

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5437797号
(P5437797)

(45) 発行日 平成26年3月12日 (2014. 3. 12)

(24) 登録日 平成25年12月20日 (2013. 12. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/08 (2006. 01)

C O 7 K 14/08

A 6 1 K 39/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 39/12 (2006. 01)

A 6 1 K 39/12

A 6 1 K 31/711 (2006. 01)

A 6 1 K 31/711

請求項の数 16 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-514696 (P2009-514696)
 (86) (22) 出願日 平成19年6月12日 (2007. 6. 12)
 (65) 公表番号 特表2009-539907 (P2009-539907A)
 (43) 公表日 平成21年11月19日 (2009. 11. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/005188
 (87) 国際公開番号 W02007/144150
 (87) 国際公開日 平成19年12月21日 (2007. 12. 21)
 審査請求日 平成22年6月14日 (2010. 6. 14)
 (31) 優先権主張番号 60/812, 592
 (32) 優先日 平成18年6月12日 (2006. 6. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2006/069734
 (32) 優先日 平成18年12月14日 (2006. 12. 14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 304042375
 サイトス バイオテクノロジー アーゲー
 スイス国 シーエイチー 8 9 5 2 シュリ
 ーレン, ヴァギシュトラッセ 2 5
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義敦
 (72) 発明者 キンツラー, マチアス
 スイス国 シーエイチー 8 0 5 7 チュー
 リッヒ, シャフハウザーシュトラッセ
 2 0 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNAバクテリオファージのウイルス様粒子にオリゴヌクレオチドをパッケージ化するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物を作製する方法であって、

(a) 少なくとも一つのポリ G 伸展を含むオリゴヌクレオチド を溶液 I に準備する工程、このとき該溶液 I はアルカリ性 pH を有し、

(b) 以下の工程を含む解離によって、該オリゴヌクレオチドを解離する工程、

(i) 温度 I に溶液 I の温度を調節する、該温度 I は 4 ~ 7 0 度 であり、

(ii) 該オリゴヌクレオチドが相対的なピークのスタート時間を 1 1 0 % より上になるまで、該温度 I にて該溶液 I 中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする、そして、

(iii) 温度 I I に該溶液 I の温度を調整する、該温度 I I は 0 ~ 7 0 度 であり、

(c) pH 5 ~ 8 に該溶液 I の pH を調整する工程、そして、

(d) 以下の工程を含む凝集によって、該オリゴヌクレオチドを凝集する工程、

(i) pH 5 ~ 8 であり、少なくとも 2 0 m M の陽イオンを含む溶液 I I に該オリゴヌクレオチドを準備する、このとき該陽イオンは Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} からなる群から選択されるものであり、

(ii) 温度 I I I に溶液 I I の温度を調整する、該温度 I I I は 5 0 ~ 9 9 度 であり、

(iii) 該オリゴヌクレオチドが 5 0 ~ 1 1 0 % の相対的なピークのスタート時間になるまで、該温度 I I I にて該溶液 I I 中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする、そして、

10

20

(iv) 温度 I V に溶液 I I の温度を調整する、該温度 I V は 5 0 未満である、を含む方法であって、相対的なピークのスタート時間がバクテリオファージ Q のキャプシドと比較したサイズ排除 H P L C により測定されるものである方法。

【請求項 2】

前記溶液 I の温度を温度 I I に調節する工程が、少なくとも 3 . 6 / 分の温度勾配で行われ、及び / 又は、該溶液 I I の温度を温度 I V に調節する工程が、少なくとも 3 . 6 / 分の温度勾配で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記溶液 I が、アルカリ金属の水酸化物を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記陽イオンが Na^+ 又は K^+ である、請求項 1 から 3 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 5】

前記溶液 I の前記オリゴヌクレオチドの濃度が、5 0 μM ~ 2 m M である、請求項 1 から 4 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 6】

温度 I I I にて溶液 I I 中で前記オリゴヌクレオチドをインキュベートする工程が、前記オリゴヌクレオチドが 8 0 ~ 9 5 % の相対的なピークのスタート時間になるまで行われる、請求項 1 から 5 のいずれかーに記載の方法であって、相対的なピークのスタート時間がバクテリオファージ Q のキャプシドと比較したサイズ排除 H P L C により測定されるものである方法。

【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチドが、その 5 ' 末端に少なくとも 3、最大 1 5 のグアノシン体と、その 3 ' 末端に少なくとも 3、最大の 1 5 グアノシン体を含む、請求項 1 から 6 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 8】

前記オリゴヌクレオチドが、

- (a) 「 G 4 - 4 」 GGGGGACGATCGTCGGGG (配列番号 : 2)、
- (b) 「 G 5 - 5 」 GGGGGACGATCGTCGGGGG (配列番号 : 3)、
- (c) 「 G 6 - 6 」 GGGGGGACGATCGTCGGGGGG (配列番号 : 4)、
- (d) 「 G 7 - 7 」 GGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG (配列番号 : 5)、
- (e) 「 G 8 - 8 」 GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (配列番号 : 6)、
- (f) 「 G 9 - 9 」 GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (配列番号 : 7)、
- (g) 「 G 1 0 」 GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (配列番号 : 8)、
- (h) 「 G 1 1 」 GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGGG (配列番号 : 9)

からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 1 から 7 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 9】

前記オリゴヌクレオチドが核酸配列「 G 1 0 」 GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (配列番号 : 8) を含む、請求項 1 から 8 のいずれかーに記載の方法。

【請求項 1 0】

オリゴヌクレオチドを含有するヌクレオチド組成物であって、該ヌクレオチド組成物が請求項 1 から 9 のいずれかーに記載の方法によって取得され、該オリゴヌクレオチドが 5 0 ~ 1 1 0 % の相対的なピークのスタート時間を有する、ヌクレオチド組成物であって、相対的なピークのスタート時間がバクテリオファージ Q のキャプシドと比較したサイズ排除 H P L C により測定されるものである組成物。

【請求項 1 1】

(i) R N A バクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法であって、

- (a) 該 R N A バクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、
- (b) オリゴヌクレオチドを準備する工程、

- (i) このとき、該オリゴヌクレオチドが少なくとも一つのポリG伸展を含み、そして、
- (ii) このとき、該オリゴヌクレオチドが50～110%の相対的なピークのスタート時間を有するものであり、
- (c) 混合物を生成する工程、このとき該混合物が以下を含有してなるものであり、
- (i) 前記コートタンパク質、
- (ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤、
- (iii) 前記オリゴヌクレオチド
- (d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、
- (e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含む方法であって、相対的なピークのスタート時間がバクテリオファージQのキャプシドと比較したサイズ排除HPLCにより測定されるものである方法。

10

【請求項12】

- (i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法であって、
- (a) 該RNAバクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、
- (b) 請求項10に記載のヌクレオチド組成物を準備する工程、
- (c) 混合物を生成する工程、このとき該混合物が以下を含有してなるものであり、
- (i) 前記コートタンパク質、
- (ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤、
- (iii) 前記オリゴヌクレオチド
- (d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、
- (e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含む方法。

20

【請求項13】

- 前記コートタンパク質が、RNAバクテリオファージの組み換えタンパクを含み、前記RNAバクテリオファージが、
- (a) バクテリオファージQ、
- (b) バクテリオファージR17、
- (c) バクテリオファージfr、
- (d) バクテリオファージGA、
- (d) バクテリオファージSP、
- (e) バクテリオファージMS2、
- (f) バクテリオファージM11、
- (g) バクテリオファージMX1、
- (h) バクテリオファージNL95、
- (i) バクテリオファージf2、
- (j) バクテリオファージPP7、及び
- (k) バクテリオファージAP205
- からなる群から選択される、請求項11又は12に記載の方法。

30

40

【請求項14】

前記RNAバクテリオファージがQであり、前記混合物中の前記オリゴヌクレオチドと前記コートタンパク質のモル比が、0.5～1.2である、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項15】

- 前記コートタンパク質が、
- (a) 配列番号：10(QCP)；
- (b) 配列番号：10と配列番号：11の混合物(QA1タンパク質)；
- (c) 配列番号：12(R17コートタンパク質)；

50

- (d) 配列番号：13 (fr コートタンパク質)；
- (e) 配列番号：14 (GA コートタンパク質)；
- (f) 配列番号：15 (SP コートタンパク質)；
- (g) 配列番号：15 と配列番号：16 の混合物；
- (h) 配列番号：17 (MS2 コートタンパク質)；
- (i) 配列番号：18 (M11 コートタンパク質)；
- (j) 配列番号：19 (MX1 コートタンパク質)；
- (k) 配列番号：20 (NL95 コートタンパク質)；
- (l) 配列番号：21 (f2 コートタンパク質)；
- (m) 配列番号：22 (PP7 コートタンパク質)；及び、
- (n) 配列番号：23 (AP205 コートタンパク質)

10

からなる群から選択される配列を含む、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項16】

タンパク質収率が少なくとも75%であり、及び/又はオリゴヌクレオチド収率が少なくとも75%である、請求項11から15のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法を提供する。さらに、本発明は、前記の方法において用いられるのに適したオリゴヌクレオチドを含有してなるヌクレオチド組成物を作製するための方法を提供する。さらに、本発明は、本発明の方法によって入手可能なヌクレオチド組成物とその使用を提供する。さらに、本発明は、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなり、本発明の方法によって入手可能であり、好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%の純度を含む組成物を提供する。

20

【背景技術】

【0002】

オリゴヌクレオチドをパッケージ化したRNAバクテリオファージのウイルス様粒子は、免疫系の強力な刺激因子であって(国際公開2003/024481A2)、現代のワクチン接種治療において広く使われている。(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法は、例えば国際公開2003/024481A2、国際公開2004/000351A1、国際公開2004/084940A1及び国際公開2004/007538A2に記載されている。組み換えウイルス様粒子の分解、コートタンパク質の精製及び核酸の存在下での該コートタンパク質の再集合化に基づく方法が、最も一般的に用いられる。RNAバクテリオファージの組み換えウイルス様粒子の産生のための効率的かつ拡張可能な方法は、国際公開2005/117963A1に開示されている。エンドトキシンを含まないインタクトなウイルス様粒子の大規模な精製のための方法は、国際公開2007/039552A1に開示されている。組み換えて産生したウイルス様粒子(「分解(disassembly)」)からのコートタンパク質の調製のための方法は、とりわけ、国際公開2003/024481A2において、そして、本出願の実施例の項目において開示されている。従来開示される核酸の存在下におけるコートタンパク質の集合体化(「再集合体化(reassembly)」)のための方法は、効率、拡張性及び集合体化した生成物の純度に関して最適化されない。特に、従来技術は、「再集合体化」方法の効率が特定の粒子の大きさを含有する凝集したオリゴヌクレオチドを用いることによって劇的に改善されうること示すものではない(本明細書において、相対的なピークのスタート時間によって特徴付けられる、下記参照)。本出願は、非常に高い純度のパッケージ化生成物を生じる劇的に効率が改善されている「再集合体化」方法を提供する

30

40

50

。典型的にそして好ましくは、本明細書中で開示される「再集合体化」方法はタンパク質収率及び少なくともおよそ75%のオリゴヌクレオチド収率を含み、典型的にそして好ましくは少なくとも99%の純度である生成物(オリゴヌクレオチドをパッケージ化したウイルス様粒子を含む組成物)が生じる。

【発明の概要】

【0003】

本発明は、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法に関する。前記方法の間、前記ウイルス様粒子は、オリゴヌクレオチドの存在下にて、前記RNAバクテリオファージのコートタンパク質の自己集合体化(self assembly)によって形成される。驚くべきことに、コートタンパク質の自己集合体化が凝集されたオリゴヌクレオチド(aggregated oligonucleotide)の存在下にて行われる場合には、方法の効率が有意に改善されうること、を発見した。通常、少なくとも一つのポリG伸展(stretch)を含むオリゴヌクレオチドは凝集(aggregation)が可能である。オリゴヌクレオチドの集合状態は、前記RNAバクテリオファージのキャプシドを標準物質として用いたサイズ排除HPLCにおいて相対的なピークのスタート時間に特徴がある。50~110%、好ましくは80~95%の相対的なピークのスタート時間を含むオリゴヌクレオチドが、最適であることを発見した。これは、前記RNAバクテリオファージのキャプシドの見かけの分子量の範囲、又はわずかにそれより下である見かけの分子量を含むオリゴヌクレオチド集合体に一致する。所望の相対的なピークのスタート時間を含むオリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドを凝集方法にかけることによって得られ

【0004】

ゆえに、本発明の第一の態様は、オリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物を作製する方法であって、好ましくは該オリゴヌクレオチドが50~110%の相対的なピークのスタート時間を含み、(a) 少なくとも一つのポリGが伸展しているオリゴヌクレオチドを溶液IIに準備する工程、このとき該溶液IIは5~8のpHを含み、そしてこのとき該溶液IIは陽イオンを含み、好ましくは該溶液II中の該陽イオンの濃度は少なくとも20mMであり、このとき該陽イオンは好ましくは Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} からなる群から選択されるものであり、(b) 50~99である温度IIIに溶液IIの温度を調整する工程、そして、(c) 該オリゴヌクレオチドが50~110%の相対的なピークのスタート時間を含むまで、該温度IIIにて該溶液II中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする工程、そして、(d) 50未満である温度IVに溶液IIの温度を調整する工程を含み、好ましくはこれらの工程が所定の順序で行われる方法である。

オリゴヌクレオチド調製物が最適の粒子サイズと狭いサイズの分布を有する集合体を含む場合に、前記コートタンパク質の自己集合体化は最も効率が良い。さらに驚くべきことに、オリゴヌクレオチドを凝集(aggregate)工程の前に解離(disaggregate)工程を行うと、オリゴヌクレオチドの集合状態がより効率良く制御されうること、サイズ分布がより狭いオリゴヌクレオチド調製物が得られることを発見した。前記方法は、本明細書中に記載した実施態様といずれか一の特徴とをいずれかの組み合わせで含んでよい。

【0005】

ゆえに、本発明の第二の態様は、オリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物を作製する方法であって、好ましくは該オリゴヌクレオチドが50~110%の相対的なピークのスタート時間を含み、(a) 少なくとも一つのポリGが伸展しているオリゴヌクレオチドを溶液Iに準備する工程、このとき該溶液Iはアルカリ性pHを含み、(b) 以下の工程を含む解離によって、該オリゴヌクレオチドを解離する工程、(i) 4~70である温度Iに溶液Iの温度を調節する、(ii) 該オリゴヌクレオチドが相対的なピークのスタート時間を110%より上に含むまで、該温度Iにて該溶液I中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする、そして、(iii) 0~70である温度IIに該溶液Iの温度を調整する

、(c) pH 5 ~ 8 に該溶液 I の pH を調整する工程、そして、(d) 以下の工程を含む凝集によって、該オリゴヌクレオチドを凝集する工程、(i) pH 5 ~ 8 であり、好ましくは少なくとも 20 mM の濃度の陽イオンを含む溶液 II に該オリゴヌクレオチドを準備する、このとき該陽イオンは好ましくは Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} からなる群から選択されるものであり、(ii) 50 ~ 99 である温度 III に溶液 II の温度を調整する、(iii) 該オリゴヌクレオチドが 50 ~ 110 % の相対的なピークのスタート時間を含むまで、該温度 III にて該溶液 II 中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする、そして、(iv) 50 未満である温度 V に溶液 II の温度を調整することを含み、好ましくはこれらの工程が所定の順序で行われる方法である。前記方法は、本明細書中に記載した実施態様といずれか一の特徴とをいずれかの組み合わせで含んでよい。

10

【0006】

本発明の第三の態様は、オリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物であって、このとき該ヌクレオチド組成物は前記の方法のいずれかによって入手可能であり、好ましくは該オリゴヌクレオチドは 50 ~ 110 % の相対的なピークのスタート時間を含む。前記ヌクレオチド組成物は、本明細書中に記載した実施態様といずれか一の特徴とをいずれかの組み合わせで含んでよい。

