(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099185
(43) 공개일자 2024년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/67 (2006.01) *C12N 7/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/67 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7012678
(22) 출원일자(국제) 2022년09월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/043808
(87) 국제공개번호 WO 2023/044006
국제공개일자 2023년03월23일
(30) 우선권주장
63/245,354 2021년09월17일 미국(US)

(71) 출원인
플래그쉽 파이어니어링 이노베이션스 브이아이, 엘엘씨
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 55 캠브리지 파크웨이 8 플로어
(72) 발명자
더드킨, 바딤
미국 02142 메사추세츠 케임브릿지 케임브릿지 파크웨이 55 8쓰 플로어
백, 기, 영
미국 02142 메사추세츠 케임브릿지 케임브릿지 파크웨이 55 8쓰 플로어
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

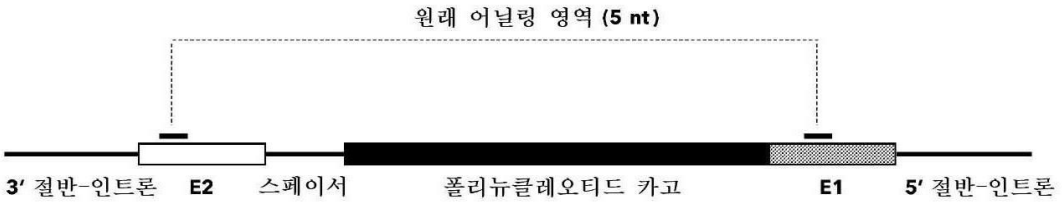
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 **원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 원형 RNA를 생성하고, 정제하고, 사용하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 2310/532 (2013.01)
C12N 2770/20022 (2013.01)
C12N 2770/20051 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)
C12N 2840/203 (2013.01)
(72) 발명자
데 보어, 알렉산드라, 소피
미국 02142 메사추세츠 케임브릿지 케임브릿지 파크웨이 55 8쓰 플로어
넬슨, 제니퍼, 에이.
미국 02142 메사추세츠 케임브릿지 케임브릿지 파크웨이 55 8쓰 플로어

명 세 서

청구범위

청구항 1

식 5'-(A)-(B)-(C)-(D)-(E)-(F)-(G)-3'를 갖는, 선형 폴리리보뉴클레오티드:

상기 식에서,

(A)는 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반을 포함하고;

(B)는 3' 스플라이스 부위를 포함하고;

(C)는 3' 엑손 단편을 포함하고;

(D)는 폴리리보뉴클레오티드 카고를 포함하고;

(E)는 5' 엑손 단편을 포함하고;

(F)는 5' 스플라이스 부위를 포함하고;

(G)는 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반을 포함하고;

(A), (B), 또는 (C)는 8 내지 50개의 리보뉴클레오티드를 포함하는 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E), (F), 또는 (G)는 8 내지 50개의 리보뉴클레오티드를 포함하는 제2 어닐링 영역을 포함하고,

제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 80% 내지 100% 상보성을 갖거나,

제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 0 내지 10개의 미스매칭된 염기 쌍을 포함한다.

청구항 2

제1항에 있어서, (A) 또는 (C)는 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E) 또는 (G)는 제2 어닐링 영역을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 어닐링 영역은 10 내지 30개의 리보뉴클레오티드를 포함하고, 제2 어닐링 영역은 10 내지 30개의 리보뉴클레오티드를 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 어닐링 영역은 10 내지 20개의 리보뉴클레오티드를 포함하고, 제2 어닐링 영역은 10 내지 20개의 리보뉴클레오티드를 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 어닐링 영역은 10 내지 15개의 리보뉴클레오티드를 포함하고, 제2 어닐링 영역은 10 내지 15개의 리보뉴클레오티드를 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 90% 내지 100% 상보성을 갖는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 0 또는 1개의 미스매칭된 염기 쌍을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 100% 상보적인, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나(Anabaena) 프리-tRNA-Leu 유전자, 또는 테트라히메나(Tetrahymena) 프리-rRNA로부터의 것인, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 12

제1항에 있어서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자로부터의 것이고,

(C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 13

제12항에 있어서, 제1 어닐링 영역은 10 내지 15개의 리보뉴클레오티드를 포함하고, 제2 어닐링 영역은 10 내지 15개의 리보뉴클레오티드를 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 14

제1항에 있어서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 테트라히메나 프리-rRNA로부터의 것이고,

(A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 15

제14항에 있어서, 제1 어닐링 영역은 10 내지 16개의 리보뉴클레오티드를 포함하고, 제2 어닐링 영역은 10 내지 16개의 리보뉴클레오티드를 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 16

제1항에 있어서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 T4 파지 td 유전자로부터의 것이고, (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 제2 어닐링 영역을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 17

제16항에 있어서, 제1 어닐링 영역은 2 내지 16개의 리보뉴클레오티드를 포함하고, 제2 어닐링 영역은 2 내지 16개의 리보뉴클레오티드를 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 선형 폴리뉴클레오티드의 5' 말단인, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 말단인, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 어닐링 영역을 포함하지 않는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, (G)에 대해 5'에 어닐링 영역과의 부분적 또는 완전한 핵산 상보성을 포함하는 (A)에 대해 3'에 어닐링 영역을 포함하지 않는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 발현 서열, 비-코딩 서열, 또는 발현 서열 및 비-코딩 서열을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 IRES를 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 대상체에 대한 생물학적 효과를 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, (C)의 3' 엑손 단편과 (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고 사이에 제1 스페이서 영역을 추가로 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고와 (E)의 5' 엑손 단편 사이에 제2 스페이서 영역을 추가로 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 각각의 스페이서 영역은 적어도 5개의 리보뉴클레오티드의 길이인, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 29

제28항에 있어서, 각각의 스페이서 영역은 5 내지 500개의 리보뉴클레오티드의 길이인, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A 서열을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 31

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A-C 서열을 포함하는, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 300 내지 20,000개의 리보뉴클레오티드의 길이인, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1,000개의 리보뉴클레오티드의 길이인, 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 34

제33항에 있어서, 적어도 3,000개의 리보뉴클레오티드의 길이인 선형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 선형 폴리리보뉴클레오티드를 코딩하는 DNA 서열에 작동가능하게 연결된 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함하는 DNA 벡터.

청구항 36

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항의 선형 폴리리보뉴클레오티드로부터 또는 제35항의 DNA 벡터로부터 생성된 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 37

5' 엑손 단편 및 3' 엑손 단편을 연결시키는 스플라이스 연접부를 포함하는 원형 폴리리보뉴클레오티드로서,

여기서 3' 엑손 단편은 8 내지 50개의 리보뉴클레오티드를 포함하는 제1 어닐링 영역을 포함하고, 5' 엑손 단편은 8 내지 50개의 리보뉴클레오티드를 포함하는 제2 어닐링 영역을 포함하고,

제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 80% 내지 100% 상보성을 포함하거나, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 0 내지 10개의 미스매칭된 염기 쌍을 포함하는, 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 38

제37항에 있어서, 폴리리보뉴클레오티드 카고를 추가로 포함하는, 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 39

제38항에 있어서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 발현 서열, 비-코딩 서열, 또는 발현 서열 및 비-코딩 서열의 조합을 포함하는, 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 40

제39항에 있어서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열을 포함하는, 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 41

제40항에 있어서, 폴리리보뉴클레오티드는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 IRES를 포함하는, 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 42

제41항에 있어서, IRES와 3' 엑손 단편 또는 5' 엑손 단편 사이에 스페이서 영역을 추가로 포함하는, 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 43

제42항에 있어서, 스페이서 영역은 적어도 5개의 리보뉴클레오티드의 길이인 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 44

제43항에 있어서, 스페이서 영역은 5 내지 500개의 리보뉴클레오티드의 길이인 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 스페이서 영역은 폴리A 서열을 포함하는, 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 46

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 스페이서 영역은 폴리A-C 서열을 포함하는, 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 47

제37항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 500개의 리보뉴클레오티드의 길이인 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 48

제47항에 있어서, 500 내지 20,000개의 리보뉴클레오티드의 길이인 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 49

제37항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항의 선형 폴리리보뉴클레오티드로부터 또는 제33항의 벡터로부터 생성된 원형 폴리리보뉴클레오티드.

청구항 50

세포에서 폴리펩티드를 발현시키는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 선형 폴리리보뉴클레오티드, 제35항의 DNA 벡터, 또는 제36항 내지 제49항 중 어느 한 항의 원형 폴리리보뉴클레오티드를 세포에 제공하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 51

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 선형 폴리리보뉴클레오티드로부터 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은 선형 폴리리보뉴클레오티드의 자기-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 선형 폴리리보뉴클레오티드를 제공하여 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하는 것을 포함하는, 방법.

발명의 설명

배 경 기 술

[0001] 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하고, 정제하고, 사용하기 위한 방법에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0002] 본 발명은 원형 RNA를 생성하고, 정제하고, 사용하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0003] 한 양태에서, 본 발명은 식 5'-(A)-(B)-(C)-(D)-(E)-(F)-(G)-3'를 갖는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 특색으로 한다. 선형 폴리리보뉴클레오티드는, 5'에서 3'로, (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; (C) 3' 엑손 단편; (D) 폴리리보뉴클레오티드 카고; (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 및 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반을 포함한다. 폴리리보뉴클레오티드는 2 내지 50개, 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 7 내지 50개, 예를 들어, 8 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,

21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖고 (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; 또는 (C) 3' 엑손 단편 내에 존재하는 제1 어닐링 영역을 포함한다. 폴리리보뉴클레오티드는 또한 2 내지 50개, 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 7 내지 50개, 예를 들어, 8 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖고 (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 또는 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반 내에 존재하는 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 제2 어닐링 영역과 80% 내지 100%(예를 들어, 85% 내지 100%, 예를 들어, 90% 내지 100%, 예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 상보성을 갖거나, 0 내지 10개(예를 들어, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 미스매칭된 염기 쌍을 갖는다.

[0004] 또 다른 양태에서, 본 발명은 식 5'-(A)-(B)-(C)-(D)-(E)-(F)-(G)-3'를 갖는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 특색으로 한다. 선형 폴리리보뉴클레오티드는, 5'에서 3'로, (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; (C) 3' 엑손 단편; (D) 폴리리보뉴클레오티드 카고; (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 및 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반을 포함하고, 여기서 (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나(Anabaena) 프리-tRNA-Leu 유전자로부터의 것이다. 폴리리보뉴클레오티드는 5 내지 50개, 예를 들어, 6 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖고 (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; 또는 (C) 3' 엑손 단편 내에 존재하는 제1 어닐링 영역을 포함한다. 폴리리보뉴클레오티드는 또한 5 내지 50개, 예를 들어, 6 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖고 (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 또는 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반 내에 존재하는 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 제2 어닐링 영역과 80% 내지 100%(예를 들어, 85% 내지 100%, 예를 들어, 90% 내지 100%, 예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 상보성을 갖거나, 0 내지 10개, 예를 들어, (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 미스매칭된 염기 쌍을 갖는다.

[0005] 또 다른 양태에서, 본 발명은 식 5'-(A)-(B)-(C)-(D)-(E)-(F)-(G)-3'를 갖는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 특색으로 한다. 선형 폴리리보뉴클레오티드는, 5'에서 3'로, (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; (C) 3' 엑손 단편; (D) 폴리리보뉴클레오티드 카고; (E) 5' 엑손 단편;(F) 5' 스플라이스 부위; 및 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반을 포함하고, 여기서 (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 테트라히메나(Tetrahymena) 프리-rRNA로부터의 것이다. 폴리리보뉴클레오티드는 6 내지 50개, 예를 들어, 7 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 적어도 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖고 (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; 또는 (C) 3' 엑손 단편 내에 존재하는 제1 어닐링 영역을 포함한다. 폴리리보뉴클레오티드는 또한 6 내지 50개, 예를 들어, 7 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 적어도 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖고 (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 또는 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반 내에 존재하는 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 제2 어닐링 영역과 80% 내지 100%(예를 들어, 85% 내지 100%, 예를 들어, 90% 내지 100%, 예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 상보성을 갖거나, 0 내지 10개, 예를 들어, (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 미스매칭된 염기 쌍을 포함한다.

[0006] 일부 실시 형태에서, (A) 또는 (C)는 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E) 또는 (G)는 제2 어닐링 영역을 포함한다.

[0007] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다.

[0008] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 제2 어닐링 영역을 포함한다.

[0009] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다.

[0010] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 0 또는 1개의 미스매칭된 염기 쌍을 포함한다.

[0011] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 100% 상보적이다.

[0012] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자, 테트라히메나 프리-rRNA, 또는 T4 파지 td 유전자로부터의 것이다.

[0013] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자로부터의 것이고, (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 15개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 어닐링 영역은 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 15개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0014] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 테트라히메나 프리-rRNA로부터의 것이고, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다. 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 어닐링 영역은 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0015] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 5' 그룹 I 촉매 인트론 단편은 T4 파지 td 유전자로부터의 것이다. (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함할 수 있고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 제2 어닐링 영역을 포함할 수 있다. 제1 어닐링 영역은 예를 들어, 2 내지 16개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 어닐링 영역은 예를 들어, 2 내지 16개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0016] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 선형 폴리뉴클레오티드의 5' 말단이다.

[0017] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 말단이다.

[0018] 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 추가의 어닐링 영역을 포함하지 않는다.

[0019] 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 (G)에 대해 5'에 어닐링 영역과의 부분적 또는 완전한 핵산 상보성을 포함하는 (A)에 대해 3'에 어닐링 영역을 포함하지 않는다.

[0020] 일부 실시 형태에서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 발현 서열, 비-코딩 서열, 또는 발현 서열 및 비-코딩 서열을 포함한다.

[0021] 일부 실시 형태에서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열을 포함한다.

[0022] 일부 실시 형태에서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 IRES를 포함한다.

[0023] 일부 실시 형태에서, IRES는 발현 서열의 상류에 위치한다. 일부 실시 형태에서, IRES는 발현 서열의 하류에 위치한다.

[0024] 일부 실시 형태에서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 대상체에 대한 생물학적 효과를 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열을 포함한다.

[0025] 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 (C)의 3' 엑손 단편과 (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고 사

이에 제1 스페이서 영역을 추가로 포함한다. 제1 스페이서 영역은 예를 들어, 적어도 5개(예를 들어, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개)의 리보뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고와 (E)의 5' 엑손 단편 사이에 제2 스페이서 영역을 추가로 포함한다. 제2 스페이서 영역은 예를 들어, 적어도 5개(예를 들어, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개)의 리보뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 각각의 스페이서 영역은 적어도 5개(예를 들어, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개)의 리보뉴클레오티드의 길이이다. 각각의 스페이서 영역은 예를 들어, 5 내지 500개(예를 들어, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500개)의 리보뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A 서열을 포함할 수 있다. 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A-C 서열을 포함할 수 있다. 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A-G 서열을 포함할 수 있다. 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A-T 서열을 포함할 수 있다. 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 무작위 서열을 포함할 수 있다.

[0026] 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 50 내지 20,000개, 예를 들어, 100 내지 20,000개, 예를 들어, 200 내지 20,000개, 예를 들어, 300 내지 20,000개(예를 들어, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000, 10,000, 11,000, 12,000, 13,000, 14,000, 15,000, 16,000, 17,000, 18,000, 19,000, 또는 20,000개)의 리보뉴클레오티드의 길이이다. 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 예를 들어, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 200개, 적어도 300개, 적어도 400개, 적어도 500개, 적어도 1,000개, 적어도 2,000개, 적어도 3,000개, 적어도 4,000개, 또는 적어도 5,000개의 리보뉴클레오티드의 길이이다.

[0027] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 실시 형태 중 임의의 것의 선형 폴리리보뉴클레오티드를 코딩하는 DNA 서열에 작동가능하게 연결된 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함하는 DNA 벡터를 특색으로 한다.

[0028] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 실시 형태 중 임의의 것의 선형 폴리리보뉴클레오티드 또는 DNA 벡터로부터 생성된 원형 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 공유적으로 폐쇄된 원형 폴리리보뉴클레오티드)를 특색으로 한다.

[0029] 또 다른 양태에서, 본 발명은 5' 엑손 단편 및 3' 엑손 단편을 연결시키는 스플라이스 연접부를 갖는 원형 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 공유적으로 폐쇄된 원형 폴리리보뉴클레오티드)를 특색으로 한다. 3' 엑손 단편은 2 내지 50개, 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 7 내지 50개, 예를 들어, 8 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 포함하는 제1 어닐링 영역을 포함하고, 5' 엑손 단편은 2 내지 50개, 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 7 내지 50개, 예를 들어, 8 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 포함하는 제2 어닐링 영역을 포함한다. 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 80% 내지 100%(예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 상보성을 포함한다. 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 0 내지 10개(예를 들어, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 미스매칭된 염기 쌍(bp)을 포함한다. 실시 형태에서, 원형 폴리뉴클레오티드는 폴리리보뉴클레오티드 카고를 추가로 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 발현(또는 코딩) 서열, 비-코딩 서열, 또는 발현(또는 코딩) 서열 및 비-코딩 서열의 조합을 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 폴리펩티드를 코딩하는 발현(코딩) 서열을 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 IRES를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 IRES와 3' 엑손 단편 또는 5' 엑손 단편 사이에 스페이서 영역을 추가로 포함한다. 스페이서 영역은 예를 들어, 적어도 5개(예를 들어, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개)의 리보뉴클레오티드의 길이 리보뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 스페이서 영역은 예를 들어, 5 내지 500개(예를 들어, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500개)의 리보뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은 폴리A 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은 폴리A-C 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은

폴리A-G 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은 폴리A-T 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은 무작위 서열을 포함한다.

[0030] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 50 내지 20,000개, 예를 들어, 100 내지 20,000개, 예를 들어, 200 내지 20,000개, 예를 들어, 300 내지 20,000개(예를 들어, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000, 10,000, 11,000, 12,000, 13,000, 14,000, 15,000, 16,000, 17,000, 18,000, 19,000, 또는 20,000개)의 리보뉴클레오티드의 길이이다. 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 예를 들어, 적어도 500개, 적어도 1,000개, 적어도 2,000개, 적어도 3,000개, 적어도 4,000개, 또는 적어도 5,000개의 리보뉴클레오티드의 길이이다.

[0031] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 본원에 기재된 바와 같은 선형 폴리리보뉴클레오티드 또는 벡터로부터 생성된다.

[0032] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 선형 폴리리보뉴클레오티드, DNA 벡터, 또는 원형 폴리리보뉴클레오티드를 세포에 제공함으로써 세포에서 폴리펩티드를 발현시키는 방법을 특색으로 한다. 방법은 세포 기구가 폴리리보뉴클레오티드로부터 폴리펩티드를 발현시키게 하는 것을 추가로 포함한다.

[0033] 또 다른 양태에서, 본 발명은 선형 폴리리보뉴클레오티드의 자기-스플라이싱에 적합한 조건 하에서 본원에 기재된 바와 같은 선형 폴리리보뉴클레오티드를 제공하여 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성함으로써 본원에 기재된 바와 같은 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하는 방법을 특색으로 한다.

[0034] **정의**

[0035] 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어가 하기에 정의된다. 본원에 정의된 용어는 본 발명과 관련된 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다. 단수 형태 용어는 단수 실체를 지칭하는 것으로 의도될 뿐만 아니라 그의 구체적인 예가 예시를 위해 사용될 수 있는 일반적 부류를 포함한다. "또는"이라는 용어는 단지 대안을 지칭하는 것으로 명백하게 표시되거나 대안이 상호 배타적이지 않는 한, "및/또는"을 의미하기 위해 사용되지만, 본 발명은 단지 대안 및 "및/또는"을 지칭하는 정의를 지지한다. 본원에서의 용어는 구체적인 실시 형태를 기재하기 위해 사용되지만, 그들의 용법은 청구범위에 개요된 것을 제외하고는, 제한적인 것으로 취해지지 않아야 한다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같이, 값의 범위로 제공된 임의의 값은 상계 및 하계 둘 모두, 및 상계 및 하계 내에 함유된 임의의 값을 포함한다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같이, "약"이라는 용어는 나열된 값의 ± 10% 이내인 값을 지칭한다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, "담체"라는 용어는 부분적으로 또는 완전히 캡슐화제를 통해, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 공유 변형에 의해 세포 내로의 조성물(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드)의 수송 또는 전달을 용이하게 하는 화합물, 조성물, 시약, 또는 분자, 또는 이들의 조합이다. 담체의 비제한적인 예는 탄수화물 담체(예를 들어, 무수물-변형 피토글리코겐 또는 글리코겐-유형 물질), 나노입자(예를 들어, 캡슐화하거나 공유적으로 연결된 나노입자는 원형 폴리리보뉴클레오티드에 결합함), 리포좀, 푸소좀, 생체외 분화된 망상적혈구, 엑소좀, 단백질 담체(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드에 공유적으로 연결된 단백질), 또는 양이온성 담체(예를 들어, 양이온성 지질중합체 또는 형질감염 시약)를 포함한다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같이, "원형 폴리리보뉴클레오티드" 및 "원형 RNA"라는 용어는 상호교환 가능하게 사용되며, 유리 단부를 갖지 않는(즉, 유리 3' 또는 5' 단부를 갖지 않는) 구조를 갖는 폴리리보뉴클레오티드 분자, 예를 들어 공유 또는 비-공유 결합을 통해 원형 또는 단부 없는 구조를 형성하는 폴리리보뉴클레오티드 분자를 의미한다. 원형 폴리리보뉴클레오티드는 예를 들어, 공유적으로 폐쇄된 폴리리보뉴클레오티드일 수 있다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같이, "원형화 효율"이라는 용어는 그의 비-원형 출발 물질 대비 생성된 원형 폴리리보뉴클레오티드의 측정이다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같이, "질환", "장애", 및 "상태"라는 용어는 각각 준최적 건강의 상태, 예를 들어, 전형적으로 의학 전문가에 의해 진단되거나 치료되는 또는 진단되거나 치료될 상태를 지칭한다.

[0042] "이종"은 천연 발생(천연) 맥락 이외의 맥락에서 발생하는 것을 의미한다. "이종" 폴리뉴클레오티드 서열은 폴

리뉴클레오티드 서열이 그 서열의 천연 게놈에서 발견되는 것 이외의 방식으로 사용되고 있음을 나타낸다. 예를 들어, "이종 프로모터"는 그 프로모터에 의해 천연적으로 전사되는 것이 아닌 서열의 전사를 유도하는 데 사용되며; 따라서, "이종 프로모터" 서열은 종종 재조합 핵산 기법에 의해 발현 구축물에 포함된다. "이종"이라는 용어는 또한 주어진 서열이 또 다른 서열에 대해 비-천연 발생 관계에 놓인 것을 지칭하기 위해 사용되며; 예를 들어, 이종 코딩 또는 비-코딩 뉴클레오티드 서열은 통상적으로 게놈 형질전환 기법에 의해 게놈 내로 삽입되어 유전적으로 변형된 또는 재조합 게놈을 발생시킨다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같이 대상체의 "적합성을 증가시키는 것" 또는 "적합성을 촉진시키는 것"은 하기 원하는 효과 중 임의의 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌, 본원에 기재된 펩티드 또는 폴리펩티드의 투여의 결과로서, 대상체 유기체에 의해 수행되는 생리학의, 또는 임의의 활성의 임의의 바람직한 변경을 지칭한다: (1) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 증가된 생물적 또는 비생물적 스트레스의 내성; (2) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 증가된 수율 또는 바이오매스; (3) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 변형된 개화 시간; (4) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 증가된 해충 또는 병원체에 대한 저항성, (4) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 증가된 제초제에 대한 저항성; (5) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 농업적으로 중요한 곤충)의 집단을 증가시키는 것; (6) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)의 번식률을 증가시키는 것; (7) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)의 이동성을 증가시키는 것; (8) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)의 체중을 증가시키는 것; (9) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)의 대사율 또는 활성을 증가시키는 것; (10) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)에 의한 수분(예를 들어, 주어진 양의 시간에 수분되는 식물의 수)을 증가시키는 것; (11) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에) 부산물(예를 들어, 꿀벌로부터의 꿀 또는 누에로부터의 명주)의 생산을 증가시키는 것; (12) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충)의 영양분 함량(예를 들어, 단백질, 지방산, 또는 아미노산)을 증가시키는 것; 또는 (13) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 살충제(예를 들어, 네오니코티노이드(예를 들어, 이미다클로프리드) 또는 유기인 살곤충제(예를 들어, 포스포로티오에이트, 예를 들어, 페니트로티온))에 대한 대상체 유기체의 저항성을 증가시키는 것, (14) 대상체 유기체, 예컨대 인간 또는 비-인간 동물의 건강을 증가시키거나 질환을 감소시키는 것. 숙주 적합성의 증가는 조정제가 투여되지 않은 대상체 유기체와 비교하여 결정될 수 있다. 반대로, 대상체의 "적합성을 감소시키는 것"은 하기 의도된 효과 중 임의의 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌, 본원에 기재된 펩티드 또는 폴리펩티드의 투여의 결과로서, 대상체 유기체에 의해 수행되는 생리학의, 또는 임의의 활성의 임의의 바람직하지 않은 변경을 지칭한다: (1) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 감소된 생물적 또는 비생물적 스트레스의 내성; (2) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 감소된 수율 또는 바이오매스; (3) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 변형된 개화 시간; (4) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 감소된 해충 또는 병원체에 대한 저항성, (4) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 감소된 제초제에 대한 저항성; (5) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 농업적으로 중요한 곤충)의 집단을 감소시키는 것; (6) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)의 번식률을 감소시키는 것; (7) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)의 이동성을 감소시키는 것; (8) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)의 체중을 감소시키는 것; (9) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)의 대사율 또는 활성을 감소시키는 것; (10) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%,

60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에)에 의한 수분(예를 들어, 주어진 양의 시간에 수분되는 식물의 수)을 감소시키는 것; (11) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충, 예를 들어, 벌 또는 누에) 부산물(예를 들어, 꿀벌로부터의 꿀 또는 누에로부터의 명주)의 생산을 감소시키는 것; (12) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 대상체 유기체(예를 들어, 곤충)의 영양분 함량(예를 들어, 단백질, 지방산, 또는 아미노산)을 감소시키는 것; 또는 (13) 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 또는 그 초과만큼 살충제(예를 들어, 네오니코티노이드(예를 들어, 이미다클로프리드) 또는 유기인 살곤충제(예를 들어, 포스포로티오에이트, 예를 들어, 페니트로티온))에 대한 대상체 유기체의 저항성을 감소시키는 것, (14) 대상체 유기체, 예컨대 인간 또는 비-인간 동물의 건강을 감소시키거나 질환을 감소시키는 것. 숙주 적합성의 감소는 조정제가 투여되지 않은 대상체 유기체와 비교하여 결정될 수 있다. 대상체의 생리학, 표현형, 또는 활성의 특정 변화, 예를 들어, 식물에서 개화 시간의 변형은 맥락에 따라(예를 들어, 기후 또는 다른 환경 조건의 변화에 적응하는 것), 대상체의 적합성을 증가시키거나 대상체의 적합성을 감소시키는 것으로 간주될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 개화 시간의 지연(예를 들어, 주어진 달력 표시 일자에서 집단 개화에 있어서 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% 더 적은 식물)은 더 늦거나 더 시원한 봄철에 대한 유익한 적응일 수 있고, 따라서 식물의 적합성을 증가시키는 것으로 간주될 수 있으며; 반대로, 더 이른 또는 더 따뜻한 봄철의 맥락에서 개화 시간의 동일한 지연은 식물의 적합성을 감소시키는 것으로 간주될 수 있다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같이, "선형 RNA" 또는 "선형 폴리리보뉴클레오티드" 또는 "선형 폴리리보뉴클레오티드 분자"라는 용어는 상호교환 가능하게 사용되며, 5' 및 3' 단부를 갖는 폴리리보뉴클레오티드 분자를 의미한다. 5' 및 3' 단부 중 하나 또는 둘 모두는 유리 단부이거나 또 다른 모이어티에 연결될 수 있다. 선형 RNA는 원형화를 겪지 않은(예를 들어, 원형화되기 전인) RNA를 포함하고, 원형화를 위한 출발 물질로서 사용될 수 있다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같이, "변형된 리보뉴클레오티드"라는 용어는 당, 핵염기, 또는 뉴클레오시드간 연결에 대한 적어도 하나의 변형을 갖는 뉴클레오티드를 의미한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같이, "네이키드 전달"이라는 용어는 담체의 보조 없이 및 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 대한 공유 변형 없이 세포에 전달하기 위한 제형이다. 네이키드 전달 제형은 임의의 형질감염 시약, 양이온성 담체, 탄수화물 담체, 나노입자 담체, 또는 단백질 담체가 없다. 예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 네이키드 전달 제형은 공유 변형이 없고 담체가 없는 원형 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 제형이다.

[0047] "제약 조성물"이라는 용어는 또한 제약 조성물 내에 포함되는 원형 또는 선형 폴리리보뉴클레오티드가 요법에 의한 인간 또는 동물 신체의 치료에 사용될 수 있음을 개시하는 것으로 의도된다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같이 "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 하나 이상의 핵산 서브유닛, 또는 뉴클레오티드를 포함하는 분자를 의미하며, "핵산" 또는 "올리고뉴클레오티드"와 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 아데노신(A), 시토신(C), 구아닌(G), 티민(T) 및 우라실(U), 또는 그의 변이체로부터 선택되는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드는 뉴클레오시드 및 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과의 포스페이트(PO3) 기를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드는 핵염기, 5탄당(리보스 또는 데옥시리보스 중 어느 하나), 및 하나 이상의 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 리보뉴클레오티드는 당이 리보스인 뉴클레오티드이다. 폴리리보뉴클레오티드 또는 리보핵산, 또는 RNA는 포스포디에스테르 결합을 통해 중합된 다수의 리보뉴클레오티드를 포함하는 거대 분자를 지칭할 수 있다. 데옥시리보뉴클레오티드는 당이 데옥시리보스인 뉴클레오티드이다. 본원에 사용된 바와 같이, 티민(T)을 나열하는 폴리리보뉴클레오티드 서열은 우라실(U)을 나타내는 것으로 이해된다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, 본원에서 "폴리리보뉴클레오티드 카고"라는 용어는 적어도 하나의 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 임의의 서열을 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 하나 또는 다수의 발현 서열을 포함하고, 여기서 각각의 발현 서열은 폴리펩티드를 코딩한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 하나 또는 다수의 비코딩 서열, 예컨대 조절 또는 촉매 기능을 갖는 폴리리보뉴클레오티드를 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 발현 및 비코딩 서열의 조합을 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 본원에 기재된 하나 이상의 폴리리보뉴클레오티드 서열, 예컨대 하나 또는 다수의 조절 요소, 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 요소, 또는 스페이서 서열을 포함한다.

[0050] 본원에서 상호교환 가능하게 사용된 바와 같이, "폴리A" 또는 "폴리A 서열"이라는 용어는 적어도 5개의 뉴클레오티드의 길이이고 아데노신 잔기로 이루어진 핵산 분자의 비번역된 인접한 영역을 지칭한다. 일부 실시 형태에

서, 폴리A 서열은 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 또는 적어도 50개의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 폴리A 서열은 오픈 리딩 프레임(예를 들어, 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임)에 대해 3'에(예를 들어, 그의 하류에) 위치하고, 폴리A 서열은 폴리A가 번역되지 않도록 종결 요소(예를 들어, 정지 코돈)에 대해 3'이다. 일부 실시 형태에서, 폴리A 서열은 종결 요소 및 3' 비번역된 영역에 대해 3'에 위치한다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같이, 핵산의 요소는, 이들이 전사되어 선형 RNA를 형성할 수 있고, 이는 이어서 본원에서 제공된 방법을 사용하여 원형 RNA로 원형화될 수 있도록 벡터 상에 위치되는 경우, "작동가능하게 연결된다".

[0052] 폴리데옥시리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보핵산, 또는 DNA는 포스포디에스테르 결합을 통해 중합된 다수의 데옥시리보뉴클레오티드를 포함하는 거대분자를 의미한다. 뉴클레오티드는 뉴클레오시드 모노포스페이트 또는 뉴클레오시드 폴리포스페이트일 수 있다. 뉴클레오티드는 검출가능한 태그, 예컨대 발광 태그 또는 마커(예를 들어, 형광단)를 포함하는, 데옥시아데노신 트리포스페이트(dATP), 데옥시시티딘 트리포스페이트(dCTP), 데옥시구아노신 트리포스페이트(dGTP), 우리딘 트리포스페이트(dUTP) 및 데옥시티미딘 트리포스페이트(dTTP) dNTP로부터 선택될 수 있는 데옥시리보뉴클레오시드 폴리포스페이트, 예컨대, 예를 들어, 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트(dNTP)를 의미한다. 뉴클레오티드는 성장하는 핵산 가닥 내로 혼입될 수 있는 임의의 서브유닛을 포함할 수 있다. 이러한 서브유닛은 A, C, G, T, 또는 U, 또는 하나 이상의 상보적 A, C, G, T 또는 U에 대해 특이적이거나, 퓨린(즉, A 또는 G, 또는 그의 변이체) 또는 피리미딘(즉, C, T 또는 U, 또는 그의 변이체)에 대해 상보적인 임의의 다른 서브유닛일 수 있다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오티드는 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 또는 그의 유도체 또는 변이체이다. 일부 경우에, 폴리뉴클레오티드는 약간의 예를 들자면, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA), 플라스미드 DNA(pDNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 소핵 RNA(snRNA), 메신저 RNA(mRNA), 전구체 mRNA(프리-mRNA), 안티센스 RNA(asRNA)이고, 뉴클레오티드 서열 및 그의 임의의 구조적 실시 형태 둘 다, 예컨대 단일-가닥, 이중-가닥, 삼중-가닥, 나선, 헤어핀 등을 포괄한다. 일부 경우에, 폴리뉴클레오티드 분자는 원형이다. 폴리뉴클레오티드는 다양한 길이를 가질 수 있다. 핵산 분자는 적어도 약 10개의 염기, 20개의 염기, 30개의 염기, 40개의 염기, 50개의 염기, 100개의 염기, 200개의 염기, 300개의 염기, 400개의 염기, 500개의 염기, 1 킬로베이스(kb), 2 kb, 3, kb, 4 kb, 5 kb, 10 kb, 50 kb, 또는 그 초과의 길이를 가질 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 세포 또는 조직으로부터 단리될 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 실시 형태는 단리된 및 정제된 DNA/RNA 분자, 합성 DNA/RNA 분자, 및 합성 DNA/RNA 유사체를 포함한다.

[0053] 폴리뉴클레오티드의 실시 형태, 예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드는 비표준 뉴클레오티드(들), 비-천연 뉴클레오티드(들), 뉴클레오티드 유사체(들) 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 변이체를 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 변형된 뉴클레오티드의 예는 디아미노퓨린, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 히포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실퀘오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실퀘오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-D46-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산(v), 와이부톡소신, 슈도우라실, 퀘오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산(v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필) 우라실, (acp3)w, 2,6-디아미노퓨린 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 경우에, 뉴클레오티드는 트리포스페이트 모이어티에 대한 변형을 포함하는 그들의 포스페이트 모이어티의 변형을 포함한다. 이러한 변형의 비제한적인 예는 더 큰 길이의 포스페이트 쇄(예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 포스페이트 모이어티를 갖는 포스페이트 쇄) 및 티올 모이어티를 갖는 변형(예를 들어, 알파-티오트리포스페이트 및 베타-티오트리포스페이트)을 포함한다. 실시 형태에서, 핵산 분자는 염기 모이어티(예를 들어, 전형적으로 상보적 뉴클레오티드와 수소 결합을 형성하는 데 이용가능한 하나 이상의 원자에서 또는 전형적으로 상보적 뉴클레오티드와 수소 결합을 형성할 수 없는 하나 이상의 원자에서), 당 모이어티 또는 포스페이트 백본에서 변형된다. 실시 형태에서, 핵산 분자는 아민-변형된 기, 예컨대 아민 반응성 모이어티, 예컨대 N-히드록시숙신이미드 에스테르(NHS)의 공유 부착을 허용하는 아미노 알릴 1-dUTP(aa-dUTP) 및 아미노헥실아크릴아미드-dCTP(aha-dCTP)를 함유한다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드에서 표준 DNA 염기 쌍 또는 RNA 염기 쌍에 대한 대안은 mm^3당 비트 단위의 더 높은 밀도, 더 높은 안전성(천연 독소의 우연한 또는 목적성 합성에 대해 저항성), 광-프로그램된 폴리머라제에서의 더 용이한 식별, 또는 더 낮은 2차 구조를 제공할 수 있다. 데 노보 또는 증폭

합성을 위한 천연 및 돌연변이체 폴리머라제와 혼화성인 이러한 대안적인 염기 쌍은 문헌[Betz K, Malyshev DA, Lavergne T, Welte W, Diederichs K, Dwyer TJ, Ordoukhanian P, Romesberg FE, Marx A. Nat. Chem. Biol. 2012 Jul;8(7):612-4]에 기재되어 있으며, 이는 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같이, "폴리펩티드"는 대부분 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기(천연 또는 비천연)의 중합체를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 상기 용어는 임의의 크기, 구조, 또는 기능의 단백질, 폴리펩티드, 및 펩티드를 지칭한다. 폴리펩티드는 유전자 생성물, 천연 발생 폴리펩티드, 합성 폴리펩티드, 상기의 동족체, 오르토로그, 파라로그, 단편 및 다른 등가물, 변이체, 및 유사체를 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 단일 분자 또는 다중-분자 복합체, 예컨대 이량체, 삼량체, 또는 사량체일 수 있다. 이들은 또한 단일 쇄 또는 다중쇄 폴리펩티드, 예컨대 항체 또는 인슐린을 포함할 수 있고, 회합되거나 연결될 수 있다. 가장 통상적으로 디술피드 연결은 다중쇄 폴리펩티드에서 발견된다. 폴리펩티드라는 용어는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공 화학적 유사체인 아미노산 중합체에도 적용될 수 있다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같이, "식물-변형 폴리펩티드"라는 용어는 식물의 유전적 특성(예를 들어, 유전자 발현을 증가시키거나, 유전자 발현을 감소시키거나, 다른 방식으로는 DNA 또는 RNA의 뉴클레오티드 서열을 변경시킴), 후성유전학적 특성, 또는 생화학적 또는 생리학적 특성을 식물의 생리학 또는 표현형의 변화, 예를 들어, 식물 적합성의 증가 또는 감소를 발생시키는 방식으로 변경시킬 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같이, "조절 요소"라는 용어는 원형 또는 선형 폴리리보뉴클레오티드 내의 발현 서열의 발현을 변형시키는 모이어티, 예컨대 핵산 서열이다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같이, "스페이서"는 2개의 인접한 폴리뉴클레오티드 영역 사이의 거리 또는 유연성을 제공하는 (예를 들어, 하나 이상의 뉴클레오티드의) 임의의 인접한 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이, "서열 동일성"이라는 용어는 전역 또는 국부 정렬 알고리즘을 사용하여 2개의 펩티드 또는 2개의 뉴클레오티드 서열의 정렬에 의해 결정된다. 서열은 이들이 최적으로 정렬된 경우(예를 들어, 디폴트 파라미터를 사용하는 GAP 또는 BESTFIT와 같은 프로그램에 의해 정렬되는 경우) 서열 동일성의 적어도 특정 최소 백분율을 공유하는 경우, "실질적으로 동일한" 또는 "본질적으로 유사한" 것으로 지칭된다. GAP는 2개의 서열을 그들의 전체 길이에 걸쳐 정렬하여, 매치의 수를 최대화하고, 갭의 수를 최소화하는 Needleman 및 Wunsch 전역 정렬 알고리즘을 사용한다. 일반적으로, GAP 디폴트 파라미터가 사용되며, 갭 생성 페널티 = 50(뉴클레오티드) / 8(단백질) 및 갭 연장 페널티 = 3(뉴클레오티드) / 2(단백질)이다. 뉴클레오티드에 대해, 사용되는 디폴트 점수화 매트릭스는 nwsgapdna이고, 단백질에 대해, 디폴트 점수화 매트릭스는 Blosum62이다(Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). 서열 정렬 및 백분율 서열 동일성에 대한 점수는 예를 들어, 컴퓨터 프로그램, 예컨대 미국 92121-3752 캘리포니아주 샌 디에고 스크랜톤 로드 9685에 소재하는 악셀리스 인크.(Accelrys Inc.)로부터 이용가능한 GCG Wisconsin Package, 버전 10.3, 또는 EmbossWin 버전 2.10.0(프로그램 "needle"을 사용하여)을 사용하여 결정된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 퍼센트 동일성은 예를 들어, FASTA, BLAST 등과 같은 알고리즘을 사용하여, 데이터베이스에 대해 검색함으로써 결정된다. 서열 동일성은 서열의 전체 길이에 걸친 서열 동일성을 지칭한다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같이, RNA에 관하여 "구조화된"은 동일한 RNA 분자에서 그 자신 또는 다른 서열을 갖는 구조(예를 들어, 헤어핀 루프)를 형성하도록 RNAFold 소프트웨어 또는 유사한 예측 도구에 의해 예측되는 RNA 서열을 지칭한다.

[0060] 본원에 사용된 바와 같이, "대상체"라는 용어는 유기체, 예컨대 동물, 식물, 또는 미생물을 지칭한다. 실시 형태에서, 대상체는 척추 동물(예를 들어, 포유동물, 조류, 어류, 파충류, 또는 양서류)이다. 실시 형태에서, 대상체는 인간이다. 실시 형태에서, 대상체는 비-인간 포유동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 비-인간 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 유인원), 유제류(예를 들어, 소, 버팔로, 비손, 양, 염소, 돼지, 낙타, 라마, 알파카, 사슴, 말, 당나귀), 육식동물(예를 들어, 개, 고양이), 설치류(예를 들어, 래트, 마우스), 또는 토끼목(예를 들어, 토끼)이다. 실시 형태에서, 대상체는 조류, 예컨대 조류 분류군 순계목(예를 들어, 닭, 칠면조, 꿩, 메추라기), 기러기목(예를 들어, 오리, 거위), 고관목(예를 들어, 타조, 에뮤), 비둘기목(예를 들어, 피존, 도브), 또는 앵무새목(예를 들어, 앵무새)의 구성원이다. 실시 형태에서, 대상체는 무척추동물, 예컨대 절지동물(예를 들어, 곤충류, 거미류, 갑각류), 선충, 환형동물, 연충, 또는 연체동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 무척추동물 농업적 해충 또는 무척추동물 또는 척추동물 숙주 상에 기생하는 무척추동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 식물, 예컨대 피자 식물(쌍자엽 또는 단자엽일 수 있음) 또는 나자 식물(예를 들어, 침엽수, 소철류, 마황문, 은행나무), 양치식물, 쇠뜨기, 석송, 또는 선태식물이다. 실시 형태에서, 대상체는 진핵 조류

(단세포 또는 다세포)이다. 실시 형태에서, 대상체는 농업적으로 또는 원예적으로 중요한 식물, 예컨대 줄뿌림 작물 식물, 과실-생산 식물 및 나무, 채소, 나무, 및 관상용 꽃, 관목, 나무, 지표식물, 및 잔디풀을 포함하는 관상용 식물이다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이, "치료하다", 또는 "치료하는 것"이라는 용어는 대상체에서의 질환 또는 장애(예를 들어, 감염성 질환, 암, 독성, 또는 알레르기 반응)의 예방적 또는 치료적 치료를 지칭한다. 치료의 효과는 치료적 치료의 부재 하에서의 질환 또는 장애의 상태 또는 상태와 비교하여, 질환, 또는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상 또는 징후를 반전시키는 것, 경감시키는 것, 그의 중증도를 감소시키는 것, 치유하는 것, 그의 진행을 억제하는 것, 그의 재발의 가능성을 감소시키는 것, 질환 또는 장애의 상태를 안정화시키는 것(즉, 악화시키지 않는 것), 또는 질환 또는 장애의 확산을 방지하는 것을 포함할 수 있다. 실시 형태는 무척추동물 해충 또는 미생물(예를 들어, 박테리아, 진균, 난균류, 또는 바이러스) 병원체에 의해 유발되거나 그와 관련된 질환 또는 유해 상태를 제어하기 위해 식물을 치료하는 것을 포함한다. 실시 형태는 해충 또는 병원체 압력을 내성화시키는 식물의 선천적 방어 또는 면역 능력을 증가시키기 위해 식물을 치료하는 것을 포함한다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같이, "종결 요소"라는 용어는 원형 또는 선형 폴리리보뉴클레오티드에서 발현 서열의 번역을 종결시키는 모이어티, 예컨대 핵산 서열이다.

