

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-513874
(P2025-513874A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10	Z N A
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全72頁)				
(21)出願番号	特願2024-560578(P2024-560578)	(71)出願人	513084469	
(86)(22)出願日	令和5年4月13日(2023.4.13)		モデルナティエックス インコーポレイ	
(85)翻訳文提出日	令和6年12月10日(2024.12.10)		テッド	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065719		ModernaTX, Inc.	
(87)国際公開番号	WO2023/201294		アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセ	
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)		ッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリー	
(31)優先権主張番号	63/331,145		ト 3 2 5	
(32)優先日	令和4年4月14日(2022.4.14)	(74)代理人	100188558	
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 飯田 雅人	
	米国(US)	(74)代理人	100195796	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		弁理士 塩尻 一尋	
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),	(72)発明者	エイミー・イー・ラビドー	
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(		アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0	
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,		2 1 4 2・ケンブリッジ・ビニー・スト	
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		リート・3 2 5・モデルナティエックス	
	最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 RNAポリメラーゼバリエント

(57)【要約】

RNAポリメラーゼバリエントは、RNAの高効率の転写を可能にする。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエントは、高いキャッピング効率でのRNA転写及び／又は低レベルの二本鎖RNA混入を可能にする。

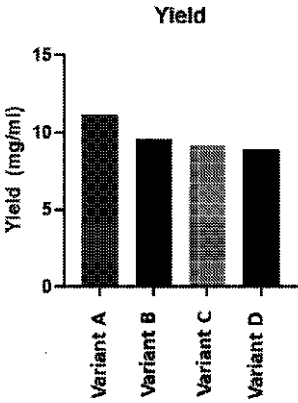


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 ～ 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むリボ核酸 (RNA) ポリメラーゼバリエントであって、前記アミノ酸配列が、前記配列番号 1 のアミノ酸配列を含む RNA ポリメラーゼと比較して、D 3 5 1 位でのアミノ酸置換及び少なくとも 2 つの追加のアミノ酸置換を含む、前記 RNA ポリメラーゼバリエント。

【請求項 2】

配列番号 2 ～ 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の RNA ポリメラーゼバリエント。

10

【請求項 3】

配列番号 2 ～ 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の RNA ポリメラーゼバリエント。

【請求項 4】

前記配列番号 1 のアミノ酸配列を含む野生型 T 7 RNA ポリメラーゼと比較して、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つのアミノ酸置換を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の RNA ポリメラーゼバリエント。

【請求項 5】

配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、リボ核酸 (RNA) ポリメラーゼバリエント。

【請求項 6】

配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、リボ核酸 (RNA) ポリメラーゼバリエント。

20

【請求項 7】

配列番号 8 のアミノ酸配列を含む、リボ核酸 (RNA) ポリメラーゼバリエント。

【請求項 8】

配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、リボ核酸 (RNA) ポリメラーゼバリエント。

【請求項 9】

DNA、ヌクレオシド三リン酸、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の RNA ポリメラーゼバリエントを含む、*in vitro* 転写反応においてメッセンジャー RNA (mRNA) を生成することを含む方法。

【請求項 10】

前記反応物が、cap アナログをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記 cap アナログが、ジヌクレオチド cap アナログ、トリヌクレオチド cap アナログ、またはテトラヌクレオチド cap アナログである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

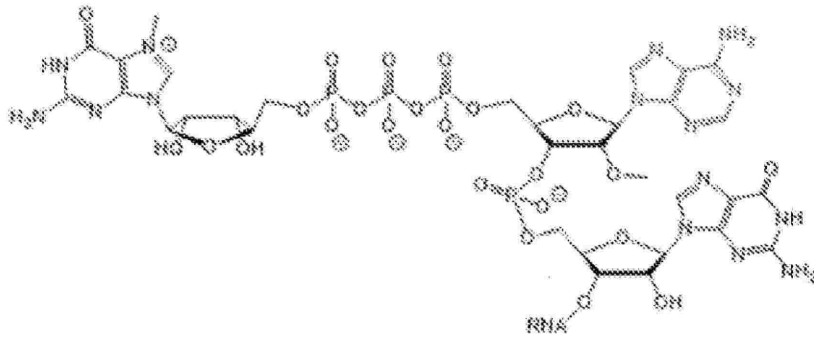
前記 cap アナログが、GAG 配列を含むトリヌクレオチド cap アナログである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 cap アナログが、

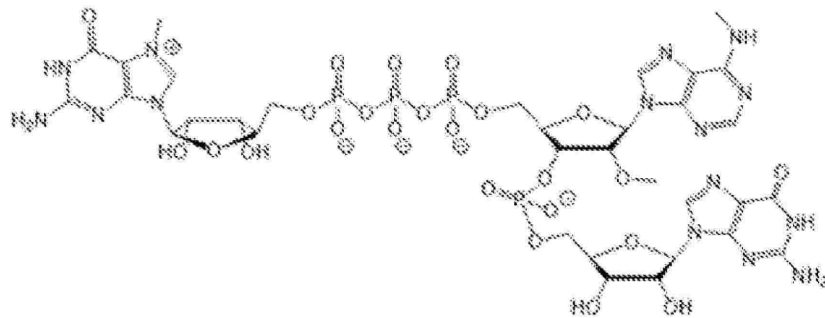
40

【化 1】



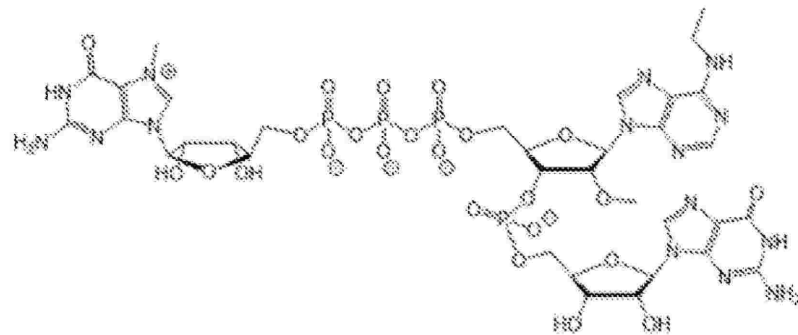
(X)、

10



(XI)、または

20



(XII)

30

から選択される化合物を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記テトラヌクレオチド c a p アナログが、G G A G 配列を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

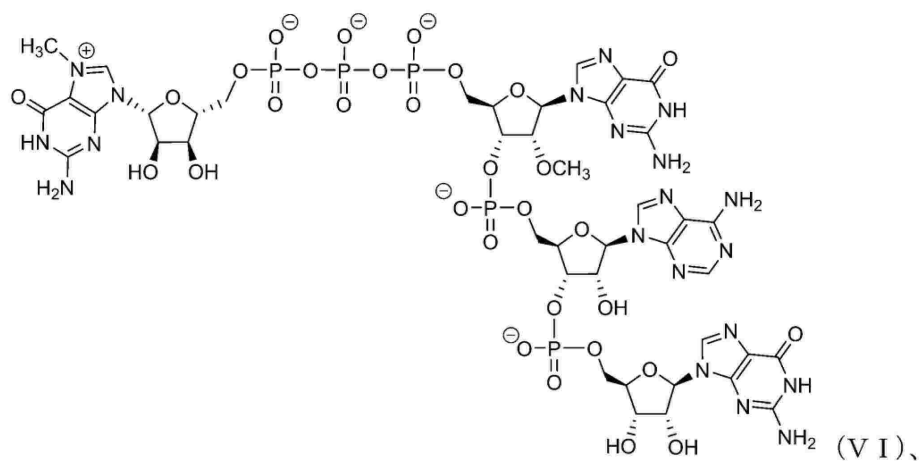
【請求項 1 5】

前記テトラヌクレオチド c a p アナログが、

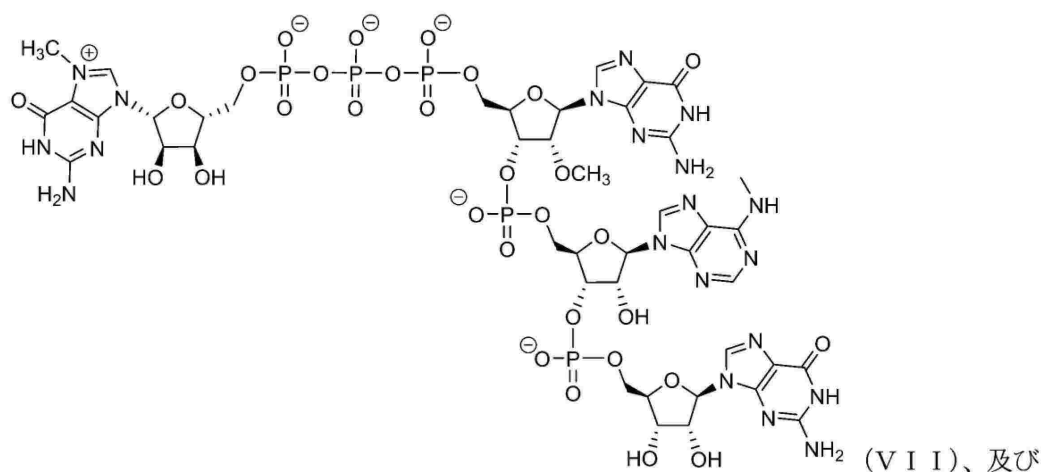
40

50

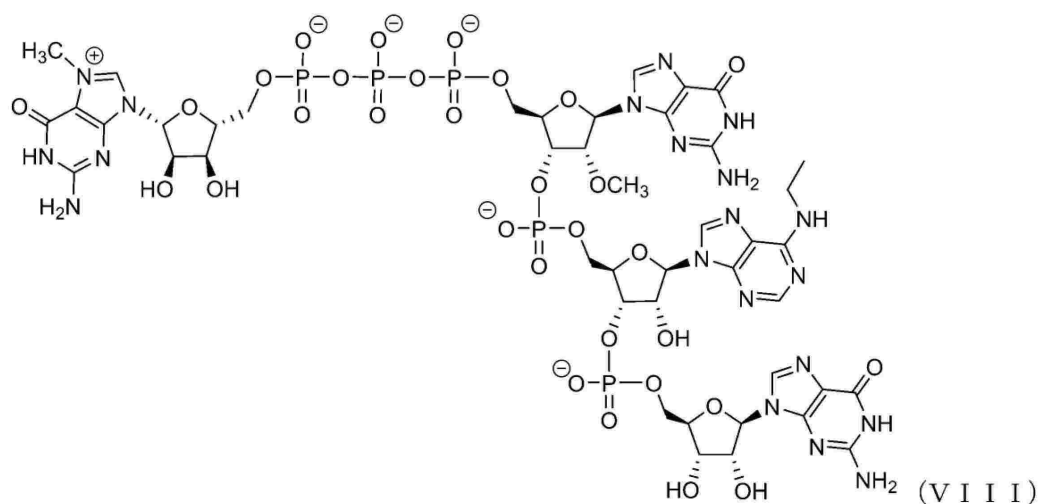
【化 2】



10



20



30

40

から選択される化合物を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 DNA が、2'-デオキシチミジン残基または 2'-デオキシシチジン残基を、位置 +1 に含む、請求項 9～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の RNA ポリメラーゼバリエント、ならびに DNA、ヌクレオシド三リン酸、及び cap アナログからなる群から選択される *in vitro* 転写 (IVT) 試薬を含む、組成物またはキット。

【請求項 18】

50

請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の RNA ポリメラーゼバリエントをコードする核酸

。

【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) の定めにより、2022 年 4 月 14 日に出願された米国仮出願第 63 / 331, 145 号の利益を主張し、その内容はその全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

電子配列表の参照

電子配列表 (M137870217WO00-SEQ-HJD. xml ; サイズ : 31, 370 バイト ; 及び作成日 : 2023 年 4 月 12 日) の内容は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

【0003】

リボ核酸 (RNA) ベースの治療薬の出現には、異常活性による副産物がほとんどない RNA を生成するポリメラーゼが必要である。バクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼを使用して *in vitro* 転写から得られる転写産物は、多くの場合、望ましくなく制御できない免疫刺激活性を示す。T7 転写産物のこの免疫刺激活性は、プロモーターを含まないデオキシリボ核酸 (DNA) 末端から転写を開始する異常活性の寄与によるものである。この活性により、意図されたセンス RNA 産物に完全に相補的なアンチセンス RNA、ひいては、意図しない免疫応答をロバストに刺激することができる長い二本鎖 RNA (dsRNA) が産生される。さらに、バクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼは、cap アナログ (複数可) の存在下で、5' 末端キャッピング効率が低い T7 転写産物を生成するが、これは、1 つには、ポリメラーゼが cap アナログ (複数可) に対して結合親和性が低いからである。

【発明の概要】

【0004】

いくつかの態様は、T7 RNA ポリメラーゼバリエント及びこれらのバリエントを使用する *in vitro* 転写法を含み、これらは、対照 (例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む野生型 T7 RNA ポリメラーゼ) と比較して、dsRNA の混入物質を低減し、及び／又は共転写 5' 末端キャッピング効率を向上させることが示されている。

【0005】

いくつかの態様は、配列番号 2～9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むリボ核酸 (RNA) ポリメラーゼバリエントを提供し、アミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む RNA ポリメラーゼと比較して、D351 位でのアミノ酸置換及び少なくとも 2 つの追加のアミノ酸置換を含む。

。

【0006】

いくつかの態様は、野生型 T7 RNA ポリメラーゼ (例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む野生型 T7 RNA ポリメラーゼ) と比較して、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む RNA ポリメラーゼバリエントを提供する。

【0007】

いくつかの態様は、配列番号 2～9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む RNA ポリメラーゼバリエントを提供する。

【0008】

いくつかの態様は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む野生型 T7 RNA ポリメラーゼに

10

20

30

40

50

対して、(i) E 3 5 0 位でのアミノ酸置換、(ii) D 3 5 1 でのアミノ酸置換、ならびに (iii) K 3 8 7、N 4 3 7 位、または K 3 8 7 位及び N 4 3 7 位でのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む RNA ポリメラーゼバリエントを提供する。

【0009】

いくつかの実施形態では、バリエントのアミノ酸配列は、K 3 8 7 位でのアミノ酸置換を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、バリエントのアミノ酸配列は、N 4 3 7 位でのアミノ酸置換を含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、バリエントのアミノ酸配列は、K 3 8 7 位及び N 4 3 7 位でのアミノ酸置換を含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、K 3 8 7 位でのアミノ酸置換は、極性の中性アミノ酸である。

【0013】

いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、アスパラギン (N)、システイン (C)、グルタミン (Q)、メチオニン (M)、セリン (S)、及びトレオニン (T) から選択される。

【0014】

いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、アスパラギン (K 3 8 7 N) である。

【0015】

いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、システイン (K 3 8 7 C) である。

【0016】

いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、グルタミン (K 3 8 7 Q) である。

【0017】

いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、メチオニン (K 3 8 7 M) である。

【0018】

いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、セリン (K 3 8 7 S) である。

【0019】

いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、トレオニン (K 3 8 7 T) である。

【0020】

いくつかの実施形態では、N 4 3 7 位でのアミノ酸置換は、芳香族アミノ酸である。

【0021】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、及びフェニルアラニン (F) から選択される。

【0022】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン (N 4 3 7 W) である。

【0023】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、チロシン (N 4 3 7 Y) である。

【0024】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、フェニルアラニン (N 4 3 7 F) である。

【0025】

他の態様は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む野生型 T 7 RNA ポリメラーゼに対して、(i) E 3 5 0 位でのアミノ酸置換、(ii) D 3 5 1 でのアミノ酸置換、ならびに (iii) D 6 5 3 位でのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む RNA ポリメラーゼバリエントを提供する。

【0026】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、D 6 5 3 位でのアミノ酸置換は、芳香族アミノ酸である。

【0027】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。

【0028】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（D 6 5 3 W）である。

【0029】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、チロシン（D 6 5 3 Y）である。

【0030】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、フェニルアラニン（D 6 5 3 F）である 10

【0031】

いくつかの実施形態では、E 3 5 0 位でのアミノ酸置換は、芳香族アミノ酸である。

【0032】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。

【0033】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（E 3 5 0 W）である。

【0034】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、チロシン（E 3 5 0 Y）である。 20

【0035】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、フェニルアラニン（E 3 5 0 F）である

【0036】

いくつかの実施形態では、D 3 5 1 位でのアミノ酸置換は、非極性の脂肪族アミノ酸である。

【0037】

いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。 30

【0038】

いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（D 3 5 1 A）である

【0039】

いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、グリシン（D 3 5 1 G）である

【0040】

いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、イソロイシン（D 3 5 1 I）である。

【0041】

いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、ロイシン（D 3 5 1 L）である 40

【0042】

いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、プロリン（D 3 5 1 P）である

【0043】

いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、バリン（D 3 5 1 V）である。

【0044】

さらに他の態様は、配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエントを提供し、その場合、バリエント 50

のアミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む野生型 T7 RNA ポリメラーゼと比較して、(i) E 3 5 0 位でのアミノ酸置換、(ii) D 3 5 1 位でのアミノ酸置換、及び (iii) K 3 8 7 位、N 4 3 7 位、または K 3 8 7 位及び N 4 3 7 位でのアミノ酸置換を含む。

【0045】

いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 98 % の同一性を有する。

【0046】

いくつかの実施形態では、バリエーションのアミノ酸配列は、K 3 8 7 位でのアミノ酸置換を含む。

【0047】

いくつかの実施形態では、バリエーションのアミノ酸配列は、N 4 3 7 位でのアミノ酸置換を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、バリエーションのアミノ酸配列は、K 3 8 7 位及び N 4 3 7 位でのアミノ酸置換を含む。

【0049】

いくつかの実施形態では、K 3 8 7 位でのアミノ酸置換は、極性の中性アミノ酸である。

【0050】

いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、アスパラギン (K 3 8 7 N)、システイン (K 3 8 7 C)、グルタミン (K 3 8 7 Q)、メチオニン (K 3 8 7 M)、セリン (K 3 8 7 S)、及びトレオニン (K 3 8 7 T) から選択される。

【0051】

いくつかの実施形態では、N 4 3 7 位でのアミノ酸置換は、芳香族アミノ酸である。

【0052】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン (N 4 3 7 W)、チロシン (N 4 3 7 Y)、及びフェニルアラニン (N 4 3 7 F) から選択される。

【0053】

さらに他の態様は、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む RNA ポリメラーゼバリエーションを提供し、その場合、バリエーションのアミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む野生型 T7 RNA ポリメラーゼと比較して、(i) E 3 5 0 位でのアミノ酸置換、(ii) D 3 5 1 位でのアミノ酸置換、及び (iii) D 6 5 3 位でのアミノ酸置換を含む。

【0054】

いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 98 % の同一性を有する。

【0055】

いくつかの実施形態では、D 6 5 3 位でのアミノ酸置換は、芳香族アミノ酸である。

【0056】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン (D 6 5 3 W)、チロシン (D 6 5 3 Y)、及びフェニルアラニン (D 6 5 3 F) から選択される。

【0057】

いくつかの実施形態では、E 3 5 0 位でのアミノ酸置換は、芳香族アミノ酸である。

【0058】

いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン (E 3 5 0 W)、チロシン (E 3 5 0 Y)、及びフェニルアラニン (E 3 5 0 F) から選択される。

【0059】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、D 3 5 1 位でのアミノ酸置換は、非極性の脂肪族アミノ酸である。

【0060】

いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（D 3 5 1 A）、グリシン（D 3 5 1 G）、イソロイシン（D 3 5 1 I）、ロイシン（D 3 5 1 L）、プロリン（D 3 5 1 P）、及びバリン（D 3 5 1 V）から選択される。

【0061】

いくつかの態様は、配列番号2のアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエーションを提供し、その場合、 X^1 は、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸であり、 X^2 は、A、G、I、L、P、及びVから任意に選択される非極性の脂肪族アミノ酸から選択され、 X^3 は、N、C、Q、M、S、及びTから任意に選択される極性の中性アミノ酸であり、 X^4 は、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸である。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。

10

【0062】

いくつかの態様は、配列番号3のアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエーションを提供し、式中、 X^1 は、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸であり、 X^2 は、A、G、I、L、P、及びVから任意に選択される非極性の脂肪族アミノ酸から選択され、 X^4 は、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸である。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、配列番号7のアミノ酸配列を含む。

20

【0063】

いくつかの態様は、配列番号4のアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエーションを提供し、式中、 X^1 は、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸であり、 X^2 は、A、G、I、L、P、及びVから任意に選択される非極性の脂肪族アミノ酸から選択され、 X^3 は、N、C、Q、M、S、及びTから任意に選択される極性の中性アミノ酸である。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。

【0064】

いくつかの態様は、配列番号5のアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエーションを提供し、式中、 X^1 は、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸であり、 X^2 は、A、G、I、L、P、及びVから任意に選択される非極性の脂肪族アミノ酸から選択され、 X^5 は、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸である。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、配列番号9のアミノ酸配列を含む。

30

【0065】

いくつかの態様は、DNA、ヌクレオシド三リン酸、先行段落のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼバリエーション、及び任意選択でcapアナログを含む、*in vitro*転写反応においてメッセンジャーRNA（mRNA）を生成することを含む方法を提供する。

【0066】

いくつかの実施形態では、反応は、capアナログを含む。

40

【0067】

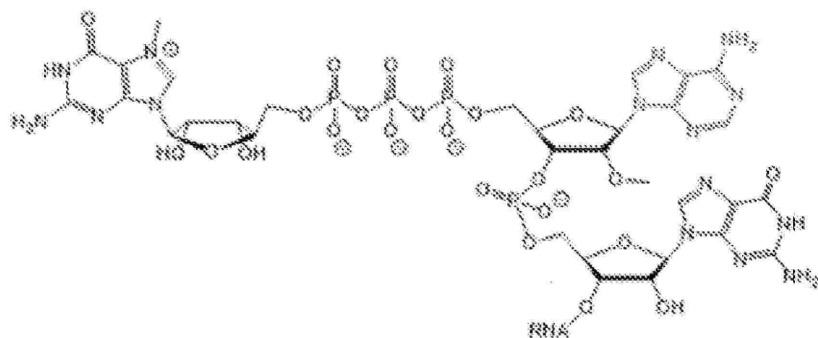
いくつかの実施形態では、capアナログは、ジヌクレオチドcapアナログ、トリヌクレオチドcapアナログ、またはテトラヌクレオチドcapアナログである。いくつかの実施形態では、capアナログは、テトラヌクレオチドcapアナログである。

【0068】

いくつかの実施形態では、capアナログは、GAG配列を含むトリヌクレオチドcapアナログである。いくつかの実施形態では、GAG capアナログは、

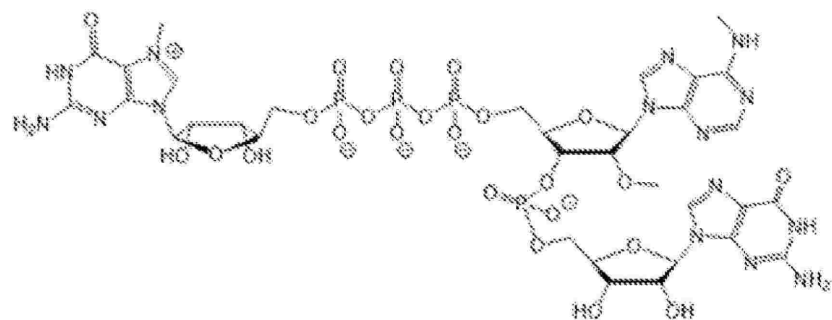
50

【化 1】



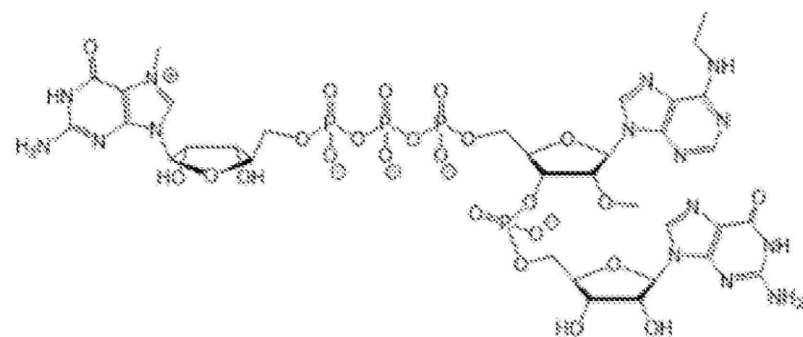
(X)、

10



(XI)、または

20



(XII)