【0007】

本発明の第四の態様は、(i) RNA バクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法であって、(a) 該 RNA バクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、(b) 本発明の第一及び第二の態様のいずれかの方法によって入手可能である、オリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物を準備する工程、(c) (i) 前記コートタンパク質と、(ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤と、(iii) 前記オリゴヌクレオチドとを含有してなる混合物を生成する工程、(d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、(e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含む方法である。前記方法は、本明細書中に記載した実施態様といずれか一の特徴とをいずれかの組み合わせで含んでよい。

20

【0008】

本発明の第五の態様は、(i) RNA バクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法であって、(a) 該 RNA バクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、(b) オリゴヌクレオチドを準備する工程、(i) このとき該オリゴヌクレオチドにおいて少なくとも一つのポリ G が伸展しており、そして、(ii) このとき、該オリゴヌクレオチドが 50 ~ 110 % の相対的なピークのスタート時間を含むものであり、(c) (i) 前記コートタンパク質と、(ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤と、(iii) 前記オリゴヌクレオチドとを含有してなる混合物を生成する工程、(d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、(e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含む方法である。前記方法は、本明細書中に記載した実施態様といずれか一の特徴とをいずれかの組み合わせで含んでよい。

30

40

【0009】

本発明の第六の態様は、(i) RNA バクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法であって、(a) 該 RNA バクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、(b) 以下の工程を含む準備によって、オリゴヌクレオチドを準備する工程、このとき好ましくは該オリゴヌクレオチドは 50 ~ 110 % の相対的なピークのスタート時間を含むものであり、(i) pH 5 ~ 8 であり、好ましくは少なくとも 20 mM の濃度の陽イオンを含む溶液 II にオリゴヌクレオチドを準備する、このとき好ましくは該陽イオンは Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} から

50

なる群から選択されるものであり、(ii) 50～99 である温度ⅠⅠⅠに溶液ⅠⅠの温度を調整する、(iii) 該オリゴヌクレオチドが50～110%の相対的なピークのスタート時間を含むまで、該温度ⅠⅠⅠにて該溶液ⅠⅠ中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする、そして、(iv) 50 未満である温度ⅠⅤに溶液ⅠⅠの温度を調整し、このとき工程(i)から(iv)を好ましくは所定の順序で行い、(c) (i) 前記コートタンパク質と、(ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤と、(iii) 前記オリゴヌクレオチドとを含有してなる混合物を生成する工程、(d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、(e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含む方法である。前記方法は、本明細書中に記載した実施態様といずれか一の特徴とをいずれかの組み合わせで含んでよい。

10

【0010】

本発明の第七の態様は、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法であって、(a) 該RNAバクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、(b) オリゴヌクレオチドを準備する工程、このとき好ましくは該オリゴヌクレオチドは50～110%の相対的なピークのスタート時間を含むものであり、(i) 少なくとも一つのポリGが伸展しているオリゴヌクレオチドを溶液Ⅰに準備する工程、このとき該溶液Ⅰはアルカリ性pHを含み、(ii) 以下の工程を含む解離によって、該オリゴヌクレオチドを解離する工程、(1) 4～70 である温度Ⅰに溶液Ⅰの温度を調節する、(2) 該オリゴヌクレオチドが相対的なピークのスタート時間を110%より上に含むまで、該温度Ⅰにて該溶液Ⅰ中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする、そして、(3) 0～70 である温度ⅠⅠに該溶液Ⅰの温度を調整する、(iii) pH5～8に該溶液ⅠのpHを調整する工程、そして、(iv) 以下の工程を含む凝集によって、該オリゴヌクレオチドを凝集する工程、(1) pH5～8であり、好ましくは少なくとも20mMの濃度の陽イオンを含む溶液ⅠⅠに該オリゴヌクレオチドを準備する、このとき好ましくは該陽イオンは Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} からなる群から選択されるものであり、(2) 50～99 である温度ⅠⅠⅠに溶液ⅠⅠの温度を調整する、(3) 該オリゴヌクレオチドが50～110%の相対的なピークのスタート時間を含むまで、該温度ⅠⅠⅠにて該溶液ⅠⅠ中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする、そして、(4) 50 未満である温度ⅠⅤに溶液ⅠⅠの温度を調整し、このとき工程(i)から(iv)を好ましくは所定の順序で行い、(c) (i) 前記コートタンパク質と、(ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤と、(iii) 前記オリゴヌクレオチドとを含有してなる混合物を生成する工程、(d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、(e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含む方法である。前記方法は、本明細書中に記載した実施態様といずれか一の特徴とをいずれかの組み合わせで含んでよい。

20

30

【0011】

本発明の第八の態様は、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法における、本発明のいずれか一に記載の方法によって入手可能なヌクレオチド組成物の使用である。

40

【0012】

本発明の第九の態様は、本発明のいずれか一に記載の方法によって入手可能な組成物であって、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなり、好ましくは該RNAバクテリオファージがQ であり、さらに好ましくは該オリゴヌクレオチドが、G8-8(配列番号：6)又はG10(配列番号：8)、好ましくはG10(配列番号：8)であり、ここでさらに好ましくは該組成物の純度が少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは少なくとも99.2%である組成物である。

【図面の簡単な説明】

50

【0013】

【図1】Q キャプシド標準物質(上部)及び凝集したG10(下部)のサイズ排除HPLCクロマトグラム。HPLCは実施例4に記載のように行った。標準物質の持続時間は8.532分であり、凝集したG10のピークのスタート時間は7.510分であった。したがって、凝集したG10の相対的なピークのスタート時間は88%(7.510分/8.532分×100)であった。

【図2】未処置のG10、凝集したオリゴヌクレオチドG10及びQ キャプシド標準物質のサイズ排除HPLCクロマトグラム。HPLCは実施例4に記載のように行った。(A)凝集の前に解離処理を行わなかった凝集G10は、Q キャプシドと同じか、Q キャプシドよりも高い見かけの分子量を示した(A、ボックス2)。相対的なピークのスタート時間はおよそ75%であった。(B)実施例1に記載のように、凝集の前に解離処理を行った凝集G10は、Q キャプシドより低い見かけの分子量を示した(B、ボックス2)。相対的なピークのスタート時間はおよそ88%であった。

10

【図3】未処置のG10、解離したG10及び凝集したG10オリゴヌクレオチドとG10をパッケージ化した再集合体化VLPのCDスペクトル。22.5μMのオリゴヌクレオチド濃度を用いてスペクトルを記録し、その後正規化した。正規化のために、楕円形は $Q = 100 \times CD \text{ シグナル} [mdeg] / L [cm] \times c [mM]$ に従って算出される。

【図4】分析的サイズ排除クロマトグラフィによる精製されたQ コートタンパク質の特徴づけ。(A)精製されたQ VLPの試料。観察されたピーク(比率A260/A280=2)は、VLPのRNAコアが占めている。これは260nmでのRNAの吸光度係数がコートタンパク質の吸光度係数のおよそ100倍であるためである。(B)分解反応の上清の試料。放出されたコートタンパク質は、およそ12分でのタンパク質様ピークの存在によって表される。さらに、様々な種類の沈殿していないRNA分子は6.8~11分の範囲に存在する。(C)精製したQ コートタンパク質の試料。カラムTSK G5000PWx1(Tosoh Bioscience)にてPBSで分析を行った。

20

【図5】(A)天然のQ VLP、(D)Q G10 VLPとパッケージ化する構成成分、(B)オリゴヌクレオチドG10、及び(C)Q コートタンパク質の分析的サイズ排除クロマトグラフィ。Q G10 VLP(D)について観察されたピーク(比率A260/A280=1.74)はVLPのG10コアが占めている。これは260nmでのG10の吸光度係数がコートタンパク質の吸光度係数のおよそ130倍であるためである。カラムTSK G5000PWx1(Tosoh Bioscience)にてPBSで分析を行った。

30

【図6】天然のQ VLPの非還元SDS-PAGE分析とインビトロの集合体化Q G10。コートタンパク質五量体と六量体の位置を示す((a)分子量マーカー、(b)Q VLP、(c)Q G10)。

【発明を実施するための形態】

【0014】

特別に言及しない限り、以下に記載の定義及び実施態様は、本発明の特定の方法、組成物、ヌクレオチド組成物及び使用においていずれかの態様及び実施態様に当てはめることができる。特に定義しない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語はすべて、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されているのと、同じ意味を有する。

40

【0015】

「オリゴヌクレオチド」：本明細書中で用いるオリゴヌクレオチドなる用語は一本鎖デオキシリボヌクレオチドを指す。以下に定められるように、好適なオリゴヌクレオチドは少なくとも一つのポリG(stretch)伸展を含む。より好適なオリゴヌクレオチドは、2、3、4、5、6、7、8、9又は10の前記ポリG伸展を含む。非常に好適なオリゴヌクレオチドはちょうど2つのポリG伸展を含み、このとき好ましくは該2つのポリG伸展のうちの一つは該オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端に位置する。さらにより好適なオリゴヌクレオチドはちょうど2つのポリG伸展を含み、このとき該2つのポリG伸展のうちの一つは該オリゴヌクレオチドの5'末端に位置し、該2つのポリG伸展のうちの一つは該オリゴヌクレオチドの3'末端に位置する。典型的にかつ好ましくは、本明細書中

50

で用いるオリゴヌクレオチドは、6 ~ 1000、好ましくは10 ~ 1000、より好ましくは10 ~ 200、さらにより好ましくは10 ~ 100、さらにより好ましくは20 ~ 40、そして最も好ましくは30のヌクレオチドからなる。さらに好適なオリゴヌクレオチドは、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39又は40のヌクレオチドからなる。さらにより好適なオリゴヌクレオチドは、24 ~ 32のヌクレオチド、より好ましくはおよそ30のヌクレオチドからなる。

【0016】

また、オリゴヌクレオチドなる用語は、少なくとも一の修飾されたヌクレオチドを含む分子を指し、このとき該修飾されたヌクレオチドは(a)ヌクレオチドアナログ又は(b)骨格修飾を含むヌクレオチドから選択されるのが好ましい。一実施態様では、オリゴヌクレオチドは、(a)ペプチド核酸、(b)イノシン、(c)トリチル化塩基、(d)ホスホロチオエート、(e)アルキルホスホロチオエート、(f)5 - ニトロインドールデオキシリボフラノシル、(g)5 - メチルデオキシシトシン、及び(h)5,6 - ジヒドロ - 5,6 - ジヒドロキシデオキシチミジンからなる群から選択される修飾ヌクレオチドの少なくとも一を含む。更なる実施態様では、オリゴヌクレオチドは、ホスホチオエート化されたヌクレオチドを含むか、あるいはこれからなる。ホスホチオエート化されたヌクレオチドは細胞又は生物体内での分解を受けないので、好適なヌクレオチド修飾体である。さらに、典型的に天然で発見されるポリヌクレオチドの化学的、酵素的、又は代謝的に修飾された形態が好適である。しかしながら、好適なオリゴヌクレオチドはもっぱら修飾されていないヌクレオチド、すなわちアデノシン、チミジン、グアノシン及び/又はシチジンからなる。なお更なる好適なオリゴヌクレオチドはもっぱらホスホジエステル結合したヌクレオチドからなる。

【0017】

非常に好適なオリゴヌクレオチドは、少なくとも1、好ましくは1、2、3、又は4のCpGモチーフを含むオリゴヌクレオチドを有するメチル化されていないCpGである。さらにより好適なオリゴヌクレオチドはパリンδροーム配列を含み、このとき該パリンδροーム配列が少なくとも1、好ましくは1、2、3又は4のCpGモチーフを含むことが好ましい。さらにより好適なオリゴヌクレオチドはパリンδροーム配列を含み、このとき該パリンδροーム配列が配列GACGATCGTC(配列番号：1)を含む、好ましくは配列GACGATCGTC(配列番号：1)からなることが好ましい。さらにより好適なオリゴヌクレオチドはパリンδροーム配列を含み、このとき該パリンδροーム配列が5'末端でポリG伸展に隣接しており、該パリンδροーム配列が3'末端でポリG伸展に隣接しており、このとき該パリンδροーム配列がGACGATCGTC(配列番号：1)であることが好ましい。非常に好適なオリゴヌクレオチドはパリンδροーム配列を含み、このとき該パリンδροーム配列が5'末端で少なくとも3 ~ 10、好ましくは4 ~ 10のグアノシン自体に隣接しており、該パリンδροーム配列が3'末端で少なくとも3 ~ 10、好ましくは4 ~ 10のグアノシン自体に隣接しており、このとき該パリンδροーム配列がGACGATCGTC(配列番号：1)であることが好ましい。

【0018】

「ポリG伸展(poly G stretch)」：ポリG伸展なる用語はオリゴヌクレオチドのセグメントを指し、このとき該セグメントは少なくとも3の連続するグアノシン残基からなる。好適なポリG伸展は、3 ~ 25、好ましくは4 ~ 20、より好ましくは4 ~ 15、そして最も好ましくは4 ~ 10の連続するグアノシン自体からなる。さらに好適なポリG伸展は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20の連続するグアノシン自体からなる。

「CpGモチーフ」：本明細書中で用いる「CpGモチーフ」なる用語は、短いDNA配列、好ましくは一本鎖のDNA配列であって、シトシン(C) - グアノシン(G)ジヌクレオチドを含むものを指し、このときCはメチル化されておらず、該CGジヌクレオチドがホスホジエステル結合であることが好ましい。好ましくは、CpGモチーフは少なくとも1、好ましくは1、2又は3の、付加的なヌクレオチド5'及び/又は3'の該CGジヌク

10

20

30

40

50

レオチドを含み、このとき該付加的なヌクレオチドはC G ジヌクレオチドを含まないことがさらに好ましい。

「相対的なピークのスタート時間」：「相対的なピークのスタート時間」なる用語はオリゴヌクレオチドの集合状態を表すパラメーターである。オリゴヌクレオチドの相対的なピークのスタート時間は分析的サイズ排除HPLCによって測定され、このとき基本的に、好ましくは厳密に以下のパラメーターによって該HPLCを実施する。

カラム： TSK gel 5000 PWXL 7.8 mm x 30.0 cm (Lot: 5PWX06GN MH3304, Art: 08023, Tosoh Bioscience)

溶出剤： PBS (150 mM NaClを含む20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.2)

注射体積： 40.0 μ l (およそ20 μ M ~ およそ500 μ Mの濃度を含むのが好ましい)

流速： 0.8 ml / 分

勾配： アイソクラチック

ランタイム： 20分

波長： 215、260及び280 nm、260 nmでのデータ評価

カラムオープン温度： 25

自動回収装置の温度： 8、

そして、前記RNAバクテリオファージのキャプシドを標準物質として用いる。前記RNAバクテリオファージのキャプシドと比較したときの前記オリゴヌクレオチドの相対的なピークのスタート時間X%は以下の通りに算出される。X% = オリゴヌクレオチドのピークのスタート時間[分] ÷ 標準物質[分]の持続時間 × 100%、このときオリゴヌクレオチドのピークのスタート時間はオリゴヌクレオチドの溶出が検出可能になる時間として測定し、標準物質の持続時間は該標準物質の最大のピークが生じる時間として測定した。したがって、前記RNAバクテリオファージが例えばバクテリオファージAP205である実施態様では、AP205のキャプシドを前記HPLCの標準物質として用い、前記オリゴヌクレオチドの相対的なピークのスタート時間は該AP205標準物質と比較して算出される。重要なことには、RNAバクテリオファージでない実施態様では、相対的なピークのスタート時間は、バクテリオファージQのキャプシドを標準物質として用いて常に決定される。さらに、前記HPLCの適切な標準物質の選択に関してもいくらか不確定である場合には、バクテリオファージQのキャプシドが標準物質として用いられ、相対的なピークのスタート時間は該バクテリオファージQのキャプシドと比較して決定される。ゆえに、非常に好適な実施態様では、前記相対的なピークのスタート時間は前記HPLCによって測定され、このとき該標準物質はバクテリオファージQのキャプシドであることが好ましく、該相対的なピークのスタート時間は該バクテリオファージQのキャプシドと比較して決定されることがさらに好ましい。

