

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6983455号  
(P6983455)

(45) 発行日 令和3年12月17日(2021.12.17)

(24) 登録日 令和3年11月26日(2021.11.26)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 N 15/11 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/11 Z N A Z
<b>C 1 2 P 19/34 (2006.01)</b>	C 1 2 P 19/34 Z

請求項の数 20 (全 109 頁)

(21) 出願番号	特願2019-535224 (P2019-535224)	(73) 特許権者	516317171
(86) (22) 出願日	平成29年9月14日 (2017.9.14)		モデルナティーエックス、 インコーポレ
(65) 公表番号	特表2019-533476 (P2019-533476A)		イテッド
(43) 公表日	令和1年11月21日 (2019.11.21)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/051674		1 3 9, ケンブリッジ, テクノロジー
(87) 国際公開番号	W02018/053209		スクエア 2 0 0
(87) 国際公開日	平成30年3月22日 (2018.3.22)	(74) 代理人	100188558
審査請求日	令和2年9月9日 (2020.9.9)		弁理士 飯田 雅人
(31) 優先権主張番号	62/394,711	(74) 代理人	100195796
(32) 優先日	平成28年9月14日 (2016.9.14)		弁理士 塩尻 一尋
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(72) 発明者	スティーヴン・ホグ
早期審査対象出願			アメリカ合衆国・マサチューセッツ・O 2
前置審査			1 4 1・ケンブリッジ・ベント・ストリー
			ト・3 2 0
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高純度RNA組成物及びその調製のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オープンリーディングフレームを含むメッセンジャーRNAを生成する方法であって、  
 (a) DNA 鋳型と、アデノシン三リン酸 (A T P)、シチジン三リン酸 (C T P)、  
 ウリジン三リン酸 (U T P)、グアノシン三リン酸 (G T P) を含むヌクレオシド三リン  
 酸 (N T P) と、緩衝液とを含む反応混合物を形成することと、

(b) 前記反応混合物をインキュベートし、メッセンジャーRNAを含む組成物を生成  
 することとを包含し、

ここで

G T P の濃度対 A T P の濃度の比が  $2 : 1$  であり、G T P の濃度対 C T P の濃度の比が  $2 : 1$  または  $4 : 1$  であり、G T P の濃度対 U T P の濃度の比が  $4 : 1$  である、方法。

【請求項 2】

G T P の濃度対 A T P の濃度の比が  $2 : 1$  であり、G T P の濃度対 C T P の濃度の比が  $2 : 1$  であり、G T P の濃度対 U T P の濃度の比が  $4 : 1$  である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

G T P の濃度対 A T P の濃度の比が  $2 : 1$  であり、G T P の濃度対 C T P の濃度の比が  $4 : 1$  であり、G T P の濃度対 U T P の濃度の比が  $4 : 1$  である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

前記反応混合物がグアノシン三リン酸（GDP）をさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記組成物が、逆相補体転写産物を実質的に含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記メッセンジャー RNA の質量の 90 % 超が一本鎖全長転写物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記組成物が、RNAse III 非感受性断片を実質的に含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記組成物がセンス配向の一本鎖部分 RNA 転写物の集団を含み、かつ前記センス配向の一本鎖部分 RNA 転写物の集団の 80 % 超が 100 ヌクレオチド以下のヌクレオチド長を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記センス配向の一本鎖部分 RNA 転写物の集団の 90 % 超が 100 ヌクレオチド以下のヌクレオチド長を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記組成物中の前記 RNA の質量の 0.25 % 未満がサイトカイン誘導性の RNA 混入物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記組成物がサイトカイン誘導性の RNA 混入物を実質的に含まない、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記組成物中の前記 RNA の質量の 0.5 % 未満が逆相補体転写産物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記逆相補体転写産物が、前記メッセンジャー RNA の少なくとも一部の逆相補体である配列を含む鎖を含む dsRNA であるか、またはポリ U 含有配列を含む鎖を含む dsRNA である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記メッセンジャー RNA の逆相補体である配列を含む前記鎖、または前記ポリ U 配列を含む前記鎖が、5' 三リン酸（5' - PPP）で開始する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記逆相補体転写産物が、目的のポリペプチドをコードする、前記メッセンジャー RNA の 5' 末端の逆相補体及び／または前記メッセンジャー RNA の 3' 末端の逆相補体を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

前記メッセンジャー RNA が目的のポリペプチドをコードする RNA であり、前記目的のポリペプチドをコードするメッセンジャー RNA の逆相補体が、前記目的のポリペプチドをコードするメッセンジャー RNA のオープンリーディングフレームの全部または一部に相補的な配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

オープンリーディングフレームを含むメッセンジャー RNA を生成する方法であって、  
（a）DNA 鋳型と、T7 もしくは T3 ポリメラーゼと、アデノシン三リン酸（ATP）、シチジン三リン酸（CTP）、ウリジン三リン酸（UTP）、グアノシン三リン酸（GTP）を含むヌクレオシド三リン酸（NTP）と、緩衝液とを含む反応混合物を形成することと、

（b）前記反応混合物をインキュベートし、メッセンジャー RNA を含む組成物を生成することとを包含し、

10

20

30

40

50

ここで

GTPの濃度対ATPの濃度の比が2:1であり、GTPの濃度対CTPの濃度の比が2:1または4:1であり、GTPの濃度対UTPの濃度の比が4:1である、方法。

【請求項18】

GTPの濃度対ATPの濃度の比が2:1であり、GTPの濃度対CTPの濃度の比が2:1であり、GTPの濃度対UTPの濃度の比が4:1である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

GTPの濃度対ATPの濃度の比が2:1であり、GTPの濃度対CTPの濃度の比が4:1であり、GTPの濃度対UTPの濃度の比が4:1である、請求項17に記載の方法。

10

【請求項20】

前記反応混合物がグアノシン二リン酸(GDP)をさらに含む、請求項17から19のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第119条(e)項に基づき、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2016年9月14日に出願された米国仮特許出願第62/394,711号の利益を請求する。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

細胞内の核酸、例えば、リボ核酸(RNA)、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)を設計、合成及び送達する能力は、治療、診断、試薬の分野及び生物学的アッセイにおける進歩をもたらした。核酸の細胞内翻訳、及び少なくとも1つの目的のコードされたペプチドまたはポリペプチドの産生のプロセスにおいて多くの進歩がなされている。

【0003】

mRNAは、ウイルス及びDNAベースの核酸送達アプローチの悪影響を回避しながら、mRNA治療薬が本質的に任意の所望のタンパク質を一過性に発現し得るという点で、大きな治療的可能性を有する。しかしながら、哺乳動物細胞、特にヒト細胞は、自然免疫系の一部としてRNAを含む核酸のセンサーを含み、そしてmRNA治療薬を開発するときにはそのような感知及び免疫応答を避けることが望ましい。

30

【0004】

理論的には、化学合成によって産生されるmRNAは、mRNA治療薬として有望であるが、今日までのこの重要な治療分野における研究の大部分は、インビトロ転写(IVT)mRNAに焦点を合わせている。なぜならこの酵素的プロセスは、ほとんどのmRNA分子の標準的な長さである、約1~2またはそれ以上のkBの、長いRNAの生成を容易にするからである。

40

【0005】

初期の研究によって、修飾ヌクレオシド、特にシュードウリジンの組み込みが先天性免疫活性化を減少させ、mRNAの翻訳を増加させたが、I型インターフェロン(IFN)及び炎症誘発性サイトカインの残留誘導が残ったことが示された(Kariko et al. (2005) Immunity 23(2):165~75)。先天的免疫活性化に少なくとも部分的に関与するものとして、二本鎖RNA(dsRNA)を同定するヌクレオシド修飾IVT RNA中の混入物の同定にむかった進歩があった。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるそのような混入物の除去は、IFN及び炎症性サイトカインレベルの低下、ひいては初代細胞におけるより高い発現レベルをもたらした(Kariko et al. (2011) Nuc. Acids Res. 39:e142)。注

50

目すべきことに、未修飾のmRNAは、HPLC精製後により良く翻訳されたが、依然として高レベルのサイトカイン分泌を誘導した。

【0006】

WO2013/102203号は、ヒトまたは動物細胞への反復または連続的なトランスフェクションのため、特に、ある分化状態から別の分化状態への細胞の再プログラミングのために、IVT mRNAからdsRNAを除去するために使用されるRNAse III処理方法を記載する。この方法は、高レベルの再プログラミング因子及び細胞に対するより低い毒性によって証明されるように、減少したレベルのdsRNA及び増大したレベルのインタクトなssRNAを有する調製物をもたらすことを目的としている。しかしながら、そのような方法は、治療用途、特に、ヒトの治療用途のためのmRNAの調製における使用には適合しない。RNAse IIIは、dsRNAと同様にssRNAを消化することが知られており、そしてdsRNA混入物を除去しようと試みる際に、所望のssRNA生成物の完全性は必然的に危険にさらされる。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】WO2013/102203号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Kariko et al. (2005) Immunity 23 (2) : 165 ~ 75

20

【非特許文献2】Kariko et al. (2011) Nuc. Acids Res. 39 : e142

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、IVT調製物中の混入物のレベル及び性質をより良く制御するために、IVT生成mRNA調製物中の混入物の性質をより良く理解する必要がある。さらに、治療用途のためのmRNAの改良された調製方法及びそのような方法に従って製造された高純度組成物に対する必要性が存在する。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、少なくとも部分的には、インビトロRNA合成のための新規方法及び関連生成物の発見を含む。本明細書に記載の方法によって産生されたRNA転写物は、上記RNA転写物を含む定性的及び定量的に優れた組成物をもたらす増強された特性を有する。本明細書に記載の方法によって産生されたRNA転写物は、mRNA、lncRNA、ならびに改善された免疫サイレンシング及びより良好な安全性プロフィールなどの他の治療的及び診断的RNA用途に特に重要な増強された特性を有する。

【0011】

特に、本発明のIVT RNA組成物は、IVTプロセスと日常的に関連する特定の望ましくない混入物を実質的に含まない。しかしながら、特に、本発明の方法は、IVT反応において生成される混入物の性質及びレベルを制御することによって、治療用途に適したmRNA組成物に到達し、すなわち、混入物は、その混入物が生成されればそれを除去しようと試みる、当該分野で記載された方法とは対照的に、初期反応において生成されない。理論に拘束されないが、最初からIVT反応における望ましくない混入物の生成を防止することは、例えば、組成物中の全長インタクトなmRNAからの翻訳の増大に関して測定可能な、より高い純度及び効力を有する改良された組成物を提供すると考えられる。

40

【0012】

インビトロ転写された(IVT)RNA及び薬学的に許容される賦形剤を含む組成物であって、逆相補体転写産物を実質的に含まない組成物は、本発明のいくつかの態様におい

50



て提供される。いくつかの実施形態では、組成物中のRNAの総質量の約5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、または0.55%未満が、逆相補体転写産物である。いくつかの実施形態では、組成物中のRNAの質量の約1.0%未満が、逆相補体転写産物である。いくつかの実施形態では、組成物中のRNAの質量の約0.5%未満が、逆相補体転写産物である。いくつかの実施形態では、組成物中のRNAの質量の約0.25%未満が、逆相補体転写産物である。いくつかの実施形態では、組成物中のRNAの質量の約0.1%未満が、逆相補体転写産物である。いくつかの実施形態では、組成物中のRNAの質量の約0.05%未満が逆相補体転写産物である。いくつかの実施形態では、組成物中のRNAの質量の約0.01%未満が、逆相補体転写産物である。いくつかの実施形態では、組成物中のRNAの質量の約0.005%未満が、逆相補体転写産物である。いくつかの実施形態では、組成物中のRNAの質量の約0.001%未満が逆相補体転写産物である。例示的な実施形態では、組成物中のRNAの質量は、LC、J2 Elisa、RNase III、放射標識NTPを用いたゲル電気泳動、LCMS+/−ヌクレアーゼまたは化学消化、標識NTP、化学的/同位体的/放射活性などで標識されたNTPを用いたNMR、細胞、生化学的手段、RIG-I ATPアーゼ活性もしくはMSもしくはゲル電気泳動、またはRNA含有組成物中のRNAの検出及び/または定量に適していることが当技術分野において公知の他の方法によって決定される。

10

#### 【0013】

いくつかの実施形態では、逆相補体転写産物は、所望のまたは意図するIVT転写産物であるRNAの領域（例えば、mRNA、lncRNA、または治療用途を意図する長さが50ヌクレオチドを超える他のRNA）と完全に相補的である。RNA転写物と完全に相補的な産物は、100%の相補性を有すると考えられる（例えば、逆相補体転写産物の長さにわたって）。他の実施形態では、逆相補体転写産物は、RNA転写物の領域と部分的に相補的である。いくつかの実施形態では、逆相補体転写産物は、RNA転写産物の領域と70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の相補性である。さらに他の実施形態では、逆相補体生成物は、RNA転写産物の領域と70%~90%、75%~90%、80%~90%、85%~90%、90%~95%、91%~95%、92%~95%、93%~95%、94%~95%、95%~99%、96%~99%、97%~99%、または98%~99%相補性である。

20

30

#### 【0014】

当業者は、IVT反応において生成される意図しないかまたは望ましくない逆相補体転写産物が、IVT反応の意図されるかまたは望まれる産物であるRNA転写物（例えば、mRNA、lncRNA、または治療用途を意図した長さが50ヌクレオチドより大きな他のRNA）に対してのみ相補性を有し得るのではなく、意図または所望のRNA転写物が生成されるDNA鋳型の鎖に対する相補性も有し得ることを理解する。理論に拘束されるものではないが、本発明の新規プロセスに従って減少または排除されるIVT RNA組成物を汚染する、特定の意図しないまたは望ましくない転写産物は、意図されるかまたは所望のRNA転写産物から転写され、IVT RNA組成物を汚染する、特定の意図されないかまたは望ましくない転写産物は、IVT反応に使用されるDNA鋳型から転写され得る可能性が存在すると考えられる。後者の推定は、可能ではあるが、逆相補体転写産物がmRNA転写産物の5'UTR及び/またはポリAテールに主に相補的であることを示し、転写されたmRNA中に存在しないDNA鋳型の一部（例えば、配列エレメント）に相補性である逆相補体転写産物が有意に減少し、そしてある場合には検出不可能であることを示す、本明細書に提示されたデータによって証明されないようである。

40

#### 【0015】

他の態様において、本発明は、目的のポリペプチドをコードするインビトロ転写（IVT）RNA及び薬学的に許容される賦形剤を含む組成物であり、ここでこの組成物は実質的にサイトカイン誘導性RNA混入物を含まない。いくつかの実施形態では、組成物中の

50

R N Aの質量の約0.5%未満がサイトカイン誘導性R N A混入物である。いくつかの実施形態では、組成物中のR N Aの質量の約0.25%未満が、サイトカイン誘導性R N A混入物である。いくつかの実施形態では、組成物中のR N Aの質量の約0.1%未満が、サイトカイン誘導性のR N A混入物である。いくつかの実施形態では、組成物中のR N Aの質量の約0.05%未満が、サイトカイン誘導性R N A混入物である。いくつかの実施形態では、組成物中のR N Aの質量の約0.01%未満が、サイトカイン誘導性R N A混入物である。いくつかの実施形態では、組成物中のR N Aの質量の約0.005%未満が、サイトカイン誘導性R N A混入物である。いくつかの実施形態では、組成物中のR N Aの質量の約0.001%未満がサイトカイン誘導性R N A混入物である。いくつかの実施形態では、組成物中のR N Aの質量は、LCもしくはMSもしくはゲル電気泳動、または当該分野で公知の他の方法によって決定される。

10

**【0016】**

いくつかの実施形態では、本発明は、目的のポリペプチドをコードするインビトロ転写(I V T) R N Aと薬学的に許容される賦形剤とを含む組成物を特徴とし、ここでこの組成物は低減されたレベルのサイトカイン誘導性R N A混入物及び/または逆相補体転写産物を有する。

**【0017】**

本明細書に記載の本発明の組成物のいくつかの実施形態では、サイトカイン誘導性R N A混入物及び/または逆相補体転写産物の合計の質量は、組成物中のR N Aの全質量の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、または0.55%、0.5%、0.45%、0.4%、0.35%、0.3%、0.025%、0.2%、0.15%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、または0.001%未満である。いくつかの実施形態では、組成物中のサイトカイン誘導性R N A混入物対R N A転写産物(例えば、意図されたまたは所望のR N A転写物)の比は、99:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、または1:99である。他の実施形態では、組成物中の逆相補体転写産物対R N A転写産物(例えば、意図されたまたは所望のR N A転写産物)の比は、99:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、または1:99である。

20

30

**【0018】**

混入物の大きさは変化し得る。いくつかの実施形態では、サイトカイン誘導性R N A混入物及び/またはR N A転写産物の長さは、2ヌクレオチド超から最大で全長転写産物(例えば、意図されたまたは所望の転写産物、例えばm R N A転写産物)の長さまでである。他の実施形態では、サイトカイン誘導性R N A混入物及び/またはR N A転写産物の長さは、それぞれ5、10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチドを超える長さであり、最大で全長転写産物の長さまでである。他の実施形態では、サイトカイン誘導性R N A混入物及び/またはR N A転写産物の長さは、2~500ヌクレオチド長、10~500ヌクレオチド長、15~500ヌクレオチド長、20~500ヌクレオチド長、30~500ヌクレオチド長、40~500ヌクレオチド長、50~500ヌクレオチド長、100~500ヌクレオチド長、200~500ヌクレオチド長、300~500ヌクレオチド長、400~500ヌクレオチド長、2~200ヌクレオチド長、10~200ヌクレオチド長、15~200ヌクレオチド長、20~200ヌクレオチド長、30~200ヌクレオチド長、40~200ヌクレオチド長、50~200ヌクレオチド長、100~200ヌクレオチド長、200~300ヌクレオチド長、300~400ヌクレオチド長、2~100ヌクレオチド長、10~100ヌクレオチド長、15~100ヌクレオチド長、20~100ヌクレオチド長、30~100ヌクレオチド長

40

50

、40～100ヌクレオチド長、または50～100ヌクレオチド長である。

【0019】

当業者は、特定の構造及び／または長さのRNA混入物が、例えば、少なくとも15または少なくとも20または少なくとも25ヌクレオチド長のRNA混入物、特に、天然では二本鎖であるRNA混入物(dsRNA)が所望されないかまたは望ましくない免疫応答を刺激する傾向が極めて高いことを理解するであろう。そのような混入物の除去は、当技術分野で認識されている特定の方法(例えば、酵素的及び／または精製プロセスまたは方法ステップ)を使用して可能である。しかしながら、例えば、mRNA、lncRNA、または治療用途を目的とした、長さが50ヌクレオチドを超える他のRNAの生成におけるそのような追加の精製プロセスまたはステップのそれぞれは、例えば、直接IVT反

10

応生成物を、混入物を分解または除去しようとするプロセスでのRNA産物の品質を損ない得る、(1)酵素的条件(例えばRNAの断片を生成するRNAse処理)及び／または(2)高温非生理学的溶媒条件(例えば、HPLCまたはRPクロマトグラフィー条件)にさらすことによって、意図する生成物の忠実度の低下の可能性を誘導する。

【0020】

本発明の特定の態様では、所望されないかまたは望ましくない混入物は、例えば、特定の範囲内のサイズ及び質量の分布を有するRNA種の集団である。例えば、特定の種類の混入物は、任意の個々の種の混入物(すなわち、同じ配列、同じ長さなどのRNA種)を5%未満有してもよい。他の実施形態では、混入物は、4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.0%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.05%、0.001%、0.0005%、または0.0001%未満の任意の個々の種を有し得る。

20

【0021】

いくつかの実施形態では、逆相補体転写産物は、IVT RNAまたはRNA(dsRNA、ssRNAまたはds-ssRNA)の逆相補体である配列を含む鎖を含むRNA(dsRNA、ssRNAまたはds部分及びss部分を有するds-ssRNAハイブリッド)である。ポリAテールがDNA鋳型内のポリA:Tトラクト内にコードされているいくつかの実施形態では、逆相補体産物は、ポリU配列を含む鎖、またはRNA中にポリAテールを挿入するために当該分野で一般的に使用される他の方法を含む。ポリU配列は、例えば、nが1以上であるpppU(U)nである。いくつかの実施形態では、(標

30

的RNAが100ntのポリAテールを有するコードされたポリAテールについては)nは1～100である。他の実施形態では、nは30または30～200より大きい。例示的な実施形態では、逆相補体産物は5'三リン酸(5'-PPP)で開始する。他の実施形態では、逆相補体産物は、5'二リン酸(5'-PP)または5'一リン酸(5'-P)で開始する。

【0022】

いくつかの実施形態では、逆相補体転写産物は、IVT RNAの5'末端の逆相補体及び／またはIVT RNAの3'末端の逆相補体を含む。いくつかの実施形態では、IVT RNAの5'末端の逆相補体は、IVT RNAの5'UTRの全部または一部に相補的な配列を含む。他の実施形態では、IVT RNAの3'末端の逆相補体は、IVT RNAのポリAテールの全部または一部に相補的な配列を含む。さらに他の実施形態では、3'末端の逆相補体は、テールなしのRNAの逆相補体である。さらに他の実施形態では、逆相補体転写産物は、RNAの5'末端、3'末端、オープンリーディングフレーム及び／またはポリAテールの全部もしくは一部、あるいはそれらの任意の組み合わせに相補的な配列を含む。

40

【0023】

本発明の例示的な態様では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、RNA(dsRNA、ssRNAまたはds-ssRNA)である。いくつかの実施形態では、サイトカイン誘発性RNA混入物は、ポリU配列を含む鎖を含むIVT RNAまたはdsRNAまたはssRNAの逆相補体である逆配列をいくつかの実施形態では含む鎖である。

50

## 【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、I V T R N Aの逆相補体である配列を含む鎖、またはポリU配列を含む鎖は、5'三リン酸(5'-PPP)で開始する。いくつかの実施形態では、このポリU配列は、20ヌクレオチド長を超える。いくつかの実施形態では、ポリU配列は、30ヌクレオチド長を超える。他の実施形態では、ポリU配列は一本鎖である。さらに他の実施形態では、ポリU配列は二本鎖である。

## 【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、I V T R N Aの5'末端の逆相補体及び/またはI V T R N Aの3'末端の逆相補体を含む。いくつかの実施形態では、I V T R N Aの5'末端の逆相補体は、I V T R N Aの5' U T Rの全部または一部に相補的な配列を含む。他の実施形態では、I V T R N Aの3'末端の逆相補体は、I V T R N AのポリAテールの全部または一部に相補的な配列を含む。いくつかの実施形態では、逆相補体は、5' U T Rの最初の10~15ヌクレオチドに相補的な配列を含む。いくつかの実施形態では、逆相補体は、5' U T Rの最初の10~20ヌクレオチドに相補的な配列を含む。いくつかの実施形態では、逆相補体は、5' U T Rの最初の10~30ヌクレオチドに相補的な配列を含む。いくつかの実施形態では、この逆相補体は、5' U T Rの最初の10~40ヌクレオチドに相補的な配列を含む。さらに他の実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、RNAの5'末端、3'末端、オープンリーディングフレーム及び/またはポリAテールの全部または一部、あるいはそれらの任意の組み合わせに相補的な配列を含む。

## 【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、20ヌクレオチド以上の一本鎖三リン酸逆相補体である。他の実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、25ヌクレオチド以上の一本鎖三リン酸逆相補体である。他の実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、30ヌクレオチド以上の一本鎖三リン酸逆相補体である。いくつかの実施形態では、一本鎖三リン酸逆相補体は、20~200ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖三リン酸逆相補体は、20~100ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖三リン酸逆相補体は、20~50ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖三リン酸逆相補体は、25~200ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖三リン酸逆相補体は、25~100ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖三リン酸逆相補体は、25~50ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖三リン酸逆相補体は、30~200ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖三リン酸逆相補体は、30~100ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖三リン酸逆相補体は、30~50ヌクレオチド長である。

## 【 0 0 2 7 】

他の実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、末端三リン酸-A、三リン酸-C、または三リン酸-Uを有する一本鎖逆相補体である。

## 【 0 0 2 8 】

他の実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、20ヌクレオチド以上の二本鎖三リン酸逆相補体である。いくつかの実施形態では、この二本鎖三リン酸逆相補体は、20~200ヌクレオチドを有する。さらに他の実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、完全な二重鎖である(一本鎖領域ではない)二本鎖三リン酸逆相補体である。他の実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、一本鎖オーバーハングを含む二本鎖三リン酸逆相補体である。

## 【 0 0 2 9 】

本発明のいくつかの態様では、dsRNAは、20~100ヌクレオチド長の鎖を、いくつかの実施形態では含む。他の実施形態では、dsRNAは、長さが約20~約50bpの間の二重鎖である。さらに他の実施形態では、dsRNAは、1~1,000、5~1,000、10~1,000、100~1,000、500~1,000、1~10、

10

20

30

40

50

1 ~ 20、1 ~ 50、1 ~ 100、5 ~ 10、5 ~ 20、5 ~ 30、5 ~ 50、5 ~ 100、5 ~ 200、5 ~ 300、5 ~ 400、10 ~ 20、10 ~ 30、10 ~ 100、10 ~ 200、10 ~ 300、10 ~ 400、10 ~ 500、20 ~ 25、20 ~ 30、20 ~ 100、20 ~ 200、20 ~ 300、20 ~ 400、20 ~ 500、30 ~ 35、30 ~ 40、30 ~ 100、30 ~ 200、30 ~ 300、30 ~ 400、または30 ~ 500ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに他の実施形態では、dsRNAは、1ヌクレオチドから全長転写産物長までの鎖を含む。

#### 【0030】

他の実施形態では、組成物中のRNAの質量の約0.5%未満が、40塩基対を超えるサイズのdsRNAである。

10

#### 【0031】

産物の純度は、既知の分析方法及びアッセイを用いて評価され得る。本発明の例示的な態様において、逆相補体転写産物またはサイトカイン誘導性RNA混入物の量は、高速液体クロマトグラフィー（例えば、逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー）、Bioanalyzerチップベースの電気泳動システム、ELISA、フローサイトメトリー、アクリルアミドゲル、再構成または代替型アッセイによって決定される。このアッセイは、RNA調製物のヌクレアーゼ処理（P1、RNaseIII、RNaseHなど）を用いて実施しても、または用いずに実施してもよい。ヌクレアーゼ消化産物の電気泳動/クロマトグラフィー/質量分析もまた行ってもよい。

#### 【0032】

20

いくつかの実施形態では、RNAの質量は、LC-MS、MALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間）などの質量分析法によって決定される。

#### 【0033】

いくつかの実施形態では、組成物は、例えば全長よりも少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、または900ヌクレオチド少ないなど、全長転写物よりも短い長さを有する混入転写物を含む。混入転写物は、全長よりも例えば少なくとも100、200、300、400、500、600、700、800、または900ヌクレオチド少ないなど、全長転写物よりも短い長さを有するリバース転写産物またはフォワード転写産物（転写産物）を含んでもよい。例示的なフォワード転写物は、例えば、アポータシブ転写物を含む。特定の実施形態では、この組成物は、30ヌクレオチド未満の三リン酸ポリU逆相補体を含む。いくつかの実施形態では、この組成物は、全長転写物にハイブリダイズした任意の長さの三リン酸ポリU逆相補体を含む。他の実施形態では、この組成物は、一本鎖三リン酸フォワード転写物を含む。他の実施形態では、この組成物は、末端三リン酸-Gを有する一本鎖RNAを含む。他の実施形態では、この組成物は、12未満のヌクレオチドまたは塩基対（フォワードまたはリバース相補体転写物を含む）の一本鎖または二本鎖RNAを含む。これらの実施形態のいずれにおいても、この組成物は、これらの全長未満の転写産物のうちのいずれか1つまたはそれらの組み合わせの50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、または0.5%未満を含み得る。

30

#### 【0034】

40

他の実施形態では、RNAは、あるプロセスによって生成されるか、または、

(a) DNA鋳型と、アデノシン三リン酸(ATP)、シチジン三リン酸(CTP)、ウリジン三リン酸(UTP)、グアノシン三リン酸(GTP)、及び任意選択的にグアノシン二リン酸(GDP)を含むNTPと、(T7補因子、例えばマグネシウムを含む緩衝液)とを含む、反応混合物を形成することと、

(b) RNAが転写されるような条件下で反応混合物をインキュベートすることと、を包含するプロセスによって調製可能であり、

ここで、GTP、CTP、ATP、及びUTPのうちの少なくとも1つの濃度は、ATP、CTPまたはUTPのうちのいずれか1つ以上の濃度より少なくとも2倍高いか、またはこの反応物は、ヌクレオチド二リン酸(NDP)またはヌクレオチド類似体をさらに含

50

み、ここでNDPまたはヌクレオチド類似体の濃度は、ATP、CTPまたはUTPのうちのいずれか1つ以上の濃度の少なくとも2倍大きい。いくつかの実施形態では、GTPの濃度対ATP、CTPまたはUTPのいずれか1つの濃度の比は、少なくとも2:1、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1または少なくとも6:1である。

【0035】

GTPの濃度対ATP、CTP及びUTPの濃度の比は、いくつかの実施形態では、それぞれ2:1、4:1及び4:1である。他の実施形態では、GTPの濃度対、ATP、CTP及びUTPの濃度の比は、それぞれ3:1、6:1及び6:1である。この反応混合物は、GTP及びGDPを含んでもよく、そしてGTP+GDPの濃度対ATP、CTPまたはUTPのいずれか1つの濃度の比は、少なくとも2:1、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1または少なくとも6:1である。いくつかの実施形態では、GTP+GDPの濃度対ATP、CTP及びUTPの濃度の比は、それぞれ3:1、6:1及び6:1である。

10

【0036】

さらに他の実施形態では、RNAは、あるプロセスによって産生されるか、または、

(a) DNA鋳型と、アデノシン三リン酸(ATP)、シチジン三リン酸(CTP)、ウリジン三リン酸(UTP)、グアノシン三リン酸(GTP)及び任意選択的にグアノシン二リン酸(GDP)と、緩衝液マグネシウム含有緩衝液とを含む反応混合物を形成すること、

20

(b) RNAが転写されるような条件下で反応混合物をインキュベートすること、を包含するプロセスによって調製可能であり、

ここで、反応物中のリン酸塩の有効濃度は、少なくとも150mMのリン酸塩、少なくとも160mM、少なくとも170mM、少なくとも180mM、少なくとも190mM、少なくとも200mM、少なくとも210mMまたは少なくとも220mMである。この反応物中のリン酸塩の有効濃度は180mMであってもよい。いくつかの実施形態における反応物中のリン酸塩の有効濃度は、195mMである。他の実施形態では、この反応物中のリン酸塩の有効濃度は225mMである。

【0037】

他の実施形態では、RNAは、あるプロセスによって生成されるか、または、

30

(a) DNA鋳型と、アデノシン三リン酸(ATP)、シチジン三リン酸(CTP)、ウリジン三リン酸(UTP)、グアノシン三リン酸(GTP)、及び任意選択的にグアノシン二リン酸(GDP)と、マグネシウム含有緩衝液とを含む反応混合物を形成すること、

(b) RNAが転写されるような条件下で反応混合物をインキュベートすること、を包含するプロセスによって調製可能であり、

ここで、このマグネシウム含有緩衝液は、Mg<sup>2+</sup>を含み、そしてMg<sup>2+</sup>の濃度に対するATP+CTP+UTP+GTP及び任意選択的にGDPの濃度のモル比は、少なくとも1.0、少なくとも1.25、少なくとも1.5、少なくとも1.75、少なくとも1.85、少なくとも3以上である。Mg<sup>2+</sup>の濃度に対するATP+CTP+UTP+GTP及び任意選択的にGDPの濃度のモル比は1.5であってもよい。いくつかの実施形態では、Mg<sup>2+</sup>の濃度に対するATP+CTP+UTP+GTP及び任意選択的にGDPの濃度のモル比は1.88である。いくつかの実施形態では、Mg<sup>2+</sup>の濃度に対するATP+CTP+UTP+GTP及び任意選択的にGDPの濃度のモル比は3である。

40

【0038】

いくつかの実施形態では、この組成物は、dsRNase(例えば、RNaseIII)処理ステップを含まないプロセスによって生成される。他の実施形態では、この組成物は、逆相(RP)クロマトグラフィー精製ステップを含まないプロセスによって生成される。さらに他の実施形態では、この組成物は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)精製ステップを含まないプロセスによって生成される。

50

## 【 0 0 3 9 】

R N A は、いくつかの実施形態では、修飾 m R N A である。他の実施形態では、R N A は未修飾 R N A である。他の実施形態では、R N A は、l n c R N A である。さらに他の実施形態では、5 0 ヌクレオチド長を超える R N A である。R N A は、U T P を含んでもよく、U T P は修飾 U T P である。

## 【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態では、逆相補体転写産物またはサイトカイン誘導種の量は、

( a ) I V T R N A を生成するために使用されたのと同じの I V T 条件下でモデル R N A をコードする D N A 鋳型からモデル R N A を含む組成物を生成すること、及び

( b ) モデル R N A を含む組成物中の逆相補体転写産物またはサイトカイン誘導種の量を L C - M S によって決定すること、

を包含するプロセスによって間接的に決定され、

ここで、モデル R N A を含む組成物中の L C - M S による逆相補体転写産物またはサイトカイン誘導種の量は、I V T R N A を含む組成物中の逆相補体転写産物またはサイトカイン誘導種の量を示す。

## 【 0 0 4 1 】

他の態様では、本発明は、R N A が R N a s e I I I 処理を受けないか、及び / または R P 精製を受けない、インビトロ転写 ( I V T ) R N A 組成物である。

## 【 0 0 4 2 】

さらに他の態様において、本発明は、目的のポリペプチドをコードするインビトロ転写 ( I V T ) 一本鎖 R N A 及び薬学的に許容される賦形剤を含む組成物であり、ここで R N A の 9 8 % 超が一本鎖であり、この一本鎖の R N A は、異なる長さの転写物を含む。いくつかの実施形態では、異なる長さの転写物を含む一本鎖 R N A は、全長転写物及びアポーターティブ転写物を含む。いくつかの実施形態では、一本鎖非全長転写物の 8 0 ~ 9 8 % は、アポーターティブ転写物を含む。さらに他の実施形態では、一本鎖非全長転写物の 9 5 ~ 9 8 % がアポーターティブ転写物を含む。

## 【 0 0 4 3 】

使用組成物の単位は、本発明の他の態様において提供される。使用組成物の単位は、目的のポリペプチド及び薬学的に許容される賦形剤をコードするインビトロ転写 ( I V T ) 一本鎖 R N A であり、ここでこの組成物は、残留有機溶媒を含まない。

## 【 0 0 4 4 】

他の態様において、本発明は、目的のポリペプチドをコードするインビトロ転写 ( I V T ) 一本鎖 R N A 及び薬学的に許容される賦形剤を含む組成物であり、ここでこの組成物は非免疫原性であり、この一本鎖 R N A は異なる長さの転写物を含む。いくつかの実施形態では、異なる長さの転写物を含む一本鎖 R N A は、全長転写物及びアポーターティブ転写物などの断片転写物を含む。断片転写物としては、例えば、非全長センス R N A 、切断型または時期尚早に終結した転写物、ならびに典型的には転写産物の最初の 2 5 ヌクレオチド未満であるアポーターティブ転写物が挙げられる。

## 【 0 0 4 5 】

他の態様では、本発明は、R N A を調製する方法であり、この方法は、

( a ) D N A 鋳型と、アデノシン三リン酸 ( A T P ) 、シチジン三リン酸 ( C T P ) 、ウリジン三リン酸 ( U T P ) 、グアノシン三リン酸 ( G T P ) 及び任意選択的にグアノシン二リン酸 ( G D P ) を含む N T P と、緩衝剤、例えば、マグネシウム含有緩衝液とを含む反応混合物を形成すること、及び

( b ) R N A が転写されるような条件下で反応混合物をインキュベートすること、を包含し、

ここで、G T P 、C T P 、A T P 、及び U T P のうちの少なくとも 1 つの濃度は、A T P 、C T P または U T P のうちのいずれか 1 つ以上の濃度より少なくとも 2 倍高いか、またはこの反応物は、ヌクレオチド二リン酸 ( N D P ) またはヌクレオチド類似体をさらに含み、N D P またはヌクレオチド類似体の濃度は、A T P 、C T P または U T P のいずれか

10

20

30

40

50

1つ以上の濃度より少なくとも2倍大きい。いくつかの実施形態では、GTPの濃度対ATP、CTPまたはUTPのいずれか1つの濃度の比は、RNAを生成するために、少なくとも2:1、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1または少なくとも6:1である。

【0046】

いくつかの実施形態では、GTPの濃度対ATP、CTP及びUTPの濃度の比は、それぞれ2:1、4:1及び4:1である。他の実施形態では、GTPの濃度対ATP、CTP及びUTPの濃度の比は、それぞれ3:1、6:1及び6:1である。さらに他の実施形態では、この反応混合物はGTP及びGDPを含み、GTP+GDPの濃度対ATP、CTPまたはUTPのいずれか1つの濃度の比は、少なくとも2:1、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1または少なくとも6:1である。他の実施形態では、GTP+GDPの濃度対ATP、CTP及びUTPの濃度の比は、それぞれ3:1、6:1及び6:1である。

10

【0047】

本明細書に記載の任意の組成物は、反応混合物、例えばRPクロマトグラフィーなどの他の方法によって精製されていないIVT反応の混合物であってもよい。他の態様では、この組成物は対象への治療的投与の準備ができている最終生成物である。

【0048】

本発明の各制限は、本発明の様々な実施形態を包含し得る。したがって、いずれか1つの要素または要素の組み合わせを含む本発明の各制限は、本発明の各態様に含まれ得ることが予想される。本発明は、その適用において、以下の説明に記載されるかまたは図面に示される構成の詳細及び構成要素の配置に限定されない。本発明は、他の実施形態が可能であり、様々な方法で実施または実行され得る。

20

【0049】

添付の図面は一定の縮尺で描かれることを意図していない。図面では、様々な図に示されているそれぞれの同一またはほぼ同一の構成要素は、同様の数字で表されている。明確にするために、あらゆる構成要素があらゆる図面中表示されているとは限らない。図面では以下である。

【図面の簡単な説明】

【0050】

30

【図1】hEPO化学変異体、nLuc及びビヒクル対照、ならびにBJ線維芽細胞におけるショートモデルRNA-1をスクリーニングするIFN- $\alpha$ アッセイの結果を示すグラフである。

【図2】ショートモデル転写物のLCMS分析の結果を示す。このモデルによって、アポタイプ種が3つの化学物質全てに存在することが示される。上のトレースは、未修飾のショートモデルRNA-1を示し、中央のトレースは、全てのウリジンをシュードウリジンに修飾し、全てのシチジンを5'-O-メチルで修飾したショートモデルRNAを示し、下のトレースはいくつかのウリジン及びシチジン残基が修飾されたショートモデルRNA-1を示す。

【図3】モデル転写物のLCMS分析の結果を示す。このモデルは、IVTによって調製されたモデルRNA-4及びhEPOの不純物プロファイルを示している。

40

【図4】処理時に免疫刺激生成物を付与するDNA鋳型の非存在下でT7を用いてRNA鋳型RNA転写が行われ得ることが示される。

【図5A】図5A及び図5Bは、RNase III基質の量に対する、過剰のGTPを用いる逆相(RP)及びIVTの影響を示す。アルファプロセスとRP精製の両方とも、RNase III基質を減少させる。両者を組み合わせることによる相加効果を示されている。図5Aは、RNase III処理hEPO G5材料のキャピラリー電気泳動分析を示す。

【図5B】図5Bは、RNase III処理hEPO G0材料のキャピラリー電気泳動分析を示す。

50



【図6】hEPOタンパク質発現及びIFN-からのトランスフェクションデータを示す。

【図7】異なるプロセスを使用して転写され、RNase IIIで処理された短い転写物のキャピラリー電気泳動分析である。このデータは、RNase IIIで処理したモデルRNAの効果を示す。

