(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-509106
(P2025-509106A)
(43)公表日　令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類　FI

C12N 15/11 (2006.01)	C12N	15/11	Z ZNA	
C12N 15/67 (2006.01)	C12N	15/67	Z	
C12N 15/63 (2006.01)	C12N	15/63	Z	
C12N 15/41 (2006.01)	C12N	15/41		
C12N 15/12 (2006.01)	C12N	15/12		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全37頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-549763(P2024-549763)
(86)(22)出願日　令和5年3月21日(2023.3.21)
(85)翻訳文提出日　令和6年8月20日(2024.8.20)
(86)国際出願番号　PCT/TH2023/000003
(87)国際公開番号　WO2023/182948
(87)国際公開日　令和5年9月28日(2023.9.28)
(31)優先権主張番号　2201001686
(32)優先日　令和4年3月21日(2022.3.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
タイ(TH)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　524311756
バイオ アドヴェンチャー カンパニー リミテッド
タイ バンコク １０５００ バン ラック シ プラヤ スラウォン ロード １８４ セカンド フロア
(71)出願人　524311767
マヒドン ユニヴァーシティ
タイ ナコーンパトム ７３１７０ プッタモントン サラヤ プッタモントン サイ ４ ロード ９９９
(71)出願人　524311778
オフィス オブ ナショナル ハイヤー エデュケイション サイエンス リサーチ アンド イノヴェイション ポリシー カ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　タンパク質発現を増強するための、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、プラスミドベクター及び環状ｍＲＮＡ

(57)【要約】
本発明は、高度に効率的なタンパク質発現をもたらす、小さいバックボーン、最適化されたホモロジーアーム、及び効率的なオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）をコードする配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を有する、オープンリーディングフレームをコードする環状ｍＲＮＡ（ＯＲＦをコードする環状ｍＲＮＡ）を作製するためのプラスミドベクターに関する。ＩＲＥＳはまた、目的のタンパク質の翻訳を促進し、それによりタンパク質発現が向上するよう、開発された。本発明のプラスミドベクター及びＯＲＦをコードする環状ｍＲＮＡは、その最適化されたコンストラクト及び小さいサイズによって、以前の技術的な課題を克服し得、送達の容易さ、細胞における安定性、及び有意に高い翻訳効率及びインビボのタンパク質発現をもたらす。医薬又は医薬調製物において応用される場合、本発明に記載される環状ｍＲＮＡは、投与の頻度及び／又は必要な用量を潜在的に減少させ得、望まない副作用を減少させ、患者が医薬を利用する機会を向上させる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５若しくは配列番号２６又はそれらの組合せからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）。
【請求項２】
配列番号２１に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）。
【請求項３】
互いに連結し、以下の順序：
－ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、
－５’スペーサー１、
－５’外部ホモロジーアーム、
－３’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）、
－５’内部ホモロジーアーム、
－５’スペーサー２、
－配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、
－オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、
－３’スペーサー１、
－３’内部ホモロジーアーム、
－５’順序を変えられたイントロン－エクソン、
－３’スペーサー２、及び
－３’外部ホモロジーアーム
で配置されたエレメントを含む、オープンリーディングフレームコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクター。
【請求項４】
ＲＮＡポリメラーゼプロモーターが１５～２５ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項５】
ＲＮＡポリメラーゼプロモーターが、Ｔ７ウイルスＲＮＡポリメラーゼプロモーター、ＳＰ６ウイルスＲＮＡポリメラーゼプロモーター、又はＴ３ウイルスＲＮＡポリメラーゼからなる群から選択される、請求項３又は４に記載のプラスミドベクター。
【請求項６】
ＲＮＡポリメラーゼプロモーターがＴ７ウイルスＲＮＡポリメラーゼプロモーターである、請求項５に記載のプラスミドベクター。
【請求項７】
５’スペーサー１が５～１５ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項８】
５’外部ホモロジーアームが１５～３０ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項９】
５’外部ホモロジーアームが１５～２０ヌクレオチドの長さを有する、請求項８に記載のプラスミドベクター。
【請求項１０】
５’外部ホモロジーアームが２０～３０ヌクレオチドの長さを有する、請求項８に記載のプラスミドベクター。
【請求項１１】
５’外部ホモロジーアームが配列番号４の配列である、請求項８～１０のいずれか１項に記載のプラスミドベクター。

【請求項９】
３’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）が１００～２５０ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項１０】
３’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）がシアノバクテリウム・アナバエナｔＲＮＡ前駆体グループＩイントロン遺伝子から得られる、請求項３又は９に記載のプラスミドベクター。
【請求項１１】
５’内部ホモロジーアームが１５～２５ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項１２】
５’スペーサー２が５０～１００ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項１３】
ＩＲＥＳが１９０～９００ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項１４】
ＩＲＥＳが、エコーウイルス３３型ＩＲＥＳ、エコーウイルス２０型ＩＲＥＳ、エコーウイルス２９型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＢ１型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＢ３型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＡ１２型ＩＲＥＳ、エンテロウイルス８０型ＩＲＥＳ、ダイズアブラムシウイルス１型ＩＲＥＳ、ハラスタビ・アルバウイルスＩＲＥＳ、若しくはペギウイルスＪ型ＩＲＥＳ又はそれらの組合せからなる群から選択される、請求項３又は１３に記載のプラスミドベクター。
【請求項１５】
ＩＲＥＳがコクサッキーウイルスＢ３型ＩＲＥＳである、請求項１４に記載のプラスミドベクター。
【請求項１６】
ＩＲＥＳが、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５若しくは配列番号２６又はそれらの組合せから選択される、請求項３又は１３に記載のプラスミドベクター。
【請求項１７】
ＩＲＥＳが配列番号２１の配列である、請求項１６に記載のプラスミドベクター。
【請求項１８】
ＯＲＦが、ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦ、癌抗原タンパク質をコードするＯＲＦ、初期化因子タンパク質をコードするＯＲＦ、若しくはキメラ抗原受容体タンパク質（ＣＡＲタンパク質）をコードするＯＲＦ又はそれらの組合せからなる群から選択される、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項１９】
ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦである、請求項１８に記載のプラスミドベクター。
【請求項２０】
癌抗原タンパク質をコードするＯＲＦが、癌抗原タンパク質Ｈ３Ｋ２７ＭをコードするＯＲＦ、癌抗原タンパク質ＰＳＣＡをコードするＯＲＦ、又は癌抗原タンパク質ＴＲＯＰ２をコードするＯＲＦから選択される、請求項１８に記載のプラスミドベクター。
【請求項２１】
初期化因子タンパク質をコードするＯＲＦが、初期化因子タンパク質ＯＳＣＫをコードするＯＲＦである、請求項１８に記載のプラスミドベクター。
【請求項２２】
キメラ抗原受容体タンパク質（ＣＡＲタンパク質）をコードするＯＲＦが、ＣＡＲタンパク質ＣＤ１９をコードするＯＲＦである、請求項１８に記載のプラスミドベクター。

【請求項２３】
３’スペーサー１が１５～２５ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項２４】
３’内部ホモロジーアームが１５～２５ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項２５】
５’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）が１００～２５０ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項２６】
５’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）が、シアノバクテリウム・アナバエナｔＲＮＡ前駆体グループＩイントロン遺伝子から得られる、請求項３又は２５に記載のプラスミドベクター。
【請求項２７】
３’スペーサー２が５～１５ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項２８】
３’外部ホモロジーアームが１５～３０ヌクレオチドの長さを有する、請求項３に記載のプラスミドベクター。
【請求項２９】
３’外部ホモロジーアームが１５～２５ヌクレオチドの長さを有する、請求項２８に記載のプラスミドベクター。
【請求項３０】
３’外部ホモロジーアームが２５～３０ヌクレオチドの長さを有する、請求項２８に記載のプラスミドベクター。
【請求項３１】
３’外部ホモロジーアームが配列番号４１の配列である、請求項２８～３０のいずれか１項に記載のプラスミドベクター。
【請求項３２】
請求項１～３１のいずれか１項に記載のプラスミドベクターから得られる、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項３３】
互いに連結し、以下の順序：
－３’エクソン
－配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）
－オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）
－５’エクソン
で配置されたエレメントを含むプラスミドベクターから得られた、オープンリーディングフレームコーディング環状ｍＲＮＡ（ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ）。
【請求項３４】
ＩＲＥＳが１９０～９００ヌクレオチドの長さを有する、請求項３３に記載のＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項３５】
ＩＲＥＳが、エコーウイルス３３型ＩＲＥＳ、エコーウイルス２０型ＩＲＥＳ、エコーウイルス２９型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＢ１型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＢ３型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＡ１２型ＩＲＥＳ、エンテロウイルス８０型ＩＲＥＳ、ダイズアブラムシウイルス１型ＩＲＥＳ、ハラスタビ・アルバウイルスＩＲＥＳ、若しくはペギウイルスＪ型ＩＲＥＳ又はそれらの組合せからなる群から選択される、請求項３３又は３４に記載のＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項３６】

ＩＲＥＳがコクサッキーウイルスＢ３型ＩＲＥＳである、請求項３５に記載のＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項３７】
ＩＲＥＳが、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５若しくは配列番号２６又はそれらの組合せから選択される、請求項３３又は３４に記載のＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項３８】
ＩＲＥＳが配列番号２１の配列である、請求項３７に記載の、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項３９】
ＯＲＦが、ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦ、癌抗原タンパク質をコードするＯＲＦ、初期化因子タンパク質をコードするＯＲＦ、若しくはキメラ抗原受容体タンパク質（ＣＡＲタンパク質）をコードするＯＲＦ又はそれらの組合せからなる群から選択される、請求項３３に記載のＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項４０】
ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦである、請求項３９に記載のＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項４１】
癌抗原タンパク質をコードするＯＲＦが、癌抗原タンパク質Ｈ３Ｋ２７ＭをコードするＯＲＦ、癌抗原タンパク質ＰＳＣＡをコードするＯＲＦ、又は癌抗原タンパク質ＴＲＯＰ２をコードするＯＲＦから選択される、請求項３９に記載のＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項４２】
初期化因子タンパク質をコードするＯＲＦが、初期化因子タンパク質ＯＳＣＫをコードするＯＲＦである、請求項３９に記載のＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【請求項４３】
キメラ抗原受容体タンパク質（ＣＡＲタンパク質）をコードするＯＲＦが、ＣＡＲタンパク質ＣＤ１９をコードするＯＲＦである、請求項３９に記載のＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、バイオテクノロジーに関し、より具体的には、タンパク質発現を増強するための、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、プラスミドベクター及び環状ｍＲＮＡに関する。
【背景技術】
【０００２】
遺伝子工学は、標的を絞った予防及び治療アプローチを開発するための有益なツールになっている。この技術は、生物の細胞中の遺伝子材料を使用して疾患病状に特異的なタンパク質合成を制御することを伴う。焦点となる一つの分野は、メッセンジャーリボ核酸（ｍＲＮＡ）であり、これは鋳型遺伝子のデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）に相補的な一本鎖分子である。ｍＲＮＡは、直鎖状配列に配置されたヌクレオチドで構成されている。タンパク質合成の間に、リボソームはｍＲＮＡに結合してヌクレオチド配列を読み取り、これは次いでタンパク質へと翻訳される。
医薬におけるｍＲＮＡの利点は重要である。短期間でｍＲＮＡをインビトロで合成することは比較的容易であり、生物に投与された場合に迅速な応答を活性化することができ、標的を絞った送達を可能にし、望まない副作用のリスクを低下させる。ｍＲＮＡは、短期間に研究室内で容易に合成することができ、生物に投与された場合に迅速な応答を活性化することができる。更に、ｍＲＮＡは、プラスミドベクターとは異なり、医療目的で応用