【0019】

「パッケージ化(packaged)」：本明細書中で用いる「パッケージ化」なる用語は、ウイルス様粒子との関係において、オリゴヌクレオチドの状態を指す。「VLPにパッケージ化されるオリゴヌクレオチド」又は「オリゴヌクレオチドをパッケージ化したVLP」なる用語は同様に用いられる。本明細書中で用いる「パッケージ化」なる用語は、非共有結合、好ましくはイオン性相互作用、疎水性相互作用、水素結合を指す。非常に好ましくは、本明細書中で用いる「パッケージ化」なる用語は、VLP内への前記オリゴヌクレオチドの封入、又は部分的な封入を指す。例えば、オリゴヌクレオチド、好ましくは50~110%の相対的なピークのスタート時間を含むオリゴヌクレオチドは、共有でも非共有でもなく実際に結合することなく、又は非共有的な結合によって、VLPに封入される。典型的にかつ好ましくは、オリゴヌクレオチドをパッケージ化したVLPは、該オリゴヌクレオチドを分解から、好ましくはDNアーゼ加水分解から保護する。したがって、好適な意味では、「パッケージ化」なる用語は、パッケージ化された状態のオリゴヌクレオチドがDNアーゼ加水分解にアクセスできないことを示す。より好ましくは、「パッケ

10

20

30

40

50

ージ化」なる用語は、オリゴヌクレオチドがDNアーゼ加水分解にアクセスできないことを示し、このときDNアーゼはDNアーゼI又はベンゾナーゼであることがさらに好ましい。さらにより好ましくは、「パッケージ化」なる用語は、オリゴヌクレオチドがベンゾナーゼ加水分解にアクセスできないことを示す。

【0020】

DNアーゼ(例えばDNアーゼI又はベンゾナーゼ)へのオリゴヌクレオチドのアクセス容易性は、国際公開2003/024481A2の実施例11~17(p.111を参照)に記載されるようにアッセイされるのが好ましい。好適な意味では、ベンゾナーゼで処理した後(2mM MgCl₂, pH7.2を含むバッファ中の190Uベンゾナーゼ/mgコートタンパク質、20~25、18時間)にオリゴヌクレオチドの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%がVLPから回収される場合(例えばエチジウムブロマイド染色ゲルにおいて)に、該VLPは該オリゴヌクレオチドをパッケージ化しているとみなされる。このようなアッセイは適切なコントロールが必要であり、VLP及びオリゴヌクレオチドの特定の組合せに応用することが必要であることは当業者に明らかである。好適な意味では、ベンゾナーゼで処理した後(2mM MgCl₂, pH7.2を含むバッファ中の190Uベンゾナーゼ/mgコートタンパク質、20~25、18時間)にオリゴヌクレオチドの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%がRNAバクテリオファージのVLPから回収される場合に、該オリゴヌクレオチドは該VLPにパッケージ化されているとみなされる。非常に好適な意味では、ベンゾナーゼで処理した後(2mM MgCl₂, pH7.2を含むバッファ中の190Uベンゾナーゼ/mgコートタンパク質、20~25、18時間)にG10の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%がVLPから回収される場合に、オリゴヌクレオチドG10(配列番号:8)はRNAバクテリオファージのVLPにパッケージ化されているとみなされる。より具体的な意味では、ベンゾナーゼで処理した後(2mM MgCl₂, pH7.2を含むバッファ中の190Uベンゾナーゼ/mgコートタンパク質、20~25、18時間)にG10の少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%がRNAバクテリオファージのVLPから回収される場合に、オリゴヌクレオチドG10(配列番号:8)はRNAバクテリオファージQ、AP205、GA又はfrのVLPにパッケージ化されているとみなされる。非常に具体的な意味では、ベンゾナーゼで処理した後(2mM MgCl₂, pH7.2を含むバッファ中の190Uベンゾナーゼ/mgコートタンパク質、20~25、18時間)にメチル化されていないCpG含有オリゴヌクレオチドの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%がRNAバクテリオファージQのVLPから回収される場合に、オリゴヌクレオチドG10(配列番号:8)はRNAバクテリオファージQのVLPにパッケージ化されているとみなされる。

【0021】

「コートタンパク質」:本明細書中で用いる「コートタンパク質」なる用語は、バクテリオファージ又はRNAバクテリオファージのキャプシド集合体内に取り込むことができる、RNAバクテリオファージのタンパク質(一又は複数)を指す。ゆえに、コートタンパク質なる用語は、RNAバクテリオファージのキャプシド又はRNAバクテリオファージのVLPを形成しているタンパク質を指す。典型的にかつ好ましくは、RNAバクテリオファージのコートタンパク質は二量体構造を有する。本明細書中で用いられる、組み換えコートタンパク質の特定の断片において「(組み換え)コートタンパク質の断片」は、野生型コートタンパク質又は野生型組み換えタンパク質のそれぞれの少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%の長さであり、好ましくはVLPを形成する能力を保持するポリペプチドとして定義される。好ましくは、断片は、少なくとも一つの内部欠損、少なくとも一つの切断又はこれらの少なくとも一つの組合せによって得られる。さらに「組み換えコートタンパク質の断片」又は「コートタンパク質の断片」なる用語は、それぞれ野生型コートタン

パク質と少なくとも 80 %、好ましくは 90 %、さらにより好ましくは 95 % のアミノ酸配列同一性を有し、ウイルス様粒子に集合体化することができることが好ましいポリペプチドを包含する。「変異コートタンパク質」なる用語は、野生型組み換えタンパク質又はコートタンパク質のそれぞれから得られるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指し、このとき該アミノ酸配列は野生型配列と少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、95 %、97 % 又は 99 % の同一性であって、好ましくは VLP に集まる能力を保持する。

【0022】

本明細書中で用いる「ウイルス様粒子(VLP)」なる用語は、非複製性の又は非感染性の、好ましくは非複製性かつ非感染性のウイルス粒子を指すか、又は非複製性の又は非感染性の、好ましくは非複製性かつ非感染性のウイルス粒子、好ましくはウイルスのキャプシドに似た構造を指す。本明細書中で用いる「非複製性」なる用語は VLP に包含されるゲノムを複製することができないことを指す。本明細書中で用いる「非感染性」なる用語は宿主細胞に侵入することができないことを指す。好ましくは、本発明に係るウイルス様粒子は、ウイルスゲノムないしはゲノム機能のすべてないし一部を欠いているので、非複製性及び/又は非感染性である。一実施態様では、ウイルス様粒子はウイルス粒子であり、このウイルスゲノムは分解と再集合によって、又は VLP への精製されたタンパク質の集合によって、物理的又は化学的に不活性化され、取り除かれている。典型的かつより好ましくは、ウイルス様粒子は、ウイルスゲノムの複製及び感染の構成成分のすべてないし一部を欠いている。本発明に係るウイルス様粒子はそれらのゲノムとは異なる核酸を含有してもよい。本発明に係るウイルス様粒子の典型的かつ好適な実施態様は、対応するウイルス、バクテリオファージ、好ましくは RNA バクテリオファージのウイルスキャプシドなどのウイルスキャプシドである。「キャプシド」なる用語は、ウイルスタンパク質サブユニットからなる高分子集合に関する。一般的に、60、120、180、240、300、360 及び 360 以上のウイルスタンパク質サブユニットがある。典型的かつ好ましくは、これらサブユニットの相互作用により、固有の反復編成である構造を有するウイルスキャプシドが形成され、この構造は典型的かつ好ましくは球状である。例えば、RNA バクテリオファージのキャプシド、正二十面体対称の球状形状を有する。

【0023】

「RNA バクテリオファージのウイルス様粒子」：本明細書中で用いる「RNA バクテリオファージのウイルス様粒子」なる用語は、RNA バクテリオファージのコートタンパク質、その変異体ないしは断片を含んでなる、好ましくは基本的にこれからなる、あるいはこれからなるウイルス様粒子を指す。さらに、RNA バクテリオファージの構造に類似する RNA バクテリオファージのウイルス様粒子は非複製性及び/又は非感染性であり、RNA バクテリオファージの複製機構をコードする少なくとも一の遺伝子又は複数の遺伝子を欠損しており、及び典型的には、宿主にウイルスが接着するか侵入するためのタンパク質又はそれに関与するタンパク質をコードする一又は複数の遺伝子を欠損する。RNA バクテリオファージ由来の好適な VLP は、正二十面体の対称性を表し、180 のサブユニットからなる。本発明では、RNA バクテリオファージのウイルス様粒子なる用語は、RNA バクテリオファージの組み換えコートタンパク質、又はその断片ないしは変異体の自己集合体化によって得られる高分子構造を指すことが好ましく、このときこの自己集合体化はオリゴヌクレオチドの存在下で起こるのが好ましい。

【0024】

「コートタンパク質の自己集合体化(self assembly)を予防することが可能な薬剤」：コートタンパク質の自己集合体化を予防することが可能な薬剤は、前記混合物中のウイルス様粒子の自然形成を予防する薬剤である。当業者は、例えば実施例 9 に開示したように、サイズ排除クロマトグラフィによって前記混合物を分析することによって、実験的に前記薬剤の化学的性質及び適切な濃度を決定することができる。前記混合物を室温、好ましくは 22 °C で少なくとも 1 時間インキュベートした後に、実施例 9 に開示したサイズ排除クロマトグラフィによって非ウイルス様粒子が検出可能である場合に、薬剤はコートタン

10

20

30

40

50

パク質の自己集合体化を予防することができる。しかしながら、コートタンパク質の自己集合体化を予防することが可能な薬剤は該コートタンパク質を不可逆的に修飾せず、前記混合物から該薬剤を除去するとウイルス様粒子が自然に形成される。コートタンパク質の自己集合体化を予防することができる好適な薬剤は、界面活性剤、グアニジウムハイドロクロライド及び尿素、最も好ましくは尿素を含む。好適な界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、Tween 20、トリトンX 100などである。典型的にかつ好ましくは、コートタンパク質の自己集合体化を予防することが可能な薬剤は、還元された状態の前記コートタンパク質のシステイン残基によって形成される分子間ジスルフィド結合を保つ還元剤を更に含む。

【0025】

「タンパク質収率」：本発明の方法のタンパク質収率は、前記混合物に含まれるコートタンパク質の量と比較したときの、該方法の最終工程後にウイルス様粒子として回収されるコートタンパク質の量として決定され、このとき好ましくは、該コートタンパク質の量はブラッドフォードタンパク質アッセイによって決定される。典型的にかつ好ましくは、前記混合物に含有されるコートタンパク質の少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%は、前記方法の最終工程の後にウイルス様粒子として回収されるものであり、該最終工程は前記滅菌濾過であることが好ましい。

「オリゴヌクレオチド収率」：本発明の方法のオリゴヌクレオチド収率は、前記混合物に含まれるオリゴヌクレオチドの量と比較したときの、該方法の最終工程後にウイルス様粒子から回収されるオリゴヌクレオチドの量として決定され、このとき好ましくは、ウイルス様粒子から回収されるオリゴヌクレオチドの量は基本的に又は好ましくは厳密に実施例9に開示したように決定される。典型的にかつ好ましくは、前記混合物に含有されるオリゴヌクレオチドの少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%は、前記方法の最終工程の後にウイルス様粒子から回収されるものであり、該最終工程は前記滅菌濾過であることが好ましい。

【0026】

「純度」：(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる本発明の組成物の純度は、分析的サイズ排除HPLCによって測定され、該HPLCは基本的に、好ましくは厳密に実施例4に開示される条件下で行われる。前記組成物の純度は、同じクロマトグラムの総ピーク領域と比較したときの、該組成物に含まれる前記ウイルス様粒子のピーク領域の割合として決定される。典型的にかつ好ましくは、本発明の組成物の純度は、少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%である。

「one」、「a/an」：「one」、「a」又は「an」なる用語を本開示中で使用するとき、それらは、特に示さない限りは、「少なくとも一」、又は「一又は複数」を意味する。

「およそ」：本出願の意味の範囲内でおよそなる表現は±10%の意味を有するであろう。例えば、およそ100は90~110を意味する。

【0027】

本発明は、凝集したオリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物を生成するための方法を提供する。更に詳細には、本発明は、オリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物を作製する方法であって、好ましくは該オリゴヌクレオチドが50~110%の相対的なピークのスタート時間を含み、(a) オリゴヌクレオチドを溶液IIに準備する工程、このとき該オリゴヌクレオチドはその5'末端に少なくとも3のグアノシン自体を、その3'末端に少なくとも3のグアノシン自体を含むことが好ましく、そして該溶液IIは5~8のpHを含み、そして該溶液IIは陽イオンを含み、好ましくは該溶液II中の該陽イオンの濃度は少なくとも20mMであり、このとき該陽イオンは好ましくは Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} からなる群から選択されるものであり、(b) 50~99である温度IIIに溶液IIの温度を調整する工程、そして、(c) 該オリゴヌクレオチドが50~110%の相対的なピークのスタート時間を含むまで、該温度IIIに

て該溶液ⅠⅠ中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする工程、そして、(d) 50未満である温度ⅠⅤに溶液ⅠⅠの温度を調整する工程を含み、好ましくはこれらの工程が所定の順序で行われる方法を提供する。以下に記載のすべての実施態様はいずれかの組み合わせで本方法に応用可能である。

【0028】

上記したように、前記オリゴヌクレオチドに前記凝集工程の前に解離工程を行うことに利点があることを発見した。このとき該オリゴヌクレオチドは完全に解離されていることが好ましい。オリゴヌクレオチドの完全な解離とは、好ましくは基本的に実施例4に記載のように行われるサイズ排除HPLCにおけるオリゴヌクレオチドの見かけの分子量が、該オリゴヌクレオチドの配列から得られる分子量に相当することを意味する。ゆえに、本発明はさらに、オリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物を作製する方法であって、好ましくは該オリゴヌクレオチドが50～110%の相対的なピークのスタート時間を含み、(a) 少なくとも一つのポリGが伸展しているオリゴヌクレオチドを溶液Ⅰに準備する工程、このとき該溶液Ⅰはアルカリ性pHを含み、(b) 以下の工程を含む解離によって、該オリゴヌクレオチドを解離する工程、(i) 4～70 である温度Ⅰに溶液Ⅰの温度を調節する、(ii) 該オリゴヌクレオチドが相対的なピークのスタート時間を110%より上に含むまで、該温度Ⅰにて該溶液Ⅰ中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする、そして、(iii) 0～70 である温度ⅠⅠに該溶液Ⅰの温度を調整する、(c) pH5～8に該溶液ⅠのpHを調整する工程、そして、(d) 以下の工程を含む凝集によって、該オリゴヌクレオチドを凝集する工程、(i) pH5～8であり、好ましくは少なくとも20mMの濃度の陽イオンを含む溶液ⅠⅠに該オリゴヌクレオチドを準備する、このとき該陽イオンは好ましくは Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} からなる群から選択されるものであり、(ii) 50～99 である温度ⅠⅠⅠに溶液ⅠⅠの温度を調整する、(iii) 該オリゴヌクレオチドが50～110%の相対的なピークのスタート時間を含むまで、該温度ⅠⅠⅠにて該溶液ⅠⅠ中で該オリゴヌクレオチドをインキュベートする、そして、(iv) 50 未満である温度ⅠⅤに溶液ⅠⅠの温度を調整することを含み、好ましくはこれらの工程が所定の順序で行われる方法を提供する。

