）mRNA（配列番号1）

【化5】

X₁AUGGGGGUGCACGAAUGUCCUGCCUGGCUGUGGCUUCUCCUGUCCCGC
UGUCGCUCCUCUGGGCCUCCCAGUCCUGGGCGCCCCACACGCCUCAUCU
GUGACAGCCGAGUCCUGGAGAGGUACCUCUUGGAGGCCAAGGAGGCCGAG
AAUAUCACGACGGGCUGUGCUGAACACUGCAGCUUGAAUGAGAAUAUCAC
UGUCCCGAGACACCAAAGUUAAUUUCUAUGCCUGGAAGAGGAUGGAGGUCG
GGCAGCAGGCCGUAGAAGUCUGGCAGGGCCUGGCCCUUCGCAGCCUCACCA
GUCCUGCGGGGCCAGGCCCUGUUGGUCAACUCUCCCGAGCCGUGGGAGCC
CCUGCAGCUGCAUGUGGAUAAAGCCGUCAGUGGCCUUCGCAGCCUCACCA
CUCUGCUUCGGGCUCUGGGAGCCCAGAAGGAAGCCAUCUCCCUCCAGAU
GCGGCCUCAGCUGCUCCACUCCGAACAAUCACUGCUGACACUUUCCGCAAA
CUCUCCGAGUCUACUCCAAUUUCCUCCGGGGAAAGCUGAAGCUGUACAC
AGGGGAGGCCUGCAGGACAGGGGACAGAUGAY₁

20

【0104】

コドン最適化ホタルルシフェラーゼ（FFL）mRNA（配列番号2）

30

【化 6】

X_2 AUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCC
 ACUCGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGC
 UACGCCCUGGUGCCCGGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUAUCGAGG
 UGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGA
 AGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUG
 CAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUCAUGCCCGUGUUGGGUGCCCUGUUC
 AUCGGUGUGGCUGUGGGCCCCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGC
 UGCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCCACCGUCGUUUUCGUGAGCAA
 GAAAGGGCUGCAAAAGAUAUCCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGAUCAUA
 CAAAAGAUCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAA
 GCAUGUACACCUUCGUGACUUCCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUA
 CGACUUCGUGCCCGAGAGCUUCGACCGGGACAAAACCAUCGCCCUGAUC
 AUGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGC
 ACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUCGG
 CAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGUGGUGCCAUUUCAC
 CACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUC
 GGGUCGUGCUCAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUU
 GCAAGACUAUAAGAUUCAAUCUGCCCUGCUGGUGCCCACACUAUUUAGC
 UUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGC
 ACGAGAUCCGCGCGGGCGGGCGCCGCUCAGCAAGGAGGUAGGUGAGGC
 CGUGGGCCAAACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUG
 ACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUCACCCCCGAAGGGGACGACAAGC
 CUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGG
 ACUUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUG
 CGUCCGUGGCCCCAUGAUCAUGAGCGGCUACGUUAACAACCCCGAGGCU
 ACAAACGCUCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCG
 CCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGUGGACCGGCUGAAGAG
 CCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGC
 AUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCGGGGUGCGCCGGCCUGC
 CCGACGACGAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGCAGUCGUCGUGCUGGAACA
 CGGUAAAACCAUGACCGAGAAGGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAG
 GUUACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAG
 GUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCGCAAGAUCGCGGAGA
 UUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAY₂

10

20

30

【 0 1 0 5 】

X_1 / Y_1 及び X_2 / Y_2 の 5' 及び 3' UTR 配列は以下の通りであった。

【 0 1 0 6 】

X_1 = GGACAGAUCCGCGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUU
 GACCUCCAUAAGAACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCG
 GCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGCCCGUGCCAA
 GAGUGACUACCGUCCUUGACACG (配列番号 3)

40

【 0 1 0 7 】

X_2 = GGGAUCCUACC (配列番号 4)

【 0 1 0 8 】

Y_1 = CGGGUGGCAUCCCUUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCU
 CCUGGCCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCAACAGCCUU
 GUCCUAAUAUAAAUUAAGUUGCAUC (配列番号 5)

【 0 1 0 9 】

50

$Y_2 = U U U G A A U U$ (配列番号 6)

【0110】

mRNAの合成を、完全なリボヌクレアーゼを含まない条件下で実施した。全てのチューブ、バイアル、ピペットチップ、ピペット、緩衝液などがヌクレアーゼを含まない必要があった。メッセンジャーRNAを線状化DNAテンプレートから合成した。所望のmRNA前駆体(I VT)構築物を産生するために、約100 μ gの線状化DNA、rNTP(3.33 mM)、DTT(10 mM)、T7 RNAポリメラーゼ、リボヌクレアーゼ阻害剤、ピロホスファターゼ、及び反応緩衝液(10 \times 、800 mMのヘブス(pH 8.0)、20 mMのスペルミジン、250 mMのMgCl₂、pH 7.7)の混合物を、2.24 mlの最終容量にリボヌクレアーゼを含まない水で調製した。反応混合物を20 ~ 120分間37 でインキュベートした。完了の際に、混合物をさらに15分間、デオキシリボヌクレアーゼIで処理し、適宜反応を停止させた。

10

【0111】

前述のI VTステップからの精製されたmRNA産物を65 で10分間変性させた。別々に、一部のGTP(20 mM)、S-アデノシルメチオニン、リボヌクレアーゼ阻害剤、2'-O-メチルトランスフェラーゼ、及びグアニリルトランスフェラーゼを、8.3 mlの最終濃度へと反応緩衝液(10 \times 、500 mMのトリス-HCl(pH 8.0)、60 mMのKCl、12.5 mMのMgCl₂)と共に混合した。変性の際に、mRNAを氷上で冷却し、次いで、反応混合物に添加した。組み合わせた溶液を20 ~ 90分間37 でインキュベートした。完了の際に、一定分量のATP(20 mM)、ポリAポリメラーゼ、及び尾引き反応緩衝液(10 \times 、500 mMのトリス-HCl(pH 8.0)、2.5 MのNaCl、100 mMのMgCl₂)を添加し、合計反応混合物を約20 ~ 45分間、37 でさらにインキュベートした。完了の際に、最終反応混合物は反応を停止し、適宜精製される。