された場合に、生物のゲノムへの組み込みの懸念を全く引き起こさない。
医薬におけるｍＲＮＡ技術は多数の利点を提供するが、ｍＲＮＡは本質的に不安定であり、生体に投与された場合に細胞機構による分解を受けやすいという点に欠点を有する。結果として、ｍＲＮＡは、迅速な細胞応答の活性化における限定された期間の使用にのみ適している。これらの技術的な課題を克服するために、研究者たちは、ｍＲＮＡの活性を拡張してタンパク質発現効率及び安定性を増強する方法を探求している。
【０００３】
米国特許出願公開第２０２０００８０１０６号は、疾患治療の効率を増大させるよう開発された環状ＲＮＡを開示した。互いに連結されて以下の順序：３’グループＩイントロンフラグメントに連結された５’ホモロジーアーム、５’スペーサー、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、タンパク質コード領域、５’グループＩイントロンフラグメント、及び３’ホモロジーアームで配置された種々のエレメントを含む、環状ＲＮＡを構築するためのベクター。環状ＲＮＡは、真核細胞の内部でタンパク質へと翻訳され得るか、又は生物学的に活性であり得、トランスフェクションによって細胞に送達され得る。この開示によって、環状ＲＮＡが、細胞でより長期間にわたって、より高いタンパク質発現を生じさせ得、より高い治療効率につながることが示された。しかしながら、ＲＮＡ環状化及び開示される環状ＲＮＡのＩＲＥＳは、最適化されていない。したがって、開示される環状ＲＮＡは、より低いタンパク質発現をもたらす。更に、開示される環状ＲＮＡによって使用される種々のＩＲＥＳの発現は、マウスで試験されなかった。
【０００４】
欧州特許第２９９６６９７号は、真核細胞内で目的のタンパク質を効率的に翻訳する、高安定性環状ＲＮＡを開示し、それを治療に役立てた。環状ＲＮＡ分子が、それらの直鎖状ＲＮＡ分子よりもずっと長い半減期を有することが、確立されている。この文献は、細胞に送達された場合にエキソヌクレアーゼによる排出を減少させる、ＲＮＡ環状化によるＲＮＡ半減期及び安定性の増大を示唆した。この開示は、環状ＲＮＡ半減期がインビボでおよそ４０時間であり、６～８時間のみの直鎖状ｍＲＮＡ半減期よりも高いことを明らかにした。ここでも、異なるＩＲＥＳを使用した、開示される環状ＲＮＡの発現は、マウスで試験されなかった。
【０００５】
国際特許出願第２０２０２３７２２７号は、遺伝子治療又はワクチン等の疾患治療に適用し得る、生物における遺伝子発現を制御するための、高い安定性を有する環状ＲＮＡを開示した。この文献はまた、サリウイルスＡ　ＳＺ１、サリウイルスＡ　ＢＮ２、及びコクサッキーウイルスＢ３型（ＣＶＢ３）等のウイルス成分を使用した配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）修飾を開示した。サリウイルスＡ　ＳＺ１及びサリウイルスＡ　ＢＮ２等のウイルス成分でＩＲＥＳを修飾することによって、環状ＲＮＡに高い機能安定性が提供されることが見出された。しかしながら、この開示によれば、タンパク質発現レベルが経時的に減少するため、ＲＮＡ安定性は理想的ではない。
上記の開示によって示されるように、環状ＲＮＡの利点にもかかわらず、そのサイズ及び限られたＩＲＥＳ活性によって、インビボの効率的な翻訳が妨げられ得る。また、環状化は、更に改良もされ得る。
【０００６】
Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｊｏｕｒｎａｌ, ２０１４, ９(９), １１６４-１１７４は、融合タンパク質をコードするプラスミドベクターとＢｃｌ－ｘＬタンパク質をコードするプラスミドベクターとの、ＣＨＯ細胞へのコトランスフェクションによって、融合タンパク質発現が顕著に増大し、６日間より長く細胞安定性が供給されたことを開示した。しかしながら、このコトランスフェクションプロセスは、ＤＮＡプラスミドベクターを使用した。
したがって、本発明は、ＲＮＡ環状化を容易にするための補助ホモロジーアーム（ａｓｓｉｓｔｅｄ　ｈｏｍｏｌｏｇｙ　ａｒｍ）を有する小さいバックボーンを有する、オープンリーディングフレームコーディング環状ｍＲＮＡ（ｏｐｅｎ　ｒｅａｄｉｎｇ　ｆｒａｍｅ－ｃｏｄｉｎｇ　ｃｉｒｃｕｌａｒ　ｍＲＮＡ）（ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮ

Ａ）を作製するためのプラスミドベクターを開発するものである。配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）はまた、目的のタンパク質の翻訳を増強し、それによりタンパク質発現が向上するよう、開発された。本発明のプラスミドベクター及びＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡは、その最適化されたコンストラクト及び小さいサイズによって、以前の技術的な課題を克服し得、有意に高い翻訳効率及びインビボのタンパク質発現をもたらす。

【発明の概要】

【０００７】

本発明は、小さいバックボーン、効率的なオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）をコードする最適化されたホモロジーアームを有し、高度に効率的なタンパク質発現をもたらす、オープンリーディングフレームコーディング環状ｍＲＮＡ（ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ）を作製するためのプラスミドベクターに関する。配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）はまた、目的のタンパク質の翻訳を増強し、それによりインビボのタンパク質発現が向上するよう、開発された。本発明のプラスミドベクター及びＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡは、その最適化されたコンストラクト及び小さいサイズによって、以前の技術的な課題を克服し得、顕著に高い翻訳効率及びインビボのタンパク質発現をもたらす。医薬又は医薬調製物において適用される場合、本発明に記載される環状ｍＲＮＡは、投与の頻度及び／又は必要な用量を潜在的に減少させ得、望まない副作用を減少させ、患者が医薬を利用する機会を向上させる。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

【図１】本発明の環状ｍＲＮＡコンストラクトの例を示す図である。

【図２】種々の市販の送達系を使用した、環状ＧＦＰ　ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）でのトランスフェクションのおよそ４８時間後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞のフローサイトメトリーヒストグラムを示す図である。

【図３】種々の市販の送達系を使用した、環状ＧＦＰ　ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）でのトランスフェクションのおよそ４８時間後にＨＥＫ２９３Ｔ細胞で観察された蛍光強度を示す図である。

【図４】種々の市販の送達系を使用することによる、環状ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）でのトランスフェクションのおよそ２４時間後にＨＥＫ２９３Ｔ細胞の上清で観察されたルシフェラーゼ活性を示す図である。

【図５】種々の市販の送達系を使用することによる、環状ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）でのトランスフェクションのおよそ４８時間後にＨＥＫ２９３Ｔ細胞の上清で観察されたルシフェラーゼ活性を示す図である。

【図６】種々のタイプのＩＲＥＳを含む環状ＧＦＰ　ｍＲＮＡでのトランスフェクションのおよそ４８時間後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞のフローサイトメトリーヒストグラムを示す図である。

【図７】種々のタイプのＩＲＥＳを含む環状ＧＦＰ　ｍＲＮＡでのトランスフェクションのおよそ４８時間後の、陽性のＧＦＰを示すＨＥＫ２９３Ｔ細胞のパーセンテージを示す図である。

【図８】筋肉内（Ｉ．Ｍ．）及び静脈内（Ｉ．Ｖ．）注射による試料Ｂの送達系を介した環状ルシフェラーゼｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）の注射のおよそ２４又は４８時間後のマウス（ＢＡＬＢ／ｃ種）における発光画像を示す図である。

【図９】環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡでのトランスフェクションのおよそ４８時間後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞のフローサイトメトリーヒストグラムを示す図である。

【図１０】環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡでのトランスフェクションの後の、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞から得られた上清中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスのスパイクタンパク質の発現を検出するためのウエスタンブロット解析の結果を示す図である。

【図１１】酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）を使用して、対照マウスと比較した、

スパイクタンパク質を発現する環状ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）の注射のおよそ２週間後の、マウス血清中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスオミクロン種（Ｂ．１．１．５２９）のスパイクタンパク質に特異的な免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）発現の解析を示す図である。
【図１２】対照マウスと比較した、スパイクタンパク質を発現する環状ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）の注射のおよそ２週間後に中和抗体法を使用して測定した、マウス血清での、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスオミクロン種（Ｂ．１．１．５２９）の偽ウイルス粒子侵入の阻害能力を示す図である。
【図１３】免疫蛍光測定法を使用した、環状癌抗原タンパク質ｍＲＮＡ　Ｈ３Ｋ２７Ｍでのトランスフェクションのおよそ４８時間後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞の蛍光画像を示す図である。
【図１４】免疫蛍光測定法を使用した、環状癌抗原タンパク質ｍＲＮＡ　ＰＳＣＡでのトランスフェクションのおよそ４８時間後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞の蛍光画像を示す図である。
【図１５】免疫蛍光測定法を使用した、環状癌抗原タンパク質ｍＲＮＡ　ＴＲＯＰ２でのトランスフェクションのおよそ４８時間後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞の蛍光画像を示す図である。
【図１６】ＯＣＴ４タンパク質に特異的な抗体でのグラム染色による免疫蛍光測定法を使用した、環状初期化因子ｍＲＮＡ　ＯＳＣＫでのトランスフェクションのおよそ４８時間後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞の蛍光画像を示す図である。
【図１７】ＳＯＸ２タンパク質に特異的な抗体でのグラム染色による免疫蛍光測定法を使用した、環状初期化因子ｍＲＮＡ　ＯＳＣＫでのトランスフェクションのおよそ４８時間後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞の蛍光画像を示す図である。
【図１８】免疫蛍光測定法を使用した、環状ＣＡＲ　ｍＲＮＡ　ＣＤ１９でのトランスフェクションのおよそ４８時間後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞の蛍光画像を示す図である。
【図１９】アガロースゲル電気泳動を使用して、環状ＲＮＡ－ｅＨＡ－１と環状ＲＮＡ－ｅＨＡ－２との間で比較した、インビトロ転写（ＩＶＴ）、環状化生成物（ＩＣ）、及びＲＮアーゼＲで処理されたＩＣを示す図である。白色の矢印は、環状形態のＲＮＡを示す。
【図２０】ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において２つの異なる設計された外部ホモロジーアーム（ｅｘｔｅｒｎａｌ　ｈｏｍｏｌｏｇｙ　ａｒｍ）、環状Ｆｌｕｃ－ｅＨＡ－１－ＣＶＢ３と環状Ｆｌｕｃ－ｅＨＡ－２－ＣＶＢ３との間で比較した、ルシフェラーゼ活性を示す図である。独立ｔ検定で、統計的有意性を決定した。平均値±ＳＥＭ；ｎ＝２；*ｐ＜０．０５。
【図２１】オンラインツールＲＮＡｆｏｌｄを使用して予測されたＩＲＥＳ配列の二次構造を示す図である。ＣＶＢ３、ＥＣＨ２０、キメラ３（２０）３、及びキメラ２０（３）２０由来のＩＲＥＳの二次構造のみを本明細書に示す。
【図２２】異なるＩＲＥＳの間の、ｉｍＨＣ細胞におけるＧＦＰの平均蛍光強度（ＭＦＩ）及び平均蛍光強度の差（ΔＭＦＩ）を示す図である。独立ｔ検定で、統計的有意性を決定した。平均値±ＳＥＭ；ｎ＝３；*ｐ＜０．０５。
【図２３】ＢＨＫ－２１細胞における異なるＩＲＥＳの間の、ＢＨＫ－２１細胞におけるＧＦＰの平均蛍光強度（ＭＦＩ）及び平均蛍光強度の差（ΔＭＦＩ）を示す図である。
【図２４】ＢＡＬＢ／ｃマウスにおける、ＬＮＰに封入された環状Ｆｌｕｃ－ｅＨＡ－２－ＣＶＢ３又は環状Ｆｌｕｃ－ｅＨＡ－２－３（２０）３の筋肉内（Ｉ．Ｍ．）注射の（Ａ）６時間後及び（Ｂ）４８時間後に撮影された、インビボ生物発光画像を示す図である。陰性対照群にはＰＢＳが投与された。
【発明を実施するための形態】
【０００９】
本発明は、小さいバックボーン、最適化されたホモロジーアーム及びインビボでの高度に効率的なタンパク質発現のためのＩＲＥＳを有する、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ

に関する。本発明によれば、ＩＲＥＳは、目的のタンパク質の翻訳を増強し、そのためタンパク質発現が向上するよう、開発された。その結果、本発明のプラスミドベクター及びＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡは、その小さいサイズ及び最適化されたコンストラクトによって、以前の技術的な課題を克服し得、送達の容易さ、細胞での安定性、並びに有意に高い翻訳効率及びインビボのタンパク質発現をもたらす。そのため、本発明の環状ｍＲＮＡを医薬又は医薬調製物において適用する場合、これは、投与の頻度及び／又は必要な用量を減少させ得、望まない副作用を潜在的に減少させ、患者が医薬を利用する機会を増大させる。

【００１０】

当業者に理解されるように、本発明の下記の態様は、適宜必要に応じて、本明細書で開示される発明の好ましい任意選択の特徴の１つ若しくは複数又は全てを含み得、好ましくは含む。更に、当業者は、本開示で言及される特徴及び／又は要素は、本明細書で明らかに述べられなくても、本開示の範囲を逸脱することなく、他の特徴及び／又は要素によって変更し得ることを認識するであろう。例えば、本開示で言及されるＯＲＦの代わりに、他のタンパク質をコードするＯＲＦを使用して、適切な機能に相当するＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製し得た。したがって、本開示の範囲は、いかなる特定のタイプのＯＲＦにも限定されるべきではない。

【００１１】

定義

本発明は、ＸＭＬファイル形式で提供され、電子ファイリングシステムを介して提出される、配列表を含む。

本明細書で使用される技術用語又は科学用語は、他に述べられない限りは、当業者によって理解される定義を有する。

本明細書で言及される、器具、装置、方法、又は化学物質は、本発明で使用される器具、装置、方法、又は化学物質であると他に明らかに述べられない限りは、当業者によって一般に操作又は使用されるものをいう。

【００１２】

特許請求の範囲又は明細書における「含む」という用語との単数形又は複数形の名詞の使用は、「１つ」並びに「１つ又は複数」、「少なくとも１つ」、及び「１つ、又は１つより多く」と解釈されるべきである。

開示及び特許請求される全ての組成物及び／又はプロセスは、行われた実験、記載される実施例、又は本発明に示されるデータから有意に逸脱することなく、特許請求の範囲で特に言及されなくても、当業者によって、本発明に記載されるのと同じ有用性及び結果で同様の対象が得られる、あらゆるパラメータの作用、操作、修飾、又は変化を伴う本発明の態様を包含するよう意図される。したがって、当業者に明らかな小さな修飾又は変更を含む、本発明の置換又は同様の対象は、添付の特許請求の範囲によって定義されるような、本発明の範囲、精神、及び概念の範囲内であると考えられるべきである。

本明細書全体を通して、「約」という用語は、本明細書で提示されるあらゆる値が、計算誤差、装置若しくは方法の不一致、又は装置若しくは方法を実施する個々の操作者の間の差等の要素の多様性によって潜在的に変化又は逸脱し得ることを示すよう使用される。

【００１３】

第一の実施形態によれば、本発明は、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５若しくは配列番号２６又はそれらの組合せからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）に関する。

好ましい例示的な実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号２１に示されるヌクレオチド配列を含む。