部分的に凝集したオリゴヌクレオチドを含みうる未処置のオリゴヌクレオチドの解離はアルカリ性pHで起こる。解離工程は温度を上げることによって促されうる。

【0029】

ゆえに、一実施態様では、溶液Ⅰは、8～13、好ましくは10～13、最も好ましくは12のpHを含む。溶液Ⅰが任意のバッファ又は薬剤を含んでもよく、又は、8と13の間のpHを調整することができる当分野で公知のバッファ又は薬剤を含む。好適な実施態様では、溶液Ⅰは、水酸化物、好ましくは水酸化金属、最も好ましくはアルカリ金属又はアルカリ土類金属の水酸化物、好ましくはアルカリ金属の水酸化物を含む。好適な実施態様では、前記水酸化物は、水酸化カリウム又は水酸化ナトリウム、最も好ましくは水酸化ナトリウムである。一実施態様では、前記溶液Ⅰ中の前記水酸化ナトリウム、好ましくは前記水酸化物の濃度は、10mM～200mM、より好ましくはおよそ25mM、最も好ましくは25mMである。

オリゴヌクレオチドの分解を避けるために、温度Ⅰは90 を超えないことが好ましく、温度Ⅰが70 を超えない。一実施態様では、温度Ⅰは室温、好ましくは19～25 である。他の実施態様では、温度Ⅰは4～70 、好ましくは20～70 、より好ましくは45～70 、好ましくはおよそ50 、そして最も好ましくは50 である。好適な実施態様では、前記温度Ⅰでの前記溶液Ⅰ中での前記オリゴヌクレオチドのインキュベートは、前記オリゴヌクレオチドが十分に分解されるまで行う。他の実施態様では、前記温度Ⅰでの前記溶液Ⅰ中での前記オリゴヌクレオチドのインキュベートは、前記オリゴヌクレオチドの相対的なピークのスタート時間が110%を超える、好ましくは130%を超える、最も好ましくは135%を超えるまで行う。更なる実施態様では、前記温度Ⅰでの前記溶液Ⅰ中での前記オリゴヌクレオチドのインキュベートは、30～190分間、好ましくは50～90分間、最も好ましくは70分間行う。

更なる好適な実施態様では、前記溶液 I 中での前記オリゴヌクレオチドの濃度は、 $50\ \mu\text{M}$ ~ $2\ \text{mM}$ 、好ましくは $50 \sim 500\ \mu\text{M}$ 、より好ましくは $200 \sim 300\ \mu\text{M}$ 、最も好ましくは $260\ \mu\text{M}$ である。

【0030】

オリゴヌクレオチドの解離は、溶液 I を中和するか又は酸性化し及び / 又は温度を下げることによって止めることができる。ゆえに、前記方法は、前記溶液 I の pH を pH 8 以下、好ましくは pH 5 ~ 8 に調整する工程を更に含む。好適な実施態様では、前記の pH の調整は、前記 pH が 6 ~ 7 となるまで、最も好ましくは前記 pH がおよそ 6 になるまで行う。更なる好適な実施態様では、前記溶液 I の pH の調整は、溶液 I に酸を加えることによって行う。このために当分野で公知のいずれかの鉱酸又は有機酸を用いてもよい。好適な実施態様では、前記酸は、リン酸、塩酸、及び有機酸からなる群から選択され、前記有機酸が蟻酸、酢酸及びクエン酸から選択されるのが好ましい。好適な実施態様では、前記酸は鉱酸である。好ましくは、前記酸はリン酸又は塩酸、最も好ましくはリン酸である。

10

前記工程はさらに、前記溶液 I の温度を温度 II に調整することを含み、前記温度 II が $0 \sim 70$ であることが好ましく、前記温度 II が温度 I よりも低いことが好ましい。好適な実施態様では、前記温度 II が $0 \sim 25$ 、好ましくは $0 \sim 10$ 、最も好ましくは $0 \sim 2$ である。

【0031】

方法はさらに、前記オリゴヌクレオチドを凝集する工程を含む。オリゴヌクレオチドの凝集は、G-四重鎖 DNA 構造を促すことができる陽イオン (Simonsson T., Biol. Chem. 382:621-628 を参照) を含む溶液中でおよそ中性の pH で、そして 50 を超える温度で前記オリゴヌクレオチドをインキュベートすることによって達成される。したがって、一実施態様では、前記陽イオンは、 Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 NH_4^+ 、 Cs^+ 、 Li^+ 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 及び Mg^{2+} からなる群から選択される。好適な実施態様では、前記陽イオンは Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} からなる群から選択され、より好ましくは前記陽イオンは Na^+ 又は K^+ であり、最も好ましくは前記陽イオンは Na^+ である。非常に好適な実施態様では濃度である。

20

好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドを含む溶液 II は、前記溶液 I に前記陽イオンを加えることによって得られ、該添加は溶液 I の pH の調整後に行うことが好ましい。

30

更なる実施態様では、前記溶液 II は、 Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 NH_4^+ 、 Cs^+ 、 Li^+ 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、及び Mg^{2+} からなる群から選択されるいずれかの陽イオンの混合である。更なる実施態様では、前記溶液 II は、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} からなる群から選択されるいずれかの陽イオンの混合である。非常に好適な実施態様では、前記混合物は Na^+ 及び K^+ を含むか、又は好ましくはこれらからなる。

【0032】

好適な実施態様では、前記溶液 II は、少なくとも $20\ \text{mM}$ 、好ましくは少なくとも $100\ \text{mM}$ 、より好ましくは、 $200 \sim 275\ \text{mM}$ 及び最も好ましくは $250\ \text{mM}$ の前記陽イオン、又は陽イオンの前記混合物を含む。非常に好適な実施態様では、前記溶液 II は、 $250\ \text{mM}$ の Na^+ 及び K^+ 、最も好ましくは $250\ \text{mM}$ の Na^+ を含む。なお更なる好適な実施態様では、前記溶液 II は、 $250\ \text{mM}$ の塩化ナトリウム又は塩化カリウム、最も好ましくは $250\ \text{mM}$ の塩化ナトリウムを含む。しかしながら、この目的のために当分野で公知のいずれかのナトリウム、カリウム、アンモニウム、リチウム、カルシウム又はマグネシウム塩が使われてもよい。

40

更なる実施態様では、前記溶液 II 中の前記オリゴヌクレオチドの濃度は、 $50\ \mu\text{M}$ ~ $2\ \text{mM}$ 、好ましくは $100 \sim 300\ \mu\text{M}$ 、最も好ましくは $175\ \mu\text{M}$ である。

更なる実施態様では、前記方法はさらに、溶液 II の温度を温度 III に調整すること

50

を含み、このとき前記温度ⅠⅠⅠは50～99、好ましくは80～90、より好ましくはおよそ85、最も好ましくは85である。

【0033】

更なる実施態様では、前記方法は、溶液ⅠⅠ中の前記オリゴヌクレオチドを温度ⅠⅠⅠにてインキュベートすることを含み、このとき前記オリゴヌクレオチドが50～110%、好ましくは80～95%、より好ましくは80～90%、さらにより好ましくは83～90%、さらにより好ましくは85～90%、最も好ましくは88%の相対的なピークのスタート時間を含むまで該インキュベートを行う。非常に好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドはG10(配列番号：8)であり、前記オリゴヌクレオチドが50～110%、好ましくは80～95%、より好ましくは80～90%、さらにより好ましくは83～90%、さらにより好ましくは85～90%、最も好ましくは88%の相対的なピークのスタート時間を含むまで、前記インキュベートを行う。

所望の相対的なピークのスタート時間を含むオリゴヌクレオチドを得るために必要なインキュベート時間は、配列とオリゴヌクレオチドの純度に依存し、典型的かつ好ましくはおよそ5分からおよそ30分までの範囲である。好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドはG10(配列番号：8)であり、前記温度ⅠⅠⅠでの溶液ⅠⅠ中での前記オリゴヌクレオチドのインキュベートは9～24分間行う。

凝集過程は溶液ⅠⅠを50より下に冷却することによって停止させる。好適な実施態様では、前記過程は溶液ⅠⅠの温度を温度ⅠⅤに調整することを含み、該温度ⅠⅤは50未満であり、該温度ⅠⅤは0～25、より好ましく、0～10、最も好ましくは0～2であることが好ましい。

【0034】

本発明の方法に適用する加熱及び/又は冷却の速度は、入手した凝集したオリゴヌクレオチドの収率及び粒子サイズの分布に影響を及ぼすことを発見した。特に、この工程のバッチ体積のスケールを上げる方法において、収率及び粒子サイズの分布は少なくとも3.6/分の温度勾配(すなわち加熱又は冷却速度)を用いてさらに改善されうることを発見した。当業者は、反応容器の反応体積、形状及び熱伝導率と選択する温度の違いに関する反応条件を正規化することによって定められた温度勾配が達成されうる。好適な実施態様では、前記の溶液Ⅰの温度を温度Ⅰに調整すること、前記の溶液Ⅰの温度を温度ⅠⅠに調整すること、前記の溶液ⅠⅠの温度を温度ⅠⅠⅠに調整すること、及び/又は前記の溶液ⅠⅠの温度を温度ⅠⅤに調節することは、最低3.6/分の温度勾配によって実行される。更なる好適な実施態様では、前記の溶液ⅠⅠの温度を温度ⅠⅠⅠに調整することは、最低3.6/分の温度勾配によって行い、該温度勾配はおよそ7/分であることが好ましい。更なる好適な実施態様では、前記の溶液ⅠⅠの温度を温度ⅠⅤに調節することは、最低3.6/分の温度勾配によって行い、該温度勾配はおよそ7/分であることが好ましい。

【0035】

集合体を形成することができるように、前記オリゴヌクレオチドは少なくとも1、好ましくは2のポリG伸展を含む。好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、その5'末端に少なくとも3、好ましくは少なくとも4のグアノシン自体を、そして、その3'末端に少なくとも3、好ましくは少なくとも4のグアノシン自体を含む。更なる好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、その5'末端に少なくとも4のグアノシン自体を、そして、その3'末端に少なくとも4のグアノシン自体を含む。好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、その5'末端に少なくとも3で最大20、好ましくは最大15のグアノシン自体を、そして、その3'末端に少なくとも3で最大20、好ましくは最大15のグアノシン自体を含む。更なる好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、その5'末端に少なくとも3、好ましくは少なくとも4、最大11のグアノシン自体を、そして、その3'末端に少なくとも3、好ましくは少なくとも4、最大10のグアノシン自体を含む。更なる好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドを含むメチル化されていないCpGであり、該オリゴヌクレオチドを含むメチル化さ

れていないC p Gは2つのポリG伸展を含むことが好ましく、このポリG伸展のそれぞれは少なくとも4のグアノシン自体からなることが好ましく、さらに該オリゴヌクレオチドを含むメチル化されていないC p Gはパリンドローム配列を含むことが好ましい、このパリンドローム配列は前記ポリG伸展の間に位置する。更なる好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、その5'末端に少なくとも3、好ましくは少なくとも4のグアノシン自体を、そして、その3'末端に少なくとも3、好ましくは少なくとも4のグアノシン自体を含み、さらに該オリゴヌクレオチドはパリンドローム配列を含み、該パリンドローム配列はGACGATCGTC(配列番号：1)であることが好ましい。

【0036】

更なる好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドはパリンドローム配列を含み、該パリンドローム配列はGACGATCGTC(配列番号：1)であることが好ましく、該パリンドローム配列は少なくとも3、好ましくは少なくとも4、多くても15のグアノシン自体がその5'末端で隣接しており、該パリンドローム配列は少なくとも3、好ましくは少なくとも4、多くても15のグアノシン自体がその3'末端で隣接している。

更なる好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、10～1000のヌクレオチド、好ましくは10～200のヌクレオチド、より好ましくは10～100のヌクレオチド、さらにより好ましくは20～40のヌクレオチド、最も好ましくは30のヌクレオチドを含む。

非常に好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、(a)「G4-4」GGGGGACGATCGTCGGGG(配列番号：2)；(b)「G5-5」GGGGGACGA TCGTCGGGGG(配列番号：3)；(c)「G6-6」GGGGGGACG ATCGTCGGGG GG(配列番号：4)；(d)「G7-7」GGGGGGGACGATCGTCGGG GGGG(配列番号：5)；(e)「G8-8」GGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGG(配列番号：6)；(f)「G9-9」GGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGG(配列番号：7)；(g)「G10」GGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGG(配列番号：8)；(h)「G11」GGGGGGGGG GGACGATCGT CGGGGGGGG GG(配列番号：9)からなる群から選択される核酸配列を含むか、又は好ましくはこれらからなり、該オリゴヌクレオチドはホスホジエステル結合したヌクレオチドから完全になることが好ましい。さらにより好適な実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは核酸配列「G10」GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG(配列番号：8)を含むか、又は好ましくはこれらからなり、このとき該オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合したヌクレオチドから完全になることが好ましい。

【0037】

さらに、本発明はオリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物に関し、該ヌクレオチド組成物は、上記のいずれか一の方法、上記いずれか一の実施態様を行うこと、の単独ないしはいずれかの組み合わせによって得ることができる。特に、本発明はオリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物に関し、該ヌクレオチド組成物は上記の方法のいずれかによって入手可能であり、該オリゴヌクレオチドは50～110%、好ましくは80～95%、より好ましくは80～90%、さらにより好ましくは83～90%、さらにより好ましくは85～90%、最も好ましくは88%の相対的なピークのスタート時間を含むことが好ましい。好適な実施態様では、前記ヌクレオチド組成物はオリゴヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドは、(a)「G4-4」GGGGGACGAT CGTCGGGG(配列番号：2)；(b)「G5-5」GGGGGACGA TCGTCGGGGG(配列番号：3)；(c)「G6-6」GGGGGGACG ATCGTCGGGG GG(配列番号：4)；(d)「G7-7」GGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG(配列番号：5)；(e)「G8-8」GGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGG(配列番号：6)；(f)「G9-9」GGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGG(配列番号：7)；(g)「G10」GGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGG(配列番号：8)；(h)「G11」GGGGGGGGG GGACGATCGT CGGGGGGGG GG(配列番号：9)からなる群から選択される核酸配列を含むか、又は好ましくはこれらからなり、該オリゴヌクレオチドはホスホジエステル結合したヌクレオチドから完全になることが好ましい。さらにより好適な実施態様では、前記ヌクレオチド組成物はオリゴヌクレオチドを含み、このとき該オリゴヌクレオチドは核酸配列「G10」GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG(配列番号：8)を含むか、又は好ましくはこれらからなり、このとき該オリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドはホスホジエステル結合したヌクレオチドから完全になることが好ましい。非常に好適な実施態様では、前記ヌクレオチド組成物はオリゴヌクレオチドを含み、このとき該オリゴヌクレオチドは核酸配列「G 1 0」GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG(配列番号：8)からなり、このとき該オリゴヌクレオチドはホスホジエステル結合したヌクレオチドから完全になり、前記オリゴヌクレオチドは50～110%、好ましくは80～95%、より好ましくは80～90%、さらにより好ましくは83～90%、さらにより好ましくは85～90%、最も好ましくは88%の相対的なピークのスタート時間を含む。

【0038】

前述のように、本発明のヌクレオチド組成物に含まれる凝集したオリゴヌクレオチドはRNAバクテリオファージのコートタンパク質が自己集合体化し、これによってRNAバクテリオファージのウイルス様粒子が形成されるのを促すので、本発明のヌクレオチド組成物は、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法に有用であり、このとき該オリゴヌクレオチドは該ウイルス様粒子内にパッケージ化される。したがって、本発明は、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法であって、(a) 該RNAバクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、(b) 本発明のいずれかの方法によって入手可能なヌクレオチド組成物である、オリゴヌクレオチドを含むヌクレオチド組成物を準備する工程、(c) (i) 前記コートタンパク質と、(ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤と、(iii) 前記オリゴヌクレオチドとを含有してなる混合物を生成する工程、(d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、(e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含む方法に関する。前記方法は、本明細書中に記載した実施態様といずれか一の特徴とをいずれかの組み合わせで含んでよい。