[0063] 본원에 사용된 바와 같이, "번역 효율"이라는 용어는 리보뉴클레오티드 전사체로부터의 단백질 또는 펩티드 생성의 속도 또는 양이다. 일부 실시 형태에서, 번역 효율은 예를 들어, 주어진 기간에, 예를 들어, 주어진 번역 시스템, 예를 들어, 토끼 망상적혈구 용해물과 같은 무세포 번역 시스템에서, 단백질 또는 펩티드를 코딩하는 전사체의 주어진 양당 생성된 단백질 또는 펩티드의 양으로서 표현될 수 있다.

[0064] 본원에 사용된 바와 같이, "번역 개시 서열"이라는 용어는 원형 또는 선형 폴리리보뉴클레오티드에서 발현 서열의 번역을 개시시키는 핵산 서열이다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같이, "치료 폴리펩티드"라는 용어는 대상체에게 투여되거나 대상체에서 발현되는 경우 일부 치료적 이익을 제공하는 폴리펩티드를 지칭한다. 실시 형태에서, 치료 폴리펩티드는 대상체에의 치료 펩티드의 투여에 의해 또는 치료 폴리펩티드의 대상체에서의 발현에 의해 대상체에서 질환, 장애, 또는 상태를 치료하거나 예방하는 데 사용된다. 대안적인 실시 형태에서, 치료 폴리펩티드는 세포에서 발현되고, 세포는 대상체에게 투여되어 치료 이익을 제공한다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, "벡터"는 외래 DNA 단편이 클로닝 또는 발현 목적을 위해 삽입될 수 있거나 삽입된 합성된(예를 들어, PCR을 사용하여), 또는 바이러스, 플라스미드, 또는 고등 유기체의 세포로부터 취해진 DNA의 조각을 의미한다. 일부 실시 형태에서, 벡터는 유기체에서 안정하게 유지될 수 있다. 벡터는 예를 들어, 복제 기점, 선택가능한 마커 또는 리포터 유전자, 예컨대 항생제 저항성 또는 GFP, 또는 다중 클로닝 부위(MCS)를 포함할 수 있다. 상기 용어는 선형 DNA 단편(예를 들어, PCR 생성물, 선형화된 플라스미드 단편), 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 코스미드, 박테리아 인공 염색체(BAC), 효모 인공 염색체(YAC) 등을 포함한다. 한 실시 형태에서, 본원에서 제공된 벡터는 다중 클로닝 부위(MCS)를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 본원에서 제공된 벡터는 MCS를 포함하지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0067] **도 1a** 및 **1b**는 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 예시적인 아나바에나 재배치된(permuted) 인트론-엑손(도 1a) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(도 1b)을 보여주는 개략도이다.

도 2a 및 **2b**는 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 예시적인 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(도 2a) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(도 2b)의 구조를 보여주는 개략도이다.

도 3a 및 **3b**는 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 1), 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 2), 및 1.2 Kb RNA(도 3a) 또는 4.5 Kb RNA(도 3b) 중 어느 하나를 갖는 아나바에나 3의 원형화 효율을 보여주는 그래프이다.

도 4는 3개의 상이한 시점에서의 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 1), 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 2), 또는 아나바에나 3으로 생성된 원형 RNA로부터의 Gluc의 상대적 발현을 보여주는 그래프이다.

도 5는 3개의 상이한 시점에서의 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 1), 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 2), 또는 아나바에나 3으로 생성된 원형 RNA로부터의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 상대적 발현을 보여주는 그래프이다.

도 6은 E2와 E1 사이에 몇몇 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손의 예시적인 설계를 보여주는 개략도이다.

도 7은 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 2), 및 어닐링 영역의 추가의 5, 10, 또는 15 뉴클레오티드 연장을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손으로의 원형화 효율을 보여주는 그래프이다.

도 8은 3개의 상이한 시점에서의 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 2), 및 어닐링 영역의 추가의 5, 10, 또는 15 뉴클레오티드 연장을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손으로의 발현을 보여주는 그래프이다.

도 9a 및 **9b**는 6개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 예시적인 테트라히메나 재배치된 인트론-엑손(도 9a) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 테트라히메나 재배치된 인트론-엑손(도 9b)을 보여주는 개략도이다.

도 10a 및 **10b**는 6개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 예시적인 테트라히메나 재배치된 인트론-엑손(도 9a) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 테트라히메나 재배치된 인트론-엑손(도 9b)의 구조를 보여주는 개략도이다.

도 11은 6개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 재배치된 인트론-엑손(테트라히메나 1) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 재배치된 인트론-엑손(테트라히메나 2)의 원형화 효율을 보여주는 그래프이다.

도 12a 및 **12b**는 2개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 예시적인 T4 파지 재배치된 인트론-엑손(도 12a) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 T4 파지 재배치된 인트론-엑손(도 12b)을 보여주는 개략도이다.

도 13은 2개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 재배치된 인트론-엑손(T4 파지 1) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 재배치된 인트론-엑손(T4 파지 2)의 원형화 효율을 보여주는 그래프이다.

도 14a 및 **14b**는 어닐링 영역을 갖는 예시적인 재배치된 인트론-엑손(도 14a) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 재배치된 인트론-엑손(도 14b)을 보여주는 개략도이다.

도 15a 및 **15b**는 7개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 예시적인 시네코코쿠스(Synechococcus) 재배치된 인트론-엑손(도 15a) 및 변형되고 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 시네코코쿠스 재배치된 인트론-엑손(도 15b)의 구조를 보여주는 개략도이다.

도 16a 및 **16b**는 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 예시적인 아나바에나 아졸라에(Anabaena azollae) 재배치된 인트론-엑손(도 16a) 및 변형되고 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 아나바에나 아졸라에 재배치된 인트론-엑손(도 16b)의 구조를 보여주는 개략도이다.

도 17a 및 **17b**는 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 예시적인 아나바에나 실린드리카(Anabaena cylindrica)(도 17a) 및 변형되고 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 아나바에나 실린드리카 재배치된 인트론-엑손(도 17b)의 구조를 보여주는 개략도이다.

도 18a 및 **18b**는 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 예시적인 스키토네마(Scytonema) 재배치된 인트론-엑손(도 18a) 및 변형되고 연장된 어닐링 영역을 갖는 예시적인 스키토네마 재배치된 인트론-엑손(도 18b)의 구조를 보여주는 개략도이다.

도 19는 어닐링 영역을 갖는 다양한 재배치된 인트론-엑손에 대한 예시적인 변형을 보여주는 표이다. 굵은 글자는 원래 어닐링 영역을 확인하고; 이탤릭체 및 밑줄은 연장된 어닐링에 대한 예시적인 변형을 확인한다.

도 20은 4.5 Kb RNA를 갖는 비변형된(원래) 재배치된 인트론-엑손에 비해 4.5 Kb RNA를 갖는 다양한 변형된 재배치된 인트론-엑손의 원형화의 증가 배수를 보여주는 그래프이다. 증진된 원형화 효율은 연장된 E2-E1 어닐링 영역을 갖는 재배치된 인트론-엑손을 갖는 그룹 I 인트론으로 관찰된다.

도 21a는 아나바에나 자기-스플라이싱 인트론의 2차 구조를 보여주는 개략도이다. P6b 내의 교환 영역은 강조된다. **도 21b**는 연장된 P6b 스템을 갖는(아나바에나 4) 또는 P6b의 벌지의 스템으로의 변경을 갖는(아나바에나 5)

아나바에나 재배치된 인트론-엑손의 예시적인 설계의 구조를 보여주는 개략도이다.

도 22는 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 2), 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(아나바에나 1), 아나바에나 4, 및 아나바에나 5로의 원형화 효율을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 본 발명은 원형 폴리리보뉴클레오티드(원형 RNA)를 생성하기 위한 조성물 및 방법을 특색으로 한다. 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 카고(예를 들어, 유전자 또는 단백질을 코딩함)를 표적 세포에 전달하는 데 특히 유용하다.

[0069] 원형 폴리리보뉴클레오티드는 단부가 함께 자기-스플라이싱되고, 그에 의해 원형 폴리리보뉴클레오티드를 형성하는 선형 폴리리보뉴클레오티드로부터 생성될 수 있다. 본원에 기재된 선형 RNA 분자는, 5'에서 3'로, (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; (C) 3' 엑손 단편; (D) 폴리리보뉴클레오티드 카고; (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 및 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반을 포함한다. 폴리리보뉴클레오티드는 2 내지 50개, 예를 들어, 8 내지 50개의 리보뉴클레오티드를 갖고 (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; 또는 (C) 3' 엑손 단편 내에 존재하는 제1 어닐링 영역을 포함한다. 폴리리보뉴클레오티드는 또한 2 내지 50개, 예를 들어, 8 내지 50개의 리보뉴클레오티드를 갖고 (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 또는 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반 내에 존재하는 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 제2 어닐링 영역과 80% 내지 100% 상보성을 갖거나, 0 내지 10개의 미스매칭된 염기 쌍을 갖는다. 이들 특색은 제1 어닐링 영역이 제2 어닐링 영역에 혼성화하고, 따라서 선형 폴리리보뉴클레오티드의 5' 및 3' 단부 부근의 스플라이스 부위를 아주 근접하게 가져오게 한다. 스플라이스 부위가 인근에 있으면, 폴리리보뉴클레오티드는 3' 및 5' 스플라이스 부위를 자기-스플라이싱하고, 따라서 원형 폴리리보뉴클레오티드를 형성할 수 있다.

[0070] 예를 들어, (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; 또는 (C) 3' 엑손 단편 내에 제1 어닐링 영역, 및 예를 들어, (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 또는 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반 내에 제2 어닐링 영역을 포함함으로써, 선형 분자는 이들 특색을 결여한 다른 폴리리보뉴클레오티드 구축물과 비교하여 증가된 원형화 효율 및 스플라이싱 충실도를 나타낸다. 더욱이, 자가촉매 자기-스플라이싱 인트론을 사용함으로써, 선형 분자는 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하기 위해 외인성 효소, 예컨대 리가제로 처리될 필요가 없다. 이는 단일 포트 반응에서 원형 생성물을 생성하는 데 특히 유리하다. 분자, 생성 방법, 및 그의 용도는 하기에 보다 상세하게 기재된다.

[0071] **폴리뉴클레오티드**

[0072] 본 발명은 원형 폴리리보뉴클레오티드 조성물 및 원형 폴리리보뉴클레오티드를 제조하는 방법을 특색으로 한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 선형 폴리리보뉴클레오티드로부터 (예를 들어, 선형 폴리리보뉴클레오티드의 혼화성 단부를 자기-스플라이싱함으로써) 생성된다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드 주형(예를 들어, 벡터, 선형화 벡터, 또는 cDNA)으로부터 전사된다. 따라서, 본 발명은 원형 폴리리보뉴클레오티드의 생성에 유용한 데옥시리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드, 및 원형 폴리리보뉴클레오티드 및 그의 조성물을 특색으로 한다.

[0073] *주형 데옥시리보뉴클레오티드*

[0074] 본 발명은 원형 RNA를 제조하기 위한 주형 데옥시리보뉴클레오티드를 특색으로 한다. 데옥시리보뉴클레오티드는 5'에서 3' 배향으로 작동가능하게 연결된 하기의 것을 포함한다: (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; (C) 3' 엑손 단편; (D) 폴리리보뉴클레오티드 카고; (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 및 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반. 실시 형태에서, 데옥시리보뉴클레오티드는 예를 들어, 요소 (A), (B), (C), (D), (E), (F), 또는 (G) 중 임의의 것의 외부에 또는 사이에 추가의 요소를 포함한다. 실시 형태에서, 요소 (A), (B), (C), (D), (E), (F), 또는 (G) 중 임의의 것은 본원에 기재된 바와 같이 스페이서 서열에 의해 서로로부터 분리된다.

[0075] 실시 형태에서, 데옥시리보뉴클레오티드는 예를 들어, 원형 DNA 벡터, 선형화 DNA 벡터, 또는 선형 DNA(예를 들어, 예를 들어, DNA 벡터로부터 생성된 cDNA)이다.

[0076] 일부 실시 형태에서, 데옥시리보뉴클레오티드는 본원에 기재된 선형 RNA를 코딩하는 서열에 작동가능하게 연결

된 RNA 폴리머라제 프로모터를 추가로 포함한다. 실시 형태에서, RNA 폴리머라제 프로모터는 선형 RNA를 코딩하는 서열에 대해 이종이다. 일부 실시 형태에서, RNA 폴리머라제 프로모터는 T7 프로모터, T6 프로모터, T4 프로모터, T3 프로모터, SP6 바이러스 프로모터, 또는 SP3 프로모터이다.

[0077] 일부 실시 형태에서, 데옥시리보뉴클레오티드는 다중-클로닝 부위(MCS)를 포함한다.

[0078] 일부 실시 형태에서, 데옥시리보뉴클레오티드는 약 100개 내지 약 20,000개의 뉴클레오티드의 크기 범위를 갖는 원형 RNA를 생성하는 데 사용된다. 일부 실시 형태에서, 원형 RNA는 적어도 100, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500 또는 5,000개의 뉴클레오티드의 크기이다. 일부 실시 형태에서, 원형 RNA는 20,000, 15,000 10,000, 9,000, 8,000, 7,000, 6,000, 5,000 또는 4,000개 이하의 뉴클레오티드의 크기이다.

[0079] *선형 폴리리보뉴클레오티드*

[0080] 본 발명은 또한 5'에서 3' 배향으로 작동가능하게 연결된 하기의 것을 포함하는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 특색으로 한다: (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; (C) 3' 엑손 단편; (D) 폴리리보뉴클레오티드 카고; (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 및 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반. 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 예를 들어, 요소 (A), (B), (C), (D), (E), (F), 또는 (G) 중 임의의 것의 외부에 또는 사이에 추가의 요소를 포함한다. 예를 들어, 요소 (A), (B), (C), (D), (E), (F), 또는 (G) 중 임의의 것은 본원에 기재된 바와 같이 스페이서 서열에 의해 분리될 수 있다.

[0081] 특정 실시 형태에서, 본원에서 제공된 데옥시리보뉴클레오티드(예를 들어, 벡터, 선형화 벡터, 또는 cDNA)를 주형(예를 들어, 선형 RNA를 코딩하는 영역의 상류에 위치한 RNA 폴리머라제 프로모터를 갖는 본원에서 제공된 벡터, 선형화 벡터, 또는 cDNA)으로서 사용하여 무세포 시스템에서의 전사(예를 들어, 시험관내 전사)를 수행함으로써 선형 RNA를 생성하는 방법이 본원에서 제공된다.

[0082] 실시 형태에서, 데옥시리보뉴클레오티드 주형은 전사되어 본원에 기재된 성분을 함유하는 선형 RNA를 생성한다. 발현시, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하기 위해 자기-스플라이싱될 수 있는 스플라이싱-혼화성 폴리리보뉴클레오티드를 생성한다.

[0083] 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 50 내지 20,000개, 100 내지 20,000개, 200 내지 20,000개, 300 내지 20,000개(예를 들어, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000, 10,000, 11,000, 12,000, 13,000, 14,000, 15,000, 16,000, 17,000, 18,000, 19,000, 또는 20,000개)의 리보뉴클레오티드의 길이이다. 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 예를 들어, 적어도 500개, 적어도 1,000개, 적어도 2,000개, 적어도 3,000개, 적어도 4,000개, 또는 적어도 5,000개의 리보뉴클레오티드의 길이이다.

[0084] *원형 폴리리보뉴클레오티드*

[0085] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 원형 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 공유적으로 폐쇄된 원형 폴리리보뉴클레오티드)를 특색으로 한다. 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 5' 엑손 단편 및 3' 엑손 단편을 연결시키는 스플라이스 연접부를 포함한다. 실시 형태에서, 3' 엑손 단편은 2 내지 50개, 예를 들어, 8 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖는 제1 어닐링 영역을 포함하고, 5' 엑손 단편은 2 내지 50개, 예를 들어, 8 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖는 제2 어닐링 영역을 포함한다. 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 80% 내지 100%(예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 상보성을 포함한다. 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 0 내지 10개(예를 들어, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 미스매칭된 염기쌍을 포함한다.

[0086] 실시 형태에서, 원형 폴리뉴클레오티드는 폴리리보뉴클레오티드 카고를 추가로 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 발현(또는 코딩) 서열, 비-코딩 서열, 또는 발현(코딩) 서열 및 비-코딩 서열의 조합

을 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 폴리펩티드를 코딩하는 발현(코딩) 서열을 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 IRES를 포함한다. 일부 실시 형태에서, IRES는 발현 서열의 상류에 위치한다. 일부 실시 형태에서, IRES는 발현 서열의 하류에 위치한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 IRES와 3' 엑손 단편 또는 5' 엑손 단편 사이에 스페이서 영역을 추가로 포함한다. 스페이서 영역은 예를 들어, 적어도 5개(예를 들어, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개)의 리보뉴클레오티드의 길이 리보뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 스페이서 영역은 예를 들어, 5 내지 500개(예를 들어, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500개)의 리보뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은 폴리A 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은 폴리A-C 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은 폴리A-G 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은 폴리A-T 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 영역은 무작위 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 연결되고, 그에 의해 원형 폴리리보뉴클레오티드를 형성한다.

[0087] 일부 실시 형태에서, 원형 RNA는 본원에 기재된 데옥시리보뉴클레오티드 주형 또는 선형 RNA에 의해 생성된다. 일부 실시 형태에서, 원형 RNA는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 의해 생성된다.

[0088] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 적어도 약 20개의 뉴클레오티드, 적어도 약 30개의 뉴클레오티드, 적어도 약 40개의 뉴클레오티드, 적어도 약 50개의 뉴클레오티드, 적어도 약 75개의 뉴클레오티드, 적어도 약 100개의 뉴클레오티드, 적어도 약 200개의 뉴클레오티드, 적어도 약 300개의 뉴클레오티드, 적어도 약 400개의 뉴클레오티드, 적어도 약 500개의 뉴클레오티드, 적어도 약 1,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 2,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 5,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 6,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 7,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 8,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 9,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 10,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 12,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 14,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 15,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 16,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 17,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 18,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 19,000개의 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 20,000개의 뉴클레오티드이다.

[0089] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 리보솜에 대한 결합 부위를 수용하는 데 충분한 크기의 것이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 크기는 유용한 폴리펩티드를 코딩하는 데 충분한 길이이고, 예를 들어, 적어도 20,000개의 뉴클레오티드, 적어도 15,000개의 뉴클레오티드, 적어도 10,000개의 뉴클레오티드, 적어도 7,500개의 뉴클레오티드, 적어도 5,000개의 뉴클레오티드, 적어도 4,000개의 뉴클레오티드, 적어도 3,000개의 뉴클레오티드, 적어도 2,000개의 뉴클레오티드, 적어도 1,000개의 뉴클레오티드, 적어도 500개의 뉴클레오티드, 적어도 1400개의 뉴클레오티드, 적어도 300개의 뉴클레오티드, 적어도 200개의 뉴클레오티드, 또는 적어도 100개의 뉴클레오티드가 생성될 수 있다.

[0090] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 본원의 다른 곳에 기재된 하나 이상의 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 요소는 스페이서 서열에 의해 서로로부터 분리된다. 일부 실시 형태에서, 요소는 1개의 리보뉴클레오티드, 2개의 뉴클레오티드, 약 5개의 뉴클레오티드, 약 10개의 뉴클레오티드, 약 15개의 뉴클레오티드, 약 20개의 뉴클레오티드, 약 30개의 뉴클레오티드, 약 40개의 뉴클레오티드, 약 50개의 뉴클레오티드, 약 60개의 뉴클레오티드, 약 80개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드, 약 150개의 뉴클레오티드, 약 200개의 뉴클레오티드, 약 250개의 뉴클레오티드, 약 300개의 뉴클레오티드, 약 400개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드, 약 600개의 뉴클레오티드, 약 700개의 뉴클레오티드, 약 800개의 뉴클레오티드, 약 900개의 뉴클레오티드, 약 1000개의 뉴클레오티드, 최대 약 1 kb, 적어도 약 1000개의 뉴클레오티드, 또는 그들 사이의 임의의 양의 뉴클레오티드에 의해 서로로부터 분리된다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 요소는 서로와 인접하며, 예를 들어, 스페이서 요소를 결여한다.

[0091] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 본원의 다른 곳에 기재된 하나 이상의 반복적 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 본원의 다른 곳에 기재된 하나 이상의 변형을 포함한다. 한 실시 형태에서, 원형 RNA는 적어도 하나의 뉴클레오시드 변형을 함유한다. 한 실시 형태에서, 원형 RNA의 뉴클레오시드의 최대 100%가 변형된다. 한 실시 형태에서, 적어도 하나의 뉴클레오시드 변형은 우리딘 변형 또는 아데노신 변형이다.

[0092] 그의 원형화의 결과로서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 그것을 선형 RNA로부터 구별하는 특정 특징을 포함할 수 있다. 예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 선형 RNA와 비교하여 엑소뉴클레아제에 의한 분해에 덜 감수성이다. 따라서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는, 특히 엑소뉴클레아제의 존재 하에서 인큐베이션되는 경우, 선형

RNA보다 더 안정하다. 선형 RNA와 비교하여 원형 폴리리보뉴클레오티드의 증가된 안정성은 원형 폴리리보뉴클레오티드를 폴리펩티드를 생성하기 위한 세포 형질전환 시약으로서 더 유용하게 만들고, 선형 RNA보다 더 용이하게 및 더 오랫동안 저장될 수 있다. 엑소뉴클레아제로 처리된 원형 폴리리보뉴클레오티드의 안정성은 RNA 분해가 발생하였는지 여부를 결정하는 당업계의 표준 방법을 사용하여(예를 들어, 겔 전기영동에 의해) 테스트될 수 있다. 더욱이, 선형 RNA와는 달리, 원형 폴리리보뉴클레오티드는, 원형 폴리리보뉴클레오티드가 포스파타제, 예컨대 송아지 장 포스파타제와 인큐베이션되는 경우, 탈인산화에 덜 감수성이다.

[0093] **어닐링 영역**

[0094] 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 조성물은 2개 이상의 어닐링 영역, 예를 들어, 본원에 기재된 2개 이상의 어닐링 영역을 포함할 수 있다. 어닐링 영역, 또는 어닐링 영역의 쌍은 적합한 조건 하에서 혼성화를 촉진시키는 높은 정도의 상보성을 갖는 부분을 함유하는 것들이다.

[0095] 어닐링 영역은 본원에 기재된 바와 같이 적어도 상보적인 영역을 포함한다. 상보적 영역의 높은 정도의 상보성은 어닐링 영역 쌍의 회합을 촉진시킨다. 제1 어닐링 영역(예를 들어, 5' 어닐링 영역)이 선형 RNA의 5' 단부에 또는 부근에 위치하고, 제2 어닐링 영역(예를 들어, 3' 어닐링 영역)이 선형 RNA의 3' 단부에 또는 부근에 위치하는 경우, 어닐링 영역의 회합은 5' 및 3' 및 상응하는 인트론 단편을 근접하게 가져온다. 일부 실시 형태에서, 이는 3' 및 5' 스플라이스 부위의 스플라이싱에 의한 선형 RNA의 원형화에 유리하다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 어닐링 영역은 천연 발생 어닐링 영역을 강화시켜, 예를 들어, 자기-스플라이싱을 촉진시킨다.

[0096] 어닐링 영역은 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개, 또는 그 초과)의 돌연변이를 폴리리보뉴클레오티드 서열 내로 도입함으로써 변경될 수 있다. 예를 들어, 어닐링 영역은 하나 이상의 점 돌연변이를 제1 어닐링 영역 및/또는 제2 어닐링 영역 내로 도입하여 제1 및 제2 어닐링 영역 사이의 상보성의 길이를 증가시킴으로써 연장될 수 있다. 어닐링 영역은 또한 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개, 또는 그 초과)의 뉴클레오티드를 폴리리보뉴클레오티드 내로 삽입함으로써 변경될 수 있다. 실시 형태에서, 어닐링 영역은 하나 이상의 뉴클레오티드를 제1 어닐링 영역 및/또는 제2 어닐링 영역 내로 삽입하여 제1 및 제2 어닐링 영역 사이의 상보성의 길이를 증가시킴으로써 연장된다. 실시 형태에서, 어닐링 영역은 하나 이상의 점 돌연변이를 제1 어닐링 및/또는 제2 영역 내로 도입하고, 하나 이상의 뉴클레오티드를 제1 어닐링 및/또는 제2 어닐링 영역 내로 삽입하여 상보성의 길이를 증가시킴으로써 연장된다. 어닐링 영역을 변경시키는 것은 원래 서열을 갖는 벌지 또는 미스매칭된 영역에 유리하게 하여 변경된 서열을 갖는 스템 또는 스템 루프 구조를 우선적으로 형성함으로써 폴리리보뉴클레오티드의 2차 구조를 변경시킬 수 있다.

[0097] 폴리리보뉴클레오티드는 2 내지 50개, 5 내지 50개, 6 내지 50개, 7 내지 50개, 또는 8 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖고 (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; 또는 (C) 3' 엑손 단편 내에 존재하는 제1 어닐링 영역을 포함한다. 폴리리보뉴클레오티드는 또한 2 내지 50개, 5 내지 50개, 6 내지 50개, 7 내지 50개, 또는 8 내지 50개(예를 들어, 10 내지 30개, 10 내지 20개, 또는 10 내지 15개, 예를 들어, 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개)의 리보뉴클레오티드를 갖고 (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 또는 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반 내에 존재하는 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 제2 어닐링 영역과 80% 내지 100%(예를 들어, 85% 내지 100%, 예를 들어, 90% 내지 100%, 예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 상보성을 갖거나, 0 내지 10개, 예를 들어, (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 미스매칭된 염기 쌍을 갖는다.

[0098] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 100% 상보적이다.

[0099] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역은 5'- TCCGT-3'(서열 번호 1)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖고, 제2 어닐링 영역은 5'- ACGGA-3'(서열 번호 2)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0100] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역은 5'- TCCGTAGCGTCT -3'(서열 번호 5)의 서열과 적어도 80%(예를 들어,

적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖고, 제2 어닐링 영역은 5'- AGACGCTACGGA -3'(서열 번호 6)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0101] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역은 5'- TCCGTAGCGTCTAAACG -3'(서열 번호 22)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖고, 제2 어닐링 영역은 5'- CGTTTAGACGCTACGGA -3'(서열 번호 23)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0102] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역은 5'- TCCGTAGCGTCTAAACGGTCGT -3'(서열 번호 24)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖고, 제2 어닐링 영역은 5'- ACGACCGTTTAGACGCTACGGA -3'(서열 번호 25)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0103] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역은 5'- TCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGG -3'(서열 번호 26)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖고, 제2 어닐링 영역은 5'- CCCACACGACCGTTTAGACGCTACGGA -3'(서열 번호 27)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0104] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역은 5'- AAGGTA -3'(서열 번호 13)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖고, 제2 어닐링 영역은 5'- TACCTT -3'(서열 번호 14)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0105] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역은 5'- AAGGTAAATATT -3'(서열 번호 16)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖고, 제2 어닐링 영역은 5'- AATATTTACCTT -3'(서열 번호 17)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0106] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역은 5'- CT -3'의 서열을 갖고, 제2 어닐링 영역은 5'- AG -3'의 서열을 갖는다.

[0107] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역은 5'- CTCAATT -3'(서열 번호 20)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖고, 제2 어닐링 영역은 5'- AATTGAG -3'(서열 번호 21)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0108] 일부 실시 형태에서, (A) 또는 (C)는 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E) 또는 (G)는 제2 어닐링 영역을 포함한다.

[0109] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다.

[0110] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다.

[0111] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 제2 어닐링 영역을 포함한다.

[0112] 일부 실시 형태에서, 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역은 0 또는 1개의 미스매칭된 염기 쌍을 포함한다.

[0113] 실시 형태에서, 어닐링 영역은 하기 기재된 바와 같이 비-상보적 영역을 추가로 포함한다. 비-상보적 영역은 상보적 영역에 첨가되어 RNA의 단부가 유연성이거나, 비구조화되거나, 상보성 영역보다 덜 구조화되어 남아 있도록 한다.

[0114] 일부 실시 형태에서, 각각의 어닐링 영역은 2 내지 100개, 5 내지 100개, 또는 6 내지 100개의 리보뉴클레오티드(예를 들어, 6 내지 80개, 6 내지 50개, 6 내지 30개, 6 내지 20개, 10 내지 100개, 10 내지 80개, 10 내지 50개, 또는 10 내지 30개의 리보뉴클레오티드)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 5' 어닐링 영역은 2 내지 100개, 5 내지 100개, 6 내지 100개의 리보뉴클레오티드(예를 들어, 6 내지 80개, 6 내지 50개, 6 내지 30개, 6 내지 20개, 10 내지 100개, 10 내지 80개, 10 내지 50개, 또는 10 내지 30개의 리보뉴클레오티드)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 3' 어닐링 영역은 6 내지 100개의 리보뉴클레오티드(예를 들어, 6 내지 80개, 6 내지 50개,

6 내지 30개, 6 내지 20개, 10 내지 100개, 10 내지 80개, 10 내지 50개, 또는 10 내지 30개의 리보뉴클레오티드)를 포함한다.

[0115] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 (G)에 대해 5'에 어닐링 영역과 부분적 또는 완전한 핵산 상보성을 포함하는 (A)에 대해 3'에 어닐링 영역을 포함하지 않는다.

[0116] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 제1 어닐링 영역 및 제2 어닐링 영역에 추가적으로, 추가의 어닐링 영역을 포함하지 않는다.

[0117] *상보적 영역*

[0118] 상보적 영역은 적합한 조건 하에서, 상응하는 상보적 영역과 회합에 유리한 영역이다. 예를 들어, 상보적 영역의 쌍은 높은 정도의 서열 상보성을 공유할 수 있다(예를 들어, 제1 상보적 영역은 적어도 부분적으로 제2 상보적 영역의 역상보체이다). 2개의 상보적 영역이 회합하는(예를 들어, 혼성화하는) 경우, 이들은 고도로 구조화된 2차 구조, 예컨대 스템 또는 스템 루프를 형성할 수 있다.

[0119] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 5' 상보적 영역 및 3' 상보적 영역을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 5' 상보적 영역은 2 내지 50개, 예를 들어, 5 내지 50개의 리보뉴클레오티드(예를 들어, 5~40개, 5~30개, 5~20개, 5~10개, 10~50개, 10~40개, 10~30개, 10~20개, 또는 20~50개, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 리보뉴클레오티드)를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 3' 상보적 영역은 2 내지 50개, 예를 들어, 5 내지 50개의 리보뉴클레오티드(예를 들어, 5~40개, 5~30개, 5~20개, 5~10개, 10~50개, 10~40개, 10~30개, 10~20개, 또는 20~50개, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 리보뉴클레오티드)를 갖는다.

[0120] 일부 실시 형태에서, 5' 상보적 영역 및 3' 상보적 영역은 50% 내지 100% 서열 상보성(예를 들어, 60%~100%, 70%~100%, 80%~100%, 90%~100%, 또는 100%, 예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100% 서열 상보성)을 갖는다.

[0121] 일부 실시 형태에서, 5' 상보적 영역 및 3' 상보적 영역은 -5 kcal/mol 미만(예를 들어, -10 kcal/mol 미만, -20 kcal/mol 미만, 또는 -30 kcal/mol 미만)의 결합의 자유 에너지를 갖는다.

[0122] 일부 실시 형태에서, 5' 상보적 영역 및 3' 상보적 영역은 적어도 10℃, 적어도 15℃, 적어도 20℃, 적어도 30℃, 적어도 40℃, 적어도 50℃, 적어도 60℃, 적어도 70℃, 적어도 80℃, 또는 적어도 90℃의 결합의 Tm을 갖는다.

[0123] 일부 실시 형태에서, 5' 상보적 영역 및 3' 상보적 영역은 적어도 하나 그러나 10개 이하의 미스매치, 예를 들어, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2개의 미스매치, 또는 1개의 미스매치를 포함한다(즉, 5' 상보적 영역 및 3' 상보적 영역이 서로에 혼성화하는 경우). 미스매치는 예를 들어, 서로 반대이지만(즉, 5' 상보적 영역 및 3' 상보적 영역이 혼성화되는 경우) 왓슨-크릭 염기-쌍을 형성하지 않는 5' 상보적 영역 내의 뉴클레오티드 및 3' 상보적 영역 내의 뉴클레오티드일 수 있다. 미스매치는 예를 들어, 5' 상보적 영역 또는 3' 상보적 영역 중 어느 하나에 킹크 또는 벌지를 형성하는 비쌍형성된 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 5' 상보적 영역 및 3' 상보적 영역은 임의의 미스매치를 포함하지 않는다.

[0124] *비-상보적 영역*

[0125] 비-상보적 영역은 적합한 조건 하에서, 상응하는 비-상보적 영역과의 회합에 유리하지 않은 영역이다. 예를 들어, 비-상보적 영역의 쌍은 낮은 정도의 서열 상보성을 공유할 수 있다(예를 들어, 제1 비-상보적 영역은 제2 비-상보적 영역의 역상보체가 아니다). 2개의 비-상보적 영역이 근접한 경우, 이들은 고도로 구조화된 2차 구조, 예컨대 스템 또는 스템 루프를 형성하지 않는다.

[0126] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 5' 비-상보적 영역 및 3' 비-상보적 영역을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 5' 비-상보적 영역은 5 내지 50개의 리보뉴클레오티드(예를 들어, 5~40개, 5~30개, 5~20개, 5~10개, 10~50개, 10~40개, 10~30개, 10~20개, 또는 20~50개의 리보뉴클레오티드)를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 3' 비-상보적 영역은 5 내지 50개의 리보뉴클레오티드(예를 들어, 5~40개, 5~30개, 5~20개, 5~10개, 10~50개, 10~40개, 10~30개, 10~20개, 또는 20~50개의 리보뉴클레오티드)를 갖는다.

[0127] 일부 실시 형태에서, 5' 비-상보적 영역은 5' 상보적 영역에 대해 5'에(예를 들어, 5' 촉매 인트론 단편과 5' 상보적 영역 사이에) 위치한다. 일부 실시 형태에서, 3' 비-상보적 영역은 3' 상보적 영역에 대해 3'에(예를 들어, 3' 상보적 영역과 3' 촉매 인트론 단편 사이에) 위치한다.

[0128] 일부 실시 형태에서, 5' 비-상보적 영역 및 3' 비-상보적 영역은 0% 내지 50% 서열 상보성(예를 들어, 0%~40%, 0%~30%, 0%~20%, 0%~10%, 또는 0% 서열 상보성)을 갖는다.

[0129] 일부 실시 형태에서, 5' 비-상보적 영역 및 3' 비-상보적 영역은 -5 kcal/mol 초과의 결합의 자유 에너지를 갖는다.

[0130] 일부 실시 형태에서, 5' 상보적 영역 및 3' 상보적 영역은 10℃ 미만의 결합의 Tm을 갖는다.

[0131] 일부 실시 형태에서, 5' 비-상보적 영역 및 3' 비-상보적 영역은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 미스매치를 포함한다.

[0132] **촉매 인트론**

[0133] 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 촉매 인트론 단편, 예컨대 (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반을 포함한다. 제1 및 제2 어닐링 영역은 촉매 인트론 단편 내에 위치될 수 있다. 그룹 I 촉매 인트론은 2-금속 이온 포르포릴 전달 메카니즘을 통해 mRNA, tRNA, 및 rRNA 전구체로부터 그들 자신의 삭제를 촉매하는 자기-스플라이싱 리보자임이다. 중요하게는, RNA 자체는 외인성 효소, 예컨대 리가제의 요구 없이 인트론 제거를 자기-촉매한다.

[0134] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자, 또는 테트라히메나 프리-rRNA로부터의 것이다.

[0135] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자로부터의 것이고, (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 15개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 어닐링 영역은 예를 들어, 5 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 15개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0136] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 테트라히메나 프리-rRNA로부터의 것이고, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (E)의 5' 엑손 단편은 제2 어닐링 영역을 포함한다. 일부 실시 형태에서, (B)의 3' 엑손은 제1 어닐링 영역을 포함하고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 제2 어닐링 영역을 포함한다. 제1 어닐링 영역은 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 어닐링 영역은 예를 들어, 6 내지 50개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0137] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자, 테트라히메나 프리-rRNA, 또는 T4 파지 td 유전자로부터의 것이다.

[0138] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반 및 (G)의 5' 그룹 I 촉매 인트론 단편은 T4 파지 td 유전자로부터의 것이다. (C)의 3' 엑손 단편은 제1 어닐링 영역을 포함할 수 있고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 제2 어닐링 영역을 포함할 수 있다. 제1 어닐링 영역은 예를 들어, 2 내지 16개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 어닐링 영역은 예를 들어, 2 내지 16개, 예를 들어, 10 내지 16개(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개)의 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0139] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 선형 폴리뉴클레오티드의 5' 말단이다.

[0140] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 말단이다.

[0141] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 5'-AACAACAGATAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATG-3'(서열 번호 28)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%,

97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0142] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 5'-AAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3'(서열 번호 29)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0143] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 서열 번호 28의 서열을 갖고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 서열 번호 29의 서열을 갖는다.

[0144] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 5'-CTTCTGTTGATATGGATGCAGTTCACAGACTAAATGTCGGTCGGGGAAGATGTATTCTTCTCATAAGATATAGTCGGACCTCTCCTTAATGGGAGCTAGCGGATGAAGTGATGCAACACTGGAGCCGCTGGGAACTAATTTGTATGCGAAAGTATATTGATTAGTTTTGGAGTACTCG-3'(서열 번호 30)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0145] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 5'-AAATAGCAATATTTACCTTTGGAGGGAAAAGTTATCAGGCATGCACCTGGTAGCTAGTCTTTAAACCAATAGATTGCATCGGTTTAAAAGGCAAGACCGTCAAATTGCGGGAAAGGGGTCAACAGCCGTTCAGTACCAAGTCTCAGGGGAAACTTTGAGATGGCCTTGCAAAGGGTATGGTAATAAGCTGACGGACATGGTCCTAACCACGCAGCCAAGTCCTAAGTCAACAGAT-3'(서열 번호 31)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0146] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 서열 번호 30의 서열을 갖고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 서열 번호 31의 서열을 갖는다.

[0147] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 5'-GGTTCTACATAAATGCCTAACGACTATCCCTTTGGGGAGTAGGGTCAAGTGACTCGAAACGATAGACAACTTGCTTTAACAAGTTGGAGATATAGTCTGCTCTGCATGGTGACATGCAGCTGGATATAATTCCGGGGTAAGATTAACGACCTTATCTGAACATAATG-3'(서열 번호 32)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0148] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 5'-TAATTGAGGCCTGAGTATAAGGTGACTTATACTTGTAATCTATCTAAACGGGGAACCTCTCTAGTAGACAATCCCGTGCTAAATTGTAGGACT-3'(서열 번호 33)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0149] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 서열 번호 32의 서열을 갖고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 서열 번호 33의 서열을 갖는다.

[0150] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 5'-TAAACAACTAACAGCTTTAGAAGGTGCAGAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGATTCAGCCGAGGGTAAAGGGATAGTCCAATTCTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGCGAAAGTTGCAGAGAGAATGAAAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGAGGGTTCGAGTCCCTCCGCCCCCA-3'(서열 번호 80)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0151] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 5'-ACGGTAGACGCAGCGGACTTAGAAAACTGGGCCTCGATCGCGAAAGGGATCGAGTGGCAGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAAACTTTAAACATTMAAGTCATGGCAATCCTGAGCCAAGCTAAAGC-3'(서열 번호 81)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0152] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 서열 번호 80의 서열을 갖고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 서열 번호 81의 서열을 갖는다.

[0153] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 5'-TTAAACTCAAAATTTAAAATCCCAAATTCAAAATTCCGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCTGAAGTTGCTGAAGCAACAAGGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCGTTGACTGTAAAAAGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCCCACCCCC-3'(서열 번호 82)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0154] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 5'-ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTTAAGTGGAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGC

AATCCTGAGCCAAGCCCAGAAAATTTAGACTTGAGATTTGATTTTGGAG-3'(서열 번호 83)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0155] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 서열 번호 82의 서열을 갖고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 서열 번호 83의 서열을 갖는다.

[0156] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 5'-GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTTAAAGCCTGAAGTTGTGCAAGCAACAAGGCAACAGTGAAAGCTGTGGAAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCCCACCCCC-3'(서열 번호 84)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0157] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 5'-ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTCAAGTGGAAGCTCTCAAATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCGGAAATTTTAGAATCAAGATTTTATTTT-3'(서열 번호 85)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0158] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 서열 번호 84의 서열을 갖고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 서열 번호 85의 서열을 갖는다.

[0159] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 5'-AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3'(서열 번호 86)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0160] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 5'-AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGACAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3'(서열 번호 87)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0161] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 서열 번호 86의 서열을 갖고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 서열 번호 87의 서열을 갖는다.

[0162] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 5'-ACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3'(서열 번호 88)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0163] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 5'-AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAGTAAGTT-3'(서열 번호 89)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0164] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 서열 번호 88의 서열을 갖고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 서열 번호 89의 서열을 갖는다.

[0165] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 5'-AACAACAGATAACTTACTAGTTACTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3'(서열 번호 90)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0166] 일부 실시 형태에서, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 5'-AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3'(서열 번호 91)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0167] 일부 실시 형태에서, (A)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반은 서열 번호 90의 서열을 갖고, (G)의 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반은 서열 번호 91의 서열을 갖는다.

[0168] **스플라이스 부위**

[0169] 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 스플라이스 부위, 예컨대 (B) 3' 스플라이스 부위; 및 (F) 5' 스플라이스 부위를 포함한다. 스플라이스 부위는 시아노박테리아 아나바에나 프리-tRNA-Leu 유전자, 테트라히메나 프리-rRNA, 또는 T4 파지 td 유전자로부터의 것일 수 있다.

[0170] 일부 실시 형태에서, 3' 스플라이스 부위(예를 들어, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반과 3' 엑손 단편 사이)는 **AGAATG** ↓ AAAATC(서열 번호 34)의 서열을 갖고, 여기서 화살표는 커팅 부위를 표시한다. 일부 실시 형태에서, 5' 스플라이스 부위(예를 들어, 5' 엑손 단편과 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반 사이)는 GGACTT ↓ **AAATAA**(서열 번호 35)의 서열을 갖고, 여기서 화살표는 커팅 부위를 표시한다.

[0171] 일부 실시 형태에서, 3' 스플라이스 부위(예를 들어, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반과 3' 엑손 단편 사이)는 서열 **TACTCG** ↓ TAAGGT(서열 번호 36)를 갖고, 여기서 화살표는 커팅 부위를 표시한다. 일부 실시 형태에서, 5' 스플라이스 부위(예를 들어, 5' 엑손 단편과 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반 사이)는 CTCTCT ↓ **AAATAG**(서열 번호 37)의 서열을 갖고, 여기서 화살표는 커팅 부위를 표시한다.

[0172] 일부 실시 형태에서, 3' 스플라이스 부위(예를 들어, 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반과 3' 엑손 단편 사이)는 **ATAATG** ↓ CTACCG(서열 번호 38)의 서열을 갖고, 여기서 화살표는 커팅 부위를 표시한다. 일부 실시 형태에서, 5' 스플라이스 부위(예를 들어, 5' 엑손 단편과 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반 사이)는 TTGGGT ↓ **TAATTG**(서열 번호 39)의 서열을 갖고, 여기서 화살표는 커팅 부위를 표시한다.