【図8A】RP-IP純度法の結果を示す。図8Aは、等モル方法を用いたIVT後のRNase III処理を受けたモデルRNA-4を示す。

【図8B】RP-IP純度法の結果を示す。図8Bは、過剰のGTPを用いたIVT後にRNase III処理を受けたモデルRNA-4を示す。

【図9】RNase III処理があったhEPOのRP分画と、RNase III処理がなかったhEPOのRP分画である。

【図10A】図10A~図10Dは、等モル(図10A、10B、及び10C)反応後のhEPO画分RNase IIIフラグメントアナライザーデータを示す。hEPOは、そのウリジン塩基が1-メチルシュドウリジンとなるように修飾した。RNase IIIによる処理は、過剰のGTPを用いる方法を用いても感知できるほどの純度の相違を示さなかった。等モルではかなりの基質がある。

【図10B】図10Bは、図10Aの続きである。

【図10C】図10Cは、図10Aの続きである。

【図10D】図10Dは、未処理の、または等モル条件下でのRNase III処理後のhEPO EQ G5のインビトロIFN分析を示す。

【図11A】図11A~図11Dは、RP分画hEPOアルファ+/R III処理のキャピラリー電気泳動分析を示す。図11A、11B及び11Cは、反応において過剰のGTPを用いたIVTの効果を示す。

【図11B】図11Bは、図11Aの続きである。

【図11C】図11Cは、図11Aの続きである。

【図11D】図11Dは、過剰のGTPを伴うIVTを示し、これはIFN応答をもたらさなかった。

【図12】J2抗dsRNA ELISAアッセイの結果を示す。

【図13】dsRNAがRNase III処理によって除去されることを示す。

【図14】IVT特徴付け研究の結果を示しており、過剰のGTPを用いるIVTは低温誘導性サイトカインスパイクに対してそれほど敏感ではないことを示している。

【図15】IVT特徴付け研究のヌクレアーゼP1の結果を示す。

【図16A】図16Aは、等モルプロセス(図16A)においてG5を使用した、異なる化学物質におけるRNAに基づくIVTのLCMSによる不純物分析を示す。

【図16B】図16Bは、アルファプロセス(図16B)においてG5を使用した、異なる化学物質におけるRNAに基づくIVTのLCMSによる不純物分析を示す。

【図17】異なるIVT条件下でのBJ線維芽細胞中のIFN-を示す。

【図18】dsRNAがワクシニアによってキャップされ得ないことを示す。

【図19】異なるdsRNA種に対するCIP処理の効果を示す。

【図20】インビボ実験からのFA純度データを示す。

【図21】BJ線維芽細胞におけるIFN-誘導を示す。

【図22】hEPOのインビボ発現を示す。

【図23A】図23A~23Dは、インビボ実験からのサイトカインLuminexデータを示す。

【図23B】図23Bは、図23Aの続きである。

【図23C】図23Cは、図23Aの続きである。

【図23D】図23Dは、図23Aの続きである。

【図24】インビボでのB細胞活性化頻度を示す。

【図25】短いdsRNAを分析したIFN-アッセイの結果を示す。このアッセイは、短い5'三リン酸化オリゴのインビトロ分析である。

10

20

30

40

50

【図26】20mer及びポリU/A dsRNAを分析したIFN-アッセイの結果を示す。

【図27】IFN- 応答に関する3'オーバーハングの分析を示す。

【図28】5'オーバーハング、完全二重鎖、及び3'オーバーハングを様々な長さで用いてdsRNA標準を試験するサイトカインアッセイの結果を示す。

【図29】ポリU種のインビトロ分析を示すグラフである。

【図30】ssRNAオリゴ標準のインビトロ分析を示すグラフである。

【図31】5'官能価が異なるdsRNAオリゴ標準のインビトロ分析を示すグラフである。

【図32】ホスファターゼがdsRNAを脱リン酸化し得ないことを実証するグラフである。

10

【図33】ssRNA不純物用量反応(BJ線維芽細胞中のIFN-)を実証するグラフである。

【図34】dsRNA不純物用量反応(BJ線維芽細胞中のIFN-)を示すグラフである。

【図35】フォワードオリゴ標準における修飾5'ヌクレオチドのIFN- 応答を示すグラフである。

【図36】逆相補性オリゴ標準上の修飾5'ヌクレオチドに対するIFN- 応答を示すグラフである。

【図37】5'ヒドロキシル官能化dsRNAのIFN- 応答を示すグラフである。

20

【図38】そのアルファプロセスが等モルプロセスよりも多くのOH(クリーン)を生成することを実証するグラフである。

【図39】1ugのmRNAについて計算されたdsRNAを示すグラフである。

【図40】伝統的なインビトロ転写(IVT)プロセス及び形成された不純物の種類を示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0051】

タンパク質をコードするポリマーを製造する方法を強化するために、RNAを生成する新しい方法が開発された。伝統的なインビトロ転写(IVT)プロセスを使用して生成されたRNAとは大きく異なる特性を有するRNA調製物を産生するために、インビトロ転写プロセスに変更を加えてもよいことが発見された。本発明の方法に従って製造されたRNA調製物(本明細書ではIVT RNA組成物とも呼ばれる)は、上記RNA転写物を含む定性的及び定量的に優れた組成物の生成を可能にする特性を有する。広範囲の精製プロセスと組み合わせた場合でさえも、伝統的なIVT法を使用して製造されたRNAは、本発明のRNA調製物と定性的及び定量的に異なる。例えば、本発明のRNA調製物(及びそれを含む組成物)は、伝統的なIVTを用いて製造されたRNA調製物(及びそれを含む組成物)と比較して免疫原性が低い。本発明の方法に従って生成されたRNA調製物(本明細書ではIVT RNA組成物とも呼ばれる)は、例えば翻訳時に、定性的及び定量的に優れたタンパク質産生の産生を可能にする特性をさらに有する。例えば、本発明のRNA調製物から生成されたタンパク質は、伝統的なIVTを用いて製造されたRNA調製物と比較して免疫原性が低い。

30

40

【0052】

さらに、より高い純度でのタンパク質発現レベルの増大が、本明細書に記載のRNA調製物から生じる。ある機構に拘束されるものではないが、実質的なタンパク質発現レベルは、精製試料中のmRNAの高い完全性の結果であると考えられている。いくつかの精製手順は、それらの混入物の分解によってあるレベルの混入物を効果的に除去し得るが、医薬品の完全性は悪影響を受ける。例えば、mRNA試料のRNAse消化は、RNA混入物を除去するのに有用であることが先行技術において主張されている。しかしながら、RNAse消化はまた、IVT反応によって生成された全長転写物の一部を分解することによってmRNAの完全性を低下させる。先行技術のIVT/精製プロセスとは対照的に、

50

本発明の方法を用いたmRNAの完全性は、RNAse消化などの手順を用いた除去を必要とするであろう二本鎖転写物を、この方法がほとんどまたは全く生じないので、非常に高い。

#### 【0053】

本明細書中に記載されるプロセスによって産生されるRNAは、治療目的または診断目的のために使用され得る、30ヌクレオチド長を超える任意のRNAである。いくつかの実施形態では、RNAは、40、50、60、75、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチド長を超えるRNAである。いくつかの実施形態では、RNAは、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、11,000、または12,000ヌクレオチド長を超えるRNAである。RNAは、いくつかの実施形態では、mRNAである。いくつかの実施形態では、RNAは、約500～約4000ヌクレオチド長、1000～約2000ヌクレオチド長、750～約1800ヌクレオチド長、約1500～約3000ヌクレオチド長、約4000～約7000ヌクレオチド長、または約6000～約12000ヌクレオチド長のRNAである。mRNAは修飾されていてもよいし、修飾されていなくてもよい。他の実施形態では、RNAは、以下：mRNA、修飾mRNA、非修飾RNA、lncRNA、自己複製RNA、環状RNA、CRISPRガイドRNAのうちの1つ以上である。

#### 【0054】

伝統的なIVT反応は、転写緩衝液中でDNA鋳型をRNAポリメラーゼならびにGTP、ATP、CTP、及びUTPを含む等モル量のヌクレオチド三リン酸と共にインキュベートすることによって行われる。この反応から、5'末端グアノシン三リン酸を有するRNA転写産物が生成される。これらの反応はまた、免疫刺激性であり、かつ付加的な影響を及ぼし得る、二本鎖及び一本鎖RNAのような多数の不純物の生成をもたらす。逆相補体の形成を妨げる本発明の方法は、両方の種の自然免疫認識を妨げる。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、等モルのNTPを用いた先行技術の方法を用いて生成されたRNA調製物よりも有意に低い細胞活性を有するRNAの産生をもたらす。この先行技術は、一連のその後の精製ステップを用いてこれらの望ましくない成分を除去しようと試みている。そのような精製方法は、それらが追加の時間及び資源を含み、そして最終生成物中に残留有機溶媒の混入（医薬製品にとって望ましくない）をもたらすので望ましくない。逆相クロマトグラフィー（RP）のようなプロセスを大規模化することは、例えば、耐圧防爆設備、HPLCカラム及び高圧、高温、可燃性溶媒等に定格された精製システムなどを利用するため、労力集約的及び資本集約的である。このスケール及び大規模製造の処理能力は、これらの要因によって制限される。RPプロセスにおいて利用されるアルキルアンモニウムイオン対を除去するために、その後の精製もまた必要とされる。対照的に、本明細書に記載の方法は、現在利用されている方法（例えばRP）をさらに向上させる。不純物負荷が低いほど、サイトカイン誘導性混入物を含まない全長RNAの精製回収率が高くなり、例えば、最初は材料の品質が高い。分取精製としてRNAse IIIを使用する場合、本発明の修飾IVTプロセスのさらなる利点は、RNAse III基質が少ないので、RNAse III処理によって生成される不活性／無関係な切断生成物（分解するが翻訳しないもの）がより少ないということである。ごく微量のdsRNA/RNAse III基質しかない場合は、たとえサイトカインがサイレントであっても、タンパク質を翻訳することができる、より最終的なインタクトなRNA産物（インタクトなキャップ/ORF/ポリA）が存在する。これにより、その後の精製に対する負担が軽減される。

#### 【0055】

驚くべきことに、本発明の態様によれば、IVT反応における1つ以上の反応パラメータの操作により、先行技術のプロセスを用いて生成される1つ以上の望ましくない混入物なしで高機能RNAのRNA調製物が生成されることが発見された。操作され得るIVT反応における1つのパラメータは、反応混合物中の1つ以上の他のヌクレオチドまた

10

20

30

40

50

はヌクレオチド類似体と比較した、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の相対量（例えば、異なるヌクレオチド量または濃度）である。例えば、I V T 反応は、過剰のヌクレオチド、例えば、一リン酸ヌクレオチド、二リン酸ヌクレオチドもしくは三リン酸ヌクレオチド、及び／または過剰のヌクレオチド類似体及び／またはヌクレオシド類似体を含んでもよい。本発明の方法は、伝統的なI V T 法によって製造された生成物よりも著しく純粋な高収率の生成物を生成する。

#### 【0056】

ヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドの一般構造を有するか、またはヌクレオチドもしくはその一部と構造的に類似している化合物である。特に、ヌクレオチド類似体は、例えば、ヌクレオチドの核酸部分、糖部分及び／またはリン酸基の類似体を含むヌクレオチドである。ヌクレオチドとしては、例えば、ヌクレオチドーリン酸、ヌクレオチドニリン酸、及びヌクレオチド三リン酸が挙げられる。本明細書で使用されるヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドまたはその一部と構造的に類似しているが、典型的なヌクレオチド構造（核酸塩基 - リボース - リン酸）を有さない。ヌクレオシド類似体は、ヌクレオシドの一般構造を有するか、またはヌクレオシドもしくはその一部と構造的に類似している化合物である。特に、ヌクレオシド類似体は、例えば、ヌクレオシドの核酸及び／または糖部分の類似体を含むヌクレオシドである。

#### 【0057】

本明細書で使用されるヌクレオシド三リン酸は、リボースに結合した核酸塩基（すなわちヌクレオシド）及び3つのリン酸（すなわちヌクレオチド）を含む分子を指す。ヌクレオチドニリン酸は、同じ分子であるが、2つのリン酸部分を有するものを指す。ヌクレオチドーリン酸は、同じ分子であるが、1つのリン酸部分を有するものを指す。ヌクレオチドーリン酸、ヌクレオチドニリン酸及び三リン酸は、本明細書においてそれぞれNMP、NDP及びNTPと呼ばれる場合がある。NMP、NDP及びNTP中のNは、天然に存在するヌクレオチド、合成ヌクレオチド、及び修飾ヌクレオチドを含む任意のヌクレオチドを指す。したがって、NDP及びNTPという用語は、天然に存在するか、合成であるか、または修飾された任意のヌクレオチドをその中に有する、それぞれヌクレオチドニリン酸及びヌクレオチド三リン酸を指す。

#### 【0058】

天然ヌクレオチドニリン酸としては、少なくともアデノシンニリン酸（ADP）、グアノシンニリン酸（GDP）、シチジンニリン酸（CDP）、及びウリジンニリン酸（UDP）が挙げられる。天然ヌクレオチド三リン酸としては、少なくともアデノシン三リン酸（ATP）、グアノシン三リン酸（GTP）、シチジン三リン酸（CTP）、5 - メチルウリジン三リン酸（m5UTP）、及びウリジン三リン酸（UTP）が挙げられる。いくつかの実施形態では、NDP及び／またはNTPは修飾されている。例えば、修飾NDPまたはNTPは、容易な精製及び単離を可能にするためのハンドルを有し得る。

#### 【0059】

ヌクレオチド三リン酸は、T7ポリメラーゼなどのポリメラーゼによってRNA鎖に付加される。対照的に、ヌクレオチドニリン酸及び一リン酸は反応を開始し得る（例えば、最初に転写されるモノマーとして働く）が、T7ポリメラーゼによって鎖内に組み込まれることはない（例えば、鎖の他の場所に組み込まれることはない）。場合によっては、GDPなどのヌクレオチドニリン酸を第1のモノマーとして組み込んでもよい。例えば、T7がGDPで始まり5' GDPを産生する場合、機能的RNAが生成され得る。5' GDP開始RNAは、依然としてワクシニアキャッピング酵素の基質である。GMPのような過剰のNMPが反応物中で使用される場合、5' PO<sub>4</sub>を有する転写産物はリガーゼ（複数可）の基質であるので（例えば、DNA/RNAリガーゼ（複数可））、キャップをライゲーションすることによって純度を高めてもよい。

#### 【0060】

本発明において有用なヌクレオチド類似体は、構造的にヌクレオチドまたはその一部と類似しているが、例えば、T7によって重合可能ではない。本明細書で使用されるヌクレ

10

20

30

40

50

オチド/ヌクレオシド類似体 (C、T、A、U、G、dC、dT、dA、dU、またはdG類似体を含む) としては、例えば、抗ウイルスヌクレオチド類似体、リン酸類似体 (可溶性または固定化、加水分解性または非加水分解性)、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、テトラヌクレオチド、例えばキャップ類似体、または酵素キャッピング用の前駆体/基質 (ワクシニア、またはリガーゼ)、キャップまたは5'部分のライゲーシオン/コンジュゲーシオンを容易にするための官能基で標識されたヌクレオチド (IRES)、キャップもしくは5'部分の連結を容易にするために5'PO<sub>4</sub>で標識されたヌクレオチド、または化学的もしくは酵素的に切断可能であり得る官能基/保護基で標識されたヌクレオチドが挙げられる。抗ウイルスヌクレオチド/ヌクレオシド類似体としては、限定するものではないが、ガンシクロビル、エンテカビル、テルビブジン、ビダラビン及びシドフォビルが挙げられる。

10

#### 【0061】

##### IVT反応条件

例示的な態様では、本発明の方法は、IVT反応によるRNAの産生を含む。IVTは、インビトロで合成ポリヌクレオチドを生成するために使用される当該分野で認識されている方法である。インビトロ転写 (IVT) RNAは、天然のRNAに構造的に類似することによってタンパク質を一時的に発現するように操作され得る。しかしながら、この薬物クラスには固有の課題があり、特にIVT RNAの翻訳効率及び免疫原性の制御に関連している。特に、IVT RNAは、望ましくない自然免疫効果を生み出し、HPLCによる極めてストリンジェントな精製手順は、典型的には追加の最終RNA生成ステップとして適用される。少量の短い二本鎖RNA断片の除去は、このさらなる免疫応答の低下を達成するために極めて重要である。

20

#### 【0062】

先行技術で使用されている典型的な反応は、高忠実度で適度に高収率の産物を提供する。しかし、この産物にはベースラインレベルの混入物が含まれており、そのうちのいくつかだけが日常的な精製方法を使用して除去され得る。IVT反応は、典型的には以下を含む: RNAポリメラーゼ、例えば1000~12000 U/mL、例えば7000 U/mLという最終濃度の例えば、T7 RNAポリメラーゼ; 例えば10~70 nM、例えば40 nMの最終濃度のDNA鋳型; 例えば、0.5~10 mM、例えば、それぞれ7.5 mMの最終濃度のヌクレオチド (NTP); 最終濃度が例えば12~60 mMのマグネシウム、例えば40 mMの酢酸マグネシウム; 例えば、7~8.5のpHの、例えば、HEPESまたはTrisなどの緩衝剤、例えば、40 mM Tris HCl、pH 8。いくつかの実施形態では、5 mMジチオトレイトール (DTT) 及び/または1 mMスベルミジンが含まれ得る。いくつかの実施形態では、転写反応中にRNase誘導分解を確実に防止するために、RNase阻害剤がIVT反応に含まれる。例えば、マウスRNase阻害剤は、1000 U/mLの最終濃度で利用してもよい。いくつかの実施形態では、ピロホスファターゼがIVT反応に含まれて、各ヌクレオチドが2単位の無機リン酸に組み込まれた後に生成された無機ピロリン酸を切断する。これによって、マグネシウムが溶液中に留まりそしてピロリン酸マグネシウムとして沈殿しないことが確実になる。例えば、E.coli無機ピロホスファターゼは、1 U/mLの最終濃度で利用され得る。

30

40

#### 【0063】

典型的なインビトロ転写反応は以下のものを含む:

- 1 鋳型cDNA 1.0 µg
- 2 10×転写緩衝液 (400 mM Tris-HCl pH 8.0、190 mMのMgCl<sub>2</sub>、50 mMのDTTまたはTCEP、10 mMスベルミジン) 2.0 µl
- 3 カスタムNTP (各25 mM) 7.2 µl
- 4 RNase阻害剤 20 U
- 5 T7 RNAポリメラーゼ 3000 U
- 6 dH<sub>2</sub>O 最大20.0 µl、及び
- 7 37 °Cで1時間~5時間のインキュベーション

50

## 【0064】

粗 I V T 混合物は、4 で 4 ~ 12 時間貯蔵され得る。次いで、1 単位の R N a s e フリー D N a s e を用いて元の鋳型を消化する。37 で 15 分間インキュベートした後、d T レジン、逆相 H P L C、または A m b i o n の M E G A C L E A R ( 商 標 ) K i t ( A u s t i n , T X ) などの精製技術を使用して、製造元の指示に従って R N A を精製する。例示的な I V T 反応は、使用される成分または成分の量に関して限定的ではない。

## 【0065】

伝統的な方法と同様に、本発明の R N A は、D N A 鋳型、ならびに A T P、C T P、U T P、G T P ( または対応する前述の成分の類似体 ) などの 1 つ以上の N T P、及び緩衝液を含む反応混合物を形成することによっても生成してもよい。次いで、R N A が転写されるような条件下で反応物をインキュベートする。しかしながら、本発明の方法は、過剰量の 1 つ以上のヌクレオチド及び / またはヌクレオチド類似体の存在が最終生成物に有意な影響を及ぼし得るという驚くべき知見を含む。本発明の方法は、意図しないまたは望ましくない不純物を欠き、かつ反応の有効性に影響を与えることなく、高品質の製品を製造するために使用され得る。

## 【0066】

本発明の I V T 方法は、反応混合物中のヌクレオチド及び / またはヌクレオチド類似体の量 ( 例えば、モル量または分量 ) の変更を含む。いくつかの態様では、1 つ以上のヌクレオチド及び / または 1 つ以上のヌクレオチド類似体を過剰に反応混合物に添加してもよい。過剰のヌクレオチド及び / またはヌクレオチド類似体は、反応混合物中の N T P のような 1 つ以上の他のヌクレオチドの量よりも大きい任意の量である。例えば、過剰のヌクレオチド及び / またはヌクレオチド類似体は、反応混合物中の他の個々の N T P のそれぞれまたは少なくとも 1 つの量よりも多い量であってもよいし、または等モル量よりも多い量の他の N T P を指してもよい。

## 【0067】

反応混合物に含まれるヌクレオチド及び / またはヌクレオチド類似体が N T P である実施形態では、N T P は、反応混合物に含まれる他の 3 つ全ての N T P よりも高濃度で存在してもよい。他の 3 つの N T P は、互いに等モル濃度であってもよい。あるいは、他の 3 つの N T P のうちの 1 つ以上が、他の 1 つ以上の N T P とは異なる濃度であってもよい。

## 【0068】

いくつかの実施形態では、選択された N T P の過剰とは、反応混合物中の他の個々の N T P のうちのいずれか 1 つ以上の量よりも 2 倍または倍 (  $\times$  )、3  $\times$ 、4  $\times$ 、5  $\times$ 、6  $\times$ 、7  $\times$ 、8  $\times$ 、9  $\times$ 、10  $\times$ 、11  $\times$ 、12  $\times$ 、13  $\times$ 、14  $\times$ 、15  $\times$ 、15  $\times$  ~ 100  $\times$ 、10  $\times$  ~ 90  $\times$ 、10  $\times$  ~ 80  $\times$ 、10  $\times$  ~ 70  $\times$ 、またはさらにはそれより多い。他の実施形態では、選択された N T P の過剰とは、反応混合物中の他の個々の N T P の合計の量よりも 2 倍または倍 (  $\times$  )、3  $\times$ 、4  $\times$ 、5  $\times$ 、6  $\times$ 、7  $\times$ 、8  $\times$ 、9  $\times$ 、10  $\times$ 、11  $\times$ 、12  $\times$ 、13  $\times$ 、14  $\times$ 、15  $\times$ 、15  $\times$  ~ 100  $\times$ 、10  $\times$  ~ 90  $\times$ 、10  $\times$  ~ 80  $\times$ 、10  $\times$  ~ 70  $\times$ 、さらにはそれ以上である。例示的な実施形態では、N T P は、反応混合物中の他の N T P に対してモル過剰である。例えば、過剰の N T P は、反応混合物中の 1 以上の他の N T P の、例えば 2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1 またはそれを超えるモル比で添加されてもよい。他の実施形態では、過剰の選択された N T P は、0 . 5 m M、1 . 0 m M、1 . 5 m M、2 . 0 m M、2 . 5 m M、3 . 0 m M、3 . 5 4 . 0 m M、4 . 5 m M、5 . 0 m M、5 . 5 m M、6 . 0 m M、7 m M、8 m M、9 m M、10 m M、15 m M、20 m M、30 m M、40 m M、50 m M、60 m M、70 m M、100 m M、120 m M、150 m M の濃度、または反応混合物中の他の個々の N T P のいずれか 1 つ以上の量をさらに超える量、または 60 ~ 100 m M もしくは 4 . 5 ~ 100 m M の範囲である。他の実施形態では、過剰の選択された N T P は、0 . 5 m M、1 . 0 m M、1 . 5 m M、2 . 0 m M、2 . 5 m M、3 . 0 m M、3 . 5 4 . 0 m M、4 . 5 m M、5 . 0 m M、5 . 5 m M、6 . 0 m M、7 m M、8 m M、9 m M、1

0 mM、15 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、100 mM、120 mM、150 mMの濃度、または反応混合物中の他のNTPの合計のいずれか1つ以上の量よりもさらに多い。

#### 【0069】

いくつかの例において、反応混合物中の過剰のNTPはNTP-1であり、反応混合物中の他のNTPは、NTP-2、NTP-3、及びNTP-4である。いくつかの実施形態では、NTP-2、NTP-3、及びNTP-4よりも高濃度でNTP-1が反応混合物中に存在し、NTP-2、NTP-3、及びNTP-4はそれぞれ等モル量である。いくつかの実施形態では、NTP-1：NTP-2：NTP-3：NTP-4の比は、少なくとも2：1：1：1、少なくとも3：1：1：1、少なくとも4：1：1：1、少なくとも5：1：1：1、少なくとも6：1：1：1、少なくとも7：1：1：1、少なくとも8：1：1：1、少なくとも9：1：1：1、少なくとも10：1：1：1、少なくとも11：1：1：1、少なくとも12：1：1：1、少なくとも13：1：1：1、少なくとも14：1：1：1、少なくとも15：1：1：1、少なくとも16：1：1：1、少なくとも17：1：1：1、少なくとも18：1：1：1、少なくとも19：1：1：1であり、それぞれNTP-1の潜在的なキャップ上限は20である。いくつかの実施形態では、NTP-1：NTP-2+NTP-3+NTP-4の比は、少なくとも3：3、少なくとも5：3、少なくとも6：3、少なくとも7：3、少なくとも8：3、少なくとも9：3、少なくとも10：3、または少なくとも15：3であり、それぞれ潜在的な上限は20：3である。

#### 【0070】

他の実施形態では、NTP-1は、NTP-2、NTP-3、及びNTP-4よりも高い濃度で反応混合物中に存在し、NTP-2及びNTP-3はそれぞれ等モル量であり、NTP-4は、反応混合物中に、NTP-2及びNTP-3より高濃度でかつNTP-1より低い濃度で存在する。例えば、いくつかの実施形態では、NTP-1：NTP-4：NTP-2：NTP-3の比は、少なくとも3：2：1：1、少なくとも4：3：1：1、少なくとも4：2：1：1、少なくとも5：3：1：1、少なくとも5：3：2：2、少なくとも6：4：2：2、少なくとも8：4：2：2、少なくとも9：2：1：1、少なくとも10：2：1：1、少なくとも11：2：1：1、少なくとも12：2：1：1、少なくとも13：2：1：1、少なくとも14：2：1：1、少なくとも15：2：1：1、少なくとも16：2：1：1、少なくとも17：2：1：1、少なくとも18：2：1：1、少なくとも19：2：1：1であり、それぞれNTP-1の潜在的な上限は20である。

#### 【0071】

他の実施形態では、NTP-1は、NTP-2、NTP-3、及びNTP-4よりも高い濃度で反応混合物中に存在し、NTP-2及びNTP-3はそれぞれ等モル量であり、NTP-4は、反応混合物中に、NTP-1、NTP-2及びNTP-3未満の濃度で存在する。例えば、いくつかの実施形態では、NTP-1：NTP-3：NTP-2：NTP-4の比は、少なくとも3：2：2：1、少なくとも4：3：3：1、少なくとも4：2：2：1、少なくとも5：3：3：1、少なくとも5：3：3：2、少なくとも6：4：4：2、少なくとも8：4：4：2、少なくとも9：2：2：1、少なくとも10：2：2：1、少なくとも11：2：2：1、少なくとも12：2：2：1、少なくとも13：2：2：1、少なくとも14：2：2：1、少なくとも15：2：2：1、少なくとも16：2：2：1、少なくとも17：2：2：1、少なくとも18：2：2：1、少なくとも19：2：2：1であり、それぞれNTP-1の潜在的な上限のキャップは20である。

#### 【0072】

いくつかの実施形態におけるNTP-1は、GTP、ATP、UTP、またはCTPである。いくつかの実施形態におけるNTP-2は、GTP、ATP、UTP、またはCTPである。いくつかの実施形態におけるNTP-3は、GTP、ATP、UTP、または

10

20

30

40

50

CTPである。いくつかの実施形態におけるNTP-4は、GTP、ATP、UTP、またはCTPである。

【0073】

いくつかの実施形態では、NTPはGTPであり、混合物中に、ATP、CTP、またはUTPのいずれかが1つの濃度に対して少なくとも2:1、少なくとも3:1、少なくとも4:1、少なくとも5:1、少なくとも6:1、少なくとも7:1、少なくとも8:1、少なくとも9:1、少なくとも10:1、少なくとも11:1、少なくとも12:1、少なくとも13:1、少なくとも14:1、または少なくとも15:1の比で存在する。GTPと他のNTPとの比は、約2:1~約3:1、約2.5:1~約3.5:1、約3:1~約4:1、約3.5:1~約4.5:1、約4:1~約5:1、約4.5:1~約5.5:1、約5:1~約6:1、約5.5:1~約6.5:1、約6:1~7:1、約6.5:1~約7.5:1、約7:1~約8:1、約7.5:1~約8.5:1、約8:1~約9:1、約8.5:1~約9.5:1、及び約9:1~約10:1であってもよい。一実施形態では、ATP、CTP、及びUTPの濃度に対するGTPの濃度の比は、それぞれ2:1、4:1、及び4:1であってもよい。別の実施形態では、ATP、CTP、及びUTPの濃度に対するGTPの濃度の比は、それぞれ3:1、6:1、及び6:1であってもよい。

10

【0074】

反応混合物に含まれるヌクレオチド及び/またはヌクレオチド類似体がNDPまたはヌクレオチド類似体である実施形態では、NDPまたはヌクレオチド類似体は、反応混合物に含まれる4つ全てのNTPよりも高濃度で存在してもよい。4つのNTPは互いに等モル濃度であってもよい。あるいは、4つのNTPのうちの1つ以上が、他のNTPのうちの1つ以上とは異なる濃度であってもよい。

20

【0075】

他の実施形態では、過剰の選択されたNDPまたはヌクレオチド類似体は、反応混合物中の個々のNTPのうちのいずれか1つ以上の量よりも2倍または倍(x)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、11x、12x、13x、14x、15x~100x、10x~90x、10x~80x、10x~70x、さらにはそれ以上である。他の実施形態では、過剰の選択されたNDPまたはヌクレオチド類似体は、反応混合物中の個々のNTPの合計の量よりも2倍または倍(x)、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、11x、12x、13x、14x、15x、15x~100x、10x~90x、10x~80x、10x~70xまたはさらにそれ以上である。例示的な実施形態では、NDPまたはヌクレオチド類似体は、反応混合物中の他のNTPに対してモル過剰である。例えば、過剰のNDPまたはヌクレオチド類似体は、反応混合物中の1以上のNTPの、例えば2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、またはそれを超えるモル比で添加されてもよい。他の実施形態では、過剰の選択されたNDPまたはヌクレオチド類似体は、0.5mM、1.0mM、1.5mM、2.0mM、2.5mM、3.0mM、3.54.0mM、4.5mM、5.0mM、5.5mM、6.0mM、7mM、8mM、9mM、10mM、15mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、100mM、120mM、150mMの濃度、またはさらには反応混合物中の個々のNTPのうちのいずれか1つ以上のNTPの量より高いか、または60~100mMもしくは4.5~100mMの範囲である。他の実施形態では、過剰の選択されたNDPまたはヌクレオチド類似体は、0.5mM、1.0mM、1.5mM、2.0mM、2.5mM、3.0mM、3.54.0mM、4.5mM、5.0mM、5.5mM、6.0mM、7mM、8mM、9mM、10mM、15mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、100mM、120mM、150mMの濃度であるか、またはさらには反応混合物中のNTPの合計のうちのいずれか1つ以上の量を超える。

30

40

【0076】

50



いくつかの例において、反応混合物中のNTPは、NTP - 1、NTP - 2、NTP - 3、及びNTP - 4である。いくつかの実施形態では、NDPまたはヌクレオチド類似体は、NTP - 1、NTP - 2、NTP - 3、及びNTP - 4よりも高い濃度で反応混合物中に存在し、ここでNTP - 1、NTP - 2、NTP - 3、及びNTP - 4はそれぞれ等モル量である。いくつかの実施形態では、NDPまたはヌクレオチド類似体：NTP - 1 + NTP + 2 : NTP - 3 + NTP - 4の比は少なくとも4 : 4、少なくとも5 : 4、少なくとも6 : 4、少なくとも7 : 4、少なくとも8 : 4、少なくとも9 : 4、少なくとも10 : 4、または少なくとも15 : 4であり、それぞれ潜在的な上限キャップは20 : 4である。

【0077】

10

いくつかの実施形態では、過剰のNDPまたはヌクレオチド類似体は、同等またはそれ以上の濃度の4つのNTPのうちの1つと組み合わせられる。

【0078】

他の実施形態では、NDPまたはヌクレオチド類似体は、NTP - 1、NTP - 2、NTP - 3、及びNTP - 4よりも高い濃度で反応混合物中に存在し、NTP - 1、NTP - 2及びNTP - 3はそれぞれ、等モル量であり、NTP - 4は、反応混合物中にNTP - 1、NTP - 2及びNTP - 3より低いかまたは大きい濃度で存在する。例えば、いくつかの実施形態では、NDPまたはヌクレオチド類似体：NTP - 1 : NTP - 3 : NTP - 2 : NTP - 4の比は少なくとも3 : 2 : 2 : 1、少なくとも4 : 3 : 3 : 3 : 1、少なくとも4 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも5 : 3 : 3 : 3 : 1、少なくとも5 : 3 : 3 : 3 : 2、少なくとも6 : 4 : 4 : 4 : 2、少なくとも8 : 4 : 4 : 4 : 2、少なくとも9 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも10 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも11 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも12 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも13 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも14 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも15 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも16 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも17 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも18 : 2 : 2 : 2 : 1、少なくとも19 : 2 : 2 : 2 : 1であり、それぞれNDPまたはヌクレオチド類似体の潜在的な上限キャップは20である。

20

【0079】

他の実施形態では、NDPまたはヌクレオチド類似体は、NTP - 1、NTP - 2、NTP - 3、及びNTP - 4よりも高い濃度で反応混合物中に存在し、NTP - 2及びNTP - 3はそれぞれ等モル量であり、NTP - 1及び/またはNTP - 4は、反応混合物中にNTP - 2及びNTP - 3未満の濃度またはそれより高い濃度で存在する。他の実施形態では、NDPまたはヌクレオチド類似体は、NTP - 1、NTP - 2、NTP - 3、及びNTP - 4よりも高い濃度で反応混合物中に存在し、NTP - 1、NTP - 2、NTP - 3、及びNTP - 4はそれぞれ互いに異なる量で存在する。

30

【0080】

いくつかの実施形態では、反応混合物中の過剰のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の上限は、溶解度の限界によって支配される。

【0081】

いくつかの実施形態では、NTPは、塩NTPである。例えば、NTPは、アンモニウムNTP、トリスNTP、リチウムNTP、カリウムNTP、またはナトリウムNTPであってもよい。

40

【0082】

本発明の一実施形態では、IVT法は、反応混合物へのNTPとNDPの組み合わせの添加を含み得る。NTPとNDPを組み合わせる反応混合物に過剰に添加してもよい。NTPとNDPの組み合わせの過剰とは、反応混合物中の他のNTPのうちの少なくとも1つまたは他の全てのNTPのうちの1つ以上の量よりも大きい量である。例えば、過剰のNTP及びNDPは、反応混合物中の他のNTPの少なくとも1つの量よりも多い量である合計量であってもよい。

【0083】

50

したがって、いくつかの実施形態では、I V T反応は、そのヌクレオチドの総量がその反応中に過剰に存在する限り、対応するヌクレオチド三リン酸と組み合わせて使用される場合、他のヌクレオチド三リン酸の少なくとも1つに対して等モル量のヌクレオチド三リン酸を含んでも、または過剰に満たないヌクレオチド三リン酸を含んでもよい。対応するヌクレオチド三リン酸は、ヌクレオチド三リン酸と同じ塩基を有するヌクレオチド三リン酸を指す。例えば、ヌクレオチド三リン酸はG T Pであってもよく、そしてヌクレオチド三リン酸はG D Pであってもよい。

#### 【0084】

いくつかの実施形態では、N T PとN D Pは組み合わせて等モルである。別の実施形態では、N T Pの量は、反応混合物に添加された組み合わせ中のN D Pの量よりも多い。N D Pの量は、反応混合物に添加される組み合わせ中のN T Pの量よりも多くてもよい。いくつかの実施形態では、過剰のN T PとN D Pの組み合わせ混合物は、反応混合物中の他の個々のN T Pの量よりも2倍または倍(×)、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、11×、12×、13×、14×、15×、15×~100×、10×~90×、10×~80×、10×~70×、またはそれよりもさらに大きい。各実施形態では、他の個々のN T Pは、反応混合物中に同じ(等モル)で存在しても、または異なる量で存在してもよい。本明細書に記載の倍数差は、反応混合物中の他のN T Pの少なくとも1つ、少なくとも2つまたは3つ全てとの比較を指す。

#### 【0085】

他の実施形態では、N T Pは、反応混合物中のN D Pの量よりも2倍または倍(×)、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、11×、12×、13×、14×、15×、15×~100×、10×~90×、10×~80×、10×~70×またはさらにそれ以上である。さらに他の実施形態では、N D Pは、反応混合物中のN T Pの量よりも2倍または倍(×)、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、11×、12×、13×、14×、15×、15×~100×、10×~90×、10×~80×、10×~70×、またはさらにそれより大きい。

#### 【0086】

本明細書に記載の各実施形態では、N T P及びN D Pは、例えば、それぞれG T P及びG D Pであり得、混合物中に少なくとも6倍または倍(×)、7×、8×、9×、10×、11×、12×、13×、14×、15×、15×~100×、10×~90×、10×~80×、10×~70×の濃度で、または反応混合物中のA T P、C T P、またはU T Pのいずれか1つの量よりさらに多い量で存在し得る。例示的な実施形態では、N T PとN D Pとの組み合わせは、反応混合物中の他の個々のN T Pに対してモル過剰である。例えば、N T PとN D Pの組合せ混合物は、反応混合物中に、例えば2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、またはそれを超えるモル比で添加されてもよい。G T P及びG D P対他のN T Pの比は、約2:1~約3:1、約2.5:1~約3.5:1、約3:1~約4:1、約3.5:1~約4.5:1、約4:1~約5:1、約4.5:1~約5.5:1、及び約5:1~約6:1であってもよい。一実施形態では、G T Pの濃度対A T P、C T P、及びU T Pの濃度の比は、それぞれ3:1、6:1、及び6:1であってもよい。

#### 【0087】

他の実施形態では、N T P対N D Pの比、及びいくつかの実施形態では、G T P対G D Pは、反応混合物中のプリンヌクレオチド対ピリミジンヌクレオチドの比(P u:P y)と比較して考慮される。いくつかの実施形態では、G T P:G D P対P u:P yの比は、反応混合物中で2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1以上である。

#### 【0088】

いくつかの実施形態では、緩衝液はリン酸塩を含む。リン酸塩の有効濃度は、少なくとも150 mM、少なくとも160 mM、少なくとも170 mM、少なくとも180 mM、

10

20

30

40

50

少なくとも 190 mM、少なくとも 200 mM、少なくとも 210 mM、少なくとも 220 mM、または少なくとも 230 mM のリン酸塩である。一実施形態では、リン酸塩の有効濃度は 180 mM である。別の実施形態では、リン酸塩の有効濃度は 195 mM である。

#### 【0089】

別の実施形態では、緩衝剤はマグネシウムを含む。この緩衝液は、少なくとも 1.0、少なくとも 1.1、少なくとも 1.2、少なくとも 1.25、少なくとも 1.3、少なくとも 1.4、少なくとも 1.5、少なくとも 1.6、少なくとも 1.7、少なくとも 1.75、少なくとも 1.8、及び少なくとも 1.85 または 3 という  $Mg^{2+}$  のモル濃度に対する ATP + CTP + UTP + GTP 及び任意選択的に GDP の濃度の比を有してもよい。他の実施形態では、この比は 1.0、1.1、1.2、1.25、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.75、1.8、1.85、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 もしくは 3 またはこれらの変数の任意の範囲である。一実施形態では、この比は 1.5 である。別の実施形態では、上記モル比は、1.88 である。一実施形態では、この比は 3 である。

