(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-534428
(P2024-534428A)
(43)公表日　令和6年9月20日(2024.9.20)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/11*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	４Ｂ０６４
Ｃ１２Ｎ	*15/63*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ１２Ｐ	*21/02*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ	

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全127頁）

(21)出願番号　特願2024-516852(P2024-516852)
(86)(22)出願日　令和4年9月16日(2022.9.16)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月9日(2024.5.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/043808
(87)国際公開番号　WO2023/044006
(87)国際公開日　令和5年3月23日(2023.3.23)
(31)優先権主張番号　63/245,354
(32)優先日　令和3年9月17日(2021.9.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,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,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　520445473
フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ シックス，エルエルシー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１４２，ケンブリッジ，ケンブリッジ・パークウェイ ５５，エイス・フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　環状ポリリボヌクレオチドを生成するための組成物及び方法

(57)【要約】
本開示は、一般に、環状ＲＮＡを生成、精製、及び使用するための組成物及び方法に関する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式５’－（Ａ）－（Ｂ）－（Ｃ）－（Ｄ）－（Ｅ）－（Ｆ）－（Ｇ）－３’（式中、
（Ａ）は、グループＩ触媒イントロン断片の３’半分を含む；
（Ｂ）は、３’スプライス部位を含む；
（Ｃ）は、３’エクソン断片を含む；
（Ｄ）は、ポリリボヌクレオチドカーゴを含む；
（Ｅ）は、５’エクソン断片を含む；
（Ｆ）は、５’スプライス部位を含む；及び
（Ｇ）は、グループＩ触媒イントロン断片の５’半分を含む；
並びに（Ａ）、（Ｂ）、又は（Ｃ）は、８～５０リボヌクレオチドを含む第１のアニーリング領域を含み、且つ（Ｅ）、（Ｆ）、又は（Ｇ）は、８～５０リボヌクレオチドを含む第２のアニーリング領域を含む）を有する線状ポリリボヌクレオチドであって、
前記第１のアニーリング領域及び前記第２のアニーリング領域が８０％～１００％の相補性を有し、又は
前記第１のアニーリング領域及び前記第２のアニーリング領域が０～１０のミスマッチ塩基対を含む、線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項２】
（Ａ）又は（Ｃ）が前記第１のアニーリング領域を含み、且つ（Ｅ）又は（Ｇ）が前記第２のアニーリング領域を含む、請求項１に記載の線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項３】
（Ｃ）の前記３’エクソン断片が前記第１のアニーリング領域を含み、且つ（Ｅ）の前記５’エクソン断片が前記第２のアニーリング領域を含む、請求項１又は２に記載の線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４】
（Ａ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の３’半分が前記第１のアニーリング領域を含み、且つ（Ｅ）の前記５’エクソン断片が前記第２のアニーリング領域を含む、請求項１又は２に記載の線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項５】
前記第１のアニーリング領域が１０～３０リボヌクレオチドを含み、且つ前記第２のアニーリング領域が１０～３０リボヌクレオチドを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項６】
前記第１のアニーリング領域が１０～２０リボヌクレオチドを含み、且つ前記第２のアニーリング領域が１０～２０リボヌクレオチドを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項７】
前記第１のアニーリング領域が１０～１５リボヌクレオチドを含み、且つ前記第２のアニーリング領域が１０～１５リボヌクレオチドを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項８】
前記第１のアニーリング領域及び前記第２のアニーリング領域が９０％～１００％の相補性を有する、請求項１～７のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項９】
前記第１のアニーリング領域及び前記第２のアニーリング領域が０又は１つのミスマッチ塩基対を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項１０】
前記第１のアニーリング領域及び前記第２のアニーリング領域が１００％相補的である、請求項１～７のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。
【請求項１１】

（Ａ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の５’半分が、シアノバクテリアアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のプレｔＲＮＡ－Ｌｅｕ遺伝子、又はテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のプレｒＲＮＡに由来する、請求項１～１０のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項１２】

（Ａ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の５’半分がシアノバクテリアアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のプレｔＲＮＡ－Ｌｅｕ遺伝子に由来し、

且つ（Ｃ）の前記３’エクソン断片が前記第１のアニーリング領域を含み、且つ（Ｅ）の前記５’エクソン断片が前記第２のアニーリング領域を含む、

請求項１に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項１３】

前記第１のアニーリング領域が１０～１５リボヌクレオチドを含み、且つ前記第２のアニーリング領域が１０～１５リボヌクレオチドを含む、請求項１２に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項１４】

（Ａ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の５’半分がテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のプレｒＲＮＡに由来し、

且つ（Ａ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の３’半分が前記第１のアニーリング領域を含み、且つ（Ｅ）の前記５’エクソン断片が前記第２のアニーリング領域を含む、請求項１に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項１５】

前記第１のアニーリング領域が１０～１６リボヌクレオチドを含み、且つ前記第２のアニーリング領域が１０～１６リボヌクレオチドを含む、請求項１４に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項１６】

（Ａ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の５’半分がＴ４ファージのｔｄ遺伝子に由来し、且つ（Ｃ）の前記３’エクソン断片が前記第１のアニーリング領域を含み、且つ（Ｇ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の５’半分が前記第２のアニーリング領域を含む、請求項１に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項１７】

前記第１のアニーリング領域が２～１６リボヌクレオチドを含み、且つ前記第２のアニーリング領域が２～１６リボヌクレオチドを含む、請求項１６に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項１８】

（Ａ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の３’半分が前記線状ポリヌクレオチドの５’末端である、請求項１～１７のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項１９】

（Ｇ）の前記グループＩ触媒イントロン断片の５’半分が前記線状ポリリボヌクレオチドの３’末端である、請求項１～１８のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２０】

さらなるアニーリング領域を含まない、請求項１～１９のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２１】

（Ｇ）の５’側のアニーリング領域との部分的又は完全な核酸相補性を含む（Ａ）の３’側のアニーリング領域を含まない、請求項１～２０のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２２】

（Ｄ）の前記ポリリボヌクレオチドカーゴが、発現配列、非コード配列、又は発現配列及び非コード配列を含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２３】

（Ｄ）の前記ポリリボヌクレオチドカーゴが、ポリペプチドをコードする発現配列を含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２４】

（Ｄ）の前記ポリリボヌクレオチドカーゴが、ポリペプチドをコードする発現配列に作動可能に連結されているＩＲＥＳを含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２５】

（Ｄ）の前記ポリリボヌクレオチドカーゴが、対象に対する生物学的効果を有するポリペプチドをコードする発現配列を含む、請求項１～２４のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２６】

（Ｃ）の前記３’エクソン断片と（Ｄ）の前記ポリリボヌクレオチドカーゴとの間に第１のスペーサー領域をさらに含む、請求項１～２５のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２７】

（Ｄ）の前記ポリリボヌクレオチドカーゴと（Ｅ）の前記５’エクソン断片との間に第２のスペーサー領域をさらに含む、請求項１～２６のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２８】

各スペーサー領域が少なくとも５リボヌクレオチドの長さである、請求項２６又は２７に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項２９】

各スペーサー領域が５～５００リボヌクレオチドの長さである、請求項２８に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項３０】

前記第１のスペーサー領域、前記第２のスペーサー領域、又は前記第１のスペーサー領域及び前記第２のスペーサー領域がポリＡ配列を含む、請求項２６～２９のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項３１】

前記第１のスペーサー領域、前記第２のスペーサー領域、又は前記第１のスペーサー領域及び前記第２のスペーサー領域がポリＡ－Ｃ配列を含む、請求項２６～２９のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項３２】

３００～２０，０００リボヌクレオチドの長さである、請求項１～３１のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項３３】

少なくとも１，０００リボヌクレオチドの長さである、請求項１～３２のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項３４】

少なくとも３，０００リボヌクレオチドの長さである、請求項３３に記載の線状ポリリボヌクレオチド。

【請求項３５】

請求項１～３４のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチドをコードするＤＮＡ配列に作動可能に連結されているＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含むＤＮＡベクター。

【請求項３６】

請求項１～３２のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド又は請求項３５に記載のＤＮＡベクターから生成される環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項３７】
５’エクソン断片及び３’エクソン断片を連結するスプライス結合を含む環状ポリリボヌクレオチドであって、
前記３’エクソン断片が８～５０リボヌクレオチドを含む第１のアニーリング領域を含み、且つ前記５’エクソン断片が８～５０リボヌクレオチドを含む第２のアニーリング領域を含み、
且つ前記第１のアニーリング領域及び前記第２のアニーリング領域が８０％～１００％の相補性を含み、又は前記第１のアニーリング領域及び前記第２のアニーリング領域が０～１０のミスマッチ塩基対を含む、
環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項３８】
ポリリボヌクレオチドカーゴをさらに含む、請求項３７に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項３９】
前記ポリリボヌクレオチドカーゴが、発現配列、非コード配列、又は発現配列及び非コード配列の組み合わせを含む、請求項３８に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４０】
前記ポリリボヌクレオチドカーゴが、ポリペプチドをコードする発現配列を含む、請求項３９に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４１】
前記ポリリボヌクレオチドが、ポリペプチドをコードする発現配列に作動可能に連結されているＩＲＥＳを含む、請求項４０に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４２】
前記ＩＲＥＳと前記３’エクソン断片又は前記５’エクソン断片との間にスペーサー領域をさらに含む、請求項４１に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４３】
前記スペーサー領域が少なくとも５リボヌクレオチドの長さである、請求項４２に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４４】
前記スペーサー領域が５～５００リボヌクレオチドの長さである、請求項４３に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４５】
前記スペーサー領域がポリＡ配列を含む、請求項４２～４４のいずれか一項に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４６】
前記スペーサー領域がポリＡ－Ｃ配列を含む、請求項４２～４４のいずれか一項に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４７】
少なくとも５００リボヌクレオチドの長さである、請求項３７～４６のいずれか一項に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４８】
５００～２０，０００リボヌクレオチドの長さである、請求項４７に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項４９】
請求項１～３２のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド又は請求項３３に記載のベクターから生成される、請求項３７～４８のいずれか一項に記載の環状ポリリボヌクレオチド。
【請求項５０】

細胞内でポリペプチドを発現する方法であって、請求項１～３４のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチド、請求項３５に記載のＤＮＡベクター、又は請求項３６～４９のいずれか一項に記載の環状ポリリボヌクレオチドを前記細胞に提供することを含む、方法。

【請求項５１】

請求項１～３４のいずれか一項に記載の線状ポリリボヌクレオチドから環状ポリリボヌクレオチドを生成する方法であって、前記線状ポリリボヌクレオチドを前記線状ポリリボヌクレオチドの自己スプライシングに適した条件下で準備し、前記環状ポリリボヌクレオチドを生成することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【０００１】

環状ポリリボヌクレオチドを生成、精製、及び使用する方法の必要性が存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００２】

本開示は、環状ＲＮＡを生成、精製、及び使用するための組成物及び方法を提供する。

【０００３】

一態様では、本発明は、５’－（Ａ）－（Ｂ）－（Ｃ）－（Ｄ）－（Ｅ）－（Ｆ）－（Ｇ）－３’の式を有する線状ポリリボヌクレオチドを特徴とする。線状ポリリボヌクレオチドは、５’から３’へ、（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；（Ｃ）３’エクソン断片；（Ｄ）ポリリボヌクレオチドカーゴ（ｐｏｌｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｃａｒｇｏ）；（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；及び（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分を含む。ポリリボヌクレオチドは、２～５０、例えば、５～５０、例えば、６～５０、例えば、７～５０、例えば、８～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、少なくとも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、又は５０）リボヌクレオチドを有し、且つ（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；又は（Ｃ）３’エクソン断片の内部に存在する第１のアニーリング領域を含む。ポリリボヌクレオチドはまた、２～５０、例えば、５～５０、例えば、６～５０、例えば、７～５０、例えば、８～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、少なくとも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、又は５０）リボヌクレオチドを有し、且つ（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；又は（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分の内部に存在する第２のアニーリング領域を含む。第１のアニーリング領域は、第２のアニーリング領域と８０％～１００％（例えば、８５％～１００％、例えば、９０％～１００％、例えば、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の相補性を有する、又は０～１０（例えば、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）のミスマッチ塩基を有する。

【０００４】

別の態様では、本発明は、式５’－（Ａ）－（Ｂ）－（Ｃ）－（Ｄ）－（Ｅ）－（Ｆ）－（Ｇ）－３’を有する線状ポリリボヌクレオチドを特徴とする。線状ポリリボヌクレオチドは、５’から３’へ、（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；（Ｃ）３’エクソン断片；（Ｄ）ポリリボヌクレオチドカーゴ；（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；及び（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分を含み、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）のグループＩ

触媒イントロン断片の５’半分は、シアノバクテリアアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のプレｔＲＮＡ－Ｌｅｕ遺伝子に由来する。ポリリボヌクレオチドは、５～５０、例えば、６～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、少なくとも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、又は５０）リボヌクレオチドを有し、且つ（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；又は（Ｃ）３’エクソン断片の内部に存在する第１のアニーリング領域を含む。ポリリボヌクレオチドは、５～５０、例えば、６～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、少なくとも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、又は５０）リボヌクレオチドを有し、且つ（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；又は（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分の内部に存在する第２のアニーリング領域も含む。第１のアニーリング領域は、第２のアニーリング領域と８０％～１００％（例えば、８５％～１００％、例えば、９０％～１００％、例えば、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の相補性を有する、又は０～１０、例えば、（０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）のミスマッチ塩基対を有する。

【０００５】

別の態様では、本発明は、式５’－（Ａ）－（Ｂ）－（Ｃ）－（Ｄ）－（Ｅ）－（Ｆ）－（Ｇ）－３’を有する線状ポリリボヌクレオチドを特徴とする。線状ポリリボヌクレオチドは、５’から３’へ、（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；（Ｃ）３’エクソン断片；（Ｄ）ポリリボヌクレオチドカーゴ；（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；及び（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分を含み、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のプレｒＲＮＡに由来する。ポリリボヌクレオチドは、６～５０、例えば、７～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、少なくとも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、又は５０）リボヌクレオチドを有し、且つ（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；又は（Ｃ）３’エクソン断片の内部に存在する第１のアニーリング領域を含む。ポリリボヌクレオチドは、６～５０、例えば、７～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、少なくとも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、又は５０）リボヌクレオチドを有し、且つ（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；又は（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分の内部に存在する第２のアニーリング領域も含む。第１のアニーリング領域は、第２のアニーリング領域と８０％～１００％（例えば、８５％～１００％、例えば、９０％～１００％、例えば、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の相補性を有する、又は０～１０、例えば、（０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）のミスマッチ塩基対を有する。

【０００６】

いくつかの実施形態では、（Ａ）又は（Ｃ）は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）又は（Ｇ）は、第２のアニーリング領域を含む。

【０００７】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）の５’エクソン断片は、第２のアニーリング領域を含む。

【０００８】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、第２のアニーリング領域を含む。

【０００９】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）の５’エクソン断片は、第２のアニーリング領域を含む。

【００１０】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域は、０又は１つのミスマッチ塩基対を含む。

【００１１】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域は、１００％相補的である。

【００１２】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、シアノバクテリアアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のプレｔＲＮＡ－Ｌｅｕ遺伝子、テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のプレｒＲＮＡ、又はＴ４ファージのｔｄ遺伝子に由来する。

【００１３】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、シアノバクテリアアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のプレｔＲＮＡ－Ｌｅｕ遺伝子に由来し、（Ｃ）の３’エクソン断片は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）の５’エクソン断片は、第２のアニーリング領域を含む。第１のアニーリング領域は、例えば、５～５０、例えば、１０～１５（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、又は１５）リボヌクレオチドを含んでもよく、第２のアニーリング領域は、例えば、５～５０、例えば、１０～１５（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、又は１５）リボヌクレオチドを含み得る。

【００１４】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のプレｒＲＮＡに由来し、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）の５’エクソン断片は、第２のアニーリング領域を含む。いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、第２のアニーリング領域を含む。第１のアニーリング領域は、例えば、６～５０、例えば、１０～１６（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６）リボヌクレオチドを含んでもよく、第２のアニーリング領域は、例えば、６～５０、例えば、１０～１６（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６）リボヌクレオチドを含み得る。

【００１５】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）の５’グループＩ触媒イントロン断片は、Ｔ４ファージのｔｄ遺伝子に由来する。（Ｃ）の３’エクソン断片は、第１のアニーリング領域を含んでもよく、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、第２のアニーリング領域を含み得る。第１のアニーリング領域は、例えば、２～１６、例えば、１０～１６（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６）リボヌクレオチドを含んでもよく、第２のアニーリング領域は、例えば、２～１６、例えば、１０～１６（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６）リ

ボヌクレオチドを含み得る。
【００１６】
いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、線状ポリヌクレオチドの５’末端である。
【００１７】
いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、線状ポリリボヌクレオチドの３’末端である。
【００１８】
いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、さらなるアニーリング領域を含まない。
【００１９】
いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、（Ｇ）の５’側のアニーリング領域との部分的又は完全な核酸相補性を含む（Ａ）の３’側のアニーリング領域を含まない。
【００２０】
いくつかの実施形態では、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴは、発現配列、非コード配列、又は発現配列及び非コード配列を含む。
【００２１】
いくつかの実施形態では、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴは、ポリペプチドをコードする発現配列を含む。
【００２２】
いくつかの実施形態では、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴは、ポリペプチドをコードする発現配列に作動可能に連結されているＩＲＥＳを含む。
【００２３】
いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、発現配列の上流に位置する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、発現配列の下流に位置する。
【００２４】
いくつかの実施形態では、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴは、対象に対して生物学的効果を有するポリペプチドをコードする発現配列を含む。
【００２５】
いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、（Ｃ）の３’エクソン断片と（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴとの間に第１のスペーサー領域をさらに含む。第１のスペーサー領域は、例えば、少なくとも５（例えば、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０）リボヌクレオチドの長さであってもよい。いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴと（Ｅ）の５’エクソン断片との間に第２のスペーサー領域をさらに含む。第２のスペーサー領域は、例えば、少なくとも５（例えば、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０）リボヌクレオチドの長さであってもよい。いくつかの実施形態では、各スペーサー領域は、少なくとも５（例えば、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０）リボヌクレオチドの長さである。各スペーサー領域は、例えば、５～５００（例えば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、又は５００）リボヌクレオチドの長さであってもよい。第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ポリＡ配列を含んでもよい。第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ポリＡ－Ｃ配列を含んでもよい。第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ポリＡ－Ｇ配列を含んでもよい。第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ポリＡ－Ｔ配列を含んでもよい。第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ランダム配列を含んでもよい。

【００２６】
いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、５０～２０，０００、例えば、１００～２０，０００、例えば、２００～２０，０００、例えば、３００～２０，０００（例えば、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、又は２０，０００）リボヌクレオチドの長さである。実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、例えば、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも１，０００、少なくとも２，０００、少なくとも３，０００、少なくとも４，０００、又は少なくとも５，０００リボヌクレオチドの長さである。
【００２７】
別の態様では、本発明は、本明細書に記載の実施形態のいずれかの線状ポリリボヌクレオチドをコードするＤＮＡ配列に作動可能に連結されているＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含むＤＮＡベクターを特徴とする。
【００２８】
別の態様では、本発明は、本明細書に記載の実施形態のいずれかの線状ポリリボヌクレオチド又はＤＮＡベクターから生成される環状ポリリボヌクレオチド（例えば、共有的に閉じている環状ポリリボヌクレオチド）を特徴とする。
【００２９】
別の態様では、本発明は、５’エクソン断片及び３’エクソン断片を連結するスプライス結合を有する環状ポリリボヌクレオチド（例えば、共有的に閉じている環状ポリリボヌクレオチド）を特徴とする。３’エクソン断片は、２～５０、例えば、５～５０、例えば、６～５０、例えば、７～５０、例えば、８～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、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、又は５０）リボヌクレオチドを含む第１のアニーリング領域を含み、５’エクソン断片は、２～５０、例えば、５～５０、例えば、６～５０、例えば、７～５０、例えば、８～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、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、又は５０）リボヌクレオチドを含む第２のアニーリング領域を含む。実施形態では、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域は、８０％～１００％（例えば、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の相補性を含む。実施形態では、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域は、０～１０（例えば、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）のミスマッチ塩基対（ｂｐ）を含む。実施形態では、環状ポリヌクレオチドは、ポリリボヌクレオチドカーゴをさらに含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、発現（又はコード）配列、非コード配列、又は発現（又はコード）配列及び非コード配列の組み合わせを含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、ポリペプチドをコードする発現（コード）配列を含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする発現配列に作動可能に連結されているＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、ＩＲＥＳと３’エクソン断片又は５’エクソン断片との間にスペーサー領域をさらに含む。スペーサー領域は、例えば、少なくとも５（例えば、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０）リボヌクレオチドの長さであってもよい。スペーサ

ー領域は、例えば、５～５００（例えば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、又は５００）リボヌクレオチドであってもよい。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ポリＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ポリＡ－Ｃ配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ポリＡ－Ｇ配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ポリＡ－Ｔ配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ランダム配列を含む。

【００３０】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、５０～２０，０００、例えば、１００～２０，０００、例えば、２００～２０，０００、例えば、３００～２０，０００（例えば、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、又は２０，０００）リボヌクレオチドの長さである。実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、例えば、少なくとも５００、少なくとも１，０００、少なくとも２，０００、少なくとも３，０００、少なくとも４，０００、又は少なくとも５，０００リボヌクレオチドの長さである。

【００３１】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチド又はベクターから生成される。

【００３２】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチド、ＤＮＡベクター、又は環状ポリリボヌクレオチドを細胞に提供することにより、細胞内でポリペプチドを発現する方法を特徴とする。方法は、細胞機構がポリリボヌクレオチドからポリペプチドを発現することを可能にすることをさらに含む。

【００３３】

別の態様では、本発明は、環状ポリリボヌクレオチドを生成するため、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチドを線状ポリリボヌクレオチドの自己スプライシングに適した条件下で提供することによる、本明細書に記載される環状ポリリボヌクレオチドを生成する方法を特徴とする。

【００３４】

定義

本開示の理解を促すため、いくつかの用語が以下に定義される。本明細書で定義される用語は、本開示に関連する領域における当業者によって一般に理解されているような意味を有する。「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」などの用語は、単数の実体のみを指すことを意図しておらず、一般的クラスも含むが、その具体例は、例示のために使用されてもよい。「又は」という用語は、代替物のみを指すように明示されない限り、又は代替物が相互に排他的でない限り、「及び／又は」を意味するものとして使用されるが、本開示は、代替物のみと「及び／又は」とを指すような定義を支持する。本明細書中の用語は、具体的な実施形態を説明するために使用されるが、それらの使用は、請求項において概説される場合を除き、限定するものとして解釈されるべきでない。

【００３５】

本明細書で使用されるとき、値の範囲内に提供される任意の値は、上限と下限の両方、並びに上限及び下限の範囲内に含まれる任意の値を含む。

【００３６】

本明細書で使用されるとき、「約」という用語は、列挙値の±１０％以内にある値を指す。

【００３７】
本明細書で使用されるとき、「担体」という用語は、細胞への組成物（例えば、環状ポリリボヌクレオチド）の輸送又は送達を、部分又は完全カプセル化をした薬剤、又はその組み合わせを介して、環状ポリリボヌクレオチドの共有結合修飾によって容易にする化合物、組成物、試薬、又は分子である。担体の非限定的な例には、炭水化物担体（例えば、無水物修飾フィトグリコーゲン又はグリコーゲン型物質）、ナノ粒子（例えば、環状ポリリボヌクレオチドにカプセル化又は共有結合されるナノ粒子）、リポソーム、フソソーム、生体外で分化した網状赤血球、エキソソーム、タンパク質担体（例えば、ポリリボヌクレオチドに共有結合したタンパク質）、又はカチオン性担体（例えば、カチオン性リポポリマー又はトランスフェクション試薬）が含まれる。

【００３８】
本明細書で使用されるとき、「環状ポリリボヌクレオチド」及び「環状ＲＮＡ」という用語は、互換的に使用され、遊離末端（即ち、遊離３’及び／又は５’末端）を有していない構造を有するポリリボヌクレオチド分子、例えば、共有結合又は非共有結合を介して環状又は末端のない構造を形成するポリリボヌクレオチド分子を意味する。環状ポリリボヌクレオチドは、例えば、共有的に閉じているポリリボヌクレオチドであってもよい。

【００３９】
本明細書で使用されるとき、「環状化効率」という用語は、得られた環状ポリリボヌクレオチドのその非環状出発物質に対する測定値である。

【００４０】
本明細書で使用されるとき、「疾患」、「障害」、及び「症状」という用語はそれぞれ、最適でない健康の状態、例えば、医療専門家によって通常は診断又は処置されている、又は診断又は処置されることになる状態を指す。

【００４１】
「異種」は、天然に存在する（天然の）状況以外の状況下で生じること意味する。「異種」ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列がその配列の天然ゲノムにおいて見出されるもの以外の方法で使用されていることを示す。例えば、「異種プロモーター」は、そのプロモーターによって天然に転写される配列でない配列の転写を駆動するために使用され；それ故、「異種プロモーター」配列は、組換え核酸技術を用いて、発現構築物中に含まれることが多い。「異種」という用語はまた、別の配列との天然に存在しない関係において配置される所与の配列を指すように使用され；例えば、異種コード又は非コードヌクレオチド配列は、一般にゲノム形質転換技術によってゲノムに挿入され、遺伝子修飾又は組換えゲノムをもたらす。

【００４２】
本明細書で使用されるとき、対象の「適応度を増加させる」又は「適応度を促進する」は、本明細書に記載のペプチド又はポリペプチドの投与の結果としての、生理における、又は対象生物によって実施される任意の活性の任意の好ましい改変、例えば限定はされないが、以下の所望の効果のいずれか１つ以上を指す：（１）生物的又は非生物的ストレスの耐性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（２）収率又はバイオマスの約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（３）開花期の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の変更；（４）害虫又は病原体に対する抵抗性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加、（４）除草剤に対する抵抗性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（５）対象生物（例えば、農業的に重要な昆虫）の集団の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（６）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の生殖率の約１０％、２０％、３０％

、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（７）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の運動性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（８）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の体重の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（９）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の代謝率又は活動性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（１０）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）による受粉（例えば、所与の期間内に受粉された植物の数）の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（１１）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の副産物（例えば、ミツバチからの蜂蜜又はカイコからの絹）の生成の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；（１２）対象生物（例えば、昆虫）の栄養素含有量（例えば、タンパク質、脂肪酸、又はアミノ酸）の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加；又は（１３）駆除薬（例えば、ネオニコチノイド（例えば、イミダクロプリド）又は有機リン殺虫剤（例えば、ホスホロチオエート、例えば、フェニトロチオン））に対する対象生物の抵抗性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の増加、（１４）ヒト又は非ヒト動物などの対象生物の健康の増強又は疾患の低減。宿主適応度の増加は、調節剤が投与されていない対象生物と比較して判定することができる。逆に、対象の「適応度の低下」は、本明細書に記載のペプチド又はポリペプチドの投与の結果としての、生理における、又は対象生物によって実施される任意の活性の任意の好ましくない改変、例えば限定はされないが、以下の意図された効果のいずれか１つ以上を指す：（１）生物的又は非生物的ストレスの耐性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の低下；（２）収率又はバイオマスの約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の低下；（３）開花期の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の変更；（４）害虫又は病原体に対する抵抗性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の低下、（４）除草剤に対する抵抗性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の低下；（５）対象生物（例えば、農業的に重要な昆虫）の集団の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の減少；（６）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の生殖率の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の低下；（７）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の運動性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の低下；（８）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の体重の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の減少；（９）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の代謝率又は活動性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の低下；（１０）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）による受粉（例えば、所与の期間内に受粉された植物の数）の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の減少；（１１）対象生物（例えば昆虫、例えばミツバチ又はカイコ）の副産物（例えば、ミツバチからの蜂蜜又はカイコからの絹）の生

成の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の低下；（１２）対象生物（例えば、昆虫）の栄養素含有量（例えば、タンパク質、脂肪酸、又はアミノ酸）の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の減少；又は（１３）駆除薬（例えば、ネオニコチノイド（例えば、イミダクロプリド）又は有機リン殺虫剤（例えば、ホスホロチオエート、例えば、フェニトロチオン））に対する対象生物の抵抗性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％又はそれ以上の低下、（１４）ヒト又は非ヒト動物などの対象生物の健康の低減又は疾患の低減。宿主適応度の低下は、調節剤が投与されていない対象生物と比較して判定することができる。対象の生理、表現型、又は活動性における特定の変化、例えば植物における開花期の変更により、状況に応じて（例えば、気候又は他の環境条件における変化に適応するのに）、対象の適応度が増加するか又は対象の適応度が低下すると考察可能であることは当業者にとって明らかであろう。例えば、開花期の遅延（例えば、所与のカレンダー日付に開花する集団内の植物が約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、１００％減少すること）は、より遅いか又はより涼しい春季への有利な適応であり得て、それ故、植物の適応度を増加させると考察可能であり；逆に、より早期の又はより暖かい春季という状況下での開花期の同様の遅延は、植物の適応度を低下させると考察可能である。

【００４３】

本明細書で使用されるとき、「線状ＲＮＡ」又は「線状ポリリボヌクレオチド」又は「線状ポリリボヌクレオチド分子」という用語は、互換的に使用され、５’及び３’末端を有するポリリボヌクレオチド分子を意味する。５’末端及び３’末端の一方又は両方は、遊離末端であってもよいし、又は別の部分に結合していてもよい。線状ＲＮＡは、環状化されていない（例えば、事前に環状化されていない）ＲＮＡを含み、環状化のための出発物質として使用することができる。

【００４４】

本明細書で使用されるとき、「修飾リボヌクレオチド」という用語は、糖、核酸塩基、又はヌクレオシド間結合に対して少なくとも１つの修飾を有するヌクレオチドを意味する。

【００４５】

本明細書で使用されるとき、「裸の送達」という用語は、担体の助けを借りず、細胞への送達を助ける部分への共有結合修飾も使用しない、細胞への送達のための製剤である。裸の送達製剤には、トランスフェクション試薬、カチオン担体、炭水化物担体、ナノ粒子担体、又はタンパク質担体のいずれも含まれない。例えば、環状ポリリボヌクレオチドの裸の送達製剤は、共有結合修飾なしで環状ポリリボヌクレオチドを含み、担体を含まない製剤である。

【００４６】

「医薬組成物」という用語は、医薬組成物内に含まれる環状又は線状ポリリボヌクレオチドを、療法によるヒト又は動物の体の処置に使用できることを開示することも意図している。

【００４７】

本明細書で使用されるとき、「ポリヌクレオチド」という用語は、１つ又は複数の核酸サブユニット又はヌクレオチドを含む分子を意味し、「核酸」又は「オリゴヌクレオチド」と互換的に使用することができる。ポリヌクレオチドは、アデノシン（Ａ）、シトシン（Ｃ）、グアニン（Ｇ）、チミン（Ｔ）、及びウラシル（Ｕ）、又はそれらの変異体から選択される１つ又は複数のヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチドは、ヌクレオシド及び少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、又はそれ以上のリン酸（PO_3）基を含み得る。ヌクレオチドは、核酸塩基、五炭糖（リボース又はデオキシリボースのいずれか）、及び１つ又は複数のリン酸基を含み得る。リボヌクレオ

チドは、糖がリボースであるヌクレオチドである。ポリリボヌクレオチド又はリボ核酸、又はＲＮＡは、ホスホジエステル結合を介して重合された複数のリボヌクレオチドを含む高分子を指し得る。デオキシリボヌクレオチドは、糖がデオキシリボースであるヌクレオチドである。本明細書で使用されるとき、チミン（Ｔ）を表すポリリボヌクレオチド配列は、ウラシル（Ｕ）を表すと理解されている。

【００４８】

本明細書で使用されるとき、本明細書中の「ポリリボヌクレオチドカーゴ」という用語は、少なくとも１つのポリリボヌクレオチドを含む任意の配列を含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、１つ又は複数の発現配列を含み、各発現配列は、ポリペプチドをコードする。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、調節又は触媒機能を有するポリリボヌクレオチドなどの１つ又は複数の非コード配列を含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、発現及び非コード配列の組み合わせを含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、本明細書に記載の１つ又は複数のポリリボヌクレオチド配列、例えば、１つ又は複数の調節要素、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）要素、又はスペーサー配列を含む。

【００４９】

本明細書で互換的に使用されるとき、「ポリＡ」又は「ポリＡ配列」という用語は、少なくとも５ヌクレオチドの長さであり、アデノシン残基からなる核酸分子の翻訳されない隣接領域を指す。いくつかの実施形態では、ポリＡ配列は、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、又は少なくとも５０ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、ポリＡ配列は、オープンリーディングフレーム（ｏｐｅｎ　ｒｅａｓｏｎ　ｆｒａｍｅ）（例えば、ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム）の３’側（例えば、その下流）に位置し、ポリＡ配列は、ポリＡが翻訳されないように、終結配列（例えば、停止コドン）の３’側に存在する。いくつかの実施形態では、ポリＡ配列は、終結配列及び３’非翻訳領域の３’側に位置する。

【００５０】

本明細書で使用されるとき、核酸の要素は、それらが転写されて、線状ＲＮＡを形成し得て、次いで本明細書に提供される方法を用いて、環状ＲＮＡに環状化され得るように、ベクターに配置される場合、「作動可能に連結されている」。

