



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201936201 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：107145131

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 14 日

(51)Int. Cl. : A61K31/713 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

(30)優先權：2017/12/14 美國

62/598,532

(71)申請人：美商堅固生物科技公司 (美國) SOLID BIOSCIENCES INC. (US)

美國

(72)發明人：拉姆 珊希爾 RAMU, SENTHIL (US)；施耐德 喬爾 SCHNEIDER, JOEL (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：10 共 121 頁

(54)名稱

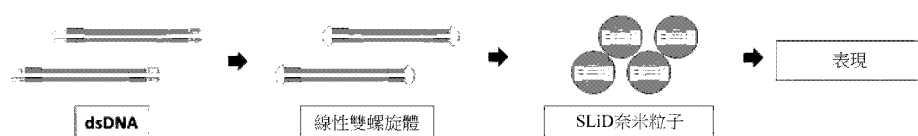
基因之非病毒生產及遞送

(57)摘要

本文所述之發明係關於可容易擴增及大量生產之封閉末端雙股 DNA (cdsDNA) 的產生，該封閉末端雙股 DNA 用於例如治療用途，諸如基因療法。

The invention described herein pertains to the production of closed-end double-stranded DNA (cdsDNA) that can be easily amplified and produced in large quantity, for use in, for example, therapeutic use, such as gene therapy.

指定代表圖：



【圖1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

基因之非病毒生產及遞送

【英文發明名稱】

NON-VIRAL PRODUCTION AND DELIVERY OF GENES

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 用於諸如基因療法之目的的基因遞送至靶細胞為眾所周知的，特別是用於治療諸如囊腫性纖維化及某些癌症之疾病。該術語包括將任何核酸材料(諸如基因或基因的一部分)遞送或引入靶細胞以糾正一些基因缺陷，以及基因疫苗接種及在適合之宿主細胞中活體外生產商業上有用之蛋白質。

【0002】 細胞遞送系統通常分為三大類，亦即涉及直接注射裸DNA或RNA之細胞遞送系統、利用病毒或經基因修飾之病毒之細胞遞送系統以及利用非病毒遞送劑之細胞遞送系統。儘管作為遞送劑之病毒具有高效率及高細胞選擇性之優點，但其亦具有毒性、產生發炎反應及難以處理大DNA片段之缺點。

【0003】 因此，需要提供經改良之細胞遞送系統，其包括任何所關注之DNA片段的非病毒遞送。

【發明內容】

【0004】 本發明之一個態樣提供一種DNA構築體，其包含：(1)骨架序列，其包含支持在真核(例如哺乳動物)或原核細胞中自我複製之序列；(2)嵌段，其包含：(a)所關注之DNA片段；(b)側接所關注之DNA片

段的一對末端序列，其中該等末端序列為反向末端重複序列(ITR)、長末端重複序列(LTR)或內部重複序列或端粒序列；及(c)側接ITR或LTR對之一對原核端粒酶(protelomerase)識別序列。在某些實施例中，嵌段或所關注之DNA片段經組態以能夠在真核細胞之整個生命週期中染色體外存在。

【0005】 在某些實施例中，ITR來自雙股DNA病毒，諸如AAV。在某些實施例中，AAV為AAV1-AAV10中之任一者。

【0006】 在某些實施例中，LTR來自DNA病毒，諸如HSV。

【0007】 在某些實施例中，原核端粒酶識別序列中之至少一者包含至少14 bp長度之完美反向重複DNA序列或其變體。

【0008】 在某些實施例中，原核端粒酶識別序列中之至少一者包含嗜溫性噬菌體完美反向重複序列之22 bp共同序列。

【0009】 在某些實施例中，原核端粒酶識別序列中之至少一者來自大腸桿菌噬菌體N15 (諸如由大腸桿菌N15 TelN原核端粒酶識別之大腸桿菌噬菌體)、土壤桿菌克雷伯氏菌(*Klebsiella*)噬菌體Phi KO2、耶爾森氏菌(*Yersinia*)噬菌體PY54、鹽單胞菌(*Halomonas*)噬菌體phiHAP-1及弧菌(*Vibrio*)噬菌體VP882，或伯氏疏螺旋體(*Borrelia burgdorferi*)。

【0010】 在某些實施例中，原核端粒酶識別序列中之至少一者包含至少30個、至少40個、至少60個、至少80個或至少100個鹼基對長度之完美反向重複序列。

【0011】 在某些實施例中，所關注之DNA片段包含在真核啟動子及/或增強子控制下/可操作地連接於真核啟動子及/或增強子之所關注之編碼序列，及視情況選用之真核轉錄終止序列。

【0012】 在某些實施例中，所關注之編碼序列可包含編碼抗原之DNA疫苗，該抗原：(1)用於治療或預防諸如癌症、過敏症、毒性及病原體感染之病況(例如，真菌，病毒，諸如人類乳頭瘤病毒(HPV)、HIV、HSV2/HSV1、流感病毒(A、B及C型)、脊髓灰質炎病毒、RSV病毒、鼻病毒、輪狀病毒、A型肝炎病毒、諾沃克病毒組(Norwalk Virus Group)、腸病毒、星狀病毒、麻疹病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、水痘-帶狀疱疹病毒、細胞巨大病毒、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)、腺病毒、風疹病毒、人類T細胞淋巴瘤I型病毒(HTLV-I)、B型肝炎病毒(HBV)、C型肝炎病毒(HCV)、D型肝炎病毒、痘病毒、馬爾堡(Marburg)及埃博拉(Ebola))；細菌(諸如結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、披衣菌屬(*Chlamydia*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、志賀桿菌屬(*Shigella*)、沙門氏菌屬(*Salmonella*)、霍亂弧菌(*Vibrio cholerae*)、梅毒螺旋體(*Treponema pallidum*)、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、布氏桿菌屬(*Brucella*)、土拉熱弗朗西絲菌(*Francisella tularensis*)、幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)、鉤端螺旋體(*Leptospira interrogans*)、嗜肺性退伍軍人桿菌(*Legionella pneumophila*)、鼠疫耶爾森氏菌(*Yersinia pestis*)、鏈球菌屬(*Streptococcus*)(A型及B型)、肺炎球菌屬(*Pneumococcus*)、腦膜炎雙球菌屬(*Meningococcus*)、流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenza*)(b型)、剛地弓形蟲(*Toxoplasma gondii*)、彎曲桿菌病(*Campylobacteriosis*)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、多諾萬病(*Donovanosis*)及放線菌病(*Actinomycosis*))；真菌病原體(諸如念珠菌病(*Candidiasis*)及麴菌病(*Aspergillosis*))；寄生蟲病原體(諸如條蟲屬(*Taenia*)、吸蟲、蛔蟲、阿米

巴病(Amoebiasis)、梨形鞭毛蟲病(Giardiasis)、隱孢子蟲屬(Cryptosporidium)、住血吸蟲屬(Schistosoma)、肺炎肺囊蟲(Pneumocystis carinii)、滴蟲病(Trichomoniasis)及旋毛蟲病(Trichinosis)；(2)來自腺病毒科(adenoviridae)(例如人類腺病毒)、疱疹病毒科(herpesviridae)(例如HSV-1、HSV-2、EBV、CMV及VZV)、乳多空病毒科(papovaviridae)(例如HPV)、痘病毒科(poxviridae)(例如天花及牛痘)、細小病毒科(parvoviridae)(例如小病毒B19)、呼腸孤病毒科(reoviridae)(例如輪狀病毒)、冠狀病毒科(coronaviridae)(例如SARS)、黃病毒科(flaviviridae)(例如黃熱病、西尼羅河病毒、登革熱、C型肝炎及蜱媒腦炎)、小核糖核酸病毒科(picornaviridae)(例如脊髓灰質炎、鼻病毒及A型肝炎)、披膜病毒科(togaviridae)(例如風疹病毒)、絲狀病毒科(filoviridae)(例如馬爾堡及埃博拉)、副黏病毒科(paramyxoviridae)(例如副流感病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎及麻疹)、彈狀病毒科(rhabdoviridae)(例如狂犬病病毒)、布尼亞病毒科(bunyaviridae)(例如漢坦病毒(Hantaan virus))、正黏病毒科(orthomyxoviridae)(例如A型、B型及C型流感病毒)、反轉錄病毒科(retroviridae)(例如HIV及HTLV)及肝DNA病毒科(hepadnaviridae)(例如B型肝炎)之成員；(3)來自造成獸醫學疾病之病原體，諸如病毒病原體、呼腸孤病毒(例如非洲馬病或藍舌病毒)及疱疹病毒(例如馬疱疹)、口蹄疫病毒、蜱媒腦炎病毒、登革熱病毒、SARS、西尼羅河病毒及漢坦病毒；(4)來自免疫缺陷病毒，諸如SIV或貓免疫缺陷病毒；(5)係新抗原(例如由癌症/腫瘤中之突變基因編碼)、腫瘤抗原，諸如睪丸抗原(例如MAGE家族之成員(MAGE 1、2、3等)、NY-ESO-1及SSX-2)、分化抗原(例如酪胺酸酶、gp100、PSA、Her-2及

CEA)、突變的自身抗原及病毒性腫瘤抗原(例如來自致癌HPV類型之E6及/或E7)、MART-1、Melan-A、p97、 β -HCG、GaINAc、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-4、MAGE-12、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC18、CEA、DDC、P1A、EpCam、黑素瘤抗原gp75、Hker 8、高分子量黑素瘤抗原、K19、Tyr1、Tyr2、pMel 17基因家族之成員、c-Met、PSM (前列腺黏蛋白抗原)、PSMA (前列腺特異性膜抗原)、前列腺分泌蛋白、 α -胎蛋白、CA 125、CA 19.9、TAG-72、BRCA-1及BRCA-2抗原。

【0013】 在某些實施例中，所關注之編碼序列包含用於基因療法之治療性DNA分子，其中該治療性DNA分子：(1)在患有由功能基因之功能異常形式(例如杜興氏肌肉萎縮症(Duchenne muscular dystrophy)、囊腫性纖維化、高歇氏病(Gaucher's Disease)及腺苷脫胺酶(ADA)缺乏症、發炎疾病、自體免疫、慢性及感染性疾病、AIDS、癌症、神經疾病、心血管疾病、高膽固醇血症、各種血液病症(包括各種貧血症、地中海貧血症及血友病，及肺氣腫)及實體腫瘤之基因)引起之基因病症的個體中表現該功能基因；(2)編碼毒性肽(亦即化學治療劑，諸如蓖麻毒素、白喉毒素及眼鏡蛇毒因子)、腫瘤抑制基因(諸如p53)、編碼轉化致癌基因之反義mRNA序列的基因、諸如腫瘤壞死因子(TNF)及其他細胞介素之抗腫瘤肽、或轉化致癌基因之反式顯性陰性突變體；(3)編碼活性RNA形式(例如小干擾RNA (siRNA、miRNA、shRNA)或小活化RNA (saRNA)；或(4)編碼CRISPR/Cas組分(諸如Cas9酶或sgRNA)。

【0014】 本發明之另一態樣提供藉由使主題DNA構築體與識別一對原核端粒酶識別序列之原核端粒酶接觸而產生之封閉末端雙股DNA (c dsDNA)。在某些實施例中，主題c dsDNA經組態以能夠在真核細胞之整

個生命週期中染色體外存在。

【0015】 本發明之另一態樣提供封閉末端雙股DNA (c_{ds}DNA)，其包含：(a)所關注之DNA片段；(b)側接所關注之DNA片段的一對末端序列，其中該等末端序列為(例如雙股DNA病毒的)反向末端重複序列(ITR)、DNA病毒(諸如HSV)之長末端重複序列(LTR)或內部重複序列、或端粒序列；及(c)側接該對末端序列之一對半原核端粒酶識別序列，其中該等半原核端粒酶識別序列中之每一者形成c_{ds}DNA之一個封閉末端。在某些實施例中，c_{ds}DNA或所關注之DNA片段經組態以能夠在真核細胞之整個生命週期中染色體外存在。

【0016】 本發明之另一態樣提供包含主題c_{ds}DNA之醫藥組合物。

【0017】 在某些實施例中，c_{ds}DNA係由奈米粒子(諸如LNP或基於聚合物之NP)包圍。

【0018】 在某些實施例中，奈米粒子為SNALP (穩定核酸-脂質粒子)、AtuPLEX、DACC、DBTC、RONDEL、DPC (Dynamic PolyConjugate)、SMARTICLE、DiLA²或EnCore。

【0019】 本發明之另一態樣提供產生無細胞封閉末端雙股DNA (c_{ds}DNA)之方法，該方法包含：(1)在真核(例如哺乳動物)或原核細胞中擴增DNA構築體後，分離主題DNA構築體；(2)使用不會在該嵌段內消解之核酸內切酶使DNA構築體線性化；(3)使DNA構築體與識別一對原核端粒酶識別序列之原核端粒酶接觸以釋放c_{ds}DNA；(4)在步驟(2)及(3)之後，用核酸外切酶移除不是c_{ds}DNA之線性化DNA構築體或其片段；(5)富集或純化c_{ds}DNA。

【0020】 在某些實施例中，步驟(2)及(3)以任何順序或同時在步驟

(1)之後進行。

【0021】 本發明之另一態樣提供產生封閉末端雙股DNA (cdsDNA) 之方法，該方法包含：(1)在真核(例如哺乳動物)或原核細胞中擴增DNA 構築體後，分離主題DNA構築體；(2)使DNA構築體與識別一對原核端粒酶識別序列之原核端粒酶接觸以釋放cdsDNA；(3)富集或純化cdsDNA。

【0022】 在某些實施例中，該方法進一步包含將cdsDNA囊封於奈米粒子(諸如SNALP、AtuPLEX、DACC、DBTC、RONDEL、DPC、SMARTICLE、DiLA²或EnCore)中。

【0023】 本發明之另一態樣提供將所關注之靶基因(GOI)遞送至靶細胞中之方法，該方法包含使靶細胞與包含主題cdsDNA之組合物接觸。

【0024】 在某些實施例中，靶細胞係活體外、離體或活體內接觸。

【0025】 在某些實施例中，靶GOI為用於治療DMD (杜興氏肌肉萎縮症)之野生型迷你-或微型肌縮蛋白基因、DMD途徑中之基因(諸如卵泡抑素或其人類IgG融合物，或IKK β 或NF- κ B途徑之抑制劑)、或與DMA之基因修飾物(諸如SPP1或LTBP4)相關之構築體，且其中靶細胞為肌肉(例如骨骼肌諸如脛骨前肌細胞、心肌、平滑肌、或膈肌、肱三頭肌、比目魚肌、脛骨前肌、腓腸肌、伸趾長肌、腹直肌、股四頭肌及其組合之肌肉，或如以引用的方式併入之WO2017152090A2之表1中所述之肌肉)。在某些實施例中，DMD之至少一種症狀或特徵在強度、嚴重性或頻率方面有所降低，或延遲發作(例如，DMD之至少一種症狀或特徵選自由肌肉萎縮、肌無力、肌肉脆性、肌肉壞死、肌肉纖維化、關節攣縮、骨骼變形、心肌病、吞咽受損、腸和膀胱功能受損、肌肉缺血、認知障礙、行為功能障礙、社交障礙、脊柱側凸和呼吸功能受損組成之群)。在某些實施例

中，治療導致肌肉質量相對於對照增加(例如，相對於對照增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%或500%)。在某些實施例中，治療導致肌肉再生、肌肉力量增加、柔韌性增加、運動範圍增加、耐力增加、易疲勞性減少、血流量增加、認知改善、肺功能改善、炎症抑制、肌纖維化減少及/或肌肉壞死減少。在某些實施例中，該方法進一步包含投與一或多種額外治療劑，諸如抗Fit-1抗體或其片段、艾達沙隆(edasalonexent)、龐日魯單抗(pamrevlumab)、潑尼松(prednisone)、地夫可特(deflazacort)、RNA調節治療劑、外顯子跳躍治療劑及任何其他基因療法。

【0026】 在某些實施例中，所關注之靶基因(GOI)每日、每週兩次、每週一次、每月一次、兩月一次或每2、3、4、5、6、9、12、18、24、36、60、72或更多個月一次遞送至靶細胞。

【0027】 本發明之一個相關態樣提供包含主題cdsDNA或主題醫藥組合物中之任一者之組合物的用途，其係用於製造將所關注之靶基因(GOI)活體內遞送至靶細胞中之藥物。

【0028】 預期本文所述實施例中之任一者或多者，包括僅在實例中或僅在本發明之一個態樣下描述的彼等實施例，可與任一或多個實施例組合，除非明確否定或不當。

【圖式簡單說明】

【0029】 圖1為展示囊封封閉末端dsDNA (cdsDNA)之奈米粒子之非病毒生產的例示性實施例的示意圖，該等奈米粒子可用於例如基因療法中以將所關注之基因(GOI)在靶宿主生物體活體外、離體或活體內遞送至靶細胞。cdsDNA之中心區域由中間最長的雙線表示，代表GOI。緊鄰

GOI側翼之一對短桿代表病毒基因組之反向末端重複(ITR)序列，諸如來自腺相關病毒(AAV)基因組。緊鄰ITR封端之GOI側翼的一對短條代表原核端粒酶之識別或靶序列，諸如56 bp TelN原核端粒酶識別序列。一旦cdsDNA經原核端粒酶消化，dsDNA之兩端就轉變為封閉末端單股DNA環，作為原核端粒酶消化之產物，從而形成cdsDNA分子。隨後將cdsDNA分子封裝/組裝/製備/製造於適合材料之奈米粒子中，可將奈米粒子引入靶細胞或靶生物體內之細胞中以表現GOI。

【0030】圖2說明TelN原核端粒酶裂解dsDNA受質以產生包含圖1中之GOI的cdsDNA的過程。56-bp TelN原核端粒酶識別序列(TelN位點)展示在圖的頂部。在TelN位點中間藉由TelN裂解後，裂解位點左側頂部股中之G的3'與裂解位點左側底部股中之C的5'藉由TelN連接以形成封閉末端單股環，TelN裂解位點右側亦是如此。因此，在包含側接ITR序列(ITR1及ITR2)且進一步側接一對TelN位點(亦即TelN-左及TelN-右)之GOI (例如GFP)的dsDNA質體中，原核端粒酶消化釋放線性雙螺旋體，其包含側接ITR且進一步側接具有封閉末端單股環之TelN半位點的GOI以形成cdsDNA。

【0031】圖3展示使用本發明之方法產生cdsDNA藥物物質。各泳道自上而下之三個條帶為包含GFP作為GOI的未消化質體；剩餘質體骨架；及由原核端粒酶消化產生之側接具有閉環末端之ITR的GOI (GFP)。

【0032】圖4A及4B展示如此產生之cdsDNA具有生物學活性，以活體外指導靶肌肉細胞中之GFP表現。圖4A之左圖為展示環狀質體(pCK8-GFP)經原核端粒酶消化以產生編碼GFP報導體基因之cdsDNA(「SLiD/非病毒AAV」)的示意圖。圖4A之右圖展示凝膠影像，其中具有核酸外切酶

III消化產物之泳道形成單一條帶(cdsDNA)，而另外兩個條帶可能由於核酸外切酶III消化而消失。隨後將包含GFP編碼序列之cdsDNA引入C2C12肌管中，之後監測GFP表現。圖4B中之合併影像組包括GFP信號(由cdsDNA表示)、DAPI核染色及F-肌動蛋白染色。

【0033】 圖4C展示，作為對照，Not I消化之相同質體釋放基本上由GOI (GFP)組成但不包括側接的ITR之dsDNA片段。另一個對照為pCK8 GFP構築體，其為具有側接相同GFP報導體基因之ITR序列的親本質體構築體。雖然經轉染之細胞在相差顯微鏡下顯示相同的形態，但FITC影像展示轉染C2C12細胞之cdsDNA編碼之GFP的強表現，而經Not I消化之GFP dsDNA (不含ITR的開放末端DNA)轉染之細胞具有弱表現。與經cdsDNA轉染之細胞相比，pCK8 GFP對照亦產生不良表現。確定cdsDNA編碼之GFP的轉染效率為約60%，且隨著肌管成熟，GFP表現變得更強。

【0034】 圖5A顯示由原核端粒酶消化產生之cdsDNA的閉環末端保護cdsDNA免於核酸外切酶消化。

【0035】 圖5B展示質體骨架用核酸內切酶(諸如XbaI)線性化使得原核端粒酶消化保護包含對核酸外切酶消化敏感的質體骨架。

【0036】 圖6為說明無細胞cdsDNA藥物物質製造過程的示意圖。

【0037】 圖7A展示編碼5-重複微型肌縮蛋白之主題cdsDNA (SLiD-MD44)對核酸外切酶III消化具有抗性，證實在原核端粒酶消化後存在封閉末端。

【0038】 圖7B展示主題cdsDNA可在C2C12細胞中活體外表現編碼的5-重複微型肌縮蛋白。

【0039】圖8A及8B展示外源微型肌縮蛋白在*mdx*小鼠肌肉組織中之活體內表現。經由肌內電穿孔(IM電穿孔)向小鼠投與40 µg編碼微型肌縮蛋白小基因之主題cDNA (SLiD-MD4)或對照鹽水。微型肌縮蛋白在肌肉中之表現藉由使用針對微型肌縮蛋白小基因中發現的血影蛋白重複序列升高之抗DysB單株抗體進行免疫染色來驗證。

【0040】圖9A及9B分別為圖8A及8B中所示之影像的放大部分。展示藉由表現之外源微型肌縮蛋白之正確的亞細胞(以及質膜)定位。

【0041】圖10展示在IM/電穿孔後7天，在接受60 µg cDNA構築體SLiD-MD4之*mdx*小鼠中持續的微型肌縮蛋白小基因表現。微型肌縮蛋白表現顯示為紅色螢光信號，而內源性層黏連蛋白表現顯示為綠色螢光信號。

【實施方式】

【0042】

相關申請案之引用

本申請案主張2017年12月14日申請之美國臨時申請案第62/598,532號之申請日權益，該臨時申請案之全部內容以引用的方式併入本文中。

【0043】

1. 概述

本文所述之本發明之組合物及方法部分基於以下發現：所關注之DNA片段側接一對末端序列，諸如基於某些雙股DNA病毒之反向末端重複序列(ITR)、或某些DNA病毒之長末端重複序列(LTR)或內部重複序列的末端序列，且進一步側接一對原核端粒酶識別序列，可有效擴增以產生包含此類所關注之DNA片段的無細胞封閉末端雙股DNA (cDNA)分

子，隨後可將c_{ds}DNA封裝於某些奈米粒子中，諸如基於脂質之奈米粒子(LNP)或基於聚合物之奈米粒子(NP)作為醫藥組合物。

【0044】 本文所提供之本發明提供一種大量或大規模製造/生產任何所關注之無細胞DNA片段(例如治療性DNA分子)的方式，該片段可用於例如基因療法而不使用任何病毒載體。

【0045】 本發明之不同態樣更詳細地描述於下文單獨的部分中。

【0046】

2. 所關注之DNA片段

所關注之DNA片段理論上可為任何DNA序列，包括非編碼序列，或編碼蛋白質、RNA (諸如非轉譯RNA，其可用於RNAi、反義抑制，小活化RNA或用於CRISPR/Cas之sgRNA，僅舉幾例)等之序列。

【0047】 在某些實施例中，所關注之DNA片段的長度為約100 bp、200 bp、500 bp、1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、10 kb、15 kb、20 kb、25 kb、30 kb、50 kb、100 kb、150 kb、300 kb、500 kb、750 kb、1000 kb、1500 kb、2000 kb、5000 kb或更長。

【0048】 在某些實施例中，所關注之DNA片段編碼功能蛋白、或其功能結構域或部分。舉例而言，所編碼之功能蛋白可為與缺乏功能蛋白相關/由缺乏功能蛋白引起之疾病中缺少的蛋白質。所編碼之功能蛋白可為DMD小基因或全長DMD基因。

【0049】 在某些實施例中，所關注之DNA片段編碼設計用於拮抗靶基因之轉錄及/或轉譯的反義寡核苷酸。

【0050】 在某些實施例中，所關注之DNA片段編碼設計用於拮抗靶基因表現之RNAi構築體。RNAi構築體可產生siRNA、shRNA (短髮夾

RNA)或miRNA (微RNA)。

【0051】 在某些實施例中，所關注之DNA片段不編碼設計用於拮抗靶基因之轉錄及/或轉譯的反義寡核苷酸。

【0052】 在某些實施例中，所關注之DNA片段不編碼設計用於拮抗靶基因表現之RNAi構築體。RNAi構築體可產生siRNA、shRNA (短髮夾RNA)或miRNA (微RNA)。

【0053】 在某些實施例中，所關注之DNA片段編碼設計用於拮抗靶基因表現之小活化RNA (saRNA)。

【0054】 小活化RNA (saRNA)為靶向基因啟動子以在稱為RNAa之過程中誘導轉錄基因活化的小雙股RNA (dsRNA)。已知小dsRNA，諸如siRNA及微小RNA (miRNA)，係進化保守RNAi之觸發物，其經由抑制轉錄、降解互補mRNA或阻斷蛋白質轉譯而始終導致基因沉默。dsRNA亦可藉由靶向基因啟動子中之選定序列而充當saRNA。

【0055】 在某些實施例中，saRNA為21個核苷酸長，在各股之3'端具有2個核苷酸的突出端。藉由遵循一組已知規則且視情況在培養細胞中測試，可在1至2 kb啟動子區內設計數種saRNA。

【0056】 在某些實施例中，saRNA經設計以靶向與蛋白質編碼基因之啟動子序列重疊的非編碼轉錄物。

【0057】 化學合成之saRNA及表現為shRNA之saRNA已用於活體外及活體內實驗，包括用於治療癌症、肝病、局部缺血及勃起功能障礙之動物模型及人類臨床試驗。