10

#### 【0090】

本発明の例示的な態様では、IVT 反応（反応混合物）は、RNA ポリメラーゼ、例えば T7、SP6、T3 などを含む。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ、例えば T7 ポリメラーゼは、5 U /  $\mu$ l 超、10 U /  $\mu$ l 超、20 U /  $\mu$ l 超、50 U /  $\mu$ l 超、または 100 U /  $\mu$ l 超の濃度で含まれる。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ、例えば、T7 ポリメラーゼの濃度は、反応混合物 1  $\mu$ l あたり約 1 ~ 約 250 U、例えば、約 1 ~ 約 100 U /  $\mu$ l、または約 100 ~ 約 250 U /  $\mu$ l の範囲である。いくつかの実施形態では、T7 ポリメラーゼ濃度は、約 30 ~ 約 60 U /  $\mu$ l、約 60 ~ 約 80 U /  $\mu$ l、約 80 ~ 約 100 U /  $\mu$ l、約 100 ~ 約 150 U /  $\mu$ l、または約 150 ~ 約 200 U /  $\mu$ l の範囲である。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ、例えば T7 ポリメラーゼは、7、14、25、50、75、または 140 の濃度で含まれる。

20

#### 【0091】

本明細書中で使用される場合、DNA 鋳型とは、RNA ポリメラーゼのためのポリヌクレオチド鋳型を指す。本明細書に記載の方法に従って有用な DNA 鋳型は、いくつかの実施形態では、例えば目的のポリペプチドをコードする目的の遺伝子を含む。いくつかの実施形態における DNA 鋳型は、RNA ポリメラーゼプロモーター、例えば、目的の遺伝子の 5' 側に位置し、かつ作動可能に連結された T7 プロモーター、及び任意選択的に、目的の遺伝子の 3' に位置するポリ A テールをコードする配列を含む。

30

#### 【0092】

当該分野で公知の RNA ポリメラーゼは、本発明の方法において使用され得る。RNA ポリメラーゼとしては、限定するものではないが、ファージ RNA ポリメラーゼ、例えば T7 RNA ポリメラーゼ、T3 RNA ポリメラーゼ、SP6 RNA ポリメラーゼ、及び / または突然変異型ポリメラーゼ、例えば、限定するものではないが、修飾型核酸を取り込むことができるポリメラーゼが挙げられる。非限定的な例として、RNA ポリメラーゼは、未修飾の RNA ポリメラーゼと比較して、2' 修飾ヌクレオチド三リン酸を取り込む能力の増大を示すように修飾されてもよい。

40

#### 【0093】

本明細書中で使用される場合、「目的の遺伝子」とは、目的のポリペプチドまたはタンパク質をコードするポリヌクレオチドをいう。文脈次第で、目的の遺伝子とは、デオキシリボ核酸、例えば、RNA 転写物に転写され得る DNA 鋳型中の目的の遺伝子、またはリボ核酸、例えば、RNA 転写物中の目的の遺伝子（インビトロ、インビボ、インサイチュまたはエキソビボで、コードされた目的のポリペプチドを生成するために翻訳され得る）を指す。目的のポリペプチドとしては、限定するものではないが、生物製剤、抗体、ワクチン、治療用タンパク質またはペプチドなどが挙げられる。

#### 【0094】

50

「RNA転写物」とは、DNA鋳型及びRNAポリメラーゼを用いたIVT反応によって産生されたりボ核酸を指す。いくつかの実施形態では、RNA転写物は、mRNAであり、典型的には目的の遺伝子のコード配列及びポリAテールを含む。RNA転写物は、mRNAを含む。RNA転写物は修飾、例えば修飾ヌクレオチドを含んでもよい。本明細書中で使用される場合、RNA転写物という用語は、mRNA、修飾mRNA「mmRNA」または修飾mRNA、及び一次構築物を含み、それらと交換可能である。

#### 【0095】

##### 純度

本発明の方法に従って製造されたRNAは、驚くほど純粋でありそして完全性が高い。それは伝統的なIVT法に従って製造されたRNA調製物よりも混入物が少ない。いくつかの実施形態では、それは伝統的なIVT方法に従って製造されたRNA調製物よりも免疫刺激混入物が少ない。この混入物は、所望のRNA以外の反応によって生成されたRNA断片である。いくつかの実施形態では、RNA断片混入物は、逆相補体転写産物及び/またはサイトカイン誘導性RNA混入物である。他の実施形態では、RNA断片混入物は、二本鎖RNAまたは免疫原性混入物である。

#### 【0096】

いくつかの実施形態における本発明のRNA調製物は、伝統的なIVT法に従って製造されたRNA調製物よりも混入物が少ない。いくつかの実施形態では、本発明のRNA調製物は、伝統的なIVT方法に従って生成されたRNA調製物よりも少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%混入物が少ない。他の実施形態では、本発明のRNA調製物は、混入物を実質的に含まない。他の実施形態では、本発明のRNA調製物は混入物を100%含まない。

#### 【0097】

したがって、いくつかの態様における本発明は、さらなる精製ステップを必要とせずに、逆相補体転写産物を実質的に含まないIVT RNAの調製を含む。本明細書中で使用される場合、「逆相補体転写産物」という用語は、RNA鋳型転写から生じるRNA分子をいう。逆相補体転写産物は、いくつかの実施形態では、RNA鋳型転写産物であってもよい。理論に拘束されるものではないが、逆相補体産物は、主にまたは全てRNA鋳型転写産物であると考えられる。逆相補体産物がDNA鋳型転写産物から構成される場合、その産物は、例えばDNA鋳型由来のT7プロモーター領域に相補的なヌクレオチド配列を含むであろう。今日までに特徴付けられている逆相補体産物は、例えばT7プロモーター領域に相補的な配列を主には含まない。いくつかの実施形態では、逆相補体転写産物は、二本鎖RNA(dsRNA)であり、これはIVT RNAの少なくとも一部の逆相補体である配列をコードする一本鎖を含み得る。他の実施形態では、逆転写相補体産物は、ポリU配列を含む一本鎖を有するdsRNAであってもよい。目的のポリペプチドをコードする逆相補鎖またはポリU配列をコードする鎖のいずれもが、5'三リン酸(5'ppp)で開始し得る。RNA鋳型転写産物は、IVT RNAの5'末端の逆相補体か、及び/またはIVT RNAの3'末端の逆相補体を含んでもよい。さらに、IVT RNAの5'末端の逆相補体は、IVT RNAの5'UTRの全部または一部に相補的である場合がある。逆相補体は、5'UTRの最初の10~15個、最初の5~15個、最初の5~20個、最初の10~20個、最初の15~25個のヌクレオチドに相補的な配列を含んでもよい。同様に、IVT RNAの3'末端の逆相補体は、IVT RNAのポリAテールの全部または一部に相補的であってもよい。逆相補体転写産物は、RNA上のどこからでも鋳型化され得、したがって鋳型上で任意のサイズであっても、または任意の位置に相補的であってもよい。例えば、逆相補体生成物は、5mer、10mer、15mer、20mer、25mer、40mer、50mer、60mer、70mer、100mer、200merなど、最大で意図される生成物の全長か、または所望の生成物の全長までであり得る。

## 【0098】

本発明は、I V T RNA及び実質的に逆相補体転写産物を含まない薬学的に許容される賦形剤を含む組成物を特徴とする。いくつかの実施形態では、I V Tにおいて、逆相補体転写産物を実質的に含まないRNAは、総RNAの質量の約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、または0.55%、0.5%、0.45%、0.4%、0.35%、0.3%、0.025%、0.2%、0.15%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、または0.001%未満を構成する逆相補体転写産物を含む。RNA組成物の質量は、当該分野で公知の任意の手段によって決定され得る。RNAの質量を決定するための方法の例としては、液体クロマトグラフィー及び質量分析が挙げられる。

10

## 【0099】

理論に拘束されるものではないが、本発明のいくつかの実施形態では、混入物は、より長いRNAの状況において二本鎖構造を形成するI V T RNAの集団に結合した一本鎖逆相補体であると考えられる。T7は、アポータイプ(センス鎖)新生RNAならびに全長産物新生RNAを鋳型にしてもよい。RNA鋳型転写物(アンチセンス)は、一度転写されると(主にpppC、pppU、及びpppAで開始される)、おそらく新生センスRNAと会合したままである。あるいは、そのような構築物が形成するならば、それらは本質的にサイレントであってもよい。2本鎖の結合は、効果的には5' pppを有するdsRNAである。1本以上のハイブリダイズした鎖に5' pppが存在することによって、構造は免疫刺激性になる。アンチセンスRNA鋳型転写物がRNAから解離されるときでさえ、pppC、pppU、及びpppAを有するssRNAの存在は、依然としてサイトカイン誘導性である。本発明の方法は、J2 ELISA及びRNase III処理において見られるようにdsRNAを欠くRNAを生成するので、この産物は大きな全長RNAの構造をとらないであろう。等モルまたは本発明のI V Tプロセスで転写された場合、RNAは同様に折り畳まれていると思われる。

20

## 【0100】

いくつかの実施形態では、本発明のRNA調製物は、サイトカイン誘導性のRNA混入物を実質的に含まない。本明細書中で使用される場合、「サイトカイン誘導性混入物」という用語は、例えば、細胞ベースのサイトカイン誘導アッセイにおいて決定されるように、例えば、本明細書の実施例に記載されるような、BJ線維芽細胞/IFNアッセイ及び/またはLuminoxアッセイにおいて決定されるように、サイトカイン生成を誘導するRNA分子、例えばI型インターフェロン(IFN / 誘導)を指す。本発明の例示的な態様では、「サイトカイン誘導」混入物という用語は、サイトカイン誘導を誘導し、そして本質的に実質的に二本鎖であるRNA分子を指す。

30

## 【0101】

理論に縛られることなく、異常なポリメラーゼ転写、例えばI V T反応で生成される所望のRNAから鋳型が取られた転写から生じる二本鎖RNA分子は、天然の抗ウイルス免疫応答と似た自然免疫応答の活性化を介してサイトカインを誘導すると考えられ、これには、2種類の病原体認識受容体(PRR): トール様受容体(TLR)及びRIG-I様受容体(RLR)、例えばトール様受容体3(TLR3)、ならびにRNAヘリカーゼ、例えばRIG-I及びMDA5が挙げられる。他のサイトカイン誘導分子の例としては、RNase III基質が挙げられる。本明細書で使用されるRNase III基質とは、RNase III酵素による切断を受けやすい二本鎖RNA分子を指す。

40

## 【0102】

いくつかの実施形態では、サイトカイン誘導性RNA混入物は、I V T RNAに相補的な逆配列またはポリU配列を有する二本鎖RNAであってもよい。I V T RNAの逆相補体またはポリU配列は5' pppで始まる場合がある。

## 【0103】

サイトカイン誘導性RNA混入物は、I V T RNAの5'末端の逆相補体を含んでも

50

よいし、及び／または I V T RNA の 3' 末端の逆相補体を含んでもよい。さらに、I V T RNA の 5' 末端の逆相補体は、I V T RNA の 5' U T R の全部または一部に相補的であり得る。逆相補体は、5' U T R の最初の 10 ~ 15 個、最初の 5 ~ 15 個、最初の 5 ~ 20 個、最初の 10 ~ 20 個、最初の 15 ~ 25 個のヌクレオチドに相補的な配列を含み得る。いくつかの実施形態では、逆相補体は、5' U T R 以内で 1 ~ 20、1 ~ 30、1 ~ 40、1 ~ 50、1 ~ 60、1 ~ 70、1 ~ 80、1 ~ 90、1 ~ 100、1 ~ 200、1 ~ 300、1 ~ 400、1 ~ 500、1 ~ 600、1 ~ 700、1 ~ 800、1 ~ 900、1 ~ 1000、1 ~ 2000、1 ~ 2500、または 1 ~ 3000 ヌクレオチド長の範囲に相補的な配列を含んでもよい。他の実施形態では、逆相補体は、5' U T R 内で、10 ~ 20、10 ~ 30、10 ~ 40、10 ~ 50、1 ~ 60、10 ~ 70、10 ~ 80、10 ~ 90、10 ~ 100、10 ~ 200、10 ~ 300、10 ~ 400、10 ~ 500、10 ~ 600、10 ~ 700、10 ~ 800、10 ~ 900、10 ~ 1000、10 ~ 2000、10 ~ 2500、または 10 ~ 3000 ヌクレオチド長の範囲に相補的な配列を含んでもよい。他の実施形態では、逆相補体は、5' U T R 内で 20 ~ 25、20 ~ 30、20 ~ 40、20 ~ 50、20 ~ 60、20 ~ 70、20 ~ 80、20 ~ 90、20 ~ 100、20 ~ 200、20 ~ 300、20 ~ 400、20 ~ 500、20 ~ 600、20 ~ 700、20 ~ 800、20 ~ 900、20 ~ 1000、20 ~ 2000、20 ~ 2500、または 20 ~ 3000 ヌクレオチド長の範囲に相補的な配列を含んでもよい。同様に、I V T RNA の 3' 末端の逆相補体は、I V T RNA のポリ A テールの全部または一部に相補的である場合がある。逆相補体は、3' U T R の最初の 10 ~ 15 個、最初の 5 ~ 15 個、最初の 5 ~ 20 個、最初の 10 ~ 20 個、最初の 15 ~ 25 個のヌクレオチドに相補的な配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、逆相補体は、3' U T R 内の 1 ~ 20、1 ~ 30、1 ~ 40、1 ~ 50、1 ~ 60、1 ~ 70、1 ~ 80、1 ~ 90、1 ~ 100、1 ~ 200、1 ~ 300、1 ~ 400、1 ~ 500、1 ~ 600、1 ~ 700、1 ~ 800、1 ~ 900、1 ~ 1000、1 ~ 2000、1 ~ 2500、1 ~ 3000、または 1 から全長または最大サイズの RNA ヌクレオチド長という範囲に相補的な配列を含んでもよい。他の実施形態では、逆相補体は、3' U T R 内の 10 ~ 20、10 ~ 30、10 ~ 40、10 ~ 50、1 ~ 60、10 ~ 70、10 ~ 80、10 ~ 90、10 ~ 100、10 ~ 200、10 ~ 300、10 ~ 400、10 ~ 500、10 ~ 600、10 ~ 700、10 ~ 800、10 ~ 900、10 ~ 1000、10 ~ 2000、10 ~ 2500、または 10 ~ 3000 ヌクレオチド長の範囲に相補的な配列を含んでもよい。他の実施形態では、逆相補体は、3' U T R 内の 20 ~ 25、20 ~ 30、20 ~ 40、20 ~ 50、20 ~ 60、20 ~ 70、20 ~ 80、20 ~ 90、20 ~ 100、20 ~ 200、20 ~ 300、20 ~ 400、20 ~ 500、20 ~ 600、20 ~ 700、20 ~ 800、20 ~ 900、20 ~ 1000、20 ~ 2000、20 ~ 2500、または 20 ~ 3000 ヌクレオチド長の範囲に相補的な配列を含んでもよい。

#### 【0104】

本開示は、I V T RNA と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、サイトカイン誘導性 RNA 混入物を実質的に含まない組成物を包含する。いくつかの実施形態では、サイトカイン誘導性 RNA 混入物は、RNA の量の 0.5%、0.45%、0.4%、0.35%、0.3%、0.25%、0.2%、0.15%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005% または 0.001% 未満を構成する。RNA 組成物の質量は、当該分野で公知の任意の手段によって決定され得る。例としては、液体クロマトグラフィー及び質量分析法が挙げられる。

#### 【0105】

サイトカイン誘導性 RNA 混入物及び／または逆相補体転写産物などの混入物の ds RNA は、20 ~ 50 ヌクレオチド長であってもよい。他の実施形態では、ds RNA は、20 ~ 25、25 ~ 30、30 ~ 35、35 ~ 40、40 ~ 45、45 ~ 50、50 ~ 55、55 ~ 60、60 ~ 65、65 ~ 70、70 ~ 75、75 ~ 80、80 ~ 85、85

～ 90、90～95、95～100、100～110、110～120、120～130、130～140、140～150、150～160、160～170、170～180、180～190、190～200、200～225、225～250、250～275、275～300、300～325、325～350、350～375、375～400、400～425、425～450、450～475、475～500、500～550、550～600、600～650、650～700、700～750、750～800、800～850、850～900、900～950、及び950～1000ヌクレオチド長であってもよい。いくつかの実施形態では、dsRNAの質量は、40塩基対より大きく、RNA組成物の約0.5%未満を構成する。

#### 【0106】

混入物鎖は5' ppp端部を有する場合がある。いくつかの実施形態では、混入物鎖は、等モルのプロセス産生RNAと比較して、より低量のpppA、pppC、及びpppUを有し得る。別の実施形態では、混入物鎖は、等モルプロセスと比較して、より低い比のpppA：pppG、pppC：pppG、及び/またはpppU：pppGを有し得る。pppNTPは、全ヌクレアーゼ消化、例えば、ヌクレアーゼP1処理後にLC-MSによって検出してもよい。ヌクレアーゼP1は、RNA及びDNAを単一のヌクレオチドに消化する。存在すべき唯一の三リン酸種は、開始ヌクレオチドに対するものである。RNA鋳型転写産物が形成されない場合は、5' PPPGが開始の唯一の標的部位であるため、存在するはずの唯一の三リン酸である。Nuclease P1消化後にLC/MSで検出された5' pppA、5' pppC、及び/または5' pppUの存在及び量は、RNA鋳型RNA転写産物を示す。

#### 【0107】

不純物、特に二本鎖不純物が少ないことに加えて、IVT RNA組成物は、特に精製ステップ、例えば、逆相クロマトグラフィーまたはRNAse III処理と組み合わせたIVT法を用いて生成された従来の精製RNA組成物と比較した場合、組成物中の他のRNA種に対して高い割合の全長機能的RNA転写物を有する。いくつかの実施形態では、RNAの質量の約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または99.8%超が、一本鎖全長転写物を含む。一本鎖全長転写物に加えて、IVT RNA組成物は、アポータティブ転写物を含む、センス配向の一本鎖部分RNA転写物のような他の一本鎖RNA種を含んでもよい。しかしながら、IVT RNA組成物は、RNAse III非感受性断片を実質的に含まない。

#### 【0108】

本明細書に記載のRNA組成物は、全長RNA転写物以外の他の成分、例えば短縮型転写物及び/またはランオン(run-on)転写物を含んでもよい。例えば、RNAは、異なる長さの転写物、例えば、全長の転写物よりも短いまたは長い転写物を含んでもよい。したがって、いくつかの実施形態では、本発明のRNA調製物は、切断型及び/またはアポータティブ型転写物を含む。RNAポリメラーゼは、DNAプロモーターに結合し、そして短いmRNA転写物を合成する。本明細書中で使用される場合、「短縮された転写物」という用語は、IVT RNAに対して同一性を有するが、不十分な長さであり、かつ目的のポリペプチドをコードするために必要な全ての要素(例えば、ポリA)を欠く転写物を指す。特定の場合には、切断型転写物は、アポータティブ転写物と呼ばれる、転写複合体がプロモーターを離れる前に放出される。本明細書中で使用される場合、「アポータティブ転写物」という用語は、IVT RNAに対して同一性を有するが、不十分な長さであり、目的のポリペプチドをコードするのに必要な全ての要素(例えば、ポリA)を欠く、一般には、15ヌクレオチド以下の長さを有する転写物を指す。本発明の例示的な態様では、短縮型及び/またはアポータティブ型の転写物が存在し、サイトカイン誘導性ではない。ある実施形態では、短縮型及び/またはアポータティブ転写物は試料から除去される。いくつかの実施形態では、短縮された転写物は、100ヌクレオチド以下の長さを有する。

10

20

30

40

50

## 【0109】

本発明の方法はまた、本明細書において3'均一性または3'末端均一性の増大とも呼ばれる、3'不均一性または3'末端不均一性が低減された組成物を生成すると判断された。本発明者らは、伝統的な等モルのIVT反応条件が、異なる3'残基で終結する転写物（例えば、転写が一樣に終結していない）を生じ得ると判断した。実施例に記載されたアッセイは、伝統的なIVT反応（特定の試験転写物の3'末端で生じる非A核酸塩基間を識別するアッセイ）から生じる3'末端の不均一性を検出するために開発された。特に、本発明の方法は、より低い程度の3'末端不均一性（またはより均一な3'末端）を有する転写物を生成する。例えば、伝統的なIVT反応（例えば、等モル反応）に従って製造された転写物は、50%を超える（任意選択的に60%を超える、70%を超える、75%を超える、80%を超える）転写産物が異なる末端を有する組成物を生成し得るが、本発明のIVT反応（例えば、アルファ反応）に従って生成された転写物は、50%未満の転写物、すなわち50%を超える転写物が、（例えば、DNA鋳型に対して）同じ核酸塩基で同じ末端を有する、すなわち、終止する（任意選択的に、40%未満、30%未満、25%未満、20%未満またはそれ以下）が異なる末端を有する）組成物を生成することができる。

10

## 【0110】

一本鎖部分RNA転写物の集団内の短縮転写物は、ある範囲のサイズを含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、短縮転写産物の集団の少なくとも80%が、100ヌクレオチド以下の長さを有する。他の実施形態では、短縮転写産物の集団の少なくとも50%、60%、70%、85%、90%、95%、98%または100%が100ヌクレオチド以下の長さを有する。

20

## 【0111】

本明細書に記載のIVT RNA組成物内の一本鎖RNA集団は、典型的にはRNAse III非感受性断片を含まないか、または実質的に含まない。本明細書で使用される「RNAse III非感受性断片」とは、IVT RNAに対する同一性（センス配向）を有するが、不十分な長さであり、目的のポリペプチドをコードするのに必要な全ての要素を欠く（全長転写産物未満のヌクレオチドを有する）一本鎖転写産物であって、ここで、この断片が、酵素的、特にRNAse III切断によって生成されるものを指す。RNAse III非感受性断片の生成は、例えば、RNAse III消化と組み合わせた（図40に示されるような）伝統的なIVTプロセスを生じ得る。

30

## 【0112】

図40に示すように、従来のIVT/RNAse III精製プロセスの最初のステップは、 $Mg^{2+}$ 存在下での直鎖dsDNA鋳型、等モル濃度のNTP及びRNAポリメラーゼを利用した転写反応に関与する。この反応は、一本鎖切断型/アポータティブ転写物、全長RNA転写物、ランオン転写物、及び逆相補体不純物の混合集団を生成する。逆相補体不純物は、一本鎖RNAのいくつかまたは他の不純物、例えば、短縮転写物に結合して、二本鎖RNA及び/または二本鎖領域と一本鎖領域との両方を有するRNAを生成し得る。当該技術分野では、RNAse IIIを使用してIVT組成物から二本鎖RNAを分解し、それによってそれを組成物から効果的に除去することができると想定されてきた。しかし、RNAse IIIはまた、全長RNA転写物及び/またはランオン転写物の二本鎖領域（例えば、ポリAテール領域内の逆相補体の結合から生じる二本鎖領域）を分解し、全長RNA転写物より短い長さの一本鎖断片を残し得る。これらの一本鎖断片は、本明細書に記載のRNAse III非感受性断片である。このRNAse III分解の結果として、IVTプロセスの間に生成されたかなりの量の全長転写物が失われ、それにより生成物の完全性が著しく失われる。これらの組成物は、細胞または対象に送達されたときにタンパク質を発現する能力が有意に低い。

40

## 【0113】

図40に示す方法などの方法に従って生成された生成物のRNAse III処理後に生成されたRNAse III非感受性断片は、ある範囲のサイズを含み得る。例えば、

50



いくつかの実施形態では、アポータティブ転写産物の集団の少なくとも80%は、100ヌクレオチドを超える長さを有する。他の実施形態では、RNAse III非感受性断片の集団の少なくとも50%、60%、70%、85%、90%、95%、98%または100%が100ヌクレオチド超の長さを有する。

#### 【0114】

理論に拘束されるものではないが、特定の種または混入物、例えばdsRNA種または混入物の除去は、治療用途のためのIVT RNA組成物の調製において重要であると考えられる。対照的に、IVT RNA組成物中の残留短縮型転写物及び/またはアポータティブ転写物の存在は、必要であるとは考えられない；そのような種は、望ましくないサイトカイン及び/またはIVT RNAに対する自然免疫応答を誘発するとは考えられていない。他の実施形態では、本発明のRNA調製物は、短縮転写物またはアポータティブ転写物を実質的に含まない。

#### 【0115】

短縮型/アポータティブ転写物は、IVT RNA組成物または本発明に存在し得るが、組成物はRNAse IIIで処理されないので、RNAse III非感受性断片は、IVT RNA組成物には存在しない。短縮型転写物及びRNAse III非感受性断片は両方とも様々なサイズまたは長さを有するが、短縮型転写物の平均長は、RNAse

III非感受性断片の平均長より短い。したがって、組成物がセンス配向の一本鎖部分RNA転写物の集団を含む場合、センス配向の一本鎖部分RNA転写物の集団の80%超が100ヌクレオチド以下のヌクレオチド長を有する場合。いくつかの実施形態では、センス配向における一本鎖部分RNA転写物の集団の90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%超が、100ヌクレオチド以下のヌクレオチド長を有する。他の実施形態では、センス配向の一本鎖部分RNA転写物の集団の50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%、または88%超が100ヌクレオチド以下のヌクレオチド長を有する。

#### 【0116】

いくつかの実施形態では、RNA調製物は、薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物である。他の実施形態では、RNA調製物は、さらなる精製技術にまだ供されていない反応生成物（例えば、IVT反応生成物）である。RNA調製物は、RNAに加えて多数の他の成分を含み得る。しかしながら、この反応生成物は、逆相補体転写産物及び/またはサイトカイン誘導性RNA混入物を実質的に含まない。

#### 【0117】

##### アッセイ

逆相補体転写産物及び/またはサイトカイン誘導性RNA混入物を含む混入物の量は、当該分野で公知の方法によって決定され得る。核酸試料の純度を決定するための多くの方法が当該技術分野において公知である。例示的な方法としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：高速液体クロマトグラフィー（逆相クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなど）、ゲル電気泳動、ならびに核酸産生の品質及び純度を評価するための翻訳アッセイ。RNA調製物の品質はまた、Bioanalyzerチップベースの電気泳動システムを使用して決定されてもよい。インピトロの有効性は、例えば、RNA転写物をヒト細胞株（例えば、HeLA、PBMC、BJ線維芽細胞、Hek293）にトランスフェクトすることによって分析してもよい。目的のポリペプチドのタンパク質発現は、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ウエスタンブロット、またはフローサイトメトリーなどの方法を用いて定量してもよい。

#### 【0118】

dsRNA特異的抗体を用いてdsRNAを検出及び/または定量するために様々な方法が用いられてきた。これらとしては、ELISA、例えばサンドイッチELISA（Schonborn et al. (1991) Nucleic Acids Res 19:2993-3000）、ドットブロット（定量化、特異性試験用）（Kariko et al. (2011) Nucleic Acids Res 39:e142）、及

び免疫沈降ノイムノブロッティングが挙げられる。本発明の例示的な態様では、混入物は、E L I S Aを使用して認識され得る。K 1 / J 2またはK 2 / J 2アッセイは、試料中のd s R N A混入物の存在量を決定するために使用され得る。例示的なE L I S Aは、以下のようにサンドイッチE L I S Aである。ブロッキング：マイクロタイタープレート、4 で一晩、タンパク質、例えば、0 . 4  $\mu$  g / ウェルのプロテインAで予めコーティングする。遊離結合部位を、緩衝液（例えばP B S）中のウシ血清アルブミン（B S A）（例えば2 %）で飽和させ、次いでプレートを緩衝液（例えばP B S）で洗浄し、そして4 で保存する。d s R N A特異的J 2モノクローナル抗体（I g G 2 a）を、ハイブリドーマ上清（例えば、1 ウェルあたり1 0 0  $\mu$  l、4 で一晩）をインキュベートすることにより、プロテインA層に固定する。そのプレートを、緩衝液、例えば、P B Sに加えてT w e e n 2 0（例えば、0 . 5 %（v / v）T w e e n 2 0）で複数回洗浄し、及び核酸試料を緩衝液（例えば、T E 緩衝液、3 7 、2 時間）に添加する。上記のような洗浄後、結合した核酸（すなわち、J 2 抗原）を、d s R N A 特異的K 2 I g Mモノクローナル抗体、続いてアルカリホスファターゼコンジュゲート二次抗体（例えば、1 : 5 0 0 0 希釈ヤギ抗マウスI g M）の希釈ハイブリドーマ上清（例えば1 : 2）との連続インキュベーションによって特定する。両方のインキュベーションステップとも、3 7 で約1 ~ 2 時間行う。洗浄、基質のインキュベーション及び吸収の読み取りは、当技術分野で認められている方法に従って行う。

#### 【0 1 1 9】

ドットプロットを使用する同様のアッセイは、K a r i k o e t a l . , N u c . A c i d s R e s . 2 0 1 1 ; 3 9 ( 2 1 ) : e 1 4 2 に記載される。このアッセイは、R N A ( 2 0 0 n g ) を、超荷電N y t r a n 膜上にプロットし、そこでそれを乾燥させ、T B S - T 緩衝液（5 0 m M のトリス - H C l 、1 5 0 m M のN a C l 、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 、p H 7 . 4 ）中の5 % 脱脂粉乳でブロックすることによって行う。次いで、試料を、d s R N A 特異的K 1 またはJ 2 モノクローナル抗体（I g G）と共に1 時間インキュベートする。この膜は、T B S - T で洗浄し、例えば、H R P 結合抗ヤギポリクローナル抗体と共にインキュベートしてもよい。この膜を再び洗浄し、そしてシグナルを、T M B を用いて検出する。そのシグナルは、T M B を添加して発生させる。このアッセイは、長さが4 0 塩基対を超えるd s R N A 二本鎖を検出するのに有用である。

#### 【0 1 2 0】

サイトカインアッセイもまた、R N A 混入物を検出するために使用してもよい。多数のサイトカインアッセイが当該分野において公知である。このアッセイは、不純なI V T 生成物に関連する任意のサイトカインの誘導について試験し得る。これらのサイトカインとしては、例えば、インターロイキン（I L）、干渉（I F N）アルファ、ベータ、及びガンマ、ならびにT N F が挙げられる。一実施形態では、I F N - 細胞ベースのアッセイを使用してもよい。その結果は、L C - M S によって検出されたR N a s e I I I 基質の存在と相関することが示されている。例えば、I L または多重サイトカインアッセイなどの他の細胞ベースのサイトカインアッセイを使用してもよい。

#### 【0 1 2 1】

例示的なB J F I F N 及びh E P O 発現アッセイでは、B J 線維芽細胞（A T C C）を細胞培養プレートに播種する。播種の約2 4 時間後に、リポフェクタミンまたは他の送達剤を用いて細胞にm R N A をトランスフェクトする。トランスフェクション後、上清を回収し、I F N 発現は、製造業者の指示（P B L A s s a y S c i e n c e）に従ってヒトI F N E L I S A キット、H i g h S e n s i t i v i t y を用いて測定する。要するに、ヒトI F N - を、細胞上清中で間接的酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）により測定する。予めコーティングしたプレートを、細胞上清と共にインキュベートし、次いで洗浄して非特異的に結合した物質を除去する。ウェルを抗I F N - 抗体、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）にコンジュゲートした二次抗体と共にインキュベートすることによって、I F N - 発現を分析する。テトラメチルベンジジン（T M B）は、検出に使用されるH R P 基質である。ヒトE p o レベルは、E p o H

uman ELISA Kit (Thermo Fisher) を使用して測定される。  
【0122】

例示的な LumineX アッセイでは、LumineX スクリーニングアッセイ技術 (R & D Systems) を使用して、マウス由来の血清を収集してサイトカインレベルを評価する。要するに、分析物特異的抗体を、色分けされたビーズ上に予めコーティングする。ビーズ、標準物質、及び試料をウェル中にピペティングして、固定した抗体を目的の分析物に結合させる。未結合物質を洗い流した後、目的の分析物に特異的なビオチン化抗体カクテルを、各ウェルに加える。未結合ビオチン化抗体を除去するための洗浄の後、ビオチン化検出抗体に結合するストレプトアビジン - フィコエリトリンコンジュゲート (ストレプトアビジン - PE) を、各ウェルに添加する。最後の洗浄により未結合ストレプトアビジン - PE を除去し、ビーズを緩衝液に再懸濁し、LumineX アナライザー (R & D Systems) を用いて読み取る。第1のレーザーはビーズ特異的であり、どの分析物が検出されているかを決定する。第2のレーザーはPE由来のシグナルの大きさを決定し、それは結合した分析物の量に正比例する。

10

【0123】

純度のサロゲートアッセイ

本発明の例示的な態様では、生成物及び/または不純物の高度に定性的及び/または定量的な検出に適している代替アッセイの使用によって純度を決定することが望ましい場合がある。したがって、本発明は、同一の条件によって産生されたサロゲートRNA (例えば、モデルRNA) の純度を決定することによる、特定のIVT方法によって産生されたRNA組成物、例えばIVT RNAの純度の決定を企図している。このようにして、代替システムにおける高度に定性的及び/または定量的な検出方法を介して、間接的に純度を決定してもよく、この純度決定は、生成システムにおいて生成されるIVT RNAの純度に相関する。さらに、再構成または代替型アッセイを使用して、所与のRNA調製物中の混入物の量及び同一性を間接的に決定してもよい。ある場合には、低レベルの混入物またはRNA転写物と類似の構造特性を有する混入物を検出することは困難である場合がある。再構成系を用いて、伝統的なIVT法によって生成されたRNA組成物による生物学的活性と比較して、本発明のRNA調製物から欠けている推定混入物を加えることによって、免疫刺激活性、例えば、混入物に関連するサイトカイン活性などの生物学的活性を試験してもよい。本発明の純粋なRNA調製物と推定上の混入物との再構成は、純粋なRNA調製物中に混入物がないことを実証し得る。

20

30

【0124】

さらに、モデルRNA (サロゲートmRNA) を使用してもよい。IVT RNAを生成するために使用されたのと同じIVT条件下で、モデルRNAをコードするDNA鋳型からモデルRNAが生成される。本明細書で使用されるモデルRNAまたはサロゲートmRNAは、5' UTR、3' UTR、及びポリAテールのみからなる非コードRNA転写物を指す。ショートモデルRNAもまた使用されてもよい。ショートモデルRNAは、モデルRNAのより短いバージョンである (5' UTRと、より短いポリAテール (A20) のみで構成されている)。モデルRNAの量は組成物中の逆相補体転写産物またはサイトカイン誘導種の量を示すので、組成物中の逆相補体転写産物またはサイトカイン誘導種の量は、LC-MSまたは他の分析方法によって決定される。アッセイで検出された混入物の量及び性質は、全長mRNAを生成するために同一のIVT反応条件を用いて得られるであろう混入物の量及び性質と相関しており、これを予測する。

40

【0125】

本発明のRNA調製物は高品質の調製物である。いくつかの実施形態では、IVTプロセスから直接得られるRNA調製物は、さらなる精製なしに研究用試薬または診断用もしくは治療用試薬として直接使用され得る。いくつかの実施形態では、RNA調製物は、1つ以上の精製ステップに供され得る。例えば、RNA調製物は、オリゴdTクロマトグラフィーを用いて短縮型RNA、DNA鋳型、及び残留酵素から精製してもよい。例示的なオリゴdTクロマトグラフィーアッセイは、固相抽出真空マニホールド上の5 mLのSP

50

Eカラムに20merのポリチミジンセファロース(3ml)を充填することを包含する。RNA転写物をカラムに加え、続いて洗浄及び溶出する。オリゴdT精製RNA転写物を、水中に透析濾過し、100kDa MWCO Amiconスピンフィルター(EMD Millipore)を使用して1.22mg/mlに濃縮する。このRNAを回収し、その濃度をBioanalyzerゲル電気泳動を用いて決定してもよい。

【0126】

試料の純度及び品質を決定するためのRNA調製物の分析は、キャッピングの前または後に実施してもよい。あるいは、分析は、ポリA捕捉に基づくアフィニティー精製の前に行っても、または後に行ってもよい。別の実施形態では、分析は、任意選択の追加の精製ステップ、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーなどの前または後に行ってもよい。

10

【0127】

質量分析は、混合物中の化合物を同定し、特徴付けるための広範囲の技術を包含する。試料を分析してその組成を決定するために、異なる種類の質量分析に基づくアプローチを使用してもよい。質量分析法は、イオン化プロセスによって、分析されている試料を複数のイオンに変換することを包含する。得られた各イオンは、力場に置かれると、その加速がその質量電荷比に反比例するように軌道に沿ってその力場内を移動する。このようにして分子の質量スペクトルが生成され、これは前駆イオンの相対量対それらの質量電荷比のプロットを表示する。タンデム質量分析などの質量分析の次の段階が、前駆イオンをより高いエネルギーにさらすことによって試料をさらに分析するために使用されるとき、各前駆イオンは、生成物イオンと呼ばれる断片への解離を受ける場合がある。得られた断片は、それらの前駆体分子の性質及び構造に関する情報を提供するために使用され得る。

20

【0128】

MALDI-TOF(マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間)質量分析法は、光吸収材料のマトリックスにそれらを埋め込んでその分子の重量を、それがイオン化され、揮発によって飛行するようになるにつれて測定することによって、低揮発性の低イオン化分析物または容易に断片化される分析物の質量の分光測定を提供する。電場と磁場の組み合わせを試料に印加して、分子の個々の質量及び電荷に応じてイオン化材料を移動させる。Kosterらに発行された米国特許第6,043,031号は、MALDI-TOF及び他の質量分析法を用いて、DNA内の一塩基変異を同定するための例示的な方法を記載している。

30

【0129】

HPLC(高速液体クロマトグラフィー)は、バイオポリマーの特性に基づいて、バイオポリマーの分析的分離に使用される。HPLCを使用して、サイズ電荷及び塩基組成に基づいて核酸配列を分離してもよい。別の核酸と1塩基対の差がある核酸配列が、HPLCを用いて分離され得る。したがって、単一のヌクレオチドを除いて同一である核酸試料は、特定の核酸断片の存在または非存在を同定するために、HPLCを用いて示差的に分離され得る。好ましくは、HPLCは、HPLC-UVである。

【0130】

いくつかの実施形態では、RNAは、dsRNaseステップを使用せずに精製され得る。例えば、RNaseIIIが使用されないことがある。組成物は、逆相クロマトグラフィー精製ステップを使用しないプロセスによって生成してもよい。一実施形態では、RNA組成物は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)精製を使用することなく生成され得る。従って、この組成物は、伝統的な精製プロセスと関連する残留有機試薬または混入物を含まない。

40

【0131】

場合によっては、本発明の方法は、RNA試料の純度を決定するために使用される。本明細書で使用される「純粋な」という用語は、無関係の核酸の存在が低減または排除される、すなわち、RNA断片を含む不純物または混入物が低減または排除されるような標的核酸活性剤のみを有する材料を指す。例えば、精製されたRNA試料は、1つ以上の標的または試験核酸を含むが、記載された方法によって検出可能な他の核酸を実質的に含まな

50

いことが好ましい。本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」という用語は、材料の分析試験の文脈において操作上使用される。好ましくは、精製された材料は、本明細書に記載の逆相補体転写産物及び／またはサイトカイン誘導性RNA混入物を含む1つ以上の不純物または混入物を実質的に含まず、例えば、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、または97%の純度である；より好ましくは少なくとも98%純粋、そしてさらにより好ましくは少なくとも99%純粋である。いくつかの実施形態では、純粋なRNA試料は、100%の標的または試験RNAからなり、他のRNAを含まない。

#### 【0132】

いくつかの実施形態では、キャピラリー電気泳動(CE)を用いてRNAを分離する。試料が水性緩衝液などの電解質溶液を通して毛细管を介して目的のバイアルに流れるように、試料に電場を印加する。この分析物は、電気泳動移動度に基づいて示差的に移動し、そしてキャピラリーの出口端で検出される。出力データが記録され、その後エレクトロフェログラムとして表示される。試料成分の同一性を決定するために、これを質量分析と組み合わせ使用してもよい。キャピラリー電気泳動システムは、3つ程度の小さい塩基対の差を検出し得る、FRAGMENT ANALYZER(商標)で完全に自動化されている。

10

#### 【0133】

いくつかの実施形態では、フラグメントアナライザー(FA)を用いてRNAを定量及び精製してもよい。フラグメントアナライザーはキャピラリー電気泳動及びHPLCを自動化する。