30

から選択される化合物を含む。

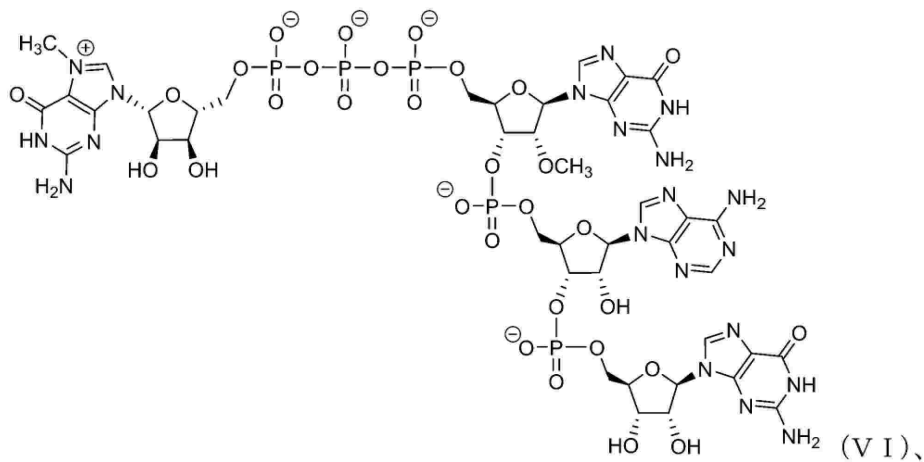
【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチド c a p アナログは、G G A G 配列を含む。いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチド c a p アナログは、

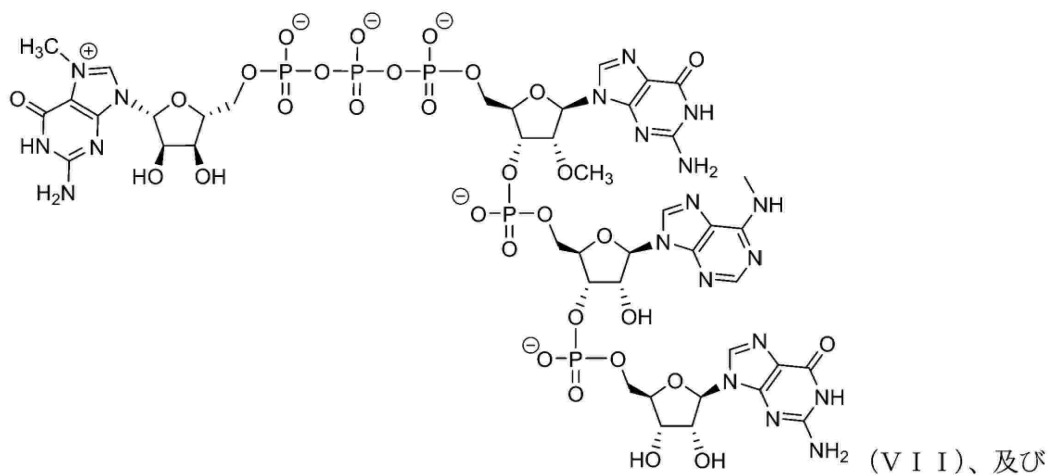
40

50

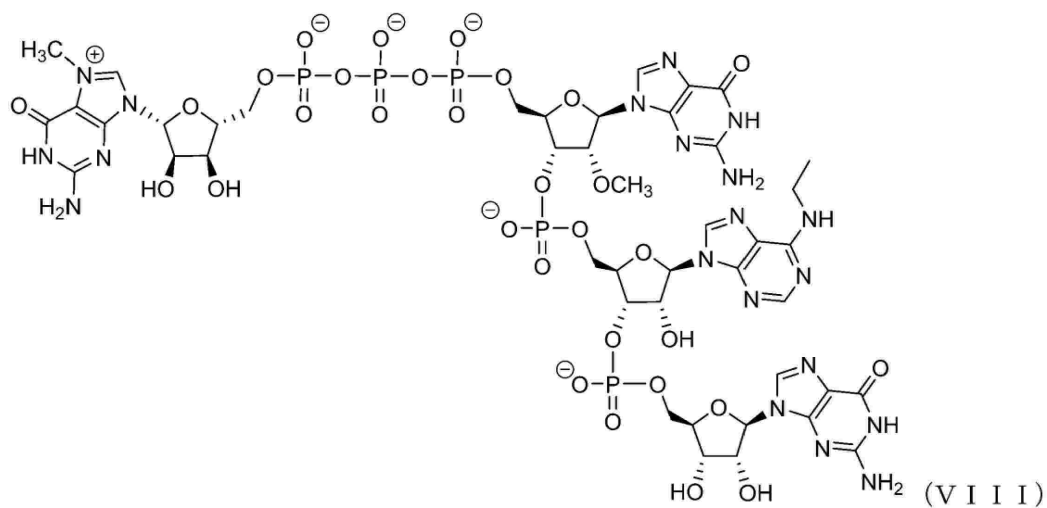
【化 2】



10



20



30

40

から選択される化合物を含む。

【0070】

いくつかの実施形態では、DNAは、2'-デオキシチミジン残基または2'-デオキシシチジン残基を+1位に含む。

【0071】

いくつかの態様は、先行段落のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼバリエント、ならびにDNA、ヌクレオシド三リン酸、及びcapアナログからなる群から選択される*in vitro*転写(IVT)試薬を含む組成物またはキットを含む。

【0072】

50

いくつかの態様は、先行段落のいずれか 1 項に記載の RNA ポリメラーゼバリエントをコードする核酸を含む。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図 1 A】例示的な RNA ポリメラーゼバリエントを含む *in vitro* 転写 (IVT) 反応から得られた転写 RNA 産物の機能特性を示すグラフを示す。オリゴ dT 精製後、転写 RNA 産物を、収率について分析した。

【図 1 B】例示的な RNA ポリメラーゼバリエントを含む *in vitro* 転写 (IVT) 反応から得られた転写 RNA 産物の機能特性を示すグラフを示す。オリゴ dT 精製後、転写 RNA 産物を、キャップされた RNA の割合について分析した。

【図 1 C】例示的な RNA ポリメラーゼバリエントを含む *in vitro* 転写 (IVT) 反応から得られた転写 RNA 産物の機能特性を示すグラフを示す。オリゴ dT 精製後、転写 RNA 産物を、Tris RP (逆相) 法によるテールの割合 (すなわち、ポリ A テールを含む RNA の割合) について分析した。

【図 1 D】例示的な RNA ポリメラーゼバリエントを含む *in vitro* 転写 (IVT) 反応から得られた転写 RNA 産物の機能特性を示すグラフを示す。オリゴ dT 精製後、転写 RNA 産物を、dsRNA の量について分析した。

【図 2 A】様々なレベルの GGAG cap アナログの存在下で例示的な RNA ポリメラーゼバリエントを含む *in vitro* 転写 (IVT) 反応から得られた転写 RNA 産物の機能特性を示すグラフを示す。オリゴ dT 精製後、転写 RNA 産物を、キャップされた RNA の割合について分析した。

【図 2 B】様々なレベルの GGAG cap アナログの存在下で例示的な RNA ポリメラーゼバリエントを含む *in vitro* 転写 (IVT) 反応から得られた転写 RNA 産物の機能特性を示すグラフを示す。オリゴ dT 精製後、転写 RNA 産物を、収率について分析した。

【図 2 C】様々なレベルの GGAG cap アナログの存在下で例示的な RNA ポリメラーゼバリエントを含む *in vitro* 転写 (IVT) 反応から得られた転写 RNA 産物の機能特性を示すグラフを示す。オリゴ dT 精製後、転写 RNA 産物を、Tris RP (逆相) 法によるテールの割合 (すなわち、ポリ A テールを含む RNA の割合) について分析した。

【発明を実施するための形態】

【0074】

RNA ポリメラーゼ (例えば、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) は、酵素の基質として機能するヌクレオシド三リン酸 (NTP) 及び DNA 鋳型によって特定されるヌクレオチドの配列を使用して、成長する RNA 鎖の 3' 末端へのリボヌクレオチドの連続的な付加 (5' → 3' 方向の RNA の転写) を触媒する酵素である。転写は、相補的塩基対合に依存する。二重らせんの 2 本の鎖は局所的に分離し、分離された鎖の一方は鋳型 (DNA 鋳型) として機能する。RNA ポリメラーゼは、その後、鋳型内の相補的塩基による DNA 鋳型上での遊離ヌクレオチドのアラインメントを触媒する。したがって、ポリメラーゼが、成長する RNA 鎖の 3' 末端へのリボヌクレオチドの連続的付加を触媒する場合、RNA ポリメラーゼは、RNA ポリメラーゼ活性を有すると見なされる。

【0075】

DNA 指向性 RNA ポリメラーゼは、プライマーなしで RNA の合成を開始することが可能であり、開始の最初の触媒段階は、新規 RNA 合成と称される。新規合成は、RNA ポリメラーゼが、新生 RNA ポリマーと単一のヌクレオチドではなく、2 つのヌクレオチドを結合する転写サイクルにおける特有の段階である。バクテリオファージ T7 RNA ポリメラーゼの場合、転写は、GTP に対して +1 及び +2 の位置で特に優先して始まる。開始ヌクレオチドは、伸長複合体について記載されたものとは異なる場所で、RNA ポリメラーゼに結合する (Kennedy WP et al. J Mol Biol. 2007; 370 (2): 256-68)。開始ヌクレオチドとして GTP を好む選択バイア

スは、形状の相補性、広範なタンパク質側鎖、及び酵素活性部位のグアニン部分に対する強力な塩基スタッキング相互作用によって達成される。したがって、開始GTPは、オープンプロモーターコンフォメーションに最大の安定化力を提供する（Kennedy et al., 2007）。RNAポリメラーゼバリエントは、いくつかの実施形態では、新規RNA合成のための1つ以上の結合部位の残基（複数可）に1つ以上のアミノ酸置換（複数可）を含み、これは、理論に拘束されるものではないが、in vitro転写反応のcapアナログに対するRNAポリメラーゼの親和性を変化させ、例えば、低いcapアナログ濃度でキャッピング効率が改善される。

【0076】

したがって、いくつかの態様では、RNAポリメラーゼバリエントは、新規RNA合成のための結合部位残基に2つ以上のアミノ酸置換を含むRNAポリメラーゼを含む。RNAポリメラーゼバリエントは、RNAポリメラーゼ活性ならびに、対応する野生型RNAポリメラーゼに対して少なくとも1つの置換及び／又は修飾を有する酵素である。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、野生型RNAポリメラーゼに対して、350、351、387、437、及び653位から選択される位置であり、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

【0077】

T7 RNAポリメラーゼの構造研究により、N末端ドメインのコンフォメーションは、転写の開始段階と伸長段階の間で実質的に変化することが示されている。N末端ドメインは、Cヘリックスサブドメイン及びプロモーター結合ドメインを含み、これは、サブドメインHで区切られた2つのセグメントを含む。プロモーター結合ドメイン及び結合したプロモーターは、8 ntのRNA転写産物の合成時、約45度回転し、成長するヘテロ二本鎖に対応するために活性部位が拡張されている間、プロモーターの接触が維持されるようにする。Cヘリックスサブドメインは、その伸長コンフォメーションに向かって適度に移動するが、サブドメインHは、70オングストローム超離れたその伸長段階の位置ではなく、その開始位置にとどまる。T7 RNAポリメラーゼの開始複合体と伸長複合体の構造を比較すると、N末端の267残基（N末端ドメイン）内の広範なコンフォメーション変化が見られ、残りのRNAポリメラーゼにはほとんど変化が見られない。プロモーター結合ドメインの剛体回転、ならびにN末端のCヘリックス（残基28～71）及びH（残基151～190）サブドメインのリフォールディングは、プロモーター結合部位を無効にすること、活性部位を拡大すること及びRNA転写産物のための出口トンネルを創製することに関与する。特に、開始複合体にβループ構造として存在するT7 RNAポリメラーゼの残基E42～G47は、伸長複合体ではαヘリックス構造を採用する。N末端ドメイン内の構造変化は、伸長複合体の安定性及び処理能力の増加を説明する（例えば、Durniak, K. J. et al., Science 322 (5901): 553–557, 2008（参照により本明細書に援用される））。T7 RNAポリメラーゼはまた、鋳型から分離する際にRNA転写産物の5'末端の方向をそらすように機能し、伸長複合体の安定性及び処理能力に影響を与える（例えば、残基385～395とリボース骨格との相互作用を介して）「Nヘリックス」（残基374～409）も含む。RNAポリメラーゼ（残基627～640）の「Oヘリックス」は、挿入中に取り込むNTPを安定化し、RNA転写産物の合成中のバックトラッキングを防ぐために機能する。最後に、「Yヘリックス」（残基644～661）は、成長するRNA転写産物のn+1位で鋳型塩基を安定化するように機能する。

【0078】

いくつかの態様は、RNAポリメラーゼの開始複合体からRNAポリメラーゼの伸長複合体へのコンフォメーション変化を促進するRNAポリメラーゼバリエント（例えば、T7 RNAポリメラーゼバリエント）である。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエントは、野生型RNAポリメラーゼに対して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのアミノ酸修飾を含み、これは、RNAポリメラーゼバリエントが開始複合体から伸長複合体へ移行するにつれて、RNAポリメラーゼ

バリエーションの少なくとも1つの3次元ループ構造に、ヘリックス構造へのコンフォメーション変化を受けさせる。したがって、いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸修飾は、野生型アミノ酸に対して、高いヘリックス傾向を有する。

【0079】

さらに、いくつかの態様では、野生型T7RNAポリメラーゼと比較して、伸長複合体の安定性及び処理能力を増加させ、バックトラッキングを防止し、取り込むNTP及び鑄型を安定化するRNAポリメラーゼバリエーション（例えば、T7RNAポリメラーゼバリエーション）である。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのアミノ酸修飾を含み、これは、伸長複合体の安定性及び処理能力を増加させ、バックトラッキングを防止し、取り込むNTP及び鑄型を安定化する。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのアミノ酸修飾を「Nヘリックス」（残基374～409）中に含む（例えば、伸長複合体の安定性及び処理能力を高めるための）。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのアミノ酸修飾を「Oヘリックス」（残基627～640）中に含む（例えば、挿入中に取り込むNTPを安定化し、バックトラッキングを防止するための）。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのアミノ酸修飾を「Yヘリックス」（残基644～661）中に含む（例えば、成長するRNA転写産物を安定化するための）。

【0080】

したがって、いくつかの態様は、野生型RNAポリメラーゼと比較して、複数のアミノ酸置換及び／又は修飾を含むRNAポリメラーゼバリエーションを提供する。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、（a）新規RNA合成のための結合部位の残基でのアミノ酸置換、及び（b）RNAポリメラーゼの開始複合体からRNAポリメラーゼの伸長複合体へのコンフォメーション変化を促進するアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む。

【0081】

in vitro 転写反応でのRNAポリメラーゼバリエーションの使用は、いくつかの実施形態では、対照RNAポリメラーゼと比較して、転写効率を高める。例えば、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、転写効率（例えば、RNA収率及び／又は転写速度）を少なくとも20%高め得る。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、転写効率（例えば、RNA収率及び／又は転写速度）を、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも10%高める。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、転写効率を、20～100%、20～90%、20～80%、20～70%、20～60%、20～50%、30～100%、30～90%、30～80%、30～70%、30～60%、30～50%、40～100%、40～90%、40～80%、40～70%、40～60%、40～50%、50～100%、50～90%、50～80%、50～70%、または50～60%高める。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、全RNA収率を、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも10%高める。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、全RNA収率を、20～100%、20～90%、20～80%、20～70%、20～60%、20～50%、30～100%、30～90%、30～80%、30～70%、30～60%、30～50%、40～100%、40～90%、40～80%、40～70%、40～60%、40～50%、50～100%、50～90%、50～80%、50～70%、または50～60%高

める。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、転写速度を、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも10%高める。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、転写速度を、20~100%、20~90%、20~80%、20~70%、20~60%、20~50%、30~100%、30~90%、30~80%、30~70%、30~60%、30~50%、40~100%、40~90%、40~80%、40~70%、40~60%、40~50%、50~100%、50~90%、50~80%、50~70%、または50~60%高める。いくつかの実施形態では、対照RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む野生型RNAポリメラーゼである（「野生型T7RNAポリメラーゼ」）。
【0082】

10

驚くべきことに、RNAポリメラーゼバリエーションにより、*in vitro*転写反応ではるかに低い濃度（量）のcapアナログを使用して、野生型T7RNAポリメラーゼを使用して生成される量と同等の量のキャップされたRNAを生成することができる。例えば、図1A~2C及び実施例1~2を参照されたい。いくつかの実施形態では、*in vitro*転写反応において半分のcapアナログ濃度を使用する場合、*in vitro*転写反応にRNAポリメラーゼバリエーションを使用することにより、キャップされたRNAの収率が高くなる。いくつかの実施形態では、*in vitro*転写反応において25%、50%、または75%のみのcapアナログ濃度を使用する場合、*in vitro*転写反応にRNAポリメラーゼバリエーションを使用することにより、キャップされたRNAの収率が高くなる。例えば、*in vitro*転写反応において25%、50%、または75%のみのcapアナログ濃度を使用する場合、RNAポリメラーゼバリエーションを使用することにより、キャップされたRNAの収率が少なくとも20%高まり得る。いくつかの実施形態では、*in vitro*転写反応において25%、50%、または75%のみのcapアナログ濃度を使用する場合、RNAポリメラーゼバリエーションを使用することにより、キャップされたRNAの収率が、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%高まる。いくつかの実施形態では、*in vitro*転写反応において25%、50%、または75%のみのcapアナログ濃度を使用する場合、RNAポリメラーゼバリエーションを使用することにより、キャップされたRNAの収率が、20~100%、20~90%、20~80%、20~70%、20~60%、20~50%、30~100%、30~90%、30~80%、30~70%、30~60%、30~50%、40~100%、40~90%、40~80%、40~70%、40~60%、40~50%、50~100%、50~90%、50~80%、50~70%、または50~60%高まる。いくつかの実施形態では、対照RNAポリメラーゼは、野生型T7RNAポリメラーゼである。

20

30

【0083】
いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションを使用することにより、キャップされたRNAの全収率が、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも10%高まる。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションを使用することにより、キャップされたRNAの全収率が、20~100%、20~90%、20~80%、20~70%、20~60%、20~50%、30~100%、30~90%、30~80%、30~70%、30~60%、30~50%、40~100%、40~90%、40~80%、40~70%、40~60%、40~50%、50~100%、50~90%、50~80%、50~70%、または50~60%高まる。

40

【0084】
いくつかの実施形態では、*in vitro*転写反応でのRNAポリメラーゼバリエーションの使用は、共転写キャッピング効率を高める。例えば、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、共転写キャッピング効率（例えば、capアナログを含む転写産物の割合）を

50

少なくとも20%高め得る。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、共転写キャッピング効率（例えば、capアナログを含む転写産物の割合）を、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%高める。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、共転写キャッピング効率を、20~100%、20~90%、20~80%、20~70%、20~60%、20~50%、30~100%、30~90%、30~80%、30~70%、30~60%、30~50%、40~100%、40~90%、40~80%、40~70%、40~60%、40~50%、50~100%、50~90%、50~80%、50~70%、または50~60%高める。いくつかの実施形態では、対照RNAポリメラーゼは、野生型T7RNAポリメラーゼである。

10

【0085】

いくつかの実施形態では、mRNAの少なくとも50%は、機能性capアナログを含む。例えば、mRNAの少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも95%、または100%は、capアナログを含み得る。いくつかの実施形態では、mRNAの50%~100%、50~90%、50~80%、または50~70%は、capアナログを含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、in vitro転写反応でのRNAポリメラーゼバリエーションの使用は、in vitro転写反応において半分のcapアナログ濃度を使用する場合のRNAの3'均一性を改善する。例えば、in vitro転写反応において25%、50%、または75%のみのcapアナログ濃度を使用する場合、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、RNAの3'均一性を少なくとも20%改善し得る。いくつかの実施形態では、in vitro転写反応において25%、50%、または75%のみのcapアナログ濃度を使用する場合、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、3'均一性を、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%改善する。いくつかの実施形態では、in vitro転写反応において25%、50%、または75%のみのcapアナログ濃度を使用する場合、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、3'均一性を、20~100%、20~90%、20~80%、20~70%、20~60%、20~50%、30~100%、30~90%、30~80%、30~70%、30~60%、30~50%、40~100%、40~90%、40~80%、40~70%、40~60%、40~50%、50~100%、50~90%、50~80%、50~70%、または50~60%改善する。いくつかの実施形態では、対照RNAポリメラーゼは、野生型T7RNAポリメラーゼである。

20

30

【0087】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションを含むin vitro転写反応で生成されるmRNAの少なくとも50%は、3'均一性を示す。例えば、mRNAの少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも95%、または100%は、3'均一性を示す。いくつかの実施形態では、mRNAの50%~100%、50~90%、50~80%、または50~70%は、3'均一性を示す。

40

【0088】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションを含むin vitro転写反応で生成されるmRNAは、閾値を超える3'均一性を有する。いくつかの実施形態では、閾値は50%であるか、または少なくとも50%である。例えば、閾値は、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、または90%であってもよい。

【0089】

いくつかの実施形態では、in vitro転写反応でのRNAポリメラーゼバリエーション

50

トの使用は、転写の忠実度（例えば、変異率）を改善する。例えば、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、転写の忠実度を、少なくとも20%改善し得る。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、転写の忠実度を、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%改善する。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、転写の忠実度を、20~100%、20~90%、20~80%、20~70%、20~60%、20~50%、30~100%、30~90%、30~80%、30~70%、30~60%、30~50%、40~100%、40~90%、40~80%、40~70%、40~60%、40~50%、50~100%、50~90%、50~80%、50~70%、または50~60%改善する。転写の忠実度を改善するRNAポリメラーゼバリエーションは、対照RNAポリメラーゼよりも低い変異率または変異の総数でRNA転写産物（例えば、mRNA転写産物）を生成する。いくつかの実施形態では、対照RNAポリメラーゼは、野生型T7RNAポリメラーゼである。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションを使用して生成されるmRNAは、DNA鋳型に対して、100ヌクレオチドあたり1個未満の変異を有する。例えば、生成されるmRNAは、DNA鋳型に対して、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000ヌクレオチドあたり1個未満の変異を有し得る。

20

【0091】

いくつかの実施形態では、*in vitro*転写反応でのRNAポリメラーゼバリエーションの使用は、*in vitro*転写反応における二本鎖RNA (dsRNA) の混入量を低下させる。例えば、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、*in vitro*転写反応におけるdsRNAの混入量を、少なくとも20%低下させ得る。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、*in vitro*転写反応におけるdsRNAの混入量を、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%低下させる。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションの使用は、*in vitro*転写反応におけるdsRNAの混入量を、20~100%、20~90%、20~80%、20~70%、20~60%、20~50%、30~100%、30~90%、30~80%、30~70%、30~60%、30~50%、40~100%、40~90%、40~80%、40~70%、40~60%、40~50%、50~100%、50~90%、50~80%、50~70%、または50~60%低下させる。いくつかの実施形態では、対照RNAポリメラーゼは、野生型T7RNAポリメラーゼである。

30

【0092】

いくつかの実施形態では、dsRNA混入物質の濃度は、mRNA産物25 µgあたり、10 ng未満である。いくつかの実施形態では、dsRNA混入物質の濃度は、mRNA産物25 µgあたり、5 ng未満である。例えば、dsRNA混入物質の濃度は、mRNA産物25 µgあたり、4 ng未満、mRNA産物25 µgあたり3 ng未満、mRNA産物25 µgあたり2 ng未満、またはmRNA産物25 µgあたり1 ng未満であり得る。いくつかの実施形態では、dsRNA混入物質の濃度は、mRNA産物25 µgあたり、0.5~1、0.5~2、0.5~3、0~.4、または0.5~5 ngである。

40

【0093】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションを含む*in vitro*転写反応で生成されるmRNAは、閾値より低いdsRNA量を有する。いくつかの実施形態では、閾値は10 ngである。いくつかの実施形態では、閾値は5 ngである。いくつかの実施形態では、閾値は、4 ng、3 ng、2 ng、または1 ngである。

【0094】

50

アミノ酸の置換及び修飾

RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型(WT) RNAポリメラーゼに対して、少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは少なくとも2つのアミノ酸置換を含む。例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するWT T7 RNAポリメラーゼに関して、350位のグルタミン酸(E)は「野生型アミノ酸」と見なされる一方、350位でのグルタミン酸からトリプトファンへの置換は「アミノ酸置換」と見なされる。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、T7 RNAポリメラーゼバリエーションであり、WT RNAポリメラーゼ(例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するWT T7 RNAポリメラーゼ)に対して少なくとも1つ(1つ以上)のアミノ酸置換を含む。

【0095】

いくつかの実施形態では、RNA T7ポリメラーゼバリエーションは、少なくとも2つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、RNA T7ポリメラーゼバリエーションは、少なくとも3つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、RNA T7ポリメラーゼバリエーションは、少なくとも4つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、RNA T7ポリメラーゼバリエーションは、少なくとも5つのアミノ酸置換を含む。

【0096】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、RNAポリメラーゼバリエーションが開始複合体から伸長複合体に移行するときに、RNAポリメラーゼバリエーションのループ構造にヘリックス構造へのコンフォメーション変化をもたらす1つ(少なくとも1つ)のアミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含む。アミノ酸置換は、いくつかの実施形態において、高傾向のアミノ酸置換である。高ヘリックス傾向のアミノ酸の例としては、アラニン、イソロイシン、ロイシン、アルギニン、メチオニン、リジン、グルタミン、及び／又はグルタミン酸が挙げられる。