【0058】 在某些實施例中，所關注之DNA片段為DNA疫苗。DNA疫苗通常編碼感染性生物體DNA之修飾形式。向個體投與DNA疫苗，隨

後其表現所選擇之感染性生物體的蛋白質，從而引發針對該蛋白質之免疫反應，該蛋白質通常為保護性的。DNA疫苗亦可在癌症免疫療法中編碼腫瘤抗原或新抗原。

【0059】 DNA疫苗可包含編碼抗原之核酸序列，用於治療或預防許多病況，包括但不限於癌症、過敏症、毒性及病原體感染，該病原體諸如但不限於真菌；病毒，包括人類乳頭瘤病毒(HPV)、HIV、HSV2/HSV1、流感病毒(A、B及C型)、脊髓灰質炎病毒、RSV病毒、鼻病毒、輪狀病毒、A型肝炎病毒、諾沃克病毒組、腸病毒、星狀病毒、麻疹病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、水痘-帶狀疱疹病毒、細胞巨大病毒、埃-巴二氏病毒、腺病毒、風疹病毒、人類T細胞淋巴瘤I型病毒(HTLV-I)、B型肝炎病毒(HBV)、C型肝炎病毒(HCV)、D型肝炎病毒、痘病毒、馬爾堡及埃博拉；細菌，包括結核分枝桿菌、披衣菌屬、淋病奈瑟氏菌、志賀桿菌屬、沙門氏菌屬、霍亂弧菌、梅毒螺旋體、假單胞菌屬、百日咳博德特氏菌、布氏桿菌屬、土拉熱弗朗西絲菌、幽門螺旋桿菌、鉤端螺旋體、嗜肺性退伍軍人桿菌、鼠疫耶爾森氏菌、鏈球菌屬(A型及B型)、肺炎球菌屬、腦膜炎雙球菌屬、流感嗜血桿菌(b型)、剛地弓形蟲、彎曲桿菌病、卡他莫拉菌、多諾萬病及放線菌病；真菌病原體，包括念珠菌病及麴菌病；寄生蟲病原體，包括條蟲屬、吸蟲、蛔蟲、阿米巴病、梨形鞭毛蟲病、隱孢子蟲屬、住血吸蟲屬、肺炎肺囊蟲、滴蟲病及旋毛蟲病。DNA疫苗可包含編碼來自以下成員之抗原的核酸序列：腺病毒科(包括例如人類腺病毒)、疱疹病毒科(包括例如HSV-1、HSV-2、EBV、CMV及VZV)、乳多空病毒科(包括例如HPV)、痘病毒科(包括例如天花及牛痘)、細小病毒科(包括例如小病毒B 19)、呼腸孤病毒科(包括例

如輪狀病毒)、冠狀病毒科(包括例如SARS)、黃病毒科(包括例如黃熱病、西尼羅河病毒、登革熱、C型肝炎及蜱媒腦炎)、小核糖核酸病毒科(包括脊髓灰質炎、鼻病毒及A型肝炎)、披膜病毒科(包括例如風疹病毒)、絲狀病毒科(包括例如馬爾堡及埃博拉)、副黏病毒科(包括例如副流感病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎及麻疹)、彈狀病毒科(包括例如狂犬病病毒)、布尼亞病毒科(包括例如漢坦病毒)、正黏病毒科(包括例如A型、B型及C型流感病毒)、反轉錄病毒科(包括例如HIV及HTLV)及肝DNA病毒科(包括例如B型肝炎)。

【0060】 抗原可來自造成獸醫學疾病之病原體，且尤其可來自病毒病原體，包括例如呼腸孤病毒(諸如非洲馬病或藍舌病毒)及疱疹病毒(包括馬疱疹)。抗原可為來自口蹄疫病毒、蜱媒腦炎病毒、登革熱病毒、SARS、西尼羅河病毒及漢坦病毒之抗原。抗原可來自免疫缺陷病毒，且可例如來自SIV或貓免疫缺陷病毒。

【0061】 DNA疫苗亦可包含編碼腫瘤抗原或腫瘤相關抗原之核酸序列。腫瘤相關抗原之實例包括但不限於新抗原(諸如由來自癌症/腫瘤之突變基因編碼的抗原，新抗原引發T細胞反應以殺死呈現此類新抗原之癌症/腫瘤細胞)、癌症-睪丸抗原(諸如MAGE家族之成員(MAGE 1、2、3等)、NY-ESO-1及SSX-2)、分化抗原(諸如酪胺酸酶、gp100、PSA、Her-2及CEA)、突變的自身抗原及病毒性腫瘤抗原(諸如來自致癌HPV類型之E6及/或E7)。特定腫瘤抗原之其他實例包括MART-I、Melan-A、p97、 β -HCG、GaINAc、MAGE-I、MAGE-2、MAGE-4、MAGE-12、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC18、CEA、DDC、P1A、EpCam、黑素瘤抗原gp75、Hker 8、高分子量黑素瘤抗原、K1 9、Tyr1、Tyr2、pMel

17基因家族之成員、c-Met、PSM (前列腺黏蛋白抗原)、PSMA (前列腺特異性膜抗原)、前列腺分泌蛋白、 α -胎蛋白、CA 125、CA 19.9、TAG-72、BRCA-I及BRCA-2抗原。

【0062】 在某些實施例中，所關注之DNA片段編碼新抗原，其係由癌症或腫瘤中之突變基因編碼的抗原，且可僅存在於癌症或腫瘤中。此類新抗原可充當癌症治療之個人化疫苗。

【0063】 在某些實施例中，所關注之DNA片段為治療性DNA分子，例如用於基因療法之治療性DNA分子。應注意，本文所述之本發明之組合物及方法為通常適用於基因療法之平台技術，包括可藉由提供編碼引起疾病之缺陷內源性基因及作為基因療法之靶標的所關注之功能性DNA片段的一或多個複本來校正的所有單基因人類疾病。

【0064】 舉例而言，此類DNA分子可用於表現功能基因，其中個體患有由該基因之功能異常形式引起的基因病症。此類疾病之實例包括杜興氏肌肉萎縮症(DMD)、囊腫性纖維化(CF)、高歇氏疾病及腺苷脫胺酶(ADA)缺乏症。

【0065】 基因療法可能有用之其他疾病包括發炎疾病、自體免疫、慢性及感染性疾病，包括諸如AIDS、癌症、神經疾病、心血管疾病、高膽固醇血症、各種血液病症(包括各種貧血症、地中海貧血症及血友病)及肺氣腫之病症。

【0066】 為了治療實體腫瘤，可表現編碼毒性肽(亦即化學治療劑，諸如蓖麻毒素、白喉毒素及眼鏡蛇毒因子)之基因、腫瘤抑制基因(諸如p53)、編碼轉化致癌基因之反義mRNA序列的基因、諸如腫瘤壞死因子(TNF)及其他細胞介素之抗腫瘤肽、或轉化致癌基因之反式顯性陰性突變

體。

【0067】 亦考慮其他類型之治療性DNA分子，包括例如轉錄成活性RNA形式(例如小干擾RNA，諸如siRNA、shRNA、miRNA或小活化RNA(saRNA))的DNA分子；或編碼CRISPR/Cas組分(諸如Cas9酶或sgRNA)之DNA。

【0068】 在涉及生產具有治療效用之DNA分子的實施例中，所關注之DNA片段通常包含表現卡匣，該表現卡匣包含一或多個啟動子或增強子元件及編碼所關注之mRNA或蛋白質的基因或其他編碼序列。在涉及用於基因療法之DNA疫苗分子或DNA分子之產生的具體實施例中，DNA模板包含由可操作地連接於編碼所關注之蛋白質的序列的真核啟動子及視情況選用之強化子及/或真核轉錄終止序列組成的表現卡匣。

【0069】

3. *LTR*及*ITR*

儘管本文所述之本發明之組合物及方法不依賴於任何病毒載體來遞送所關注之DNA片段，但本發明之DNA構築體可含有一些病毒載體中常見的某些元件，包括ITR (反向末端重複序列)及LTR (長末端重複序列)。此類病毒元件可用作本發明之末端序列，其可充當所關注之DNA片段的抗分解元件。其他適合之末端序列可包括端粒序列或其功能衍生物或等效物。

【0070】 一旦本發明之cdsDNA被靶細胞攝取，本發明之末端序列使得cdsDNA能夠作為長期穩定的染色體外基因元件存在。具有末端序列之cdsDNA可穩定6小時、12小時、1天、3天、5天、10天、2週、3週、4週、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、9個月、12個月、2

年、3年、5年、10年或更長時間，或可在諸如骨骼、心臟或平滑肌細胞之靶細胞的整個生命週期中穩定。

【0071】 在某些實施例中，所關注之DNA片段側接一對ITR（例如雙股DNA病毒諸如AAV，包括AAV1-AAV10之ITR），或LTR或內部重複序列（例如DNA病毒之LTR，諸如HSV之LTR）。在某些實施例中，ITR為AAV1-AAV10中之任一者的ITR。在某些實施例中，LTR為HSV之LTR。

【0072】 在某些實施例中，該對LTR為來自 γ -反轉錄病毒或慢病毒之元件。LTR可包含在逆轉錄病毒原病毒之任一側發現的U3-R-U5區。

【0073】 在某些實施例中，U3為病毒基因組RNA之3'端的獨特3'區（但在原病毒之5'及3'端均發現），其含有活化病毒基因組RNA轉錄所必需之序列。

【0074】 在某些實施例中，R為在反轉錄病毒/慢病毒載體之5'及3'LTR內均發現之重複序列。Tat蛋白結合於此區。

【0075】 在某些實施例中，U5為病毒基因組RNA之5'端的獨特5'區（但在原病毒之5'及3'端均發現）。

【0076】 在某些實施例中，所關注之DNA片段的一端或兩端具有5'LTR區，其可充當RNA pol II啟動子。轉錄物可在其R區之起點開始，封端，且前進經過U5及所關注之DNA片段的其餘部分。在某些實施例中，雜合5'LTR可與諸如CMV或RSV啟動子之組成型啟動子一起使用。

【0077】 在某些實施例中，LTR之R區可包含轉活化反應元件TAR，且充當Tat（結合TAR以活化自LTR啟動子之轉錄的轉活化因子）之結合位點。

【0078】 在某些實施例中，所關注之DNA片段的一端或兩端具有3'

LTR區，其可藉由恰好在其R序列後添加poly A段來終止在所關注之DNA片段的另一端由5' LTR開始的轉錄。

【0079】 在某些實施例中，所關注之DNA片段的轉錄由5' LTR引發。

【0080】 在某些實施例中，所關注之DNA片段的轉錄由3' LTR引發。

【0081】 在某些實施例中，替代地或另外地，所關注之DNA片段本身可攜帶其自身的啟動子、強化子、其他轉錄/轉譯調節元件、聚腺苷酸化信號及/或轉譯終止位點。

【0082】 在某些實施例中，轉譯調節元件包含WPRE或土拔鼠肝炎病毒轉錄後調節元件，其經由增加的核輸出刺激轉殖基因之表現。

【0083】 在某些實施例中，該對ITR為來自腺相關病毒(AAV)之元件。AAV ITR各約145個鹼基。ITR形成T形髮夾，其通常充當病毒DNA複製之起源。其含有封裝所需之D區。

【0084】

4. 原核端粒酶及原核端粒酶識別序列

本發明之方法包含藉由在促進cdsDNA產生之條件下使擴增的DNA構築體與釋放嵌段之原核端粒酶接觸來產生cdsDNA的步驟。

【0085】 用於本發明之原核端粒酶為能夠裂解及重新連接包含原核端粒酶靶序列之模板以產生共價cdsDNA分子的任何多肽。具有原核端粒酶活性之酶亦描述為端粒解離酶(例如在伯氏疏螺旋體中)。原核端粒酶靶序列之要求如下所述。給定多肽催化自包含原核端粒酶靶序列之模板產生cdsDNA的能力可使用此項技術中描述之任何適合之分析來確定。

【0086】已在噬菌體中描述原核端粒酶。在一些溶源性細菌中，噬菌體作為染色體外DNA存在，其包含具有共價封閉末端之線性雙股。此DNA之複製及共價封閉末端(或端粒末端)之維持視原核端粒酶之活性而定。此催化活性之實例係由來自感染大腸桿菌之噬菌體N15的酶TelN提供。TelN識別環狀雙股DNA中之特定核苷酸序列。此序列為略微不完美的反向回文結構，稱為telRL，包含兩個半部telR及telL，側接22個鹼基對的反向完美重複序列(telO)。藉由作用於線性原噬菌體DNA之特定DNA聚合酶的初始活性，在環狀雙股DNA中形成兩個telRL位點。TelN將此環狀DNA轉化為兩個相同的線性原噬菌體DNA分子，從而完成複製週期。telR及telL包含線性原噬菌體DNA之封閉末端，使DNA能夠以相同的方式進一步複製。

【0087】適合之原核端粒酶的實例包括來自以下噬菌體之原核端粒酶，諸如來自海水鹽單胞菌(*Halomonas aquamarina*)之phiHAP-1 (SEQ ID NO: 7)、來自小腸結腸炎耶爾森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)之PY54 (SEQ ID NO: 9)、來自產酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)之phiKO2 (SEQ ID NO: 11)、來自弧菌屬之VP882 (SEQ ID NO: 13)及來自大腸桿菌之N15 (SEQ ID NO: 15)或其任何變體。在某些實施例中，使用噬菌體N15原核端粒酶(SEQ ID NO: 15)或其變體。

【0088】SEQ ID NO: 7、9、11、13及15之變體包括其同源物或突變體。突變體包括相對於天然序列之截短、取代或缺失。變體必須自包含如上所述之原核端粒酶靶位點的模板產生封閉的線性DNA。

【0089】本文提及之任何同源物通常為功能同源物，且通常與天然蛋白質之相關區域至少40%同源。可使用已知方法量測同源性。舉例而

言，UWGCG套件提供BESTFIT程式，其可用於計算同源性(例如在其預設設置下使用) (Devereux等人 (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387-395)。PILEUP及BLAST算法可用於計算同源性或對齊序列(通常在其預設設置下)，如Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300；Altschul, S, F等人 (1990) *J Mol Biol* 215:403-10中所述。進行BLAST分析之軟體可經由國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)公開獲得。

【0090】 BLAST算法進行兩個序列之間相似性的統計分析；參見例如Karlin及Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787。BLAST算法提供的一種相似性量度係最小和概率(P(N))，其提供兩個核苷酸或胺基酸序列之間偶然發生匹配之概率的指示。舉例而言，若第一序列與第二序列之比較中的最小和概率小於約1，較佳小於約0.1，更佳小於約0.01且最佳小於約0.001，則認為序列與另一序列相似。

【0091】 「原核端粒酶靶序列」或「原核端粒酶識別序列」(在本文中可互換使用)係由原核端粒酶識別之聚核苷酸(例如雙股DNA)序列，用於藉由原核端粒酶裂解及重新連接以形成共價封閉末端dsDNA。藉由原核端粒酶消化原核端粒酶靶/識別序列產生兩個「半原核端粒酶靶/識別序列」。

【0092】 在某些實施例中，原核端粒酶靶序列包含完美的回文序列，亦即具有雙重旋轉對稱性之雙股DNA序列，在本文中亦描述為完美的反向重複序列。

【0093】 來自各種嗜溫性噬菌體及細菌質體之原核端粒酶靶序列均具有包含完美反向重複序列之共同特徵。完美反向重複序列之長度視特定

生物體而不同。

【0094】 在某些實施例中，完美反向重複序列來自伯氏疏螺旋體，且長度為14 bp。

【0095】 在某些實施例中，完美反向重複序列來自嗜溫性噬菌體，且長度為22 bp或更長。

【0096】 在某些實施例中，原核端粒酶識別序列來自大腸桿菌N15，其中中央完美反向回文序列側接反向重複序列，亦即形成較大的不完美反向回文序列的一部分(參見US9109250B2中之圖2及3，以引用的方式併入本文中；加下劃線的鹼基表示反向重複序列之對稱性被中斷處)。

【0097】 在某些實施例中，原核端粒酶靶序列包含至少14個鹼基對長度之雙股回文(完美反向重複)序列。在某些實施例中，完美反向重複序列包括SEQ ID NO: 11至16之序列及其變體。

【0098】 SEQ ID NO: 11 (NCATNNTANNCGNNTANNATGN)為用於嗜溫性噬菌體完美反向重複序列之22個鹼基的共同序列。完美反向重複序列之鹼基對在不同噬菌體之間的某些位置為保守的，而在其他位置序列可能為靈活的。因此，SEQ ID NO: 11為在本發明之方法中與噬菌體原核端粒酶一起使用之完美反向重複序列的最小共同序列。

【0099】 在由SEQ ID NO: 11定義之共同序列內，SEQ ID NO: 12 (CCATTATACGCGCGTATAATGG)係與大腸桿菌噬菌體N15 (SEQ ID NO: 10)及克雷伯氏菌噬菌體Phi KO2 (SEQ ID NO: 6)原核端粒酶一起使用的完美反向重複序列。

【0100】 亦在由SEQ ID NO: 11定義之共同序列內，SEQ ID NO: 13至15：

GCATACTACGCGCGTAGTATGC (SEQ ID NO: 13) ,

CCATACTATACGTATAGTATGG (SEQ ID NO: 14) ,

GCATACTATACGTATAGTATGC (SEQ ID NO: 15) ,

為分別與來自耶爾森氏菌噬菌體PY54 (SEQ ID NO: 4)、鹽單胞菌噬菌體phiHAP-1 (SEQ ID NO: 2)及弧菌噬菌體VP882 (SEQ ID NO: 8)之原核端粒酶一起使用的完美反向重複序列。

【0101】 SEQ ID NO: 16 (ATTATATATATAAT)係與伯氏疏螺旋體原核端粒酶一起使用的完美反向重複序列。此完美反向重複序列來自線性共價封閉質體，亦即伯氏疏螺旋體中所包含之lpB31.16。此14-bp序列短於噬菌體之22-bp共同完美反向重複序列(SEQ ID NO: 11)，表明細菌原核端粒酶可能對噬菌體原核端粒酶之特定靶序列要求不同。然而，所有原核端粒酶靶序列共有完美反向重複序列之共同結構基元。

【0102】 完美反向重複序列之長度可大於22 bp，視本發明方法中使用之特定原核端粒酶的要求而定。因此，在一些實施例中，完美反向重複序列的長度可為至少30、至少40、至少60、至少80或至少100個鹼基對。此類完美反向重複序列之實例包括SEQ ID NO: 17至19及其變體。

GGCATACTATACGTATAGTATGCC (SEQ ID NO: 17)

ACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATAGGT
(SEQ ID NO: 18)

CCTATATTGGGCCACCTATGTATGCACAGTTCGCCCATACTATA
CGTATAGTATGGGCGAACTGTGCATACATAGGTGGCCCAATATAGG
(SEQ ID NO: 19)

【0103】 SEQ ID NO: 17至19及其變體分別與來自弧菌噬菌體

VP882 (SEQ ID NO: 8)、耶爾森氏菌噬菌體PY54 (SEQ ID NO: 4)及鹽單胞菌噬菌體phi HAP-1 (SEQ ID NO: 2)之原核端粒酶一起使用。

【0104】 完美反向重複序列可側接額外的反向重複序列。側接反向重複序列可為完美或不完美的重複序列，亦即可為完全對稱或部分對稱的。側接反向重複序列可與中央回文序列鄰接或非鄰接。

【0105】 在某些實施例中，原核端粒酶靶序列可包含不完美的反向重複序列，其包含至少14個鹼基對長的完美反向重複序列。一個實例為SEQ ID NO: 24。

【0106】 在某些實施例中，不完美的反向重複序列可包含至少22個鹼基對長的完美反向重複序列。一個實例為SEQ ID NO: 20。

【0107】 在某些實施例中，原核端粒酶靶序列包含SEQ ID NO: 20-24中之任一者的序列或其變體。

TATCAGCACACAATTGCCATTATACGCGCGTATAATGGACTAT
TGTGTGCTGATA (SEQ ID NO: 20)

ATGCGCGCATCCATTATACGCGCGTATAATGGCGATAATACA
(SEQ ID NO: 21)

TAGTCACCTATTTTCAGCATACTACGCGCGTAGTATGCTGAAATA
GGTTACTG (SEQ ID NO: 22)

GGGATCCCGTTCCATACATACATGTATCCATGTGGCATACTATA
CGTATAGTATGCCGATGTTACATATGGTATCATTCGGGATCCCGTT
(SEQ ID NO: 23)

TACTAAATAAATATTATATATATAATTTTTTATTAGTA (SEQ ID
NO: 24)

【0108】 SEQ ID NO: 20至24之序列包含如上所述之完美反向重複序列，且另外包含來自相關生物體之側接序列。

【0109】 在某些實施例中，包含SEQ ID NO: 20之序列或其變體的原核端粒酶靶序列係與SEQ ID NO: 10之大腸桿菌N15 TelN原核端粒酶及其變體組合使用。

【0110】 在某些實施例中，包含SEQ ID NO: 21之序列或其變體的原核端粒酶靶序列係與SEQ ID NO: 6之克雷伯氏菌噬菌體Phi K02原核端粒酶及其變體組合使用。

【0111】 在某些實施例中，包含SEQ ID NO: 22之序列或其變體的原核端粒酶靶序列係與SEQ ID NO: 4之耶爾森氏菌噬菌體PY54原核端粒酶及其變體組合使用。

【0112】 在某些實施例中，包含SEQ ID NO: 23之序列或其變體的原核端粒酶靶序列係與SEQ ID NO: 8之弧菌噬菌體VP882原核端粒酶及其變體組合使用。

【0113】 在某些實施例中，包含SEQ ID NO: 24之序列或其變體的原核端粒酶靶序列係與伯氏疏螺旋體原核端粒酶組合使用。

【0114】 上述回文序列或原核端粒酶靶序列中之任一者的變體包括其同源物或突變體。突變體包括相對於天然序列之截短、取代或缺失。變體序列為當存在於DNA模板中時允許其藉由原核端粒酶之酶活性轉化為封閉的線性DNA的任何序列。此點很容易藉由使用針對所形成封閉的線性DNA之適當分析法來確定。可使用此項技術中描述之任何合適分析法。一個合適分析法實例描述於Deneke等人, PNAS 97:7721-7726, 2000 (以引用的方式併入本文)中。在某些實施例中，變體可允許原核端粒酶之

結合性及活性與天然序列觀察到的活性相當。

【0115】 本文所述之回文序列之變體的實例包括截短的回文序列，其保留完美的重複結構，且仍能夠允許形成封閉的線性DNA。

【0116】 在某些實施例中，變體原核端粒酶靶序列經修飾以使其不再保留完美的回文序列，其限制條件為其能夠充當原核端粒酶活性之受質。

【0117】 應理解，熟習此項技術者將能夠基於上述結構原理容易地鑑定適用於本發明之原核端粒酶靶序列。

【0118】 在某些實施例中，可使用上述分析篩選候選原核端粒酶靶序列促進封閉末端DNA形成的能力。

【0119】 下面列出可用於本發明之組合物及方法的某些例示性原核端粒酶序列。

【0120】 鹽單胞菌噬菌體phiHAP-1原核端粒酶核酸序列：

ATGAGCGGTG AGTCACGTAG AAAGGTCGAT TTAGCGGAAT TGATAGAGTG GTTGCTCAGC 60
GAGATCAAAG AGATCGACGC CGATGATGAG ATGCCACGTA AAGAGAAAAC CAAGCGCATG
120 GCGCGGCTGG CACGTAGCTT CAAAACGCGC CTGCATGATG ACAAGCGCCG
CAAGGATTCT 180 GAGCGGATCG CGGTCACGAC CTTTCGCCGC TACATGACAG
AAGCGCGCAA GCGGTGACT 240 GCGCAGAACT GGCGCCATCA CAGCTTCGAC
CAGCAGATCG AGCGGCTGGC CAGCCGCTAC 300 CCGGCTTATG CCAGCAAGCT
GGAAGCGCTC GGCAAGCTGA CCGATATCAG CGCCATTCGT 360 ATGGCCCACC
GCGAGCTGCT CGACCAGATC CGCAACGATG ACGACGCTTA TGAGGACATC 420
CGGGCGATGA AGCTGGACCA TGAAATCATG CGCCACCTGA CGTTGAGCTC TGCACAGAAA
480 AGCACGCTGG CTGAAGAGGC CAGCGAGACG CTGGAAGAGC GCGCGGTGAA
CACGGTCGAG 540 ATCAACTACC ACTGGTTGAT GGAGACGGTT TACGAGCTGC
TGAGTAACCG GGAGAGAATG 600 GTCGATGGGG AGTATCGCGG CTTTTTCAGT
TACCTAGCGC TTGGGCTGGC GCTGGCCACC 660 GGGCGTCGCT CGATCGAGGT
GCTGAAGACC GGACGGATCA CGAAGGTGGG CGAGTATGAG 720 CTGGAGTTCA
GCGGCCAGGC GAAAAAGCGC GGCGGCGTCG ACTATAGCGA GGCTTACCAC 780
ATTTATACCC TGGTGAAAGC TGACCTGGTG ATCGAAGCGT GGGATGAGCT TCGCTCGCTG
840 CCGGAAGCTG CTGAGCTGCA GGGCATGGAC AACAGCGATG TGAACCGCCG
CACGGCGAAG 900 ACGCTCAACA CGCTCACTAA GCGGATCTTT AACACGATG
AGCGCGTTTT CAAGGACAGC 960 CGGGCGATCT GGGCGCGGCT GGTGTTTGAG
CTGCACTTCT CGCGCGACAA GCGCTGGAAG 1020 AAAGTCACCG AGGACGTGTT
CTGGCGTGAG ATGCTGGGGC ATGAGGACAT GGATACACAG 1080 CGCAGCTACC
GCGCCTTTAA AATCGACTAC GACGAGCCGG ATCAAGCCGA CCAGGAAGAT 1140
TACGAACACG CTAGCCGCCT CGCCGCGCTG CAGGCGCTGG ACGGCCATGA GCAGCTTGAG
1200 AGCAGCGACG CCCAGGCGCG TGTGCATGCC TGGGTGAAAG CGCAGATCGA
GCAGGAGCCT 1260 GACGCGAAAA TTACGCAGTC TCTGATCAGC CGGGAGCTGG
GCGTTTATCG CCCTGCCATA 1320 AAAGCGTACC TGGAGCTGGC GCGAGAGGCG
CTCGACGCGC CGAACGTCGA TCTGGACAAG 1380 GTCGCGGCGG CAGTGCCGAA
GGAAGTAGCC GAGGCGAAGC CCCGGCTGAA CGCCCACCCA 1440 CAAGGGGATG
GCAGGTGGGT CGGGGTGGCT TCAATCAACG GGGTGGAAGT TGCACGGGTG 1500
GGCAACCAGG CAGGCCGAT CGAAGCGATG AAAGCGGCCT ATAAAGCGGC GGGTGGGCGC
1560 TGA 1563 (SEQ ID NO: 1)