20

#### 【0134】

いくつかの実施形態では、RNA分子は、mRNA分子である。本明細書中で使用される場合、「メッセンジャーRNA」(mRNA)という用語は、少なくとも1つの目的のペプチドまたはポリペプチドをコードし、インビトロ、インビボ、インサイチュまたはエキソビボで、コードされた目的のペプチドポリペプチドを生成するために翻訳され得る任意のポリヌクレオチドを指す。mRNAは、RNAポリメラーゼ酵素によってDNA配列から転写され、そしてリボソームと相互作用して、DNAによってコードされる遺伝情報を合成する。一般に、mRNAは、2つのサブクラスに分類される：プレmRNA及び成熟mRNA。前駆体mRNA(プレmRNA)は、RNAポリメラーゼによって転写されたが、いかなる転写後プロセッシング(例えば、5'キャッピング、スプライシング、編集、及びポリアダニル化)も受けていないmRNAである。成熟mRNAは、転写後プロセッシング(例えば、イントロンを除去するためにスプライスされそしてポリアダニル化される)を介して修飾されており、そしてリボソームと相互作用してタンパク質合成を行い得る。mRNAは、様々な方法によって組織または細胞から単離してもよい。例えば、全RNA抽出を、細胞または細胞溶解物に対して実施してもよく、得られた抽出全RNAを(例えば、オリゴdTビーズを含むカラム上で)精製して抽出mRNAを得てもよい。

30

#### 【0135】

あるいは、mRNAは、例えばインビトロ転写(IVT)によって、無細胞環境で合成してもよい。本明細書で使用される場合「インビトロ転写鑄型」とは、メッセンジャーRNA(mRNA)の生成のためのIVT反応での使用に適したデオキシリボ核酸(DNA)を指す。いくつかの実施形態では、IVT鑄型は、5'非翻訳領域をコードし、オープンリーディングフレームを含み、そして3'非翻訳領域及びポリAテールをコードする。IVT鑄型の特定のヌクレオチド配列組成及び長さは、その鑄型によってコードされる目的のmRNAに依存するであろう。

40

#### 【0136】

「5'非翻訳領域(UTR)」とは、タンパク質もペプチドもコードしない開始コドン(すなわち、リボソームによって翻訳されるmRNA転写物の最初のコドン)からすぐ上流(すなわち、5')にあるmRNAの領域を指す。

#### 【0137】

50

「3' 非翻訳領域 (UTR)」とは、タンパク質もペプチドもコードしない、終止コドン (すなわち、翻訳の終結をシグナル伝達する mRNA 転写物のコドン) のすぐ下流 (すなわち、3') である mRNA の領域を指す。

#### 【0138】

「オープンリーディングフレーム」とは、開始コドン (例えば、メチオニン (ATG)) で始まり、終止コドン (例えば、TAA、TAG または TGA) で終わり、タンパク質またはペプチドをコードする、一続きの連続的な DNA である。

#### 【0139】

「ポリA テール」とは、複数の連続したアデノシンーリン酸を含有する 3' UTR から下流、例えばすぐ下流 (すなわち 3') である mRNA の領域である。ポリA テールは、10 ~ 300 個のアデノシンーリン酸を含んでもよい。例えば、ポリA テールは、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、350、400、450、500、550、または 600 のアデノシンーリン酸を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ポリA テールは、50 ~ 250 個のアデノシンーリン酸を含む。関連する生物学的設定 (例えば、細胞内、インビボなど) では、ポリ (A) テールは、例えば、細胞質内で、酵素分解から mRNA を保護するように機能し、ならびに転写終結、核からの mRNA の輸送、及び翻訳を補助する。

#### 【0140】

したがって、いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、(a) 目的のポリペプチドをコードする連結ヌクレオチドの第1の領域；(b) 5' 非翻訳領域 (UTR) を含む、上記第1の領域に対して5' に位置する第1の末端領域；(c) 上記第1の領域に対して3' に位置する第2の末端領域；及び (d) テーリング領域を含む。ポリヌクレオチド及び核酸という用語は、本明細書では互換的に使用される。

#### 【0141】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、約1 ~ 約3,000、10 ~ 約3,000、20 ~ 約3,000、30 ~ 約3,000、40 ~ 約3,000、50 ~ 約3,000、100 ~ 約3,000、200 ~ 約3,000 ヌクレオチド (例えば、200 ~ 500、200 ~ 1,000、200 ~ 1,500、200 ~ 3,000、500 ~ 1,000、500 ~ 1,500、500 ~ 2,000、500 ~ 3,000、1000 ~ 1,500、1,000 ~ 2,000、1,000 ~ 3,000、1,500 ~ 3,000、及び2,000 ~ 3,000) を含む。

#### 【0142】

IVT RNA は RNA として機能し得るが、それらの機能的及び/または構造的設計の特徴において野生型 RNA とは区別され、これは核酸ベースの治療剤を用いた効果的なポリペプチド生成の既存の問題を克服するのに役立つ。例えば、IVT RNA は、構造的に修飾されていても化学的に修飾されていてもよい。本明細書中で使用される場合、「構造的」修飾とは、ヌクレオチド自体に対する有意な化学修飾なしに、2つ以上の連結ヌクレオチドが、ポリヌクレオチド中に挿入、欠失、重複、反転または無作為化される修飾である。化学結合は必然的に破壊され、構造的修飾をもたらすように再形成されるので、構造的修飾は、化学的性質のものであり、したがって化学的修飾である。しかしながら、構造修飾は、異なるヌクレオチド配列をもたらすであろう。例えば、ポリヌクレオチド「ATCG」は、「AT-5meC-G」に化学修飾されていてもよい。同じポリヌクレオチドを「ATCG」から「ATCCCCG」に構造的に修飾してもよい。ここでは、ジヌクレオチド「CC」が挿入されており、その結果、ポリヌクレオチドに対する構造的修飾をもたらされる。

#### 【0143】

本明細書に記載のポリヌクレオチドをコードする cDNA は、インビトロ転写 (IVT) 系を用いて転写してもよい。この系は典型的には転写緩衝液、ヌクレオチド三リン酸 (

NTP)、RNAase阻害剤及びポリメラーゼを含む。NTPは、自家製であってもよく、供給者から選択されてもよく、または本明細書に記載のように合成されてもよい。NTPは、限定するものではないが、天然及び非天然（修飾）NTPを含む本明細書に記載のNTPから選択され得る。ポリメラーゼは、限定するものではないが、T7RNAポリメラーゼ、T3RNAポリメラーゼ、及び突然変異ポリメラーゼ（限定するものではないが、ポリヌクレオチド（例えば、修飾核酸）を取り込み得るポリメラーゼなど）から選択されてもよい。

#### 【0144】

##### 化学修飾RNA

したがって、例示的な態様では、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの化学修飾を含んでもよい。このポリヌクレオチドは、天然のまたは天然に存在するポリヌクレオチドからの種々の置換及び/または挿入を含み得る。本明細書中でポリヌクレオチドにおいて使用される場合、「化学修飾」または必要に応じて「化学修飾された」という用語は、位置、パターン、百分率または母集団のうちの1つ以上における、アデノシン（A）、グアノシン（G）、ウリジン（U）、チミジン（T）またはシチジン（C）リボ-またはデオキシリボヌクレオチドに関する修飾を指す。一般に、本明細書において、これらの用語は、天然に存在する5'末端RNAキャップ部分におけるリボヌクレオチド修飾を指すことを意図していない。

#### 【0145】

この修飾は、様々な異なる修飾であり得る。いくつかの実施形態では、この領域は、1つ、2つ、またはそれ以上（任意選択的に異なる）のヌクレオチドまたはヌクレオチド修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞に導入された修飾ポリヌクレオチドは、未修飾ポリヌクレオチドと比較して、細胞内で分解の低下を示し得る。

#### 【0146】

ポリヌクレオチドの修飾としては、限定するものではないが、以下に詳細に列挙される修飾が挙げられる。ポリヌクレオチドは、天然に存在するか、天然に存在しない修飾を含んでもよく、またはポリヌクレオチドは、天然に存在する修飾及び天然に存在しない修飾の両方を含んでもよい。

#### 【0147】

本発明のポリヌクレオチドは、糖、核酸塩基、またはヌクレオチド間結合に対するもの（例えば、結合ホスフェートに対するもの/ホスホジエステル結合に対するもの/ホスホジエステル骨格に対するもの）などの任意の有用な修飾を含んでもよい。ピリミジン核酸塩基の1つ以上の原子は、任意選択的に置換されたアミノ、任意選択的に置換されたチオール、任意選択的に置換されたアルキル（例えば、メチルまたはエチル）、またはハロ（例えば、クロロまたはフルオロ）で置き換えられても、または置換されてもよい。特定の実施形態では、修飾（例えば、1つ以上の修飾）が、糖及びヌクレオチド間結合のそれぞれに存在する。本発明による修飾は、デオキシリボ核酸（DNA）、トレオース核酸（TNA）、グリコール核酸（GNA）、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）またはそれらのハイブリッドへのリボ核酸（RNA）の修飾であってもよい。追加の修飾が本明細書に記載される。

#### 【0148】

非天然修飾ヌクレオチドを、鎖の合成中または合成後にポリヌクレオチドに導入して、所望の機能または特性を達成してもよい。修飾は、ヌクレオチド間系統、プリンもしくはピリミジン塩基、または糖に対するものであってもよい。修飾は鎖の末端または鎖の他の場所に導入されてもよい（化学合成またはポリメラーゼ酵素によって）。ポリヌクレオチドのいずれの領域も化学的に修飾されてもよい。

#### 【0149】

本開示は、未修飾または修飾ヌクレオチド及びヌクレオチドならびにそれらの組み合わせからなるポリヌクレオチドを提供する。本明細書に記載の場合、「ヌクレオチド」とは、有機塩基（例えばプリンまたはピリミジン）またはその誘導体（本明細書において「核

10

20

30

40

50

酸塩基」とも呼ばれる)と組み合わせて糖分子(例えば、ペントースまたはリボース)またはその誘導体を含む化合物として定義される。本明細書中に記載される場合、「ヌクレオチド」とは、リン酸基を含むヌクレオシドとして定義される。修飾ヌクレオチドは、本明細書中に記載されるように、任意の有用な方法によって(例えば、化学的、酵素的、または組換え的に、1つ以上の修飾ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドを含むように)合成され得る。このポリヌクレオチドは、連結ヌクレオチドの領域(複数可)を含んでもよい。そのような領域は、可変主鎖結合を有してもよい。この結合は、標準的なホスホジエステル結合であってもよく、その場合、ポリヌクレオチドはヌクレオチドの領域を含むであろう。塩基/糖またはリンカーの任意の組み合わせを本発明のポリヌクレオチドに組み込んでもよい。

10

**【0150】**

いくつかの実施形態では、本発明のRNAは、1つ以上の前述の修飾核酸塩基の組み合わせ(例えば、2つ、3つまたは4つの前述の修飾核酸塩基の組み合わせ)を含む。

**【0151】**

本発明において有用である核酸の修飾としては、限定するものではないが、以下の表中の修飾が挙げられる。

**【0152】**



【表 A - 1】

名称	記号	塩基	天然に存在するか
2-メチルチオ-N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン	ms2i6A	A	存在する
2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン	ms2m6A	A	存在する
2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン	ms2t6A	A	存在する
N6-グリシニルカルバモイルアデノシン	g6A	A	存在する
N6-イソペンテニルアデノシン	i6A	A	存在する
N6-メチルアデノシン	m6A	A	存在する
N6-トレオニルカルバモイルアデノシン	t6A	A	存在する
1,2'-O-ジメチルアデノシン	m1Am	A	存在する
1-メチルアデノシン	m1A	A	存在する
2'-O-メチルアデノシン	Am	A	存在する
2'-O-リボシルアデノシン(リン酸塩)	Ar(p)	A	存在する
2-メチルアデノシン	m2A	A	存在する
2-メチルチオ-N6 イソペンテニルアデノシン	ms2i6A	A	存在する
2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン	ms2hn6A	A	存在する
2'-O-メチルアデノシン	m6A	A	存在する
2'-O-リボシルアデノシン(リン酸塩)	Ar(p)	A	存在する
イソペンテニルアデノシン	Iga	A	存在する
N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン	io6A	A	存在する
N6,2'-O-ジメチルアデノシン	m6Am	A	存在する
N6,2'-O-ジメチルアデノシン	m6Am	A	存在する
N6,N6,2'-O-トリメチルアデノシン	m62Am	A	存在する
N6,N6-ジメチルアデノシン	m62A	A	存在する
N6-アセチルアデノシン	ac6A	A	存在する
N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン	hn6A	A	存在する

10

20

30

40

【表 A - 2】

N6-メチル-N6-トレオニルカルバモ イルアデノシン	m6t6A	A	存在する
2-メチルアデノシン	m2A	A	存在する
2-メチルチオ-N6-イソペンテニル アデノシン	ms2i6A	A	存在する
7-デアザ-アデノシン	--	A	存在しない
N1-メチル-アデノシン	--	A	存在しない
N6, N6(ジメチル)アデニン	--	A	存在しない
N6-シス-ヒドロキシ-イソペンテニ ル-アデノシン	--	A	存在しない
$\alpha$ -チオ-アデノシン	--	A	存在しない
2(アミノ)アデニン	--	A	存在しない
2(アミノプロピル)アデニン	--	A	存在しない
2(メチルチオ)N6(イソペンテニル) アデニン	--	A	存在しない
2-(アルキル)アデニン	--	A	存在しない
2-(アミノアルキル)アデニン	--	A	存在しない
2-(アミノプロピル)アデニン	--	A	存在しない
2-(ハロ)アデニン	--	A	存在しない
2-(ハロ)アデニン	--	A	存在しない
2-(プロピル)アデニン	--	A	存在しない
2'-アミノ-2'-デオキシ-ATP	--	A	存在しない
2'-アジド-2'-デオキシ-ATP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-アミノアデノシ ン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-アジドアデノシ ン TP	--	A	存在しない
6(アルキル)アデニン	--	A	存在しない
6(メチル)アデニン	--	A	存在しない
6-(アルキル)アデニン	--	A	存在しない
6-(メチル)アデニン	--	A	存在しない
7(デアザ)アデニン	--	A	存在しない
8(アルケニル)アデニン	--	A	存在しない
8(アルキニル)アデニン	--	A	存在しない
8(アミノ)アデニン	--	A	存在しない
8(チオアルキル)アデニン	--	A	存在しない
8-(アルケニル)アデニン	--	A	存在しない
8-(アルキル)アデニン	--	A	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 3】

8-(アルキニル)アデニン	--	A	存在しない
8-(アミノ)アデニン	--	A	存在しない
8-(ハロ)アデニン	--	A	存在しない
8-(ヒドロキシル)アデニン	--	A	存在しない
8-(チオアルキル)アデニン	--	A	存在しない
8-(チオール)アデニン	--	A	存在しない
8-アジド-アデノシン	--	A	存在しない
アザアデニン	--	A	存在しない
デアザアデニン	--	A	存在しない
N6(メチル)アデニン	--	A	存在しない
N6-(イソペンチル)アデニン	--	A	存在しない
7-デアザ-8-アザ-アデノシン	--	A	存在しない
7-メチルアデニン	--	A	存在しない
1-デアザアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-フルオロ-N6-Bz-デオキシアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-OMe-2'-アミノ-ATP	--	A	存在しない
2'-O-メチル-N6-Bz-デオキシアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-a-エチニルアデノシン TP	--	A	存在しない
2-アミノアデニン	--	A	存在しない
2-アミノアデノシン TP	--	A	存在しない
2-アミノ-ATP	--	A	存在しない
2'-a-トリフルオロメチルアデノシン TP	--	A	存在しない
2-アジドアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-b-エチニルアデノシン TP	--	A	存在しない
2-プロモアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-b-トリフルオロメチルアデノシン TP	--	A	存在しない
2-クロロアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2', 2'-ジフルオロアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-メルカプトアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-チオメトキシアデノシン TP	--	A	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 4】

2'-デオキシ-2'-b-アミノアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-アジドアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-ブロモアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-クロロアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-フルオロアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-ヨードアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-メルカプトアデノシン TP	--	A	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-チオメトキシアデノシン TP	--	A	存在しない
2-フルオロアデノシン TP	--	A	存在しない
2-ヨードアデノシン TP	--	A	存在しない
2-メルカプトアデノシン TP	--	A	存在しない
2-メトキシ-アデニン	--	A	存在しない
2-メチルチオ-アデニン	--	A	存在しない
2-トリフルオロメチルアデノシン TP	--	A	存在しない
3-デアザ-3-ブロモアデノシン TP	--	A	存在しない
3-デアザ-3-クロロアデノシン TP	--	A	存在しない
3-デアザ-3-フルオロアデノシン TP	--	A	存在しない
3-デアザ-3-ヨードアデノシン TP	--	A	存在しない
3-デアザアデノシン TP	--	A	存在しない
4'-アジドアデノシン TP	--	A	存在しない
4'-炭素環式アデノシン TP	--	A	存在しない
4'-エチニルアデノシン TP	--	A	存在しない
5'-ホモ-アデノシン TP	--	A	存在しない
8-アザ-ATP	--	A	存在しない
8-ブロモ-アデノシン TP	--	A	存在しない
8-トリフルオロメチルアデノシン TP	--	A	存在しない
9-デアザアデノシン TP	--	A	存在しない
2-アミノプリン	--	A/G	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 5】

7-デアザ-2,6-ジアミノプリン	--	A/G	存在しない
7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン	--	A/G	存在しない
7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン	--	A/G	存在しない
2,6-ジアミノプリン	--	A/G	存在しない
7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン	--	A/G	存在しない
2-チオシチジン	s2C	C	存在する
3-メチルシチジン	m3C	C	存在する
5-ホルミルシチジン	f5C	C	存在する
5-ヒドロキシメチルシチジン	hm5C	C	存在する
5-メチルシチジン	m5C	C	存在する
N4-アセチルシチジン	ac4C	C	存在する
2'-O-メチルシチジン	Cm	C	存在する
2'-O-メチルシチジン	Cm	C	存在する
5,2'-O-ジメチルシチジン	m5 Cm	C	存在する
5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン	f5Cm	C	存在する
リシジン	k2C	C	存在する
N4,2'-O-ジメチルシチジン	m4Cm	C	存在する
N4-アセチル-2'-O-メチルシチジン	ac4Cm	C	存在する
N4-メチルシチジン	m4C	C	存在する
N4,N4-ジメチル-2'-OMe-シチジン TP	--	C	存在する
4-メチルシチジン	--	C	存在しない
5-アザ-シチジン	--	C	存在しない
シュード-イソ-シチジン	--	C	存在しない
ピロロシチジン	--	C	存在しない
$\alpha$ -チオ-シチジン	--	C	存在しない
2-(チオ)シトシン	--	C	存在しない
2'-アミノ-2'-デオキシ-CTP	--	C	存在しない
2'-アジド-2'-デオキシ-CTP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-アミノシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-アジドシチジン TP	--	C	存在しない
3(デアザ)5(アザ)シトシン	--	C	存在しない
3(メチル)シトシン	--	C	存在しない
3-(アルキル)シトシン	--	C	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 6】

3-(デアザ)5(アザ)シトシン	--	C	存在しない
3-(メチル)シチジン	--	C	存在しない
4,2'-O-ジメチルシチジン	--	C	存在しない
5(ハロ)シトシン	--	C	存在しない
5(メチル)シトシン	--	C	存在しない
5(プロピニル)シトシン	--	C	存在しない
5(トリフルオロメチル)シトシン	--	C	存在しない
5-(アルキル)シトシン	--	C	存在しない
5-(アルキニル)シトシン	--	C	存在しない
5-(ハロ)シトシン	--	C	存在しない
5-(プロピニル)シトシン	--	C	存在しない
5-(トリフルオロメチル)シトシン	--	C	存在しない
5-ブロモ-シチジン	--	C	存在しない
5-ヨードシチジン	--	C	存在しない
5-プロピニルシトシン	--	C	存在しない
6-(アゾ)シトシン	--	C	存在しない
6-アザ-シチジン	--	C	存在しない
アザシトシン	--	C	存在しない
デアザシトシン	--	C	存在しない
N4(アセチル)シトシン	--	C	存在しない
1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン	--	C	存在しない
1-メチル-シュードイソシチジン	--	C	存在しない
2-メトキシ-5-メチル-シチジン	--	C	存在しない
2-メトキシ-シチジン	--	C	存在しない
2-チオ-5-メチル-シチジン	--	C	存在しない
4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン	--	C	存在しない
4-メトキシ-シュードイソシチジン	--	C	存在しない
4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン	--	C	存在しない
4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン	--	C	存在しない
4-チオ-シュードイソシチジン	--	C	存在しない
5-アザ-ゼブラリン	--	C	存在しない
5-メチル-ゼブラリン	--	C	存在しない
ピロロ-シュードイソシチジン	--	C	存在しない
ゼブラリン	--	C	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 7】

(E)-5-(2-プロモ-ビニル)シチジン TP	--	C	存在しない
2, 2'-アンヒドロ-シチジン TP 塩酸塩	--	C	存在しない
2'-フルオロ-N4-Bz-シチジン TP	--	C	存在しない
2'-フルオロ-N4-アセチル-シチジン TP	--	C	存在しない
2'-O-メチル-N4-アセチル-シチジン TP	--	C	存在しない
2'-O-メチル-N4-Bz-シチジン TP	--	C	存在しない
2'-a-エチニルシチジン TP	--	C	存在しない
2'-a-トリフルオロメチルシチジン TP	--	C	存在しない
2'-b-エチニルシチジン TP	--	C	存在しない
2'-b-トリフルオロメチルシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2', 2'-ジフルオロシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-メルカプトシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-チオメトキシシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-アミノシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-アジドシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-プロモシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-クロロシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-フルオロシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-ヨードシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-メルカプトシチジン TP	--	C	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-チオメトキシシチジン TP	--	C	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 8】

2'-0-メチル-5-(1-プロピニル)シチジン TP	--	C	存在しない
3'-エチニルシチジン TP	--	C	存在しない
4'-アジドシチジン TP	--	C	存在しない
4'-炭素環シチジン TP	--	C	存在しない
4'-エチニルシチジン TP	--	C	存在しない
5-(1-プロピニル)アラ-シチジン TP	--	C	存在しない
5-(2-クロロ-フェニル)-2-チオシチジン TP	--	C	存在しない
5-(4-アミノ-フェニル)-2-チオシチジン TP	--	C	存在しない
5-アミノアリル-CTP	--	C	存在しない
5-シアノシチジン TP	--	C	存在しない
5-エチニルアラ-シチジン TP	--	C	存在しない
5-エチニルシチジン TP	--	C	存在しない
5'-ホモ-シチジン TP	--	C	存在しない
5-メトキシシチジン TP	--	C	存在しない
5-トリフルオロメチル-シチジン TP	--	C	存在しない
N4-アミノ-シチジン TP	--	C	存在しない
N4-ベンゾイル-シチジン TP	--	C	存在しない
シュードイソシチジン	--	C	存在しない
7-メチルグアノシン	m7G	G	存在する
N2, 2'-0-ジメチルグアノシン	m2Gm	G	存在する
N2-メチルグアノシン	m2G	G	存在する
ワイオシン	imG	G	存在する
1, 2'-0-ジメチルグアノシン	m1Gm	G	存在する
1-メチルグアノシン	m1G	G	存在する
2'-0-メチルグアノシン	Gm	G	存在する
2'-0-リボシルグアノシン(リン酸塩)	Gr(p)	G	存在する
2'-0-メチルグアノシン	Gm	G	存在する
2'-0-リボシルグアノシン(リン酸塩)	Gr(p)	G	存在する
7-アミノメチル-7-デアザグアノシン	preQ1	G	存在する
7-シアノ-7-デアザグアノシン	preQ0	G	存在する
アルケオシン	G+	G	存在する

10

20

30

40



【表 A - 9】

メチルワイオシン	mimG	G	存在する
N2, 7-ジメチルグアノシン	m2, 7G	G	存在する
N2, N2, 2'-O-トリメチルグアノシン	m22Gm	G	存在する
N2, N2, 7-トリメチルグアノシン	m2, 2, 7G	G	存在する
N2, N2-ジメチルグアノシン	m22G	G	存在する
N2, 7, 2'-O-トリメチルグアノシン	m2, 7Gm	G	存在する
6-チオ-グアノシン	--	G	存在しない
7-デアザ-グアノシン	--	G	存在しない
8-オキソ-グアノシン	--	G	存在しない
N1-メチル-グアノシン	--	G	存在しない
$\alpha$ -チオ-グアノシン	--	G	存在しない
2(プロピル)グアニン	--	G	存在しない
2-(アルキル)グアニン	--	G	存在しない
2'-アミノ-2'-デオキシ-GTP	--	G	存在しない
2'-アジド-2'-デオキシ-GTP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-アミノグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-アジドグアノシン TP	--	G	存在しない
6(メチル)グアニン	--	G	存在しない
6-(アルキル)グアニン	--	G	存在しない
6-(メチル)グアニン	--	G	存在しない
6-メチル-グアノシン	--	G	存在しない
7(アルキル)グアニン	--	G	存在しない
7(デアザ)グアニン	--	G	存在しない
7(メチル)グアニン	--	G	存在しない
7-(アルキル)グアニン	--	G	存在しない
7-(デアザ)グアニン	--	G	存在しない
7-(メチル)グアニン	--	G	存在しない
8(アルキル)グアニン	--	G	存在しない
8(アルキニル)グアニン	--	G	存在しない
8(ハロ)グアニン	--	G	存在しない
8(チオアルキル)グアニン	--	G	存在しない
8-(アルケニル)グアニン	--	G	存在しない
8-(アルキル)グアニン	--	G	存在しない
8-(アルキニル)グアニン	--	G	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 10】

8-(アミノ)グアニン	--	G	存在しない
8-(ハロ)グアニン	--	G	存在しない
8-(ヒドロキシル)グアニン	--	G	存在しない
8-(チオアルキル)グアニン	--	G	存在しない
8-(チオール)グアニン	--	G	存在しない
アザグアニン	--	G	存在しない
デアザグアニン	--	G	存在しない
N(メチル)グアニン	--	G	存在しない
N-(メチル)グアニン	--	G	存在しない
1-メチル-6-チオ-グアノシン	--	G	存在しない
6-メトキシ-グアノシン	--	G	存在しない
6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン	--	G	存在しない
6-チオ-7-デアザ-グアノシン	--	G	存在しない
6-チオ-7-メチル-グアノシン	--	G	存在しない
7-デアザ-8-アザ-グアノシン	--	G	存在しない
7-メチル-8-オキソ-グアノシン	--	G	存在しない
N2, N2-ジメチル-6-チオ-グアノシン	--	G	存在しない
N2-メチル-6-チオ-グアノシン	--	G	存在しない
1-Me-GTP	--	G	存在しない
2'フルオロ-N2-イソブチル-グアノシン TP	--	G	存在しない
2' O-メチル-N2-イソブチル-グアノシン TP	--	G	存在しない
2'-a-エチニルグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-a-トリフルオロメチルグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-b-エチニルグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-b-トリフルオロメチルグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2', 2'-ジフルオログアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-メルカプトグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-チオメトキシグアノシン TP	--	G	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 11】

2'-デオキシ-2'-b-アミノグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-アジドグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-プロモグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-クロログアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-フルオログアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-ヨードグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-メルカプトグアノシン TP	--	G	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-チオメトキシグアノシン TP	--	G	存在しない
4'-アジドグアノシン TP	--	G	存在しない
4'-炭素環グアノシン TP	--	G	存在しない
4'-エチニルグアノシン TP	--	G	存在しない
5'-ホモ-グアノシン TP	--	G	存在しない
8-プロモ-グアノシン TP	--	G	存在しない
9-デアザグアノシン TP	--	G	存在しない
N2-イソブチル-グアノシン TP	--	G	存在しない
1-メチルイノシン	m1I	I	存在する
イノシン	I	I	存在する
1, 2'-O-ジメチルイノシン	m1Im	I	存在する
2'-O-メチルイノシン	Im	I	存在する
7-メチルイノシン		I	存在しない
2'-O-メチルイノシン	Im	I	存在する
エポキシクエオシン	oQ	Q	存在する
ガラクトシル-クエオシン	galQ	Q	存在する
マンノシルクエオシン	manQ	Q	存在する
クエオシン	Q	Q	存在する
アリアルミノ-チミジン	--	T	存在しない
アザチミジン	--	T	存在しない
デアザチミジン	--	T	存在しない
デオキシ-チミジン	--	T	存在しない
2'-O-メチルウリジン	--	U	存在する

10

20

30

40

【表 A - 12】

2-チオウリジン	s2U	U	存在する
3-メチルウリジン	m3U	U	存在する
5-カルボキシメチルウリジン	cm5U	U	存在する
5-ヒドロキシウリジン	ho5U	U	存在する
5-メチルウリジン	m5U	U	存在する
5-タウリノメチル-2-チオウリジン	$\tau$ m5s2U	U	存在する
5-タウリノメチルウリジン	$\tau$ m5U	U	存在する
ジヒドロウリジン	D	U	存在する
シュードウリジン	$\Psi$	U	存在する
(3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン)	acp3U	U	存在する
1-メチル-3-(3-アミノ-5-カルボキシプロピル)シュードウリジン	m1acp3 $\Psi$	U	存在する
1-メチルシュードウリジン	m1 $\Psi$	U	存在する
1-メチル-シュードウリジン	--	U	存在する
2'-0-メチルウリジン	Um	U	存在する
2'-0-メチルシュードウリジン	$\Psi$ m	U	存在する
2'-0-メチルウリジン	Um	U	存在する
2-チオ-2'-0-メチルウリジン	s2Um	U	存在する
3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン	acp3U	U	存在する
3,2'-0-ジメチルウリジン	m3Um	U	存在する
3-メチル-シュードウリジン TP	--	U	存在する
4-チオウリジン	s4U	U	存在する
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン	chm5U	U	存在する
5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル	mchm5U	U	存在する
5,2'-0-ジメチルウリジン	m5Um	U	存在する
5,6-ジヒドロ-ウリジン	--	U	存在する
5-アミノメチル-2-チオウリジン	nm5s2U	U	存在する
5-カルバモイルメチル-2'-0-メチルウリジン	ncm5Um	U	存在する
5-カルバモイルメチルウリジン	ncm5U	U	存在する
5-カルボキシヒドロキシメチルウリジン	--	U	存在する
5-カルボキシヒドロキシメチルウリジンメチルエステル	--	U	存在する

10

20

30

40

【表 A - 13】

5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-0-メチルウリジン	cmnm5Um	U	存在する
5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン	cmnm5s2U	U	存在する
5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン	--	U	存在する
5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン	cmnm5U	U	存在する
5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン	--	U	存在する
5-カルバモイルメチルウリジン TP	--	U	存在する
5-メトキシカルボニルメチル-2'-0-メチルウリジン	mcm5Um	U	存在する
5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン	mcm5s2U	U	存在する
5-メトキシカルボニルメチルウリジン	mcm5U	U	存在する
5-メトキシウリジン	mo5U	U	存在する
5-メチル-2-チオウリジン	m5s2U	U	存在する
5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン	mn5se2U	U	存在する
5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン	mn5s2U	U	存在する
5-メチルアミノメチルウリジン	mn5U	U	存在する
5-メチルジヒドロウリジン	--	U	存在する
5-オキシ酢酸-ウリジン TP	--	U	存在する
5-オキシ酢酸-メチルエステル-ウリジン TP	--	U	存在する
N1-メチル-シュード-ウリジン	--	U	存在する
ウリジン 5-オキシ酢酸	cmo5U	U	存在する
ウリジン 5-オキシ酢酸メチルエステル	mcmo5U	U	存在する
3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)-ウリジン TP	--	U	存在する
5-(イソペンテニルアミノメチル)-2-チオウリジン TP	--	U	存在する
5-(イソペンテニルアミノメチル)-2'-0-メチルウリジン TP	--	U	存在する

10

20

30

40

【表 A - 14】

5-(イソ-ペンテニルアミノメチル)ウリジン TP	--	U	存在する
5-プロピニルウラシル	--	U	存在しない
$\alpha$ -チオ-ウリジン	--	U	存在しない
1(アミノアルキルアミノ-カルボニルエチレニル)-2(チオ)-シュードウラシル	--	U	存在しない
1(アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-2,4-(ジチオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
1(アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-4(チオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
1(アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-シュードウラシル	--	U	存在しない
1(アミノカルボニルエチレニル)-2(チオ)-シュードウラシル	--	U	存在しない
1(アミノカルボニルエチレニル)-2,4-(ジチオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
1(アミノカルボニルエチレニル)-4(チオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
1(アミノカルボニルエチレニル)-シュードウラシル	--	U	存在しない
1 置換 2(チオ)-シュードウラシル	--	U	存在しない
1 置換 2,4-(ジチオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
1 置換 4(チオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
1 置換シュードウラシル	--	U	存在しない
1-(アミノアルキルアミノ-カルボニルエチレニル)-2-(チオ)-シュードウラシル	--	U	存在しない
1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)シュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-メチル-3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
2(チオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
2' デオキシウリジン	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 15】

2'フルオロウリジン	--	U	存在しない
2-(チオ)ウラシル	--	U	存在しない
2,4-(ジチオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
2'メチル,2'アミノ,2'アジド,2'フルオロ-グアノシン	--	U	存在しない
2'-アミノ-2'-デオキシ-UTP	--	U	存在しない
2'-アジド-2'-デオキシ-UTP	--	U	存在しない
2'-アジド-デオキシウリジン TP	--	U	存在しない
2'-O-メチルシュードウリジン	--	U	存在しない
2'デオキシウリジン	2' dU	U	存在しない
2'フルオロウリジン	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-アミノウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-アジドウリジン TP	--	U	存在しない
2-メチルシュードウリジン	m3Ψ	U	存在しない
3(3アミノ-3カルボキシプロピル)ウラシル	--	U	存在しない
4(チオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
4-(チオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
4-(チオ)ウラシル	--	U	存在しない
4-チオウラシル	--	U	存在しない
5(1,3-ジアゾール-1-アルキル)ウラシル	--	U	存在しない
5(2-アミノプロピル)ウラシル	--	U	存在しない
5(アミノアルキル)ウラシル	--	U	存在しない
5(ジメチルアミノアルキル)ウラシル	--	U	存在しない
5(グアニジニウムアルキル)ウラシル	--	U	存在しない
5-(メトキシカルボニルメチル)-2-(チオ)ウラシル	--	U	存在しない
5(メトキシカルボニル-メチル)ウラシル	--	U	存在しない
5(メチル)2(チオ)ウラシル	--	U	存在しない
5(メチル)2,4(ジチオ)ウラシル	--	U	存在しない
5(メチル)4(チオ)ウラシル	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 16】

5(メチルアミノメチル)-2(チオ)ウ ラシル	--	U	存在しない
5(メチルアミノメチル)-2,4(ジチ オ)ウラシル	--	U	存在しない
5(メチルアミノメチル)-4(チオ)ウ ラシル	--	U	存在しない
5(プロピニル)ウラシル	--	U	存在しない
5(トリフルオロメチル)ウラシル	--	U	存在しない
5-(2-アミノプロピル)ウラシル	--	U	存在しない
5-(アルキル)-2-(チオ)シュードウ ラシル	--	U	存在しない
5-(アルキル)-2,4-(ジチオ)シュード ウラシル	--	U	存在しない
5-(アルキル)-4(チオ)シュードウ ラシル	--	U	存在しない
5-(アルキル)シュードウラシル	--	U	存在しない
5-(アルキル)ウラシル	--	U	存在しない
5-(アルキニル)ウラシル	--	U	存在しない
5-(アリルアミノ)ウラシル	--	U	存在しない
5-(シアノアルキル)ウラシル	--	U	存在しない
5-(ジアルキルアミノアルキル)ウ ラシル	--	U	存在しない
5-(ジメチルアミノアルキル)ウラ シル	--	U	存在しない
5-(グアニジニウムアルキル)ウラ シル	--	U	存在しない
5-(ハロ)ウラシル	--	U	存在しない
5-(1,3-ジアゾール-1-アルキル)ウ ラシル	--	U	存在しない
5-(メトキシ)ウラシル	--	U	存在しない
5-(メトキシカルボニルメチル)-2- (チオ)ウラシル	--	U	存在しない
5-(メトキシカルボニル-メチル)ウ ラシル	--	U	存在しない
5-(メチル)2(チオ)ウラシル	--	U	存在しない
5-(メチル)2,4(ジチオ)ウラシル	--	U	存在しない
5-(メチル)4(チオ)ウラシル	--	U	存在しない

10

20

30

40



【表 A - 17】

5-(メチル)-2-(チオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
5-(メチル)-2,4-(ジチオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
5-(メチル)-4(チオ)シュードウラシル	--	U	存在しない
5-(メチル)シュードウラシル	--	U	存在しない
5-(メチルアミノメチル)-2(チオ)ウラシル	--	U	存在しない
5-(メチルアミノメチル)-2,4-(ジチオ)ウラシル	--	U	存在しない
5-(メチルアミノメチル)-4-(チオ)ウラシル	--	U	存在しない
5-(プロピニル)ウラシル	--	U	存在しない
5-(トリフルオロメチル)ウラシル	--	U	存在しない
5-アミノアリル-ウリジン	--	U	存在しない
5-プロモ-ウリジン	--	U	存在しない
5-ヨード-ウリジン	--	U	存在しない
5-ウラシル	--	U	存在しない
6(アゾ)ウラシル	--	U	存在しない
6-(アゾ)ウラシル	--	U	存在しない
6-アザ-ウリジン	--	U	存在しない
アリルアミノ-ウラシル	--	U	存在しない
アザウラシル	--	U	存在しない
デアサウラシル	--	U	存在しない
N3(メチル)ウラシル	--	U	存在しない
シュード-UTP-1-2-エタン酸	--	U	存在しない
シュードウラシル	--	U	存在しない
4チオ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-カルボキシメチル-シュードウリジン	--	U	存在しない
1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン	--	U	存在しない
1-プロピニル-ウリジン	--	U	存在しない
1-タウリノメチル-1-メチル-ウリジン	--	U	存在しない
1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 18】

1-タウリノメチル-シュードウリジン	--	U	存在しない
2-メトキシ-4-チオ-シュードウリジン	--	U	存在しない
2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン	--	U	存在しない
2-チオ-1-メチル-シュードウリジン	--	U	存在しない
2-チオ-5-アザ-ウリジン	--	U	存在しない
2-チオ-ジヒドロシュードウリジン	--	U	存在しない
2-チオ-ジヒドロウリジン	--	U	存在しない
2-チオ-シュードウリジン	--	U	存在しない
4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン	--	U	存在しない
4-メトキシ-シュードウリジン	--	U	存在しない
4-チオ-1-メチル-シュードウリジン	--	U	存在しない
4-チオ-シュードウリジン	--	U	存在しない
5-アザ-ウリジン	--	U	存在しない
ジヒドロシュードウリジン	--	U	存在しない
(±)1-(2-ヒドロキシプロピル)シュードウリジン TP	--	U	存在しない
(2R)-1-(2-ヒドロキシプロピル)シュードウリジン TP	--	U	存在しない
(2S)-1-(2-ヒドロキシプロピル)シュードウリジン TP	--	U	存在しない
(E)-5-(2-ブロモ-ビニル)アラ-ウリジン TP	--	U	存在しない
(E)-5-(2-ブロモ-ビニル)ウリジン TP	--	U	存在しない
(Z)-5-(2-ブロモ-ビニル)アラ-ウリジン TP	--	U	存在しない
(Z)-5-(2-ブロモ-ビニル)ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(2,2,2-トリフルオロエチル)-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-(2,2,3,3,3-ペンタフルオロプロピル)シュードウリジン TP	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 19】