【0097】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、極性の中性アミノ酸を導入する(少なくとも1つの)アミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、アスパラギン(N)、システイン(C)、グルタミン(Q)、メチオニン(M)、セリン(S)、及びトレオニン(T)から選択される。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、芳香族アミノ酸を導入する(少なくとも1つの)アミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン(W)、チロシン(Y)、及びフェニルアラニン(F)から選択される。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、非極性の脂肪族アミノ酸を導入する(少なくとも1つの)アミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン(A)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、プロリン(P)、及びバリン(V)から選択される。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、正に荷電したアミノ酸を導入する(少なくとも1つの)アミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、正に荷電したアミノ酸は、リジン(K)、アルギニン(R)、及びヒスチジン(H)から選択される。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、負に荷電したアミノ酸を導入する(少なくとも1つの)アミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、負に荷電したアミノ酸は、アスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)から選択される。

【0098】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、保存アミノ酸残基ではない位置で、(少なくとも1つの)アミノ酸修飾を含むアミノ酸配列を含む。保存アミノ酸残基は、同じタンパク質の複数の相同配列で一般に共通のアミノ酸またはアミノ酸タイプ(例えば、GlyもしくはSerなどの個々のアミノ酸、または酸性官能基を有するアミノ酸等の同様の特性を共有するアミノ酸の群)である。保存アミノ酸残基は、相同アミノ酸配列の配列アラインメントを使用して同定することができる。基本的なローカルアラインメント(Basic Local Alignment)検索を使用して得られた約1

10

20

30

40

50

000のRNAポリメラーゼ配列の配列アラインメントにより、RNAポリメラーゼ配列間で保存される可能性が最も高い配列番号1の240の位置の決定が可能になった。RNAポリメラーゼ配列間で保存される可能性が最も高い配列番号1のこれらの240の位置は、5～6、39、269～277、279、281～282、323～333、411～448、454～470、472～474、497～516、532～560、562～573、626～646、691、693～702、724～738、775～794、805～820、828～833、865～867、及び877～879位である。したがって、いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、配列番号1の5～6、39、269～277、279、281～282、323～333、411～448、454～470、472～474、497～516、532～560、562～573、626～646、691、693～702、724～738、775～794、805～820、828～833、865～867、及び877～879位のうちの1つではない位置に、（少なくとも1つの）アミノ酸修飾を含むRNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、配列番号1の5～6、39、269～277、279、281～282、323～333、411～448、454～470、472～474、497～516、532～560、562～573、626～646、691、693～702、724～738、775～794、805～820、828～833、865～867、及び877～879位のうちの1つではない任意の数の位置に、任意の数のアミノ酸修飾をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、配列番号2～9のいずれか1つのアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエーションは、5～6、39、269～277、279、281～282、323～333、411～448、454～470、472～474、497～516、532～560、562～573、626～646、691、693～702、724～738、775～794、805～820、828～833、865～867、及び877～879位のうちの1つではない位置に、（少なくとも1つの）さらなるアミノ酸修飾をさらに含み得る。反対に、保存されていないアミノ酸位置は、修飾されているまたは変異している可能性が最も高い。したがって、いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、1～4、7～38、40～268、278、280、283～322、334～410、449～453、471、475～496、517～531、561、574～625、647～690、692、703～723、739～774、795～804、821～827、834～864、868～876、及び880～883位に、（少なくとも1つの）アミノ酸修飾を含むRNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、配列番号2～9のいずれか1つのアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエーションは、1～4、7～38、40～268、278、280、283～322、334～410、449～453、471、475～496、517～531、561、574～625、647～690、692、703～723、739～774、795～804、821～827、834～864、868～876、及び880～883位に、（少なくとも1つの）さらなるアミノ酸修飾をさらに含み得る。

【0099】

いくつかの実施形態では、配列番号2～9のいずれか1つのアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエーションは、RNAポリメラーゼタンパク質の二次構造または三次構造を破壊しない任意のアミノ酸位置に、（少なくとも1つの）アミノ酸修飾をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、配列番号2～9のいずれか1つのアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエーションは、RNAポリメラーゼタンパク質がフォールドする能力を妨害しない任意のアミノ酸位置に、（少なくとも1つの）アミノ酸修飾をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、配列番号2～9のいずれか1つのアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエーションは、RNAポリメラーゼタンパク質が核酸（例えば、DNA）に結合する能力を妨害しない任意のアミノ酸位置に、（少なくとも1つの）アミノ酸修飾をさらに含み得る。

【0100】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼに対して、437位でのアミノ酸置換（例えば、N437Y）、387位でのアミノ酸置換（例えば、K387S）、350位でのアミノ酸置換（例えば、E350W）、及び351位でのアミノ酸置換（例えば、D351V）を含むアミノ酸配列を含み、その場合、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼに対して、N437Y、K387S、E350W、及びD351V置換を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

【0101】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼに対して、437位でのアミノ酸置換（例えば、N437Y）、位置でのアミノ酸置換（例えば、E350W）、及び351位でのアミノ酸置換（例えば、D351V）を含むアミノ酸配列を含み、その場合、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼに対して、N437Y、E350W、及びD351V置換を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼに対して、387位でのアミノ酸置換（例えば、K387S）、位置でのアミノ酸置換（例えば、E350W）、及び351位でのアミノ酸置換（例えば、D351V）を含むアミノ酸配列を含み、その場合、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼに対して、K387S、E350W、及びD351V置換を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

20

【0103】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼに対して、653位でのアミノ酸置換（例えば、D653W）、350位でのアミノ酸置換（例えば、E350W）、及び351位でのアミノ酸置換（例えば、D351V）を含むアミノ酸配列を含み、その場合、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼに対して、D653W、E350W、及びD351V置換を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

30

【0104】

いくつかの実施形態では、K387位でのアミノ酸置換は、極性の中性アミノ酸である。いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、アスパラギン（N）、システイン（C）、グルタミン（Q）、メチオニン（M）、セリン（S）、及びトレオニン（T）から選択される。したがって、いくつかの実施形態では、K387位でのアミノ酸置換は、K387N、K387C、K387Q、K387M、K387S、またはK387Tである。

【0105】

いくつかの実施形態では、N437位でのアミノ酸置換は、芳香族アミノ酸である。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。したがって、いくつかの実施形態では、N437位でのアミノ酸置換は、N437W、N437Y、またはN437Fである。

40

【0106】

いくつかの実施形態では、D653位でのアミノ酸置換は、芳香族アミノ酸である。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。したがって、いくつかの実施形態では、D653位でのアミノ酸置換は、D653W、D653Y、またはD653Fである。

【0107】

50

いくつかの実施形態では、E 3 5 0 位でのアミノ酸置換は、芳香族アミノ酸である。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、及びフェニルアラニン (F) から選択される。したがって、いくつかの実施形態では、E 3 5 0 位でのアミノ酸置換は、E 3 5 0 W、E 3 5 0 Y、または E 3 5 0 F である。

【0 1 0 8】

いくつかの実施形態では、D 3 5 1 位でのアミノ酸置換は、非極性の脂肪族アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン (A)、グリシン (G)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、プロリン (P)、及びバリン (V) から選択される。したがって、いくつかの実施形態では、D 3 5 1 位でのアミノ酸置換は、D 3 5 1 A、D 3 5 1 G、D 3 5 1 I、D 3 5 1 L、D 3 5 1 P、または D 3 5 1 V である。

10

【0 1 0 9】

いくつかの実施形態では、RNA ポリメラーゼバリエーションは、野生型 RNA ポリメラーゼと比較して、R 3 7 9 位にアミノ酸置換 (例えば、R 3 7 9 A) を含むアミノ酸配列を含み、野生型 RNA ポリメラーゼは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、R 3 7 9 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン (A)、グリシン (G)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、プロリン (P)、及びバリン (V) から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、及びフェニルアラニン (F) から選択される。いくつかの実施形態では、荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸 (例えば、リジン (K) もしくはヒスチジン (H)) または負に荷電したアミノ酸 (例えば、グルタミン酸 (E) もしくはアスパラギン酸 (D)) である。いくつかの実施形態では、R 3 7 9 位でのアミノ酸置換は、R 3 7 9 A、R 3 7 9 K、R 3 7 9 E、または R 3 7 9 W である。

20

【0 1 1 0】

いくつかの実施形態では、RNA ポリメラーゼバリエーションは、野生型 RNA ポリメラーゼと比較して、Y 3 8 5 位にアミノ酸置換 (例えば、Y 3 8 5 A) を含むアミノ酸配列を含み、野生型 RNA ポリメラーゼは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Y 3 8 5 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン (A)、グリシン (G)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、プロリン (P)、及びバリン (V) から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン (W) 及びフェニルアラニン (F) から選択される。いくつかの実施形態では、荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸 (例えば、リジン (K)、ヒスチジン (H)、もしくはアルギニン (R)) または負に荷電したアミノ酸 (例えば、グルタミン酸 (E) もしくはアスパラギン酸 (D)) である。いくつかの実施形態では、Y 3 8 5 位でのアミノ酸置換は、Y 3 8 5 A、Y 3 8 5 K、Y 3 8 5 W、または Y 3 8 5 V である。

30

【0 1 1 1】

いくつかの実施形態では、RNA ポリメラーゼバリエーションは、野生型 RNA ポリメラーゼと比較して、R 3 8 6 位にアミノ酸置換 (例えば、R 3 8 6 A) を含むアミノ酸配列を含み、野生型 RNA ポリメラーゼは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、R 3 8 6 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン (A)、グリシン (G)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、プロリン (P)、及びバリン (V) から選択される。いくつかの実施形態では、荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸 (例えば、リジン (K) もしくはヒスチジン (H)) または負に荷電したアミノ酸 (例えば、グルタミン酸 (E) もしくはアスパラギン酸 (D)) である。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン (W)、チロシン (

40

50

Y)、及びフェニルアラニン(F)から選択される。いくつかの実施形態では、R386位でのアミノ酸置換は、R386A、R386K、またはR386Yである。

【0112】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、D388位にアミノ酸置換(例えば、D388A)を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、D388位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン(A)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、プロリン(P)、及びバリン(V)から選択される。いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、アスパラギン(N)、システイン(C)、グルタミン(Q)、メチオニン(M)、セリン(S)、及びトレオニン(T)から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン(W)、チロシン(Y)、及びフェニルアラニン(F)から選択される。いくつかの実施形態では、D388位でのアミノ酸置換は、D388A、D388N、またはD388Yである。

10

【0113】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、K389位にアミノ酸置換(例えば、K389A)を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、K389位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン(A)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、プロリン(P)、及びバリン(V)から選択される。いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、アスパラギン(N)、システイン(C)、グルタミン(Q)、メチオニン(M)、セリン(S)、及びトレオニン(T)から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン(W)、チロシン(Y)、及びフェニルアラニン(F)から選択される。いくつかの実施形態では、K389位でのアミノ酸置換は、K389A、K389S、またはK389Yである。

20

【0114】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、R391位にアミノ酸置換(例えば、R391A)を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、R391位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン(A)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、プロリン(P)、及びバリン(V)から選択される。いくつかの実施形態では、R391位でのアミノ酸置換は、R391Aである。

30

【0115】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、R394位にアミノ酸置換(例えば、R394A)を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、R394位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン(A)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、プロリン(P)、及びバリン(V)から選択される。いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、アスパラギン(N)、システイン(C)、グルタミン(Q)、メチオニン(M)、セリン(S)、及びトレオニン(T)から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン(W)、チロシン(Y)、及びフェニルアラニン(F)から選択される。いくつかの実施形態では、R394位でのアミノ酸置換は、R394A、R394Q、またはR394Yである。

40

50

【0116】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、R395位にアミノ酸置換（例えば、R395A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、R395位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、R395位でのアミノ酸置換は、R395Aである。

【0117】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、D471位にアミノ酸置換（例えば、D471A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、D471位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン（K）、ヒスチジン（H）、もしくはアルギニン（R））または負に荷電したアミノ酸（例えば、グルタミン酸）である。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。いくつかの実施形態では、D471位でのアミノ酸置換は、D471A、D471E、またはD471Yである。

【0118】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、R627位にアミノ酸置換（例えば、R627A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、R627位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、R627位でのアミノ酸置換は、R627Aである。

【0119】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、R631位にアミノ酸置換（例えば、R631A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、R631位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、R631位でのアミノ酸置換は、R631Aである。

【0120】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、R632位にアミノ酸置換（例えば、R632A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、R632位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。いくつかの実施形態では、極性の中性アミノ酸は、アスパラギン（N）、システ

10

20

30

40

50

イン（C）、グルタミン（Q）、メチオニン（M）、セリン（S）、及びトレオニン（T）から選択される。いくつかの実施形態では、R 6 3 2 位でのアミノ酸置換は、R 6 3 2 D、R 6 3 2 A、R 6 3 2 Q、または R 6 3 2 Y である。

【0121】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、G 6 4 0 位にアミノ酸置換（例えば、G 6 4 0 A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、G 6 4 0 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、G 6 4 0 位でのアミノ酸置換は、G 6 4 0 A である。

10

【0122】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、G 6 4 5 位にアミノ酸置換（例えば、G 6 4 5 A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、G 6 4 5 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、G 6 4 5 位でのアミノ酸置換は、G 6 4 5 A である。

20

【0123】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、Q 6 4 8 位にアミノ酸置換（例えば、Q 6 4 8 A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Q 6 4 8 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。いくつかの実施形態では、荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン（K）、ヒスチジン（H）、もしくはアルギニン（R））または負に荷電したアミノ酸（例えば、グルタミン酸（E）もしくはアスパラギン酸（D））である。いくつかの実施形態では、Q 6 4 8 位でのアミノ酸置換は、Q 6 4 8 A、Q 6 4 8 R、Q 6 4 8 D、Q 6 4 8 E、または Q 6 4 8 Y である。

30

【0124】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、Q 6 4 9 位にアミノ酸置換（例えば、Q 6 4 9 A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Q 6 4 9 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、Q 6 4 9 位でのアミノ酸置換は、Q 6 4 9 A である。

40

【0125】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、E 6 5 2 位にアミノ酸置換（例えば、E 6 5 2 A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、E 6 5 2 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族ア

50

ミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。いくつかの実施形態では、荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン（K）、ヒスチジン（H）、またはアルギニン（R））である。いくつかの実施形態では、E 6 5 2 位でのアミノ酸置換は、E 6 5 2 R、E 6 5 2 A、またはE 6 5 2 Yである。

【0 1 2 6】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、D 6 5 3 位にアミノ酸置換（例えば、D 6 5 3 A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、D 6 5 3 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。いくつかの実施形態では、荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン（K）、ヒスチジン（H）、またはアルギニン（R））である。いくつかの実施形態では、D 6 5 3 位でのアミノ酸置換は、D 6 5 3 K、D 6 5 3 A、またはD 6 5 3 Yである。

【0 1 2 7】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、Q 6 5 6 位にアミノ酸置換（例えば、Q 6 5 6 A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Q 6 5 6 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。いくつかの実施形態では、荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン（K）、ヒスチジン（H）、もしくはアルギニン（R））または負に荷電したアミノ酸（例えば、グルタミン酸（E）もしくはアスパラギン酸（D））である。いくつかの実施形態では、Q 6 5 6 位でのアミノ酸置換は、Q 6 5 6 K、Q 6 5 6 A、Q 6 5 6 E、またはQ 6 5 6 Yである。

【0 1 2 8】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、野生型RNAポリメラーゼと比較して、P 6 5 7 位にアミノ酸置換（例えば、P 6 5 7 A）を含むアミノ酸配列を含み、野生型RNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P 6 5 7 位のアミノ酸置換は、非極性脂肪族アミノ酸、極性中性アミノ酸、芳香族アミノ酸、または荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、非極性の脂肪族アミノ酸は、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される。いくつかの実施形態では、芳香族アミノ酸は、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、及びフェニルアラニン（F）から選択される。いくつかの実施形態では、荷電アミノ酸は、正に荷電したアミノ酸（例えば、リジン（K）、ヒスチジン（H）、もしくはアルギニン（R））または負に荷電したアミノ酸（例えば、グルタミン酸（E）もしくはアスパラギン酸（D））である。いくつかの実施形態では、P 6 5 7 位でのアミノ酸置換は、P 6 5 7 G、P 6 5 7 A、P 6 5 7 E、またはP 6 5 7 Yである。

【0 1 2 9】

【表 1 - 1】

表 1. RNAポリメラーゼバリエーション

RNAポリメラーゼバリエーション	アミノ酸配列	配列番号
E350X ¹ D351X ² K387X ³ N437X ⁴	MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRK MFERQLKAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFL QEIKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEA KHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHV GVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGIS PMFQPCVVPKPKWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYK AINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVX¹X²IPAIEREELPMKPEDIDM NPEALTAWKRAAAVYRX³DKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMD WRGRVYAVSMFNPQGX⁴DMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWYWLKIHGANCAGVDKV PFERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGL SYNCSLPLAFDGSCSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVN EILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKR SVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDITIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESV SVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWTPDGFVPVWQE YKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSDGSHL RKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLAD FYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF (式中、X¹は芳香族アミノ酸であり、任意選択でW、Y、及びFから選択され、X²は非極性脂 肪族アミノ酸であり、任意選択でA、G、I、L、P、及びVから選択され、X³は極性中性ア ミノ酸であり、任意選択でN、C、Q、M、S、及びTから選択され、X⁴は芳香族アミノ酸で あり、任意選択でW、Y、及びFから選択される)。	2
E350X ¹ D351X ² N437X ⁴	MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRK MFERQLKAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFL QEIKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEA KHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHV GVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGIS PMFQPCVVPKPKWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYK AINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVX¹X²IPAIEREELPMKPEDIDM NPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDW RGRVYAVSMFNPQGX⁴DMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWYWLKIHGANCAGVDKVP PFERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLS YNC SLPLAFDGSCSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVN I LQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRS VMTLAYGSKEFGFRQQVLEDITIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVS VTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWTPDGFVPVWQEY KKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSDGSHLR KTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADF YDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF (式中、X¹は芳香族アミノ酸であり、任意選択でW、Y、及びFから選択され、X²は非極性脂 肪族アミノ酸であり、任意選択でA、G、I、L、P、及びVから選択され、X⁴は芳香族アミ ノ酸であり、任意選択でW、Y、及びFから選択される)。	3

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

RNAポリメラーゼバリエーション	アミノ酸配列	配列番号
E350X ¹ D351X ² K387X ³	MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRK MFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKA KRGRPTAFQFL QEIKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEA KHFKKNVVEEQLNKRVRGHVYKKAFTMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHV GVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGIS PMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPVEVYK AINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVX ¹ X ² IPAIEREELPMKPEDIDM NPEALTAWKRAAAAVYRX ³ DKARKSRRI SLEFMLEQANKFANHKA IWFPYNMD WRGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVP FPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLS YNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGI VAKKVNE ILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRS VMTLAYGSKEFGFRQQVLEDITIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVS VTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVPWQEQY KKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLR KTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFAVRETMTVDTYESCDVLADF YDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFABA (式中、 X ¹ は芳香族アミノ酸であり、任意選択でW、Y、及びFから選択され、X ² は非極 性脂肪族アミノ酸であり、任意選択でA、G、I、L、P、及びVから選択され、X ³ は極性中性アミノ酸であり、任意選択でN、C、Q、M、S、及びTから選択され る)。	4
E350X ¹ D351X ² D653X ³	MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRK MFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKA KRGRPTAFQFL QEIKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEA KHFKKNVVEEQLNKRVRGHVYKKAFTMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHV GVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGIS PMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPVEVYK AINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVX ¹ X ² IPAIEREELPMKPEDIDM NPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRI SLEFMLEQANKFANHKA IWFPYNMDW RGRVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPF PERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSY NCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGI VAKKVNEI LQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSV MTLAYGSKEFGFRQQVLEX ³ TIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVS VTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVPWQEQY KKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLR KTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFAVRETMTVDTYESCDVLADF YDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFABA (式中、X ¹ は芳香族アミノ酸であり、任意選択でW、Y、及びFから選択され、X ² は非 極性脂肪族アミノ酸であり、任意選択でA、G、I、L、P、及びVから選択され、X ³ は 芳香族アミノ酸であり、任意選択でW、Y、及びFから選択される)。	5
E350W D351V K387S N437Y	MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRK MFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKA KRGRPTAFQFL QEIKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEA KHFKKNVVEEQLNKRVRGHVYKKAFTMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHV GVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGIS PMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPVEVYK AINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVW ¹ IPAIEREELPMKPEDIDMNP EALTAWKRAAAAVYRS ² DKARKSRRI SLEFMLEQANKFANHKA IWFPYNMDWRG RVYAVSMFNPQGYDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPE RIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNC SLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGI VAKKVNEILQ ADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMT LAYGSKEFGFRQQVLEDITIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVS VTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVPWQEQYKKP IQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKT VWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFAVRETMTVDTYESCDVLADFDQ FADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFABA	6
E350W D351V	MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRK MFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKA KRGRPTAFQFL	7

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

RNAポリメラーゼバリエーション	アミノ酸配列	配列番号
N437Y	QEIKPEAVAYITIKTTLACLTSDANTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEA KHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHV GVRCIEMLIESTGMVSLHRQNA GVVGDSE TIELAPEYAEAIATRAGALAGIS PMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYK AINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPV WV IPAIEREELPMKPEDIDMNP EALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKA IWFPYNMDWRG RVYAVSMFNPQGYDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWYWLKIHGANCAGVDKVPFPE RIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNC SLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGIVAKKVNEILQ ADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVT RSVTKRSVMT LAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTV VAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQYKPKP IQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGS HLRKTV VWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFDYDQ FADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF	10
E350W D351V K387S	MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRK MFERQLKAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFL QEIKPEAVAYITIKTTLACLTSDANTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEA KHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHV GVRCIEMLIESTGMVSLHRQNA GVVGDSE TIELAPEYAEAIATRAGALAGIS PMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYK AINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPV WV IPAIEREELPMKPEDIDMNP EALTAWKRAAAAVYR SD KARKSRRISLEFMLEQANKFANHKA IWFPYNMDWRG RVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWYWLKIHGANCAGVDKVPFPE RIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNC SLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGIVAKKVNEILQ ADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVT RSVTKRSVMT LAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTV VAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQYKPKP IQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGS HLRKTV VWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFDYDQ FADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF	8
E350W D351V D653W	MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRK MFERQLKAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFL QEIKPEAVAYITIKTTLACLTSDANTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEA KHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHV GVRCIEMLIESTGMVSLHRQNA GVVGDSE TIELAPEYAEAIATRAGALAGIS PMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYK AINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPV WV IPAIEREELPMKPEDIDMNP EALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKA IWFPYNMDWRG RVYAVSMFNPQGNMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWYWLKIHGANCAGVDKVPFPE RIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNC SLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGIVAKKVNEILQ ADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVT RSVTKRSVMT LAYGSKEFGFRQQVLE WT IQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTV VAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQYKPKP IQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGS HLRKTV VWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFDYDQ FADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF	9

10

20

30

40

【0130】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、1つ以上の精製タグをさらに含む。例えば、RNAポリメラーゼバリエーションは、ヒスチジン精製タグ（例えば、－HHHHHHH－（配列番号14）のアミノ酸配列）または精製に有用なアミノ酸の任意の他の配列を含み得る。ヒスチジン精製タグまたは同様に荷電したアミノ酸配列は、 Ni^{2+} 樹脂に結合することができる。いくつかの実施形態では、ヒスチジン精製タグは、－HHHHHHHHV－（配列番号15）のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、精製タグは、RNAポリメラーゼバリエーションのN末端に共有結合されたN末端精製タグである。いくつかの実施形態では、精製タグは、RNAポリメラーゼバリエーションのC末端に共

50

有結合されたC末端精製タグである。いくつかの実施形態では、タンパク質精製タグは、FLAGタグ（例えば、**－DYKDDDK－**（配列番号16）のアミノ酸配列）またはヘマグルチニンタグである。いくつかの実施形態では、N末端Hisタグを含むRNAポリメラーゼバリエーションは、配列番号10～13のいずれか1つを含む。