【００５１】

ポリデオキシリボヌクレオチド又はデオキシリボ核酸、又はＤＮＡは、ホスホジエステル結合を介して重合された複数のデオキシリボヌクレオチドを含む高分子を意味する。ヌクレオチドは、ヌクレオシドーリン酸又はヌクレオシドポリリン酸であり得る。ヌクレオチドは、発光タグやマーカーなどの検出可能なタグ（例えば、フルオロフォア）を含む、例えば、デオキシアデノシン三リン酸（ｄＡＴＰ）、デオキシシチジン三リン酸（ｄＣＴＰ）、デオキシグアノシン三リン酸（ｄＧＴＰ）、ウリジン三リン酸（ｄＵＴＰ）、及びデオキシチミジン三リン酸（ｄＴＴＰ）ｄＮＴＰから選択することができるデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰ）などのデオキシリボヌクレオシドポリリン酸を意味する。ヌクレオチドは、成長する核酸鎖に組み込むことができる任意のサブユニットを含み得る。このようなサブユニットは、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｔ、又はＵ、或いは、１つ又は複数の相補的なＡ、Ｃ、Ｇ、Ｔ、若しくはＵに特異的であるか、又はプリン（即ち、Ａ又はＧ、又はその変異体）若しくはピリミジン（即ち、Ｃ、Ｔ、又はＵ、又はその変異体）に相補的な任意の他のサブユニットであり得る。いくつかの例では、ポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、又はそれらの誘導体若しくは変異体である。場合によっては、ポリヌクレオチドは、いくつか例を挙げると、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、プラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ｍＲＮＡ前駆体（ｐｒｅ－ｍＲＮＡ）、アンチセンスＲＮＡ（ａｓＲＮＡ）であり、ヌクレオチド配列、及び一本鎖、二本鎖、三本鎖、らせん、ヘアピンなどのその任意の構造的実施形態の両方を包含する。場合によっては、ポリヌクレオチド分子は環

状である。ポリヌクレオチドは、様々な長さを有し得る。核酸分子は、少なくとも約１０塩基、２０塩基、３０塩基、４０塩基、５０塩基、１００塩基、２００塩基、３００塩基、４００塩基、５００塩基、１キロ塩基（ｋｂ）、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、１０ｋｂ、５０ｋｂ、又はそれ以上の長さを有し得る。ポリヌクレオチドは、細胞又は組織から単離することができる。ポリヌクレオチド配列の実施形態は、単離及び精製されたＤＮＡ／ＲＮＡ分子、合成ＤＮＡ／ＲＮＡ分子、及び合成ＤＮＡ／ＲＮＡ類似体を含み得る。

【００５２】

ポリヌクレオチドの実施形態、例えば、ポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドは、非標準ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、又は修飾ヌクレオチドを含む１つ又は複数のヌクレオチド変異体を含有するポリヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドの例には、限定されるものではないが、ジアミノプリン、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルケオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルケオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ウィブトキソシン、プソイドウラシル、ケオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、及び２，６－ジアミノプリンなどが含まれる。場合によっては、ヌクレオチドは、三リン酸部分への修飾を含む、それらのリン酸部分の修飾を含む。そのような修飾の非限定的な例としては、より長いリン酸鎖（例えば、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、又はそれ以上のリン酸部分を有するリン酸鎖）及びチオール部分の修飾（例えば、α－チオ三リン酸及びβ－チオ三リン酸）が挙げられる。実施形態では、核酸分子はまた、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格で（例えば、典型的には相補的ヌクレオチドとの水素結合を形成するのに利用できる１つ又は複数の原子で、又は典型的には相補的なヌクレオチドとの水素結合を形成できない１つ又は複数の原子で）修飾される。実施形態では、核酸分子は、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＮＨＳ）などのアミン反応性部分の共有結合を可能にするために、アミノアリル－ｄＵＴＰ（ａａ－ｄＵＴＰ）及びアミノヘキシルアクリルアミド－ｄＣＴＰ（ａｈａ－ｄＣＴＰ）などのアミン修飾基を含む。本開示のオリゴヌクレオチドにおける標準的なＤＮＡ塩基対又はＲＮＡ塩基対の代替物は、高い１立方ｍｍ当たりのビット密度、より高い安全性（天然毒素の偶発的又は意図的な合成に対する耐性）、光プログラムされたポリメラーゼにおけるより容易な識別、又は下位二次構造を提供し得る。デノボ又は増幅合成のための天然及び突然変異ポリメラーゼと適合するそのような代替塩基対は、すべての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、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に記載されている。

【００５３】

本明細書で使用されるとき、「ポリペプチド」は、ほとんどの場合ペプチド結合によって一緒に連結されたアミノ酸残基（天然又は非天然）のポリマーを意味する。この用語は、本明細書で使用されるとき、任意のサイズ、構造、又は機能のタンパク質、ポリペプチ

ド、及びペプチドを指す。ポリペプチドには、遺伝子産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、相同体、オルソログ、パラログ、それらの断片及び他の同等物、変異体、及び類似体が含まれ得る。ポリペプチドは、単一分子であっても、又は二量体、三量体、若しくは四量体などの多分子複合体であってもよい。ポリペプチドはまた、単鎖、又は抗体若しくはインスリンなどの多重鎖ポリペプチドを含み得、会合又は連結され得る。最も一般的なジスルフィド結合は、多重鎖ポリペプチドに見られる。ポリペプチドという用語は、１つ又は複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学類似体であるアミノ酸ポリマーにも適用することができる。

【００５４】

本明細書で使用されるとき、「植物改変ポリペプチド（ｐｌａｎｔ－ｍｏｄｉｆｙｉｎｇ　ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ）」という用語は、遺伝的特性（例えば、遺伝子発現を増加させる、遺伝子発現を低下させる、又はそれ以外ではＤＮＡ若しくはＲＮＡのヌクレオチド配列を改変する）、エピジェネティック特性、又は植物の生化学的若しくは生理学的特性を、植物の生理又は表現型の変化、例えば植物適応度の増加又は低下をもたらす方法で改変し得るポリペプチドを指す。

【００５５】

本明細書で使用されるとき、「調節要素」という用語は、環状又は線状ポリリボヌクレオチド内の発現配列の発現を変更する、核酸配列などの部分である。

【００５６】

本明細書で使用されるとき、「スペーサー」は、２つの隣接するポリヌクレオチド領域間に距離又は柔軟性をもたらす（例えば、１つ以上のヌクレオチドの）任意の隣接するヌクレオチド配列を指す。

【００５７】

本明細書で使用されるとき、「配列同一性」という用語は、グローバル又はローカルアラインメントアルゴリズムを使用して２つのペプチド配列又は２つのヌクレオチド配列のアラインメントによって決定される。配列は、それらが最適に整列された場合（デフォルトパラメータを使用して、ＧＡＰ又はＢＥＳＴＦＩＴなどのプログラムによって整列された場合）に少なくとも特定の最小パーセンテージの配列同一性を共有する場合、「実質的に同一」又は「本質的に類似」と呼ばれる。ＧＡＰは、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ及びＷｕｎｓｃｈグローバルアラインメントアルゴリズムを使用して、２つの配列をその全長にわたって整列させ、一致の数を最大化し、ギャップの数を最小化する。一般に、ギャップ作成ペナルティ＝５０（ヌクレオチド）／８（タンパク質）及びギャップ拡張ペナルティ＝３（ヌクレオチド）／２（タンパク質）のＧＡＰのデフォルトパラメータが使用される。ヌクレオチドの場合、使用されるデフォルトのスコア行列は、ｎｗｓｇａｐｄｎａであり、タンパク質の場合、デフォルトのスコア行列は、Ｂｌｏｓｕｍ６２である（Ｈｅｎｉｋｏｆｆ＆Ｈｅｎｉｋｏｆｆ，１９９２，ＰＮＡＳ　８９，９１５－９１９）。配列アラインメント及び配列同一性パーセンテージのスコアは、例えば、Ａｃｃｅｌｒｙｓ　Ｉｎｃ．，９６８５　Ｓｃｒａｎｔｏｎ　Ｒｏａｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ　９２１２１－３７５２　ＵＳＡから入手可能なＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ　１０．３又はＥｍｂｏｓｓＷｉｎ　ｖｅｒｓｉｏｎ　２．１０．０（プログラム「針」を使用）などのコンピュータープログラムを使用して決定される。別法又はこれに加えて、パーセント同一性は、例えば、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴなどのアルゴリズムを使用してデータベースで検索することによって決定される。配列同一性は、配列の全長にわたる配列同一性を指す。

【００５８】

本明細書で使用されるとき、ＲＮＡに関して「構造化された」は、それ自身又は同じＲＮＡ分子中の他の配列を用いる構造（例えば、ヘアピンループ）を形成するため、ＲＮＡＦｏｌｄソフトウェア又は類似の予測ツールによって予測されるＲＮＡ配列を指す。

【００５９】

本明細書で使用されるとき、「対象」という用語は、動物、植物、又は微生物などの生

物を指す。実施形態では、対象は、脊椎動物（例えば、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、又は両生類）である。実施形態では、対象はヒトである。実施形態では、対象は非ヒト哺乳動物である。実施形態では、対象は、非ヒト霊長類（例えば、サル、類人猿）、有蹄動物（例えば、ウシ、水牛、バイソン、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ラクダ、ラマ、アルパカ、シカ、ウマ、ロバ）、肉食動物（例えば、イヌ、ネコ）、齧歯類（例えば、ラット、マウス）、又はウサギ類（例えば、ウサギ）などの非ヒト哺乳動物である。実施形態では、対象は、キジ目（Ｇａｌｌｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、キジ、ウズラ）、ガンカモ目（Ａｎｓｅｒｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、アヒル、ガチョウ）、古顎類（Ｐａｌｅａｏｇｎａｔｈａｅ）（例えば、ダチョウ、エミュー）、ハト目（Ｃｏｌｕｍｂｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、ハト（ｐｉｇｅｏｎｓ）、ハト（ｄｏｖｅｓ））、又はオウム目（Ｐｓｉｔｔａｃｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、オウム）といった鳥類分類群のメンバーなどの鳥類である。実施形態では、対象は、節足動物（例えば、昆虫、クモ類、甲殻類）、線虫、環形動物、蠕虫、又は軟体類などの無脊椎動物である。実施形態では、対象は、無脊椎動物の農業害虫又は無脊椎動物若しくは脊椎動物宿主に対する寄生虫である無脊椎動物である。実施形態では、対象は、被子植物（双子葉又は単子葉であり得る）又は裸子植物（例えば、針葉樹、ソテツ、マオウ門（Ｇｎｅｔｏｐｈｙｔｅ）、イチョウ）、シダ、ツクシ、ヒカゲノカズラ、又はコケ植物などの植物である。実施形態では、対象は、真核藻類（単細胞又は多細胞）である。実施形態では、対象は、作条作物、果実生成植物及び樹木、野菜、樹木、及び観賞植物、例えば、観賞花、低木、樹木、グランドカバー、及び芝生などの農業又は園芸上重要な植物である。

【００６０】

本明細書で使用されるとき、「処置する」又は「処置すること」という用語は、対象の疾患又は障害（例えば、感染症、がん、毒性、又はアレルギー反応）の予防的又は治療的処置を指す。処置の効果には、疾患又は疾患若しくは障害の１つ若しくは複数の徴候若しくは発現の逆転、軽減、重症度の軽減、治癒、進行の阻害、再発の可能性の低減、疾患又は障害の状態の安定化（即ち、悪化しないこと）、又は治療的処置がない場合の疾患又は障害の状態又は症状と比較して、疾患又は障害の蔓延の防止が含まれ得る。実施形態は、植物を処置して、無脊椎動物害虫又は微生物（例えば、細菌、真菌、卵菌、又はウイルス）病原体に起因するか又はそれと関連する疾患又は有害な症状を制御することを含む。実施形態は、植物を処置して、害虫又は病原体圧力に耐える植物の自然防御能又は免疫能を増加させることを含む。

【００６１】

本明細書で使用されるとき、「終結要素」という用語は、環状又は線状ポリリボヌクレオチドにおける発現配列の翻訳を終結させる核酸配列などの部分である。

【００６２】

本明細書で使用されるとき、「翻訳効率」という用語は、リボヌクレオチド転写産物からのタンパク質又はペプチド産生の速度又は量である。ある実施形態では、翻訳効率は、例えば、所与の翻訳系、例えば、ウサギ網状赤血球溶解物のような無細胞翻訳系において、例えば所与の期間で、タンパク質又はペプチドをコードする所与の量の１転写産物当たりで生成されるタンパク質又はペプチドの量として表され得る。

【００６３】

本明細書で使用されるとき、「翻訳開始配列」という用語は、環状又は線状ポリリボヌクレオチドにおける発現配列の翻訳を開始させる核酸配列である。

【００６４】

本明細書で使用されるとき、「治療用ポリペプチド」という用語は、対象に投与されるか又は対象で発現されると、いくつかの治療的利益を提供するポリペプチドを指す。実施形態では、治療用ポリペプチドを使用して、対象における疾患、障害、又は症状を、治療用ペプチドの対象への投与によって、又は治療用ポリペプチドの対象における発現によって処置又は予防する。他の実施形態では、治療用ポリペプチドは、細胞内で発現され、細胞は、対象に投与することで、治療的利益を提供する。

【００６５】
本明細書で使用されるとき、「ベクター」は、（例えば、ＰＣＲを使用して）合成される、又は外来ＤＮＡ断片がクローニング若しくは発現を目的として挿入可能である、若しくは挿入されている高次生物のウイルス、プラスミド、若しくは細胞から採取される、ＤＮＡの断片を意味する。いくつかの実施形態では、ベクターは、生物内で安定に維持され得る。ベクターは、例えば、複製起点、選択可能マーカー又はレポーター遺伝子、例えば、抗生物質耐性若しくはＧＦＰ、又は複数のクローニング部位（ＭＣＳ）を含み得る。該用語は、直鎖状ＤＮＡ断片（例えば、ＰＣＲ産物、線状化プラスミド断片）、プラスミドベクター、ウイルスベクター、コスミド、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）などを含む。一実施形態では、本明細書に提供されるベクターは、複数のクローニング部位（ＭＣＳ）を含む。別の実施形態では、本明細書に提供されるベクターはＭＣＳを含まない。

【図面の簡単な説明】

【００６６】
【図１】５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴う例示的なアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（図１Ａ）及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的なアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（図１Ｂ）を示す概略図である。
【図２】５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴う例示的なアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（図２Ａ）及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的なアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（図２Ｂ）の構造を示す概略図である。
【図３】５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ１）、拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ２）、及び１．２ＫｂのＲＮＡ（図３Ａ）又は４．５ＫｂのＲＮＡ（図３Ｂ）のいずれかを伴うＡｎａｂａｅｎａ３の環状化効率を示すグラフである。
【図４】３つの異なる時点で、５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ１）、拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ２）、又はＡｎａｂａｅｎａ３により生成された環状ＲＮＡからのＧｌｕｃの相対的発現を示すグラフである。
【図５】３つの異なる時点で、５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ１）、拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ２）、又はＡｎａｂａｅｎａ３により生成された環状ＲＮＡからのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の相対的発現を示すグラフである。
【図６】Ｅ２とＥ１との間にいくつかの拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソンの例示的設計を示す概略図である。
【図７】拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ２）、及びアニーリング領域の５、１０、又は１５ヌクレオチド拡張をさらに伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソンの場合の環状化効率を示すグラフである。
【図８】拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ２）、及びアニーリング領域の５、１０、又は１５ヌクレオチド拡張をさらに伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソンの場合の３つの異なる時点での発現を示すグラフである。
【図９】６ヌクレオチドのアニーリング領域を伴う例示的なテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）置換イントロン－エクソン（図９Ａ）及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的なテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）置換イントロン－エクソン（図

９Ｂ）を示す概略図である。
【図１０】６ヌクレオチドのアニーリング領域を伴う例示的なテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）置換イントロン－エクソン（図９Ａ）及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的なテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）置換イントロン－エクソン（図９Ｂ）の構造を示す概略図である。
【図１１】６ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ１）及び拡張されたアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ２）の環状化効率を示すグラフである。
【図１２】２ヌクレオチドのアニーリング領域を伴う例示的なＴ４ファージ置換イントロン－エクソン（図１２Ａ）及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的なＴ４ファージ置換イントロン－エクソン（図１２Ｂ）を示す概略図である。
【図１３】２ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うＴ４ファージ置換イントロン－エクソン（Ｔ４ファージ１）及び拡張されたアニーリング領域を伴うＴ４ファージ置換イントロン－エクソン（Ｔ４ファージ２）の環状化効率を示すグラフである。
【図１４】アニーリング領域を伴う例示的な置換イントロン－エクソン（図１４Ａ）及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的な置換イントロン－エクソン（図１４Ｂ）を示す概略図である。
【図１５】７ヌクレオチドのアニーリング領域を伴う例示的なシネココッカス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ）置換イントロン－エクソン（図１５Ａ）並びに修飾及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的なシネココッカス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ）置換イントロン－エクソン（図１５Ｂ）の構造を示す概略図である。
【図１６】５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴う例示的なアナベナ・アゾラエ（Ａｎａｂａｅｎａ　ａｚｏｌｌａｅ）置換イントロン－エクソン（図１６Ａ）並びに修飾及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的なアナベナ・アゾラエ（Ａｎａｂａｅｎａ　ａｚｏｌｌａｅ）置換イントロン－エクソン（図１６Ｂ）の構造を示す概略図である。
【図１７】５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴う例示的なアナベナ・シリンドリカ（Ａｎａｂａｅｎａ　ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ）（図１７Ａ）並びに修飾及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的なアナベナ・シリンドリカ（Ａｎａｂａｅｎａ　ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ）置換イントロン－エクソン（図１７Ｂ）の構造を示す概略図である。
【図１８】５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴う例示的なスキトネマ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ）置換イントロン－エクソン（図１８Ａ）並びに修飾及び拡張されたアニーリング領域を伴う例示的なスキトネマ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ）置換イントロン－エクソン（図１８Ｂ）の構造を示す概略図である。
【図１９】アニーリング領域を伴う様々な置換イントロン－エクソンに対する例示的修飾を示す表である。太字は、元のアニーリング領域を特定し；イタリック体及び下線は、拡張されたアニーリングに対する例示的修飾を特定する。
【図２０】４．５ＫｂのＲＮＡを伴う様々な修飾された置換イントロン－エクソンの環状化の、４．５ＫｂのＲＮＡを伴う非修飾（元の）置換イントロン－エクソンと比較した倍数増加を示すグラフである。拡張されたＥ２－Ｅ１アニーリング領域を伴う置換イントロン－エクソンを有するグループＩイントロンの場合、増強された環状化効率が認められる。
【図２１】（図２１Ａ）アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシングイントロンの二次構造を示す概略図である。Ｐ６ｂにおける置換領域が強調される。　（図２１Ｂ）拡張されたＰ６ｂステムを伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ４）、又はＰ６ｂのバルジのステムへの変化を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ５）の例示的設計の構造を示す概略図である。
【図２２】拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ２）、５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うア

ナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）置換イントロン－エクソン（Ａｎａｂａｅｎａ１）、Ａｎａｂａｅｎａ４、及びＡｎａｂａｅｎａ５の場合の環状化効率を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００６７】

本発明は、環状ポリリボヌクレオチド（環状ＲＮＡ）を生成するための組成物及び方法を特徴とする。本明細書に記載の環状ポリリボヌクレオチドは、ポリヌクレオチドカーゴ（例えば、遺伝子又はタンパク質をコードする）を標的細胞に送達するのに特に有用である。

【００６８】

環状ポリリボヌクレオチドは、線状ポリリボヌクレオチドから生成することができ、そこで、末端は一緒に自己スプライスされ、それにより環状ポリリボヌクレオチドを形成する。本明細書に記載の線状ＲＮＡ分子は、５’から３’へ、（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；（Ｃ）３’エクソン断片；（Ｄ）ポリリボヌクレオチドカーゴ；（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；及び（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分を含む。ポリリボヌクレオチドは、２～５０、例えば、８～５０リボヌクレオチドを有し、且つ（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；又は（Ｃ）３’エクソン断片の内部に存在する第１のアニーリング領域を含む。ポリリボヌクレオチドは、２～５０、例えば、８～５０リボヌクレオチドを有し、且つ（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；又は（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分の内部に存在する第２のアニーリング領域も含む。第１のアニーリング領域は、第２のアニーリング領域と８０％～１００％の相補性を有する、又は０～１０のミスマッチ塩基対を有する。これらの特徴は、第１のアニーリング領域が第２のアニーリング領域とハイブリダイズし、それにより線状ポリリボヌクレオチドの５’及び３’末端近傍のスプライス部位を接近状態にすることを可能にする。一旦スプライス部位が近傍に存在すると、ポリリボヌクレオチドは、３’及び５’スプライス部位を自己スプライスし、それにより環状ポリリボヌクレオチドを形成することができる。

【００６９】

例えば、（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；又は（Ｃ）３’エクソン断片の内部に第１のアニーリング領域を、また例えば、（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；又は（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分の内部に第２のアニーリング領域を含めることにより、線状分子は、これらの特徴を欠いている他のポリリボヌクレオチド構築物と比較すると、増加した環状化効率及びスプライシング忠実度を示す。さらに、自己触媒性の自己スプライシングイントロンを使用することにより、線状分子は、環状ポリリボヌクレオチドを生成するため、リガーゼなどの外因性酵素で処理される必要がない。これは、単一ポット反応で環状生成物を生成するのに特に有利である。生成する分子、方法、及びその使用は、以下により詳細に記載される。

【００７０】

ポリヌクレオチド

本開示は、環状ポリリボヌクレオチド組成物及び環状ポリリボヌクレオチドを作製する方法を特徴とする。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、線状ポリリボヌクレオチドから（例えば、線状ポリリボヌクレオチドの自己スプライシングに適合可能な末端により）生成される。いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド鋳型（例えば、ベクター、線状化ベクター、又はｃＤＮＡ）から転写される。したがって、本開示は、環状ポリリボヌクレオチドの生成において有用である、デオキシリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド、及び環状ポリリボヌクレオチド及びその組成物を特徴とする。

【００７１】

鋳型デオキシリボヌクレオチド

本発明は、環状ＲＮＡを作製するための鋳型デオキシリボヌクレオチドを特徴とする。

デオキシリボヌクレオチドは、５’から３’への方向で作動可能に連結されている以下を含む：（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；（Ｃ）３’エクソン断片；（Ｄ）ポリリボヌクレオチドカーゴ；（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；及び（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分。実施形態では、デオキシリボヌクレオチドは、さらなる要素を、例えば、要素（Ａ）、（Ｂ）、（Ｃ）、（Ｄ）、（Ｅ）、（Ｆ）、又は（Ｇ）の外部又はそれら要素のいずれかの間に含む。実施形態では、要素（Ａ）、（Ｂ）、（Ｃ）、（Ｄ）、（Ｅ）、（Ｆ）、又は（Ｇ）のいずれかは、本明細書に記載のとおり、スペーサー配列によって互いに分離されている。

【００７２】

実施形態では、デオキシリボヌクレオチドは、例えば、環状ＤＮＡベクター、線状化ＤＮＡベクター、又は線状ＤＮＡ（例えば、ＤＮＡベクターから生成される、例えばｃＤＮＡ）である。

【００７３】

いくつかの実施形態では、デオキシリボヌクレオチドは、本明細書に記載の線状ＲＮＡをコードする配列に作動可能に連結されているＲＮＡポリメラーゼプロモーターをさらに含む。実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターは、線状ＲＮＡをコードする配列に対して異種である。いくつかの実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターは、Ｔ７プロモーター、Ｔ６プロモーター、Ｔ４プロモーター、Ｔ３プロモーター、ＳＰ６ウイルスプロモーター、又はＳＰ３プロモーターである。

【００７４】

いくつかの実施形態では、デオキシリボヌクレオチドは、多重クローニング部位（ＭＣＳ）を含む。

【００７５】

いくつかの実施形態では、デオキシリボヌクレオチドを使用して、約１００～約２０，０００ヌクレオチドのサイズ範囲を有する環状ＲＮＡを生成する。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、少なくとも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又は５，０００ヌクレオチドのサイズである。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、２０，０００、１５，０００、１０，０００、９，０００、８，０００、７，０００、６，０００、５，０００又は４，０００ヌクレオチド以下のサイズである。

【００７６】

線状ポリリボヌクレオチド

本発明はまた、以下の、５’から３’への方向で作動可能に連結されている以下を含む線状ポリリボヌクレオチドを特徴とする：（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；（Ｃ）３’エクソン断片；（Ｄ）ポリリボヌクレオチドカーゴ；（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；及び（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分。実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、さらなる要素を、例えば、要素（Ａ）、（Ｂ）、（Ｃ）、（Ｄ）、（Ｅ）、（Ｆ）、又は（Ｇ）の外部又はそれら要素のいずれかの間に含み、例えば、要素（Ａ）、（Ｂ）、（Ｃ）、（Ｄ）、（Ｅ）、（Ｆ）、又は（Ｇ）のいずれかは、本明細書に記載のとおり、スペーサー配列によって分離され得る。

【００７７】

特定の実施形態では、本明細書に提供されるのは、本明細書に提供されるデオキシリボヌクレオチド（例えば、ベクター、線状化ベクター、又はｃＤＮＡ）を鋳型（例えば、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターが線状ＲＮＡをコードする領域の上流に配置された、本明細書に提供されるベクター、線状化ベクター、又はｃＤＮＡ）として使用して、無細胞系における転写（例えば、インビトロ転写）を実施することによって線状ＲＮＡを生成する方法である。

【００７８】
実施形態では、デオキシリボヌクレオチド鋳型は、転写され、本明細書に記載の成分を含有する線状ＲＮＡを生成する。発現時、線状ポリリボヌクレオチドは、スプライシングに適合可能なポリリボヌクレオチドを生成し、それは自己スプライスされることで、環状ポリリボヌクレオチドを生成し得る。
【００７９】
いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、５０～２０，０００、１００～２０，０００、２００～２０，０００、３００～２０，０００（例えば、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、又は２０，０００）リボヌクレオチドの長さである。実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、例えば、少なくとも５００、少なくとも１，０００、少なくとも２，０００、少なくとも３，０００、少なくとも４，０００、又は少なくとも５，０００リボヌクレオチドの長さである。
【００８０】
環状ポリリボヌクレオチド
いくつかの実施形態では、本発明は、環状ポリリボヌクレオチド（例えば、共有的に閉じている環状ポリリボヌクレオチド）を特徴とする。実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、５’エクソン断片及び３’エクソン断片を連結するスプライス結合を含む。実施形態では、３’エクソン断片は、２～５０、例えば、８～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、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、又は５０）リボヌクレオチドを有する第１のアニーリング領域を含み、５’エクソン断片は、２～５０、例えば、８～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、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、又は５０）リボヌクレオチドを有する第２のアニーリング領域を含む。実施形態では、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域は、８０％～１００％（例えば、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の相補性を含む。実施形態では、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域は、０～１０（例えば、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）のミスマッチ塩基対を含む。
【００８１】
実施形態では、環状ポリヌクレオチドは、ポリリボヌクレオチドカーゴをさらに含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、発現（又はコード）配列、非コード配列、又は発現（コード）配列及び非コード配列の組み合わせを含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、ポリペプチドをコードする発現（コード）配列を含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする発現配列に作動可能に連結されているＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、発現配列の上流に位置する。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、発現配列の下流に位置する。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、ＩＲＥＳと３’エクソン断片又は５’エクソン断片との間にスペーサー領域をさらに含む。スペーサー領域は、例えば、少なくとも５（例えば、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０）リボヌクレオチドの長さであってもよい。スペーサー領域は、例えば、５～５００（例えば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５

０、４００、４５０、又は５００）リボヌクレオチドであってもよい。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ポリＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ポリＡ－Ｃ配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ポリＡ－Ｇ配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ポリＡ－Ｔ配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサー領域は、ランダム配列を含む。いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域は連結され、それにより環状ポリリボヌクレオチドが形成される。

【００８２】

いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、本明細書に記載のデオキシリボヌクレオチド鋳型又は線状ＲＮＡによって生成される。いくつかの実施形態では、環状ＲＮＡは、本明細書に記載の方法のいずれかによって生成される。

【００８３】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、少なくとも約２０ヌクレオチド、少なくとも約３０ヌクレオチド、少なくとも約４０ヌクレオチド、少なくとも約５０ヌクレオチド、少なくとも約７５ヌクレオチド、少なくとも約１００ヌクレオチド、少なくとも約２００ヌクレオチド、少なくとも約３００ヌクレオチド、少なくとも約４００ヌクレオチド、少なくとも約５００ヌクレオチド、少なくとも約１，０００ヌクレオチド、少なくとも約２，０００ヌクレオチド、少なくとも約５，０００ヌクレオチド、少なくとも約６，０００ヌクレオチド、少なくとも約７，０００ヌクレオチド、少なくとも約８，０００ヌクレオチド、少なくとも約９，０００ヌクレオチド、少なくとも約１０，０００ヌクレオチド、少なくとも約１２，０００ヌクレオチド、少なくとも約１４，０００ヌクレオチド、少なくとも約１５，０００ヌクレオチド、少なくとも約１６，０００ヌクレオチド、少なくとも約１７，０００ヌクレオチド、少なくとも約１８，０００ヌクレオチド、少なくとも約１９，０００ヌクレオチド、又は少なくとも約２０，０００ヌクレオチドである。

【００８４】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、リボソームへの結合部位を収容するのに十分なサイズである。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドのサイズは、有用なポリペプチドをコードするのに十分な長さであり、例えば、少なくとも２０，０００ヌクレオチド、少なくとも１５，０００ヌクレオチド、少なくとも１０，０００ヌクレオチド、少なくとも７，５００ヌクレオチド、少なくとも５，０００ヌクレオチド、少なくとも４，０００ヌクレオチド、少なくとも３，０００ヌクレオチド、少なくとも２，０００ヌクレオチド、少なくとも１，０００ヌクレオチド、少なくとも５００ヌクレオチド、少なくとも１４００ヌクレオチド、少なくとも３００ヌクレオチド、少なくとも２００ヌクレオチド、又は少なくとも１００ヌクレオチドが生成され得る。

【００８５】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、本明細書中の他の箇所に記載の１つ以上の要素を含む。いくつかの実施形態では、要素は、スペーサー配列によって互いに分離される。いくつかの実施形態では、要素は、１リボヌクレオチド、２ヌクレオチド、約５ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド、約１５ヌクレオチド、約２０ヌクレオチド、約３０ヌクレオチド、約４０ヌクレオチド、約５０ヌクレオチド、約６０ヌクレオチド、約８０ヌクレオチド、約１００ヌクレオチド、約１５０ヌクレオチド、約２００ヌクレオチド、約２５０ヌクレオチド、約３００ヌクレオチド、約４００ヌクレオチド、約５００ヌクレオチド、約６００ヌクレオチド、約７００ヌクレオチド、約８００ヌクレオチド、約９００ヌクレオチド、約１０００ヌクレオチド、最大約１ｋｂ、少なくとも約１０００ヌクレオチド、又はそれらの間の任意の量のヌクレオチドによって互いに分離される。いくつかの実施形態では、１つ以上の要素は、互いに隣接しており、例えばスペーサーエレメントを欠いている。

【００８６】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、本明細書中の他の箇所に記載

の１つ以上の反復エレメントを含む。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、本明細書中の他の箇所に記載の１つ以上の修飾を含む。一実施形態では、環状ＲＮＡは、少なくとも１つのヌクレオシド修飾を含む。一実施形態では、環状ＲＮＡのヌクレオシドの最大１００％が修飾される。一実施形態では、少なくとも１つのヌクレオシド修飾は、ウリジン修飾又はアデノシン修飾である。

【００８７】

その環状化の結果として、環状ポリリボヌクレオチドは、それを線状ＲＮＡと区別する特定の特徴を含み得る。例えば、環状ポリリボヌクレオチドは、線状ＲＮＡと比較して、エキソヌクレアーゼによる分解をより受けにくい。そのようなものとして、環状ポリリボヌクレオチドは、特にエキソヌクレアーゼの存在下でインキュベートされる際、線状ＲＮＡより安定である。環状ポリリボヌクレオチドの線状ＲＮＡと比較して増加した安定性は、環状ポリリボヌクレオチドを、ポリペプチドを生成するための細胞形質転換試薬としてより有用なものにし、線状ＲＮＡより容易に、より長い間、貯蔵することができる。エキソヌクレアーゼで処理された環状ポリリボヌクレオチドの安定性は、（例えば、ゲル電気泳動により）ＲＮＡ分解が生じているか否かを判定する、当該技術分野における標準の方法を用いて試験することができる。さらに、線状ＲＮＡと異なり、環状ポリリボヌクレオチドは、環状ポリリボヌクレオチドがホスファターゼ、例えば子ウシ腸ホスファターゼとともにインキュベートされる際、脱リン酸化をより受けにくい。

【００８８】

アニーリング領域

本明細書に記載のポリヌクレオチド組成物は、２つ以上のアニーリング領域、例えば、本明細書に記載の２つ以上のアニーリング領域を含み得る。アニーリング領域、又はアニーリング領域の対は、好適な条件下でハイブリダイゼーションを促進する高度な相補性を有する部分を含むものである。

【００８９】

アニーリング領域は、少なくとも本明細書に記載される相補的領域を含む。相補的領域の高度な相補性は、アニーリング領域対の会合を促進する。第１のアニーリング領域（例えば、５’アニーリング領域）が線状ＲＮＡの５’末端又はその近傍に位置し、且つ第２のアニーリング領域（例えば、３’アニーリング領域）が線状ＲＮＡの３’末端又はその近傍に位置する場合、アニーリング領域の会合により、５’及び３’及び対応するイントロン断片が近接状態になる。いくつかの実施形態では、これは、３’及び５’スプライス部位のスプライシングによる線状ＲＮＡの環状化を支持する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアニーリング領域は、天然に存在するアニーリング領域を強化し、例えば、自己スプライシングを促進する。

【００９０】

アニーリング領域は、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、又はそれ以上）の変異をポリリボヌクレオチド配列に導入することによって改変することができる。例えば、アニーリング領域を、１つ以上の点変異を第１のアニーリング領域及び／又は第２のアニーリング領域に導入することによって拡張させ、第１及び第２のアニーリング領域間の相補性の長さを増加させることができる。アニーリング領域はまた、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、又はそれ以上）のヌクレオチドをポリリボヌクレオチドに挿入することによって変更することができる。実施形態では、アニーリング領域は、１つ以上のヌクレオチドを第１のアニーリング領域及び／又は第２のアニーリング領域に挿入することによって拡張され、第１及び第２のアニーリング領域間の相補性の長さが増加する。実施形態では、アニーリング領域を、１つ以上の点変異を第１アニーリング及び／又は第２の領域に導入し、１つ以上のヌクレオチドを第１のアニーリング及び／又は第２のアニーリング領域に挿入することによって拡張され、相補性の長さが増加する。アニーリング領域を変更することで、元の配列を有するバルジ又はミスマッチ領域を支持することによって