【0121】 鹽單胞菌噬菌體phiHAP-1原核端粒酶胺基酸序列：

MSGESRRKVD LAELIEWLLS EIKEIDADDE MPRKEKTKRM ARLARSFKTR LHDDKRRKDS 60
ERIAVTTFRR YMTEARKAVT AQNWRHHSFD QQIERLASRY PAYASKLEAL GKLTDISAIR
120 MAHRELLDQI RNDDDAYEDI RAMKLDHEIM RHLTLSSAQK STLAESEASET
LEERAVNTVE 180 INYHWMETV YELLSNRERM VDGEYRGFFS YLALGLALAT
GRRSIEVLKT GRITKVGEYE 240 LEFSGQAKKR GGVDYSEAYH IYTLVKADLV
IEAWDELRLS PEAAELQGMD NSDVNRRTAK 300 TLNTLTKRIF NNDERVFKDS
RAIWARLVFE LHFSRDKRWK KVTEDVFWRE MLGHEDMDTQ 360 RSYRAFKIDY
DEPDQADQED YEHASRLAAL QALDGHEQLE SSDAQARVHA WVKAQIEQEP 420
DAKITQSLIS RELGVYRPAI KAYLELAREA LDAPNVLDK VAAAVPKEVA EAKPRLNAHP
480 QGDGRWVGVA SINGVEVARV GNQAGRIEAM KAAVKAAGGR 520 (SEQ ID NO: 2)

【0122】 耶爾森氏菌噬菌體PY54原核端粒酶核酸序列：
ATGAAAATCC ATTTTCGCGA TTTAGTTAGT GGTTTAGTTA AAGAGATCGA TGAAATAGAA 60
AAATCAGACC GGGCGCAGGG TGACAAAAC TCGCGTTATC AGGGCGCGGC CAGAAAGTTC
120 AAAAATGCCG TGTTTATGGA TAAACGGAAA TATCGCGGTA ACGGTATGAA
GAATAGAATA 180 TCGTTAACAA CATTTAATAA ATATTTAAGT CGAGCACGTT
CTCGGTTTGA AGAAAGGCTT 240 CACCATAGTT TTCCTCAATC TATAGCAACT
ATCTCAAATA AATATCCTGC ATTCAGCGAA 300 ATAATAAAAG ATCTGGATAA
TAGACCCGCT CATGAAGTTA GAATAAAAC TAAAGAATTA 360 ATAACTCATC
TTGAATCCGG TGTTAATTTA TTAGAAAAA TAGGTAGCTT AGGGAAAATA 420
AAACCATCTA CAGCTAAAAA AATAGTTAGC TTAAAAAAA TGTACCCATC ATGGGCTAAT
480 GATCTAGATA CTTTAATTAG TACTGAAGAT GCTACAGAAT TACAACAAAA
GTTAGAGCAA 540 GGGACCGACC TACTTAACGC ATTACATTCT CTAAAAGTAA
ACCATGAAGT TATGTATGCA 600 TTAACGATGC AGCCTTCTGA CAGAGCTGCA

TTAAAAGCTA GGCATGACGC TGCCCTTCAC 660 TTTAAAAAGC GTAACATCGT
ACCTATCGAT TATCCCGGCT ATATGCAACG AATGACGGAC 720 ATACTACATC
TTCCAGATAT AGCTTTTGAA GATTCGATGG CATCACTTGC CCCTTTAGCA 780
TTTGCTCTAG CAGCTGCTAG CGGTCGCAGA CAAATTGAAA TACTAATTAC TGGTGAGTTT
840 GACGCCAAAA ATAAAAGCAT CATTAAATTT TCTGGACAAG CAAAAAAAAG
AATGGCCGTT 900 TCAGGTGGAC ATTATGAAAT ATACAGTCTA ATTGACTCAG
AGCTATTCAT TCAACGGTTA 960 GAGTTTTTAC GTTCTCATAG CTCAATACTT
CGATTACAAA ATTTGGAAAT AGCACATGAT 1020 GAACATCGTA CTGAACTATC
TGTTATTAAC GGTTTTGTAG CCAAACCTTT AAATGATGCA 1080 GCAAAACAGT
TCTTTGTCGA TGACAGAAGA GTATTTAAAG ATACCCGTGC AATTTCGCT 1140
CGCATAGCAT ATGAAAAATG GTTTAGAACA GATCCTCGCT GGGCGAAGTG CGACGAAGAT
1200 GTTTTCTTCT CTGAATTATT AGGCCATGAC GACCCAGATA CTCAGCTGGC
ATATAAACAA 1260 TTCAAGCTGG TAAATTTCAA TCCAAAATGG ACACCTAATA
TATCAGATGA AAACCCTCGG 1320 TTAGCTGCAC TTCAAGAGCT TGACAATGAT
ATGCCCCGCC TAGCACGTGG CGATGCGGCA 1380 GTTCGCATAC ATGAGTGGGT
TAAAGAGCAA CTGGCGCAGA ACCCTGCGGC AAAAATAACT 1440 GCATACCAA
TCAAGAAAAA TTTAAATTGT CGAAATGACT TGGCCAGCCG ATACATGGCA 1500
TGGTGTGCTG ACGCGCTAGG GGTGTATTATT GGTGATGATG GACAGGCAAG GCCAGAAGAA
1560 CTCCCACCAT CGCTCGTGCT TGATATTAAC GCTGATGACA CTGACGCTGA
AGAAGATGAA 1620 ATAGAGGAAG ACTTTACTGA TGAGGAAATA GACGACACCG
AATTCGACGT ATCAGATAAC 1680 GCCAGTGATG AAGATAAGCC CGAAGATAAA
CCTCGCTTTG CAGCACCAAT TCGTAGAAGT 1740 GAGGACTCTT GGCTGATTAA
ATTTGAATTT GCTGGCAAGC AATATAGCTG GGAGGGTAAT 1800 GCCGAAAGTG
TTATCGATGC GATGAAACAA GCATGGACTG AAAATATGGA GTAA 1854 (SEQ ID NO:
3)

【0123】 耶爾森氏菌噬菌體PY54原核端粒酶胺基酸序列：

MKIHFRDLVS GLVKEIDEIE KSDRAQDKT RRYQGAARKF KNAVFMDKRK YRGNGMKNRI 60
SLTTFNKYLS RARSFEERL HHSFPQSIAT ISNKYPAFSE IIKDLNRP A HEVRIKLKEL
120 ITHLESGVNL LEKIGSLGKI KPSTAKKIVS LKKMYP SWAN DLDTLISTED
ATELQQKLEQ 180 GTDLLNALHS LKVNHEVMYA LTMQPSDRAA LKARHDAALH
FKKRNIVPID YPGYMQRMTD 240 ILHLPDIAFE DSMASLAPLA FALAAASGRR
QIEILITGEF DAKNKSIIKF SGQAKKRMV 300 SGGHYEIIYSL IDSELF IQRL
EFLRSHSSIL RLQNLEIAHD EHRTLSVIN GFVAKPLNDA 360 AKQFFVDDRR
VFKDTRAIYA RIAYEKWFRT DPRWAKCDED VFFSELLGHD DPDTQLAYKQ 420
FKLVNFPNPKW TPNISDENPR LAALQELDND MPGLARGDAA VRIHEWVKEQ LAQNPAAKIT
480 AYQIKKNLNC RNDLASRYMA WCADALGVVI GDDGQARPEE LPPSLVL DIN
ADDTDAEED 540 IEEDFTDEEI DDTEFDVSDN ASDEDKPEDK PRFAAPIRRS
EDSWLIKFEF AGKQYSWEGN 600 AESVIDAMKQ AWTENME 617 (SEQ ID NO: 4)

【0124】 克雷伯氏菌噬菌體phiKO2原核端粒酶核酸序列：

ATGCGTAAGG TGAAAATTGG TGAGCTAATC AATTCGCTTG TGAGCGAGGT CGAGGCAATC 60
GATGCCTCTG ATCGTCCGCA AGGCGATAAA ACGAAGAAAA TTAAAGCCGC AGCATTAAAA
120 TATAAGAATG CATTATTTAA TGACAAAAGA AAGTTTCGCG GTAAAGGTTT
AGAAAAAAGA 180 ATTTCTGCCA ACACGTTCAA CTCGTATATG AGTCGGGCAA
GGAAAAGATT TGATGATAGA 240 TTGCATCATA ACTTTGAAAA GAATGTAATT
AAACTATCAG AAAAATATCC TTTATATAGT 300 GAAGAATTAT CTTCGTGGCT
TTCTATGCCT GCGGCATCAA TTAGACAGCA TATGTCAAGA 360 TTGCAAGCCA
AGCTAAAAGA GATAATGCCA TTGGCAGAAG ACTTATCCAA TATAAAGATT 420
GGTACAAAAA ATAGCGAAGC AAAAATAAAT AAACGCTGCTA ATAAATATCC TGAATGGCAA
480 TTCGCTATTA GTGATTTAAA TAGCGAAGAT TGGAAGGATA AAAGAGATTA
TCTTTATAAA 540 CTATTCCAAC AAGGTTCTTC GTCCTGGAA GACTTGAATA
ACCTGAAAGT AAACCATGAG 600 GTTCTCTATC ATCTGCAGCT TAGTTCTGCC
GAGCGAACCT CTATCCAGCA GCGCTGGGCC 660 AACGTCCTCA GCGAGAAAAA
GCGCAACGTT GTCGTGATTG ACTATCCGCG CTATATGCAG 720 GCCATCTACG
ATATAATCAA CAAGCCTATA GTTTCGTTCG ATTTGACTACTCGTCGTGGT 780
ATGGCCCCGC TGGCGTTTCG CTTTGCCGCG CTATCTGGTC GCCGAATGAT TGAAATCATG
840 CTCCAGGGTG AATTTTCCGT CGCAGGTAAA TATACAGTAA CATTCCTGGG
GCAAGCTAAA 900 AAACGCTCGG AAGATAAAGG TATATCAAGG AAAATATATA
CCTTATGCGA CGCTACTTTA 960 TTTGTTAGTT TGGTAAATGA ACTTCGCTCA
TGCCCCGCTG CTGCGGATTT TGATGAAGTA 1020 ATAAAAGGAT ATGGCGAAAA
TGACACTCGC TCAGAAAATG GGCGTATTAA TGCAATTCTC 1080 GCTACAGCTT
TTAATCCGTG GGTAAAACT TTCTTAGGCG ATGACCGCCG CGTTTATAAA 1140
GATAGCCGCG CTATTTACGC CCGTATTGCC TATGAAATGT TCTTCCGCGT TGACCCTCGG
1200 TGGAAGAATG TTGATGAGGA TGTATTCTTC ATGGAGATTC TCGGCCATGA
CGATGAAAAC 1260 ACCCAACTGC ACTATAAGCA GTTTAAATTG GCTAACTTCT
CCAGAACATG GCGACCAAAT 1320 GTCGGCGAGG AGAATGCCCG CCTAGCGGCG
CTGCAAAAGC TGGATAGCAT GATGCCAGAT 1380 TTTGCCAGGG GCGACGCCGG
GGTTCGTATT CATGAGACCG TGAAGCAGCT GGTGGAGCAG 1440 GACCCATCGA
TAAAAATCAC AAACAGCACC CTGCGACCGT TTAACCTCAG TACCAGGCTG 1500
ATTCCTCGCT ACCTGGAGTT TGCCGCCGAT GCATTGGGCC AGTTCGTGCG TGAAAATGGG
1560 CAATGGCAAC TGAAGGATGA GGCGCCTGCA ATAGTCCTGC CTGATGAGGA
AATTCTTGAG 1620 CCTATGGACG ACGTCGATCT CGATGACGAA AACCATGATG
ATGAAACGCT GGATGACGAT 1680 GAGATCGAAG TGGACGAAAG CGAAGGAGAG
GAACTGGAGG AAGCGGGCGA CGCTGAAGAG 1740 GCCGAGGTGG CTGAACAGGA
AGAGAAGCAC CCTGGCAAGC CAAACTTTAA AGCGCCGAGG 1800 GATAATGGCG
ATGGTACCTA CATGGTGGAA TTTGAATTCG GTGGCCGTCA TTACGCCTGG 1860
TCCGGTGCCG CCGGTAATCG GGTAGAGGCA ATGCAATCTG CCTGGAGTGC CTACTTCAAG
1920 TGA 1923 (SEQ ID NO: 5)

【0125】 克雷伯氏菌噬菌體phiKO2原核端粒酶胺基酸序列：

MRKVKIGELI NSLVSEVEAI DASDRPQGD KTKIKAAALK YKNALFNDKR KFRGKGLEKR 60
ISANTFNSYM SRARKRFDDR LHHNFEKNVI KLSEKYPLYS EELSSWLSMP AASIRQHMSR
120 LQAKLKEIMP LAEDLSNIKI GTKNSEAKIN KLANKYPEWQ FAISDLNSED
WKDKRDYLYK 180 LFQQGSSLLE DLNNLKVNHE VLYHLQLSSA ERTSIQQRWA
NVLSEKKRNV VVIDYPRYMQ 240 AIYDIINKPI VSFDLTTRRG MAPLAFALAA
LSGRRMIEIM LQGEFSVAGK YTVTFLGQAK 300 KRSEDKGISR KIYTLCDATL
FVSLVNELRS CPAAADFDEV IKGYGENDTR SENGRIINAIL 360 ATAFNPWVKT
FLGDDRRVYK DSRAIYARIA YEMFFRVDPR WKNVDEDVFF MEILGHDDEN 420
TQLHYKQFKL ANFSRTWRPN VGEENARLAA LQKLDSMMPD FARGDAGVRI HETVKQLVEQ
480 DPSIKITNST LRPFNFSTRL IPRYLEFAAD ALGQFVGENG QWQLKDEAPA
IVLPDEEILE 540 PMDDVDLDDE NHDDETLDDD EIEVDESEGE ELEEAGDAEE
AEVAEQEEKH PGKPNFKAPR 600 DNGDGTVMVE FEFGRHYAW SGAAGNRVEA
MQSAWSAYFK 640 (SEQ ID NO: 6)

【0126】 弧菌噬菌體VP882原核端粒酶核酸序列：

ATGAGCGGCG AAAGTAGACA AAAGGTAAAC CTCGAGGAGT TAATAAATGA GCTCGTCGAG 60
GAGGTGAAAA CCATCGATGA CAATGAGGCG ATTACTCGGT CTGAAAAAAC CAAGTTGATC
120 ACCAGGGCGG CGACTAAATT CAAGACCAAG CTGCACGACG ATAAGCGCCG
GAAGGATGCG 180 ACCAGAATCG CTCTGAGCAC CTATCGTAAG TACATGACAA
TGGCCAGGGC AGCAGTTACT 240 GAGCAGAACT GGAAACACCA CAGTCTCGAG
CAGCAGATAG AGCGGCTGGC CAAAAGCAC 300 CCGCAATACG CTGAGCAGCT
GGTGGCCATC GGGGCCATGG ATAACATCAC CGAGTTGCGC 360 CTGGCGCATC
GCGACCTCCT GAAGAGCATC AAGGACAACG ATGAAGCCTT CGAGGATATC 420
CGCAGCATGA AGTTAGACCA CGAGGTAATG CGCCATCTGA CGCTACCCAG TGCGCAAAAG
480 GCGAGACTGG CAGAGGAAGC CGCCGAGGCG TTGACCGAGA AGAAAACCGC
CACGGTCGAC 540 ATCAACTATC ACGAGCTGAT GGCCGGCGTG GTGGAGCTGT
TGACCAAGAA GACCAAGACG 600 GTCGGCAGCG ACAGCACCTA CAGCTTCAGC
CGGCTGGCGC TTGGTATTGG CCTGGCTACC 660 GGTCGTCGTT CTATCGAGAT
ACTGAAGCAG GCGGAGTTCA AAAAGGTGGA TGAGCAGCGG 720 CTCGAGTTCT
CTGGCCAAGC GAAAAGCGC GGCGGTGCCG ACTATTCAGA GACCTATACC 780
ATTTACACCC TGGTCGACTC CGACCTGGTA CTGATGGCGC TGAAGAACCT GCGAGAGTTG
840 CCAGAAGTTC GCGCACTGGA TGAGTACGAC CAACTGGGCG AGATTAAGCG
GAACGACGCC 900 ATCAATAAAC GCTGTGCAAA AACGCTCAAC CAAACCGCCA

AGCAGTTCTT TGGCAGCGAC 960 GAGCGCGTGT TCAAAGATAG TCGTGCCATC
TGGGCGCGTC TGGCTTATGA GTTGTTTTTT 1020 CAACGTGATC CGCGCTGGAA
AAAGAAAGAC GAGGACGTTT TCTGGCAGGA GATGCTGGGC 1080 CACGAGGACA
TCGAGACTCA GAAAGCCTAT AAGCAATTCA AGGTCGACTA CAGCGAACCT 1140
GAGCAGCCGG TGCACAAGCC TGGCAAATTT AAGAGCAGAG CTGAAGCCCT CGCGGCGCTC
1200 GACTCAAATG AGGACATTAC CACCCGCTCA TCCATGGCCA AGATCCACGA
CTGGGTGAAA 1260 GAGCGTATTG CGGAAGACCC CGAGGCGAAC ATCACACAGT
CACTCATCAC CCGGGAAGT 1320 GGCTCAGGCC GTAAGGTGAT CAAGGACTAC
CTCGACCTGG CTGACGATGC CCTTGCTGTG 1380 GTGAATACTC CTGTCGATGA
CGCAGTCGTC GAGGTTCCAG CTGATGTGCC GGCAGCAGAA 1440 AAACAGCCGA
AGAAAGCGCA GAAGCCCAGA CTCGTGGCTC ACCAGGTTGA TGATGAGCAC 1500
TGGGAAGCCT GGGCGCTGGT GGAAGGCGAG GAGGTGGCCA GGGTGAAAAT CAAGGGCACC
1560 CGCGTTGAGG CAATGACAGC CGCATGGGAG GCCAGCCAAA AGGCACTCGA TGAATAA
1617 (SEQ ID NO: 7)

【0127】 弧菌噬菌體VP882原核端粒酶胺基酸序列：

MSGESRQKVN LEELINELVE EVKTIDDNEA ITRSEKTKLI TRAATKFKTK LHDDKRRKDA 60
TRIALSTYRK YMTMARAATV EQNWKHHSLE QQIERLAKKH PQYAEQLVAI GAMDNITELR
120 LAHRDLLKSI KDNDEAFEDI RSMKLDHEVM RHLTLPSAQK ARLAEEAAEA
LTEKKTATVD 180 INYHELMAGV VELLTKKTKT VGSDSTYSFS RLALGIGLAT
GRRSIEILKQ GEFKKVDEQR 240 LEFSGQAKKR GGADYSETYT IYTLVDSDLV
LMALKNLREL PEVRALDEYD QLGEIKRND 300 INKRC AKTLN QTAKQFFGSD
ERVFKDSRAI WARLAYELFF QRDPRWKKKD EDVFWQEMLG 360 HEDIETQKAY
KQFKVDYSEP EQPVHKPGKF KSRAEALAL DSNEDITTRS SMAKIHDWVK 420
ERIAEDPEAN ITQSLITREL GSGRKVIKDY LDLADDALAV VNTPVDDAVV EVPADVPAE
480 KQPKKAQKPR LVAHQVDDEH WEAWALVEGE EVARVKIKGT RVEAMTAAWE ASQKALDD
538 (SEQ ID NO: 8)

【0128】 大腸桿菌噬菌體N15端粒酶(telN)及二級免疫阻遏物(cA)核
酸序列：

CATATGCACT ATATCATATC TCAATTACGG AACATATCAG CACACAATTG CCCATTATAC 60
GCGCGTATAA TGGACTATTG TGTGCTGATA AGGAGAACAT AAGCGCAGAA CAATATGTAT
120 CTATTCCGGT GTTGTGTTCC TTTGTTATTC TGCTATTATG TTCTCTTATA
GTGTGACGAA 180 AGCAGCATAA TTAATCGTCA CTTGTTCTTT GATTGTGTTA
CGATATCCAG AGACTTAGAA 240 ACGGGGGAAC CGGGATGAGC AAGGTAAAAA
TCGGTGAGTT GATCAACACG CTTGTGAATG 300 AGGTAGAGGC AATTGATGCC
TCAGACCGCC CACAAGGCGA CAAAACGAAG AGAATTAAAG 360 CCGCAGCCGC
ACGGTATAAG AACGCGTTAT TTAATGATAA AAGAAAGTTC CGTGGGAAAG 420

GATTGCAGAA AAGAATAACC GCGAATACTT TTAACGCCTA TATGAGCAGG GCAAGAAAGC
480 GGTTTGATGA TAAATTACAT CATAGCTTTG ATAAAAATAT TAATAAATTA
TCGGAAGAGT 540 ATCCTCTTTA CAGCGAAGAA TTATCTTCAT GGCTTTCTAT
GCCTACGGCT AATATTCGCC 600 AGCACATGTC ATCGTTACAA TCTAAATTGA
AAGAAATAAT GCCGCTTGCC GAAGAGTTAT 660 CAAATGTAAG AATAGGCTCT
AAAGGCAGTG ATGCAAAAAT AGCAAGACTA ATAAAAAAT 720 ATCCAGATTG
GAGTTTTGCT CTTAGTGATT TAAACAGTGA TGATTGGAAG GAGCGCCGTG 780
ACTATCTTTA TAAGTTATTC CAACAAGGCT CTGCGTTGTT AGAAGAACTA CACCAGCTCA
840 AGGTCAACCA TGAGGTTCTG TACCATCTGC AGCTAAGCCC TCGGAGCGT
ACATCTATAC 900 AGCAACGATG GGCCGATGTT CTGCGCGAGA AGAAGCGTAA
TGTTGTGGTT ATTGACTACC 960 CAACATACAT GCAGTCTATC TATGATATTT
TGAATAATCC TGCGACTTTA TTTAGTTTAA 1020 ACACTCGTTC TGGAATGGCA
CCTTTGGCCT TTGCTCTGGC TGCGGTATCA GGGCGAAGAA 1080 TGATTGAGAT
AATGTTTCAG GGTGAATTTG CCGTTTCAGG AAAGTATACG GTTAATTTCT 1140
CAGGGCAAGC TAAAAAACGC TCTGAAGATA AAAGCGTAAC CAGAACGATT TATACTTTAT
1200 GCGAAGCAAA ATTATTCGTT GAATTATTAA CAGAATTGCG TTCTTGCTCT
GCTGCATCTG 1260 ATTTGATGA GGTGTGTTAA GGATATGGAA AGGATGATAC
AAGGTCTGAG AACGGCAGGA 1320 TAAATGCTAT TTTAGCAAAA GCATTTAACC
CTTGGGTAA ATCATTTTTT GCGCATGACC 1380 GTCGTGTTTA TAAAGATAGC
CGCGCTATTT ACGCTCGCAT CGCTTATGAG ATGTTCTTCC 1440 GCGTCGATCC
ACGGTGAAAA AACGTCGACG AGGATGTGTT CTTTATGGAG ATTCTCGGAC 1500
ACGACGATGA GAACACCCAG CTGCACTATA AGCAGTTCAA GCTGGCCAAC TTCTCCAGAA
1560 CCTGGCGACC TGAAGTTGGG GATGAAAACA CCAGGCTGGT GGCTCTGCAG
AAACTGGACG 1620 ATGAAATGCC AGGCTTTGCC AGAGGTGACG CTGGCGTCCG
TCTCCATGAA ACCGTTAAGC 1680 AGCTGGTGGA GCAGGACCCA TCAGCAAAAA
TAACCAACAG CACTCTCCGG GCCTTTAAAT 1740 TTAGCCCGAC GATGATTAGC
CGGTACCTGG AGTTTGCCGC TGATGCATTG GGGCAGTTTCG 1800 TTGGCGAGAA
CGGGCAGTGG CAGCTGAAGA TAGAGACACC TGCAATCGTC CTGCCTGATG 1860
AAGAATCCGT TGAGACCATC GACGAACCGG ATGATGAGTC CCAAGACGAC GAGCTGGATG
1920 AAGATGAAAT TGAGCTCGAC GAGGGTGGCG GCGATGAACC AACCGAAGAG
GAAGGGCCAG 1980 AAGAACATCA GCCAACTGCT CTAAAACCCG TCTTCAAGCC
TGCAAAAAAT AACGGGGACG 2040 GAACGTACAA GATAGAGTTT GAATACGATG
GAAAGCATTA TGCCTGGTCC GGCCCCGCCG 2100 ATAGCCCTAT GGCCGCAATG
CGATCCGCAT GGGAAACGTA CTACAGCTAA AAGAAAAGCC 2160 ACCGGTGTTA
ATCGGTGGCT TTTTTATTGA GGCCTGTCCC TACCCATCCC CTGCAAGGGA 2220
CGGAAGGATT AGGCGGAAAC TGCAGCTGCA ACTACGGACA TCGCCGTCCC GACTGCAGGG
2280 ACTTCCCCGC GTAAAGCGGG GCTTAAATTC GGGCTGGCCA ACCCTATTTT