第二の実施形態では、本発明は、互いに連結し、以下の順序：

－ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、

－５’スペーサー１、

－５’外部ホモロジーアーム、

－３’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）（ｐｅｒｍｕｔｅｄ　ｉｎｔｒｏｎ－ｅｘｏｎ）、
－５’内部ホモロジーアーム（ｉｎｔｅｒｎａｌ　ｈｏｍｏｌｏｇｙ　ａｒｍ）、
－５’スペーサー２、
－配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、
－オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）、
－３’スペーサー１、
－３’内部ホモロジーアーム、
－５’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）、
－３’スペーサー２、及び
－３’外部ホモロジーアーム
で配置されたエレメントを含む、オープンリーディングフレームコーディング環状ｍＲＮＡ（ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ）を作製するためのプラスミドベクターに関する。

【００１４】

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１５～２５ヌクレオチドの範囲の長さを有するＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含む。

本発明の例示的な実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターは、Ｔ７ウイルスＲＮＡポリメラーゼプロモーター、ＳＰ６ウイルスＲＮＡポリメラーゼプロモーター、又はＴ３ウイルスＲＮＡポリメラーゼからなる群から選択される。

本発明の好ましい例示的な実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターは、Ｔ７ウイルスＲＮＡポリメラーゼプロモーターである。

【００１５】

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、５～１５ヌクレオチドの範囲の長さを有する５’スペーサー１を含む。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１５～３０ヌクレオチドの範囲の長さを有する５’外部ホモロジーアームを含む。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１５～２０ヌクレオチドの範囲の長さを有する５’外部ホモロジーアームを含む。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、２０～３０ヌクレオチドの範囲の長さを有する５’外部ホモロジーアームを含む。

【００１６】

本発明の好ましい例示的な実施形態では、５’外部ホモロジーアームは、配列番号４の配列である。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１００～２５０ヌクレオチドの範囲の長さを有する３’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）を含む。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、シアノバクテリウム・アナバエナ（Ｃｙａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｎａｂａｅｎａ）ｔＲＮＡ前駆体グループＩイントロン遺伝子から得られた３’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）を含む。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１５～２５ヌクレオチドの範囲の長さを有する５’内部ホモロジーアームを含む。

【００１７】

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプ

ラスミドベクターは、５０～１００ヌクレオチドの範囲の長さを有する５’スペーサー２を含む。
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１９０～９００ヌクレオチドの長さを有するＩＲＥＳを含む。
本発明の例示的な実施形態では、ＩＲＥＳは、エコーウイルス３３型ＩＲＥＳ、エコーウイルス２０型ＩＲＥＳ、エコーウイルス２９型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＢ１型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＢ３型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＡ１２型ＩＲＥＳ、エンテロウイルス８０型ＩＲＥＳ、ダイズアブラムシ（Ａｐｈｉｓ ｇｌｙｃｉｎｅｓ）ウイルス１型ＩＲＥＳ、ハラスタビ・アルバ（ｈａｌａｓｔａｖｉ ａｒｖａ）ウイルスＩＲＥＳ、若しくはペギウイルスＪ型ＩＲＥＳ又はそれらの組合せからなる群から選択される。

【００１８】
本発明の好ましい例示的な実施形態では、ＩＲＥＳはコクサッキーウイルスＢ３型ＩＲＥＳである。
本発明の例示的な実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５若しくは配列番号２６又はそれらの組合せから選択される。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、ＩＲＥＳは配列番号２１の配列である。
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターにおいて、ＯＲＦは、ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦ、癌抗原タンパク質をコードするＯＲＦ、初期化因子タンパク質をコードするＯＲＦ、若しくはキメラ抗原受容体タンパク質（ＣＡＲタンパク質）をコードするＯＲＦ又はそれらの組合せからなる群から選択される。

【００１９】
本発明の好ましい例示的な実施形態では、ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦである。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、癌抗原タンパク質をコードするＯＲＦは、癌抗原タンパク質Ｈ３Ｋ２７Ｍをコードするオープンリーディングフレーム、癌抗原タンパク質ＰＳＣＡをコードするＯＲＦ、又は癌抗原タンパク質ＴＲＯＰ２をコードするＯＲＦである。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、初期化因子タンパク質をコードするＯＲＦは、初期化因子タンパク質ＯＳＣＫをコードするＯＲＦである。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、キメラ抗原受容体タンパク質（ＣＡＲタンパク質）をコードするＯＲＦは、ＣＡＲタンパク質ＣＤ１９をコードするＯＲＦである。

【００２０】
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１５～２５ヌクレオチドの範囲の長さを有する３’内部ホモロジーアームを含む。
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１００～１５０ヌクレオチドの範囲の長さを有する５’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）を含む。
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、シアノバクテリウム・アナバエナｔＲＮＡ前駆体グループＩイントロン遺伝子から得られる５’ＰＩＥ（順序を変えられたイントロン－エクソン）を含む。

【００２１】
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、５～１５ヌクレオチドの範囲の長さを有する３’スペーサー２を含む。
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１５～３０ヌクレオチドの範囲の長さを有する３’外部ホモロジーアームを含む。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、１５～２５ヌクレオチドの範囲の長さを有する３’外部ホモロジーアームを含む。
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、２５～３０ヌクレオチドの範囲の長さを有する３’外部ホモロジーアームを含む。
【００２２】
本発明の好ましい例示的な実施形態では、３’外部ホモロジーアームは配列番号３２の配列である。
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡは、本発明の上述の実施形態のいずれか１つのプラスミドベクターから得られる。
第三の実施形態によれば、本発明は、互いに連結し、以下の順序：
－３’エクソン
－配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）
－オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）
－５’エクソン
で配置されたエレメントを含むプラスミドベクターから得られた、オープンリーディングフレームコーディング環状ｍＲＮＡ（ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ）に関する。
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡは、１９０～９００ヌクレオチドの範囲の長さを有するＩＲＥＳを含む。
【００２３】
本発明の例示的な実施形態では、ＩＲＥＳは、エコーウイルス３３型ＩＲＥＳ、エコーウイルス２０型ＩＲＥＳ、エコーウイルス２９型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＢ１型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＢ３型ＩＲＥＳ、コクサッキーウイルスＡ１２型ＩＲＥＳ、エンテロウイルス８０型ＩＲＥＳ、ダイズアブラムシウイルス１型ＩＲＥＳ、ハラスタビ・アルバウイルスＩＲＥＳ、若しくはペギウイルスＪ型ＩＲＥＳ又はそれらの組合せからなる群から選択される。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、ＩＲＥＳはコクサッキーウイルスＢ３型ＩＲＥＳである。
本発明の例示的な実施形態では、ＩＲＥＳは、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５若しくは配列番号２６又はそれらの組合せから選択される。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、ＩＲＥＳは配列番号２１の配列である。
【００２４】
本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡのＯＲＦは、ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦ、癌抗原タンパク質をコードするＯＲＦ、初期化因子タンパク質をコードするＯＲＦ、若しくはキメラ抗原受容体タンパク質（ＣＡＲタンパク質）をコードするＯＲＦ又はそれらの組合せからなる群から選択される。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルススパイクタンパク質をコードするＯＲＦである。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、癌抗原タンパク質をコードするＯＲＦは、癌抗原タンパク質Ｈ３Ｋ２７Ｍをコードするオープンリーディングフレーム、癌抗原タンパク質ＰＳＣＡをコードするＯＲＦ、又は癌抗原タンパク質ＴＲＯＰ２をコードするＯＲＦである。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、初期化因子タンパク質をコードするＯＲＦは、初期化因子タンパク質ＯＳＣＫをコードするＯＲＦである。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、キメラ抗原受容体タンパク質（ＣＡＲタンパク質）をコードするＯＲＦは、ＣＡＲタンパク質ＣＤ１９をコードするＯＲＦである。
【００２５】
ヌクレオチド配列
本発明の例示的な実施形態では、Ｔ７プロモーターは、配列番号１のヌクレオチド配列

を含むＴ７プロモーターである。
本発明の例示的な実施形態では、５’スペーサー１は、配列番号２のヌクレオチド配列を含む５’スペーサー１である。
本発明の例示的な実施形態では、５’外部ホモロジーアームは、配列番号３又は配列番号４のヌクレオチド配列を含む５’外部ホモロジーアームである。
本発明の好ましい例示的な実施形態では、５’外部ホモロジーアームは、配列番号４のヌクレオチド配列である。
【００２６】
本発明の例示的な実施形態では、アナバエナ３’ＰＩＥ（イントロン－エクソン）は、配列番号５のヌクレオチド配列を含むアナバエナ３’ＰＩＥである。
本発明の例示的な実施形態では、５’内部ホモロジーアームは、配列番号６のヌクレオチド配列を含む５’内部ホモロジーアームである。
本発明の例示的な実施形態では、５’スペーサー２は、配列番号７のヌクレオチド配列を含む５’スペーサー２である。
本発明の例示的な実施形態では、本発明のＩＲＥＳは、表１に記載されるＩＲＥＳである（配列番号８～２６）。
【００２７】
【表１】
表1 IRES配列

配列番号	IRES
8	エコーウイルス33型
9	エコーウイルス29型
10	エコーウイルス20型
11	コクサッキーウイルスB1型
12	エンテロウイルス80型
13	コクサッキーウイルスA12型
14	コクサッキーウイルスB3型
15	ダイズアブラムシウイルス1型
16	ハラスタビ・アルバウイルス1型
17	ハラスタビ・アルバウイルス2型
18	ハラスタビ・アルバウイルス3型
19	ペギウイルスJ型
20	ハラスタビ・アルバウイルスと組み合わせたペギウイルスJ型
21	キメラ3(20)3
22	キメラ20(3)20
23	キメラ3(80)3
24	キメラ80(3)80
25	キメラ12(20)12
26	キメラ20(12)20

【００２８】
本発明の例示的な実施形態では、Ａｇｅ１制限酵素部位は、以下のヌクレオチド配列：
ＡＣＣＧＧＴ
を有するＡｇｅ１制限酵素部位である。
本発明の例示的な実施形態では、本発明のＯＲＦは、表２に記載されるＯＲＦである（配列番号２７～３５）。
【００２９】

【表２】

表2 ORF配列

配列番号	ORF
27	Pan-Hexapro-SPIKEスパイクタンパク質
28	Pan-VFLIP-SPIKEスパイクタンパク質
29	H3K27M
30	PSCA
31	TROP2
32	OSCK
33	CAR-CD19
34	ホタルルシフェラーゼ
35	緑色蛍光タンパク質

【００３０】

本発明の例示的な実施形態では、ＮｏｔＩ制限酵素部位は、以下のヌクレオチド配列：ＧＣＧＧＣＣＧＣ
を有するＮｏｔＩ制限酵素部位である。

本発明の例示的な実施形態では、３’スペーサー１は、配列番号３６のヌクレオチド配列を含む３’スペーサー１である。

本発明の例示的な実施形態では、３’内部ホモロジーアームは、配列番号３７のヌクレオチド配列を含む３’内部ホモロジーアームである。

本発明の例示的な実施形態では、アナバエナ５’ＰＩＥ（イントロン－エクソン）は、配列番号３８のヌクレオチド配列を含むアナバエナ５’ＰＩＥである。

本発明の例示的な実施形態では、３’スペーサー２は、配列番号３９のヌクレオチド配列を含む３’スペーサー２である。

【００３１】

本発明の例示的な実施形態では、３’外部ホモロジーアームは、配列番号４０又は配列番号４１のヌクレオチド配列を含む３’外部ホモロジーアームである。

本発明の好ましい例示的な実施形態では、３’外部ホモロジーアームは、配列番号４１のヌクレオチド配列である。

【００３２】

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターは、配列番号４２のヌクレオチド配列を含む。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターにおいて、ＯＲＦは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルススパイクタンパク質（Ｐａｎ－Ｈｅｘａｐｒｏ－ＳＰＩＫＥ）をコードするＯＲＦであり、これは配列番号４３のヌクレオチド配列を含む全長である。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターにおいて、ＯＲＦは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルススパイクタンパク質（Ｐａｎ－ＶＦＬＩＰ－ＳＰＩＫＥ）をコードするＯＲＦであり、これは配列番号４４のヌクレオチド配列を含む全長である。

【００３３】

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターにおいて、ＯＲＦは、癌抗原タンパク質Ｈ３Ｋ２７Ｍをコードするオープンリーディングフレームであり、これは配列番号４５のヌクレオチド配列を含む全長である。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターにおいて、ＯＲＦは、配列番号４６のヌクレオチド配列を含む、癌抗原タンパク質ＰＳＣＡをコードするＯＲＦである。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターにおいて、ＯＲＦは、配列番号４７のヌクレオチド配列を含む、癌抗原タンパク質ＴＲＯＰ２をコードするＯＲＦである。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターにおいて、ＯＲＦは、配列番号４８のヌクレオチド配列を含む、初期化因子タンパク質ＯＳＣＫをコードするＯＲＦである。

本発明の例示的な実施形態では、ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡを作製するためのプラスミドベクターにおいて、ＯＲＦは、配列番号４９のヌクレオチド配列を含む、キメラ抗原受容体タンパク質ＣＤ１９をコードするＯＲＦである。

【００３４】

本発明によれば、オープンリーディングフレームコーディング環状ｍＲＮＡ（ＯＲＦコーディング環状ｍＲＮＡ）は、リボソーム結合の促進及び目的のタンパク質の翻訳の活性化のために、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）で開発された。これは、直鎖状ｍＲＮＡと比較して、少なくとも２～１０倍のタンパク質発現の向上をもたらす。更に、これは、およそ１，１００～１，６００ヌクレオチドの、比較的短いバックボーンを有する。