20

【0112】

実施例2：ビオチン-ストレプトアビジン系オリゴ-dT捕捉ELISAを使用するキャップ形成効率の定量化

この実施例は、キャップ形成効率を定量化するために例示的なELISA方法を示す。例示的な実施形態を図1に示す。市販のストレプトアビジンマイクロプレートを、洗浄緩衝液(0.05%のTween 20、0.01 MのPBS、pH 7.2)で3回洗浄し、軽く叩いて乾燥させた。市販の5'ビオチンオリゴdT20を、100 μ lの最終容量において1 ~ 5 pmol/ウェルで添加し、1時間、室温(RT)で、インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄し、遮断緩衝液320 μ l(0.01 MのPBS、0.5%のBSA、0.15%のTween 20)で1時間遮断した。

30

【0113】

メッセンジャーRNAサンプルを、10分間、94 で変性させ、30分間、室温でインキュベートした。20 pmol ~ 1 μ molのmRNAを含有する100 μ lのハイブリダイゼーション緩衝液(4 \times SSC、20 mMのヘブス、2 mMのEDTA、0.15%のTween 20)を各ウェルに添加し、1時間、室温でインキュベートした。プレートを、2 mMのEDTAを含有する洗浄緩衝液で3回洗浄した。

40

【0114】

一次抗体、マウスモノクローナル抗m⁷Gキャップ(100 μ lの一定分量における1:2000 ~ 1:25000希釈)をプレートの各ウェルに適用し、およそ1時間、室温でインキュベートした。プレートを、2 mMのEDTAを含有する洗浄緩衝液で3回洗浄した。洗浄後、100 μ lの二次抗体、ヤギ抗マウスHRP接合抗体(1:40,000希釈)を各ウェルに添加し、1時間、室温でインキュベートした。プレートを、2 mMのEDTAを含有する洗浄緩衝液で3回洗浄した。

【0115】

一次抗体及び二次抗体の相互作用を検出するために、TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)発色基質溶液を、製造業者の支持に従って調製し、100 μ lの

50

一定分量において、各ウェルに添加し、15分間、室温でインキュベートした。反応を100 μ Lの2N H_2SO_4 を添加することによって停止した。

【0116】

HRPを検出するときにTMBは認識可能な程度の青色を産生した。 H_2SO_4 の添加後、色は450nmでの、最大吸光度で黄色に変化し、それはMolecular Devicesプレートリーダーを使用して読み取られた。

【0117】

450nmでの吸光度を有するウェルはキャップされたmRNAの存在を示したことが見出される。サンプル当たりのキャップされたmRNAの定量的測定を、サンプルの平均吸光度値に続いて、ストレプトアビジンコーティングされたプレートに結合され、マウスモノクローナル m^7G キャップ抗体(Synaptic systems)によって検出されるビオチン接合 m^7G キャップ小分子の連続的に希釈された正の対照から生成された標準曲線(濃度対吸光度を図示する)の補間から判定する。

10

【0118】

実施例3：ポリA結合タンパク質系捕捉ELISAを使用するキャップ形成効率の定量化

この実施例は、ポリA結合タンパク質コーティングされたELISAプレートを使用する別の例示的なELISA方法を示す。具体的には、ELISAプレートを、コーティング緩衝液(50mMの $NaHCO_3$ 、pH9.6)を使用する1 μ g/mlのポリA結合タンパク質(「PABP」)でコーティングする。その後、プレートを洗浄し、遮断緩衝液(1 \times PBS、0.05%のTween20、2%のBSA)で遮断し、1時間、室温でインキュベートする。次いで、プレートを、洗浄緩衝液(1 \times PBS、0.05%のTween20)で3回洗浄する。

20

【0119】

mRNAサンプルを、10分間、94℃で変性させ、30分間、室温で、インキュベートする。次いで、サンプルを、RNAを含有するハイブリダイゼーション緩衝液(4 \times SSC、20mMのヘプス、2mMのEDTA、0.15%のTween20)においておよそ(20pmol~1 μ mol)の濃度に希釈する。およそ100 μ Lを各ウェルに添加し、1時間、室温でインキュベートする。

【0120】

一次抗体、マウスモノクローナル抗 m^7G キャップ(100 μ Lの一定分量における1:2000~1:25000希釈)をプレートの各ウェルに適用し、およそ1時間、室温でインキュベートする。プレートを、2mMのEDTAを含有する洗浄緩衝液で3回洗浄し、続いて、1:40,000希釈でヤギ抗マウスIgG Fc HRP接合二次抗体(Pierce31439)を添加し、1時間、室温でインキュベートする。洗浄緩衝液で3回洗浄した後、TMBを調製し、上記の通り添加する。室温で15分間インキュベートした後、反応を2N H_2SO_4 を添加することによって停止させ、プレートを上記の通り450nmで読み取る。