ポリリボヌクレオチドの二次構造が変更され、変更された配列を有するステム又はステムループ構造を優先的に形成することができる。

【００９１】

ポリリボヌクレオチドは、２～５０、５～５０、６～５０、７～５０、又は８～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、少なくとも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、又は５０）リボヌクレオチドを有し、且つ（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；又は（Ｃ）３’エクソン断片の内部に存在する第１のアニーリング領域を含む。ポリリボヌクレオチドは、２～５０、５～５０、６～５０、７～５０、又は８～５０（例えば、１０～３０、１０～２０、又は１０～１５、例えば、少なくとも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、又は５０）リボヌクレオチドを有し、且つ（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；又は（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分の内部に存在する第２のアニーリング領域も含む。第１のアニーリング領域は、第２のアニーリング領域と８０％～１００％（例えば、８５％～１００％、例えば、９０％～１００％、例えば、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の相補性を有する、又は０～１０、例えば、（０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）のミスマッチ塩基対を有する。

【００９２】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域は、１００％相補的である。

【００９３】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域は、５’－ＴＣＣＧＴ－３’の配列（配列番号１）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有し、第２のアニーリング領域は、５’－ＡＣＧＧＡ－３’の配列（配列番号２）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【００９４】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域は、５’－ＴＣＣＧＴＡＧＣＧＴＣＴ－３’の配列（配列番号５）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有し、第２のアニーリング領域は、５’－ＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡ－３’の配列（配列番号６）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【００９５】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域は、５’－ＴＣＣＧＴＡＧＣＧＴＣＴＡＡＡＣＧ－３’の配列（配列番号２２）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有し、第２のアニーリング領域は、５’－ＣＧＴＴＴＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡ－３’の配列（配列番号２３）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【００９６】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域は、５’－ＴＣＣＧＴＡＧＣＧＴＣＴＡＡＡＣＧＧＴＣＧＴ－３’の配列（配列番号２４）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有し、第２のアニーリング領域は、５’－ＡＣＧＡＣＣＧＴＴＴＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡ－

３’の配列（配列番号２５）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【００９７】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域は、５’－ＴＣＣＧＴＡＧＣＧＴＣＴＡＡＡＣＧＧＴＣＧＴＧＴＧＧＧ－３’の配列（配列番号２６）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有し、第２のアニーリング領域は、５’－ＣＣＣＡＣＡＣＧＡＣＣＧＴＴＴＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡ－３’の配列（配列番号２７）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【００９８】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域は、５’－ＡＡＧＧＴＡ－３’の配列（配列番号１３）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有し、第２のアニーリング領域は、５’－ＴＡＣＣＴＴ－３’の配列（配列番号１４）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【００９９】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域は、５’－ＡＡＧＧＴＡＡＡＴＡＴＴ－３’の配列（配列番号１６）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有し、第２のアニーリング領域は、５’－ＡＡＴＡＴＴＴＡＣＣＴＴ－３’の配列（配列番号１７）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１００】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域は、５’－ＣＴ－３’の配列を有し、第２のアニーリング領域は、５’－ＡＧ－３’の配列を有する。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域は、５’－ＣＴＣＡＡＴＴ－３’の配列（配列番号２０）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有し、第２のアニーリング領域は、５’－ＡＡＴＴＧＡＧ－３’の配列（配列番号２１）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、（Ａ）又は（Ｃ）は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）又は（Ｇ）は、第２のアニーリング領域を含む。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）の５’エクソン断片は、第２のアニーリング領域を含む。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）の５’エクソン断片は、第２のアニーリング領域を含む。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、第１のアニーリング領域を含み、グループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、第２のアニーリング領域を含む。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域は、０又は１つのミスマッチ塩基対を含む。

【０１０７】

実施形態では、アニーリング領域は、下記のような非相補的領域をさらに含む。非相補的領域を相補的領域に付加することで、ＲＮＡの末端が柔軟性、不定形性、又は相補性領

域より低い構造性を維持することを可能にする。
【０１０８】
いくつかの実施形態では、各アニーリング領域は、２～１００、５～１００、又は６～１００リボヌクレオチド（例えば、６～８０、６～５０、６～３０、６～２０、１０～１００、１０～８０、１０～５０、又は１０～３０リボヌクレオチド）を含む。いくつかの実施形態では、５’アニーリング領域は、２～１００、５～１００、６～１００リボヌクレオチド（例えば、６～８０、６～５０、６～３０、６～２０、１０～１００、１０～８０、１０～５０、又は１０～３０リボヌクレオチド）を含む。いくつかの実施形態では、３’アニーリング領域は、６～１００リボヌクレオチド（例えば、６～８０、６～５０、６～３０、６～２０、１０～１００、１０～８０、１０～５０、又は１０～３０リボヌクレオチド）を含む。
【０１０９】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、（Ｇ）の５’側のアニーリング領域との部分的又は完全な核酸相補性を含む（Ａ）の３’側のアニーリング領域を含まない。
【０１１０】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、例えば、第１のアニーリング領域及び第２のアニーリング領域に加えて、さらなるアニーリング領域を含まない。
【０１１１】
相補的領域
相補的領域は、対応する相補的領域との会合を好適な条件下で支持する領域である、例えば、相補的領域の対は、高度な配列相補性を共有し得る（例えば、第１の相補的領域は、少なくとも部分的には第２の相補的領域の逆相補である）。２つの相補的領域が会合する（例えば、ハイブリダイズする）場合、それらは、ステム又はステムループなどの高度に構造化された二次構造を形成し得る。
【０１１２】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、５’相補的領域及び３’相補的領域を含む。いくつかの実施形態では、５’相補的領域は、２～５０、例えば、５～５０リボヌクレオチド（例えば、５～４０、５～３０、５～２０、５～１０、１０～５０、１０～４０、１０～３０、１０～２０、又は２０～５０、例えば、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、又は５０リボヌクレオチド）を有する。いくつかの実施形態では、３’相補的領域は、２～５０、例えば、５～５０リボヌクレオチド（例えば、５～４０、５～３０、５～２０、５～１０、１０～５０、１０～４０、１０～３０、１０～２０、又は２０～５０、例えば、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、又は５０リボヌクレオチド）を有する。
【０１１３】
いくつかの実施形態では、５’相補的領域及び３’相補的領域は、５０％～１００％の配列相補性（例えば、６０％～１００％、７０％～１００％、８０％～１００％、９０％～１００％、又は１００％、例えば、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％の配列相補性）を有する。
【０１１４】
いくつかの実施形態では、５’相補的領域及び３’相補的領域は、－５ｋｃａｌ／モル未満（例えば、－１０ｋｃａｌ／モル未満、－２０ｋｃａｌ／モル未満、又は－３０ｋｃａｌ／モル未満）の結合の自由エネルギーを有する。
【０１１５】
いくつかの実施形態では、５’相補的領域及び３’相補的領域は、少なくとも１０℃、少

なくとも１５℃、少なくとも２０℃、少なくとも３０℃、少なくとも４０℃、少なくとも５０℃、少なくとも６０℃、少なくとも７０℃、少なくとも８０℃、又は少なくとも９０℃の結合のＴｍを有する。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、５’相補的領域及び３’相補的領域は、少なくとも１つであるが１０以下のミスマッチ、例えば、１０、９、８、７、６、５、４、３、若しくは２つのミスマッチ、又は１つのミスマッチを含む（即ち、５’相補的領域及び３’相補的領域が互いにハイブリダイズする場合）。ミスマッチは、例えば、互いに逆である（即ち、５’相補的領域及び３’相補的領域がハイブリダイズされる場合）が、ワトソン・クリック塩基対を形成しない、５’相補的領域内のヌクレオチド及び３’相補的領域内のヌクレオチドであり得る。ミスマッチは、例えば、５’相補的領域又は３’相補的領域のいずれかにおいてキンク又はバルジを形成する不対ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、５’相補的領域及び３’相補的領域は、ミスマッチを全く含まない。

【０１１７】

非相補的領域

非相補的領域は、対応する非相補的領域との会合を好適な条件下で支持しない領域である。例えば、非相補的領域の対は、低度な配列相補性を共有し得る（例えば、第１の非相補的領域は、第２の非相補的領域の逆相補でない）。２つの非相補的領域が近接状態にある場合、それらはステム又はステムループなどの高度に構造化された二次構造を形成しない。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、５’非相補的領域及び３’非相補的領域を含む。いくつかの実施形態では、５’非相補的領域は、５～５０リボヌクレオチド（例えば、５～４０、５～３０、５～２０、５～１０、１０～５０、１０～４０、１０～３０、１０～２０、又は２０～５０リボヌクレオチド）を有する。いくつかの実施形態では、３’非相補的領域は、５～５０リボヌクレオチド（例えば、５～４０、５～３０、５～２０、５～１０、１０～５０、１０～４０、１０～３０、１０～２０、又は２０～５０リボヌクレオチド）を有する。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、５’非相補的領域は、５’相補的領域の５’側（例えば、５’触媒イントロン断片と５’相補的領域との間）に位置する。いくつかの実施形態では、３’非相補的領域は、３’相補的領域の３’側（例えば、３’相補的領域と３’触媒イントロン断片との間）に位置する。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、５’非相補的領域及び３’非相補的領域は、０％～５０％の配列相補性（例えば、０％～４０％、０％～３０％、０％～２０％、０％～１０％、又は０％の配列相補性）を有する。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、５’非相補的領域及び３’非相補的領域は、－５ｋｃａｌ／モルを超える結合の自由エネルギーを有する。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、５’相補的領域及び３’相補的領域は、１０℃未満の結合のＴｍを有する。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、５’非相補的領域及び３’非相補的領域は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０のミスマッチを含む。

【０１２４】

触媒イントロン

本明細書に記載のポリリボヌクレオチド（ｐｏｌｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｔｉｄｅｓ）は、（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）グループＩ触媒イントロン

断片の５’半分などの触媒イントロン断片を含む。第１及び第２のアニーリング領域は、触媒イントロン断片内に配置され得る。グループＩ触媒イントロンは、２金属イオンホスホリル（ｐｈｏｒｐｈｏｒｙｌ）導入機構を介して、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、及びｒＲＮＡ前駆体からのそれら自身の切断を触媒する自己スプライシングリボザイムである。重要なことに、ＲＮＡ自体は、リガーゼなどの外因性酵素を必要とすることなく、イントロン除去を自己触媒する。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、シアノバクテリアアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のプレｔＲＮＡ－Ｌｅｕ遺伝子、又はテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のプレｒＲＮＡに由来する。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、シアノバクテリアアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のプレｔＲＮＡ－Ｌｅｕ遺伝子に由来し、（Ｃ）の３’エクソン断片は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）の５’エクソン断片は、第２のアニーリング領域を含む。第１のアニーリング領域は、例えば、５～５０、例えば、１０～１５（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、又は１５）リボヌクレオチドを含んでもよく、第２のアニーリング領域は、例えば、５～５０、例えば、１０～１５（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、又は１５）リボヌクレオチドを含み得る。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のプレｒＲＮＡに由来し、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、第１のアニーリング領域を含み、（Ｅ）の５’エクソン断片は、第２のアニーリング領域を含む。いくつかの実施形態では、（Ｂ）の３’エクソンは、第１のアニーリング領域を含み、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、第２のアニーリング領域を含む。第１のアニーリング領域は、例えば、６～５０、例えば、１０～１６（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６）リボヌクレオチドを含んでもよく、第２のアニーリング領域は、例えば、６～５０、例えば、１０～１６（例えば、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６）リボヌクレオチドを含み得る。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、シアノバクテリアアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のプレｔＲＮＡ－Ｌｅｕ遺伝子、テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のプレｒＲＮＡ、又はＴ４ファージのｔｄ遺伝子に由来する。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分及び（Ｇ）の５’グループＩ触媒イントロン断片は、Ｔ４ファージのｔｄ遺伝子に由来する。（Ｃ）の３’エクソン断片は、第１のアニーリング領域を含んでもよく、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、第２のアニーリング領域を含み得る。第１のアニーリング領域は、例えば、２～１６、例えば、１０～１６（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６）リボヌクレオチドを含んでもよく、第２のアニーリング領域は、例えば、２～１６、例えば、１０～１６（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６）リボヌクレオチドを含み得る。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、線状ポリヌクレオチドの５’末端である。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、線状ポリリボヌクレオチドの３’末端である。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、５’－ＡＡＣＡＡＣＡＧＡＴＡＡＣＴＴＡＣＡＧＣＴＡＧＴＣＧＧＡＡＧＧＴＧＣＡＧＡＧＡＣＴＣＧＡＣＧＧＧＡＧＣＴＡＣＣＣＴＡＡＣＧＴＣＡＡＧＡＣＧＡＧＧＧＴＡＡＡＧＡＧＡＧＡＧＴＣＣＡＡＴＴＣＴＣＡＡＡＧＣＣＡＡＴＡＧＧＣＡＧＴＡＧＣＧＡＡＡＧＣＴＧＣＧＧＧＡＧＡＡＴＧ－３’の配列（配列番号２８）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、５’－ＡＡＡＴＡＡＴＴＧＡＧＣＣＴＴＡＧＡＧＡＡＧＡＡＡＴＴＣＴＴＴＡＡＧＴＧＧＡＴＧＣＴＣＴＣＡＡＡＣＴＣＡＧＧＧＡＡＡＣＣＴＡＡＡＴＣＴＡＧＣＴＡＴＡＧＡＣＡＡＧＧＣＡＡＴＣＣＴＧＡＧＣＣＡＡＧＣＣＧＡＡＧＴＡＧＴＡＡＴＴＡＧＴＡＡＧＴＴ－３’の配列（配列番号２９）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、配列番号２８の配列を有し、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、配列番号２９の配列を有する。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、

【化１】

5’-
CTTCTGTTGATATGGATGCAGTTCACAGACTAAATGTCGGTCGGGGAAGATGTATTCTTCTCATAAGA
TATAGTCGGACCTCTCCTTAATGGGAGCTAGCGGATGAAGTGATGCAACACTGGAGCCGCTGGGAA
CTAATTTGTATGCGAAAGTATATTGATTAGTTTTGGAGTACTCG-3’ (配列番号30)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、

【化２】

5’-
AAATAGCAATATTTACCTTTGGAGGGAAAAGTTATCAGGCATGCACCTGGTAGCTAGTCTTTAAACCA
ATAGATTGCATCGGTTTAAAAGGCAAGACCGTCAAATTGCGGGAAAGGGGTCAACAGCCGTTCAGTA
CCAAGTCTCAGGGGAAACTTTGAGATGGCCTTGCAAAGGGTATGGTAATAAGCTGACGGACATGGT
CCTAACCACGCAGCCAAGTCCTAAGTCAACAGAT-3’ (配列番号31)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、配列番号３０の配列を有し、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、配列番号３１の配列を有する。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、

【化３】

5'-
GGTTCTACATAAATGCCTAACGACTATCCCTTTGGGGAGTAGGGTCAAGTGACTCGAAACGATAGAC
AACTTGCTTTAACAAGTTGGAGATATAGTCTGCTCTGCATGGTGACATGCAGCTGGATATAATTCCGG
GGTAAGATTAACGACCTTATCTGAACATAATG-3' (配列番号32)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、５’－ＴＡＡＴＴＧＡＧＧＣＣＴＧＡＧＴＡＴＡＡＧＧＴＧＡＣＴＴＡＴＡＣＴＴＧＴＡＡＴＣＴＡＴＣＴＡＡＡＣＧＧＧＧＡＡＣＣＴＣＴＣＴＡＧＴＡＧＡＣＡＡＴＣＣＣＧＴＧＣＴＡＡＡＴＴＧＴＡＧＧＡＣＴ－３’の配列（配列番号３３）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、配列番号３２の配列を有し、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、配列番号３３の配列を有する。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、

【化４】

5'-
TAAACAACTAACAGCTTTAGAAGGTGCAGAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGATTCAGCCGAG
GGTAAAGGGATAGTCCAATTCTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGCGAAAGTTGCAGAGAGAATGA
AAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGAGGGTTCGAGTCCCTCCGCCCCCA-3' (配列番号80)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、５’－ＡＣＧＧＴＡＧＡＣＧＣＡＧＣＧＧＡＣＴＴＡＧＡＡＡＡＣＴＧＧＧＣＣＴＣＧＡＴＣＧＣＧＡＡＡＧＧＧＡＴＣＧＡＧＴＧＧＣＡＧＣＴＣＴＣＡＡＡＣＴＣＡＧＧＧＡＡＡＣＣＴＡＡＡＡＣＴＴＴＡＡＡＣＡＴＴＭＡＡＧＴＣＡＴＧＧＣＡＡＴＣＣＴＧＡＧＣＣＡＡＧＣＴＡＡＡＧＣ－３’の配列（配列番号８１）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、配列番号８０の配列を有し、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、配列番号８１の配列を有する。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、

【化５】

5'-
TTAAACTCAAAATTTAAAATCCCAAATTCAAAATTCCGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC
CCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCTGAAGTTGCTGAAGCAACAA
GGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCGTTGACTGTAAAAAGTCGTGGGGGTTCAAGTC
CCCCCACCCCC-3' (配列番号82)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、

【化６】

5'-
ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTTAAGTGGAAGCTCTCAAA
TTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCAGAAAATTTAGACTTGA
GATTTGATTTTGGAG-3' (配列番号83)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、配列番号８２の配列を有し、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、配列番号８３の配列を有する。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、

【化７】

5'-
GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCT
AACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTTAAAGCCTGAAGTTGTGCAAGCAACAAGGC
CACCCCC-3' (配列番号84)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、

【化８】

5'-
ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTCAAGTGGAAGCTCTCAA
ATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCGGAAATTTTAGAATCA
AGATTTTATTTT-3' (配列番号85)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、配列番号８４の配列を有し、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、配列番号

８５の配列を有する。
【０１５０】
いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、
【化９】

5’-
AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGA
CAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGG
TCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3’ (配列番号86)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。
【０１５１】
いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、
【化１０】

5’-
AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGA
CAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGG
TCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3’ (配列番号87)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。
【０１５２】
いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、配列番号８６の配列を有し、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、配列番号８７の配列を有する。
【０１５３】
いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、
【化１１】

5’-
ACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAAC
GTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGA
GAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3’ (配列番号88)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。
【０１５４】
いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、
【化１２】

5’-
AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAG
GGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAG
TAAGTT-3’ (配列番号89)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。
【０１５５】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、配列番号８８の配列を有し、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、配列番号８９の配列を有する。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、

【化１３】

5’-
AACAACAGATAACTTACTAGTTACTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC
AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAA
TGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3’ (配列番号90)

と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、５’－ＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡＣＴＴＡＡＡＴＡＡＴＴＧＡＧＣＣＴＴＡＧＡＧＡＡＧＡＡＡＴＴＣＴＴＴＡＡＧＴＧＧＡＴＧＣＴＣＴＣＡＡＡＣＴＣＡＧＧＧＡＡＡＣＣＴＡＡＡＴＣＴＡＧＣＴＡＴＡＧＡＣＡＡＧＧＣＡＡＴＣＣＴＧＡＧＣＣＡＡＧＣＣＧＡＡＧＴＡＧＴＡＡＴＴＡＧＴＡＡＧＴＴ－３’の配列（配列番号９１）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、（Ａ）のグループＩ触媒イントロン断片の３’半分は、配列番号９０の配列を有し、（Ｇ）のグループＩ触媒イントロン断片の５’半分は、配列番号９１の配列を有する。

【０１５９】

スプライス部位

本明細書に記載のポリリボヌクレオチドは、（Ｂ）３’スプライス部位；及び（Ｆ）５’スプライス部位などのスプライス部位を含む。スプライス部位は、シアノバクテリアアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のプレｔＲＮＡ－Ｌｅｕ遺伝子、テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のプレｒＲＮＡ、又はＴ４ファージのｔｄ遺伝子に由来してもよい。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、３’スプライス部位（例えば、グループＩ触媒イントロン断片の３’半分と３’エクソン断片との間は、

【化１４】

AGAATG↓AAAATC (配列番号34)

を有し、ここで矢印は切断部位を表す。いくつかの実施形態では、５’スプライス部位（例えば、５’エクソン断片とグループＩ触媒イントロン断片の５’半分との間は、

【化１５】

GGACTT↓**AAATAA** (配列番号35)

を有し、ここで矢印は切断部位を表す。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、３’スプライス部位（例えば、グループＩ触媒イントロン断片の３’半分と３’エクソン断片との間は、

【化１６】

TACTCG↓TAAGGT (配列番号36)

を有し、ここで矢印は切断部位を表す。いくつかの実施形態では、５’スプライス部位（例えば、５’エクソン断片とグループＩ触媒イントロン断片の５’半分との間は、

【化１７】

CTCTCT↓**AAATAG** (配列番号37)

を有し、ここで矢印は切断部位を表す。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、３’スプライス部位（例えば、グループＩ触媒イントロン断片の３’半分と３’エクソン断片との間は、

【化１８】

ATAATG↓CTACCG (配列番号38)

を有し、ここで矢印は切断部位を表す。いくつかの実施形態では、５’スプライス部位（例えば、５’エクソン断片とグループＩ触媒イントロン断片の５’半分との間は、

【化１９】

TTGGGT↓**TAATTG** (配列番号39)

を有し、ここで矢印は切断部位を表す。

【０１６３】

エクソン断片

本明細書に記載のポリリボヌクレオチドは、（Ｃ）３’エクソン断片；及び（Ｅ）５’エクソン断片などのエクソン断片を含む。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、５’－ＡＡＡＡＴＣＣＧＴＴＧＡＣＣＴＴＡＡＡＣＧＧＴＣＧＴＧＴＧＧＧＴＴＣＡＡＧＴＣＣＣＴＣＣＡＣＣＣＣＣＡ－３’の配列（配列番号４０）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、５’－ＡＡＡＡＴＣＣＧＴＡＧＣＧＴＣＴＡＡＡＣＧＧＴＣＧＴＧＴＧＧＧＴＴＣＡＡＧＴＣＣＣＴＣＣＡＣＣＣＣＣＡ－３’の配列（配列番号４１）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、（Ｅ）の５’エクソン断片は、５’－ＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡＣＴＴ－３’の配列（配列番号４２）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、（Ｅ）の５’エクソン断片は、５’－ＣＧＴＴＴＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡＣＴＴ－３’の配列（配列番号４３）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、（Ｅ）の５’エクソン断片は、５’－ＡＣＧＡＣＣＧＴＴＴＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡＣＴＴ－３’の配列（配列番号４４）と少なくとも８０％（例え

ば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、（Ｅ）の５’エクソン断片は、５’－ＣＣＣＡＣＡＣＧＡＣＣＧＴＴＴＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡＣＴＴ－３’の配列（配列番号４５）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、５’－ＴＡＡＧＧＴＡＧＣ－３’の配列（配列番号４６）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、５’－ＴＡＡＧＧＴＡＡＡＴＡＴＴＧＣ－３’の配列（配列番号４７）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、（Ｅ）の５’エクソン断片は、５’－ＡＴＧＡＣＴＣＴＣＴ－３’の配列（配列番号４８）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、５’－ＣＴＡＣＣＧＴＴＴＡＡＴＡＴＴ－３’の配列（配列番号４９）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、（Ｃ）の３’エクソン断片は、５’－ＣＴＣＡＡＴＴＴＴＡＡＴＡＴＴ－３’の配列（配列番号５０）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、（Ｅ）の５’エクソン断片は、５’－ＡＴＧＴＴＴＴＣＴＴＧＧＧＴ－３’の配列（配列番号５１）と少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、又は１００％）の配列同一性を有する。

【０１７６】

ポリリボヌクレオチドカーゴ

本明細書に記載のポリリボヌクレオチドカーゴは、少なくとも１つのポリリボヌクレオチドを含む任意の配列を含む。いくつかの実施形態では、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴは、発現配列、非コード配列、又は発現配列及び非コード配列を含む。いくつかの実施形態では、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴは、ポリペプチドをコードする発現配列を含む。いくつかの実施形態では、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴは、ポリペプチドをコードする発現配列に作動可能に連結されているＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態では、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴは、対象に対する生物学的効果を有するポリペプチドをコードする発現配列を含む。

【０１７７】

ポリリボヌクレオチドカーゴは、例えば、少なくとも約４０ヌクレオチド、少なくとも約５０ヌクレオチド、少なくとも約７５ヌクレオチド、少なくとも約１００ヌクレオチド、少なくとも約２００ヌクレオチド、少なくとも約３００ヌクレオチド、少なくとも約４００ヌクレオチド、少なくとも約５００ヌクレオチド、少なくとも約１，０００ヌクレオチド、少なくとも約２，０００ヌクレオチド、少なくとも約５，０００ヌクレオチド、少なくとも約６，０００ヌクレオチド、少なくとも約７，０００ヌクレオチド、少なくとも約８，０００ヌクレオチド、少なくとも約９，０００ヌクレオチド、少なくとも約１０，０００ヌクレオチド、少なくとも約１２，０００ヌクレオチド、少なくとも約１４，００

０ヌクレオチド、少なくとも約１５，０００ヌクレオチド、少なくとも約１６，０００ヌクレオチド、少なくとも約１７，０００ヌクレオチド、少なくとも約１８，０００ヌクレオチド、少なくとも約１９，０００ヌクレオチド、又は少なくとも約２０，０００ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、１～２０，０００ヌクレオチド、１～１０，０００ヌクレオチド、１～５，０００ヌクレオチド、１００～２０，０００ヌクレオチド、１００～１０，０００ヌクレオチド、１００～５，０００ヌクレオチド、５００～２０，０００ヌクレオチド、５００～１０，０００ヌクレオチド、５００～５，０００ヌクレオチド、１，０００～２０，０００ヌクレオチド、１，０００～１０，０００ヌクレオチド、又は１，０００～５，０００ヌクレオチドを含む。

【０１７８】

実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、１つ又は複数の発現（又はコード）配列を含み、ここで各発現（又はコード）配列は、ポリペプチドをコードする。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、１つ又は複数の非コード配列を含む。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、全体的に非コード配列からなる。実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、発現（又はコード）配列及び非コード配列の組み合わせを含む。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のとおりに作製されたポリリボヌクレオチドは、治療法又は農業におけるエフェクターとして使用される。例えば、本明細書に記載の方法（例えば、本明細書に記載の無細胞法）によって作製された環状ポリリボヌクレオチドは、（例えば、医薬、動物、又は農業組成物において）対象に投与することができる。別の例では、本明細書に記載の方法（例えば、本明細書に記載の無細胞法）によって作製された環状ポリリボヌクレオチドは、細胞に送達することができる。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９／１１８９１９号パンフレットに開示されたとおりの任意の特徴、又は特徴のいずれかの組み合わせを含む。

【０１８１】

ポリペプチド発現配列

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、１つ以上の発現（又はコード）配列を含み、ここで各発現配列は、ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０又はそれ以上の発現（又はコード）配列を含む。

【０１８２】

各コードポリペプチドは、直鎖状又は分岐状であってもよい。様々な実施形態では、ポリペプチドは、約５～約４０，０００アミノ酸、約１５～約３５，０００アミノ酸、約２０～約３０，０００アミノ酸、約２５～約２５，０００アミノ酸、約５０～約２０，０００アミノ酸、約１００～約１５，０００アミノ酸、約２００～約１０，０００アミノ酸、約５００～約５，０００アミノ酸、約１，０００～約２，５００アミノ酸、又はそれらの間の任意の範囲の長さを有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、有用であり得る、約４０，０００アミノ酸未満、約３５，０００アミノ酸未満、約３０，０００アミノ酸未満、約２５，０００アミノ酸未満、約２０，０００アミノ酸未満、約１５，０００アミノ酸未満、約１０，０００アミノ酸未満、約９，０００アミノ酸未満、約８，０００アミノ酸未満、約７，０００アミノ酸未満、約６，０００アミノ酸未満、約５，０００アミノ酸未満、約４，０００アミノ酸未満、約３，０００アミノ酸未満、約２，５００アミノ酸未満、約２，０００アミノ酸未満、約１，５００アミノ酸未満、約１，０００アミノ酸未満、約９００アミノ酸未満、約８００アミノ酸未満、約７００アミノ酸未満、約６００アミノ酸未満、約５００アミノ酸未満、約４００アミノ酸未満、約３００アミノ酸未満

、又はそれ以下の長さを有する。

【０１８３】

本明細書に含まれるポリペプチドは、天然に存在するポリペプチド又は天然に存在しないポリペプチドを含み得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、参照ポリペプチドの機能断片又は変異体（例えば、酵素の酵素活性断片又は変異体）であるか又はそれを含む。例えば、ポリペプチドは、例えば、特定領域にわたり、又は全配列にわたり、本明細書に記載のポリペプチド又は天然に存在するポリペプチドの配列と少なくとも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％、又は９９％の同一性を有する、本明細書に記載のポリペプチドのいずれかの機能的に活性のある変異体であってもよい。いくつかの場合、ポリペプチドは、目的のタンパク質と少なくとも５０％（例えば、少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９７％、９９％、又はそれ以上）の同一性を有し得る。

【０１８４】

ポリペプチドのいくつかの例として、限定はされないが、蛍光タグ若しくはマーカー、抗原、治療用ポリペプチド、又は農業用途のポリペプチドが挙げられる。

【０１８５】

治療用ポリペプチドは、ホルモン、神経伝達物質、成長因子、酵素（例えば、オキシドレダクターゼ、代謝酵素、ミトコンドリア酵素、オキシゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ、ＡＴＰ非依存性酵素、リソソーム酵素、デサチュラーゼ）、サイトカイン、抗原結合ポリペプチド（例えば、抗原結合抗体又は抗体様断片、例えば、一本鎖抗体、ナノボディ又は他のＩｇ重鎖若しくは軽鎖を含むポリペプチド）、Ｆｃ融合タンパク質、抗凝固剤、血液因子、骨形成タンパク質、インターフェロン、インターロイキン、及び血栓溶解剤であってもよい。

【０１８６】

農業用途のポリペプチドは、バクテリオシン、溶解素、抗菌ポリペプチド、抗真菌ポリペプチド、根粒Ｃリッチペプチド、菌細胞調節ペプチド（ｂａｃｔｅｒｉｏｃｙｔｅ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ ｐｅｐｔｉｄｅ）、ペプチド毒素、殺虫性（ｐｅｓｔｉｃｉｄａｌ）ポリペプチド（例えば、殺虫性（ｉｎｓｅｃｔｉｃｉｄａｌ）ポリペプチド又は殺線虫性ポリペプチド）、抗原結合ポリペプチド（例えば、抗原結合抗体又は抗体様断片、例えば、一本鎖抗体、ナノボディ又は他のＩｇ重鎖若しくは軽鎖を含むポリペプチド）、酵素（例えば、ヌクレアーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ、キチナーゼ）、ペプチドフェロモン、及び転写因子であってもよい。

【０１８７】

いくつかの場合、環状ポリリボヌクレオチドは、非ヒトタンパク質を発現する。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、抗体、例えば、抗体断片、又はその一部分を発現する。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドによって発現される抗体は、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＭなどの任意のアイソタイプであり得る。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、抗体の一部分、例えば、軽鎖、重鎖、Ｆｃ断片、ＣＤＲ（相補性決定領域）、Ｆｖ断片、又はＦａｂ断片、そのさらなる一部分を発現する。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、抗体の１つ以上の部分を発現する。例えば、環状ポリリボヌクレオチドは、２つ以上の発現（又はコード）配列を含むことができ、それらの各々は、抗体の一部分を発現し、それらの和は、抗体を構成し得る。いくつかの場合、環状ポリリボヌクレオチドは、抗体の重鎖をコードする１つの発現配列、及び抗体の軽鎖をコードする別の発現配列を含む。いくつかの場合、環状ポリリボヌクレオチドが細胞又は無細胞環境下で発現される場合、軽鎖及び重鎖は、適切な修飾、フォールディング、又は他の翻訳後修飾を受け、機能的抗体を形成し得る。

【０１８９】
実施形態では、ポリペプチドは、複数のポリペプチド、例えば、１つのポリペプチド配列の複数のコピー、又は複数の異なるポリペプチド配列を含む。実施形態では、複数のポリペプチドは、リンカーアミノ酸又はスペーサーアミノ酸によって接続される。
【０１９０】
実施形態では、ポリヌクレオチドカーゴは、シグナルペプチドをコードする配列を含む。多くのシグナルペプチド配列は記載がなされており、例えば、Ｔａｔ（ツインアルギニン転座）シグナル配列は、典型的に、脂質二重層を通じてそのようなＴａｔシグナルペプチドを含む折り畳みタンパク質を転座させることに役立つ、コンセンサスＳＲＲｘＦＬＫ「ツインアルギニン」モチーフを含むＮ末端ペプチド配列である。また、例えば、ｗｗｗ［ｄｏｔ］ｓｉｇｎａｌｐｅｐｔｉｄｅ［ｄｏｔ］ｄｅで公的に利用可能なシグナルペプチドデータベースを参照されたい。シグナルペプチドは、タンパク質を特定の細胞小器官に誘導するためにも有用であり；例えば、ｐｒｏｌｉｎｅ［ｄｏｔ］ｂｉｃ［ｄｏｔ］ｎｕｓ［ｄｏｔ］ｅｄｕ［ｄｏｔ］ｓｇ／ｓｐｄｂで公的に利用可能なＳｐｄｂシグナルペプチドデータベースにおいて開示された、実験的に測定され、計算的に予測されたシグナルペプチドを参照されたい。
【０１９１】
実施形態では、ポリヌクレオチドカーゴは、細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）をコードする配列を含む。数百のＣＰＰ配列が記載されており；例えば、ｃｒｄｄ［ｄｏｔ］ｏｓｄｄ［ｄｏｔ］ｎｅｔ／ｒａｇｈａｖａ／ｃｐｐｓｉｔｅ／で公的に利用可能な細胞透過性ペプチドのデータベースのＣＰＰｓｉｔｅを参照されたい。一般に使用されるＣＰＰ配列の例が、ＣＧＩペプチドのＣ末端に融合され得る、ポリ－アルギニン配列、例えば、オクタアルギニン（ｏｃｔｏａｒｇｉｎｉｎｅ）又はノナアルギニン（ｎｏｎｏａｒｇｉｎｉｎｅ）である。
【０１９２】
実施形態では、ポリヌクレオチドカーゴは、自己集合ペプチドをコードする配列を含み；例えば、Ｍｉｋｉ ｅｔ ａｌ．（２０２１）Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，２１：３４１２，ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓ４１４６７－０２１－２３７９４－６を参照されたい。
【０１９３】
いくつかの実施形態では、発現（又はコード）配列は、（例えば、発現配列の３’末端に）ポリＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリＡ配列の長さは、１０を超えるヌクレオチドの長さである。一実施形態では、ポリＡ配列は、１５を超えるヌクレオチドの長さである（例えば、少なくとも約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、及び３，０００ヌクレオチドであるか又はそれを超える）。いくつかの実施形態では、ポリＡ配列は、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９／１１８９１９Ａ１号パンフレットの［０２０２］～［０２０４］におけるポリＡ配列の記載に従って設計される。いくつかの実施形態では、発現配列は、（例えば、発現配列の３’末端で）ポリＡ配列を欠いている。
【０１９４】
いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、環状ポリリボヌクレオチドの１つ以上の特徴を調節するため、ポリＡを含むか、ポリＡを欠いているか、又は修飾ポリＡを有する。いくつかの実施形態では、ポリＡを欠いているか又は修飾ポリＡを有する環状ポリリボヌクレオチドは、１つ以上の機能特性、例えば、免疫原性（例えば、免疫又は炎症性応答の１つ以上のマーカーのレベル）、半減期、及び／又は発現効率を改良する。
【０１９５】