本発明をよりよく理解するために、本発明の環状ｍＲＮＡの種々の実施例を提示する。これらの実施例は、本発明の実施形態を説明するために提供されるものであり、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。本発明の範囲は、特許請求の範囲、及び本開示に由来するそれらの同等物によって定義される。

【実施例】

【００３５】

本明細書で、以下で使用される試料についての略語のリスト

〇「試料Ａ」は、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（商標）送達系をいう。

〇「試料Ａ／ｃｉｒｃＧＦＰ」は、本発明の環状ＧＦＰ ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３ ＩＲＥＳ）を搭載したＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（商標）送達系をいう。

〇「試料Ａ／ｃｉｒｃＦｌｕｃ」は、本発明の環状Ｆｌｕｃ ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３ ＩＲＥＳ）を搭載したＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（商標）送達系をいう。

〇「試料Ｂ」は、International Journal of Pharmaceutics, 2021, 601, 120586の方法によって調製された脂質ナノ粒子製剤送達系をいう。

〇「試料Ｂ／ｃｉｒｃＧＦＰ」は、本発明の環状ＧＦＰ ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３ ＩＲＥＳ）を搭載した脂質ナノ粒子製剤送達系をいう。

〇「試料Ｂ／ｃｉｒｃＦｌｕｃ」は、本発明の環状Ｆｌｕｃ ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３ ＩＲＥＳ）を搭載した脂質ナノ粒子製剤送達系をいう。

〇「試料Ｂ／ｐＣＡＧ－Ｆｌｕｃ」は、陽性対照（ｐＣＡＧ－Ｆｌｕｃ ＤＮＡ）を搭載した脂質ナノ粒子製剤送達系をいう。

〇「試料Ｃ」は、ＧｅｎＶｏｙ Ｉｏｎｉｚａｂｌｅ Ｌｉｐｉｄ Ｍｉｘ（ＧｅｎＶｏｙ－ＩＬＭ（商標））送達系をいう。

〇「試料Ｃ／ｃｉｒｃＧＦＰ」は、本発明の環状ＧＦＰ ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３ ＩＲＥＳ）を搭載した、ＧｅｎＶｏｙ Ｉｏｎｉｚａｂｌｅ Ｌｉｐｉｄ Ｍｉｘ（ＧｅｎＶｏｙ－ＩＬＭ（商標））送達系をいう。

〇「試料Ｃ１」は、４：１のイオン化脂質の窒素対核酸のリン酸塩の間の比及び約１２ｍｌ／分の流速で製剤化されたＧｅｎＶｏｙ Ｉｏｎｉｚａｂｌｅ Ｌｉｐｉｄ Ｍｉｘ（ＧｅｎＶｏｙ－ＩＬＭ（商標））送達系をいう。

〇「試料Ｃ１／ｃｉｒｃＧＦＰ」は、本発明の環状ＧＦＰ ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３ ＩＲＥＳ）を搭載したＧｅｎＶｏｙ Ｉｏｎｉｚａｂｌｅ Ｌｉｐｉｄ Ｍｉｘ（ＧｅｎＶｏｙ－ＩＬＭ（商標））送達系をいう。

〇「試料Ｃ２」は、６：１のイオン化脂質の窒素対核酸のリン酸塩の間の比及び約６ｍｌ

／分の流速で製剤化されたＧｅｎＶｏｙ　Ｉｏｎｉｚａｂｌｅ　Ｌｉｐｉｄ　Ｍｉｘ（ＧｅｎＶｏｙ－ＩＬＭ（商標））送達系をいう。
〇「試料Ｃ２／ｃｉｒｃＧＦＰ」は、本発明の環状ＧＦＰ　ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）を搭載したＧｅｎＶｏｙ　Ｉｏｎｉｚａｂｌｅ　Ｌｉｐｉｄ　Ｍｉｘ（ＧｅｎＶｏｙ－ＩＬＭ（商標））送達系をいう。
〇「試料Ｄ」は、市販の送達系Ｉｎｖｉｖｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）をいう。
〇「試料Ｄ／ｃｉｒｃＦｌｕｃ」は、本発明の環状Ｆｌｕｃ　ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）を搭載した市販の送達系Ｉｎｖｉｖｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）をいう。
〇「試料Ｅ」は、ＬＰ３０００送達系をいう。
〇「試料Ｅ／ｐＣＡＧ－Ｆｌｕｃ」は、陽性対照（ｐＣＡＧ－Ｆｌｕｃ　ＤＮＡ）を搭載したＬＰ３０００送達系をいう。

【００３６】

（実施例１）

環状ｍＲＮＡの調製

ＯＲＦを含むＤＮＡ鋳型及び環状ＲＮＡエレメントを使用したＨｉＳｃｒｉｂｅ（商標）Ｔ７　Ｈｉｇｈ　Ｙｉｅｌｄ　ＲＮＡ合成キットによって、インビトロ転写反応を行った。反応をおよそ３７℃で約２時間インキュベートし、その後ＤＮアーゼバッファーと共にデオキシリボヌクレアーゼ（ＤＮアーゼ）を加えることによってＤＮＡ鋳型を除去した。次いで、フェノール／クロロホルム抽出及びアルコール沈殿を使用して、合成されたＲＮＡを精製し、得られたＲＮＡ沈殿を超純水に溶解させた。分光光度計を使用してＲＮＡ濃度を測定し、アガロースゲル電気泳動を使用して、ＲＮＡのおおよそのサイズを決定した。

【００３７】

ＲＮＡ環状化のために、環状ＲＮＡエレメントのヌクレオチド配列を含むＲＮＡ溶液をまずおよそ６５℃で約５分間加熱した。その後、それらをすぐに氷上に移し、約３分間冷却した。得られたＲＮＡ溶液をグアノシン－５’－三リン酸（ＧＴＰ）、及びMg^{2+}イオンを含むバッファー（例えば、Ｔ４　ＲＮＡリガーゼ反応バッファー、ＮＥＢ）と混合し、およそ５５℃で約１５分間インキュベートした。その後、環状化生成物をアルコール沈殿によって精製した後に、ＲＮＡ沈殿物を超純水に溶解させた。分光光度計を使用して環状ＲＮＡの濃度を測定し、アガロースゲル電気泳動を使用して、環状ＲＮＡのおおよそのサイズを決定した。

【００３８】

（実施例２）

種々の送達系を使用した、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞への環状ｍＲＮＡトランスフェクションの効率の研究

種々の市販の送達系を使用して、試料を調製した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を伴うおよそ１マイクログラム（μｇ）の環状ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）（環状ＧＦＰ　ｍＲＮＡ）でトランスフェクトした。

【００３９】

調製の詳細は以下の通りである：

１．試料Ａ／ｃｉｒｃＧＦＰ

Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（商標）培地で試料Ａ試薬を希釈し、室温で約１０分間インキュベートした。次いで、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（商標）培地中の、希釈した環状ＧＦＰ　ｍＲＮＡを、調製された試料Ａと混合し、室温で約５分間インキュベートして、試料Ａ／ｃｉｒｃＧＦＰを得た。

２．試料Ｂ／ｃｉｒｃＧＦＰ

およそ６：１のイオン化脂質の窒素対核酸のリン酸塩の間の比（Ｎ：Ｐ）及び約６ｍｌ／分の流速でＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（登録商標）Ｂｅｎｃｈｔｏｐ（商標）を使用して、環状ＧＦＰ　ｍＲＮＡを試料Ｂと混合した。次いで、調製された溶液をリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で透析して、試料Ｂ／ｃｉｒｃＧＦＰを得た。

３．試料Ｃ／ｃｉｒｃＧＦＰ
種々のイオン化脂質の窒素対核酸のリン酸塩の間の比（Ｎ：Ｐ）及び種々の流速でＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（登録商標）Ｂｅｎｃｈｔｏｐ（商標）を使用して、環状ＧＦＰｍＲＮＡを試料Ｃと混合した。次いで、調製された溶液をリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で透析して、試料Ｃ１／ｃｉｒｃＧＦＰ及び試料Ｃ２／ｃｉｒｃＧＦＰを得た。

【００４０】
４８時間のトランスフェクションの後、フローサイトメトリーを使用して、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞のトランスフェクション効率及び平均蛍光強度（ＭＦＩ）を解析した。
トランスフェクション効率及び平均蛍光強度の解析から、他の試料と比較して、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞への試料Ａ／ｃｉｒｃＧＦＰトランスフェクションが最も良い効率及び最も高いＧＦＰの発現を生じたことが示された。試料Ａ／ｃｉｒｃＧＦＰから得られたトランスフェクション効率は、最高で約９２．３％であった。また、試料Ａ／ｃｉｒｃＧＦＰをトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞はまた、図２及び３に示されるように、他の試料と比較して、最高で約２５０，０００ＭＦＩの平均蛍光強度を生じた。

【００４１】
（実施例３）
ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における環状ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究
種々の市販の送達系（試料Ａ、及びＤ）を使用して、約１μｇのルシフェラーゼを発現する環状ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）（環状ルシフェラーゼｍＲＮＡ）で、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をトランスフェクトした。試料Ａ／ｃｉｒｃＦｌｕｃと同様に、試料Ｄ／ｃｉｒｃＦｌｕｃを調製した。およそ２４時間及び４８時間のトランスフェクションの後、トランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞を溶解させ、溶解した細胞を解析し、ルシフェラーゼアッセイを使用してルシフェラーゼ活性を測定した。
ルシフェラーゼ活性の解析から、試料Ｂ／ｐＣＡＧ－Ｆｌｕｃ及び試料Ｅ／ｐＣＡＧ－Ｆｌｕｃであるトランスフェクトされた陽性対照と比較して、試料Ａ／ｃｉｒｃＦｌｕｃ、及び試料Ｄ／ｃｉｒｃＦｌｕｃがより高いルシフェラーゼ発現を生じたことが示された。試料Ａと同様に、試料Ｅを調製した。試料Ａ／ｃｉｒｃＦｌｕｃ及び試料Ｄ／ｃｉｒｃＦｌｕｃは、図４及び図５にそれぞれ示されるように、約２４時間及び約４８時間で、約１０，０００，０００～１００，０００，０００ＲＬＵ（相対発光量）の範囲及び約１，０００，０００～１００，０００，０００ＲＬＵの範囲のルシフェラーゼ発現を生じた。また、トランスフェクションの後、ルシフェラーゼ活性の解析から、図４及び５に示されるように、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において最高で４８時間、試料Ａ／ｃｉｒｃＦｌｕｃ及び試料Ｄ／ｃｉｒｃＦｌｕｃは安定なままであり、２４時間及び４８時間の時点でルシフェラーゼ活性に有意な差がなかったことも示された。

【００４２】
（実施例４）
ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における、種々の種類のＩＲＥＳを有する環状ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究
ＩＲＥＳ配列のそれぞれ、即ちコクサッキーウイルスＢ３型ＩＲＥＳ（ＣＶＢ３）（配列番号１４）、ダイズアブラムシウイルス１型ＩＲＥＳ（Ａ５Ｉ）（配列番号１５）、ハラスタビ・アルバウイルスＩＲＥＳ（Ｈ５Ｉ、ＨＣＩ、ＨＩＩ）（それぞれ配列番号１６、１７、１８）、ペギウイルスＪ型ＩＲＥＳ（Ｐｅｇ）（配列番号１９）、及びペギウイルスＪ型とハラスタビ・アルバウイルスＩＲＥＳとの組合せ（ＣＰＨ）（配列番号２０）を、環状ＧＦＰベクターにクローニングした。これらの環状ＧＦＰベクターを使用して、環状ｍＲＮＡを作製した。その後、試料Ａを送達系として使用して、約２μｇの環状ｍＲＮＡをＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした。およそ４８時間でのトランスフェクションの後、フローサイトメトリーを使用してＨＥＫ２９３Ｔ細胞を解析した。
ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における種々のＩＲＥＳを有する環状ｍＲＮＡのＧＦＰ発現及び安定性の解析から、ＣＶＢ３　ＩＲＥＳを有する環状ｍＲＮＡが、他のＩＲＥＳを有する環状ｍＲＮＡでトランスフェクトされた細胞と比較して、最高で約８９％の、陽性結果を有

する最も高い発現を生じたことが示された。また、かかるフローサイトメーターの結果から、図６及び７に示されるように、ＣＶＢ３　ＩＲＥＳを有する環状ｍＲＮＡはまた、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において約４８時間安定であったことも示された。

【００４３】

（実施例５）

動物における環状ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究

約１μｇ及び約１０μｇの用量で、筋肉内（Ｉ．Ｍ．）及び静脈内（Ｉ．Ｖ．）経路でマウス（ＢＡＬＢ／ｃ種、およそ７週齢、雌）に試料Ｂ／ｃｉｒｃＦｌｕｃを投与した。注射後およそ２４時間及び４８時間で、マウスを麻酔し、ＩＶＩＳ（登録商標）スペクトラムインビボイメージングシステムを使用して、それらの蛍光値を測定した。

発光画像の解析から、同じ条件の陽性対照（試料Ｂ／ｐＣＡＧ－Ｆｌｕｃ）と比較して、注射経路（筋肉内又は静脈内注射）又は用量（約１μｇ又は約１０μｇ）にかかわらず、マウスにおいて約４８時間、試料Ｂ／ｃｉｒｃＦｌｕｃが最も高い発現及び長い安定性を有することが示された（図８）。