TCTGCAATCG 2340 CTGGCGATGT TAGTTTCGTG GATAGCGTTT CCAGCTTTTC
AATGGCCAGC TCAAAATGTG 2400 CTGGCAGCAC CTTCTCCAGT TCCGTATCAA
TATCGGTGAT CGGCAGCTCT CCACAAGACA 2460 TACTCCGGCG ACCGCCACGA
ACTACATCGC GCAGCAGCTC CCGTTCGTAG ACACGCATGT 2520 TGCCCAGAGC
CGTTTCTGCA GCCGTTAATA TCCGGCGCAC GTCGGCGATG ATTGCCGGGA 2580
GATCATCCAC GGTTATTGGG TTCGGTGATG GGTTCTTGCA GGCGCGGCGG AGAGCCATCC
2640 AGACGCCGCT AACCCATGCG TTACGGTACT GAAAACTTTG TGCTATGTGC
TTTATCAGGC 2700 CCGAAGTTCT TCTTTCTGCC GCCAGTCCAG TGGTTCACCG
GCGTTCTTAG GCTCAGGCTC 2760 GACAAAAGCA TACTCGCCGT TTTTCCGGAT
AGCTGGCAGA ACCTCGTTTCG TCACCCACTT 2820 GCGGAACCGC CAGGCTGTGC
TCCCCTGTTT CACCGCGTCG CGGCAGCGGA GGATTATGGT 2880 GTAGAGACCA
GATTCCGATA CCACATTTAC TTCCCTGGCC ATCCGATCAA GTTTTTGTGC 2940
CTCGGTTAAA CCGAGGGTCA ATTTTTCATC ATGATCCAGC TTACGCAATG CATCAGAAGG
3000 GTTGGCTATA TTCAATGCAG CACAGATATC CAGCGCCACA AACCACGGGT
CACCACCGAC 3060 AAGAACCACC CGTATAGGGT GGCTTTCCTG AAATGAAAAG
ACGGAGAGAG CCTTCATTGC 3120 GCCTCCCCGG ATTTTCAGCTG CTCAGAAAGG
GACAGGGAGC AGCCGCGAGC TTCCTGCGTG 3180 AGTTCGCGCG CGACCTGCAG
AAGTTCGCA GCTTCCTGCA AATACAGCGT GGCCTCATAA 3240 CTGGAGATAG
TGCGGTGAGC AGAGCCCACA AGCGCTTCAA CCTGCAGCAG GCGTTCCTCA 3300
ATCGTCTCCA GCAGGCCCTG GCGGTTTAAAC TGAATCTGGT TCATGCGATC ACCTCGCTGA
3360 CCGGGATACG GGCTGACAGA ACGAGGACAA AACGGCTGGC GAACTGGCGA
CGAGCTTCTC 3420 GCTCGGATGA TGCAATGGTG GAAAGGCGGT GGATATGGGA
TTTTTTGTCC GTGCGGACGA 3480 CAGCTGCAAA TTTGAATTTG AACATGGTAT
GCATTCTAT CTTGTATAGG GTGCTACCAC 3540 CAGAGTTGAG AATCTCTATA
GGGGTGGTAG CCCAGACAGG GTTCTCAACA CCGGTACAAG 3600 AAGAAACCGG
CCCAACCGAA GTTGGCCCCA TCTGAGCCAC CATAATTCAG GTATGCGCAG 3660
ATTTAACACA CAAAAAACA CGCTGGCGCG TGTGTGCGC TTCTTGTCAT TCGGGGTTGA
3720 GAGGCCCGGC TGCAGATTTT GCTGCAGCGG GGTAACCTA CCGCCAAAGC
AGAACGCACG 3780 TCAATAATTT AGGTGGATAT TTTACCCCGT GACCAGTCAC
GTGCACAGGT GTTTTTATAG 3840 TTTGCTTTAC TGA CTGATCA GAACCTGATC
AGTTATTGGA GTCCGTAAT CTTATTGATG 3900 ACCGCAGCCA CCTTAGATGT
TGTCTCAAAC CCCATACGGC CACGAATGAG CCACTGGAAC 3960 GGAATAGTCA
GCAGGTACAG CGGAACGAAC CACAAACGGT TCAGACGCTG CCAGAACGTC 4020
GCATCACGAC GTTCCATCCA TTCGGTATTG TCGAC 4055 (SEQ ID NO: 9)

【0129】 大腸桿菌噬菌體N15端粒酶胺基酸序列：

MSKVKIGELI NTLVNEVEAI DASDRPQGDK TKRIKAAAR YKNALFNDKR KFRGKGLQKR 60
ITANTFNAYM SRARKRFDDK LHHSFDKNIN KLSEKYPLYS EELSSWLSMP TANIRQHMSS

120 LQSKLKEIMP LAEELSNVRI GSKGSDAKIA RLIKKYPDWS FALSDLNSDD
WKERRDYLYK 180 LFQQGSALLE ELHQLKVNHE VLYHLQLSPA ERTSIQQRWA
DVLREKKRNV VVIDYPTYMQ 240 SIYDILNNPA TLFSLNTRSG MAPLAFALAA
VSGRRMIEIM FQGEFAVSGK YTVNFSGQAK 300 KRSEDKSVTR TIYTLCEAKL
FVELLTELRS CSAASDFDEV VKGYGKDDTR SENGRIINAIL 360 AKAFNPWVKS
FFGDDRRVYK DSRAIYARIA YEMFFRVDPR WKNVDEDVFF MEILGHDDEN 420
TQLHYKQFKL ANFSRTWRPE VGDENTRLVA LQKLDDDEMPG FARGDAGVRL HETVKQLVEQ
480 DPSAKITNST LRAFKFSPTM ISRYLEFAAD ALGQFVGENG QWQLKIETPA
IVLPDEESVE 540 TIDEPDESQ DDELDEDEIE LDEGGGDEPT EEEGPPEHQ
TALKPVFKPA KNNGDGTYKI 600 EFEYDGKHYA WSGPADSPMA AMRSAWETYY S 631
(SEQ ID NO: 10)

【0130】 擴增之DNA構築體可在促進封閉cdsDNA產生的條件下與至少一種原核端粒酶一起培育。促進dsDNA裂解及重新連接之條件包含原核端粒酶靶序列，以形成具有髮夾末端之共價封閉的末端DNA。促進封閉末端DNA產生之條件包含使用允許產生封閉末端DNA之任何溫度，通常在20至90℃之範圍內。溫度可在25至40℃之範圍內，諸如約25至約35℃，或約30℃。可根據上文關於DNA聚合酶之溫度條件概述的原理選擇特定原核端粒酶的適當溫度。與SEQ ID NO: 10之大腸桿菌噬菌體TelN原核端粒酶一起使用的適合溫度為約25至約35℃，諸如約30℃。

【0131】 促進封閉末端DNA產生之條件亦包含存在原核端粒酶及適合之緩衝劑/pH及酶效能或穩定性所需之其他因素。適合之條件包括用於提供此項技術中已知的原核端粒酶活性的任何條件。舉例而言，在使用大腸桿菌噬菌體TelN原核端粒酶之情況下，適合之緩衝液可為20 mM TrisHCl，pH 7.6；5 mM CaCl2；50 mM麩胺酸鉀；0.1 mM EDTA；1 mM二硫蘇糖醇(DTT)。維持最佳活性及穩定性之藥劑及條件亦可選自關於DNA聚合酶所列之藥劑及條件。

【0132】 用於本發明方法之所有酶及蛋白質可例如在細菌中重組產生。可使用熟習此項技術者已知的任何允許重組表現的方式。可將包含編

碼所關注蛋白質之核酸序列的質體或其他形式之表現載體引入細菌中，以使其表現所編碼之蛋白質。舉例而言，對於SEQ ID NO: 2、4、6、8或10之表現，載體可分別包含SEQ ID NO: 1、3、5、7或9之序列。所表現之蛋白質隨後通常例如藉由使用足量的親和標籤來純化，且以適用於本發明方法之形式提供。用於重組蛋白生產之此類方法為熟習此項技術者基於其一般知識常規可用的。以上論述適用於提供本文所論述之任何蛋白質。

【0133】 在某些實施例中，擴增之DNA在與原核端粒酶接觸之前經純化。因此，本發明之方法可進一步包含純化擴增之DNA的步驟。在某些實施例中，擴增之DNA在與原核端粒酶接觸之前未經純化。在一些實施例中，該方法包含添加提供原核端粒酶活性之緩衝液，亦即提供促進封閉末端DNA形成之條件。

【0134】

5. DNA 構築體

本發明之DNA構築體可包含不止一種原核端粒酶靶序列，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多種原核端粒酶靶序列。多種原核端粒酶靶序列允許自較大的DNA分子(諸如質體或自我複製的染色體外基因元件)切除各自包含所關注之DNA片段的短封閉末端DNA。舉例而言，一或多個嵌段，各自包含側接其自身的一對末端序列的所關注之DNA片段，可各在任一側(末端序列之外)進一步側接原核端粒酶靶序列。可在兩個相鄰嵌段之間共享相同的原核端粒酶靶序列。兩個側接原核端粒酶序列可隨後介導自擴增之較大DNA分子切除各嵌段作為封閉末端DNA，經受原核端粒酶之作用。

【0135】 在一個實施例中，DNA構築體包含具有所關注之DNA片

段(諸如表現卡匣)的嵌段，其在任一側側接原核端粒酶靶序列。在一個實施例中，所關注之DNA片段(例如表現卡匣)可包含可操作地連接於所關注之編碼序列的真核啟動子及視情況選用之真核轉錄終止序列。在此實施例中，在擴增DNA構築體且與原核端粒酶接觸後，所關注之DNA片段(例如表現卡匣)作為封閉末端DNA自擴增的DNA構築體釋放。

【0136】 由於原核端粒酶消化，DNA構築體中之其他序列同時缺失。此類序列通常為細菌或載體序列，其可包括細菌複製起點、細菌選擇標記(例如抗生素抗性基因)及未甲基化之CpG二核苷酸。此類序列之缺失產生「最小的」所關注之DNA片段(例如表現卡匣)，其不含外來基因物質。

【0137】 在一些實施例中，尤其在封閉末端DNA產物為DNA疫苗時，CpG基元可保留在產物之序列中。

【0138】 因此，本發明之一個態樣提供用於生產醫藥組合物之活體外方法，該醫藥組合物包含側接末端序列之封閉末端雙股DNA。此方法包含：a)在宿主細胞(例如真核或原核宿主細胞)中擴增DNA構築體，其包含側接一對末端序列(諸如在宿主細胞之生命週期中促進cdsDNA穩定性之ITR、LTR或端粒序列)且進一步側接一對原核端粒酶靶序列的至少一種所關注之DNA片段(例如表現卡匣)；及b)在促進該對原核端粒酶靶序列裂解之條件下，使a)中產生的擴增之DNA構築體與一或多個特異性針對該對原核端粒酶靶序列之原核端粒酶接觸，以形成包含所關注之DNA片段的封閉末端雙股DNA。

【0139】 在某些實施例中，cdsDNA包含以下、由以下組成或基本上由以下組成：可操作地連接於所關注之編碼序列的真核啟動子及視情況

選用之真核轉錄終止序列，其全部側接一對末端序列。

【0140】 在某些實施例中，**cdsDNA**缺乏細菌或載體序列，諸如(i)細菌複製起點；(ii)細菌選擇標記(通常為抗生素抗性基因)；及(iii)未甲基化之**CpG**基元。

【0141】 所關注之**DNA**片段可包含**DNA**疫苗，或編碼可校正靶細胞缺陷之基因產物的治療性**DNA**分子。

【0142】 **DNA**構築體可呈質體或通常用於容納細菌繁殖基因之其他載體的形式，包括任何商業上可獲得的質體或其他載體，諸如商業上可獲得的**DNA**藥品，其經工程改造以包括側接末端序列及原核端粒酶識別序列。

【0143】 在某些實施例中，**DNA**構築體不含滾環擴增(RCA)所需之任何序列元件。

【0144】

6. 醫藥調配物及遞送

在藉由原核端粒酶之作用產生**cdsDNA**後，本發明之方法可進一步包含純化**cdsDNA**產物之步驟。

【0145】 在某些實施例中，純化移除不需要的副產物或雜質或兩者。

【0146】 純化可藉由此項技術中已知的任何適合之方式來進行。舉例而言，純化可包括苯酚/氯仿核酸提取，或使用選擇性結合核酸之管柱，諸如可自Qiagen購得之彼等管柱。熟習此項技術者可常規地鑑定用於分離**DNA**之適合的純化技術。

【0147】 一旦已產生且純化足夠量的**cdsDNA**，該方法可進一步包

含其作為DNA組合物之調配物，例如治療性DNA組合物或包含c_{ds}DNA之醫藥組合物。

【0148】 治療性DNA組合物包含上文提及之類型的治療性DNA分子，例如包含治療功能的所關注之DNA片段，其側接一對末端序列，且進一步側接一對原核端粒酶半識別序列。一旦c_{ds}DNA（例如治療性DNA分子）在靶細胞內遞送，尤其當c_{ds}DNA作為未整合至宿主細胞基因組/染色體中之染色體外基因元件存在時，末端序列可用以防止DNA分解。此類組合物將包含治療有效量之所關注之DNA片段，其呈適用於藉由所需途徑投與之形式，例如氣溶膠、可注射組成物或適用於非經腸(*i.v.*、*i.m.*等)、經口、黏膜或局部投藥之調配物。

【0149】 可使用熟習此項技術者可用之標準醫藥調配物化學及方法將DNA調配為習知醫藥製劑。可使用任何適合之醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、pH緩衝物質及其類似物，可存在於賦形劑或媒劑中。此等賦形劑、媒劑及輔助物質一般為醫藥劑，其可投與而無過度毒性，且在疫苗組合物之情況下，在接收組合物之個體中不會誘導免疫反應。適合之載劑可為脂質體。

【0150】 醫藥學上可接受之賦形劑包括但不限於液體，諸如水、鹽水、聚乙二醇、玻尿酸、甘油及乙醇。

【0151】 醫藥學上可接受之鹽亦可包括於其中，例如無機酸鹽，諸如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、磷酸鹽、硫酸鹽及其類似物；及有機酸鹽，諸如乙酸鹽、丙酸鹽、丙二酸鹽、苯甲酸鹽及其類似物。

【0152】 在某些實施例中，製劑亦含有醫藥學上可接受之賦形劑，其充當尤其肽、蛋白質或其他類似分子(若其包括於組合物中)之穩定劑。

亦充當肽穩定劑之適合載劑的實例包括但不限於醫藥級右旋糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、葡聚糖及其類似物。其他適合之載劑包括但不限於澱粉、纖維素、磷酸鈉或磷酸鈣、檸檬酸、酒石酸、甘胺酸、高分子量聚乙二醇(PEG)及其組合。醫藥學上可接受之賦形劑、媒劑及輔助物質之透徹論述可在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)中獲得，其以引用的方式併入本文中。

【0153】 可使用非病毒遞送系統將主題cDsDNA遞送至任何所關注之靶細胞。非病毒基因遞送系統係基於藉由DNA或RNA之帶負電荷磷酸骨架與陽離子脂質、肽或其他聚合物之間的靜電相互作用將基因物質壓縮成奈米粒子(Erbacher等人, *Gene Therapy* 6:138-145, 1999)。與病毒相反，使用包括脂質之非病毒轉染載體可導致較低的毒性，尤其較低的免疫原性、更高的安全性、降低的成本、合理有效的靶向性及增強的封裝能力，例如處理核酸材料之大片段的能力。

【0154】 在某些實施例中，主題cDsDNA係使用任何適合之非病毒基因療法載體來遞送，諸如Yin等人, *Non-viral vectors for gene-based therapy. Nature reviews Genetics*, 15:541-555, 2014；或Schroeder等人, *Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. J Intern Med.* 267:9-21, 2010；或Zhao及Huang, *Lipid nanoparticles for gene delivery. Adv Genet.* 88: 13-36, 2014(全部以引用的方式併入本文中)中所述之彼等非病毒基因療法載體。

【0155】 在某些實施例中，cDsDNA係使用脂複合體遞送用於基於脂質之核酸複合物(參見Feigner等人, *Human Gene Therapy* 8:511-512,

1997，以引用的方式併入)。術語「LPD」為脂多聚複合體之一種形式，代表包含脂質、整合素(或其他受體)結合肽及DNA (或其他核酸)之調配物。LPD複合物經由整合素介導或其他受體介導之途徑實現轉染。其不一定需要具有總體正電荷，因此可減少不期望的血清相互作用。LPD之肽組分提供核酸封裝功能，保護DNA或RNA免於細胞內或細胞外核內體或以其他方式降解。脂質組分藉由膜融合或滲透介導與核內體脂質雙層之相互作用，減少核內體或溶酶體降解且允許核酸負荷物運輸至細胞質。

【0156】 在某些實施例中，肽組分設計為細胞類型特異性或細胞表面受體特異性的。舉例而言，整合素或其他受體之特異性程度可賦予LPD複合物一定程度的細胞特異性。特異性由靶向細胞表面受體(例如整合素受體)產生，且可實現與一些腺病毒載體相當之轉染效率。(參見Du等人, The role of the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations. *Sci Rep.* 4:7107, 2014 ; Welser等人, Gene delivery using ternary lipopolyplexes incorporating branched cationic peptides: the role of Peptide sequence and branching. *Mol Pharm.* 10:127-41, 2013 ; Meng等人, Inhibition of neointimal hyperplasia in a rabbit vein graft model following non-viral transfection with human iNOS cDNA. *Gene Ther.* 20:979-86, 2013 ; Manunta等人, Airway deposition of nebulized gene delivery nanocomplexes monitored by radioimaging agents. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 49:471-80, 2013 ; Kenny等人, Multifunctional receptor-targeted nanocomplexes for the delivery of therapeutic nucleic acids to the Brain. *Biomaterials.* 34:9190-200, 2013 ; Tagalakakis等人, Receptor-targeted liposome -peptide

nanocomplexes for siRNA delivery. *Biomaterials*. 32:6302-15, 2011 ; Tagalakakis等 人, Integrin-targeted nanocomplexes for tumor specific delivery and therapy by systemic administration. *Biomaterials*. 32: 1370-6, 2011 ; Manunta等 人, Nebulisation of receptor-targeted nanocomplexes for gene delivery to the airway epithelium. *PLoS One*. 6:e26768, 2011 ; Grosse等 人, Tumor-specific gene transfer with receptor-mediated nanocomplexes modified by polyethylene glycol shielding and endosomally cleavable lipid and peptide linkers. *F ASEB J*. 24:2301-13, 2010)。

【0157】 在某些實施例中，非病毒遞送包含靶向人類氣管上皮細胞之肽。參見WO02/072616 (以引用的方式併入)。

【0158】 在某些實施例中，非病毒遞送包含靶向樹突狀細胞之肽。參見WO2004/108938 (以引用的方式併入)。

【0159】 在某些實施例中，非病毒遞送為脂質/肽載體，其以高效率及低毒性轉染一系列細胞株及初級細胞培養物，包括上皮細胞(40%效率)、血管平滑肌細胞(50%效率)、內皮細胞(30%效率)、造血細胞(10%效率)、小鼠支氣管上皮細胞(參見Manunta等人, Nebulisation of receptor-targeted nanocomplexes for gene delivery to the airway epithelium. *PLoS One*. 2011;6:e26768 ; Tagalakakis等 人, A receptor-targeted nanocomplex vector system optimized for respiratory gene transfer. *Mol Ther*. 2008; 16:907-15 ; Jenkins等 人, Formation of LID vector complexes in water alters physicochemical properties and enhances pulmonary gene expression *in vivo*, *Gene Therapy* 2003, 10, 1026-34) 、

大鼠肺(Jenkins等人, An integrin-targeted non-viral vector for pulmonary gene therapy, Gene Therapy 2000, 7, 393-400)及豬肺(Manunta等人, Airway deposition of nebulized gene delivery nanocomplexes monitored by radioimaging agents. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013;49:471-80 ; Cunningham等人, Evaluation of a porcine model for pulmonary gene transfer using a novel synthetic vector, J Gene Med 2002, 4, 438-46) , 效率與腺病毒載體相當(Jenkins等人, 2000, 如上所述)。

【0160】 在某些實施例中，用於此類LPD複合物或脂質/肽複合物之肽具有兩種功能：含有細胞表面受體(例如整合素)識別序列之「頭端」及可非共價結合DNA之「尾部」。在某些實施例中，肽之此兩種組分經由間隔子以不干擾其各自功能之方式共價連接。在某些實施例中，肽具有「尾部」，其為聚陽離子核酸結合組分，諸如WO96/15811中所述之肽。

【0161】 在某些實施例中，LPD複合物之脂質組分為Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987及US 5,264,618 (兩者均以引用的方式併入)中報導之陽離子脂質。商標為「Lipofectin」之市售陽離子脂質體，其由細胞轉染素、DOTMA 1及中性脂質DOPE 2以1:1之比率組成，為此類脂質之一個實例。

【0162】 在某些實施例中，陽離子脂質體調配物組合合成的陽離子細胞轉染素及中性脂質。舉例而言，一些基於甘油骨架(諸如DOTMA)或膽固醇，諸如DC-Chol 3。

【0163】 在某些實施例中，主題cDNA調配於脂質奈米粒子(LNP)中，諸如SNALP (穩定核酸-脂質粒子)。此類脂質奈米粒子通常包含一或多種可電離脂質、磷脂、膽固醇及PEG-脂質作為包含在核酸(諸如RNAi

劑(siRNA、miRNA、shRNA)、反義寡核苷酸(ASO)、CRISPR/Cas系統組分(諸如編碼Cas9酶之核酸及sgRNA)、治療性mRNA、基因疫苗或傳統DNA載體諸如質體)內之載劑材料。

【0164】 在某些實施例中，主題c_{ds}DNA調配於脂質體中，該等脂質體通常包含一或多種磷脂、膽固醇及PEG-脂質作為包含在核酸(諸如上述核酸)內之載劑材料。

【0165】 在某些實施例中，主題c_{ds}DNA調配於基於聚合物之奈米粒子(NP)中，其通常包含一或多種聚丙交酯(例如PLGA)、嵌段共聚物(諸如PEG-b-PLGA)及多糖(諸如聚葡萄糖胺糖及纖維素)作為包含在核酸(諸如上述核酸)內之載劑材料。

【0166】 下文舉例說明某些特定類型之LNP、脂質體及聚合物NP。

【0167】

SNALP

在某些實施例中，主題c_{ds}DNA調配於SNALP (穩定核酸-脂質粒子)中，其為具有非層狀結構之穩定脂質粒子。SNALP包含可電離之脂質、屏蔽脂質(例如聚乙二醇(PEG))、膽固醇及內源性或外源性靶向配體，諸如ApoE脂蛋白。其為在生理pH下中性帶電且藉由PEG穩定之單層(單脂質雙層)脂質體，其將核酸囊封在SNALP內(諸如c_{ds}DNA)。SNALP適用於遞送至各種組織及細胞類型。

【0168】 在某些實施例中，SNALP包含可電離的陽離子脂質DLinDMA (1,2-二亞油氧基-3-二甲基胺基丙烷)。在某些實施例中，SNALP包含DLin-KC2-DMA及DLin-MC3-DMA，且藉由結構-活性關係(SAR)研究產生，其最佳化陽離子脂質部分之可電離胺基脂質頭端的

pKa。在某些實施例中，SNALP為reLNP (快速消除的LNP)，諸如L319，其為現有的SNALP平台提供生物可降解性且自血漿及組織中快速消除。

【0169】 在某些實施例中，將主題cdsDNA調配為複數個核酸-脂質粒子，其中該複數個粒子中之各粒子包含：(a)核酸(例如cdsDNA，其可編碼蛋白質、RNAi、反義寡核苷酸或mRNA)；(b)陽離子脂質，佔粒子中存在之總脂質的約50-85 mol% (例如約50-65 mol%；約56.5-66.5 mol%；約52-62 mol%)；(c)非陽離子脂質(諸如膽固醇或其衍生物，或磷脂(諸如二棕櫚醯磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯磷脂醯膽鹼(DSPC)或其混合物)，或磷脂及膽固醇或其衍生物之混合物)，佔粒子中存在之總脂質的約13-49.5 mol% (例如約31.5-42.5 mol%之膽固醇或其衍生物；或4-10 mol%之磷脂及30-40 mol%膽固醇；或5-9 mol%之磷脂及32-36 mol%膽固醇；或10-30 mol%磷脂及10-30 mol%膽固醇)；及(d)抑制粒子聚集之結合脂質(例如PEG-脂質結合物，諸如PEG-二醯基甘油(PEG-DAG)結合物、PEG-二烷氧基丙基(PEG-DAA)結合物或其混合物)，佔粒子中存在之總脂質的約0.5-10 mol% (例如約0.5-2 mol%或約1-2 mol%)，視情況其中該複數個粒子中至少約95%之粒子具有非層狀形態。在某些實施例中，核酸-脂質粒子包含約61.5 mol%陽離子脂質、約36.9%膽固醇或其衍生物及約1.5 mol% PEG-脂質結合物。在某些實施例中，核酸-脂質粒子包含約57.1 mol%陽離子脂質、約7.1 mol%磷脂、約34.3 mol%膽固醇或其衍生物及約1.4 mol% PEG-脂質結合物。

【0170】 在某些實施例中，將主題cdsDNA調配為複數個核酸-脂質粒子，其中該複數個粒子中之各粒子包含：(a)核酸；(b)陽離子脂質，佔粒子中存在之總脂質的約50 mol%至約85 mol% (例如約50 mol%至約65

mol%，或約50 mol%至約60 mol%); (c)非陽離子脂質，佔粒子中存在之總脂質的約13 mol%至約49.5 mol% (例如磷脂及膽固醇或膽固醇衍生物之混合物，其中磷脂佔粒子中存在之總脂質的約3 mol%至約15 mol% (或約4 mol%至約12 mol%); 且其中膽固醇或其衍生物佔粒子中存在之總脂質的約30 mol%至約40 mol%); 及(d)抑制粒子聚集之結合脂質，佔粒子中存在之總脂質的約0.5 mol%至約10 mol% (例如約0.5 mol%至約2 mol%或約5 mol%至約10 mol%)，其中該複數個粒子中至少約95%之粒子具有非層狀形態。

【0171】 在某些實施例中，將主題cdsDNA調配為複數個核酸-脂質粒子，其中該複數個粒子中之各粒子包含：(a)核酸(諸如cdsDNA，其可編碼蛋白質、RNAi、反義寡核苷酸或mRNA); (b)陽離子脂質(例如粒子中存在之總脂質的約10-50 mol%、約20-50 mol%或約20-40 mol%); (c)非陽離子脂質(例如粒子中存在之總脂質的約10-60 mol%、約20-55 mol%或約25-50 mol%); 及(d)抑制粒子聚集之結合脂質(例如粒子中存在之總脂質的約0.5-20 mol%、約2-20 mol%或約1.5-18 mol%)，其中該複數個粒子中至少約95%之粒子具有非層狀形態，或其中該複數個粒子中至少約95%之粒子為電子密集。

【0172】 cdsDNA可編碼任何所關注之基因產物，包括蛋白質、反義寡核苷酸或RNAi構築體(諸如siRNA、aiRNA、miRNA、Dicer-受質dsRNA、shRNA、ssRNAi寡核苷酸及其組合)。

【0173】 在某些實施例中，陽離子脂質包含1,2-二亞油氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLinDMA)、1,2-二次亞麻油氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(DLenDMA)、1,2-二-γ-次亞麻油氧基-N,N-二甲基胺基丙烷(γ-

DLenDMA)、2,2-二亞油醯基-4-(2-二甲胺基乙基)-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亞油醯基-4-二甲胺基甲基-[1,3]-二氧戊環(DLin-K-DMA)或其混合物。

【0174】 在某些實施例中，陽離子脂質包含MC3、LenMC3、CP-LenMC3、y-LenMC3、CP-y-LenMC3、MC3MC、MC2MC、MC3醚、MC4醚、MC3醯胺、Pan-MC3、Pan-MC4、Pan MC5或其混合物。

【0175】 在某些實施例中，陽離子脂質包含N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化銨(DDAB)、N-(1-(2,3-二油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTAP)、N-(1-(2,3-二油氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油氧基丙胺(DODMA)及其組合。