1-(2,2-ジエトキシエチル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(2,4,6-トリメチルベンジル) シ ュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-(2,4,6-トリメチル-ベンジル) シ ュード-UTP	--	U	存在しない
1-(2,4,6-トリメチル-フェニル) シ ュード-UTP	--	U	存在しない
1-(2-アミノ-2-カルボキシエチル) シュード-UTP	--	U	存在しない
1-(2-アミノ-エチル) シュード-UTP	--	U	存在しない
1-(2-ヒドロキシエチル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(2-メトキシエチル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(3,4-ビス-トリフルオロメトキ シベンジル) シュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-(3,4-ジメトキシベンジル) シ ュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-(3-アミノ-3-カルボキシプロピ ル) シュード-UTP	--	U	存在しない
1-(3-アミノ-プロピル) シュード- UTP	--	U	存在しない
1-(3-シクロプロピル-プロパ-2-イ ニル) シュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-アミノ-4-カルボキシブチル) シュード-UTP	--	U	存在しない
1-(4-アミノ-ベンジル) シュード- UTP	--	U	存在しない
1-(4-アミノ-ブチル) シュード-UTP	--	U	存在しない
1-(4-アミノ-フェニル) シュード- UTP	--	U	存在しない
1-(4-アジドベンジル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-ブロモベンジル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-クロロベンジル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 20】

1-(4-フルオロベンジル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-ヨードベンジル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-メタンスルホニルベンジル) シュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-メトキシベンジル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-メトキシ-ベンジル) シュード -UTP	--	U	存在しない
1-(4-メトキシ-フェニル) シュード -UTP	--	U	存在しない
1-(4-メチルベンジル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-メチル-ベンジル) シュード- UTP	--	U	存在しない
1-(4-ニトロベンジル) シュード ウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-ニトロ-ベンジル) シュード- UTP	--	U	存在しない
1-(4-ニトロ-フェニル) シュード- UTP	--	U	存在しない
1-(4-チオメトキシベンジル) シュ ードウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-トリフルオロメトキシベンジ ル) シュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-(4-トリフルオロメチルベンジ ル) シュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-(5-アミノ-ペンチル) シュード- UTP	--	U	存在しない
1-(6-アミノ-ヘキシル) シュード- UTP	--	U	存在しない
1,6-ジメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-[3-(2-{2-[2-(2-アミノエトキ シ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキ シ)-プロピオニル] シュードウリジ ン TP	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 2 1】

1-{3-[2-(2-アミノエトキシ)-エトキシ]-プロピオニル}シュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-アセチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-アルキル-6-(1-プロピニル)-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-アルキル-6-(2-プロピニル)-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-アルキル-6-アリル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-アルキル-6-エチニル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-アルキル-6-ホモアリル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-アルキル-6-ビニル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-アリルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-アミノメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-ベンゾイルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-ベンジルオキシメチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-ベンジル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-ビオチニル-PEG2-シュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-ビオチニルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-ブチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シアノメチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-シクロブチルメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロブチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロヘプチルメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロヘプチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロヘキシルメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロヘキシル-シュード-UTP	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 2 2】

1-シクロオクチルメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロオクチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロペンチルメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロペンチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロプロピルメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-シクロプロピル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-エチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-ヘキシル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-ホモアリルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-ヒドロキシメチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-イソ-プロピル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-Me-2-チオ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-Me-4-チオ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-Me-アルファ-チオ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メタンスルホニルメチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-メトキシメチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-メチル-6-(2, 2, 2-トリフルオロエチル)シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-(4-モルホリノ)-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-(4-チオモルホリノ)-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-(置換フェニル)シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-アミノ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-アジド-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-ブロモ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-ブチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-クロロ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-シアノ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-ジメチルアミノ-シュード-UTP	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 23】

1-メチル-6-エトキシ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-エチルカルボキシレート-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-エチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-フルオロ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-ホルミル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-ヒドロキシアミノ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-ヒドロキシ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-ヨード-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-イソ-プロピル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-メトキシ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-メチルアミノ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-フェニル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-プロピル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-tert-ブチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-トリフルオロメトキシ-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-メチル-6-トリフルオロメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-モルホリノメチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-ペンチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-フェニル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-ピバロイルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-プロパルギルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-プロピル-シュード-UTP	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 2 4】

1-プロピニル-シュードウリジン	--	U	存在しない
1-p-トリル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-tert-ブチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-チオメトキシメチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-チオモルホリノメチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-トリフルオロアセチルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
1-トリフルオロメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
1-ビニルシュードウリジン TP	--	U	存在しない
2, 2'-アンヒドロウリジン TP	--	U	存在しない
2'-ブromo-デオキシウリジン TP	--	U	存在しない
2'-F-5-メチル-2'-デオキシ-UTP	--	U	存在しない
2'-OMe-5-Me-UTP	--	U	存在しない
2'-OMe-シュード-UTP	--	U	存在しない
2'-a-エチニルウリジン TP	--	U	存在しない
2'-a-トリフルオロメチルウリジン TP	--	U	存在しない
2'-b-エチニルウリジン TP	--	U	存在しない
2'-b-トリフルオロメチルウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2', 2'-ジフルオロウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-メルカプトウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-a-チオメトキシウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-アミノウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-アジドウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-ブロモウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-クロロウリジン TP	--	U	存在しない

10

20

30

40



【表 A - 25】

2'-デオキシ-2'-b-フルオロウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-ヨードウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-メルカプトウリジン TP	--	U	存在しない
2'-デオキシ-2'-b-チオメトキシウリジン TP	--	U	存在しない
2-メトキシ-4-チオ-ウリジン	--	U	存在しない
2-メトキシウリジン	--	U	存在しない
2'-0-メチル-5-(1-プロピニル)ウリジン TP	--	U	存在しない
3-アルキル-シュード-UTP	--	U	存在しない
4'-アジドウリジン TP	--	U	存在しない
4'-炭素環式ウリジン TP	--	U	存在しない
4'-エチニルウリジン TP	--	U	存在しない
5-(1-プロピニル)アラ-ウリジン TP	--	U	存在しない
5-(2-フラニル)ウリジン TP	--	U	存在しない
5-シアノウリジン TP	--	U	存在しない
5-ジメチルアミノウリジン TP	--	U	存在しない
5'-ホモ-ウリジン TP	--	U	存在しない
5-ヨード-2'-フルオロ-デオキシウリジン TP	--	U	存在しない
5-フェニルエチニルウリジン TP	--	U	存在しない
5-トリデュウテロメチル-6-デュウテロウリジン TP	--	U	存在しない
5-トリフルオロメチル-ウリジン TP	--	U	存在しない
5-ビニルアラウリジン TP	--	U	存在しない
6-(2,2,2-トリフルオロエチル)-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-(4-モルホリノ)-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-(4-チオモルホリノ)-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-(置換-フェニル)-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-アミノ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-アジド-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-ブロモ-シュード-UTP	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 26】

6-ブチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-クロロ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-シアノシュード-UTP	--	U	存在しない
6-ジメチルアミノ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-エトキシ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-エチルカルボキシレート-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-エチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-フルオロ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-ホルミル-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-ヒドロキシアミノ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-ヒドロキシ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-ヨードシュード-UTP	--	U	存在しない
6-イソ-プロピル-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-メトキシ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-メチルアミノ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-メチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-フェニル-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-フェニル-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-プロピル-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-tert-ブチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-トリフルオロメトキシ-シュード-UTP	--	U	存在しない
6-トリフルオロメチル-シュード-UTP	--	U	存在しない
アルファ-チオ-シュード-UTP	--	U	存在しない
シュードウリジン 1-(4-メチルベンゼンスルホン酸)TP	--	U	存在しない
シュードウリジン 1-(4-メチル安息香酸)TP	--	U	存在しない
シュードウリジン TP 1-[3-(2-エトキシ)]プロピオン酸	--	U	存在しない
シュードウリジン TP 1-[3-{2-(2-[2-(2-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ)-エトキシ}]プロピオン酸	--	U	存在しない

10

20

30

40

【表 A - 27】

シュードウリジン TP 1-[3-{2-(2-[2-{2(2-エトキシ)-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ}-エトキシ}]プロピオン酸	--	U	存在しない
シュードウリジン TP 1-[3-{2-(2-[2-エトキシ]-エトキシ)-エトキシ}]プロピオン酸	--	U	存在しない
シュードウリジン TP 1-[3-{2-(2-エトキシ)-エトキシ}]プロピオン酸	--	U	存在しない
シュードウリジン TP 1-メチルホスホン酸	--	U	存在しない
シュードウリジン TP 1-メチルホスホン酸ジエチルエステル	--	U	存在しない
シュード-UTP-N1-3-プロピオン酸	--	U	存在しない
シュード-UTP-N1-4-ブタン酸	--	U	存在しない
シュード-UTP-N1-5-ペンタン酸	--	U	存在しない
シュード-UTP-N1-6-ヘキササン酸	--	U	存在しない
シュード-UTP-N1-7-ヘプタン酸	--	U	存在しない
シュード-UTP-N1-メチル-p-安息香酸	--	U	存在しない
シュード-UTP-N1-p-安息香酸	--	U	存在しない
ワイプトシン	yW	W	存在する
ヒドロキシワイプトシン	OHyW	W	存在する
イソワイオシン	imG2	W	存在する
ペルオキシワイプトシン	o2yW	W	存在する
未修飾ヒドロキシワイプトシン	OHyW*	W	存在する
4-デメチルワイオシン	imG-14	W	存在する

## 【0153】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、シュードウリジン( )、N1-メチルシュードウリジン( $m^1$ )、2-チオウリジン、4'-チオウリジン、5-メチルシトシン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-シュードウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロシュードウリジン、5-メトキシウリジン、または2'-O-メチルウリジンである。いくつかの実施形態では、本発明のRNAは、1つ以上の前述の修飾核酸塩基の組み合わせ(例えば、2つ、3つまたは4つの前述の修飾核酸塩基の組み合わせ)を含む。

## 【0154】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、1-メチル-シュードウリジン( $m^1$ )、5-メトキシ-ウリジン( $mo^5U$ )、5-メチル-シチジン( $m^5C$ )、シュードウ

リジン( )、 - チオ - グアノシン、または - チオ - アデノシンである。いくつかの実施形態では、本発明の mRNA は、1 つ以上の前述の修飾核酸塩基の組み合わせ(例えば、2 つ、3 つまたは 4 つの前述の修飾核酸塩基の組み合わせ)を含む。

#### 【0155】

いくつかの実施形態では、RNA は、シュードウリジン( )及び 5 - メチル - シチジン( $m^5C$ )を含む。いくつかの実施形態では、RNA は 1 - メチル - シュードウリジン( $m^1$ )を含む。いくつかの実施形態では、RNA は、1 - メチル - シュードウリジン( $m^1$ )及び 5 - メチル - シチジン( $m^5C$ )を含む。いくつかの実施形態では、RNA は、2 - チオウリジン( $s^2U$ )を含む。いくつかの実施形態では、RNA は、2 - チオウリジン及び 5 - メチル - シチジン( $m^5C$ )を含む。いくつかの実施形態では、RNA は、5 - メトキシ - ウリジン( $mo^5U$ )を含む。いくつかの実施形態では、RNA は、5 - メトキシ - ウリジン( $mo^5U$ )及び 5 - メチル - シチジン( $m^5C$ )を含む。いくつかの実施形態では、RNA は、2' - O - メチルウリジンを含む。いくつかの実施形態では、RNA は、2' - O - メチルウリジン及び 5 - メチル - シチジン( $m^5C$ )を含む。いくつかの実施形態では、RNA は、N6 - メチル - アデノシン( $m^6A$ )を含む。いくつかの実施形態では、RNA は N6 - メチル - アデノシン( $m^6A$ )及び 5 - メチル - シチジン( $m^5C$ )を含む。

10

#### 【0156】

特定の実施形態では、本発明の RNA は、特定の修飾のために均一に修飾されている(すなわち、完全に修飾されている、全配列にわたって修飾されている)。例えば、RNA は、5 - メチル - シチジン( $m^5C$ )で均一に修飾されてもよく、これは、RNA 配列中の全てのシトシン残基が、5 - メチル - シチジン( $m^5C$ )で置換されることを意味する。同様に、本発明の RNA は、配列中に存在する任意の種類のヌクレオチド残基について、上記のような修飾残基と交換することによって均一に修飾されてもよい。

20

#### 【0157】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は修飾シトシンである。修飾シトシンを有する例示的な核酸塩基、ヌクレオシド、及びヌクレオチドとしては、N4 - アセチル - シチジン( $ac4C$ )、5 - メチル - シチジン( $m5C$ )、5 - ハロ - シチジン(例えば、5 - ヨード - シチジン)、5 - ヒドロキシメチル - シチジン( $hm5C$ )、1 - メチル - シュードイソシチジン、2 - チオ - シチジン( $s2C$ )、2 - チオ - 5 - メチル - シチジンが挙げられる。

30

#### 【0158】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾ウリジンである。修飾ウリジンを有する例示的な核酸塩基、ヌクレオシド、及びヌクレオチドとしては、5 - シアノウリジンまたは 4' - チオウリジンが挙げられる。

#### 【0159】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾アデニンである。修飾アデニンを有する例示的な核酸塩基、ヌクレオシド、及びヌクレオチドとしては、7 - デアザ - アデニン、1 - メチル - アデノシン( $m1A$ )、2 - メチル - アデニン( $m2A$ )、N6 - メチル - アデノシン( $m6A$ )、及び 2, 6 - ジアミノプリンが含まれる。

40

#### 【0160】

いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾グアニンである。修飾グアニンを有する例示的な核酸塩基、ヌクレオシド、及びヌクレオチドとしては、イノシン( $I$ )、1 - メチル - イノシン( $m1I$ )、ワイオシン( $imG$ )、メチルワイオシン( $miG$ )、7 - デアザ - グアノシン、7 - シアノ - 7 - デアザ - グアノシン(プレQ0)、7 - アミノメチル - 7 - デアザ - グアノシン(プレQ1)、7 - メチル - グアノシン( $m7G$ )、1 - メチル - グアノシン( $m1G$ )、8 - オキソ - グアノシン、7 - メチル - 8 - オキソ - グアノシンが挙げられる。

#### 【0161】

一実施形態では、IVT ポリヌクレオチドなどの本発明のポリヌクレオチドは、全てま

50

たは任意の同じヌクレオチド型の均一の化学修飾または全てまたは任意の同じヌクレオチド型において同じ出発修飾の単なる下向き滴定によって生じる修飾の集団、または全てのウリジンがウリジン類似体、例えばシュードウリジンで置換されている場合のように、任意の同じヌクレオチド型であるが、ランダムに組み込まれた化学修飾の測定パーセントを有してもよい。別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド全体にわたって同じヌクレオチド型の2つ、3つ、または4つの均一な化学修飾を有していてもよい(全てのウリジン及び全てのシトシンなどが同様に修飾される)。本発明のポリヌクレオチドが化学的及び/または構造的に修飾されている場合、そのポリヌクレオチドは「修飾ポリヌクレオチド」と呼ばれてもよい。

**【0162】**

一般に、目的のポリペプチドをコードするIVTポリヌクレオチド(例えば、IVT RNA)の長さは、約30ヌクレオチドより長い(例えば、少なくとも約35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、及び3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000またはそれを超え、最大100,000ヌクレオチド以下)。

**【0163】**

いくつかの実施形態では、IVTポリヌクレオチド(例えば、IVT RNA)は、約30~約100,000ヌクレオチド(例えば、30~50、30~100、30~250、30~500、30~1,000、30~1,500、30~3,000、30~5,000、30~7,000、30~10,000、30~25,000、30~50,000、30~70,000、100~250、100~500、100~1,000、100~1,500、100~3,000、100~5,000、100~7,000、100~10,000、100~25,000、100~50,000、100~70,000、100~100,000、500~1,000、500~1,500、500~2,000、500~3,000、500~5,000、500~7,000、500~10,000、500~25,000、500~50,000、500~70,000、500~100,000、1,000~1,500、1,000~2,000、1,000~3,000、1,000~5,000、1,000~7,000、1,000~10,000、1,000~25,000、1,000~50,000、1,000~70,000、1,000~100,000、1,500~3,000、1,500~5,000、1,500~7,000、1,500~10,000、1,500~25,000、1,500~50,000、1,500~70,000、1,500~100,000、2,000~3,000、2,000~5,000、2,000~7,000、2,000~10,000、2,000~25,000、2,000~50,000、2,000~70,000、及び2,000~100,000)を含む。

**【0164】**

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の核酸は、キメラポリヌクレオチドである。キメラポリヌクレオチドまたはRNA構築物は、IVTポリヌクレオチドと同様のモジュール構造を維持するが、キメラポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに有用な特性を付与する1つ以上の構造的及び/または化学的修飾または改変を含む。したがって、本発明の修飾RNA分子であるキメラポリヌクレオチドは、「キメラ修飾RNA」または「キメラRNA」と呼ばれる。キメラポリヌクレオチドは、サイズ及び/または化学修飾パターン、化学修飾位置、化学修飾パーセントまたは化学修飾集団及びこれらの組み合わせが異なる部分または領域を有する。

**【0165】**

### 目的のポリペプチド

本発明のいくつかの実施形態では、本発明は、以下のうちの1つ以上である：mRNA、修飾mRNA、非修飾RNA、lncRNA、自己複製RNA、環状RNA、CRISPRガイドRNAなど。この実施形態では、RNAは、mRNAまたは自己複製RNAなどのポリペプチドをコードするRNAである。

#### 【0166】

本発明の例示的な態様では、高純度のRNA組成物を使用して目的のポリペプチド、例えば、治療用タンパク質、ワクチン抗原などを生成する。いくつかの実施形態では、この核酸は治療用RNAである。本明細書中で使用される場合、「治療用mRNA」という用語は、治療用タンパク質をコードするmRNAを指す。治療用タンパク質は、疾患を処置するため、または疾患の徴候及び症状を改善するために、宿主細胞または対象において様々な効果を媒介する。例えば、治療用タンパク質は、欠損または異常であるタンパク質を置換し、内因性タンパク質の機能を増強し、細胞に新規機能を提供する（例えば、内因性細胞活性を阻害もしくは活性化する）か、または別の治療用化合物（例えば、抗体-薬物コンジュゲート）の送達剤として作用し得る。治療用mRNAは、以下の疾患及び状態の処置に有用であり得る：細菌感染症、ウイルス感染症、寄生虫感染症、細胞増殖障害、遺伝的障害、及び自己免疫障害。

#### 【0167】

したがって、本発明のポリヌクレオチドは、治療剤または予防剤として使用してもよい。それらは医学分野での使用のために提供されている。例えば、本明細書に記載のRNAを対象に投与してもよく、ここでポリヌクレオチドはインピボで翻訳されて治療用ペプチドを生成する。ヒト及び他の哺乳動物における疾患または状態の診断、処置または予防のための組成物、方法、キット、及び試薬が提供される。本発明の活性治療剤としては、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含有する細胞、またはポリヌクレオチドから翻訳されたポリペプチドが挙げられる。

#### 【0168】

ポリヌクレオチドは、細胞、組織または生物体において翻訳のために誘導され得る。そのような翻訳は、インピボであっても、エクスピボであっても、培養物中であっても、またはインビトロであってもよい。細胞、組織または生物体は、RNAポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有する有効量の組成物と接触させられる。

#### 【0169】

ポリヌクレオチドの「有効量」とは、少なくとも部分的には、標的組織、標的細胞型、投与手段、ポリヌクレオチドの物理的特性（例えば、サイズ及び修飾ヌクレオチドの程度）ならびにポリヌクレオチドの他の成分及び他の決定基に基づいて提供される。一般に、有効量のポリヌクレオチドは、好ましくは同じペプチドをコードする対応する未修飾ポリヌクレオチドを含有する組成物よりも効率的に、細胞内で誘導されるかまたは促進されたペプチド生成を提供する。ペプチド産生の増大は、細胞トランスフェクションの増大、ポリヌクレオチドからのタンパク質翻訳の増大、核酸分解の減少（例えば、修飾ポリヌクレオチドからのタンパク質翻訳の持続時間の増大により示される）、または宿主細胞におけるペプチド産生の変化により実証され得る。

#### 【0170】

本発明のRNAは、限定するものではないが、生物製剤、抗体、ワクチン、治療用タンパク質またはペプチド、細胞透過性ペプチド、分泌タンパク質、原形質膜タンパク質、細胞質または細胞骨格タンパク質、細胞内膜結合タンパク質、核タンパク質、ヒト疾患に関連するタンパク質、標的化部分、または治療適応が同定されていないが、それにもかかわらず研究及び発見の分野において有用性があるヒトゲノムによってコードされるタンパク質を含む任意のいくつかの標的カテゴリーから選択される目的のポリペプチドをコードするように設計され得る。「治療用タンパク質」とは、細胞に投与したときに治療的、診断的、及び/または予防的効果を有し、かつ/または所望の生物学的効果及び/または薬理学的効果を引き出すタンパク質を指す。

## 【 0 1 7 1 】

本明細書中に開示されるRNAは、1つ以上の生物製剤をコードし得る。本明細書中で使用される場合、「生物学的」とは、本明細書中に提供される方法によって産生され、そして重篤なまたは生命を脅かす疾患または病状を処置、治癒、軽減、予防または診断するために使用され得るポリペプチドベースの分子である。本発明による生物製剤としては、限定するものではないが、アレルギー性抽出物（例えば、アレルギー注射及び試験用）、血液成分、遺伝子治療製品、移植に使用されるヒト組織または細胞製品、ワクチン、モノクローナル抗体、サイトカイン、増殖因子、酵素、血栓溶解薬、及び免疫調節薬がとりわけ挙げられる。

## 【 0 1 7 2 】

本発明によれば、現在市販されているかまたは開発中の1つ以上の生物製剤は、本発明のRNAによってコードされ得る。理論に拘束されることを望まないが、本発明のRNAへの公知の生物製剤のコードポリヌクレオチドの組み込みは、少なくとも部分的には、構築物設計の特異性、純度、及び/または選択性に起因して改善された治療効果をもたらすと考えられる。

## 【 0 1 7 3 】

本明細書中に開示されるRNAは、1つ以上の抗体またはその断片をコードし得る。「抗体」という用語は、モノクローナル抗体（免疫グロブリンFc領域を有する全長抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ、及び一本鎖分子）、ならびに抗体断片を含む。「免疫グロブリン」（Ig）という用語は、本明細書において「抗体」と互換的に用いられる。本明細書中で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、微量で存在し得る、天然に存在する突然変異及び/または翻訳後修飾（例えば、異性化、アミド化）の可能性以外は同一である。モノクローナル抗体は、極めて特異的であり、単一の抗原部位に対して向けられている。

## 【 0 1 7 4 】

本明細書におけるモノクローナル抗体は、具体的には、重鎖及び/または軽鎖の一部が特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同であり、ただし、鎖（複数可）の残りの部分は、それらが所望の生物活性を示す限り、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびにそのような抗体の断片中の対応する配列と同一または相同である、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を含む。本明細書において目的のキメラ抗体としては、限定するものではないが、非ヒト霊長類由来の変換ドメイン抗原結合配列（例えば、Old World Monkey、Apeなど）及びヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体が挙げられる。

## 【 0 1 7 5 】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合及び/または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及びFv断片；ダイアボディ；線形抗体；ナノボディ；一本鎖抗体分子及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。

## 【 0 1 7 6 】

任意の5つのクラスの免疫グロブリン、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMが、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ及びミューと呼ばれる重鎖を含む、本発明のRNAによってコードされ得る。サブクラスである、ガンマ及びミューをコードするポリヌクレオチド配列も含まれる。それ故、抗体の任意のサブクラスが、部分的または全体的にコードされ得、そして以下のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2を含む。本発明によれば、現在市販されているかまたは開発中の1つ以上の抗体または断片は、本発明のRNAによってコードされ得る。

## 【 0 1 7 7 】

本発明のRNAにコードされた抗体は、限定するものではないが、血液、心血管、CNS、中毒（抗毒素を含む）、皮膚科、内分泌学、胃腸、医用イメージング、筋骨格、腫瘍学、免疫学、呼吸器系、感覚系及び抗感染症などの多くの治療分野における状態または疾患の処置に利用され得る。

【0178】

一実施形態では、本明細書に開示されるRNAは、モノクローナル抗体及び/またはその変異体をコードし得る。抗体の変異体としてはまた、限定するものではないが、置換変異体、保存的アミノ酸置換、挿入変異体、欠失変異体及び/または共有結合誘導体も挙げられる。一実施形態では、本明細書に開示のRNAは、免疫グロブリンFc領域をコードし得る。別の実施形態では、RNAは、変異免疫グロブリンFc領域をコードし得る。

10

【0179】

本明細書中に開示されるmRNAは、1つ以上のワクチン抗原をコードし得る。本明細書中で使用される場合、「ワクチン抗原」とは、特定の疾患または感染因子に対する免疫を向上させる生物学的調製物である。本発明によれば、現在市販されているかまたは開発中の1つ以上のワクチン抗原は、本発明のRNAによってコードされ得る。

【0180】

本発明のRNA中にコードされたワクチン抗原は、がん、アレルギー及び感染性疾患を含むがこれらに限定されない多くの治療分野における状態または疾患を治療するために利用してもよい。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、コンカテマーもしくはペプチドエピトープをコードする個々のRNAまたはそれらの組み合わせの形態の個別化されたがんワクチンであってもよい。

20

【0181】

本発明のRNAは、1つ以上の抗菌ペプチド（AMP）または抗ウイルスペプチド（AVP）をコードするように設計され得る。AMP及びAVPは、限定するものではないが、微生物、無脊椎動物、植物、両生類、鳥類、魚類、及び哺乳類などの広範囲の動物から単離及び記載されている。本明細書に記載の抗微生物ポリペプチドは、1つ以上のエンベロープウイルス（例えば、HIV、HCV）による細胞融合及び/またはウイルス侵入を遮断し得る。例えば、抗微生物ポリペプチドは、ある領域に対応する合成ペプチド、例えば、ウイルスエンベロープタンパク質、例えばHIV-1 gp120またはgp41の膜貫通サブユニットの少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60アミノ酸の連続配列を含んでもよいし、またはそれからなってもよい。HIV-1 gp120またはgp41のアミノ酸及びヌクレオチド配列は、例えば、Kuiken et al., (2008) "HIV Sequence Compendium," Los Alamos National Laboratory に記載されている。

30

【0182】

いくつかの実施形態では、抗微生物ポリペプチドは、対応するウイルスタンパク質配列に対して少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、100%の配列相同性を有し得る。いくつかの実施形態では、抗微生物ポリペプチドは、対応するウイルスタンパク質配列に対して少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列相同性を有し得る。

40

【0183】

他の実施形態では、抗微生物ポリペプチドは、ある領域に対応する合成ペプチド、例えば、キャプシド結合タンパク質の結合ドメインの少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60アミノ酸の連続配列を含んでもよいし、またはそれからなってもよい。いくつかの実施形態では、抗微生物ポリペプチドは、キャプシド結合タンパク質の対応する配列に対して少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、または100%の配列相同性を有し得る。

【0184】

本明細書に記載の抗菌ポリペプチドは、プロテアーゼ二量体化を遮断し、ウイルスプロ

50



タンパク質（例えば、H I V G a g - p o l プロセッシング）の機能性タンパク質への切断を阻害し、それによって1つ以上のエンベロープウイルス（例えば、H I V、H C V）の放出を防止し得る。いくつかの実施形態では、抗微生物ポリペプチドは、対応するウイルスタンパク質配列に対して少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、100%の配列相同性を有し得る。

#### 【0185】

他の実施形態では、抗菌性ポリペプチドは、ある領域に対応する合成ペプチド、例えば、プロテアーゼ結合タンパク質の結合ドメインの少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60アミノ酸の連続配列を含んでもよいし、またはそれからなってもよい。いくつかの実施形態では、抗菌性ポリペプチドは、

10

#### 【0186】

R N A ワクチン抗原または抗菌ペプチドが処置し得る感染性疾患の非限定的な列挙を以下に示す：ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、マイコバクテリア感染を引き起こすH I V、A I D S 関連悪液質、A I D S 関連サイトメガロウイルス感染、H I V 関連腎症、脂肪異栄養症、A I D 関連クリプトコックス髄膜炎、A I D S 関連好中球減少症、P n e u m o c y s i t i s j i r o v e c i ( P n e u m o c y s t i s c a r i n i i ) 感染症、A I D 関連トキソプラズマ症、A 型、B 型、C 型、D 型またはE 型の肝炎、疱疹、帯状疱疹（水疱瘡）、風疹（風疹ウイルス）、黄熱病、デング熱など（フラビウイルス）、インフルエンザ（インフルエンザウイルス）、出血性感染症（マールブルグまたはエボラウイルス）、レジオネラ症などの細菌感染症（レジオネラ）、胃潰瘍（ヘリコバクター）、コレラ（ビブリオ）、E . c o l i 感染、ブドウ球菌感染症、サルモネラ感染症またはレンサ球菌感染症、破傷風（破傷風菌）、原虫感染症（マラリア、睡眠病、リーシュマニア症、トキソプラズマ症、すなわち、プラスモジウム、トリパノソーマ、リーシュマニア及びトキソプラズマによって引き起こされる感染症）、ジフテリア、ハンセン病、はしか、百日咳、狂犬病、破傷風、結核、腸チフス、水痘、下痢感染症、例えば、アメーバ症、クロストリジウム・ディフィシレ関連下痢症（C D A D）、クリプトスポリジウム症、ジアルジア症、シクロスポリア症及びロタウイルス性胃腸炎、日本脳炎などの脳炎、西部ウマ脳炎及びダニ媒介脳炎（T B E）、真菌性皮膚病、例えば、カンジダ症、爪甲真菌症、頭部白癬／しらくも、体部白癬（T i n e a c o r p o r i s）／体部白癬（b o d y r i n g w o r m）、頑癬／いんきんたむし、スポロトリウム症及び足白癬／水虫（A t h l e t e ' s f o o t）、髄膜炎、例えば、インフルエンザ菌b型（H i b）、髄膜炎、ウイルス性、髄膜炎菌感染症及び肺炎球菌感染症、軽視される熱帯病、例えば、アルゼンチン出血熱、リーシュマニア症、線形動物／線虫感染、ロスリバーウイルス感染症及び西ナイルウイルス（W N V）病、非H I V S T D、例えば、トリコモナス症、ヒトパピローマウイルス（H P V）感染症、性感染性クラミジア疾患、軟性下疳及び梅毒、非特異的細菌感染、例えば、蜂窩織炎、ライム病、M R S A 感染、シュードモナス、ブドウ球菌感染症、ボタン熱、レプトスピラ症、リウマチ熱、ボツリヌス中毒症、リケッチア症及び乳様突起炎、寄生生物感染、例えば、囊虫症、エキノコックス症、吸虫（T r e m a t o d e）／吸虫感染（F l u k e i n f e c t i o n）、旋毛虫症、バベシア症、牛バエ幼虫症、裂頭条虫症及びトリパノソーマ症、呼吸器感染症、例えば、アデノウイルス感染、アスペルギルス症感染、鳥（H 5 N 1）インフルエンザ、インフルエンザ、R S V 感染、重症急性呼吸器症候群（S A R S）、副鼻腔炎、レジオネラ症、コクシジオイデス症及びブタ（H 1 N 1）インフルエンザ、菌血症などの敗血症、敗血症／敗血性ショック、未熟児における敗血症、尿路感染症、例えば、膣感染症（細菌性）、膣感染症（真菌）及び淋菌感染、ウイルス性皮膚疾患、例えば、B 1 9 パルボウイルス感染症、いぼ、性器ヘルペス、口腔顔面ヘルペス、帯状疱疹、内耳感染症、胎児サイトメガロウイルス症候群、食物感染症、例えば、ブルセラ症（B r u c e l l a 種）、C l o s t r i d i u m p e r f r i n g e n s ( E p s i l o n 毒素)、E . c o l i O 1 5 7 : H 7 (

20

30

40

50

*Escherichia coli*)、サルモネラ中毒(サルモネラ種)、*Shingelliosis*(*Shingella*)、ピブリオ症及びリステリア症、パイオテロリズム及び潜在的な流行性疾患、例えば、エボラ出血熱、ラッサ熱、マールブルク出血熱、ペスト、炭疽ニパウイルス病、ハンタウイルス、痘瘡、鼻疽(*Burkholderia mallei*)、類鼻疽(*Burkholderia pseudomallei*)、*Psittacosis*(*Chlamydia psittaci*)、Q熱(*Coxiella burnetii*)、野兔病(*Fancisella tularensis*)、風疹、おたふく風邪及びポリオ。

【0187】

本明細書中に開示されるRNAは、1つ以上の確認された、または「試験中」の治療用タンパク質またはペプチドをコードし得る。本発明によれば、現在市販されているかまたは開発中の1つ以上の治療用タンパク質またはペプチドを、本発明のRNAによってコードしてもよい。本発明のRNAにコードされる治療用タンパク質及びペプチドは、限定するものではないが、血液、心血管、CNS、中毒(抗毒素を含む)、皮膚科、内分泌学、遺伝学、尿生殖器、胃腸、筋骨格系、腫瘍学、及び免疫学、呼吸器系、感覚系及び抗感染症などの、多くの治療分野における状態または疾患を処置するために利用され得る。

【0188】

本明細書中に開示されるRNAは、1つ以上の細胞透過性ポリペプチドをコードし得る。本明細書中で使用される場合、「細胞透過性ポリペプチド」またはCPPとは、分子の細胞内取り込みを促進し得るポリペプチドを指す。本発明の細胞透過性ポリペプチドは、1つ以上の検出可能な標識を含み得る。ポリペプチドは部分的に標識されていても全体にわたって完全に標識されていてもよい。RNAは、検出可能な標識を完全にコードしていても、部分的にコードしていても、または全くコードしていてもよい。細胞透過性ペプチドは、シグナル配列も含んでもよい。本明細書中で使用される場合、「シグナル配列」とは、タンパク質翻訳中に新生タンパク質のアミノ末端に結合したアミノ酸残基の配列を指す。シグナル配列は、細胞透過性ポリペプチドの分泌をシグナル伝達するために使用され得る。

【0189】

一実施形態では、RNAはまた、融合タンパク質もコードし得る。この融合タンパク質は、荷電タンパク質を治療用タンパク質に作動可能に連結することによって作製され得る。本明細書中で使用される場合、「作動可能に連結された」とは、細胞内に導入された場合、複合体の発現を可能にするように連結されている治療用タンパク質及び荷電タンパク質を指す。本明細書中で使用される場合、「荷電タンパク質」とは、正、負または全体的に中性の電荷を帯びたタンパク質を指す。好ましくは、治療用タンパク質は、融合タンパク質の形成において荷電タンパク質に共有結合され得る。全アミノ酸または表面アミノ酸に対する表面電荷の比は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8または0.9であってもよい。

【0190】

RNAによってコードされる細胞透過性ポリペプチドは、翻訳後に複合体を形成し得る。この複合体は、細胞透過性ポリペプチドに連結、例えば、共有結合した荷電タンパク質を含んでもよい。

【0191】

一実施形態では、細胞透過性ポリペプチドは、第1ドメイン及び第2ドメインを含んでもよい。第1ドメインは、過荷電ポリペプチドを含んでもよい。第2ドメインは、タンパク質結合パートナーを含んでもよい。本明細書中で使用される場合、「タンパク質結合パートナー」としては、限定するものではないが、抗体及びその機能的断片、足場タンパク質、またはペプチドが挙げられる。細胞透過性ポリペプチドは、タンパク質結合パートナーに対する細胞内結合パートナーをさらに含んでもよい。細胞透過性ポリペプチドは、RNAが導入され得る細胞から分泌され得る。細胞透過性ポリペプチドはまた、第1の細胞も透過し得る。

## 【0192】

一実施形態では、RNAは、タンパク質結合パートナーを含み得る細胞透過性ポリペプチドをコードし得る。タンパク質結合パートナーとしては、限定するものではないが、抗体、超荷電抗体または機能的断片が挙げられる。RNAは、タンパク質結合パートナーを含む細胞透過性ポリペプチドが導入されている細胞に導入されてもよい。

## 【0193】

ヒト及び他の真核細胞は、膜によって多くの機能的に異なる区画に細分される。各膜結合区画、すなわち細胞小器官は、細胞小器官の機能に必須の異なるタンパク質を含む。細胞は、タンパク質を特定の細胞小器官に向けるために、タンパク質内に位置するアミノ酸モチーフである「選別シグナル」を使用する。シグナル配列、シグナルペプチド、またはリーダ配列と呼ばれる1種の選別シグナルは、あるクラスのタンパク質を小胞体（ER）と呼ばれる細胞小器官へ向かわせる。

10

## 【0194】

シグナル配列によってERを標的とするタンパク質は、分泌タンパク質として細胞外空間に放出され得る。同様に、細胞膜上に存在するタンパク質もまた、タンパク質を膜に保持する「リンカー」のタンパク質分解的切断によって細胞外空間に分泌され得る。理論に束縛されることを望まないが、本発明の分子は、上記の細胞輸送を活用するために使用され得る。そのため、本発明のいくつかの実施形態では、分泌タンパク質を発現させるためにRNAが提供される。一実施形態では、これらは大量の貴重なヒト遺伝子産物の製造に使用してもよい。

20

## 【0195】

本発明のいくつかの実施形態では、RNAを提供して、原形質膜のタンパク質を発現する。

## 【0196】

本発明のいくつかの実施形態では、RNAを提供して、細胞質タンパク質または細胞骨格タンパク質を発現する。

## 【0197】

本発明のいくつかの実施形態では、RNAを提供して、細胞内膜結合タンパク質を発現する。

## 【0198】

本発明のいくつかの実施形態では、RNAを提供して、核タンパク質を発現する。

30

## 【0199】

本発明のいくつかの実施形態では、RNAを提供して、ヒトの疾患に関連するタンパク質を発現する。

## 【0200】

RNAは、天然もしくは天然に存在するRNAのヌクレオチド配列を有してもよく、または天然もしくは天然に存在するペプチドをコードするヌクレオチド配列を有してもよい。あるいは、RNAは、天然または天然に存在するRNAのヌクレオチド配列に対してあるパーセントの同一性を有するヌクレオチド配列を有してもよいし、またはmRNAは、天然または天然に存在するペプチドのヌクレオチド配列に対してあるパーセントの同一性を有するペプチドをコードするヌクレオチド配列を有してもよい。当技術分野において公知の「同一性」という用語は、配列を比較することによって決定される、2つ以上のペプチドの配列間の関係を指す。当技術分野において、同一性とはまた、2つ以上のアミノ酸残基のストリング間の一致の数によって決定されるように、ペプチド間の配列関連性の程度も意味する。同一性は、特定の数学的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち「アルゴリズム」）によって対処されるギャップアライメント（もしあれば）を有する2つ以上の配列のうち小さい方の間の同一の一致のパーセントを測定する。関連ペプチドの同一性は、既知の方法によって容易に計算され得る。そのような方法としては、限定するものではないが、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Ne

40

50

w York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; 及び Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988) に記載される方法が挙げられる。

10

#### 【0201】

したがって、いくつかの実施形態では、RNAによってコードされるペプチドは、参照ポリペプチドと同じまたは類似の活性を有し得るポリペプチド変異体である。あるいは、変異体は、参照ポリペプチドと比較して変更された活性（例えば、増大または減少）を有し得る。一般に、本発明の特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、本明細書に記載の及び当業者に公知の配列アラインメントプログラム及びパラメーターにより決定した場合、その特定の参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対して少なくとも約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、ただし100%未満の配列同一性を有する。そのようなアラインメントのためのツールとしては、BLASTスイートのツール（Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997) and “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.）が挙げられる。他のツールは、本明細書中に、具体的には「同一性」の定義において、記載されている。BLASTアルゴリズム中のデフォルトパラメーターとしては、例えば、期待閾値10、ワードサイズ28、一致/不一致スコア1、-2、ギャップコスト線形が挙げられる。例えばホモサピエンスのような、種特異的反復のための選択と同様に、任意のフィルターを適用してもよい。