[0173] **엑손 단편**

[0174] 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 엑손 단편, 예컨대 (C) 3' 엑손 단편; 및 (E) 5' 엑손 단편을 포함한다.

[0175] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 5'- AAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3'(서열 번호 40)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0176] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 5'- AAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3'(서열 번호 41)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0177] 일부 실시 형태에서, (E)의 5' 엑손 단편은 5'- AGACGCTACGGACTT-3'(서열 번호 42)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0178] 일부 실시 형태에서, (E)의 5' 엑손 단편은 5'- CGTTTAGACGCTACGGACTT-3'(서열 번호 43)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0179] 일부 실시 형태에서, (E)의 5' 엑손 단편은 5'- ACGACCGTTTAGACGCTACGGACTT-3'(서열 번호 44)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0180] 일부 실시 형태에서, (E)의 5' 엑손 단편은 5'- CCCACACGACCGTTTAGACGCTACGGACTT-3'(서열 번호 45)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0181] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 5'- TAAGGTAGC-3'(서열 번호 46)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0182] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 5'- TAAGGTAAATATTGC-3'(서열 번호 47)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0183] 일부 실시 형태에서, (E)의 5' 엑손 단편은 5'- ATGACTCTCT-3'(서열 번호 48)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0184] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 5'- CTACCGTTTAATATT-3'(서열 번호 49)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0185] 일부 실시 형태에서, (C)의 3' 엑손 단편은 5'- CTCAATTTTAATATT-3'(서열 번호 50)의 서열과 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0186] 일부 실시 형태에서, (E)의 5' 엑손 단편은 5'- ATGTTTTCTTGGGT-3'(서열 번호 51)의 서열과 적어도 80%(예를

들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 갖는다.

[0187] **폴리리보뉴클레오티드 카고**

[0188] 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드 카고는 적어도 하나의 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 임의의 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 발현 서열, 비-코딩 서열, 또는 발현 서열 및 비-코딩 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 IRES를 포함한다. 일부 실시 형태에서, (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고는 대상체에 대한 생물학적 효과를 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 발현 서열을 포함한다.

[0189] 폴리리보뉴클레오티드 카고는 예를 들어, 적어도 약 40개의 뉴클레오티드, 적어도 약 50개의 뉴클레오티드, 적어도 약 75개의 뉴클레오티드, 적어도 약 100개의 뉴클레오티드, 적어도 약 200개의 뉴클레오티드, 적어도 약 300개의 뉴클레오티드, 적어도 약 400개의 뉴클레오티드, 적어도 약 500개의 뉴클레오티드, 적어도 약 1,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 2,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 5,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 6,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 7,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 8,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 9,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 10,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 12,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 14,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 15,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 16,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 17,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 18,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 19,000개의 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 20,000개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 1~20,000개의 뉴클레오티드, 1~10,000개의 뉴클레오티드, 1~5,000개의 뉴클레오티드, 100~20,000 뉴클레오티드, 100~10,000개의 뉴클레오티드, 100~5,000개의 뉴클레오티드, 500~20,000개의 뉴클레오티드, 500~10,000개의 뉴클레오티드, 500~5,000개의 뉴클레오티드, 1,000~20,000개의 뉴클레오티드, 1,000~10,000개의 뉴클레오티드, 또는 1,000~5,000개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0190] 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 하나 또는 다수의 발현(또는 코딩) 서열을 포함하고, 여기서 각각의 발현(또는 코딩) 서열은 폴리펩티드를 코딩한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 하나 또는 다수의 비코딩 서열을 포함한다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 전적으로 비-코딩 서열(들)로 이루어진다. 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 발현(또는 코딩) 및 비코딩 서열의 조합을 포함한다.

[0191] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 바와 같이 제조된 폴리리보뉴클레오티드는 요법 또는 농업에서 이펙터로서 사용된다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법(예를 들어, 본원에 기재된 무세포 방법)에 의해 제조된 원형 폴리리보뉴클레오티드는 대상체에게 투여될 수 있다(예를 들어, 제약, 수의학, 또는 농업 조성물로). 또 다른 예에서, 본원에 기재된 방법(예를 들어, 본원에 기재된 무세포 방법)에 의해 제조된 원형 폴리리보뉴클레오티드는 세포에 전달될 수 있다.

[0192] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제 WO2019/118919호에 개시된 바와 같은 임의의 특색, 또는 특색의 임의의 조합을 포함한다.

[0193] *폴리펩티드 발현 서열*

[0194] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 하나 이상의 발현(또는 코딩) 서열을 포함하고, 여기서 각각의 발현 서열은 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 발현(또는 코딩) 서열을 포함한다.

[0195] 각각의 코딩된 폴리펩티드는 선형 또는 분지형일 수 있다. 다양한 실시 형태에서, 폴리펩티드는 약 5개 내지 약 40,000개의 아미노산, 약 15개 내지 약 35,000개의 아미노산, 약 20개 내지 약 30,000개의 아미노산, 약 25개 내지 약 25,000개의 아미노산, 약 50개 내지 약 20,000개의 아미노산, 약 100개 내지 약 15,000개의 아미노산, 약 200개 내지 약 10,000개의 아미노산, 약 500개 내지 약 5,000개의 아미노산, 약 1,000개 내지 약 2,500개의 아미노산, 또는 그들 사이의 임의의 범위의 길이를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는 약 40,000개 미만의 아미노산, 약 35,000개 미만의 아미노산, 약 30,000개 미만의 아미노산, 약 25,000개 미만의 아미노산, 약 20,000개 미만의 아미노산, 약 15,000개 미만의 아미노산, 약 10,000개 미만의 아미노산, 약 9,000개 미만의 아미노산, 약 8,000개 미만의 아미노산, 약 7,000개 미만의 아미노산, 약 6,000개 미만의 아미노산, 약 5,000개 미만의 아미노산, 약 4,000개 미만의 아미노산, 약 3,000개 미만의 아미노산, 약 2,500개 미만의 아미노산, 약 2,000개 미만의 아미노산, 약 1,500개 미만의 아미노산, 약 1,000개 미만의 아미노산, 약 900개 미만의 아미노

산, 약 800개 미만의 아미노산, 약 700개 미만의 아미노산, 약 600개 미만의 아미노산, 약 500개 미만의 아미노산, 약 400개 미만의 아미노산, 약 300개 미만의 아미노산의 길이를 갖거나, 그 미만이 유용할 수 있다.

[0196] 본원에 포함된 폴리펩티드는 천연 발생 폴리펩티드 또는 비-천연 발생 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는 기준 폴리펩티드의 기능적 단편 또는 변이체(예를 들어, 효소의 효소적으로 활성인 단편 또는 변이체)이거나 이를 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드는 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 천연 발생 폴리펩티드의 서열과, 예를 들어, 특정된 영역에 걸쳐 또는 전체 서열에 걸쳐, 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 본원에 기재된 폴리펩티드 중 임의의 것의 기능적으로 활성인 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 폴리펩티드는 관심 단백질과 적어도 50%(예를 들어, 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 그 초과) 동일성을 가질 수 있다.

[0197] 폴리펩티드의 일부 예는 형광 태그 또는 마커, 항원, 치료 폴리펩티드, 또는 농업적 적용을 위한 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0198] 치료 폴리펩티드는 호르몬, 신경전달물질, 성장 인자, 효소(예를 들어, 옥시도리덕타제, 대사 효소, 미토콘드리아 효소, 옥시게나제, 데히드로게나제, ATP-독립적 효소, 리소좀 효소, 데사추라제), 사이토카인, 항원 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항원 결합 항체 또는 항체-유사 단편, 예컨대 단일 쇄 항체, 나노바디 또는 다른 Ig 중쇄 또는 경쇄 함유 폴리펩티드), Fc 융합 단백질, 항응고물, 혈액 인자, 골 형태형성 단백질, 인터페론, 인터루킨, 및 혈전용해제일 수 있다.

[0199] 농업적 적용을 위한 폴리펩티드는 박테리오신, 리신, 항미생물 폴리펩티드, 항진균 폴리펩티드, 소절 C-풍부 펩티드, 균세포 조절 펩티드, 펩티드 독소, 살충 폴리펩티드(예를 들어, 살곤충 폴리펩티드 또는 살선충 폴리펩티드), 항원 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항원 결합 항체 또는 항체-유사 단편, 예컨대 단일 쇄 항체, 나노바디 또는 다른 Ig 중쇄 또는 경쇄 함유 폴리펩티드), 효소(예를 들어, 뉴클레아제, 아밀라제, 셀룰라제, 펩티다제, 리파제, 키티나제), 펩티드 페로몬, 및 전사 인자일 수 있다.

[0200] 일부 경우에, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 비-인간 단백질을 발현한다.

[0201] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체, 예를 들어, 항체 단편, 또는 그의 부분을 발현한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드에 의해 발현되는 항체는 임의의 이소타입, 예컨대 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM의 것일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체의 부분, 예컨대 경쇄, 중쇄, Fc 단편, CDR(상보성 결정 영역), Fv 단편, 또는 Fab 단편, 그의 추가의 부분을 발현한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체의 하나 이상의 부분을 발현한다. 예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 초과의 발현(또는 코딩) 서열을 포함할 수 있으며, 그의 각각은 항체의 부분을 발현하고, 그의 합은 항체를 구성할 수 있다. 일부 경우에, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체의 중쇄를 코딩하는 하나의 발현 서열, 및 항체의 경쇄를 코딩하는 또 다른 발현 서열을 포함한다. 일부 경우에, 원형 폴리리보뉴클레오티드가 세포 또는 무세포 환경에서 발현되는 경우, 경쇄 및 중쇄는 적절한 변형, 폴딩, 또는 다른 번역후 변형에 적용되어 기능적 항체를 형성할 수 있다.

[0202] 실시 형태에서, 폴리펩티드는 다수의 폴리펩티드, 예를 들어, 하나의 폴리펩티드 서열의 다수의 카피, 또는 다수의 상이한 폴리펩티드 서열을 포함한다. 실시 형태에서, 다수의 폴리펩티드는 링커 아미노산 또는 스페이서 아미노산에 의해 연결된다.

[0203] 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드 카고는 신호 펩티드를 코딩하는 서열을 포함한다. 많은 신호 펩티드 서열이 기재되었으며, 예를 들어, Tat(트윈-아르기닌 전위) 신호 서열은 전형적으로 지질 이중층에 걸쳐 이러한 Tat 신호 펩티드를 함유하는 폴딩된 단백질을 전위시키는 역할을 하는 컨센서스 SRRxFLK "트윈-아르기닌" 모티프를 함유하는 N-말단 펩티드 서열이다. 또한, 예를 들어, www[dot]signalpeptide[dot]de에서 공개적으로 이용가능한 신호 펩티드 데이터베이스를 참조한다. 신호 펩티드는 또한 단백질을 특이적 소기관에 지정하는 데 유용하며; 예를 들어, proline[dot]bic[dot]nus[dot]edu[dot]sg/spdb에서 공개적으로 이용가능한 Spdb 신호 펩티드 데이터베이스에 개시된 실험적으로 결정되고 컴퓨터로 예측되는 신호 펩티드를 참조한다.

[0204] 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드 카고는 세포-관통 펩티드(CPP)를 코딩하는 서열을 포함한다. 수백 개의 CPP 서열이 기재되었으며; 예를 들어, crdd[dot]osdd[dot]net/raghava/cppsite/에서 공개적으로 이용가능한 세포-관통 펩티드의 데이터베이스, CPPsite를 참조한다. 통상적으로 사용되는 CPP 서열의 예는 CGI 펩티드의 C-말단에 융합될 수 있는 폴리-아르기닌 서열, 예를 들어, 옥토아르기닌 또는 노노아르기닌이다.

[0205] 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드 카고는 자기-어셈블리 펩티드를 코딩하는 서열을 포함하며; 예를 들어, 문헌 [Miki et al.(2021) Nature Communications, 21:3412, DOI: 10.1038/s41467-021-23794-6]을 참조한다.

[0206] 일부 실시 형태에서, 발현(또는 코딩) 서열은 폴리-A 서열을 포함한다(예를 들어, 발현 서열의 3' 단부에). 일부 실시 형태에서, 폴리-A 서열의 길이는 10개 초과의 뉴클레오티드의 길이이다. 한 실시 형태에서, 폴리-A 서열은 15개 초과의 뉴클레오티드의 길이(예를 들어, 적어도 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 및 3,000개의 뉴클레오티드 또는 그 초과)이다. 일부 실시 형태에서, 폴리-A 서열은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제WO2019/118919A1호의 [0202]~[0204]에서의 폴리-A 서열의 설명에 따라 설계된다. 일부 실시 형태에서, 발현 서열은 폴리-A 서열을 결여한다(예를 들어, 발현 서열의 3' 단부에).

[0207] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리A를 포함하거나, 폴리A를 결여하거나, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 하나 이상의 특징을 조정하도록 변형된 폴리A를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 폴리A를 결여하거나 변형된 폴리A를 갖는 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 기능적 특징, 예를 들어, 면역원성(예를 들어, 면역 또는 염증 반응의 하나 이상의 마커의 수준), 반감기, 및/또는 발현 효율을 개선시킨다.

[0208] *치료 폴리펩티드*

[0209] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 치료 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 발현 서열을 포함한다. 치료 폴리펩티드는 대상체에게 투여되거나 대상체에서 발현되는 경우 일부 치료 이익을 제공하는 폴리펩티드이다. 치료 폴리펩티드의 대상체에의 투여 또는 대상체에서의 발현은 질환, 장애, 또는 상태 또는 그의 증상을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 치료 폴리펩티드를 코딩한다.

[0210] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 치료 단백질을 코딩하는 발현 서열을 포함한다. 단백질은 이를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 치료 단백질은 이를 필요로 하는 대상체에서 돌연변이된, 과소-발현된, 또는 부재하는 단백질을 보상할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 치료 단백질은 이를 필요로 하는 대상체에서 세포, 조직, 또는 바이러스를 표적화하거나, 이와 상호작용하거나, 이에 결합할 수 있다.

[0211] 치료 폴리펩티드는 세포로부터 분비되거나, 세포의 세포질, 핵, 또는 막 구획에 국재화될 수 있는 폴리펩티드일 수 있다.

[0212] 치료 폴리펩티드는 호르몬, 신경전달물질, 성장 인자, 효소(예를 들어, 옥시도리덕타제, 대사 효소, 미토콘드리아 효소, 옥시게나제, 데히드로게나제, ATP-독립적 효소, 리소좀 효소, 데사추라제), 사이토카인, 전사 인자, 항원 결합 폴리펩티드(예를 들어, 항원 결합 항체 또는 항체-유사 단편, 예컨대 단일 쇄 항체, 나노바디 또는 다른 Ig 중쇄 또는 경쇄 함유 폴리펩티드), Fc 융합 단백질, 항응고물, 혈액 인자, 골 형태형성 단백질, 인터페론, 인터루킨, 혈전용해제, 항원(예를 들어, 종양, 바이러스, 또는 박테리아 항원), 뉴클레아제(예를 들어, 엔도뉴클레아제, 예컨대 Cas 단백질, 예를 들어, Cas9), 막 단백질(예를 들어, 키메라 항원 수용체(CAR), 막관통 수용체, G-단백질-커플링된 수용체(GPCR), 수용체 티로신 키나제(RTK), 항원 수용체, 이온 채널, 또는 막 수송체), 분비된 단백질, 유전자 편집 단백질(예를 들어, CRISPR-Cas, TALEN, 또는 아연 핑거), 또는 진 라이팅 단백질(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제WO2020/047124호 참조)일 수 있다.

[0213] 일부 실시 형태에서, 치료 폴리펩티드는 항체, 예를 들어, 전장 항체, 항체 단편, 또는 그의 부분이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드에 의해 발현되는 항체는 임의의 이소타입, 예컨대 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM의 것일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체의 부분, 예컨대 경쇄, 중쇄, Fc 단편, CDR(상보성 결정 영역), Fv 단편, 또는 Fab 단편, 그의 추가의 부분을 발현한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체의 하나 이상의 부분을 발현한다. 예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 초과의 발현 서열을 포함할 수 있으며, 그의 각각은 항체의 부분을 발현하고, 그의 합은 항체를 구성할 수 있다. 일부 경우에, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 항체의 중쇄를 코딩하는 하나의 발현 서열, 및 항체의 경쇄를 코딩하는 또 다른 발현 서열을 포함한다. 원형 폴리리보뉴클레오티드가 세포에서 발현되는 경우, 경쇄 및 중쇄는 적절한 변형, 폴딩, 또는 다른 번역후 변형에 적용되어 기능적 항체를 형성할 수 있다.

[0214] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 바와 같이 제조된 원형 폴리리보뉴클레오티드는 요법 또는 농업에서 이펙터

로서 사용된다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법(예를 들어, 본원에 기재된 무세포 방법)에 의해 제조된 원형 폴리리보뉴클레오티드는 대상체에게 투여될 수 있다(예를 들어, 제약, 수의학, 또는 농업 조성물로). 실시 형태에서, 대상체는 척추 동물(예를 들어, 포유동물, 조류, 어류, 파충류, 또는 양서류)이다. 실시 형태에서, 대상체는 인간이다. 실시 형태에서, 방법 대상체는 비-인간 포유동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 비-인간 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 유인원), 유제류(예를 들어, 소, 버팔로, 양, 염소, 돼지, 낙타, 라마, 알파카, 사슴, 말, 당나귀), 육식동물(예를 들어, 개, 고양이), 설치류(예를 들어, 래트, 마우스), 또는 토끼목(예를 들어, 토끼)이다. 실시 형태에서, 대상체는 조류, 예컨대 조류 분류군 순계목(예를 들어, 닭, 칠면조, 꿩, 메추라기), 기러기목(예를 들어, 오리, 거위), 고관목(예를 들어, 타조, 에뮤), 비둘기목(예를 들어, 피존, 도브), 또는 앵무새목(예를 들어, 앵무새)의 구성원이다. 실시 형태에서, 대상체는 무척추동물, 예컨대 절지동물(예를 들어, 곤충류, 거미류, 갑각류), 선충, 환형동물, 연충, 또는 연체동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 무척추동물 농업적 해충 또는 무척추동물 또는 척추동물 숙주 상에 기생하는 무척추동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 식물, 예컨대 피자 식물(쌍자엽 또는 단자엽일 수 있음) 또는 나자 식물(예를 들어, 침엽수, 소철류, 마황문, 은행나무), 양치식물, 쇠뜨기, 석송, 또는 선태식물이다. 실시 형태에서, 대상체는 진핵 조류(단세포 또는 다세포)이다. 실시 형태에서, 대상체는 농업적으로 또는 원예적으로 중요한 식물, 예컨대 줄뿌림 작물 식물, 과실-생산 식물 및 나무, 채소, 나무, 및 관상용 꽃, 관목, 나무, 지표식물, 및 잔디풀을 포함하는 관상용 식물이다.

[0215] *분비된 폴리펩티드 이펙터*

[0216] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 분비된 폴리펩티드 이펙터를 코딩하는 적어도 하나의 코딩 서열을 포함한다. 발현될 수 있는 예시적인 분비된 폴리펩티드 이펙터 또는 단백질은 예를 들어, 사이토카인 및 사이토카인 수용체, 폴리펩티드 호르몬 및 수용체, 성장 인자, 응고 인자, 치료 대체 효소 및 치료 비-효소적 이펙터, 재생, 복구, 및 섬유화 인자, 형질전환 인자, 및 세포 재생을 자극하는 단백질을 포함하며, 그의 비제한적인 예는 본원에, 예를 들어, 하기 표에 기재되어 있다.

[0217] *사이토카인 및 사이토카인 수용체*

[0218] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 1의 사이토카인, 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편, 예를 들어, 그의 UniProt ID를 참조하여 표 1에 개시된 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% 동일성을 갖는 단백질을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 기능적 변이체는 동일한 조건 하에서 동일한 수용체에 대한 상응하는 야생형 사이토카인의 Kd보다 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하 더 높거나 더 낮은 Kd로 상응하는 사이토카인 수용체에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터는 제1 영역(예를 들어, 표 1의 사이토카인 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체 또는 단편) 및 제2, 이종 영역을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 제1 영역은 표 1의 제1 사이토카인 폴리펩티드이다. 일부 실시 형태에서, 제2 영역은 표 1의 제2 사이토카인 폴리펩티드이고, 여기서 제1 및 제2 사이토카인 폴리펩티드는 야생형 세포에서 서로와 사이토카인 이종이량체를 형성한다. 일부 실시 형태에서, 표 1의 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체는 신호 서열, 예를 들어, 이펙터에 대해 내인성인 신호 서열, 또는 이종 신호 서열을 포함한다.

[0219] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 1의 사이토카인에 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 항체 분자는 신호 서열을 포함한다.

[0220] 표 1. 예시적인 사이토카인 및 사이토카인 수용체

사이토카인	사이토카인 수용체(들)	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
IL-1α, IL-1β, 또는 그의 이종이량체	IL-1 유형 1 수용체, IL-1 유형 2 수용체	3552, 3553	P01583, P01584
IL-1Ra	IL-1 유형 1 수용체, IL-1 유형 2 수용체	3454, 3455	P17181, P48551
IL-2	IL-2R	3558	P60568
IL-3	IL-3 수용체 α + β c (CD131)	3562	P08700
IL-4	IL-4R 유형 I, IL-4R 유형 II	3565	P05112
IL-5	IL-5R	3567	P05113
IL-6	IL-6R (sIL-6R) gp130	3569	P05231
IL-7	IL-7R 및 sIL-7R	3574	P13232
IL-8	CXCR1 및 CXCR2	3576	P10145
IL-9	IL-9R	3578	P15248
IL-10	IL-10R1/IL-10R2 복합체	3586	P22301
IL-11	IL-11Rα 1 gp130	3589	P20809
IL-12 (예를 들어, p35, p40, 또는 그의 이종이량체)	IL-12Rβ1 및 IL-12Rβ2	3593, 3592	P29459, P29460
IL-13	IL-13R1α1 및 IL-13R1α2	3596	P35225
IL-14	IL-14R	30685	P40222
IL-15	IL-15R	3600	P40933
IL-16	CD4	3603	Q14005
IL-17A	IL-17RA	3605	Q16552
IL-17B	IL-17RB	27190	Q9UHF5
IL-17C	IL-17RA 내지 IL-17RE	27189	Q9P0M4
IL-17D	SEF	53342	Q8TAD2
IL-17F	IL-17RA, IL-17RC	112744	Q96PD4
IL-18	IL-18 수용체	3606	Q14116
IL-19	IL-20R1/IL-20R2	29949	Q9UHD0
IL-20	L-20R1/IL-20R2 및 IL-22R1/ IL-20R2	50604	Q9NYY1
IL-21	IL-21R	59067	Q9HBE4
IL-22	IL-22R	50616	Q9GZX6
IL-23 (예를 들어, p19, p40, 또는 그의 이종이량체)	IL-23R	51561	Q9NPF7
IL-24	IL-20R1/IL-20R2 및 IL-22R1/ IL-20R2	11009	Q13007
IL-25	IL-17RA 및 IL-17RB	64806	Q9H293

[0221]

사이토카인	사이토카인 수용체(들)	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
IL-26	IL-10R2 쇄 및 IL-20R1 쇄	55801	Q9NPH9
IL-27 (예를 들어, p28, EBI3, 또는 그의 이종이량체)	WSX-1 및 gp130	246778	Q8NEV9
IL-28A, IL-28B, 및 IL29	IL-28R1/IL-10R2	282617, 282618	Q8IZI9, Q8IU54
IL-30	IL6R/gp130	246778	Q8NEV9
IL-31	IL-31RA/OSMRβ	386653	Q6EBC2
IL-32		9235	P24001
IL-33	ST2	90865	O95760
IL-34	콜로니-자극 인자 1 수용체	146433	Q6ZMJ4
IL-35 (예를 들어, p35, EBI3, 또는 그의 이종이량체)	IL-12Rβ2/gp130; IL-12Rβ2/IL-12Rβ2; gp130/gp130	10148	Q14213
IL-36	IL-36Ra	27179	Q9UHA7
IL-37	IL-18Rα 및 IL-18BP	27178	Q9NZH6
IL-38	IL-1R1, IL-36R	84639	Q8WWZ1
IFN-α	IFNAR	3454	P17181
IFN-β	IFNAR	3454	P17181
IFN-γ	IFNGR1/IFNGR2	3459	P15260
TGF-β	TβR-I 및 TβR-II	7046, 7048	P36897, P37173
TNF-α	TNFR1, TNFR2	7132, 7133	P19438, P20333

[0222]

[0223] [1] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/gene" 상에서 NCBI 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열; Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.

[0224] [2] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "uniprot.org/uniprot/" 상에서 Uniprot 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1(2021).

[0225] *폴리펩티드 호르몬 및 수용체*

[0226] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 2의 호르몬, 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어, 그의 UniProt ID를 참조하여 표 2에 개시된 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% 동일성을 갖는 단백질을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 기능적 변이체는 동일한 조건 하에서 동일한 수용체에 대한 상응하는 야생형 호르몬의 Kd보다 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하 더 높은 Kd로 상응하는 수용체에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 표 2의 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체는 신호 서열, 예를 들어, 이펙터에 대해 내인성인 신호 서열, 또는 이종 신호 서열을 포함한다.

[0227] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 2의 호르몬에 결합하는 항체 분자(예를 들어, scFv)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 2의 호르몬 수용체에 결합하는 항체 분자(예를 들어, scFv)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 항체 분자는 신호 서열을 포함한다.

[0228] **표 2. 예시적인 폴리펩티드 호르몬 및 수용체**

호르몬	수용체	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
나트륨이뇨 펩티드, 예를 들어, 심방 나트륨이뇨 펩티드 (ANP)	NPRA, NPRB, NPRC	4878	P01160
뇌 나트륨이뇨 펩티드 (BNP)	NPRA, NPRB	4879	P16860
C-유형 나트륨이뇨 펩티드 (CNP)	NPRB	4880	P23582
성장 호르몬 (GH)	GHR	2690	P10912
프로락틴 (PRL)	PRLR	5617	P01236
갑상선-자극 호르몬 (TSH)	TSH 수용체	7253	P16473
부신피질자극 호르몬 (ACTH)	ACTH 수용체	5443	P01189
난포-자극 호르몬 (FSH)	FSHR	2492	P23945
황체형성 호르몬 (LH)	LHR	3973	P22888
항이뇨 호르몬 (ADH)	바소프레신 수용체, 예를 들어, V2; AVPR1A; AVPR1B; AVPR3; AVPR2	554	P30518
옥시토신	OXTR	5020	P01178
칼시토닌	칼시토닌 수용체 (CT)	796	P01258
부갑상선 호르몬 (PTH)	PTH1R 및 PTH2R	5741	P01270
인슐린	인슐린 수용체 (IR)	3630	P01308
글루카곤	글루카곤 수용체	2641	P01275
GIP	GIPR	2695	P09681
섬유모세포 성장 인자 19 (FGF19)	FGFR4	9965	O95750
섬유모세포 성장 인자 21 (FGF21)	FGFR1c, 2c, 3c	26291	Q9NSA1
섬유모세포 성장 인자 23 (FGF23)	FGFR1, 2, 4	8074	Q9GZV9
멜라닌세포-자극 호르몬 (알파-MSH)	MC1R, MC4R, MC5R		
멜라닌세포-자극 호르몬 (베타-MSH)	MC4R		
멜라닌세포-자극 호르몬 (감마-MSH)	MC1R, MC3R, MC4R, MC5R		
프로오피오멜라노코르틴 POMC (알파- 베타-, 감마-, MSH 전구체)	MC1R, MC3R, MC4R, MC5R	5443	P01189

[0229]

호르몬	수용체	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
당단백질 호르몬 알파 쇄 (CGA)		1081	P01215
난포-자극 호르몬 베타 (FSHB)	FSHR	2488	P01225
렙틴	LEPR	3952	P41159
그렐린	GHSR	51738	Q9UBU3

[0230]

[0231] [1] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/gene" 상에서 NCBI 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열, Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.

[0232] [2] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "uniprot.org/uniprot/" 상에서 Uniprot 데이터베이스 상에서 이용가능한

서열; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1(2021).

[0233] *성장 인자*

[0234] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 3의 성장 인자, 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어, 그의 UniProt ID를 참조하여 표 3에 개시된 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% 동일성을 갖는 단백질을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 기능적 변이체는 동일한 조건 하에서 동일한 수용체에 대한 상응하는 야생형 성장 인자의 Kd보다 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이하 더 높은 Kd로 상응하는 수용체에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 표 3의 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체는 신호 서열, 예를 들어, 이펙터에 대해 내인성인 신호 서열, 또는 이종 신호 서열을 포함한다.

[0235] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 3의 성장 인자에 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 3의 성장 인자 수용체에 결합하는 항체 분자(예를 들어, scFv)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 항체 분자는 신호 서열을 포함한다.

[0236] **표 3. 예시적인 성장 인자**

PDGF 패밀리		**Entrez 유전자 ID[1]**	**UniProt ID[2]**
PDGF (예를 들어, PDGF-1, PDGF-2, 또는 그의 이종이량체)	PDGF 수용체, 예를 들어, PDGFRα, PDGFRβ	5156	P16234
CSF-1	CSF1R	1435	P09603
SCF	CD117	3815	P10721
VEGF 패밀리			
VEGF (예를 들어, 이소형 VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189, 및 VEGF 206)	VEGFR-1, VEGFR-2	2321	P17948
VEGF-B	VEGFR-1	2321	P17949
VEGF-C	VEGFR-2 및 VEGFR -3	2324	P35916
PlGF	VEGFR-1	5281	Q07326
EGF 패밀리			
EGF	EGFR	1950	P01133
TGF-α	EGFR	7039	P01135
암피레귤린	EGFR	374	P15514
HB-EGF	EGFR	1839	Q99075
베타셀룰린	EGFR, ErbB-4	685	P35070
에피레귤린	EGFR, ErbB-4	2069	O14944
헤레귤린	EGFR, ErbB-4	3084	Q02297
FGF 패밀리			
FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9	FGFR1, FGFR2, FGFR3, 및 FGFR4	2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254	P05230, P09038, P11487, P08620, P12034, P10767, P21781, P55075, P31371
인슐린 패밀리			
인슐린	IR	3630	P01308
IGF-I	IGF-I 수용체, IGF-II 수용체	3479	P05019
IGF-II	IGF-II 수용체	3481	P01344
HGF 패밀리			
HGF	MET 수용체	3082	P14210
MSP	RON	4485	P26927
뉴로트로핀 패밀리			

[0237]

PDGF 패밀리		Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
NGF	LNGFR, trkA	4803	P01138
BDNF	trkB	627	P23560
NT-3	trkA, trkB, trkC	4908	P20783
NT-4	trkA, trkB	4909	P34130
NT-5	trkA, trkB	4909	P34130
안지오포이에틴 패밀리			
ANGPT1	HPK-6/TEK	284	Q15389
ANGPT2	HPK-6/TEK	285	O15123
ANGPT3	HPK-6/TEK	9068	O95841
ANGPT4	HPK-6/TEK	51378	Q9Y264
ANGPTL2	LILRB2 및 인테그린 α5β1	23452	Q9UKU9
ANGPTL3	LPL	27329	Q9Y5C1
ANGPTL4		51129	Q9BY76
ANGPTL8	PirB	55908	Q6UXH0

[0238]

[0239] [1] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/gene" 상에서 NCBI 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열, Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.

[0240] [2] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "uniprot.org/uniprot/" 상에서 Uniprot 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1(2021).

[0241] *응고 인자*

[0242] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 4의 폴리펩티드, 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어, 그의 UniProt ID를 참조하여 표 4에 개시된 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% 동일성을 갖는 단백질을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 기능적 변이체는 예를 들어, 야생형 단백질보다 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이상 더 낮거나 더 높은 속도로 상응하는 야생형 단백질과 동일한 반응을 촉매한다. 일부 실시 형태에서, 표 4의 폴리펩티드 또는 그의 기능적 변이체는 신호 서열, 예를 들어, 이펙터에 대해 내인성인 신호 서열, 또는 이종 신호 서열을 포함한다.

[0243] **표 4. 응고-관련 인자**

이펙터	적응증	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
인자 I (피브리노겐)	무피브리노겐혈증	2243, 2266, 2244	P02671, P02679, P02675
인자 II	인자 II 결핍증	2147	P00734
인자 IX	B 형 혈우병	2158	P00740
인자 V	오브렌병	2153	P12259
인자 VIII	A 형 혈우병	2157	P00451
인자 X	스튜어트-프라워 인자 결핍증	2159	P00742
인자 XI	C 형 혈우병	2160	P03951
인자 XIII	피브린 안정화 인자 결핍증	2162, 2165	P00488, P05160
vWF	폰 빌레브란트병	7450	P04275

[0244]

[0245] [1] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/gene" 상에서 NCBI 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열, Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.

[0246] [2] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "uniprot.org/uniprot/" 상에서 Uniprot 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1(2021).

[0247] *치료 대체 효소*

[0248] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 이펙터는 표 5의 효소, 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어, 그의 UniProt ID를 참조하여 표 5에 개시된 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% 동일성을 갖는 단백질을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 기능적 변이체는 예를 들어, 야생형 단백질보다 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% 이상 또는 이하 더 낮은 속도로 상응하는 야생형 단백질과 동일한 반응을 촉매한다.

[0249] **표 5. 효소 결핍증에 대한 예시적인 효소적 이펙터**

[0250]

이펙터	결핍증	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
3-메틸크로토닐-CoA 카르복실라제	3-메틸크로토닐-CoA 카르복실라제 결핍증	56922, 64087	Q96RQ3, Q9HCC0
아세틸-CoA-글루코스아미니드 N-아세틸트랜스퍼라제	점액다당류증 MPS III (산필리포 증후군) 유형 III-C	138050	Q68CP4
ADAMTS13	혈전성 저혈소판 자색반병	11093	Q76LX8
아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제	아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 결핍증	353	P07741
아데노신 데아미나제	아데노신 데아미나제 결핍증	100	P00813
ADP-리보스 단백질 히드롤라제	글루타민 리보스-5-포스페이트 저장 질환	26119, 54936	Q5SW96, Q9NX46
알파 글루코시다제	글리코겐 저장 질환 유형 2 (폼페병)	2548	P10253
아르기나제	가족성 고아르기닌혈증	383, 384	P05089, P78540
아릴술파타제 A	이염색성 백질이영양증	410	P15289
카텝신 K	피크노디소스토시스	1513	P43235
세라미다제	파버병 (지방육아종증)	125981, 340485, 55331	Q8TDN7, Q5QJU3, Q9NUN7
시스타티오닌 B 신타제	호모시스틴뇨증	875	P35520
돌리콜-P-만노스 신타제	N-글리코실화 CDG Ie 의 선천성 장애	8813, 54344	O60762, Q9P2X0
돌리코-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-돌리콜 글루코실트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG Ic 의 선천성 장애	84920	Q5BKT4
돌리코-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-돌리콜 만노실트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG Id 의 선천성 장애	10195	Q92685
돌리킬-P-글루코스:Glc-1-Man-9-GlcNAc-2-PP-돌리킬-α-3-글루코실트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG Ih 의 선천성 장애	79053	Q9BVK2

[0251]

이펙터	결핍증	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
돌리킬-P-만노스:Man-7-GlcNAc-2-PP-돌리킬-α-6-만노실트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG Ig 의 선천성 장애	79087	Q9BV10
인자 II	인자 II 결핍증	2147	P00734
인자 IX	B 형 혈우병	2158	P00740
인자 V	오브렌병	2153	P12259
인자 VIII	A 형 혈우병	2157	P00451
인자 X	스튜어트-프라워 인자 결핍증	2159	P00742
인자 XI	C 형 혈우병	2160	P03951
인자 XIII	피브린 안정화 인자 결핍증	2162, 2165	P00488, P05160
갈락토스아민-6-술페이트 술파타제	점액다당류증 MPS IV (모르퀴오 증후군) 유형 IV-A	2588	P34059
갈락토실세라미드 β-갈락토시다제	크라베병	2581	P54803
강글리오시드 β-갈락토시다제	전신 GM1 강글리오시드증	2720	P16278
강글리오시드 β-갈락토시다제	GM2 강글리오시드증	2720	P16278
강글리오시드 β-갈락토시다제	스핑고리피드증 유형 I	2720	P16278
강글리오시드 β-갈락토시다제	스핑고리피드증 유형 II (소아 유형)	2720	P16278
강글리오시드 β-갈락토시다제	스핑고리피드증 유형 III (성인 유형)	2720	P16278
글루코시다제 I	N-글리코실화 CDG IIb 의 선천성 장애	2548	P10253
글루코실세라미드 β-글루코시다제	고쉐병	2629	P04062
헤파란-S-술페이트 술파미다제	점액다당류증 MPS III (산필리포 증후군) 유형 III-A	6448	P51688
호모겐티세이트 옥시다제	알캅톤뇨증	3081	Q93099
히알루로니다제	점액다당류증 MPS IX (히알루로니다제 결핍증)	3373, 8692, 8372, 23553	Q12794, Q12891, O43820, Q2M3T9

이펙터	결핍증	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
이두로네이트 술페이트 술파타제	점액다당류증 MPS II (헌터 증후군)	3423	P22304
레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 (LCAT)	완전 LCAT 결핍증, 어안 질환, 죽상경화증, 고콜레스테롤혈증	3931	606967
리신 옥시다제	글루타르산혈증 유형 I	4015	P28300
리소좀산 리파제	콜레스테릴 에스테르 저장 질환 (CESD)	3988	P38571
리소좀산 리파제	리소좀산 리파제 결핍증	3988	P38571
리소좀산 리파제	볼만병	3988	P38571
리소좀 펩스타틴-인센시티브 펩티다제	세로이드 지방갈색소증 후기 영아 형태 (CLN2, 얀스키-빌엘쇼프스키병)	1200	O14773
만노스 (Man) 포스페이트 (P) 이소머라제	N-글리코실화 CDG Ib 의 선천성 장애	4351	P34949
만노실-α-1,6-당단백질-β-1,2-N-아세틸글루코스미닐트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG IIa 의 선천성 장애	4247	Q10469
메탈로프로테이나제-2	윈체스터 증후군	4313	P08253
메틸말로닐-CoA 뮤타제	메틸말론산혈증 (비타민 b12 비-반응성)	4594	P22033
N-아세틸갈락토스아민 α-4-술페이트 술파타제 (아릴술파타제 B)	점액다당류증 MPS VI (마로토-라미 증후군)	411	P15848
N-아세틸-D-글루코스아미니다제	점액다당류증 MPS III (산필리포 증후군) 유형 III-B	4669	P54802
N-아세틸-갈락토스아미니다제	쉰들러병 유형 I (영아 중증 형태)	4668	P17050
N-아세틸-갈락토스아미니다제	쉰들러병 유형 II (칸자키병, 성인-발병 형태)	4668	P17050
N-아세틸-갈락토스아미니다제	쉰들러병 유형 III (중간 형태)	4668	P17050
N-아세틸-글루코스아미닌-6-술페이트 술파타제	점액다당류증 MPS III (산필리포 증후군) 유형 III-D	2799	P15586

[0252]

[0253]

이펙터	결핍증	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
N-아세틸글루코스아미닐-1-포스포트랜스퍼라제	점액지질증 ML III (슈도-헐러 다발이영양증)	79158	Q3T906
N-아세틸글루코스아미닐-1-포스포트랜스퍼라제 촉매 서브유닛	점액지질증 ML II (I-세포 질환)	79158	Q3T906
N-아세틸글루코스아미닐-1-포스포트랜스퍼라제, 기질-인식 서브유닛	점액지질증 ML III (슈도-헐러 다발이영양증) 유형 III-C	84572	Q9UJJ9
N-아스파르틸글루코스아미니다제	아스파르틸글루코스아민뇨증	175	P20933
뉴라미니다제 1 (시알리다제)	시알산증	4758	Q99519
팔미토일-단백질 티오에스테라제-1	세로이드 지방갈색소증 성인 형태 (CLN4, 쿠프병)	5538	P50897
팔미토일-단백질 티오에스테라제-1	세로이드 지방갈색소증 영아 형태 (CLN1, 산타부오리-할티아병)	5538	P50897
페닐알라닌 히드록실라제	페닐케톤뇨증	5053	P00439
포스포만노뮤타제-2	N-글리코실화 CDG Ia 의 선천성 장애 (단지 신경 및 신경-다장기 형태)	5373	O15305
포르포빌리노겐 데아미나제	급성 간헐성 포르피린증	3145	P08397
퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제	퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 결핍증	4860	P00491
피리미딘 5' 뉴클레오티다제	용혈성 빈혈 및/또는 피리미딘 5' 뉴클레오티다제 결핍증	51251	Q9H0P0
스핑고미엘리나제	니만-픽병 유형 A	6609	P17405
스핑고미엘리나제	니만-픽병 유형 B	6609	P17405
스테롤 27-히드록실라제	뇌힘줄 황색종증 (콜레스타놀 지질증)	1593	Q02318
티미딘 포스포릴라제	미토콘드리아 신경위장 뇌근병증 (MNGIE)	1890	P19971
트리헥소실세라미드 α-갈락토시다제	파브리병	2717	P06280
티로시나제, 예를 들어, OCA1	백색증, 예를 들어, 눈 백색증	7299	P14679

이펙터	결핍증	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
UDP-GlcNAc:돌리킬-P NAcGlc 포스포트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG Ij 의 선천성 장애	1798	Q9H3H5
UDP-N-아세틸글루코스아민-2-에피머라제/N-아세틸만노스아민 키나제, 시알린	시알루리아 프랑스 유형	10020	Q9Y223
우리카제	레슈-니한 증후군, 통풍	391051	단백질 없음
우리딘 디포스페이트 글루쿠로닐-트랜스퍼라제 (예를 들어, UGT1A1)	크리글러–나자르 증후군	54658	P22309
α-1,2-만노실트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG II 의 선천성 장애 (608776)	79796	Q9H6U8
α-1,2-만노실트랜스퍼라제	N-글리코실화, 유형 I 의 선천성 장애 (골지체전 글리코실화 결함)	79796	Q9H6U8
α-1,3-만노실트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG Ii 의 선천성 장애	440138	Q2TAA5
α-D-만노시다제	α-만노스증, 유형 I (중증) 또는 II (경도)	10195	Q92685
α-L-푸코시다제	푸코스증	4123	Q9NTJ4
α-I-이두로니다제	점액다당류증 MPS I H/S (헐러-샤이에 증후군)	2517	P04066
α-I-이두로니다제	점액다당류증 MPS I-H (헐러 증후군)	3425	P35475
α-I-이두로니다제	점액다당류증 MPS I-S (샤이에 증후군)	3425	P35475
β-1,4-갈락토실트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG IId 의 선천성 장애	3425	P35475
β-1,4-만노실트랜스퍼라제	N-글리코실화 CDG Ik 의 선천성 장애	2683	P15291
β-D-만노시다제	β-만노스증	56052	Q9BT22
β-갈락토시다제	점액다당류증 MPS IV (모르퀴오 증후군) 유형 IV-B	4126	O00462
β-글루쿠로니다제	점액다당류증 MPS VII (슬라이 증후군)	2720	P16278
β-헥소스아미니다제 A	테이-삭스병	2990	P08236
β-헥소스아미니다제 B	샌드호프병	3073	P06865

[0254]

[0255] [1] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/gene" 상에서 NCBI 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열, Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.

[0256] [2] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "uniprot.org/uniprot/" 상에서 Uniprot 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1(2021).

[0257] *다른 비-효소적 이펙터*

[0258] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 치료 폴리펩티드는 표 6의 폴리펩티드, 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어, 그의 UniProt ID를 참조하여 표 6에 개시된 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% 동일성을 갖는 단백질을 포함한다.