【００４４】

（実施例６）

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究

およそ１μｇの用量で、２種の形態：Ｐａｎ－Ｈｅｘａｐｒｏ－ＳＰＩＫＥ（ＨｅｘａＰｒｏ－ＶＩ）及びＰａｎ－ＶＦＬＩＰ－ＳＰＩＫＥ（ＶＦＬＩＰ－ＶＩ）でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現する環状ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）で、ヒト胎児腎２９３Ｔ（ＨＥＫ２９３Ｔ）細胞をトランスフェクトした。陽性対照は、約１μｇのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ＤＮＡ（ｐＣＭＶ３－Ｓ　ＤＮＡ）であった。

およそ４８時間でのトランスフェクションの後、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（２０１９－ｎＣｏＶ）スパイクＲＢＤ抗体（ウサギＰＡｂ、抗原アフィニティー精製済み（４０５９２－Ｔ６２、ＳｉｎｏＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ））及びヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）高度交差吸着処理済み二次抗体（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８（Ａ１１０３４、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））で染色した。次いで、フローサイトメトリーを使用して、発現の効率を解析した。

【００４５】

フローサイトメトリーの解析から、陽性対照（ｐＣＭＶ３－Ｓ　ＤＮＡ）と比較して、環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）が、Ｐａｎ－Ｈｅｘａｐｒｏ－ＳＰＩＫＥ及びＰａｎ－ＶＦＬＩＰ－ＳＰＩＫＥ形態の両方で、スパイクタンパク質の高い発現を生じたことが示された（図９）。

また、Ｐａｎ－Ｈｅｘａｐｒｏ－ＳＰＩＫＥ（ＨｅｘａＰｒｏ－ＶＩ）及びＰａｎ－ＶＦＬＩＰ－ＳＰＩＫＥ（ＶＦＬＩＰ－ＶＩ）である環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）で、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をトランスフェクトした。環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡを溶解させ、溶解した細胞をウエスタンブロットによって解析して、上清中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の発現を決定した。細胞をＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＲＢＤ抗体（ウサギＰＡｂ）、（アフィニティー精製済み（４０５９２－Ｔ６２、ＳｉｎｏＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ））及びロバ抗ウサギＩｇＧ－ＨＲＰ（ｓｃ－２０７７、ＳＡＮＴＡ　ＣＲＵＺ　ＢＩＯＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ，ＩＮＣ）で染色した。内部対照タンパク質はβ－アクチンタンパク質であった。

【００４６】

ウエスタンブロットから、図１０に示されるように、陽性対照（ｐＣＭＶ３－Ｓ　ＤＮＡ）と比較して、環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）のＰａｎ－Ｈｅｘａｐｒｏ－ＳＰＩＫＥ及びＰａｎ－ＶＦＬＩＰ－ＳＰＩＫＥ形態の両方がスパイクタンパク質の高い発現を生じたことが見出された。

【００４７】

（実施例７）
実験動物における環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究
試料Ｂを使用して、マウス（ＢＡＬＢ／ｃ種、およそ７週齢、雌）に、およそ５μｇの、Ｐａｎ－Ｈｅｘａｐｒｏ－ＳＰＩＫＥ（ＨｅｘａＰｒｏ－ＶＩ）及びＰａｎ－ＶＦＬＩＰ－ＳＰＩＫＥ（ＶＦＬＩＰ－ＶＩ）のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現する環状ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）を注射した。
投与経路は、２回の筋肉内（Ｉ．Ｍ．）注射を含み、２回目の投与は１回目の３週間後に投与された。２回目の注射の２週間後に、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）注射を受けたマウスの対照群と比較して、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）を使用してＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質オミクロンバリアント（Ｂ．１．１．５２９）に特異的な免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）の発現レベルを決定することによって、マウスの血清試料を解析した。
【００４８】
ＥＬＩＳＡの結果から、マウスの対照群と比較して、両方の形態の環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）、Ｐａｎ－Ｈｅｘａｐｒｏ－ＳＰＩＫＥ（ＨｅｘａＰｒｏ－ＶＩ）及びＰａｎ－ＶＦＬＩＰ－ＳＰＩＫＥ（ＶＦＬＩＰ－ＶＩ）が、マウス血清中でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質オミクロン種（Ｂ．１．１．５２９）に特異的なＩｇＧの発現を誘発することができたことが示された（図１１に示されるように）。
また、中和抗体法を使用して、両方の形態の環状ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ｍＲＮＡ、Ｐａｎ－Ｈｅｘａｐｒｏ－ＳＰＩＫＥ（ＨｅｘａＰｒｏ－ＶＩ）及びＰａｎ－ＶＦＬＩＰ－ＳＰＩＫＥ（ＶＦＬＩＰ－ＶＩ）を受けたマウスから得られた血清試料を調べて、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２偽ウイルススパイクタンパク質オミクロン種（Ｂ．１．１．５２９）に特異的な抗体の力価を決定した。この解析を行って、結果を、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）の注射を受けたマウスの対照群から得られたものと比較した。
【００４９】
中和抗体法の解析から、マウスの対照群と比較して、Ｐａｎ－ＶＦＬＩＰ－ＳＰＩＫＥ（ＶＦＬＩＰ－ＶＩ）スパイクタンパク質を発現する環状ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）の注射を受けたマウスから得られた血清がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２偽ウイルススパイクタンパク質オミクロン種（Ｂ．１．１．５２９）に特異的な抗体の産生を示したことが明らかになった（図１２で説明されるように）。
【００５０】
（実施例８）
ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における環状癌抗原タンパク質ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究
およそ２μｇの、Ｈ３Ｋ２７Ｍ、ＰＳＣＡ、又はＴＲＯＰ２を含む環状癌抗原タンパク質ｍＲＮＡで、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をトランスフェクトした。
およそ４８時間でのトランスフェクションの後、免疫蛍光測定法を使用して、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をタンパク質発現について解析した。細胞を、組換え抗ヒストンＨ３（変異Ｋ２７Ｍ）抗体（［ＥＰＲ１８３４０］－ＣｈＩＰグレード（ａｂ１９０６３１））及びヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）高度交差吸着処理済み二次抗体（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５９４（Ａ－１１０３７、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ））での染色に供して、Ｈ３Ｋ２７Ｍタンパク質発現を検出した。抗ＰＳＣＡ抗体（ウサギポリクローナル（２０１６８４－Ｔ３２、ＳｉｎｏＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ））及びヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）高度交差吸着処理済み二次抗体（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５９４（Ａ－１１０３７、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ））を使用して、ＰＳＣＡタンパク質発現について染色した。更に、組換え抗ＴＲＯＰ２抗体（ＡＰＣ）（ウサギモノクローナル（１０４２８－Ｒ００１－Ａ、ＳｉｎｏＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ））を使用して、ＴＲＯＰ２タンパク質発現について染色した。
免疫蛍光測定法の解析から、その形態の３種全て（即ち、Ｈ３Ｋ２７Ｍ、ＰＳＣＡ、及

びＴＲＯＰ２）において環状癌抗原タンパク質ｍＲＮＡが、対応する癌抗原タンパク質の発現につながったことが示された。これは、非トランスフェクト細胞における癌抗原タンパク質の発現に匹敵する、細胞で観察される赤色の染色から明らかであった（図１３～１５に示されるように）。

【００５１】

（実施例９）

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における環状初期化因子ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究

およそ２μｇの環状初期化因子ｍＲＮＡ　ＯＳＣＫで、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をトランスフェクトした。

およそ４８時間でのトランスフェクションの後、免疫蛍光測定法を使用して、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をタンパク質発現について解析した。細胞を、抗ｏｃｔ－３／４抗体（（Ｃ－１０）（ｓｃ－５２７９、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ））及びヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）高度交差吸着処理済み二次抗体（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８（Ａ－１１２９０、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ））で染色して、ＯＣＴ４タンパク質を検出した。Ｓｏｘ２（Ｄ６Ｄ９）ＸＰ（登録商標）ウサギｍＡｂ（３５７９、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）及びヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）高度交差吸着処理済み二次抗体（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８（Ａ－１１２９０、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ））を使用して、ＳＯＸ２タンパク質発現について染色した。

免疫蛍光測定法の解析から、環状初期化因子ｍＲＮＡ　ＯＳＣＫが、初期化因子タンパク質の発現につながったことが示された。これは、非トランスフェクト細胞における癌抗原タンパク質の発現に匹敵する、細胞で観察される緑色の染色から明らかであった（図１６～１７に示されるように）。

【００５２】

（実施例１０）

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における環状キメラ抗原受容体ｍＲＮＡ（環状ＣＡＲ　ｍＲＮＡ）の発現及び安定性の研究

およそ２μｇの、キメラ抗原受容体を発現する環状ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）（環状ＣＡＲ　ｍＲＮＡ）ＣＤ１９で、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をトランスフェクトした。

およそ４８時間のトランスフェクションの後、免疫蛍光測定法を使用して、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をタンパク質発現について解析した。細胞を、ＣＤ３－ゼータポリクローナル抗体（ＰＡ５－９８３０４、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）及びヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）高度交差吸着処理済み二次抗体（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８（Ａ－１１２９０、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ））での染色に供して、ＣＤ１９タンパク質を検出した。

免疫蛍光測定法の解析から、環状ＣＡＲ　ｍＲＮＡ（ＣＶＢ３　ＩＲＥＳ）ＣＤ１９が、キメラ抗原受容体タンパク質の発現につながったことが示された。これは、非トランスフェクト細胞におけるキメラ抗原受容体タンパク質の発現に匹敵する、細胞で観察される赤色の染色から明らかであった（図１８に示されるように）。

【００５３】

（実施例１１）

環状ＲＮＡ調製

種々のタイプのＩＲＥＳを使用して環状ＲＮＡを更に調製するために、環状リボ核酸のための領域を含むよう、ＤＮＡ鋳型を設計した。ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を行って、インビトロＲＮＡ生成のためのＤＮＡ前駆体を得た。全ての一本鎖ＲＮＡは、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ（ＮＥＢ）のＨｉＳｃｒｉｂｅ（商標）Ｔ７　Ｈｉｇｈ Ｙｉｅｌｄ　ＲＮＡ合成キットを使用して合成した。最終的な１Ｘ　ＩＶＴ反応バッファー、１０ｍＭ　ＮＴＰ（ＡＴＰ、ＵＴＰ、ＣＴＰ、及びＧＴＰ）、５００ｎｇのＤＮＡ前駆体、ＲＮアーゼ阻害剤、及びＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ混合物で、１０μｌの反応混合物を調製した。次いで、反応混合物をおよそ３７℃でおよそ２時間インキュベートした。その後、ＤＮアーゼＩの添加によってＤＮＡ前駆体を除去し、混合物を約３７℃でおよそ１５分間インキュベートした。Ｍｏｎａｒｃｈ　ＲＮＡカラムキット（ＮＥＢ）を使用し

て、得られたＲＮＡを精製した。最後に、ＲＮＡゲル電気泳動を行って、ＲＮＡ完全性を確かめた。

【００５４】

ＲＮＡを環状化するために、５０μｇの、インビトロ転写（ＩＶＴ）反応由来の直鎖状ＲＮＡを、約６５℃で約５分間加熱した。その後、これをすぐに氷上に移し、約１分間冷却した。次に、得られたＲＮＡを、１Ｘ　Ｔ７　ＲＮＡリガーゼバッファー（ＮＥＢ）中の２ｍＭ　ＧＴＰ及びMg^{2+}を含む反応に加え、約５５℃で約１５分間環状化した。溶液を氷上に移すことによって、反応をすぐに停止させた。その後、Ｍｏｎａｒｃｈ　ＲＮＡカラムキット（ＮＥＢ）を使用して、環状化生成物（ＩＣ）を精製し、アガロースゲル電気泳動によって、環状ＲＮＡのおおよそのサイズを決定した。得られた環状化ＩＶＴ生成物をＩＣと呼ぶ。

ＩＣ生成物からの、得られたＲＮＡの種を確かめた。簡潔に述べると、試料を、直鎖状ＲＮＡを特異的に消化するエキソヌクレアーゼＲＮアーゼＲで、約３７℃で約２時間処理した。その後、Ｍｏｎａｒｃｈ　ＲＮＡカラムキット（ＮＥＢ）を使用して、反応全体を精製した。アガロースゲル電気泳動を使用して、環状ＲＮＡのおおよそのサイズを決定した。

図１９に示されるように、ＲＮアーゼＲでの処理後に得られた環状ＲＮＡを表す環状ＲＮＡ－ｅＨＡ－１及びｅＨＡ－２バンドが、ＩＣ及びＲＮアーゼＲレーンに見られた。ホモロジーアームｅＨＡ－１二本鎖よりも高い自由エネルギーを有するように、ホモロジーアームｅＨＡ－２二本鎖を設計する。

【００５５】

（実施例１２）

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における環状ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、約５０，０００個の細胞／cm^2の密度でプレーティングし、５％CO_2中、約３７℃でインキュベートした。１０％熱不活性化ウシ胎仔血清（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）高グルコース（Ｃｙｔｉｖａ）中の２４時間の培養の後、細胞はＲＮＡトランスフェクションの準備ができていた。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、ホタルルシフェラーゼ（Ｆｌｕｃ）を発現する種々の設計の５’外部ホモロジーアーム（ｅＨＡ）（ｅＨＡ－１又はｅＨＡ－２）を有する環状ＲＮＡを細胞に加えた。細胞を、１Ｘ　ＰＢＳで１回洗浄し、トランスフェクションの４８時間後に収集した。細胞を計数し、１反応あたり５００，０００個の細胞になるよう計算した。細胞溶解を行うために、１Ｘ培養細胞溶解剤（ｃｅｌｌ　ｃｕｌｔｕｒｅ　ｌｙｓｉｓ　ｒｅａｇｅｎｔ）を導入した。ルシフェラーゼアッセイ試薬をルミノメーターチューブに加えた後、ルシフェラーゼアッセイ試薬対細胞溶解物の、５：１の体積比で、細胞溶解物を加えた。次いで、ルミノメーターを使用して、ルシフェラーゼ活性をモニタリングした。