【0176】 在某些實施例中，陽離子脂質為如美國專利第7,799,565號；第8,569,256號；第9,018,187號及第9,181,545號中所述之任一者(均以引用的方式併入本文中)。

【0177】 在某些實施例中，非陽離子脂質為二棕櫚醯磷脂醯膽鹼(DPPC)、二油醯磷脂醯乙醇胺(DOPE)、棕櫚醯油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)卵磷脂醯膽鹼(EPC)、二硬脂醯磷脂醯膽鹼(DSPC)、膽固醇及其組合。

【0178】 在某些實施例中，非陽離子脂質為磷脂。

【0179】 在某些實施例中，非陽離子脂質為膽固醇或膽固醇衍生物。膽固醇衍生物之實例包括但不限於膽甾烷醇、膽甾烷酮、膽甾烯酮、腎固醇、膽固醇基-2'-羥乙基醚、膽固醇基-4'-羥基丁基醚及其混合物。

【0180】 在某些實施例中，非陽離子脂質為磷脂及膽固醇或膽固醇

衍生物之混合物。

【0181】 在某些實施例中，非陽離子脂質為選自由二棕櫚醯磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯磷脂醯膽鹼(DSPC)或其混合物組成之群的磷脂。

【0182】 在某些實施例中，非陽離子脂質為DPPC。

【0183】 在某些實施例中，非陽離子脂質為DPPC及膽固醇之混合物。

【0184】 在某些實施例中，抑制粒子聚集之結合脂質為聚乙二醇(PEG)-脂質結合物。舉例而言，PEG可具有約550道爾頓至約5,000道爾頓之平均分子量，或約2,000道爾頓之平均分子量，或約750道爾頓之平均分子量。

【0185】 在某些實施例中，PEG-脂質結合物為選自由以下組成之群的成員：PEG-二醯基甘油(PEG-DAG)結合物、PEG二烷氧基丙基(PEG-DAA)結合物、PEG-磷脂結合物、PEG-神經醯胺(PEG-Cer)結合物及其混合物。

【0186】 在某些實施例中，PEG-脂質結合物為PEG-DAA結合物，諸如美國專利第8,936,942號及第7,982,027號(以引用的方式併入)中所述之彼等結合物。

【0187】 在某些實施例中，PEG-DAA結合物為選自由以下組成之群的成員：PEG-二癸氧基丙基(C₁₀)結合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C₁₂)結合物、PEG-二肉豆蔻氧基丙基(C₁₄)結合物、PEG-二棕櫚氧基丙基(C₁₆)結合物、PEG-二硬脂氧基丙基(C₁₈)結合物及其混合物。在某些實施例中，PEG-脂質結合物描述於美國專利第7,803,397號(以引用的方式併入)中。

【0188】 在某些實施例中，PEG-DAA結合物為PEG-二肉豆蔻氧基丙基(CH)結合物。

【0189】 在某些實施例中，粒子中之核酸(例如cdsDNA)在37°C下粒子暴露於核酸酶約20分鐘或約30分鐘後基本上不降解。

【0190】 在某些實施例中，cdsDNA完全囊封於粒子中。亦即，cdsDNA完全囊封於脂質粒子之脂質部分內，使得脂質粒子中之cdsDNA在水溶液對酶降解(例如藉由核酸酶或蛋白酶)具有抗性。在某些其他實施例中，脂質粒子對諸如人類之哺乳動物基本上無毒。

【0191】 在某些實施例中，粒子之脂質:cdsDNA質量比為約5:1至約15:1。

【0192】 在某些實施例中，粒子之中值直徑為約30或40 nm至約150 nm。

【0193】 在某些實施例中，陽離子脂質佔粒子中存在之總脂質的約52 mol%至約62 mol%。

【0194】 在某些實施例中，非陽離子脂質為磷脂及膽固醇或其衍生物之混合物，佔粒子中存在之總脂質的約36 mol%至約47 mol%。

【0195】 在某些實施例中，抑制粒子聚集之結合脂質為PEG-脂質結合物，佔粒子中存在之總脂質的約1 mol%至約2 mol%。

【0196】 在某些實施例中，陽離子脂質佔粒子中存在之總脂質的約56.5 mol%至約66.5 mol%。

【0197】 在某些實施例中，非陽離子脂質為膽固醇或其衍生物，佔粒子中存在之總脂質的約31.5 mol%至約42.5 mol%。

【0198】 在某些實施例中，抑制粒子聚集之結合脂質為PEG-脂質結

合物，佔粒子中存在之總脂質的約1 mol%至約2 mol%。

【0199】 在某些實施例中，陽離子脂質佔粒子中存在之總脂質的約50 mol%至約60 mol%。

【0200】 在某些實施例中，非陽離子脂質為磷脂及膽固醇或其衍生物之混合物，佔粒子中存在之總脂質的約35 mol%至約45 mol%。

【0201】 在某些實施例中，抑制粒子聚集之結合脂質為PEG-脂質結合物，佔粒子中存在之總脂質的約5 mol%至約10 mol%。

【0202】 在某些實施例中，陽離子脂質佔粒子中存在之總脂質的約55 mol%至約65 mol%。

【0203】 在某些實施例中，非陽離子脂質為膽固醇或其衍生物，佔粒子中存在之總脂質的約30 mol%至約40 mol%。

【0204】 在某些實施例中，抑制粒子聚集之結合脂質為PEG-脂質結合物，佔粒子中存在之總脂質的約5 mol%至約10 mol%。

【0205】 在某些實施例中，大於95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或大於99%之粒子具有非層狀形態，亦即非雙層結構。在某些實施例中，大於95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或大於99%之粒子為電子密集。

【0206】 在某些實施例中，粒子之非層狀形態包含反六角形(H_{II})或立方相結構。

【0207】 在某些實施例中，具有非層狀形態之粒子為電子密集。粒子之非層狀形態可藉由例如低溫透射電子顯微法(cryo-TEM)、X射線繞射或藉由差示掃描量熱法(DSC)來測定，其中在5至75℃下未觀察到熱轉變。

【0208】 製造SNALP及遞送SNALP之方法為此項技術中已知的，參見例如US7901708、US9492386、WO2009127060A1及WO2012000104A1 (以引用的方式併入本文中)。

【0209】 可以訂製優先靶向所關注之特定組織、器官或腫瘤之脂質粒子。在某些其他情況下，可能需要使靶向部分附接至脂質粒子之表面以進一步增強粒子之靶向。將靶向部分(例如抗體、蛋白質等)附接至脂質(諸如本發明粒子中使用之彼等)的方法為熟習此項技術者已知的。

【0210】 一旦形成，SNALP脂質粒子可用於將活性劑或治療劑(例如cdsDNA)引入細胞中。因此，本發明亦提供將活性劑或治療劑(諸如cdsDNA)引入細胞中之方法。

【0211】 在一些情況下，細胞為肌肉細胞，諸如骨骼肌細胞、心肌細胞或平滑肌細胞。在某些實施例中，肌肉細胞為脛骨前肌細胞。

【0212】 進行該等方法時，可藉由在活體外、離體或活體內首先形成如上所述之粒子，隨後使該等粒子與細胞接觸一段足以將活性劑或治療劑(例如cdsDNA)遞送至細胞的時間。

【0213】 SNALP脂質粒子可吸附至與其混合或接觸之幾乎任何細胞類型。一旦吸附，粒子可由一部分細胞內吞，與細胞膜交換脂質或與細胞融合。粒子之活性劑或治療劑(例如cdsDNA)部分的轉移或併入可經由此等途徑中之任一者進行。特定言之，當發生融合時，粒子膜整合至細胞膜中且粒子之內含物與細胞內流體組合。

【0214】 SNALP脂質粒子可單獨或與醫藥學上可接受之載劑(例如生理鹽水或磷酸鹽緩衝液)混合投與，該載劑根據投藥途徑及標準醫藥實踐選擇。一般而言，正常緩衝鹽水(例如135-150 mM NaCl)將用作醫藥學

上可接受之載劑。其他適合之載劑包括例如水、緩衝水、0.4%鹽水、0.3%甘胺酸及其類似物，包括用於增強穩定性之糖蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。額外適合之載劑描述於例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版 (1985)中。如本文所用，「載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、媒劑、包衣、稀釋劑、抗細菌及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑、緩衝劑、載劑溶液、懸浮液、膠體及其類似物。片語「醫藥學上可接受」係指當投與人類時不產生過敏或類似不良反應的分子實體及組合物。

【0215】醫藥學上可接受之載劑一般在脂質粒子形成後添加。因此，在形成脂質粒子(例如SNALP)之後，可將粒子稀釋於醫藥學上可接受之載劑中，諸如正常緩衝鹽水。

【0216】醫藥調配物中之粒子濃度可廣泛變化，亦即以重量計自小於約0.05%，通常處於或至少約2至5%，至高達約10至90%，且將根據所選特定投藥模式，主要藉由流體體積、黏度等來選擇。舉例而言，可增加濃度以降低與治療相關之流體負荷。此在患有動脈粥樣硬化相關之充血性心臟衰竭或嚴重高血壓之患者中可能為特別理想的。或者，可將由刺激性脂質構成之粒子稀釋至低濃度以減輕投與部位之炎症。

【0217】本發明之醫藥組合物可藉由眾所周知的習知滅菌技術來滅菌。水溶液可封裝使用或在無菌條件下過濾並凍乾，凍乾製劑在投與之前與無菌水溶液組合。組合物可含有接近生理條件所需之醫藥學上可接受之輔助物質，諸如pH調節及緩衝劑、張力調節劑及其類似物，例如乙酸钠、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀及氯化鈣。另外，粒子懸浮液可包括脂質保

護劑，其保護脂質在儲存時免受自由基及脂質過氧化損害。親脂性自由基淬滅劑，諸如 α -生育酚，及水溶性鐵特異性螯合劑，諸如鐵胺，為適合的。

【0218】在某些其他實施例中，可將治療有效量之脂質粒子投與哺乳動物。在其他情況下，自患者移出細胞，活體外遞送脂質粒子(例如使用本文所述之SNALP)，且將細胞重新注射至患者體內。

【0219】用於活體內療法之全身遞送，例如經由諸如循環之身體系統將治療性核酸遞送至遠端靶細胞，已使用核酸-脂質粒子實現，諸如PCT公開案第WO 05/007196號、第WO 05/121348號、第WO 05/120152號及第WO 04/002453號中所述之核酸-脂質粒子，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。本發明亦提供完全囊封之脂質粒子，其保護核酸免受血清中之核酸酶降解，為非免疫原性的，尺寸小，且適用於重複給藥。

【0220】對於活體內投與，投與可為此項技術中已知的任何方式，例如藉由注射、經口投與、吸入(例如鼻內或氣管內)、經皮施用或直腸投與。投與可經由單次或分次劑量來實現。醫藥組合物可非經腸投與，亦即關節內、靜脈內、腹膜內、皮下或肌肉內。在一些實施例中，醫藥組合物藉由快速注射靜脈內、肌肉內或腹膜內投與(參見例如美國專利第5,286,634號)。細胞內核酸遞送亦已論述於Straubinger等人, *Methods Enzymol.*, 101:512 (1983)；Mannino等人, *Biotechniques*, 6:682 (1988)；Nicolau等人, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989)；及Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:21 (1993)中。投與基於脂質之治療劑的其他方法描述於例如美國專利第3,993,754號；第4,145,410號；第4,235,871號；第

4,224,179號；第4,522,803號及第4,588,578號中。脂質粒子可藉由在疾病部位直接注射或藉由在遠離疾病部位之部位注射來投與(參見例如Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. 第70-71頁(1994))。出於所有目的，上述參考文獻之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【0221】 在靜脈內投與SNALP脂質粒子之實施例中，粒子之總注射劑量的至少約5%、10%、15%、20%或25%在注射後約8、12、24、36或48小時存在於血漿中。在其他實施例中，脂質粒子之總注射劑量的大於約20%、30%、40%及高達約60%、70%或80%在注射後約8、12、24、36或48小時存在於血漿中。在某些情況下，複數個粒子之大於約10%在投與後約1小時存在於哺乳動物之血漿中。在某些其他情況下，在粒子投與後至少約1小時可偵測到脂質粒子之存在。在某些實施例中，在投與後約8、12、24、36、48、60、72或96小時，在肺細胞、肝細胞、腫瘤細胞中或在炎症部位可偵測到治療劑諸如核酸之存在。

【0222】 本發明之組合物，單獨或與其他適合之組分組合，可製成氣溶膠調配物(亦即其可「經霧化」)以經由吸入(例如鼻內或氣管內)投與(參見Brigham等人, Am. J. Sci., 298:278 (1989))。可將氣溶膠調配物置於可接受之加壓推進劑中，諸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮氣及其類似物。

【0223】 在某些實施例中，醫藥組合物可藉由鼻內噴霧、吸入及/或其他氣溶膠遞送媒劑遞送。經由經鼻氣溶膠噴霧劑將核酸組合物直接遞送至肺的方法已描述於例如美國專利第5,756,353號及第5,804,212號中。同樣，使用鼻內微粒樹脂及溶血磷脂醯甘油化合物遞送藥物(美國專利5,725,871)亦為醫藥技術中眾所周知的。類似地，以聚四氟乙烯支撐基質

形式遞送經黏膜藥物描述於美國專利第5,780,045號中。出於所有目的，上述專利之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【0224】 適用於非經腸投與，諸如藉由關節內(關節中)、靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內及皮下途徑投與之調配物包括水性及非水性等張無菌注射溶液，其可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑及使調配物與預定接受者之血液等張之溶質；及水性及非水性無菌懸浮液，其可包括懸浮劑、增溶劑、增稠劑、穩定劑及防腐劑。在本發明之實踐中，組合物較佳例如藉由靜脈內輸注、經口、局部、腹膜內、膀胱內或鞘內投與。

【0225】 一般而言，當靜脈內投與時，脂質粒子調配物用適合之醫藥載劑調配。許多醫藥學上可接受之載劑可用於本發明之組合物及方法。適用於本發明之調配物見於例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版 (1985) 中。可使用各種含水載劑，例如水、緩衝水、0.4%鹽水、0.3%甘胺酸及其類似物，且可包括用於增強穩定性之糖蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。一般而言，正常的緩衝鹽水(135-150 mM NaCl)將用作醫藥學上可接受之載劑，但其他適合之載劑就足夠。此等組合物可藉由習知脂質體滅菌技術滅菌，諸如過濾。組合物可含有接近生理條件所需要之醫藥學上可接受之輔助物質，諸如pH調節劑及緩衝劑、張力調節劑、濕潤劑及其類似物，例如乙酸钠、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、脫水山梨糖醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。此等組合物可使用上文提及之技術滅菌，或者，其可在無菌條件下生產。所得水溶液可封裝使用或在無菌條件下過濾並凍乾，凍乾製劑在投與之前與無菌水溶液組合。

【0226】 在某些應用中，本文所揭示之脂質粒子可經由經口投與遞

送至個體。粒子可與賦形劑合併且以可攝入之錠劑、頰內錠劑、糖衣錠、膠囊、丸劑、口含錠、酞劑、漱口劑、懸浮液、口腔噴霧劑、糖漿、粉片及其類似物之形式使用(參見例如美國專利第5,641,515號、第5,580,579號及第5,792,451號，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)。此等經口劑型亦可含有以下：黏合劑、明膠；賦形劑、潤滑劑及/或調味劑。當單位劑型為膠囊時，除上述材料之外，其可含有液體載劑。各種其他材料可以包衣形式存在或以其他方式改變劑量單位之物理形式。當然，用於製備任何單位劑型之任何材料應為醫藥學上純的且在所使用之量下基本上無毒。

【0227】 通常，此等經口調配物可含有至少約0.1%的脂質粒子或更多，但粒子之百分比當然可變化且可方便地在約1%或2%及約60%或70%或更多的總調配物之重量或體積之間變化。當然，可製備各治療上有用之組合物中之粒子量，使得在任何給定單位劑量化合物中獲得適合之劑量。製備此類醫藥調配物之熟習此項技術者應考慮諸如溶解度、生物可用性、生物半衰期、投藥途徑、產物存放期以及其他藥理學考慮因素之因素，且因此，各種劑量及治療方案可為可取的。

【0228】 適用於經口投與之調配物可由以下組成：(a)液體溶液，諸如懸浮於稀釋劑諸如水、鹽水或PEG 400中的有效量之封裝治療劑諸如核酸(例如cdsDNA)；(b)膠囊、藥囊或錠劑，各含有預定量之呈液體、固體、顆粒或明膠形式之治療劑，諸如核酸(例如cdsDNA)；(c)於適當液體中之懸浮液；及(d)適合之乳液。錠劑形式可包括以下中之一或多者：乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、磷酸鈣、玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、微晶纖維素、明膠、膠態二氧化矽、滑石、硬脂酸鎂、硬脂酸，及其他賦形

劑、著色劑、填充劑、黏合劑、稀釋劑、緩衝劑、濕潤劑、防腐劑、調味劑、染料、崩解劑及醫藥學上相容之載劑。口含錠形式可包含調味劑例如蔗糖中之治療劑，諸如核酸(例如cdsDNA)，以及在惰性基質中包含治療劑的片劑，該惰性基質諸如明膠及甘油或蔗糖及阿拉伯膠乳液、凝膠及其類似物，除治療劑之外含有此項技術中已知的載劑。

【0229】 在其另一個使用實例中，脂質粒子可併入多種局部劑型中。舉例而言，含有核酸-脂質粒子諸如SNALP之懸浮液可經調配且以凝膠、油、乳液、局部乳膏、糊劑、軟膏、洗劑、泡沫、慕斯及其類似物之形式投與。

【0230】 當製備本發明之脂質粒子的醫藥製劑時，較佳使用一定量的已經純化之粒子，以減少或消除空粒子或治療劑諸如核酸與外表面締合之粒子。

【0231】 本發明之方法可在各種宿主中實踐。較佳宿主包括哺乳動物物種，諸如靈長類動物(例如人類及黑猩猩以及其他非人類靈長類動物)、犬科動物、貓科動物、馬科動物、牛科動物、綿羊、山羊、嚙齒動物(例如大鼠及小鼠)、兔類動物及豬。

【0232】 投與之粒子的量將視治療劑(例如核酸)與脂質之比率、所使用之特定治療劑(例如核酸)、所治療之疾病或病症、患者之年齡、體重及病況以及臨床醫師之判斷而定，但通常每次投與(例如注射)約0.01至約50 mg/kg體重，較佳約0.1至約5 mg/kg體重。

【0233】 對於活體外應用，可將治療劑諸如核酸(例如cdsDNA)遞送至培養物中生長之任何細胞，不論植物或動物來源、脊椎動物或無脊椎動物以及任何組織或類型。在較佳實施例中，細胞為動物細胞，更佳哺乳

動物細胞，且最佳人類細胞(例如腫瘤細胞或肝細胞)。

【0234】 當活體外進行時，細胞與脂質粒子之間的接觸在生物相容性介質中進行。粒子之濃度視具體應用而廣泛變化，但通常在約1 μmol 與約10 mmol之間。用脂質粒子處理細胞一般在生理溫度(約37°C)下進行約1至48小時、較佳約2至4小時的時間段。

【0235】 在一個實施例中，將脂質粒子懸浮液添加至60-80%匯合的塗覆細胞中，細胞密度為約 10^3 至約 10^5 個細胞/毫升，更佳約 2×10^4 個細胞/毫升。添加至細胞中之懸浮液的濃度較佳為約0.01至0.2 $\mu\text{g/ml}$ ，更佳約0.1 $\mu\text{g/ml}$ 。

【0236】 在可能需要細胞組織培養之程度上，其為此項技術中熟知的。舉例而言，Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 第3版, Wiley-Liss, New York (1994), Kuchler等 人, Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977)及其中列舉之參考文獻提供細胞培養之一般指導。培養的細胞系統通常呈單層細胞形式，但亦使用細胞懸浮液。

【0237】 使用核內體釋放參數(ERP)分析，可最佳化本發明之SNALP或其他脂質粒子的遞送效率。ERP分析詳細描述於美國專利公開案第20030077829號中，其揭示內容出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。更特定言之，ERP分析之目的為基於其對核內體膜之結合/攝入或融合/去穩定化之相對效應來區分SNALP或其他脂質粒子之各種陽離子脂質及輔助脂質組分之效應。此分析允許定量測定SNALP或其他脂質粒子之每種組分如何影響遞送效率，從而最佳化SNALP或其他脂質粒子。通常，ERP分析量測報導蛋白(例如螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、綠色螢光

蛋白(GFP)等)之表現，且在一些情況下，針對表現質體最佳化之SNALP調配物亦適合於囊封干擾RNA。在其他情況下，ERP分析可適於在存在或不存在干擾RNA（例如siRNA）之情況下量測靶序列之轉錄或轉譯的下調。藉由比較各種SNALP或其他脂質粒子中之每一者的ERP，吾人可容易地確定經最佳化之系統，例如SNALP或在細胞中具有最大攝入之其他脂質粒子。

【0238】 本發明之組合物及方法用於活體內及活體外治療多種細胞類型。適合之細胞包括但不限於肝細胞、網狀內皮細胞(例如單核球、巨噬細胞等)、成纖維細胞、內皮細胞、血小板細胞、感染及/或易感染病毒之其他細胞類型、造血前體(幹)細胞、角質細胞、骨骼肌細胞、心肌細胞及平滑肌細胞、成骨細胞、神經元、靜止淋巴細胞、終末分化細胞、緩慢或非循環初級細胞、實質細胞、淋巴細胞、上皮細胞、骨細胞及其類似物。

【0239】 在具體實施例中，將活性劑或治療劑諸如cdsDNA遞送至癌細胞(例如實體腫瘤細胞)，包括但不限於肝癌細胞、肺癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、肛門癌細胞、膽管癌細胞、小腸癌細胞、胃癌細胞、食道癌細胞、膽囊癌細胞、胰臟癌細胞、闌尾癌細胞、乳癌細胞、卵巢癌細胞、子宮頸癌細胞、前列腺癌細胞、腎癌細胞、中樞神經系統癌細胞、膠質母細胞瘤腫瘤細胞、皮膚癌細胞、淋巴瘤細胞、絨膜癌腫瘤細胞、頭頸癌細胞、骨原性肉瘤腫瘤細胞及血癌細胞。

【0240】 囊封核酸(例如cdsDNA)之脂質粒子諸如SNALP的活體內遞送適於靶向任何細胞類型之細胞。該等方法及組合物可與多種脊椎動物之細胞一起使用，包括哺乳動物，諸如犬科動物、貓科動物、馬科動物、

牛科動物、綿羊、山羊、嚙齒動物(例如小鼠、大鼠及天竺鼠)、兔類動物、豬及靈長類動物(例如猴、黑猩猩及人類)。

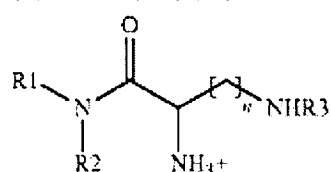
【0241】

AtuPLEX

AtuPLEX為多層(多個脂質雙層)且帶正電荷之siRNA-脂複合體，其將siRNA與三脂質脂質體組合在一起。此可經修飾以遞送主題cDsDNA用於各種目的。

【0242】 脂質體含有專有的陽離子脂質AtuFect01、共脂質(促融合或穩定化)及聚乙二醇化脂質，以形成核酸(siRNA或cDsDNA)嵌入粒子之多個脂質雙層內的奈米粒子結構。

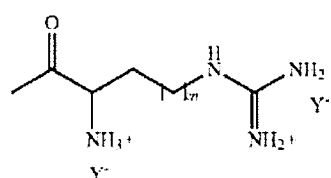
【0243】 因此，在某些實施例中，將主題cDsDNA調配於包含醫藥學上可接受之載劑及式(I)化合物之組合物中：



其中R1及R2各自獨立地選自包含烷基之群；

n為1至4之任何整數；

R3為選自包含離胺醯基、鳥胺醯基、2,4-二胺基丁醯基、組胺醯基及根據式(II)之醯基部分之群的醯基，



其中m為1至3之任何整數且Y⁻為醫藥學上可接受之陰離子。

【0244】 在某些實施例中，R1及R2各自獨立地選自包含月桂基、肉豆蔻基、棕櫚基及油基之群。

sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二烷基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺及神經醯胺-PEG組成之群。

【0251】 在某些實施例中，組合物包含：a) 50 mol%之 β -精胺醯基-2,3-二胺基丙酸-N-棕櫚基-N-油基-醯胺三鹽酸鹽、48 mol%之1,2-二植烷醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺及2 mol% 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-PEG2000；或b) β -精胺醯基-2,3-二胺基丙酸-N-棕櫚基-N-油基-醯胺三鹽酸鹽、49 mol% 1,2-二植烷醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺及1 mol% 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-PEG2000。

【0252】 在某些實施例中，組合物包含：a) 50 mol%之 β -精胺醯基-2,3-二胺基丙酸-N-棕櫚基-N-油基-醯胺三鹽酸鹽、48 mol%之1,2-二植烷醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺及2 mol% N(羰基-甲氧基聚乙二醇-2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺；或b) 50 mol%之 β -精胺醯基-2,3-二胺基丙酸-N-棕櫚基-N-油基-醯胺三鹽酸鹽、49 mol% 1,2-二植烷醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺及1 mol% N(羰基-甲氧基聚乙二醇-2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

【0253】 在某些實施例中，組合物包含：a) 50 mol%之 β -L-精胺醯基-2,3-L-二胺基丙酸-N-棕櫚基-N-油基-醯胺三鹽酸鹽、48 mol%之1,2-二植烷醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺及2 mol% N(羰基-甲氧基聚乙二醇-2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺；或b) 50 mol%之 β -L-精胺醯基-2,3-L-二胺基丙酸-N-棕櫚基-N-油基-醯胺三鹽酸鹽、49 mol% 1,2-二植烷醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺及1 mol% N(羰基-甲氧基聚乙二醇-2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