30

【0121】

代替的な実施形態において、市販のマイクロプレートを、PAIP2に特異的な抗体が予めコーティングされたその上に使用する。0.1 μ g/ml~10 μ g/mlでの100 μ Lの市販のヒト組み換え型PAIP2(Cusabio(登録商標))を、コーティング緩衝液(50mMの $NaHCO_3$ 、pH9.6)を使用して、各ウェルに添加し、続いて、1時間室温でインキュベートする。ヒト組み換え型PAIP2の存在は、固定化抗体に制約される。任意の非結合物質を除去した後、mRNAサンプルをキャップ形成効率定量化のために上記の通り、ウェルに添加する。一次抗体、マウスモノクローナル抗 m^7G キャップ(100 μ Lの一定分量における1:2000~1:25000希釈)をプレートの各ウェルに適用し、およそ1時間、室温でインキュベートする。プレートを、2mMのEDTAを含有する洗浄緩衝液で3回洗浄する。洗浄後、100 μ Lの二次抗体、ヤギ抗マウスHRP接合抗体(1:40,000希釈)を各ウェルに添加し、1時間、室温でインキュベートする。プレートを3回洗浄し、続いて、TMB発色基質溶液を添加する

40

50

。発色現像を停止し、色の強度を測定し、キャップされたmRNAの量を、上記の通り標準曲線を使用して定量化する。

【0122】

実施例4：インビボのタンパク質産生上のmRNA 5'キャップ形成の評価

この実施例において、我々は、インビボのタンパク質産生上のmRNA 5'キャップ形成の影響及びmRNA系治療の有効性に対するその潜在的影響を評価する。具体的には、我々は、ファブリ病で欠乏している - ガラクトシダーゼA (- Gal A) のインビボの産生上の5'キャップ形成の影響を評価する。ファブリ病は、重度の腎機能障害、角化血管腫、及び心室拡大及び僧帽弁閉鎖不全を含む循環障害を特徴とするX結合遺伝性リソソーム蓄積症である。ファブリ病はまた、抹消神経系に影響を及ぼし、四肢における苦悶の灼熱痛の発症を引き起こす。ファブリ病は、酵素 - ガラクトシダーゼA (- Gal A) の欠乏によって引き起こされる。 - Gal A は、様々な複合糖質の終端 - ガラクトシル部分を切断するリソソームグリコヒドロラーゼである。ファブリ病は、中性スフィンゴ糖脂質、セラミドトリヘキソシド (C T H) の異化の遮断、ならびに細胞内及び血流中の酵素基質の蓄積をもたらす。

10

【0123】

ヒト - Gal A、GLAをコードするcDNA及び遺伝子を単離し、配列決定した。ヒト - Gal A は、N末端31アミノ酸がシグナルペプチドである429アミノ酸ポリペプチドとして発現される。ヒト酵素は、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞において発現された (Desnick et al. , 米国特許第5,356,804号 ; Ioannou et al. , J. CELL BIOL. 119:1137 (1992)) ; 及び insect cells (Calhoun et al. , WO90/11353) 。

20

【0124】

ファブリ病を患っている個体は、ヒト - Gal Aを用いた酵素補充療法によって処置され得る (例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,458,574号を参照されたい) 。 - Gal A 欠乏の発現を調節し、または補い、ひいては、根底にある欠乏を改善するさらなる方策が、関連する障害のための適切な治療法の開発に有用であり得る。かかる方策は、現存の遺伝子欠陥を補正することが可能であり、かつ/または1つ以上の標的細胞に有益な機能を提供することが可能である核酸の細胞内送達 (例えば、GLA mRNA) の方法を含む。標的組織及び細胞への成功裏の送達後、組成物及び核酸は標的細胞をトランスフェクトし、核酸 (例えば、GLA mRNA) は、対象の遺伝子産物 (例えば、 - GALA) へと翻訳され得るか、さもなければ、対象の遺伝子産物の存在または発現を調節/制御し得る。かかる方法は、以前に記載された。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国付与前公開第2011/0244026号を参照されたい。

30

【0125】

この実施例において、我々は、インビボのタンパク質産生上の5'キャップ形成の影響を評価した。ヒトGLA mRNAを、遺伝子をコードするプラスミドDNAテンプレートからのインビトロの転写によって合成し、それは、続いて、キャップ0またはキャップ1のいずれかの5'キャップ構造を付加した (Fechter, P. et al. , J. Gen. Virology, 86:1239-1249 (2005)) 。ゲル電気泳動法によって判定されたおよそ200ヌクレオチド長の3'ポリ (A) 尾部も付加された。GLA mRNA中に存在する5'及び3'不飽和領域は、以下に示される配列番号7におけるX及びYとして表される。

40

【0126】

- ガラクトシダーゼ (GLA) mRNA (配列番号7) :