[0259] **표 6. 예시적인 비-효소적 이펙터 및 상응하는 적응증**

이펙터	적응증	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
생존 운동 뉴런 단백질 (SMN)	척수 근위축증	6606	Q16637
디스트로핀	근이영양증 (예를 들어, 뒤시엔느 근이영양증 또는 베커 근이영양증)	1756	P11532
보체 단백질, 예를 들어, 보체 인자 C1	보체 인자 I 결핍증	3426	P05156
보체 인자 H	비정형 용혈성 요독 증후군	3075	P08603
시스티노신 (리소좀 시스틴 수송체)	시스틴증	1497	O60931
부고환 분비 단백질 1 (HE1; NPC2 단백질)	니만-픽병 유형 C2	10577	P61916
GDP-푸코스 수송체-1	N-글리코실화 CDG IIc 의 선천성 장애 (람밤-하샤론 증후군)	55343	Q96A29
GM2 활성화제 단백질	GM2 활성화제 단백질 결핍증 (테이-삭스병 AB 변이체, GM2A)	2760	Q17900
리소좀 막관통 CLN3 단백질	세로이드 지방갈색소증 소아 형태 (CLN3, 바튼병, 포그트-스필마이어병)	1207	Q13286
리소좀 막관통 CLN5 단백질	세로이드 지방갈색소증 변이체 후기 영아 형태, 핀란드 유형 (CLN5)	1203	O75503
Na 포스페이트 공수송체, 시알린	영아 시알산 저장 장애	26503	Q9NRA2
Na 포스페이트 공수송체, 시알린	시알루리아 핀란드 유형 (살라병)	26503	Q9NRA2
NPC1 단백질	니만-픽병 유형 C1/유형 D	4864	O15118
올리고머성 골지 복합체-7	N-글리코실화 CDG IIe 의 선천성 장애	91949	P83436
프로사포신	프로사포신 결핍증	5660	P07602
보호성 단백질/카텝신 A (PPCA)	갈락토시알산증 (골드버그 증후군, 복합 뉴라미니다제 및 β-갈락토시다제 결핍증)	5476	P10619

[0260]

이펙터	적응증	Entrez 유전자 ID[1]	UniProt ID[2]
만노스-P-돌리콜 이용에 관여하는 단백질	N-글리코실화 CDG If의 선천성 장애	9526	O75352
사포신 B	사포신 B 결핍증 (술파티드 활성화제 결핍증)	5660	P07602
사포신 C	사포신 C 결핍증 (고쉐 활성화제 결핍증)	5660	P07602
술파타제-변형 인자-1	점액술파티드증 (다발성 술파타제 결핍증)	285362	Q8NBK3
막관통 CLN6 단백질	세로이드 지방갈색소증 변이체 후기 영아 형태 (CLN6)	54982	Q9NWW5
막관통 CLN8 단백질	지적 장애를 갖는 세로이드 지방갈색소증 진행성 간질	2055	Q9UBY8
vWF	폰 빌레브란트병	7450	P04275
인자 I (피브리노겐)	무피브리노겐혈증	2243, 2244, 2266	P02671, P02675, P02679
에리트로포이에틴 (hEPO)			

[0261]

[0262] [1] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/gene" 상에서 NCBI 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열, Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.

[0263] [2] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "uniprot.org/uniprot/" 상에서 Uniprot 데이터베이스 상에서 이용가능한 서열; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1(2021).

[0264] *재생, 복구 및 섬유화 인자*

[0265] 본원에 기재된 치료 폴리펩티드는 또한 예를 들어, 표 7에 개시된 바와 같은 성장 인자, 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어, 그의 NCBI 단백질 수탁 번호를 참조하여 표 7에 개시된 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% 동일성을 갖는 단백질을 포함한다. 또한, 이러한 성장 인자에 대한 항체 또는 그의 단편, 또는 재생 및 복구를 촉진시키는 miRNA가 포함된다.

[0266] **표 7. 예시적인 재생, 복구, 및 섬유화 인자**

표적	NCBI 유전자 수탁 번호[1]	NCBI 단백질 수탁 번호[2]
VEGF-A	NG_008732	NP_001165094
NRG-1	NG_012005	NP_001153471
FGF2	NG_029067	NP_001348594
FGF1	유전자 ID: 2246	NP_001341882
miR199-3p	MIMAT0000232	n/a
miR590-3p	MIMAT0004801	n/a
miR17-92	MI0000071	월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732113/figure/F1/" 상에서
miR222	MI0000299	n/a
miR302-367	MIR302A 및 MIR367	월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400607/" 상에서

[0267]

[0268] [1] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/gene" 상에서 이용가능한 서열(Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. Pii: gku1055.)

[0269] [2] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/protein/" 상에서 이용가능한 서열

[0270] *형질전환 인자*

[0271] 본원에 기재된 치료 폴리펩티드는 형질전환 인자, 예를 들어, 섬유모세포를 분화된 세포로 형질전환시키는 단백질 인자, 예를 들어, 표 8에 개시된 인자 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어, 그의 UniProt ID를 참조하여 표 8에 개시된 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% 동일성을 갖는 단백질을 포함한다.

[0272] **표 8: 섬유모세포를 형질전환시킴으로써 기관 복구를 위해 지시된 폴리펩티드**

표적	NCBI 유전자 수탁 번호[1]	NCBI 단백질 수탁 번호[2]
MESP1	유전자 ID: 55897	EAX02066
ETS2	유전자 ID: 2114	NP_005230
HAND2	유전자 ID: 9464	NP_068808
MYOCARDIN	유전자 ID: 93649	NP_001139784
ESRRA	유전자 ID: 2101	AAH92470
miR1	MI0000651	n/a
miR133	MI000450	n/a
TGFb	유전자 ID: 7040	NP_000651.3
WNT	유전자 ID: 7471	NP_005421
JAK	유전자 ID: 3716	NP_001308784
NOTCH	유전자 ID: 4851	XP_011517019

[0273]

[0274] [1] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/gene" 상에서 이용가능한 서열(Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. Pii: gku1055.)

[0275] [2] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/protein/" 상에서 이용가능한 서열

[0276] *세포 재생을 자극하는 단백질*

[0277] 본원에 기재된 치료 폴리펩티드는 또한 세포 재생을 자극하는 단백질, 예를 들어, 표 9에 개시된 단백질 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어, 그의 UniProt ID를 참조하여 표 9에 개시된 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% 동일성을 갖는 단백질을 포함한다.

[0278] **표 9. 세포 재생을 자극하는 예시적인 단백질**

표적	유전자 수탁 번호[1]	단백질 수탁 번호[2]
MST1	NG_016454	NP_066278
STK30	유전자 ID: 26448	NP_036103
MST2	유전자 ID: 6788	NP_006272
SAV1	유전자 ID: 60485	NP_068590
LATS1	유전자 ID: 9113	NP_004681
LATS2	유전자 ID: 26524	NP_055387
YAP1	NG_029530	NP_001123617
CDKN2b	NG_023297	NP_004927
CDKN2a	NG_007485	NP_478102

[0279]

[0280] [1] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/gene" 상에서 이용가능한 서열(Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. Pii: gku1055.)

[0281] [2] 월드 와이드 웹 인터넷 사이트 "ncbi.nlm.nih.gov/protein/" 상에서 이용가능한 서열

[0282] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열(코딩 서열)을 포함하고, 생체내에서 대상체의 세포에서 지속적인 발현을 위해 구성된다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 더 나중

의 시점에서의 세포에서의 하나 이상의 발현 서열의 발현이 더 이른 시점에서와 동등하거나 그보다 더 높도록 구성된다. 이러한 실시 형태에서, 하나 이상의 발현 서열의 발현은 상대적으로 안정한 수준에서 유지될 수 있거나, 시간 경과에 따라 증가할 수 있다. 발현 서열의 발현은 연장된 기간 동안 상대적으로 안정할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 적어도 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 23일 또는 그 초과의 기간에 걸친 세포에서의 하나 이상의 발현 서열의 발현은 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 감소하지 않는다. 일부 경우에, 일부 경우에, 세포에서의 하나 이상의 발현 서열의 발현은 적어도 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 23일 또는 그 초과 동안 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 초과만큼 달라지지 않는 수준에서 유지된다.

[0283] *식물-변형 폴리펩티드*

[0284] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 식물-변형 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 발현 서열을 포함한다. 식물-변형 폴리펩티드는 식물의 생리학 또는 표현형의 변화, 예를 들어, 식물의 적합성의 증가 또는 감소를 발생시키는 방식으로 식물의 유전적 특성(예를 들어, 유전자 발현을 증가시키거나, 유전자 발현을 감소시키거나, 다른 방식으로는 DNA 또는 RNA의 뉴클레오티드 서열을 변경시킴), 후성유전학적 특성, 또는 생리학적 또는 생화학적 특성을 변경시킬 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 상이한 식물-변형 폴리펩티드, 또는 하나 이상의 식물-변형 폴리펩티드의 다수의 카피를 코딩한다. 식물-변형 폴리펩티드는 다양한 식물의 생리학 또는 표현형을 변화시키거나, 그의 적합성을 증가시키거나 감소시킬 수 있거나, 하나 이상의 특정 식물(예를 들어, 식물의 특정 종 또는 속)에서 이러한 변화(들)를 실행하는 것일 수 있다.

[0285] 본원에 사용될 수 있는 폴리펩티드의 예는 효소(예를 들어, 대사 리콤비나제, 헬리카제, 인테그라제, RN아제, DN아제, 또는 유비퀴틴화 단백질), 기공-형성 단백질, 신호전달 리간드, 세포 관통 펩티드, 전사 인자, 수용체, 항체, 나노바디, 유전자 편집 단백질(예를 들어, CRISPR-Cas 엔도뉴클레아제, TALEN, 또는 아연 핑거), 리보단백질, 단백질 압타머, 또는 샤페론을 포함할 수 있다.

[0286] *농업적 폴리펩티드*

[0287] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 농업적 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 하나의 발현 서열을 포함한다. 농업적 폴리펩티드는 농업적 용도에 적합한 폴리펩티드이다. 실시 형태에서, 농업적 폴리펩티드는 식물 또는 종자에(예를 들어, 엽상 분무, 살포, 주사, 또는 종자 코팅에 의해) 또는 식물의 환경에(예를 들어, 토양 관주 또는 과립상 토양 시용에 의해) 사용되어, 식물의 생리학, 표현형, 또는 적합성의 변경을 발생시킨다. 농업적 폴리펩티드의 실시 형태는 식물 또는 비-인간 동물 숙주 내에 또는 그 상에 살고 있는 하나 이상의 미생물의 수준, 활성, 또는 대사를 변경시키는 폴리펩티드를 포함하며, 변경은 숙주의 적합성의 증가를 발생시킨다. 일부 실시 형태에서, 농업적 폴리펩티드는 식물 폴리펩티드이다. 일부 실시 형태에서, 농업적 폴리펩티드는 곤충 폴리펩티드이다. 일부 실시 형태에서, 농업적 폴리펩티드는 비-인간 척추 동물, 무척추 동물, 미생물, 또는 식물 세포와 접촉하는 경우 생물학적 효과를 갖는다.

[0288] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 농업적 폴리펩티드, 또는 하나 이상의 농업적 폴리펩티드의 다수의 카피를 코딩한다.

[0289] 농업적 적용에 유용한 폴리펩티드의 실시 형태는 예를 들어, 박테리오신, 리신, 항미생물 펩티드, 소절 C-풍부 펩티드, 및 균세포 조절 펩티드를 포함한다. 이러한 폴리펩티드는 곤충, 예컨대 꿀벌 및 누에의 적합성을 증가시키기 위해 표적 미생물의 수준, 활성, 또는 대사를 변경시키는 데 사용될 수 있다. 농업적으로 유용한 폴리펩티드의 실시 형태는 펩티드 독소, 예컨대 당업계에 공지된 바와 같이, 곤충병원성 박테리아(예를 들어, 바실루스 투린기엔시스(Bacillus thuringiensis), 포토랍두스 루미네센스(Photorhabdus luminescens), 세라티아 엔토모필라(Serratia entomophila), 또는 크세노랍두스 네마토필라(Xenorhabdus nematophila))에 의해 자연적으로 생성되는 것들을 포함한다. 농업적으로 유용한 폴리펩티드의 실시 형태는 농업적으로 중요한 해충 또는 병원체를 방제하기 위한 폴리펩티드(소형 펩티드, 예컨대 시클로디펩티드 또는 디케토피페라진 포함), 예를 들어, 식물에서의 질환을 방제하기 위한 항미생물 폴리펩티드 또는 항진균 폴리펩티드, 또는 무척추동물 해충, 예컨대 곤충 또는 선충을 방제하기 위한 살충 폴리펩티드(예를 들어, 살곤충 폴리펩티드 또는 살선충 폴리펩티드)를 포함한다. 농업적으로 유용한 폴리펩티드의 실시 형태는 항체, 나노바디, 및 그의 단편, 예를 들어, 무손상 항체 또는 나노바디의 특이적 결합 활성의 적어도 일부(예를 들어, 적어도 10%)를 보유하는 항체 또는 나노바디 단편

을 포함한다. 농업적으로 유용한 폴리펩티드의 실시 형태는 전사 인자, 예를 들어, 식물 전사 인자를 포함하며; 예를 들어, agris-knowledgebase[dot]org/AtTFDB/에서 공개적으로 이용가능한, 모델 식물 아라비돕시스 탈리아나(Arabidopsis thaliana)에서 확인된 전사 인자 패밀리를 열거하는 "AtTFDB" 데이터베이스를 참조한다. 농업적으로 유용한 폴리펩티드의 실시 형태는 뉴클레아제, 예를 들어, 엑소뉴클레아제 또는 엔도뉴클레아제(예를 들어, Cas 뉴클레아제, 예컨대 Cas9 또는 Cas12a)를 포함한다. 농업적으로 유용한 폴리펩티드의 실시 형태는 세포-관통 펩티드, 효소(예를 들어, 아밀라제, 셀룰라제, 펩티다제, 리파제, 키티나제), 펩티드 페로몬(예를 들어, 효모 교미 페로몬, 무척추동물 생식 및 유충 신호전달 페로몬, 예를 들어, 문헌[Altstein(2004) Peptides, 25:1373-1376] 참조)을 추가로 포함한다.

[0290] *내부 리보솜 진입 부위*

[0291] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 하나 이상의 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, IRES는 하나 이상의 발현 서열에 작동가능하게 연결된다(예를 들어, 각각의 IRES는 하나 이상의 발현 서열에 작동가능하게 연결된다). 실시 형태에서, IRES는 이종 프로모터와 코딩 서열의 5' 단부 사이에 위치한다.

[0292] 폴리리보뉴클레오티드에 포함시키는 데 적합한 IRES 요소는 진핵 리보솜을 결착할 수 있는 RNA 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, IRES 요소는 적어도 약 5 nt, 적어도 약 8 nt, 적어도 약 9 nt, 적어도 약 10 nt, 적어도 약 15 nt, 적어도 약 20 nt, 적어도 약 25 nt, 적어도 약 30 nt, 적어도 약 40 nt, 적어도 약 50 nt, 적어도 약 100 nt, 적어도 약 200 nt, 적어도 약 250 nt, 적어도 약 350 nt, 또는 적어도 약 500 nt이다.

[0293] 일부 실시 형태에서, IRES 요소는 바이러스, 포유동물, 및 드로소필라(Drosophila)를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 유기체의 DNA로부터 유래된다. 이러한 바이러스 DNA는 뇌심근염 바이러스(EMCV) cDNA 및 폴리오바이러스 cDNA와의 피코르나바이러스 상보적 DNA(cDNA)로부터 유래될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 한 실시 형태에서, IRES 요소가 유래되는 드로소필라 DNA는 드로소필라 멜라노가스터(Drosophila melanogaster)로부터의 안테나페디아(Antennapedia) 유전자를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0294] 일부 실시 형태에서, 존재하는 경우, IRES 서열은 타우라 증후군 바이러스, 트리아토마(Triatoma) 바이러스, 타일러 뇌척수염 바이러스, 원숭이 바이러스 40, 솔레놉시스 인빅타(Solenopsis invicta) 바이러스 1, 로팔로시품 파디(Rhopalosiphum padi) 바이러스, 망상내피증 바이러스, 인간 폴리오바이러스 1, 플라우티아 스톨(Plautia stall) 장 바이러스, 카슈미르 벌 바이러스, 인간 리노바이러스 2, 호말로디스카 코아굴라타(Homalodisca coagulata) 바이러스- 1, 인간 면역결핍 바이러스 유형 1, 호말로디스카 코아굴라타 바이러스- 1, 히메토비(Himetobi) P 바이러스, C형 간염 바이러스, A형 간염 바이러스, GB형 간염 바이러스, 구제역 바이러스, 인간 엔테로바이러스 71, 말 비염 바이러스, 엑트로피스 오블리쿠아(Ectropis obliqua) 피코르나-유사 바이러스, 뇌심근염 바이러스(EMCV), 드로소필라 C 바이러스, 크루시퍼 토바모(Crucifer tobamo) 바이러스, 귀뚜라미 마비 바이러스, 소 바이러스성 설사 바이러스 1, 블랙 퀸 세포(Black Queen Cell) 바이러스, 진딧물 치사성 마비 바이러스, 조류 뇌척수염 바이러스, 급성 벌 마비 바이러스, 히비스쿠스 황백화 윤문병 바이러스, 고전적 돼지열 바이러스, 인간 FGF2, 인간 SFTPA1, 인간 AML1/RUNX1, 드로소필라 안테나페디아, 인간 AQP4, 인간 AT1R, 인간 BAG-1, 인간 BCL2, 인간 BiP, 인간 c-IAP1 , 인간 c-myc, 인간 eIF4G, 마우스 NDST4L, 인간 LEF1, 마우스 HIF1 알파, 인간 n.myc, 마우스 Gtx, 인간 p27kip1, 인간 PDGF2/c-sis, 인간 p53, 인간 Pim-1, 마우스 Rbm3, 드로소필라 레아퍼(Drosophila reaper), 카나인 스캠퍼(Canine Scamper), 드로소필라 Ubx, 인간 UNR, 마우스 UtrA, 인간 VEGF-A, 인간 XIAP, 살리바이러스, 코사바이러스, 파레코바이러스, 드로소필라 헤어리스, 에스. 세레비지아에(S. cerevisiae) TFIID, 에스. 세레비지아에 YAP1, 인간 c-src, 인간 FGF-1, 원숭이 피코마바이러스, 순무 주름 바이러스, eIF4G에 대한 압타머, 콕사키바이러스 B3(CVB3) 또는 콕사키바이러스 A(CVB1/2)의 IRES 서열이다. 추가의 또 다른 실시 형태에서, IRES는 콕사키바이러스 B3(CVB3)의 IRES 서열이다. 추가의 실시 형태에서, IRES는 뇌심근염 바이러스의 IRES 서열이다.

[0295] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 발현 서열에 플랭킹된 적어도 하나의 IRES를 포함한다. 일부 실시 형태에서, IRES는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 발현 서열의 양측에 플랭킹된다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 각각의 발현 서열의 한 측 또는 양측 상에 하나 이상의 IRES 서열을 포함하여, 생성된 펩티드(들) 및 또는 폴리펩티드(들)의 분리를 초래한다.

[0296] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 IRES를 포함한다. 예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드 카고는 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 문헌[Chen et al. Mol. Cell 81:1-19, 2021]에 기재된 바와 같

이, 원형 RNA IRES를 포함할 수 있다.

[0297] *조절 요소*

[0298] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 하나 이상의 조절 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 조절 요소, 예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드 내의 발현 서열의 발현을 변형시키는 서열을 포함한다.

[0299] 조절 요소는 발현 생성물을 코딩하는 발현 서열에 인접하여 위치한 서열을 포함할 수 있다. 조절 요소는 인접한 서열에 작동적으로 연결될 수 있다. 조절 요소는 조절 요소가 존재하지 않는 경우 발현된 생성물의 양과 비교하여 발현된 생성물의 양을 증가시킬 수 있다. 또한, 하나의 조절 요소는 탠덤으로 부착된 다수의 발현 서열에 대해 발현된 생성물의 양을 증가시킬 수 있다. 따라서, 하나의 조절 요소는 하나 이상의 발현 서열의 발현을 증진시킬 수 있다. 다수의 조절 요소는 당업자에게 널리 알려져 있다.

[0300] 일부 실시 형태에서, 조절 요소는 번역 조정제이다. 번역 조정제는 폴리리보뉴클레오티드에서 발현 서열의 번역을 조정할 수 있다. 번역 조정제는 번역 증진제 또는 억제제일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 적어도 하나의 발현 서열에 인접한 적어도 하나의 번역 조정제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 각각의 발현 서열에 인접한 번역 조정제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 번역 조정제는 각각의 발현 서열의 한 측 또는 양측에 존재하여, 발현 생성물, 예를 들어, 펩티드(들) 및 또는 폴리펩티드(들)의 분리를 초래한다.

[0301] 일부 실시 형태에서, 조절 요소는 마이크로RNA(miRNA) 또는 miRNA 결합 부위이다.

[0302] 조절 요소의 추가의 예는 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제WO2019/118919호의 단락 [0154]~[0161]에 기재되어 있다.

[0303] *번역 개시 서열*

[0304] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 적어도 하나의 번역 개시 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 번역 개시 서열을 포함한다.

[0305] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 폴리펩티드를 코딩하고, 번역 개시 서열, 예를 들어, 시작 코돈을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열은 코작(Kozak) 또는 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 인접한 번역 개시 서열, 예를 들어, 코작 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열은 비-코딩 시작 코돈이다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열, 예를 들어, 코작 서열은 각각의 발현 서열의 한 측 또는 양측에 존재하여, 발현 생성물의 분리를 초래한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 인접한 적어도 하나의 번역 개시 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열은 폴리리보뉴클레오티드에 대한 형태적 유연성을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 번역 개시 서열은 폴리리보뉴클레오티드의 실질적으로 단일 가닥 영역 내에 있다. 번역 개시 서열의 추가의 예는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제2019/118919호의 단락 [0163]~[0165]에 기재되어 있다.

[0306] 폴리리보뉴클레오티드는 1개 초과의 시작 코돈, 예컨대 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개 또는 60개 초과의 시작 코돈(그러나 이에 한정되는 것은 아님)을 포함할 수 있다. 번역은 제1 시작 코돈 상에서 개시될 수 있거나, 제1 시작 코돈의 하류에서 개시될 수 있다.

[0307] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 제1 시작 코돈이 아닌 코돈, 예를 들어, AUG에서 개시될 수 있다. 폴리리보뉴클레오티드의 번역은 대안적인 번역 개시 서열, 예컨대 ACG, AGG, AAG, CTG/CUG(서열 번호 74), GTG/GUG(서열 번호 75), ATA/AUA(서열 번호 76), ATT/AUU(서열 번호 77), TTG/UUG(서열 번호 78)(그러나 이에 한정되는 것은 아님)에서 개시될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 번역은 선택적 조건, 예를 들어, 스트레스 유도 조건 하에서 대안적인 번역 개시 서열에서 시작한다. 비제한적인 예로서, 폴리리보뉴클레오티드의 번역은 대안적인 번역 개시 서열, 예컨대 ACG에서 시작할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 폴리리보뉴클레오티드 번역은 대안적인 번역 개시 서열, CTG/CUG(서열 번호 74)에서 시작할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 폴리리

보뉴클레오티드 번역은 대안적인 번역 개시 서열, GTG/GUG(서열 번호 75)에서 시작할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 폴리리보뉴클레오티드는 반복부-관련 비-AUG(RAN) 서열, 예컨대 반복적 RNA의 짧은 스트레치를 포함하는 대안적인 번역 개시 서열, 예를 들어, CGG, GGGGCC(SEQ DI NO: 79), CAG, CTG에서 번역을 시작할 수 있다.

[0308] *종결 요소*

[0309] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 최소 하나의 종결 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 작동가능하게 연결된 종결 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 종결 요소를 결여한다.

[0310] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 각각의 발현 서열은 종결 요소를 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 발현 서열은, 폴리리보뉴클레오티드가 연속적으로 번역되도록, 종결 요소를 결여한다. 종결 요소의 배제는 발현 생성물의 롤링 서클 번역 또는 연속적 발현을 발생시킬 수 있다.

[0311] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 각각의 발현 서열은 종결 요소를 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 발현 서열은, 원형 폴리리보뉴클레오티드가 연속적으로 번역되도록, 종결 요소를 결여한다. 종결 요소의 배제는 리보솜 멈춤 또는 탈락의 결여로 인해, 발현 생성물, 예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드의 롤링 서클 번역 또는 연속적 발현을 발생시킬 수 있다. 이러한 실시 형태에서, 롤링 서클 번역은 각각의 발현 서열을 통해 연속적 발현 생성물을 발현시킨다. 일부 다른 실시 형태에서, 발현 서열의 종결 요소는 스태거 요소의 일부일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 하나 이상의 발현 서열은 종결 요소를 포함한다. 그러나, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 뒤이은(예를 들어, 제2, 제3, 제4, 제5 등의) 발현 서열의 롤링 서클 번역 또는 발현이 수행된다. 이러한 경우에, 발현 생성물은 리보솜이 종결 요소, 예를 들어, 정지 코돈에 직면할 때 리보솜을 탈락시킬 수 있고, 번역을 종결시킨다. 일부 실시 형태에서, 번역은 리보솜, 예를 들어, 리보솜의 적어도 하나의 서브유닛이 원형 폴리리보뉴클레오티드와 접촉하여 남아 있는 동안 종결된다.

[0312] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열의 단부에 종결 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 발현 서열은 잇달아 2개 이상의 종결 요소를 포함한다. 이러한 실시 형태에서, 번역은 종결되고, 롤링 서클 번역은 종결된다. 일부 실시 형태에서, 리보솜은 원형 폴리리보뉴클레오티드와 완전히 탈착된다. 일부 이러한 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 뒤이은(예를 들어, 제2, 제3, 제4, 제5 등의) 발현 서열의 생성은 번역의 개시 전에 리보솜이 원형 폴리리보뉴클레오티드와 재결착하는 것을 요구할 수 있다. 일반적으로, 종결 요소는 번역의 종결을 신호화하는 프레임내 뉴클레오티드 삼중자, 예를 들어, UAA, UGA, UAG를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 하나 이상의 종결 요소는 프레임-이동된 종결 요소, 예컨대 번역을 종결시킬 수 있는 오프-프레임 또는 -1 및 + 1 이동된 리딩 프레임(예를 들어, 히든 스톱)(그러나 이에 한정되는 것은 아님)이다. 프레임-이동된 종결 요소는 발현 서열의 제2 및 제3 리딩 프레임에서 보이는 뉴클레오티드 삼중자, TAA, TAG, 및 TGA를 포함한다. 프레임-이동된 종결 요소는 종종 세포에 유해한 mRNA의 오해독을 방지하는 데 있어서 중요할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 종결 요소는 정지 코돈이다.

[0313] 종결 요소의 추가의 예는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제2019/118919호의 단락 [0169]~[0170]에 기재되어 있다.

[0314] *비번역된 영역*

[0315] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 비번역된 영역(UTR)을 포함한다. 유전자를 포함하는 게놈 영역의 UTR은 전사되지만 번역되지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, UTR은 본원에 기재된 발현 서열의 번역 개시 서열의 상류에 포함될 수 있다. 일부 실시 형태에서, UTR은 본원에 기재된 발현 서열의 하류에 포함될 수 있다. 일부 경우에, 제1 발현 서열에 대한 하나의 UTR은 제2 발현 서열에 대한 또 다른 UTR과 동일하거나, 그와 연속적이거나 그와 중첩한다. 일부 실시 형태에서, 인트론은 인간 인트론이다. 일부 실시 형태에서, 인트론은 전장 인간 인트론, 예를 들어, ZKSCAN1이다.

[0316] 예시적인 비번역된 영역은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제WO2019/118919호의 단락 [0197]~[201]에 기재되어 있다.

[0317] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리-A 서열을 포함한다. 예시적인 폴리-A 서열은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제WO2019/118919호의 단락 [0202]~[0205]에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리-A 서열을 결여한다.

[0318] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 그 내에 내포된 아데노신 및 우리딘의 하나 이상의 스트레치를 갖는 UTR을 포함한다. 이들 AU 풍부 특징은 발현 생성물의 턴오버 속도를 증가시킬 수 있다.

[0319] UTR AU 풍부 요소(ARE)의 도입, 제거, 또는 변형은 원형 폴리리보뉴클레오티드의 안정성, 또는 면역원성(예를 들어, 면역 또는 염증 반응의 하나 이상의 마커의 수준)을 조정하는 데 유용할 수 있다. 특정 원형 폴리리보뉴클레오티드를 조작하는 경우, ARE의 하나 이상의 카피는 원형 폴리리보뉴클레오티드에 도입될 수 있고, ARE의 카피는 발현 생성물의 번역 및/또는 생성을 조정할 수 있다. 마찬가지로, ARE는 확인되고 제거되거나 원형 폴리리보뉴클레오티드 내로 조작되어 세포내 안정성을 조정하고, 따라서 생성된 단백질의 번역 및 생성에 영향을 미칠 수 있다.

[0320] 임의의 유전자로부터의 임의의 UTR은 원형 폴리리보뉴클레오티드의 각각의 플랭킹 영역 내로 혼입될 수 있음을 이해해야 한다.

[0321] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 5'-UTR을 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현에 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 3'-UTR을 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현에 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리-A 서열을 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 종결 요소를 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 내부 리보솜 진입 부위를 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 캡을 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 5'-UTR, 3'-UTR, 및 IRES를 결여하고, 그의 하나 이상의 발현 서열로부터의 단백질 발현을 위해 적격이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하기 서열 중 하나 이상을 포함한다: 하나 이상의 miRNA를 코딩하는 서열, 하나 이상의 복제 단백질을 코딩하는 서열, 외인성 유전자를 코딩하는 서열, 치료제를 코딩하는 서열, 조절 요소(예를 들어, 번역 조정제, 예를 들어, 번역 증진제 또는 억제제), 번역 개시 서열, 내인성 유전자를 표적화하는 하나 이상의 조절 핵산(예를 들어, siRNA, lncRNA, shRNA), 및 치료 mRNA 또는 단백질을 코딩하는 서열.

[0322] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 5'-UTR을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 3'-UTR을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 폴리-A 서열을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 종결 요소를 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 내부 리보솜 진입 부위를 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 엑소뉴클레아제에 의한 분해 감수성을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드가 분해 감수성을 결여한다는 사실은 원형 폴리리보뉴클레오티드가 엑소뉴클레아제에 의해 분해되지 않거나, 엑소뉴클레아제의 존재하에서 단지 제한된 정도로, 예를 들어, 엑소뉴클레아제의 부재 하에서와 대등하거나 유사한 정도로 분해됨을 의미할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 엑소뉴클레아제에 의해 분해되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 엑소뉴클레아제에 노출되는 경우 감소된 분해를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 캡-결합 단백질에의 결합을 결여한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 5' 캡을 결여한다.

[0323] *스태거 요소*

[0324] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 발현 서열에 인접한 적어도 하나의 스태거 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 각각의 발현 서열에 인접한 스태거 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 각각의 발현 서열의 한 측 또는 양측에 존재하여, 발현 생성물, 예를 들어, 펩티드(들) 및 또는 폴리펩티드(들)의 분리를 초래한다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 하나 이상의 발현 서열의 부분이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 서열을 포함하고, 하나 이상의 발현 서열 각각은 원형 폴리리보뉴클레오티드 상의 스태거 요소에 의해 뒤이은 발현 서열로부터 분리된다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 (a) 단일 발현 서열의 번역의 2개의 라운드로부터의 또는 (b) 2개 이상의 발현 서열의 번역의 하나 이상의 라운드로부터의 단일 폴리펩티드의 생성을 방지한다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 하나 이상의 발현 서열로부터 별개의 서열이다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 하나 이상의

발현 서열의 발현 서열의 부분을 포함한다.

[0325] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 스태거 요소를 포함한다. 롤링 서클 번역을 유지하면서, 연속적 발현 생성물, 예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드의 생성을 회피하기 위해, 스태거 요소는 번역 동안 리보솜 휴지를 유도하기 위해 포함될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 하나 이상의 발현 서열 중 적어도 하나의 3' 단부에 있다. 스태거 요소는 원형 폴리리보뉴클레오티드의 롤링 서클 번역 동안 리보솜을 멈추도록 구성될 수 있다. 스태거 요소는 2A-유사, 또는 CHYSEL(서열 번호 71)(시스-작용 히드롤라제 요소) 서열을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 $X_1X_2X_3EX_5NPGP$(서열 번호 72)인 C-말단 컨센서스 서열을 갖는 서열을 코딩하고, 여기서 X_1은 부재하거나 G 또는 H이고, X_2는 부재하거나 D 또는 G이고, X_3은 D 또는 V 또는 I 또는 S 또는 M이고, X_5는 임의의 아미노산이다. 일부 실시 형태에서, 이 서열은 강한 알파-나선 경향을 갖는 아미노산의 비-보존된 서열, 이어서 컨센서스 서열 -D(V/I)EXNPGP(서열 번호 73)을 포함하고, 여기서 x= 임의의 아미노산이다. 스태거 요소의 일부 비제한적인 예는 GDVESNPGP(서열 번호 52), GDIEENPGP(서열 번호 53), VEPNPGP(서열 번호 54), IETNPGP(서열 번호 55), GDIESNPGP(서열 번호 56), GDVELNPGP(서열 번호 57), GDIETNPGP(서열 번호 58), GDVENPGP(서열 번호 59), GDVEENPGP(서열 번호 60), GDVEQNPGP(서열 번호 61), IESNPGP(서열 번호 62), GDIELNPGP(서열 번호 63), HDIETNPGP(서열 번호 64), HDVETNPGP(서열 번호 65), HDVEMNPGP(서열 번호 66), GDMESNPGP(서열 번호 67), GDVETNPGP(서열 번호 68) GDIEQNPGP(서열 번호 69), 및 DSEFNPGP(서열 번호 70)를 포함한다.

[0326] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 스태거 요소는 예컨대 본원에 기재된 컨센서스 서열의 G와 P 사이에서 발현 생성물을 절단한다. 한 비제한적인 예로서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 발현 생성물을 절단하는 적어도 하나의 스태거 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 적어도 하나의 발현 서열에 인접한 스태거 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 각각의 발현 서열 뒤에 스태거 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 각각의 발현 서열의 한 측 또는 양측에 존재하는 스태거 요소를 포함하여, 각각의 발현 서열로부터의 개별적인 펩티드(들) 및 또는 폴리펩티드(들)의 번역을 초래한다.

[0327] 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 번역 동안 리보솜 휴지를 유도하는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 또는 비천연 뉴클레오티드를 포함한다. 비천연 뉴클레오티드는 펩티드 핵산(PNA), 모르폴리노 및 잠금 핵산(LNA), 뿐만 아니라 글리콜 핵산(GNA) 및 트레오스 핵산(TNA)을 포함할 수 있다. 이들과 같은 예는 분자의 백본에 대한 변화에 의해 천연 발생 DNA 또는 RNA로부터 구별된다. 예시적인 변형은 번역 동안 리보솜 휴지를 유도할 수 있는 당, 핵염기, 뉴클레오시드간 연결(예를 들어, 연결 포스페이트에 대한 / 포스포디에스테르 연결에 대한 / 포스포디에스테르 백본에 대한), 및 이들의 임의의 조합에 대한 임의의 변형을 포함할 수 있다. 본원에서 제공된 예시적인 변형의 일부는 본원의 다른 곳에 기재되어 있다.

[0328] 일부 실시 형태에서, 스태거 요소는 다른 형태로 원형 폴리리보뉴클레오티드에 존재한다. 예를 들어, 일부 예시적인 원형 폴리리보뉴클레오티드에서, 스태거 요소는 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 제1 발현 서열의 종결 요소, 및 제1 발현 서열에 뒤이은 발현의 제1 번역 개시 서열로부터 종결 요소를 분리하는 뉴클레오티드 스페이서 서열을 포함한다. 일부 예에서, 제1 발현 서열의 제1 스태거 요소는 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 제1 발현 서열에 뒤이은 발현의 제1 번역 개시 서열의 상류(그에 대해 5')에 있다. 일부 경우에, 제1 발현 서열 및 제1 발현 서열에 뒤이은 발현 서열은 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 2개의 별개의 발현 서열이다. 제1 스태거 요소와 제1 번역 개시 서열 사이의 거리는 제1 발현 서열 및 그의 뒤이은 발현 서열의 연속적 번역을 가능하게 할 수 있다.

[0329] 일부 실시 형태에서, 제1 스태거 요소는 종결 요소를 포함하고, 제1 발현 서열의 발현 생성물을 그의 뒤이은 발현 서열의 발현 생성물로부터 분리하고, 그에 의해 별개의 발현 생성물을 생성한다. 일부 경우에, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 뒤이은 서열의 제1 번역 개시 서열의 상류에 제1 스태거 요소를 포함하는 원형 폴리리보뉴클레오티드는 연속적으로 번역되는 반면, 제2 발현 서열에 뒤이은 발현 서열의 제2 번역 개시 서열의 상류에 있는 제2 발현 서열의 스태거 요소를 포함하는 상응하는 원형 폴리리보뉴클레오티드는 연속적으로 번역되지 않는다. 일부 경우에, 원형 폴리리보뉴클레오티드에 단지 하나의 발현 서열이 존재하며, 제1 발현 서열 및 그의 뒤이은 발현 서열은 동일한 발현 서열이다. 일부 예시적인 원형 폴리리보뉴클레오티드에서, 스태거 요소는 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 제1 발현 서열의 제1 종결 요소, 및 종결 요소를 하류 번역 개시 서열로부터 분리하는 뉴클레오티드 스페이서 서열을 포함한다. 일부 이러한 예에서, 제1 스태거 요소는 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 제1 발현 서열의 제1 번역 개시 서열의 상류에(그에 대해 5'에) 있다. 일부 경우에, 제1 스태거 요소와

제1 번역 개시 서열 사이의 거리는 제1 발현 서열 및 임의의 뒤이은 발현 서열의 연속적 번역을 가능하게 한다.

[0330] 일부 실시 형태에서, 제1 스태거 요소는 제1 발현 서열의 하나의 라운드 발현 생성물을 제1 발현 서열의 다음 라운드 발현 생성물로부터 분리하고, 그에 의해 별개의 발현 생성물을 생성한다. 일부 경우에, 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 제1 발현 서열의 제1 번역 개시 서열의 상류에 제1 스태거 요소를 포함하는 원형 폴리리보뉴클레오티드는 연속적으로 번역되는 반면, 상응하는 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 제2 발현 서열의 제2 번역 개시 서열의 상류에 스태거 요소를 포함하는 상응하는 원형 폴리리보뉴클레오티드는 연속적으로 번역되지 않는다. 일부 경우에, 제2 스태거 요소와 제2 번역 개시 서열 사이의 거리는 원형 폴리리보뉴클레오티드 내의 제1 스태거 요소와 제1 번역 개시 사이의 거리보다 상응하는 원형 폴리리보뉴클레오티드에서 적어도 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 또는 10x 더 크다. 일부 경우에, 제1 스태거 요소와 제1 번역 개시 사이의 거리는 적어도 2 nt, 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt, 11 nt, 12 nt, 13 nt, 14 nt, 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt, 20 nt, 25 nt, 30 nt, 35 nt, 40 nt, 45 nt, 50 nt, 55 nt, 60 nt, 65 nt, 70 nt, 75 nt, 또는 그 초과이다. 일부 실시 형태에서, 제2 스태거 요소와 제2 번역 개시 사이의 거리는 제1 스태거 요소와 제1 번역 개시 사이의 거리보다 적어도 2 nt, 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt, 11 nt, 12 nt, 13 nt, 14 nt, 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt, 20 nt, 25 nt, 30 nt, 35 nt, 40 nt, 45 nt, 50 nt, 55 nt, 60 nt, 65 nt, 70 nt, 75 nt, 또는 그 초과이다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 하나 초과의 발현 서열을 포함한다.

[0331] 스태거 요소의 예는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 국제 특허 공개 제WO2019/118919호의 단락 [0172]~[0175]에 기재되어 있다.

[0332] *비-코딩 서열*

[0333] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 폴리리보뉴클레오티드의 폴리리보뉴클레오티드 카고)는 하나 이상의 비-코딩 서열, 예를 들어, 폴리펩티드의 발현을 코딩하지 않는 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 10개 초과의 비-코딩 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 폴리펩티드 발현 서열을 코딩하지 않는다.

[0334] 비코딩 서열은 천연 또는 합성 서열일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 비코딩 서열은 세포 거동, 예컨대, 예를 들어, 림프구 거동을 변경시킬 수 있다. 일부 실시 형태에서, 비코딩 서열은 세포 RNA 서열에 대해 안티센스이다.

[0335] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 전형적으로 약 5~500 염기 쌍(bp)(특이적 RNA 구조에 따라(예를 들어, miRNA 5~30 bp, lncRNA 200~500 bp)의 RNA 또는 RNA-유사 구조인 조절 핵산을 포함하고, 세포 내의 발현된 표적 유전자 내의 코딩 서열과 동일한(상보적) 또는 거의 동일한(실질적으로 상보적) 핵염기 서열을 가질 수 있다. 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 더 작은 miRNA 중간체 또는 성숙 miRNA로 프로세싱될 수 있는, 약 50 내지 약 1000 bp일 수 있는, 더 작은 RNA, 예를 들어, miRNA 전구체로 프로세싱될 수 있는 RNA 전구체를 코딩하는 조절 핵산을 포함한다.

[0336] 긴 비-코딩 RNA(lncRNA)는 100개 초과의 뉴클레오티드의 비-단백질 코딩 전사체로서 정의된다. 많은 lncRNA는 조직 특이적인 것으로서 특성화된다. 인근의 단백질-코딩 유전자에 대해 반대 방향에서 전사되는 분기성 lncRNA는 상당한 비율(예를 들어, 포유동물 게놈 내의 총 lncRNA의 약 20%)을 포함하고, 가능하게는 인근의 유전자의 전사를 조절한다. 한 실시 형태에서, 본원에서 제공된 폴리리보뉴클레오티드는 lncRNA의 센스 가닥을 포함한다. 한 실시 형태에서, 본원에서 제공된 폴리리보뉴클레오티드는 lncRNA의 안티센스 가닥을 포함한다.

[0337] 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 내인성 유전자 또는 유전자 생성물(예를 들어, mRNA)의 전부에 대해 또는 적어도 하나의 단편에 대해 실질적으로 상보적, 또는 완전히 상보적인 조절 핵산을 코딩한다. 실시 형태에서, 조절 핵산은 인트론과 엑손 사이의 경계에, 엑손 사이에, 또는 엑손에 인접한 서열을 보완하여, 전사를 위한 특이적 유전자의 새롭게 생성된 핵 RNA 전사체의 mRNA로의 성숙을 방지한다. 특이적 유전자에 대해 상보적인 조절 핵산은 그 유전자에 대한 mRNA와 혼성화되고 그의 번역을 방지할 수 있다. 안티센스 조절 핵산은 DNA, RNA, 또는 그의 유도체 또는 혼성체일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 조절 핵산은 내인성 유전자 또는 외인성 유전자의 발현의 조절에 참여하는 단백질에 결합할 수 있는 단백질-결합 부위를 포함한다.

[0338] 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 관심 전사체에 혼성화하는 조절 RNA를 코딩하고, 여기서 조절 RNA는 약 5개 내지 30개의 뉴클레오티드, 약 10개 내지 30개의 뉴클레오티드, 또는 약 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 또는 30개 초과의 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 실시 형

태에서, 표적화된 전사체와의 조절 RNA의 서열 동일성의 정도는 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%이다.

[0339] 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 표적 유전자의 약 5개 내지 약 25개의 인접한 뉴클레오티드와 동일한 마이크로RNA(miRNA) 분자를 코딩하거나, 그 miRNA에 대한 전구체를 코딩한다. 일부 실시 형태에서, miRNA는 mRNA가 특이적 표적 mRNA를 인식하고 그에 결합하게 하는 서열을 갖는다. 실시 형태에서, miRNA 서열은 디뉴클레오티드 AA로 시작되고, 약 30~70%(약 30~60%, 약 40~60%, 또는 약 45%~55%)의 GC-함량을 포함하고, 예를 들어 표준 BLAST 검색에 의해 결정된 바와 같이, 그것이 도입될 대상체(예를 들어, 포유동물)의 게놈 내의 표적 이외의 임의의 뉴클레오티드 서열과 높은 백분율 동일성을 갖지 않는다.