治療用ポリペプチド

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の環状ポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、治療用ポリペプチドをコードする少なくとも１つの発現配列を含む。治療用ポリペプチドは、対象に投与されるか又は対象内で発現される場合、いくつかの治療的利益を提供するポリペプチドである。治療用ポリペプチドの対象への投与又は対象内での発現を用いて、疾患、障害、若しくは状態又はその症状を処置又は予防することができる。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０又はそれ以上の治療用ポリペプチドをコードする。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、治療用タンパク質をコードする発現配列を含む。該タンパク質は、それを必要とする対象における疾患を処置することができる。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、それを必要とする対象における変異された、下方発現された、又は存在しないタンパク質を補償し得る。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、それを必要とする対象における細胞、組織、又はウイルスを標的にし、それと相互作用し、又はそれに結合することができる。

【０１９７】

治療用ポリペプチドは、細胞から分泌され得る、又は細胞の細胞質、核、若しくは膜区画に局在化され得るポリペプチドであり得る。

【０１９８】

治療用ポリペプチドは、ホルモン、神経伝達物質、成長因子、酵素（例えば、オキシドレダクターゼ、代謝酵素、ミトコンドリア酵素、オキシゲナーゼ、デヒドロゲナーゼ、ＡＴＰ非依存性酵素、リソソーム酵素、デサチュラーゼ）、サイトカイン、転写因子、抗原結合ポリペプチド（例えば、抗原結合抗体又は抗体様断片、例えば一本鎖抗体、ナノボディ又は他のＩｇ重鎖若しくは軽鎖を含むポリペプチド）、Ｆｃ融合タンパク質、抗凝固剤、血液因子、骨形成タンパク質、インターフェロン、インターロイキン、血栓溶解剤、抗原（例えば、腫瘍、ウイルス、又は細菌抗原）、ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓタンパク質、例えばＣａｓ９などのエンドヌクレアーゼ）、膜タンパク質（例えば、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、膜貫通受容体、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）、抗原受容体、イオンチャネル、又は膜トランスポーター）、分泌タンパク質、遺伝子編集タンパク質（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ、ＴＡＬＥＮ、又はＺｎフィンガー）、又は遺伝子書き込みタンパク質（ｇｅｎｅ ｗｒｉｔｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）（例えば、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０２０／０４７１２４号パンフレットを参照されたい）であってもよい。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、抗体、例えば、全長抗体、抗体断片、又はその一部分である。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドによって発現される抗体は、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、ＩｇＭなどの任意のアイソタイプであり得る。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、発現・抗体の一部分、例えば、軽鎖、重鎖、Ｆｃ断片、ＣＤＲ（相補性決定領域）、Ｆｖ断片、又はＦａｂ断片、そのさらなる一部分を発現する。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、抗体の１つ以上の部分を発現する。例えば、環状ポリリボヌクレオチドは、２つ以上の発現配列を含むことができ、それらの各々は、抗体の一部分を発現し、それらの和は、抗体を構成し得る。いくつかの場合、環状ポリリボヌクレオチドは、抗体の重鎖をコードする１つの発現配列、及び抗体の軽鎖をコードする別の発現配列を含む。環状ポリリボヌクレオチドが細胞下で発現される場合、軽鎖及び重鎖は、適切な修飾、フォールディング、又は他の翻訳後修飾を受け、機能的抗体を形成し得る。

【０２００】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のとおりに作製された環状ポリリボヌクレオチドは、治療法又は農業におけるエフェクターとして使用される。例えば、本明細書に記

載の方法（例えば、本明細書に記載の無細胞法）によって作製された環状ポリリボヌクレオチドは、（例えば、医薬、動物、又は農業組成物において）対象に投与することができる。実施形態では、対象は、脊椎動物（例えば、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、又は両生類）である。実施形態では、対象はヒトである。実施形態では、方法の対象は非ヒト哺乳動物である。実施形態では、対象は、非ヒト霊長類（例えば、サル、類人猿）、有蹄動物（例えば、ウシ、水牛、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ラクダ、ラマ、アルパカ、シカ、ウマ、ロバ）、肉食動物（例えば、イヌ、ネコ）、齧歯類（例えば、ラット、マウス）、又はウサギ類（例えば、ウサギ）などの非ヒト哺乳動物である。実施形態では、対象は、キジ目（Ｇａｌｌｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、キジ、ウズラ）、ガンカモ目（Ａｎｓｅｒｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、アヒル、ガチョウ）、古顎類（Ｐａｌｅａｏｇｎａｔｈａｅ）（例えば、ダチョウ、エミュー）、ハト目（Ｃｏｌｕｍｂｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、ハト（ｐｉｇｅｏｎｓ）、ハト（ｄｏｖｅｓ））、又はオウム目（Ｐｓｉｔｔａｃｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、オウム）といった鳥類分類群のメンバーなどの鳥類である。実施形態では、対象は、節足動物（例えば、昆虫、クモ類、甲殻類）、線虫、環形動物、蠕虫、又は軟体類などの無脊椎動物である。実施形態では、対象は、無脊椎動物の農業害虫又は無脊椎動物若しくは脊椎動物宿主に対する寄生虫である無脊椎動物である。実施形態では、対象は、被子植物（双子葉又は単子葉であり得る）又は裸子植物（例えば、針葉樹、ソテツ、マオウ門（Ｇｎｅｔｏｐｈｙｔｅ）、イチョウ）、シダ、ツクシ、ヒカゲノカズラ、又はコケ植物などの植物である。実施形態では、対象は、真核藻類（単細胞又は多細胞）である。実施形態では、対象は、作条作物、果実生成植物及び樹木、野菜、樹木、及び観賞植物、例えば、観賞花、低木、樹木、グランドカバー、及び芝生などの農業又は園芸上重要な植物である。

【０２０１】

分泌ポリペプチドエフェクター

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の環状ポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、分泌ポリペプチドエフェクターをコードする少なくとも１つのコード配列を含む。発現され得る例示的な分泌ポリペプチドエフェクター又はタンパク質として、例えば、サイトカイン及びサイトカイン受容体、ポリペプチドホルモン及び受容体、成長因子、凝固因子、治療用の置換酵素及び治療用の非酵素的なエフェクター、再生、修復、及び線維症因子、形質転換因子、及び細胞再生を刺激するタンパク質が挙げられ、それらの非限定的な例は、本明細書、例えば下の表に記載される。

【０２０２】

サイトカイン及びサイトカイン受容体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表１のサイトカイン、又はその機能的変異体若しくは断片、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照すると、表１に開示されるタンパク質配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、機能的変異体は、対応するサイトカイン受容体に、対応する野生型サイトカインの同じ条件下での同じ受容体に対するＫｄよりも１０％、２０％、３０％、４０％、又は５０％以下高いか又は低いＫｄで結合する。いくつかの実施形態では、エフェクターは、第１の領域（例えば、表１のサイトカインポリペプチド又はその機能的変異体若しくは断片）及び第２の異種領域を含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、第１の領域は、表１の第１のサイトカインポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第２の領域は、表１の第２のサイトカインポリペプチドであり、第１及び第２のサイトカインポリペプチドは、野生型細胞内で互いにサイトカインヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態では、表１のポリペプチド又はその機能的変異体は、シグナル配列、例えば、エフェクターに対して内因性であるシグナル配列、又は異種シグナル配列を含む。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表１のサイトカインに結

合する抗体又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、抗体分子は、シグナル配列を含む。

【０２０４】

【表１－１】

表 1. 例示的なサイトカイン及びサイトカイン受容体

サイトカイン	サイトカイン受容体	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
IL-1α, IL-1β, 又はそのヘテロ二量体	IL-1 1 型受容体, IL-1 2 型受容体	3552, 3553	P01583, P01584
IL-1Ra	IL-1 1 型受容体, IL-1 2 型受容体	3454, 3455	P17181, P48551
IL-2	IL-2R	3558	P60568
IL-3	IL-3 受容体 α + β c (CD131)	3562	P08700
IL-4	IL-4R I 型, IL-4R II 型	3565	P05112
IL-5	IL-5R	3567	P05113
IL-6	IL-6R (sIL-6R) gp130	3569	P05231
IL-7	IL-7R 及び sIL-7R	3574	P13232
IL-8	CXCR1 及び CXCR2	3576	P10145
IL-9	IL-9R	3578	P15248
IL-10	IL-10R1/IL-10R2 複合体	3586	P22301
IL-11	IL-11Rα 1 gp130	3589	P20809
IL-12 (例えば, p35, p40, 又はそのヘテロ二量体)	IL-12Rβ1 及び IL-12Rβ2	3593, 3592	P29459, P29460
IL-13	IL-13R1α1 及び 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~IL-17RE	27189	Q9P0M4
IL-17D	SEF	53342	Q8TAD2
IL-17F	IL-17RA, IL-17RC	112744	Q96PD4
IL-18	IL-18 受容体	3606	Q14116
IL-19	IL-20R1/IL-20R2	29949	Q9UHD0
IL-20	L-20R1/IL-20R2 及び IL-22R1/ IL-20R2	50604	Q9NYY1
IL-21	IL-21R	59067	Q9HBE4
IL-22	IL-22R	50616	Q9GZX6
IL-23 (例えば, p19, p40, 又はそのヘテロ二量体)	IL-23R	51561	Q9NPF7
IL-24	IL-20R1/IL-20R2 及び IL-22R1/ IL-20R2	11009	Q13007
IL-25	IL-17RA 及び IL-17RB	64806	Q9H293
IL-26	IL-10R2 鎖及び IL-20R1 鎖	55801	Q9NPH9

【０２０５】

【表１－２】

サイトカイン	サイトカイン受容体	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
IL-27 (例えば, p28, EBI3, 又はそのヘテロ二量体)	WSX-1 及び gp130	246778	Q8NEV9
IL-28A, IL-28B,及び 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	コロニー刺激因子 1 受容体	146433	Q6ZMJ4
IL-35 (例えば, p35, EBI3, 又はそのヘテロ二量体)	IL-12Rβ2/gp130; IL-12Rβ2/IL-12Rβ2; gp130/gp130	10148	Q14213
IL-36	IL-36Ra	27179	Q9UHA7
IL-37	IL-18Rα 及び 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 及び TβR-II	7046, 7048	P36897, P37173
TNF-α	TNFR1, TNFR2	7132, 7133	P19438, P20333

[1] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の NCBI データベース “ncbi.nlm.nih.gov/gene” ; Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055 で利用可能な配列。

[2] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の Uniprot データベース “uniprot.org/uniprot/” ; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021)で利用可能な配列。

【０２０６】

ポリペプチドホルモン及び受容体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表２のホルモン、又はその機能的変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照すると、表２に開示されるタンパク質配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、機能的変異体は、対応する受容体に、対応する野生型ホルモンの同じ条件下での同じ受容体に対するＫｄよりも１０％、２０％、３０％、４０％、又は５０％以下高いＫｄで結合する。いくつかの実施形態では、表２のポリペプチド又はその機能的変異体は、シグナル配列、例えば、エフェクターに対して内因性であるシグナル配列、又は異種シグナル配列を含む。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表２のホルモンに結合する抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表２のホルモン受容体に結合する抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態では、抗体分子は、シグナル配列を含む。

【０２０８】

【表２－１】

表 2. 例示的なポリペプチドホルモン及び受容体

ホルモン	受容体	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
ナトリウム利尿ペプチド, 例えば, 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)	NPRA, NPRB, NPRC	4878	P01160
脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP)	NPRA, NPRB	4879	P16860
C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)	NPRB	4880	P23582
成長ホルモン (GH)	GHR	2690	P10912
プロラクチン (PRL)	PRLR	5617	P01236
甲状腺刺激ホルモン (TSH)	TSH 受容体	7253	P16473
副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)	ACTH 受容体	5443	P01189
卵胞刺激ホルモン(FSH)	FSHR	2492	P23945
黄体ホルモン(LH)	LHR	3973	P22888
抗利尿ホルモン(ADH)	バソプレシン受容体, 例えば, V2; AVPR1A; AVPR1B; AVPR3; AVPR2	554	P30518
オキシトシン	OXTR	5020	P01178
カルシトニン	カルシトニン受容体 (CT)	796	P01258
副甲状腺ホルモン (PTH)	PTH1R 及び PTH2R	5741	P01270
インスリン	インスリン受容体 (IR)	3630	P01308
グルカゴン	グルカゴン受容体	2641	P01275
GIP	GIPR	2695	P09681
線維芽細胞増殖因子 19 (FGF19)	FGFR4	9965	O95750
線維芽細胞増殖因子 21 (FGF21)	FGFR1c, 2c, 3c	26291	Q9NSA1
線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23)	FGFR1, 2, 4	8074	Q9GZV9
メラニン細胞刺激ホルモン (α-MSH)	MC1R, MC4R, MC5R		
メラニン細胞刺激ホルモン (β-MSH)	MC4R		
メラニン細胞刺激ホルモン (γ-MSH)	MC1R, MC3R, MC4R, MC5R		
プロオピオメラノコルチン POMC (α- β-, γ-, MSH 前駆体)	MC1R, MC3R, MC4R, MC5R	5443	P01189

【０２０９】

【表２－２】

ホルモン	受容体	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
糖タンパク質ホルモンα鎖 (CGA)		1081	P01215
卵胞刺激ホルモンβ (FSHB)	FSHR	2488	P01225
レプチン	LEPR	3952	P41159
グレリン	GHSR	51738	Q9UBU3

[1]ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の NCBI データベース “ncbi.nlm.nih.gov/gene” , Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055 で利用可能な配列。

[2] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の Uniprot データベース “uniprot.org/uniprot/”; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021) で利用可能な配列。

【０２１０】

成長因子

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表３の成長因子、又はその機能的変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照すると、表３に開示されるタンパク質配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、機能的変異体は、対応する受容体に、対応する野生型成長因子の同じ条件下での同じ受容体に対するＫｄよりも１０％、２０％、３０％、４０％、又は５０％以下高いＫｄで結合する。いくつかの実施形態では、表３のポリペプチド又はその機能的変異体は、シグナル配列、例えば、エフェクターに対して内因性であるシグナル配列、又は異種シグナル配列を含む。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表３の成長因子に結合する抗体又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表３の成長因子受容体に結合する抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態では、抗体分子は、シグナル配列を含む。

【０２１２】

【表３－１】

表 3. 例示的な成長因子

PDGF ファミリー		**Entrez 遺伝子 ID[1]**	**UniProt ID[2]**
PDGF (例えば, PDGF-1, PDGF-2, 又はそのヘテロ二量体)	PDGF 受容体, 例えば, PDGFRα, PDGFRβ	5156	P16234
CSF-1	CSF1R	1435	P09603
SCF	CD117	3815	P10721
VEGF ファミリー			
VEGF (例えば, アイソフォーム VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189,及び VEGF 206)	VEGFR-1, VEGFR-2	2321	P17948
VEGF-B	VEGFR-1	2321	P17949
VEGF-C	VEGFR-2 及び VEGFR -3	2324	P35916
PlGF	VEGFR-1	5281	Q07326
EGF ファミリー			
EGF	EGFR	1950	P01133
TGF-α	EGFR	7039	P01135
アンフィレグリン	EGFR	374	P15514
HB-EGF	EGFR	1839	Q99075
ベータセルリン	EGFR, ErbB-4	685	P35070
エピレギュリン	EGFR, ErbB-4	2069	O14944
ヘレグリン	EGFR, ErbB-4	3084	Q02297
FGF ファミリー			
FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9	FGFR1, FGFR2, FGFR3, 及び FGFR4	2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254	P05230, P09038, P11487, P08620, P12034, P10767, P21781, P55075, P31371

【０２１３】

【表３－２】

PDGFファミリー		Entrez遺伝子ID[1]	UniProt ID[2]
インスリンファミリー			
インスリン	IR	3630	P01308
IGF-I	IGF-I受容体, IGF-II受容体	3479	P05019
IGF-II	IGF-II受容体	3481	P01344
HGFファミリー			
HGF	MET受容体	3082	P14210
MSP	RON	4485	P26927
ニューロトロフィンファミリー			
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
アンジオポエチンファミリー			
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及びインテグリンα5β1	23452	Q9UKU9
ANGPTL3	LPL	27329	Q9Y5C1
ANGPTL4		51129	Q9BY76
ANGPTL8	PirB	55908	Q6UXH0

[1] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上のNCBIデータベース “ncbi.nlm.nih.gov/gene”, Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055で利用可能な配列。

[2] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上のUniprotデータベース “uniprot.org/uniprot/”; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021)で利用可能な配列。

【０２１４】

凝固因子

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表４のポリペプチド、又はその機能的変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照すると、表４に開示されるタンパク質配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、機能的変異体は、例えば、野生型タンパク質よりも１０％、２０％、３０％、４０％、又は５０％以上低い又は高い速度で、対応する野生型タンパク質と同じ反応を触媒する。いくつかの実施形態では、表４のポリペプチド又はその機能的変異体は、シグナル配列、例えば、エフェクターに対して内因性であるシグナル配列、又は異種シグナル配列を含む。

【０２１５】

【表４】

表 4. 凝固関連因子

エフェクター	適応症	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
第 I 因子 (フィブリノゲン)	無フィブリノゲン血症	2243, 2266, 2244	P02671, P02679, P02675
第 II 因子	第 II 因子欠乏症	2147	P00734
第 IX 因子	血友病 B	2158	P00740
第 V 因子	オーレン病	2153	P12259
第 VIII 因子	血友病 A	2157	P00451
第 X 因子	スチュアート・プロワー因子欠乏症	2159	P00742
第 XI 因子	血友病 C	2160	P03951
第 XIII 因子	フィブリン安定化因子欠乏症	2162, 2165	P00488, P05160
vWF	フォン・ヴィルブランド病	7450	P04275

[1] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の NCBI データベース “ncbi.nlm.nih.gov/gene”, Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055 で利用可能な配列。

[2] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の Uniprot データベース “uniprot.org/uniprot/”; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021) で利用可能な配列。

【０２１６】

治療用の置換酵素

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５の酵素、又はその機能的変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照すると、表５に開示されるタンパク質配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、機能的変異体は、例えば、野生型タンパク質よりも１０％、２０％、３０％、４０％、又は５０％以上又は以下低い速度で、対応する野生型タンパク質と同じ反応を触媒する。

【０２１７】

【表５－１】

表 5. 酵素欠乏に対する例示的な酵素エフェクター

エフェクター	欠乏	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
3-メチルクロトニル-CoA カルボキシラーゼ	3-メチルクロトニル-CoA カルボキシラーゼ欠乏症	56922, 64087	Q96RQ3, Q9HCC0
アセチル-CoA-グルコサミニド N-アセチルトランスフェラーゼ	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群) III 型-C	138050	Q68CP4
ADAMTS13	血栓性血小板減少性紫斑病	11093	Q76LX8
アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ	アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠乏症	353	P07741
アデノシンデアミナーゼ	アデノシンデアミナーゼ欠乏症	100	P00813
ADP-リボースタンパク質ヒドロラーゼ	グルタミルリボース-5-リン酸蓄積症	26119, 54936	Q5SW96, Q9NX46
αグルコシダーゼ	糖原病 II 型(ポンペ病)	2548	P10253
アルギナーゼ	家族性高アルギニン血症	383, 384	P05089, P78540
アリールスルファターゼ A	異染性白質ジストロフィー	410	P15289
カテプシン K	濃化異骨症	1513	P43235
セラミダーゼ	ファーバー病 (脂肪肉芽腫症)	125981, 340485, 55331	Q8TDN7, Q5QJU3, Q9NUN7
シスタチオニン B シンターゼ	ホモシスチン尿症	875	P35520
ドリコール-P-マンノースシンターゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Ie	8813, 54344	O60762, Q9P2X0
Dolicho-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-ドリコールグルコシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Ic	84920	Q5BKT4
Dolicho-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-ドリコールマンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Id	10195	Q92685
ドリチル-P-グルコース:Glc-1-Man-9-GlcNAc-2-PP-ドリチル-α-3-グルコシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Ih	79053	Q9BVK2

【０２１８】

【表５－２】

エフェクター	欠乏	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
ドリチル-P-マンノース:Man-7-GlcNAc-2-PP-ドリチル-α-6-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Ig	79087	Q9BV10
第 II 因子	第 II 因子欠乏症	2147	P00734
第 IX 因子	血友病 B	2158	P00740
第 V 因子	オーレン病	2153	P12259
第 VIII 因子	血友病 A	2157	P00451
第 X 因子	スチュアート・プロワー因子欠乏症	2159	P00742
第 XI 因子	血友病 C	2160	P03951
第 XIII 因子	フィブリン安定化因子欠乏症	2162, 2165	P00488, P05160
ガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼ	ムコ多糖症 MPS IV (モルキオ症候群) IV-A 型	2588	P34059
ガラクトシルセラミド β-ガラクトシダーゼ	クラッベ病	2581	P54803
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	GM1 ガングリオシドーシス, 全身性	2720	P16278
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	GM2 ガングリオシドーシス	2720	P16278
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	スフィンゴリピドーシス I 型	2720	P16278
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	スフィンゴリピドーシス II 型 (若年型)	2720	P16278
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	スフィンゴリピドーシス III 型 (成人型)	2720	P16278
グルコシダーゼ I	N-グリコシル化の先天性障害 CDG IIb	2548	P10253
グルコシルセラミド β-グルコシダーゼ	ゴーシェ病	2629	P04062
ヘパラン-S-硫酸スルファミダーゼ	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群) III -A 型	6448	P51688
ホモゲンチジン酸オキシダーゼ	アルカプトン尿症	3081	Q93099

【０２１９】

【表５－３】

エフェクター	欠乏	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
ヒアルロニダーゼ	ムコ多糖症 MPS IX (ヒアルロニダーゼ欠乏症)	3373, 8692, 8372, 23553	Q12794, Q12891, O43820, Q2M3T9
イズロン酸硫酸スルファターゼ	ムコ多糖症 MPS II (ハンター症候群)	3423	P22304
レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)	完全な LCAT 欠乏症, 魚眼病, アテローム性動脈硬化症, 高コレステロール血症	3931	606967
リジンオキシダーゼ	グルタル酸血症 I 型	4015	P28300
ライソゾーム酸性リパーゼ	コレステリルエステル蓄積症(CESD)	3988	P38571
ライソゾーム酸性リパーゼ	ライソゾーム酸性リパーゼ欠乏症	3988	P38571
ライソゾーム酸性リパーゼ	ウォルマン病	3988	P38571
ライソゾームペプスタチン非感受性ペプチダーゼ	セロイドリポフスチン沈着症後期乳児型 (CLN2, ヤンスキー・ビエルショフスキー病)	1200	O14773
マンノース(Man)リン酸(P)イソメラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Ib	4351	P34949
マンノシル-α-1,6-糖タンパク質-β-1,2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG IIa	4247	Q10469
メタロプロテイナーゼ-2	ウィンチェスター症候群	4313	P08253
メチルマロニル CoA ムターゼ	メチルマロン酸血症(ビタミン b12 非応答性)	4594	P22033
N-アセチルガラクトサミン α-4-硫酸スルファターゼ (アリールスルファターゼ B)	ムコ多糖症 MPS VI (マロトー・ラミー症候群)	411	P15848
N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群) III -B 型	4669	P54802
N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ	シンドラー病 I 型 (乳児重症型)	4668	P17050
N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ	シンドラー病 II 型 (神崎病, 成人発症型)	4668	P17050
N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ	シンドラー病 III 型 (中間型)	4668	P17050
N-アセチル-グルコサミニン-6-硫酸スルファターゼ	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群) III -D 型	2799	P15586
N-アセチルグルコサミニル-1-ホスホトランスフェラーゼ	ムコリピドーシス ML III (偽性ハーラーポリジストロフィー)	79158	Q3T906

【０２２０】

【表５－４】

エフェクター	欠乏	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
N-アセチルグルコサミニル-1-ホスホトランスフェラーゼ触媒サブユニット	ムコリピドーシス ML II (I 細胞病)	79158	Q3T906
N-アセチルグルコサミニル-1-ホスホトランスフェラーゼ, 基質認識サブユニット	ムコリピドーシス ML III (偽性ハーラーポリジストロフィー) III -C 型	84572	Q9UJJ9
N-アスパルチルグルコサミニダーゼ	アスパルチルグルコサミン尿症	175	P20933
ノイラミニダーゼ 1 (シアリダーゼ)	シアリドーシス	4758	Q99519
パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ 1	セロイドリポフスチン沈着症成人型 (CLN4, クフ病)	5538	P50897
パルミトイルタンパク質チオエステラーゼ 1	セロイドリポフスチン沈着症乳児型 (CLN1, サンタヴオーリ・ハルティア病)	5538	P50897
フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	フェニルケトン尿症	5053	P00439
ホスホマンノムターゼ 2	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Ia (神経単独型及び神経多臓器型)	5373	O15305
ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ	急性間欠性ポルフィリン症	3145	P08397
プリンヌクレオシドホスホリラーゼ	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠乏症	4860	P00491
ピリミジン 5'ヌクレオチダーゼ	溶血性貧血及び/又はピリミジン 5' ヌクレオチダーゼ欠乏症	51251	Q9H0P0
スフィンゴミエリナーゼ	ニーマン・ピック病 A 型	6609	P17405
スフィンゴミエリナーゼ	ニーマン・ピック病 B 型	6609	P17405
ステロール 27-ヒドロキシラーゼ	脳腱黄色腫症 (コレスタノールリピドーシス)	1593	Q02318
チミジンホスホリラーゼ	ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症 (MNGIE)	1890	P19971
トリヘキソシルセラミド α-ガラクトシダーゼ	ファブリー病	2717	P06280
チロシナーゼ, 例えば, OCA1	白子症, 例えば, 眼白子症	7299	P14679
UDP-GlcNAc:ドリチル-P NAcGlc ホスホトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Ij	1798	Q9H3H5

【０２２１】

【表５－５】

エフェクター	欠乏	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
UDP-N-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼ/N-アセチルマンノサミンキナーゼ, シアリン	シアル酸尿症フランス型	10020	Q9Y223
ウリカーゼ	レッシュ・ナイハン症候群, 痛風	391051	タンパク質不在
ウリジン二リン酸グルクロニルトランスフェラーゼ (例えば, UGT1A1)	クリグラー・ナジャー症候群	54658	P22309
α-1,2-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Il (608776)	79796	Q9H6U8
α-1,2-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害, I 型 (前ゴルジのグリコシル化異常症)	79796	Q9H6U8
α-1,3-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Ii	440138	Q2TAA5
α-D-マンノシダーゼ	α-マンノシドーシス, I 型 (重度) 又は II 型 (軽度)	10195	Q92685
α-L-フコシダーゼ	フコシドーシス	4123	Q9NTJ4
α-l-イズロニダーゼ	ムコ多糖症 MPS I H/S (ハーラー・シャイエ症候群)	2517	P04066
α-l-イズロニダーゼ	ムコ多糖症 MPS I-H (ハーラー症候群)	3425	P35475
α-l-イズロニダーゼ	ムコ多糖症 MPS I-S (シャイエ症候群)	3425	P35475
β-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG IId	3425	P35475
β-1,4-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化の先天性障害 CDG Ik	2683	P15291
β-D-マンノシダーゼ	β-マンノシドーシス	56052	Q9BT22
β-ガラクトシダーゼ	ムコ多糖症 MPS IV (モルキオ症候群) IV-B 型	4126	O00462
β-グルクロニダーゼ	ムコ多糖症 MPS VII (スライ症候群)	2720	P16278
β-ヘキソサミニダーゼ A	テイ・サックス病	2990	P08236
β-ヘキソサミニダーゼ B	サンドホフ病	3073	P06865

[1] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の NCBI データベース “ncbi.nlm.nih.gov/gene”, Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055 で利用可能な配列。

[2] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の Uniprot データベース “uniprot.org/uniprot/”; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021) で利用可能な配列。

【０２２２】

他の非酵素的なエフェクター

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用ポリペプチドは、表６のポリペプチド、又はその機能的変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照すると、表６に開示されるタンパク質配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。

【０２２３】

【表６－１】

表 6. 例示的な非酵素的なエフェクター及び対応する適応症

エフェクター	適応症	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
生存運動ニューロンタンパク質 (SMN)	脊髄性筋萎縮症	6606	Q16637
ジストロフィン	筋ジストロフィー (例えば, デュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィー)	1756	P11532
補体タンパク質, 例えば, 補体因子 C1	補体因子 I 欠乏症	3426	P05156
補体因子 H	非典型溶血性尿毒症症候群	3075	P08603
シスチノシン (リソソームシスチン輸送体)	シスチン症	1497	O60931
精巣上体分泌タンパク質 1 (HE1; NPC2 タンパク質)	ニーマン・ピック病 C2 型	10577	P61916
GDP-フコース輸送体 1	N-グリコシル化の先天性障害 CDG IIc (ランバン・ハシャロン症候群)	55343	Q96A29
GM2 活性化タンパク質	GM2 活性化タンパク質欠乏症 (テイ・サックス病 AB 異型, GM2A)	2760	Q17900
リソソーム膜貫通 CLN3 タンパク質	セロイドリポフスチン症若年型 (CLN3, バッテン病, フォークト・スピールマイヤー病)	1207	Q13286
リソソーム膜貫通 CLN5 タンパク質	セロイドリポフスチン症の異型の後期乳児型, フィンランド型(CLN5)	1203	O75503

【０２２４】

【表６－２】

エフェクター	適応症	Entrez 遺伝子 ID[1]	UniProt ID[2]
Na リン酸共輸送体, シアリン	乳児シアル酸蓄積症	26503	Q9NRA2
Na リン酸共輸送体, シアリン	シアル酸尿症フィンランド型(サラ病)	26503	Q9NRA2
NPC1 タンパク質	ニーマン・ピック病 C1 型/ D 型	4864	O15118
オリゴマーゴルジ複合体-7	N-グリコシル化の先天性障害 CDG IIe	91949	P83436
プロサポシン	プロサポシン欠乏症	5660	P07602
保護タンパク質/カテプシン A (PPCA)	ガラクトシアリドーシス(ゴールドバーグ症候群,ノイラミニダーゼ及び β-ガラクトシダーゼ複合欠乏症)	5476	P10619
マンノース-P-ドリコール利用に関与するタンパク質	N-グリコシル化の先天性障害 CDG If	9526	O75352
サポシン B	サポシン B 欠乏症 (スルファチドアクチベーター欠損症)	5660	P07602
サポシン C	サポシン C 欠損症 (ゴーシェアクチベーター欠損症)	5660	P07602
スルファターゼ修飾因子 1	ムコスルファチドーシス (多種スルファターゼ欠損症)	285362	Q8NBK3
膜貫通 CLN6 タンパク質	セロイドリポフスチン症の異型の後期乳児型 (CLN6)	54982	Q9NWW5
膜貫通 CLN8 タンパク質	セロイドリポフスチン症の知的障害を伴う進行性てんかん	2055	Q9UBY8
vWF	フォン・ヴィルブランド病	7450	P04275
第 I 因子 (フィブリノゲン)	無フィブリノーゲン血症(Afibrinogenomia)	2243, 2244, 2266	P02671, P02675, P02679
エリスロポエチン(hEPO)			

[1] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の NCBI データベース “ncbi.nlm.nih.gov/gene”, Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055 で利用可能な配列。

[2] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト上の Uniprot データベース “uniprot.org/uniprot/”; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021) で利用可能な配列。

【０２２５】

再生、修復、及び線維症因子

本明細書に記載の治療用ポリペプチドはまた、例えば表７に開示される成長因子、又はその機能的変異体、例えば、そのＮＣＢＩタンパク質受入番号を参照すると、表７に開示されるタンパク質配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。また、このような成長因子、又は再生及び修復を促進するｍｉＲＮＡに対する抗体又はその断片が含まれる。

【０２２６】

【表７】

表 7. 例示的な再生、修復、及び線維症因子

標的	NCBI 遺伝子受入番号[1]	NCBI タンパク質受入番号[2]
VEGF-A	NG_008732	NP_001165094
NRG-1	NG_012005	NP_001153471
FGF2	NG_029067	NP_001348594
FGF1	遺伝子 ID: 2246	NP_001341882
miR199-3p	MIMAT0000232	該当なし
miR590-3p	MIMAT0004801	該当なし
miR17-92	MI0000071	ワールドワイドウェブ・インターネットサイト “ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732113/figure/F1/”
miR222	MI0000299	該当なし
miR302-367	MIR302A 及び MIR367	ワールドワイドウェブ・インターネットサイト “ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400607/”

[1] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト “ncbi.nlm.nih.gov/gene” (Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. Pii: gku1055.)で利用可能な配列
[2] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト “ncbi.nlm.nih.gov/protein/” で利用可能な配列