【化 7】

X₂AUGCAGCUGAGGAACCCAGAACUACAUCUGGGCUGCGCGCUUGCGCUUCGCUU
 CCUGGCCCUCGUUCCUGGGACAUCCCUGGGGCUAGAGCACUGGACAAUGGAUUG
 GCAAGGACGCCUACCAUGGGCUGGCUGCACUGGGAGCGCUUCAUGUGCAACCUUG
 ACUGCCAGGAAGAGCCAGAUUCCUGCAUCAGUGAGAAGCUCUUAUGGAGAUGG
 CAGAGCUCAUGGUCUCAGAAGGCUGGAAGGAUGCAGGUUAUGAGUACCUCUGCA
 UUGAUGACUGUUGGAUGGCUCCCCAAAGAGAUUCAGAAGGCAGACUUCAGGCAG
 ACCCUCAGCGCUUCCUCAUGGGAUUUCGCCAGCUAGCUAAUUAUGUUCACAGCAA
 AGGACUGAAGCUAGGGAUUUAUGCAGAUUUGGAAUAAAACCUGCGCAGGCUU
 CCCUGGGAGUUUUGGAUACUACGACAUUGAUGCCCAGACCUUUGCUGACUGGGG
 AGUAGAUCUGCUAAAAUUUGAUGGUUGUUACUGUGACAGUUUGGAAAAUUUGGC
 AGAUGGUUAUAAGCACAUUGUCCUUGGCCUGAAUAGGACUGGCAGAAGCAUUGU
 GUACUCCUGUGAGUGGCCUCUUUAUAUGUGGCCCUUUCAAAAGCCCAAUUAUACA
 GAAAUCCGACAGUACUGCAAUCACUGGCGAAAUUUUGCUGACAUUGAUGAUUCC
 UGGAAAAGUAUAAAGAGUAUCUUGGACUGGACAUCUUUUAACCAGGAGAGAAU
 GUUGAUGUUGCUGGACCAGGGGGUUGGAAUGACCCAGAUUGUUAGUGAUUGGC
 AACUUUGGCCUCAGCUGGAAUCAGCAAGUAACUCAGAUGGCCUCUGGGCUAUCA
 UGGCUGCUCCUUUAUUAUGUCUAAUGACCUCCGACACAUCAGCCCUCAAGCCAA
 AGCUCUCCUUCAGGAUAAGGACGUAAUUGCCAUCAAUCAGGACCCCUUGGGCAAG
 CAAGGGUACCAGCUUAGACAGGGAGACAACUUUGAAGUGUGGGAACGACCUCUC
 UCAGGCUUAGCCUGGGCUGUAGCUAUGAUAAACCGGCAGGAGAUUGGUGGACCU
 CGCUCUUUAUACCAUCGCAGUUGCUUCCCUGGGUAAAGGAGUGGCCUGUAAUCCUG
 CCUGCUUCAUCACACAGCUCCUCCCUGUGAAAAGGAAGCUAGGGUUCUAUGAAUG
 GACUUCAAGGUUAAGAAGUCACAUAAAUCCACAGGCACUGUUUUGCUUCAGCU
 AGAAAAUACAAUGCAGAUUGUCAUUAAGACUUAACUUUAAY₂

10

20

【 0 1 2 7 】

X = G G G A U C C U A C C (配列番号 4)

【 0 1 2 8 】

Y = U U U G A A U U (配列番号 6)

【 0 1 2 9 】

ポリ A 挿入物 (C O - G L A - ポリ A) を有するコドン最適化 - ガラクトシダーゼも
 、いくつかの実施形態において利用される。(配列番号 8)

30

【化 8】

X₁AUGCAGCUGAGGAACCCAGAGCUCCAUCUCGGAUGUGCACUGGCACUUAGAUAU
 UCUCGCGCUUGUGUCGUGGGACAUCCCCGGAGCCAGGGCGCUGGAUAAUGGGCUC
 GCCCGGACUCCCACAAUGGGUUGGCUGCACUGGGAGCGCUUUAUGUGCAAUCUGG
 ACUGCCAGGAAGAGCCCCGAUAGCUGUAUUUCGGAGAAGCUCUUAUGGAAAUGG
 CGGAGUUGAUGGUGUCCGAAGGGUGGAAGGAUGCGGGGAUAUGAGUAUCUGUGUA
 UCGAUGACUGCUGGAUGGCACCGCAGCGAGAUAUCGGAGGGGGCGAUUGCAGGCCG
 ACCCUCAGCGCUUCCCUCAUGGAAUUCGGCAGCUGGCCAACUACGUACACUCAA
 AGGACUUAAGUUGGGGAUCUACGCGGACGUCGGUAAUAAGACAUGCGCUGGGUU
 CCCGGGGAGCUUCGGAUACUAUGAUUAUGAUGCCCAGACCUUCGCGGACUGGGGA
 GUGGACUUGCUUAAGUUUGAUGGUUGUACUGUGACUCAUUGGAAAACUUGGCG
 GAUGGGUAUAAACAUUGUCCUUGGCCUUGAAUCGGACAGGGCGGUCGAUCGUC
 UACAGCUGCGAAUGGCCUUUGUAUAUGUGGCCGUUCCAGAAACCCAACUACACCG
 AAAUUCGCCAGUAUUGCAAUCACUGGAGAAACUUCGCCGAUAUCGACGAUUCGU
 GGAAAUCAAUCAAGUCCAUCUCGACUGGACGUCCUUAACCAAGAGAGAAUCGU
 AGAUGUGGCCGGACCGGGAGGAUGGAACGACCCUGAUUUGCUUGUAAUUGGCAA
 CUUUGGACUCUCGUGGAACCAGCAAGUAACGCAAUUGGCACUCUGGGCUAUAUG
 GCUGCGCCCCUGUUAUGUCAAAACGACCUCAGGCACAUCUCGCCGCAGGGCGAAAG
 CCUUGCUUCAAGAUAAAGGACGUCAUCGCGAUUAAUCAGGACCCGCUGGGGAAGCA
 GGGCUAUCAGCUUAGACAGGGCGACAUAUUUGAGGUCUGGGAGCGACCCCUGAG
 CGGACUCGCAUGGGCGGUGGCAAUGAUCAAUAGGCAGGAAAUUGGUGGGCCGAG
 GUCGUACACUAUCGCCGUCGCGUCGUUGGGAAAGGGUGUGGCGUGUAAUCCAGC
 GUGCUUUAUCACCCAACUGCUGCCCGUCAAGCGCAAACUGGGUUUUUACGAAUGG
 ACGAGCAGACUUCGCUCACACAUAUAAACCAACGGGUACGGUGUUGCUCCAGCUCG
 AGAAUACAAUGCAAAUGUCACUUAAGAUAUUGCUCUGACGGGUGGCAUCCCUGU
 GACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCA
 GCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AA
 AA

10

20

【0130】

GLAmRNAを、使用時まで - 80 で 1 mg / mL の最終濃度で水中に保存した。全ての mRNA 濃度を、吸収 (260 nm の max) により判定した。