[0340] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 적어도 하나의 miRNA(또는 miRNA 전구체), 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개, 또는 그 초과의 miRNA 또는 miRNA 전구체를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 표적 서열과 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90% 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 또는 100% 뉴클레오티드 서열 상보성을 갖는 miRNA(또는 그의 전구체)를 코딩하는 서열을 포함한다.

[0341] siRNA 및 shRNA는 내인성 마이크로RNA(miRNA) 유전자의 프로세싱 경로에서의 중간체를 닮았다. 일부 실시 형태에서, siRNA는 miRNA로서 기능할 수 있고, 그 역도 마찬가지이다. 마이크로RNA는, siRNA와 같이, 표적 유전자를 하향조절하기 위해 RISC를 사용하지만, siRNA와는 달리, 대부분의 동물 miRNA는 mRNA를 절단하지 않는다. 대신, miRNA는 번역 억제 또는 폴리A 제거 및 mRNA 분해를 통해 단백질 산출량을 감소시킨다. 알려진 miRNA 결합 부위는 mRNA 3' UTR 내에 있으며; miRNA는 miRNA의 5' 단부로부터의 뉴클레오티드 2~8과 거의 완벽한 상보성을 갖는 부위를 표적화하는 것으로 보인다. 이 영역은 시드 영역으로 알려져 있다. 성숙 siRNA 및 miRNA는 상호교환 가능하기 때문에, 외인성 siRNA는 siRNA와 시드 상보성을 갖는 mRNA를 하향조절한다.

[0342] 알려진 miRNA 서열의 목록은 검색 조직, 예컨대 다른 것들 중에서도, 웰컴 트러스트 생어 협회(Wellcome Trust Sanger Institute), 펜 생물정보학 센터(Penn Center for Bioinformatics), 메모리얼 슬로안 케터링 암 센터(Memorial Sloan Kettering Cancer Center), 및 유럽 분자 생물학 실험실(European Molecule Biology Laboratory)에 의해 유지되는 데이터베이스에서 발견될 수 있다. 알려진 효과적인 siRNA 서열 및 동종체 결합 부위는 또한 관련 문헌에 잘 나타나 있다. RNAi 분자는 당업계에 알려진 기술에 의해 용이하게 설계되고 생성된다. 또한, 효과적이고 특이적인 서열 모티프를 발견할 기회를 증가시키는 컴퓨터 도구가 존재한다.

[0343] *단백질-결합 서열*

[0344] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 단백질, 예를 들어, 리보솜이 RNA 서열 내의 내부 부위에 결합하는 것을 가능하게 하는 하나 이상의 단백질 결합 부위를 포함한다. 단백질 결합 부위, 예를 들어, 리보솜 결합 부위를 원형 폴리리보뉴클레오티드 내로 조작함으로써, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 숙주의 면역계에 의한 검출을 회피하거나 감소된 검출을 가질 수 있고, 원형 폴리리보뉴클레오티드를 숙주의 면역계의 성분으로부터 마스킹함으로써, 조정된 분해, 또는 조정된 번역을 가질 수 있다.

[0345] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 예를 들어 면역 반응, 예를 들어, CTL(세포독성 T 림프구) 반응을 회피하기 위해, 적어도 하나의 면역단백질 결합 부위를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 면역단백질 결합 부위는 면역단백질에 결합하고 원형 폴리리보뉴클레오티드를 외인성으로서 마스킹하는 것을 보조하는 뉴클레오티드 서열이다. 일부 실시 형태에서, 면역단백질 결합 부위는 면역단백질에 결합하고 원형 폴리리보뉴클레오티드를 외인성 또는 외래로서 은폐시키는 것을 보조하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0346] 선형 RNA에 대한 리보솜 결착의 전통적인 메카니즘은 RNA의 캡핑된 5' 단부에 대한 리보솜 결합을 수반한다. 5' 단부로부터, 리보솜은 개시 코돈으로 이동하고, 그 때 제1 펩티드 결합이 형성된다. 본 발명에 따르면, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 번역의 내부 개시(즉, 캡-독립적)는 유리 단부 또는 캡핑된 단부를 요구하지 않는다. 오히려, 리보솜은 비-캡핑된 내부 부위에 결합하고, 그에 의해 리보솜은 개시 코돈에서 폴리펩티드 신장을 시작한다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 리보솜 결합 부위, 예를 들어, 개시 코돈을 포함하는 하나 이상의 RNA 서열을 포함한다.

[0347] 천연 5'UTR은 번역 개시를 위해 역할을 하는 특색을 보유한다. 이들은 리보솜이 많은 유전자의 번역을 개시시키는 과정에 관여하는 것으로 통상적으로 알려져 있는 코작 서열과 같은 특징을 갖는다. 코작 서열은 컨센서스 CCR(A/G)CCAUGG(서열 번호 79)를 갖고, 여기서 R은 시작 코돈(AUG)의 3개의 염기 상류에 있는 퓨린(아데닌 또는 구아닌)이고, 여기에 또 다른 'G'가 이어진다. 5 'UTR은 또한 신장 인자 결합에 관여하는 2차 구조를 형성하는 것으로 알려졌다.

[0348] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 단백질에 결합하는 단백질 결합 서열을 코딩한다. 일부 실시 형태에서, 단백질 결합 서열은 원형 폴리리보뉴클레오티드를 특이적 표적에 표적화하거나 국재화한다. 일부 실시 형태에서, 단백질 결합 서열은 단백질의 아르기닌-풍부 영역에 특이적으로 결합한다.

[0349] 일부 실시 형태에서, 단백질 결합 부위는 단백질, 예컨대 ACIN1, AGO, APOBEC3F, APOBEC3G, ATXN2, AUH, BCCIP, CAPRIN1, CELF2, CPSF1, CPSF2, CPSF6, CPSF7, CSTF2, CSTF2T, CTCF, DDX21, DDX3, DDX3X, DDX42, DGCR8, EIF3A, EIF4A3, EIF4G2, ELAVL1, ELAVL3, FAM120A, FBL, FIP1L1, FKBP4, FMR1, FUS, FXR1, FXR2, GNL3, GTF2F1, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, HNRNPUL1, IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3, ILF3, KHDRBS1, LARP7, LIN28A, LIN28B, m6A, MBNL2, METTL3, MOV10, MSI1, MSI2, NONO, NONO-, NOP58, NPM1, NUDT21, PCBP2, POLR2A, PRPF8, PTBP1, RBFOX2, RBM10, RBM22, RBM27, RBM47, RNPS1, SAFB2, SBDS, SF3A3, SF3B4, SIRT7, SLBP, SLTM, SMNDC1, SND1, SRRM4, SRSF1, SRSF3, SRSF7, SRSF9, TAF15, TARDBP, TIA1, TNRC6A, TOP3B, TRA2A, TRA2B, U2AF1, U2AF2, UNK, UPF1, WDR33, XRN2, YBX1, YTHDC1, YTHDF1, YTHDF2, YWHAG, ZC3H7B, PDK1, AKT1, 및 RNA에 결합하는 임의의 다른 단백질에 대한 결합 부위를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0350] **스페이서 서열**

[0351] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드는 하나 이상의 스페이서 서열을 포함한다. 스페이서는 2개의 인접한 폴리뉴클레오티드 영역 사이에 거리 또는 유연성을 제공하는 (예를 들어, 하나 이상의 뉴클레오티드의) 임의의 인접한 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 스페이서는 본원에 기재된 핵산 요소 중 임의의 것 사이에 존재할 수 있다. 스페이서는 또한 본원에 기재된 핵산 요소 내에 존재할 수 있다.

[0352] 예를 들어, 여기서 핵산은 하기 요소 중 임의의 2개 이상을 포함한다: (A) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반; (B) 3' 스플라이스 부위; (C) 3' 엑손 단편; (D) 폴리리보뉴클레오티드 카고; (E) 5' 엑손 단편; (F) 5' 스플라이스 부위; 및 (G) 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반; 스페이서 영역은 요소 중 임의의 하나 이상 사이에 존재할 수 있다. 요소 (A), (B), (C), (D), (E), (F), 또는 (G) 중 임의의 것은 본원에 기재된 바와 같이 스페이서 서열에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어, (A)와 (B) 사이, (B)와 (C) 사이, (C)와 (D) 사이, (D)와 (E) 사이, (E)와 (F) 사이, 또는 (F)와 (G) 사이에 스페이서가 존재할 수 있다.

[0353] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 (C)의 5' 엑손 단편과 (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고 사이에 제1 스페이서 영역을 추가로 포함한다. 스페이서는 예를 들어, 적어도 5개(예를 들어, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개)의 리보뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 (D)의 폴리리보뉴클레오티드 카고와 (E)의 5' 엑손 단편 사이에 제2 스페이서 영역을 추가로 포함한다. 스페이서는 예를 들어, 적어도 5개(예를 들어, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개)의 리보뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 각각의 스페이서 영역은 적어도 5개(예를 들어, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개)의 리보뉴클레오티드의 길이이다. 각각의 스페이서 영역은 예를 들어, 5 내지 500개(예를 들어, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500개)의 리보뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A 서열을 포함할 수 있다. 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A-C 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A-G 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 폴리A-T 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 제1 스페이서 영역, 제2 스페이서 영역, 또는 제1 스페이서 영역 및 제2 스페이서 영역은 무작위 서열을 포함한다.

[0354] 스페이서는 또한 본원에 기재된 핵산 영역 내에 존재할 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 카고 영역은 하나 또는 다수의 스페이서를 포함할 수 있다. 스페이서는 폴리뉴클레오티드 카고 내에서 영역을 분리할 수 있다.

[0355] 일부 실시 형태에서, 스페이서 서열은 예를 들어, 적어도 10개의 뉴클레오티드의 길이, 적어도 15개의 뉴클레오티드의 길이, 또는 적어도 30개의 뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 서열은 적어도 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 또는 30개의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 서열은 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 또는 30개 이하의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 스페이서 서열은 20 내지 50개의 뉴클레오티드의 길이이다. 특정 실시 형태에서, 스페이서 서열은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 뉴클레오티드의 길이

이다.

[0356] 스페이서 서열은 폴리A 서열, 폴리A-C 서열, 폴리C 서열, 또는 폴리-U 서열일 수 있다.

[0357] 일부 실시 형태에서, 스페이서 서열은 폴리A-T, 폴리A-C, 폴리A-G, 또는 무작위 서열일 수 있다.

[0358] 스페이서 서열은 IRES를 인접한 구조적 요소로부터 분리하여 IRES 또는 인접한 요소의 구조 및 기능을 유지하는 데 사용될 수 있다. 스페이서는 IRES에 따라 특이적으로 조작될 수 있다. 일부 실시 형태에서, RNA 폴딩 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 RNAFold는 스페이서를 포함하는 벡터의 다양한 요소의 설계를 가이드하는 데 이용될 수 있다.

[0359] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 5' 스페이서 서열(예를 들어, 5' 어닐링 영역과 폴리리보뉴클레오티드 카고 사이에)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 적어도 10개의 뉴클레오티드의 길이이다. 또 다른 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 적어도 15개의 뉴클레오티드의 길이이다. 추가의 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 적어도 30개의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 적어도 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 또는 30개의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 또는 30개 이하의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 20 내지 50개의 뉴클레오티드의 길이이다. 특정 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 뉴클레오티드의 길이이다. 한 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 폴리A 서열이다. 또 다른 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 폴리A-C 서열이다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 폴리A-G 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 폴리A-T 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 무작위 서열을 포함한다.

[0360] 일부 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 3' 스페이서 서열(예를 들어, 3' 어닐링 영역과 폴리리보뉴클레오티드 카고 사이에)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 3' 스페이서 서열은 적어도 10개의 뉴클레오티드의 길이이다. 또 다른 실시 형태에서, 3' 스페이서 서열은 적어도 15개의 뉴클레오티드의 길이이다. 추가의 실시 형태에서, 3' 스페이서 서열은 적어도 30개의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 3' 스페이서 서열은 적어도 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 또는 30개의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 3' 스페이서 서열은 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 또는 30개 이하의 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 실시 형태에서, 3' 스페이서 서열은 20 내지 50개의 뉴클레오티드의 길이이다. 특정 실시 형태에서, 3' 스페이서 서열은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개의 뉴클레오티드의 길이이다. 한 실시 형태에서, 3' 스페이서 서열은 폴리A 서열이다. 또 다른 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 폴리A-C 서열이다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 폴리A-G 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 폴리A-T 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 5' 스페이서 서열은 무작위 서열을 포함한다.

[0361] 한 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 5' 스페이서 서열을 포함하지만, 3' 스페이서 서열은 포함하지 않는다. 또 다른 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 3' 스페이서 서열을 포함하지만, 5' 스페이서 서열은 포함하지 않는다. 또 다른 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 5' 스페이서 서열도 3' 스페이서 서열도 포함하지 않는다. 또 다른 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 IRES 서열을 포함하지 않는다. 추가의 실시 형태에서, 폴리리보뉴클레오티드는 IRES 서열, 5' 스페이서 서열 또는 3' 스페이서 서열을 포함하지 않는다.

[0362] 일부 실시 형태에서, 스페이서 서열은 적어도 3개의 리보뉴클레오티드, 적어도 4개의 리보뉴클레오티드, 적어도 5개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 8개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 10개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 12개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 15개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 20개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 25개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 30개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 40개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 50개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 60개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 70개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 80개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 90개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 100개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 120개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 150개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 200개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 250개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 300개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 400개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 500개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 600개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 700개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 800개의 리보뉴클레오티드, 적어도 약 900개의 리보뉴클레오티드, 또는 적어

도 약 100개의 리보뉴클레오티드를 포함한다.

[0363] **생성 방법**

[0364] *무세포 시스템에서의 생성 방법*

[0365] 본 발명은 또한 원형 RNA를 생성하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 데옥시리보뉴클레오티드 주형은 무세포 시스템에서 (예를 들어, 시험관내 전사에 의해) 전사되어 선형 RNA를 생성할 수 있다. 선형 폴리리보뉴클레오티드는 스플라이싱-혼화성 폴리리보뉴클레오티드를 생성하며, 이는 자기-스플라이시되어 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성할 수 있다.

[0366] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 선형 폴리리보뉴클레오티드를 제공하고; 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 및 5' 스플라이스 부위의 스플라이싱에 적합한 조건 하에서 선형 폴리리보뉴클레오티드를 자기-스플라이싱하고; 그에 의해 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성함으로써 (예를 들어, 무세포 시스템에서) 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하는 방법을 제공한다.

[0367] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 선형 폴리리보뉴클레오티드를 코딩하는 데옥시리보뉴클레오티드를 제공하고; 데옥시리보뉴클레오티드를 무세포 시스템에서 전사하여 선형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하고; 임의적으로 스플라이싱-혼화성 선형 폴리리보뉴클레오티드를 정제하고; 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 및 5' 스플라이스 부위의 스플라이싱에 적합한 조건 하에서 선형 폴리리보뉴클레오티드를 자기-스플라이싱하고, 그에 의해 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성함으로써, 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하는 방법을 제공한다.

[0368] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 선형 폴리리보뉴클레오티드를 코딩하는 데옥시리보뉴클레오티드를 제공하고; 데옥시리보뉴클레오티드를 무세포 시스템에서 전사하여 선형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하고, 여기서 전사는 선형 폴리리보뉴클레오티드의 3' 및 5' 스플라이스 부위의 스플라이싱에 적합한 조건 하에서 용액에서 일어나고, 그에 의해 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성함으로써 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 5' 스플리트-인트론 및 3' 스플리트-인트론(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하기 위한 자기-스플라이싱 구축물)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 5' 어닐링 영역 및 3' 어닐링 영역을 포함한다.

[0369] 시험관내 전사 및 또는 자기-스플라이싱을 위한 적합한 조건은 하나 이상의 관점에서 생리학적 조건을 모방하는 임의의 조건(예를 들어, 용액 또는 완충제, 예컨대 수성 완충제 또는 용액)을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 적합한 조건은 0.1~100 mM Mg^{2+} 이온 또는 그의 염(예를 들어, 1~100 mM, 1~50 mM, 1~20 mM, 5~50 mM, 5~20 mM, 또는 5~15 mM)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 적합한 조건은 1~1000 mM K^+ 이온 또는 그의 염, 예컨대 KCl(예를 들어, 1~1000 mM, 1~500 mM, 1~200 mM, 50~500 mM, 100~500 mM, 또는 100~300 mM)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 적합한 조건은 1~1000 mM Cl^- 이온 또는 그의 염, 예컨대 KCl(예를 들어, 1~1000 mM, 1~500 mM, 1~200 mM, 50~500 mM, 100~500 mM, 또는 100~300 mM)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 적합한 조건은 0.1~100 mM Mn^{2+} 이온 또는 그의 염, 예컨대 $MnCl_2$(예를 들어, 0.1~100 mM, 0.1~50 mM, 0.1~20 mM, 0.1~10 mM, 0.1~5 mM, 0.1~2 mM, 0.5~50 mM, 0.5~20 mM, 0.5~15 mM, 0.5~5 mM, 0.5~2 mM, 또는 0.1~10 mM)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 적합한 조건은 디티오트레이톨(DTT)(예를 들어, 1~1000 μM, 1~500 μM, 1~200 μM, 50~500 μM, 100~500 μM, 100~300 μM, 0.1~100 mM, 0.1~50 mM, 0.1~20 mM, 0.1~10 mM, 0.1~5 mM, 0.1~2 mM, 0.5~50 mM, 0.5~20 mM, 0.5~15 mM, 0.5~5 mM, 0.5~2 mM, 또는 0.1~10 mM)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 적합한 조건은 0.1 mM 내지 100 mM 리보뉴클레오시드 트리포스페이트(NTP)(예를 들어, 0.1~100 mM, 0.1~50 mM, 0.1~10 mM, 1~100 mM, 1~50 mM, 또는 1~10 mM)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 적합한 조건은 4 내지 10의 pH(예를 들어, 5 내지 9의 pH, 6 내지 9의 pH, 또는 6.5 내지 8.5의 pH)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 적합한 조건은 4℃ 내지 50℃(예를 들어, 10℃ 내지 40℃, 15℃ 내지 40℃, 20℃ 내지 40℃, 또는 30℃ 내지 40℃)의 온도를 포함한다.

[0370] 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 데옥시리보핵산, 예를 들어, 본원에 기재된 데옥시리보핵산, 예컨대 DNA 벡터, 선형화 DNA 벡터, 또는 cDNA로부터 생성된다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 무세포 시스템에서의 전사(예를 들어, 시험관내 전사)에 의해 데옥시리보핵산으로부터 전사된다.

[0371] *세포에서의 생성 방법*

[0372] 본 발명은 또한 세포, 예를 들어, 원핵 세포 또는 진핵 세포에서 원형 RNA를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 외인성 폴리리보뉴클레오티드는 세포에 제공된다(예를 들어, 본원에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드 또는 여기에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드의 전사를 코딩하는 DNA 분자). 선형 폴리리보뉴클레오

티드는 세포에서 세포에 제공된 외인성 DNA 분자로부터 전사될 수 있다. 선형 폴리리보뉴클레오티드는 세포에서 세포에 일시적으로 제공된 외인성 재조합 DNA 분자로부터 전사될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 외인성 DNA 분자는 세포의 게놈 내로 통합되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 세포에서 세포의 게놈 내로 혼입된 재조합 DNA 분자로부터 전사된다.

[0373] 일부 실시 형태에서, 세포는 원핵 세포이다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 원핵 세포는 박테리아 세포 또는 고세균 세포일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 원핵 세포는 이. 콜라이(E. coli), 호염성 고세균(예를 들어, 할로페락스 볼카니이(Haloferax volcaniii)), 스핑고모나스(Sphingomonas), 시아노박테리아(예를 들어, 시네코코쿠스 엘론가투스(Synechococcus elongatus), 스피룰리나(Spirulina)(아르트로스피라(Arthrospira)) 종, 및 시네코시스티스(Synechocystis) 종), 스트렙토미세스(Streptomyces), 악티노미세테스(예를 들어, 노노무라에아(Nonomuraea), 키타사토스포라(Kitasatospora), 또는 써모비피다(Thermobifida)), 바실루스(Bacillus) 종(예를 들어, 바실루스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 바실루스 안트라시스(Bacillus anthracis), 바실루스 세레우스(Bacillus cereus)), 베타프로테오박테리아(예를 들어, 부르크홀데리아(Burkholderia)), 알파프로테오박테리아(예를 들어, 아그로박테리움(Agrobacterium)), 슈도모나스(Pseudomonas)(예를 들어, 슈도모나스 푸티다(Pseudomonas putida)), 및 엔테로박테리아일 수 있다. 원핵 세포는 배양 배지에서 성장될 수 있다. 원핵 세포는 생물반응기에 함유될 수 있다.

[0374] 일부 실시 형태에서, 세포는 진핵 세포이다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 진핵 세포는 단세포 진핵 세포이다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵은 단세포 진균 세포, 예컨대 효모 세포(예를 들어, 사카로미세스 세레비지아에(Saccharomyces cerevisiae) 및 다른 사카로미세스(Saccharomyces) 종, 브레타노미세스(Brettanomyces) 종, 쉬조사카로미세스(Schizosaccharomyces) 종, 토룰라스포라(Torulaspora) 종, 및 피키아(Pichia) 종)이다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 단세포 동물 세포이다. 단세포 동물 세포는 다세포 동물로부터 단리되고 배양에서 성장된 세포, 또는 그의 딸 세포일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단세포 동물 세포는 탈분화될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 단세포 식물 세포이다. 단세포 식물 세포는 다세포 식물로부터 단리되고 배양에서 성장된 세포, 또는 그의 딸 세포일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단세포 식물 세포는 탈분화될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 단세포 식물 세포는 식물 캘러스로부터의 것이다. 실시 형태에서, 단세포 세포는 식물 세포 원형질체이다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 단세포 진핵 조류 세포, 예컨대 단세포 녹조류, 규조류, 유글레나과, 또는 편모조류이다. 관심 단세포 진핵 조류의 비제한적인 예는 두날리엘라 살리나(Dunaliella salina), 클로렐라 불가리스(Chlorella vulgaris), 클로렐라 조핀기엔시스(Chlorella zofingiensis), 해마토코쿠스 플루비알리스(Haematococcus pluvialis), 네오클로리스 올레오아분단스(Neochloris oleoabundans) 및 다른 네오클로리스(Neochloris) 종, 프로토시폰 보트리오이데스(Protosiphon botryoides), 보트리오코쿠스 브라우니이(Botryococcus braunii), 크립토코쿠스(Cryptococcus) 종, 클라미도모나스 레인하르드티이(Chlamydomonas reinhardtii) 및 다른 클라미도모나스(Chlamydomonas) 종을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 원생생물 세포이다. 일부 실시 형태에서, 단세포 진핵 세포는 원충 세포이다.

[0375] 일부 실시 형태에서, 진핵 세포는 다세포 진핵생물의 세포이다. 예를 들어, 다세포 진핵생물은 척추 동물, 무척추 동물, 다세포 진균, 다세포 조류, 및 다세포 식물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 인간이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 비-인간 척추 동물이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 무척추 동물이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 다세포 진균이다. 일부 실시 형태에서, 진핵 유기체는 다세포 식물이다. 실시 형태에서, 진핵 세포는 인간의 세포, 또는 비-인간 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 유인원), 유제류(예를 들어, 소, 버팔로, 비손, 양, 염소, 및 사향 소를 포함하는 소과; 돼지; 낙타, 라마, 및 알파카를 포함하는 낙타과; 사슴, 영양; 및 말 및 당나귀를 포함하는 말과), 육식동물(예를 들어, 개, 고양이), 설치류(예를 들어, 래트, 마우스, 기니아 피그, 햄스터, 다람쥐), 또는 토끼목(예를 들어, 토끼, 헤어)의 세포이다. 실시 형태에서, 진핵 세포는 조류, 예컨대 조류 분류군 순계목(예를 들어, 닭, 칠면조, 꿩, 메추라기), 기러기목(예를 들어, 오리, 거위), 고관목(예를 들어, 타조, 에뮤), 비둘기목(예를 들어, 피존, 도브), 또는 앵무새목(예를 들어, 앵무새)의 구성원의 세포이다. 실시 형태에서, 진핵 세포는 절지동물(예를 들어, 곤충류, 거미류, 갑각류), 선충, 환형동물, 연충, 또는 연체동물의 세포이다. 실시 형태에서, 진핵 세포는 다세포 식물, 예컨대 피자 식물(쌍자엽 또는 단자엽일 수 있음) 또는 나자 식물(예를 들어, 침엽수, 소철류, 마황문, 은행나무), 양치식물, 쇠뜨기, 석송, 또는 선태식물의 세포이다. 실시 형태에서, 진핵 세포는 진핵 다세포 조류의 세포이다.

[0376] 진핵 세포는 배양 배지에서 성장될 수 있다. 진핵 세포는 생물반응기에 함유될 수 있다.

[0377] *정제 방법*

[0378] 하나 이상의 정제 단계는 본원에 기재된 방법에 포함될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 자기-스플라이싱하기 전에 실질적으로 풍부화되거나 순수하다(예를 들어, 정제된다). 다른 실시 형태에서, 선형 폴리리보뉴클레오티드는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 자기-스플라이싱하기 전에 정제되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 생성된 원형 RNA는 정제된다.

[0379] 정제는 원하는 반응 생성물을 하나 이상의 원하지 않는 성분, 예컨대 임의의 비반응된 출발 물질, 부산물, 효소, 또는 다른 반응 성분으로부터 분리하거나 풍부화하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 무세포 시스템에서의 전사(예를 들어, 시험관내 전사) 후의 선형 폴리리보뉴클레오티드의 정제는 선형 폴리리보뉴클레오티드를 자기-스플라이싱하기 전에 DNA 주형으로부터의 분리 또는 풍부화를 포함할 수 있다. 스플라이싱 후의 원형 RNA 생성물의 정제는 원형 RNA를 그의 상응하는 선형 RNA로부터 분리하거나 풍부화하는 데 사용될 수 있다. RNA의 정제 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 효소적 정제 또는 크로마토그래피에 의한 정제를 포함한다.

[0380] 일부 실시 형태에서, 정제 방법은 50% 미만(예를 들어, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만)의 선형 폴리리보뉴클레오티드를 갖는 원형 폴리리보뉴클레오티드를 발생시킨다.

[0381] *생물반응기*

[0382] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드를 생성하는 임의의 방법은 생물반응기에서 수행될 수 있다. 생물반응기는 유기체 또는 이러한 유기체로부터 유래된 생화학적으로 활성인 물질을 수반하는 화학적 또는 생물학적 과정이 수행되는 임의의 용기를 지칭한다. 생물반응기는 본원에 기재된 원형 RNA의 생성을 위한 무세포 방법과 혼화성일 수 있다. 생물반응기를 위한 용기는 단일 사용(일회용), 오토클레이브 가능할, 또는 멸균 가능할 수 있는 배양 플라스크, 디쉬, 또는 백을 포함할 수 있다. 생물반응기는 유리로 제조될 수 있거나, 이는 중합체-기반일 수 있거나, 이는 다른 물질로 제조될 수 있다.

[0383] 생물반응기의 예는 제한 없이, 교반 탱크(예를 들어, 잘 혼합된) 생물반응기 및 관상(예를 들어, 플러그 유동) 생물반응기, 에어리프트 생물반응기, 막 교반 탱크, 스핀 필터 교반 탱크, 진동혼합기, 유동층 반응기, 및 막 생물반응기를 포함한다. 생물반응기를 작동하는 방식은 회분식 또는 연속식 과정일 수 있다. 생물반응기는 시약 및 생성물 스트림이 연속적으로 공급되고 있고 시스템으로부터 빼내어지는 경우 연속적이다. 회분식 생물반응기는 연속적 재순환 유동을 가질 수 있지만, 시약 또는 생성물 수확물의 연속적 공급은 갖지 않을 수 있다.

[0384] 본 발명의 일부 방법은 원형 폴리리보뉴클레오티드의 대규모 생성에 관한 것이다. 대규모 생성 방법을 위해, 방법은 1 리터(L) 내지 50 L, 또는 그 초과(예를 들어, 5 L, 10 L, 15 L, 20 L, 25 L, 30 L, 35 L, 40 L, 45 L, 50 L, 또는 그 초과)의 부피에서 수행될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 방법은 5 L 내지 10 L, 5 L 내지 15 L, 5 L 내지 20 L, 5 L 내지 25 L, 5 L 내지 30 L, 5 L 내지 35 L, 5 L 내지 40 L, 5 L 내지 45 L, 10 L 내지 15 L, 10 L 내지 20 L, 10 L 내지 25 L, 20 L 내지 30 L, 10 L 내지 35 L, 10 L 내지 40 L, 10 L 내지 45 L, 10 L 내지 50 L, 15 L 내지 20 L, 15 L 내지 25 L, 15 L 내지 30 L, 15 L 내지 35 L, 15 L 내지 40 L, 15 L 내지 45 L, 또는 15 내지 50 L의 부피에서 수행될 수 있다.

[0385] 일부 실시 형태에서, 생물반응기는 적어도 1 g의 원형 RNA를 생성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 생물반응기는 1~200 g의 원형 RNA(예를 들어, 1~10 g, 1~20 g, 1~50 g, 10~50 g, 10~100 g, 50~100 g, 50~200 g의 원형 RNA)를 생성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 생성되는 양은 리터당(예를 들어, 리터당 1~200 g), 회분 또는 반응당(예를 들어, 회분 또는 반응당 1~200 g), 또는 단위 시간당(예를 들어, 시간당 또는 일당 1~200 g) 측정된다.

[0386] 일부 실시 형태에서, 생성 용량을 증가시키기 위해 하나 초과의 생물반응기가 일련으로 이용될 수 있다(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9개의 생물반응기가 일련으로 사용될 수 있다).

[0387] **사용 방법**

[0388] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 바와 같이 제조된 원형 폴리리보뉴클레오티드는 요법 또는 농업에서 이펙터로서 사용된다.

[0389] 예를 들어, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 원형 폴리리보뉴클레오티드는 대상체에게 투여될 수 있다(예를 들어, 제약, 수의학, 또는 농업 조성물로). 일부 실시 형태에서, 대상체는 척추 동물(예를 들어, 포유동물, 조

류, 어류, 파충류, 또는 양서류)이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 비-인간 포유동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 비-인간 포유동물, 예컨대 비-인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 유인원), 유제류(예를 들어, 소, 버팔로, 양, 염소, 돼지, 낙타, 라마, 알파카, 사슴, 말, 당나귀), 육식동물(예를 들어, 개, 고양이), 설치류(예를 들어, 래트, 마우스), 또는 토끼목(예를 들어, 토끼)이다. 실시 형태에서, 대상체는 조류, 예컨대 조류 분류군 순계목(예를 들어, 닭, 칠면조, 꿩, 메추라기), 기러기목(예를 들어, 오리, 거위), 고관목(예를 들어, 타조, 에뮤), 비둘기목(예를 들어, 피존, 도브), 또는 앵무새목(예를 들어, 앵무새)의 구성원이다. 실시 형태에서, 대상체는 무척추동물, 예컨대 절지동물(예를 들어, 곤충류, 거미류, 갑각류), 선충, 환형동물, 연충, 또는 연체동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 무척추동물 농업적 해충 또는 무척추동물 또는 척추동물 숙주 상에 기생하는 무척추동물이다. 실시 형태에서, 대상체는 식물, 예컨대 피자 식물(쌍자엽 또는 단자엽일 수 있음) 또는 나자 식물(예를 들어, 침엽수, 소철류, 마황문, 은행나무), 양치식물, 쇠뜨기, 석송, 또는 선태식물이다. 실시 형태에서, 대상체는 진핵 조류(단세포 또는 다세포)이다. 실시 형태에서, 대상체는 농업적으로 또는 원예적으로 중요한 식물, 예컨대 줄뿌림 작물 식물, 과실-생산 식물 및 나무, 채소, 나무, 및 관상용 꽃, 관목, 나무, 지표식물, 및 잔디풀을 포함하는 관상용 식물이다.

[0390] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 조성물 또는 제형을 대상체에게 제공함으로써 대상체를 변형시키는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 조성물 또는 제형은 핵산 분자(예를 들어, 본원에 기재된 DNA 분자 또는 RNA 분자)이거나 이를 포함하고, 폴리뉴클레오티드는 진핵 대상체에게 제공된다. 일부 실시 형태에서, 조성물 또는 제형은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 진핵 또는 원핵 세포이거나 이를 포함한다.

[0391] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 조성물 또는 제형을 대상체에게 제공함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 조성물 또는 제형은 핵산 분자(예를 들어, 본원에 기재된 DNA 분자 또는 RNA 분자)이거나 이를 포함하고, 폴리뉴클레오티드는 진핵 대상체에게 제공된다. 일부 실시 형태에서, 조성물 또는 제형은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 진핵 또는 원핵 세포이거나 이를 포함한다.

[0392] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 진핵 또는 원핵 세포를 대상체에게 제공함으로써 원형 폴리리보뉴클레오티드를 대상체에게 제공하는 방법을 제공한다.

[0393] **제형**

[0394] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드는 조성물, 예를 들어, 세포, 식물, 무척추 동물, 비-인간 척추 동물, 또는 인간 대상체에의 전달을 위한 조성물, 예를 들어, 농업, 수의학, 또는 제약 조성물로 제형화될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 제약 조성물로 제형화된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 원형 폴리리보뉴클레오티드 및 희석제, 담체, 보조제, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 실시 형태에서, 조성물은 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드 및 담체 또는 임의의 담체가 없는 희석제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 임의의 담체가 없는 희석제를 갖는 원형 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 조성물은 대상체에의 원형 폴리리보뉴클레오티드의 네이키드 전달을 위해 사용된다.

[0395] *염*

[0396] 일부 경우에, 본원에서 제공된 조성물 또는 제약 조성물은 하나 이상의 염을 포함한다. 긴장성을 제어하기 위해, 생리학적 염, 예컨대 나트륨 염은 본원에서 제공된 조성물에 포함될 수 있다. 다른 염은 염화칼륨, 인산이수소칼륨, 인산이나트륨, 및/또는 염화마그네슘 등을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조성물은 하나 이상의 제약상 허용되는 염으로 제제화된다. 하나 이상의 제약상 허용되는 염은 무기 이온, 예컨대, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 이온 등의 것들을 포함할 수 있다. 이러한 염은 무기 또는 유기 산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 인산, 질산, 황산, 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 푸마르산, 숙신산, 락트산, 만델산, 말산, 시트르산, 타르타르산, 또는 말레산과의 염을 포함할 수 있다. 폴리리보뉴클레오티드는 선형 또는 원형 형태 중 어느 하나로 존재할 수 있다.

[0397] *완충제/pH*

[0398] 본원에서 제공된 조성물 또는 제약 조성물은 하나 이상의 완충제, 예컨대 트리스 완충제; 보레이트 완충제; 숙시네이트 완충제; 히스티딘 완충제(예를 들어, 수산화알루미늄 보조제를 가짐); 또는 시트레이트 완충제를 포함할 수 있다. 완충제는, 일부 경우에, 5~20 mM 범위로 포함된다.

[0399] 본원에서 제공된 조성물 또는 제약 조성물은 약 5.0 내지 약 8.5, 약 6.0 내지 약 8.0, 약 6.5 내지 약 7.5, 또는 약 7.0 내지 약 7.8의 pH를 가질 수 있다. 조성물 또는 제약 조성물은 약 7의 pH를 가질 수 있다. 폴리리보

뉴클레오티드는 선형 또는 원형 형태 중 어느 하나로 존재할 수 있다.

[0400] *세정제/계면활성제*

[0401] 본원에서 제공된 조성물 또는 제약 조성물은 의도되는 투여 경로에 따라, 하나 이상의 세정제 및/또는 계면활성제, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제(통상적으로 "Tween"으로 지칭됨), 예를 들어, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80; DOWFAX™ 상표명 하에 판매되는 에틸렌 옥시드(EO), 프로필렌 옥시드(PO), 및/또는 부틸렌 옥시드(BO)의 공중합체, 예컨대 선형 EO/PO 블록 공중합체; 반복하는 에톡시(옥시-1,2-에탄디일) 기의 수에 있어서 달라질 수 있는 옥톡시놀, 예를 들어, 옥톡시놀-9(트리톤 X-100, 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올); (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올(IGEPAL CA-630/NP-40); 인지질, 예컨대 포스파티딜콜린(레시틴); 노닐페놀 에톡실레이트, 예컨대 Tergitol™ NP 시리즈; 라우릴, 세틸, 스테아릴 및 올레일 알콜로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르(Brij 계면활성제로 알려짐), 예컨대 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르(Brij 30); 및 소르비탄 에스테르(통상적으로 "SPAN"으로 알려짐), 예컨대 소르비탄 트리올레에이트(Span 85) 및 소르비탄 모노라우레이트, 옥톡시놀(예컨대 옥톡시놀-9(트리톤 X-100) 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올), 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드("CTAB"), 또는 나트륨 데옥시콜레이트를 포함할 수 있다. 하나 이상의 세정제 및/또는 계면활성제는 단지 흔적량으로 존재할 수 있다. 일부 경우에, 조성물은 1 mg/ml 미만의 각각의 옥톡시놀-10 및 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다. 비-이온성 계면활성제는 본원에서 사용될 수 있다. 계면활성제는 그들의 "HLB"(친수성/친지질성 균형)에 의해 분류될 수 있다. 일부 경우에, 계면활성제는 적어도 10, 적어도 15, 및/또는 적어도 16의 HLB를 갖는다. 폴리리보뉴클레오티드는 선형 또는 원형 형태 중 어느 하나로 존재할 수 있다.

[0402] *희석제*

[0403] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 원형 폴리리보뉴클레오티드 및 희석제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 선형 폴리리보뉴클레오티드 및 희석제를 포함한다.

[0404] 희석제는 비-담체 부형제일 수 있다. 비-담체 부형제는 본원에 기재된 바와 같은 조성물, 예컨대 원형 폴리리보뉴클레오티드에 대한 비히클 또는 매질로서 역할을 한다. 비-담체 부형제는 본원에 기재된 바와 같은 조성물, 예컨대 선형 폴리리보뉴클레오티드에 대한 비히클 또는 매질로서 역할을 한다. 비-담체 부형제의 비제한적인 예는 용매, 수성 용매, 비-수성 용매, 분산 매질, 희석제, 분산액, 현탁 조제, 표면 활성제, 등장성제, 증점제, 유화제, 보존제, 중합체, 펩티드, 단백질, 세포, 히알루로니다제, 분산제, 과립화제, 붕해제, 결합제, 완충제(예를 들어, 포스페이트 완충 염수(PBS)), 윤활제, 오일, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 비-담체 부형제는 세포-관통 효과를 나타내지 않는 미국 식품의약국(FDA)에 의해 승인되고 불활성 성분 데이터베이스에 열거된 불활성 성분 중 임의의 하나일 수 있다. 비-담체 부형제는 비-인간 동물에의 투여에 적합한, 예를 들어, 수의학 용도에 적합한 임의의 불활성 성분일 수 있다. 조성물을 다양한 동물에의 투여에 적합하게 만들기 위한 인간에의 투여에 적합한 조성물의 변형은 널리 이해되어 있으며, 통상의 기술을 갖는 수의학 약리학자는 존재하는 경우, 단지 통상적인 실험으로 이러한 변형을 설계하고/거나 수행할 수 있다.

[0405] 일부 실시 형태에서, 원형 폴리리보뉴클레오티드는 예컨대 희석제를 포함하는 네이키드 전달 제형으로서 전달될 수 있다. 네이키드 전달 제형은 담체의 보조 없이 및 원형 폴리리보뉴클레오티드, 캡핑된 폴리리보뉴클레오티드, 또는 이들의 복합체의 변형 또는 부분적 또는 완전한 캡슐화 없이 원형 폴리리보뉴클레오티드를 세포에 전달한다.

[0406] 네이키드 전달 제형은 담체가 없는 제형이고, 여기서 원형 폴리리보뉴클레오티드는 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 결합하는 공유 변형이 없거나, 원형 폴리리보뉴클레오티드의 부분적 또는 완전한 캡슐화가 없다. 일부 실시 형태에서, 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 결합하는 공유 변형이 없는 원형 폴리리보뉴클레오티드는 단백질, 소분자, 입자, 중합체, 또는 생체중합체에 공유적으로 결합되지 않는 폴리리보뉴클레오티드이다. 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 결합하는 공유 변형이 없는 원형 폴리리보뉴클레오티드는 변형된 포스페이트 기를 함유하지 않는다. 예를 들어, 세포에의 전달을 보조하는 모이어티에 결합하는 공유 변형이 없는 원형 폴리리보뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 포스포로셀레네이트, 보라노포스페이트, 보라노포스페이트 에스테르, 히드로겐 포스포네이트, 포스포르아미데이트, 포스포로디아미데이트, 알킬 또는 아릴 포스포네이트, 또는 포스포트리에스테르를 함유하지 않는다.

[0407] 일부 실시 형태에서, 네이키드 전달 제형은 형질감염 시약, 양이온성 담체, 탄수화물 담체, 나노입자 담체, 또는 단백질 담체 중 임의의 것 또는 전부가 없다. 일부 실시 형태에서, 네이키드 전달 제형은 프토글리코겐 옥테

닐 숙시네이트, 피토글리코겐 베타-덱스트린, 무수물-변형된 피토글리코겐 베타-덱스트린, 리포펙타민, 폴리에틸렌이민, 폴리(트리메틸렌이민), 폴리(테트라메틸렌이민), 폴리프로필렌이민, 아미노글리코시드-폴리아민, 디데옥시-디아미노-b-시클로덱스트린, 스페르민, 스페르미딘, 폴리(2-디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리(리신), 폴리(히스티딘), 폴리(아르기닌), 양이온화 젤라틴, 덴드리머, 키토산, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP), N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리늄 클로라이드(DOTIM), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카르복스아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트(DOSPA), 3B-[N-(N\N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일]콜레스테롤 히드로클로라이드(DC-콜레스테롤 HC1), 디헵타데실아미도글리실 스페르미딘(DOGS), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(DDAB), N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 암모늄 브로마이드(DMRIE), N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC), 인간 혈청 알부민(HSA), 저-밀도 지단백질(LDL), 고-밀도 지단백질(HDL), 또는 글로불린이 없다.

[0408] 특정 실시 형태에서, 네이키드 전달 제형은 비-담체 부형제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 비-담체 부형제는 세포-관통 효과를 나타내지 않는 불활성 성분을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 비-담체 부형제는 완충제, 예를 들어 PBS를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 비-담체 부형제는 용매, 비-수성 용매, 희석제, 현탁 조제, 표면 활성제, 등장성제, 증점제, 유화제, 보존제, 중합체, 펩티드, 단백질, 세포, 히알루로니다제, 분산제, 과립화제, 붕해제, 결합제, 완충제, 윤활제, 또는 오일이다.

[0409] 일부 실시 형태에서, 네이키드 전달 제형은 희석제를 포함한다. 희석제는 액체 희석제 또는 고체 희석제일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 희석제는 RNA 가용화제, 완충제, 또는 등장성제이다. RNA 가용화제의 예는 물, 에탄올, 메탄올, 아세톤, 포름아미드, 및 2-프로판올을 포함한다. 완충제의 예는 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산(MES), 비스-트리스, 2-[(2-아미노-2-옥소에틸)-(카르복시메틸)아미노]아세트산(ADA), N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산(ACES), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산)(PIPES), 2-[[1,3-디히드록시-2-(히드록시메틸)프로판-2-일]아미노]에탄술폰산(TES), 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산(MOPS), 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산(HEPES), 트리스, 트리신, Gly-Gly, 비신, 또는 포스페이트를 포함한다. 등장성제의 예는 글리세린, 만니톨, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 트레할로스, 또는 수크로스를 포함한다.