【0254】 用於生產粒子之多個脂質雙層的其他適合之脂質組合物描

述於美國專利第8,357,722號、第8,017,804號及第9,486,538號中(均以引用的方式併入)。

【0255】

DACC

DACC為包括AtuFect01 (參見上文)之脂質遞送系統，且用於將siRNA嵌入多脂質雙層結構中。此系統亦可經修飾以遞送主題cDsDNA用於各種目的。

【0256】 雖然與AtuPLEX系統密切相關，但DACC具有顯著不同的生物醫藥特性，且將核酸遞送至肺血管內皮。

【0257】

DBTC

DBTC為將siRNA遞送至肝細胞及肝實質之肝血管系統，而非僅靶向肝臟肝細胞的脂質遞送系統。此系統亦可經修飾以遞送主題cDsDNA用於各種目的。

【0258】 DBTC奈米粒子由合成遞送系統組成，其含有(i)基於環糊精之線性聚合物(CDP)，(ii)呈現於奈米粒子之外部上的人類轉鐵蛋白(hTf)靶向配體以接合癌細胞表面上之Tf受體(hTfR)，(iii)親水性聚合物(用於促進生物流體中之奈米粒子穩定性的聚乙二醇(PEG))及(iv)經設計以降低靶基因表現之siRNA。參見Davis等人, *Nature* 464(7291):1067-1070, 2010 (以引用的方式併入)。可藉由用主題cDsDNA置換siRNA組分來修飾此系統。亦可藉由置換靶向部分來修飾該系統，從而可實現向其他特定組織部位之遞送。舉例而言，為遞送至骨骼肌或心肌細胞，TfR可用骨骼或心血管細胞上之受體的天然配體或對骨骼或心血管細胞上之標記具有特異

性的抗體或其片段置換。靶向部分亦可衍生自具有所需天然趨向性之病毒(例如用於心肌細胞遞送之腺病毒5型旋鈕蛋白)。相同策略可用於本文所述之奈米粒子之任何其他靶向遞送。

【0259】 已顯示此等奈米粒子在非人類靈長類動物之多劑量研究中具有良好耐受性，且可全身遞送以治療例如實體腫瘤。

【0260】

RONDEL

RONDEL表示RNAi/寡核苷酸奈米粒子遞送。其為已用於在臨床試驗中遞送siRNA用於治療實體腫瘤之平台。RONDEL為針對活體內siRNA遞送再最佳化之基於聚合物之非脂質體奈米粒子。其具有四種自組裝成奈米粒子之組分：(i) siRNA股(其可用本發明之cdsDNA置換)，(ii)含有環糊精之聚合物(CDP)，(iii)作為空間穩定劑之聚乙二醇(PEG)及(iv)人類轉鐵蛋白(Tf)。Tf為與轉鐵蛋白受體(TfR)結合之靶向配體，其通常在癌細胞上上調。但此組分可經任何靶向部分置換，諸如對肌肉細胞或其他靶組織具有特異性之抗體或抗體片段。CDP為含有帶正電荷之脒基團與糖(環糊精)部分交替的線性聚陽離子寡聚物。帶正電荷之CDP聚合物與帶負電荷之核酸(諸如cdsDNA)骨架締合，形成直徑小於100 nm之奈米粒子，使核酸在其核心且環糊精基團在其表面上。組分(iii)及(iv)經由與PEG之一個末端共價結合的疏水性金剛烷基團與CDP中之疏水性核心非共價締合。所得複合物為包覆有PEG (穩定劑)及PEG-靶向配體(諸如TfR)之含有核酸的奈米粒子。

【0261】

DPC

DPC (Dynamic PolyConjugates)為一類基於聚合物結合物之非脂質體核酸(例如siRNA或cdsDNA)遞送平台。DPC係尺寸為5-20 nm之小奈米粒子，其含有兩性核內體裂解聚合物聚(丁基胺基乙基基醚) (PBAVE)，可逆地連接屏蔽劑(例如PEG)及靶向配體，且經由可水解之二硫化物連接子連接核酸。雖然破壞膜之PBAVE聚合物經PEG側鏈掩蔽，但PEG及靶向配體在核內體之酸性環境中釋放以觸發核內體釋放。一旦進入細胞質的還原環境，就裂解二硫鍵以釋放核酸(例如cdsDNA)。參見美國專利第8,501,930號(以引用的方式併入本文中)。

【0262】 DPC系統之改良版利用原子轉移自由基聚合(ATRP)及可逆加成-斷裂鏈轉移(RAFT)來生產均勻且易於大規模製造的聚合物。其中之核酸不附接至DPC聚合物。相反，核酸-膽固醇結合物與類似於PBAVE聚合物之具有經可逆掩蔽之核內體裂解特性的蜂毒素樣肽共注射。

【0263】

SMARTICLES

SMARTICLES為兩性脂質體，其為pH依賴性電荷轉換粒子，藉由局部或全身投與向細胞提供治療性核酸(例如cdsDNA)。SMARTICLES在血液中穩定且以與習知脂質體相同的方式分佈，但當其穿過細胞膜時變成帶正電荷，從而導致在炎症部位、腫瘤、肝臟及脾臟內遞送核酸有效負載。

【0264】

DiLA²

DiLA² (二烷基化胺基酸)為用於自二烷基化胺基酸產生脂質體調配物以遞送治療性核酸(諸如cdsDNA)的平台。DiLA²為基於含有組胺酸之二烷基化胺基酸系統，其允許吾人修改遞送系統之關鍵態樣，諸如電荷、

連接子及醯基鏈以最佳化脂質體之特性。舉例而言，DiLA²允許吾人最佳化向所關注之靶組織的遞送，且允許包含肽以改良多種遞送特徵，諸如奈米粒子之囊封、細胞攝取、核內體釋放及細胞/組織靶向。參見Adami等人, An amino acid-based amphoteric liposomal delivery system for systemic administration of siRNA. *Mol. Ther.* 19:1141-1151, 2011 (以引用的方式併入)。亦參見美國專利第8,501,824號及第7,959,505號(以引用的方式併入本文中)。

【0265】

EnCore

EnCore為開發用於遞送核酸有效負載(諸如cdsDNA)之奈米粒子系統，用於遞送至肝臟及實體腫瘤。EnCore含有由不同脂質混合物之包膜包圍的脂質-核酸核心，其介導核酸有效負載之積聚、內化及釋放至靶細胞中。此亞結構粒子經設計以用於在腫瘤中優先積聚且提供高水準之有效負載遞送。參見美國專利第7,371,404號(以引用的方式併入本文中)。

【0266】

PRX

聚輪烷或PRX為一種由多個 α -環糊精環、PEG鏈及兩個龐大的塞子構成之互鎖大分子，用於物理防止環解開。PRX可自組裝且將核酸縮合成奈米結構。已在mdx小鼠中證明PRX成功遞送質體，且資料顯示在大多數肌肉組織中有豐富的質體分佈。因此，PRX亦可用於遞送主題cdsDNA。

【0267】 本發明之方法部分在活體外無細胞環境中進行，諸如原核端粒酶消化及下游純化及調配步驟。因此，該方法部分在不存在宿主細胞之情況下進行，且通常包含使用經純化之酶組分。因此，藉由原核端粒酶

加工及其他下游操作通常藉由使溶液中之反應組分在適合之容器中接觸來進行。視情況，特定組分可以固定化形式提供，諸如附接至固體支撐物。

【0268】應理解，本發明之方法可在任何規模下進行。然而，較佳進行該方法以商業或工業規模生產任何所關注之DNA片段，亦即以mg或更大量產生所關注之擴增DNA片段。在某些實施例中，該方法產生至少1 mg、至少10 mg、至少20 mg、至少50 mg或至少100 mg所關注之DNA片段。最終cdsDNA產物亦可以mg或更大量產生。在某些實施例中，該方法產生至少1 mg、至少2 mg、至少5 mg、至少10 mg、至少20 mg、至少50 mg或至少100 mg之cdsDNA。

【0269】

7. 大規模製造

包含主題cdsDNA之本發明之LNP及聚合物NP可使用任何此項技術中公認的方法製造。在某些實施例中，LNP及聚合物LP可使用市售服務及/或設備製造，諸如由Precision Nanosystems (Vancouver, British Columbia)提供之彼等服務及/或設備。

【0270】在某些實施例中，使用Precision Nanosystems之NanoAsseblr平台製備LNP及NP。NanoAsseblr平台利用微流體混合進行受控制、經調整且完全可擴展之奈米藥物製造，包括本發明之LNP及聚合物NP。其能夠經由定製工程改造之微流體混合筒快速且受控地製造奈米藥物(脂質體、脂質奈米粒子、聚合物奈米粒子)，該等混合筒允許在奈升規模下進行奈米粒子之毫秒級混合。該平台允許使用者藉由方法及組成來控制尺寸，且調節諸如混合比、流動速率及脂質組成之參數以微調奈米粒子尺寸及囊封效率。

【0271】 此系統已與Neuro9™轉染套組(Precision Nanosystems, Vancouver, British Columbia之非病毒轉染套組)結合使用，以活體外及活體內將siRNA及mRNA及pDNA遞送至原代神經元，實現95%之細胞轉染效率及在經轉染細胞中實現90%之阻斷基因表現，且無可觀察的毒性。

【0272】 Neuro9™將核酸囊封且保護在模擬內源性低密度脂蛋白(LDL)之合成脂質奈米粒子(LNP)中，其由如神經元、星形膠質細胞及iPSC之細胞天然攝取。Neuro9具有pH敏感性且經工程改造以將其內含物釋放至細胞質中。Neuro9™轉染套組及相關產品亦可用於將主題cDNA遞送至特定靶細胞，諸如神經元。

【0273】 在某些實施例中，本發明之LNP及聚合物NP以規模擴大之量生產約10 mL至1 L，或多達5 L，或多達10 L，或多達15 L，或多達20 L，或多達25 L，或多達50 L或更多的LNP及NP調配物。規模擴大可經由微流體反應器並行化，類似於整合晶片上之電晶體陣列。在某些實施例中，製造過程受軟體控制或半/全自動化。

【0274】 在某些實施例中，製造在NanoAssemblr Spark中進行，其具有25-250 μ L之操作奈米粒子調配物體積。

【0275】 在某些實施例中，製造在NanoAssemblr Benchtop系統中進行，其經設計用於1至15 mL之新奈米粒子調配物的快速原型製作，且具有軟體控制，其能夠控制輸入混合參數以最佳化粒子特徵，諸如尺寸及囊封效率。

【0276】 在某些實施例中，製造在適於臨床開發之NanoAssemblr Blaze系統中進行。該系統可在10 mL與1 L之間製造。

【0277】 在某些實施例中，製造在NanoAssemblr Scale-Up系統中

進行，該系統經開發用於在cGMP環境中製造臨床試驗奈米粒子材料。其提供在NanoAssemblr Benchtop及Blaze平台上開發之調配物的無縫規模擴大。使用相同的並聯連接的微流體混合器將在臨床前儀器上開發的製程直接轉移至規模擴大。並行混合器可在較短的時間內執行相同的製程，從而生產單個大批量批次。具有8個並行運行之微流體混合器的規模擴大系統可生產適合於早期臨床試驗之奈米粒子調配物體積。

【0278】

8. 套組

本發明進一步提供一種套組，其包含實施本發明方法所需之組分。此套組包含至少一種原核端粒酶及視情況用於本文所述方法之說明書。該套組可包含兩種、三種、四種、五種或更多種不同的原核端粒酶。原核端蛋白酶可選自SEQ ID NO: 2、4、6、8或10中之任一者或其任何變體。在某些實施例中，該套組包含大腸桿菌N15 TelN (SEQ ID NO: 10)或其變體。

【0279】該套組亦可包含適合之緩衝劑及如上所述之原核端粒酶效能或穩定性所需的其他因子。

實例

實例1 包含所關注基因之*cdsDNA*的產生

製備Puc19骨架質體構築體用於擴增GFP報導體基因，該構築體包括在哺乳動物啟動子控制下之GFP編碼序列且包含polyA編碼序列。在質體構築體中，GFP報導體基因側接一對AAV2 ITR序列，分別為ITR1及ITR2。由於ITR與GFP報導體基因之間存在Not I識別序列，所以各ITR可經由Not I消化與GFP報導體基因分離。側接ITR之GFP報導體基因進一步

側接兩個TelN識別序列TelN-左及TelN-右。

【0280】 在擴增及收穫包含GFP構築體之質體後，用N6原核端粒酶TelN消化質體以將GFP構築體拆分成兩個cdsDNA，一個基本上包含側接ITR且進一步側接TelN識別序列之兩個半位點的GFP報導體基因。另一個cdsDNA包含質體骨架之其餘部分，側接TelN識別序列之兩個半位點。參見圖3中之凝膠電泳結果。

【0281】 含有GFP之cdsDNA可自凝膠中回收，或直接自TelN消化反應中純化以供進一步使用。

【0282】

實例2 *cdsDNA* 編碼之所關注基因的表現

使用標準分子生物學技術將包含GFP報導體基因之經純化之cdsDNA (圖4A)轉染至C2C12肌管中，且隨時間推移監測C2C12肌管中之GFP表現 (參見圖4B)。

【0283】 作為對照，將經Not I消化之cdsDNA類似地轉染至C2C12肌管中，具有未側接ITR之相同GFP報導體基因的pCK8-GFP構築體亦是如此。

【0284】 儘管經轉染細胞在相差顯微鏡下呈現相同的形態，但FITC影像顯示轉染至C2C12細胞之cdsDNA編碼之GFP的強表現，而經Not I消化之GFP dsDNA轉染細胞具有弱表現。與經cdsDNA轉染之細胞相比，pCK8 GFP對照亦產生不良表現。確定cdsDNA編碼之GFP的轉染效率為約60%，且隨著肌管成熟，GFP表現變得更強。參見圖4C。

【0285】

實例3 保護*cdsDNA* 編碼之所關注基因免受核酸外切酶消化

為了測試cdsDNA之完整性，在數種條件下用TelN及/或核酸外切酶消化實例1之質體構築體，且在凝膠電泳上解析消化產物。參見圖5A及5B。

【0286】 在圖5A中，在尺寸標記右側之第一泳道中，在不存在核酸外切酶之情況下用TelN消化4 µg環狀質體DNA，結果顯示僅存在兩種預期的cdsDNA產物，一種代表包含GFP報導體基因之cdsDNA。

【0287】 在其右側的泳道中，進行相同的實驗，不同之處在於添加核酸外切酶。結果顯示，兩種cdsDNA產物均對核酸外切酶消化具有抗性，與TelN消化產物之封閉末端保護cdsDNA免受核酸外切酶消化的期望一致。

【0288】 然而，當輸入DNA並非環狀而是在原核端粒酶消化之前經線性化時，經線性化之質體骨架對核酸外切酶消化不具有抗性，而cdsDNA (在圖中標記為SLiD)仍對核酸外切酶具有抗性。

【0289】 在一組類似的實驗中，其結果顯示在圖5B中，改為使用2 µg輸入質體DNA及增加量之核酸外切酶，不同之處在於輸入質體DNA首先用Xba I線性化，Xba I一旦在GFP構築體及TelN識別位點之外就消化實例1之質體構築體。作為TelN消化之結果，包含GFP構築體之cdsDNA為完整的，而包含質體骨架之其餘部分的准cdsDNA藉由Xba I消化等分，產生具有僅一個封閉末端之兩個線性dsDNA。此類消化產物易受核酸外切酶消化。參見圖5B中尺寸標記右側之第3至第5泳道。

【0290】 此實驗證明，在圖6中概述之製造過程中，在原核端粒酶消化後，核酸外切酶可用於移除污染性質體骨架cdsDNA，從而促進包含GOI之cdsDNA的純化。

【0291】

實例4 *cdsDNA* 編碼之微型肌縮蛋白在細胞中之活體外表現

此實例證明，本發明之*cdsDNA*構築體可用於在根據製造商之推薦使用VIAFECT™轉染劑(Promega Corp., WI)由稱為SLiD-MD44之*cdsDNA*構築體轉染的C2C12細胞中活體外表現外源性轉殖基因。

【0292】 SLiD-MD44編碼5重複微型肌縮蛋白，其自N端至C端含有N端肌動蛋白結合結構域、鉸鏈區1 (H1)、血影蛋白樣重複序列R1、R16、R17、R23及R24、鉸鏈區4 (H4)及人類全長肌縮蛋白之C端肌縮聚糖結合結構域。此5重複微型肌縮蛋白之蛋白質序列及相關肌縮蛋白小基因描述於WO2016/115543 (以引用的方式併入本文中)中。

【0293】 圖7A顯示主題*cdsDNA*對核酸外切酶III消化具有抗性。包含5重複微型肌縮蛋白編碼序列(SLiD-MD44)之質體的限制性及原核端粒酶消化產生在電泳上解析的多個條帶，僅一個匹配主題*cdsDNA* (亦即MD44)之預期尺寸的條帶似乎對核酸外切酶III消化具有抗性，證實原核端粒酶消化產物中共價連接之末端結構。

【0294】 隨後使用VIAFECT™轉染劑將經分離之*cdsDNA* SLiD-MD44轉染至培養的C2C12細胞中，且使用免疫螢光染色顯露細胞骨架(抗F-肌動蛋白抗體染色)、細胞核(蘇木精染色)及任何表現之5重複微型肌縮蛋白(抗DysB抗體)。顯而易見的是，由編碼5重複微型肌縮蛋白之主題*cdsDNA*轉染的C2C12細胞具有5重複微型肌縮蛋白之穩固表現。同時，當使用相同的抗DysB抗體時，無DNA之對照轉染不產生信號。

【0295】

實例5 *cdsDNA* 編碼之微型肌縮蛋白在mdx小鼠中之活體內表現

此實例證明，本發明之cdsDNA構築體可用於活體內表現外源性轉殖基因，尤其在DMD之*mdx*小鼠模型中表現外源性微型肌縮蛋白基因。

【0296】 如實例4中製備稱為SLiD-MD4之cdsDNA構築體以編碼5重複微型肌縮蛋白。隨後將約40 µg SLiD-MD4 cdsDNA經由肌肉內電穿孔(IM電穿孔)引入*mdx*小鼠中。作為對照，使用鹽水溶液代替SLiD-MD4 cdsDNA構築體。

【0297】 將經純化之SLiD-MD4 cdsDNA構築體以2 µg/µL調配於150 mM NaCl中，且儲存在-20℃下直至使用。將玻尿酸酶(Sigma，H-4272)以2 mg/mL調配於PBS中，且將1 mL等分試樣儲存在-20℃下直至使用。

【0298】 對於電穿孔，解凍SLiD-MD4及玻尿酸酶原料。經由吸入2-3%異氟醚麻醉*mdx*小鼠。在脛骨前肌的位置對小鼠後腿進行刮毛。隨後藉由用0.3 mL結核菌素注射器進入肌肉中部，將50 µL玻尿酸酶直接注射至脛骨前肌中。緩慢注射材料，注射後針緩慢縮回。在玻尿酸酶注射後約2小時，藉由用結核菌素注射器進入肌肉中部的針頭，將30 µL之60 µg含SLiD-MD4 cdsDNA之構築體直接注射至脛骨前肌中。緩慢注射材料，注射後針緩慢縮回。在DNA注射後，立即使用BTX AgilePulse ID電穿孔器及5 mm 4針陣列電極(BTX，47-0045)對*mdx*小鼠進行電穿孔。DNA注射部位位於2個平行針陣列之間，將其插入穿過皮膚且進入脛骨前肌，直至估計之負荷讀數<3000 ohms。使用以下設置進行電穿孔。

電壓組	電壓	脈衝長度	脈衝間隔	脈衝數
1	570	50 µsec	1 msec	1
2	570	50 µsec	50 msec	1
3	130	10 msec	20 msec	8

【0299】 注射後7天收集脛骨前肌進行分析。

【0300】 隨後使用抗DysB小鼠單株抗體(Leica Biosystems，產品代碼：NCL-DYSB)進行免疫螢光染色，用於驗證自SLiD-MD4 cdsDNA構築體電穿孔之*mdx*小鼠分離的肌肉組織中之微型肌縮蛋白表現。針對人類肌縮蛋白之殘基321-494產生抗體。

【0301】 圖8B展示廣譜螢光信號，其代表經由IM電穿孔接受SLiD-MD4 cdsDNA構築體之*mdx*小鼠中的穩固肌縮蛋白表現。圖8B之放大部分展示在圖9B中，其中沿著質膜周圍的正確亞細胞定位觀察到肌縮蛋白表現，表明外源性微型肌縮蛋白不僅在*mdx*小鼠之肌肉組織中成功且廣泛地表現，而且由於正確的摺疊和正確的亞細胞定位，亦可能為功能性的。

【0302】 相反，經由相同程序接受鹽水對照之對照小鼠僅具有背景水準信號。參見圖8A及圖9A中之類似放大部分。

【0303】 圖10顯示在IM電穿孔後7天後外源性微型肌縮蛋白基因之表現持續存在。在此實驗中，經由IM電穿孔在*mdx*小鼠中使用60 µg的相同SLiD-MD4 cdsDNA構築體。在電穿孔後7天，使用由紅色螢光信號標記之抗DysB單株抗體及由綠色螢光信號標記之抗層黏連蛋白單株抗體進行免疫染色。

【補充序列表】

<110> 美商堅固生物科技公司
<120> 基因之非病毒生產及遞送
<130> 129159-00163
<140> TW 107145131
<141> 2018-12-14
<150> PCT/US2018/065609
<151> 2018-12-14
<150> 62/598,532
<151> 2017-12-14
<160> 26
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 1563
<212> DNA
<213> 鹽單胞菌病毒HAP1

<400> 1	
atgagcgggtg agtcacgtag aaaggicgat ttagcggaat tgatagagtg gttgctcagc	60
gagatcaaag agatcgacgc cgatgatgag atgccacgta aagagaaaac caagcgcatg	120
gcgcggctgg cacgtagctt caaaacgcgc ctgcatgatg acaagcgccg caaggattct	180
gagcggatcg cggtcacgac ctctcgccgc tacatgacag aagcgcgcaa ggcggtgact	240
gcgcagaact ggcgccatca cagcttcgac cagcagatcg agcggctggc cagccgctac	300
ccggcttatg ccagcaagct ggaagcgctc ggcaagctga ccgatatcag cggcattcgt	360
atggcccacc gcgagctgct cgaccagatc cgcaacgatg acgacgctta tgaggacatc	420
cgggcgatga agctggacca tgaaatcatg cggcacctga cgttgagctc tgcacagaaa	480
agcacgctgg ctgaagaggc cagcgagacg ctggaagagc gcgcggtgaa cacggtcgag	540
atcaactacc actggttgat ggagacgggt tacgagctgc tgagtaaccg ggagagaaatg	600
gtcgatgggg agtatcgccg ctttttcagt taccatagcg ttgggctggc gctggccacc	660
gggcgtcgtc cgatcgaggt gctgaagacc ggacggatca cgaaggctgg cgagtaigag	720
ctggagttca gcggccaggc gaaaaagcgc ggcggcgtcg actatagcga ggcttaccac	780
atttataccc tgggtgaaagc tgacctggtg atcgaagcgt gggatgagct tcgctcgtc	840
ccggaagctg ctgagctgca gggcatggac aacagcgatg tgaaccgccg cacggcgaag	900
acgcicaaca cgtcactaa gcggatcttt aacaacgatg agcgcgtttt caaggacagc	960
cgggcgatct ggcgcggctt ggtgtttgag ctgcacttct cgcgcgacaa gcgctggaag	1020
aaagtcaccg aggacgtgtt ctggcgtgag atgctggggc atgaggacat ggatacacag	1080
cgcagctacc gcgcctttaa aatcgactac gacgagccgg atcaagccga ccaggaagat	1140
tacgaacacg ctagccgcct cgcgcgctg caggcgctgg acggccatga gcagcttgag	1200

agcagcgacg cccaggcgcg tgtgcatgcc tgggtgaaag cgcagatcga gcaggagcct 1260
gacgcgaaaa ttacgcagtc tctgatcagc cgggagctgg gcgtttatcg ccttgccata 1320
aaagcgtacc tggagctggc gcgagaggcg ctgcacgcgc cgaacgtcga tctggacaag 1380
gtcgcgggcg cagtgcggaa ggaagtagcc gaggcgaagc cccggctgaa cggccaccca 1440
caaggggatg gcaggtaggt cggggtggct tcaatcaacg gggtaggaagt tgcacgggtg 1500
ggcaaccagg caggccggat cgaagcgaig aaagcggcct ataaagcggc gggtagggcg 1560
tga 1563

<210> 2
<211> 520
<212> PRT
<213> 鹽單胞菌病毒HAP1

<400> 2
Met Ser Gly Glu Ser Arg Arg Lys Val Asp Leu Ala Glu Leu Ile Glu
1 5 10 15