30

【0131】

GLA キャップ 0 mRNA、GLA キャップ 1 mRNA、GLA mRNA、及び他の
 対照のインビボの送達のために好適な配合物は、1つ以上のカチオン性脂質、ヘルパー脂
 質、及びペグ化脂質を用いる変化する比率の多成分脂質混合物を含む。カチオン性脂質は
 、(排他的ではないが)DOTAP(1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウム
 プロパン)、DODAP(1,2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン)、
 DOTMA(1,2-ジ-O-オクタデセニル-3-トリメチルアンモニウムプロパン)
 、DLinDMA(Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I., "Cationic lipid saturation
 influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. Contr. Rel., 107
 : 276 - 287 (2005))、DLin-KC2-DMA(サンプル、S. C. et
 al., "Rational Design of Cationic Lipids
 for siRNA Delivery", Nature Biotech., 28: 1
 72 - 176 (2010))、C12-200(Love, K. T. et al., "Lipid-like materials for low-dose in vivo
 gene silencing", Proc Natl Acad Sci. USA, 1
 07: 1864 - 1869 (2010))、HGT4003、ICE、ジアルキルアミノ
 系、イミダゾール系、グアニジウム系などを含み得る。ヘルパー脂質は、(排他的ではな

40

50

いが) DSPC (1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、DP
PC (1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン)、DOPE (1,
2 - ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、DPPE (1, 2 -
ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、DMPE (1, 2 -
ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン)、DOPG (1, 2 -
ジオレイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホ - (1' - rac - グリセロ 1))、コレステ
ロールなどを含み得る。ベグ化脂質は、(排他的ではないが) C6 ~ C20 の長さのアル
キル鎖 (複数可) を有する脂質に共有結合的に付着した最大 5 kDa 長のポリ (エチレン
) グリコール鎖を含み得る。mRNA の脂質カプセル化を、0.1% の Triton - X
100 の存在を伴う及び伴わない Ribogreen アッセイを実施することによって計
算した。粒径 (動的光散乱 (DLS)) 及びゼータ電位を、1 × PBS 及び 1 mM の KCl
の溶液中それぞれで Malvern Zetasizer 機器を用いて判定した。

10

【0132】

C12 - 200、DOPE、Chol、及び DMG - PEG2K の一定分量の 50 mg
/ mL のエタノール溶液を混合し、3 mL の最終容量へと、エタノールで希釈した。別々
に、CO - GLA mRNA (キャップ 0 またはキャップ 1) の水性緩衝溶液 (10 mM
のクエン酸塩 / 150 mM の NaCl、pH 4.5) を、1 mg / mL 貯蔵物から調製し
た。脂質溶液を、水性 mRNA 溶液中に急速に注入し、振盪して、20% のエタノール中
に最終懸濁液を生じさせた。結果として生じるナノ粒子懸濁液を濾過し、1 × PBS (p
H 7.4) で透析濾過し、濃縮し、2 ~ 8 で保管した。最終濃度 = 0.72 mg / mL
の GLA mRNA (カプセル化)。Zave = 85.5 nm (Dv (50) = 61.9
nm、Dv (90) = 113 nm)。

20

【0133】

mRNA が C12 - 200 系脂質内にカプセル化されたときに、GLA mRNA 内に
組み込まれたキャップの種類がタンパク質産生に影響を与えたかどうかを判定するため
に、野生型 (CD - 1) マウスにキャップされた GLA mRNA 種を注射し、その後、ヒ
ト GLA タンパク質産生を監視した実験を実行した。キャップされた mRNA 種は、キャ
ップ 0 (2' - O 位置で非メチル化) 及びキャップ 1 (2' - O メチル化) を含んだ。

【0134】

各研究の開始時におよそ 6 ~ 8 週間の年齢の雄の CD - 1 マウスを使用して、前述の研
究を実施した。サンプルを、カプセル化された GLA、EPO、FIX、または AIT
mRNA の 30 マイクログラムの等価合計投与量の単回ボース尾静脈注射によって導
入した。GLA タンパク質の血清濃度を 6 時間で判定した。全ての動物を、用量投与 (±
5%) の 6 時間後に CO₂ 室息によって安楽死させ、続いて、開胸及び末端心臓血液採取
をした。全血液 (最大取得可能な容量) を、安楽死させた動物上の心臓穿刺によって、血
清分離器チューブ内へ採取し、少なくとも 30 分間室温で凝血させ、10 分間、9300
g で、22 ± 5 で、遠心分離し、血清を抽出した。6 時間での中間血液採取のために
、およそ 40 ~ 50 µL の全血液を、顔面静脈穿刺または尾部切除によって採取した。未
処置動物から採取されたサンプルを、研究動物との比較のためベースライン GLA レベル
として使用する。各マウスの肝臓及び脾臓を採取し、3 つの部分に分配し、10% の中性
緩衝ホルマリンまたはスナップ冷凍のいずれかで保存し、80 で保存した。

30

40

【0135】

ヒト GLA タンパク質産生を酵素様免疫吸収分析アッセイ (「ELISA」) によって
測定した。二次 (検出) 抗体としてウサギ抗 Replagal IgG を伴う、捕捉抗体と
してヒツジ抗 Replagal G - 188 IgG を用いて、標準 ELISA 手法に従った
。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 接合ヤギ抗ウサギ IgG を、3, 3', 5, 5
' - テトラメチルベンジジン (TMB) 基質溶液の活性化のために使用した。20 分後、
2N H₂SO₄ を使用して反応を停止させた。Molecular Device Fl
ex Station 機器上の吸収 (450 nm) によって、検出を監視した。未処置
マウス血清及びヒト Replagal (登録商標) タンパク質を、負及び正の対照、それ

50

それぞれとして使用した。

【0136】

図3に示す通り、C12-200系脂質ナノ粒子中に充填されたCO-GLA mRNAのキャップされた種の静脈内注射後、ヒトGLAタンパク質の実質的なレベルは、6時間以内にマウス血清において検出され得る。とりわけ、キャップ0構造のものに対してキャップ1構造を有するmRNAを用いるときに統計的にタンパク質生産の著しい増加がある。これらの結果は、mRNA合成過程のキャップ形成効率を特徴付け、定量化する能力を有することの重要性を実証した。