20

30

#### 【0202】

本発明によれば、ポリヌクレオチドは、目的の1つ以上のポリペプチドまたはその断片をコードするためのRNAを含む。目的のポリペプチドとしては、限定するものではないが、全ポリペプチド、複数のポリペプチドまたはポリペプチドの断片が挙げられる。本明細書中で使用される場合、「目的のポリペプチド」という用語は、本発明の一次構築物中にコードされるように選択される任意のポリペプチドを指す。本明細書において用いる場合、「ポリペプチド」とは、最も多くの場合ペプチド結合によって一緒に結合される、アミノ酸残基のポリマー（天然または非天然）を意味する。この用語は、本明細書で使用する場合、任意のサイズ、構造、または機能のタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを指す。いくつかの例では、コードされるポリペプチドは、約50アミノ酸より小さく、そのためこのポリペプチドは、ペプチドと呼ばれる。ポリペプチドがペプチドである場合、それは少なくとも約2、3、4、または少なくとも5アミノ酸残基の長さであろう。したがって、ポリペプチドとしては、遺伝子産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片、ならびに上述の他の等価物、変異体、及び類似体が挙げられる。ポリペプチドは、単一分子であってもよく、または二量体、三量体もしくは四量体のような多分子複合体であってもよい。それらはまた、抗体またはインスリンなどの単鎖または多鎖ポリペプチドを含んでもよく、そして会合または連結されてもよい。最も一般的なジスルフィド結合は、多鎖ポリペプチドに見られる。ポリペプチ

40

50

ドという用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的類似体であるアミノ酸ポリマーにも適用され得る。

【0203】

「ポリペプチド変異体」という用語は、それらのアミノ酸配列が天然または参照配列と異なる分子を指す。アミノ酸配列変異体は、天然または参照配列と比較して、アミノ酸配列内の特定の位置に置換、欠失、及び/または挿入を有し得る。通常、変異体は天然または参照配列に対して少なくとも約50%の同一性を有し、そして好ましくは、それらは天然または参照配列に対して少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%同一である。

【0204】

いくつかの実施形態では、「変異体模倣物」が提供される。本明細書において用いる場合、「変異体模倣物」という用語は、活性化配列を模倣するであろう1つ以上のアミノ酸を含むものである。例えば、グルタメートは、ホスホロ-トレオニン及び/またはホスホロ-セリンの模倣物として役立ち得る。あるいは、変異体模倣物は、不活性化をもたらし得る場合もあるし、または模倣物を含有する不活性化生成物をもたらす場合もあり、例えば、フェニルアラニンは、チロシンの不活性化置換として作用する場合もあり；またはアラニンは、セリンの不活性化置換として作用する場合もある。

【0205】

本発明は、変異体及び誘導体を含むポリペプチドベースのいくつかの種類の組成物を企図する。これらとしては、置換型、挿入型、欠失型及び共有結合型の変異体及び誘導体が挙げられる。「誘導体」という用語は、「変異体」という用語と同義で使用されるが、一般には、参照分子または出発分子に対して何らかの方法で修飾及び/または変更されている分子を指す。

【0206】

そのように、参照配列、特に本明細書に開示されているポリペプチド配列に関して置換、挿入及び/または付加、欠失及び共有結合修飾を含むポリペプチドをコードするRNAは、本発明の範囲内に含まれる。例えば、1以上のリジンのような配列タグまたはアミノ酸を、本発明のペプチド配列に（例えば、N末端またはC末端に）付加してもよい。配列タグは、ペプチド精製に使用しても、または局在化に使用してもよい。リジンは、ペプチドの溶解度を高めるため、またはビオチン化を可能にするために使用してもよい。あるいは、ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ及びアミノ末端領域に位置するアミノ酸残基は任意選択的に、短縮配列を提供するために欠失されてもよい。特定のアミノ酸（例えば、C末端残基またはN末端残基）は、代わりに、例えば、可溶性であるか、または固体に結合しているより大きな配列の一部としての配列の発現など、配列の用途に応じて欠失されてもよい。

【0207】

ポリペプチドに言及する場合の「置換変異体」とは、天然配列または出発配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、その場所の同じ位置に異なるアミノ酸が挿入されているものである。置換は、分子中の1個のアミノ酸のみが置換されている場合は単一でもよく、または同一分子中で2個以上のアミノ酸が置換されている場合は複数であってもよい。

【0208】

本明細書中で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」という用語は、配列中に通常存在するアミノ酸の、同様のサイズ、電荷、または極性の異なるアミノ酸による置換をいう。保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン及びロイシンなどの非極性（疎水性）残基の別の非極性残基への置換が挙げられる。同様に、保存的置換の例としては、アルギニンとリジンの間、グルタミンとアスパラギンの間、グリシンとセリンの間などの、ある極性（親水性）残基の別のものへの置換が挙げられる。さらに、リジン、アルギニンもしくはヒスチジンなどの塩基性残基の別のものへの置換、またはアスパラギン酸またはグルタミン酸などの1つの酸性残基の別の酸性残基への置換は、保存的置換のさらなる例であ

10

20

30

40

50

る。非保存的置換の例としては、システイン、グルタミン、グルタミン酸もしくはリジンなどの極性（親水性）残基の代わりに、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、メチオニンなどの非極性（疎水性）アミノ酸残基の置換及び／または非極性残基の場合は極性残基の置換が挙げられる。

【0209】

ポリペプチドに言及するときの「挿入変異体」とは、天然または出発配列中の特定の位置のアミノ酸に直接隣接して挿入された1つ以上のアミノ酸を有するものである。アミノ酸に「直接隣接する」とは、そのアミノ酸のアルファ-カルボキシ官能基またはアルファ-アミノ官能基のいずれかに結合していることを意味する。

【0210】

ポリペプチドに言及する場合の「欠失変異体」は、天然のまたは出発アミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸が除去されたものである。通常、欠失変異体は、分子の特定の領域において1つ以上のアミノ酸が欠失しているであろう。

【0211】

ポリペプチドに言及する場合の「共有結合誘導体」としては、有機タンパク質または非タンパク質誘導体誘導体化剤を用いた天然または出発タンパク質の修飾、及び／または翻訳後修飾が挙げられる。共有結合修飾は、伝統的には、タンパク質の標的アミノ酸残基を、選択された側鎖もしくは末端残基と反応し得る有機誘導体化剤と反応させることによって、または選択された組換え宿主細胞において機能する翻訳後修飾の機構を利用することによって導入される。得られた共有結合誘導体は、生物学的活性、免疫アッセイ、または組換え糖タンパク質の免疫親和性精製のための抗タンパク質抗体の調製に重要な残基を同定することに向けられたプログラムにおいて有用である。そのような修飾は、当該技術分野の範囲内であり、過度の実験をすることなく行われる。

【0212】

特定の翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミニル及びアスパラギニル残基はしばしば翻訳後に対応するグルタミル及びアスパルチル残基に脱アミド化される。あるいは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も、本発明に従って製造されたポリペプチド中に存在し得る。

【0213】

他の翻訳後修飾としては、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のアルファアミノ基のメチル化が挙げられる (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79 - 86 (1983))。

【0214】

ポリペプチドに関して本明細書で使用される場合、「ドメイン」という用語は、1つ以上の同定可能な構造的または機能的特徴または特性（例えば、タンパク質-タンパク質相互作用の部位として働く結合能力）を有するポリペプチドのモチーフを指す。

【0215】

ポリペプチドに関して本明細書中で使用される場合、アミノ酸ベースの実施形態に関する「部位」という用語は、「アミノ酸残基」及び「アミノ酸側鎖」と同義的に使用される。ある部位は、本発明のポリペプチドに基づく分子内で修飾、操作、変更、誘導体化または多様化され得るペプチドまたはポリペプチド内の位置を表す。

【0216】

本明細書中で使用される場合、「末端の」または「末端」という用語は、ポリペプチドに言及する場合、ペプチドまたはポリペプチドの末端を指す。そのような末端は、ペプチドまたはポリペプチドの最初または最後の部位だけに限定されず、末端領域にさらなるアミノ酸を含んでもよい。本発明のポリペプチドベースの分子は、N末端（遊離アミノ基（

10

20

30

40

50

NH<sub>2</sub>)を有するアミノ酸で終結)及びC末端(遊離カルボキシル基(COOH)を有するアミノ酸で終結)の両方を有することを特徴とし得る。本発明のタンパク質は、いくつかの場合において、ジスルフィド結合によってまたは非共有結合力(マルチマー、オリゴマー)によって一緒にされた複数のポリペプチド鎖から構成されている。これらの種類のタンパク質は、複数のN末端及びC末端を有するであろう。あるいは、ポリペプチドの末端は、場合によっては有機複合体などの非ポリペプチド系部分で開始または終了するように修飾されてもよい。

#### 【0217】

いずれかの特徴が本発明のRNAによってコードされるポリペプチドの所望の成分として同定または定義されると、これらの特徴のいくつかの操作及び/または修飾のいずれかを、移動、交換、反転、欠失、ランダム化または複製によって行ってもよい。さらに、特徴の操作が本発明の分子に対する修飾と同じ結果をもたらし得ることが理解される。例えば、全長未満の分子をコードするように核酸を修飾するのと同様に、ドメインを欠失させることを含む操作は、分子の長さの変更をもたらすであろう。

#### 【0218】

修飾及び操作は、それだけに限らないが、部位特異的突然変異誘発などの当技術分野において公知の方法によって達成してもよい。次いで、得られた修飾分子を、本明細書に記載のものなどのインビトロまたはインビボアッセイ、または当技術分野で公知の他の任意の適切なスクリーニングアッセイを用いて活性について試験してもよい。

#### 【0219】

##### 製剤/薬学的組成物

本発明は、ポリヌクレオチド及びそれらの医薬組成物を、任意選択的に1つ以上の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて提供する。薬学的組成物は、任意選択的に1つ以上の追加の活性物質、例えば、治療的及び/または予防的に活性な物質を含んでもよい。本発明の薬学的組成物は、無菌であっても、及び/または発熱物質を含まないものであってもよい。製剤及び/または薬剤の製造における一般的な考慮事項は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)に見出され得る。

#### 【0220】

いくつかの実施形態では、組成物は、ヒト、ヒト患者または対象に投与される。本開示の目的のために、「活性成分」という句は、一般に、本明細書に記載されるように送達されるポリヌクレオチド、例えば、mRNAをコードするポリヌクレオチドを指す。

#### 【0221】

本明細書に記載の医薬組成物の製剤は、薬理学の分野において公知であるか、または今後開発される任意の方法によって調製される場合もある。一般に、そのような調製方法は、活性成分を賦形剤及び/または1つ以上の他の副成分と会合させ、次いで必要に応じて及び/または望ましい場合には生成物を、望ましい単回または複数回投与単位に分割、成形及び/または包装するステップを包含する。

#### 【0222】

本発明による医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、及び/または任意の追加の成分の相対量は、治療される対象の同一性、大きさ、及び/または状態に応じて、さらに組成物が投与される経路に応じて変化する。例として、この組成物は、0.1%~100%、例えば0.5~50%、1~30%、5~80%、少なくとも80%(w/w)の活性成分を含み得る。

#### 【0223】

本発明のポリヌクレオチドを、1つ以上の賦形剤を用いて製剤化して、以下を行ってもよい:(1)安定性を増大する;(2)細胞トランスフェクションを増大させる;(3)持続放出または遅延放出を可能にする(例えばデポ製剤から);(4)生体内分布を変える(例えば、特定の組織または細胞型を標的とする);(5)インビボでコードされたタ

10

20

30

40

50

ンパク質の翻訳を増大させるか；及び／または（６）インビボでコードされたタンパク質の放出プロファイルを変える。あらゆる溶媒、分散媒体、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散剤または懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、防腐剤、賦形剤などの従来の賦形剤に加えて、本発明の賦形剤としては、限定するものではないが、脂質、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポブックス、コア-シェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドでトランスフェクトした細胞、ヒアルロニダーゼ、ナノ粒子模倣物、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

#### 【０２２４】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子は、１つ以上のリポソーム、リポブックス、または脂質ナノ粒子を使用して製剤化してもよい。一実施形態では、核酸分子の医薬組成物は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む。いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子はＭＣ３ベースの脂質ナノ粒子である。

10

#### 【０２２５】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、脂質-ポリカチオン複合体に製剤化してもよい。脂質-ポリカチオン複合体の形成は、当該分野において公知の方法によって達成される。非限定的な例として、ポリカチオンとしては、限定するものではないが、ポリリジン、ポリオルニチン及び／またはポリアルギニンなどのカチオン性ペプチドまたはポリペプチドを含み得る。別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、限定するものではないが、コレステロールまたはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）などの非カチオン性脂質をさらに含み得る、脂質-ポリカチオン複合体中に製剤化され得る。

20

#### 【０２２６】

リポソーム製剤は、限定するものではないが、カチオン性脂質成分の選択、カチオン性脂質飽和度、ＰＥＧ化の性質、全成分の比率、及びサイズなどの生物物理学的パラメーターの影響を受ける場合がある。Simpleら（Simple et al. Nature Biotech. 2010 28:172-176；その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）による一例では、リポソーム製剤は、５７．１％のカチオン性脂質、７．１％のジパルミトイルホスファチジルコリン、３４．３％のコレステロール、及び１．４％のＰＥＧ-c-DMAから構成された。別の例として、カチオン性脂質の組成を変えることは、様々な抗原提示細胞にsiRNAをより効果的に送達し得る（Basha et al. Mol Ther. 2011 19:2186-2200；その全体が参照により本明細書に組み入れられる）。いくつかの実施形態では、リポソーム製剤は、約３５～約４５％のカチオン性脂質、約４０％～約５０％のカチオン性脂質、約５０％～約６０％のカチオン性脂質及び／または約５５％～約６５％のカチオン性脂質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、リポソーム中の脂質対RNAの比は、約５：１～約２０：１、約１０：１～約２５：１、約１５：１～約３０：１、及び／または少なくとも３０：１であってもよい。

30

#### 【０２２７】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤中のＰＥＧの比率を増減してもよいし、及び／またはＰＥＧ脂質の炭素鎖長をＣ１４からＣ１８に変更してＬＮＰ製剤の薬物動態及び／または生体分布を変えてもよい。非限定的な例として、ＬＮＰ製剤は、約０．５％～約３．０％、約１．０％～約３．５％、約１．５％～約４．０％、約２．０％～約４．５％、約２．５％～約５．０％、及び／または約３．０％～約６．０％の脂質モル比のＰＥＧ-c-DOMG（R-3-[（-メトキシ-ポリ（エチレングリコール）2000）カルバモイル）]-1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-アミン）（本明細書ではＰＥＧ-DOMGとも呼ばれる）をカチオン性脂質、DSPC及びコレステロールと比較して含んでもよい。別の実施形態では、ＰＥＧ-c-DOMGは、限定するものではないが、ＰＥＧ-DSG（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール）、ＰＥＧ-DMG（1,2-ジミリスチル-sn-グリセロール）及び／またはＰＥＧ-DPG（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール）などの、ＰＥＧ脂質で置き換えてもよい。カチオン性

40

50



脂質は、限定するものではないが、DLin-MC3-DMA、DLin-DMA、C12-200及びDLin-KC2-DMAなどの当該分野で公知の任意の脂質から選択されてもよい。

#### 【0228】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの脂質を含み得るナノ粒子に製剤化される。この脂質は、限定するものではないが、DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG、PEG化脂質及びアミノアルコール脂質から選択され得る。別の態様では、脂質は、限定するものではないが、DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA及びアミノアルコール脂質などのカチオン性脂質であってもよい。アミノアルコールカチオン性脂質は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20130150625号に記載されている脂質であってもよいし、及び/またはそれに記載の方法によって製造された脂質であってもよい。非限定的な例として、カチオン性脂質は、2-アミノ-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]-2-{[(9Z,2Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]メチル}プロパン-1-オール(US20130150625中の化合物1);2-アミノ-3-[(9Z)-オクタデカ-9-エン-1-イルオキシ]-2-{[(9Z)-オクタデカ-9-エン-1-イルオキシ]メチル}プロパン-1-オール(US20130150625中の化合物2);2-アミノ-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]-2-[(オクチルオキシ)メチル]プロパン-1-オール(US20130150625中の化合物3);及び2-(ジメチルアミノ)-3-[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]-2-{[(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン-1-イルオキシ]メチル}プロパン-1-オール(US20130150625中の化合物4);またはその任意の薬学的に許容される塩もしくは立体異性体であってもよい。

#### 【0229】

脂質ナノ粒子製剤は、典型的には脂質、特にイオン化可能カチオン性脂質、例えば2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノブチレート(DLin-MC3-DMA)、またはジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L319)を含み、さらに中性脂質、ステロール及び粒子凝集を減少し得る分子、例えばPEGまたはPEG修飾脂質を含む。

#### 【0230】

一実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、(i)2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノブチレート(DLin-MC3-DMA)、及びジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L319)からなる群より選択される少なくとも1つの脂質;(ii)DSPC、DPPC、POPC、DOPE及びSMから選択される中性脂質;(iii)ステロール、例えばコレステロール;ならびに(iv)約20~60%のカチオン性脂質:5~25%の中性脂質:25~55%のステロール;0.5~15%のPEG-脂質のモル比のPEG-脂質、例えば、PEG-DMGまたはPEG-cDMAから本質的になる。

#### 【0231】

一実施形態では、この製剤は、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノブチレート(DLin-MC3-DMA)、及びジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオ

エート（L 3 1 9）から選択されるカチオン性脂質をモル基準で約 2 5 % ~ 約 7 5 % まで、例えば、モル基準で、約 3 5 ~ 約 6 5 %、約 4 5 ~ 約 6 5 %、約 6 0 %、約 5 7 . 5 %、約 5 0 % または約 4 0 % 含む。

【 0 2 3 2 】

一実施形態では、この製剤は、中性脂質をモル基準で約 0 . 5 % ~ 約 1 5 %、例えばモル基準で約 3 ~ 約 1 2 %、約 5 ~ 約 1 0 %、または約 1 5 %、約 1 0 %、または約 7 . 5 % 含む。例示的な中性脂質としては、限定するものではないが、D S P C、P O P C、D P P C、D O P E 及び S M が挙げられる。一実施形態では、この製剤は、ステロールをモル基準で約 5 % ~ 約 5 0 %（例えば、モル基準で約 1 5 ~ 約 4 5 %、約 2 0 ~ 約 4 0 %、約 4 0 %、約 3 8 . 5 %、約 3 5 % または約 3 1 %）含む。例示的なステロールはコレステロールである。一実施形態では、この製剤は、モル基準で約 0 . 5 % ~ 2 0 % の P E G または P E G 修飾脂質（例えば、モル基準で約 0 . 5 ~ 約 1 0 %、約 0 . 5 ~ 約 5 %、約 1 . 5 %、約 0 . 5 %、約 1 . 5 %、約 3 . 5 %、または約 5 %）を含む。一実施形態では、P E G または P E G 修飾脂質は、2 , 0 0 0 D a の平均分子量の P E G 分子を含む。他の実施形態では、P E G または P E G 修飾脂質は、2 , 0 0 0 未満、例えば約 1 , 5 0 0 D a、約 1 , 0 0 0 D a、または約 5 0 0 D a の平均分子量の P E G 分子を含む。例示的な P E G 修飾脂質としては、限定するものではないが、P E G - ジステアロイルグリセロール（P E G - D M G）（本明細書では P E G - C 1 4 または C 1 4 - P E G と呼ばれる）、P E G - c D M A が挙げられる。

【 0 2 3 3 】

一実施形態では、本発明の製剤は、2 , 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [ 1 , 3 ] - ジオキソラン（D L i n - K C 2 - D M A）、ジリノレイル - メチル - 4 - ジメチルアミノブチレート（D L i n - M C 3 - D M A）、及びジ（（Z）- ノナ - 2 - エン - 1 - イル）9 - （（4 - （ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（L 3 1 9）から選択される 2 5 ~ 7 5 % のカチオン性脂質、0 . 5 ~ 1 5 % の中性脂質、5 ~ 5 0 % のステロール、及び 0 . 5 ~ 2 0 % の P E G または P E G 修飾脂質をモル基準で含む。

【 0 2 3 4 】

一実施形態では、本発明の製剤は、2 , 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [ 1 , 3 ] - ジオキソラン（D L i n - K C 2 - D M A）、ジリノレイル - メチル - 4 - ジメチルアミノブチレート（D L i n - M C 3 - D M A）、及びジ（（Z）- ノナ - 2 - エン - 1 - イル）9 - （（4 - （ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（L 3 1 9）、から選択される 3 5 ~ 6 5 % のカチオン性脂質、3 ~ 1 2 % の中性脂質、1 5 ~ 4 5 % のステロール、及び 0 . 5 ~ 1 0 % の P E G または P E G 修飾脂質をモル基準で含む。

【 0 2 3 5 】

一実施形態では、本発明の製剤は、2 , 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [ 1 , 3 ] - ジオキソラン（D L i n - K C 2 - D M A）、ジリノレイル - メチル - 4 - ジメチルアミノブチレート（D L i n - M C 3 - D M A）、及びジ（（Z）- ノナ - 2 - エン - 1 - イル）9 - （（4 - （ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（L 3 1 9）から選択される 4 5 ~ 6 5 % のカチオン性脂質、5 ~ 1 0 % の中性脂質、2 5 ~ 4 0 % のステロール、及び 0 . 5 ~ 1 0 % の P E G または P E G 修飾脂質をモル基準で含む。

【 0 2 3 6 】

一実施形態では、本発明の製剤は、2 , 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [ 1 , 3 ] - ジオキソラン（D L i n - K C 2 - D M A）、ジリノレイル - メチル - 4 - ジメチルアミノブチレート（D L i n - M C 3 - D M A）、及びジ（（Z）- ノナ - 2 - エン - 1 - イル）9 - （（4 - （ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（L 3 1 9）から選択される約 6 0 % のカチオン性脂質、約 7 . 5 % の中性脂質、約 3 1 % のステロール、及び約 1 . 5 % の P E G または P E G 修飾脂質をモル基準で

含む。

【0237】

一実施形態では、本発明の製剤は、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノブチレート(DLin-MC3-DMA)、及びジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L319)から選択される約50%のカチオン性脂質、約10%の中性脂質、約38.5%のステロール、及び約1.5%のPEGまたはPEG修飾脂質をモル基準で含む。

【0238】

一実施形態では、本発明の製剤は、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノブチレート(DLin-MC3-DMA)、及びジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L319)から選択される約50%のカチオン性脂質、約10%の中性脂質、約35%のステロール、約4.5%または約5%のPEGまたはPEG修飾脂質、及び約0.5%の標的脂質をモル基準で含む。

【0239】

一実施形態では、本発明の製剤は、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノブチレート(DLin-MC3-DMA)、及びジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L319)から選択される約40%のカチオン性脂質、約15%の中性脂質、約40%のステロール、及び約5%のPEGまたはPEG修飾脂質をモル基準で含む。

【0240】

一実施形態では、本発明の製剤は、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-KC2-DMA)、ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノブチレート(DLin-MC3-DMA)、及びジ((Z)-ノナ-2-エン-1-イル)9-((4-(ジメチルアミノ)ブタノイル)オキシ)ヘプタデカンジオエート(L319)から選択される約57.2%のカチオン性脂質、約7.1%の中性脂質、約34.3%のステロール、及び約1.4%のPEGまたはPEG修飾脂質をモル基準で含む。

【0241】

一実施形態では、本発明の製剤は、PEG脂質から選択される約57.5%のカチオン性脂質であるPEG-cDMA(PEG-cDMAは、Reyes et al.(J. Controlled Release, 107, 276-287(2005))(その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる)にさらに考察されている)、約7.5%の中性脂質、約31.5%のステロール、及び約3.5%のPEGまたはPEG修飾脂質をモル基準で含む。

【0242】

好ましい実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、モル比で約20~70%のカチオン性脂質:5~45%の中性脂質:20~55%のコレステロール:0.5~15%のPEG修飾脂質;より好ましくは、約20~60%のモル比のカチオン性脂質:5~25%の中性脂質:25~55%のコレステロール:0.5~15%のPEG修飾脂質の脂質混合物から本質的になる。

【0243】

特定の実施形態では、脂質モル比は、約50/10/38.5/1.5(モル%カチオン性脂質/中性脂質、例えば、DSPC/コレステロール/PEG修飾脂質、例えば、PEG-DMG、PEG-DSGまたはPEG-DPG)、57.2/7.1/34.3/1.4(モル%カチオン性脂質/中性脂質、例えばDPPC/コレステロール/PEG修

10

20

30

40

50

飾脂質、例えばPEG-cDMA)、40/15/40/5(モル%カチオン性脂質/中性)脂質、例えばDSPC/コレステロール/PEG修飾脂質、例えばPEG-DMG)、50/10/35/4.5/0.5(モル%カチオン性脂質/中性脂質、例えば、DSPC/コレステロール/PEG修飾脂質、例えば、PEG-DSG)、50/10/35/5(カチオン性脂質/中性脂質、例えばDSPC/コレステロール/PEG修飾脂質、例えばPEG-DMG)、40/10/40/10(モル%カチオン性脂質/中性脂質、例えばDSPC/コレステロール/PEG修飾脂質、例えばPEG-DMGまたはPEG-cDMA)、35/15/40/10(mol%カチオン性脂質/中性脂質、例えばDSPC/コレステロール/PEG-修飾脂質、例えば、PEG-DMGまたはPEG-cDMA)または52/13/30/5(モル%カチオン性脂質/中性脂質、例えばDSPC/コレステロール/PEG修飾脂質、例えばPEG-DMGまたはPEG-cDMA)である。

10

#### 【0244】

例示的な脂質ナノ粒子組成物及びそれを作製する方法は、例えば、Semple et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:172-176; Jayarama et al. (2012)、Angew. Chem. Int. Ed., 51:8529-8533; 及びMaier et al. (2013) Molecular Therapy 21, 1570-1578(それぞれの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される。

#### 【0245】

20

一実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子製剤は、カチオン性脂質、PEG脂質、及び構造脂質を含んでもよく、任意選択的に非カチオン性脂質を含んでもよい。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約40~60%のカチオン性脂質、約5~15%の非カチオン性脂質、約1~2%のPEG脂質、及び約30~50%の構造的脂質を含み得る。別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約50%のカチオン性脂質、約10%の非カチオン性脂質、約1.5%のPEG脂質、及び約38.5%の構造脂質を含み得る。さらに別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約55%のカチオン性脂質、約10%の非カチオン性脂質、約2.5%のPEG脂質、及び約32.5%の構造脂質を含み得る。一実施形態では、カチオン性脂質は、限定するものではないが、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA及びL319などの、本明細書に記載の任意のカチオン性脂質であり得る。

30

#### 【0246】

一実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子製剤は、4成分脂質ナノ粒子であってもよい。脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、PEG脂質及び構造脂質を含み得る。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約40~60%のカチオン性脂質、約5~15%の非カチオン性脂質、約1~2%のPEG脂質、及び約30~50%の構造脂質を含んでもよい。別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約50%のカチオン性脂質、約10%の非カチオン性脂質、約1.5%のPEG脂質、及び約38.5%の構造脂質を含んでもよい。さらに別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約55%のカチオン性脂質、約10%の非カチオン性脂質、約2.5%のPEG脂質、及び約32.5%の構造脂質を含んでもよい。一実施形態では、カチオン性脂質は、限定するものではないが、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA及びL319などの本明細書に記載の任意のカチオン性脂質であってもよい。

40

#### 【0247】

一実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子製剤は、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、PEG脂質及び構造脂質を含んでもよい。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約50%のカチオン性脂質DLin-KC2-DMA、約10%の非カチオン性脂質DSPC、約1.5%のPEG脂質PEG-DOMG及び約38.5%の構造脂質コレステロールを含む。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約50%のカチオン性脂質DLin-MC3-DMA、約10%の非カチオン性脂質DSPC、約1.5%のPEG脂質P

50

EG-DOMG及び約38.5%の構造脂質コレステロールを含む。非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約50%のカチオン性脂質DLin-MC3-DMA、約10%の非カチオン性脂質DSPC、約1.5%のPEG脂質PEG-DMG及び約38.5%の構造脂質コレステロールを含む。さらに別の非限定的な例として、脂質ナノ粒子は、約55%のカチオン性脂質L319、約10%の非カチオン性脂質DSPC、約2.5%のPEG脂質PEG-DMG、及び約32.5%の構造脂質コレステロールを含む。

【0248】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、直径が約10～約100nm、例えば、限定するものではないが、約10～約20nm、約10～約30nm、約10～約40nm、約10～約50nm、約10～約60nm、約10～約70nm、約10～約80nm、約10～約90nm、約20～約30nm、約20～約40nm、約20～約50nm、約20～約60nm、約20～約70nm、約20～約80nm、約20～約90nm、約20～約100nm、約30～約40nm、約30～約50nm、約30～約60nm、約30～約70nm、約30～約80nm、約30～約90nm、約30～約100nm、約40～約50nm、約40～約60nm、約40～約70nm、約40～約80nm、約40～約90nm、約40～約100nm、約50～約60nm、約50～約70nm、約50～約80nm、約50～約90nm、約50～約100nm、約60～約70nm、約60～約80nm、約60～約90nm、約60～約100nm、約70～約80nm、約70～約90nm、約70～約100nm、約80～約90nm、約80～約100nm及び/または約90～約100nmの脂質ナノ粒子に製剤化され得る。

【0249】

一実施形態では、脂質ナノ粒子は、約10～500nmの直径を有し得る。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、100nm超、150nm超、200nm超、250nm超、300nm超、350nm超、400nm超、450nm超、500nm超、550nm超、600nm超、650nm超、700nm超、750nm超、800nm超、850nm超、900nm超、950nm超または1000nm超の直径を有してもよい。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質ナノ粒子は、50～150nmの平均直径を有する。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質ナノ粒子は、80～100nmの平均直径を有する。

【0250】

本開示による医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、及び/または任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の同一性、大きさ、及び/または状態に応じて、さらに組成物を投与する経路に応じて変化してもよい。例えば、組成物は、0.1%～99%(w/w)の活性成分を含んでもよい。例として、組成物は、0.1%～100%、例えば0.5～50%、1～30%、5～80%、少なくとも80%(w/w)の活性成分を含んでもよい。

【0251】

一実施形態では、この組成物は、MC3、コレステロール、DSPC及びPEG2000-DMG、緩衝剤クエン酸三ナトリウム、スクロース、ならびに注射用水を含む脂質ナノ粒子に製剤化された、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含有する。非限定的な例として、この組成物は、以下を含む：2.0mg/mLの製剤原料、21.8mg/mLのMC3、10.1mg/mLのコレステロール、5.4mg/mLのDSPC、2.7mg/mLのPEG2000-DMG、5.16mg/mLのクエン酸三ナトリウム、71mg/mLのスクロース及び約1.0mLの注射用水。

【0252】

本発明のポリヌクレオチドは、治療上有効な結果をもたらす任意の経路によって投与してもよい。本発明は、それを必要とする対象に本発明に従ってポリヌクレオチドを投与することを包含する方法を提供する。必要とされる正確な量は、対象の種、年齢、及び全身状態、疾患の重篤度、特定の組成物、その投与方法、その活動方法などに応じて、対象ごとに異なるであろう。本発明に従う組成物は、典型的には投与の容易さ及び投薬量の均一

性のために単位剤形で製剤化される。しかしながら、本発明の組成物の1日の総使用量は、正しい医学的判断の範囲内で主治医によって決定され得ることが理解されるであろう。任意の特定の患者に対する具体的な治療上有効、予防上有効、または適切な画像化投与量レベルは、処置される障害及び障害の重症度；用いた特定の化合物の活性；採用した特定の組成物；患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別及び食事；採用した特定の化合物の投与時間、投与経路、及び排泄速度；処置の期間；使用される特定の化合物と組み合わせるまたは同時に使用される薬物；ならびに医学の分野で周知の同様の要因を含む様々な要因に依存するであろう。

#### 【0253】

特定の実施形態では、本発明による組成物は、所望の治療的、診断的、予防的、または画像化を得るために、1日あたり1回以上、1日あたり対象の体重1kgあたり、約0.0001mg/kg～約100mg/kg、約0.001mg/kg～約0.05mg/kg、約0.005mg/kg～約0.05mg/kg、約0.001mg/kg～約0.005mg/kg、約0.05mg/kg～約0.5mg/kg、約0.01mg/kg～約50mg/kg、約0.1mg/kg～約40mg/kg、約0.5mg/kg～約30mg/kg、約0.01mg/kg～約10mg/kg、約0.1mg/kg～約10mg/kg、または約1mg/kg～約25mg/kgを送達するのに十分な用量レベルで投与され得る。所望の投与量は、1日3回、1日2回、1日1回、隔日、3日ごと、毎週、2週間ごと、3週間ごと、または4週間ごとに送達され得る。特定の実施形態では、所望の投与量は、複数回投与（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14またはそれ以上の投与）を使用して送達され得る。複数回投与を採用する場合、本明細書に記載の投与計画のような分割投与計画を使用してもよい。

#### 【0254】

本明細書に記載のポリヌクレオチド医薬組成物は、鼻腔内、気管内、または注射用（例えば、静脈内、眼内、硝子体内、筋肉内、皮内、心臓内、腹腔内、及び皮下）のような、本明細書に記載の剤形に製剤化してもよい。

#### 【0255】

本発明は、ポリヌクレオチド（例えば、RNA分子）ならびに任意選択的に1つ以上の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせたポリヌクレオチド組成物及び/または複合体を含む医薬組成物を提供する。

#### 【0256】

本発明は、ポリヌクレオチド（例えば、RNA分子）ならびに関連する医薬組成物及び複合体を、任意選択的に1つ以上の医薬上許容される賦形剤と組み合わせて提供する。薬学的組成物は、1つ以上の追加の活性物質、例えば治療的及び/または予防的活性物質を任意選択的に含んでもよい。本発明の薬学的組成物は、無菌であっても、及び/または発熱物質を含まないものであってもよい。医薬品の製剤及び/または製造における一般的な考慮事項は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005（その全体が参照により本明細書に組み入れられる）に見出され得る。

#### 【0257】

いくつかの実施形態では、組成物は、ヒト、ヒト患者または対象に投与される。本開示の目的のために、「活性成分」という句は、一般に、本明細書に記載されるように送達されるべきポリヌクレオチド（例えば、RNA分子）を指す。

#### 【0258】

本明細書で提供される薬学的組成物の説明は、主にヒトへの投与に適した薬学的組成物を対象としているが、そのような組成物は一般に任意の他の動物、例えば非ヒト動物、例えば、非ヒト哺乳動物への投与に適していると当業者には理解されるだろう。組成物を様々な動物への投与に適したものにさせるための、ヒトへの投与に適した薬学的組成物の修飾は十分に理解されており、当業者の獣医薬理学者は、存在する場合、単に通常の実験を

用いてそのような修飾を設計及び／または実施し得る。薬学的組成物の投与が企図される対象としては、限定するものではないが、ヒト及び／または他の霊長類；哺乳動物、例としては、商業的に関連のある哺乳動物、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウス、及び／またはラットなど；及び／または鳥類、例としては、商業的に関連する鳥、例えば、家禽、ニワトリ、カモ、ガチョウ及び／または七面鳥が挙げられる。

#### 【0259】

本明細書に記載の薬学的組成物の製剤は、薬理学の分野において公知であるかまたは今後開発される任意の方法によって調製され得る。一般に、そのような調製方法は、活性成分を賦形剤及び／または1つ以上の他の副成分と会合させ、次いで必要に応じて及び／または望ましい場合にはその生成物を、望ましい単回または複数回投与単位に分割、成形及び／または包装するステップを包含する。

10

#### 【0260】

本発明による薬学的組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤、及び／または任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の同一性、大きさ、及び／または状態に応じて、さらにその組成物が投与される経路に応じて変化する。例として、この組成物は、0.1%～100%、例えば0.5～50%、1～30%、5～80%、少なくとも80% (w/w) の活性成分を含んでもよい。

#### 【0261】

本発明は、その適用において、以下の説明に記載されるかまたは図面に示される構成の詳細及び構成要素の配置に限定されない。本発明は他の実施形態が可能であり、様々な方法で実施または実行されてもよい。また、本明細書で使用されている表現及び用語は説明を目的としており、限定と見なされるべきではない。本明細書における「含む (including)」、「含む (comprising)」、または「有する」、「含有する」、「包含する」、及びそれらの変形の使用は、その後に列挙される項目及びその等価物、ならびに追加の項目を包含することを意味する。

20

#### 【実施例】

#### 【0262】

##### 実施例1．ポリヌクレオチドの製造

本発明によれば、ポリヌクレオチド及び／またはその部分もしくは領域の製造は、「Manufacturing Methods for Production of RNA Transcripts」(代理人整理番号M500)と題する、2013年3月15日に出願されたWO2014/152027(その内容が、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に教示される方法を利用して達成され得る。精製方法は、国際特許出願WO2014/152030号及びWO2014/152031号(それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に教示されている方法を包含し得る。

30

#### 【0263】

ポリヌクレオチドの検出及び特徴付け方法は、WO2014/144039(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)に教示されているように行ってもよい。

#### 【0264】

本開示のポリヌクレオチドの特徴付けは、ポリヌクレオチドマッピング、逆転写酵素配列決定、電荷分布分析、及びRNA不純物の検出からなる群より選択される手順を使用して達成してもよく、ここで特徴付けは、RNA転写物配列を決定すること、RNA転写物の純度を決定すること、またはRNA転写物の荷電異質性を決定することを包含する。そのような方法は、例えば、WO2014/144711及びWO2014/144767に教示されており、そのそれぞれの内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

#### 【0265】

##### 実施例2．キメラポリヌクレオチド合成 序

本発明によれば、三リン酸化学を用いてキメラポリヌクレオチドの2つの領域または部

50

分を接合しても、または連結してもよい。

【0266】

この方法によれば、100ヌクレオチド以下の最初の領域または部分は、5'ーリン酸及び末端の3' de s O HまたはブロックされたO Hを用いて化学的に合成される。この領域が80ヌクレオチドより長い場合、それはライゲーション用の2本鎖として合成され得る。

【0267】

最初の領域または部分がインビトロ転写 ( I V T ) を使用して非位置的に修飾された領域または部分として合成される場合、5'ーリン酸の変換とそれに続く3'末端のキャッピングが続く場合がある。

10

【0268】

ーリン酸保護基は、当該分野で公知の任意の保護基から選択され得る。

【0269】

キメラポリヌクレオチドの第2の領域または部分は、化学合成法またはI V T法のいずれを用いて合成してもよい。I V T法は、修飾キャップを有するプライマーを利用し得るRNAポリメラーゼを含み得る。あるいは、最大130ヌクレオチドのキャップを化学的に合成し、そしてI V T領域またはその一部に結合してもよい。

【0270】

ライゲーション方法については、DNA T4リガーゼによるライゲーション、それに続くDNA seによる処理は容易に連結を回避するはずであることに留意のこと。

20

【0271】

キメラポリヌクレオチド全体をリン酸-糖骨格で製造する必要はない。領域または部分の1つがポリペプチドをコードする場合、そのような領域または部分はリン酸-糖骨格を含むことが好ましい。

【0272】

次いで、ライゲーションは、任意の公知のクリックケミストリー、オルソクリックケミストリー、ソルリンク ( s o l u l i n k )、または当業者に公知の他のバイオコンジュゲートケミストリーを使用して行われる。

【0273】

合成経路

30

キメラポリヌクレオチドは、一連の出発セグメントを用いて作製される。そのようなセグメントとしては以下が挙げられる：

( a ) 通常の3' O Hからなる、キャップされ保護された5'セグメント ( S E G . 1 )

( b ) ポリペプチドのコード領域を含み得、正常な3' O Hを含んでいる5'三リン酸セグメント ( S E G . 2 )

( c ) コルジセピンを含む、または3' O Hを含まない、キメラポリヌクレオチドの3'末端 (例えば、テール) の5'ーリン酸セグメント ( S E G . 3 )

【0274】

合成後 ( 化学的またはI V T )、セグメント3 ( S E G . 3 ) をコルジセピンで処理し、次にピロホスファターゼで処理して5'ーリン酸を生成する。

40

【0275】

次にセグメント2 ( S E G . 2 ) を、RNAリガーゼを用いてS E G . 3に連結する。次いで、連結したポリヌクレオチドを精製し、ピロホスファターゼで処理して二リン酸を切断する。次いで、処理したS E G . 2 - S E G . 3構築物を精製し、そしてS E G . 1を5'末端に連結させる。キメラポリヌクレオチドのさらなる精製ステップを実施してもよい。