【0039】

50～110%の相対的なピークのスタート時間を含むオリゴヌクレオチドは本発明の目的のために最も有用であり、それに対して、より高い又はより低い相対的なピークのスタート時間を含むオリゴヌクレオチドは低い収率となりうる。したがって、本発明はさらに、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法であって、(a) 該RNAバクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、(b) オリゴヌクレオチドを準備する工程、(i) 該オリゴヌクレオチドは少なくとも一つのポリG伸展を有することが好ましく、そして、(ii) 該オリゴヌクレオチドは50～110%の相対的なピークのスタート時間を含むものであり、(c) (i) 前記コートタンパク質と、(ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤と、(iii) 前記オリゴヌクレオチドとを含有してなる混合物を生成する工程、(d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、(e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含む方法に関する。前記方法は、本明細書中に記載した実施態様といずれか一の特徴とをいずれかの組み合わせで含んでよい。

当業者は、標準的な方法を適用することによってRNAバクテリオファージから前記コートタンパク質を精製することによってRNAバクテリオファージのコートタンパク質を生産して、精製することが可能である。しかしながら、好適な実施態様では、前記コートタンパク質は、好ましくは大腸菌の該コートタンパク質の発現によって、組み換えて生産される。RNAバクテリオファージのコートタンパク質を得る方法は、実施例の項目において開示される。好適な実施態様では、前記コートタンパク質は、RNAバクテリオファージの組み換えタンパク質又はその断片を含むか、あるいは基本的にこれからなるか、あるいはこれからなり、該RNAバクテリオファージは、(a) バクテリオファージQ；(b) バクテリオファージR17；(c) バクテリオファージfr；(d) バクテリオファージGA；(e) バクテリオファージSP；(f) バクテリオファージMS2；(g) バクテリオファ

ージ M 1 1 ; (h) バクテリオファージ M X 1 ; (i) バクテリオファージ N L 9 5 ; (j) バクテリオファージ f 2 ; (k) バクテリオファージ P P 7 ; 及びバクテリオファージ A P 2 0 5 からなる群から選択されるのが好ましい。好適な実施態様では、前記 R N A バクテリオファージはバクテリオファージ Q である。R N A バクテリオファージ、特にバクテリオファージ Q のウイルス様粒子を発現させ、精製するための工程及び方法は、国際公開 2 0 0 6 / 1 2 5 8 2 1 A 2 及び国際公開 2 0 0 7 / 0 3 9 5 5 2 A 1 において開示される。これらは出典明記によって本明細書中に援用される。例えば本明細書中の実施例にて説明したように、R N A バクテリオファージのコートタンパク質はウイルス様粒子の分解によって得られてもよい。

【 0 0 4 0 】

更なる好適な実施態様では、前記 R N A バクテリオファージはバクテリオファージ A P 2 0 5 である。また、アミノ酸 5 のプロリンがスレオニンに置換している A P 2 0 5 コートタンパク質を含む、A P 2 0 5 V L P の集合体化しやすい変異形態が本発明の実施に使われてもよい。国際公開 2 0 0 4 / 0 0 7 5 3 8 は、特に実施例 1 及び実施例 2 において、A P 2 0 5 コートタンパク質を含む V L P を得る方法、特にこれらの発現及び精製方法を記載する。国際公開 2 0 0 4 / 0 0 7 5 3 8 は出典明記によって本明細書中に援用される。

更なる好適な実施態様では、前記 R N A バクテリオファージはバクテリオファージ f r である。Pushko P et al. ((1993) Prot Engin 6:883-891) によって記載されるように、組み換え V L P の形態の f r コートタンパク質が得られてもよい。更なる好適な実施態様では、前記 R N A バクテリオファージはバクテリオファージ G A である。G A V L P は、G A ファージから p Q b 1 8 5 への逆転写によって単離される G A コートタンパク質をクローニングすることによって得られてもよい。これは国際公開 2 0 0 4 / 0 0 7 5 3 8 の実施例のために記述される。f r 及び G A の V L P の分解は、場合によって 0 . 1 M の濃度の酢酸を添加した 7 M 尿素中で V L P をインキュベートすることによって容易に行うことができる。さらに、有意な量のコートタンパク質が流れ出るが、核酸は保持される pH が、又はコートタンパク質もカラムに吸着され、その後塩勾配によって溶出される pH のいずれかのイオン交換クロマトグラフィによって、核酸はコートタンパク質から精製される。

【 0 0 4 1 】

好適な実施態様では、前記コートタンパク質は、(a) 配列番号：1 0 (Q C P) ; (b) 配列番号：1 0 と配列番号：1 1 の混合物 (Q A 1 タンパク質) ; (c) 配列番号：1 2 (R 1 7 コートタンパク質) ; (d) 配列番号：1 3 (f r コートタンパク質) ; (e) 配列番号：1 4 (G A コートタンパク質) ; (f) 配列番号：1 5 (S P コートタンパク質) ; (g) 配列番号：1 5 と配列番号：1 6 の混合物 ; (h) 配列番号：1 7 (M S 2 コートタンパク質) ; (i) 配列番号：1 8 (M 1 1 コートタンパク質) ; (j) 配列番号：1 9 (M X 1 コートタンパク質) ; (k) 配列番号：2 0 (f 2 コートタンパク質) ; (l) 配列番号：2 1 (f 2 コートタンパク質) ; (m) 配列番号：2 2 (P P 7 コートタンパク質) ; 及び (n) 配列番号：2 3 (A P 2 0 5 コートタンパク質) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又は好ましくはこれからなる。更なる好適な実施態様では、前記コートタンパク質は、(a) 配列番号：1 0 ; (b) 配列番号：1 1 と配列番号：1 1 の混合物 ; (c) 配列番号：1 3 ; (d) 配列番号：1 4 ; (e) 配列番号：2 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又は好ましくはこれからなる。更なる非常に好適な実施態様では、前記コートタンパク質は、(a) 配列番号：1 0 ; 及び (b) 配列番号：1 0 と配列番号：1 1 の混合物からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又は好ましくはこれからなる。

さらに、露出したリジン残基がアルギニンによって置換されているバクテリオファージ Q の変異コートタンパク質が、本発明のために使われてもよい。ゆえに、更なる好適な実施態様では、前記コートタンパク質は、国際公開 0 2 / 0 5 6 9 0 5 (この実施例 1 8 を参照) に開示される変異 Q コートタンパク質を含むか、基本的にこれからなるか、あるいはこれからなる。

【 0 0 4 2 】

さらにまた、RNAバクテリオファージコートタンパク質は、細菌宿主での発現の際に自己集合化することが示された(Kastelein, RA. et al., Gene 23:245-254 (1983)、Kozlovskaya, TM. et al., Dokl. Akad. Nauk SSSR 287:452-455 (1986)、Adhin, MR. et al., Virology 170:238-242 (1989)、Priano, C. et al., J. Mol. Biol. 249:283-297 (1995))。特にGA(Ni, CZ., et al., Protein Sci. 5: 2485-2493 (1996)、Tars, K et al., J. Mol. Biol. 271:759-773(1997))、及びfr(Pushko P. et al., Prot. Eng. 6: 883-891 (1993)、Liljas, L et al. J Mol. Biol. 244:279-290, (1994))の生物学的及び生化学的な性質が開示された。いくつかのRNAバクテリオファージの結晶構造は決定されている(Golmohammadi, R. et al., Structure 4:543-554 (1996))。

10

典型的かつ好ましくは、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための本明細書に開示した方法は室温で実施される。好適な実施態様では、前記方法は、15～30、好ましくは19～25、最も好ましくは22で行われる。更なる好適な実施態様では、前記の混合物の生成、前記の混合物からの薬剤の除去、及び/又は前記のコートタンパク質のウイルス様粒子への自己集合化は、15～30、好ましくは19～25、最も好ましくは22で行われる。前記方法は混合物を生成することを含み、該混合物は、(i) 前記コートタンパク質；(ii) 前記コートタンパク質の自己集合を予防することが可能な薬剤；(iii) 前記オリゴヌクレオチドを含む。好適な実施態様では、前記混合物中の前記コートタンパク質の濃度は0.5～10mg/ml、好ましくは1～4mg/ml、最も好ましくは2.5mg/mlであり、該濃度はブラッドフォードアッセイにおいて決定されることが好ましい。更なる好適な実施態様では、前記混合物中の前記オリゴヌクレオチドの濃度は、12.5～250μM、より好ましくは25～100μM、最も好ましくは62.5μMである。

20

【 0 0 4 3 】

パッケージ化工程の最適収率を得るために、前記オリゴヌクレオチド、及び前記混合物中の前記コートタンパク質のモル比は、0.5～1.2、好ましくは0.6～0.8、最も好ましくは0.7である。コートタンパク質当たりのオリゴヌクレオチドの使用が少なければ収率が低くなり、過剰なオリゴヌクレオチドを使うと費用が増し、純度の低い生成物となるであろう。非常に好適な実施態様では、前記混合物中の前記コートタンパク質の濃度は2.5mg/mlであり、前記混合物中の前記オリゴヌクレオチドの濃度は62.5μMである。

30

一般に、ウイルス、特にRNAバクテリオファージのコートタンパク質は、キャプシド構造、例えばウイルス様粒子に自己集合体化する強力な傾向がある。常にではなく、多くの場合、この傾向はRNA又はDNAなどの核酸の存在下で亢進される。前記コートタンパク質の自己集合体化が起こる前に前記コートタンパク質と前記オリゴヌクレオチドを適度に混合するために、該混合物は該コートタンパク質の自己集合を防ぐことが可能な薬剤を含む。典型的かつ好ましくは、前記薬剤は変性化合物を含む。多数の変性化合物は生化学において公知であり、界面活性剤、尿素又はグアニジウムハイドロクロライドを含む。好適な界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、Tween 20、Triton X 100などである。好適な実施態様では、前記変性化合物は尿素又はグアニジウムハイドロクロライドであり、前記混合物中の該変性化合物、好ましくは該尿素の濃度は0.25～7.2M、好ましくは1Mであることが好ましい。非常に好適な実施態様では、前記変性化合物は尿素であり、前記混合物中の前記尿素の濃度は0.5～2M、好ましくは0.7～1.5M、より好ましくは0.8～1.2M、最も好ましくは1Mである。

40

【 0 0 4 4 】

更なる好適な実施態様では、前記混合物のpHはおよそ中性であり、該pHは6～8、より好ましくは6.8～7.5であることが好ましく、前記pHは7.2であることが最も好ましい。非常に好適な実施態様では、前記混合物はリン酸バッファ、好ましくはリン酸ナトリウムバッファを含み、さらに、前記混合物中の該リン酸バッファの終濃度は2～

50

100 mM、より好ましくは10～50 mM、最も好ましくはおよそ20 mMであることが好ましい。

更なる実施態様では、前記混合物はさらに塩を含み、前記塩はハロゲン化物、好ましくはアルカリ金属の塩化物であることが好ましく、該塩は塩化カリウム又は塩化ナトリウム又はこれらの組合せであることがより好ましく、該塩は塩化ナトリウムであることが最も好ましい。好適な実施態様では、前記混合物中の、前記塩又は塩類の組み合わせの濃度、好ましくは前記塩化ナトリウムの濃度は、0～1 M、好ましくは0～550 mM、より好ましくは0～350 mM、さらにより好ましくは50～350 mM、最も好ましくは250 mMである。

【0045】

特定のRNAバクテリオファージ、特に、バクテリオファージQ、バクテリオファージAP205及びバクテリオファージfrのキャプシド及び/又はウイルス様粒子は、前記キャプシド又はウイルス様粒子を形成しているタンパク質サブユニット間の分子間ジスルフィド結合によって安定化される。前記混合物への還元剤の添加は、前記ジスルフィド架橋を還元状態に保ち、前記コートタンパク質の自己集合の防止を助ける。ゆえに、好適な実施態様では、前記薬剤は還元剤を更に含み、該還元剤は、当分野で公知のDTT(dithioerythol)、 β -メルカプトエタノール、TCEP及び他の還元剤から選択されるのが好ましい。好適な実施態様では、前記還元剤はDTTであり、前記混合物中の前記DTTの濃度は1～25 mM、好ましくは2～5 mMであることが好ましい。非常に好適な実施態様では、前記RNAバクテリオファージはバクテリオファージQ、バクテリオファージAP205又はバクテリオファージfrであり、前記薬剤は還元剤を更に含み、該還元剤はDTTであることが好ましく、前記混合物中の該DTTの濃度は1～25 mM、好ましくは2～5 mMであることがさらに好ましい。更なる好適な実施態様では、前記コートタンパク質は前記ウイルス様粒子の分子間ジスルフィド結合を形成することが可能なシステイン残基を含み、該薬剤は還元剤を更に含み、該還元剤はDTTであることが好ましく、前記混合物中の該DTTの濃度は1～25 mM、好ましくは2～5 mMであることがさらに好ましい。

【0046】

好適な実施態様では、前記の混合物を生成することは、(i) 前記コートタンパク質と、(ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤と、(iii) 前記オリゴヌクレオチドとを前記混合物に加えることを含み、この添加を所定の順序で行うことが好ましく、該混合物が該オリゴヌクレオチドの添加の前に混合されることがさらに好ましい。

更なる好適な実施態様では、前記方法は、前記薬剤の除去の前に前記混合物をインキュベートする処置をさらに含み、該インキュベートはおよそ50～70、好ましくはおよそ60分間行うことが好ましい。更なる好適な実施態様では、前記混合物のインキュベートは、15～30、より好ましくは19～25、最も好ましくは22で行う。さらに好適な実施態様では、前記混合物のインキュベートは該混合物をかき回すことを含み、該攪拌はおよそ50～200回転数/分、最も好ましくはおよそ100回転数/分で行うことが好ましい。非常に好適な実施態様では、前記混合物のインキュベートはおよそ60分間行い、前記混合物のインキュベートは該混合物を攪拌することを含み、該攪拌はおよそ100回転数/分で行われることが好ましい。

一実施態様では、前記の混合物からの薬剤の除去は第一バッファとの第一バッファ交換によって行われ、該第一バッファ交換は透析によって、又は連続流動濾過、好ましくは連続流動濾過によって行われるのが好ましい。前記第一バッファ交換は、前記コートタンパク質と自己集合体化したVLPの保持を可能にする分子量カットオフを含むメンブランによって行う。好適な実施態様では、前記第一バッファ交換はメンブランによって行い、前記メンブランは、1～50 kD、好ましくは5～30 kD、最も好ましくは30 kDの分子量カットオフを含む。非常に好適な実施態様では、前記第一バッファ交換は、1～50 kD、好ましくは30 kDの分子量カットオフを含むメンブランに対する連続流動濾過に

10

20

30

40

50

よって行われ、該第一バッファの体積は前記混合物の体積のおよそ6倍であることがさらに好ましい。非常に好適な実施態様では、前記メンブランは、30 kD分子量カットオフを含むBio max-5 (PES)である。非常に好適な実施態様では、前記第一バッファ交換は、1 ~ 50 kD、好ましくは30 kDの分子量カットオフを含むメンブランに対する連続流動濾過によって行われ、このとき透過流量はおよそ $96 \text{ l} / (\text{m}^2 \times \text{h})$ に調整される。