[0410] *담체*

[0411] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 원형 폴리리보뉴클레오티드 및 담체를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 선형 폴리리보뉴클레오티드 및 담체를 포함한다.

[0412] 특정 실시 형태에서, 조성물은 소낭 또는 다른 막-기반 담체에 본원에 기재된 바와 같은 원형 폴리리보뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시 형태에서, 조성물은 소낭 또는 다른 막-기반 담체에 본원에 기재된 바와 같은 선형 폴리리보뉴클레오티드를 포함한다.

[0413] 다른 실시 형태에서, 조성물은 세포, 소낭 또는 다른 막-기반 담체에 또는 이를 통해 원형 폴리리보뉴클레오티드를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 조성물은 세포, 소낭 또는 다른 막-기반 담체에 또는 이를 통해 선형 폴리리보뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시 형태에서, 조성물은 리포좀 또는 다른 유사한 소낭에 원형 폴리리보뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시 형태에서, 조성물은 리포좀 또는 다른 유사한 소낭에 선형 폴리리보뉴클레오티드를 포함한다. 리포좀은 내부 수성 구획을 둘러싼 단층 또는 다층 지질 이중층 및 상대적으로 비투과성인 외부 친지성 인지질 이중층으로 구성된 구형 소낭 구조이다. 리포좀은 음이온성, 중성 또는 양이온성일 수 있다. 리포좀은 생체적합성, 무독성이며, 친수성 및 친지성 약물 분자 둘 모두를 전달하고, 혈장 효소에 의한 분해로부터 이들의 카고를 보호하고, 이들의 로드(load)를 생물학적 막 및 혈액 뇌 장벽(BBB)을 가로질러 수송할 수 있다(예를 들어, 검토를 위해, 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011 doi:101155/2011/469679] 참조).

[0414] 소낭은 몇몇 상이한 유형의 지질로 제조될 수 있지만; 인지질이 약물 담체로서 리포좀을 생성하기 위해 가장 통상적으로 사용된다. 다층 소낭 지질의 제조 방법은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 다층 소낭 지질 제조에 관한 교시가 본원에 참조로 포함되는, 미국 특허 제6,693,086호 참조). 지질막이 수용액과 혼합되는 경우 소낭 형성은 자발적일 수 있지만, 이는 또한 균질화기, 초음파분쇄기, 또는 압출 장치를 사용함으로써 진탕 형태로 힘을 가하여 촉진될 수 있다(예를 들어, 검토를 위해 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011 doi:10.1155/2011/469679] 참조). 압출된 지질은 압출된 지질 제조에 관한 교시가 본원에 참조로 포함되는, 문헌[Templeton et al, Nature Biotech, 15:647-652, 1997]에 기재된

바와 같이, 감소하는 크기의 필터를 통해 압출함으로써 제조될 수 있다.

[0415] 특정 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 원형 폴리리보뉴클레오티드 및 지질 나노입자, 예를 들어 본원에 기재된 지질 나노입자를 포함한다. 특정 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 선형 폴리리보뉴클레오티드 및 지질 나노입자를 포함한다. 지질 나노입자는 본원에 기재된 바와 같은 원형 폴리리보뉴클레오티드 분자에 대한 생체혼화성 및 생체분해성 전달 시스템을 제공하는 담체의 또 다른 예이다. 지질 나노입자는 본원에 기재된 바와 같은 선형 폴리리보뉴클레오티드 분자에 대한 생체혼화성 및 생체분해성 전달 시스템을 제공하는 담체의 또 다른 예이다. 나노구조화된 지질 담체(NLC)는 고체 지질 나노입자(SLN)의 특징을 보유하고, 약물 안정성 및 로딩 용량을 개선시키고, 약물 누출을 방지하는 변형된 SLN이다. 중합체 나노입자(PNP)는 약물 전달의 중요한 성분이다. 이들 나노입자는 특이적 표적에 약물 전달을 효과적으로 지정하고 약물 안정성 및 제어된 약물 방출을 개선시킬 수 있다. 리포좀 및 중합체를 조합한 담체의 새로운 유형인 지질-중합체 나노입자(PLN)는 또한 이용될 수 있다. 이들 나노입자는 PNP 및 리포좀의 보완적 이점을 갖는다. PLN은 코어-쉘 구조로 구성되며; 중합체 코어는 안정한 구조를 제공하고, 인지질 쉘은 우수한 생체적합성을 제공한다. 따라서, 2가지 성분은 약물 캡슐화 효율을 증가시키고, 표면 변형을 용이하게 하고, 수용성 약물의 누출을 방지한다. 검토를 위해, 예를 들어, 문헌[Li et al. 2017, Nanomaterials 7, 122; doi:10.3390/nano7060122]을 참조한다.

[0416] 담체의 추가적인 비제한적인 예는 탄수화물 담체(예를 들어, 무수물-변형된 피토글리코겐 또는 글리코겐-유형 물질), 단백질 담체(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드에 공유적으로 연결된 단백질 또는 선형 폴리리보뉴클레오티드에 공유적으로 연결된 단백질), 또는 양이온성 담체(예를 들어, 양이온성 지질중합체 또는 형질감염 시약)를 포함한다. 탄수화물 담체의 비제한적인 예는 프토글리코겐 옥테닐 숙시네이트, 피토글리코겐 베타-덱스트린, 및 무수물-변형된 피토글리코겐 베타-덱스트린을 포함한다. 양이온성 담체의 비제한적인 예는 리포펙타민, 폴리에틸렌이민, 폴리(트리메틸렌이민), 폴리(테트라메틸렌이민), 폴리프로필렌이민, 아미노글리코시드-폴리아민, 디데옥시-디아미노-b-시클로덱스트린, 스페르민, 스페르미딘, 폴리(2-디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리(리신), 폴리(히스티딘), 폴리(아르기닌), 양이온화 젤라틴, 덴드리머, 키토산, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP), N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA), 1-[2-(올레오일옥시)에틸]-2-올레일-3-(2-히드록시에틸)이미다졸리늄 클로라이드(DOTIM), 2,3-디올레일옥시-N-[2(스페르민카르복스아미도)에틸]-N,N-디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트(DOSPA), 3B-[N-(N\N'-디메틸아미노에탄)-카르바모일]콜레스테롤 히드로클로라이드(DC-콜레스테롤 HC1), 디헵타데실아미도글리실 스페르미딘(DOGS), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(DDAB), N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-히드록시에틸 암모늄 브로마이드(DMRIE), 및 N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC)를 포함한다. 단백질 담체의 비제한적인 예는 인간 혈청 알부민(HSA), 저-밀도 지단백질(LDL), 고-밀도 지단백질(HDL), 또는 글로불린을 포함한다.

[0417] 엑소좀은 또한 본원에 기재된 원형 RNA 조성물 또는 조제물에 대한 약물 전달 비히클로서 사용될 수 있다. 엑소좀은 본원에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드 조성물 또는 조제물에 대한 약물 전달 비히클로서 사용될 수 있다. 검토를 위해, 문헌[Ha et al. July 2016. Acta Pharmaceutica Sinica B. Volume 6, Issue 4, Pages 287-296]; https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001을 참조한다.

[0418] 생체외 분화된 적혈구는 또한 본원에 기재된 원형 RNA 조성물 또는 조제물에 대한 담체로서 사용될 수 있다. 생체외 분화된 적혈구는 또한 본원에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드 조성물 또는 조제물에 대한 담체로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 국제 특허 공개 제WO2015/073587호; 제WO2017/123646호; 제WO2017/123644호; 제WO2018/102740호; 제WO2016/183482호; 제WO2015/153102호; 제WO2018/151829호; 제WO2018/009838호; 문헌[Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136]; 미국 특허 9,644,180; 문헌[Huang et al. 2017. Nature Communications 8: 423]; [Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136]을 참조한다.

[0419] 예를 들어, 국제 특허 공개 제WO2018/208728호에 기재된 바와 같은 푸소좀 조성물은 또한 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드 분자를 전달하는 담체로서 사용될 수 있다. 예를 들어, WO2018/208728에 기재된 바와 같은 푸소좀 조성물은 또한 본원에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드 분자를 전달하는 담체로서 사용될 수 있다.

[0420] 비로좀 및 바이러스-유사 입자(VLP)는 또한 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드 분자를 표적화된 세포에 전달하는 담체로서 사용될 수 있다. 비로좀 및 바이러스-유사 입자(VLP)는 또한 본원에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드 분자를 표적화된 세포에 전달하는 담체로서 사용될 수 있다.

[0421] 예를 들어, 국제 특허 공개 제WO2011/097480호, 제WO2013/070324호, 제WO2017/004526호, 또는 제WO2020/041784

호에 기재된 바와 같은 식물 나노베지클 및 식물 메신저 팩(PMP)은 또한 본원에 기재된 원형 RNA 조성물 또는 조제물을 전달하는 담체로서 사용될 수 있다. 식물 나노베지클 및 식물 메신저 팩(PMP)은 또한 본원에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드 조성물 또는 조제물을 전달하는 담체로서 사용될 수 있다.

[0422] 마이크로버블은 또한 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드 분자를 전달하는 담체로서 사용될 수 있다. 마이크로버블은 또한 본원에 기재된 선형 폴리리보뉴클레오티드 분자를 전달하는 담체로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 제US7115583호; 문헌[Beeri, R. et al., Circulation. 2002 Oct 1;106(14):1756-1759]; [Bez, M. et al., Nat Protoc. 2019 Apr; 14(4): 1015-1026]; [Hernot, S. et al., Adv Drug Deliv Rev. 2008 Jun 30; 60(10): 1153-1166]; [Rychak, J.J. et al., Adv Drug Deliv Rev. 2014 Jun; 72: 82-93]을 참조한다. 일부 실시 형태에서, 마이크로버블은 알부민-코팅된 퍼플루오로카본 마이크로버블이다.

[0423] 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 담체는 복수개의 입자를 포함할 수 있다. 입자는 30 내지 700 나노미터(예를 들어, 30 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 200, 200 내지 300, 300 내지 400, 400 내지 500, 500 내지 600, 600 내지 700, 100 내지 500, 50 내지 500, 또는 200 내지 700 나노미터)의 중위 물품 크기를 가질 수 있다. 입자의 크기는 세포 내로의 원형 폴리리보뉴클레오티드를 포함하는 페이로드의 침착에 유리하도록 최적화될 수 있다. 특정 세포 유형 내로의 원형 폴리리보뉴클레오티드의 침착은 상이한 입자 크기에 유리할 수 있다. 예를 들어, 입자 크기는 항원 제시 세포 내로의 원형 폴리리보뉴클레오티드의 침착을 위해 최적화될 수 있다. 입자 크기는 수지상 세포 내로의 원형 폴리리보뉴클레오티드의 침착을 위해 최적화될 수 있다. 추가적으로, 입자 크기는 배수 림프절 세포 내로의 원형 폴리리보뉴클레오티드의 침착을 위해 최적화될 수 있다.

[0424] *지질 나노입자*

[0425] 본 발명에 의해 제공된 조성물, 방법, 및 전달 시스템은 특정 실시 형태에서, 지질 나노입자(LNP)를 포함하는 본원에 기재된 임의의 적합한 담체 또는 전달 양상을 이용할 수 있다. 지질 나노입자는 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 이온성 지질, 예컨대 비-양이온성 지질(예를 들어, 중성 또는 음이온성 또는 양쪽이온성 지질); 하나 이상의 컨쥬게이트된 지질(예컨대 PEG-컨쥬게이트된 지질 또는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2019217941호의 표 5에 기재된 중합체에 컨쥬게이트된 지질); 하나 이상의 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤)을 포함한다.

[0426] 나노입자 제형(예를 들어, 지질 나노입자)에서 사용될 수 있는 지질은 예를 들어, 참조로 포함되는 제WO2019217941호의 표 4에 기재된 것들을 포함하며-예를 들어, 지질-함유 나노입자는 제WO2019217941호의 표 4의 지질 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 지질 나노입자는 추가의 요소, 예컨대 중합체, 예컨대 참조로 포함되는 제WO2019217941호의 표 5에 기재된 중합체를 포함할 수 있다.

[0427] 일부 실시 형태에서, 컨쥬게이트된 지질은 존재하는 경우, PEG-디아실글리세롤(DAG)(예컨대 1-(모노메톡시-폴리에틸렌글리콜)-2,3-디미리스토일글리세롤(PEG-DMG)), PEG-디알킬옥시프로필(DAA), PEG-인지질, PEG-세라미드(Cer), PEG화 포스파티딜에탄올로아민(PEG-PE), PEG 숙시네이트 디아실글리세롤(PEGS-DAG)(예컨대 4-O-(2',3'-디(테트라데카노일옥시)프로필-1-O-(w-메톡시(폴리에톡시)에틸)부탄디오에이트(PEG-S-DMG)), PEG 디알콕시프로필카르밤, N-(카르보닐-메톡시폴리 에틸렌 글리콜 2000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 나트륨 염, 및 제WO2019051289호(참조로 포함됨)의 표 2에 기재된 것들, 및 이들의 조합 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0428] 일부 실시 형태에서, 지질 나노입자 내로 혼입될 수 있는 스테롤은 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체 중 하나 이상, 예컨대 참조로 포함되는 제WO2009/127060호 또는 제US2010/0130588호의 것들을 포함한다. 추가적인 예시적인 스테롤은 본원에 참조로 포함되는 문헌[Eygeris et al(2020), dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386]에 기재된 것들을 포함하는 피토스테롤을 포함한다.

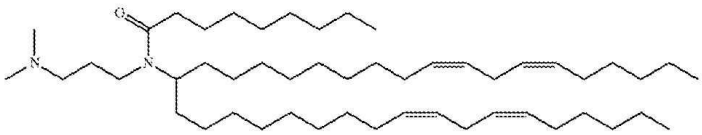
[0429] 일부 실시 형태에서, 지질 입자는 이온화 가능한 지질, 비-양이온성 지질, 입자의 응집을 억제하는 컨쥬게이트된 지질, 및 스테롤을 포함한다. 이들 성분의 양은 독립적으로, 그리고 원하는 특성을 달성하도록 달라질 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 지질 나노입자는 총 지질의 약 20 mol% 내지 약 90 mol%의 양(다른 실시 형태에서, 이는 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 20~70%(mol), 30~60%(mol) 또는 40~50%(mol); 약 50 mol% 내지 약 90 mol%일 수 있음)의 이온화 가능한 지질, 총 지질의 약 5 mol% 내지 약 30 mol%의 양의 비-양이온성 지질, 총 지질의 약 0.5 mol% 내지 약 20 mol%의 양의 컨쥬게이트된 지질 및 총 지질의 약 20 mol% 내지 약 50 mol%의 양의 스테롤을 포함한다. 총 지질 대 핵산의 비는 원하는 대로 달라질 수 있다. 예를 들어, 총 지질 대

핵산(질량 또는 중량) 비는 약 10: 1 내지 약 30: 1일 수 있다.

[0430] 일부 실시 형태에서, 지질 대 핵산 비(질량/질량 비; w/w 비)는 약 1:1 내지 약 25:1, 약 10:1 내지 약 14:1, 약 3:1 내지 약 15:1, 약 4:1 내지 약 10:1, 약 5:1 내지 약 9:1 또는 약 6:1 내지 약 9:1의 범위일 수 있다. 지질 및 핵산의 양은 원하는 N/P 비, 예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과의 N/P 비를 제공하도록 조정될 수 있다. 일반적으로, 지질 나노입자 제형의 전체 지질 함량은 약 5 mg/ml 내지 약 30 mg/mL의 범위일 수 있다.

[0431] 본원에 기재된 조성물, 예를 들어, 본원에 기재된 핵산(예를 들어, RNA(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드))의 전달을 위한 지질 나노입자를 형성하기 위해 (예를 들어, 다른 지질 구성성분과 조합하여) 사용될 수 있는 지질 화합물의 일부 비제한적인 예는 하기를 포함한다:

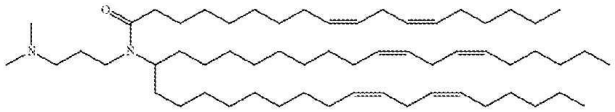
[0432] [화학식 i]



[0433]

[0434] 일부 실시 형태에서, 화학식 i을 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

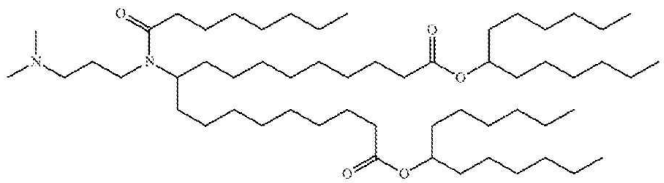
[0435] [화학식 ii]



[0436]

[0437] 일부 실시 형태에서, 화학식 ii를 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

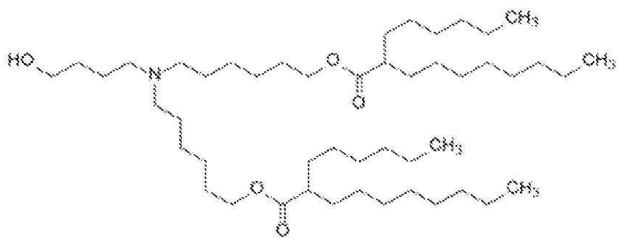
[0438] [화학식 iii]



[0439]

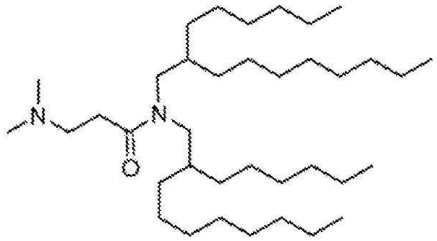
[0440] 일부 실시 형태에서, 화학식 iii을 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0441] [화학식 iv]



[0442]

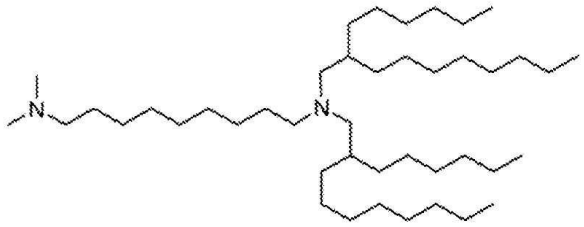
[0443] [화학식 v]



[0444]

[0445] 일부 실시 형태에서, 화학식 v를 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

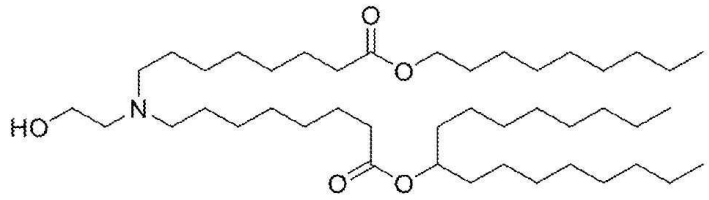
[0446] [화학식 vi]



[0447]

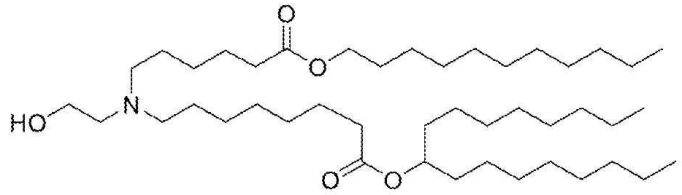
[0448] 일부 실시 형태에서, 화학식 vi을 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0449] [화학식 vii]



[0450]

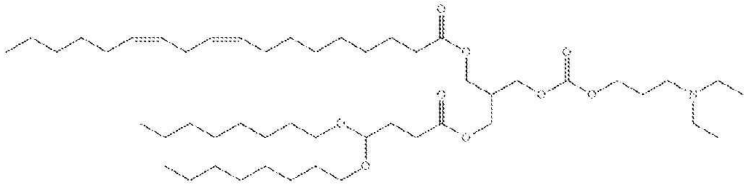
[0451] [화학식 viii]



[0452]

[0453] 일부 실시 형태에서, 화학식 viii을 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

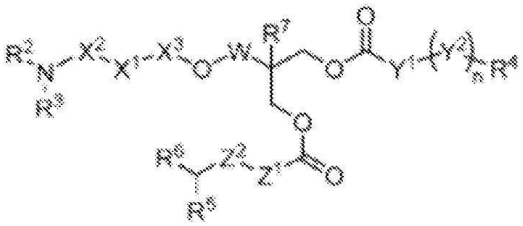
[0454] [화학식 ix]



[0455]

[0456] 일부 실시 형태에서, 화학식 ix를 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

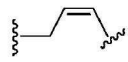
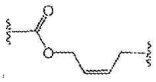
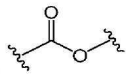
[0457] [화학식 x]



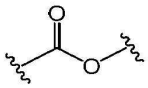
[0458] 또는 이의 염

[0459] 상기 식에서,

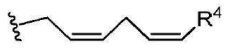
[0460] X^1은 O, NR^1 또는 직접적인 결합이고, X^2는 C2-5 알킬렌이고, X^3은 C(=O) 또는 직접적인 결합이고, R^1은 H 또는 Me이고, R^3은 C1-3알킬이고, R^2는 C1-3 알킬이거나, R^2는 이것이 부착된 질소 원자 및 X^2의 1~3개의 탄소 원자와 함께, 4-, 5- 또는 6-원 고리를 형성하거나, X^1은 NR^1이고, R^1 및 R^2는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 5- 또는 6-원 고리를 형성하거나, R^2는 R^3 및 이들이 부착된 질소 원자와 함께 5-, 6- 또는 7-원 고리를 형성하고, Y^1은 C2-12 알킬렌이고, Y^2는

[0461]  (어느 배향이든 가능),  (어느 배향이든 가능),  (어느 배향이든 가능) 로부터 선택되며,

[0462] n은 0 내지 3이고, R^4는 C1-15 알킬이고, Z^1은 C1-6 알킬렌 또는 직접적인 결합이고,

[0463] Z^2는  (어느 배향이든 가능) 이거나, 부재하되, 단, Z^1이 직접적인 결합이면, Z^2는 부재하고;

[0464] R^5는 C5-9 알킬 또는 C6-10 알콕시이며, R^6은 C5-9 알킬 또는 C6-10 알콕시이며, W는 메틸렌 또는 직접적인 결합이며, R^7은 H 또는 Me이되, 단, R^3 및 R^2가 C2 알킬이고, X^1이 O이고, X^2가 선형 C3 알킬렌이고, X^3이 C(=O)이고, Y^1이 선형 Ce 알킬렌이고, $(Y^2)n-R^4$가

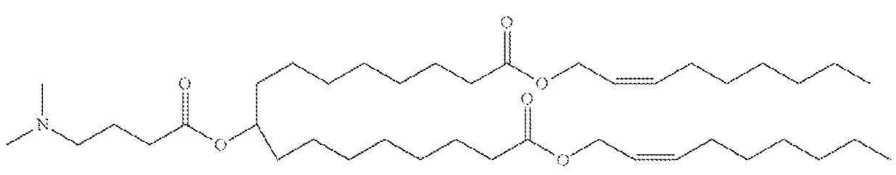
[0465] 

[0466] 이고,

[0467] R^4가 선형 C5 알킬이고, Z^1이 C2 알킬렌이고, Z^2가 부재하고, W가 메틸렌이고, R^7이 H이면, R^5 및 R^6은 Cx 알콕시가 아니다.

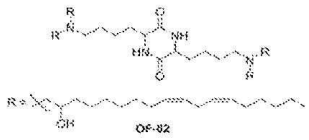
[0468] 일부 실시 형태에서, 화학식 xii를 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0469] [화학식 xi]

[0470] 

[0471] 일부 실시 형태에서, 화학식 xi을 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

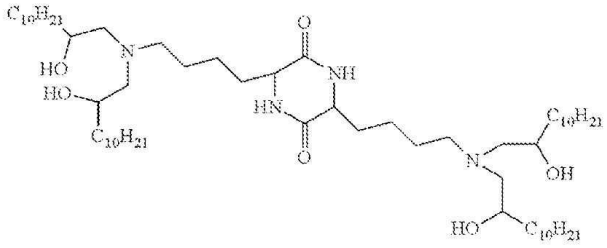
[0472] [화학식 xii]



[0473]

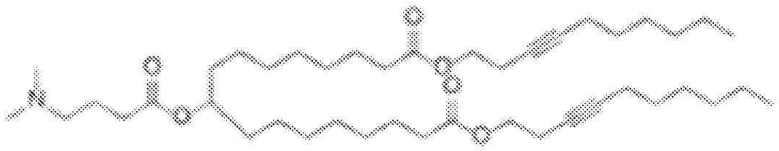
[0474] (여기서, R은  임)

[0475] [화학식 xiii]



[0476]

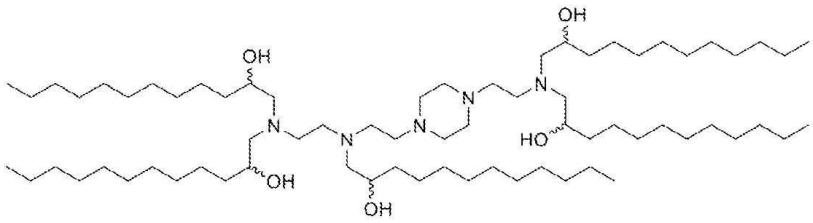
[0477] [화학식 xiv]



[0478]

[0479] 일부 실시 형태에서, LNP는 화학식 xiii의 화합물 및 화학식 xiv의 화합물을 포함한다.

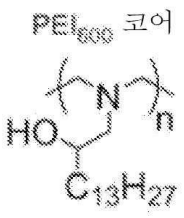
[0480] [화학식 xv]



[0481]

[0482] 일부 실시 형태에서, 화학식 xv를 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

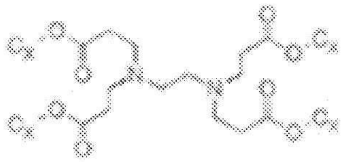
[0483] [화학식 xvi]



[0484]

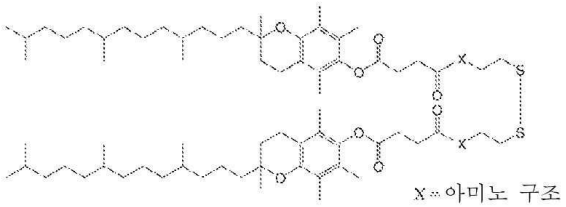
[0485] 일부 실시 형태에서, 화학식 xvi을 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0486] [화학식 xvii]



[0487]

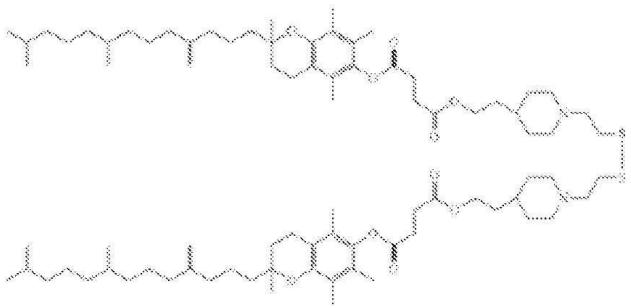
[0488] [화학식 xviii(a)]



[0489]

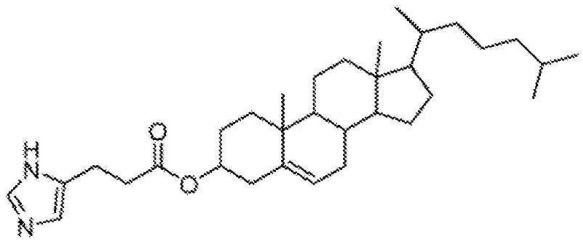
[0490] (여기서, X는  임)

[0491] [화학식 xviii(b)]



[0492]

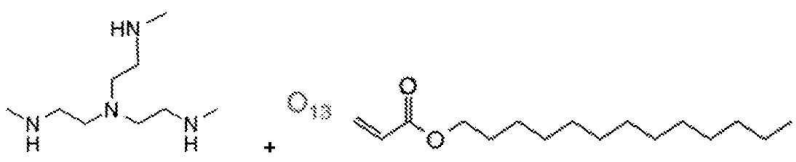
[0493] [화학식 xix]



[0494]

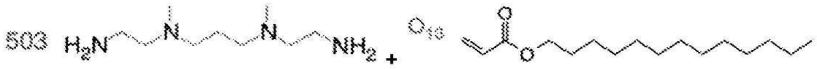
[0495] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 조성물, 예를 들어, 본원에 기재된 핵산(예를 들어, RNA(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드))의 전달을 위해 지질 나노입자를 형성하기 위해 사용되는 지질 화합물은 하기 반응 중 하나에 의해 제조된다:

[0496] [화학식 xx(a)]



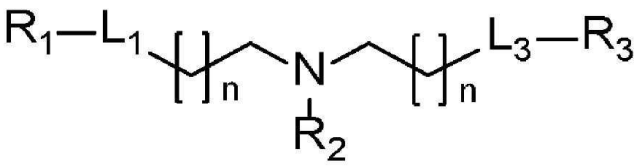
[0497]

[0498] [화학식 xx(b)]

[0499] 

[0500] 일부 실시 형태에서, 화학식 xxi을 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하기 위해 사용된다. 일부 실시 형태에서, 화학식 xxi의 LNP는 제WO2021113777호에 기재된 LNP(예를 들어, 화학식 1의 지질, 예컨대 제WO2021113777호의 표 1의 지질)이다.

[0501] [화학식 xxi]

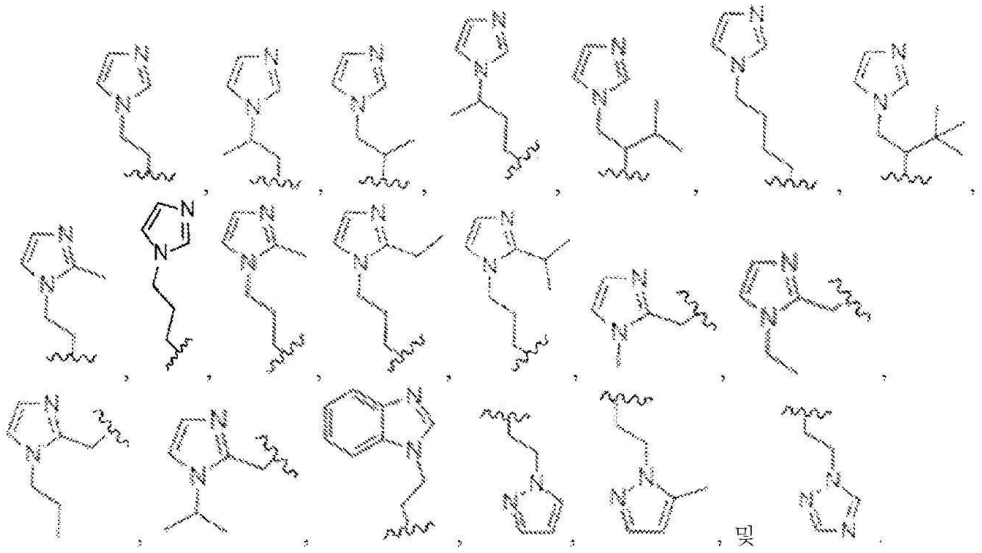
[0502] 

[0503] 상기 식에서,

[0504] 각각의 n은 독립적으로 2~15의 정수이며; L_1 및 L_3은 각각 독립적으로 -OC(O)-* 또는 -C(O)O-*이며, "*"는 R_1 또는 R_3에 대한 부착점을 나타내며;

[0505] R_1 및 R_3은 각각 독립적으로 옥소, 할로, 히드록시, 시아노, 알킬, 알케닐, 알데히드, 헤테로시클릴알킬, 히드록시알킬, 디히드록시알킬, 히드록시알킬아미노알킬, 아미노알킬, 알킬아미노알킬, 디알킬아미노알킬, (헤테로시클릴)(알킬)아미노알킬, 헤테로시클릴, 헤테로아릴, 알킬헤테로아릴, 알키닐, 알콕시, 아미노, 디알킬아미노, 아미노알킬카르보닐아미노, 아미노카르보닐알킬아미노, (아미노카르보닐알킬)(알킬)아미노, 알케닐카르보닐아미노, 히드록시카르보닐, 알킬옥시카르보닐, 아미노카르보닐, 아미노알킬아미노카르보닐, 알킬아미노알킬아미노카르보닐, 디알킬아미노알킬아미노카르보닐, 헤테로시클릴알킬아미노카르보닐, (알킬아미노알킬)(알킬)아미노카르보닐, 알킬아미노알킬카르보닐, 디알킬아미노알킬카르보닐, 헤테로시클릴카르보닐, 알케닐카르보닐, 알키닐카르보닐, 알킬술폭시드, 알킬술폭시드알킬, 알킬 술포닐 및 알킬 술폰알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기에 의해 임의적으로 치환되는 선형 또는 분지형 C_9-C_{20} 알킬 또는 C_9-C_{20} 알케닐이며;

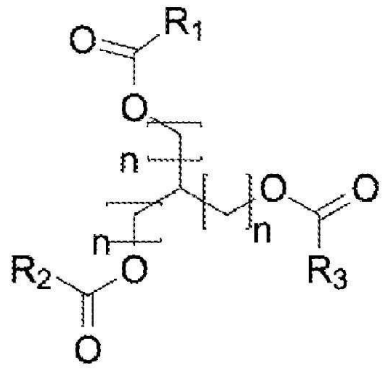
[0506] R_2는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0507] 

[0508] 일부 실시 형태에서, 화학식 xxii를 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리

리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하기 위해 사용된다. 일부 실시 형태에서, 화학식 xxii의 LNP는 제WO2021113777호에 기재된 LNP(예를 들어, 화학식 2의 지질, 예컨대 제WO2021113777호의 표 2의 지질)이다.

[0509] [화학식 xxii]



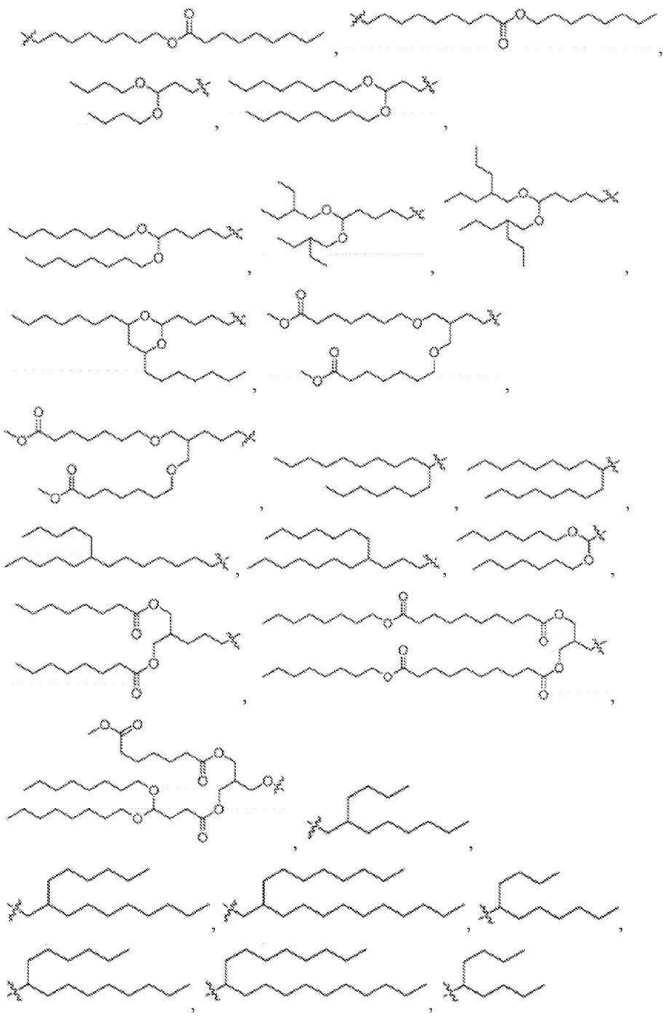
[0510]

[0511] 상기 식에서,

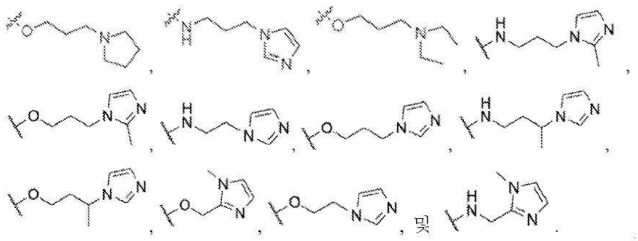
[0512] 각각의 n은 독립적으로 1~15의 정수이며;

[0513] R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 하기로 이루어진 군으로부터 선택되며:

[0514]



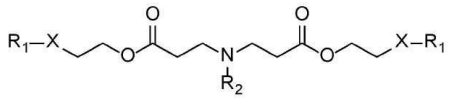
[0515] R_3은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0516]

[0517] 일부 실시 형태에서, 화학식 xxiii을 포함하는 LNP는 본원에 기재된 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 조성물을 세포에 전달하기 위해 사용된다. 일부 실시 형태에서, 화학식 xxiii의 LNP는 제WO2021113777호에 기재된 LNP(예를 들어, 화학식 3의 지질, 예컨대 제WO2021113777호의 표 3의 지질)이다.

[0518] [화학식 xxiii]

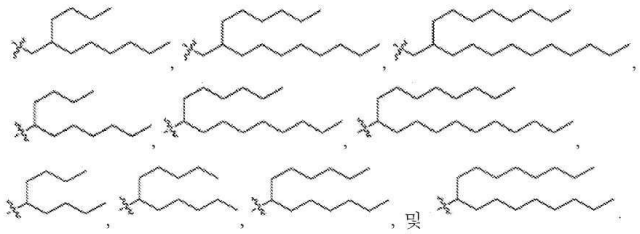


[0519]

[0520] 상기 식에서,

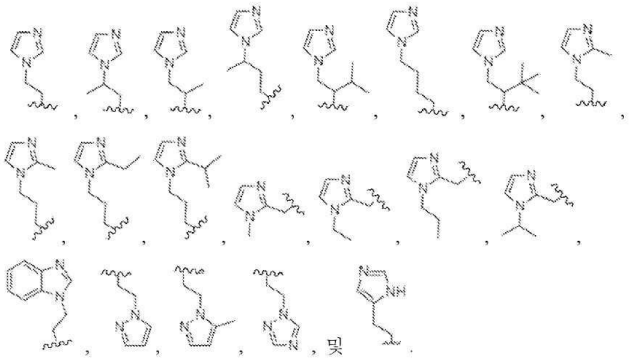
[0521] X는 -O-, -S-, 또는 -OC(O)-*로부터 선택되며, *는 R_1에 대한 부착점을 나타내며;

[0522] R_1은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되며:



[0523]

[0524] R_2는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0525]

[0526] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 조성물(예를 들어, 핵산(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) 또는 단백질)은 이온화 가능한 지질을 포함하는 LNP에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어, 제US9,867,888호(그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 실시예 1에 기재된 바와 같은; 헵타데칸-9-일 8-((2-히드록시에틸)(6-옥소-6-(운데실옥시)헥실)아미노)옥타노에이트(SM-102)이다. 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어, 제WO2015/095340호(그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 실시예 13에서 합성되는 바와 같은; 9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트(LP01)이다. 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은

예를 들어, 제US2012/0027803호(그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 실시예 7, 8 또는 9에서 합성되는 바와 같은; 디((Z)-논-2-엔-1-일) 9-((4-디메틸아미노)부타노일)옥시)헵타데칸디오에이트(L319)이다. 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어, 제WO2010/053572호(그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 실시예 14 및 16에서 합성되는 바와 같은; 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-히드록시도데실)아미노)에틸)(2-히드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아잔디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200)이다. 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은 이미다졸 콜레스테롤 에스테르(ICE) 지질 (3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-디메틸-17-((R)-6-메틸헵탄-2-일)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 3-(1H-이미다졸-4-일)프로파노에이트, 예를 들어, 제WO2020/106946호(그 전체가 본원에 참조로 포함됨)로부터의 구조 I이다.

[0527] 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은 양이온성 지질, 이온화 가능한 양이온성 지질, 예를 들어, pH에 따라 양으로 하전된 또는 중성 형태로 존재할 수 있는 양이온성 지질, 또는 용이하게 양성자화될 수 있는 아민-함유 지질일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 양이온성 지질은 예를 들어, 생리학적 조건 하에서 양으로 하전될 수 있는 지질이다. 예시적인 양이온성 지질은 양전하를 보유하는 하나 이상의 아민 기(들)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 지질 입자는 중성 지질, 이온화 가능한 아민-함유 지질, 생체분해성 알킨 지질, 스테로이드, 고도불포화된 지질을 포함하는 인지질, 구조적 지질(예를 들어, 스테롤), PEG, 콜레스테롤 및 중합체 컨쥬게이트된 지질 중 하나 이상을 갖는 제형에서 양이온성 지질을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 양이온성 지질은 이온화 가능한 양이온성 지질일 수 있다. 본원에 개시된 바와 같은 예시적인 양이온성 지질은 6.0을 초과하는 유효 pKa를 가질 수 있다. 실시 형태에서, 지질 나노입자는 제1 양이온성 지질과는 상이한(예를 들어, 제1 유효 pKa보다 더 큰) 유효 pKa를 갖는 제2 양이온성 지질을 포함할 수 있다. 지질 나노입자는 지질 나노입자 내에 캡슐화된 또는 이와 회합된, 40 내지 60 mol 퍼센트의 양이온성 지질, 중성 지질, 스테로이드, 중합체 컨쥬게이트된 지질, 및 치료제, 예를 들어, 본원에 기재된 핵산(예를 들어, RNA(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드))을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 양이온성 지질과 동시-제형화된다. 핵산은 LNP, 예를 들어, 양이온성 지질을 포함하는 LNP의 표면에 흡착될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 LNP, 예를 들어, 양이온성 지질을 포함하는 LNP에 캡슐화될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 지질 나노입자는 예를 들어, 표적화제로 코팅된 표적화 모이어티를 포함할 수 있다. 실시 형태에서, LNP 제형은 생체분해성이다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 지질, 예를 들어, 화학식 i, ii, ii, vii 및/또는 ix를 포함하는 지질 나노입자는 적어도 1%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 100%의 RNA 분자를 캡슐화한다.

[0528] 지질 나노입자 제형에서 사용될 수 있는 예시적인 이온화 가능한 지질은 제한 없이, 본원에 참조로 포함되는 제WO2019051289호의 표 1에 열거된 것들을 포함한다. 추가적인 예시적인 지질은 제한 없이, 하기 화학식 중 하나 이상을 포함한다: 제US2016/0311759호의 X; 제US20150376115호 또는 제US2016/0376224호의 I; 제US20160151284호의 I, II 또는 III; 제US20170210967호의 I, IA, II 또는 IIA; 제US20150140070호의 I-c; 제US2013/0178541호의 A; 제US2013/0303587호 또는 제US2013/0123338호의 I; 제US2015/0141678호의 I; 제US2015/0239926호의 II, III, IV 또는 V; 제US2017/0119904호의 I; 제WO2017/117528호의 I 또는 II; 제US2012/0149894호의 A; 제US2015/0057373호의 A; 제WO2013/116126호의 A; 제US2013/0090372호의 A; 제US2013/0274523호의 A; 제US2013/0274504호의 A; 제US2013/0053572호의 A; 제WO2013/016058호의 A; 제WO2012/162210호의 A; 제US2008/042973호의 I; 제US2012/01287670호의 I, II, III 또는 IV; 제US2014/0200257호의 I 또는 II; 제US2015/0203446호의 I, II 또는 III; 제US2015/0005363호의 I 또는 III; 제US2014/0308304호의 I, IA, IB, IC, ID, II, IIA, IIB, IIC, IID 또는 III~XXIV; 제US2013/0338210호의; 제WO2009/132131호의 I, II, III 또는 IV; 제US2012/01011478호의 A; 제US2012/0027796호의 I 또는 XXXV; 제US2012/0058144호의 XIV 또는 XVII; 제US2013/0323269호의; 제US2011/0117125호의 I; 제US2011/0256175호의 I, II 또는 III; 제US2012/0202871호의 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII; 제US2011/0076335호의 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV 또는 XVI; 제US2006/008378호의 I 또는 II; 제US2013/0123338호의 I; 제US2015/0064242호의 I 또는 X-A-Y-Z; 제US2013/0022649호의 XVI, XVII 또는 XVIII; 제US2013/0116307호의 I, II 또는 III; 제US2013/0116307호의 I, II 또는 III; 제US2010/0062967호의 I 또는 II; 제US2013/0189351호의 I~X; 제US2014/0039032호의 I; 제US2018/0028664호의 V; 제US2016/0317458호의 I; 제US2013/0195920호의 I; 제US10,221,127호의 5, 6 또는 10; 제WO2018/081480호의 III-3; 제WO2020/081938호의 I-5 또는 I-8; 제US9,867,888호의 18 또는 25; 제US2019/0136231호의 A; 제WO2020/219876호의 II; 제US2012/0027803호의 1; 제US2019/0240349호의 OF-02; 제US10,086,013호의 23; 문헌[Miao et al(2020)]의 cKK-E12/A6; 제WO2010/053572

호의 C12-200; 문헌[Dahlman et al(2017)]의 7C1; 문헌[Whitehead et al]의 304-013 또는 503-013; 제US9,708,628호의 TS-P4C2; 제WO2020/106946호의 I; 제WO2020/106946호의 I; 및 제WO2021/113777호의 (1), (2), (3), 또는 (4). 예시적인 지질은 제WO2021/113777호의 표 1~16 중 어느 하나의 지질을 추가로 포함한다.