【0276】

キメラポリヌクレオチドがポリペプチドをコードする場合、連結されたまたは接続されたセグメントは、5' U T R ( S E G . 1 )、オープンリーディングフレームまたはOR

50



F ( S E G . 2 ) 及び 3 ' U T R + ポリ A ( S E G . 3 ) として表され得る。

【 0 2 7 7 】

各ステップの収率は、90 ~ 95 % 程度であってもよい。

【 0 2 7 8 】

実施例 3 : DNA 鋳型の製造のための P C R

c D N A の調製のための P C R 手順は、K a p a B i o s y s t e m s ( W o b u r n , M A ) による 2 × K A P A H I F I ( 商標 ) H o t S t a r t R e a d y M i x を使用して行われる。このシステムには、2 × K A P A R e a d y M i x 12 . 5 μ l ; フォワードプライマー ( 10 u M ) 0 . 75 μ l ; リバースプライマー ( 10 u M ) 0 . 75 μ l ; 鋳型 c D N A - 100 n g ; 及び 25 . 0 μ l に希釈した d H <sub>2</sub> O を含む。反応条件は 95 で 5 分間であり、そして 98 で 20 秒間、次いで 58 で 15 秒間、次いで 72 で 45 秒間、次いで 72 で 5 分間、次いで 4 の 25 サイクルである。

10

【 0 2 7 9 】

I n v i t r o g e n の P U R E L I N K ( 商標 ) P C R M i c r o K i t ( C a r l s b a d , C A ) を製造元の指示 ( 最大 5 μ g ) に従って使用して反応液をクリーンアップする。より大きな反応は、より大きな容量を有する生成物を使用するクリーンアップを必要とするだろう。クリーンアップ後、N A N O D R O P ( 商標 ) を用いて c D N A を定量し、アガロースゲル電気泳動によって分析して c D N A が予想されるサイズであることを確認する。次いで、インビトロ転写反応に進む前に、c D N A を配列決定分析にかける。

20

【 0 2 8 0 】

実施例 4 . ショートモデル R N A - 1 の I V T 及び I F N - 分析

I V T 反応は、特定のヌクレオチドで「スパイク」され得、サイトカイン反応の混入物が最小限になり、収率が良くなる。あるプロセスでは、表 1 に示すように、他の N T P に対する G T P 比が増大し、総 N P T 負荷が高くなり、N T P : M g <sup>2+</sup> モル比が増大した。これらの特定のヌクレオチドは、ショートモデル R N A と呼ばれる。ショートモデル R N A の目的は、全長 R N A において観察された本発明の方法と同じサイトカインシグナル / 等モルの効果 ( 従来技術 ) を再現することであった。この構築物は、L C / M S ( 全長 R N A では現在実現可能ではなかった ) によって全長の不純物を検出するのに十分に小さかった。

30

【 0 2 8 1 】

【表 1】

表 1. ヌクレオチド製剤

	等モル	アルファ	GDP アルファ
[GDP] mM	0	0	30
[GTP] mM	7.5	30	15
[ATP] mM	7.5	15	15
[CTP] mM	7.5	7.5	7.5
[UTP] mM	7.5	7.5	7.5
総[Nuc] mM	30	60	75
[Mg <sup>2+</sup> ] mM	40	40	40
Nuc : Mg <sup>2+</sup>	0.75	1.50	1.88
有効 [リン酸 塩]	90	180	195
T7 (U/ $\mu$ l 反 応)	7	14	14

## 【0282】

2つの異なるIVTプロセスを使用して調製されたショートモデル転写物が、全長転写物について観察されたインビトロ(BJ線維芽細胞)IFN 反応を模倣するか否かを決定するために、独立した実験プロセス(すなわち、粗IVT、限外濾過、またはdT精製)研究を設定した。標的RNAと同じIVT条件下で、そして同じDNA鋳型二重鎖から産生されたサロゲートRNA、ショートモデルRNA-1を生成した。サイトカイン応答は、BJ線維芽細胞におけるIFN-アッセイにおける全長RNAの応答を模倣していた(図1)。等モルのIVTプロセスを使用して調製されたショートモデル転写物は、アルファIVTプロセスを使用して調製された材料よりも高いIFN 応答を有する。限外濾過及びdT精製の後、サイトカイン応答は保存された。

## 【0283】

さらに、ショートモデルRNA-1(シュードウリジンに修飾された全てのウリジン及び5'-O-メチルによって修飾された全てのシチジン)の不純物プロファイリングは、等モル過程における逆相補体(dsRNA)の存在を示したが、アルファ反応においては示さなかった。9つの異なる種が同定された: 2つの間で重なっているピークはアポーティブ種を表しているが、等モル製剤でのみ見られるピークは逆相補性種である。スクリーニングを、様々な量のウリジン及びシチジン修飾を有する種について行い、逆相補性種及びアポーティブ種を3つ全てに見出した(図2)。アポーティブ転写物は、センスであり、そして逆相補物はアンチセンス転写物である。IFN-レベルもまた3つの間で変動した(図2)。上部はG0=標準A、G、C、Uであり、中央は、G5=標準A、G、C及び1-メチルシュードUであり、下部は、G6=標準A、G、C及び5-メトキシウリジンである。3つの異なる化学において2つの異なるプロセスによって調製されたショートモデル転写物は、BJFアッセイにおける相違にもかかわらず、LCMSによる類似の不純物プロファイルを有し、異なる化学に対して鋭敏であるように思われる。

## 【0284】

モデル転写物及びインタクトな転写物のLCMS分析を、25で6時間のIVTによって調製した。短い転写物及び全長の転写物を、25で6時間、等モル及びアルファプロセスを使用して調製した(37、2時間である我々の通常のIVTではない)。低温IVT反応(<30)は、37よりも多量の逆相補体RNAを生成する。試料の不純

物プロファイルをLCMSによって分析した。両方のプロセスを使用して調製された試料は両方ともアポータティブ/切断型生成物を含んでいた。等モルプロセスを用いて調製された転写物は、様々な長さのポリU種を含んでいた。アルファプロセスは、等モルプロセスを使用して存在量が標準条件よりも大きかった25 においてもなお逆相補体の形成を軽減する(図3)。

#### 【0285】

相補的/アンチセンスRNAの検出

T7が新生転写RNAから重合するので、免疫刺激不純物は、RNA鋳型RNA転写によって引き起こされるように思われる。生成された相補的/アンチセンスRNA(dsRNA)は、混合塩基、ポリU成分、及び5'三リン酸(5'ppp)を示し、これは任意の塩基から開始する。RNA鋳型転写を実施した。qPCRによってインビトロ転写に必要な閾値未満であると決定されたDNA鋳型を除く、全てのIVT成分と共に、逆相精製hEPO G5(低温)を、4mg/mLでインキュベートして(インビトロ転写反応の典型的な収率と一致)て、RNA鋳型転写現象を探索した。その材料をUPLC及びインビトロBJF IFN アッセイにより分析した。UPLC分析によって、異常なRNA転写産物、そして最も顕著にはポリU種が(DNA鋳型の非存在下で)RNA鋳型転写を介して産生されることが実証された。RNA及び全てのIVT成分を用いて実施された反応は、IFN ホットであり、一方RNAを用いずに実施された反応はコールドであった。(図4)。

#### 【0286】

二本鎖RNAは、逆相(RP)精製転写RNAから除去してもよい。RNase III処理hEPO G5材料のキャピラリー電気泳動分析を実施した。hEPO G5を等モルまたはアルファ条件を用いて調製し、そして一部をRPにより精製した。次いでその試料を、RNase IIIで処理し、キャピラリー電気泳動により分析した。アルファプロセスによって調製された材料は、等モルプロセスによって調製されたものよりも少ないRNase III基質を含んでいた。RP精製は、等物質及びアルファ物質からRNase III基質の大部分を除去する。アルファプロセス及び逆相精製は、RNase III基質(例えば、dsRNA)における相乗的な減少を提供するように思われる(図5A)。RNase III処理hEPO G0材料のキャピラリー電気泳動分析を実施した。hEPO G0を、等モルプロセスを用いて調製し、そして一部をRPにより精製した。次いで、試料をRNase IIIで処理し、そしてキャピラリー電気泳動により分析した(青:処理済み;黒:未処理)。RP精製された材料は、RP精製されなかった材料よりも含んでいるRNase III基質が少なかった(最新技術)(図5B)。

#### 【0287】

RNase IIIは、dsRNA特異的ヌクレアーゼである。RNA調製物を、一定時間RNase III処理に供する。RNA純度/不純物プロファイルを、RNase III処理前後で比較し、HPLCまたはキャピラリー電気泳動によって測定する。分解された全長産物の量は、RNA調製物中に存在する二本鎖RNA不純物のレベルに比例した。見かけの大きさ/保持時間の変化によって示されるように分解された量は、RNase III基質の量と考えられた。dsRNAを含まない試料は、RNase III処理前後でほぼ同一の純度を示すはずである。かなりの量のdsRNAを含有する試料は、HPLCまたはキャピラリー電気泳動によって見られるように、未処理供給原料中に存在する実質的な切断生成物の形成及び全長RNAの枯渇を示すであろう。(例えば、元のmRNAの80%がRNase III処理後に残っている場合、20%がRNase IIIの基質であった)。

#### 【0288】

図5A及び5Bからの試料のIFN 及びhEPO発現分析を実施した。処理試料及び未処理試料を分析して、RNase III処理がBJ線維芽細胞におけるIFN 応答及びhEPO発現にどのように影響するかを決定した(インビトロ)。hEPO A100 G5等モル物質は、未処理試料及びRIII処理試料について同様に発現することが

見出された。等処理した R P 試料のサイトカインレベルは、R I I I で処理した後に減少した。h E P O A 1 0 0 G 5 アルファ物質は全て同様に発現し、ゼロ / 低い I F N 応答を有した。T L 物質は発現していない。しかしながら、R I I I 処理は、+ 及び - R P 試料の両方について C K レベルを低下させた。G 0 h E P O A 1 0 0 材料には、R N a s e I I I 処理から最大の効果が見られた。R N a s e I I I 処理後、+ 及び - R P 精製試料は両方とも、発現の増大及び I F N レベルの減少が見られた ( 図 6 ) 。

#### 【 0 2 8 9 】

異なるプロセスを使用して転写され、そして R N a s e I I I で処理された短い転写物のキャピラリー電気泳動分析を行った。質問は、ショートモデル転写産物を用いて R N a s e I I I 処理の効果を特徴付け得るか否か？であった。サロゲート R N A 構築物を等モルまたはアルファプロセスを用いて転写し、次いで R N a s e I I I で処理し、そしてキャピラリー電気泳動により分析した。等モルの材料はほとんど R N a s e I I I の基質を含んでいるように見えたが、アルファプロセス材料は、C E ( キャピラリー電気泳動 ) によれば、基質を含んでいなかった。R N a s e I I I 処理により、モデル R N A のピークはフラグメントアナライザー上で 5 ~ 7 ヌクレオチドシフトする。等モルの I V T は、主ピークよりも 2 1 6 ヌクレオチド短い強烈な第 2 ピークを形成し、これは O R F を含む m R N A でも観察された ( 図 7 ) 。したがって、モデル R N A 及び L C / M S を使用して、どの成分が切断されたか、及び推論によってどの成分が残っているかを正確に特徴付け得る。H P L C 純度法は、切断産物の単離及び濃縮の際にポリ U を示した ( 図 9 ) 。R N a s e I I I で処理した R N A サロゲート 2 E Q 転写産物の R P 分析 ( 図 7 の上の図と同じ構築物 . . . 別の分析 ) を行った。サロゲート R N A 転写物を R N a s e I I I で処理した後、R P 分析によっていくつかの種が観察された。この R P 法は、テール選択的方法であったので、我々はこれらの早期溶出ピークが短いオリゴ及び / またはテール変異体であると仮定する ( 図 8 A ) 。R N a s e I I I で処理されたアルファプロセス転写物を用いて転写された R N A サロゲート 2 アルファ構築物の R P 分析を行った。本発明者らは、R I I I で処理したサロゲート R N A アルファ材料についての R P トレースにおいて、さらなる不純物ピークのピークの発生及び全体的な純度への明らかな変化は観察しなかった。したがって、本発明者らは、アルファプロセスは等モルプロセスと同じ d s R N A 種を作らないと結論付け得る ( 図 8 B ) 。

#### 【 0 2 9 0 】

R P 画分からの R N a s e I I I 及びサイトカインデータによる d s R N A の存在量 R N a s e I I I 処理があった h E P O の R P 分画と R N a s e I I I 処理がなかった h E P O の R P 分画を実施した。等モルプロセス及びアルファプロセスの両方を介して転写された h E P O G 5 m R N A を、逆相 H P L C によって精製した。画分を溶出勾配にわたって集めた。画分を、R N a s e I I I で処理し、続いて未処理の R N A 及び R N a s e I I I 処理を比較するキャピラリー電気泳動により分析した ( 重ね合わせた ) 。R N A 画分も B J 線維芽細胞にトランスフェクトし、I F N - B 誘導を、R N a s e I I I 処理の前後に評価した ( 図 9 ) 。

#### 【 0 2 9 1 】

R P 分画 h E P O E Q + / - R I I I 処理のキャピラリー電気泳動分析を行った。h E P O E Q を、R N a s e I I I で処理し、次いで R P 精製し、分画し、そして C E ( キャピラリー電気泳動 ) によって分析した ( 青 : R I I I 処理 ; 黒 : 未処理 ) 。R N A 不純物を含有する初期等モル画分 ( 画分 1 ~ 6 ) は、かなりの量の d s R N A / R N a s e I I I 基質を示す。d s R N A は、初期の画分に富んでいた。これは高い I N F - B レベルによって確認された。等モル画分 7 ~ 9 は、C E ( キャピラリー電気泳動 ) によるより低レベルの d s R N A / R N a s e I I I 基質を示し、これはまた、I F N - B のレベルの減少によっても確認された。各画分の R N a s e I I I 処理は、I F N - B 誘導を基礎レベルまで減少させ、これもまた I F N - B 不純物が d s R N A からなることを裏付けている ( 図 1 0 A ~ C ) 。未処理または R N a s e I I I 処理後の h E P O E Q G 5 のインビトロ I F N 分析 ( 図 1 0 D ) 。

## 【0292】

R P分画h E P Oアルファ + / - R I I I 処理のキャピラリー電気泳動分析を実施した。h E P Oアルファを、R N a s e I I I で処理し、次いでR P精製し、分画し、そしてC E (キャピラリー電気泳動) によって分析した (青: R I I I 処理; 黒: 未処理) (図11A ~ C)。未処理またはR N a s e I I I 処理後のh E P OアルファG 5のインビトロIFN 分析 (図11D)。オーバーレイ電気泳動図は実質的に同一であるので、全ての画分は両方のキャピラリー電気泳動による微量レベルのd s R N A (R N a s e I I I 基質) を示す。これは、処理画分と未処理画分の両方において基礎レベルのIFN - Bによって確認された。アルファプロセスで転写されたR N Aは、初期の画分中に非全長 / 切断型R N A不純物が存在するにもかかわらず、d s R N Aを欠いていた。

10

## 【0293】

d s R N A存在量のE L I S A検出

J 2 / K 2 d s R N A E L I S Aは、d s R N Aの存在量を測定するために開発された。プレートをJ 2モノクローナル (I g G) 抗体でコーティングし、次いでブロックした。次いで、目的のR N Aを所定の濃度で添加し、1時間インキュベートした。K 2モノクローナル抗体を加え (I g M)、そしてH R P結合抗I g Mヤギポリクローナル抗体を加えた。T M Bを添加してシグナルを発生させた。アッセイは、長さが40塩基対を超える二重鎖を検出する。J 2は、R I I Iエンドポイントの決定を支援し得る。d s R N Aのノックダウンは、R PまたはR N a s e I I I 処理で観察された (図12)。J 2アッセイは、等モル物質中にアルファよりもかなり多いd s R N Aが存在したことを示唆する。R Pプロセスは、R I I I処理と同程度に、E Q試料からd s R N A材料を除去する。アルファ反応m R N Aは、等モルのI V T生成物と比較して供給原料中のd s R N Aが少なかった。また、d T精製R N a s e I I I材料におけるノックダウンは、T r i s R Pよりも大きいことが観察された。このアッセイではまた、d s R N AがR N a s e I I I 処理によって除去されたことが示された (図13)。J 2によって検出されたd s R N Aレベルは、構築物 / プロセス / 化学に基づいて変化するが、R N a s e I I I 処理は、ほとんどのd s R N Aレベルをベースラインまで減少させるように思われる。ヌクレアーゼP 1処理後のL C M S分析では、反応群と比較して、非Gで開始された逆相補体が等モル量の群においてより多く存在するので、F F B m R N A中にさらなるN T Pが存在することが示された (表2)。

20

30

## 【0294】

## 【表2】

表2

	pppA ng/mL	pppG ng/mL	pppC ng/mL	pppU ng/mL
G5 hEP0 等モル キャップなし	31	172	53	BQL
G5 hEP0 本発明の製 剤 キャップなし	12	159	BQL	BQL

40

50

## 【 0 2 9 5 】

低温 I V T における R N A 鋳型転写の緩和

異なるプロセス及び化学を用いて調製した h E P O 構築物に対する I F N 応答を実施した。I V T 特徴付け研究に示されるように、アルファ反応は低温誘導サイトカインスパイクに対してそれほど敏感ではなかった（図 1 4）。2 5 で行われたときの標準的な等モル I V T は、増強された I F N - B 誘導不純物存在量を生成する。異なるプロセスを用いて調製した h E P O 構築物について全ヌクレオチド分析を行った。3 7 及び 2 5 の両方で I V T を実施する場合、アルファプロセス条件（G D P 及び G T P）は両方とも、外来の I F N - B 誘導性不純物形成を軽減する。ヌクレオチド分布は、ヌクレアーゼ P 1 研究における対照領域にわたって一貫しており（灰色の枠）、同じ h E P O プラスミドは一貫した切断を示す（図 1 5）。等モルの I V T プロセスを 2 5 で実行すると、おそらくポリ U の進化に起因して、3 7 よりも多量のウリジン / 1 - メチルシュード U が存在し、アルファプロセス（G D P 及び G T P）は 2 5 でも一貫したヌクレオチド分布を示し、さらに不純物形成の緩和を支持している。バーの高さの違いは、おそらく濃度の違いに起因するものである。2 5 の標準 I V T では、U 含有量は時間とともに増大した。モル補正したヌクレオチド組成を表 3 及び 4 に示した。G 及び U は理論値であるが、一方 A は過剰に表されそして C は過少に表された。アルファ反応による温度条件間の偏差は少なく、標準の I V T では U で最大の偏差が観察された。

## 【 0 2 9 6 】

## 【表 3】

表 3

	%A	%G	%C	%U
GDP 37°C 2 時間	35.5	27.9	18.3	18.3
GDP 25°C 6 時間	35.2	28.1	18.4	18.2
GDP 25°C 0/N	34.8	27.7	19.3	18.2
GTP 37°C 2 時間	35.2	27.5	18.9	18.4
GTP 25°C 6 時間	35.2	27.5	19.1	18.3
GTP 25°C 0/N	35.1	27.7	19.0	18.2
G5 37°C 2 時間	35.4	26.8	19.5	18.3
G5 25°C 6 時間	33.8	27.7	18.3	20.1
G5 25°C 0/N	32.1	26.5	17.1	24.3
G0 37°C 2 時間	36.5	26.7	19.1	17.6
G0 25°C 6 時間	33.0	24.4	17.1	25.6
理論値	31.7%	27.3%	22.4%	18.6%

10

20

30

40

50

【 0 2 9 7 】

【表 4】

表 4. 標準偏差

	A	G	C	U
GDP	0.34	0.23	0.53	0.04
GTP	0.07	0.15	0.06	0.09
G5 標 準	1.66	0.60	1.20	3.08
G0 標 準	2.53	1.65	1.43	5.61

10

【 0 2 9 8 】

「強制」RNA 鋳型転写

不純物分析は、G5 eGFP EQを使用して、様々な化学におけるRNAベースのIVTのLCMSによって実行された。4mg/mLのeGFP G5等RNAを使用し、DNA鋳型は使用しないで、IVTを(様々な化学的性質で)設定した。ポリU種は、RNA鋳型転写から生成される。RNA鋳型転写は、化学とは無関係に起こる。逆相精製したeGFP G5(コールド)を、qPCRによってインビトロ転写に必要な閾値未満であると決定されたDNA鋳型を除く、全てのIVT成分と共に、4mg/mL(インビトロ転写反応の典型的な収量と一致)でインキュベートし、RNA鋳型転写現象を探究した。その物質をLC/MSによって分析した(図16A(等モルプロセス)、16B(アルファプロセス))。

20

【 0 2 9 9 】

RNA鋳型IVT産物についてのIFN分析を実施した。材料は、図16由来のものであった。RNAに基づくIVTの後、LCMS分析(ポリU種)とIFN応答との間に相関があるか否かを決定するために試料をインビトロで分析した。アルファ(A100)RNAベースのIVTは、等モルの材料よりもCK応答が低い材料を生成する。(G0またはG5);ここでも、アルファプロセスがRNA鋳型転写産物の形成を軽減することを示唆している。G6は全てコールドであった;(不純物の生成にもかかわらず本質的にコールド)(図17)。

30

【 0 3 0 0 】

dsRNAがキャップされてもよいか否かを決定するために、dsRNAをワクシニアによってキャップできないことが実施された。両方とも5'三リン酸を有するフォワード相補オリゴ及びリバーズ相補オリゴをアニーリングし、次いでワクシニアを使用してキャッピングプロセスに供し、dsRNAをキャッピングしてもよいか否かを決定した。pppFオリゴ(5'pppGを含む)は、ワクシニアを使用してcap1にキャップすることができる。pppRCオリゴ(5'pppUを含む)は、ワクシニアを使ってキャップできない。pppF+pppRCを有するdsRNAは、ワクシニアを用いてキャップできない(図18)。

40

【 0 3 0 1 】

CIPを使用したdsRNAの脱リン酸化を行って、子牛の腸ホスファターゼが異なる5'/3'オーバーハングを有するdsRNAを脱リン酸化するか否かを確認した。種々のF及びRCオリゴをアニーリングし、次いでCIPで処理し、脱リン酸化効率についてLCMSにより分析した。5'オーバーハングを有するdsRNAは完全に脱リン酸化されてもよい。完全二重鎖dsRNAは、部分的に脱リン酸化できる。3'オーバーハング

50

を有する dsRNA は、完全に脱リン酸化できない。これによって、ホスファターゼが CK 応答を低下させるのに 100% 有効ではなかった理由が示される (図 19)。

#### 【0302】

エレクトロフェログラムで示される前述のインビボ研究において投与された mRNA の CE (キャピラリー電気泳動) 純度を実施した。(図 20)。5' UTR がアルファ反応の有効性に影響を与える可能性があるので、構造がある役割を果たす可能性がある (図 20)。

#### 【0303】

##### インビボ研究

RIII 処理は、未修飾種及び完全に修飾された種 (全てのウリジンが 1 - メチルシュードウリジンであった) の両方を用いて、マウスにおいて明確なサイトカインノックダウンを示した。それは基礎レベル近くまでサイトカインをノックダウンするための独立した方法として使用され得る。雌性マウス (1 群あたり  $n = 5$ ) に  $0.5 \text{ mg/kg}$  の選択した試験材料を 1 回注射した。

#### 【0304】

異なる IVT プロセス及び精製順列を使用して転写された G0 及び G5 hEPO mRNA の IFN 分析を実施して、異なる化学物質、プロセス、及び処理を用いて生成された材料に対する IFN 応答が何であることを決定した (インビトロ; BJ 線維芽細胞)。+RIII、+RP、及びアルファプロセスは、G5 のインビトロでの IFN 応答に対して同様の効果 (減少) を有する。G0 は、アルファ + RIII が、等 + RIII より優れていたことを実証している (図 21)。

#### 【0305】

G0 または G5 化学、等モル量またはアルファプロセス、及び ELISA による RNase III 処理を用いて調製した hEPO のインビボ (Balb - C マウス) 発現を行って、種々のプロセス (化学、IVT プロセス、RIII 処理) を用いて調製した hEPO によって発現がどのように影響されるかを調べた。図 12、20、21、22 と同じ材料。異なるプロセスによって生成された RNA を用いた hEPO 発現に有意差はない (図 22)。

#### 【0306】

RNase III 処理が有った異なる IVT プロセス及び精製順列と RNase III 処理がなかった異なる IVT プロセス及び精製順列を使用して転写されたインビボ (Balb - C マウス) G0 及び G5 の hEPO の mRNA についてのサイトカイン (luminescence) パネルを実施して、図 12、20、21、22 と同じ材料で決定した。Balb - C マウスを  $0.5 \text{ mpk}$  製剤化 RNA で処理した後のサイトカイン分析。未処理のアルファ物質は、IP10 の EQ 物質 (G5) と同様の CK 応答を有する。全体的に、RNase III 処理と組み合わせたアルファプロセスは、特に G0 において、等モル比較剤 (+RNase III) よりも低い免疫刺激活性を付与するようである。RIII 処理は、CK 応答を低下させる (図 23A ~ 23D)。

#### 【0307】

G0 または G5 化学、等モルまたはアルファプロセス、及び RNase III 処理を用いて調製した hEPO で処理した Balb - C マウスの脾臓からの B 細胞活性化、を行った。活性化 B 細胞 (CD86 + CD69 +) を、様々なプロセスを用いて調製した hEPO の処理後のそれらの応答に関して分析した。B 細胞活性化は、サイトカイン (luminescence) パネルとおおまかに相関している。RIII 処理は、未処理対照と比較して、CK 応答を減少させる (図 24)。

#### 【0308】

短い 5' 三リン酸化オリゴのインビトロ分析を行って、短い 5' 三リン酸化オリゴがインビトロで IFN 応答を刺激するか否かを決定した (BJF、IFN)。ssRNA 及び dsRNA の 12 未満のヌクレオチドまたは塩基対は、BJF 中の IFN を刺激しない (図 25)。

10

20

30

40

50



## 【0309】

ポリU及びdsRNA標準のインビトロ分析を行い、5'三リン酸化オリゴ標準を使用しているか否か、BJFのIFN 応答を刺激するのは何かを判断した。20bp超のpppF+pppRC dsRNAは免疫刺激性であった。5'三リン酸化ポリUは、<25ntまたは25bpのssRNAまたはdsRNAとして免疫刺激性ではなかった(図26)。

## 【0310】

3'オーバーハングを有するdsRNA標準のインビトロ分析を行って、dsRNA標準についてIFN 応答に対して3'オーバーハング長の依存性があるか否かを決定した。3'オーバーハングが長いほど、IFN 反応は低くなる(図27)。

10

## 【0311】

5'オーバーハング、完全二重鎖、及び3'オーバーハングの長さが異なるdsRNA標準のインビトロ分析を実施して、オーバーハングの長さ/同一性がIFN 応答に依存するか否かを決定した。ssRNA pppRCオリゴはホットである。5'オーバーハング(及び約20bp二重鎖)のdsRNAは、完全な二重鎖より免疫刺激性が低くなる。3'オーバーハングを有するdsRNAは、完全二重鎖と同等かそれ未満の免疫刺激を有する。dsRNA二重鎖が長いほど、CK応答が高い(図28)。

## 【0312】

ポリU種のインビトロ分析を実施して、ポリU種がIFN 応答をシミュレートするのに何が必要かを決定した。5'三リン酸を含むssRNA ポリU標準はわずかに免疫刺激性である。OH-F30(30bp二重鎖)を有するdsRNAとして、相加的CK応答があった。しかしながら、ポリU標準は、全長mRNA(A100)の存在下では免疫刺激性ではない(図29)。

20

## 【0313】

ssRNAオリゴヌクレオチド標準のインビトロ分析を行って、ssRNA標準に対するIFN 応答が何であることを決定した。(Fまたはフォワードオリゴは、アポタイプまたは短縮型種を表し;RまたはRCまたは逆相補体オリゴは、RNA鋳型転写によって生成された逆相補体種を表す)。5'三リン酸を含むフォワードオリゴは、IFN を刺激しない。5'三リン酸を有する逆相補体オリゴは、25ntを超える長さでIFN を刺激する(図30)。

30

## 【0314】

5'官能基(三リン酸及びヒドロキシル)がIFN 応答に影響するか否かを判断するために、異なる5'官能基を有するdsRNAオリゴ標準のインビトロ分析を行った。Fオリゴ上の5'三リン酸及びRCオリゴ上の5'ヒドロキシルは、>20bpでIFN をシミュレートする。Fオリゴ上の5'三リン酸とRCオリゴ上の5'ヒドロキシルは、>25bpでIFN をシミュレートする。Fオリゴ上の5'ヒドロキシル及びRCオリゴ上の5'三リン酸は、>20bpでIFN を刺激する。20bp超のIFN をシミュレートするために必要な三リン酸は1つだけであった(図31)。

## 【0315】

CIP処理dsRNAオリゴ標準のIFN 分析を実施した。様々なオーバーハング長のdsRNAオリゴ標準をCIPで処理し、IFN 応答を分析した。LCMSによって、脱リン酸化(すなわち、5'オーバーハング)が観察された試料(図19)は、未処理試料ほどIFN を刺激しなかった。CIPによって脱リン酸化されなかった試料(すなわち、完全二重鎖及び3'オーバーハング)は、IFN 応答+/-CIPに変化がなかった(図32)。

40

## 【0316】

ssRNA不純物用量応答(BJ線維芽細胞中のIFN )を実施して、インビトロでのssRNA不純物標準の用量依存性が何であることを決定した(BJF、IFN )。反応を刺激するためにいずれか1つの種類の不純物がどれくらい必要だったか。<20merのssRNA(RC)はホットではなかった。>30merのssRNA(RC)は、

50

約  $> 1 \text{ ng} / \mu\text{L}$  (または  $> 2.5 \text{ ng} / \text{トランスフェクション}$ ) で  $\text{IFN}$  を刺激した。 $\text{ssRNA}$   $\text{CK}$  応答 ( $\text{RC}$ ) に対して見かけの長さ依存性があった。オリゴが長ければ長いほど、 $\text{CK}$  応答は高くなる (図 33)。

#### 【0317】

$\text{dsRNA}$  不純物用量応答 ( $\text{BJ}$  線維芽細胞における  $\text{IFN}$ ) を実施して、インビトロでの  $\text{dsRNA}$  不純物標準の用量依存性 ( $\text{BJF}$ 、 $\text{IFN}$ ) を決定した。20 ~ 30 bp の  $\text{dsRNA}$  は、約  $> 1 \text{ ng} / \mu\text{L}$  ( $> 2.5 \text{ ng} / \text{トランスフェクション}$ ) で  $\text{IFN}$  を刺激する。 $> 30 \text{ bp}$  の  $\text{dsRNA}$  は、約  $0.1 \text{ ng} / \mu\text{L}$  ( $> 0.25 \text{ ng} / \text{トランスフェクション}$ ) で  $\text{IFN}$  を刺激する。 $\text{IFN}$  応答をサイレンシングするためには、 $> 1000 \times$  の希釈の  $> 30 \text{ bp}$  の  $\text{dsRNA}$  が必要であった。・・・応答を刺激するには、これらの不純物のほんの数分子で十分であることが示されている。 $\text{dsRNA}$   $\text{CK}$  応答に対する見かけの長さ依存性があった。・・・二重鎖が長いほど、 $\text{CK}$  応答は高い (図 34)。

10

#### 【0318】

フォワードオリゴ標準の修飾 5'ヌクレオチドに対する  $\text{IFN}$  応答を、5'ヌクレオチド (三リン酸化) が  $\text{CK}$  応答に影響するか否かを決定するために行った。5' A / C / U が  $\text{F}$  オリゴに付加されたとき、 $\text{CK}$  応答が誘導された。5' 非-G は、 $\text{IFN}$  応答を変化させない (依然としてコールド)。これは、配列依存性があったことを示唆する ( $\text{RC}$  がホットなので) (図 35)。

#### 【0319】

20

5'ヌクレオチド (三リン酸化) が  $\text{CK}$  応答に影響を与えるか否かを判断するために、逆相補体オリゴ標準の修飾 5'ヌクレオチドに対する  $\text{IFN}$  応答を実施した。5' G が  $\text{RC}$  オリゴに付加されると、 $\text{CK}$  応答が誘導された。 $\text{RC}$  オリゴ上の 5' pppG は  $\text{IFN}$  応答をサイレンシングする。これによって、配列同一性が何であっても、5' G が  $\text{CK}$  応答をサイレンシングすることが示唆される (図 36)。

#### 【0320】

5'ヒドロキシル官能化  $\text{dsRNA}$  の  $\text{IFN}$  応答を行って、5'官能基 (ppp対OH) が  $\text{dsRNA}$  のサイトカイン応答にどの程度影響するかを決定した。5' ppp-F / 5' ppp-RC 二重鎖から 5' OH-F / 5' OH-RC までを試験した。5' ppp または 5' OH のいずれかを用了  $> 30 \text{ bp}$   $\text{dsRNA}$  の  $\text{IFN}$  応答があった。これによって、5'の官能基が何であっても、30 bp を超える  $\text{dsRNA}$  が  $\text{BJF}$  の  $\text{IFN}$  応答を刺激したことが示唆される (図 37)。

30

#### 【0321】

推測

$\text{IVT}$  副産物としての  $\text{RNA}$  鋳型転写は大幅に減少し、アルファ反応プロセスでほぼ排除された。逆相補体の形成を軽減した結果として、目的の不純物である  $\text{dsRNA}$  (5' pppを有する) と非 pppG (pppA、pppC、及び pppU) で開始する  $\text{RNA}$  の両方が対処される。

#### 【0322】

$\text{RNA}$  鋳型転写は、37 未満の  $\text{IVT}$  反応温度 (例えば、25) で増強された。 $\text{IVT}$  反応が進行している間に 37 の加熱を達成するための傾斜時間は、特に 25 ~ 37 の時間傾斜が増大するにつれて、より高い不純物レベルをもたらす得る。微量の  $\text{RNA}$  鋳型転写種が周囲温度で検出されたので、アルファ反応プロセスは 25 でより寛容であった。

40

#### 【0323】

$\text{RP}$  は、等モルプロセスよりもアルファ反応の方が効果的であった。アルファ反応では不純物量がより少なく、分離の改善をもたらす。「純度」がより明確に解明され得、潜在的に負荷の課題を増やし、生産性を高め得る。単一の  $\text{RP}$  サイクルは、 $\text{GDP}$  アルファ反応を用いて未修飾種をベースラインにロックするのに十分であるが、一方、等モルの  $\text{IVT}$  を用いて未修飾種の 2 つの画分を得るためには 2 ~ 3 連続する  $\text{RP}$  サイクルが必要であ

50

る。

【0324】

実施例5．アルファプロセスを用いて生成されたRNAは<40%のランオン転写物を有する。

hEPO RNAは、等モルまたはアルファプロセスを用いて生成した。RNAを、RNase T1で消化し、テール断片をLCMSによって分析した。3' mPのテールの断片は、ランオン転写物を示す。アルファプロセスは、32780 Daであると計算された3' OH(クリーン)と32860 Daであると計算された5' OH/3' mP(ランオン)を生成した。等モルプロセスは、32861 Daの5' OH/3' mP(ランオン)及びはるかに少量の3' OH(クリーン)を生成した(図38)。

10

【0325】

実施例6．総消化は、等モルプロセス由来のRNAがアルファプロセスで作られたRNAより高い存在量の非GTP 5'ヌクレオチドを有することを示す

短いオープンリーディングフレームRNAを4つの異なる条件を用いて生成した: 37 2時間(標準)対25 6時間及び等モル対アルファ。各RNAを、単一ヌクレオチドに酵素的に消化し、次いで5'ヌクレオチド存在量をLCMS(例えば、pppGまたはGTP、pppAまたはATPなど)によって分析した。5'Gは、最初の鋳型ヌクレオチドであり、つまり、不純なRNA集団が生成されたならば、ATP、CTP、またはUTP(例えば、等モルプロセス)として5'ヌクレオチドの大部分が存在することになり、純粋なRNA集団が生成されたならば、5'ヌクレオチドの大部分はGTPになる(例えば、アルファプロセス)ことを意味する。

20

【0326】

実施例7．アルファプロセスによって生成された短いオープンリーディングフレームRNAは、より少ない逆相補体を生成する

32P-GTPまたは32P-CTPのいずれかを含む等モルまたはアルファプロセスを用いて、G0(野生型)及びG5(m<sup>1</sup>)化学において、短いオープンリーディングフレームRNAを生成した。32P-GTP標識アポータティブ転写物及び32P-CTP標識逆相補体転写物。G0とG5の化学の間でアポータティブまたはRCプロファイルに違いはなかった。等モルプロセス及びアルファプロセスは、同様のアポータティブプロファイルを有する。等モルプロセスは、アルファプロセスよりも多くの逆相補体を生成する。

30

【0327】

実施例8．RNase T1消化は、ランオンの転写物集団に情報提供する

RNase T1は、5'水酸化物と3'ーリン酸を残して、グアノシンヌクレオチドの後でRNAを特異的に切断するエンドヌクレアーゼである。3'末端に鋳型化グアノシンヌクレオチドを含む構築物では、RNase T1を使用して、3'水酸化物を含むきれいな転写物と比較して、3'ーリン酸を残すランオン転写物の集団を識別し得る。等モルまたはアルファプロセスを用いてhEPO RNAを生成し、次いでRNase T1で消化し、そして質量分析により分析した。3'オリゴ断片を分析し、その3'不均一性について定量した。等モルプロセスで生成されたRNAは、約70~80%のランオン転写物を含むが、アルファプロセスで生成されたRNAは、30~40%のランオン転写物を含む。

40

【0328】

実施例9．試料純度を決定するためのRNAの全消化

ショートモデルRNA構築物(サロゲートRNA1)を、37 または25 のインキュベーションで等モルまたはアルファプロセスを用いて生成した。各試料をオリゴdT樹脂で精製して未反応のNTPを除去した。各試料を、S1及びベンゾナーゼヌクレアーゼを用いて単一ヌクレオチドに酵素的に消化した。5'末端で三リン酸化されている5'ヌクレオチドの存在量を質量分析によって分析した。抽出されたイオンピークを積分し、NTP存在量%を表5にまとめる。5'GTPが最初の鋳型化ヌクレオチドであるため、純粋なRNA集団は高い%GTP値で示される。同様に、不純なRNA集団は、比較的少量

50

の GTP によって示される。EQ プロセスを使用して生成された試料は、5 % を超える非 GTP 5'ヌクレオチドを含むが、アルファプロセスを使用して生成された試料は 5 % 未満の非 GTP 5'ヌクレオチドを有する。

【0329】

【表5】

表5

	% GTP	% ATP	% CTP	% UTP
サロゲート RNA 1 等モル 37°C	94.4	0.8	3.8	1.2
サロゲート RNA 1 アルファ 37°C	97.4	0.3	2.3	0.0
サロゲート RNA 1 等モル 25°C	68.1	5.0	12.3	21.6
サロゲート RNA 1 アルファ 25°C	97.6	0.2	1.9	0.4

10

【0330】

20

実施例10. dsRNA ELISAはdsRNAの存在を示す

hEPO RNA構築物を、等モルまたはアルファプロセスを使用して生成し、そしてオリゴdT樹脂のみ(-RP)または逆相精製(+RP)のいずれかにより精製した。dsRNA特異的抗体を使用するELISAを使用して、異なるプロセスを使用して生成されたRNAの純度の相対的差異を決定する。等モルプロセスを用いて生成されたRNAは、アルファプロセスを用いて生成されたRNAよりも有意により多くのdsRNAを含む(図39)。逆相精製は、-RP RNAの純度を向上させる。