【0131】

【表2－1】

表2. N末端Hisタグを含むRNAポリメラーゼバリエーション

RNAポリメラーゼバリエーション	アミノ酸配列	配列番号
E350W D351V K387S N437Y	MHHHHHHVNSNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESY EMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRG KRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTSAADNTTVQAVASAI GRAIEDEAR FGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQVVEADMLSKGLLGGEAWSS WHKEDSIHVGVRCEMLIESTGMVSLHRQNAAGVVGQDSEITELAPEYAEAIAT RAGALAGISPMFQPCVVPKPKWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYE DVYMPPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPV WV IPAIEREELPM KPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYR SD KARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIW FPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGYDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWYWLKIHGANCA GVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGV QHHGLSYNCSLPLAFDGSQSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIV AKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTR SVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGF PVWQYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQ DGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDITYESC DVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF	10
N437Y E350W D351V	MHHHHHHVNSNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESY EMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRG KRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTSAADNTTVQAVASAI GRAIEDEAR FGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQVVEADMLSKGLLGGEAWSS WHKEDSIHVGVRCEMLIESTGMVSLHRQNAAGVVGQDSEITELAPEYAEAIAT RAGALAGISPMFQPCVVPKPKWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYE DVYMPPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPV WV IPAIEREELPM KPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYR SD KARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIW FPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGYDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWYWLKIHGANCA GVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGV QHHGLSYNCSLPLAFDGSQSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIV AKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTR SVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGF PVWQYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQ DGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDITYESC DVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF	11
K387S E350W D351V	MHHHHHHVNSNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESY EMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRG KRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTSAADNTTVQAVASAI GRAIEDEAR FGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQVVEADMLSKGLLGGEAWSS WHKEDSIHVGVRCEMLIESTGMVSLHRQNAAGVVGQDSEITELAPEYAEAIAT RAGALAGISPMFQPCVVPKPKWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYE DVYMPPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPV WV IPAIEREELPM KPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYR SD KARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIW FPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGYDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWYWLKIHGANCA GVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGV QHHGLSYNCSLPLAFDGSQSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIV AKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTR SVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL	12

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

RNAポリメラーゼバリエーション	アミノ酸配列	配列番号
	IWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGF PVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQ DGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDITYESC DVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF	
D653W E350W D351V	MHHHHHHVNSNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESY EMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAKPLITTLPKMIARINDWFEEVKAKRG KRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTADNTTVQAVASAIGRAIEDEAR FGRIRDLEAKHFKNVVEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSS WHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAVVGQDSETIELAPEYAEAIAT RAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYE DVYMPVEYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVWVIPAIEREELPM KPEDIDMNPALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRI SLEFMLEQANKFANHKA IW FPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWYWLKIHGANC GVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGV QHHGLSYNCSLPLAFDGSQSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIV AKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKLGTALAGQWLAYGVTR SVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEWTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL IWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGF PVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQ DGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDITYESC DVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRLDILESDFAF	13

10

20

【0132】

いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、配列番号2～13のいずれか1つのアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼと、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼバリエーションは、配列番号1のアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼと少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%の同一性を共有し得る。

30

【0133】

用語「同一性」とは、配列を比較して決定される、2つ以上のポリペプチド（例えば、酵素）またはポリヌクレオチド（核酸）の配列間の関係を指す。同一性はまた、配列間の配列関連性の程度も指し、2つ以上のアミノ酸残基または核酸残基の鎖間の一致数によって決定される。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（例えば、「アルゴリズム」）によって対処される、ギャップアラインメント（もしあれば）を有する2つ以上の配列の小さい方の間の完全な一致の割合を測定する。関連するタンパク質または核酸の同一性は、既知の方法によって容易に計算することができる。ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列に適用される「同一性の割合（%）」は、当該配列をアラインし、必要に応じてギャップを導入して最大の同一性の割合を達成した後の第2の配列のアミノ酸配列または核酸配列における残基と同一の、アミノ酸または核酸の候補配列における残基（アミノ酸残基または核酸残基）の割合と定義される。アラインメントのための方法及びコンピュータプログラムは、当技術分野で周知である。同一性は、同一性の割合の計算に依存するが、この計算に導入されるギャップ及びペナルティによって値が異なり得ることが理解される。一般に、特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（例えば、抗原）のバリエーションは、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、本明細書に記載の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によって決定される、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97

40

50

%、98%、99%であるが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用のツールとしては、BLASTスイート (Stephen F. Altschul, et al (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) のツールが挙げられる。別のよく知られたローカルアラインメント技術は、Smith-Waterman algorithm (Smith, T. F. & Waterman, M. S. (1981) "Identification of common molecular subsequences." J. Mol. Biol. 147:195-197) を基にしている。動的計画法に基づく一般的なグローバルアラインメント技術は、Needleman-Wunschアルゴリズム (Needleman, S. B. & Wunsch, C. D. (1970) "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins." J. Mol. Biol. 48:443-453) である。より最近では、Fast Optimal Global Sequence Alignment Algorithm (FOGSA) が開発されており、これは、Needleman-Wunschアルゴリズムを含めた他の最適グローバルアラインメント法よりも速く、ヌクレオチド及びタンパク質配列の全体的なアラインメントを意図的に生成する。

10

20

【0134】

RNAキャッピング

多価RNA組成物は、タンパク質またはペプチドをコードするオープンリーディングフレームを有する1つ以上のmRNAを含み得る。これらのmRNAのそれぞれは、5' Capを有し得る。5' Capは、IVT反応と同時に (例えば、転写キャッピングと同時に)、またはIVT反応後に添加してもよい。

【0135】

いくつかの態様はまた、5' Cap及びポリヌクレオチド (例えば、発現させるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド) の両方を含むポリヌクレオチドも含む。

【0136】

天然mRNAの5' Cap構造は、核外搬出に参与して、mRNA安定性を増加させ、mRNA Cap結合タンパク質 (CBP)、例えば、eIF4E (これはCBPがポリ (A) 結合タンパク質と会合して、成熟した環状mRNA種を形成することにより、細胞内のmRNA安定性及び翻訳能力を担う) に結合する。capはさらに、mRNAスプライシング中に5' 近位イントロンの除去を補助する。

30

【0137】

内在性mRNA分子は、5' 末端でキャップされ得、末端グアノシンcap残基と、mRNA分子の5' 末端転写センスヌクレオチドとの間に5' -ppp-5' -三リン酸結合を生成する。この5' -グアニレートcapは次いで、N7-メチルグアニレート残基を生成するようにメチル化され得る。mRNAの5' 末端の末端及び／又は非末端の転写されたヌクレオチドのリボース糖はまた、2' -O-メチル化され得る。グアニレートcap構造の加水分解及び切断を介する5' -脱キャッピングは、分解のための核酸分子、例えば、mRNA分子を標的とし得る。

40

【0138】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド (例えば、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド) は、cap部分を組み込む。

【0139】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、デキャッピングを阻止し、それゆえmRNAの半減期を増加させる非加水分解性cap構造を含む。cap構造の加水分解は、5' -ppp-5' ホスホジエステル結合の切断を必要とするため、キャップ付加反応中に

50

修飾ヌクレオチドが使用され得る。例えば、New England Biolabs (Ipswich, MA) からの Vaccinia Capping Enzyme は、5' - ppp - 5' cap においてホスホチオエート結合を生成するために製造業者の指示書に従って α -thio-グアノシンヌクレオチドと共に使用され得る。 α -メチル-ホスホネート及びセレノ-ホスフェートヌクレオチドなどの追加の修飾グアノシンヌクレオチドが使用され得る。

【0140】

追加の修飾には、糖環の 2'-ヒドロキシル基上のポリヌクレオチドの 5'-末端及び／又は 5'-非末端ヌクレオチドのリボース糖の 2'-O-メチル化（上述されている）が含まれるがこれらに限定されない。複数の別個の 5'-cap 構造を使用して、mRNA 分子として働くポリヌクレオチドなどの、核酸分子の 5'-cap を生成することができる。本明細書で合成 cap アナログ、化学的 cap、化学的 cap アナログ、または構造のもしくは機能性 cap アナログとも称される cap アナログは、cap の機能を保持しながらそれらの化学的構造において天然（すなわち、内在性、野生型、または生理学的）5'-cap とは異なる。Cap アナログは、ポリヌクレオチドに化学的に（すなわち、非酵素的に）または酵素的に合成及び／又は連結され得る。

10

【0141】

例えば、アンチリバーScapアナログ（ARCA）cap は、5'-5'-三リン酸基によって連結された2つのグアニンを含有し、一方のグアニンが、N7メチル基及び3'-O-メチル基を含有する（すなわち、N7, 3'-O-ジメチル-グアノシン-5'-三リン酸-5'-グアノシン（m⁷G-3'mppp-G（これは同様に3'-O-Me-m⁷G（5'）ppp（5'）Gとも称され得る））。他方の非修飾グアニンの3'-O原子は、キャップされたポリヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドに連結される。N7-及び3'-O-メチル化グアニンは、キャップされたポリヌクレオチドの末端部分を提供する。

20

【0142】

別の例示的なcapはmCAPであり、これはARCAに類似しているが、グアノシン上に2'-O-メチル基を有する（すなわち、N7, 2'-O-ジメチル-グアノシン-5'-三リン酸-5'-グアノシン、m⁷Gm-ppp-G）。

【0143】

別の例示的なcapは、m⁷G-ppp-Gm-AGである（すなわち、N7, グアノシン-5'-三リン酸-2'-O-ジメチル-グアノシン-アデノシン-グアノシン）。

30

【0144】

いくつかの実施形態では、capは、ジヌクレオチドcapアナログである。非限定的な例として、ジヌクレオチドcapアナログは、ボラノリン酸基またはホスホロセレンオエート（phosphoroselenoate）基を用いて異なるリン酸位置で修飾され得、例えば、米国特許第8,519,110号（その内容はその全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているジヌクレオチドcapアナログなどである。

【0145】

別の実施形態では、capは、当技術分野で公知の、及び／又は本明細書に記載されるcapアナログのN7-（4-クロロフェノキシエチル）置換ジヌクレオチド形態のcapアナログである。capアナログのN7-（4-クロロフェノキシエチル）置換ジヌクレオチド形態の非限定的な例としては、N7-（4-クロロフェノキシエチル）-G（5'）ppp（5'）G及びN7-（4-クロロフェノキシエチル）-m⁷-G（5'）ppp（5'）G capアナログが挙げられる（例えば、Kore et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574（その内容はその全体が参照により本明細書に援用される）に記載されている様々なcapアナログ及びcapアナログの合成方法を参照のこと）。別の実施形態では、capアナログは、4-クロロ／プロモフェノキシエチルアナログである。

40

【0146】

ポリヌクレオチドはまた、より真正な5'-cap構造を生成するために、酵素を使用

50

して（I V Tまたは化学合成のいずれであっても）製造後にキャップされ得る。本明細書で使用される場合、語句「より真正な」とは、構造的または機能的のいずれかで、内在性または野生型の特徴を厳密に反映または模倣する特徴を指す。すなわち、「より真正な」特徴は、先行技術の合成特徴もしくはアナログなどと比較して、または1つ以上の点で対応する内在性、野生型、天然もしくはは生理学的特徴よりも性能が優れている内在性、野生型、天然もしくはは生理学的細胞機能及び／又は構造をより良好に代表する。より真正な5' cap構造の非限定的な例は、当技術分野で公知の合成5' cap構造（または野生型、天然もしくはは生理学的5' cap構造）と比較して、特に、cap結合タンパク質の結合が増強され、半減期が増加し、5' エンドヌクレアーゼに対する感受性が低下し、及び／又は5' デキャッピングが減少した構造である。例えば、組換えワクシニアウイルスキャッピング酵素及び組換え2'-O-メチルトランスフェラーゼ酵素は、ポリヌクレオチドの5'-末端ヌクレオチドとグアニンcapヌクレオチドとの間の標準的な5'-5'-三リン酸結合を生成し得、capグアニンは、N7メチル化を含有し、mRNAの5'-末端ヌクレオチドは、2'-O-メチルを含有する。そのような構造は、Cap1構造と称される。このcapは、例えば、当技術分野で公知の他の5' capアナログ構造と比較して、より高い翻訳能力及び細胞安定性、ならびに細胞炎症促進性サイトカインの活性化の低減をもたらす。cap構造には、7mG(5')ppp(5')N, pN2p(cap0)、7mG(5')ppp(5')NlmpN2p(cap1)、及び7mG(5')-ppp(5')NlmpN2mp(cap2)が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0147】

非限定的な例として、製造後にキメラポリヌクレオチドをキャッピングすることは、キメラポリヌクレオチドのほぼ100%がキャップされ得るため、より効率的であり得る。これは、capアナログがin vitro転写反応の過程においてキメラポリヌクレオチドに連結される場合の約80%とは対照的である。

【0148】

いくつかの実施形態では、5'末端capとしては、内在性capまたはcapアナログを挙げることができる。いくつかの実施形態では、5'末端capは、グアニンアナログを含み得る。有用なグアニンアナログには、イノシン、N1-メチルグアノシン、2'-フルオログアノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソグアノシン、2-アミノグアノシン、LNA-グアノシン、及び2-アジドグアノシンが含まれるがこれらに限定されない。

30

【0149】

RNAポリメラーゼ、例えば、野生型RNAポリメラーゼまたはそのバリエーション、例えば、記載されるバリエーションなどを使用して、リボ核酸（RNA）合成のための共転写キャッピング法に使用され得るcapを含む、例示的なcapもまた記載される。一実施形態では、RNAを「ワンポット」反応で生成する場合、capを追加することができ、個別のキャッピング反応は必要ない。したがって、この方法は、いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド鋳型をRNAポリメラーゼバリエーション、ヌクレオシド三リン酸、及びcapアナログとin vitro転写反応条件下で反応させて、RNA転写産物を生成することを含む。

40

【0150】

いくつかの実施形態では、capアナログは、ヌクレオチド位置+1に第1のヌクレオチド、ヌクレオチド位置+2に第2のヌクレオチド、及びヌクレオチド位置+3に第3のヌクレオチドを有する転写開始部位を含むプロモーター領域を含む、ポリヌクレオチド鋳型に結合する。いくつかの実施形態では、capアナログは、少なくともヌクレオチド+1位（例えば、+1及び+2位、または+1、+2、及び+3位）でポリヌクレオチド鋳型にハイブリダイズする。

【0151】

capアナログは、例えば、ジヌクレオチドcapでも、トリヌクレオチドcapでも、テトラヌクレオチドcapでもよい。いくつかの実施形態では、capアナログは、ジ

50

ヌクレオチド cap である。いくつかの実施形態では、cap アナログは、トリヌクレオチド cap である。いくつかの実施形態では、cap アナログは、テトラヌクレオチド cap である。本明細書で使用される場合、用語「cap」は、逆位 G ヌクレオチドを含み、逆位 G の 3' 側に追加のヌクレオチド、例えば、逆位 G の 3' 側及び 5' ~ 5' UTR に 1 個、2 個、またはそれ以上のヌクレオチドを含み得る。

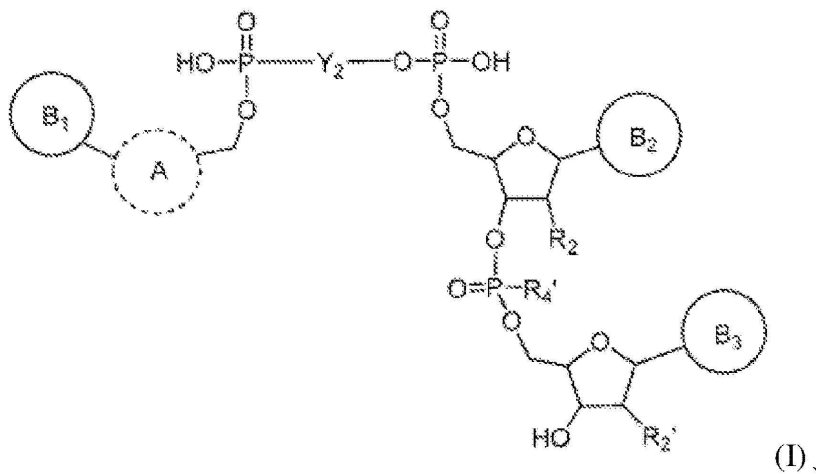
【0152】

例示的な cap は、GG、GA、または GGA の配列を含み、配列中、下線付きで斜体の G は、逆位 G である。

【0153】

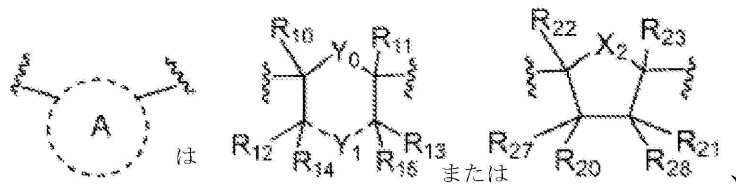
ヌクレオチド cap (例えば、トリヌクレオチド cap またはテトラヌクレオチド cap) は、いくつかの実施形態では、式 (I) の化合物

【化 3】



またはその立体異性体、互変異性体もしくは塩を含み、式中、

【化 4】



アルキニルであり、 R_3 は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、または $C_2 \sim C_6$ アルキニルである場合、ハロ、OH及び1つ以上のOHまたはOC(O) - $C_1 \sim C_6$ アルキルで任意に置換される $C_1 \sim C_6$ アルコキシルのうち1つ以上で任意に置換され、

各 R_4 及び R_4' は独立して、H、ハロ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、OH、SH、SeH、または BH_3^- であり、

R_6 、 R_7 、及び R_8 の各々は、独立して $-Q_1-T_1$ であり、式中、 Q_1 は、結合またはハロ、シアノ、OH及び $C_1 \sim C_6$ アルコキシのうち1つ以上で任意に置換される $C_1 \sim C_3$ アルキルリンカーであり、 T_1 は、H、ハロ、OH、COOH、シアノ、または R_{s1} であり、式中、 R_{s1} は、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシル、 $C(O)O-C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $NR_{31}R_{32}$ 、 $(NR_{31}R_{32}R_{33})^+$ 、4～12員ヘテロシクロアルキル、または5員もしくは6員ヘテロアリールであり、 R_{s1} は、ハロ、OH、オキソ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、COOH、 $C(O)O-C_1 \sim C_6$ アルキル、シアノ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシル、 $NR_{31}R_{32}$ 、 $(NR_{31}R_{32}R_{33})^+$ 、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、4～12員ヘテロシクロアルキル、及び5員または6員ヘテロアリールからなる群から選択される1つ以上の置換基で任意に置換され、

10

R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、及び R_{15} の各々は、独立して、 $-Q_2-T_2$ であり、式中、 Q_2 は、結合または任意に1つ以上のハロ、シアノ、OH及び $C_1 \sim C_6$ アルコキシで置換される $C_1 \sim C_3$ アルキルリンカーであり、 T_2 は、H、ハロ、OH、 NH_2 、シアノ、 NO_2 、 N_3 、 R_{s2} 、または OR_{s2} であり、式中、 R_{s2} は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $NHC(O)-C_1 \sim C_6$ アルキル、 $NR_{31}R_{32}$ 、 $(NR_{31}R_{32}R_{33})^+$ 、4～12員のヘテロシクロアルキル、または5員もしくは6員のヘテロアリールであり、 R_{s2} は、任意に、ハロ、OH、オキソ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、COOH、 $C(O)O-C_1 \sim C_6$ アルキル、シアノ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシル、 $NR_{31}R_{32}$ 、 $(NR_{31}R_{32}R_{33})^+$ 、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、4～12員のヘテロシクロアルキル、及び5員または6員ヘテロアリールであり、または代替的に、 R_{12} と R_{14} が一緒になって、もしくは R_{13} と R_{15} が一緒になって、オキソであり、

20

30

R_{20} 、 R_{21} 、 R_{22} 、及び R_{23} の各々は、独立して $-Q_3-T_3$ であり、式中、 Q_3 は、結合またはハロ、シアノ、OH及び $C_1 \sim C_6$ アルコキシのうち1つ以上で任意に置換される $C_1 \sim C_3$ アルキルリンカーであり、 T_3 は、H、ハロ、OH、 NH_2 、シアノ、 NO_2 、 N_3 、 R_{s3} 、または OR_{s3} であり、式中、 R_{s3} は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $NHC(O)-C_1 \sim C_6$ アルキル、モノ- $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、ジ- $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、4～12員ヘテロシクロアルキル、または5員もしくは6員ヘテロアリールであり、 R_{s3} は、ハロ、OH、オキソ、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、COOH、 $C(O)O-C_1 \sim C_6$ アルキル、シアノ、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシル、アミノ、モノ- $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、ジ- $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、4～12員ヘテロシクロアルキル、及び5員または6員ヘテロアリールからなる群から選択される1つ以上の置換基で任意に置換され、

40

R_{24} 、 R_{25} 、及び R_{26} の各々は独立して、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 R_{27} 及び R_{28} の各々は、独立してHもしくは OR_{29} であるか、または R_{27} 及び R_{28} が共に $O-R_{30}-O$ を形成し、各 R_{29} は、独立してH、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、または $C_2 \sim C_6$ アルキニルであり、 R_{29} は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、または $C_2 \sim C_6$ アルキニルである場合、ハロ、OH及び1つ以上のOHまたはOC(O) - $C_1 \sim C_6$ アルキルで任意に置換される $C_1 \sim C_6$ アルコキシルのうち1つ以上で任意に置換され、

50

R₃₀は、ハロ、OH及びC₁～C₆アルコキシルのうち1つ以上で任意に置換されるC₁～C₆アルキレンであり、

R₃₁、R₃₂、及びR₃₃の各々は、独立してH、C₁～C₆アルキル、C₃～C₈シクロアルキル、C₆～C₁₀アリール、4～12員ヘテロシクロアルキル、または5員もしくは6員ヘテロアリールであり、

R₄₀、R₄₁、R₄₂、及びR₄₃の各々は、独立してH、ハロ、OH、シアノ、N₃、OP(O)R₄₇R₄₈、もしくは1つ以上のOP(O)R₄₇R₄₈で任意に置換されるC₁～C₆アルキルであるか、または1つのR₄₁及び1つのR₄₃が、それらが結合している炭素原子及びQ₀と共にC₄～C₁₀シクロアルキル、4～14員ヘテロシクロアルキル、C₆～C₁₀アリール、もしくは5～14員ヘテロアリールを形成し、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、フェニル、または5～6員ヘテロアリールの各々は、OH、ハロ、シアノ、N₃、オキソ、OP(O)R₄₇R₄₈、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆ハロアルキル、COOH、C(O)O-C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシル、C₁～C₆ハロアルコキシル、アミノ、モノ-C₁～C₆アルキルアミノ、及びジ-C₁～C₆アルキルアミノのうち1つ以上で任意に置換され、

R₄₄は、H、C₁～C₆アルキル、またはアミン保護基であり、

R₄₅及びR₄₆の各々は、独立してH、OP(O)R₄₇R₄₈、または1つ以上のOP(O)R₄₇R₄₈で任意に置換されるC₁～C₆アルキルであり、

R₄₇及びR₄₈の各々は、独立してH、ハロ、C₁～C₆アルキル、OH、SH、SeH、またはBH₃である。

【0154】

capアナログは、2017年4月20日公開の国際公開WO2017/066797（その全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているcapアナログのいずれかを含む場合があると理解されるべきである。