【0047】

更なる好適な実施態様では、前記第一バッファは塩を含み、このとき該第一バッファの塩組成は該混合物の塩組成と同一である。好適な実施態様では、前記第一バッファ中の塩は、ハロゲン化物、好ましくはアルカリ金属の塩化物であり、該塩は塩化カリウム又は塩化ナトリウム又はこれらの組合せであることが好ましく、該塩は塩化ナトリウムであることが最も好ましい。好適な実施態様では、前記第一バッファ中の、前記塩又は塩類の組み合わせの濃度、好ましくは前記塩化ナトリウムの濃度は、0 ~ 1 M、好ましくは0 ~ 550 mM、より好ましくは0 ~ 350 mM、さらにより好ましくは50 ~ 350 mM、最も好ましくは250 mMである。更なる好適な実施態様では、前記第一バッファのpHは6 ~ 8、より好ましくは6.8 ~ 7.5であり、最も好ましくは前記pHは7.2である。更なる好適な実施態様では、前記第一バッファはリン酸バッファ、好ましくはリン酸ナトリウムバッファを含み、前記第一バッファ中の前記リン酸バッファの終濃度は2 ~ 100 mM、より好ましくは10 ~ 50 mM、最も好ましくはおよそ20 mMであることがさらに好ましい。

自己集合において形成される前記ウイルス様粒子を安定化するために、前記ウイルス様粒子を、ウイルス様粒子内で分子間ジスルフィド結合を形成することが可能な酸化剤と接触させることが好ましい。ゆえに、好適な実施態様では、前記方法はさらに、前記ウイルス様粒子を酸化剤と接触させる工程を含み、該酸化剤は、(a) 過酸化水素(好ましくは該過酸化水素の濃度は0.25 ~ 50 mM、好ましくは2 mMである)、(b) 酸素、(c) グルタチオン、(d) アスコルビン酸、(e) Cu^{2+} 、及び(f) Fe^{3+} からなる群から選択されるのが好ましい。非常に好適な実施態様では、前記RNAバクテリオファージはバクテリオファージQ、バクテリオファージAP205又はバクテリオファージfrであり、前記方法はさらに、前記ウイルス様粒子を酸化剤と接触させる工程を含み、該酸化剤は、(a) 過酸化水素(好ましくは該過酸化水素の濃度は0.25 ~ 50 mM、好ましくは2 mMである)、(b) 酸素、(c) グルタチオン、(d) Cu^{2+} 、及び(e) Fe^{3+} からなる群から選択されるのが好ましく、該酸化剤は過酸化水素であることが最も好ましく、該過酸化水素の濃度は0.25 ~ 50 mM、好ましくは2 mMであることがさらに好ましい。好適な実施態様では、前記コートタンパク質は前記ウイルス様粒子内で分子間ジスルフィド結合を形成することが可能なシステイン残基を含み、前記コートタンパク質は、バクテリオファージQ、バクテリオファージAP205又はバクテリオファージfrのコートタンパク質であることが好ましく、前記方法はさらに、前記ウイルス様粒子を酸化剤と接触させる工程を含み、該酸化剤は、(a) 過酸化水素(好ましくは該過酸化水素の濃度は0.25 ~ 50 mM、好ましくは2 mMである)、(b) 酸素、(c) グルタチオン、(d) Cu^{2+} 、及び(e) Fe^{3+} からなる群から選択されるのが好ましく、該酸化剤は過酸化水素であることが最も好ましく、該過酸化水素の濃度は0.25 ~ 50 mM、好ましくは2 mMであることがさらに好ましい。

【0048】

更なる好適な実施態様では、前記方法はさらに前記ウイルス様粒子を精製する工程を含み、該精製は第二バッファとの第二バッファ交換を含むことが好ましく、該第二バッファは薬学的に許容されるバッファであることがさらに好ましい。好適な実施態様では、前記第二バッファ交換は第二バッファによって行われ、該第二バッファ交換は透析によって、又は連続流量濾過、好ましくは連続流量濾過によって行われることが好ましい。前記第二バッファ交換は、前記ウイルス様粒子の保持を可能にする分子量カットオフを含むメンブランによって行い、この分子量カットオフは前記コートタンパク質及び/又は前記オリゴ

ヌクレオチドの透過を可能にすることが好ましい。ゆえに、好適な実施態様では、前記第二バッファ交換は、 $100 \sim 1000 \text{ kD}$ 、好ましくは 300 kD の分子量カットオフを含むメンブランに対して行われ、該第二バッファ交換は連続流量濾過によって行われることが好ましい。非常に好適な実施態様では、前記メンブランは、 300 kD の分子量カットオフを含むPLCMK-300である。更なる非常に好適な実施態様では、前記第二バッファ交換は、 $100 \sim 1000 \text{ kD}$ 、好ましくは 300 kD の分子量カットオフを含むメンブランに対する連続流動濾過によって行われ、このとき前記混合物の体積のおよそ10倍が交換されるのが好ましく、透過流量はおよそ $100 \text{ l} / (\text{m}^2 \times \text{h})$ に調整されることがさらに好ましい。

更なる実施態様では、前記方法は、前記ウイルス様粒子を濃縮することを含み、この濃縮は、前記組成物中のウイルス様粒子の終濃度を $1 \sim 5 \text{ mg タンパク質} / \text{ml}$ 、好ましくはおよそ $2.5 \text{ mg タンパク質} / \text{ml}$ にするまで行われることが好ましく、該濃度はブラッドフォードタンパク質アッセイで測定されるのが好ましく、該ウイルス様粒子は該第二バッファに溶解されることがさらに好ましい。非常に好適な実施態様では、前記の濃縮はウイルス様粒子を保持することが可能なメンブランによって行われ、該メンブランの分子量カットオフは、 $100 \sim 1000 \text{ kD}$ 、好ましくはおよそ 300 kD であることが好ましく、このときこの濃縮が $100 \text{ l} / (\text{h} \times \text{m}^2)$ 未満、好ましくはおよそ $30 \text{ l} / (\text{h} \times \text{m}^2)$ のメンブランに対する透過流量で行われることがさらに好ましい。濃縮工程の間に流量速度が低ければ生成物の沈殿が妨げられる。

【0049】

更なる好適な実施態様では、前記方法はさらに、前記ウイルス様粒子を滅菌濾過する工程を含み、該ウイルス様粒子が前記第二バッファに含まれることが好ましく、該滅菌濾過は $0.1 \sim 0.45 \mu\text{m}$ 、好ましくはおよそ $0.22 \mu\text{m}$ を含むメンブランフィルターによって行われることがさらに好ましい。

更なる好適な実施態様では、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための本発明に係る方法はタンパク質の産生を含み、このタンパク質産生(収率)は少なくとも 50% 、好ましくは少なくとも 60% 、より好ましくは少なくとも 70% 、さらにより好ましくは少なくとも 75% 、最も好ましくは少なくとも 80% である。

更なる好適な実施態様では、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための本発明に係る方法はオリゴヌクレオチドの産生を含み、このオリゴヌクレオチド産生(収率)は少なくとも 50% 、好ましくは少なくとも 60% 、より好ましくは少なくとも 70% 、さらにより好ましくは少なくとも 75% 、最も好ましくは少なくとも 80% である。

更なる好適な実施態様では、前記のウイルス様粒子を含む組成物は、少なくとも 80% 、好ましくは少なくとも 90% 、より好ましくは少なくとも 95% 、さらにより好ましくは少なくとも 98% 、最も好ましくは少なくとも 99% の純度を含む。

【0050】

更なる好適な実施態様では、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための本発明に係る方法はオリゴヌクレオチドの産生を含み、このオリゴヌクレオチド産生(収率)は少なくとも 50% 、好ましくは少なくとも 60% 、より好ましくは少なくとも 70% 、さらにより好ましくは少なくとも 75% 、最も好ましくは少なくとも 80% である。

更なる好適な実施態様では、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための本発明に係る方法はタンパク質の産生とオリゴヌクレオチドの産生を含み、このタンパク質産生(収率)は少なくとも 50% 、好ましくは

10

20

30

40

50

少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも80%である。

更なる好適な実施態様では、前記のウイルス様粒子を含む組成物は、100 μ g コートタンパク質につきオリゴヌクレオチドを15 ~ 30 μ g、好ましくは20 ~ 25 μ g、最も好ましくはおよそ20 μ g 含み、該ウイルス様粒子はバクテリオファージQ のウイルス様粒子であることが好ましく、該オリゴヌクレオチドはG10 (配列番号：8)であることがさらに好ましく、このウイルス様粒子を含む組成物は少なくとも98%、好ましくは少なくとも99%の純度を含むことがさらに好ましく、該コートタンパク質の定量化はブラッドフォードタンパク質アッセイによって行われることがさらに好ましく、該オリゴヌクレオチドの定量化は基本的に、好ましくは厳密に実施例9に開示されるように行われる

10

【0051】

本発明はさらに、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法における、本発明のいずれかーに記載の方法によって入手可能なヌクレオチド組成物の使用に関し、この方法は、(a) 該RNAバクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、(b) ヌクレオチド組成物を準備する工程、(c) (i) 前記コートタンパク質と、(ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤と、(iii) 前記オリゴヌクレオチドとを含有してなる混合物を生成する工程、(d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、(e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含むことが好ましく、このとき前記のヌクレオチド組成物に含まれるオリゴヌクレオチドは50 ~ 110%の相対的なピークのスタート時間を含むことが好ましく、前記RNAバクテリオファージがQ であることがさらに好ましく、前記オリゴヌクレオチドがG10 (配列番号：8)であることがさらに好ましい。

20

【0052】

本発明はさらに、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物を作製するための方法における、50 ~ 110%の相対的なピークのスタート時間を含むオリゴヌクレオチドの使用に関し、この方法は、(a) 該RNAバクテリオファージのコートタンパク質を準備する工程、(b) オリゴヌクレオチドを準備する工程、(c) (i) 前記コートタンパク質と、(ii) 前記コートタンパク質の自己集合化を防ぐことが可能な薬剤と、(iii) 前記オリゴヌクレオチドとを含有してなる混合物を生成する工程、(d) 前記混合物から前記薬剤を除去する工程、そして、(e) 前記コートタンパク質をウイルス様粒子に自己集合化させる工程を含むことが好ましく、このとき前記RNAバクテリオファージがQ であることが好ましく、前記オリゴヌクレオチドがG10 (配列番号：8)であることがさらに好ましい。

30

【0053】

本発明はさらに、本発明のいずれかーに記載の方法によって入手可能な組成物であって、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物に関し、このとき該RNAバクテリオファージがQ であることが好ましく、該オリゴヌクレオチドがG10 (配列番号：8)であることがさらに好ましく、該組成物の純度が少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%であることがさらに好ましく、前記のウイルス様粒子を含む組成物は100 μ g コートタンパク質につきオリゴヌクレオチドを15 ~ 30 μ g、好ましくは20 ~ 25 μ g、最も好ましくはおよそ20 μ g 含むことがさらに好ましい。

40

本発明はさらに、本発明のいずれかーに記載の方法によって入手可能な組成物であって、(i) RNAバクテリオファージのウイルス様粒子である、ウイルス様粒子と、(ii) 該ウイルス様粒子内にパッケージ化されるオリゴヌクレオチドとを含有してなる組成物に関

50

し、このとき該RNAバクテリオファージがQであることが好ましく、該オリゴヌクレオチドがG10(配列番号：8)であることがさらに好ましく、該組成物の純度が少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%であることがさらに好ましく、前記オリゴヌクレオチドはDNアーゼ加水分解にアクセス可能でない。

【実施例】

【0054】

実施例1 オリゴヌクレオチドG10(配列番号：8)の解離と凝集

G10の定量：G10は、340nmの吸収によって校正した260nmのUV吸収によって定量化し、このとき $A_{260-340}$ は1cm経路長で27.8μgの濃度に相当する。

解離(10.0mlスケール、260μM G10、25mM NaOH、50、70分)：45.91mgのG10を15mlチューブに入れた。粉を11.0mlの純水に溶解した($c = 325.3\mu\text{M}$ ；吸光度測定によって決定した)。8.0mlのオリゴヌクレオチド溶液を、15mlのチューブ(260μM G10、25mM NaOH)中で250μlの1M NaOHと1.75mlの純水に混合した。混合物をウォーターバス中で50、70分間かけて解離させた。溶液を氷上で冷却した後に、pHを0.5MのHClにてpH5.31に調整した。540μlの0.5M HClと5μlの1M NaOHを加えた。

凝集(10.0mlスケール、175μM G10、250mM Na⁺、85、9~24分)：7.1mlの解離したG10溶液、2.13mlの純水及び770μlの3M NaClを、15mlチューブ(175μM オリゴ、250mM Na⁺)中で混合した。混合物をウォーターバス中で85で9分間インキュベートした。溶液を氷/ウォーターバスにて冷却し、使用時まで氷上に保存した。凝集されたオリゴヌクレオチド溶液は、調製後で3時間以内に使われなければならない。

【0055】

実施例2 オリゴヌクレオチドG4-4の解離と凝集

脱凝集：260μM オリゴヌクレオチドG4-4(配列番号：2)と25mM NaOHを純水に含む溶液を調製した。溶液を70分間50に加熱し、その後氷上で冷却し、溶液のpHを0.5M HClを用いて5と8の間のpHに調整した。

凝集：解離したG4-4を含む溶液を純水と3M NaClにて、230μM G4-4及び250mM Na⁺の終濃度に希釈した。混合物は、6.8/分の加熱勾配によって数分(2~70分)かけて80に加熱した。インキュベートの後、混合物を6.8/分の温度勾配にて0~2に冷却した。

サイズ排除HPLC(実施例4を参照)による生成物の分析によって、凝集したオリゴヌクレオチドが得られたことが明らかとなった。(相対的なピークのスタート時間：88%)

【0056】

実施例3 オリゴヌクレオチドの解離と凝集

解離：260μM オリゴヌクレオチドG5-5(配列番号：3)、G6-6(配列番号：4)、G7-7(配列番号：5)、G8-8(配列番号：6)、G9-9(配列番号：7)及びG11(配列番号：9)と、25mM NaOHを純水にそれぞれ含む溶液を調製する。溶液を70分間50に加熱し、その後氷上で冷却し、溶液のpHを0.5M HClを用いて5と8の間のpHに調整する。

凝集：解離したオリゴヌクレオチドを含む溶液を純水と3M NaClにて、230μM オリゴヌクレオチド及び250mM Na⁺の終濃度に希釈した。混合物は、6.8/分の加熱勾配によって数分(2~70分)かけて80に加熱した。インキュベートの後、混合物を6.8/分の温度勾配にて0~2に冷却した。

この凝集方法の生成物はサイズ排除HPLCによって分析される(実施例4を参照)。

【0057】

実施例 4 サイズ排除 HPLC によるオリゴヌクレオチド G10 の凝集状態の分析

G10 の凝集状態は、以下の条件を用いた分析的サイズ排除 HPLC にて分析した。

カラム： TSK gel 5000 PwXL 7.8 mm × 30.0 cm (Lot: 5PWX06GN MH3304, Art: 08023, Tosoh Bioscience)

溶出剤： PBS (150 mM NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.2)

注射体積： 40.0 μl (およそ 20 μM ~ およそ 500 μM の濃度を含むことが好ましい)

流速： 0.8 ml / 分 勾配： 均一濃度

ランタイム： 20 分

波長： 215、260 及び 280 nm、260 nm のデータ評価

カラムオープン温度： 25

自動回収装置： 8

標準物質としてバクテリオファージ Q のキャプシドを用いた。

Q キャプシドと比較したときの G10 のピークのスタート時間 X % (相対的なピークのスタート時間 Q) は、以下の通りに算出した。X % = オリゴヌクレオチドのピークのスタート時間 [分] ÷ Q キャプシド標準物質 [分] の持続時間 × 100 %、このときオリゴヌクレオチドのピークのスタート時間はオリゴヌクレオチドの溶出が検出可能になる時間として測定し、Q キャプシド標準物質の持続時間は標準物質の最大のピークが生じる時間として測定した。オリゴヌクレオチド G10 と標準物質としてのバクテリオファージ Q のキャプシドの溶出プロファイルの例を図 1 に示す。図 1 において示されるクロマトグラムに基づいて、88 % の相対的なピークのスタート時間は、凝集したオリゴヌクレオチドについて算出した。