【0137】

実施例5：オリゴdTコーティングしたプレートを使用するキャップELISA

10

この実施例は、キャップ形成定量化アッセイにおけるオリゴdTコーティングされたELISAプレートの使用を実証する。具体的には、LNA強化オリゴ-T20 (Exiqon)を、100 μ lのコーティング緩衝液緩衝液(50 mMのNaHCO₃、pH 9.6)における0.1 pmol/ウェル~500 pmol/ウェルの範囲のNuncイモビライザーアミノプレート(Thermo Scientific)におけるそれらの結合効率のために試験した。プレートを、室温で回転させながら1.5時間インキュベートし、200 μ lの洗浄緩衝液(1xPBS、0.05%のTween 20)で3回洗浄し、紙タオル上で軽く叩いて乾燥させた。mRNA結合能力を、100 μ lの結合緩衝液(50 mMのリン酸ナトリウム、pH 7.0)における7.8 ng/ウェル~500 ng/ウェルの範囲のキャップされた/キャップのないmRNAで試験し、室温で回転させながら90分間インキュベートした。プレートを200 μ lの結合緩衝液で3回洗浄し、紙タオル上で軽く叩いて乾燥させた。2 μ lの抗cap抗体(Syzy)を、20 μ lの最終容量におけるZenon西洋ワサビペルオキシダーゼマウスIgG₁標識キット(Invitrogen)を使用して、HRPに直接接合した。HRP接合抗体を、遮断緩衝液(1xPBS、2%のBSA、0.05%のTween 20)において0.8 μ l/mlで混合し、100 μ l/ウェルで添加し、室温で回転させながら1時間インキュベートした。プレートを200 μ lの結合緩衝液で3回洗浄し、紙タオル上で軽く叩いて乾燥させた。TMB EIA基質溶液を製造業者の指示に従って調製した。100 μ lのこれを各ウェルに添加し、室温で15分間インキュベートした。100 μ lの2N H₂SO₄を添加することによって、10分後、反応を停止し、450 nmでMolecular Devicesプレートリーダーを使用して読み取った。図4は、ELISAによって測定されたキャップされた及びキャップのないmRNAにおけるキャップ形成の定量化の例示的な結果を示す。検出されたシグナルは、RNAサンプル中のキャップ構造を有する抗キャップ抗体の相互作用から生じる。

20

30

【0138】

この実施例は、キャップ形成の定量化が捕捉する基質としてオリゴdTコーティングされたELISAプレートを使用して、最適化され得ることを実証する。

【0139】

実施例6：オリゴdT捕捉ELISAを使用するキャップ形成効率の定量化

40

この実施例において、我々は、様々なmRNAサンプル中のキャップ形成効率が、オリゴdT捕捉ELISAを使用して、効果的に定量化され得ることをさらに実証した。

【0140】

具体的には、オリゴdTコーティングされたmRNA捕捉プレートを、Nuncイモビライザーアミノプレート(Thermo Scientific)中のウェル当たり100 μ lのコーティング緩衝液における50 pmolのLNA強化オリゴ-T20 (Exiqon)と結合することによって、調製した。プレートを室温で回転させながら1.5時間インキュベートした。プレートを、200 μ lの洗浄緩衝液(1xPBS、0.05%のTween 20)で3回洗浄し、紙タオル上で軽く叩いて乾燥させた。N7メチルキャップされたオリゴ[N7MeGppp]-AAAAAAAAAAAAAAAAを、標準曲線測定のため合成した(Biosynthesis)。200 bpのポリA尾部と商業的

50

に、または社内で500bpのポリA尾部と合成された64ngのN7メチルキャップされたオリゴ及び64ngのキャップされたmRNAを、100μlのRNA結合緩衝液(50mMのリン酸ナトリウム、pH7.0)におけるウェル毎に添加し、室温で回転させながら90分間インキュベートした。プレートを200μlの洗浄緩衝液で3回洗浄し、紙タオル上で軽く叩いて乾燥させた。2μlの抗cap抗体(Sy sy)を、20μlの最終容量におけるZenon西洋ワサビペルオキシダーゼマウスIgG₁標識キット(In v i t r o g e n)を使用して、HRPに直接接合した。HRP接合抗体を、遮断緩衝液(1×PBS、2%のBSA、0.05%のTween20)において0.8μl/mlで混合し、100μl/ウェルで添加し、室温で回転させながら1時間インキュベートした。プレートを200μlの結合緩衝液で3回洗浄し、紙タオル上で軽く叩いて乾燥させた。TMB EIA基質溶液を製造業者の指示に従って調製した。100μlのこれを各ウェルに添加し、室温で15分間インキュベートした。100μlの2N H₂SO₄を添加することによって、10分後、反応を停止し、450nmでMolecular Devicesプレートリーダーを使用して読み取った。図5は、ELISAによって測定された様々なmRNAサンプル(例えば、特定の社内のホタルルシフェラーゼ(FFL)mRNA、市販のFFL mRNA、及び標準N7メチルキャップされたRNA)におけるキャップ形成の定量化の例示的な結果を示す。

10

【0141】

この実施例は、ELISA(オリゴdT捕捉ELISAなど)を使用して、mRNAサンプル中のキャップ形成効率を効果的に定量化し得ることを実証する。

20

【0142】

等価物及び範囲

当業者は、ほんの日常的な実験を使用して、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または確認することができるであろう。本発明の範囲は、上記説明に限定されることを意図するものではなく、むしろ添付の特許請求の範囲に記載される通りである。