Trp Leu Leu Ser Glu Ile Lys Glu Ile Asp Ala Asp Asp Glu Met Pro
20 25 30

Arg Lys Glu Lys Thr Lys Arg Met Ala Arg Leu Ala Arg Ser Phe Lys
35 40 45

Thr Arg Leu His Asp Asp Lys Arg Arg Lys Asp Ser Glu Arg Ile Ala
50 55 60

Val Thr Thr Phe Arg Arg Tyr Met Thr Glu Ala Arg Lys Ala Val Thr
65 70 75 80

Ala Gln Asn Trp Arg His His Ser Phe Asp Gln Gln Ile Glu Arg Leu
85 90 95

Ala Ser Arg Tyr Pro Ala Tyr Ala Ser Lys Leu Glu Ala Leu Gly Lys
100 105 110

Leu Thr Asp Ile Ser Ala Ile Arg Met Ala His Arg Glu Leu Leu Asp
115 120 125

Gln Ile Arg Asn Asp Asp Asp Ala Tyr Glu Asp Ile Arg Ala Met Lys
130 135 140

Leu Asp His Glu Ile Met Arg His Leu Thr Leu Ser Ser Ala Gln Lys
145 150 155 160

Ser Thr Leu Ala Glu Glu Ala Ser Glu Thr Leu Glu Glu Arg Ala Val
165 170 175

Asn Thr Val Glu Ile Asn Tyr His Trp Leu Met Glu Thr Val Tyr Glu
180 185 190

Leu Leu Ser Asn Arg Glu Arg Met Val Asp Gly Glu Tyr Arg Gly Phe
195 200 205

Phe Ser Tyr Leu Ala Leu Gly Leu Ala Leu Ala Thr Gly Arg Arg Ser
210 215 220

Ile Glu Val Leu Lys Thr Gly Arg Ile Thr Lys Val Gly Glu Tyr Glu
225 230 235 240

Leu Glu Phe Ser Gly Gln Ala Lys Lys Arg Gly Gly Val Asp Tyr Ser
245 250 255

Glu Ala Tyr His Ile Tyr Thr Leu Val Lys Ala Asp Leu Val Ile Glu
260 265 270

Ala Trp Asp Glu Leu Arg Ser Leu Pro Glu Ala Ala Glu Leu Gln Gly
275 280 285

Met Asp Asn Ser Asp Val Asn Arg Arg Thr Ala Lys Thr Leu Asn Thr
290 295 300

Leu Thr Lys Arg Ile Phe Asn Asn Asp Glu Arg Val Phe Lys Asp Ser
305 310 315 320

Arg Ala Ile Trp Ala Arg Leu Val Phe Glu Leu His Phe Ser Arg Asp
325 330 335

Lys Arg Trp Lys Lys Val Thr Glu Asp Val Phe Trp Arg Glu Met Leu
340 345 350

Gly His Glu Asp Met Asp Thr Gln Arg Ser Tyr Arg Ala Phe Lys Ile
355 360 365

Asp Tyr Asp Glu Pro Asp Gln Ala Asp Gln Glu Asp Tyr Glu His Ala
370 375 380

Ser Arg Leu Ala Ala Leu Gln Ala Leu Asp Gly His Glu Gln Leu Glu
385 390 395 400

Ser Ser Asp Ala Gln Ala Arg Val His Ala Trp Val Lys Ala Gln Ile
405 410 415

Glu Gln Glu Pro Asp Ala Lys Ile Thr Gln Ser Leu Ile Ser Arg Glu
420 425 430

Leu Gly Val Tyr Arg Pro Ala Ile Lys Ala Tyr Leu Glu Leu Ala Arg
435 440 445

Glu Ala Leu Asp Ala Pro Asn Val Asp Leu Asp Lys Val Ala Ala Ala

450455460

Val Pro Lys Glu Val Ala Glu Ala Lys Pro Arg Leu Asn Ala His Pro
465470475480

Gln Gly Asp Gly Arg Trp Val Gly Val Ala Ser Ile Asn Gly Val Glu
485490495

Val Ala Arg Val Gly Asn Gln Ala Gly Arg Ile Glu Ala Met Lys Ala
500505510

Ala Tyr Lys Ala Ala Gly Gly Arg
515520

<210> 3
<211> 1854
<212> DNA
<213> 耶爾森氏菌噬菌體PY54

<400> 3

atgaaaatcc atttcgcga tttagttagt ggtttagtta aagagatcga tgaatatgaa60

aaatcagacc gggcgaggg tgacaaaact cggcggtatc agggcgcggc cagaaagtic120

aaaaatgccg tgtttatgga taaacggaaa tatcgcggtta acggtatgaa gaatagaata180

tcgttaacaa catttaatza atatttaagt cgagcacgtt ctcggtttga agaaaggctt240

caccatagtt ttctcaatc talagcaact atctcaata aatatectgc attcagcgaa300

ataataaaag atctggataa tagaccgct catgaagtta gaataaaaact taaagaatta360

ataactcacc ttgaatccgg tgttaattta ttagaaaaaa taggtagctt agggaaaata420

aaaccatcta cagctaaaaa aatagtttagc ttaaaaaaaaa tgtaccatc atgggctaata480

gatctagata cttaatttag tactgaagat gctacagaat tacaacaaaa gttagagcaa540

gggaccgacc tacttaacgc attacattct ctaaaagtaa accatgaagt tatgtatgca600

ttaacgatgc agccttcctga cagagctgca ttaaaagcta ggcatgacgc tgccttcac660

tttaaaaagc gtaacatcgt acctatcgat tatcccggtt atatgcaacg aatgacggac720

atactacatc ttccagatat agcttttgaa gatcagatgg catcacttgc ccttttagca780

tttgccttag cagctgctag cggtcgcaga caaattgaaa tactaattac tggtagagtt840

gacgccaaaa ataaaagcat cattaaattt tctggacaag caaaaaaaag aatggccggt900

tcaggatggac attatgaaat atacagtcct attgactcag agctattcat tcaacggtta960

gagtttttac gttctcatag ctcaatactt cgattacaaa atttggaal agcacatgat1020

gaacatcgta ctgaactatc tgttattaac ggtttttag ccaaaccitt aatgatgca1080

gcaaaacagt tctttgtcga tgacagaaga gtattttaaag ataccctgc aatttacgt1140

cgcatagcct atgaaaaatg gtttagaaca gatcctcgct gggcgaagtg cgacgaagat1200

gttttcttct ctgaattatt aggccatgac gaccagata ctacagctggc atataaaca1260

ttcaagctgg taaatttcaa tcaaaaatgg acaccttaata tatcagatga aaacctcgg 1320
ttagctgcac ttcaagagct tgacaatgat atgcccggcc tagcacgtgg cgatgcggca 1380
gttcgcatac atgagtgggt taaagagcaa ctggcgaga acctgcggc aaaaataact 1440
gcataccaaa tcaagaaaaa tttaaattgt cgaatgact tggccagccg atacatggca 1500
tgggtgtcgt acgcgctagg ggttgattt ggtgatgat gacaggcaag gccagaagaa 1560
ctcccaccat cgcctgtgct tgatattaac gctgatgaca ctgacgtga agaagatgaa 1620
atagaggaag actttactga tgaggaaata gacgacaccg aattcgacgt atcagataac 1680
gccagtgaig aagataagcc cgaagataaa cctcgctttg cagcaccaat tctagaagt 1740
gaggactctt ggcigattaa atttgaattt gctggcaagc aatatagtcg ggagggtaat 1800
gccgaaagtg ttatcgatgc gatgaaacaa gcatggactg aaaatatgga gtaa 1854

<210> 4
<211> 617
<212> PRT
<213> 耶爾森氏菌噬菌體PY54

<400> 4
Met Lys Ile His Phe Arg Asp Leu Val Ser Gly Leu Val Lys Glu Ile
1 5 10 15

Asp Glu Ile Glu Lys Ser Asp Arg Ala Gln Gly Asp Lys Thr Arg Arg
20 25 30

Tyr Gln Gly Ala Ala Arg Lys Phe Lys Asn Ala Val Phe Met Asp Lys
35 40 45

Arg Lys Tyr Arg Gly Asn Gly Met Lys Asn Arg Ile Ser Leu Thr Thr
50 55 60

Phe Asn Lys Tyr Leu Ser Arg Ala Arg Ser Arg Phe Glu Glu Arg Leu
65 70 75 80

His His Ser Phe Pro Gln Ser Ile Ala Thr Ile Ser Asn Lys Tyr Pro
85 90 95

Ala Phe Ser Glu Ile Ile Lys Asp Leu Asp Asn Arg Pro Ala His Glu
100 105 110

Val Arg Ile Lys Leu Lys Glu Leu Ile Thr His Leu Glu Ser Gly Val
115 120 125

Asn Leu Leu Glu Lys Ile Gly Ser Leu Gly Lys Ile Lys Pro Ser Thr
130 135 140

Ala Lys Lys Ile Val Ser Leu Lys Lys Met Tyr Pro Ser Trp Ala Asn
145 150 155 160

Asp Leu Asp Thr Leu Ile Ser Thr Glu Asp Ala Thr Glu Leu Gln Gln
165 170 175

Lys Leu Glu Gln Gly Thr Asp Leu Leu Asn Ala Leu His Ser Leu Lys
180 185 190

Val Asn His Glu Val Met Tyr Ala Leu Thr Met Gln Pro Ser Asp Arg
195 200 205

Ala Ala Leu Lys Ala Arg His Asp Ala Ala Leu His Phe Lys Lys Arg
210 215 220

Asn Ile Val Pro Ile Asp Tyr Pro Gly Tyr Met Gln Arg Met Thr Asp
225 230 235 240

Ile Leu His Leu Pro Asp Ile Ala Phe Glu Asp Ser Met Ala Ser Leu
245 250 255

Ala Pro Leu Ala Phe Ala Leu Ala Ala Ala Ser Gly Arg Arg Gln Ile
260 265 270

Glu Ile Leu Ile Thr Gly Glu Phe Asp Ala Lys Asn Lys Ser Ile Ile
275 280 285

Lys Phe Ser Gly Gln Ala Lys Lys Arg Met Ala Val Ser Gly Gly His
290 295 300

Tyr Glu Ile Tyr Ser Leu Ile Asp Ser Glu Leu Phe Ile Gln Arg Leu
305 310 315 320

Glu Phe Leu Arg Ser His Ser Ser Ile Leu Arg Leu Gln Asn Leu Glu
325 330 335

Ile Ala His Asp Glu His Arg Thr Glu Leu Ser Val Ile Asn Gly Phe
340 345 350

Val Ala Lys Pro Leu Asn Asp Ala Ala Lys Gln Phe Phe Val Asp Asp
355 360 365

Arg Arg Val Phe Lys Asp Thr Arg Ala Ile Tyr Ala Arg Ile Ala Tyr
370 375 380

Glu Lys Trp Phe Arg Thr Asp Pro Arg Trp Ala Lys Cys Asp Glu Asp
385 390 395 400

Val Phe Phe Ser Glu Leu Leu Gly His Asp Asp Pro Asp Thr Gln Leu
405 410 415

Ala Tyr Lys Gln Phe Lys Leu Val Asn Phe Asn Pro Lys Trp Thr Pro
420 425 430

Asn Ile Ser Asp Glu Asn Pro Arg Leu Ala Ala Leu Gln Glu Leu Asp
435 440 445

Asn Asp Met Pro Gly Leu Ala Arg Gly Asp Ala Ala Val Arg Ile His
450 455 460

Glu Trp Val Lys Glu Gln Leu Ala Gln Asn Pro Ala Ala Lys Ile Thr
465 470 475 480

Ala Tyr Gln Ile Lys Lys Asn Leu Asn Cys Arg Asn Asp Leu Ala Ser
485 490 495

Arg Tyr Met Ala Trp Cys Ala Asp Ala Leu Gly Val Val Ile Gly Asp
500 505 510

Asp Gly Gln Ala Arg Pro Glu Glu Leu Pro Pro Ser Leu Val Leu Asp
515 520 525

Ile Asn Ala Asp Asp Thr Asp Ala Glu Glu Asp Glu Ile Glu Glu Asp
530 535 540

Phe Thr Asp Glu Glu Ile Asp Asp Thr Glu Phe Asp Val Ser Asp Asn
545 550 555 560

Ala Ser Asp Glu Asp Lys Pro Glu Asp Lys Pro Arg Phe Ala Ala Pro
565 570 575

Ile Arg Arg Ser Glu Asp Ser Trp Leu Ile Lys Phe Glu Phe Ala Gly
580 585 590

Lys Gln Tyr Ser Trp Glu Gly Asn Ala Glu Ser Val Ile Asp Ala Met
595 600 605

Lys Gln Ala Trp Thr Glu Asn Met Glu
610 615

<210> 5
<211> 1923
<212> DNA
<213> 克雷伯氏菌噬菌體phiKO2

<400> 5
atgcgtaagg tgaaaattgg tgagctaate aattcgcttg tgagcgaggt cgaggcaatc 60
gatgcctctg atcgtcgcga aggcgataaa acgaagaaaa ttaaagccgc agcattaaaa 120
tataagaatg cattatttaa tgacaaaaga aagtttcgcg gtaaaggttt agaaaaaaga 180
atttcgccca acaegttcaa ctcgatatg agtcgggcaa ggaaaagatt tgatgataga 240
ttgcatcata actttgaaaa gaatgtaatt aaactatcag aaaaatatec ttatatagt 300
gaagaattat cttegtggct tcttatgcct ggggcatcaa ttagacagca tatgtcaaga 360

t t g c a a g c c a a g c t a a a a g a g a t a a t g c c a t t g g c a g a a g a c t t a t c c a a t a t a a g a t t	420
g g t a c a a a a a a l a g c g a a g c a a a a a t a a a t a a a c t c g c t a a t a a a t a t c c t g a a t g g c a a	480
t t c g e t a t t a g t g a t t t a a a t a g c g a a g a t t g g a a g g a t a a a a g a g a t t a t c t t t a t a a a	540
c t a t t c c a a c a a g g t t c t t c g c t c e t t g g a a g a c t t g a a t a a c c t g a a a g t a a a c c a t g a g	600
g t t c t e t a t c a t c t g c a g c t t a g t t c t g c c g a g c g a a c c t c t a t c c a g c a g c g c t g g g c c	660
a a c g t c c t c a g c g a g a a a a g c g c a a c g t t g t c g t g a t t g a c t a t c c g c g c t a t a t g c a g	720
g c c a l c t a c g a t a t a a t c a a c a a g c c t a t a g t t c g t t c g a t t g a c t a c t c g t c g t g g t	780
a t g g c c c c g c t g g c g t t c c c t t g c c g c g c t a l c t g g t c g c g a a t g a t t g a a a t c a t g	840
c t c c a g g g t g a a t t t t c c g t c g c a g g t a a a t a c a g t a a c a t t c c t g g g g c a a g c t a a a	900
a a a c g t c g c a a g a t a a a g g t a t a t c a a g g a a a t a t a t a c c t i a t g c g a c g t a c t t i a	960
t t t g t t a g t t t g g t a a a t g a a c t t c g c t c a t g c c c c g c t g c t g c g g a t t t t g a t g a a g t a	1020
a t a a a a g g a t a t g g c g a a a a t g a c a c t c g c t c a g a a a a t g g c g t a t t a a t g c a a t t c t c	1080
g c t a c a g c t t t t a a t c c g t g g t a a a a a c t t t c t t a g g c g a t g a c c g c c g c g t t t a t a a a	1140
g a t a g c c g c g c t a t t t a c g c c g t a t t g c c t a t g a a a t g t t c t t c c g c g t t g a c c c t c g g	1200
t g g a a g a a t g t t g a t g a g g a t g t a t t c t t c a t g g a g a t t c t c g g c c a t g a c g a t g a a a a c	1260
a c c c a a c t g c a c t a t a a g c a g t t t a a a t t g g c t a a c t t c t c c a g a a c a t g g c g a c c a a a t	1320
g t c g g c g a g g a g a a t g c c c g c c t a g c g g c g c t g c a a a a g c t g g a t a g c a t g a t g c c a g a t	1380
t t t g c c a g g g g c g a c g c c g g g g t t c g t a t t c a t g a g a c c g t g a a g c a g c t g g t g g a g c a g	1440
g a c c c a t c g a t a a a a t c a c a a a c a g c a c c c t g c g a c c g t t t a a c t t c a g t a c c a g g c t g	1500
a t t c c t c g c t a c c t g g a g t t t g c c g c c g a t g c a t t g g g c c a g t t c g t c g g t g a a a a t g g g	1560
c a a t g g c a a c t g a a g g a t g a g g c g c t g c a a t a g t c c t g c t g a t g a g g a a a t t c t t g a g	1620
c c l a t g g a c g a c g t c g a t c l c g a t g a c g a a a a c c a t g a t g a t g a a a c g c t g g a t g a c g a t	1680
g a g a t c g a a g t g g a c g a a a g c g a a g g a g a g a a c t g g a g g a a g c g g g c g a c g t g a a g a g	1740
g c c g a g g t g g c t g a a c a g g a a g a g a a g c a c c t g g c a a g c a a a c t t t a a a g c g c c g a g g	1800
g a t a a t g g c g a t g g t a c c t a c a t g g t g g a a t t t g a a t t c g g t g c c g t c a t t a c g c c t g g	1860
t c c g g t g c c g c c g t a a t c g g t a g a g g c a a t g c a a t c t g c c t g g a g t g c c t a c t t c a a g	1920
t g a	1923

<210> 6
<211> 640
<212> PRT
<213> 克雷伯氏菌噬菌體phiKO2

<400> 6
Met Arg Lys Val Lys Ile Gly Glu Leu Ile Asn Ser Leu Val Ser Glu
1 5 10 15

Val Glu Ala Ile Asp Ala Ser Asp Arg Pro Gln Gly Asp Lys Thr Lys
 20 25 30

Lys Ile Lys Ala Ala Ala Leu Lys Tyr Lys Asn Ala Leu Phe Asn Asp
35 40 45

Lys Arg Lys Phe Arg Gly Lys Gly Leu Glu Lys Arg Ile Ser Ala Asn
50 55 60

Thr Phe Asn Ser Tyr Met Ser Arg Ala Arg Lys Arg Phe Asp Asp Arg
65 70 75 80

Leu His His Asn Phe Glu Lys Asn Val Ile Lys Leu Ser Glu Lys Tyr
85 90 95

Pro Leu Tyr Ser Glu Glu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Met Pro Ala Ala
100 105 110

Ser Ile Arg Gln His Met Ser Arg Leu Gln Ala Lys Leu Lys Glu Ile
115 120 125

Met Pro Leu Ala Glu Asp Leu Ser Asn Ile Lys Ile Gly Thr Lys Asn
130 135 140

Ser Glu Ala Lys Ile Asn Lys Leu Ala Asn Lys Tyr Pro Glu Trp Gln
145 150 155 160

Phe Ala Ile Ser Asp Leu Asn Ser Glu Asp Trp Lys Asp Lys Arg Asp
165 170 175

Tyr Leu Tyr Lys Leu Phe Gln Gln Gly Ser Ser Leu Leu Glu Asp Leu
180 185 190

Asn Asn Leu Lys Val Asn His Glu Val Leu Tyr His Leu Gln Leu Ser
195 200 205

Ser Ala Glu Arg Thr Ser Ile Gln Gln Arg Trp Ala Asn Val Leu Ser
210 215 220

Glu Lys Lys Arg Asn Val Val Val Ile Asp Tyr Pro Arg Tyr Met Gln
225 230 235 240

Ala Ile Tyr Asp Ile Ile Asn Lys Pro Ile Val Ser Phe Asp Leu Thr
245 250 255

Thr Arg Arg Gly Met Ala Pro Leu Ala Phe Ala Leu Ala Ala Leu Ser
260 265 270

Gly Arg Arg Met Ile Glu Ile Met Leu Gln Gly Glu Phe Ser Val Ala
275 280 285

Gly Lys Tyr Thr Val Thr Phe Leu Gly Gln Ala Lys Lys Arg Ser Glu

290	295	300
Asp Lys Gly Ile Ser Arg Lys Ile Tyr Thr Leu Cys Asp Ala Thr Leu 305 310 315 320		
Phe Val Ser Leu Val Asn Glu Leu Arg Ser Cys Pro Ala Ala Ala Asp 325 330 335		
Phe Asp Glu Val Ile Lys Gly Tyr Gly Glu Asn Asp Thr Arg Ser Glu 340 345 350		
Asn Gly Arg Ile Asn Ala Ile Leu Ala Thr Ala Phe Asn Pro Trp Val 355 360 365		
Lys Thr Phe Leu Gly Asp Asp Arg Arg Val Tyr Lys Asp Ser Arg Ala 370 375 380		
Ile Tyr Ala Arg Ile Ala Tyr Glu Met Phe Phe Arg Val Asp Pro Arg 385 390 395 400		
Trp Lys Asn Val Asp Glu Asp Val Phe Phe Met Glu Ile Leu Gly His 405 410 415		
Asp Asp Glu Asn Thr Gln Leu His Tyr Lys Gln Phe Lys Leu Ala Asn 420 425 430		
Phe Ser Arg Thr Trp Arg Pro Asn Val Gly Glu Glu Asn Ala Arg Leu 435 440 445		
Ala Ala Leu Gln Lys Leu Asp Ser Met Met Pro Asp Phe Ala Arg Gly 450 455 460		
Asp Ala Gly Val Arg Ile His Glu Thr Val Lys Gln Leu Val Glu Gln 465 470 475 480		
Asp Pro Ser Ile Lys Ile Thr Asn Ser Thr Leu Arg Pro Phe Asn Phe 485 490 495		
Ser Thr Arg Leu Ile Pro Arg Tyr Leu Glu Phe Ala Ala Asp Ala Leu 500 505 510		
Gly Gln Phe Val Gly Glu Asn Gly Gln Trp Gln Leu Lys Asp Glu Ala 515 520 525		
Pro Ala Ile Val Leu Pro Asp Glu Glu Ile Leu Glu Pro Met Asp Asp 530 535 540		
Val Asp Leu Asp Asp Glu Asn His Asp Asp Glu Thr Leu Asp Asp Asp 545 550 555 560		

Glu Ile Glu Val Asp Glu Ser Glu Gly Glu Glu Leu Glu Glu Ala Gly
565 570 575

Asp Ala Glu Glu Ala Glu Val Ala Glu Gln Glu Glu Lys His Pro Gly
580 585 590

Lys Pro Asn Phe Lys Ala Pro Arg Asp Asn Gly Asp Gly Thr Tyr Met
595 600 605

Val Glu Phe Glu Phe Gly Gly Arg His Tyr Ala Trp Ser Gly Ala Ala
610 615 620

Gly Asn Arg Val Glu Ala Met Gln Ser Ala Trp Ser Ala Tyr Phe Lys
625 630 635 640

<210> 7
<211> 1617
<212> DNA
<213> 弧菌病毒VP882

<400> 7
atgagcggcg aaagtagaca aaaggtaaac ctcgaggagt taataaatga gctcgtcgag 60
gaggtagaaa ccatcgaiga caatgaggcg attactcggt ctgaaaaaac caagttgatc 120
accagggcgg cgactaaatt caagaccaag ctgcacgacg ataagcgccg gaaggatgcg 180
accagaatcg ctctgagcac ctatcgtaag tacatgacaa tggccagggc agcagttact 240
gagcagaact ggaaacacca cagtctcgag cagcagatag agcggctggc caaaaagcac 300
ccgcaatagc ctgagcagct ggiggccatc gggggccatg ataacatcac cgagttgcgc 360
ctggcgcctc gcgacctccl gaagagcctc aaggacaacg atgaagccll cgaggatate 420
cgcagcatga agttagacca cgaggtaatg cgccatctga cgtatcccag tgcgcaaaag 480
gcgagactgg cagaggaagc cgccgaggcg ttgaccgaga agaaaaccgc cacggtcgac 540
atcaactatc acgagctgat ggcggcgctg gtggagctgt tgaccaagaa gaccaagacg 600
gtcggcagcg acagcaccta cagcttcagc cggtctggcg ttggtatagg cctggctacc 660
ggtcgtcgtt ctatcgagat actgaagcag ggcgagttca aaaagggtgga tgagcagcgg 720
ctcgagttct ciggccaagc gaaaaagcgc ggcgggtgcc actattcaga gacctatacc 780
atttacccc tggtcgactc cgacctggta ctgatggcgc tgaagaacct gcgagagttg 840
ccagaagttc gcgcactgga tgagtacgac caactgggog agattaaagc gaacgacgoc 900
atcaataaac gctgtgcaaa aacgctcaac caaacgccca agcagttctt tggcagcgac 960
gagcgcgtgt lcaaagatag tctgtccatc tgggcgcgtc tggcttatga gttgtttttt 1020
caacgtgatc cgcgctggaa aaagaaagac gaggacgttt tctggcagga gatgctggc 1080
cacgaggaca tcgagactca gaaagcciat aagcaatica aggtcgacta cagcgaacct 1140
gagcagccgg tgcacaagcc tggcaaatlt aagagcagag ctgaagccct cgcggcgctc 1200
gactcaaatg aggacattac caccgcctca tccatggcca agatccacga ctgggtgaaa 1260

gagcgtattg cggaagaccc cgaggcgaac atcacacagt cactcaccac cggggaactg 1320
ggctcaggcc glaaggtagt caaggactac ctgcacctgg ctgacgatgc ccttgctgtg 1380
gtgaatactc ctgtcgatga ccgactcgtc gaggttccag ctgatgtgcc ggcagcagaa 1440
aaacagccga agaaagcgca gaagcccaga ctctgtggctc accaggttga tgatgagcac 1500
tgggaagcct gggcgctggt ggaaggcgag gaggtggcca gggtgaaaat caagggcacc 1560
cgcggtgagg caatgacagc cgcatgggag gccagccaaa aggcactcga tgactaa 1617

<210> 8
<211> 538
<212> PRT
<213> 弧菌病毒VP882

<400> 8
Met Ser Gly Glu Ser Arg Gln Lys Val Asn Leu Glu Glu Leu Ile Asn
1 5 10 15

Glu Leu Val Glu Glu Val Lys Thr Ile Asp Asp Asn Glu Ala Ile Thr
20 25 30

Arg Ser Glu Lys Thr Lys Leu Ile Thr Arg Ala Ala Thr Lys Phe Lys
35 40 45

Thr Lys Leu His Asp Asp Lys Arg Arg Lys Asp Ala Thr Arg Ile Ala
50 55 60

Leu Ser Thr Tyr Arg Lys Tyr Met Thr Met Ala Arg Ala Ala Val Thr
65 70 75 80

Glu Gln Asn Trp Lys His His Ser Leu Glu Gln Gln Ile Glu Arg Leu
85 90 95

Ala Lys Lys His Pro Gln Tyr Ala Glu Gln Leu Val Ala Ile Gly Ala
100 105 110

Met Asp Asn Ile Thr Glu Leu Arg Leu Ala His Arg Asp Leu Leu Lys
115 120 125

Ser Ile Lys Asp Asn Asp Glu Ala Phe Glu Asp Ile Arg Ser Met Lys
130 135 140

Leu Asp His Glu Val Met Arg His Leu Thr Leu Pro Ser Ala Gln Lys
145 150 155 160

Ala Arg Leu Ala Glu Glu Ala Ala Glu Ala Leu Thr Glu Lys Lys Thr
165 170 175

Ala Thr Val Asp Ile Asn Tyr His Glu Leu Met Ala Gly Val Val Glu
180 185 190

Leu Leu Thr Lys Lys Thr Lys Thr Val Gly Ser Asp Ser Thr Tyr Ser
195 200 205

Phe Ser Arg Leu Ala Leu Gly Ile Gly Leu Ala Thr Gly Arg Arg Ser
210 215 220

Ile Glu Ile Leu Lys Gln Gly Glu Phe Lys Lys Val Asp Glu Gln Arg
225 230 235 240

Leu Glu Phe Ser Gly Gln Ala Lys Lys Arg Gly Gly Ala Asp Tyr Ser
245 250 255

Glu Thr Tyr Thr Ile Tyr Thr Leu Val Asp Ser Asp Leu Val Leu Met
260 265 270

Ala Leu Lys Asn Leu Arg Glu Leu Pro Glu Val Arg Ala Leu Asp Glu
275 280 285

Tyr Asp Gln Leu Gly Glu Ile Lys Arg Asn Asp Ala Ile Asn Lys Arg
290 295 300

Cys Ala Lys Thr Leu Asn Gln Thr Ala Lys Gln Phe Phe Gly Ser Asp
305 310 315 320

Glu Arg Val Phe Lys Asp Ser Arg Ala Ile Trp Ala Arg Leu Ala Tyr
325 330 335

Glu Leu Phe Phe Gln Arg Asp Pro Arg Trp Lys Lys Lys Asp Glu Asp
340 345 350

Val Phe Trp Gln Glu Met Leu Gly His Glu Asp Ile Glu Thr Gln Lys
355 360 365

Ala Tyr Lys Gln Phe Lys Val Asp Tyr Ser Glu Pro Glu Gln Pro Val
370 375 380

His Lys Pro Gly Lys Phe Lys Ser Arg Ala Glu Ala Leu Ala Ala Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asn Glu Asp Ile Thr Thr Arg Ser Ser Met Ala Lys Ile His
405 410 415