【0058】**実施例 5 無処置の G10、解離したオリゴヌクレオチド G10 及び凝集したオリゴヌクレオチド G10 の相対的なピークのスタート時間の比較**

基本的には実施例 1 に記載のように調製した解離した G10 と凝集した G10 の相対的なピークのスタート時間を測定し、商業的な供給元から得た無処置の G10 の相対的なピークのスタート時間と比較した。解離した G10 は、138 % (136.9 ~ 140.3 % ; n = 5) の相対的なピークのスタート時間を示した。実施例 1 に記載の解離 / 凝集の処理を行わなかった G10 調製物は解離した G10 と同じ範囲の相対的なピークのスタート時間を示す。解離及び凝集の後、G10 のピークのスタート時間は 88 % であることが明らかとなった。

【0059】**実施例 6 解離工程の影響**

無処理のオリゴヌクレオチド G10 と実施例 1 に記載のように解離させたオリゴヌクレオチド G10 を、基本的には実施例 1 に記載のように凝集させた。以下のような凝集条件を選択した。175 μM G10、250 mM Na⁺ (3 M NaCl の添加によって)、85 °C で 16 分間のインキュベーション、その後氷上で冷却。両調製物は Q キャプシド及び標準物質としての無処置の G10 を用いたサイズ排除 HPLC (実施例 4 を参照) によって分析した。結果として生じる HPLC クロマトグラムを図 2 に示す。

無処置の G10 は凝集した G10 を含んだ (図 2 A 及び 2 B、ボックス 1 を参照)。凝集の前に解離していなかった凝集した G10 は、Q キャプシドと同等か、又は Q キャプシドよりも高い見かけの分子量を示した (図 2 A、ボックス 2)。相対的なピークのスタート時間はおよそ 75 % であった。凝集の前に解離していた凝集された G10 は、Q キャプシドよりも低い見かけの分子量を表した (図 2 B、ボックス 2)。相対的なピークのスタート時間はおよそ 88 % であった。

【0060】**実施例 7 円二色性によるオリゴヌクレオチド G10 の凝集状態の分析**

無処置の G10、解離した G10 及び凝集した G10 (基本的には実施例 1 に記載のよう

10

20

30

40

50

に調製した)、並びにG10をパッケージ化したQ キャプシド(実施例10に記載のように得たQ G10)のCDスペクトルを、JASCO J-715分光光度計にて200nmと300nmの間で記録した。(図3)。凝集したG10のスペクトルは、262nmの最大及び240nmのトラフ値にて強いポジティブバンド(高い楕円形)の特徴を示した。これらのシグナルは、鎖が平行配向しているDNA四重体の典型的なスペクトルに対応することが報告されている(Lu et al., Biochemistry 31, p.2455, 1992)。重要なことに、250nm~300nmの範囲のCDスペクトルの形状は、凝集したG10がある場合に再集合体化するVLPのスペクトルを変化させない。ゆえに、G10は、パッケージの際に立体配置的变化を経ないようである。262nmの振幅のわずかな増加は、Q キャプシドに凝集したG10を選択的にパッケージ化していることを反映している可能性がある。このパッケージ化によって、凝集していない分子の分画を含んでいる凝集したG10と比較して、パッケージ化の後に四重体の割合が高くなる。これに対して、無処置のG10のスペクトルは定められる最大がない低い楕円の特徴を示し、これは定められる二次及び三次の構成成分を欠いていることを示す。また、295nmで最大、262nmで最小となることは逆平行の四重体配座異性体の存在を表すものであるが、解離したG10については低いCDシグナルも観察される(P. Balagurumoorthy et al., Nucleic Acids Research 20, p. 4061, 1992)。

【0061】

実施例8 分解/再集合体化によるG10を有するQ VLPのパッケージ化

Q VLPの分解: PBS(20mM リン酸、150mM NaCl、pH7.5)中の45mgのQ VLP(2.5mg/ml、ブラッドフォード分析によって決定)を、10mMのDTTにて、攪拌しながらRTで15分間還元した。その後、塩化マグネシウムを0.7Mの終濃度になるまで加え、攪拌しながらRTで15分間インキュベートし、カプセル化された宿主細胞RNAの沈殿と同時に起こるVLPの崩壊を引き起こした。溶液を4000rpmにて4分で10分間遠心して(以降すべての工程において用いた固定角度のローターA-4-62にて、Eppendorf 5810 R)、溶液から沈殿したRNAを除去した。放出した二量体のQ コートタンパク質を含む上清をクロマトグラフィの精製工程に用いた。

陽イオン交換クロマトグラフィ及びサイズ排除クロマトグラフィによるQ コートタンパク質の精製: 二量体コートタンパク質、宿主細胞タンパク質及び残留する宿主細胞RNAを含む、分解反応物の上清を、SP-セファロースFFカラム(xk16/20、6ml、Amersham Bioscience)に流した。カラムを20mM リン酸ナトリウムバッファ pH7で平衡化して、試料を水で1:15に希釈して伝導率を10mS/cm未満に調節してコートタンパク質をカラムに適切に結合させた。結合したコートタンパク質は、20mM リン酸ナトリウム/500mM 塩化ナトリウムに勾配することによって溶出を行い、タンパク質はおおよそ25mlの分画体積に回収した。すべての工程において5ml/分の流速にて室温でクロマトグラフィを行い、260nmと280nmの吸光度をモニターした。第二の工程において、単離されたQ コートタンパク質(陽イオン交換カラムから溶出された分画)を、20mM リン酸ナトリウム/250mM 塩化ナトリウム、pH7.2にて平衡化したセファクリルS-100 HRカラム(xk26/60、320ml、Amersham Bioscience)に流した。2.5ml/分の流速にて室温でクロマトグラフィを行い、260nmと280nmの吸光度をモニターした。5mlの分画を回収した。

【0062】

分析的サイズ排除クロマトグラフィによる精製されたQ コートタンパク質の特徴づけ: 精製されたQ コートタンパク質の試料を分析的サイズ排除クロマトグラフィ(図1C)によって分析し、i) 大腸菌溶解物から精製して、精製手順の原物質として用いたインタクトなQ VLP(図4A)、及びii) 分解反応の上清(図4B)に比較した。コートタンパク質からRNA分子が効率良く分離されたことは、図4CのいずれかのRNA様ピーク(A280/A260の典型的な比率=0.5)の欠如と、固有のタンパク質様ピーク(A280/A260の典型的な比率=1.7)の存在によって示される。

ダイアフィルトレーションによるQ G 1 0の集合：精製されたコートタンパク質(20 mM リン酸ナトリウム pH 7.2、250 mM NaCl中)を、尿素、NaCl、DTT及び凝集されたG 1 0オリゴヌクレオチド(基本的には実施例1に記載のように調製される)の貯蔵液と水に混合した。混合物の体積を50 mlとし、構成成分の終濃度は1 mg/mlのコートタンパク質、1.0 Mの尿素、250 mMのNaCl、2.5 mMのDTT及び0.24 mg/mlのG 1 0とした。その後、30 kDaのカットオフカートリッジ(Pellicon XL, Millipore)と、10 ml/分のクロス流速と2.5 ml/分の透過流速を用いて、溶液を300 mlの20 mM リン酸ナトリウム 250 mM NaCl pH 7.2に対して室温でダイアフィルトレーションを行った。H₂O₂を7 mMの終濃度になるまで加え、溶液を室温で1時間インキュベートしてジスルフィド結合の形成を誘導した。その後、300 kDaのカットオフカートリッジ(Pellicon XL, Millipore)と、10 ml/分のクロス流速と2.5 ml/分の透過流速を用いて、溶液を500 mlの20 mM リン酸ナトリウム 150 mM NaCl pH 7.2に対してダイアフィルトレーションを行い、過剰なH₂O₂とパッケージ化されなかったG 1 0オリゴヌクレオチドを集合体化したQ G 1 0生成物から取り除いた。

【0063】

実施例9 Q G 1 0パッケージ生成物の分析とパッケージ方法の収率の測定

分析的サイズ排除クロマトグラフィによるパッケージ化されたQ G 1 0 VLPの特徴づけ：パッケージ化されたQ G 1 0 VLPの試料を分析的サイズ排除クロマトグラフィ(図5)にて分析して、大腸菌溶解物から精製したインタクトなQ VLPと比較した。

前記分析的サイズ排除クロマトグラフィは、以下のパラメータを使用して実行した。

カラム： Bio-Sil SEC 250、7.8 × 300 mm、Cat. No. 125-0062

溶出剤： 50 mM リン酸ナトリウム pH 6.5、150 mM NaCl

勾配： 均一濃度(アイソクラチック)

カラム温度： 25

自動回収装置： 8

流速： 1.0 ml/分

試料濃度： 1.0 mg/ml タンパク質

注射体積： 40 µl

評価波長： 280 nm

帯域幅： 4 nm

ランタイム： 20分

試料調製：

試料は溶出剤を用いて1.0 mg/mlに希釈し、試料を短時間ボルテックスにかけ、4で10分間、16000 gで遠心分離した。

生成物中の正しく集合体化したVLPの存在は、天然のQ VLPを表しているピークと同じ滞留時間にピークが移動していることによって確認した。Q G 1 0 VLPについて観察されたピーク(図5D)は、VLPの核酸含量によって左右される。これは、260 nmの吸収係数核酸がコートタンパク質の吸収係数の100倍以上であるためである。精製されたQ G 1 0 VLPの比率A₂₆₀/A₂₈₀は1.70(1.65~1.76; n=5)であることが明らかとなり、これはG 1 0(A₂₆₀/A₂₈₀=1.74)の特徴であり、Q VLPのA₂₆₀/A₂₈₀比率は1.87(1.85~1.90; n=10)であることが明らかとなり、これはRNAの特徴である。

【0064】

SDS-PAGE分析によるパッケージ化されたQ G 1 0 VLPの特徴付け：パッケージ化されたQ G 1 0の試料を非還元SDS-PAGE(図6)にて分析し、大腸菌溶解物から精製したインタクトなQ VLPと比較した。生成物中の正しく集合体化したVLPの存在は、インタクトなQ VLPと類似する、ジスルフィド結合した五量体型と六量体型のコートタンパク質のバンドの形成によって確認した。このことは、インビトロで集合体化したQ G 1 0 VLPのコートタンパク質ユニットが構造的に正しく配

位していることを示唆する。

パッケージ化されたオリゴヌクレオチド G 1 0 の定量：Q G 1 0 V L P (P B S 中に 0 . 2 5 m g / m l) の試料を 1 m M T C E P (トリス(2-クロロエチル)フォスフェート)(室温で 1 5 分)にて処理して、ジスルフィド結合を還元した。この還元した試料に N a C l を加え(1 M の終濃度)、混合物を 6 0 で 1 5 分間インキュベートして、タンパク質成分を沈殿させた。遠心分離の後、結果として生じた上清を 9 5 で 5 分間インキュベートし、1 分間氷上で冷却して、その後 A 2 6 0 値を測定した。上清中のオリゴヌクレオチド G 1 0 の濃度は以下の式に従って算出した。

$$c(G 1 0)(m g / m l) = A_{260} \times 1.12 \times 9600 / 344580 ;$$

1.12 = 試料中の塩含量についての補正係数

9600 = オリゴヌクレオチド G 1 0 の分子質量

344580 = オリゴヌクレオチド G 1 0 の特定のモル吸収係数。

一般的に、パッケージ化されたオリゴヌクレオチド G 1 0 の量は、Q コートタンパク質 1 m g につき 0.2 m g であった。

Q G 1 0 V L P の G 1 0 含量とパッケージ化反応の収率算出：凝集された G 1 0 は、実施例 8 に記載のように、V L P の集合体化 / 再集合体化によって Q V L P にパッケージ化した。953 m g の G 1 0 オリゴヌクレオチドを、4000 m g の精製された Q

二量体との再集合体化に用いた。反応により、100 μ g のタンパク質につき 20 μ g の G 1 0 オリゴヌクレオチドを含む Q G 1 0 が得られた(ブラッドフォード分析又は H P L C で測定されるタンパク含有量)。タンパク質収率 75 % の場合に、パッケージ化反応の G 1 0 の収率は 63 % であった。

【0065】

実施例 10 ダイアフィルトレーションによる Q G 1 0 の集合体化と収率の測定

精製された Q コートタンパク質は、基本的に実施例 8 に記載のように得た。20 m M リン酸ナトリウム pH 7.2、250 m M N a C l 中のコートタンパク質を、尿素、N a C l、D T T 及び凝集した G 1 0 オリゴヌクレオチド(基本的には実施例 1 に記載のように調製される；解離した G 1 0 の相対的なピークのスタート時間は 135 % とし、凝集した G 1 0 の相対的なピークのスタート時間は 88 % とした)の貯蔵液と水に混合した。混合物の体積は 1.6 L とし、構成成分の終濃度は 2.5 m g / m l コートタンパク質、1.0 M 尿素、250 m M N a C l、2.5 m M D T T 及び 0.6 m g / m l G 1 0 とした。その後、30 k D a のカットオフカートリッジ(Pellicon Mini2、0.1 m² フィルター領域、Millipore)と、384 L / (h × m²) のクロス流速と 96 L / (h × m²) の透過流速を用いて、溶液を 9.6 L の 20 m M リン酸ナトリウム 250 m M N a C l pH 7.2 に対して室温でダイアフィルトレーションを行った。H₂O₂ を 2 m M の終濃度になるまで加え、溶液を室温で 1 時間インキュベートしてジスルフィド結合の形成を誘導した。その後、300 k D a のカットオフカートリッジ(Pellicon Mini2、0.1 m² フィルター領域、Millipore)と、300 L / (h × m²) のクロス流速と 100 L / (h × m²) の透過流速を用いて、溶液を 16 L の 20 m M リン酸ナトリウム 150 m M N a C l pH 7.2 に対してダイアフィルトレーションを行い、過剰な H₂O₂ とパッケージ化されなかった G 1 0 オリゴヌクレオチドを集合体化した Q G 1 0 生成物から取り除いた。生成物は、接線の(tangential)流量濾過によって 2.5 m g / m l まで濃縮し、0.22 μ m フィルターにて濾過した。主な生産工程を表 1 にまとめる。

【0066】

表 1：集合体化のための生産工程の概要と Q G 1 0 の精製。

方法の工程	パラメーター	方法工程の出力
G10 の解離	G10 濃度: 260 μ M NaOH 濃度: 25 mM 温度: 50°C 加熱時間: 70 分 スケール: 1.1g G10, V=440 ml (10ml の一定量)	G10 の相対的なピークのスタート時間: 138 %
解離した G10 溶液の中和	使用した酸: 0.5M H ₃ PO ₄	pH 7.2
G10 溶液の再凝集	G10 濃度: 175 μ M Na ⁺ 濃度: 250 mM 温度: 85°C 加熱時間: 10 分 スケール: 1.1g G10, V=654 ml (10ml の一定量)	G10 の相対的なピークのスタート時間: 88%
開始物質の解凍	温度: 22°C	Q β 二量体溶液
再集合体化混合物の調製	二量体濃度: 2.5 mg/ml 尿素濃度: 1 M DTT 濃度: 2.5 mM G10 濃度: 62.5 μ M 混合時間: 60 \pm 10 分 温度: 22 \pm 3°C スケール: 4 g Q β 二量体; V=1.6 l	ダイアフィルトレーション 1 の溶液
持続ダイアフィルトレーション 1	メンブレン: 30kDa MWCO 領域: 0.1m ² ダイアフィルトレーション体積: 6 (9.6 L 透過回収) バッファ: NaP250 pH 7.2 ターゲット時間: 60 分 温度: 22°C 流動: 96 l/(h*m ²) V=1.6 l	Q β 二量体は尿素および DTT の除去によって G10 主要物質の周りに VLP を形成する
過酸化水素による酸化	H ₂ O ₂ 濃度: 2 mM 温度: 22°C 反応時間: 60 \pm 10 分 V=1.6 l	ジスルフィド架橋の形成と、それによる VLP の安定化
持続ダイアフィルトレーション 2	メンブレン: 300 kDa MWCO 領域: 0.1 m ² ダイアフィルトレーション体積: 10 (16 L) バッファ: 薬学的に許容可能なバッファ 温度: 22 \pm 3°C 流動: 100 l/(h*m ²) V=1.6 l	残留する過酸化水素および残留してパッケージ化されなかった G10 の除去
QbG10 の濃度	メンブレン: 300 kDa MWCO 領域: 0.1 m ² 温度: 22 \pm 3°C 透過流量: < 100 l/(h*m ²) V=1.2 l	濃度=2.5 mg/ml
QbG10 の濾過	0.22 μ m PES メンブランフィルター	バイオ負荷還元 (Bioburden reduction)