【0331】

実施例11. 放射性シーケンシングゲル分析は試料純度を決定する

ショートモデルRNA構築物(サロゲートRNA 1)を等モルまたはアルファプロセスを用いて作製した。各IVT反応は、アポタイプ転写物を標識する<sup>32</sup>P-GTP、または逆相補体転写物を標識する<sup>32</sup>P-CTPのいずれかを含有した。RNA試料を配列決定ゲルによって分析した。<sup>32</sup>P-GTPデータに基づくと、2つのプロセス間でアポタイプ転写物量に差はない。<sup>32</sup>P-CTPデータに基づいて、等モルプロセスは、アルファプロセスよりも多くの逆相補体を生成する。

30

【0332】

実施例12. mRNAにドープされたdsRNAのインビボ分析

逆相精製したhEPO mRNAを、インタクトなhEPO構築物の最初の60ヌクレオチドに相当する5%、0.5%または0.05% w/wの60bp dsRNAを用いてドープした。mRNA試料を、MC3中に製剤化し、次いで0.5mpkでC57BL/6及びBalb-cマウスにIV投与した。24時間後、脾臓を採取し、ホモジナイズして単細胞懸濁液を生成した。脾細胞をB細胞マーカーについて染色し、次いでフローサイトメトリーによって分析した。活性化B細胞集団を、それらのCD86及びCD69マーカーの発現に基づいて分析した。60bpのdsRNAは以下の配列を有する。

40

【0333】

【化1】

60mer 5' UTR Epo F GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAAGAAGAAUUAAGAGCCACCAUGGGAGUGCACG (SEQ ID NO: 31)

60mer 5' UTR Epo R CGUGCACUCCCAUGGUGGCUCUUAUAUUUCUUCUACUCUUCUUUCUCUCUUAUUUCCC (SEQ ID NO: 32)

50

## 【 0 3 3 4 】

アルファプロセスによって生成された h E P O m R N A を与えられた群は、ドープされた d s R N A とともに h E P O を与えられた群よりも B 細胞活性化が低かった。血清も 6 時間後に収集し、サイトカイン・ルミネックス ( l u m i n e x ) パネルによって分析した。 l u m i n e x パネルからの I P - 1 0、I F N - ガンマ、及び I F N - アルファのマーカーについての発現傾向は、B 細胞活性化分析からの傾向と一致しており、ドープされた試料中の d s R N A が I 型インターフェロン経路を誘発させ、それが B 細胞活性化をもたらしたことが示される。

## 【 0 3 3 5 】

等価物

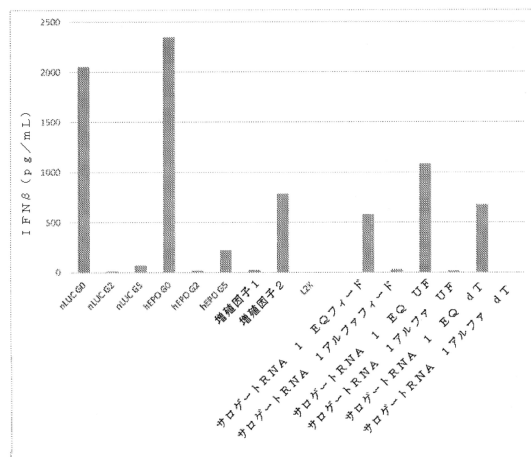
10

当業者は、本明細書に記載されてい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、または慣用的な実験のみを用いて確認し得る。そのような等価物は、添付の特許請求の範囲によって包含されるものとする。

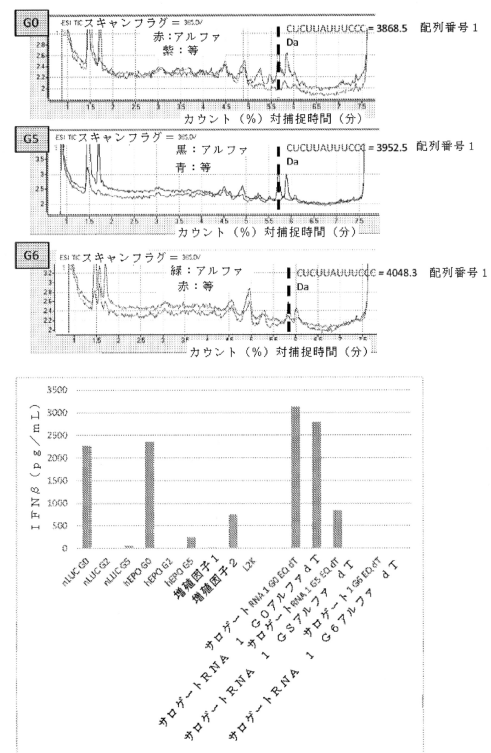
## 【 0 3 3 6 】

本明細書に開示されている、特許文献を含む全ての参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。

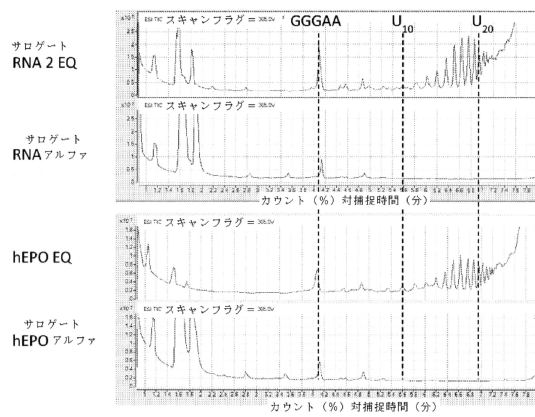
【 図 1 】



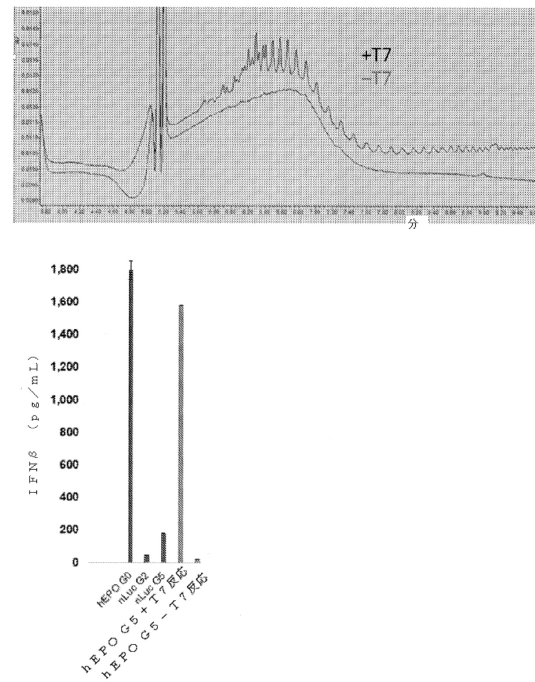
【 図 2 】



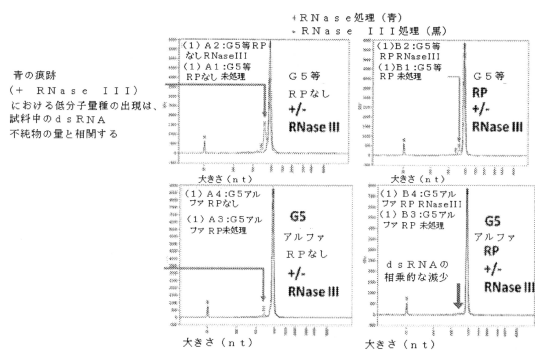
【図 3】



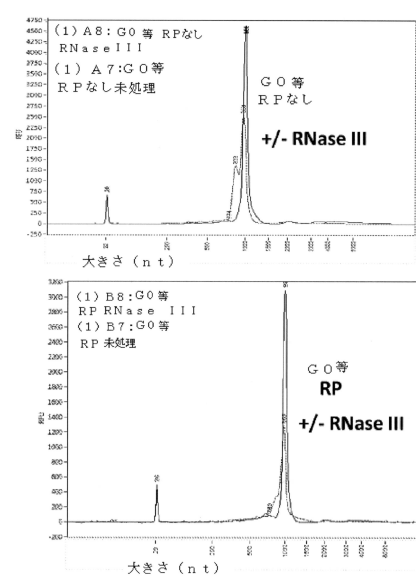
【図 4】



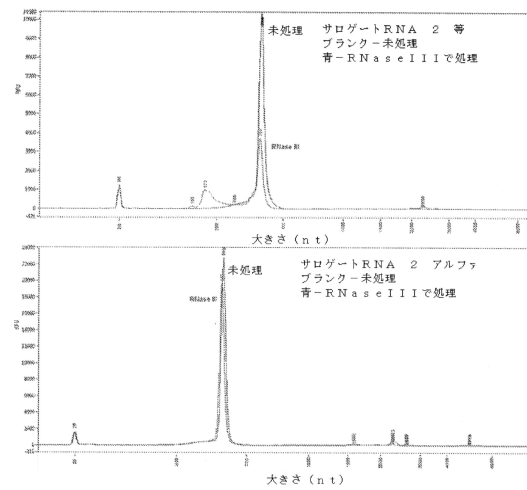
【図 5 A】



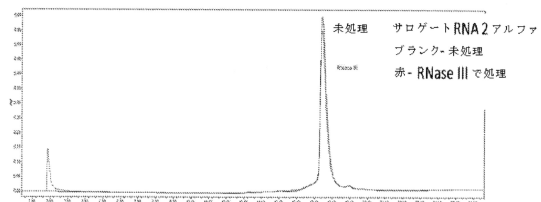
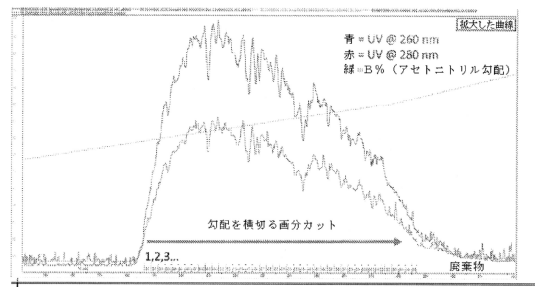
【図 5 B】



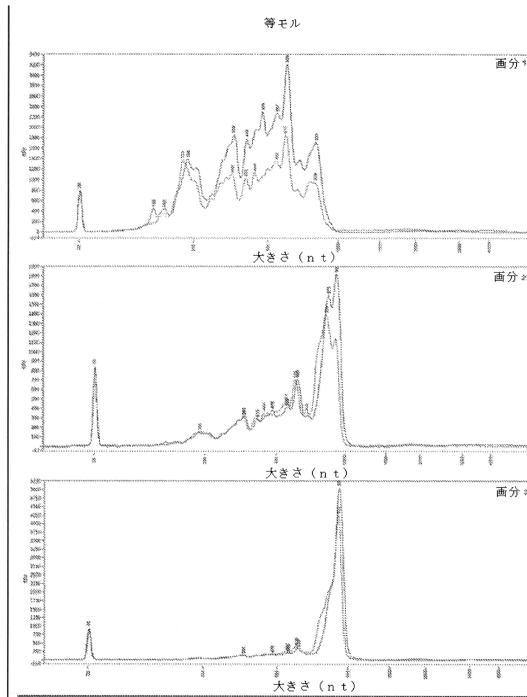
【 図 7 】



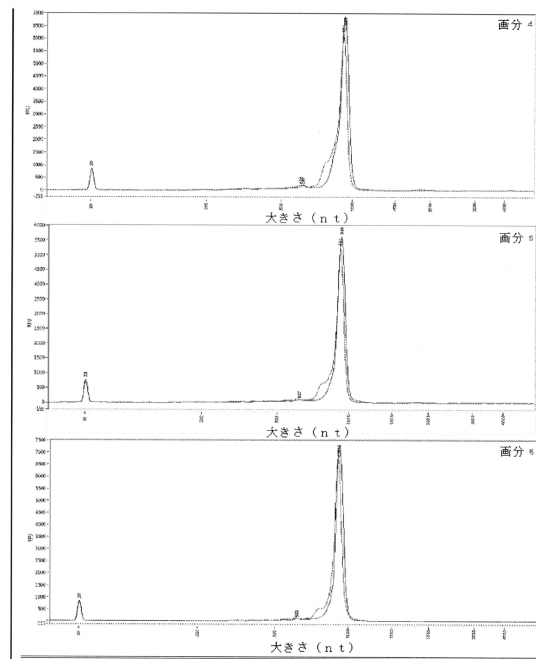
【 図 9 】



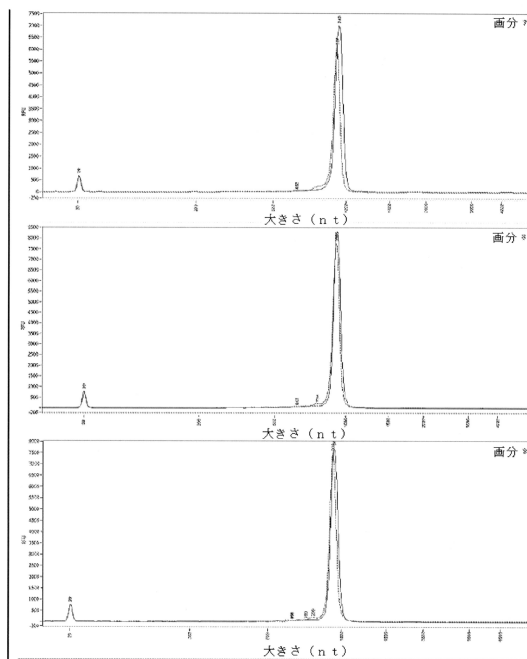
【図 10 A】



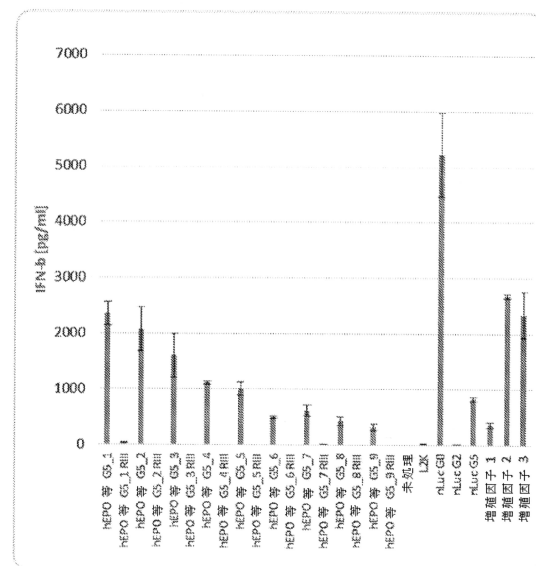
【図 10 B】



【図 10 C】

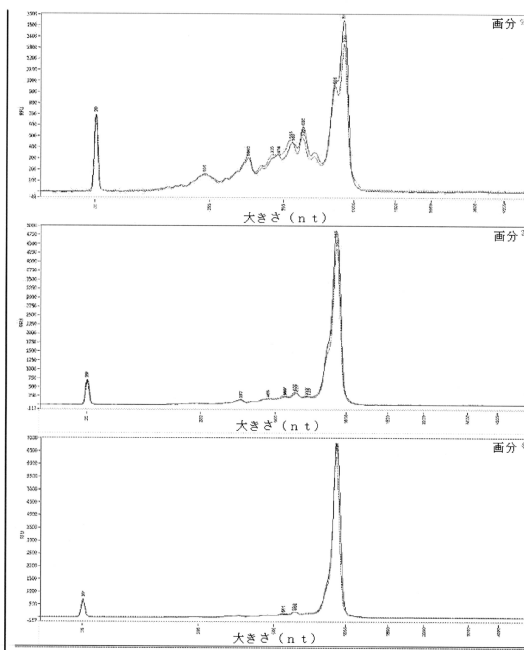


【図 10 D】

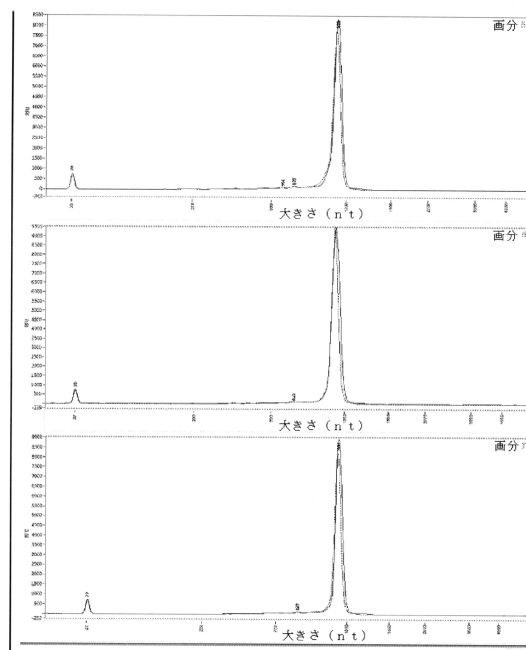




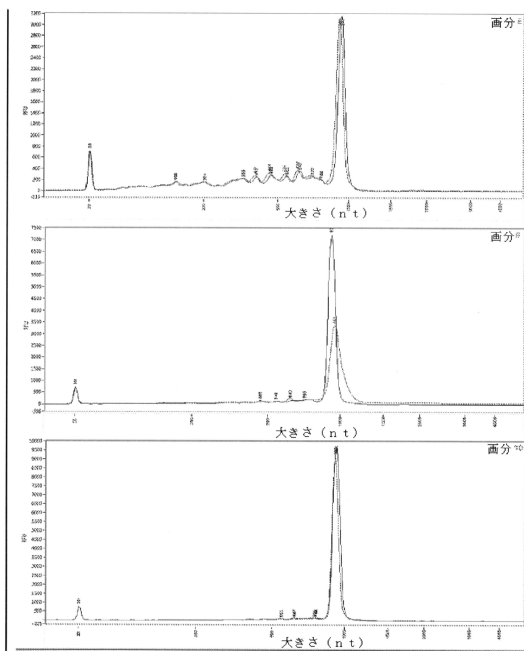
【図 1 1 A】



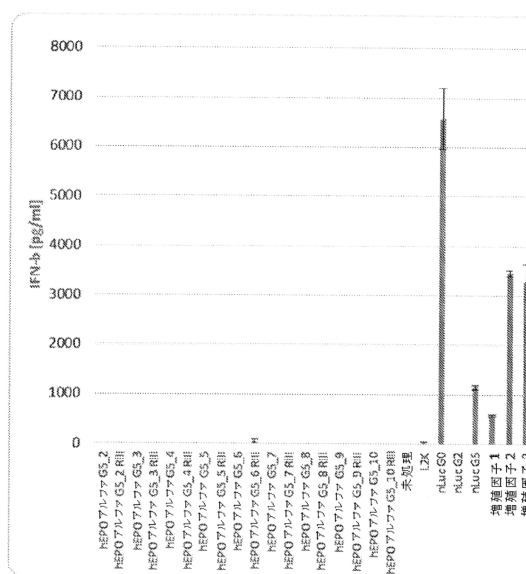
【図 1 1 B】



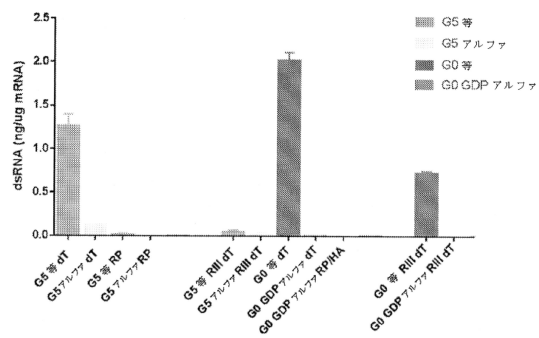
【図 1 1 C】



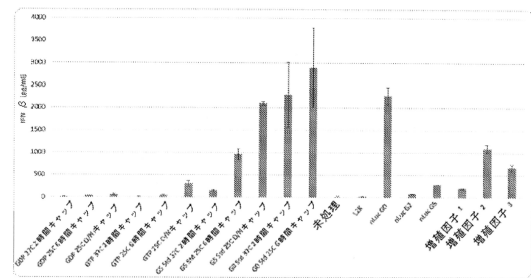
【図 1 1 D】



【図 1 2】

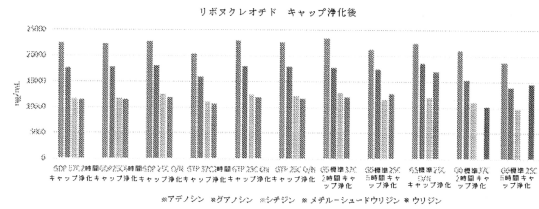
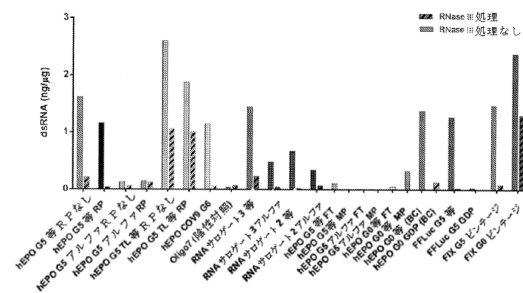


【図 1 4】

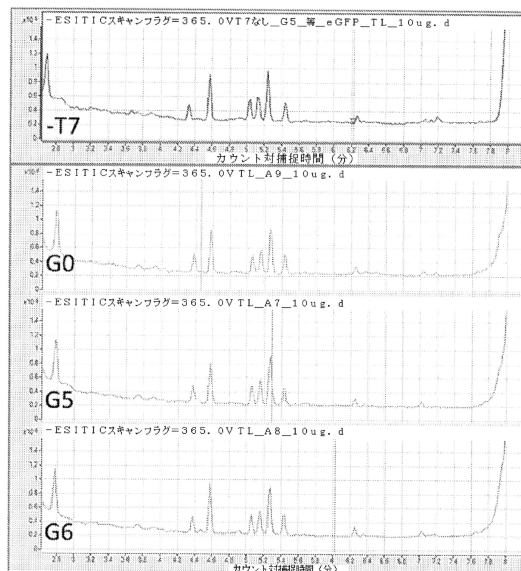


【図 1 5】

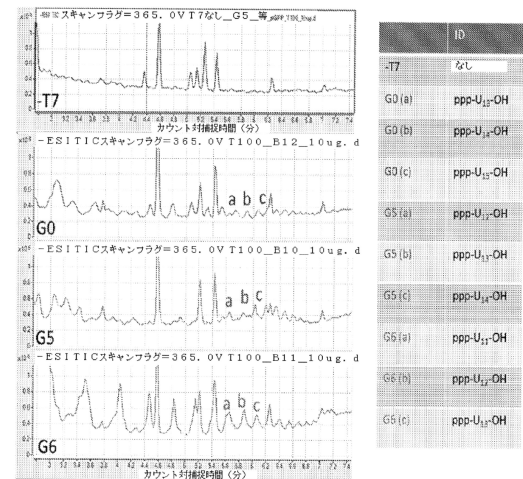
【図 1 3】



【図 1 6 A】

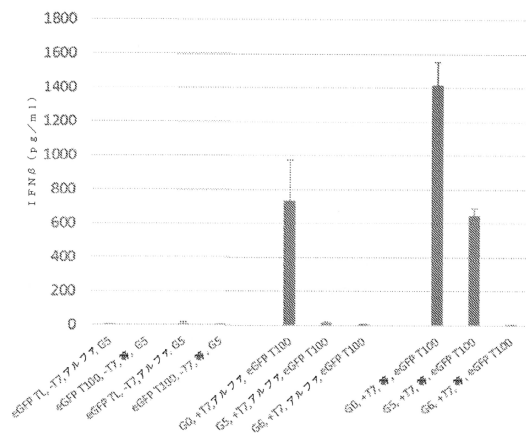


【図 1 6 B】



ID	
T7	なし
G0(a)	ppp-U <sub>12</sub> -OH
G0(b)	ppp-U <sub>12</sub> -OH
G0(c)	ppp-U <sub>12</sub> -OH
G5(a)	ppp-U <sub>12</sub> -OH
G5(b)	ppp-U <sub>12</sub> -OH
G5(c)	ppp-U <sub>12</sub> -OH
G6(a)	ppp-U <sub>12</sub> -OH
G6(b)	ppp-U <sub>12</sub> -OH
G6(c)	ppp-U <sub>12</sub> -OH

【図 17】

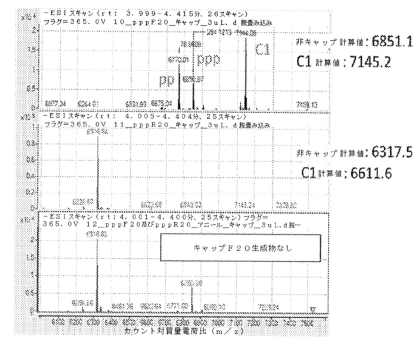


【図 18】

pppF20

pppRC20

pppF20+pppRC20



【図 19】

ppp-R30 + OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

OH-F20

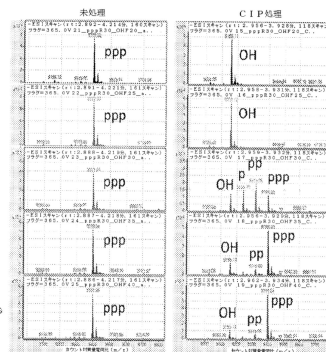
OH-F20

OH-F20

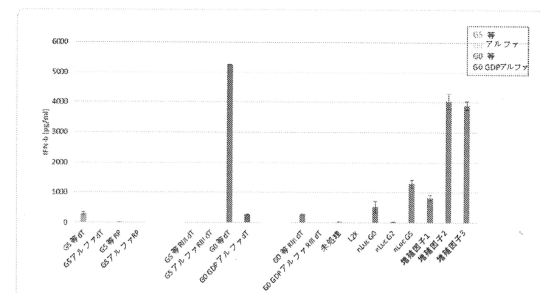
OH-F20

OH-F20

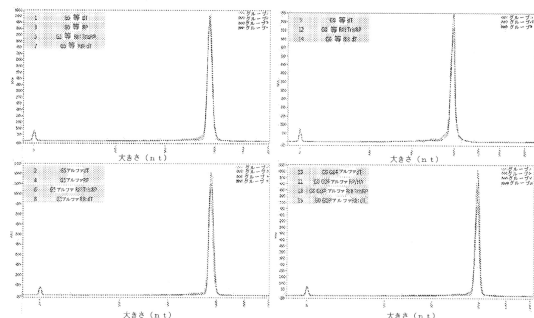
OH-F20



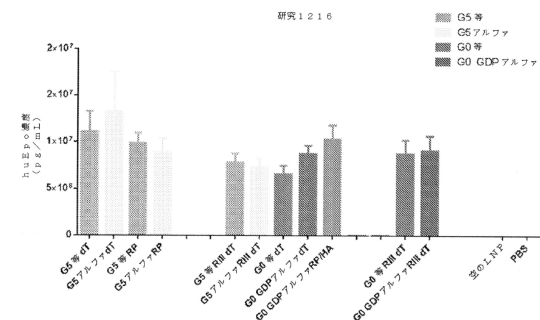
【図 21】



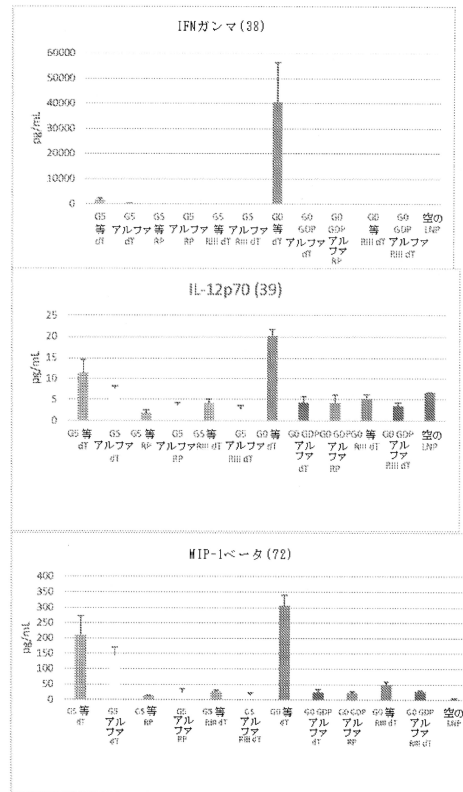
【図 20】



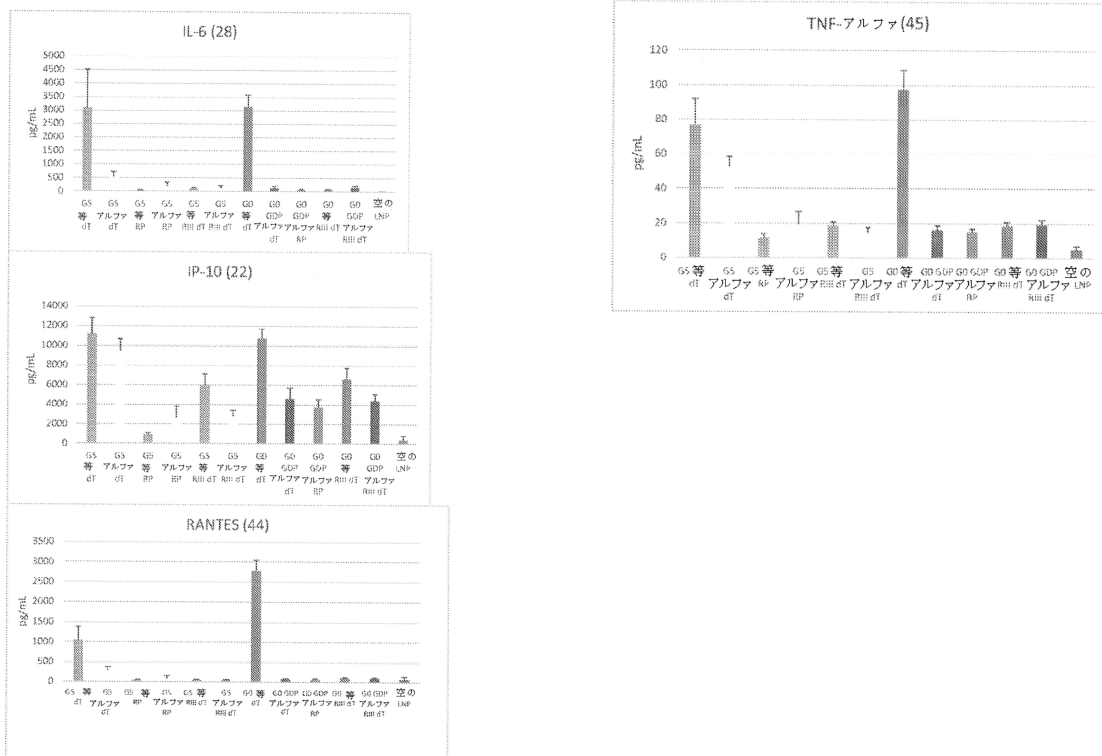
【図 22】



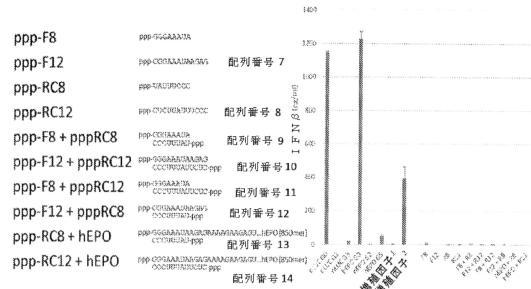
【 図 2 3 B 】



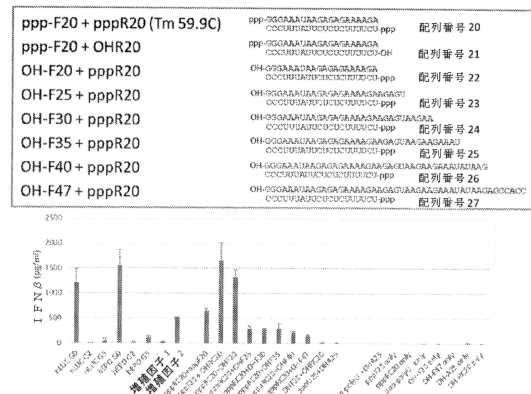
【 図 2 3 D 】



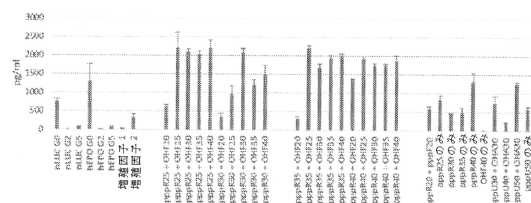
【 図 2 5 】



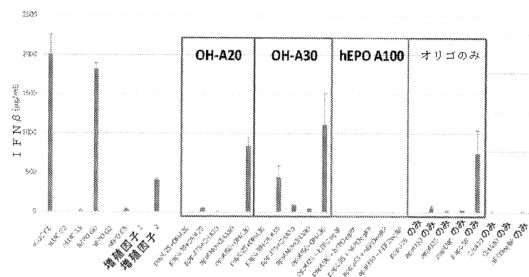
【圖 27】



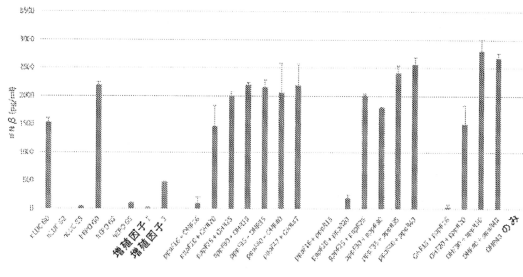
【圖 28】



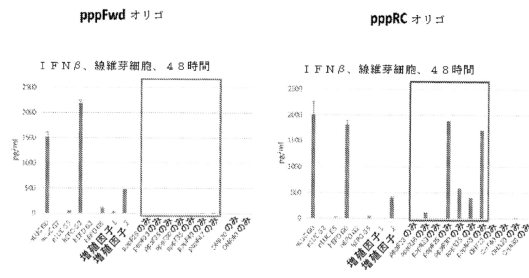
【図 29】



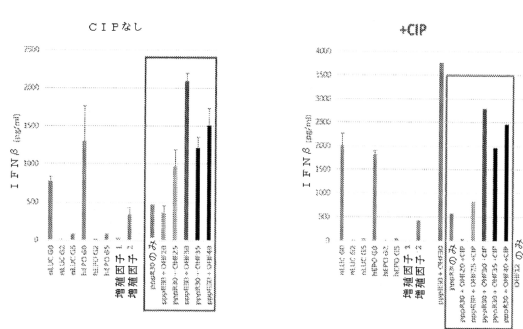
【図 31】



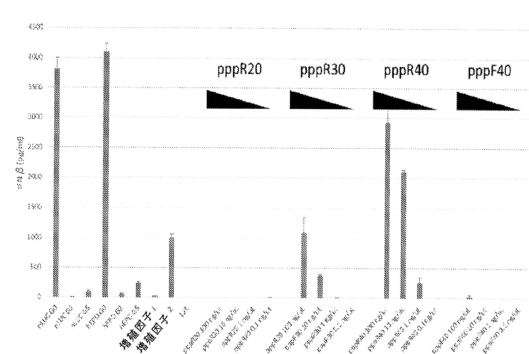
【図 30】



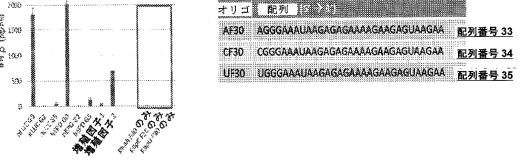
【図 32】



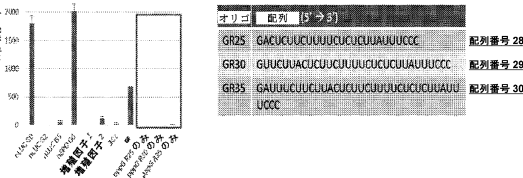
【図 33】



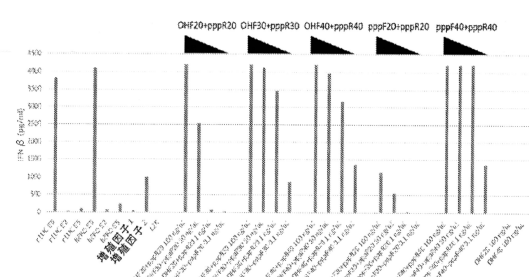
【図 35】



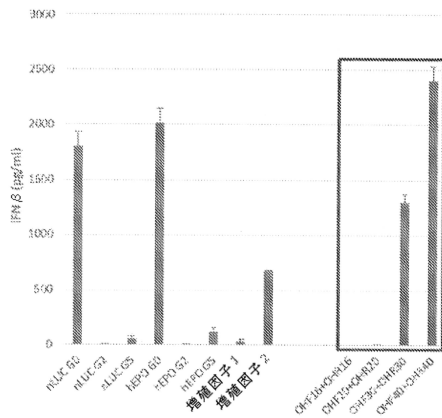
【図 36】



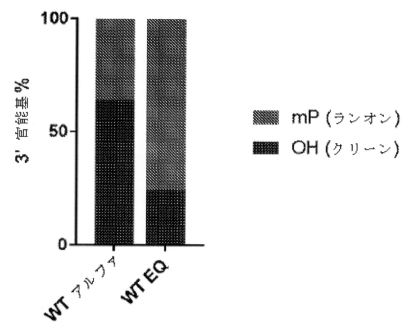
【図 34】



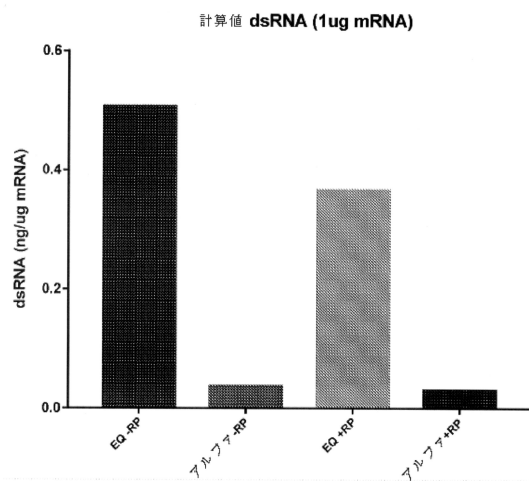
【図 37】



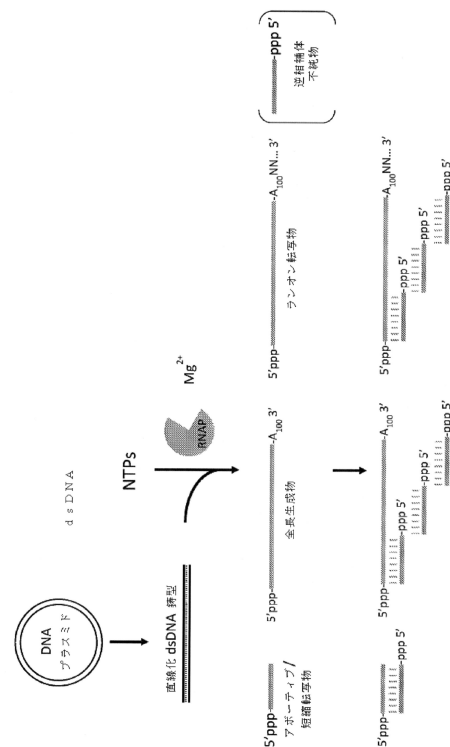
【図 38】



【図 39】



【図 40】



【配列表】

0006983455000001.app



## フロントページの続き

- (72)発明者 ウィリアム・アイッサ  
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02026・デダム・キンボール・ロード・95
- (72)発明者 エドワード・ジェイ・ミラッコ  
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02474・アーリントン・フロスト・ストリート・6
- (72)発明者 ジェニファー・ネルソン  
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02246・ブルックライン・ワシントン・ストリート・465・#2
- (72)発明者 エイミー・イー・ラビドー  
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02451・ウォルサム・ポンド・ストリート・121・ユニット・1
- (72)発明者 ガボール・ブトラ  
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02139・ケンブリッジ・テクノロジー・スクエア・200

審査官 中村 勇介

- (56)参考文献 国際公開第2013/102203(WO, A1)  
国際公開第02/048310(WO, A2)  
米国特許出願公開第2003/0165849(US, A1)  
特表2013-539969(JP, A)  
国際公開第2015/188933(WO, A1)  
米国特許第05256555(US, A)  
BRENNAN, Sean M., VIROLOGY, 1984年, Vol. 135, pp. 555-560

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/00 - 15/90  
C12P 1/00 - 41/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)