【0155】

いくつかの実施形態では、B₂の中央位置は、非リボース分子、例えば、アラビノースであり得る。

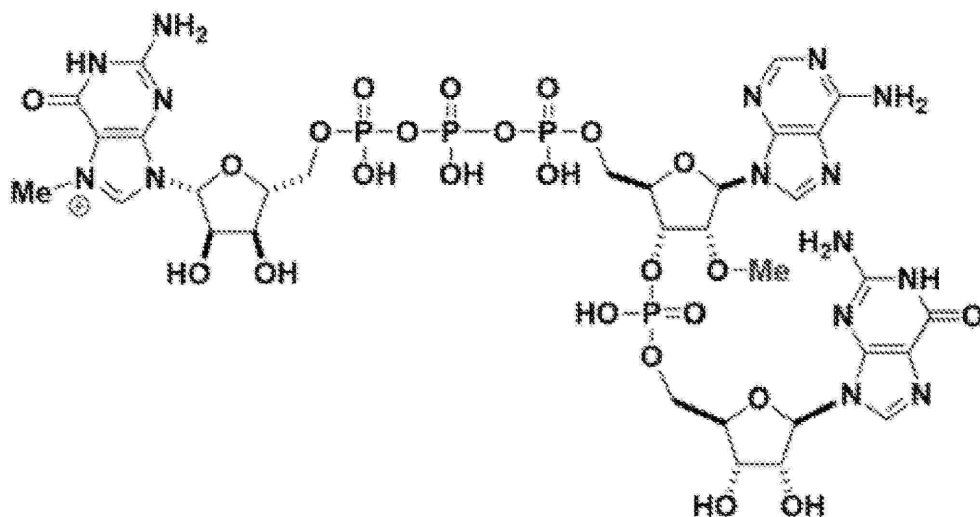
【0156】

いくつかの実施形態では、R₂は、エチルに基づく。

【0157】

したがって、いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapは、以下の構造を含む：

【化5】



(II)。

【0158】

10

20

30

40

50

10



20

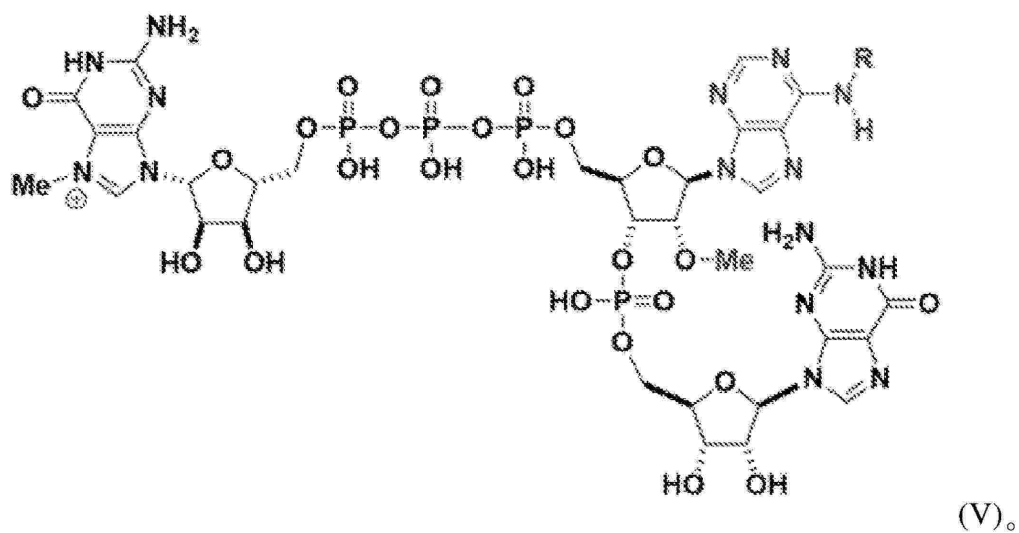
30



40

50

【化 8】



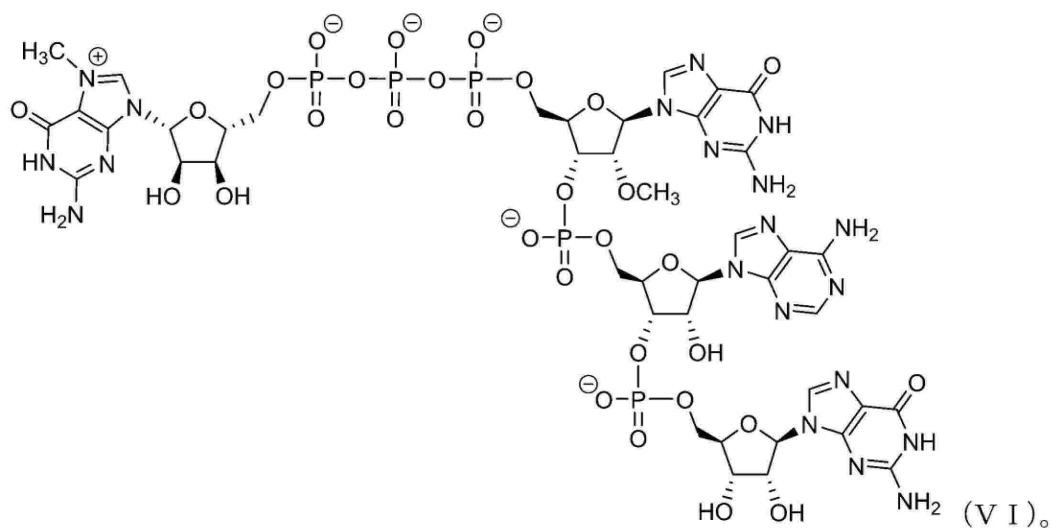
10

【 0 1 6 1】

したがって、いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチド cap は、以下の構造を含む：

20

【化 9】



30

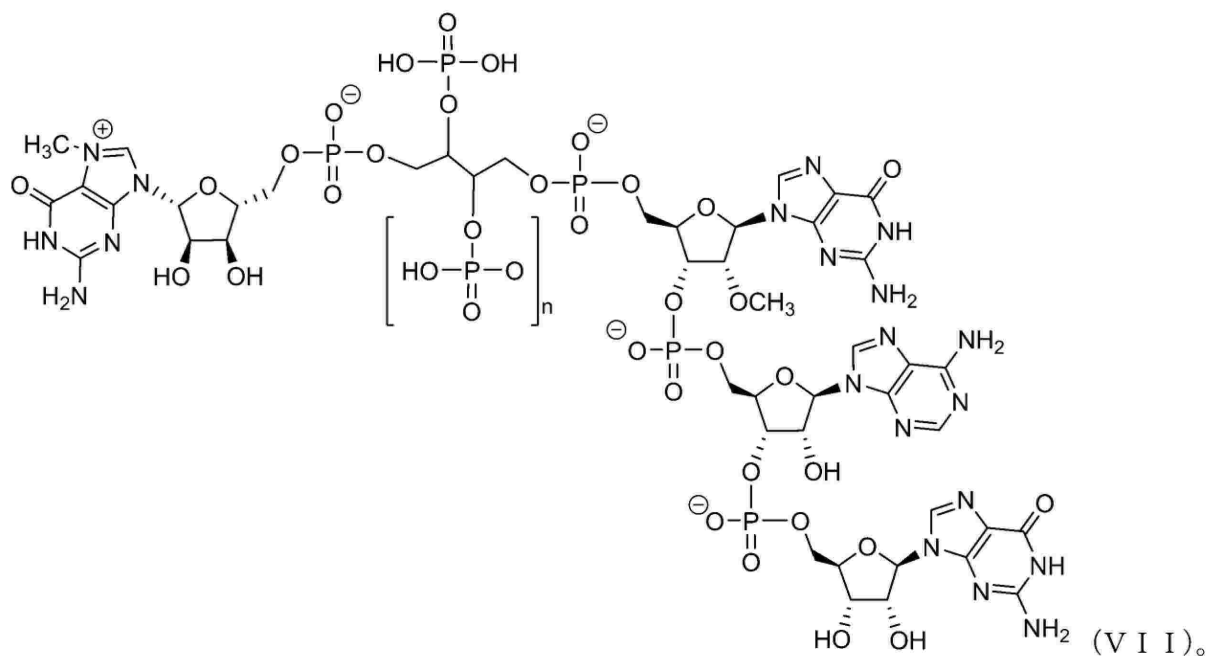
【 0 1 6 2】

他の実施形態では、テトラヌクレオチド cap は、以下の構造を含む：

40

50

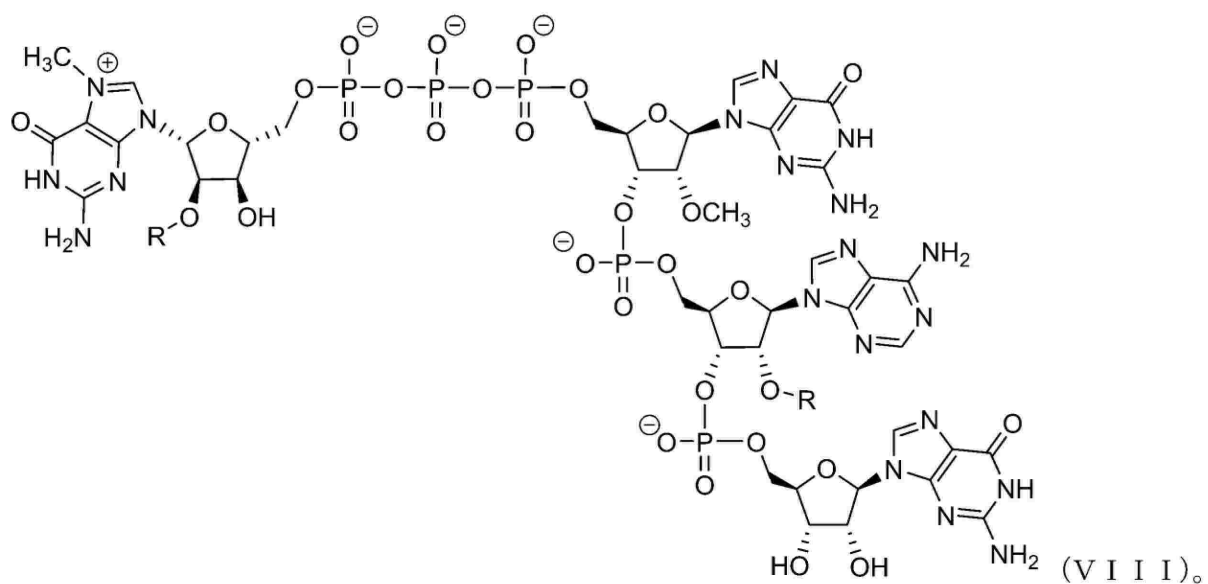
【化 1 0】



【 0 1 6 3】

さらに他の実施形態では、テトラヌクレオチド cap は、以下の構造を含む：

【化 1 1】

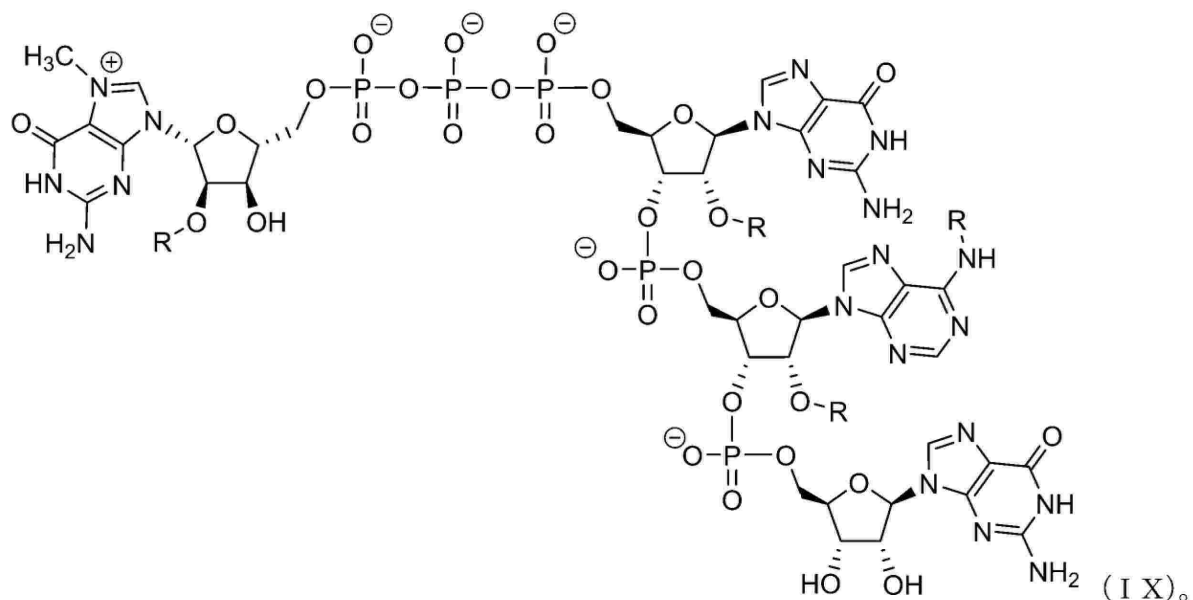


【 0 1 6 4】

さらに他の実施形態では、テトラヌクレオチド cap は、以下の構造を含む：

40

【化 1 2】



10

【0165】

いくつかの実施形態では、Rは、アルキル（例えば、C₁–C₆アルキル）である。いくつかの実施形態では、Rは、メチル基（例えば、C₁アルキル）である。いくつかの実施形態では、Rは、エチル基（例えば、C₂アルキル）である。いくつかの実施形態では、Rは、水素である。

20

【0166】

トリヌクレオチドcapは、いくつかの実施形態では、以下の配列から選択される配列を含む：GAA、GAC、GAG、GAU、GCA、GCC、GCG、GCU、GGA、GGC、GGG、GGU、GUA、GUC、GUG、及びGUU。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGAAを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGACを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGAGを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGAUを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGCAを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGCCを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGCGを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGCUを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGGAを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGGCを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGGGを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGGUを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGUAを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGUCを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGUGを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGUUを含む。

30

40

【0167】

いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapは、以下の配列から選択される配列を含む：m⁷GpppApA、m⁷GpppApC、m⁷GpppApG、m⁷GpppApU、m⁷GpppCpA、m⁷GpppCpC、m⁷GpppCpG、m⁷GpppCpU、m⁷GpppGpA、m⁷GpppGpC、m⁷GpppGpG、m⁷GpppGpU、m⁷GpppUpA、m⁷GpppUpC、m⁷GpppUpG、及びm⁷GpppUpU。

【0168】

いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapは、m⁷GpppApAを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapは、m⁷GpppApCを含む。いくつか

50

かの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p A p G$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p A p U$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p C p A$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p C p C$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p C p G$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p C p U$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p G p A$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p G p C$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p G p G$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p G p U$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p U p A$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p U p C$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p U p G$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G p p p U p U$ を含む。

10

20

30

40

50

【0169】

トリヌクレオチド $c a p$ は、いくつかの実施形態では、以下の配列から選択される配列を含む： $m^7 G_3, o m e p p p A p A$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p A p C$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p A p G$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p A p U$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p C p A$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p C p C$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p C p G$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p C p U$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p G p A$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p G p C$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p G p G$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p G p U$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p U p A$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p U p C$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p U p G$ 、及び $m^7 G_3, o m e p p p U p U$ 。

【0170】

いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3 o m e p p p A p A$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3 o m e p p p A p C$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p A p G$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p A p U$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p C p A$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p C p C$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p C p G$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p C p U$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p G p A$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p G p C$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p G p G$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p G p U$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p U p A$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p U p C$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p U p G$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド $c a p$ は、 $m^7 G_3, o m e p p p U p U$ を含む。

【0171】

トリヌクレオチド $c a p$ は、他の実施形態では、以下の配列から選択される配列を含む： $m^7 G_3, o m e p p p A_2, o m e p A$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p A_2, o m e p C$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p A_2, o m e p G$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p A_2, o m e p U$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p C_2, o m e p A$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p C_2, o m e p C$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p C_2, o m e p G$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p C_2, o m e p U$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p G_2, o m e p A$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p G_2, o m e p C$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p G_2, o m e p G$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p G_2, o m e p U$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p U_2, o m e p A$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p U_2, o m e p C$ 、 $m^7 G_3, o m e p p p U_2, o m e p G$ 、及び $m^7 G_3, o m e p p p U_2, o m e p U$ 。

【0172】

いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppA_2, omepA$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppA_2, omepC$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppA_2, omepG$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppA_2, omepU$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppC_2, omepA$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppC_2, omepC$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppC_2, omepG$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppC_2, omepU$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppG_2, omepA$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppG_2, omepC$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppG_2, omepG$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppG_2, omepU$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppU_2, omepA$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppU_2, omepC$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppU_2, omepG$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7G_3, omepppU_2, omepU$ を含む。

【0173】

トリヌクレオチド cap は、さらに他の実施形態では、以下の配列から選択される配列を含む： $m^7GppppA_2, omepA, m^7GppppA_2, omepC, m^7GppppA_2, omepG, m^7GppppA_2, omepU, m^7GppppC_2, omepA, m^7GppppC_2, omepC, m^7GppppC_2, omepG, m^7GppppC_2, omepU, m^7GppppG_2, omepA, m^7GppppG_2, omepC, m^7GppppG_2, omepG, m^7GppppG_2, omepU, m^7GppppU_2, omepA, m^7GppppU_2, omepC, m^7GppppU_2, omepG$ 、及び $m^7GppppU_2, omepU$ 。

【0174】

いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppA_2, omepA$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppA_2, omepC$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppA_2, omepG$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppA_2, omepU$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppC_2, omepA$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppC_2, omepC$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppC_2, omepG$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppC_2, omepU$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppG_2, omepA$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppG_2, omepC$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppG_2, omepG$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppG_2, omepU$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppU_2, omepA$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppU_2, omepC$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppU_2, omepG$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7GppppU_2, omepU$ を含む。

【0175】

いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7Gppppm^6A_2, omepG$ を含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチド cap は、 $m^7Gppppe^6A_2, omepG$ を含む。

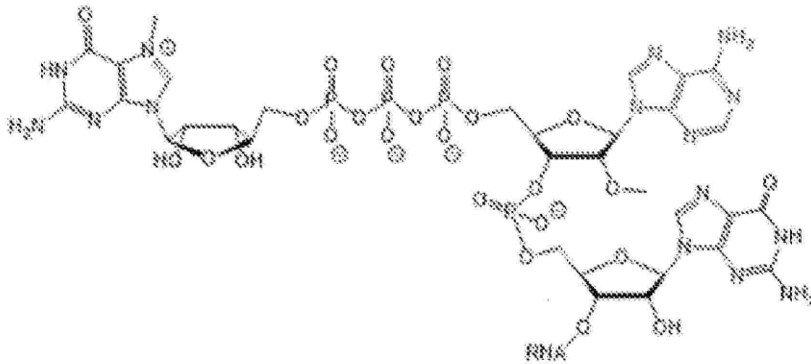
【0176】

いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGAGを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGCGを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGUGを含む。いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapはGGGを含む。

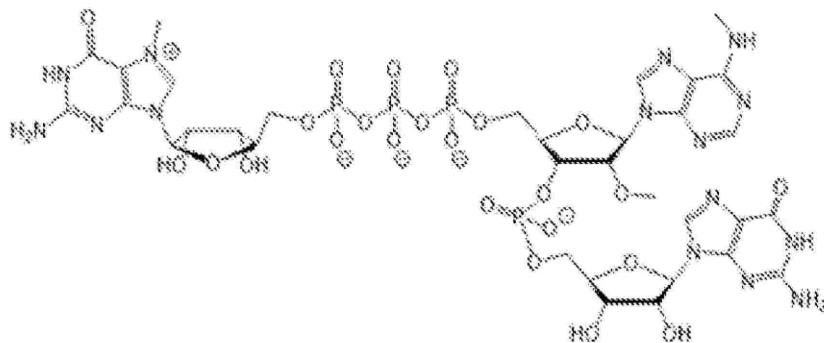
【0177】

いくつかの実施形態では、トリヌクレオチドcapは、以下の構造のいずれか1つを含む：

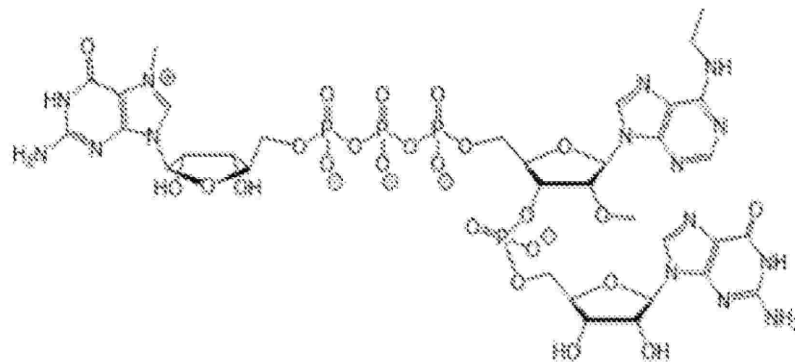
【化13】



(X)、



(XI)、または



(XII)

【0178】

いくつかの実施形態では、capアナログは、テトラヌクレオチドcapを含む。いくつかの実施形態では、capアナログは、GGAGを含む。

【0179】

いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチドcapは、以下の構造のいずれか1つを含む：

10

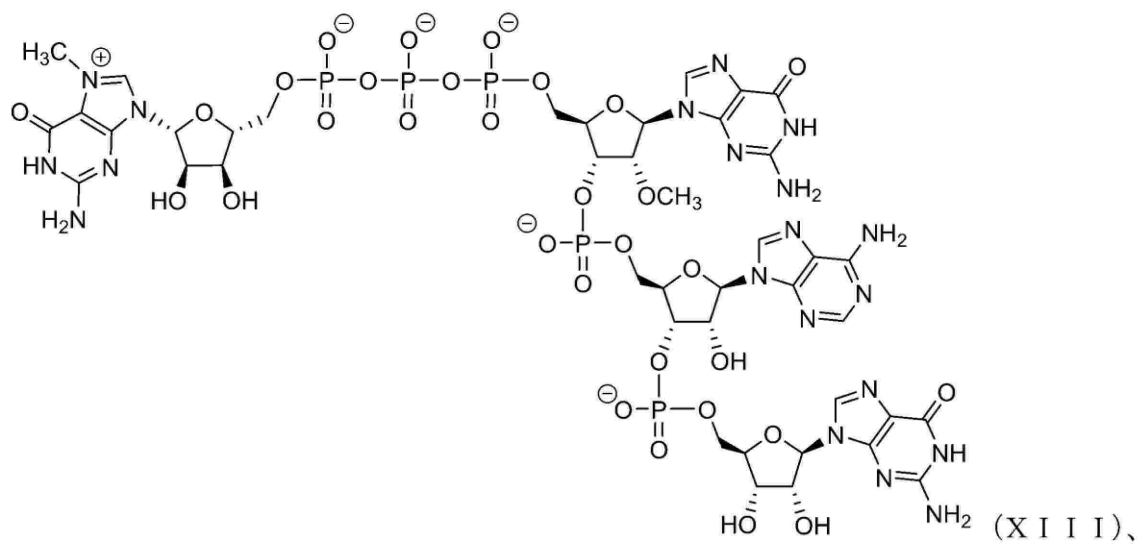
20

30

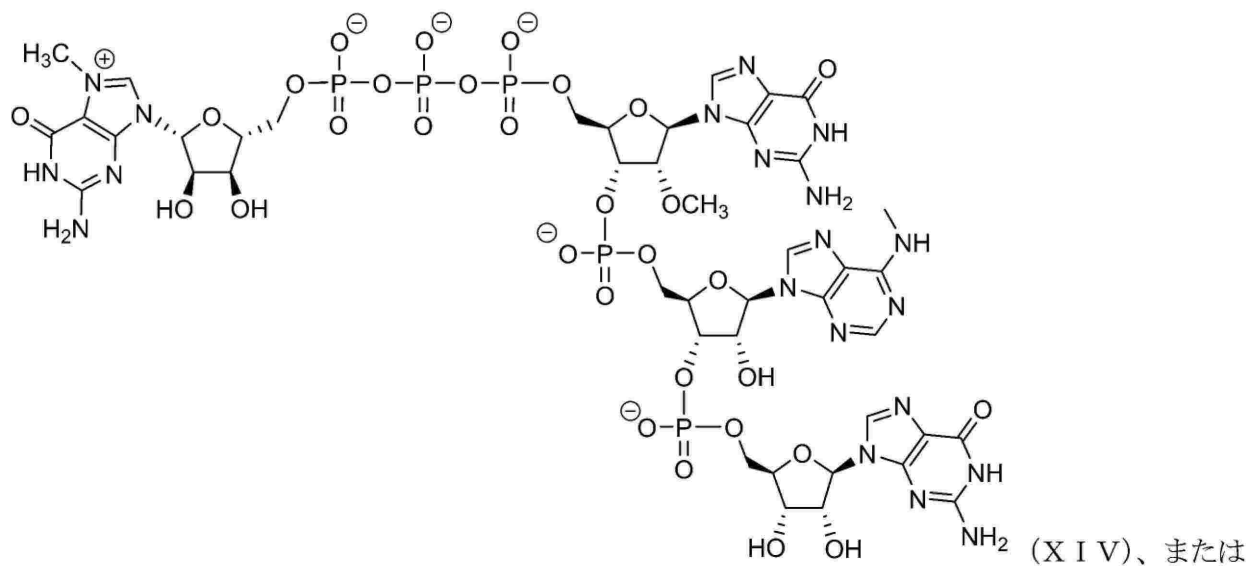
40

50

【化 1 4 - 1】



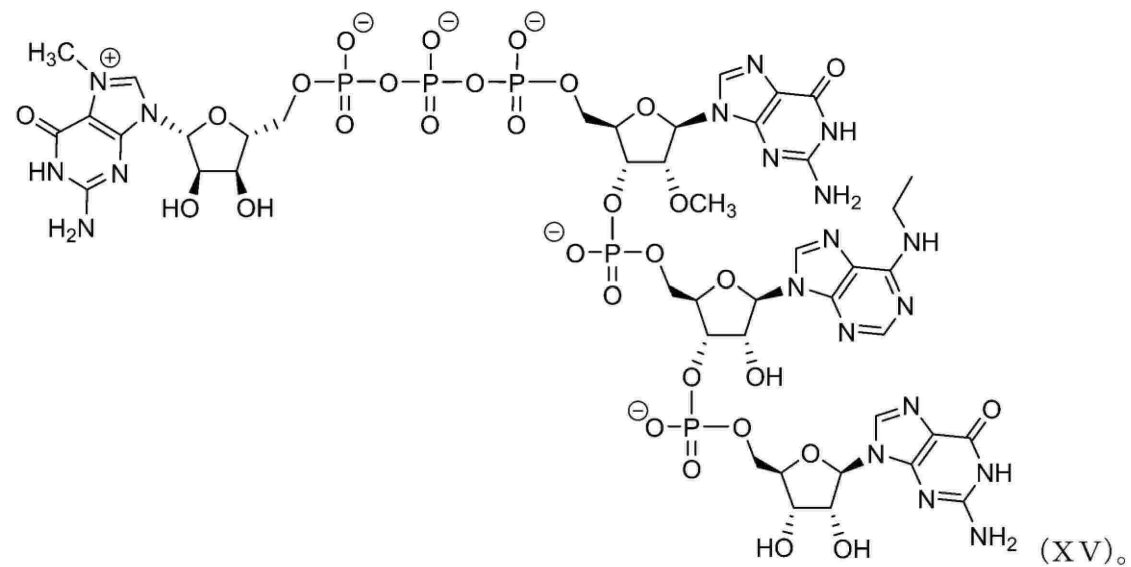
10



20

30

【化 1 4 - 2】



40

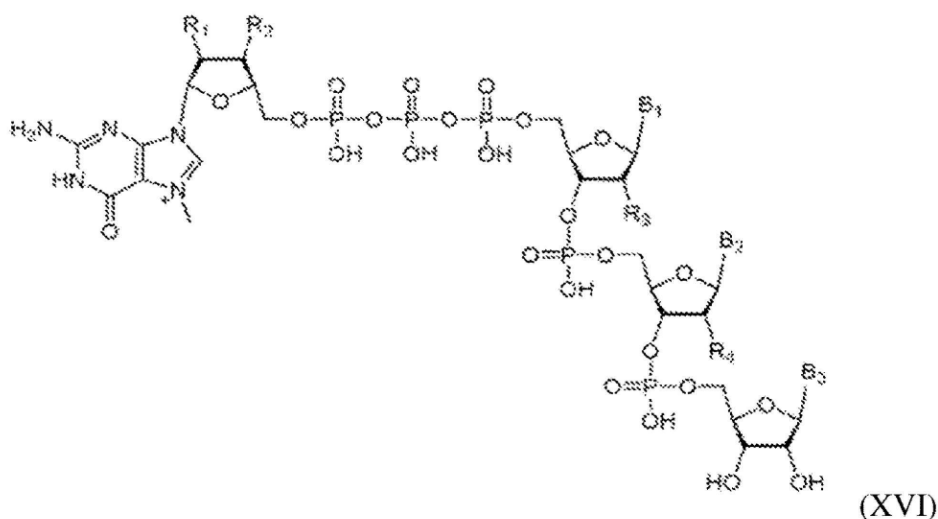
いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチド cap は、上記のトリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチド cap は、 $m^7GpppN_1N_2N_3$ を含み、 N_1 、 N_2 、及び N_3 は任意選択であり（すなわち、存在し得ないか、または 1 つ以上が存在し得る）、独立して天然、修飾、または非天然ヌクレオシド塩基である。いくつかの実施形態では、 m^7G は、例えば、3' 位でさらにメチル化される。いくつかの実施形態では、 m^7G は、3' 位に O-メチルを含む。いくつかの実施形態では、存在する場合、 N_1 、 N_2 、及び N_3 は、独立して、任意選択で、アデニン、ウラシル、グアニジン、チミン、またはシトシンである。いくつかの実施形態では、存在する場合、 N_1 、 N_2 、及び N_3 のうち 1 つ以上（または全て）が、例えば、2' 位にメチル化されている。いくつかの実施形態では、存在する場合、 N_1 、 N_2 、及び N_3 のうち 1 つ以上（または全て）が、2' 位に O-メチルを有する。