[0529] 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어, 제WO2019051289A9호(그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 실시예 9에 기재된 바와 같은 MC3 (6Z,9Z,28Z,3 1Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노) 부타노에이트(DLin-MC3-DMA 또는 MC3)이다. 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어, 제WO2019051289A9호(그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 실시예 10에 기재된 바와 같은 지질 ATX-002이다. 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어, 제WO2019051289A9호(그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 실시예 11에 기재된 바와 같은(13Z,16Z)-A,A-디메틸-3-노닐도코사-13,16-디엔-1-아민(화합물 32)이다. 일부 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어, 제WO2019051289A9호(그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 실시예 12에 기재된 바와 같은 화합물 6 또는 화합물 22이다.

[0530] 예시적인 비-양이온성 지질은 디스테아로일-sn-글리세로-포스포에탄올아민, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민(POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민(예컨대 16-O-모노메틸 PE), 디메틸-포스파티딜에탄올아민(예컨대 16-O-디메틸 PE), 18-1-트랜스 PE, 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민(SOPE), 수소화된 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 난(egg) 포스파티딜콜린(EPC), 디올레오일포스파티딜세린(DOPS), 스핑고미엘린(SM), 디미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC), 디미리스토일 포스파티딜글리세롤(DMPG), 디스테아로일포스파티딜글리세롤(DSPG), 디에루코일포스파티딜콜린(DEPC), 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤(POPG), 디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민(DEPE), 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스핑고미엘린, 난 스핑고미엘린(ESM), 세팔린, 카르디오리핀, 포스파티드산, 세레브로시드, 디세틸포스페이트, 리소포스파티딜콜린, 디리놀레오일포스파티딜콜린 또는 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 다른 디아실포스파티딜콜린 및 디아실포스파티딜에탄올아민 인지질도 또한 사용될 수 있는 것이 이해된다. 이들 지질 내의 아실 기는 바람직하게는 C10-C24 탄소 쇄를 갖는 지방산, 예를 들어, 라우로일, 미리스토일, 팔미토일, 스테아로일, 또는 올레오일로부터 유래된 아실 기이다. 추가적인 예시적인 지질은, 특정 실시 형태에서, 제한 없이, 본원에 참조로 포함되는 문헌[Kim et al. (2020) dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386]에 기재된 것들을 포함한다. 이러한 지질은 일부 실시 형태에서, mRNA(예를 들어, DGTS)로의 간 형질감염을 개선시키는 것으로 관찰된 식물 지질을 포함한다.

[0531] 지질 나노입자에 사용하는 데 적합한 비-양이온성 지질의 다른 예는 제한 없이, 인을 함유하지 않는 지질, 예컨대, 예를 들어, 스테아릴아민, 도데실아민, 헥사데실아민, 아세틸 팔미테이트, 글리세롤 리시놀레에이트, 헥사데실 스테아레이트, 이소프로필 미리스테이트, 양쪽성 아크릴계 중합체, 트리에탄올아민-라우릴 술페이트, 알킬-아릴 술페이트 폴리에틸옥실화 지방산 아미드, 디옥타데실 디메틸 암모늄 브로마이드, 세라미드, 스핑고미엘린 등을 포함한다. 다른 비-양이온성 지질은 제WO2017/099823호 또는 미국 특허 공개 제US2018/0028664호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0532] 일부 실시 형태에서, 비-양이온성 지질은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제US2018/0028664호의 화학식 I, II 또는 IV의 화합물 또는 올레산이다. 비-양이온성 지질은 예를 들어, 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 0~30%(mol)를 구성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 비-양이온성 지질 함량은 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 5~20%(mol) 또는 10~15%(mol)이다. 실시 형태에서, 이온화 가능한 지질 대 중성 지질의 몰비는 약 2:1 내지 약 8:1의 범위(예를 들어, 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 또는 8:1)이다.

[0533] 일부 실시 형태에서, 지질 나노입자는 임의의 인지질을 포함하지 않는다.

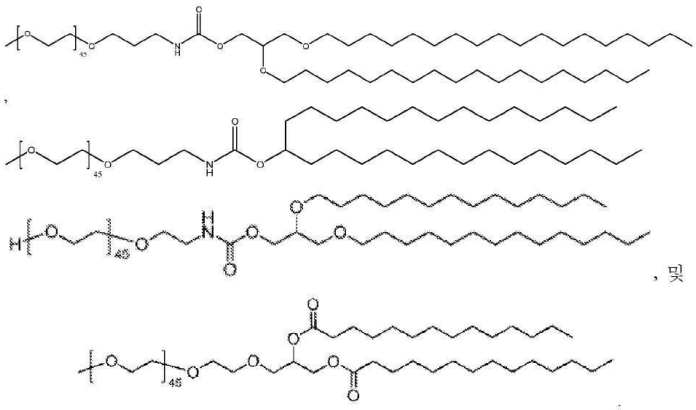
[0534] 일부 양태에서, 지질 나노입자는 막 온전성을 제공하기 위해 스테롤과 같은 성분을 추가로 포함할 수 있다. 지질 나노입자에 사용될 수 있는 한 예시적인 스테롤은 콜레스테롤 및 그의 유도체이다. 콜레스테롤 유도체의 비제한적인 예는 5a-콜레스탄올, 53-코프로스탄올, 콜레스테릴-(2'-히드록시)-에틸 에테르, 콜레스테릴-(4'-히드록시)-부틸 에테르 및 6-케토콜레스탄올과 같은 극성 유사체; 5a-콜레스탄, 콜레스테논, 5a-콜레스타논, 5p-콜레스타논 및 콜레스테릴 데카노에이트와 같은 비극성 유사체; 및 이들의 혼합물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 콜레스테롤 유도체는 극성 유사체, 예를 들어, 콜레스테릴-(4'-히드록시)-부틸 에테르이다. 예시적인 콜레

스테롤 유도체는 PCT 공개 제WO2009/127060호 및 미국 특허 공개 제US2010/0130588호에 기재되어 있으며, 이의 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0535] 일부 실시 형태에서, 막 온전성을 제공하는 성분, 예컨대 스테롤은 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 0~50%(mol)(예를 들어, 0~10%, 10~20%, 20~30%, 30~40% 또는 40~50%)를 구성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이러한 성분은 지질 나노입자의 총 지질 함량의 20%~50%(mol) 30~40%(mol)이다.

[0536] 일부 실시 형태에서, 지질 나노입자는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 컨쥬게이트된 지질 분자를 포함할 수 있다. 일반적으로, 이들은 지질 나노입자의 응집을 억제하고/거나 입체 안정화를 제공하기 위해 사용된다. 예시적인 컨쥬게이트된 지질은 PEG-지질 컨쥬게이트, 폴리옥사졸린(POZ)-지질 컨쥬게이트, 폴리아미드-지질 컨쥬게이트(예컨대, ATTA-지질 컨쥬게이트), 양이온성 중합체-지질(CPL) 컨쥬게이트 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 실시 형태에서, 컨쥬게이트된 지질 분자는 PEG-지질 컨쥬게이트, 예를 들어 (메톡시 폴리에틸렌 글리콜)-컨쥬게이트된 지질이다.

[0537] 예시적인 PEG-지질 컨쥬게이트는 PEG-디아실글리세롤(DAG)(예컨대, 1-(모노메톡시-폴리에틸렌글리콜)-2,3-디미리스토일글리세롤(PEG-DMG)), PEG-디알킬옥시프로필(DAA), PEG-인지질, PEG-세라미드(Cer), PEG화 포스파티딜에탄올로아민(PEG-PE), PEG 숙시네이트 디아실글리세롤(PEGS-DAG)(예컨대, 4-O-(2',3'-디(테트라데카노일옥시)프로필-1-O-(w-메톡시(폴리에톡시)에틸) 부탄디오에이트(PEG-S-DMG)), PEG 디알콕시프로필카르밤, N-(카르보닐-메톡시폴리에틸렌 글리콜 2000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 나트륨 염, 또는 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 추가적인 예시적인 PEG-지질 컨쥬게이트는 예를 들어 제US5,885,613호, 제US6,287,591호, 제US2003/0077829호, 제US2003/0077829호, 제US2005/0175682호, 제US2008/0020058호, 제US2011/0117125호, 제US2010/0130588호, 제US2016/0376224호, 제US2017/0119904호 및 제US/099823호에 기재되어 있으며, 이들 모두의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시 형태에서, PEG-지질은 그의 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제US2018/0028664호의 화학식 III, III-a-I, III-a-2, III-b-1, III-b-2 또는 V의 화합물이다. 일부 실시 형태에서, PEG-지질은 둘 모두의 내용의 전체가 본원에 참조로 포함되는 제US20150376115호 또는 제US2016/0376224호의 화학식 II이다. 일부 실시 형태에서, PEG-DAA 컨쥬게이트는 예를 들어 PEG-디라우릴옥시프로필, PEG-디미리스틸옥시프로필, PEG-디팔미틸옥시프로필, 또는 PEG-디스테아릴옥시프로필일 수 있다. PEG-지질은 PEG-DMG, PEG-디라우릴글리세롤, PEG-디팔미토일글리세롤, PEG-디스테릴글리세롤, PEG-디라우릴글리카미드, PEG-디미리스틸글리카미드, PEG-디팔미토일글리카미드, PEG-디스테릴글리카미드, PEG-콜레스테롤(1-[8'-(콜레스트-5-엔-3[베타]-옥시)카르복스아미도-3',6'-디옥사옥타닐]카르바모일-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜), PEG-DMB(3,4-디테트라데콕실벤질-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜)에테르) 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]일 수 있다. 일부 실시 형태에서, PEG-지질은 PEG-DMG, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]을 포함한다. 일부 실시 형태에서, PEG-지질은 하기로부터 선택되는 구조를 포함한다:



, 및

[0538]

[0539] 일부 실시 형태에서, PEG 이외의 분자와 컨쥬게이트된 지질이 또한 PEG-지질 대신 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리옥사졸린(POZ)-지질 컨쥬게이트, 폴리아미드-지질 컨쥬게이트(예컨대, ATTA-지질 컨쥬게이트) 및 양이온성 중합체-지질(GPL) 컨쥬게이트가 PEG-지질 대신에 또는 이에 더하여 사용될 수 있다.

[0540] 예시적인 컨쥬게이트된 지질, 즉, PEG-지질, (POZ)-지질 컨쥬게이트, ATTA-지질 컨쥬게이트 및 양이온성 중합체-지질은, 모든 내용의 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2019051289A9호의 표 2에 열거된 PCT 및 LIS 특허 출원에 기재되어 있다.

[0541] 일부 실시 형태에서, PEG 또는 컨쥬게이트된 지질은 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 0~20%(mol)를 구성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, PEG 또는 컨쥬게이트된 지질 함량은 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 0.5~10% 또는 2~5%(mol)이다. 이온화 가능한 지질, 비-양이온성-지질, 스테롤 및 PEG/컨쥬게이트된 지질의 몰비는 필요에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 지질 입자는 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 30~70%의 이온화 가능한 지질, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 0~60%의 콜레스테롤, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 0~30%의 비-양이온성-지질 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 1~10%의 컨쥬게이트된 지질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 30~40%의 이온화 가능한 지질, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 40~50%의 콜레스테롤, 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 10~20%의 비-양이온성-지질을 포함한다. 일부 다른 실시 형태에서, 조성물은 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 50~75%의 이온화 가능한 지질, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 20~40%의 콜레스테롤, 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 5~10%의 비-양이온성-지질 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 1~10%의 컨쥬게이트된 지질이다. 조성물은 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 60~70%의 이온화 가능한 지질, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 25~35%의 콜레스테롤, 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 5~10%의 비-양이온성-지질을 함유할 수 있다. 조성물은 또한, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 최대 90%의 이온화 가능한 지질 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 2 내지 15%의 비-양이온성 지질을 함유할 수 있다. 제형은 또한, 예를 들어, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 8~30%의 이온화 가능한 지질, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 5~30%의 비-양이온성 지질 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 0~20%의 콜레스테롤; 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 4~25% 이온화 가능한 지질, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 4~25%의 비-양이온성 지질, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 2 내지 25%의 콜레스테롤, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 10 내지 35%의 컨쥬게이트 지질 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 5%의 콜레스테롤; 또는 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 2~30%의 이온화 가능한 지질, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 2~30%의 비-양이온성 지질, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 1 내지 15%의 콜레스테롤, 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 2 내지 35%의 컨쥬게이트 지질 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 1~20%의 콜레스테롤; 또는 심지어 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 최대 90%의 이온화 가능한 지질 및 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 2~10%의 비-양이온성 지질 또는 심지어 조성물의 총 중량 또는 몰 기준으로 100%의 양이온성 지질을 포함하는 지질 나노입자 제형일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 지질 입자 제형은 50:10:38.5:1.5의 몰비의 이온화 가능한 지질, 인지질, 콜레스테롤 및 PEG화 지질을 포함한다. 일부 다른 실시 형태에서, 지질 입자 제형은 60:38.5:1.5의 몰비의 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤 및 PEG화 지질을 포함한다.

[0542] 일부 실시 형태에서, 지질 입자는 이온화 가능한 지질, 비-양이온성 지질(예를 들어, 인지질), 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤) 및 PEG화 지질을 포함하며, 지질의 몰비는 이온화 가능한 지질의 경우 20 내지 70 몰%의 범위(목표는 40 내지 60 몰%임)이고, 비양이온성 지질의 몰%는 0 내지 30몰%의 범위(목표는 0 내지 15몰%임)이고, 스테롤의 몰%는 20 내지 70 몰%의 범위(목표는 30 내지 50 몰%임)이고, PEG화 지질의 몰%는 1 내지 6 몰%의 범위(목표는 2 내지 5 몰%임)이다.

[0543] 일부 실시 형태에서, 지질 입자는 이온화 가능한 지질 / 비-양이온성-지질 / 스테롤 / 컨쥬게이트된 지질을 50:10:38.5:1.5의 몰비로 포함한다.

[0544] 한 양태에서, 본 개시내용은 인지질, 레시틴, 포스파티딜콜린 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 나노입자 제형을 제공한다.

[0545] 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 추가적인 화합물이 또한 포함될 수 있다. 이들 화합물은 개별적으로 투여될 수 있거나, 추가적인 화합물은 본 발명의 지질 나노입자에 포함될 수 있다. 다시 말하면, 지질 나노입자는 핵산에 더하여 다른 화합물 또는 적어도 제1 핵산과는 상이한 제2 핵산을 함유할 수 있다. 제한 없이, 다른 추가적인 화합물은 소형 또는 대형 유기 또는 무기 분자, 단당류, 이당류, 삼당류, 올리고당류, 다당류, 펩티드, 단백질, 펩티드 유사체 및 그의 유도체, 펩티드 모방체, 핵산, 핵산 유사체 및 유도체, 생물학적 물질로 제조된 추출물, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0546] 일부 실시 형태에서, LNP는 생체분해성 이온화 가능한 지질을 포함한다. 일부 실시 형태에서, LNP는 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트)로도 지칭되는 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트 또는 또 다른 이온화 가능한 지질을 포함한다. 예를 들어, 제WO2019/067992호, 제WO/2017/173054호, 제WO2015/095340호 및 제WO2014/136086호 및 그 안에 제공되는 참고문헌의 지질을 참조한다. 일부 실시 형태에서, LNP 지질의 맥락에서 양이온성 및 이온화 가능한이라는

용어는 상호교환 가능하며, 예를 들어, 이온화 가능한 지질은 pH에 따라 양이온성이다.

[0547] 일부 실시 형태에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 수십 nm 내지 수백 nm일 수 있으며, 예를 들어, 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된다. 일부 실시 형태에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 40 nm 내지 약 150 nm, 예컨대 약 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm 또는 150 nm일 수 있다. 일부 실시 형태에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 50 nm 내지 약 100 nm, 약 50 nm 내지 약 90 nm, 약 50 nm 내지 약 80 nm, 약 50 nm 내지 약 70 nm, 약 50 nm 내지 약 60 nm, 약 60 nm 내지 약 100 nm, 약 60 nm 내지 약 90 nm, 약 60 nm 내지 약 80 nm, 약 60 nm 내지 약 70 nm, 약 70 nm 내지 약 100 nm, 약 70 nm 내지 약 90 nm, 약 70 nm 내지 약 80 nm, 약 80 nm 내지 약 100 nm, 약 80 nm 내지 약 90 nm 또는 약 90 nm 내지 약 100 nm일 수 있다. 일부 실시 형태에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 70 nm 내지 약 100 nm일 수 있다. 특정 실시 형태에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 80 nm일 수 있다. 일부 실시 형태에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 100 nm일 수 있다. 일부 실시 형태에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 1 mm 내지 약 500 mm, 약 5 mm 내지 약 200 mm, 약 10 mm 내지 약 100 mm, 약 20 mm 내지 약 80 mm, 약 25 mm 내지 약 60 mm, 약 30 mm 내지 약 55 mm, 약 35 mm 내지 약 50 mm 또는 약 38 mm 내지 약 42 mm의 범위이다.

[0548] LNP는 일부 예에서, 상대적으로 균질할 수 있다. 다분산 지수는 LNP의 균질성, 예를 들어, 지질 나노입자의 입자 크기 분포를 나타내기 위해 사용될 수 있다. 작은(예를 들어, 0.3 미만) 다분산 지수는 일반적으로 좁은 입자 크기 분포를 나타낸다. LNP는 약 0 내지 약 0.25, 예컨대 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24 또는 0.25의 다분산 지수를 가질 수 있다. 일부 실시 형태에서, LNP의 다분산 지수는 약 0.10 내지 약 0.20일 수 있다.

[0549] LNP의 제타 전위는 조성물의 계면 동전위를 나타내기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제타 전위는 LNP의 표면 전하를 설명할 수 있다. 더 고도로 하전된 종은 신체의 세포, 조직, 및 다른 요소와 바람직하지 않게 상호작용할 수 있기 때문에, 상대적으로 낮은 양전하 또는 음전하를 갖는 지질 나노입자가 일반적으로 바람직하다. 일부 실시 형태에서, LNP의 제타 전위는 약 -10 mV 내지 약 +20 mV, 약 -10 mV 내지 약 +15 mV, 약 -10 mV 내지 약 +10 mV, 약 -10 mV 내지 약 +5 mV, 약 -10 mV 내지 약 0 mV, 약 -10 mV 내지 약 -5 mV, 약 -5 mV 내지 약 +20 mV, 약 -5 mV 내지 약 +15 mV, 약 -5 mV 내지 약 +10 mV, 약 -5 mV 내지 약 +5 mV, 약 -5 mV 내지 약 0 mV, 약 0 mV 내지 약 +20 mV, 약 0 mV 내지 약 +15 mV, 약 0 mV 내지 약 +10 mV, 약 0 mV 내지 약 +5 mV, 약 +5 mV 내지 약 +20 mV, 약 +5 mV 내지 약 +15 mV 또는 약 +5 mV 내지 약 +10 mV일 수 있다.

[0550] 단백질 및/또는 핵산의 캡슐화의 효율은 제공되는 초기의 양에 비하여, 제조 후에 LNP와 회합되거나 또는 캡슐화된 단백질 및/또는 핵산의 양을 설명한다. 캡슐화 효율은 높은(예를 들어, 100%에 가까운) 것이 바람직하다. 캡슐화 효율은 예를 들어, 지질 나노입자를 하나 이상의 유기 용매 또는 세제로 분해(breaking up)하기 전과 후에 상기 지질 나노입자를 함유하는 용액에서 단백질 또는 핵산의 양을 비교함으로써 측정될 수 있다. 음이온 교환 수지를 사용하여, 용액 중 유리 단백질 또는 핵산(예를 들어, RNA)의 양을 측정할 수 있다. 형광은 용액 중 유리 단백질 및/또는 핵산(예를 들어, RNA)의 양을 측정하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 지질 나노입자의 경우, 단백질 및/또는 핵산의 캡슐화 효율은 적어도 50%, 예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 캡슐화 효율은 적어도 80%일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 캡슐화 효율은 적어도 90%일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 캡슐화 효율은 적어도 95%일 수 있다.

[0551] LNP는 임의적으로 하나 이상의 코팅을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, LNP는 코팅을 갖는 캡슐, 필름 또는 정제로 제형화될 수 있다. 본원에 기재된 조성물을 포함하는 캡슐, 필름 또는 정제는 임의의 유용한 크기, 인장 강도, 경도 또는 밀도를 가질 수 있다.

[0552] LNP의 추가적인 예시적인 지질, 제형, 방법 및 특성화는 각각의 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2020/061457호 및 제WO2021/113777호에 교시되어 있다. LNP의 추가의 예시적인 지질, 제형, 방법 및 특성화는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 문헌[Hou et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nat Rev Mater (2021). doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0]에 교시되어 있다(예를 들어, 문헌[Hou et al.]의 도 2의 예시적인 지질 및 지질 유도체 참조).

[0553] 일부 실시 형태에서, 시험관내 또는 생체외 세포 리포펙션은 리포펙타민 메신저맥스(Lipofectamine MessengerMax)(써모 피셔(Thermo Fisher)) 또는 TransIT-mRNA 형질감염 시약(미루스 바이오(Mirus Bio))을 사

용하여 수행된다. 특정 실시 형태에서, LNP는 GenVoy_ILM 이온화 가능한 지질 믹스(프리시젼 나노시스템즈(Precision NanoSystems))를 사용하여 제형화된다. 특정 실시 형태에서, LNP는 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA) 또는 디리놀레일메틸-4-디메틸아미노부티레이트(DLin-MC3-DMA 또는 MC3)를 사용하여 제형화되며, 이의 제형 및 생체내 이용은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 문헌[Jayaraman et al. Angew Chem Int Ed Engl 51(34):8529-8533 (2012)]에 교시되어 있다.

[0554] CRISPR-Cas 시스템, 예를 들어, Cas9-gRNA RNP, gRNA, Cas9 mRNA의 전달을 위해 최적화된 LNP 제형은 둘 모두가 참조로 포함되는 제WO2019067992호 및 제WO2019067910호에 기재되어 있으며, 본원에 기재된 원형 폴리리보뉴클레오티드 및 선형 폴리리보뉴클레오티드의 전달에 유용하다.

[0555] 핵산(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드)의 전달에 유용한 추가적인 구체적인 LNP 제형은 둘 모두가 참조로 포함되는 제US8158601호 및 제US8168775호에 기재되어 있으며, 이는 명칭 ONPATTRO 하에 판매되는 파티시란(patisiran)에서 사용되는 제형을 포함한다.

[0556] 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드) LNP의 예시적인 투여는 약 0.1, 0.25, 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 또는 100 mg/kg(RNA)을 포함할 수 있다. 폴리리보뉴클레오티드(예를 들어, 원형 폴리리보뉴클레오티드, 선형 폴리리보뉴클레오티드)를 포함하는 AAV의 예시적인 투여는 약 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 및 10^{14} vg/kg의 MOI를 포함할 수 있다.

[0557] **실시예**

[0558] 하기 실시예는 당업자에게 본원에 기재된 조성물 및 방법을 사용하고, 제조하고, 평가하는 방법의 설명을 제공하기 위해 제시되며, 본 발명을 순수하게 예시하는 것으로 의도되고, 본 발명자들이 그들의 발명으로 간주하는 것의 범위를 한정하는 것으로 의도되지 않는다.

[0559] **실시예 1: 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 자기-스플라이싱 재배치된 인트론-엑손(PIE) 구축물의 설계**

[0560] 본 실시예는 더 우수한 원형화 효율을 제공하기 위한 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 자기-스플라이싱 재배치된 인트론-엑손(PIE) 서열의 설계를 기재한다.

[0561] DNA 구축물의 예시적인 설계를 나타내는 개략도는 도 1a 및 도 1b에 제공된다. 본 실시예에서, 구축물은 5'에서 3'로 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반(아나바에나 3' 절반-인트론), 3' 스플라이스 부위, 3' 엑손 단편(아나바에나 E2), 스페이서 요소, 폴리뉴클레오티드 카고, 5' 엑손 단편(아나바에나 E1), 5' 스플라이스 부위, 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반(아나바에나 5' 절반-인트론)을 포함한다. E2는 E1(5'-ACGGA-3')(서열 번호 2)에 대한 5 뉴클레오티드 상보적 서열(5'-TCCGT-3')(서열 번호 1)을 갖는다(도 1a 및 1b, E2 및 E1 상의 검은색 선). E2와 E1 사이에 연장된 어닐링 영역을 갖는 구축물을 생성하기 위해, E2로부터의 5개의 뉴클레오티드를 E1을 갖는 연장된 7 뉴클레오티드 어닐링 영역을 갖도록 돌연변이시켰다(**TGACCT**T(서열 번호 3) → **AGCGTC**T(서열 번호 4)(굵은 글자는 돌연변이된 서열을 나타냄)(도 1b, E2 및 E1 상의 회색 선, E2에서 별표는 서열 상의 돌연변이를 나타냄). 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 재배치된 인트론-엑손(PIE)으로부터의 전체 어닐링 영역은 12개의 뉴클레오티드이다(E2; 5'-TCCGTAGCGTCT-3'(서열 번호 5), E1; 5'-AGACGCTACGGA-3'(서열 번호 6))(도 1b).

[0562] RNA 구조를 RNA 구조 예측 도구, RNA fold(rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi)에 의해 추정하였다. E2-E1 상호작용의 연장을 적절한 E2-E1 상호작용 및 응축된 자기-스플라이싱 인트론 구조를 발생시키는 서열을 변형시킴으로써 생성하였다(도 2a 및 2b).

[0563] 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역(아나바에나 1) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 어닐링 서열(아나바에나 2)을 갖는 아나바에나 PIE를 갖는 구축물을 설계하여 원형화 효율을 비교하였다. 문헌[Wesselhoeft, et al. 2018 (Nat. Commun. 9:2629)]에 기재된 아나바에나 PIE 구축물(아나바에나 3)을 또한 비교를 위해 사용하였다. 본 실시예에서, 구축물은 스페이서 요소로서 폴리A50, 및 폴리뉴클레오티드 카고로서 EMCV 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 및 ORF의 조합을 포함하도록 설계되었다. 2개의 상이한 ORF를 테스트하였다: 가우시아(Gaussia) 루시페라제(Gluc) ORF(558개의 뉴클레오티드) 및 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 ORF(3822 nt). 원형 RNA의 크기는 Gluc ORF를 갖는 1.2 Kb 및 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 ORF를 갖는 4.5 Kb였다.

[0564] 비변형된 선형 RNA를 7.5 mM의 NTP의 존재 하에서 DNA 주형으로부터 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 20분 동안 DN아제로 처리함으로써 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), T2050)로 정제하였다. 자기-스플라이싱은 전사 동안 일

어났으며; 추가적인 반응은 요구되지 않았다. 자기-스플라이싱 효율을 모니터링하기 위해, 200 ng의 칼럼 정제된 시험관내 전사된 RNA를 겔 로딩 완충제 II(써모 피셔, AM8546G)와 혼합하고, 95 ℃에서 3분 동안 가열하고, 이어서 얼음 상에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 샘플을 6% 우레아 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(우레아 PAGE)에 의해 분리하고, RNA 밴드를 겔 염색을 사용하여 염색하고, 화상화 시스템을 사용하여 가시화하였다.

[0565] 어닐링 서열을 5개의 뉴클레오티드로부터 12개의 뉴클레오티드로 연장시키는 것은 원형화 효율을 2배까지 증가시켰으며, 1.2 Kb 원형 RNA의 경우 아나바에나 3과 유사한 원형화 효율을 나타내었다(도 3a). 4.5 Kb 원형 RNA의 경우, 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 2)는 아나바에나 3과 비교하여 40% 더 우수하고, 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 1)보다 3배 더 높은 원형화 효율을 나타내었다(도 3b).

[0566] 연장된 E2-E1 어닐링 서열을 갖도록 설계된 아나바에나 PIE(아나바에나 2)는 원형 RNA의 크기와 무관하게 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 1)보다 2~3배 더 우수한 원형화 효율을 나타내었다. 이는 원형화하는 데 더 용이한 1.2 Kb 구축물에 대해 유사한 원형화 효율 및 곤란한 4.5 Kb 구축물에 대해 40% 더 우수한 원형화 효율을 나타낸다.

[0567] **실시예 2: 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 자기-스플라이싱 PIE에 의해 생성된 원형 RNA로부터의 단백질 발현**

[0568] 본 실시예는 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 자기-스플라이싱 PIE에 의해 생성된 원형 RNA로부터의 단백질 발현을 입증한다.

[0569] 본 실시예에서, 5개의 뉴클레오티드(아나바에나 1) 및 연장된 어닐링 서열(아나바에나 2)의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE를 갖는 구축물을 실시예 1에 기재된 바와 같이 설계하여 단백질 발현을 비교하였다. 본 실시예에서, 구축물을 스페이서 요소로서 폴리A50, 및 폴리뉴클레오티드 카고로서 EMCV IRES 및 ORF의 조합을 포함하도록 설계하였다. 2개의 상이한 ORF를 테스트하였다: Gluc(558 nt) 및 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(3822 nt). 실시예 1에 기재된 바와 같은 아나바에나 3을 또한 비교를 위해 테스트하였다.

[0570] 선형 RNA를 7.5 mM의 NTP의 존재 하에서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 20분 동안 DN아제로 처리함으로써 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린 업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스, T2050)로 정제하였다. Gluc를 코딩하는 원형 RNA를 우레아 PAGE에 의해 정제하고, 완충제(0.5 M 아세트산나트륨, 0.1% SDS, 1 mM EDTA)에서 용리하고, 에탄올 침전시키고, RN아제 무함유수에 재현탁시켰다. SARS-CoV-2로부터의 스파이크 단백질을 코딩하는 원형 RNA를 역상 크로마토그래피에 의해 정제하고, 분획을 Amicon Ultra 원심분리 필터(시그마 알드리치(Sigma Aldrich))를 사용한 한외여과를 통해 시트르산나트륨 및 이어서 물로 완충제 교환하였다.

[0571] Gluc를 코딩하는 원형 RNA의 발현을 비교하기 위해, 아나바에나 1 및 아나바에나 2에 의해 생성된 원형 RNA를 제조하였다. 비교를 위해, 아나바에나 3에 의해 생성된 원형 RNA를 또한 제조하였다. HeLa 세포(96 웰 플레이트 내에 웰당 10,000개의 세포)를 0.1 pmol의 정제된 원형 RNA로 리포펙타민® 메신저맥스 형질감염 시약(인비트로젠(Invitrogen))을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 형질감염시켰다. 세포 배양 배지를 수거하고, 24시간, 48시간 및 72시간 시점에서 신선한 배지로 대체하여 Gluc 활성을 측정하였다. Gluc 활성을 측정하기 위해, 10 μl의 수거된 세포 배지를 흰색 96 웰 플레이트에 옮기고, 생물발광 리포터 검정 시스템을 제조업체의 지시서(피어스(Pierce) 가우시아 루시페라제 플래쉬 검정 키트, 16158, 써모 사이언티픽(Thermo Scientific))에 따라 사용하였다. 플레이트를 광도계 기기(프로메가(Promega))에서 판독하였다.

[0572] SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 코딩하는 원형 RNA의 발현을 비교하기 위해, 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 1) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 2)에 의해 생성된 원형 RNA를 제조하였다. 비교를 위해, 아나바에나 3에 의해 생성된 원형 RNA를 또한 제조하였다. HeLa 세포(6 웰 플레이트 내에 웰당 120만개의 세포)를 4 pmol의 정제된 원형 RNA로 리포펙타민® 메신저맥스(인비트로젠) 형질감염 작용제를 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 형질감염시켰다. 48시간 형질감염 후, 세포를 트립신화에 의해 수거하고, 차가운 혈청-무함유 배지에 재현탁시켰다. 이어서 세포를 항-SARS-CoV-2 RBD 항체로 1시간 동안 염색하고, 이어서 항-마우스 IgG1 항체 AF647과 30분 동안 인큐베이션하였다. 염색된 집단을 유동 세포계측법에 의해 측정하였다.

[0573] 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 2)에 의해 생성된 원형 RNA는 폴리뉴클레오티드 카고로

서 Gluc를 코딩하는 경우 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 1)에 의해 생성된 원형 RNA 및 아나바에나 3에 의해 생성된 원형 RNA와 유사한 발현을 나타내었다(도 4). SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 코딩하는 원형 RNA의 경우, 아나바에나 2에 의해 생성된 원형 RNA는 아나바에나 3에 의해 생성된 원형 RNA보다 대략 3배 더 우수한 발현 및 아나바에나 1에 의해 생성된 원형 RNA보다 50% 더 많은 발현을 나타내었다(도 5).

[0574] **실시예 3: 아나바에나 자기-스플라이싱 PIE에서 원형화 효율에 대한 어닐링 영역의 길이의 효과**

[0575] 본 실시예는 아나바에나 자기-스플라이싱 PIE에서 원형화 효율에 대한 어닐링 영역의 길이의 효과를 입증한다.

[0576] 상기 실시예 1에서, 본 발명자들은 E2 서열을 돌연변이시킴으로써 어닐링 영역을 5개의 뉴클레오티드로부터 12개의 뉴클레오티드로로 연장시키는 것이 아나바에나 PIE의 원형화 효율을 증가시킴을 보였다.

[0577] 원형화 효율에 대한 어닐링 영역의 길이의 효과를 조사하기 위해, E2에 대해 상보적인 E1의 5' 단부에 추가적인 서열을 포함시킴으로써 E2와 E1 사이에 추가의 연장된 어닐링 영역을 갖도록 3개의 추가적인 구축물을 설계하였다: (1) 5 뉴클레오티드 연장(5'- CGTTT-3')(서열 번호 7), (2) 10 뉴클레오티드 연장(5'- ACGACCGTTT-3')(서열 번호 8), 및 (3) 15 뉴클레오티드 연장(5'- CCCACACGACCGTTT-3')(서열 번호 9). E2에서 상보적 서열은 각각 5 뉴클레오티드 연장(5'- AAACG-3')(서열 번호 10), 10 뉴클레오티드 연장(5'- AAACGGTCGT-3')(서열 번호 11), 또는 15 뉴클레오티드 연장(5'- AAACGGTCGTGTGGG-3')(서열 번호 12)이다. 전체 어닐링 서열은 각각 17개의 뉴클레오티드, 22개의 뉴클레오티드, 또는 27개의 뉴클레오티드이다. E2와 E1 사이에 연장된 어닐링 영역을 갖는 DNA 구축물의 예시적인 설계를 나타내는 개략도는 도 6에 제공된다.

[0578] 연장된 어닐링 서열(아나바에나 2) 및 연장된 어닐링 영역(5 뉴클레오티드 연장, 10 뉴클레오티드 연장 및 15 뉴클레오티드 연장)을 갖는 구축물을 설계하여 원형화 효율을 비교하였다. 본 실시예에서, 구축물을 스페이서 요소로서 폴리A50, 및 폴리뉴클레오티드 카고로서 EMCV IRES 및 Gluc의 조합을 포함하도록 설계하였다.

[0579] 선형 RNA를 7.5 mM의 NTP의 존재 하에서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 20분 동안 DN아제로 처리함으로써 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린 업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스, T2050)로 정제하였다.

[0580] 자기-스플라이싱은 전사 동안 일어났으며; 추가적인 반응은 요구되지 않았다. 자기-스플라이싱 효율을 모니터링하기 위해, 200 ng의 칼럼 정제된 시험관내 전사된 RNA를 겔 로딩 완충제 II(써모 피셔, AM8546G)와 혼합하고, 95 ℃에서 3분 동안 가열하고, 이어서 얼음 상에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 샘플을 6% 우레아 PAGE에 의해 분리하고, RNA 밴드를 겔 염색을 사용하여 염색하고, 화상화 시스템을 사용하여 가시화하였다.

[0581] E2와 E1 사이의 어닐링 영역의 추가의 연장(5 nt 연장, 10 nt 연장, 또는 15 nt 연장)은 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 2)와 대등한 원형화 효율을 나타내었다(도 7). 어닐링 영역의 15 뉴클레오티드 연장은 아나바에나 2와 비교하여 30% 더 우수한 원형화 효율을 나타내었다(도 7). 이 데이터는 E2-E1 상호작용이 효율적인 원형화에 중요하며, 어닐링 영역을 추가로 연장시키는 것은 원형화 효율을 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

[0582] **실시예 4: 연장된 어닐링 서열을 갖는 아나바에나 자기-스플라이싱 PIE에 의해 생성된 원형 RNA로부터의 단백질 발현**

[0583] 본 실시예는 연장된 어닐링 서열을 갖는 아나바에나 자기-스플라이싱 PIE에 의해 생성된 원형 RNA로부터의 단백질 발현을 입증한다.

[0584] 본 실시예에서, 연장된 어닐링 서열(아나바에나 2) 및 연장된 어닐링 영역(5 뉴클레오티드 연장, 10 뉴클레오티드 연장, 및 15 뉴클레오티드 연장)을 갖는 구축물을 실시예 3에 기재된 바와 같이 설계하여 단백질 발현을 비교하였다. 본 실시예에서, 구축물을 스페이서 요소로서 폴리A50, 및 폴리뉴클레오티드 카고로서 EMCV IRES 및 Gluc의 조합을 포함하도록 설계하였다.

[0585] 선형 RNA를 7.5 mM의 NTP의 존재 하에서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 20분 동안 DN아제로 처리함으로서 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린 업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스, T2050)로 정제하였다. Gluc를 코딩하는 원형 RNA를 우레아 PAGE에 의해 정제하고, 완충제(0.5 M 아세트산 나트륨, 0.1% SDS, 1 mM EDTA)에서 용리하고, 에탄올 침전시키고, RN아제 무함유수에 재현탁시켰다.

[0586] Gluc를 코딩하는 원형 RNA의 발현을 비교하기 위해, 아나바에나 2 및 추가의 연장된 어닐링 영역(5 뉴클레오티

드 연장, 10 뉴클레오티드 연장, 또는 15 뉴클레오티드 연장)을 갖는 아나바에나 PIE에 의해 생성된 원형 RNA를 실시예 3에 기재된 바와 같이 제조하였다. HeLa 세포(96 웰 플레이트 내에 웰당 10,000개의 세포)를 0.1 pmol의 정제된 원형 RNA로 리포펙타민® 메신저맥스(인비트로젠) 형질감염 작용제를 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 형질감염시켰다. 형질감염체를 각각의 시점에 대해 별개로 제조하였다. 6시간, 24시간 및 48시간에서, 배양 배지를 수거하였다. Gluc 활성을 측정하기 위해, 10 μl의 수거된 세포 배지를 흰색 96 웰 플레이트에 옮기고, 생물발광 리포터 검정 시스템을 제조업체의 지시서(피어스 가우시아 루시페라제 플래쉬 검정 키트, 16158, 써모 사이언티픽)에 따라 사용하였다. 플레이트를 광도계 기기(프로메가)에서 판독하였다.

[0587] 추가의 연장된 어닐링 영역(5 nt 연장, 10 nt 연장, 또는 15 nt 연장)을 갖는 아나바에나 PIE에 의해 생성된 원형 RNA는 아나바에나 2에 의해 생성된 원형 RNA의 그것과 유사하거나 그보다 더 우수한 발현을 나타내었다(도 8). 예를 들어, 15 뉴클레오티드 연장(총 27개의 뉴클레오티드)을 갖는 아나바에나 PIE에 의해 생성된 원형 RNA는 12개의 뉴클레오티드의 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 2)보다 3배 더 높은 발현을 나타내었다. 이 데이터는 어닐링 영역 연장이 원형화 효율뿐만 아니라 발현에도 중요함을 나타낸다.

[0588] **실시예 5: 연장된 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 자기-스플라이싱 재배치된 인트론-엑손(PIE)의 설계**

[0589] 본 실시예는 연장된 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 자기-스플라이싱 재배치된 인트론-엑손(PIE)의 설계를 기재한다.

[0590] DNA 구축물의 예시적인 설계를 나타내는 개략도는 도 9a 및 도 9b에 제공된다.

[0591] 본 실시예에서, 구축물은 5'에서 3'로 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반(테트라히메나 3' 절반-인트론), 3' 스플라이스 부위, 3' 엑손 단편(테트라히메나 E2), 스페이서 요소, 폴리뉴클레오티드 카고, 5' 엑손 단편(테트라히메나 E1), 5' 스플라이스 부위, 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반(테트라히메나 5' 절반-인트론)을 포함한다. E2는 나선 P10을 형성하는 5' 절반-인트론(5'- TACCTT-3')(서열 번호 14)에 대한 6 뉴클레오티드 상보적 서열(5'- AAGGTA-3')(서열 번호 13)을 포함한다(도 9, E1 및 5' 절반-인트론 상의 검은색 선). E2와 5' 절반-인트론 사이에 연장된 어닐링 영역을 갖는 구축물을 생성하기 위해, 6개의 뉴클레오티드를 E2 내의 어닐링 영역의 3' 단부에 첨가하였다(5'- AATATT-3'(서열 번호 15), 도 9a 및 9b에서 E2 상의 회색 박스). 연장된 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 자기-스플라이싱 PIE로부터의 전체 어닐링 영역은 12개의 뉴클레오티드이다(E2; 5'- AAGGTA**AATATT**-3'(서열 번호 16), 5' 인트론; 5'- **AATATT**TACCTT-3'(서열 번호 17), 굵은 글자는 연장된 어닐링 영역을 나타냄)(도 9b).

[0592] RNA 구조를 RNA 구조 예측 도구, RNA fold(rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi)에 의해 추정하였다. 추가적인 서열에 의한 E2-5' 절반-인트론 상호작용의 연장은 적절한 나선 P10 형성 및 응축된 자기-스플라이싱 인트론 구조를 발생시켰다(도 10a 및 10b).

[0593] 6개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역(테트라히메나 1) 및 연장된 어닐링 서열(테트라히메나 2)을 갖는 테트라히메나 재배치된 인트론-엑손을 갖는 구축물을 설계하여 원형화 효율을 비교하였다. 본 실시예에서, 구축물을 스페이서 요소로서 폴리A50, 및 폴리뉴클레오티드 카고로서 EMCV IRES 및 hEPO ORF의 조합을 포함하도록 설계하였다. 원형 RNA의 크기는 1.2 Kb였다.

[0594] 선형 RNA를 7.5 mM의 NTP의 존재 하에서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 20분 동안 DN아제로 처리함으로써 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린 업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스, T2050)로 정제하였다.