【0143】

特許請求の範囲において、「a(1つの)」、「an(1つの)」、及び「the(その)」などの冠詞は、その反対が示されるか、または別途文脈から明白でない限り、1つまたは2つ以上を意味し得る。したがって、例えば、「1つの抗体」への言及は、複数のかかる抗体を含み、「その細胞」への言及は、当業者などに既知の1つ以上の細胞への言及を含む。群の1つ以上の要素の間に「または」を含む請求項または記載は、その反対が示されるか、または別途文脈から明白でない限り、1つ、2つ以上、または全ての群要素が、所与の製品または過程において存在するか、用いられるか、または別途関連している場合に、満たされると考えられる。本発明は、群の正確に1つの要素が、所与の製品または過程において存在するか、用いられるか、または別途関連している実施形態を含む。本発明は、2つ以上、または全ての群要素が、所与の製品または過程を提示するか、それらにおいて用いられるか、または別途それらに関連している実施形態を含む。さらに、本発明は、列挙された請求項のうちの1つ以上からの1つ以上の制限、要素、節、記述用語などが別の請求項に導入される全ての変化形、組み合わせ、及び順列を包含することが理解されるべきである。例えば、別の請求項に従属する任意の請求項は、同一の基本請求項に従属する任意の他の請求項に見出される1つ以上の制限を含むように修正され得る。さらに、請求項が組成物を唱える場合に、別途示されない限り、または矛盾もしくは不一致が生じるであろうことが当業者に明らかでない限り、本明細書に開示の目的のうちのいずれか1つのために組成物を使用する方法が含まれ、本明細書に開示された作製方法のうちのいずれかまたは当該技術分野において既知の他の方法に従い組成物を作製する方法が含まれることが理解されるべきである。

30

40

【0144】

要素が、一覧として、例えば、Markush群形式で提示される場合、要素の各亜群も開示され、いずれの要素(複数可)もこの群から除去され得ることが理解されるべきで

50

ある。一般的に、本発明、または本発明の態様が特定の要素、特徴などを含むとして見なされる場合、本発明の特定の実施形態または本発明の態様が、かかる要素、特徴などから構成されるか、または本質的に構成されることが理解されるべきである。簡潔さを目的として、それらの実施形態は、本明細書で具体的に逐語的には記載されていない。用語「含む」は開かれており、追加の要素またはステップの包含を許容することが意図されることを留意されたい。

【0145】

範囲が与えられている場合、終点を含む。さらに、別途示されるか、または別途文脈及び当業者の理解から明白でない限り、範囲として表される値は、文脈が別途明確に指示しない限り、範囲の下限の単位の10分の1まで、本発明の異なる実施形態の状態範囲内の任意の特定の値または部分範囲をとることができることが理解されるべきである。

10

【0146】

その上、先行技術範囲内の本発明の任意の特定の実施形態が、請求項のうちのいずれか1つ以上から明らかに除外され得ることが理解されるべきである。かかる実施形態は、当業者に既知であると見なされるので、除外が明らかに本明細書に記載されていない場合でも除外され得る。本発明の組成物のいずれの特定の実施形態も、先行技術の存在に関連するかどうかに関わらず、あらゆる理由により、任意の1つ以上の請求項から除外することができる。

【0147】

上記及び本文全体を通して考察された出版物は、単にそれらの開示が本出願の出願日以前であるために提供される。本明細書におけるいずれの内容も、本発明者らが、先行開示のためにかかる開示に先行する資格がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。

20

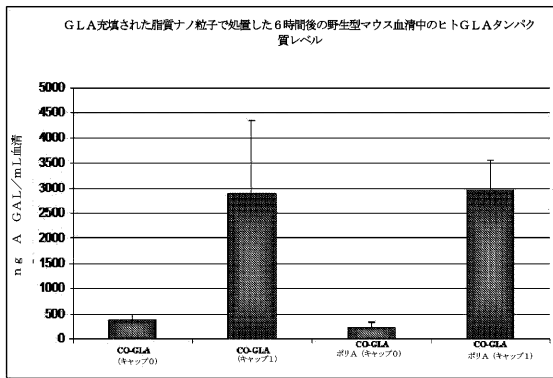
【0148】

他の実施形態

当業者は、前述のものが単に本発明の特定の好ましい実施形態を表すことを容易に理解するであろう。上述の手法及び組成物に対する様々な変更及び修正が、以下の特許請求の範囲に記載される通り、本発明の精神または範囲から逸脱することなくなされ得る。