【０２２７】

形質転換因子

本明細書に記載の治療用ポリペプチドはまた、形質転換因子、例えば、線維芽細胞を分化細胞に形質転換するタンパク質因子、例えば、表８に開示される因子又はその機能的変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照すると、表８に開示されるタンパク質配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。

【０２２８】

【表８】

表 8: 線維芽細胞を形質転換することによる臓器修復のために指示されるポリペプチド

標的	NCBI 遺伝子受入番号[1]	NCBI タンパク質受入番号[2]
MESP1	遺伝子 ID: 55897	EAX02066
ETS2	遺伝子 ID: 2114	NP_005230
HAND2	遺伝子 ID: 9464	NP_068808
MYOCARDIN	遺伝子 ID: 93649	NP_001139784
ESRRA	遺伝子 ID: 2101	AAH92470
miR1	MI0000651	該当なし
miR133	MI000450	該当なし
TGFb	遺伝子 ID: 7040	NP_000651.3
WNT	遺伝子 ID: 7471	NP_005421
JAK	遺伝子 ID: 3716	NP_001308784
NOTCH	遺伝子 ID: 4851	XP_011517019

[1] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト “ncbi.nlm.nih.gov/gene” (Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. Pii: gku1055.) で利用可能な配列

[2] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト “ncbi.nlm.nih.gov/protein/” で利用可能な配列

【０２２９】

細胞再生を刺激するタンパク質

本明細書に記載の治療用ポリペプチドはまた、細胞再生を刺激するタンパク質、例えば、表９に開示されるタンパク質又はその機能的変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ ＩＤを参照すると、表９に開示されるタンパク質配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。

【０２３０】

【表９】

表 9: 細胞再生を刺激する例示的なタンパク質

標的	遺伝子受入番号[1]	タンパク質受入番号[2]
MST1	NG_016454	NP_066278
STK30	遺伝子 ID: 26448	NP_036103
MST2	遺伝子 ID: 6788	NP_006272
SAV1	遺伝子 ID: 60485	NP_068590
LATS1	遺伝子 ID: 9113	NP_004681
LATS2	遺伝子 ID: 26524	NP_055387
YAP1	NG_029530	NP_001123617
CDKN2b	NG_023297	NP_004927
CDKN2a	NG_007485	NP_478102

[1] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト “ncbi.nlm.nih.gov/gene” (Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. Pii: gku1055.) で利用可能な配列

[2] ワールドワイドウェブ・インターネットサイト “ncbi.nlm.nih.gov/protein/” で利用可能な配列

【０２３１】
いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、１つ以上の発現配列（コード配列）を含み、インビボで対象の細胞における持続的発現のために設計される。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、後の時点での細胞における１つ以上の発現配列の発現がより早期の時点と等しいか又はそれより高いように設計される。このような実施形態では、１つ以上の発現配列の発現は、比較的安定なレベルで維持され得る、又は経時的に増加し得るのいずれかである。発現配列の発現は、長期間にわたって比較的安定であり得る。例えば、いくつかの場合、少なくとも７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２３日又はそれ以上にわたる細胞における１つ以上の発現配列の発現は、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、又は５％低下することはない。いくつかの場合、細胞における１つ以上の発現配列の発現は、少なくとも７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２２、２３日又はそれ以上の間、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、又は５％を超えて変化しないレベルで維持される。
【０２３２】
植物改変ポリペプチド
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチド（例えば、ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、植物改変ポリペプチドをコードする少なくとも１つの発現配列を含む。植物改変ポリペプチドは、植物の生理又は表現型の変化、例えば植物の適応度の増加又は低下をもたらす様式で、植物の遺伝的特性を改変し得る（例えば、遺伝子発現を増加させる、遺伝子発現を低下させる、又はそれ以外ではＤＮＡ若しくはＲＮＡのヌクレオチド配列を改変する）、エピジェネティック特性を改変し得る、又は生理学的若しくは生化学的特性を改変し得るポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０若しくはそれ以上の異なる植物改変ポリペプチド、又は１つ以上の植物改変ポリペプチドの多重コピーをコードする。植物改変ポリペプチドは、種々の植物の生理若しくは表現型を改変し得る、又は種々の植物の適応度を増加若しくは低下させ得る、又は１つ以上の特定の植物（例えば、植物の特定の種又は属）におけるこのような変化をもたらすものであり得る。
【０２３３】
本明細書で使用することができるポリペプチドの例として、酵素（例えば、代謝組換え酵素、ヘリカーゼ、インテグラーゼ、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、又はユビキチン化タンパク質）、孔形成タンパク質、シグナル伝達リガンド、細胞透過性ペプチド、転写因子、受容体、抗体、ナノボディ、遺伝子編集タンパク質（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓエンドヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ、又はＺｎフィンガー）、リボタンパク質、タンパク質アプタマー、又はシャペロンを挙げることができる。
【０２３４】
農業ポリペプチド（ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ　ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ）
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチド（例えば、ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、農業ポリペプチドをコードする少なくとも１つの発現配列を含む。農業ポリペプチドは、農業使用に適するポリペプチドである。実施形態では、農業ポリペプチドを、（例えば、葉面スプレー、ダスティング、注射、又は種子被覆により）植物若しくは種子に、又は（例えば、土壌ドレンチ又は顆粒土壌適用により）植物の環境に適用することで、植物の生理、表現型、又は適応度の改変をもたらす。農業ポリペプチドの実施形態は、植物又は非ヒト動物宿主の内部又は表面に常在する１つ以上の微生物のレベル、活性、又は代謝を改変するポリペプチドを含み、その改変により、宿主の適応度増加がもたらされる。いくつかの実施形態では、農業ポリペプチドは、植物ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、農業ポリペプチドは、昆虫ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、農業ポリペプチドは、非ヒト脊椎動物、無脊椎動物、微生物、又は植物細胞と接触する際、生物学的効果を有する。

【０２３５】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０若しくはそれ以上の農業ポリペプチド、又は１つ以上の農業ポリペプチドの多重コピーをコードする。
【０２３６】
農業適用に有用なポリペプチドの実施形態として、例えば、バクテリオシン、溶解素、抗菌ペプチド、根粒Ｃリッチペプチド、及び菌細胞調節ペプチドが挙げられる。ミツバチ及びカイコなどの昆虫の適応度を増加させるため、このようなポリペプチドを使用して、標的微生物のレベル、活性、又は代謝を改変することができる。農業的に有用なポリペプチドの実施形態は、ペプチド毒素、例えば、当該技術分野で公知のとおり、昆虫病原菌（例えば、バチルス・チューリンゲンシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓ）、フォトラブダス・ルミネッセンス（Ｐｈｏｔｏｒｈａｂｄｕｓ ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｓ）、セラチア・エントモフィラ（Ｓｅｒｒａｔｉａ ｅｎｔｏｍｏｐｈｉｌａ）、又はゼノラブダス・ネマトフィラ（Ｘｅｎｏｒｈａｂｄｕｓ ｎｅｍａｔｏｐｈｉｌａ））によって天然に生成されたものを含む。農業的に有用なポリペプチドの実施形態は、農業的に重要な害虫又は病原体を制御するための（シクロジペプチド又はジケトピペラジンなどの小ペプチドを含む）ポリペプチド、例えば、植物における疾患を制御するための抗菌ポリペプチド若しくは抗真菌ポリペプチド、又は昆虫若しくは線虫などの無脊椎動物害虫を制御するための殺虫性（ｐｅｓｔｉｃｉｄａｌ）ポリペプチド（例えば、殺虫性（ｉｎｓｅｃｔｉｃｉｄａｌ）ポリペプチド又は殺線虫性ポリペプチド）を含む。農業的に有用なポリペプチドの実施形態は、抗体、ナノボディ、及びその断片、例えば、インタクトな抗体又はナノボディの特定の結合活性の少なくとも一部（例えば、少なくとも１０％）を保持する抗体又はナノボディ断片を含む。農業的に有用なポリペプチドの実施形態は、転写因子、例えば植物転写因子を含み；例えば、ａｇｒｉｓ－ｋｎｏｗｌｅｄｇｅｂａｓｅ［ｄｏｔ］ｏｒｇ／ＡｔＴＦＤＢ／で公的に利用可能な、モデル植物のシロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ）において同定された転写因子ファミリーを列記する「ＡｔＴＦＤＢ」データベース）を参照されたい。農業的に有用なポリペプチドの実施形態は、ヌクレアーゼ、例えば、エキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９又はＣａｓ１２ａなどのＣａｓヌクレアーゼ）を含む。農業的に有用なポリペプチドの実施形態は、細胞透過性ペプチド、酵素（例えば、アミラーゼ、セルラーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ、キチナーゼ）、ペプチドフェロモン（例えば、酵母接合フェロモン、無脊椎動物の生殖及び幼生のシグナル伝達フェロモン、例えば、Ａｌｔｓｔｅｉｎ（２００４）Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，２５：１３７３－１３７６を参照されたい）をさらに含む。
【０２３７】
内部リボソーム進入部位
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチド（例えば、ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、１つ以上の内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）要素を含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、１つ以上の発現配列に作動可能に連結される（例えば、各ＩＲＥＳは、１つ以上の発現配列に作動可能に連結される）。実施形態では、ＩＲＥＳは、異種プロモーターとコード配列の５’末端との間に位置する。
【０２３８】
ポリリボヌクレオチド内に含めるのに適したＩＲＥＳ要素は、真核生物リボソームと会合することが可能なＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳ要素は、少なくとも約５ｎｔ、少なくとも約８ｎｔ、少なくとも約９ｎｔ、少なくとも約１０ｎｔ、少なくとも約１５ｎｔ、少なくとも約２０ｎｔ、少なくとも約２５ｎｔ、少なくとも約３０ｎｔ、少なくとも約４０ｎｔ、少なくとも約５０ｎｔ、少なくとも約１００ｎｔ、少なくとも約２００ｎｔ、少なくとも約２５０ｎｔ、少なくとも約３５０ｎｔ、又は少なくとも約５００ｎｔである。

【０２３９】
いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳ要素は、限定はされないが、ウイルス、哺乳動物、及びショウジョウバエを含む生物のＤＮＡに由来する。このようなウイルスＤＮＡは、限定はされないが、ピコルナウイルス相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）とともに、脳心筋炎ウイルス（ｅｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｏｃａｒｄｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）（ＥＭＣＶ）ｃＤＮＡ及びポリオウイルス（ｐｏｌｉｏｖｉｒｕｓ）ｃＤＮＡに由来し得る。一実施形態では、ＩＲＥＳ要素の由来元であるショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）ＤＮＡは、限定はされないが、キイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）由来のアンテナペディア遺伝子を含む。

【０２４０】
いくつかの実施形態では、存在する場合、ＩＲＥＳ配列は、タウラ症候群ウイルス、トリアトマウイルス、タイラー脳脊髄炎ウイルス、シミアンウイルス４０、ソレノプシスインビクタウイルス１、ムギクビレアブラムシウイルス、細網内皮症ウイルス、ヒト（ｆｕｍａｎ）ポリオウイルス１、チャバネアオカメムシ腸管ウイルス、カシミール蜂ウイルス、ヒトライノウイルス２、ヒメヨコバイ（Ｈｏｍａｌｏｄｉｓｃａ ｃｏａｇｕｌａｔａ）ウイルス－１、ヒト免疫不全ウイルス１型、ヒメヨコバイ（Ｈｏｍａｌｏｄｉｓｃａ ｃｏａｇｕｌａｔａ）ウイルス－１、ヒメトビＰウイルス（Ｈｉｍｅｔｏｂｉ Ｐ ｖｉｒｕｓ）、Ｃ型肝炎ウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、ＧＢ型肝炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒトエンテロウイルス７１、ウマ鼻炎ウイルス（Ｅｑｕｉｎｅ ｒｈｉｎｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、チャシャクガピコルナ様ウイルス、脳心筋炎ウイルス（ＥＭＣＶ）、ショウジョウバエＣウイルス、アブラナ科トバモ（Ｃｒｕｃｉｆｅｒ ｔｏｂａｍｏ）ウイルス、クリケット麻痺（Ｃｒｉｃｋｅｔ ｐａｒａｌｙｓｉｓ）ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス１、黒色女王蜂児ウイルス、アブラムシ致死性麻痺ウイルス（Ａｐｈｉｄ ｌｅｔｈａｌ ｐａｒａｌｙｓｉｓ ｖｉｒｕｓ）、トリ脳脊髄炎ウイルス、急性蜂麻痺ウイルス、ハイビスカス退緑輪点ウイルス（Ｈｉｂｉｓｃｕｓ ｃｈｌｏｒｏｔｉｃ ｒｉｎｇｓｐｏｔ ｖｉｒｕｓ）、古典的ブタ熱ウイルス、ヒトＦＧＦ２、ヒトＳＦＴＰＡｌ、ヒトＡＭＬｌ／ＲＵＮＸｌ、ショウジョウバエアンテナペディア（ａｎｔｅｎｎａｐｅｄｉａ）、ヒトＡＱＰ４、ヒトＡＴ１Ｒ、ヒトＢＡＧ－１、ヒトＢＣＬ２、ヒトＢｉＰ、ヒトｃ－ＩＡＰｌ、ヒトｃ－ｍｙｃ、ヒトｅＩＦ４Ｇ、マウスＮＤＳＴ４Ｌ、ヒトＬＥＦ１、マウスＨＩＦ１α、ヒトｎ．ｍｙｃ、マウスＧｔｘ、ヒトｐ２７ｋｉｐｌ、ヒトＰＤＧＦ２／ｃ－ｓｉｓ、ヒトｐ５３、ヒトＰｉｍ－１、マウスＲｂｍ３、ショウジョウバエリーパー（ｒｅａｐｅｒ）、イヌスカンパー（Ｓｃａｍｐｅｒ）、ショウジョウバエＵｂｘ、ヒトＵＮＲ、マウスＵｔｒＡ、ヒトＶＥＧＦ－Ａ、ヒトＸＩＡＰ、サリウイルス（Ｓａｌｉｖｉｒｕｓ）、コサウイルス、パレコウイルス、ショウジョウバエヘアレス（ｈａｉｒｌｅｓｓ）、酵母（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＴＦＩＩＤ、酵母（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＹＡＰ１、ヒトｃ－ｓｒｃ、ヒトＦＧＦ－１、サルピコマウイルス（ｐｉｃｏｍａｖｉｒｕｓ）、カブクリンクルウイルス（Ｔｕｒｎｉｐｃｒｉｎｋｌｅｖｉｒｕｓ）、ｅＩＦ４Ｇに対するアプタマー、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）又はコクサッキーウイルスＡ（ＣＶＢ１／２）のＩＲＥＳ配列である。さらに別の実施形態では、ＩＲＥＳは、コクサッキーウイルスＢ３（ＣＶＢ３）のＩＲＥＳ配列である。さらなる実施形態では、ＩＲＥＳは脳心筋炎ウイルスのＩＲＥＳ配列である。

【０２４１】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、少なくとも１つ（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ又はそれ以上）の発現配列に隣接する少なくとも１つのＩＲＥＳを含む。いくつかの実施形態では、ＩＲＥＳは、少なくとも１つ（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ又はそれ以上）の発現配列の両側に隣接する。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、各発現配列の片側又は両側に１つ以上のＩＲＥＳ配列を含み、得られるペプチド及び／又はポリペプチドの分離をもたらす。

【０２４２】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドカーゴは、ＩＲＥＳを含む。例えば、

ポリリボヌクレオチドカーゴは、例えば、全体が参照により本明細書に援用される、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　８１：１－１９，２０２１に記載されるとおり、環状ＲＮＡ　ＩＲＥＳを含み得る。

【０２４３】

調節要素

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチド（例えば、ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、１つ以上の調節要素を含む。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、調節要素、例えば、ポリリボヌクレオチド内の発現配列の発現を調節する配列を含む。

【０２４４】

調節要素は、発現産物をコードする発現配列に隣接して位置する配列を含んでもよい。調節要素は、隣接配列に作動可能に連結されてもよい。調節要素は、調節要素が存在しない場合に発現される産物の量と比較して、発現される産物の量を増加させ得る。さらに、１つの調節要素が、並んで結合された複数の発現配列について発現される産物の量を増加させ得る。したがって、１つの調節要素が、１つ以上の発現配列の発現を促進することができる。複数の調節要素が、当業者に周知である。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、調節要素は、翻訳モジュレーターである。翻訳モジュレーターは、ポリリボヌクレオチド中の発現配列の翻訳を調節し得る。翻訳モジュレーターは、翻訳エンハンサー又はサプレッサーであり得る。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、少なくとも１つの発現配列に隣接した少なくとも１つの翻訳モジュレーターを含む。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、各発現配列に隣接した翻訳モジュレーターを含む。いくつかの実施形態では、翻訳モジュレーターは、各発現配列の片側又は両側にあり、発現産物、例えばペプチド及び／又はポリペプチドの分離をもたらす。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、調節要素は、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）又はｍｉＲＮＡ結合部位である。

【０２４７】

調節要素のさらなる例が、例えば、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９／１１８９１９号パンフレットの段落［０１５４］～［０１６１］に記載されている。

【０２４８】

翻訳開始配列

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチド（例えば、ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、少なくとも１つの翻訳開始配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、発現配列に作動可能に連結されている翻訳開始配列を含む。

【０２４９】

いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、ポリペプチドをコードし、翻訳開始配列、例えば開始コドンを含み得る。いくつかの実施形態では、翻訳開始配列は、コザック又はシャイン・ダルガノ配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、発現配列に隣接する翻訳開始配列、例えば、コザック配列を含む。ある実施形態では、翻訳開始配列は、非コード開始コドンである。ある実施形態では、翻訳開始配列、例えば、コザック配列は、各発現配列の１つの側又は両側に存在して、発現産物の分離をもたらす。ある実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、発現配列に隣接する少なくとも１つの翻訳開始配列を含む。ある実施形態では、翻訳開始配列は、ポリリボヌクレオチドに立体配座柔軟性を与える。ある実施形態では、翻訳開始配列は、環状ポリリボヌクレオチドの実質的に一本鎖領域内にある。翻訳開始配列のさらなる例が、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９／１１８９１９号パンフレットの段落［０１６３］

～［０１６５］に記載されている。
【０２５０】
ポリリボヌクレオチドは、限定はされないが、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０又は６０を超える開始コドンなどの２つ以上の開始コドンを含んでもよい。翻訳は、第１の開始コドンで開始し得るか、又は第１の開始コドンの下流で開始し得る。
【０２５１】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、第１の開始コドン、例えばＡＵＧでないコドンで開始し得る。ポリリボヌクレオチドの翻訳は、代替的な翻訳開始配列、例えば限定はされないが、ＡＣＧ、ＡＧＧ、ＡＡＧ、ＣＴＧ／ＣＵＧ（配列番号７４）、ＧＴＧ／ＧＵＧ（配列番号７５）、ＡＴＡ／ＡＵＡ（配列番号７６）、ＡＴＴ／ＡＵＵ（配列番号７７）、ＴＴＧ／ＵＵＧ（配列番号７８）で開始し得る。いくつかの実施形態では、翻訳は、選択的条件、例えばストレス誘導条件下で、代替的な翻訳開始配列で開始する。非限定的な例として、ポリリボヌクレオチドの翻訳は、代替的な翻訳開始配列、例えばＡＣＧで開始し得る。別の非限定的な例として、ポリリボヌクレオチドの翻訳は、代替的な翻訳開始配列のＣＴＧ／ＣＵＧ（配列番号７４）で開始し得る。別の非限定的な例として、ポリリボヌクレオチドの翻訳は、代替的な翻訳開始配列のＧＴＧ／ＧＵＧ（配列番号７５）で開始し得る。別の非限定的な例として、ポリリボヌクレオチドは、リピート関連非ＡＵＧ（ＲＡＮ）配列、例えば、反復ＲＮＡの短いストレッチ、例えば、ＣＧＧ、ＧＧＧＧＣＣ（配列番号７９）、ＣＡＧ、ＣＴＧを含む代替的な翻訳開始配列で翻訳を開始し得る。
【０２５２】
終結配列
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチド（例えば、ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、少なくとも（ｌｅａｓｔ）１つの終結配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、発現配列に作動可能に連結されている終結配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、終結配列を欠いている。
【０２５３】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、１つ以上の発現配列を含み、各発現配列は、終結配列を有する場合も有しない場合もある。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、１つ以上の発現配列を含み、発現配列は、終結配列を欠いていることで、ポリリボヌクレオチドは、継続的に翻訳される。終結配列の除外は、ローリングサークル翻訳又は発現産物の連続的発現をもたらし得る。
【０２５４】
いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、１つ以上の発現配列を含み、各発現配列は、終結配列を有する場合も有しない場合もある。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、１つ以上の発現配列を含み、発現配列は、終結配列を欠いていることで、環状ポリリボヌクレオチドは、継続的に翻訳される。終結配列の除外は、リボソーム停止又は脱落の欠如に起因して、ローリングサークル翻訳又は発現産物、例えばペプチド又はポリペプチドの連続的発現をもたらし得る。このような実施形態では、ローリングサークル翻訳は、各発現配列を通じて、連続的発現産物を発現する。いくつかの他の実施形態では、発現配列の終結配列は、スタガー要素の一部であり得る。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチド中の１つ以上の発現配列は、終結配列を含む。しかし、環状ポリリボヌクレオチド中の後続の（例えば、第２、第３、第４、第５などの）発現配列のローリングサークル翻訳又は発現が実施される。このような場合、発現産物

は、リボソームが終結配列、例えば停止コドンに遭遇し、翻訳を終結させる場合、リボソームから脱落し得る。いくつかの実施形態では、翻訳は、リボソーム、例えば、リボソームの少なくとも１つのサブユニットが環状ポリリボヌクレオチドとの接触状態を維持しながら終結される。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、１つ以上の発現配列の末端に終結配列を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の発現配列は、後続の２つ以上の終結配列を含む。このような実施形態では、翻訳が終結され、ローリングサークル翻訳が終結される。いくつかの実施形態では、リボソームは、環状ポリリボヌクレオチドと完全に隔てられる。いくつかのこのような実施形態では、環状ポリリボヌクレオチド中の後続の（例えば、第２、第３、第４、第５などの）発現配列の生成において、翻訳の開始前に環状ポリリボヌクレオチドと再会合するため、リボソームを必要とし得る。一般に、終結配列は、翻訳の終結を伝えるインフレームのヌクレオチドトリプレット、例えば、ＵＡＡ、ＵＧＡ、ＵＡＧを含む。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチド中の１つ以上の終結配列は、フレームシフトされた終結配列、例えば限定はされないが、翻訳を終結し得る、オフフレーム又は－１及び＋１シフトされたリーディングフレーム（例えば、隠れた停止）である。フレームシフトされた終結配列は、発現配列の第２及び第３のリーディングフレーム内に出現する三重ヌクレオチド、ＴＡＡ、ＴＡＧ、及びＴＧＡを含む。フレームシフトされた終結配列は、細胞に対して有害であることが多い、ｍＲＮＡの誤読を防止するのに重要であり得る。いくつかの実施形態では、終結配列は、停止コドンである。

【０２５６】

終結配列のさらなる例が、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９／１１８９１９号パンフレットの段落［０１６９］～［０１７０］に記載されている。

【０２５７】

非翻訳領域

ある実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む。遺伝子を含むゲノム領域のＵＴＲは、転写され得るが、翻訳されていない。ある実施形態では、ＵＴＲは、本明細書に記載される発現配列の翻訳開始配列の上流に含まれ得る。ある実施形態では、ＵＴＲは、本明細書に記載される発現配列の下流に含まれ得る。ある場合において、第１の発現配列のための１つのＵＴＲは、第２の発現配列のための別のＵＴＲと同じであるか又はそれと連続しているか又はそれと重複している。ある実施形態では、イントロンは、ヒトイントロンである。ある実施形態では、イントロンは、完全長ヒトイントロン、例えば、ＺＫＳＣＡＮ１である。

【０２５８】

例示的な非翻訳領域が、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９／１１８９１９号パンフレットの段落［０１９７］～［２０１］に記載されている。

【０２５９】

ある実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、ポリＡ配列を含む。例示的なポリＡ配列が、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９／１１８９１９号パンフレットの段落［０２０２］～［０２０５］に記載されている。ある実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、ポリＡ配列を欠いている。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、アデノシン及びウリジンの１つ又は複数のストレッチが内包されたＵＴＲを含む。これらのＡＵリッチのシグネチャーは、発現産物のターンオーバー速度を増加させ得る。

【０２６１】

ＵＴＲのＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）の導入、除去、又は修飾は、環状ポリリボヌクレオチドの安定性、又は免疫原性（例えば、免疫又は炎症性応答の１つ又は複数のマーカーのレベル）を調節するのに有用であり得る。特定の環状ポリリボヌクレオチドを改変

するとき、ＡＲＥの１つ又は複数コピーを環状ポリリボヌクレオチドに導入してもよく、ＡＲＥのコピーは、発現産物の翻訳及び／又は産生を調節し得る。同様に、ＡＲＥを、同定及び除去し、又は環状ポリリボヌクレオチドに改変することで、細胞内安定性を調節し、ひいては得られるタンパク質の翻訳及び産生に作用することができる。

【０２６２】

任意の遺伝子からの任意のＵＴＲが環状ポリリボヌクレオチドの各隣接領域に組み込まれてもよいことは理解されるべきである。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、５’ＵＴＲを欠いており、その１つ又は複数の発現配列からのタンパク質発現の能力がある。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、３’ＵＴＲを欠いており、その１つ又は複数の発現配列からのタンパク質発現の能力がある。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、ポリＡ配列を欠いており、その１つ又は複数の発現配列からのタンパク質発現の能力がある。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、終結配列を欠いており、その１つ又は複数の発現配列からのタンパク質発現の能力がある。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、内部リボソーム進入部位を欠いており、その１つ又は複数の発現配列からのタンパク質発現の能力がある。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、キャップを欠いており、その１つ又は複数の発現配列からのタンパク質発現の能力がある。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、及びＩＲＥＳを欠いており、その１つ又は複数の発現配列からのタンパク質発現の能力がある。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、以下の配列：１つ又は複数のｍｉＲＮＡをコードする配列、１つ又は複数の複製タンパク質をコードする配列、外因性遺伝子をコードする配列、治療（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ）をコードする配列、調節要素（例えば、翻訳モジュレーター、例えば、翻訳エンハンサー又はサプレッサー）、翻訳開始配列、内因性遺伝子を標的にする１つ又は複数の調節核酸（例えば、ｓｉＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ）、及び治療的ｍＲＮＡ又はタンパク質をコードする配列、の１つ又は複数を含む。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、５’ＵＴＲを欠いている。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、３’ＵＴＲを欠いている。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、ポリＡ配列を欠いている。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、終結配列を欠いている。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、内部リボソーム進入部位を欠いている。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、エキソヌクレアーゼによる分解感受性を欠いている。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドが分解感受性を欠いているという事実は、環状ポリリボヌクレオチドがエキソヌクレアーゼによって分解されない、又はエキソヌクレアーゼの存在下で限られた範囲に限って分解される、例えば、エキソヌクレアーゼの不在下で同等又は類似的であることを意味し得る。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、エキソヌクレアーゼによって分解されない。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、エキソヌクレアーゼに曝露されるとき、分解が低下している。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、キャップ結合タンパク質への結合を欠いている。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、５’キャップを欠いている。

【０２６５】

スタガー要素

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、発現配列に隣接した少なくとも１つのスタガー要素を含む。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、各発現配列に隣接したスタガー要素を含む。いくつかの実施形態では、スタガー要素は、各発現配列の片側又は両側にあり、発現産物、例えばペプチド及び／又はポリペプチドの分離をもたらす。いくつかの実施形態では、スタガー要素は、１つ以上の発現配列の一部

分である。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、１つ以上の発現配列を含み、１つ以上の発現配列のそれぞれが、環状ポリリボヌクレオチドにおけるスタガー要素によって後続の発現配列から隔てられる。いくつかの実施形態では、スタガー要素は、（ａ）単一の発現配列の２回の翻訳から、又は（ｂ）２つ以上の発現配列の１回以上の翻訳からの単一のポリペプチドの生成を防止する。いくつかの実施形態では、スタガー要素は、１つ以上の発現配列から切り離された配列である。いくつかの実施形態では、スタガー要素は、１つ以上の発現配列のうちの発現配列の一部を含む。

【０２６６】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、スタガー要素を含む。連続的発現産物、例えばペプチド又はポリペプチドの生成を回避しながら、ローリングサークル翻訳を維持するため、スタガー要素を含めることで、翻訳中のリボソーム停止を誘導してもよい。いくつかの実施形態では、スタガー要素は、１つ又は複数の発現配列の少なくとも１つの３’末端にある。スタガー要素は、環状ポリリボヌクレオチドのローリングサークル翻訳中にリボソームを停止させるように設計され得る。スタガー要素は、限定はされないが、２Ａ様、又はＣＨＹＳＥＬ（配列番号７１）（シス作用性ヒドロラーゼエレメント）配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、スタガー要素は、$X_1X_2X_3EX_5$ＮＰＧＰ（配列番号７２）（式中、X_1は、不在又はＧ若しくはＨであり、X_2は、不在又はＤ若しくはＧであり、X_3は、Ｄ又はＶ又はＩ又はＳ又はＭであり、X_5は、任意のアミノ酸である）であるＣ末端コンセンサス配列を有する配列をコードする。いくつかの実施形態では、この配列は、強力なαらせん性を有するアミノ酸の非保存配列と、それに続くコンセンサス配列－Ｄ（Ｖ／Ｉ）ＥＸＮＰＧＰ（配列番号７３）（式中、ｘ＝任意のアミノ酸である）とを含む。スタガー要素のいくつかの非限定例として、ＧＤＶＥＳＮＰＧＰ（配列番号５２）、ＧＤＩＥＥＮＰＧＰ（配列番号５３）、ＶＥＰＮＰＧＰ（配列番号５４）、ＩＥＴＮＰＧＰ（配列番号５５）、ＧＤＩＥＳＮＰＧＰ（配列番号５６）、ＧＤＶＥＬＮＰＧＰ（配列番号５７）、ＧＤＩＥＴＮＰＧＰ（配列番号５８）、ＧＤＶＥＮＰＧＰ（配列番号５９）、ＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号６０）、ＧＤＶＥＱＮＰＧＰ（配列番号６１）、ＩＥＳＮＰＧＰ（配列番号６２）、ＧＤＩＥＬＮＰＧＰ（配列番号６３）、ＨＤＩＥＴＮＰＧＰ（配列番号６４）、ＨＤＶＥＴＮＰＧＰ（配列番号６５）、ＨＤＶＥＭＮＰＧＰ（配列番号６６）、ＧＤＭＥＳＮＰＧＰ（配列番号６７）、ＧＤＶＥＴＮＰＧＰ（配列番号６８）ＧＤＩＥＱＮＰＧＰ（配列番号６９）、及びＤＳＥＦＮＰＧＰ（配列番号７０）が挙げられる。

【０２６７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のスタガー要素は、本明細書に記載のコンセンサス配列のＧ及びＰの間などで、発現産物を切断する。１つの非限定例として、環状ポリリボヌクレオチドは、発現産物を切断するための少なくとも１つのスタガー要素を含む。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、少なくとも１つの発現配列に隣接したスタガー要素を含む。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、各発現配列の後にスタガー要素を含む。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、各発現配列の片側又は両側に存在するスタガー要素を含むことで、各発現配列から個別のペプチド及び／又はポリペプチドの翻訳を引き起こす。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、スタガー要素は、翻訳中にリボソーム停止を誘導する、１つ又は複数の修飾ヌクレオチド又は非天然ヌクレオチドを含む。非天然ヌクレオチドは、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルホリノ及びロックド核酸（ＬＮＡ）、並びにグリコール核酸（ＧＮＡ）及びトレオース核酸（ＴＮＡ）を含んでもよい。これらなどの例は、天然に存在するＤＮＡ又はＲＮＡと、分子の骨格に対する変化によって区別される。例示的な修飾は、翻訳中にリボソーム停止を誘導し得る、糖、核酸塩基、ヌクレオシド間結合（例えば、連結リン酸塩／リン酸ジエステル結合／リン酸ジエステル骨格）に対する任意の修飾、及びそれらの任意の組み合わせを含み得る。本明細書に提供される例示的な修飾のいくつかは、本明細書中の他の箇所に記載されている。

【０２６９】
いくつかの実施形態では、スタガー要素は、環状ポリリボヌクレオチド中に他の形態で存在する。例えば、いくつかの例示的な環状ポリリボヌクレオチドでは、スタガー要素は、環状ポリリボヌクレオチド中の第１の発現配列の終結配列、及び第１の発現配列に連続する発現の第１の翻訳開始配列から終結配列を分離するヌクレオチドスペーサー配列を含む。いくつかの例において、第１の発現配列の第１のスタガー要素は、環状ポリリボヌクレオチド中の第１の発現配列に連続する発現の第１の翻訳開始配列の上流（それに対する５’側）に存在する。いくつかの場合、第１の発現配列及び第１の発現配列に連続する発現配列は、環状ポリリボヌクレオチド中の２つの別々の発現配列である。第１のスタガー要素と第１の翻訳開始配列との間の距離は、第１の発現配列及びその連続する発現配列の連続的翻訳を可能にし得る。

【０２７０】
いくつかの実施形態では、第１のスタガー要素は、終結配列を含み、第１の発現配列の発現産物をその連続する発現配列の発現産物から分離し、それにより分離した発現産物を作出する。いくつかの場合、環状ポリリボヌクレオチド中の連続する配列の第１の翻訳開始配列の上流に第１のスタガー要素を含む環状ポリリボヌクレオチドは、継続的に翻訳される一方で、第２の発現配列に連続する発現配列の第２の翻訳開始配列の上流に存在する第２の発現配列のスタガー要素を含む対応する環状ポリリボヌクレオチドは、継続的に翻訳されない。いくつかの場合、環状ポリリボヌクレオチド中に発現配列が１つだけ存在し、第１の発現配列及びその連続する発現配列は、同じ発現配列である。いくつかの例示的な環状ポリリボヌクレオチドでは、スタガー要素は、環状ポリリボヌクレオチド中の第１の発現配列の第１の終結配列、及び下流の翻訳開始配列から終結配列を分離するヌクレオチドスペーサー配列を含む。いくつかのそのような例では、第１のスタガー要素は、環状ポリリボヌクレオチド中の第１の発現配列の第１の翻訳開始配列の上流（に対する５’側）に存在する。いくつかの場合、第１のスタガー要素と第１の翻訳開始配列との間の距離は、第１の発現配列及び任意の連続する発現配列の連続的翻訳を可能にする。