【００５６】

２種の異なる設計されたコンストラクトの間のルシフェラーゼ活性の解析から、ｅＨＡ－２を有する環状ルシフェラーゼｍＲＮＡが、ｅＨＡ－１コンストラクトよりも高いルシフェラーゼ活性を発現したことが示された。トランスフェクションの２４時間後に、環状ルシフェラーゼｍＲＮＡは、最高で約５，０００～７，０００ＲＬＵ（相対発光量）のルシフェラーゼ発現を生じた（図２０を参照のこと）。ゲル電気泳動の結果（図１９）及びルシフェラーゼ活性測定（図２０）はともに、環状ＲＮＡ－ｅＨＡ－２コンストラクトが環状ＲＮＡ－ｅＨＡ－１コンストラクトよりも高い環状化効率及びルシフェラーゼ活性を有したことを示した。これらの知見に基づいて、外部ホモロジーアームのｅＨＡ－２設計を使用して、環状ＲＮＡを構築し、ＣＶＢ３　ＩＲＥＳを、天然配列又はキメラ配列を含む、他のタイプのＩＲＥＳで置換した。

【００５７】

（実施例１３）

ｉｍＨＣ及びＢＨＫ－２１細胞における、種々の種類のＩＲＥＳを有する環状ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究

ドメインＩＶ置換を使用して、キメラ配列を操作した。例えば、ＣＶＢ３　ＩＲＥＳのドメインＩＶがＥＣＨ２０　ＩＲＥＳのもので置換された場合、得られたキメラＩＲＥＳは、３（２０）３と呼ばれる（図２１）。キメラＩＲＥＳ　３（２０）３を使用して操作されたＣｉｒｃＲＮＡ－ｅＨＡ－２は、適切な場合、図中で３（２０）３と呼ばれる。間葉系幹細胞由来の肝細胞様細胞（ｉｍＨＣ）又はベビーハムスター腎臓線維芽（ＢＨＫ－２１）細胞を、およそ５０，０００個の細胞／ｃｍ^{2}の密度でプレーティングし、５％CO_2中、約３７℃でインキュベートした。１０％熱不活性化ウシ胎仔血清（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）高グルコース（Ｃｙｔｉｖａ）中で約２４時間の培養の後、細胞はＲＮＡトランスフェクションの準備ができていた。キメラＩＲＥＳ　３（２０）３（配列番号２１）、キメラＩＲＥＳ　２０（３）２０（配列番号２２）、キメラＩＲＥＳ　３（８０）３（配列番号２３）、キメラＩＲＥＳ　８０（３）８０（配列番号２４）、キメラＩＲＥＳ　１２（２０）１２（配列番号２５）、及びキメラＩＲＥＳ　２０（１２）２０（配列番号２６）を含む種々の種類のＩＲＥＳ配列を使用した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現する異なるＩＲＥＳを有する環状ＲＮＡ－ｅＨＡ－２コンストラクトを細胞に加えた。２４時間のトランスフェクションの後、蛍光顕微鏡を使用して、ＧＦＰ蛍光シグナルを可視化した。

【００５８】

蛍光強度の解析から、異なるＩＲＥＳを使用した環状ルシフェラーゼｍＲＮＡは、ｉｍＨＣ及びＢＨＫ－２１細胞において異なるＧＦＰ発現を示したことが明らかになった。特に、３（２０）３　ＩＲＥＳを有する環状ルシフェラーゼｍＲＮＡは、他のＩＲＥＳタイプと比較して、ＧＦＰの、最も高い平均蛍光強度（ＭＦＩ）及び平均蛍光強度差（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ　ｍｅａｎ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ）（ΔＭＦＩ）を有した（図２２及び２３を参照のこと）。

【００５９】

（実施例１４）

実験動物における、異なるＩＲＥＳを有する環状ｍＲＮＡの発現及び安定性の研究

この研究において、Ｍｏｄｅｒｎａ　Ｉｎｃの処方をガイドとして使用して、環状ＲＮＡを封入するための脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の構築のための脂質成分を選択した。ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（登録商標）Ｂｅｎｃｈｔｏｐマイクロ流体デバイス（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して環状ＲＮＡ－ＬＮＰ封入を行った。プロセスを簡潔にまとめると、脂質含有エタノール相及び環状ＲＮＡ含有水相を、１：３の体積比で混合した。エタノール相は、無水エタノール中にＳＭ－１０２、ＤＳＰＣ、コレステロール及びＤＭＧ－ＰＥＧ　２０００の混合物を含み、それらは全てＳｉｎｏｐｅｇから入手した。水相は、ｐＨ４．０の２５ｍＭ酢酸塩バッファー中の、環状ＲＮＡであった。封入の後、Ｑｕｂｉｔ（商標）ＲＮＡ高感度アッセイキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を使用して、環状ＲＮＡ－ＬＮＰの濃度を調べた。マウスへの投与の前にインビトロルシフェラーゼ活性を評価することによって、環状ＲＮＡ－ＬＮＰの機能性を確かめた。

【００６０】

マウスにおける筋肉内（Ｉ．Ｍ．）注射のために、まず、インスリン注射器を使用して、５μｇの量でＬＮＰに封入された、環状ＦＬｕｃ－ｅＨＡ－２－ＣＶＢ３又は環状ＦＬｕｃ－ｅＨＡ－２－３（２０）３を、雌ＢＡＬＢ／ｃマウス（ｎ＝３）の右後肢に注射した。陰性対照として、ＰＢＳを投与した。投与の６又は４８時間後に３～５分間、マウスを、気密性の透明な麻酔ボックス中で、２％イソフルラン吸入で麻酔した。麻酔後に、マウスにＤ－ルシフェリンを腹腔内注射し（２００マイクロリットル（μｌ）のＰＢＳ中、１キログラムあたり１５０マイクログラム）、画像化のためにインビボイメージングシステム（ＩＶＩＳ）のイメージング用チャンバーに入れた。ＩＶＩＳスペクトラムを使用し

て生物発光イメージング（ＢＬＩ）を行い、６０秒間の露光時間で、１分間隔で連続的な画像を得た。

【００６１】

生物発光イメージングの解析から、陰性対照（ＰＢＳ）と比較して、筋肉内（Ｉ．Ｍ．）注射のおよそ６時間及び４８時間後の両方で、マウスにおいて、ｅＨＡ－２－３（２０）３を有する環状ルシフェラーゼｍＲＮＡが最も高い発現を示し、安定性を維持したことが示された（図２４を参照のこと）。

【００６２】

発明のベストモード

本発明のベストモードは、本発明の明細書に提供される通りである。

【図面】

【図１】

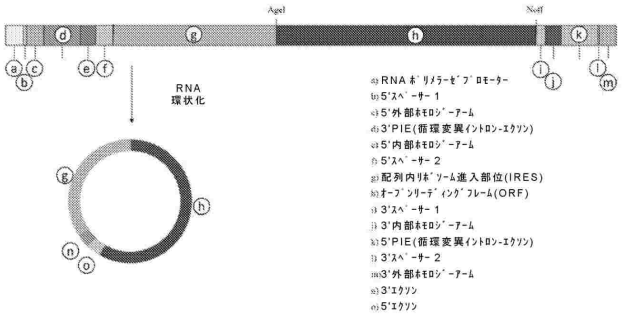


Figure 1

【図２】

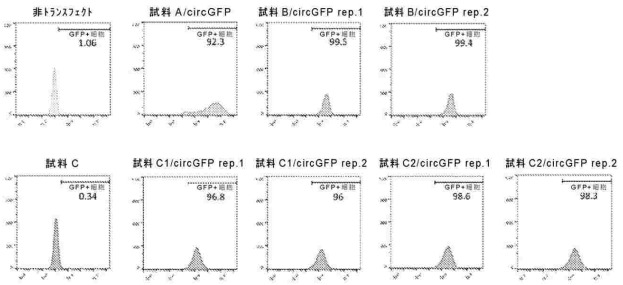


Figure 2

【図３】

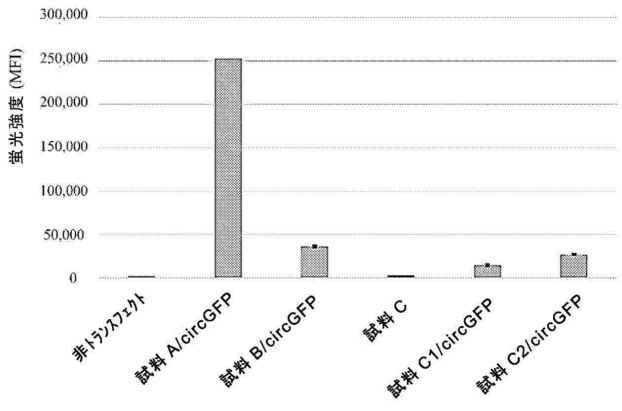


Figure 3

【図４】

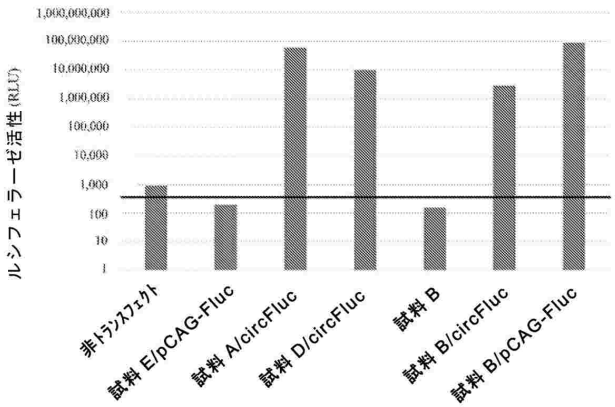


Figure 4

【図５】

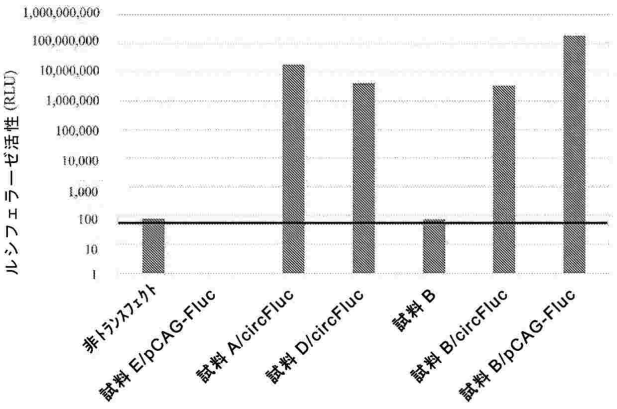
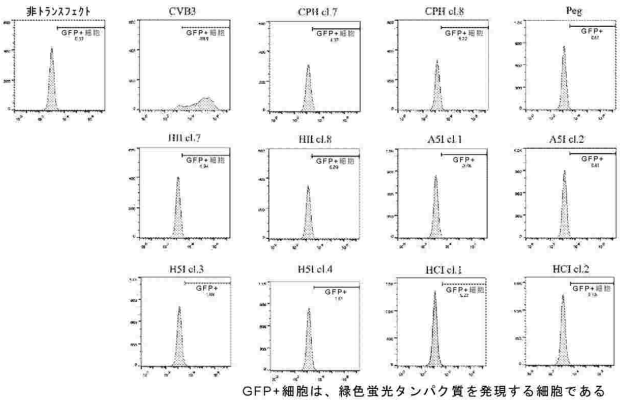


Figure 5

【図６】



GFP+細胞は、緑色蛍光タンパク質を発現する細胞である

Figure 6

【図７】

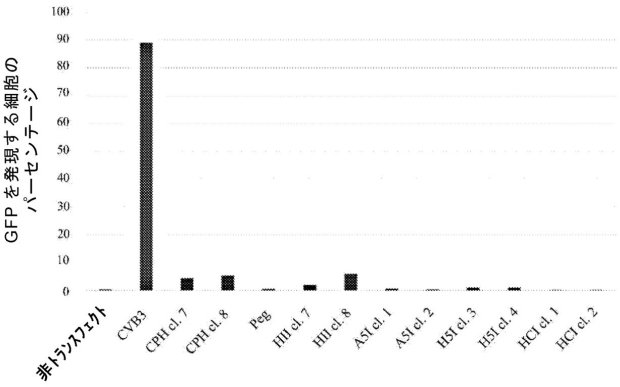
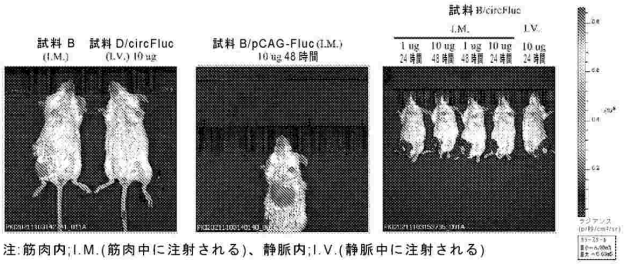


Figure 7

【図８】



注: 筋肉内;I.M.(筋肉中に注射される)、静脈内;I.V.(静脈中に注射される)