[0595] 자기-스플라이싱은 전사 동안 일어났으며; 추가적인 반응은 요구되지 않았다. 원형화 효율을 모니터링하기 위해, 200 ng의 칼럼 정제된 시험관내 전사된 RNA를 겔 로딩 완충제 II(써모 피셔, AM8546G)와 혼합하고, 95 ℃에서 3분 동안 가열하고, 이어서 얼음 상에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 샘플을 6% 우레아 PAGE에 의해 분리하고, RNA 밴드를 겔 염색을 사용하여 염색하고, 화상화 시스템을 시용하여 가시화하였다. 어닐링 서열을 6개의 뉴클레오티드로부터 12개의 뉴클레오티드로 연장시키는 것(테트라히메나 2)은 6개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 자기-스플라이싱 PIE(테트라히메나 1)와 유사한 원형화 효율을 나타내었다(도 11). 이 데이터는 테트라히메나 자기-스플라이싱 PIE에서 어닐링 서열의 연장에 의해 원형화가 파괴되지 않았음을 나타낸다.

[0596] **실시예 6: 연장된 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 PIE에 이해 생성된 원형 RNA로부터의 단백질 발현**

[0597] 본 실시예는 연장된 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 자기-스플라이싱 PIE에 의해 생성된 원형 RNA로부터의 단

백질 발현을 기재한다.

[0598] 단백질 발현을 비교하기 위해, 6개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역(테트라히메나 1) 및 연장된 어닐링 서열(테트라히메나 2)을 갖는 테트라히메나 자기-스플라이싱 PIE를 갖는 DNA 구축물을 실시예 5에 기재된 바와 같이 설계하였다. 구축물을 스페이서 요소로서 폴리A50, 및 폴리뉴클레오티드 카고로서 EMCV IRES, 및 Gluc ORF의 조합을 포함하도록 설계하였다.

[0599] 선형 RNA를 7.5 mM의 NTP의 존재 하에서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 DN아제로 처리함으로써 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린 업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스, T2050)로 정제하였다. Gluc를 코딩하는 원형 RNA를 우레아 PAGE에 의해 정제하고, 완충제(0.5 M 아세트산나트륨, 0.1% SDS, 1 mM EDTA)에서 용리하고, 에탄올 침전시키고, RN아제 무함유수에 재현탁시켰다.

[0600] Gluc를 코딩하는 원형 RNA의 발현을 비교하기 위해, 6개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 PIE(테트라히메나 1) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 테트라히메나 PIE(테트라히메나 2)에 의해 생성된 원형 RNA를 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. HeLa 세포(96 웰 플레이트 내에 웰당 10,000개의 세포)를 0.1 pmol의 정제된 원형 RNA로 리포펙타민® 메신저맥스(인비트로젠) 형질감염 작용제를 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 형질감염시켰다. 형질감염체를 각각의 시점에 대해 별개로 제조하였다. 6시간, 24시간 및 48시간에서, 배양 배지를 수거하였다. Gluc 활성을 측정하기 위해, 수거된 세포 배지를 흰색 96 웰 플레이트에 옮기고, 생물발광 리포터 검정 시스템을 제조업체의 지시서에 따라 사용하였다. 플레이트를 광도계 기기에서 판독하였다.

[0601] **실시예 7: 연장된 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 자기-스플라이싱 재배치된 인트론-엑손(PIE)의 설계**

[0602] 본 실시예는 연장된 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 자기-스플라이싱 PIE의 설계를 기재한다.

[0603] DNA 구축물의 예시적인 설계를 나타내는 개략도는 도 12a 및 도 12b에 제공된다. 구축물은 5'에서 3'로 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반(T4 파지 3' 절반-인트론), 3' 스플라이스 부위, 3' 엑손 단편(T4 파지 E2), 스페이서 요소, 폴리뉴클레오티드 카고, 5' 엑손 단편(T4 파지 E1), 5' 스플라이스 부위, 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반(T4 파지 5' 절반-인트론)을 포함한다. E2는 나선 P10을 형성하는 5' 절반-인트론(5'- AG-3')에 대해 2 뉴클레오티드 상보적 서열(5'- CT-3')을 갖는다(도 12a 및 12b, E2 및 5' 절반-인트론 상의 검은색 선). E2와 5' 절반-인트론 사이에 연장된 어닐링 영역을 갖는 구축물을 생성하기 위해, E2로부터의 4개의 뉴클레오티드를 5' 절반-인트론을 갖는 연장된 5 뉴클레오티드 어닐링 영역을 갖도록 돌연변이시켰다(5'-**ACCG**T-3'(서열 번호 18) → 5'-**CAAT**T-3'(서열 번호 19), 굵은 글자는 돌연변이된 서열을 나타냄). 연장된 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 PIE로부터의 전체 어닐링 영역은 7개의 뉴클레오티드이다(E2; 5'-CT**CAATT**-3'(서열 번호 20), 5' 절반-인트론; 5'-**AATTG**AG -3'(서열 번호 21), 굵은 글자는 연장된 어닐링 서열을 나타냄)(도 12a 및 12b).

[0604] 원형화 효율을 비교하기 위해, 2개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역(T4 파지 1) 및 연장된 어닐링 서열(T4 파지 2)을 갖는 T4 파지 PIE를 갖는 구축물을 설계하였다. 본 실시예에서, 구축물을 스페이서 요소로서 폴리A50, 및 폴리뉴클레오티드 카고로서 EMCV IRES 및 Gluc ORF의 조합을 포함하도록 설계하였다. 원형 RNA의 크기는 1.2 K였다.

[0605] 선형 RNA를 7.5 mM의 NTP의 존재 하에서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 DN아제로 처리함으로써 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린 업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스, T2050)로 정제하였다.

[0606] 자기-스플라이싱은 전사 동안 일어났으며; 추가적인 반응은 요구되지 않았다. 원형화 효율을 모니터링하기 위해, 200 ng의 칼럼 정제된 시험관내 전사된 RNA를 겔 로딩 완충제 II(써모 피셔, AM8546G)와 혼합하고, 95 ℃에서 3분 동안 가열하고, 이어서 얼음 상에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 샘플을 6% 우레아 PAGE에 의해 분리하고, RNA 밴드를 겔 염색을 사용하여 염색하고, 화상화 시스템을 사용하여 가시화하였다.

[0607] 어닐링 서열을 연장시키는 것(T4 파지 2)은 6개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 자기-스플라이싱 PIE(T4 파지 1)와 유사한 원형화 효율을 나타내었다(도 13). 이 데이터는 T4 파지 자기-스플라이싱 PIE에서 어닐링 서열의 연장에 의해 원형화가 파괴되지 않았음을 나타낸다.

[0608] **실시예 8: 연장된 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 자기-스플라이싱 PIE에 의해 생성된 원형 RNA로부터의 단백질 발현**

[0609] 본 실시예는 연장된 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 자기-스플라이싱 PIE에 의해 생성된 원형 RNA의 발현을 기재한

다.

[0610] 단백질 발현을 비교하기 위해, 2개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역(T4 파지 1) 및 연장된 어닐링 서열(T4 파지 2)을 갖는 T4 파지 PIE를 갖는 DNA 구축물을 실시예 7에 기재된 바와 같이 설계하였다. 본 실시예에서, 구축물을 스페이서 요소로서 폴리A50, 및 폴리뉴클레오티드 카고로서 EMCV IRES 및 Gluc ORF의 조합을 포함하도록 설계하였다.

[0611] 선형 RNA를 7.5 mM의 NTP의 존재 하에서 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 DN아제로 처리함으로써 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린 업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스, T2050)로 정제하였다. Gluc를 코딩하는 원형 RNA를 우레아 PAGE에 의해 정제하고, 완충제(0.5 M 아세트산나트륨, 0.1% SDS, 1 mM EDTA)에서 용리하고, 에탄올 침전시키고, RN아제 무함유수에 재현탁시켰다.

[0612] Gluc를 코딩하는 원형 RNA의 발현을 비교하기 위해, 2개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 PIE(T4 파지 1) 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 T4 파지 PIE(T4 파지 2)에 의해 생성된 원형 RNA를 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. HeLa 세포(96 웰 플레이트 내에 웰당 10,000개의 세포)를 0.1 pmol의 정제된 원형 RNA로 리포펙타민® 메신저맥스(인비트로젠) 형질감염 작용제를 사용하여 제조업체의 지시서에 따라 형질감염시켰다. 형질감염체를 각각의 시점에 대해 별개로 제조하였다. 6시간, 24시간 및 48시간에서, 배양 배지를 수거하였다. Gluc 활성을 측정하기 위해, 수거된 세포 배지를 흰색 96 웰 플레이트에 옮기고, 생물발광 리포터 검정 시스템을 제조업체의 지시서에 따라 사용하였다. 플레이트를 광도계 기기에서 판독하였다.

[0613] **실시예 9: 연장된 어닐링 영역을 갖는 자기-스플라이싱 재배치된 인트론-엑손(PIE) 구축물의 설계**

[0614] 본 실시예는 더 우수한 원형화 효율을 제공하기 위한 연장된 어닐링 영역을 갖는 다양한 자기-스플라이싱 재배치된 인트론-엑손(PIE)의 설계를 기재한다.

[0615] DNA 구축물의 예시적인 설계를 나타내는 개략도는 도 14a 및 도 14b에 제공된다. 본 실시예에서, 구축물은 5'에서 3'로 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반(3' 절반-인트론), 3' 스플라이스 부위, 3' 엑손 단편(E2), 스페이서 요소, 폴리뉴클레오티드 카고, 5' 엑손 단편(E1), 5' 스플라이스 부위, 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반(5' 절반-인트론)을 포함한다.

[0616] 상이한 그룹 I 인트론은 상보적 서열의 상이한 길이를 갖는다(도 19). 예를 들어, 시네코코쿠스 엘론가투스 PCC 6301의 E2는 시네코코쿠스 엘론가투스 PCC 6301의 E1에 대한 7 뉴클레오티드 상보적 서열을 갖고; 아나바에나 아졸라에, 아나바에나 실린드리카, 및 스키토네마 호프만니(Scytonema hofmanni)의 E2는 각각 아나바에나 아졸라에, 아나바에나 실린드리카, 및 스키토네마 호프만니의 E1에 대한 상보적 서열의 5개의 뉴클레오티드를 갖는다. E2와 E1 사이에 연장된 어닐링 영역을 갖는 구축물을 생성하기 위해, 도 19에 기재된 바와 같이 E2 내의 서열을 E1을 갖는 연장된 어닐링 영역을 갖도록 돌연변이시켰다. 연장된 어닐링 영역을 갖는 그룹 I 재배치된 인트론-엑손(PIE)으로부터의 전체 어닐링 영역은 17개의 뉴클레오티드이다.

[0617] 도 19로부터의 원래(1) 및 연장된(2) 어닐링 영역은 하기와 같다:

[0618] 시네코코쿠스 1 TCCGCTGACTGTAAAGG(서열 번호 92)

[0619] 시네코코쿠스 2 TCCGCTGCGTCTACCGT(서열 번호 93)

[0620] 아나바에나 아졸라에 1 TCCGTTGACTGTAAAAA(서열 번호 94)

[0621] 아나바에나 아졸라에 2 TCCGTAGCGTCTACCAT(서열 번호 95)

[0622] 아나바에나 실린드리카 1 TCCGTTGACCTTAAACG(서열 번호 96)

[0623] 아나바에나 실린드리카 2 TCCGTAGCGTCTACCAT(서열 번호 97)

[0624] 스키토네마 1 CCCGAAGGTCAGTGGTT(서열 번호 98)

[0625] 스키토네마 2 CCCGACGAGCTACCAGG(서열 번호 99)

[0626] RNA 구조를 RNA 구조 예측 도구, RNA fold(rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi)에 의해 추정하였다. E2-E1 상호작용의 연장을 적절한 E2-E1 상호작용 및 응축된 자기-스플라이싱 인트론 구조를 발생시키는 서열을 변형시킴으로써 생성하였다(도 15a~15b, 16a~16b, 17a~17b, 및 18a~18b).

[0627] 원래 어닐링 영역, 및 연장된 어닐링 영역을 갖는 어닐링 서열을 갖는 PIE를 갖는 구축물을 설계하여 원형화 효

율을 비교하였다. 비교를 위해, 아나바에나 1 및 아나바에나 2 구축물을 또한 사용하였다. 본 실시예에서, 구축물을 스페이서 요소, 및 폴리뉴클레오티드 카고로서 EMCV IRES 및 3822 뉴클레오티드 ORF의 조합을 포함하도록 설계하였다. 원형 RNA의 크기는 4.5 Kb였다.

[0628] 비변형된 선형 RNA를 12.5 mM의 NTP의 존재 하에서 DNA 주형으로부터 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 20분 동안 DN아제로 처리함으로써 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린 업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스, T2050)로 정제하였다. 자기-스플라이싱은 전사 동안 일어났으며; 추가적인 반응은 요구되지 않았다. 자기-스플라이싱 효율을 모니터링하기 위해, 칼럼 정제된 시험관내 전사된 RNA를 HPLC를 통해 음이온성 교환(AEX) 칼럼 상에서 분리하였다. 선형 및 원형 피크의 백분율을 측정하고, 원형화 효율을 원래 어닐링 영역을 갖는 PIE를 갖는 구축물의 그것으로 정규화하였다.

[0629] 어닐링 서열을 연장시키는 것은 원형화 효율을 아나바에나(아나바에나 2), 시네코코쿠스 엘론가투스 PCC 6301(시네코코쿠스 2), 및 아나바에나 실린드리카(아나바에나 실린드리카 2)에 대해 5배까지, 및 아나바에나 아졸라에(아나바에나 아졸라에 2)에 대해 10배까지 증가시켰지만, 스키토네마 호프만니(스키토네마 2)에 대해서는 원형화 효율의 증가는 관찰되지 않았다(도 20). 이는 아나바에나 인트론에 대해 본원에 기재된 바와 같은 동일한 또는 유사한 전략을 사용하여 다른 그룹 I 인트론을 변형시킴으로써 원형화 효율이 증가될 수 있음을 보여준다.

[0630] **실시예 10: 단부 대 단부 상호작용을 증진시키기 위한 연장된 스템 영역을 갖는 아나바에나 자기-스플라이싱 재배치된 인트론-엑손(PIE) 구축물의 설계**

[0631] 본 실시예는 단부 대 단부 상호작용을 증진시킴으로써 더 우수한 원형화 효율을 제공하기 위한 연장된 스템 영역을 갖는 아나바에나 자기-스플라이싱 재배치된 인트론-엑손(PIE) 서열의 설계를 기재한다.

[0632] DNA 구축물의 예시적인 설계를 나타내는 개략도는 도 21b에 제공된다. 본 실시예에서, 구축물은 5'에서 3'로 그룹 I 촉매 인트론 단편의 3' 절반(아나바에나 3' 절반-인트론), 3' 스플라이스 부위, 3' 엑손 단편(아나바에나 E2), 스페이서 요소, 폴리뉴클레오티드 카고, 5' 엑손 단편(아나바에나 E1), 5' 스플라이스 부위, 및 그룹 I 촉매 인트론 단편의 5' 절반(아나바에나 5' 절반-인트론)을 포함한다. 연장된 스템 영역을 갖는 구축물의 2가지 버전을 설계하였다. 아나바에나 4의 설계에 대해, 추가적인 스템 영역(5'-GUAAGUU-3')은 서로의 다음에 놓였다. 아나바에나 5의 설계에 대해, P6b 내의 벌지 영역은 충전되어 스템을 생성하였다.

[0633] 비변형된 선형 RNA를 12.5 mM의 NTP의 존재 하에서 DNA 주형으로부터 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 합성하였다. 주형 DNA를 20분 동안 DN아제로 처리함으로써 제거하였다. 합성된 선형 RNA를 RNA 클린 업 키트(뉴 잉글랜드 바이오랩스, T2050)로 정제하였다. 자기-스플라이싱은 전사 동안 일어났으며; 추가적인 반응은 요구되지 않았다. 자기-스플라이싱 효율을 모니터링하기 위해, 칼럼 정제된 시험관내 전사된 RNA를 HPLC를 통해 음이온성 교환(AEX) 칼럼 상에서 분리하였다. 선형 및 원형 피크의 백분율을 측정하고, 원형화 효율을 상응하는 원래 구축물의 그것으로 정규화하였다.

[0634] 연장된 스템 영역을 갖는 구축물은 연장된 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 2)를 갖는 구축물 및 5개의 뉴클레오티드의 어닐링 영역을 갖는 아나바에나 PIE(아나바에나 1)를 갖는 구축물과 대등한 원형화 효율을 나타내었다 (도 22).

[0635] 시네코코쿠스 엘론가투스 PCC 6301: 3' 절반-인트론 E2

[0636] TAAACAACTAACAGCTTTAGAAGGTGCAGAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGATTCAGCCGAG
GGTAAAGGGATAGTCCAATTCTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGCGAAAGTTGCAGAGAGAATGA
AAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGAGGGTTCGAGTCCCTCCGCCCCCA (서열 번호 80)

[0637] 시네코코쿠스 엘론가투스 PCC 6301: E1 5' 절반-인트론

[0638] ACGGTAGACGCAGCGGACTTAGAAAACTGGGCCTCGATCGCGAAAGGGATCGAGTGGCAGCTCTCA
AACTCAGGGAAACCTAAAACTTTAAACATTMAAGTCATGGCAATCCTGAGCCAAGCTAAAGC (서열
번호81)

[0639] 아나바에나 아졸라에: 3' 절반-인트론 E2

[0640] TTAAACTCAAAATTTAAAATCCCAAATTCAAAATTCCGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC
CCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCTGAAGTTGCTGAAGCAACAA
GGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCGTTGACTGTAAAAAGTCGTGGGGGTTCAAGTC
CCCCCACCCCC (서열 번호 82)

[0641] 아나바에나 아졸라에: E1 5' 절반-인트론

[0642] ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTTAAGTGGAAGCTCTCAAA TTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCAGAAAATTTAGACTTGA GATTTGATTTTGGAG (서열 번호 83)

[0643] 아나바에나 실린드리카: 3' 절반-인트론 E2

[0644] GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCT AACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTTAAAGCCTGAAGTTGTGCAAGCAACAAGGC AACAGTGAAAGCTGTGGAAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCC CACCCCC (서열 번호 84)

[0645] 아나바에나 실린드리카: E1 5' 절반-인트론

[0646] ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTCAAGTGGAAGCTCTCAA ATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCGGAAATTTTAGAATCA AGATTTTATTTT (서열 번호 85)

[0647] 스키토네마 호프만니: 3' 절반-인트론 E2

[0648] AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGA CAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGG TCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA (서열 번호 86)

[0649] 스키토네마 호프만니: E1 5' 절반-인트론

[0650] AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGA CAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGG TCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA (서열 번호 87)

[0651] 아나바에나 4: 3' 절반-인트론 E2

[0652] AACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAA CGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGG AGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA (서열 번호 88)

[0653] 아나바에나 4: E1 5' 절반-인트론

[0654] AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAG GGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAG TAAGTT (서열 번호 89)

[0655] 아나바에나 5: 3' 절반-인트론 E2

[0656] AACAACAGATAACTTACTAGTTACTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAA TGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA (서열 번호 90)

[0657] 아나바에나 5: E1 5' 절반-인트론

[0658] AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAG GGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT (서열 번호 91)

[0659] **다른 실시 형태**

[0660] 본 발명을 그의 구체적인 실시 형태에 관하여 설명하였지만, 추가의 변형이 가능하고, 본 출원은, 일반적으로 본 발명의 원리를 따르고 본 발명이 속하는 기술 분야 내의 알려지거나 통상적인 실시 내에 해당하며 상기 제시된 본질적인 특색에 적용될 수 있는 본 발명으로부터 벗어난 것들을 포함하는 본 발명의 임의의 변동, 용도, 또는 적응을 커버하는 것으로 의도되며, 청구범위의 범주에 따른다는 것이 이해될 것이다. 다른 실시 형태는 청구

범위 내에 있다.

도면

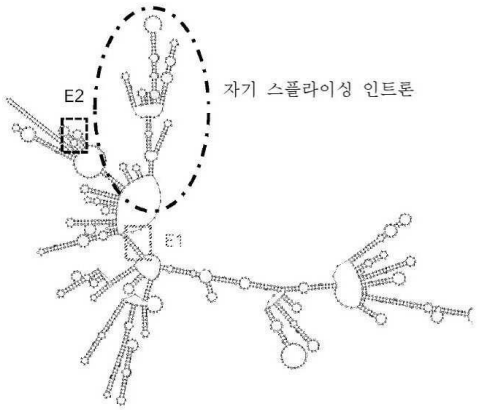
도면1a



도면1b


연장된 어닐링 영역 (12 nt)
3′절반-인트론
E2
스페이서
폴리뉴클레오티드 카고
E1
5′절반-인트론

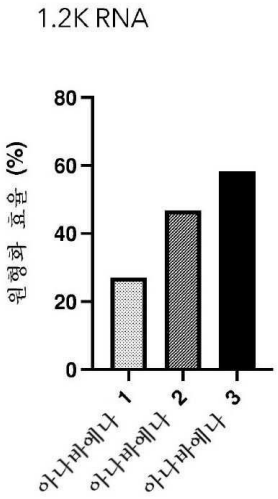
도면2a


E2
자기 스플라이싱 인트론
E1

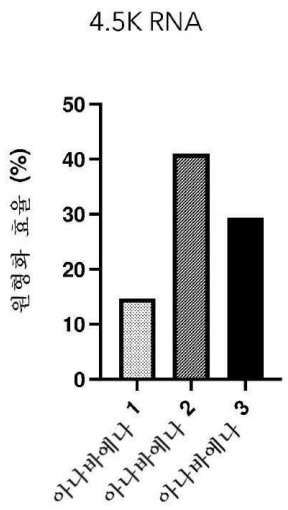
도면2b


자기 스플라이싱 인트론
E2
E1

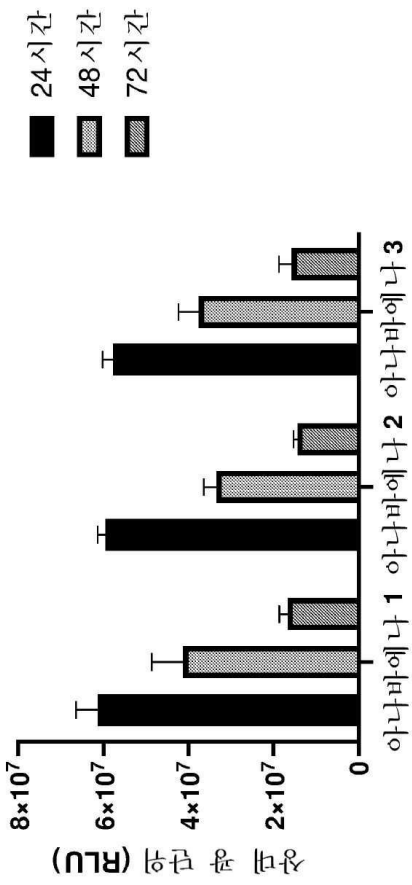
도면3a


1.2K RNA
원형화 효율 (%)
80
60
40
20
0
아나바에나 1
아나바에나 2
아나바에나 3

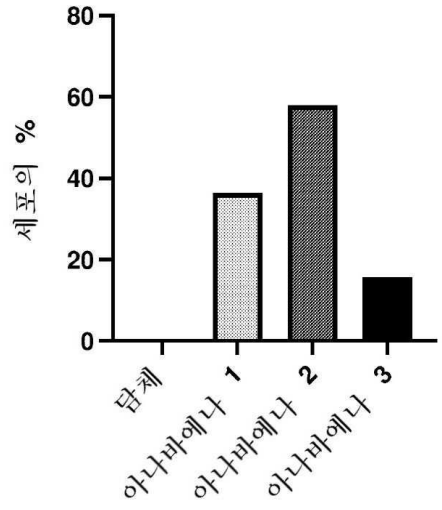
도면3b


4.5K RNA
원형화 효율 (%)
50
40
30
20
10
0
아나바에나 1
아나바에나 2
아나바에나 3

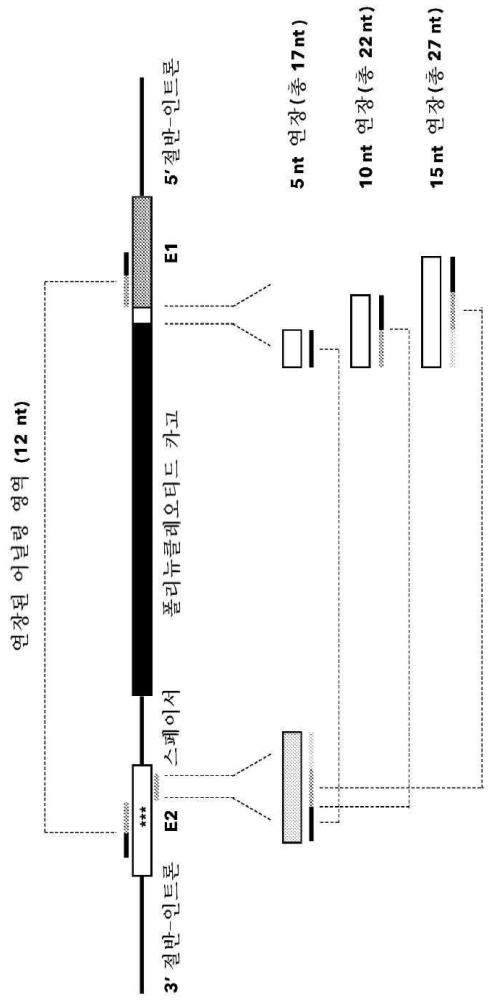
도면4


24 시간
48 시간
72 시간
상대 광 단위 (RLU)
8×10^7
6×10^7
4×10^7
2×10^7
0
아나바에나 1
아나바에나 2
아나바에나 3

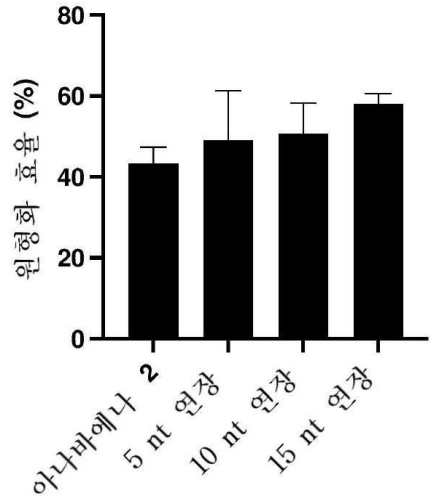
도면5


80
60
40
20
0
세포의 %
담체
아나바에나 1
아나바에나 2
아나바에나 3

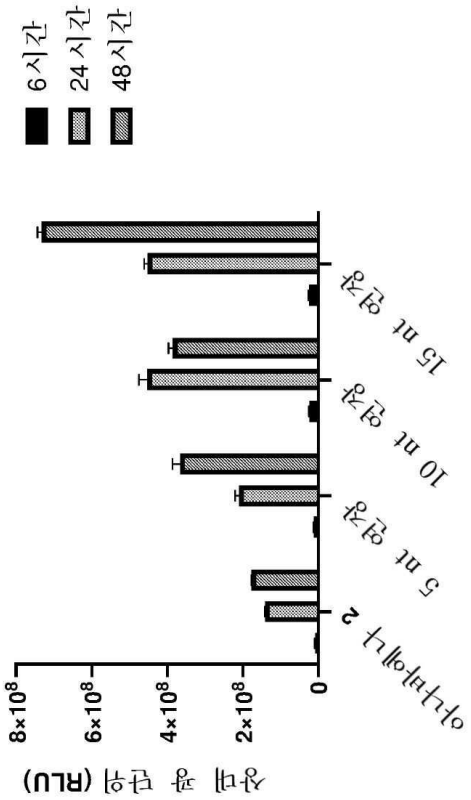
도면6


연장된 어닐링 영역 (12 nt)
3' 절반-인트론
E2
스페이서
폴리뉴클레오티드 카고
E1
5' 절반-인트론
5 nt 연장 (총 17 nt)
10 nt 연장 (총 22 nt)
15 nt 연장 (총 27 nt)

도면7


원형화 효율 (%)
80
60
40
20
0
아나바에나 2
5 nt 연장
10 nt 연장
15 nt 연장

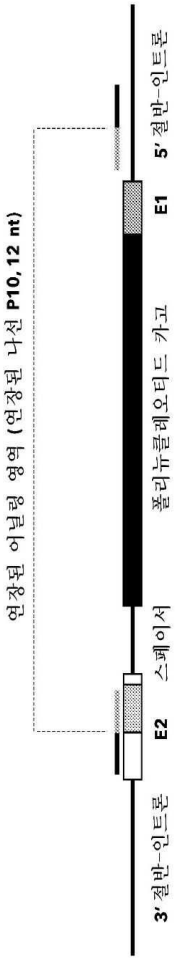
도면8


6 시간
24 시간
48 시간
상대 광 단위 (RLU)
8×10^8
6×10^8
4×10^8
2×10^8
0
아나바에나 2
5 nt 연장
10 nt 연장
15 nt 연장

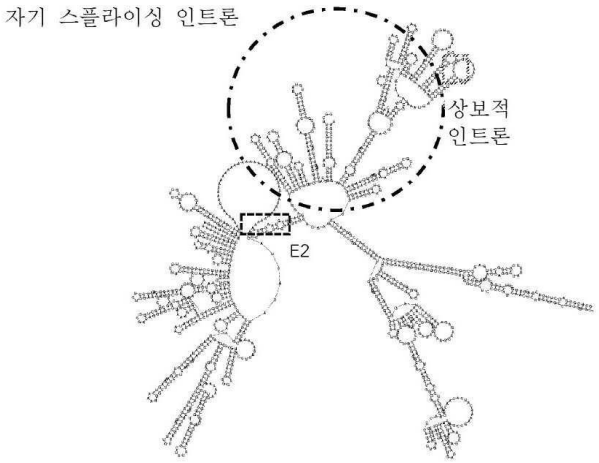
도면9a



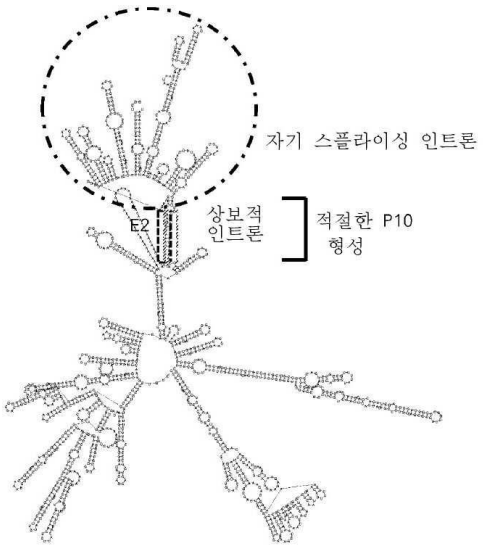
도면9b


연장된 어닐링 영역 (연장된 나선 P10, 12 nt)
3' 절반-인트론
E2
스페이서
폴리뉴클레오티드 카고
E1
5' 절반-인트론

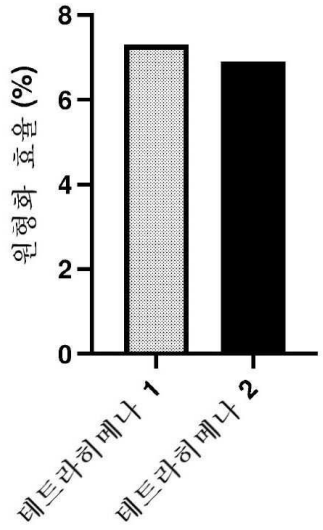
도면10a


자기 스플라이싱 인트론
상보적
인트론
E2

도면10b


자기 스플라이싱 인트론
E2
상보적
인트론
적절한 P10
형성

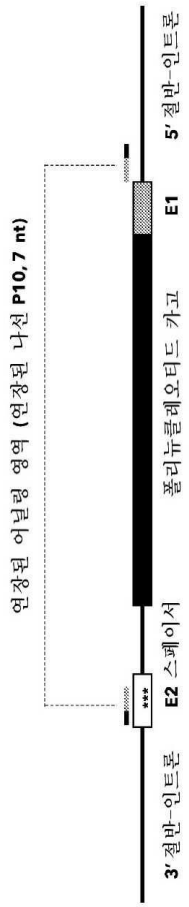
도면11


원형화 효율 (%)
8
6
4
2
0
테트라히메나 1
테트라히메나 2

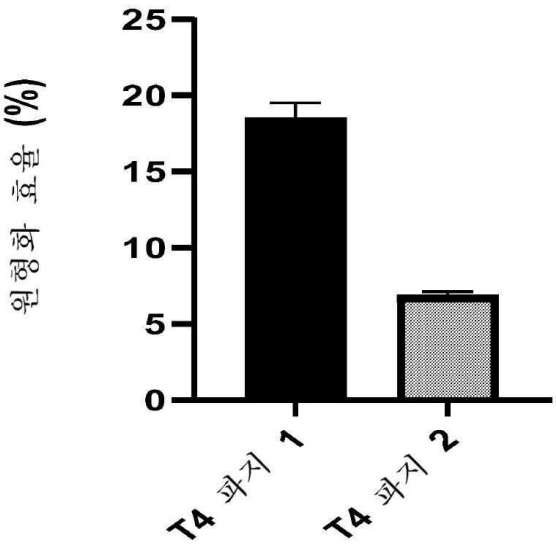
도면12a



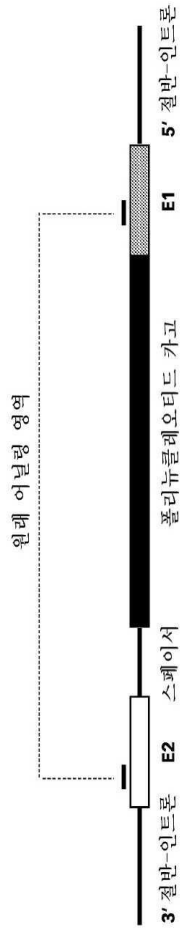
도면12b


연장된 어닐링 영역 (연장된 나선 P10, 7 nt)
3′ 절반-인트론
E2 스페이서
폴리뉴클레오티드 카고
E1
5′ 절반-인트론

도면13


원형화 효율 (%)
25
20
15
10
5
0
T4 파지 1
T4 파지 2

도면14a



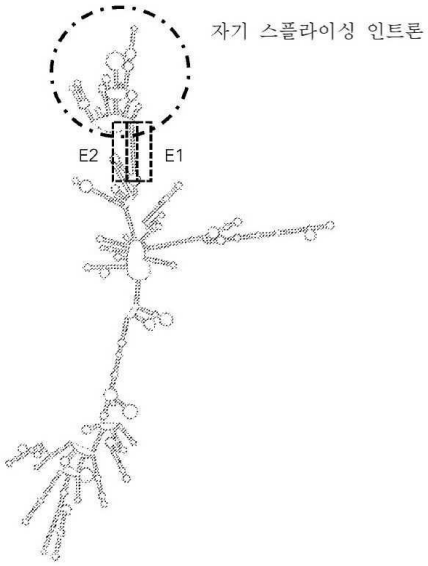
도면14b


5′ 절반-인트론
E1
폴리뉴클레오티드 카고
스페이서
E2
3′ 절반-인트론
연장된 어닐링 영역

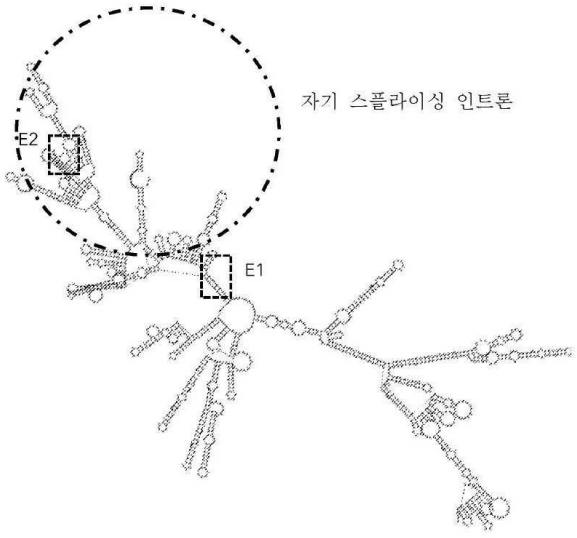
도면15a


자기 스플라이싱 인트론
E2
E1

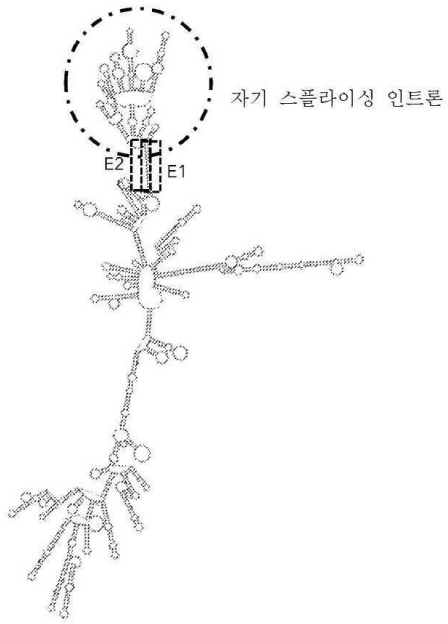
도면15b



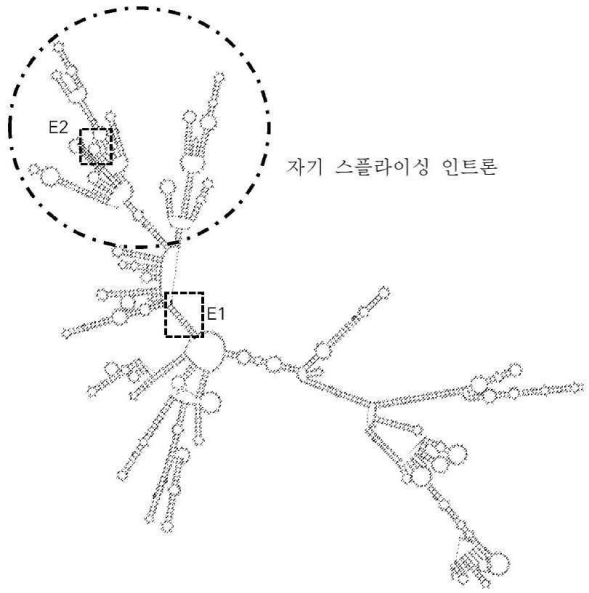
도면16a



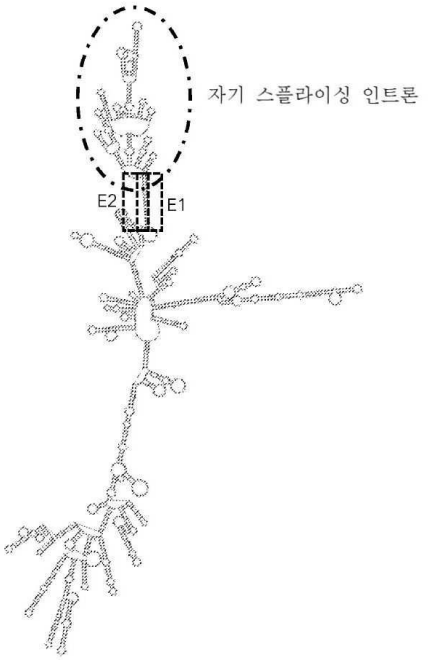
도면16b



도면17a



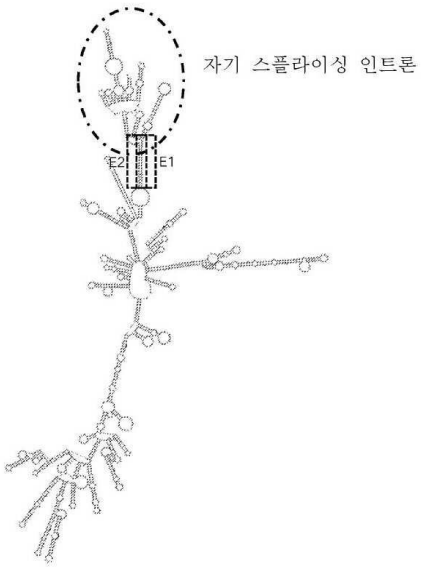
도면17b



도면18a



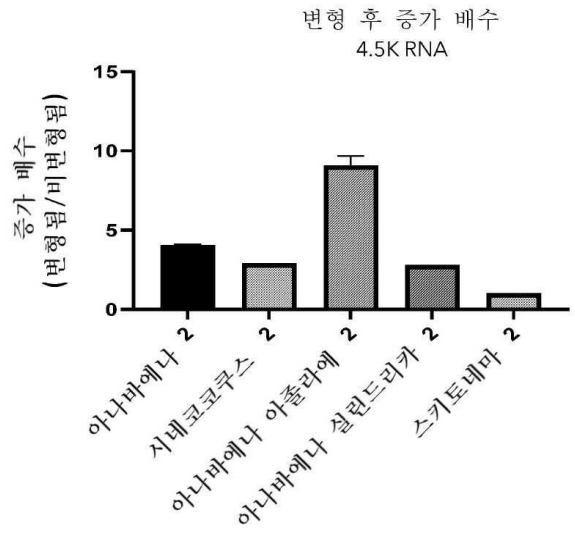
도면18b



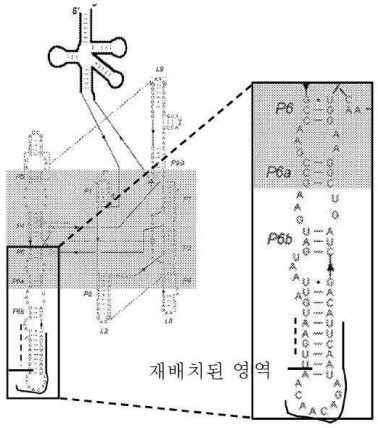
도면19

유기체	변형	원래	연장된
시네코코쿠스 엘론가투스	시네코코쿠스 1 **TCCGCTG**ACTGTAAAGG 시네코코쿠스 2 **TCCGCTG***CGTCTACCGT*	7 nt	17 nt
아나바에나 아폴라에	아나바에나 아폴라에 1 **TCCGT**TGACTGTAAAAA 아나바에나 아폴라에 2 **TCCGT***AGCGTCTACCAT*	5 nt	17 nt
아나바에나 실린드리카	아나바에나 실린드리카 1 **TCCGT**TGACCTTAAACG 아나바에나 실린드리카 2 **TCCGT***AGCGTCTACCAT*	5 nt	17 nt
스키토네마 호프만니	스키토네마 1 **CCCGA**AGGTCAGTGGTT 스키토네마 2 **CCCGA***CGAGCTACCAGG*	5 nt	17 nt

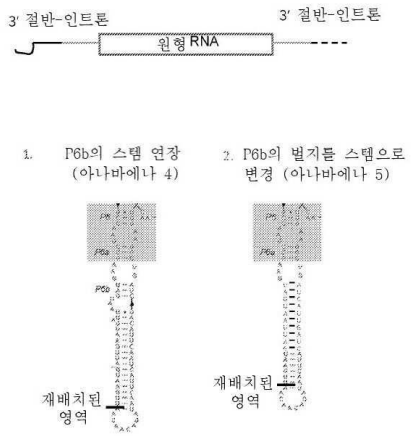
도면20



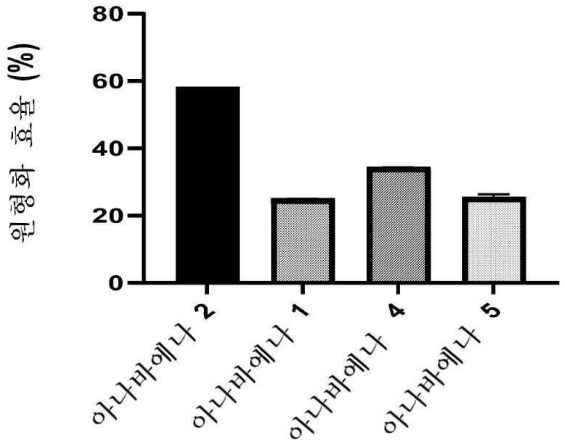
도면21a



도면21b



도면22



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.