【０２７１】
いくつかの実施形態では、第１のスタガー要素は、第１の発現配列の１回の発現産物を第１の発現配列の次回の発現産物から分離し、それにより分離した発現産物を作出する。いくつかの場合、環状ポリリボヌクレオチド中の第１の発現配列の第１の翻訳開始配列の上流に第１のスタガー要素を含む環状ポリリボヌクレオチドは、継続的に翻訳される一方で、対応する環状ポリリボヌクレオチド中の第２の発現配列の第２の翻訳開始配列の上流にスタガー要素を含む対応する環状ポリリボヌクレオチドは、継続的に翻訳されない。いくつかの場合、第２のスタガー要素と第２の翻訳開始配列との間の距離は、対応する環状ポリリボヌクレオチドにおいて、環状ポリリボヌクレオチドにおける第１のスタガー要素と第１の翻訳開始配列との間の距離よりも少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、又は１０倍大きい。いくつかの場合、第１のスタガー要素と第１の翻訳開始配列との間の距離は、少なくとも２ｎｔ、３ｎｔ、４ｎｔ、５ｎｔ、６ｎｔ、７ｎｔ、８ｎｔ、９ｎｔ、１０ｎｔ、１１ｎｔ、１２ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎｔ、１８ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔ、２５ｎｔ、３０ｎｔ、３５ｎｔ、４０ｎｔ、４５ｎｔ、５０ｎｔ、５５ｎｔ、６０ｎｔ、６５ｎｔ、７０ｎｔ、７５ｎｔ、又はそれ以上である。いくつかの実施形態では、第２のスタガー要素と第２の翻訳開始配列との間の距離は、第１のスタガー要素と第１の翻訳開始配列との間の距離よりも、少なくとも２ｎｔ、３ｎｔ、４ｎｔ、５ｎｔ、６ｎｔ、７ｎｔ、８ｎｔ、９ｎｔ、１０ｎｔ、１１ｎｔ、１２ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎｔ、１８ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔ、２５ｎｔ、３０ｎｔ、３５ｎｔ、４０ｎｔ、４５ｎｔ、５０ｎｔ、５５ｎｔ、６０ｎｔ、６５ｎｔ、７０ｎｔ、７５ｎｔ、又はそれ以上大きい。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、２つ以上の発現配列を含む。

【０２７２】
スタガー要素の例が、全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９／１

１８９１９号パンフレットの段落［０１７２］～［０１７５］に記載されている。
【０２７３】
非コード配列
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチド（例えば、ポリリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチドカーゴ）は、１つ以上の非コード配列、例えば、ポリペプチドの発現をコードしない配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０若しくは１０より大きい非コード配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、ポリペプチド発現配列をコードしない。
【０２７４】
非コード配列は、天然又は合成配列であり得る。いくつかの実施形態では、非コード配列は、細胞挙動、例えば、リンパ球挙動などを改変し得る。いくつかの実施形態では、非コード配列は、細胞ＲＮＡ配列に対してアンチセンスである。
【０２７５】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、典型的に、（特定のＲＮＡ構造（例えば、５～３０ｂｐのｍｉＲＮＡ、２００～５００ｂｐのｌｎｃＲＮＡ）に応じて約５～５００塩基対（ｂｐ）のＲＮＡ又はＲＮＡ様構造である調節核酸を含み、細胞内の発現された標的遺伝子におけるコード配列と同一（相補的）又はほぼ同一（実質的に相補的）である核酸塩基配列を有し得る。実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、より小さいｍｉＲＮＡ中間体又は成熟ｍｉＲＮＡにプロセシング可能である、約５０～約１０００ｂｐであり得る、より小さいＲＮＡにプロセシング可能であるＲＮＡ前駆体、例えばｍｉＲＮＡ前駆体をコードする調節核酸を含む。
【０２７６】
長い非コードＲＮＡ（ＩｎｃＲＮＡ）は、１００ヌクレオチドより長い非タンパク質コード転写物と定義される。多くのＩｎｃＲＮＡは、組織特異性として特徴づけられる。近傍のタンパク質コード遺伝子に対して逆方向に転写される多様なＩｎｃＲＮＡは、有意な割合（例えば、哺乳動物ゲノムにおける全ＩｎｃＲＮＡの約２０％）を含み、おそらくは近傍遺伝子の転写を調節する。一実施形態では、本明細書に提供されるポリリボヌクレオチドは、ＩｎｃＲＮＡのセンス鎖を含む。一実施形態では、本明細書に提供されるポリリボヌクレオチドは、ＩｎｃＲＮＡのアンチセンス鎖を含む。
【０２７７】
実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、内因性遺伝子又は遺伝子産物（例えば、ｍＲＮＡ）の全て又は少なくとも１つの断片に対して、実質的に相補的である、又は完全に相補的である調節核酸をコードする。実施形態では、調節核酸は、転写における特定遺伝子の新規に生成された核ＲＮＡ転写物のｍＲＮＡへの成熟を防止するため、イントロンとエクソンとの間の境界での、エクソン間における、又はエクソンに隣接した配列を補完する。特定遺伝子に対して相補的である調節核酸は、その遺伝子に対するｍＲＮＡとハイブリダイズし、その翻訳を阻止し得る。アンチセンス調節核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はその誘導体若しくはハイブリッドであり得る。いくつかの実施形態では、調節核酸は、内因性遺伝子又は外因性遺伝子の発現の調節に関与するタンパク質に結合し得るタンパク質結合部位を含む。
【０２７８】
実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、目的の転写産物にハイブリダイズする調節性ＲＮＡをコードし、ここで調節性ＲＮＡは、約５～３０ヌクレオチド、約１０～３０ヌクレオチド、又は約１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０ヌクレオチド若しくは３０を超えるヌクレオチドの長さを有する。実施形態では、調節性ＲＮＡの標的化転写産物との配列同一性の程度は、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％である。
【０２７９】

実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、標的遺伝子の約５～約２５の隣接ヌクレオチドと同一のマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子をコードする、又はそのｍｉＲＮＡの前駆体をコードする。いくつかの実施形態では、ｍｉＲＮＡは、ｍＲＮＡが特定の標的ｍＲＮＡを認識し、それに結合することを可能にする配列を有する。実施形態では、ｍｉＲＮＡ配列は、ジヌクレオチドＡＡから開始し、約３０～７０％（約３０～６０％、約４０～６０％、又は約４５％～５５％）のＧＣ含量を含み、対象（例えば、哺乳動物）のゲノム中の標的以外の任意のヌクレオチド配列であって、例えば標準ＢＬＡＳＴ検索による決定として導入されるべきであるヌクレオチド配列とは高いパーセンテージの同一性を有しない。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ（又はｍｉＲＮＡ前駆体）、例えば、２、３、４、５、６、又はそれ以上のｍｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡ前駆体を含む。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、標的配列と少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％又は１００％のヌクレオチド配列相補性を有する、ｍｉＲＮＡ（又はその前駆体）をコードする配列を含む。

【０２８１】

ｓｉＲＮＡ及びｓｈＲＮＡは、内因性マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）遺伝子のプロセシング経路における中間体に類似する。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡは、ｍｉＲＮＡとして機能することができ、その逆も言える。マイクロＲＮＡは、ｓｉＲＮＡのようにＲＩＳＣを使用して、標的遺伝子を下方制御するが、ｓｉＲＮＡと異なり、大部分の動物のｍｉＲＮＡは、ｍＲＮＡを切断しない。代わりに、ｍｉＲＮＡは、翻訳抑制又はポリＡ除去及びｍＲＮＡ分解を通じて、タンパク質出力を低減する。公知のｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍＲＮＡの３’ＵＴＲの内部に存在し；ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲＮＡの５’末端からのヌクレオチド２～８とほぼ完全な相補性を有する部位を標的にするように思われる。この領域は、シード領域として知られる。成熟ｓｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡが互換可能であることから、外因性ｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡと相補的なシードを有するｍＲＮＡを下方制御する。

【０２８２】

公知のｍｉＲＮＡ配列のリストは、特に、ウェルカム・トラスト・サンガー研究所（Ｗｅｌｌｃｏｍｅ Ｔｒｕｓｔ Ｓａｎｇｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ），Ｐｅｎｎ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、メモリアル・スローン・ケタリングがんセンター（Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｓｌｏａｎ Ｋｅｔｔｅｒｉｎｇ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ）、及び欧州分子生物学研究所（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）などの研究組織によって維持されたデータベース内に見出すことができる。公知の有効なｓｉＲＮＡ配列及び同族結合部位についても、関連文献において十分に表されている。ＲＮＡｉ分子は、当該技術分野で公知の技術によって容易に設計及び生成される。加えて、有効な特定の配列モチーフを見出す機会を増加させる計算ツールが存在する。

【０２８３】

タンパク質結合配列

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、タンパク質、例えば、リボソームがＲＮＡ配列内の内部部位に結合することを可能にする、１つ又は複数のタンパク質結合部位を含む。タンパク質結合部位、例えば、リボソーム結合部位を環状ポリリボヌクレオチド中に設計することにより、環状ポリリボヌクレオチドは、環状ポリリボヌクレオチドを宿主の免疫系の成分からマスクすることによって、宿主の免疫系による検知を逃避し得るか又は低下させているか、分解を調節しているか、又は翻訳を調節している。

【０２８４】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、少なくとも１つの免疫タンパク質結合部位を含むことで、例えば、免疫応答、例えば、ＣＴＬ（細胞傷害性Ｔリンパ球

）応答を逃避する。いくつかの実施形態では、免疫タンパク質結合部位は、免疫タンパク質に結合し、外因性としての環状ポリリボヌクレオチドのマスキングを補助するヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態では、免疫タンパク質結合部位は、免疫タンパク質に結合し、外因性又は外来性としての環状ポリリボヌクレオチドの隠蔽を補助するヌクレオチド配列である。

【０２８５】

線状ＲＮＡへのリボソーム会合の伝統的機構は、ＲＮＡのキャップされた５’末端へのリボソーム結合を含む。リボソームは、５’末端から開始コドンに移動するとすぐに、第１のペプチド結合が形成される。本開示によると、環状ポリリボヌクレオチドの翻訳の内部開始（即ち、キャップ非依存性）は、遊離末端又はキャップ末端を必要としない。むしろ、リボソームは、非キャップ内部部位に結合し、それにより、リボソームは、ポリペプチド伸長を開始コドンで開始させる。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、リボソーム結合部位、例えば、開始コドンを含む、１つ又は複数のＲＮＡ配列を含む。

【０２８６】

天然５’ＵＴＲは、翻訳開始における役割を果たす特徴を有する。それは、リボソームが多数の遺伝子の翻訳を開始させるプロセスに関与することが一般に知られるコザック配列のようなシグネチャーを内包する。コザック配列は、コンセンサスＣＣＲ（Ａ／Ｇ）ＣＣＡＵＧＧ（配列番号７９）（ここでＲは、開始コドン（ＡＵＧ）の３塩基上流のプリン（アデニン又はグアニン）である）を有し、それにもう一つの「Ｇ」が後続する。５’ＵＴＲは、伸長因子結合に関与する二次構造を形成することも知られている。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、タンパク質に結合するタンパク質結合配列をコードする。いくつかの実施形態では、タンパク質結合配列は、環状ポリリボヌクレオチドを特異的標的に標的化し、又は局在化する。いくつかの実施形態では、タンパク質結合配列は、タンパク質のアルギニンリッチ領域に特異的に結合する。

【０２８８】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合部位として、限定はされないが、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、及びＲＮＡに結合する任意の他のタンパク質などのタンパク質への結合部位が挙げられる。

【０２８９】

スペーサー配列

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチドは、１つ以上のスペーサー配列を含む。スペーサーは、２つの隣接するポリヌクレオチド領域間で距離又は柔

軟性を提供する、（例えば、１つ以上のヌクレオチドの）任意の隣接するヌクレオチド配列を指す。スペーサーは、本明細書に記載の核酸因子のいずれかの間に存在してもよい。スペーサーはまた、本明細書に記載の核酸因子の内部に存在してもよい。

【０２９０】

例えば、核酸は、以下の要素のいずれかの２つ以上を含み：（Ａ）グループＩ触媒イントロン断片の３’半分；（Ｂ）３’スプライス部位；（Ｃ）３’エクソン断片；（Ｄ）ポリリボヌクレオチドカーゴ；（Ｅ）５’エクソン断片；（Ｆ）５’スプライス部位；及び（Ｇ）グループＩ触媒イントロン断片の５’半分；スペーサー領域は、要素のいずれか１つ以上の間に存在してもよい。要素（Ａ）、（Ｂ）、（Ｃ）、（Ｄ）、（Ｅ）、（Ｆ）、又は（Ｇ）のいずれかは、本明細書に記載のとおり、スペーサー配列によって分離されてもよい。例えば、（Ａ）と（Ｂ）との間、（Ｂ）と（Ｃ）との間、（Ｃ）と（Ｄ）との間、（Ｄ）と（Ｅ）との間、（Ｅ）と（Ｆ）との間、又は（Ｆ）と（Ｇ）との間に、スペーサーが存在してもよい。

【０２９１】

いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、（Ｃ）の５’エクソン断片と（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴとの間に第１のスペーサー領域をさらに含む。スペーサーは、例えば、少なくとも５（例えば、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０）リボヌクレオチドの長さであってもよい。いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、（Ｄ）のポリリボヌクレオチドカーゴと（Ｅ）の５’エクソン断片との間に第２のスペーサー領域をさらに含む。スペーサーは、例えば、少なくとも５（例えば、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０）リボヌクレオチドの長さであってもよい。いくつかの実施形態では、各スペーサー領域は、少なくとも５（例えば、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０）リボヌクレオチドの長さである。各スペーサー領域は、例えば、５～５００（例えば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、又は５００）リボヌクレオチドの長さであってもよい。第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ポリＡ配列を含んでもよい。第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ポリＡ－Ｃ配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ポリＡ－Ｇ配列を含む。いくつかの実施形態では、第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ポリＡ－Ｔ配列を含む。いくつかの実施形態では、第１のスペーサー領域、第２のスペーサー領域、又は第１のスペーサー領域及び第２のスペーサー領域は、ランダム配列を含む。

【０２９２】

スペーサーはまた、本明細書に記載の核酸領域内に存在してもよい。例えば、ポリヌクレオチドカーゴ領域は、１つ又は複数のスペーサーを含んでもよい。スペーサーは、ポリヌクレオチドカーゴ内の領域を分離し得る。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、例えば、少なくとも１０ヌクレオチドの長さ、少なくとも１５ヌクレオチドの長さ、又は少なくとも３０ヌクレオチドの長さであり得る。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５又は３０ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５又は３０ヌクレオチドの長さ以下である。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、２０～５０ヌクレオチドの長さである。特定の実施形態では、スペーサー配列は、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又は５０ヌクレオチドの長さである。

【０２９４】
スペーサー配列は、ポリＡ配列、ポリＡ－Ｃ配列、ポリＣ配列、又はポリＵ配列であり得る。
【０２９５】
いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、ポリＡ－Ｔ、ポリＡ－Ｃ、ポリＡ－Ｇ、又はランダム配列であり得る。
【０２９６】
スペーサー配列を使用して、ＩＲＥＳを隣接する構成要素から分離することで、ＩＲＥＳ又は隣接要素の構造と機能を維持（ｍａｒｔｉｎｉ）することができる。スペーサーは、ＩＲＥＳに応じて特異的に改変することができる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡＦｏｌｄなどのＲＮＡフォールディングのコンピュータソフトウェアを利用して、スペーサーを含むベクターの様々な要素の設計を導くことができる。
【０２９７】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、（例えば、５’アニーリング領域とポリリボヌクレオチドカーゴとの間に）５’スペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、少なくとも１０ヌクレオチドの長さである。別の実施形態では、５’スペーサー配列は、少なくとも１５ヌクレオチドの長さである。さらなる実施形態では、５’スペーサー配列は、少なくとも３０ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５又は３０ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５又は３０ヌクレオチドの長さ以下である。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、２０～５０ヌクレオチドの長さである。特定の実施形態では、５’スペーサー配列は、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又は５０ヌクレオチドの長さである。一実施形態では、５’スペーサー配列は、ポリＡ配列である。別の実施形態では、５’スペーサー配列は、ポリＡ－Ｃ配列である。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、ポリＡ－Ｇ配列を含む。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、ポリＡ－Ｔ配列を含む。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、ランダム配列を含む。
【０２９８】
いくつかの実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、（例えば、３’アニーリング領域とポリリボヌクレオチドカーゴとの間に）３’スペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、３’スペーサー配列は、少なくとも１０ヌクレオチドの長さである。別の実施形態では、３’スペーサー配列は、少なくとも１５ヌクレオチドの長さである。さらなる実施形態では、３’スペーサー配列は、少なくとも３０ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、３’スペーサー配列は、少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５又は３０ヌクレオチドの長さである。いくつかの実施形態では、３’スペーサー配列は、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５又は３０ヌクレオチドの長さ以下である。いくつかの実施形態では、３’スペーサー配列は、２０～５０ヌクレオチドの長さである。特定の実施形態では、３’スペーサー配列は、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又は５０ヌクレオチドの長さである。一実施形態では、３’スペーサー配列は、ポリＡ配列である。別の実施形態では、５’スペーサー配列は、ポリＡ－Ｃ配列である。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、ポリＡ－Ｇ配列を含む。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、ポリＡ－Ｔ配列を含む。いくつかの実施形態では、５’スペーサー配列は、ランダム配列を含む。

【０２９９】
一実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、５’スペーサー配列を含むが、３’スペーサー配列を含まない。別の実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、３’スペーサー配列を含むが、５’スペーサー配列を含まない。別の実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、５’スペーサー配列も３’スペーサー配列も含まない。別の実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、ＩＲＥＳ配列を含まない。さらなる実施形態では、ポリリボヌクレオチドは、ＩＲＥＳ配列、５’スペーサー配列又は３’スペーサー配列を含まない。
【０３００】
いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、少なくとも３リボヌクレオチド、少なくとも４リボヌクレオチド、少なくとも５リボヌクレオチド、少なくとも約８リボヌクレオチド、少なくとも約１０リボヌクレオチド、少なくとも約１２リボヌクレオチド、少なくとも約１５リボヌクレオチド、少なくとも約２０リボヌクレオチド、少なくとも約２５リボヌクレオチド、少なくとも約３０リボヌクレオチド、少なくとも約４０リボヌクレオチド、少なくとも約５０リボヌクレオチド、少なくとも約６０リボヌクレオチド、少なくとも約７０リボヌクレオチド、少なくとも約８０リボヌクレオチド、少なくとも約９０リボヌクレオチド、少なくとも約１００リボヌクレオチド、少なくとも約１２０リボヌクレオチド、少なくとも約１５０リボヌクレオチド、少なくとも約２００リボヌクレオチド、少なくとも約２５０リボヌクレオチド、少なくとも約３００リボヌクレオチド、少なくとも約４００リボヌクレオチド、少なくとも約５００リボヌクレオチド、少なくとも約６００リボヌクレオチド、少なくとも約７００リボヌクレオチド、少なくとも約８００リボヌクレオチド、少なくとも約９００リボヌクレオチド、又は少なくとも約１００リボヌクレオチドを含む。
【０３０１】
生成方法
無細胞系における生成方法
本開示はまた、環状ＲＮＡを生成する方法を提供する。例えば、デオキシリボヌクレオチド鋳型を、無細胞系において（例えば、インビトロ転写により）転写して、線状ＲＮＡを生成することができる。線状ポリリボヌクレオチドは、スプライシングに適合するポリリボヌクレオチドを生成し、それは自己スプライスされて、環状ポリリボヌクレオチドを生成し得る。
【０３０２】
いくつかの実施形態では、本開示は、線状ポリリボヌクレオチド；及び自己スプライシングする線状ポリリボヌクレオチドを、線状ポリリボヌクレオチドの３’及び５’スプライス部位のスプライシングに適した条件下で準備し；それにより環状ポリリボヌクレオチドを生成することによる、（例えば、無細胞系において）環状ポリリボヌクレオチドを生成する方法を提供する。
【０３０３】
いくつかの実施形態では、本開示は、線状ポリリボヌクレオチドをコードするデオキシリボヌクレオチドを準備し；無細胞系においてデオキシリボヌクレオチドを転写し、線状ポリリボヌクレオチドを生成し；任意選択的に、スプライシングに適合する線状ポリリボヌクレオチドを精製し；そして線状ポリリボヌクレオチドを、線状ポリリボヌクレオチドの３’及び５’スプライス部位のスプライシングに適した条件下で自己スプライシングし、それにより環状ポリリボヌクレオチドを生成することによる、環状ポリリボヌクレオチドを生成する方法を提供する。
【０３０４】
いくつかの実施形態では、本開示は、線状ポリリボヌクレオチドをコードするデオキシリボヌクレオチドを準備し；無細胞系においてデオキシリボヌクレオチドを転写して、線状ポリリボヌクレオチドを生成し（ここで転写は、線状ポリリボヌクレオチドの３’及び５’スプライス部位のスプライシングに適した条件下で溶液中で行い）、それにより環状ポリリボヌクレオチドを生成することによる、環状ポリリボヌクレオチドを生成する方法

を提供する。いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、５’分割－イントロン及び３’分割－イントロン（例えば、環状ポリリボヌクレオチドを生成するための自己スプライシング構築物）を含む。いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、５’アニーリング領域及び３’アニーリング領域を含む。

【０３０５】

インビトロ転写及び自己スプライシングに適する条件は、１つ以上の観点における生理的状態を再現する任意の条件（例えば、水性緩衝液又は溶液などの溶液又は緩衝液）を含み得る。いくつかの実施形態では、好適な条件は、０．１～１００ｍＭのＭｇ２＋イオン又はその塩（例えば、１～１００ｍＭ、１～５０ｍＭ、１～２０ｍＭ、５～５０ｍＭ、５～２０ｍＭ、又は５～１５ｍＭ）を含む。いくつかの実施形態では、好適な条件は、１～１０００ｍＭのＫ＋イオン又はＫＣｌなどのその塩（例えば、１～１０００ｍＭ、１～５００ｍＭ、１～２００ｍＭ、５０～５００ｍＭ、１００～５００ｍＭ、又は１００～３００ｍＭ）を含む。いくつかの実施形態では、好適な条件は、１～１０００ｍＭのＣｌ～イオン又はＫＣｌなどのその塩（例えば、１～１０００ｍＭ、１～５００ｍＭ、１～２００ｍＭ、５０～５００ｍＭ、１００～５００ｍＭ、又は１００～３００ｍＭ）を含む。いくつかの実施形態では、好適な条件は、０．１～１００ｍＭのＭｎ２＋イオン又はＭｎＣｌ２などのその塩（例えば、０．１～１００ｍＭ、０．１～５０ｍＭ、０．１～２０ｍＭ、０．１～１０ｍＭ、０．１～５ｍＭ、０．１～２ｍＭ、０．５～５０ｍＭ、０．５～２０ｍＭ、０．５～１５ｍＭ、０．５～５ｍＭ、０．５～２ｍＭ、又は０．１～１０ｍＭ）を含む。いくつかの実施形態では、好適な条件は、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）（例えば、１～１０００μＭ、１～５００μＭ、１～２００μＭ、５０～５００μＭ、１００～５００μＭ、１００～３００μＭ、０．１～１００ｍＭ、０．１～５０ｍＭ、０．１～２０ｍＭ、０．１～１０ｍＭ、０．１～５ｍＭ、０．１～２ｍＭ、０．５～５０ｍＭ、０．５～２０ｍＭ、０．５～１５ｍＭ、０．５～５ｍＭ、０．５～２ｍＭ、又は０．１～１０ｍＭ）を含む。いくつかの実施形態では、好適な条件は、０．１ｍＭ及び１００ｍＭのリボヌクレオシド三リン酸（ＮＴＰ）（例えば、０．１～１００ｍＭ、０．１～５０ｍＭ、０．１～１０ｍＭ、１～１００ｍＭ、１～５０ｍＭ、又は１～１０ｍＭ）を含む。いくつかの実施形態では、好適な条件は、４～１０のｐＨ（例えば、５～９のｐＨ、６～９のｐＨ、又は６．５～８．５のｐＨ）を含む。いくつかの実施形態では、好適な条件は、４℃～５０℃（例えば、１０℃～４０℃、１５℃～４０℃、２０℃～４０℃、又は３０℃～４０℃）の温度を含む。

【０３０６】

いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、デオキシリボ核酸、例えば本明細書に記載のデオキシリボ核酸、例えば、ＤＮＡベクター、線状化ＤＮＡベクター、又はｃＤＮＡから生成される。いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、無細胞系における転写（例えば、インビトロ転写）によって、デオキシリボ核酸から転写される。

【０３０７】

細胞内での生成方法

本開示はまた、細胞内、例えば、原核細胞又は真核細胞内で環状ＲＮＡを生成する方法を提供する。いくつかの実施形態では、外因性ポリリボヌクレオチドが細胞に提供される（例えば、本明細書に記載の線状ポリリボヌクレオチド又は本明細書に記載の線状ポリリボヌクレオチドの転写をコードするＤＮＡ分子）。線状ポリリボヌクレオチドは、細胞に提供される外因性ＤＮＡ分子から細胞内で転写され得る。線状ポリリボヌクレオチドは、細胞に一過性に提供される外因性組換えＤＮＡ分子から細胞内で転写され得る。いくつかの実施形態では、外因性ＤＮＡ分子は、細胞のゲノム中に組み込まれない。いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、細胞のゲノム中に組み込まれる組換えＤＮＡ分子から細胞内で転写される。

【０３０８】

いくつかの実施形態では、細胞は、原核細胞である。いくつかの実施形態では、本明細

書に記載のポリリボヌクレオチドを含む原核細胞は、細菌細胞又は古細菌細胞であってもよい。例えば、本明細書に記載のポリリボヌクレオチドを含む原核細胞は、大腸菌（Ｅｃｏｌｉ）、好塩古細菌（例えば、ハロフェラックス・ボルカニ（Ｈａｌｏｆｅｒａｘ ｖｏｌｃａｎｉｉｉ））、スフィンゴモナス（Ｓｐｈｉｎｇｏｍｏｎａｓ）、シアノバクテリア（例えば、シネチョコッカス・エロンガトゥス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｅｌｏｎｇａｔｕｓ）、スピルリナ（Ｓｐｉｒｕｌｉｎａ）（アルトロスピラ（Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ））属種、及びシネコシスティス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ）属種）、ストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、放線菌（ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｓ）（例えば、ノノムラエア（Ｎｏｎｏｍｕｒａｅａ）、キタサトスポラ（Ｋｉｔａｓａｔｏｓｐｏｒａ）、又はテルモビフィダ（Ｔｈｅｒｍｏｂｉｆｉｄａ））、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属種（例えば、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、炭疽菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｈｒａｃｉｓ）、セレウス菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ））、ベータプロテオバクテリア（ｂｅｔａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ）（例えば、バークホルデリア（Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ））、アルファプロテオバクテリア（ａｌｐｈａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａｌ）（例えば、アグロバクテリウム（Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ））、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）（例えば、プチダ菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ））、及び腸内細菌（ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａ）であってもよい。原核細胞は、培地中で増殖させてもよい。原核細胞は、バイオリアクター内に含めてもよい。

【０３０９】

いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリリボヌクレオチドを含む真核細胞は、単細胞真核細胞である。いくつかの実施形態では、単細胞真核生物は、酵母細胞（例えば、出芽酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）及び他のサッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属種）、ブレタノマイセス（Ｂｒｅｔｔａｎｏｍｙｃｅｓ）属種、シゾサッカロマイセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属種、トルラスポラ（Ｔｏｒｕｌａｓｐｏｒａ）属種、及びピキア（Ｐｉｃｈｉａ）属種などの単細胞真菌細胞である。いくつかの実施形態では、単細胞真核細胞は、単細胞動物細胞である。単細胞動物細胞は、多細胞動物から単離され、培養下で増殖される細胞、又はその娘細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、単細胞動物細胞は、脱分化され得る。いくつかの実施形態では、単細胞真核細胞は、単細胞植物細胞である。単細胞植物細胞は、多細胞動物から単離され、培養下で増殖される細胞、又はその娘細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、単細胞植物細胞は、脱分化され得る。いくつかの実施形態では、単細胞植物細胞は、植物カルスに由来する。実施形態では、単細胞細胞は、植物細胞プロトプラストである。いくつかの実施形態では、単細胞真核細胞は、単細胞真核生物の藻類細胞、例えば、単細胞の緑色藻類、珪藻、ユーグレナ藻、又は渦鞭毛藻類である。目的の単細胞真核藻類の非限定例として、ドナリエラ・サリナ（Ｄｕｎａｌｉｅｌｌａ ｓａｌｉｎａ）、クロレラ・バルガリス（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｖｕｌｇａｒｉｓ）、クロレラ・ゾフィンギエンシス（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｚｏｆｉｎｇｉｅｎｓｉｓ）、ヘマトコッカス藻（Ｈａｅｍａｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｌｕｖｉａｌｉｓ）、ネオクロリス・オレオアブンダンス（Ｎｅｏｃｈｌｏｒｉｓ ｏｌｅｏａｂｕｎｄａｎｓ）及び他のネオクロリス（Ｎｅｏｃｈｌｏｒｉｓ）属種、プロトシフォン・ボトリオイデス（Ｐｒｏｔｏｓｉｐｈｏｎ ｂｏｔｒｙｏｉｄｅｓ）、ボトリオコッカス・ブラウニイ（Ｂｏｔｒｙｏｃｏｃｃｕｓ ｂｒａｕｎｉｉ）、クリプトコッカス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属種、コナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）及び他のクラミドモナス（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ）属種が挙げられる。いくつかの実施形態では、単細胞真核細胞は、原生生物細胞である。いくつかの実施形態では、単細胞真核細胞は、原生動物細胞である。

【０３１０】

いくつかの実施形態では、真核細胞は、多細胞真核生物の細胞である。例えば、多細胞真核生物は、脊椎動物、無脊椎動物、多細胞真菌、多細胞藻、及び多細胞植物からなる群

から選択されてもよい。いくつかの実施形態では、真核生物は、ヒトである。いくつかの実施形態では、真核生物は、非ヒト脊椎動物である。いくつかの実施形態では、真核生物は、無脊椎動物である。いくつかの実施形態では、真核生物は、多細胞真菌である。いくつかの実施形態では、真核生物は、多細胞植物である。実施形態では、真核細胞は、ヒトの細胞、又は非ヒト霊長類（例えば、サル、類人猿）、有蹄動物（例えば、ウシ、水牛、バイソン、ヒツジ、ヤギ、及びジャコウウシを含むウシ科；ブタ；ラクダ、ラマ、及びアルパカを含むラクダ類；シカ、アンテロープ；並びにウマ及びロバを含むウマ類）、肉食動物（例えば、イヌ、ネコ）、齧歯類（例えば、ラット、マウス、モルモット、ハムスター、リス）、若しくはウサギ類（例えば、ウサギ、ノウサギ）などの非ヒト哺乳動物の細胞である。実施形態では、真核細胞は、トリ、例えば鳥類分類群キジ目（Ｇａｌｌｉｆｏｒｍｅｓ）のメンバー（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、キジ、ウズラ）、ガンカモ目（Ａｎｓｅｒｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、アヒル、ガチョウ）、古顎類（Ｐａｌｅａｏｇｎａｔｈａｅ）（例えば、ダチョウ、エミュー）、ハト目（Ｃｏｌｕｍｂｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、ハト（ｐｉｇｅｏｎｓ）、ハト（ｄｏｖｅｓ））、又はオウム目（Ｐｓｉｔｔａｃｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、オウム）の細胞である。実施形態では、真核細胞は、節足動物（例えば、昆虫、クモ類、甲殻類）、線虫、環形動物、蠕虫、又は軟体類の細胞である。実施形態では、真核細胞は、被子植物（双子葉又は単子葉であり得る）又は裸子植物（例えば、針葉樹、ソテツ、マオウ門（Ｇｎｅｔｏｐｈｙｔｅ）、イチョウ）、シダ、ツクシ、ヒカゲノカズラ、又はコケ植物などの多細胞植物の細胞である。実施形態では、真核細胞は、真核多細胞藻類の細胞である。

【０３１１】

真核細胞は、培地中で増殖させてもよい。真核細胞は、バイオリアクター内に含めてもよい。

【０３１２】

精製方法

１つ以上の精製ステップは、本明細書に記載の方法に含めてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、線状ポリリボヌクレオチドを自己スプライシングする前に、実質的に濃縮されているか又は純粋である（例えば、精製されている）。他の実施形態では、線状ポリリボヌクレオチドは、線状ポリリボヌクレオチドを自己スプライシングする前に精製されていない。いくつかの実施形態では、得られる環状ＲＮＡは精製されている。

【０３１３】

精製は、１つ以上の望まれない成分、例えば、任意の未反応の開始材料、副産物、酵素、又は他の反応成分から所望の反応産物を分離又は濃縮することを含み得る。例えば、無細胞系における転写（例えば、インビトロ転写）後の線状ポリリボヌクレオチドの精製は、線状ポリリボヌクレオチドを自己スプライシングする前に、ＤＮＡ鋳型からの分離又は濃縮を含んでもよい。スプライシング後の環状ＲＮＡ産物の精製を用いて、環状ＲＮＡをその対応する線状ＲＮＡから分離又は濃縮することができる。ＲＮＡの精製方法は、当業者に公知であり、酵素精製又はクロマトグラフィーによる精製を含む。

【０３１４】

いくつかの実施形態では、精製方法は、５０％未満（例えば、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、４％、３％、２％、又は１％未満）の線状ポリリボヌクレオチドを有する環状ポリリボヌクレオチドをもたらす。

【０３１５】

バイオリアクター

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の環状ポリリボヌクレオチドを生成する任意の方法は、バイオリアクター内で実施してもよい。バイオリアクターは、生物又はそのような生物に由来する生化学的活性物質を含む化学的又は生物学的プロセスが実施される、任意の容器を指す。バイオリアクターは、本明細書に記載の環状ＲＮＡを生成するための無細胞法に適合し得る。バイオリアクター用の容器は、単回使用（ディスポーザブル）、