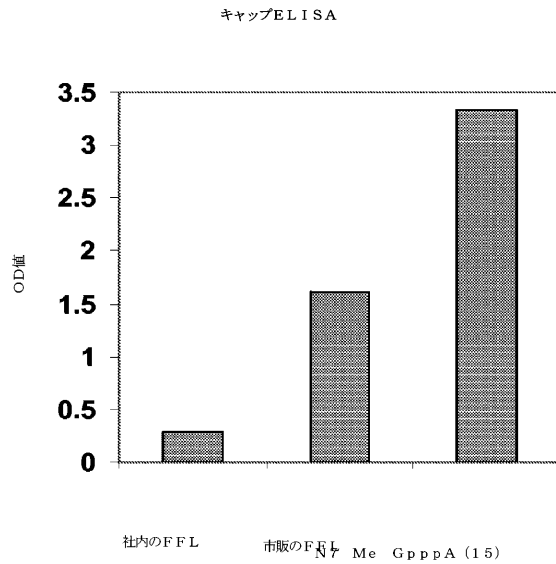
【図3】

【図3】



【図5】

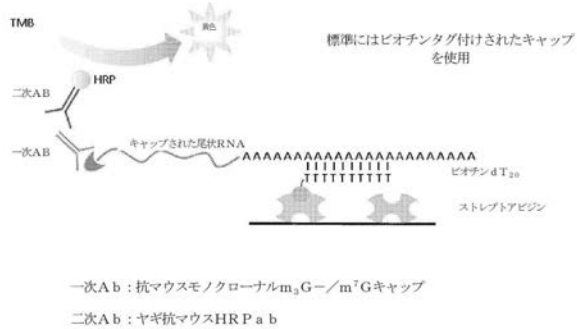
【図5】



【図1】

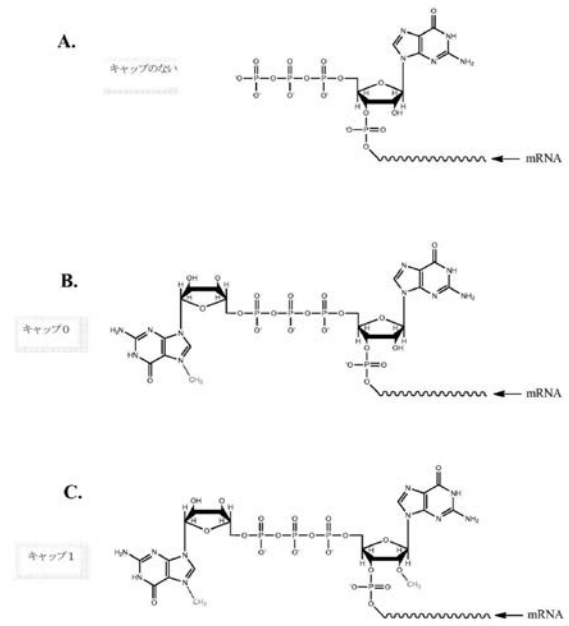
【図1】

ELISAを使用してmRNAキャップ形成をアッセイする



【図2】

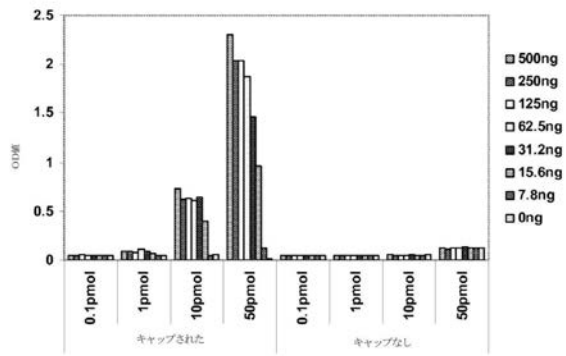
【図2】



【 図 4 】

【図4】

Nuncイモビライザーアミノプレート上にコーティングされたLNAオリゴ
dTを伴うELISAキャップ



【 配 列 表 】

2016515216000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/027602

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, COMPENDEX, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCCRACKEN S ET AL: "5'-CAPPING ENZYMES ARE TARGETED TO PRE-MRNA BY BINDING TO THE PHOSPHORYLATED CARBOXY-TERMINAL DOMAIN OF RNA POLYMERASE II", GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, PLAINVIEW, NY, US, vol. 11, no. 24, 15 December 1997 (1997-12-15), pages 3306-3318, XP000917770, ISSN: 0890-9369	1-5,8,9, 11-18, 21, 23-28, 31-35
Y	cited in the application the whole document abstract page 3307, left-hand column, last paragraph figure 1 page 3315, right-hand column, paragraph 3 ----- -/--	22

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 July 2014

Date of mailing of the international search report

28/07/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gall-Truchot, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/027602

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRUDZIEN EWA ET AL: "Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNAs with high translational efficiency", RNA, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 10, no. 9, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 1479-1487, XP002452227, ISSN: 1355-8382, DOI: 10.1261/RNA.7380904 cited in the application	1-5, 8-20,23, 25-28, 32-35
Y	the whole document abstract page 1480, right-hand column, paragraph 3 figure 1 table 1	22
X	----- T. NOJIMA ET AL: "The Interaction between Cap-binding Complex and RNA Export Factor Is Required for Intronless mRNA Export", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 282, no. 21, 15 March 2007 (2007-03-15), pages 15645-15651, XP055127633, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M700629200 the whole document page 15646, left-hand column, paragraph 2 page 15646, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 2 figure 3A	1-9, 11-17, 23, 25-30, 32-35
X	----- Y. OTSUKA ET AL: "Identification of a Cytoplasmic Complex That Adds a Cap onto 5'-Monophosphate RNA", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 29, no. 8, 17 February 2009 (2009-02-17), pages 2155-2167, XP055127635, ISSN: 0270-7306, DOI: 10.1128/MCB.01325-08 the whole document abstract page 2156, left-hand column, paragraph 5 - right-hand column, paragraph 1 figure 1 ----- -/--	1-8, 10-17, 21, 23-26, 28-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/027602

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOSEPHINE GALIPON ET AL: "Stress-induced lncRNAs evade nuclear degradation and enter the translational machinery", GENES TO CELLS, vol. 18, no. 5, 12 March 2013 (2013-03-12), pages 353-368, XP055127636, ISSN: 1356-9597, DOI: 10.1111/gtc.12042 the whole document abstract page 365, right-hand column, paragraph 2 figure 5C	1-7,9, 13,17, 28-30, 32,35
Y	----- US 2010/035249 A1 (HAYASHIZAKI YOSHIHIDE [JP] ET AL) 11 February 2010 (2010-02-11) the whole document abstract paragraph [0192] - paragraph [0203]; table 3 paragraph [0226] - paragraph [0240]; table 6 claim 9 -----	22

Information on patent family members

PCT/US2014/027602

Patent document
cited in search report

Publication date

Patent family member(s)

Publication date

US 2010035249	A1	11-02-2010	NONE
---------------	----	------------	------

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 U
C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/04

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ハートレイン, マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0
0, シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 デローサ, フランク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0
0, シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ディアス, アヌシャ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, シャイアー ウェイ 3 0
0, シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ, インコーポレイテッド 気付

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA12 HA17

4B063 QA01 QR42 QR48 QS03 QS33 QX02