Figure 8

【図９】

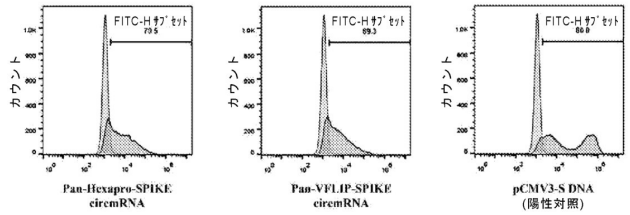


Figure 9

【図１０】

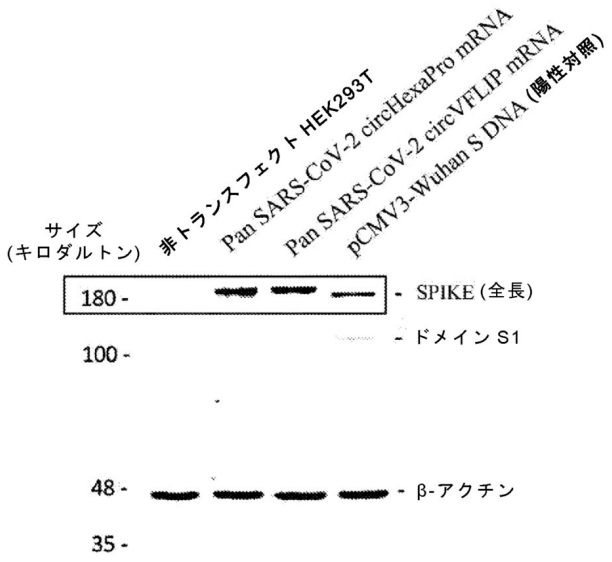


Figure 10

【図１１】

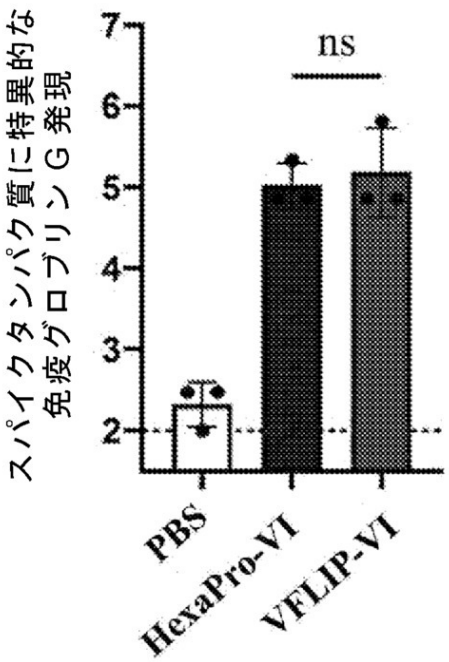


Figure 11

【図１２】

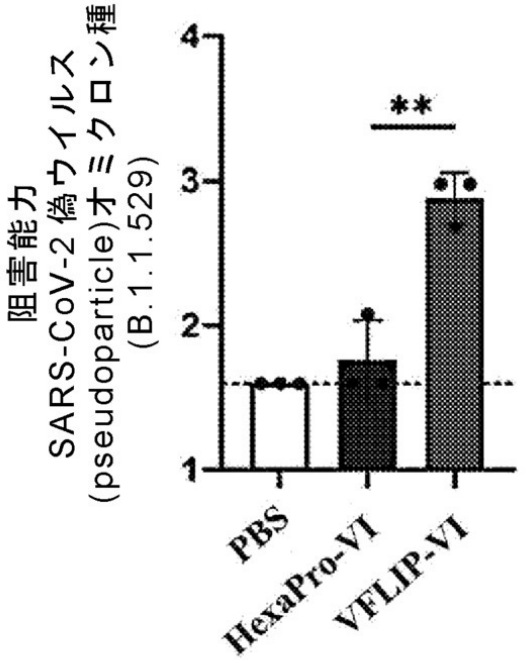


Figure 12

【図１３】

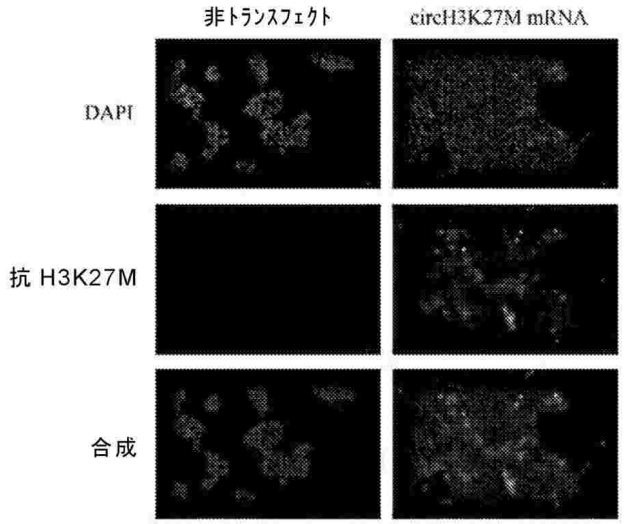


Figure 13

【図１４】

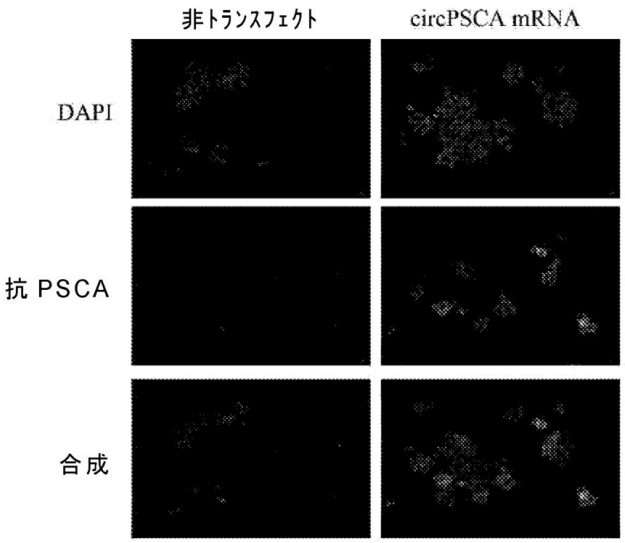


Figure 14

【図１５】

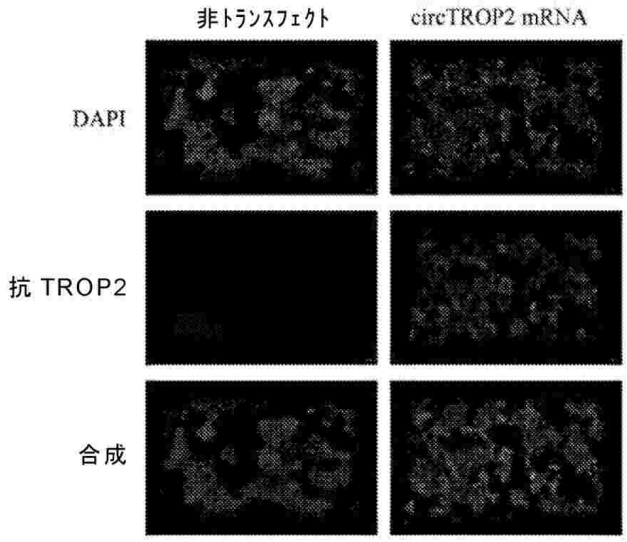


Figure 15

【図１６】

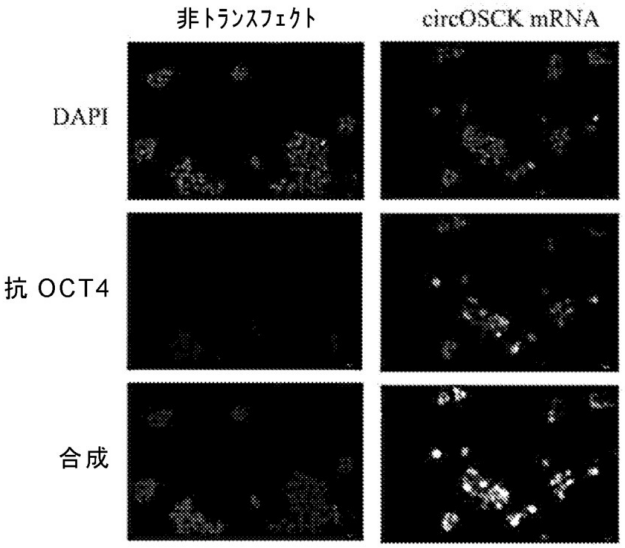


Figure 16

【図１７】

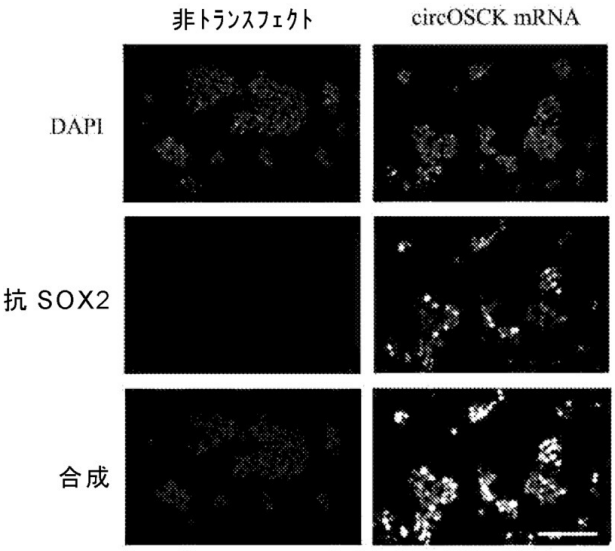


Figure 17

【図１８】

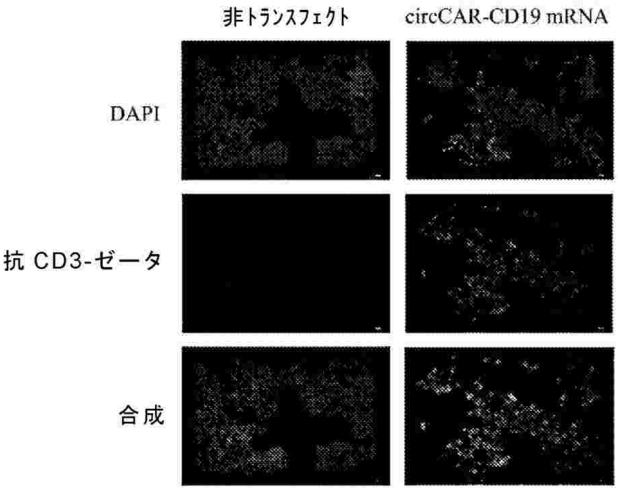


Figure 18

【図１９】

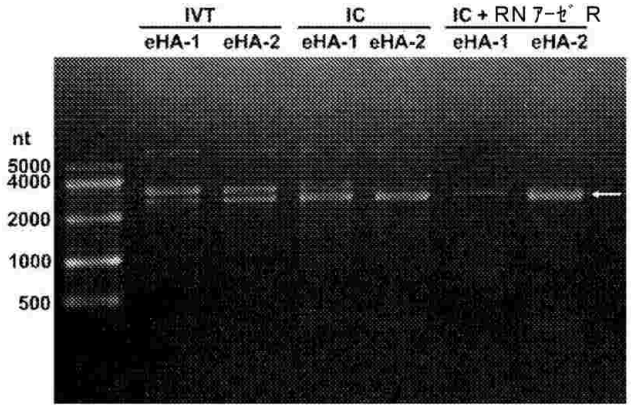


Figure 19

【図２０】

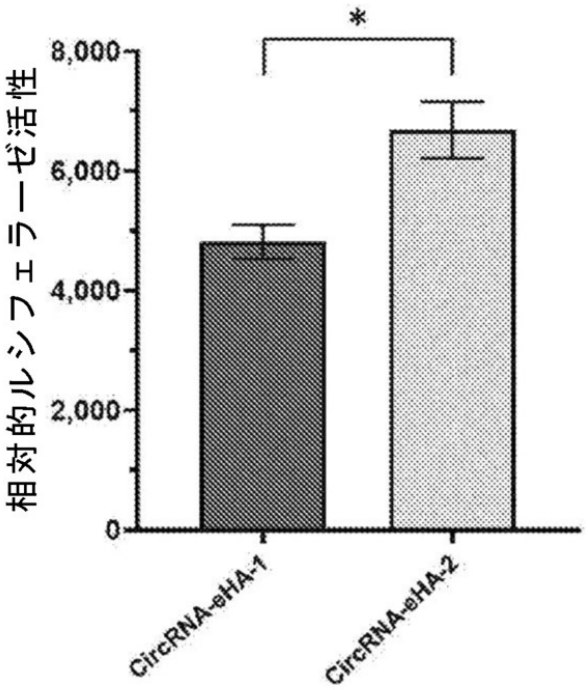


Figure 20

【図２１】

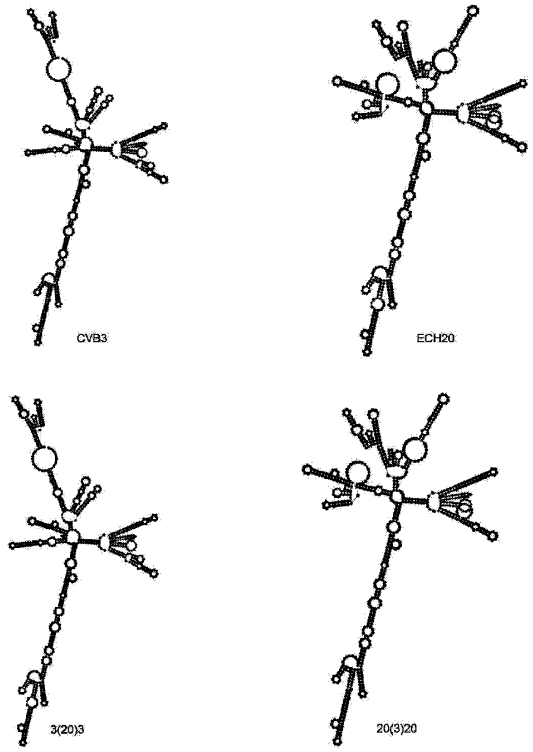


Figure 21

【図２２】

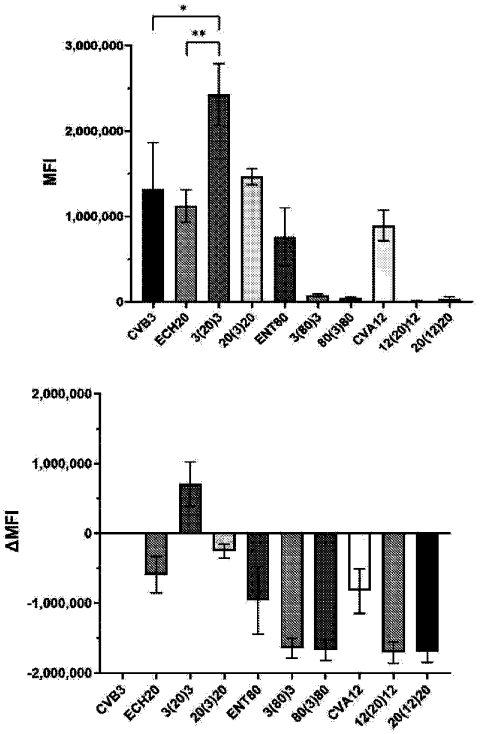


Figure 22

【図２３】

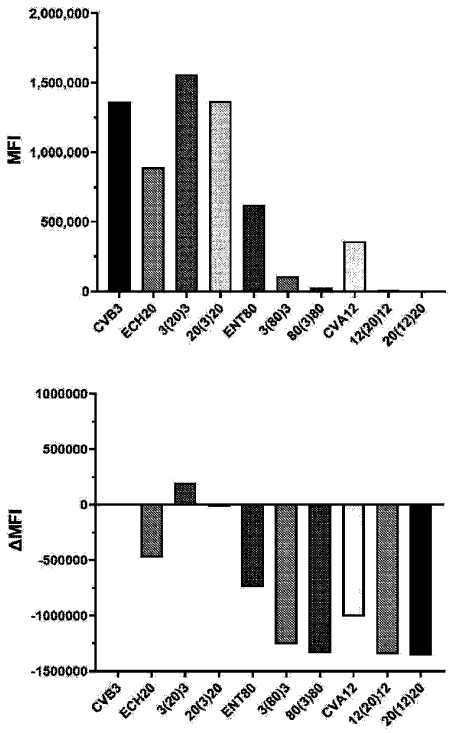


Figure 23

【図２４】

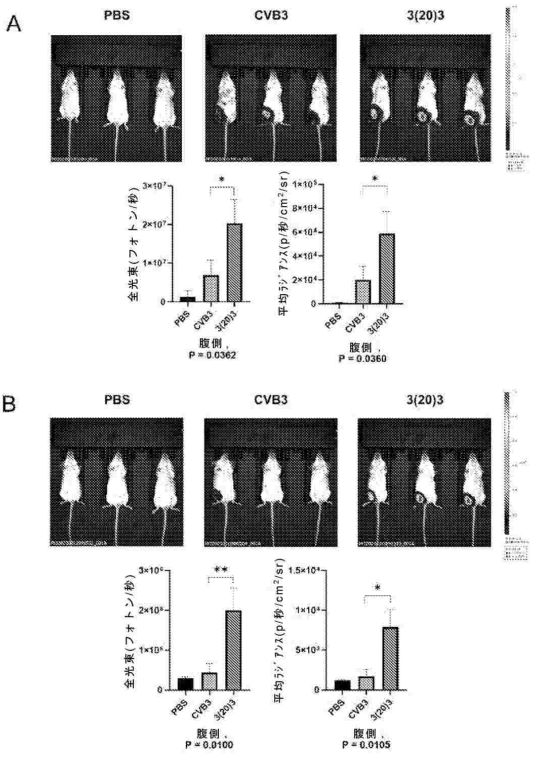


Figure 24

【配列表】
2025509106000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/TH2023/000003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K48/00 C07K14/725 C12N15/85
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/237227 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; ORNA THERAPEUTICS INC [US] ET AL.) 26 November 2020 (2020-11-26) cited in the application	3,32-35
Y	see claims	1-43
	----- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 June 2023	20/06/2023

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/TH2023/000003

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022/037692 A1 (UNIV BEIJING [CN]) 24 February 2022 (2022-02-24)	3,32-35
Y	The query sequence SEQ ID NO:21 has 99.06 % identity (99.06 % similarity) over 741 positions in a common overlap (range (q:s): 1-741:1-741) with subject GSN:BKS04834 (CVB3 virus internal ribosomal entry site (IRES) RNA, SEQ ID 53 #1 , length: 741) from WO2022037692-A1 published on 2022-02-24. The query sequence SEQ ID NO:21 has 99.06 % identity (99.06 % similarity) over 741 positions in a common overlap (range (q:s): 741-1:1-741) with subject GSN:BKS04885 (CVB3 virus internal ribosomal entry site (IRES) DNA, SEQ ID 53 #2, length: 741) from WO2022037692-A1 published on 2022-02-24. -----	1-43
Y	WO 2021/189059 A2 (ORNA THERAPEUTICS INC [US]) 23 September 2021 (2021-09-23) see claims 1-120 -----	1-43
Y	WO 2022/006399 A1 (ELEVATEBIO TECH INC [US]) 6 January 2022 (2022-01-06) The query sequence SEQ ID NO:21 has 99.06 % identity (99.06 % similarity) over 741 positions in a common overlap (range (q:s): 1-741:122-862) with subject GSN:BKN24856 (length: 2237) from WO2022006399-A1 published on 2022-01-06. -----	1-43
Y	WO 2021/236980 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI LLC [US]) 25 November 2021 (2021-11-25) The query sequence SEQ ID NO:21 has 99.06 % identity (99.06 % similarity) over 741 positions in a common overlap (range (q:s): 1-741:1-741) with subject GSN:BKH93574 (CVB3 internal ribosome entry site (IRES) sequence, SEQ ID 45, length: 741) from WO2021236980-A1 published on 2021-11-25. ----- -/--	1-43

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/TH2023/000003

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/226597 A2 (ORNA THERAPEUTICS INC [MA]) 11 November 2021 (2021-11-11) The query sequence SEQ ID NO:21 has 99.06 % identity (99.06 % similarity) over 741 positions in a common overlap (range (q:s): 1-741:1-741) with subject GSN:BKF55431 (Coxsackievirus B3 IRES sequence, SEQ 65, length: 741) from WO2021226597-A2 published on 2021-11-11. The query sequence SEQ ID NO:24 has 96.07 % identity (96.07 % similarity) over 712 positions in a common overlap (range (q:s): 1-712:1-709) with subject GSN:BKF55737 (Coxsackievirus B3 IRES sequence, SEQ 371, length: 742) from WO2021226597-A2 published on 2021-11-11.	1-43
Y	WO 2021/046243 A2 (MYELOID THERAPEUTICS INC [US]) 11 March 2021 (2021-03-11) The query sequence SEQ ID NO:21 has 99.06 % identity (99.06 % similarity) over 741 positions in a common overlap (range (q:s): 1-741:1058-1798) with subject GSN:BJB63854 (Recombinant LINE-1 plasmid CVBE-IRES-GFP DNA construct, SEQ ID 44, length: 14122) from WO2021046243-A2 published on 2021-03-11.	1-43
Y	WO 2021/236855 A1 (ORNA THERAPEUTICS INC [US]) 25 November 2021 (2021-11-25) see claims and examples 1-3	1-43