オートクレーブ可能、又は滅菌可能であり得る、培養フラスコ、ディッシュ、又はバッグを含んでもよい。バイオリアクターは、ガラス製であってもよい、又はポリマーベースであってもよい、又は他の材料で製造されてもよい。

【０３１６】

バイオリアクターの例として、限定はされないが、撹拌タンク（例えば、十分に混合された）バイオリアクター及び平板（例えば、プラグフロー）バイオリアクター、空輸バイオリアクター、膜撹拌タンク（ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｓｔｉｒｒｅｄ　ｔａｎｋ）、スピンフィルター撹拌タンク、振動ミキサー、流動層リアクター、及び膜バイオリアクターが挙げられる。バイオリアクターを運転するモードは、バッチ又は連続プロセスであってもよい。バイオリアクターは、試薬及び製品の流れが継続的に供与され、システムから取り除かれる場合、連続的である。バッチバイオリアクターは、連続再循環フローを有し得るが、試薬又は製品回収の連続供与を有し得ない。

【０３１７】

本開示のいくつかの方法は、環状ポリリボヌクレオチドの大規模生成を対象とする。大規模生成方法の場合、方法は、１リットル（Ｌ）～５０Ｌ、又はそれ以上（例えば、５Ｌ、１０Ｌ、１５Ｌ、２０Ｌ、２５Ｌ、３０Ｌ、３５Ｌ、４０Ｌ、４５Ｌ、５０Ｌ、又はそれ以上）の体積で実施することができる。いくつかの実施形態では、方法は、５Ｌ～１０Ｌ、５Ｌ～１５Ｌ、５Ｌ～２０Ｌ、５Ｌ～２５Ｌ、５Ｌ～３０Ｌ、５Ｌ～３５Ｌ、５Ｌ～４０Ｌ、５Ｌ～４５Ｌ、１０Ｌ～１５Ｌ、１０Ｌ～２０Ｌ、１０Ｌ～２５Ｌ、２０Ｌ～３０Ｌ、１０Ｌ～３５Ｌ、１０Ｌ～４０Ｌ、１０Ｌ～４５Ｌ、１０Ｌ～５０Ｌ、１５Ｌ～２０Ｌ、１５Ｌ～２５Ｌ、１５Ｌ～３０Ｌ、１５Ｌ～３５Ｌ、１５Ｌ～４０Ｌ、１５Ｌ～４５Ｌ、又は１５～５０Ｌの体積で実施することができる。

【０３１８】

いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、少なくとも１ｇの環状ＲＮＡを生成し得る。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、１～２００ｇの環状ＲＮＡ（例えば、１～１０ｇ、１～２０ｇ、１～５０ｇ、１０～５０ｇ、１０～１００ｇ、５０～１００ｇ、５０～２００ｇの環状ＲＮＡ）を生成し得る。いくつかの実施形態では、生成される量は、１リットル当たりで測定され（例えば、１リットル当たり１～２００ｇ）、バッチ又は反応当たりで測定され（例えば、バッチ又は反応当たり１～２００ｇ）、又は単位時間当たりで測定される（例えば、１時間又は１日当たり１～２００ｇ）。

【０３１９】

いくつかの実施形態では、生成能力を増強するため、２つ以上のバイオリアクターを連続的に利用することができる（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、又は９つのバイオリアクターを連続的に使用することができる）。

【０３２０】

使用方法

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のとおりに作製された環状ポリリボヌクレオチドは、治療又は農業におけるエフェクターとして使用される。

【０３２１】

例えば、本明細書に記載の方法によって作製された環状ポリリボヌクレオチドは、（例えば、医薬、動物、又は農業組成物で）対象に投与してもよい。いくつかの実施形態では、対象は、脊椎動物（例えば、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、又は両生類）である。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、対象は非ヒト哺乳動物である。実施形態では、対象は、非ヒト霊長類（例えば、サル、類人猿）、有蹄動物（例えば、ウシ、水牛、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ラクダ、ラマ、アルパカ、シカ、ウマ、ロバ）、肉食動物（例えば、イヌ、ネコ）、齧歯類（例えば、ラット、マウス）、又はウサギ類（例えば、ウサギ）などの非ヒト哺乳動物である。実施形態では、対象は、キジ目（Ｇａｌｌｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、キジ、ウズラ）、ガンカモ目（Ａｎｓｅｒｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、アヒル、ガチョウ）、古顎類（Ｐａｌｅａｏｇｎａｔｈａｅ）（例えば、ダチョウ、エミュー）、ハト目（Ｃｏｌｕｍｂｉｆｏｒ

ｍｅｓ）（例えば、ハト（ｐｉｇｅｏｎｓ）、ハト（ｄｏｖｅｓ））、又はオウム目（Ｐｓｉｔｔａｃｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、オウム）といった鳥類分類群のメンバーなどの鳥類である。実施形態では、対象は、節足動物（例えば、昆虫、クモ類、甲殻類）、線虫、環形動物、蠕虫、又は軟体類などの無脊椎動物である。実施形態では、対象は、無脊椎動物の農業害虫又は無脊椎動物若しくは脊椎動物宿主に対する寄生虫である無脊椎動物である。実施形態では、対象は、被子植物（双子葉又は単子葉であり得る）又は裸子植物（例えば、針葉樹、ソテツ、マオウ門（Ｇｎｅｔｏｐｈｙｔｅ）、イチョウ）、シダ、ツクシ、ヒカゲノカズラ、又はコケ植物などの植物である。実施形態では、対象は、真核藻類（単細胞又は多細胞）である。実施形態では、対象は、作条作物、果実生成植物及び樹木、野菜、樹木、及び観賞植物、例えば、観賞花、低木、樹木、グランドカバー、及び芝生などの農業又は園芸上重要な植物である。

【０３２２】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の組成物又は調製物を対象に提供することによる、対象を変更する方法を提供する。いくつかの実施形態では、組成物又は調製物は、核酸分子（例えば、本明細書に記載のＤＮＡ分子又はＲＮＡ分子）であるか又はそれを含み、ポリヌクレオチドは、真核生物対象に提供される。いくつかの実施形態では、組成物又は調製物は、本明細書に記載の核酸を含む真核又は原核細胞であるか又はそれを含む。

【０３２３】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の組成物又は調製物を対象に提供することによる、それを必要とする対象における症状を処置する方法を提供する。いくつかの実施形態では、組成物又は調製物は、核酸分子（例えば、本明細書に記載のＤＮＡ分子又はＲＮＡ分子）であるか又はそれを含み、ポリヌクレオチドは、真核生物対象に提供される。いくつかの実施形態では、組成物又は調製物は、本明細書に記載の核酸を含む真核又は原核細胞であるか又はそれを含む。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含む真核生物又は原核細胞を対象に提供することによる、環状ポリリボヌクレオチドを対象に提供する方法を提供する。

【０３２５】

調製物

本開示のいくつかの実施形態では、本明細書に記載の環状ポリリボヌクレオチドは、組成物、例えば、細胞、植物、無脊椎動物、非ヒト脊椎動物、又はヒト対象への送達のための組成物、例えば、農業、動物、又は医薬組成物で製剤化することができる。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、医薬組成物で製剤化される。いくつかの実施形態では、組成物は、環状ポリリボヌクレオチド及び希釈剤、担体、アジュバント、又はそれらの組み合わせを含む。特定の実施形態では、組成物は、本明細書に記載の環状ポリリボヌクレオチド及び担体又は担体を全く含まない希釈剤を含む。いくつかの実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドと担体を全く含まない希釈剤とを含む組成物は、環状ポリリボヌクレオチドの対象へのネイキッド送達に使用される。

【０３２６】

塩

いくつかの場合、本明細書に提供される組成物又は医薬組成物は、１つ又は複数の塩を含む。浸透圧を制御するため、ナトリウム塩などの生理学的塩が、本明細書に提供される組成物に含まれ得る。他の塩は、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二ナトリウム、及び／又は塩化マグネシウムなどを含み得る。いくつかの場合、組成物は、１つ又は複数の薬学的に許容できる塩と共に製剤化される。１つ又は複数の薬学的に許容できる塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムイオンなどの無機イオンのものを含み得る。そのような塩は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸、メタンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、酢酸、フマル酸、コハク酸、乳酸、マンデル酸、

リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、又はマレイン酸などの無機酸又は有機酸の塩を含み得る。ポリリボヌクレオチドは、線状又は環状のいずれかの形態で存在し得る。

【０３２７】

緩衝剤／ｐＨ

本明細書に提供される組成物又は医薬組成物は、トリス緩衝剤；ホウ酸緩衝剤；コハク酸緩衝剤；ヒスチジン緩衝剤（例えば、水酸化アルミニウムアジュバントを有する）；又はクエン酸緩衝剤などの１つ又は複数の緩衝剤を含み得る。緩衝剤は、いくつかの場合、５～２０ｍＭの範囲内に含まれる。

【０３２８】

本明細書に提供される組成物又は医薬組成物は、約５．０～約８．５の間、約６．０～約８．０の間、約６．５～約７．５の間、又は約７．０～約７．８の間のｐＨを有し得る。組成物又は医薬組成物は、約７のｐＨを有し得る。ポリリボヌクレオチドは、線状又は環状のいずれかの形態で存在し得る。

【０３２９】

洗浄剤／界面活性剤

本明細書で提供される組成物又は医薬組成物は、意図される投与経路に応じて、１種又は複数種の洗浄剤及び／又は界面活性剤、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（一般に「Ｔｗｅｅｎ（登録商標）」と呼ばれる）、例えば、ポリソルベート２０及びポリソルベート８０；ＤＯＷＦＡＸ（商標）という商品名で販売されているエチレンオキシド（ＥＯ）、プロピレンオキシド（ＰＯ）、及び／又はブチレンオキシド（ＢＯ）のコポリマー、例えば、線状ＥＯ／ＰＯブロックコポリマー；エトキシ（オキシ－ｌ，２－エタンジイル）基の繰り返し数が異なり得るオクトキシノール、例えば、オクトキシノール－９（Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００、又はｔ－オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）；（オクチルフェノキシ）ポリエトキシエタノール（ＩＧＥＰＡＬ　ＣＡ－６３０／ＮＰ－４０）；リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（レシチン）；ノニルフェノールエトキシレート、例えば、Ｔｅｒｇｉｔｏｌ（商標）ＮＰシリーズ；ラウリルアルコール、セチルアルコール、ステアリルアルコール及びオレイルアルコール由来のポリオキシエチレン脂肪族エーテル（Ｂｒｉｊ（登録商標）界面活性剤として知られる）、例えば、トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（Ｂｒｉｊ（登録商標）　３０）；並びにソルビタンエステル（一般に、「ＳＰＡＮ（登録商標）」として知られる）、例えば、ソルビタントリオレエート（Ｓｐａｎ（登録商標）　８５）及びソルビタンモノラウレート、オクトキシノール（オクトキシノール－９（Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００）又はｔ－オクチルフェノキシポリエトキシエタノールなど）、セチルトリメチルアンモニウムブロミド（「ＣＴＡＢ」）、又はデオキシコール酸ナトリウムを含むことができる。１種又は複数種の洗浄剤及び／又は界面活性剤は、微量でのみ含まれ得る。いくつかの例では、組成物は、オクトキシノール－１０及びポリソルベート８０のそれぞれを１ｍｇ／ｍｌ未満含むことができる。本明細書では、非イオン性界面活性剤を使用することができる。界面活性剤は、それらの「ＨＬＢ」（親水性／親油性バランス）によって分類することができる。いくつかの例では、界面活性剤は、少なくとも１０、少なくとも１５、及び／又は少なくとも１６のＨＬＢを有する。ポリリボヌクレオチドは、線状又は環状の形態で含まれ得る。

【０３３０】

希釈剤

いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、環状ポリリボヌクレオチド及び希釈剤を含む。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、線状ポリリボヌクレオチド及び希釈剤を含む。

【０３３１】

希釈剤は、非担体賦形剤であり得る。非担体賦形剤は、本明細書に記載される環状ポリリボヌクレオチドなどの、組成物のためのビヒクル又は媒体として働く。非担体賦形剤は、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチドなどの、組成物のためのビヒクル又は

媒体として働く。非担体賦形剤の非限定的な例としては、溶媒、水性溶媒、非水性溶媒、分散媒、希釈剤、分散体、懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤、乳化剤、保存料、ポリマー、ペプチド、タンパク質、細胞、ヒアルロニダーゼ、分散剤、造粒剤、崩壊剤、結合剤、緩衝剤（例えば、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ））、滑沢剤、油、及びそれらの混合物が挙げられる。非担体賦形剤は、米国食品医薬品局（Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）（ＦＤＡ）によって承認され、細胞透過効果を示さないＩｎａｃｔｉｖｅ Ｉｎｇｒｅｄｉｅｎｔ Ｄａｔａｂａｓｅに列挙された非有効成分のいずれかであり得る。非担体賦形剤は、例えば、獣医学的使用に好適な非ヒト動物への投与に好適な任意の不活性成分であり得る。組成物を様々な動物への投与に好適にするための、ヒトへの投与に好適な組成物の変更は、十分に理解されており、通常の技能を有する獣医薬理学者は、あったとしても通常の実験のみでこのような変更を設計及び／又は行うことができる。

【０３３２】

ある実施形態では、環状ポリリボヌクレオチドは、希釈剤を含むものなどのネイキッド送達製剤として送達され得る。ネイキッド送達製剤は、担体を用いずに、修飾又は環状ポリリボヌクレオチドの部分的若しくは完全な封入、キャップされたポリリボヌクレオチド、又はその複合体なしで、環状ポリリボヌクレオチドを細胞に送達する。

【０３３３】

ネイキッド送達製剤は、担体を含まない製剤であり、ここで、環状ポリリボヌクレオチドは、細胞への送達を助ける部分に結合する共有結合修飾を有さず、又は環状ポリリボヌクレオチドの部分的若しくは完全な封入なしである。ある実施形態では、細胞への送達を助ける部分に結合する共有結合修飾を有さない環状ポリリボヌクレオチドは、タンパク質、小分子、粒子、ポリマー、又はバイオポリマーに共有結合されないポリリボヌクレオチドである。細胞への送達を助ける部分に結合する共有結合修飾を有さない環状ポリリボヌクレオチドは、修飾リン酸基を含まない。例えば、細胞への送達を助ける部分に結合する共共有結合修飾を有さない環状ポリリボヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノリン酸エステル、水素ホスホネート、ホスホロアミダート、ホスホロジアミダート、アルキル又はアリールホスホネート、又はホスホトリエステルを含まない。

【０３３４】

ある実施形態では、ネイキッド送達製剤は、トランスフェクション試薬、カチオン性担体、炭水化物担体、ナノ粒子担体、又はタンパク質担体のうちのいずれか又は全てを含まない。ある実施形態では、ネイキッド送達製剤は、フィトグリコーゲンオクテニルスクシネート、フィトグリコーゲンβ－デキストリン、無水物修飾フィトグリコーゲンβ－デキストリン、リポフェクタミン、ポリエチレンイミン、ポリ（トリメチレンイミン）、ポリ（テトラメチレンイミン）、ポリプロピレンイミン、アミノグリコシド－ポリアミン、ジデオキシ－ジアミノ－β－シクロデキストリン、スペルミン、スペルミジン、ポリ（２－ジメチルアミノ）エチルメタクリレート、ポリ（リジン）、ポリ（ヒスチジン）、ポリ（アルギニン）、カチオン化ゼラチン、デンドリマー、キトサン、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、１－［２－（オレオイルオキシ）エチル］－２－オレイル－３－（２－ヒドロキシエチル）イミダゾリニウムクロリド（ＤＯＴＩＭ）、２，３－ジオレイルオキシ－Ｎ－［２（スペルミンカルボキサミド）エチル］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－１－プロパンアミニウムトリフルオロアセテート（ＤＯＳＰＡ）、３Ｂ－［Ｎ－（Ｎ，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロール塩酸塩（ＤＣ－コレステロールＨＣｌ）、ジヘプタデシルアミドグリシルスペルミジン（ＤＯＧＳ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）、Ｎ－（１，２－ジミリスチルオキシプロパ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、Ｎ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）、ヒト血清

アルブミン（ＨＳＡ）、低比重リポタンパク質（ＬＤＬ）、高比重リポタンパク質（ＨＤＬ）、又はグロブリンを含まない。

【０３３５】

ある実施形態では、ネイキッド送達製剤は、非担体賦形剤を含む。ある実施形態では、非担体賦形剤は、細胞透過効果を示さない不活性成分を含む。ある実施形態では、非担体賦形剤は、緩衝液、例えばＰＢＳを含む。ある実施形態では、非担体賦形剤は、溶媒、非水性溶媒、希釈剤、懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤、乳化剤、保存料、ポリマー、ペプチド、タンパク質、細胞、ヒアルロニダーゼ、分散剤、造粒剤、崩壊剤、結合剤、緩衝剤、滑沢剤、又は油である。

【０３３６】

ある実施形態では、ネイキッド送達製剤は、希釈剤を含む。希釈剤は、液体希釈剤又は固体希釈剤であり得る。ある実施形態では、希釈剤は、ＲＮＡ可溶化剤、緩衝液、又は等張剤である。ＲＮＡ可溶化剤の例としては、水、エタノール、メタノール、アセトン、ホルムアミド、及び２－プロパノールが挙げられる。緩衝液の例としては、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）、ビス－トリス、２－［（２－アミノ－２－オキソエチル）－（カルボキシメチル）アミノ］酢酸（ＡＤＡ）、Ｎ－（２－アセトアミド）－２－アミノエタンスルホン酸（ＡＣＥＳ）、ピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス（２－エタンスルホン酸）（ＰＩＰＥＳ）、２－［［１，３－ジヒドロキシ－２－（ヒドロキシメチル）プロパン－２－イル］アミノ］エタンスルホン酸（ＴＥＳ）、３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）、４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）、トリス、トリシン、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、ビシン、又はホスフェートが挙げられる。等張剤の例としては、グリセリン、マンニトール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、トレハロース、又はスクロースが挙げられる。

【０３３７】

担体

ある実施形態では、本開示の組成物は、環状ポリリボヌクレオチド及び担体を含む。ある実施形態では、本開示の組成物は、線状ポリリボヌクレオチド及び担体を含む。

【０３３８】

特定の実施形態において、組成物は、小胞又は他の膜ベースの担体中に本明細書に記載される環状ポリリボヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、組成物は、小胞又は他の膜ベースの担体中に本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチドを含む。

【０３３９】

他の実施形態において、組成物は、細胞、小胞若しくは他の膜ベースの担体中に又はそれらを介して環状ポリリボヌクレオチドを含む。他の実施形態において、組成物は、細胞、小胞若しくは他の膜ベースの担体中に又はそれらを介して線状ポリリボヌクレオチドを含む。一実施形態において、組成物は、リポソーム又は他の同様の小胞中に環状ポリリボヌクレオチドを含む。一実施形態において、組成物は、リポソーム又は他の同様の小胞中に線状ポリリボヌクレオチドを含む。リポソームは、内部の水性区画を取り囲む単層又は多重膜脂質二重層及び比較的不透過性の外側の親油性リン脂質二重層から構成される球形の小胞構造である。リポソームは、アニオン性、中性又はカチオン性であり得る。リポソームは、生体適合性であり、非毒性であり、親水性及び親油性の両方の薬物分子を送達することができ、そのカーゴを血漿酵素による分解から保護し、生体膜及び血液脳関門（ＢＢＢ）を越えてそのロードを輸送する（例えば、概説については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。

【０３４０】

小胞は、いくつかの異なるタイプの脂質から作製され得るが；リン脂質が、薬物担体としてリポソームを生成するために、最も一般的に使用される。多重膜小胞脂質の調製のための方法が、当該技術分野において公知である（例えば、多重膜小胞脂質調製に関連する

その教示内容が参照により本明細書に援用される、米国特許第６，６９３，０８６号明細書を参照されたい）。脂質膜が水溶液と混合されるとき、小胞形成が自然に起こり得るが、それはまた、ホモジナイザー、ソニケーター、又は押し出し装置を用いることによって、振とうの形態の力を加えることによって促進され得る（例えば、概説については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。押し出された脂質は、押し出された脂質の調製に関するその教示内容が参照により本明細書に援用される、Ｔｅｍｐｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ，１５：６４７－６５２，１９９７に記載されるように、減少したサイズのフィルタに通して押し出すことによって調製され得る。

【０３４１】

特定の実施形態において、本開示の組成物は、本明細書に記載される環状ポリリボヌクレオチド及び脂質ナノ粒子、例えば、脂質ナノ粒子を含む。特定の実施形態において、本開示の組成物は、線状ポリリボヌクレオチド及び脂質ナノ粒子を含む。脂質ナノ粒子は、本明細書に記載される環状ポリリボヌクレオチド分子のための生体適合性及び生分解性送達システムを提供する担体の別の例である。脂質ナノ粒子は、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチド分子のための生体適合性及び生分解性送達システムを提供する担体の別の例である。ナノ構造脂質担体（ＮＬＣ）は、ＳＬＮの特性を保持し、薬物安定性及び負荷容量を改善し、薬物漏出を防止する、修飾された固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）である。ポリマーナノ粒子（ＰＮＰ）は、薬物送達の重要な構成要素である。これらのナノ粒子は、薬物送達を、特定の標的に有効に指向し、薬物安定性及び制御薬物放出を改善し得る。リポソーム及びポリマーを組み合わせる新しいタイプの担体である脂質－ポリマーナノ粒子（ＰＬＮ）も、用いられ得る。これらのナノ粒子は、ＰＮＰ及びリポソームの補完的な利点を有する。ＰＬＮは、コア－シェル構造から構成され；ポリマーコアは、安定した構造を提供し、リン脂質シェルは、良好な生体適合性を提供する。したがって、２つの構成要素が、薬物封入効率を増加させ、表面修飾を促進し、水溶性薬物の漏出を防止する。概説については、例えば、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１７，Ｎａｎｏｍａｔｅｒｉａｌｓ７，１２２；ｄｏｉ：１０．３３９０／ｎａｎｏ７０６０１２２を参照されたい。

【０３４２】

担体のさらなる非限定的な例としては、炭水化物担体（例えば、無水物修飾フィトグリコーゲン若しくはグリコーゲン型材料）、タンパク質担体（例えば、環状ポリリボヌクレオチドに共有結合されたタンパク質又は線状ポリリボヌクレオチドに共有結合されたタンパク質）、又はカチオン性担体（例えば、カチオン性リポポリマー又はトランスフェクション試薬）が挙げられる。炭水化物担体の非限定的な例としては、フィトグリコーゲンオクテニルスクシネート、フィトグリコーゲンβ－デキストリン、及び無水物修飾フィトグリコーゲンβ－デキストリンが挙げられる。カチオン性担体の非限定的な例としては、リポフェクタミン、ポリエチレンイミン、ポリ（トリメチレンイミン）、ポリ（テトラメチレンイミン）、ポリプロピレンイミン、アミノグリコシド－ポリアミン、ジデオキシ－ジアミノ－ｂ－シクロデキストリン、スペルミン、スペルミジン、ポリ（２－ジメチルアミノ）エチルメタクリレート、ポリ（リジン）、ポリ（ヒスチジン）、ポリ（アルギニン）、カチオン化ゼラチン、デンドリマー、キトサン、ｌ，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）、Ｎ－［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、ｌ－［２－（オレオイルオキシ）エチル］－２－オレイル－３－（２－ヒドロキシエチル）イミダゾリニウムクロリド（ＤＯＴＩＭ）、２，３－ジオレイルオキシ－Ｎ－［２（スペルミンカルボキサミド）エチル］－Ｎ，Ｎ－ジメチル－ｌ－プロパンアミニウムトリフルオロアセテート（ＤＯＳＰＡ）、３Ｂ－［Ｎ－（Ｎ＼Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロール塩酸塩（ＤＣ－コレステロールＨＣ１）、ジヘプタデシルアミドグリシルスペルミジン（ＤＯＧＳ）、Ｎ，Ｎ－ジステアリル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウム

ブロミド（ＤＤＡＢ）、Ｎ－（ｌ，２－ジミリスチルオキシプロパ－３－イル）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ－ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、及びＮ，Ｎ－ジオレイル－Ｎ，Ｎ－ジメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＤＡＣ）が挙げられる。タンパク質担体の非限定的な例としては、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、低比重リポタンパク（ＬＤＬ）、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）、又はグロブリンが挙げられる。

【０３４３】

エキソソームはまた、本明細書に記載される環状ＲＮＡ組成物又は調製物の薬物送達ビヒクルとして使用され得る。エキソソームはまた、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチド組成物又は調製物の薬物送達ビヒクルとして使用され得る。レビューのためには、Ｈａ ｅｔ ａｌ．Ｊｕｌｙ ２０１６．Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ Ｂ．Ｖｏｌｕｍｅ ６，Ｉｓｓｕｅ ４，Ｐａｇｅｓ ２８７－２９６；ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ａｐｓｂ．２０１６．０２．００１を参照されたい。

【０３４４】

エクスビボ分化赤血球はまた、本明細書に記載される環状ＲＮＡ組成物又は調製物の担体として使用され得る。エクスビボ分化赤血球はまた、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチド組成物又は調製物の担体として使用され得る。例えば、国際公開第２０１５／０７３５８７号パンフレット；国際公開第２０１７／１２３６４６号パンフレット；国際公開第２０１７／１２３６４４号パンフレット；国際公開第２０１８／１０２７４０号パンフレット；国際公開第２０１６／１８３４８２号パンフレット；国際公開第２０１５／１５３１０２号パンフレット；国際公開第２０１８／１５１８２９号パンフレット；国際公開第２０１８／００９８３８号パンフレット；Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．２０１４．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１１１（２８）：１０１３１－１０１３６；米国特許第９，６４４，１８０号明細書；Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１７．Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ ８：４２３；Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．２０１４．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１１１（２８）：１０１３１－１０１３６を参照されたい。

【０３４５】

例えば、国際公開第２０１８／２０８７２８号パンフレットに記載されるようなフソソーム組成物も、本明細書に記載される環状ポリリボヌクレオチド分子を送達するための担体として使用され得る。例えば、国際公開第２０１８／２０８７２８号パンフレットに記載されるようなフソソーム組成物も、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチド分子を送達するための担体として使用され得る。

【０３４６】

ビロソーム及びウイルス様粒子（ＶＬＰ）も、本明細書に記載される環状ポリリボヌクレオチド分子を標的細胞に送達するための担体として使用され得る。ビロソーム及びウイルス様粒子（ＶＬＰ）も、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチド分子を標的細胞に送達するための担体として使用され得る。

【０３４７】

例えば、国際特許公開番号国際公開第２０１１／０９７４８０号パンフレット、国際公開第２０１３／０７０３２４号パンフレット、国際公開第２０１７／００４５２６号パンフレット、又は国際公開第２０２００４１７８４号パンフレットに記載されるような植物ナノ小胞及び植物メッセンジャーパック（ＰＭＰ）も、本明細書に記載される環状ＲＮＡ組成物又は調製物を送達するための担体として使用され得る。植物ナノ小胞及び植物メッセンジャーパック（ＰＭＰ）も、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチド組成物又は調製物を送達するための担体として使用され得る。

【０３４８】

マイクロバブルも、本明細書に記載される環状ポリリボヌクレオチド分子を送達するための担体として使用され得る。マイクロバブルも、本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチド分子を送達するための担体として使用され得る。例えば、米国特許第７１１５

５８３号明細書；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を参照されたい。ある実施形態では、マイクロバブルは、アルブミン被覆されたペルフルオロカーボンマイクロバブルである。

【０３４９】

本明細書に記載の環状ポリリボヌクレオチドを含む担体は、複数の粒子を含み得る。粒子は、３０～７００ナノメートル（例えば、３０～５０、５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、１００～５００、５０～５００、又は２００～７００ナノメートル）の物品サイズ中央値を有し得る。粒子の大きさは、細胞への環状ポリリボヌクレオチドを含むペイロードの沈着に有利に働くように最適化することができる。特定の細胞型への環状ポリリボヌクレオチドの沈着は、異なる粒径に有利であり得る。例えば、粒径は、抗原提示細胞への環状ポリリボヌクレオチドの沈着のために最適化され得る。粒径は、樹状細胞への環状ポリリボヌクレオチドの沈着のために最適化され得る。さらに、粒径は、流入領域リンパ節細胞への環状ポリリボヌクレオチドの沈着のために最適化され得る。

【０３５０】

脂質ナノ粒子

本開示によって提供される組成物、方法、及び送達システムは、特定の実施形態において、本明細書に記載の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む任意の好適な担体又は送達モダリティを用い得る。脂質ナノ粒子は、ある実施形態では、１つ以上のイオン性脂質、例えば、非カチオン性脂質（例えば、中性又はアニオン性、又は両性脂質）；１つ以上のコンジュゲート脂質（ＰＥＧコンジュゲート脂質又は全体が参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表５に記載されるポリマーにコンジュゲートされた脂質など）；１つ以上のステロール（例えば、コレステロール）を含む。

【０３５１】

ナノ粒子形成において使用され得る脂質（例えば、脂質ナノ粒子）は、例えば、参照により援用される国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表４に記載されるものを含み－例えば、脂質含有ナノ粒子は、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表４中の脂質の１つ以上を含み得る。脂質ナノ粒子は、さらなる要素、例えば、ポリマー、例えば、参照により援用される国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表５に記載されるポリマーを含み得る。

【０３５２】

ある実施形態では、コンジュゲート脂質は、存在する場合、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）（ｌ－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）など）、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、ＰＥＧスクシネートジアシルグリセロール（ＰＥＧＳ－ＤＡＧ）（４－Ｏ－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－ｌ－Ｏ－（ｗ－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）など）、ＰＥＧジアルコキシプロピルカルバム、Ｎ－（カルボニル－メトキシポリエチレングリコール２０００）－１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンナトリウム塩、及び国際公開第２０１９０５１２８９号パンフレット（参照により援用される）の表２に記載されるもの、並びに上記のものの組合せのうちの１つ以上を含み得る。

【０３５３】

ある実施形態では、脂質ナノ粒子に組み込まれ得るステロールとしては、参照により援用される国際公開第２００９／１２７０６０号パンフレット又は米国特許出願公開第２０

１０／０１３０５８８号明細書に記載されるものなどの、コレステロール又はコレステロール誘導体の１つ以上が挙げられる。さらなる例示的なステロールとしては、参照により本明細書に援用される、Ｅｙｇｅｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）、ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．０ｃ０１３８６に記載されるものを含む植物ステロールが挙げられる。

【０３５４】

ある実施形態では、脂質粒子は、イオン化可能な脂質、非カチオン性脂質、粒子の凝集を阻害するコンジュゲート脂質、及びステロールを含む。これらの構成要素の量は、独立して、所望の特性を達成するために変化され得る。例えば、ある実施形態では、脂質ナノ粒子は、総脂質の約２０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％の量のイオン化可能な脂質（他の実施形態において、それは、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の２０～７０％（ｍｏｌ）、３０～６０％（ｍｏｌ）又は４０～５０％（ｍｏｌ）；約５０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％であり得る）、総脂質の約５ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％の量の非カチオン性脂質、総脂質の約０．５ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％の量のコンジュゲート脂質、及び総脂質の約２０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％の量のステロールを含む。総脂質対核酸の比率は、必要に応じて変化され得る。例えば、総脂質対核酸（質量又は重量）比は、約１０：１～約３０：１であり得る。

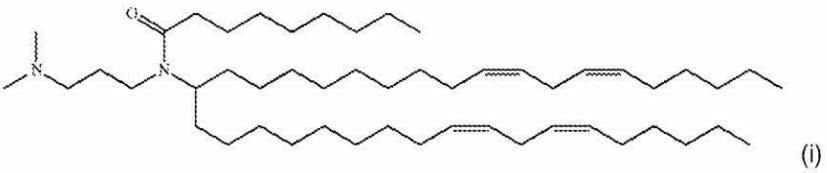
【０３５５】

ある実施形態では、脂質対核酸比（質量／質量比；ｗ／ｗ比）は、約１：１～約２５：１、約１０：１～約１４：１、約３：１～約１５：１、約４：１～約１０：１、約５：１～約９：１、又は約６：１～約９：１の範囲であり得る。脂質及び核酸の量は、所望のＮ／Ｐ比、例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれ以上のＮ／Ｐ比を得るために調整され得る。一般に、脂質ナノ粒子製剤の全脂質含量は、約５ｍｇ／ｍｌ～約３０ｍｇ／ｍＬの範囲であり得る。

【０３５６】

本明細書に記載される組成物、例えば、本明細書に記載される核酸（例えば、ＲＮＡ（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド））の送達のための脂質ナノ粒子を形成するために（例えば、他の脂質成分と組み合わせて）使用され得る脂質化合物のいくつかの非限定的な例としては、以下のものが挙げられる。

【化２０】

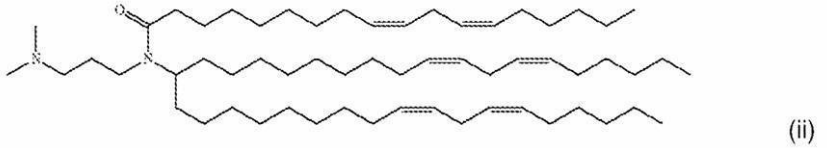


(i)

ある実施形態では、式（ｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【０３５７】

【化２１】

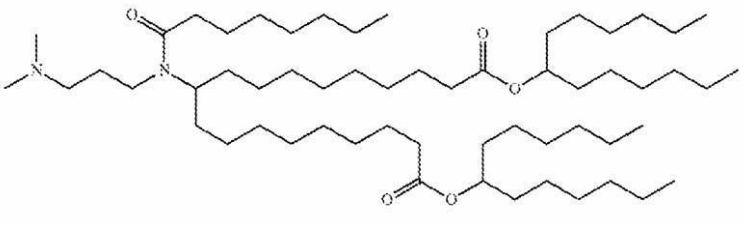


(ii)