10

【0181】

いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチド cap は、以下の構造を含み：

【化15】



20

式中、 B_1 、 B_2 、及び B_3 は、独立して、天然、修飾、または非天然ヌクレオシドベースであり、 R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 は、独立して、OH または O-メチルである。いくつかの実施形態では、 R_3 は O-メチルであり、 R_4 は OH である。いくつかの実施形態では、 R_3 及び R_4 は、O-メチルである。いくつかの実施形態では、 R_4 は O-メチルである。いくつかの実施形態では、 R_1 は OH であり、 R_2 は OH であり、 R_3 は O-メチルであり、 R_4 は OH である。いくつかの実施形態では、 R_1 は OH であり、 R_2 は OH であり、 R_3 は O-メチルであり、 R_4 は O-メチルである。いくつかの実施形態では、 R_1 及び R_2 のうちの少なくとも 1 つは O-メチルであり、 R_3 は O-メチルであり、 R_4 は OH である。いくつかの実施形態では、 R_1 及び R_2 のうちの少なくとも 1 つは O-メチルであり、 R_3 は O-メチルであり、 R_4 は O-メチルである。

30

【0182】

いくつかの実施形態では、 B_1 、 B_3 、及び B_3 は、天然ヌクレオシド塩基である。いくつかの実施形態では、 B_1 、 B_2 、及び B_3 のうちの少なくとも 1 つは、修飾または非天然塩基である。いくつかの実施形態では、 B_1 、 B_2 、及び B_3 のうちの少なくとも 1 つは、N6-メチルアデニンである。いくつかの実施形態では、 B_1 は、アデニン、シトシン、チミン、またはウラシルである。いくつかの実施形態では、 B_1 はアデニン、 B_2 はウラシル、 B_3 はアデニンである。いくつかの実施形態では、 R_1 及び R_2 は OH であり、 R_3 及び R_4 は O-メチルであり、 B_1 はアデニンであり、 B_2 はウラシルであり、 B_3 はアデニンである。

40

【0183】

いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチド cap は、以下の配列から選択される配

50

列を含む：G A A A、G A C A、G A G A、G A U A、G C A A、G C C A、G C G A、G C U A、G G A A、G G C A、G G G A、G G U A、G U C A、及びG U U A。いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチドcapは、以下の配列から選択される配列を含む：G A A G、G A C G、G A G G、G A U G、G C A G、G C C G、G C G G、G C U G、G G A G、G G C G、G G G G、G G U G、G U C G、G U G G、及びG U U G。いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチドcapは、以下の配列から選択される配列を含む：G A A U、G A C U、G A G U、G A U U、G C A U、G C C U、G C G U、G C U U、G G A U、G G C U、G G G U、G G U U、G U A U、G U C U、G U G U、及びG U U U。いくつかの実施形態では、テトラヌクレオチドcapは、以下の配列から選択される配列を含む：G A A C、G A C C、G A G C、G A U C、G C A C、G C C C、G C G C、G C U C、G G A C、G G C C、G G G C、G G U C、G U A C、G U C C、G U G C、及びG U U C。

10

【0184】

テトラヌクレオチドcapは、いくつかの実施形態では、以下の配列から選択される配列を含む： m^7G_3 、 $om_e p p p A p A p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p A p C p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p A p G p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p A p U p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C p A p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C p C p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C p G p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C p U p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p G p A p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p G p C p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p G p G p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p G p U p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p U p A p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p U p C p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p U p G p N$ 、及び m^7G_3 、 $om_e p p p U p U p N$ （式中、Nは、天然、修飾、または非天然ヌクレオシド塩基である）。

20

【0185】

テトラヌクレオチドcapは、他の実施形態では、以下の配列から選択される配列を含む： m^7G_3 、 $om_e p p p A_2$ 、 $om_e p A p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p A_2$ 、 $om_e p C p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p A_2$ 、 $om_e p G p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p A_2$ 、 $om_e p U p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C_2$ 、 $om_e p A p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C_2$ 、 $om_e p C p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C_2$ 、 $om_e p G p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C_2$ 、 $om_e p U p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p G_2$ 、 $om_e p A p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p G_2$ 、 $om_e p C p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p G_2$ 、 $om_e p G p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p G_2$ 、 $om_e p U p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p U_2$ 、 $om_e p A p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p U_2$ 、 $om_e p C p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p U_2$ 、 $om_e p G p N$ 、及び m^7G_3 、 $om_e p p p U_2$ 、 $om_e p U p N$ （式中、Nは、天然、修飾、または非天然ヌクレオシド塩基である）。

30

【0186】

テトラヌクレオチドcapは、さらに他の実施形態では、以下の配列から選択される配列を含む： m^7G ppppA₂、 $om_e p A p N$ 、 m^7G ppppA₂、 $om_e p C p N$ 、 m^7G ppppA₂、 $om_e p G p N$ 、 m^7G ppppA₂、 $om_e p U p N$ 、 m^7G ppppC₂、 $om_e p A p N$ 、 m^7G ppppC₂、 $om_e p C p N$ 、 m^7G ppppC₂、 $om_e p G p N$ 、 m^7G ppppC₂、 $om_e p U p N$ 、 m^7G ppppG₂、 $om_e p A p N$ 、 m^7G ppppG₂、 $om_e p C p N$ 、 m^7G ppppG₂、 $om_e p G p N$ 、 m^7G ppppG₂、 $om_e p U p N$ 、 m^7G ppppU₂、 $om_e p A p N$ 、 m^7G ppppU₂、 $om_e p C p N$ 、 m^7G ppppU₂、 $om_e p G p N$ 、及び m^7G ppppU₂、 $om_e p U p N$ （式中、Nは、天然、修飾、または非天然ヌクレオシド塩基である）。

40

【0187】

テトラヌクレオチドcapは、他の実施形態では、以下の配列から選択される配列を含む： m^7G_3 、 $om_e p p p A_2$ 、 $om_e p A_2$ 、 $om_e p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p A_2$ 、 $om_e p C_2$ 、 $om_e p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p A_2$ 、 $om_e p G_2$ 、 $om_e p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p A_2$ 、 $om_e p U_2$ 、 $om_e p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C_2$ 、 $om_e p A_2$ 、 $om_e p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C_2$ 、 $om_e p C_2$ 、 $om_e p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C_2$ 、 $om_e p G_2$ 、 $om_e p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p p p C_2$ 、 $om_e p U_2$ 、 $om_e p N$ 、 m^7G_3 、 $om_e p$

50

10

20

30

40

50

1の入力DNA及び第2の入力DNA)をRNAポリメラーゼ(例えば、T7RNAポリメラーゼ、T7RNAポリメラーゼバリエーションなど)と接触させることを含む、RNA転写産物(例えば、mRNA転写産物)の生成(例えば、合成)方法に関する。

【0192】

いくつかの態様は、RNA転写産物の生成をもたらす条件下、DNA鋳型をRNAポリメラーゼ(例えば、T7RNAポリメラーゼバリエーションなどのT7RNAポリメラーゼ)と、ヌクレオシド三リン酸及び緩衝剤の存在下で接触させることを含む、IVT反応を行う方法に関する。

【0193】

他の態様は、ポリヌクレオチド鋳型を、T7RNAポリメラーゼバリエーション、ヌクレオシド三リン酸、及びcapアナログとin vitro転写反応条件下で反応させ、RNA転写産物を生成することを含む、共転写キャッピング法を提供する。

【0194】

いくつかの実施形態では、RNA合成のための共転写キャッピング法は、ポリヌクレオチド鋳型を、(a)野生型RNAポリメラーゼと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含むT7RNAポリメラーゼバリエーション(例えば、配列番号1と比較して437、387、350、及び351位にアミノ酸置換を含むT7RNAポリメラーゼバリエーション)、(b)ヌクレオシド三リン酸、及び(c)capアナログ(例えば、配列GpppA₂、omepGを含むトリヌクレオチドcap)と、in vitro転写反応条件下で反応させてRNA転写産物を生成することを含み、ポリヌクレオチドテンプレートは、テンプレート位置+1に2'-デオキシチミジン残基を含む。

【0195】

IVT条件には通常、プロモーターを含有する精製した線状DNA鋳型、ヌクレオシド三リン酸、ジチオスレイトール(DTT)及びマグネシウムイオンを含む緩衝系、ならびにRNAポリメラーゼが必要である。転写反応で使用される正確な条件は、特定の用途に必要なRNAの量によって異なる。通常のIVT反応は、DNA鋳型を、RNAポリメラーゼ、ならびにGTP、ATP、CTP、及びUTP(またはヌクレオチドアナログ)などのヌクレオシド三リン酸と、転写緩衝液中で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。

【0196】

2つの配列(例えば、核酸またはアミノ酸)の「同一性の割合」、「配列同一性」、「同一性(%)」または「配列同一性(%)」(本明細書では同じ意味で使用され得る)とは、2つの配列(例えば、核酸またはアミノ酸)間の類似性の定量的測定を指す。同一性の割合は、Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, modified as in Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993のアルゴリズムを使用して決定することができる。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTタンパク質検索を、スコア=50、ワード長=3のXBLASTプログラムを使用して実行し、目的のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を取得することができる。2つの配列間にギャップが存在する場合、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997に記載されているように、Gapped BLASTを利用することができる。BLAST及びGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ(例えば、XBLAST及びNBLAST)を使用してもよい。同一性の割合またはその範囲(例えば、少なくとも、より多いなど)が記載されている場合、特に明記しない限り、境界は包括的であり、範囲(例えば、少なくとも70%の同一性)は、引用された範囲内のすべての範囲を含むものとする。

【0197】

投入デオキシリボ核酸（DNA）は、RNAポリメラーゼに対する核酸鋳型として機能する。DNA鋳型は、目的のポリペプチド（例えば、抗原性ポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドを含み得る。DNA鋳型は、いくつかの実施形態では、目的のポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドから5'に位置し、該ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたRNAポリメラーゼプロモーター（例えば、T7 RNAポリメラーゼプロモーター）を含む。DNA鋳型はまた、目的とする遺伝子の3'末端に位置するポリアデニル化（ポリA）テールをコードするヌクレオチド配列も含み得る。いくつかの実施形態では、投入DNAには、プラスミドDNA（pDNA）が含まれる。用語「プラスミドDNA」または「pDNA」とは、細胞内の染色体DNAから物理的に分離され、独立して複製可能な染色体外DNA分子を指し得る。いくつかの実施形態では、プラスミドDNAは、（例えばプラスミドDNA調製物として）細胞から単離される。いくつかの実施形態では、プラスミドDNAは、複製起点を含み、これは、1つ以上の異種核酸、例えば、RNAポリメラーゼの鋳型として機能し得る治療用タンパク質をコードする核酸を含み得る。プラスミドDNAは、環状であっても線形であってもよい（例えば、制限酵素消化によって線状化されたプラスミドDNA）。

10

20

30

40

50

【0198】

いくつかの実施形態では、共IVT反応の各投入DNA（例えば、投入DNA分子の集団）を、異なる供給源から取得する（例えば、別々に、例えば、異なる細胞または細胞の集団で合成する）。いくつかの実施形態では、各投入DNA（例えば、投入DNAの集団）を、異なる細菌細胞または細菌細胞の集団から取得する。例えば、3つの投入DNA集団を有する共IVT反応では、第1の投入DNAを細菌細胞集団Aで生成し、第2の投入DNAを細菌細胞集団Bで生成し、第3の投入DNAを細菌細胞集団Cで生成し、その場合、A、B、及びCの各々は、同じ細菌培養物（例えば、同じ容器またはプレートで共培養したもの）ではない。別の例では、異なる供給源から取得する2つの投入DNAを、i）別々の合成反応で化学的に合成するか、またはii）別々の増幅（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR反応））によって生成する。投入DNA（例えば、プラスミドDNA）の集団を取得方法は、例えば、Sambrook, Joseph. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001によって記載されるように既知である。

【0199】

いくつかの態様は、多価の共IVT反応で使用されるDNAの量を正規化することを含む。いくつかの実施形態では、正規化は、投入DNAのモル質量に基づく。いくつかの実施形態では、正規化は、投入DNAの分解速度に基づく。いくつかの実施形態では、正規化は、得られるmRNAの分解速度（例えば、反応混合物に存在するポリAバリエーション、またはT7ポリメラーゼ未成熟転写産物もしくは短縮転写産物に基づいて測定される）に基づく。いくつかの実施形態では、正規化は、投入DNAのヌクレオチド含量（例えば、A、G、C、U、またはそれらの任意の組み合わせの量）に基づく。いくつかの実施形態では、正規化は、投入DNAの純度に基づく。いくつかの実施形態では、正規化は、投入DNAのポリAテーリング効率に基づく。いくつかの実施形態では、正規化は、投入DNAの長さに基づく。

【0200】

いくつかの実施形態では、正規化は、投入DNAに存在する最低レベル（例えば、最低モル質量、分解速度（例えば、投入DNA及び／又は産出RNAの）、ヌクレオチド含量、純度、及び／又はポリAテーリング効率）に基づく。いくつかの実施形態では、正規化は、投入DNAに存在する最高レベル（例えば、最高モル質量、分解速度（例えば、投入DNA及び／又は産出RNAの）、ヌクレオチド内容、純度、及び／又はポリAテーリング効率）に基づく。いくつかの実施形態では、正規化は、投入DNAのRNA生成速度（例えば、反応混合物中の投入DNAの最高のRNA生成速度または投入DNAの最低のRNA生成速度）に基づく。

【0201】

いくつかの態様は、成分の所定のmRNA比を有する多価RNA組成物の生成を改善するために、投入DNA（例えば、第1のDNAまたは第2のDNA）の量を調整または正規化するIVT法に関する。本開示は、部分的には、投入DNA間のサイズの大きな違い（例えば、100、200、500、1000、またはそれ以上のヌクレオチド長の違い）及び／又はIVT中の所与のDNAのポリAテーリング効率などの多価RNA組成物の純度に影響を与える特定の要因が、IVTの前にそれらの要因の1つ以上に基づいて投入DNAの量を正規化することによって対処され得るという発見に基づいている。例えば、いくつかの実施形態では、2つの投入DNAの量は、投入DNAから転写される第1のRNAと第2のRNAとの所望のモル比に基づいて計算される。いくつかの実施形態では、計算は、投入DNAの所望のモル比に基づいてプラスミド質量比を決定することを含む。いくつかの実施形態では、投入DNAの量を、IVT中の投入DNAの最も高いポリAテーリング効率に基づいて正規化する。

10

【0202】

IVT反応において使用する投入DNAの数（例えば、投入DNA分子の集団）は、多価RNA組成物に含まれることを望む異なるRNA分子の数に応じて様々に異なり得る。いくつかの実施形態では、IVT反応混合物は、2つ以上の異なる投入DNA、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の異なる投入DNAを含む。いくつかの実施形態では、IVT反応は、10を超える異なる投入DNAを含む。用語「異なる投入DNA」は、異なるRNAをコードする投入DNA、例えば、i)異なる長さ（2つの長さのうち短い方の全体にわたってRNAが同一であるかどうか）、ii)異なるヌクレオチド配列、iii)異なる化学修飾パターン、またはiv)上記の任意の組み合わせを有する投入DNAを包含する。

20

【0203】

DNA分子の各集団の濃度も様々に異なり得る。いくつかの実施形態では、IVT反応におけるDNA分子の各集団の濃度は、約0.005mg/mL～約0.5mg/mLの範囲である。いくつかの実施形態では、IVT反応におけるDNA分子の各集団の濃度は、約0.02mg/mL～約0.05mg/mL、0.02～約0.15mg/mL、約0.05mg/mL～約0.20mg/mL、約0.175～約0.3mg/mL、約0.2mg/mL～約0.5mg/mL、約0.3mg/mL～約0.6mg/mL、約0.5mg/mL～約0.75mg/mL、0.5mg/mL～約1.0mg/mL、約0.75mg/mL～約0.9mg/mL、約0.75mg/mL～約1.5mg/mL、約0.8mg/mL～約1.2mg/mL、約1.0mg/mL～約1.5mg/mL、約1.0mg/mL～約2.5mg/mL、約1.5mg/mL～約3.0mg/mL、約2.0mg/mL～約4.0mg/mL、または約2.5mg/mL～約5.0mg/mLの範囲である。

30

【0204】

いくつかの実施形態では、IVT反応物に添加する投入DNAは、所定のDNA比であり、これは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の異なる投入DNAの比（例えば、組成物中の異なるRNAの数に依存する）を含み得る。いくつかの実施形態では、所定の投入DNA比は、10を超える投入DNA間の比を含む。用語「所定の投入DNA比」とは、IVT反応における所望の最終DNA分子の比率を指し得る。所望の最終投入DNA比は、投入DNAによってコードされるRNAによってコードされる最終ペプチド（複数可）またはポリペプチド産物（複数可）に応じて異なり得る。いくつかの実施形態では、投入DNAは、2～8個の投入DNA（例えば、a:b、a:b:c、a:b:c:d、a:b:c:d:e、a:b:c:d:e:f、a:b:c:d:e:f:g、a:b:c:d:e:g:g:hなど（a～hの各々が1～10の数値である））を含み得る所望の比を有し得る。いくつかの実施形態では、所定の投入DNA比は、所定のmRNA比とは異なる。

40

【0205】

50

2つ以上の投入DNA（例えば、2つ以上の異なる投入DNA集団中のDNA）のサイズは様々に異なり得る。いくつかの実施形態では、投入DNAは、約15～約8,000塩基対（例えば、15～50、15～100、15～200、15～300、15～400、15～500、15～600、15～700、15～800、15～900、15～1000、15～1200、15～1400、15～1500、15～1800、15～2000、15～2500、15～3000、50～100、50～200、50～300、50～400、50～500、50～600、50～700、50～800、50～900、50～1000、50～1200、50～1400、50～1500、50～1800、50～2000、50～2500、50～3000、100～200、100～300、100～400、100～500、100～600、100～700、100～800、100～900、100～1000、100～1200、100～1400、100～1500、100～1800、100～2000、100～2500、100～3000、200～300、200～400、200～500、200～600、200～700、200～800、200～900、200～1000、200～1500、200～3000、500～1000、500～1500、500～2000、500～2500、500～3000、1000～1500、1000～2000、1000～2500、1000～3000、1500～3000、2500～3000、2000～3000、2500～4000、3000～5000、3500～6500、5000～7500、または6500～8000塩基対）を含む。

10

20

【0206】

IVT反応における投入DNA分子の各集団の質量は様々に異なり得る。いくつかの実施形態では、投入DNAの各集団の質量は、IVT反応混合物の全体積に基づき変動する。いくつかの実施形態では、IVT混合物中の各投入DNA分子の各集団の質量は、IVT反応混合物中に存在する全投入DNAの約0.5%～約99.9%まで個々に変動する。いくつかの実施形態では、IVT反応物中の投入DNA分子の各集団のモル比は、様々に異なり得る。

【0207】

いくつかの実施形態では、IVT反応に使用する投入DNA分子のうちの2つ以上は、異なる長さを有する（例えば、異なる数のヌクレオチドを含む）。いくつかの実施形態では、IVT反応混合物中の異なる投入DNA分子の2つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の長さの差は、70塩基対、80塩基対、90塩基対、または100塩基対を超える（例えば、組成物中の2つの投入DNAは、互いの長さが70、80、90、または100塩基対以内ではない）。いくつかの実施形態では、異なる投入DNA分子の2つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の長さの差は、100塩基対を上回る、例えば、500塩基対、1000塩基対、1500塩基対、2000塩基対、3000塩基対、4000塩基対、5000塩基対、6000塩基対、7000塩基対、8000塩基対、またはそれ以上である。

30

【0208】

いくつかの実施形態では、IVT反応に使用する投入DNA分子のうちの2つ以上は、異なる長さを有する（例えば、異なる数のヌクレオチドを含む）mRNA分子をコードする。いくつかの実施形態では、IVT反応混合物の異なる投入DNA分子によってコードされる2つ以上のmRNA分子間の長さの差は、70ヌクレオチド、80ヌクレオチド、90ヌクレオチド、または100ヌクレオチドを上回る（例えば、組成物中の2つの投入DNAは、互いに70、80、90、または100ヌクレオチドの長さの範囲内でないmRNA分子をコードする）。いくつかの実施形態では、異なる投入DNA分子によってコードされる2つ以上のmRNA分子間の長さの差は、100ヌクレオチド超、例えば、500ヌクレオチド、1000ヌクレオチド、1500ヌクレオチド、2000ヌクレオチド、3000ヌクレオチド、4000ヌクレオチド、またはそれ以上である。

40

【0209】

いくつかの実施形態では、多価IVTは、A:B:C:D:E:F:G:H:I:J比

50

での、少なくとも2つの異なる投入DNA（例えば、DNA A、B、C、D、E、F、F、H、I、Jなどのうちの少なくとも2つ）の共転写を含み、DNA Aが1に正規化されている場合、DNA B、C、D、E、F、G、H、I、Jなどのうちの1つ以上を、それぞれ独立して、Aの量（例えば濃度）の0.01～100倍、例えば、Aの量の0.05倍～20倍、Aの量の0.1倍～10倍、Aの量の0.2倍～5倍、Aの量の0.3倍～3倍、Aの量の0.5倍～2倍、Aの量の0.75倍～1.4倍、Aの量の0.8倍～1.25倍、またはAの量の0.9倍～1.15倍の量（例えば濃度）で存在させることができる。DNA B、C、D、E、F、G、H、I、またはJのうちの1つ以上はまた、存在させなくてもよい。

【0210】

いくつかの実施形態では、別々の供給源由来のRNA転写産物（例えば、mRNA）を組み合わせることによって、多価RNA組成物を生成する。いくつかの実施形態では、別々のIVT反応において2つ以上のDNA鋳型を別々に転写し、転写されたRNAを組み合わせることによって、多価RNA組成物を生成する。いくつかの実施形態では、RNA転写産物をIVTによって生成し、次いで1つ以上の他のRNAに添加する。RNAを任意の所望の量で組み合わせ、特定の比率で2つ以上のRNAを含む多価RNA組成物を生成し得る。

【0211】

RNA転写産物は、いくつかの実施形態では、IVT反応の産物である。RNA転写産物は、いくつかの実施形態では、ポリAテールに連結された目的のポリペプチド（例えば、治療用タンパク質または治療用ペプチド）をコードするヌクレオチド配列を含むメッセンジャーRNA（mRNA）である。いくつかの実施形態では、mRNAは、修飾mRNA（mmRNA）であり、これは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。