Asp Trp Val Lys Glu Arg Ile Ala Glu Asp Pro Glu Ala Asn Ile Thr
420 425 430

Gln Ser Leu Ile Thr Arg Glu Leu Gly Ser Gly Arg Lys Val Ile Lys
435 440 445

Asp Tyr Leu Asp Leu Ala Asp Asp Ala Leu Ala Val Val Asn Thr Pro
450 455 460

Val Asp Asp Ala Val Val Glu Val Pro Ala Asp Val Pro Ala Ala Glu
465 470 475 480

Lys Gln Pro Lys Lys Ala Gln Lys Pro Arg Leu Val Ala His Gln Val
485 490 495

Asp Asp Glu His Trp Glu Ala Trp Ala Leu Val Glu Gly Glu Glu Val
500 505 510

Ala Arg Val Lys Ile Lys Gly Thr Arg Val Glu Ala Met Thr Ala Ala
515 520 525

Trp Glu Ala Ser Gln Lys Ala Leu Asp Asp
530 535

<210> 9
<211> 4055
<212> DNA
<213> 大腸桿菌噬菌體N15

<400> 9
catagcact aiaatcatatc tcaatlaagg aacatatcag cacacaattg cccattatac 60
ggcggtataa tggactattg tglgtgata aggagaacat aagcgcagaa caatatgtat 120
ctattccggg gttgtgttcc ttgtttattc tgcattatg ttctcttata gtgtgacgaa 180
agcagcataa ttaatcgta cttgttcttt gatgtgttta cgatatccag agacttagaa 240
acgggggaac cgggatgagc aagglaaaaa tcggtaggtt gatcaacacg cttgtgaatg 300
aggtagaggc aattgatgcc tcagaccgcc cacaaggcga caaaacgaag agaattaaag 360
ccgcagccgc acggtataag aacgcgttat ttaatgataa aagaaagttc cgtgggaaag 420
gattgcagaa aagaataacc gcaatactt ttaacgccta tatgagcagg gcaagaaagc 480
ggtttgatga taaattacat catagctttg ataaaaatat taataaaita tcggaaaagt 540
atcctcttta cagcgaagaa ttatcttcat ggctttctat gcctacggct aatattcgcc 600
agcacatgtc atcggtacaa tctaaattga aagaataat gccgcttgcc gaagagttat 660
caaatgtaag aataggetct aaaggcagtg atgcaaaaat agcaagacta ataaaaaaat 720
atccagattg gagttttgct cttagtatt taaacagtga tgattggaag gagcgccgtg 780
actatcttta taagttattc caacaaggct ctgcgttgti agaagaacta caccagctca 840
aggtaacca tgaggttctg taccatctgc agctaagccc tgcggagcgt acatctatac 900
agcaacgatg ggccgatgtt ctgcgcgaga agaagcgtaa tgttgtgtt attgaetacc 960
caacatacat gcagtcatac tatgatattt tgaataatcc tgcgaattta tttagtttaa 1020
acactcgttc tggaatggca cctttggcct ttgctctggc tgcggtatca gggcgaagaa 1080
tgattgagat aatgtttcag ggtgaatttg ccgttcagg aaagtatac gtttaattct 1140
cagggcaagc taaaaaacgc tctgaagata aaagcgtaac cagaacgatt tatactttat 1200

gcgaagcaaa attattcggtt gaattattaa cagaattgcg ttcttgctct gctgcaictg	1260
atttcgatga gggtgttaaa ggatatggaa aggatgatac aaggctctgag aacggcagga	1320
taaattgctat tttagcaaaa gcatttaacc cttaggttaa atcatttttc ggcgatgacc	1380
gtcgtgttta taaagatagc cgcgctatit acgctcgcat cgcttatgag atgtttctcc	1440
gcgtcgatcc acggiggaaa aacgtcgacg aggatgigt ttcctatggag attctcggac	1500
acgacgaiga gaacaccag ctcacalala agcagttcaa gctggccaac ttctccagaa	1560
ccggcgacc tgaagtggg gatgaaaaca ccaggctggt ggctctgcag aaactggacg	1620
atgaaatgcc aggttttgc agaggtagc ctggcgctcg tctccatgaa accgttaagc	1680
agctgggtga gcaggaccca tcagcaaaaa taaccaacag cactctccgg gcctttaaat	1740
ttagcccgac gatgattagc cggtaacctgg agtttgcgc tgaigcattg gggcagttcg	1800
ttggcgagaa cgggcagttg cagctgaaga tagagacacc tgcaatcgtc ctgcctgatg	1860
aagaatccgt tgagaccatc gacgaaccgg atgatgagtc ccaagacgac gagctggatg	1920
aagatgaaat tgagctcgac gagggtggcg gcgatgaacc aaccgaagag gaagggccag	1980
aagaacatca gccaaactgt ctaaaacccg tcttcaagcc tgcaaaaaat aacggggacg	2040
gaacgtacaa galagagttt gaatacgtg gaaagcatia tgcttggtcc ggccccgccg	2100
atagccctat ggccgcaatg cgatccgcat gggaaacgtc ctacagctaa aagaaaagcc	2160
accggtgita atcgggtggct tttttatiga ggcttgctcc taacctccc ctgcaaggga	2220
cgggaaggatt agggcgaaac tgcagctgca actacggaca tcgccgtccc gactgcaggg	2280
acttccccgc gtaaagcggg gcttaaatc gggttgacca accctatit tctgcaatcg	2340
ctggcgatgt tagtttcgtg galagcgttt ccagctttc aatggccagc tcaaatgtg	2400
ctggcagcac ctctccagt tccgtatcaa tatcgggat cggcagctct ccacaagaca	2460
tactccggcg accgccacga actacatcgc gcagcagctc ccgttcgtag acacgcatgt	2520
tgcccagagc cgtttctgca gccgttaata tccggcgcac gtccggcatg attgccggga	2580
galcatccac ggttattggg ttccgtgalt ggttcttga ggccggcgag agagccatcc	2640
agacgccgct aaccatgcg ttacgggtact gaaaacttgg tgctatgtcg ttatcaggc	2700
ccgaagtct tctttctgcc gccagtcag tggttcaccg gcgttcttag gctcaggctc	2760
gacaaaagca tactcgccgt ttttcggat agctggcaga acctcgctcg tcaccacctt	2820
gcggaaccgc caggctgtcg tccctgttt caccgcgtcg cggcagcgga ggattatggt	2880
gtagagacca gattccgata ccacatttac ttccctggcc atccgatcaa gtttttgtgc	2940
ctcgggttaaa ccgagggtca atttttcatc atgatccagc ttacgcaatg catcagaagg	3000
gttggctata ttcaatgcag cacagatata cagcgccaca aaccacgggt caccaccgac	3060
aagaaccacc cgtatagggt ggctttctct aaatgaaaag acggagagag ccttcattgc	3120
gcctccccgg atttcagctg ctcaaaaagg gacagggagc agccgcgagc ttctgcgtg	3180

agttcgcgcg cgacctgcag aagttecgcg gcttccctgca aatacagcgt ggcctcataa 3240
ctggagatag tgcggtgagc agagcccaca agcgcttcaa cctgcagcag gcgttccctca 3300
atcgtctcca gcaggccctg ggcgttttaac tgaatctggt tcatgcgac accctcgctga 3360
ccgggatacg ggcctgacaga acgaggacaa aacggctggc gaactggcga cgagcttctc 3420
gctcggatga tgcaatggtg gaaaggcggg ggatatggga tttttgtcc gtcgggacga 3480
cagctgcaaa ttggaatttg aacatggtat gcattccctat cttgtatagg gtgctaccac 3540
cagagttgag aatctctata ggggttggtag ccagacaggg gtcttcaaca ccggtacaag 3600
aagaaaccgg cccaaccgaa gtgggccccca tctgagccac cataattcag gtatgcgcag 3660
atttaacaca caaaaaaaca cgcctggcgcg tgttgtagcg tctttgtcat tcggggitga 3720
gaggccccgc tgcagattti gctgcagcgg ggttaactcta ccgccaaagc agaacgcacg 3780
tcaataattt aggtggatat ttaccacct gaccagtcac gtgcacaggt gtittttatag 3840
tttgetttac tgactgatca gaacctgac agttattgga gtccggtaat ctatttgaig 3900
accgcagcca ccttagatgt tgtctcaaac ccatacggc caggaatgag ccactggaac 3960
ggaatagtea gcaggtagag cggaacgaac cacaaacggg tcagacgctg ccagaacgtc 4020
gcatcacgac gtcccatcca ttccgtattg tcgac 4055

<210> 10
<211> 631
<212> PRT
<213> 大腸桿菌噬菌體N15

<400> 10
Met Ser Lys Val Lys Ile Gly Glu Leu Ile Asn Thr Leu Val Asn Glu
1 5 10 15

Val Glu Ala Ile Asp Ala Ser Asp Arg Pro Gln Gly Asp Lys Thr Lys
20 25 30

Arg Ile Lys Ala Ala Ala Ala Arg Tyr Lys Asn Ala Leu Phe Asn Asp
35 40 45

Lys Arg Lys Phe Arg Gly Lys Gly Leu Gln Lys Arg Ile Thr Ala Asn
50 55 60

Thr Phe Asn Ala Tyr Met Ser Arg Ala Arg Lys Arg Phe Asp Asp Lys
65 70 75 80

Leu His His Ser Phe Asp Lys Asn Ile Asn Lys Leu Ser Glu Lys Tyr
85 90 95

Pro Leu Tyr Ser Glu Glu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Met Pro Thr Ala
100 105 110

Asn Ile Arg Gln His Met Ser Ser Leu Gln Ser Lys Leu Lys Glu Ile
115 120 125

Met Pro Leu Ala Glu Glu Leu Ser Asn Val Arg Ile Gly Ser Lys Gly
130 135 140

Ser Asp Ala Lys Ile Ala Arg Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Asp Trp Ser
145 150 155 160

Phe Ala Leu Ser Asp Leu Asn Ser Asp Asp Trp Lys Glu Arg Arg Asp
165 170 175

Tyr Leu Tyr Lys Leu Phe Gln Gln Gly Ser Ala Leu Leu Glu Glu Leu
180 185 190

His Gln Leu Lys Val Asn His Glu Val Leu Tyr His Leu Gln Leu Ser
195 200 205

Pro Ala Glu Arg Thr Ser Ile Gln Gln Arg Trp Ala Asp Val Leu Arg
210 215 220

Glu Lys Lys Arg Asn Val Val Val Ile Asp Tyr Pro Thr Tyr Met Gln
225 230 235 240

Ser Ile Tyr Asp Ile Leu Asn Asn Pro Ala Thr Leu Phe Ser Leu Asn
245 250 255

Thr Arg Ser Gly Met Ala Pro Leu Ala Phe Ala Leu Ala Ala Val Ser
260 265 270

Gly Arg Arg Met Ile Glu Ile Met Phe Gln Gly Glu Phe Ala Val Ser
275 280 285

Gly Lys Tyr Thr Val Asn Phe Ser Gly Gln Ala Lys Lys Arg Ser Glu
290 295 300

Asp Lys Ser Val Thr Arg Thr Ile Tyr Thr Leu Cys Glu Ala Lys Leu
305 310 315 320

Phe Val Glu Leu Leu Thr Glu Leu Arg Ser Cys Ser Ala Ala Ser Asp
325 330 335

Phe Asp Glu Val Val Lys Gly Tyr Gly Lys Asp Asp Thr Arg Ser Glu
340 345 350

Asn Gly Arg Ile Asn Ala Ile Leu Ala Lys Ala Phe Asn Pro Trp Val
355 360 365

Lys Ser Phe Phe Gly Asp Asp Arg Arg Val Tyr Lys Asp Ser Arg Ala
370 375 380

Ile Tyr Ala Arg Ile Ala Tyr Glu Met Phe Phe Arg Val Asp Pro Arg

[illegible]

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (5)..(6)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (9)..(10)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (13)..(14)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (17)..(18)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<400> 11
ncatnntann cgnntannat gn 22

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 12
ccattatagc cgcgtataat gg 22

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 13
gcatactacg cgcgtagtat gc 22

<210> 14

<211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 14 ccatactata cgtatagtat gg	22
<210> 15 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 15 gcatactata cgtatagtat gc	22
<210> 16 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 16 attatatata taat	14
<210> 17 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 17 ggcatactat acgtatagta tgcc	24
<210> 18 <211> 42 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 18 acctatttca gcatactacg cgcgtagtat gctgaaatag gt	42
<210> 19 <211> 90 <212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 19	
cctatatattgg gccacctaig tatgcacagt tgcgccatac tatacgtata gtatgggcga	60
actgtgcata cataggtggc ccaatatagg	90
<210> 20	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 20	
tatcagcaca caattgccca ttatacgcgc gtataatgga ctattgtgtg ctgata	56
<210> 21	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 21	
atgcgcgcga ccattatacg cgcgtataat ggcgataata ca	42
<210> 22	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 22	
tagtcaccta tttcagcata ctacgcgcgt agtatgctga aatagggttac tg	52
<210> 23	
<211> 90	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 23	
gggatcccggt tccatacata catgtatcca tgtggcatac tatacgtata gtatgccgat	60
gttacatatg gtatcattcg ggatcccggt	90
<210> 24	

<211> 38 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 24	38
tactaaataa atattatata tataattttt tattagta	
<210> 25 <211> 56 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 25	56
tatacgcaca caattgccca ttatacgcgc gtataatggg caattgtgtg ctgata	
<210> 26 <211> 56 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸	
<400> 26	56
tatacgcaca caatagicca ttatacgcgc gtataatgga ctattgtgtg ctgata	



201936201

【發明摘要】

【中文發明名稱】

基因之非病毒生產及遞送

【英文發明名稱】

NON-VIRAL PRODUCTION AND DELIVERY OF GENES

【中文】

本文所述之發明係關於可容易擴增及大量生產之封閉末端雙股DNA (cdsDNA)的產生，該封閉末端雙股DNA用於例如治療用途，諸如基因療法。

【英文】

The invention described herein pertains to the production of closed-end double-stranded DNA (cdsDNA) that can be easily amplified and produced in large quantity, for use in, for example, therapeutic use, such as gene therapy.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

1. 一種DNA構築體，其包含：

(1) 骨架序列，其包含在真核(例如哺乳動物)或原核細胞中支持自我複製之序列；

(2) 嵌段，其包含：

(a) 所關注之DNA片段；

(b) 側接該所關注之DNA片段的一對末端序列，其中該等末端序列為雙股DNA病毒之反向末端重複序列(ITR)、DNA病毒(諸如HSV)之長末端重複序列(LTR)或內部重複序列、或端粒序列；及

(c) 側接該一對ITR或LTR之一對原核端粒酶識別序列。

【第2項】

如請求項1之DNA構築體，其中該等原核端粒酶識別序列中之至少一者包含至少14 bp長度之完美反向重複DNA序列或其變體。

【第3項】

如請求項1之DNA構築體，其中該等原核端粒酶識別序列中之至少一者包含嗜溫性噬菌體完美反向重複序列之22 bp共同序列。

【第4項】

如請求項1之DNA構築體，其中該等原核端粒酶識別序列中之至少一者來自大腸桿菌噬菌體N15 (諸如由大腸桿菌N15 TelN原核端粒酶識別之大腸桿菌噬菌體)、土壤桿菌克雷伯氏菌(*Klebsiella*)噬菌體Phi KO2、耶爾森氏菌(*Yersinia*)噬菌體PY54、鹽單胞菌(*Halomonas*)噬菌體phiHAP-1及弧菌(*Vibrio*)噬菌體VP882，或伯氏疏螺旋體(*Borrelia burgdorferi*)。

【第5項】

如請求項1之DNA構築體，其中該等原核端粒酶識別序列中之至少一者包含至少30個、至少40個、至少60個、至少80個或至少100個鹼基對長度之完美反向重複序列。

【第6項】

如請求項1之DNA構築體，其中該所關注之DNA片段包含在真核啟動子及/或增強子控制下/可操作地連接於真核啟動子及/或增強子之所關注之編碼序列，及視情況選用之真核轉錄終止序列。

【第7項】

如請求項6之DNA構築體，其中該所關注之編碼序列包含編碼以下抗原之DNA疫苗：

(1) 用於治療或預防諸如癌症、過敏症、毒性及病原體感染之病況(例如，真菌，病毒，諸如人類乳頭瘤病毒(HPV)、HIV、HSV2/HSV1、流感病毒(A、B及C型)、脊髓灰質炎病毒、RSV病毒、鼻病毒、輪狀病毒、A型肝炎病毒、諾沃克病毒組(Norwalk Virus Group)、腸病毒、星狀病毒、麻疹病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、水痘-帶狀疱疹病毒、細胞巨大病毒、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)、腺病毒、風疹病毒、人類T細胞淋巴瘤I型病毒(HTLV-I)、B型肝炎病毒(HBV)、C型肝炎病毒(HCV)、D型肝炎病毒、痘病毒、馬爾堡(Marburg)及埃博拉(Ebola))；細菌(諸如結核分枝桿菌(Mycobacterium tuberculosis)、披衣菌屬(Chlamydia)、淋病奈瑟氏菌(Neisseria gonorrhoeae)、志賀桿菌屬(Shigella)、沙門氏菌屬(Salmonella)、霍亂弧菌(Vibrio cholerae)、梅毒螺旋體(Treponema pallidum)、假單胞菌屬(Pseudomonas)、百日咳博德

特氏菌(*Bordetella pertussis*)、布氏桿菌屬(*Brucella*)、土拉熱弗朗西絲菌(*Francisella tularensis*)、幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)、鉤端螺旋體(*Leptospira interrogans*)、嗜肺性退伍軍人桿菌(*Legionella pneumophila*)、鼠疫耶爾森氏菌(*Yersinia pestis*)、鏈球菌屬(*Streptococcus*)(A型及B型)、肺炎球菌屬(*Pneumococcus*)、腦膜炎雙球菌屬(*Meningococcus*)、流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenza*)(b型)、剛地弓形蟲(*Toxoplasma gondii*)、彎曲桿菌病(*Campylobacteriosis*)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、多諾萬病(*Donovanosis*)及放線菌病(*Actinomycosis*)；真菌病原體(諸如念珠菌病(*Candidiasis*)及麴菌病(*Aspergillosis*))；寄生蟲病原體(諸如絛蟲屬(*Taenia*)、吸蟲、蛔蟲、阿米巴病(*Amoebiasis*)、梨形鞭毛蟲病(*Giardiasis*)、隱孢子蟲屬(*Cryptosporidium*)、住血吸蟲屬(*Schistosoma*)、肺炎肺囊蟲(*Pneumocystis carinii*)、滴蟲病(*Trichomoniasis*)及旋毛蟲病(*Trichinosis*)；

(2) 來自腺病毒科(*adenoviridae*)(例如人類腺病毒)、疱疹病毒科(*herpesviridae*)(例如HSV-1、HSV-2、EBV、CMV及VZV)、乳多空病毒科(*papovaviridae*)(例如HPV)、痘病毒科(*poxviridae*)(例如天花及牛痘)、細小病毒科(*parvoviridae*)(例如小病毒B19)、呼腸孤病毒科(*reoviridae*)(例如輪狀病毒)、冠狀病毒科(*coronaviridae*)(例如SARS)、黃病毒科(*flaviviridae*)(例如黃熱病、西尼羅河病毒、登革熱、C型肝炎及蜱媒腦炎)、小核糖核酸病毒科(*picornaviridae*)(例如脊髓灰質炎、鼻病毒及A型肝炎)、披膜病毒科(*togaviridae*)(例如風疹病毒)、絲狀病毒科(*filoviridae*)(例如馬爾堡及埃博拉)、副黏病毒科(*paramyxoviridae*)(例如

副流感病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎及麻疹)、彈狀病毒科(rhabdoviridae)(例如狂犬病病毒)、布尼亞病毒科(bunyaviridae)(例如漢坦病毒(Hantaan virus))、正黏病毒科(orthomyxoviridae)(例如A型、B型及C型流感病毒)、反轉錄病毒科(retroviridae)(例如HIV及HTLV)及肝DNA病毒科(hepadnaviridae)(例如B型肝炎)之成員；

(3) 來自造成獸醫學疾病之病原體，諸如病毒病原體、呼腸孤病毒(例如非洲馬病或藍舌病毒)及疱疹病毒(例如馬疱疹)、口蹄疫病毒、蜱媒腦炎病毒、登革熱病毒、SARS、西尼羅河病毒及漢坦病毒；

(4) 來自免疫缺陷病毒，諸如SIV或貓免疫缺陷病毒；

(5) 係新抗原(例如由癌症/腫瘤中之突變基因編碼)、腫瘤抗原，諸如睪丸抗原(例如MAGE家族之成員(MAGE 1、2、3等)、NY-ESO-1及SSX-2)、分化抗原(例如酪胺酸酶、gp100、PSA、Her-2及CEA)、突變的自身抗原及病毒性腫瘤抗原(例如來自致癌HPV類型之E6及/或E7)、MART-1、Melan-A、p97、 β -HCG、GaINAc、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-4、MAGE-12、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC18、CEA、DDC、P1A、EpCam、黑素瘤抗原gp75、Hker 8、高分子量黑素瘤抗原、K19、Tyr1、Tyr2、pMel 17基因家族之成員、c-Met、PSM (前列腺黏蛋白抗原)、PSMA (前列腺特異性膜抗原)、前列腺分泌蛋白、 α -胎蛋白、CA 125、CA 19.9、TAG-72、BRCA-1及BRCA-2抗原。

【第8項】

如請求項6之DNA構築體，其中該所關注之編碼序列包含用於基因療法之治療性DNA分子，其中該治療性DNA分子：

(1) 在患有由該功能基因之功能異常形式(例如杜興氏肌肉萎縮症

(Duchenne muscular dystrophy)、囊腫性纖維化、高歇氏病(Gaucher's Disease)及腺苷脫胺酶(ADA)缺乏症、發炎疾病、自體免疫、慢性及感染性疾病、AIDS、癌症、神經疾病、心血管疾病、高膽固醇血症、各種血液病症(包括各種貧血症、地中海貧血症及血友病，及肺氣腫)及實體腫瘤之基因)引起之基因病症的個體中表現該功能基因；

(2) 編碼毒性肽(亦即化學治療劑，諸如蓖麻毒素、白喉毒素及眼鏡蛇毒因子)、腫瘤抑制基因(諸如p53)、編碼轉化致癌基因之反義mRNA序列的基因、諸如腫瘤壞死因子(TNF)及其他細胞介素之抗腫瘤肽、或轉化致癌基因之反式顯性陰性突變體；

(3) 編碼活性RNA形式(例如小干擾RNA (siRNA、miRNA、shRNA)或小活化RNA (saRNA)；或

(4) 編碼CRISPR/Cas組分(諸如Cas9酶或sgRNA)。

【第9項】

一種封閉末端雙股DNA (cdsDNA)，其係藉由使如請求項1至8中任一項之DNA構築體與識別該一對原核端粒酶識別序列之原核端粒酶接觸而產生。

【第10項】

一種封閉末端雙股DNA (cdsDNA)，其包含：

(a) 所關注之DNA片段；

(b) 側接該所關注之DNA片段的一對末端序列，其中該等末端序列為雙股DNA病毒之反向末端重複序列(ITR)、DNA病毒(諸如HSV)之長末端重複序列(LTR)或內部重複序列、或端粒序列；及

(c) 側接該一對末端序列之一對半原核端粒酶識別序列，其中該等

半原核端粒酶識別序列中之每一者形成該cdsDNA之一個封閉末端。

【第11項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項9或10之cdsDNA。

【第12項】

如請求項11之醫藥組合物，其中該cdsDNA係由奈米粒子包圍。

【第13項】

如請求項12之醫藥組合物，其中該奈米粒子為SNALP (穩定核酸-脂質 粒 子)、AtuPLEX、DACC、DBTC、RONDEL、DPC (Dynamic PolyConjugate)、SMARTICLE、DiLA²或EnCore。

【第14項】

一種產生無細胞封閉末端雙股DNA (cdsDNA)之方法，該方法包含：

- (1) 在該真核(例如哺乳動物)或原核細胞中擴增該DNA構築體後，分離如請求項1至8中任一項之DNA構築體；
- (2) 使用不會在該嵌段內消解之核酸內切酶使該DNA構築體線性化；
- (3) 使該DNA構築體與識別該對原核端粒酶識別序列之原核端粒酶接觸，以釋放該cdsDNA；
- (4) 在步驟(2)及(3)之後，用核酸外切酶移除不是cdsDNA之線性化DNA構築體或其片段；
- (5) 富集或純化該cdsDNA。

【第15項】

如請求項14之方法，其中步驟(2)及(3)以任何順序或同時，均在步驟(1)之後進行。

【第16項】

一種產生封閉末端雙股DNA (cdsDNA)之方法，該方法包含：

- (1) 在該真核(例如哺乳動物)或原核細胞中擴增該DNA構築體後，分離如請求項1至8中任一項之DNA構築體；
- (2) 使該DNA構築體與識別該一對原核端粒酶識別序列之原核端粒酶接觸，以釋放該cgsDNA；
- (3) 富集或純化該cgsDNA。

【第17項】

如請求項14至16中任一項之方法，其其進一步包含將cgsDNA囊封於奈米粒子(諸如SNALP、AtuPLEX、DACC、DBTC、RONDEL、DPC、SMARTICLE、DiLA²或EnCore)中。

【第18項】

一種將所關注之靶基因(GOI)遞送至靶細胞中之活體外或離體方法，該方法包含使該靶細胞在活體外或離體，與包含如請求項10之cgsDNA的組合物接觸。

【第19項】

一種包含如請求項10之cgsDNA之組合物或如請求項11至13中任一項之醫藥組合物的用途，其係用於製造將所關注之靶基因(GOI)活體內遞送至靶細胞中之藥物。

【第20項】

如請求項19之用途，其中該靶GOI為野生型迷你-或微型肌縮蛋白基

因、DMD途徑中或與DMD之基因修飾物相關之基因，且其中該靶細胞為人類之肌肉(例如骨骼肌，諸如脛骨前肌細胞、心肌或平滑肌)細胞。