10

20

30

40

サイズ排除クロマトグラフィによって分析した生成物の純度は 99.28% であった、すなわち Q G10 のピークは実施例 4 に記載のように行ったクロマトグラフィの全体のピーク領域の 99.28% に達した。タンパク質収率とオリゴヌクレオチド収率は、実施例 8 に記載のように測定した。全方法全体のタンパク質収率は 75% であった。全方法全体のオリゴヌクレオチド収率は 75% であった。

【0067】

実施例 11 集合体化工程に影響する G10 の凝集状態

139% の相対的なピークのスタート時間を有する G10 を実施例 8 に記載のような集合体化工程に用いる場合には、極わずかな量の G G10 しか形成されず、VLP 生成物

50

は単離されない。

【0068】

実施例12 分解/再集合体化によるG10のAP205及びGA355のパッケージ化

分解：50～100mgのAP205又はGA355のVLP(ブラッドフォード分析によって測定される)を含むバッファA(5mM NaPO₄ pH6.8、100mM NaCl、2mM MgCl₂)を、それぞれ1mg/ml及び5U/mlのRNアーゼA(Sigma)及びベンゾナーゼ(Novagen)とともに30℃で16時間インキュベートした。AP205 VLPの場合、RNアーゼAとベンゾナーゼを加える前に20mM DTTを加えて、37℃で30分間インキュベートすることによって内部ジスルフィド架橋の脱酸化を行った。1M NaClを加えた後、70℃で15分間インキュベートすることによってウ

10

イルスコートタンパク質の沈殿を誘導した。27000gにて4℃で10分間遠心して、沈殿したコートタンパク質を堆積させた。RNアーゼA、ベンゾナーゼ及び分解した核酸を含む上清を廃棄した。ペレットをバッファB(20mM NaPO₄ pH7.2、6M 尿素)に再懸濁して、室温で10分間インキュベートした。

陽イオン交換クロマトグラフィによるコートタンパク質の精製：溶液を27000gにて4℃で10分間遠心分離して清浄化した。ごくわずかなペレットを廃棄した。そして、分解したコートタンパク質を含有する上清を、バッファB(20mM NaPO₄ pH7.2、6M 尿素)にて平衡化したSPセファロースTM FFカラム(16/20、Amersham Biosciences)にアプライした。流れ出たものは廃棄した。バッファB(15CV)にて十分に洗浄した後、カラムを、37.5CVの勾配幅のバッファBからバッファC(20

20

【0069】

再集合体化：精製したAP205又はGA355コートタンパク質を、G10オリゴヌクレオチドに5倍過剰(w/w)で用いた。コートタンパク質を、1M 尿素及び2.5mM DTTを含む再集合体化バッファ中のG10オリゴヌクレオチドと混合して、室温で

30

1時間インキュベートした。インキュベートの後、再集合体化混合物を5リットルのPBSに対して24時間透析した。結果として生じる懸濁液を27000gにて4℃で10分間遠心分離した。ごくわずかなペレットを廃棄した。上清には再集合化してパッケージ化されたVLPが含まれた。タンパク質濃度をブラッドフォード分析で測定し、再集合化してパッケージ化されたVLPを遠心フィルター装置(Amicon Ultra 15, 10K MWCO)にて濃縮した。

再集合化してパッケージ化されたVLPの精製：25mg以下の総タンパクをPBSにて平衡化したセファロースTM CL-4B(26/60、Amersham Biosciences)に流した。1.25ml/分の流速の室温の平衡化バッファにてサイズ排除クロマトグラフィを行った。溶出の間、254nmと260nmの吸光度をモニターした。2つのピークを単離

40

【0070】

実施例13 分解/再集合体化によるG10のFR VLPのパッケージ化

分解：50～100mgのFR VLP(ブラッドフォード分析によって測定される)を含むバッファA(5mM NaPO₄ pH6.8、100mM NaCl、2mM MgCl₂)を、それぞれ1mg/ml及び5U/mlのRNアーゼA(Sigma)及びベンゾナーゼ

50

(Novagen)とともに30で16時間インキュベートする。1M NaClを加えた後、70で15分間インキュベートすることによってFRコートタンパク質の沈殿を誘導する。27000gにて4で10分間遠心して、沈殿したコートタンパク質を堆積させる。RNアーゼA、ベンゾナーゼ及び分解した核酸を含む上清を廃棄する。ペレットをバッファB(20mM NaPO₄ pH7.2、6M 尿素)に再懸濁して、室温で10分インキュベートする。

陽イオン交換クロマトグラフィによるFRコートタンパク質の精製：溶液を27000gにて4で10分間遠心分離して清浄化する。ごくわずかなペレットを廃棄し、分解したコートタンパク質を含有する上清を、バッファBにて平衡化したSPセファロースTM FFカラム(16/20、Amersham Biosciences)にアプライする。流れ出たものは廃棄する。バッファB(15CV)にて十分に洗浄した後、カラムを、37.5CVの勾配幅のバッファBからバッファC(20mM NaPO₄ pH7.2、1M 尿素)への直線的な濃度勾配によって調整する。負荷、洗浄及び溶出の間、254nm及び280nmの吸光度をモニターする。バッファD(20mM NaPO₄ pH6.5、1M 尿素、300mM NaCl)にて一分画としてFRコートタンパク質を溶出し、LDS-PAGEの後にクマシー染色をすることによって分析する。溶出したタンパク質分画を「分解したコートタンパク質」として4で保存する。タンパク質濃度はブラッドフォード分析にて測定する。

【0071】

再集合体化：精製したFRコートタンパク質を、G10オリゴヌクレオチドに5倍過剰(w/w)で用いる。FRコートタンパク質を、1M 尿素及び2.5mM DTTを含む再集合体化バッファ中のG10オリゴヌクレオチドと混合して、室温で1時間インキュベートする。インキュベートの後、再集合体化混合物を5リットルのPBSに対して24時間透析する。結果として生じる懸濁液を27000gにて4で10分間遠心分離する。ごくわずかなペレットを廃棄する。上清には再集合化してパッケージ化されたFR VLPが含まれる。タンパク質濃度をブラッドフォード分析で測定し、再集合化してパッケージ化されたFR VLPを遠心フィルター装置(Amicon Ultra 15, 10K MWCO)にて濃縮する。

再集合化してパッケージ化されたFR VLPの精製：25mg以下の総タンパクをPBSにて平衡化したセファロースTM CL-4B(26/60、Amersham Biosciences)に流す。1.25ml/分の流速の室温の平衡化バッファにてサイズ排除クロマトグラフィを行う。溶出の間、254nmと260nmの吸光度をモニターする。2つのピークを単離する。主要な高分子量のピークは、それよりも低い見かけの分子量の小さいピークに先行する。主要なピークは、SE-HPLCで示すように、精製されたFR VLPに一致する見かけの分子量を示した。基本的には国際公開03/024481(p. 131ff)の実施例16に示されるように、G10オリゴヌクレオチドをパッケージ化したFR VLPの分析を行う。

【0072】

実施例14 ダイアフィルトレーションによるQ G8の集合体化と収率の測定

精製したQ コートタンパク質は基本的に実施例8に記載のように得る。コートタンパク質を含む20mM リン酸ナトリウムpH7.2、250mM NaClを、尿素、NaCl、DTT及び凝集されたG8オリゴヌクレオチドの貯蔵液と水に混合する(基本的には実施例3に記載のように調製される；解離したG8の相対的なピークのスタート時間は113%とし、凝集したG8の相対的なピークのスタート時間は88%とする)。混合物の体積を1.6Lとし、構成成分の終濃度は1mg/mlのコートタンパク質、1.0Mの尿素、250mMのNaCl、2.5mMのDTT及び0.24mg/mlのG8とする。その後、30kDaのカットオフカートリッジ(Pellicon Mini2, 0.1m² フィルター領域, Millipore)と、384L/(h×m²)のクロス流速と96L/(h×m²)の透過流速を用いて、溶液を9.6Lの20mM リン酸ナトリウム 250mM NaCl pH7.2に対して室温でダイアフィルトレーションを行う。H₂O₂を2mMの終濃度になるまで加え、溶液を室温で1時間インキュベートしてジスルフィド結合の形成を誘導す

10

20

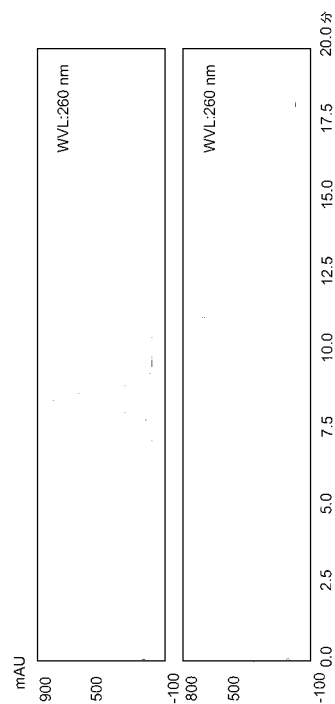
30

40

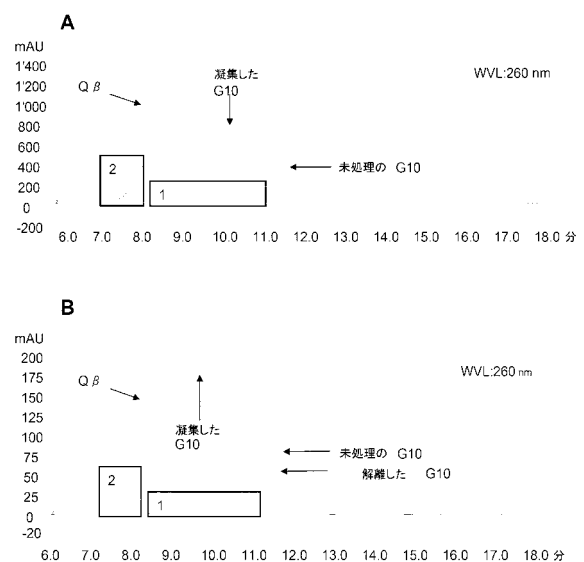
50

る。その後、 300 kDa のカットオフカートリッジ(Pellicon Mini2, 0.1 m^2 フィルター領域, Millipore)と、 $300\text{ L}/(\text{h} \times \text{m}^2)$ のクロス流速と $100\text{ L}/(\text{h} \times \text{m}^2)$ の透過流速を用いて、溶液を 16 L の 20 mM リン酸ナトリウム 150 mM NaCl $\text{pH} 7.2$ に対してダイアフィльтраーションを行い、過剰な H_2O_2 とパッケージ化されなかった G8 オリゴヌクレオチドを集合体化した Q-G8 生成物から取り除く。生成物は、接線の(tangential)流量濾過によって $2.5\text{ mg}/\text{ml}$ まで濃縮し、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルターにて濾過する。

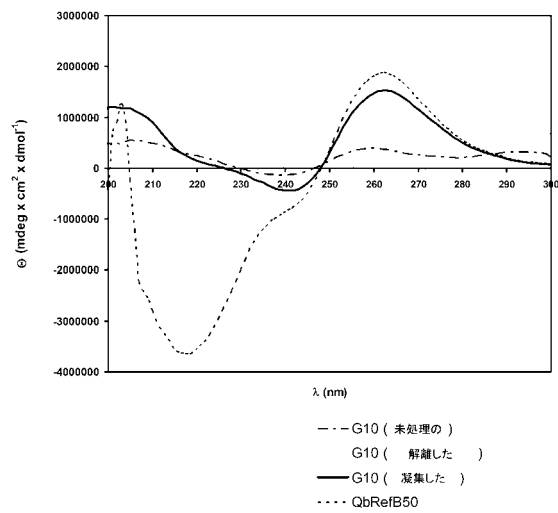
【図 1】



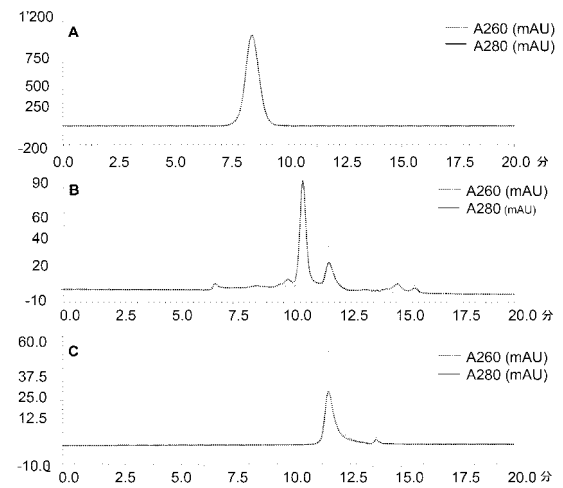
【図 2】



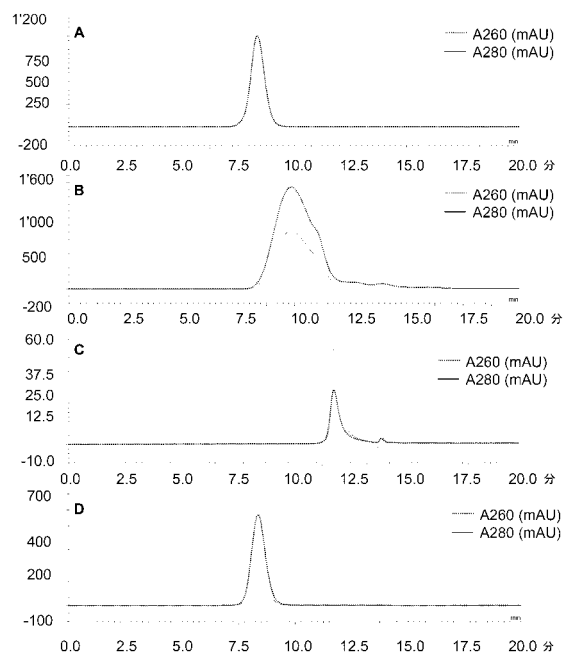
【図 3】



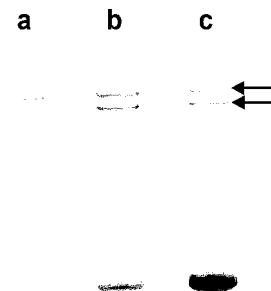
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0005437797000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 37/04 (2006.01) A 6 1 P 37/04

(72)発明者 プロバ, カール
スイス国 シーエイチ - 8 0 5 0 チューリッヒ, トラムシュトラッセ 9 5, サイトス バ
イオテクノロジー アーゲー

審査官 鶴 剛史

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 8 5 6 3 5 (W O , A 1)
特表 2 0 0 9 - 5 1 9 2 9 9 (J P , A)
KERKMANN MIREN , THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY , 2 0 0 5 年 3 月 4 日 , V280 N9 ,
P8086-8093

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 9
C 0 7 K 1 4 / 0 8
A 6 1 K 3 1 / 7 1 1
A 6 1 K 3 9 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 1 2
A 6 1 P 3 7 / 0 4
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
W P I