【0212】

ヌクレオシド三リン酸（NTP）は、非修飾もしくは修飾ATP、修飾もしくは非修飾UTP、修飾もしくは非修飾GTP、及び／又は修飾もしくは非修飾CTPを含み得る。いくつかの実施形態では、IVT反応のNTPは、未修飾ATPを含む。いくつかの実施形態では、IVT反応のNTPは、修飾ATPを含む。いくつかの実施形態では、IVT反応のNTPは、未修飾UTPを含む。いくつかの実施形態では、IVT反応のNTPは、修飾UTPを含む。いくつかの実施形態では、IVT反応のNTPは、未修飾GTPを含む。いくつかの実施形態では、IVT反応のNTPは、修飾GTPを含む。いくつかの実施形態では、IVT反応のNTPは、未修飾CTPを含む。いくつかの実施形態では、IVT反応のNTPは、修飾CTPを含む。

【0213】

IVT反応物中のNTPの組成もまた様々に異なり得る。いくつかの実施形態では、IVT反応物中の各NTPを、等モル量で存在させる。いくつかの実施形態では、IVT反応物中の各NTPを、非等モル量で存在させる。例えば、ATPを、GTP、CTP、及びUTPより多く使用してもよい。非限定的な例として、IVT反応物に、7.5ミリモル濃度のGTP、7.5ミリモル濃度のCTP、7.5ミリモル濃度のUTP、及び3.75ミリモル濃度のATPを含ませてもよい。いくつかの実施形態では、G：C：U：Aのモル比は、2：1：0.5：1である。いくつかの実施形態では、G：C：U：Aのモル比は1：1：0.7：1である。いくつかの実施形態では、G：C：A：Uのモル比は、1：1：1：1である。同じIVT反応物は、3.75ミリモル濃度のcapアナログ（例えば、トリヌクレオチドcapまたはテトラヌクレオチドcap）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、G：C：U：A：capのモル比は、1：1：1：0.5：0.5である。いくつかの実施形態では、G：C：U：A：capのモル比は、1：1：0.5：1：0.5である。いくつかの実施形態では、G：C：U：A：capのモル比は、1：0.5：1：1：0.5である。いくつかの実施形態では、G：C：U：A：capのモル比は、0.5：1：1：1：0.5である。いくつかの実施形態では、共IVT反応物中のNTPの量を、経験的に計算する。例えば、IVT反応物中の各NTPの

10

20

30

40

50

消費速度は、個々の投入DNAごとに経験的に決定してもよく、次いで、これらの個々のNTP消費速度に基づく平衡比のNTPを、複数の投入DNAを含む共IVTに添加してもよい。

【0214】

いくつかの実施形態では、IVT反応混合物は、capアナログを含む。IVT反応物中に存在するヌクレオシド三リン酸とcapアナログの濃度は様々に異なり得る。いくつかの実施形態では、反応物中にNTPとcapアナログを等モル濃度で存在させる。いくつかの実施形態では、反応物中のcapアナログ（例えば、トリヌクレオチドcapまたはテトラヌクレオチドcap）対ヌクレオシド三リン酸のモル比は、1：1よりも高い。例えば、反応物中のcapアナログ対ヌクレオシド三リン酸のモル比は、2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、15：1、20：1、25：1、50：1、または100：1であってよい。いくつかの実施形態では、反応物中のcapアナログ（例えば、トリヌクレオチドcapまたはテトラヌクレオチドcap）対ヌクレオシド三リン酸のモル比は、1：1よりも低い。例えば、反応物中のcapアナログ（例えば、トリヌクレオチドcapまたはテトラヌクレオチドcap）対ヌクレオシド三リン酸のモル比は、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：7、1：8、1：9、1：10、1：15、1：20、1：25、1：50、または1：100であってよい。

10

【0215】

いくつかの実施形態では、RNA転写産物（例えば、mRNA転写産物）は、シュードウリジン（ ψ ）、1-メチルシュードウリジン（ $m^1\psi$ ）、5-メトキシウリジン（ m^o^5U ）、5-メチルシチジン（ m^5C ）、 α -チオーグアノシン及び α -チオーアデノシンから選択される修飾核酸塩基を含む。いくつかの実施形態では、RNA転写産物（例えば、mRNA転写産物）は、前述した修飾核酸塩基のうち少なくとも2つの（例えば、2つ、3つ、4つまたはそれを上回る）組合せを含む。

20

【0216】

いくつかの実施形態では、RNA転写産物（例えば、mRNA転写産物）は、シュードウリジン（ ψ ）を含む。いくつかの実施形態では、RNA転写産物（例えば、mRNA転写産物）は、1-メチルシュードウリジン（ $m^1\psi$ ）を含む。いくつかの実施形態では、RNA転写産物（例えば、mRNA転写産物）は、5-メトキシウリジン（ m^o^5U ）を含む。いくつかの実施形態では、RNA転写産物（例えば、mRNA転写産物）は、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転写産物（例えば、mRNA転写産物）は、 α -チオーグアノシンを含む。いくつかの実施形態では、RNA転写産物（例えば、mRNA転写産物）は、 α -チオーアデノシンを含む。

30

【0217】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（例えば、RNAポリヌクレオチド、例えば、mRNAポリヌクレオチドなど）は、特定の修飾について均一に修飾される（例えば、完全に修飾される、すなわち、全配列を通して修飾される）。例えば、ポリヌクレオチドを、1-メチルシュードウリジン（ $m^1\psi$ ）で均一に修飾することができ、これはすなわち、mRNA配列中のすべてのウリジン残基を1-メチルシュードウリジン（ $m^1\psi$ ）に置き換えることを意味する。同様に、ポリヌクレオチドを、上記のいずれかの修飾残基で置き換えることにより、配列中に存在する任意のタイプのヌクレオシド残基に関して均一に修飾することができる。あるいは、ポリヌクレオチド（例えば、RNAポリヌクレオチド、例えば、mRNAポリヌクレオチド）を、均一に修飾しなくてもよい（例えば、部分的に修飾する、すなわち、配列の一部を修飾する）。各可能性は、別々の実施形態を表す。

40

【0218】

IVT反応混合物の緩衝系は様々に異なり得る。いくつかの実施形態では、緩衝系は、トリスを含有する。IVT反応に使用するトリスの濃度は、例えば、少なくとも10mM、少なくとも20mM、少なくとも30mM、少なくとも40mM、少なくとも50mM

50

、少なくとも60mM、少なくとも70mM、少なくとも80mM、少なくとも90mM、少なくとも100mM、または少なくとも110mMのリン酸であり得る。いくつかの実施形態では、リン酸の濃度は、20~60mMまたは10~100mMである。

【0219】

いくつかの実施形態では、緩衝系は、ジチオスレイトール(DTT)を含有する。IVT反応に使用するDTTの濃度は、例えば、少なくとも1mM、少なくとも5mM、または少なくとも50mMであり得る。いくつかの実施形態では、IVT反応に使用するDTTの濃度は、1~50mMまたは5~50mMである。いくつかの実施形態では、IVT反応に使用するDTTの濃度は、5mMである。

【0220】

いくつかの実施形態では、緩衝系は、マグネシウムを含有する。いくつかの実施形態では、IVT反応物中に存在するNTP対マグネシウムイオン(Mg^{2+} 、例えば、 $MgCl_2$)のモル比は、1:1~1:5である。例えば、NTP対マグネシウムイオンのモル比は、1:0.25、1:0.5、1:1、1:2、1:3、1:4、または1:5であってよい。

【0221】

いくつかの実施形態では、IVT反応物中に存在するNTP+capアナログ(例えば、GAGなどのトリヌクレオチドcap)対マグネシウムイオン(Mg^{2+} 、例えば、 $MgCl_2$)のモル比は、1:1~1:5である。例えば、NTP+トリヌクレオチドcap(例えば、GAG)対マグネシウムイオンのモル比は、1:1、1:2、1:3、1:4、または1:5であってよい。

【0222】

いくつかの実施形態では、緩衝系は、Tris-HCl、スぺルミジン(例えば、1~30mMの濃度)、TRITON(登録商標)X-100(ポリエチレングリコールp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)-フェニルエーテル)及び/又はポリエチレングリコール(PEG)を含有する。

【0223】

いくつかの実施形態では、IVT法は、さらに、in vitro転写産物(例えば、mRNA)を他の反応成分から分離する(例えば、精製する)ステップを含む。いくつかの実施形態では、分離は、IVT反応混合物でクロマトグラフィーを実施することを含む。いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーは、サイズ系(例えば、長さ系)クロマトグラフィーを含む。いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーは、オリゴdTクロマトグラフィーを含む。

【0224】

成長するRNA鎖の3'末端に対するヌクレオシド三リン酸(NTP)の付加は、ポリメラーゼ、例えば、T7RNAポリメラーゼ、例えば、T7RNAポリメラーゼバリエーション(例えば、D653W/E350W/D351V置換を含むRNAポリメラーゼ)によって触媒される。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼ(例えば、T7RNAポリメラーゼバリエーション)を、0.01mg/ml~1mg/mlの濃度で反応物(例えば、IVT反応物)中に存在させる。例えば、RNAポリメラーゼを、0.01mg/mL、0.05mg/ml、0.1mg/ml、0.5mg/mlまたは1.0mg/mlの濃度で反応物中に存在させてよい。

【0225】

驚くべきことに、本明細書に提供するT7RNAポリメラーゼバリエーション(例えば、D653W/E350W/D351V置換を含むRNAポリメラーゼ)とcapアナログ(例えば、GpppA_{2'}omepG)の組み合わせをin vitro転写反応において使用すると、例えば、RNA転写産物の生成がもたらされ、その場合、生成されるRNA転写産物の80%超が、機能性capを含んでいる。いくつかの実施形態では、生成されるRNA転写産物の85%超が、機能性capを含む。いくつかの実施形態では、生成されるRNA転写産物の90%超が、機能性capを含む。いくつかの実施形態では、生成さ

10

20

30

40

50

れるRNA転写産物の95%超が、機能性capを含む。いくつかの実施形態では、生成されるRNA転写産物の96%超が、機能性capを含む。いくつかの実施形態では、生成されるRNA転写産物の97%超が、機能性capを含む。いくつかの実施形態では、生成されるRNA転写産物の98%超が、機能性capを含む。いくつかの実施形態では、生成されるRNA転写産物の99%超が、機能性capを含む。

【0226】

同様に驚くべきは、2'-デオキシチミジン残基または2'-デオキシシチジン残基を鋳型位置+1に含むポリヌクレオチド鋳型を使用することで、RNA転写産物の生成がもたらされ、生成されるRNA転写産物の80%超（例えば、85%超、90%超、または95%超）が、機能性capを含むという発見であった。したがって、いくつかの実施形態では、例えば、IVT反応に使用するポリヌクレオチド（例えば、DNA）鋳型は、2'-デオキシチミジン残基を鋳型位置+1に含む。他の実施形態では、例えば、IVT反応に使用するポリヌクレオチド（例えば、DNA）鋳型は、2'-デオキシシチジン残基を鋳型位置+1に含む。

【0227】

用途

RNAポリメラーゼバリエーションを使用して生成されるRNA転写産物としては、mRNA（修飾mRNA及び／又は未修飾RNAを含む）、lncRNA、自己複製RNA、環状RNA、CRISPRガイドRNAなどが挙げられる。ある実施形態では、RNAは、ポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド）をコードするRNA（例えば、mRNAまたは自己複製RNA）である。したがって、RNAポリメラーゼバリエーションを使用して生成されるRNA転写産物は、無数の用途に使用され得る。

【0228】

例えば、RNA転写産物を使用して、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してもよい。いくつかの実施形態では、RNA転写産物は、治療用RNAである。治療用mRNAは、治療用タンパク質をコードするmRNAである（「タンパク質」という用語はペプチドを包含する）。治療用タンパク質は、宿主細胞または対象において、疾患を治療したり、疾患の兆候や症状を改善したりする様々な効果を媒介する。例えば、治療用タンパク質は、欠損しているまたは異常なタンパク質を置き換える場合も、内在性タンパク質の機能を増強する場合も、細胞に新しい機能を与える（例えば、内在性細胞活性を阻害または活性化する場合も、別の治療用化合物のための送達剤として作用する場合もある（例えば、抗体薬物複合体）。治療用mRNAは、以下の疾患及び病態の治療に有用であり得る：細菌感染症、ウイルス感染症、寄生虫感染症、細胞増殖障害、遺伝性障害、及び自己免疫障害。他の疾患及び病態は、本明細書に包含される。

【0229】

RNAポリメラーゼバリエーションを使用して生成されるRNA転写産物は、1つ以上の生物製剤をコードし得る。生物製剤は、ポリペプチド系の分子であり、重篤なまたは生命を脅かす疾患または病状を治療、治療、軽減、予防、または診断するために使用され得る。生物製剤としては、アレルゲンエキス（例えば、アレルギー注射及び検査用）、血液成分、遺伝子治療薬、移植に使用されるヒト組織または細胞生産物、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、血栓溶解剤、及び免疫調節剤が特に挙げられるが、これらに限定されない。

【0230】

現在販売されている、または開発中の1つ以上の生物製剤は、RNAポリメラーゼバリエーションによって産生されるRNAによってコードされ得る。理論に拘束されることを望むものではないが、既知の生物製剤のコード化ポリヌクレオチドをRNAに組み込むことは、少なくとも部分的に、構築物の設計の特異性、純度、及び／又は選択性により、治療効果を改善する。

【0231】

RNAポリメラーゼバリエーションを使用して生成されるRNA転写産物は、1つ以上の抗

体をコードし得る。用語「抗体」は、モノクローナル抗体（免疫グロブリンFc領域を有する完全長抗体を含む）、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、本明細書では「抗体」と同義で使用される。モノクローナル抗体は、実質的に同種の抗体集団から得られる抗体である。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、微量で存在する可能性のある自然発生する変異及び／又は翻訳後修飾（例えば、異性化、アミド化）を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対する。

【0232】

モノクローナル抗体は特に、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、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る一方、鎖（複数可）の残部が、別の種由来の抗体、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における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）、ならびに、所望の生物活性を示す限り、そのような抗体の断片を含む。キメラ抗体としては、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、サルなど）由来の可変ドメインの抗原結合配列及びヒト定常領域の配列を含む「霊長類化」抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0233】

RNAポリメラーゼバリエーションを使用して生成されるRNA転写産物は、1つ以上のワクチン抗原をコードし得る。ワクチン抗原は、特定の疾患または感染性因子に対する免疫を改良する生物学的製剤である。現在販売されている、または開発中の1つ以上のワクチン抗原は、RNAによってコードされ得る。RNAにおいてコードされるワクチン抗原は、がん、アレルギー、及び感染性疾患などであるがこれらに限定されない多くの治療分野における病態または疾患の治療に使用され得る。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、コンカテマーの形態またはペプチドエピトープをコードする個々のRNAの形態またはそれらの組み合わせでパーソナライズされたがんワクチンであり得る。

【0234】

RNAポリメラーゼバリエーションを使用して生成されるRNA転写産物は、1つ以上の抗菌性ペプチド（AMP）または抗ウイルス性ペプチド（AVP）をコードするように設計され得る。AMP及びAVPは、微生物、無脊椎動物、植物、両生類、鳥類、魚類、及び哺乳類などであるがこれらに限定されない広範囲の動物から単離され、特徴づけられている。

【0235】

いくつかの実施形態では、RNA転写産物を、放射性標識RNAプローブとして使用する。いくつかの実施形態では、RNA転写産物を、非同位体RNA標識に使用する。いくつかの実施形態では、RNA転写産物を、遺伝子標的法のガイドRNA（gRNA）として使用する。いくつかの実施形態では、RNA転写産物（例えば、mRNA）を、*in vitro*翻訳及びマイクロインジェクションに使用する。いくつかの実施形態では、RNA転写産物を、RNA構造、プロセッシング、及び触媒作用研究に使用する。いくつかの実施形態では、RNA転写産物を、RNA増幅に使用する。いくつかの実施形態では、RNA転写産物を、遺伝子発現実験のアンチセンスRNAとして使用する。

【0236】

野生型T7RNAポリメラーゼ

MNTINIAKND FSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALE
HESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTL LPK
MIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIK
TTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRI RDLEAK
HFKKNVEEQ LNKRVGHVYKKA FMQVVEADMLS KGL L GGEA
WSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQD
SETIELAPEYAEAIA TRAGALAGISPMFQPCVVPPK PWTG

ITGGGYWANGRRPLALVIRTHSKKALMRYEDVYMPDEVYKAI
NIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPEVEDI PAIEREEL
PMKPEDI DMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEF
MLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMT
KGLLT LAKGKPIGKEGYW LKIHGANCAGVDKVPFPERIK
FIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAG
VQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAML RDEVGGRAVN
LLPSETVQDIYGI VAKKVNEILQADAINGT DNEVVTVTDE
NTGEISEKVKLGTKALAGQW LAYGVTRSVTKRSVMTLAYG
SKEFGFRQQVLED TIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKL
IWESVSVTVVA AVEAMNWLKSA AKLLAAEVKDKKTGEILR
KRC AVHWVTPDGF PVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPT
INTNKDSEIDA HKQESGIAPNFVHSQDGS HLRKTVVWAHE
KYGIESFALIHDSFGTIPADAANL FKA VRET MVD TYE SCD
VLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNL RDILE SDF
AFA (配列番号1)

【0237】

さらなる実施形態

さらなる実施形態は、以下の番号付き項目1～71に包含される：

1. 配列番号1のアミノ酸配列を含む野生型T7RNAポリメラーゼに対して、(i)
) E350位でのアミノ酸置換、(ii) D351位でのアミノ酸置換、ならびに(ii)
) K387、N437位、またはK387位及びN437位でのアミノ酸置換を含むア
ミノ酸配列を含む、リボ核酸(RNA)ポリメラーゼバリエント。

【0238】

2. 前記バリエントの前記アミノ酸配列が、K387位でのアミノ酸置換を含む、項
目1に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0239】

3. 前記バリエントの前記アミノ酸配列が、N437位でのアミノ酸置換を含む、項
目1に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0240】

4. 前記バリエントの前記アミノ酸配列が、K387位及びN437位でのアミノ酸
置換を含む、項目1に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0241】

5. 前記K387位でのアミノ酸置換が極性の中性アミノ酸である、項目1～4のい
ずれか1項に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0242】

6. 前記極性の中性アミノ酸が、アスパラギン(N)、システイン(C)、グルタミ
ン(Q)、メチオニン(M)、セリン(S)、及びトレオニン(T)から選択される、項
目5に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0243】

7. 前記極性の中性アミノ酸がアスパラギン(K387N)である、項目6に記載の
RNAポリメラーゼバリエント。

【0244】

8. 前記極性の中性アミノ酸がシステイン(K387C)である、項目6に記載のR
NAポリメラーゼバリエント。

【0245】

9. 前記極性の中性アミノ酸がグルタミン(K387Q)である、項目6に記載のR
NAポリメラーゼバリエント。

【0246】

10. 前記極性の中性アミノ酸がメチオニン(K387M)である、項目6に記載の

R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 4 7 】

1 1 . 前記極性の中性アミノ酸がセリン (K 3 8 7 S) である、項目 6 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 4 8 】

1 2 . 前記極性の中性アミノ酸がトレオニン (K 3 8 7 T) である、項目 6 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 4 9 】

1 3 . 前記 N 4 3 7 位でのアミノ酸置換が芳香族アミノ酸である、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 0 】

1 4 . 前記芳香族アミノ酸が、トリプトファン (W) 、チロシン (Y) 、及びフェニルアラニン (F) から選択される、項目 1 3 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 1 】

1 5 . 前記芳香族アミノ酸がトリプトファン (N 4 3 7 W) である、項目 1 4 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 2 】

1 6 . 前記芳香族アミノ酸がチロシン (N 4 3 7 Y) である、項目 1 4 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 3 】

1 7 . 前記芳香族アミノ酸がフェニルアラニン (N 4 3 7 F) である、項目 1 4 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 4 】

1 8 . 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む野生型 T 7 R N A ポリメラーゼに対して、 (i) E 3 5 0 位でのアミノ酸置換、 (i i) D 3 5 1 でのアミノ酸置換、ならびに (i i i) D 6 5 3 位でのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む、リボ核酸 (R N A) ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 5 】

1 9 . 前記 D 6 5 3 位でのアミノ酸置換が芳香族アミノ酸である、項目 1 8 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 6 】

2 0 . 前記芳香族アミノ酸が、トリプトファン (W) 、チロシン (Y) 、及びフェニルアラニン (F) から選択される、項目 1 9 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 7 】

2 1 . 前記芳香族アミノ酸がトリプトファン (D 6 5 3 W) である、項目 2 0 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 8 】

2 2 . 前記芳香族アミノ酸がチロシン (D 6 5 3 Y) である、項目 2 0 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 5 9 】

2 3 . 前記芳香族アミノ酸がフェニルアラニン (D 6 5 3 F) である、項目 2 0 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 6 0 】

2 4 . 前記 E 3 5 0 位でのアミノ酸置換が芳香族アミノ酸である、項目 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 6 1 】

2 5 . 前記芳香族アミノ酸が、トリプトファン (W) 、チロシン (Y) 、及びフェニルアラニン (F) から選択される、項目 2 4 に記載の R N A ポリメラーゼバリエント。

【 0 2 6 2 】

2 6 . 前記芳香族アミノ酸がトリプトファン (E 3 5 0 W) である、項目 2 5 に記載

10

20

30

40

50

のRNAポリメラーゼバリエント。

【0263】

27. 前記芳香族アミノ酸がチロシン（E350Y）である、項目25に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0264】

28. 前記芳香族アミノ酸がフェニルアラニン（E350F）である、項目25に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0265】

29. 前記D351位でのアミノ酸置換が非極性の脂肪族アミノ酸である、項目1～28に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0266】

30. 前記非極性の脂肪族アミノ酸が、アラニン（A）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、プロリン（P）、及びバリン（V）から選択される、項目29に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0267】

31. 前記非極性の脂肪族アミノ酸がアラニン（D351A）である、項目30に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0268】

32. 前記非極性の脂肪族アミノ酸がグリシン（D351G）である、項目30に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0269】

33. 前記非極性の脂肪族アミノ酸がイソロイシン（D351I）である、項目30に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0270】

34. 前記非極性の脂肪族アミノ酸がロイシン（D351L）である、項目30に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0271】

35. 前記非極性の脂肪族アミノ酸がプロリン（D351P）である、項目30に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0272】

36. 前記非極性の脂肪族アミノ酸がバリン（D351V）である、項目30に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0273】

37. 配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエントであって、前記バリエントの前記アミノ酸配列が、前記配列番号1のアミノ酸配列を含む野生型T7 RNAポリメラーゼと比較して、(i) E350位でのアミノ酸置換、(ii) D351位でのアミノ酸置換、及び(iii) K387位、N437位、またはK387位及びN437位でのアミノ酸置換を含む、前記RNAポリメラーゼバリエント。

【0274】

38. 前記アミノ酸配列が、前記配列番号1のアミノ酸配列に対して、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも95%、または少なくとも98%の同一性を有する、項目37に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0275】

39. 前記バリエントの前記アミノ酸配列が、K387位でのアミノ酸置換を含む、項目37または38に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0276】

40. 前記バリエントの前記アミノ酸配列が、N437位でのアミノ酸置換を含む、項目37または38に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0277】

10

20

30

40

50

41. 前記バリエントの前記アミノ酸配列が、K387位及びN437位でのアミノ酸置換を含む、項目37または38に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0278】

42. 前記K387位でのアミノ酸置換が極性の中性アミノ酸である、項目37～41のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0279】

43. 前記極性の中性アミノ酸が、アスパラギン(K387N)、システイン(K387C)、グルタミン(K387Q)、メチオニン(K387M)、セリン(K387S)、及びトレオニン(K387T)から選択される、項目42に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0280】

44. 前記N437位でのアミノ酸置換が芳香族アミノ酸である、項目37～42のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0281】

45. 前記芳香族アミノ酸が、トリプトファン(N437W)、チロシン(N437Y)、及びフェニルアラニン(N437F)から選択される、項目44に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0282】

46. 配列番号1のアミノ酸配列に対して少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含むRNAポリメラーゼバリエントであって、前記バリエントの前記アミノ酸配列が、前記配列番号1のアミノ酸配列を含む野生型T7 RNAポリメラーゼと比較して、(i) E350位でのアミノ酸置換、(ii) D351位でのアミノ酸置換、及び(iii) D653位でのアミノ酸置換を含む、前記RNAポリメラーゼバリエント。

【0283】

47. 前記アミノ酸配列が、前記配列番号1のアミノ酸配列に対して、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも95%、または少なくとも98%の同一性を有する、項目46に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0284】

48. 前記D653位でのアミノ酸置換が芳香族アミノ酸である、項目46または47に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0285】

49. 前記芳香族アミノ酸が、トリプトファン(D653W)、チロシン(D653Y)、及びフェニルアラニン(D653F)から選択される、項目48に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0286】

50. 前記E350位でのアミノ酸置換が芳香族アミノ酸である、項目37～49のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0287】

51. 前記芳香族アミノ酸が、トリプトファン(E350W)、チロシン(E350Y)、及びフェニルアラニン(E350F)から選択される、項目50に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0288】