Y	WO 2022/051629 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI LLC [US]) 10 March 2022 (2022-03-10) see claims	1-43
X,P	WO 2022/241029 A1 (MYELOID THERAPEUTICS INC [US]) 17 November 2022 (2022-11-17) The query sequence SEQ ID NO:21 has 99.06 % identity (99.06 % similarity) over 741 positions in a common overlap (range (q:s): 1-741:1058-1798) with subject GSN:BMB38987 (LINE-1 plasmid CVB3 IRES GFP DNA, SEQ ID 44, length: 14122) from WO2022241029-A1 published on 2022-11-17.	1-43
X,P	WO 2022/261490 A2 (ORNA THERAPEUTICS INC [US]) 15 December 2022 (2022-12-15) see claims	1-43

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/TH2023/000003

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	CN 115 702 940 A (SUZHOU KERUI MAIDE BIOMEDICAL TECH CO LTD) 17 February 2023 (2023-02-17) The query sequence SEQ ID NO:21 has 99.06 % identity (99.06 % similarity) over 741 positions in a common overlap (range (q:s): 1-741:1-741) with subject GSN:BMK41034 (length: 741) from CN115702940-A published on 2023-02-17.	1-43
X,P	WO 2022/247943 A1 (SHANGHAI CIRCODE BIOMED CO LTD [CN]) 1 December 2022 (2022-12-01) the whole document	1-43

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/TH2023/000003

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/TH2023/000003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020237227 A1	26-11-2020	AU 2020280105 A1	20-01-2022
		BR 112021023411 A2	01-02-2022
		CA 3139032 A1	26-11-2020
		CN 115867291 A	28-03-2023
		EP 3972653 A1	30-03-2022
		IL 288284 A	01-01-2022
		JP 2022533796 A	25-07-2022
		KR 20220027855 A	08-03-2022
		SG 11202112922W A	30-12-2021
		US 2021371494 A1	02-12-2021
		US 2022177540 A1	09-06-2022
		WO 2020237227 A1	26-11-2020
WO 2022037692 A1	24-02-2022	NONE	
WO 2021189059 A2	23-09-2021	AU 2021237738 A1	10-11-2022
		BR 112022018854 A2	07-03-2023
		CA 3172423 A1	22-03-2021
		CN 116034114 A	28-04-2023
		EP 4121453 A2	25-01-2023
		JP 2023518295 A	28-04-2023
		KR 20230069042 A	18-05-2023
		WO 2021189059 A2	23-09-2021
WO 2022006399 A1	06-01-2022	AU 2021300378 A1	19-01-2023
		BR 112022027110 A2	14-03-2023
		CA 3174356 A1	06-01-2022
		CN 116194581 A	30-05-2023
		EP 4176047 A1	10-05-2023
		KR 20230030618 A	06-03-2023
		TW 202216998 A	01-05-2022
		WO 2022006399 A1	06-01-2022
WO 2021236980 A1	25-11-2021	AU 2021275223 A1	02-02-2023
		CA 3179420 A1	25-11-2021
		EP 4153224 A1	29-03-2023
		IL 298362 A	01-01-2023
		TW 202206097 A	16-02-2022
		WO 2021236980 A1	25-11-2021
WO 2021226597 A2	11-11-2021	AU 2021269137 A1	15-12-2022
		CA 3178111 A1	11-11-2021
		CN 116113419 A	12-05-2023
		EP 4146285 A2	15-03-2023
		WO 2021226597 A2	11-11-2021
WO 2021046243 A2	11-03-2021	AU 2020341479 A1	31-03-2022
		BR 112022003970 A2	21-06-2022
		CA 3149897 A1	11-03-2021
		CN 114981409 A	30-08-2022
		EP 4025686 A2	13-07-2022
		GB 2605276 A	28-09-2022
		IL 291048 A	01-05-2022
		JP 2022546592 A	04-11-2022
		KR 20220097875 A	08-07-2022
		US 2022184230 A1	16-06-2022
		US 2022364110 A1	17-11-2022
		US 2022411817 A1	29-12-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/TH2023/000003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2023067484 A1	02-03-2023
		WO 2021046243 A2	11-03-2021
WO 2021236855 A1	25-11-2021	AU 2021276410 A1	19-01-2023
		BR 112022023554 A2	11-04-2023
		CA 3179423 A1	25-11-2021
		WO 2021236855 A1	25-11-2021
WO 2022051629 A1	10-03-2022	AU 2021336976 A1	23-03-2023
		CA 3193746 A1	10-03-2022
		CN 116157148 A	23-05-2023
		TW 202218669 A	16-05-2022
		WO 2022051629 A1	10-03-2022
WO 2022241029 A1	17-11-2022	US 2023141052 A1	11-05-2023
		WO 2022241029 A1	17-11-2022
WO 2022261490 A2	15-12-2022	NONE	
CN 115702940 A	17-02-2023	NONE	
WO 2022247943 A1	01-12-2022	CN 115404240 A	29-11-2022
		WO 2022247943 A1	01-12-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13	
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z
C12N 15/50 (2006.01)		C12N	15/50	
C12N 15/64 (2006.01)		C12N	15/64	Z

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

ウンシル
タイ バンコク １０３３０ パトゥムワン パヤータイ ロード チャムチュリ スクエア ビルディング ３１９ フォーティーンス フロア

(74)代理人 100103610
弁理士 ▲吉▼田 和彦

(74)代理人 100109070
弁理士 須田 洋之

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766
弁理士 松田 七重

(74)代理人 100232781
弁理士 鄭 盈瑜

(72)発明者 ウォントラコーンゲイト パトムポン
タイ バンコク １０６００ トンブリー ワット カンラヤ プラジャディポク ロード ９０

(72)発明者 ホンゲン スラデジ
タイ バンコク １０７００ バン プラット バン プラット チャランサニットウォン ７５ １４６３