52. 前記D351位でのアミノ酸置換が非極性の脂肪族アミノ酸である、項目37～51のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0289】

53. 前記非極性の脂肪族アミノ酸が、アラニン(D351A)、グリシン(D351G)、イソロイシン(D351I)、ロイシン(D351L)、プロリン(D351P)、及びバリン(D351V)から選択される、項目52に記載のRNAポリメラーゼバリエント。

【0290】

10

20

30

40

50

54. 配列番号2のアミノ酸配列を含むリボ核酸(RNA)ポリメラーゼバリエントであって、式中、 X^1 が、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸であり、 X^2 が、A、G、I、L、P、及びVから任意に選択される非極性の脂肪族アミノ酸から選択され、 X^3 が、N、C、Q、M、S、及びTから任意に選択される極性の中性アミノ酸であり、 X^4 が、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸である、前記RNAポリメラーゼバリエント。

【0291】

55. 配列番号6のアミノ酸配列を含む、リボ核酸(RNA)ポリメラーゼバリエント。

【0292】

56. 配列番号3のアミノ酸配列を含むリボ核酸(RNA)ポリメラーゼバリエントであって、式中、 X^1 が、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸であり、 X^2 が、A、G、I、L、P、及びVから任意に選択される非極性の脂肪族アミノ酸から選択され、 X^4 が、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸である、前記RNAポリメラーゼバリエント。

【0293】

57. 配列番号7のアミノ酸配列を含む、リボ核酸(RNA)ポリメラーゼバリエント。

【0294】

58. 配列番号4のアミノ酸配列を含むリボ核酸(RNA)ポリメラーゼバリエントであって、式中、 X^1 が、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸であり、 X^2 が、A、G、I、L、P、及びVから任意に選択される非極性の脂肪族アミノ酸から選択され、 X^3 が、N、C、Q、M、S、及びTから任意に選択される極性の中性アミノ酸である、前記RNAポリメラーゼバリエント。

【0295】

59. 配列番号8のアミノ酸配列を含む、リボ核酸(RNA)ポリメラーゼバリエント。

【0296】

60. 配列番号5のアミノ酸配列を含むリボ核酸(RNA)ポリメラーゼバリエントであって、式中、 X^1 が、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸であり、 X^2 が、A、G、I、L、P、及びVから任意に選択される非極性の脂肪族アミノ酸から選択され、 X^5 が、W、Y、及びFから任意に選択される芳香族アミノ酸である、前記RNAポリメラーゼバリエント。

【0297】

61. 配列番号9のアミノ酸配列を含む、リボ核酸(RNA)ポリメラーゼバリエント。

【0298】

62. DNA、ヌクレオシド三リン酸、項目1～53のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼバリエント、及び任意選択でcapアナログを含む、*in vitro*転写反応においてメッセンジャーRNA(mRNA)を生成することを含む方法。

【0299】

63. 前記反応物が前記capアナログを含む、項目62に記載の方法。

【0300】

64. 前記capアナログが、ジヌクレオチドcapアナログ、トリヌクレオチドcapアナログ、またはテトラヌクレオチドcapアナログである、項目62または63に記載の方法。

【0301】

65. 前記capアナログが、GAG配列を含むトリヌクレオチドcapアナログである、項目64に記載の方法。

【0302】

10

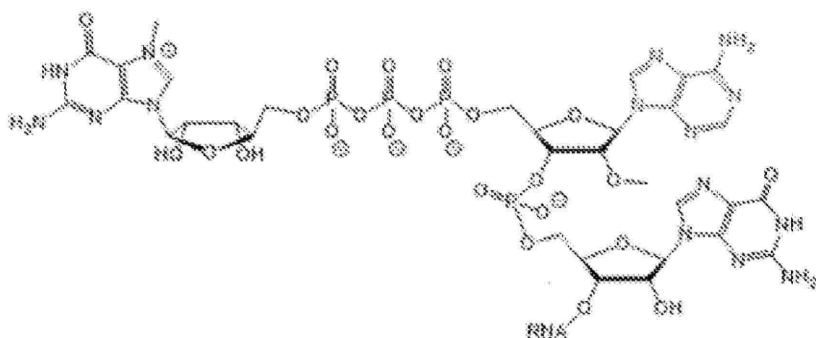
20

30

40

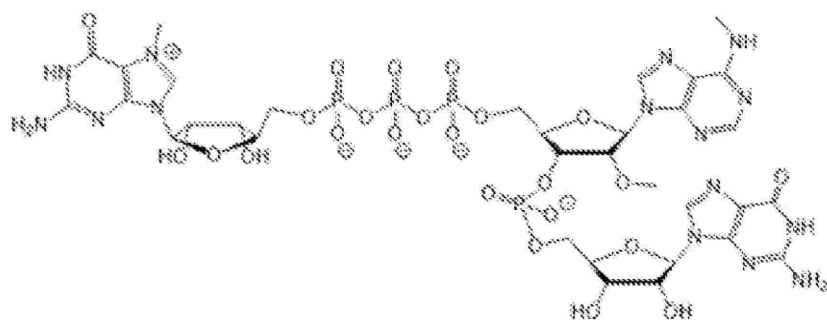
50

66. 前記 G A G c a p アナログが、
【化17】



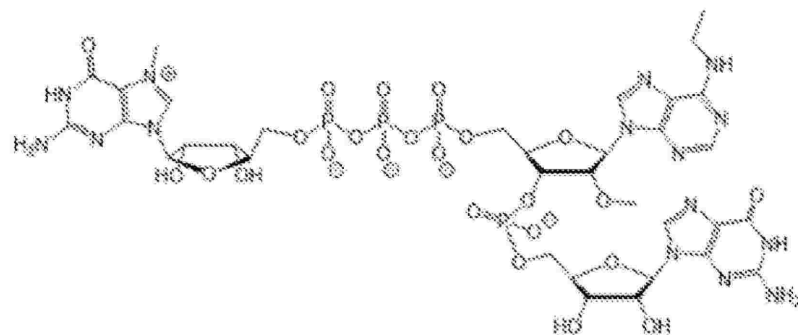
(X)、

10



(XI)、または

20



(XII)

30

から選択される化合物を含む、項目65に記載の方法。

【0303】

67. 前記テトラヌクレオチド c a p アナログが、G G A G 配列を含む、項目64に記載の方法。

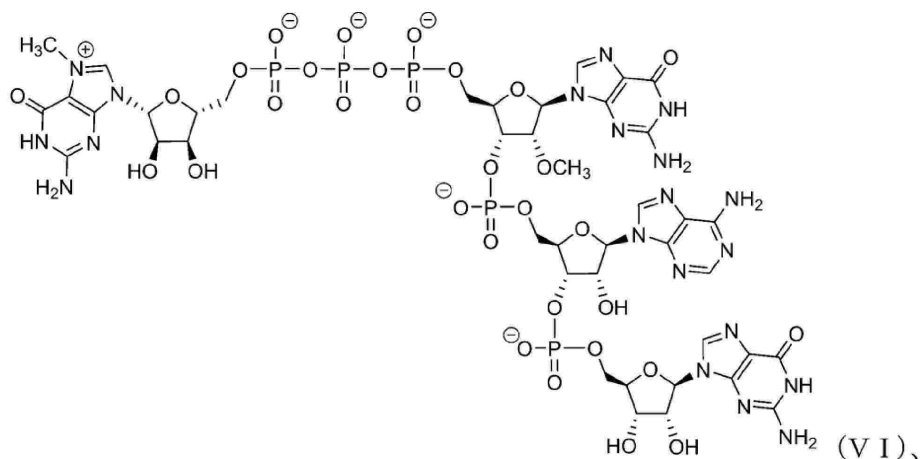
【0304】

68. 前記テトラヌクレオチド c a p アナログが、

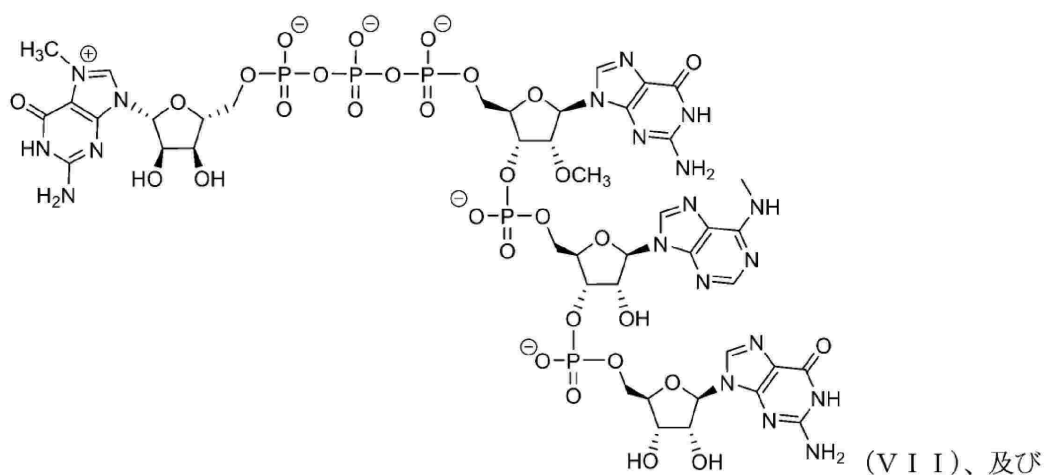
40

50

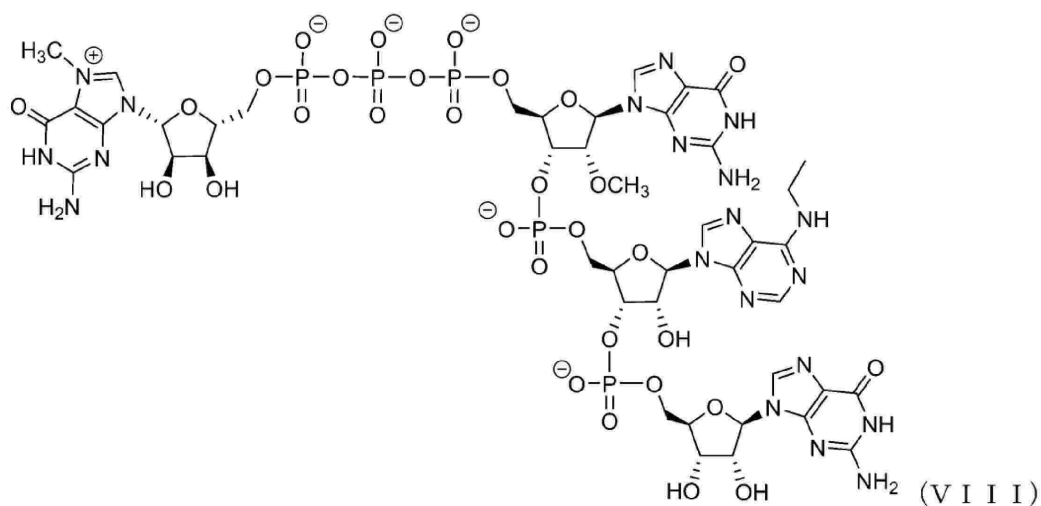
【化 1 8】



10



20



30

40

から選択される化合物を含む、項目 6 7 に記載の方法。

【0305】

69. 前記 DNA が、2'-デオキシチミジン残基または 2'-デオキシシチジン残基を、位置 +1 に含む、項目 6 2 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【0306】

70. 項目 1 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の RNA ポリメラーゼバリエント、ならびに DNA、ヌクレオシド三リン酸、及び cap アナログからなる群から選択される *in vitro* 転写 (IVT) 試薬を含む、組成物またはキット。

【0307】

50

71. 項目1～61のいずれか1項に記載のRNAポリメラーゼバリエントをコードする核酸。

【実施例】

【0308】

実施例1. RNAポリメラーゼバリエントを使用したIVT反応

DNA鋳型、GGAG capアナログ、及び表1に示すように選択した個々のRNAポリメラーゼバリエントを使用して、*in vitro*転写(IVT)反応を行った。具体的には、本実施例において、N437Y、K387S、E350W、及びD351V置換(配列番号6;「バリエントA」)、N437Y、E350W、及びD351V置換(配列番号7;「バリエントB」)、K387S、E350W、及びD351V置換(配列番号8;「バリエントC」)、ならびにD653W、E350W、及びD351V置換(配列番号9;「バリエントD」)を含むRNAポリメラーゼバリエントを試験した。対照T7RNAポリメラーゼ(配列番号1)を使用した反応も実施した。IVT反応後、各反応物由来の転写RNA産物を、キャッピング効率(GGAG capを含む全RNAの割合)、dsRNA混入、及びテール純度を含む前記RNA産物の品質に対応するために特徴決定した。

10

【0309】

オリゴdT精製後の全RNAの全収率を、UV吸収によって測定した。全RNA産物をLC-MSで分析して、キャッピング効率(すなわち、GGAG capを含む転写RNAの割合)を測定した。本実施例のIVT反応後、標準ELISAを使用して、dsRNA混入物質(例えば、40ヌクレオチド塩基対より長いdsRNA)を評価した。Tris RP(逆相)法を使用して、テールRNAの割合(すなわち、ポリAテールを含む転写RNAの割合)を評価した。

20

【0310】

試験した各RNAポリメラーゼバリエントは、IVT反応においてRNAを生成したが、キャップされたRNA(GGAG capを含む全RNAの割合)が少なくとも80%、テールRNA(すなわち、ポリAテールを含む転写RNAの割合)が少なくとも約80%であった。N437Y、E350W、及びD351V置換(配列番号7)、ならびにK387S、E350W、及びD351V置換(配列番号8)を含むRNAポリメラーゼバリエントは、0.007%未満のdsRNA(w:w)を生成した。さらに、試験したRNAポリメラーゼバリエント(8mg/mL超)の各々について、全RNAの収率は、対照T7RNAポリメラーゼと同等であった。

30

【0311】

試験した各RNAポリメラーゼバリエントは、試験した各特性の全体にわたって、対照T7RNAポリメラーゼと同等かまたはより良好な性能を示した。具体的には、N437Y+K387S+E350W+D351Vでは、対照T7RNAポリメラーゼと比較して、キャッピング効率(約85%のキャップされたRNA)がより高く、収率が同様であり、テール純度が同様であるRNAが得られた。N437Y+E350W+D351Vでは、対照T7RNAポリメラーゼと比較して、キャッピング効率(約80%のキャップされたRNA)がより高く、収率が同様であり、テール純度が同様であり、dsRNA混入度が同様であるRNAが得られた。K387S+E350W+D351Vでは、対照T7RNAポリメラーゼと比較して、キャッピング効率(約83%のキャップされたRNA)がより高く、収率が同様であり、テール純度がより高く(約85%のテールRNA)、dsRNA混入度がより少ない(0.00327 dsRNA wt:wt)RNAが得られた。D653W+E350W+D351Vでは、対照T7RNAポリメラーゼと比較して、キャッピング効率(約95%のキャップされたRNA)がより高いRNAが得られた。

40

【0312】

試験した各RNAポリメラーゼのデータを表3及び図1A～1Dに示す。

【0313】

50

【表 3】

表3. 実施例1で使用したRNAポリメラーゼによって生成されるRNAの特徴

	収率(mg/ml)	キャッピング割合	テール割合	dsRNA の割合(w:w)
対照 RNAP	9.34	69.51	83.17	0.00624
N437Y + K387S + E350W + D351V	11.14	84.95	79.51	0.01583
N437Y + E350W + D351V	9.56	80.19	80.87	0.006955
K387S + E350W + D351V	9.20	82.88	85.00	0.00327
D653W + E350W + D351V	8.87	94.47	80.30	0.02815

10

【0314】

実施例2. RNAポリメラーゼバリエントは、低濃度のGGAG capアナログにて、高レベルのキャッピング効率でRNA産物を生成する

DNA鋳型、等モルNTP、可変量のGGAGテトラヌクレオチドcapアナログ（0.25mM、0.5mM、0.75mM、1mM、1.25mM、1.5mM、3mM）及びT7RNAポリメラーゼを使用して、in vitro転写反応を実施した。N437Y、K387S、E350W、及びD351V置換（配列番号6）、N437Y、E350W、及びD351V置換（配列番号7）、K387S、E350W、及びD351V置換（配列番号8）、ならびにD653W、E350W、及びD351V置換（配列番号9）を含むRNAポリメラーゼバリエントを本実施例で試験した。対照T7RNAポリメラーゼを使用した反応も実施した。

20

【0315】

このIVT反応後、mRNA産物をオリゴdT精製し、その後、LC-MSにより分析して、キャップされたRNA（%）（すなわち、capを含む転写RNAの割合）を測定し、HPLCにより分析して、この反応のRNA収率を決定し、Tris RP（逆相）法により分析して、テールRNAの割合を測定する。

【0316】

試験したRNAポリメラーゼバリエントの各々が、GGAG capアナログの存在下で、GGAGアナログの濃度に関係なく、対照ポリメラーゼバリエントよりも高レベルのキャップされたRNAの割合を有するRNAを生成した（図2A）。GGAG capアナログの最低試験濃度（0.25mM）でも、試験したすべてのバリエントが、少なくとも50%のキャップされたRNAを生成し、これは、対照ポリメラーゼバリエントによって生成された約25%のキャップされたRNAよりもかなり高かった。1.5mMのGGAG capアナログでは、試験したすべてのバリエントが約80～95%のキャップされたRNAを生成した。

30

【0317】

試験した各バリエントは、対照ポリメラーゼバリエントと比較して、同等の収率（図2B）及びテールRNAの割合（図2C）を有するRNAを生成した。

40

【0318】

これらのデータは、試験した各RNAポリメラーゼバリエント（すなわち、N437Y + K387S + E350W + D351V、N437Y + E350W + D351V、K387S + E350W + D351V、及びD653W + E350W + D351V）は、収率またはテール含量を放棄することなく、対照T7RNAポリメラーゼよりも高いキャッピング効率を有するRNAを生成することが可能である。

【0319】

均等物及び範囲

本明細書に開示するすべての参考文献、特許、及び特許出願は、場合によっては、文書全

50

体を包含し得る、各々が引用される主題に関して参照により援用される。

【0320】

本明細書において、明細書中及び請求項中の「a」及び「an」という不定冠詞は、反対のことが明確に示されない限り、「少なくとも1つの」を意味するものと理解すべきである。

【0321】

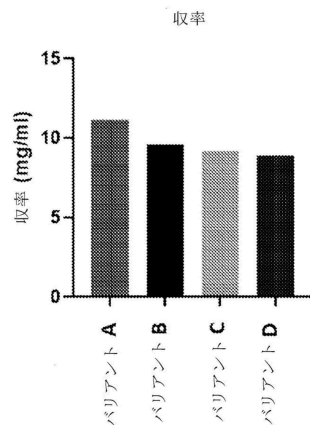
また、明確に反対のことが示されない限り、本明細書で特許請求される2つ以上のステップまたは行為を含む任意の方法において、当該方法のステップまたは行為の順序は、必ずしも当該方法のステップまたは行為が記載されている順序に限定されることも理解されたい。

【0322】

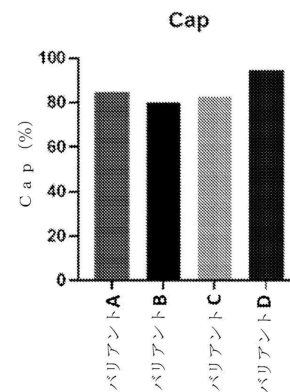
特許請求の範囲、及び上記明細書において、すべての移行句、例えば、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「有する (carrying)」、「有する (having)」、「含む (containing)」、「含む (involving)」、「有する (holding)」、「～からなる (composed of)」などは、オープンエンドである、すなわち、含むが限定されないことを意味すると理解される。「～からなる」及び「～から本質的になる」という移行句のみが、米国特許商標庁審査基準の2111.03節に記載のように、それぞれクローズドまたはセミクローズドな移行句であるものとする。

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

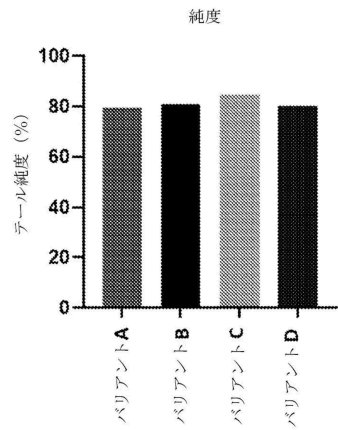
20

30

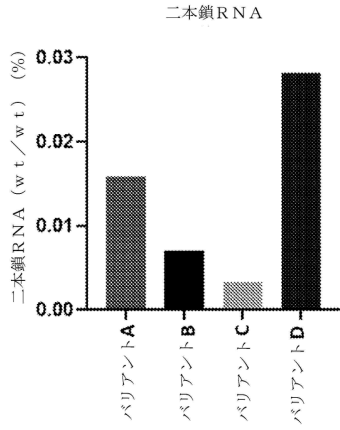
40

50

【図 1 C】

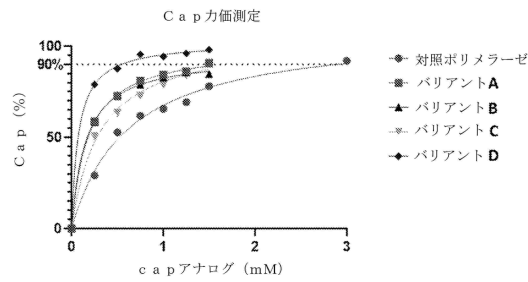


【図 1 D】

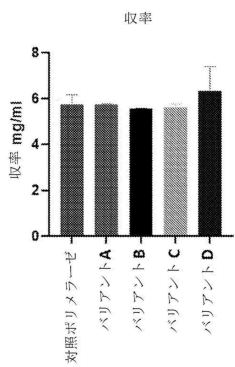


10

【図 2 A】

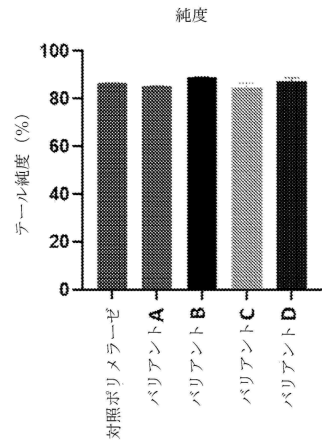


【図 2 B】



20

【図 2 C】



30

【配列表】

2025513874000001.xml

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/12
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/172239 A1 (MODERNATX INC [US]) 27 August 2020 (2020-08-27) example 1 claims 1-52 sequences 127,157,240 & DATABASE Geneseq [Online] 15 October 2020 (2020-10-15), "T7 RNA polymerase mutant G47A/D351V/E350W/K387S/G884, SEQ 127.", retrieved from EBI accession no. GSP:BIF46398 Database accession no. BIF46398 abstract -/--	1-18

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2023

Date of mailing of the international search report

30/06/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tudor, Mark

1

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065719

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	& DATABASE Geneseq [Online] 15 October 2020 (2020-10-15), "T7 RNA polymerase mutant G47A/N437Y/G884, SEQ 157.", retrieved from EBI accession no. GSP:BIF46428 Database accession no. BIF46428 abstract & DATABASE Geneseq [Online] 15 October 2020 (2020-10-15), "T7 RNA polymerase mutant D351V/D653T, SEQ 240.", retrieved from EBI accession no. GSP:BIF46511 Database accession no. BIF46511 abstract ----- WO 2011/128444 A2 (EUKARYS [FR]; JAIS PHILIPPE [FR]) 20 October 2011 (2011-10-20) claim 1 sequence 40 -----	
		1-18

1

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/065719

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					
Information on patent family members					
International application No					
PCT/US2023/065719					
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2020172239 A1	27-08-2020	AU 2020224103 A1	16-09-2021		
		CA 3130888 A1	27-08-2020		
		CN 113795579 A	14-12-2021		
		EP 3927821 A1	29-12-2021		
		JP 2022521094 A	05-04-2022		
		KR 20210142636 A	25-11-2021		
		MA 55037 A	29-12-2021		
		US 2021309976 A1	07-10-2021		
		US 2023104080 A1	06-04-2023		
		WO 2020172239 A1	27-08-2020		
WO 2011128444 A2	20-10-2011	CA 2796175 A1	20-10-2011		
		DK 2558579 T3	11-11-2013		
		EP 2377938 A1	19-10-2011		
		EP 2558579 A2	20-02-2013		
		ES 2436356 T3	30-12-2013		
		IL 222357 A	29-09-2016		
		JP 5432415 B2	05-03-2014		
		JP 2013531467 A	08-08-2013		
		KR 20130069632 A	26-06-2013		
		SG 184893 A1	29-11-2012		
		US 2013042334 A1	14-02-2013		
		US 2015203888 A1	23-07-2015		
		WO 2011128444 A2	20-10-2011		

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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

(72)発明者 マーガレット・フランクリン

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02142・ケンブリッジ・ビニー・ストリート・325・
モデルナティエックス・インコーポレイテッド内

(72)発明者 アサナシオス・ドウシス

アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02142・ケンブリッジ・ビニー・ストリート・325・
モデルナティエックス・インコーポレイテッド内