ある実施形態では、式（ｉｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【０３５８】

【化２２】

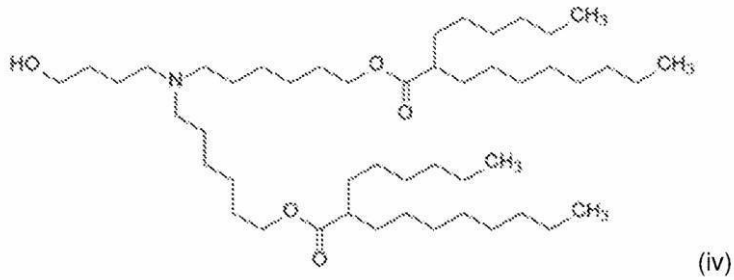


(iii)

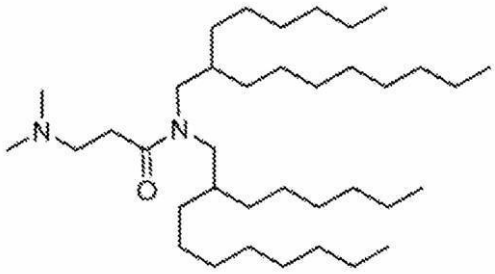
ある実施形態では、式（ｉｉｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【０３５９】

【化２３】



(iv)

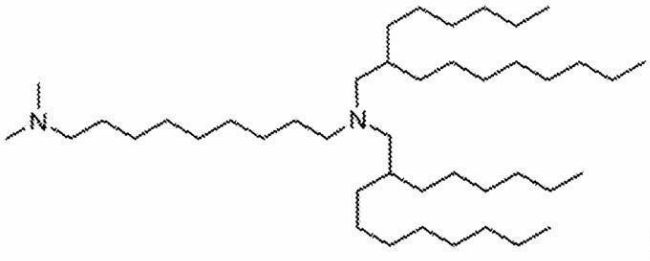


(v)

ある実施形態では、式（ｖ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【０３６０】

【化２４】

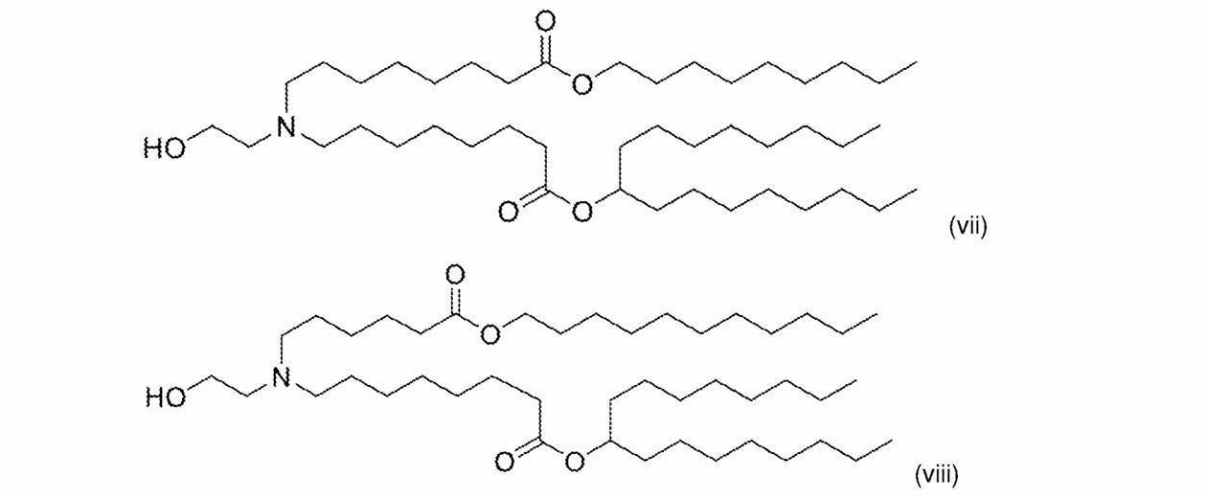


(vi)

ある実施形態では、式（ｖｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【０３６１】

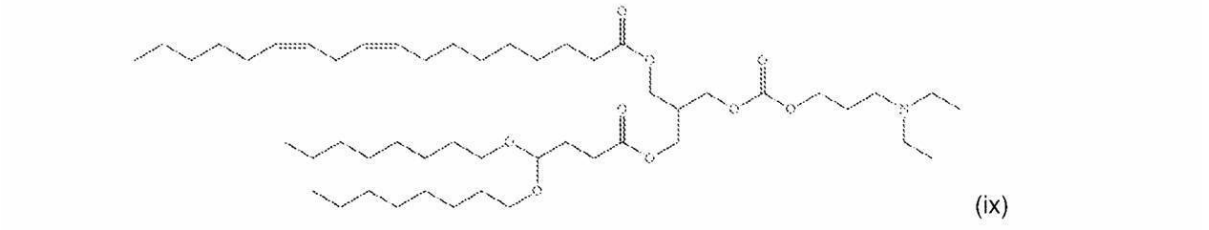
【化２５】



ある実施形態では、式（ｖｉｉｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

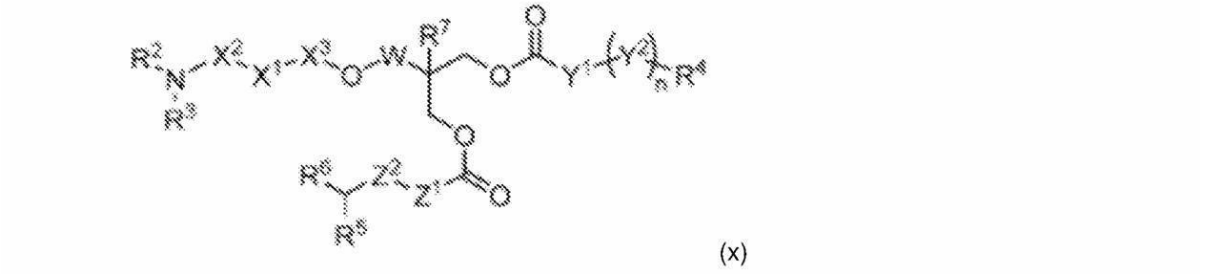
【０３６２】

【化２６】



ある実施形態では、式（ｉｘ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【化２７】

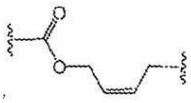


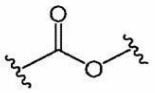
式中、

X^1が、Ｏ、NR^1、又は直接結合であり、X^2が、Ｃ２～５アルキレンであり、X^3が、Ｃ（＝Ｏ）又は直接結合であり、R^1が、Ｈ又はＭｅであり、R^3が、Ｃ１～３アルキルであり、R^2が、Ｃ１～３アルキルであり、又はR^2が、それが結合される窒素原子及びX^2の１～３個の炭素原子と一緒になって、４員、５員、若しくは６員環を形成し、又はX^1が、NR^1であり、R^1及びR^2が、それらが結合される窒素原子と一緒になって、５員若しくは６員環を形成し、又はR^2が、R^3及びそれらが結合される窒素原子と一緒になって、５員、６員、若しくは７員環を形成し、Y^1が、Ｃ２～１２アルキレンであり、Y^2が、

【化２８】

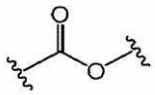

(いずれかの配向),


(いずれかの配向),


(いずれかの配向)

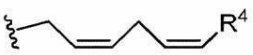
から選択され、
ｎが、０～３であり、Ｒ[4]が、Ｃ１～１５アルキルであり、Ｚ[1]が、Ｃ１～６アルキレン又は直接結合であり、
Ｚ[2]が

【化２９】



（いずれかの配向で）であるか又は非存在であり、ただし、Ｚ[1]が直接結合であり、Ｚ[2]が非存在である場合；
Ｒ[5]が、Ｃ５～９アルキル又はＣ６～１０アルコキシであり、Ｒ[6]が、Ｃ５～９アルキル又はＣ６～１０アルコキシであり、Ｗが、メチレン又は直接結合であり、Ｒ[7]が、Ｈ又はＭｅ、又はその塩であり、ただし、Ｒ[3]及びＲ[2]が、Ｃ２アルキルであり、Ｘ[1]が、Ｏであり、Ｘ[2]が、直鎖状Ｃ３アルキレンであり、Ｘ[3]が、Ｃ（＝０）であり、Ｙ[1]が、直鎖状Ｃｅアルキレンであり、（Ｙ[2]）ｎ－Ｒ[4]が、

【化３０】



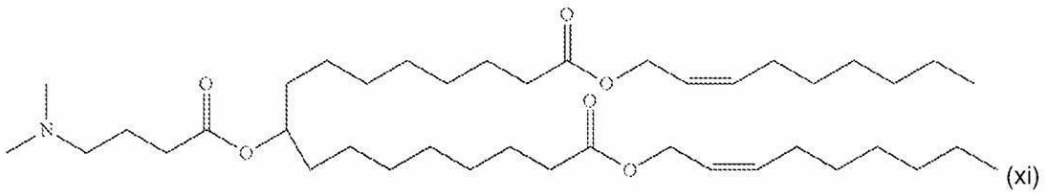
であり、Ｒ[4]が、直鎖状Ｃ５アルキルであり、Ｚ[1]が、Ｃ２アルキレンであり、Ｚ[2]が、非存在であり、Ｗが、メチレンであり、Ｒ[7]が、Ｈである場合、Ｒ[5]及びＲ[6]が、ＣｘアルコキシでないＯ。

【０３６３】

ある実施形態では、式（ｘｉｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【０３６４】

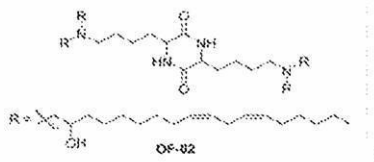
【化３１】


(xi)

ある実施形態では、式（ｘｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【０３６５】

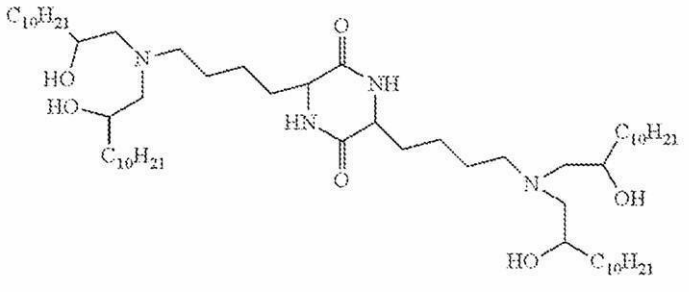
【化３２】



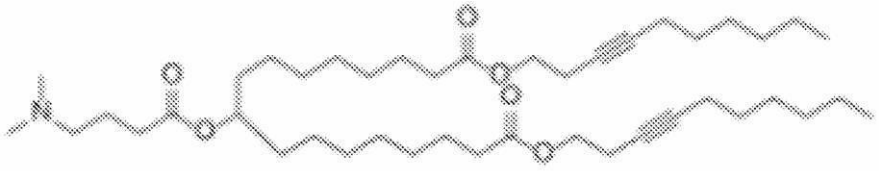
式中、R=



(xii)



(xiii)

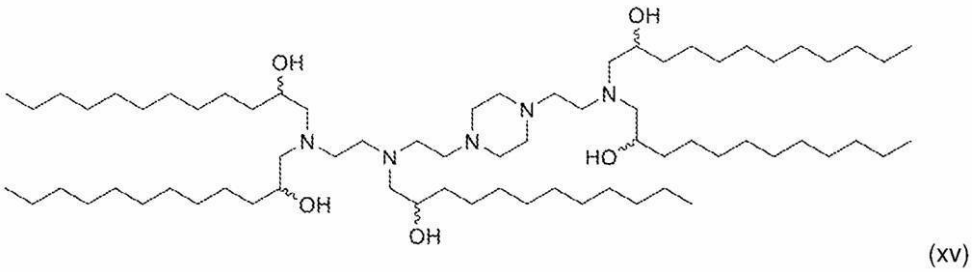


(xiv)

ある実施形態では、ＬＮＰは、式（ｘｉｉｉ）の化合物及び式（ｘｉｖ）の化合物を含む。

【０３６６】

【化３３】

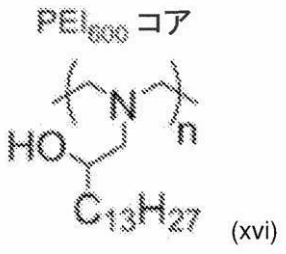


(xv)

ある実施形態では、式（ｘｖ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【０３６７】

【化３４】

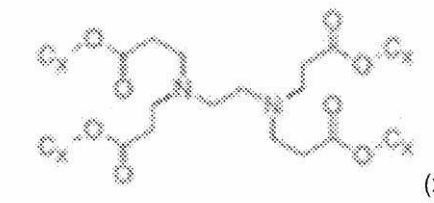


(xvi)

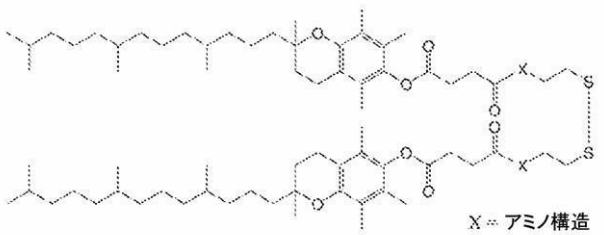
ある実施形態では、式（ｘｖｉ）の製剤を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるポリリ

ボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を、細胞に送達するのに使用される。

【化３５】



(xvii)

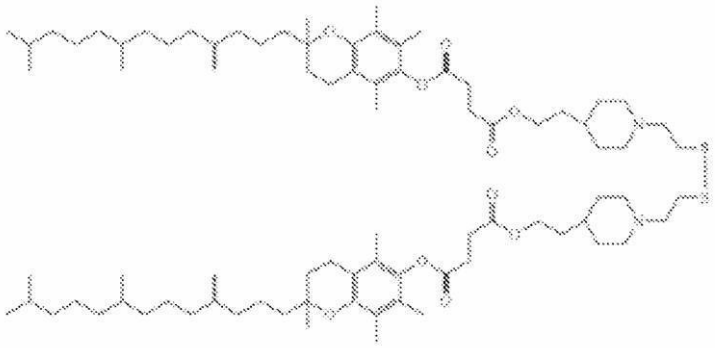


X = アミノ構造

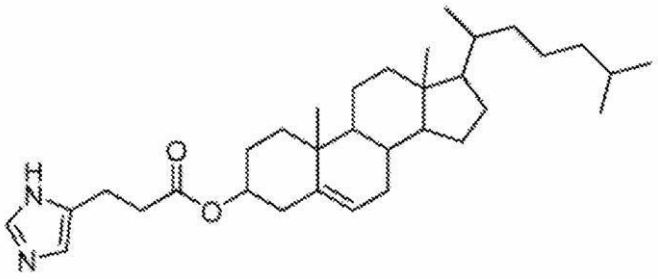
式中、X=



(xviii)(a)



(xviii)(b)

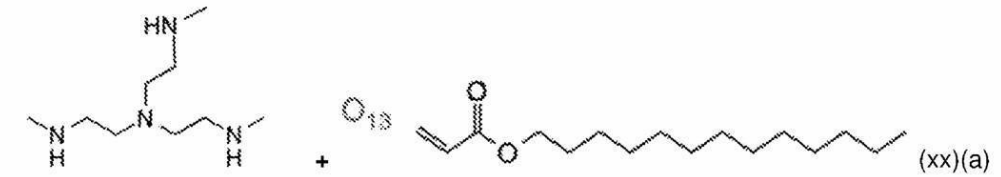


(xix)

【０３６８】

ある実施形態では、本明細書に記載される組成物、例えば、本明細書に記載される核酸（例えば、ＲＮＡ（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド））の送達のための脂質ナノ粒子を形成するのに使用される脂質化合物は、以下の反応のうちの１つによって作製される：

【化３６】



(xx)(a)

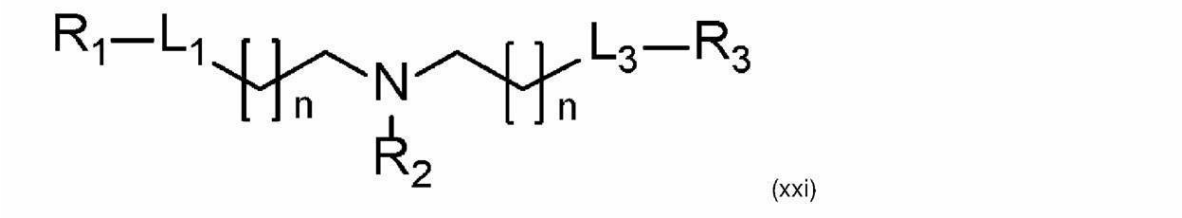


(xx)(b)

【０３６９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を細胞に送達するために、式（ｘｘｉ）を含むＬＮＰが使用される。いくつかの実施形態では、式（ｘｘｉ）のＬＮＰは、国際公開第２０２１１１３７７７号パンフレットによって記載されるＬＮＰ（例えば、国際公開第２０２１１１３７７７号パンフレットの表１の脂質など、式（１）の脂質）である。

【化３７】



(xxi)

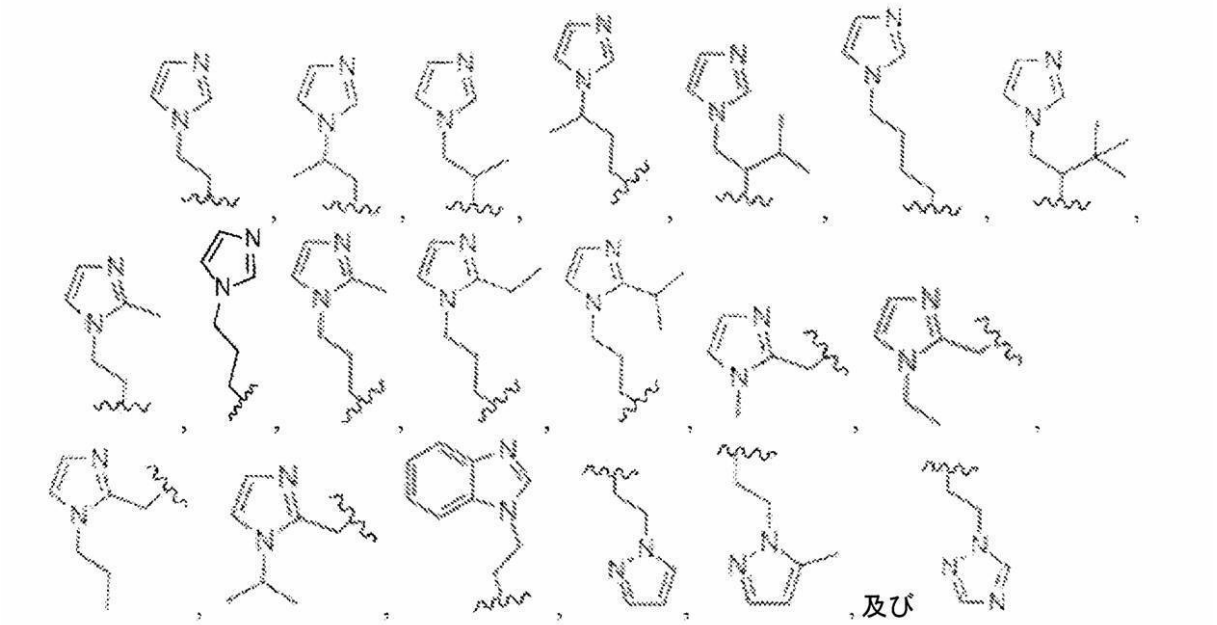
式中、

各ｎは、独立に、２～１５の整数であり；Ｌ１及びＬ３は、各々独立に、－ＯＣ（Ｏ）－＊又は－Ｃ（Ｏ）Ｏ－＊であり、式中、「＊」は、Ｒ１又はＲ３との結合点を指し；

Ｒ１及びＲ３は、各々独立に、オキソ、ハロ、ヒドロキシ、シアノ、アルキル、アルケニル、アルデヒド、ヘテロシクリルアルキル、ヒドロキシアルキル、ジヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルキルアミノアルキル、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、（ヘテロシクリル）（アルキル）アミノアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、アルキルヘテロアリール、アルキニル、アルコキシ、アミノ、ジアルキルアミノ、アミノアルキルカルボニルアミノ、アミノカルボニルアルキルアミノ、（アミノカルボニルアルキル）（アルキル）アミノ、アルケニルカルボニルアミノ、ヒドロキシカルボニル、アルキルオキシカルボニル、アミノカルボニル、アミノアルキルアミノカルボニル、アルキルアミノアルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノアルキルアミノカルボニル、ヘテロシクリルアルキルアミノカルボニル、（アルキルアミノアルキル）（アルキル）アミノカルボニル、アルキルアミノアルキルカルボニル、ジアルキルアミノアルキルカルボニル、ヘテロシクリルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、アルキルスルホキシド、アルキルスルホキシドアルキル、アルキルスルホニル、及びアルキルスルホンアルキルからなる群から選択される１つ又は複数の置換基によって任意選択で置換されている、線状又は分枝状Ｃ９～Ｃ２０アルキル又はＣ９～Ｃ２０アルケニルであり；及び

Ｒ２は、

【化３８】

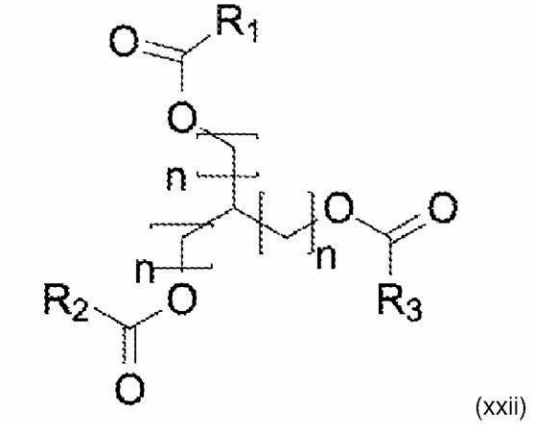


からなる群から選択される。

【０３７０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を細胞に送達するために、式（ｘｘｉｉ）を含むＬＮＰが使用される。いくつかの実施形態では、式（ｘｘｉｉ）のＬＮＰは、国際公開第２０２１１１３７７７号パンフレットによって記載されるＬＮＰ（例えば、国際公開第２０２１１１３７７７号パンフレットの表２の脂質など、式（２）の脂質）である。

【化３９】

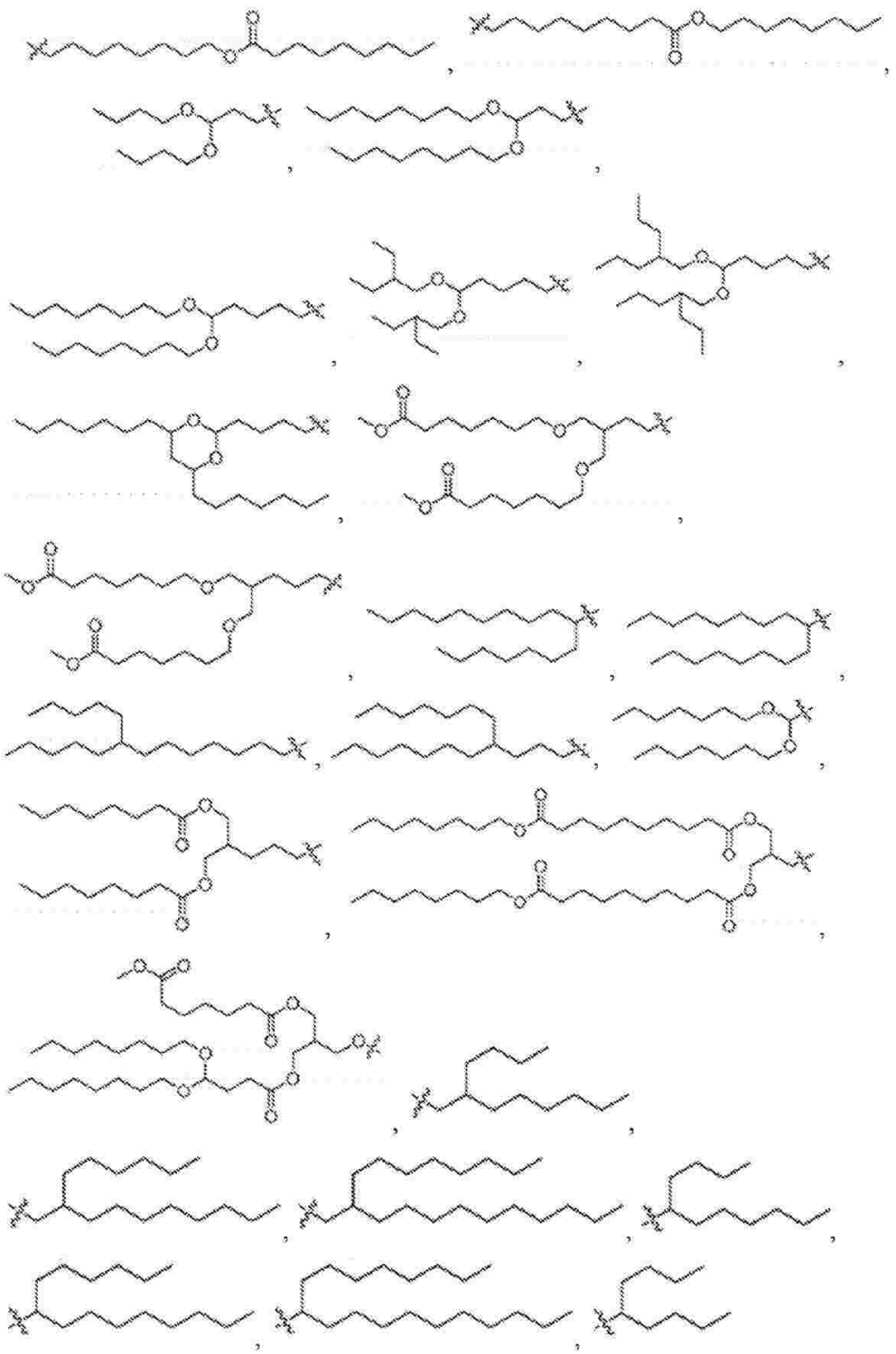


式中、

各ｎは、独立に、１～１５の整数であり；

R_1及びR_2は、各々独立に、

【化４０】

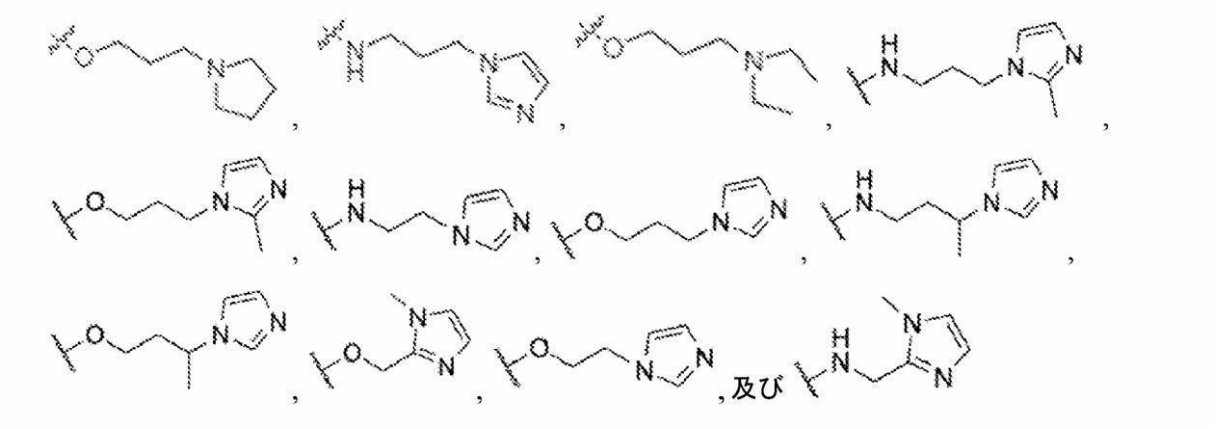


からなる群から選択される。

【０３７１】

Ｒ３は、

【化４１】

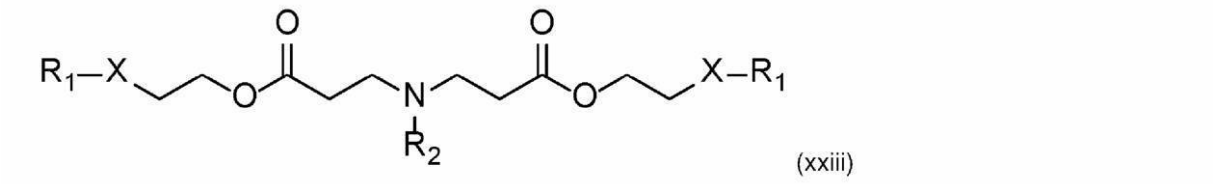


からなる群から選択される。

【０３７２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）組成物を細胞に送達するために、式（ｘｘｉｉｉ）を含むＬＮＰが使用される。いくつかの実施形態では、式（ｘｘｉｉｉ）のＬＮＰは、国際公開第２０２１１１３７７７号パンフレットによって記載されるＬＮＰ（例えば、国際公開第２０２１１１３７７７号パンフレットの表３の脂質など、式（３）の脂質）である。

【化４２】

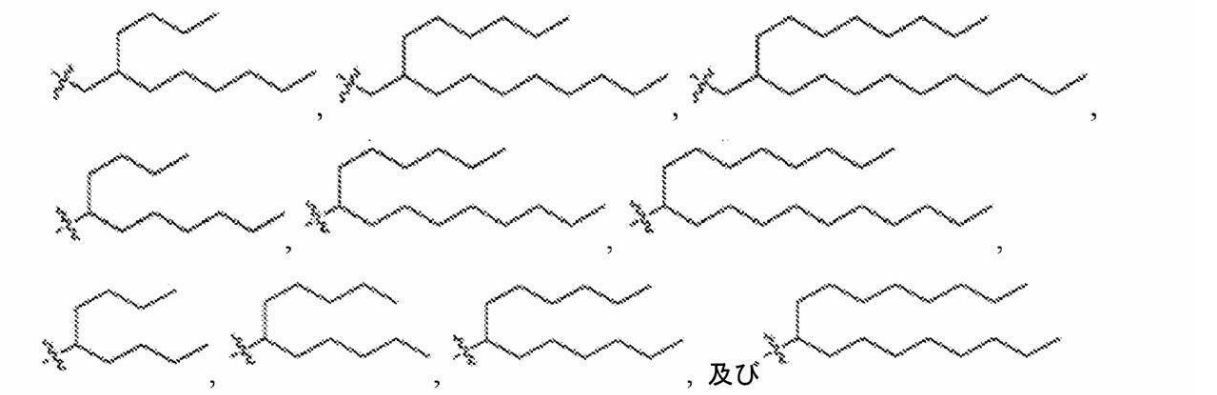


式中、

Ｘは、－Ｏ－、－Ｓ－、又は－ＯＣ（Ｏ）－＊から選択され、式中、＊は、R_1との結合点を指し；

R_1は、

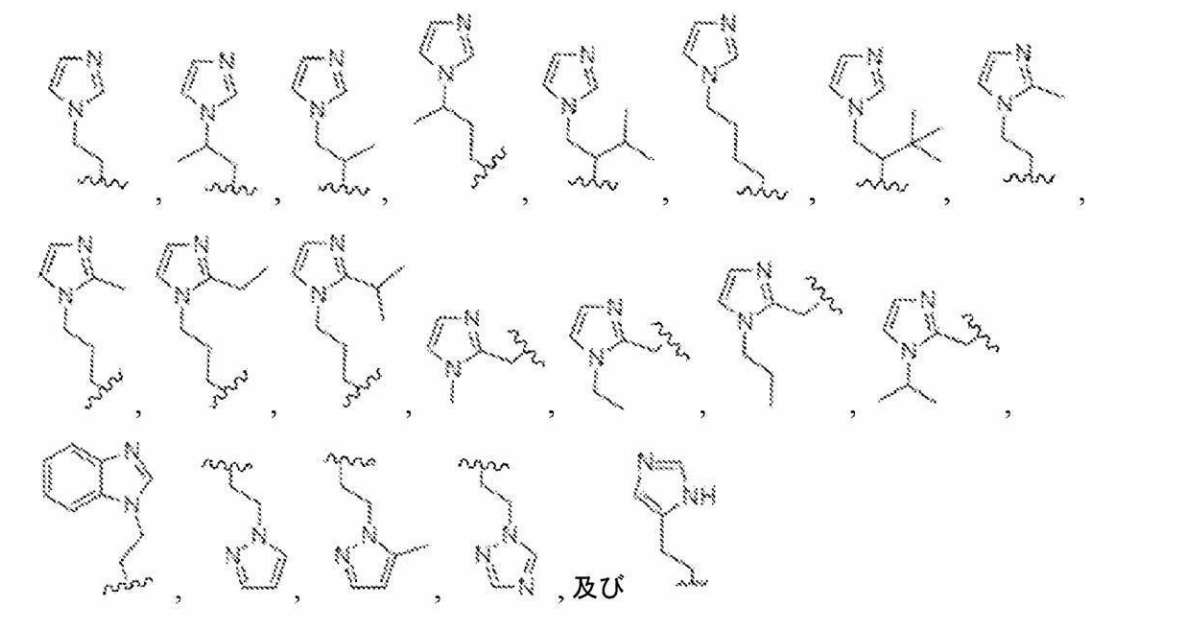
【化４３】



からなる群から選択され、

R_2は、

【化４４】



からなる群から選択される。

【０３７３】

ある実施形態では、本明細書に記載される組成物（例えば核酸（例えば環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）又はタンパク質）は、イオン化可能な脂質を含むＬＮＰ中で提供される。ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、例えば、米国特許第９，８６７，８８８号明細書（全体が参照により本明細書に援用される）の実施例１に記載されるようなヘプタデカン－９－イル８－（（２－ヒドロキシエチル）（６－オキソ－６－（ウンデシルオキシ）ヘキシル）アミノ）オクタノエート（ＳＭ－１０２）である。ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、例えば、国際公開第２０１５／０９５３４０号パンフレット（全体が参照により本明細書に援用される）の実施例１３において合成されるような９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート（ＬＰ０１）である。ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、例えば、米国特許出願公開第２０１２／００２７８３号明細書（全体が参照により本明細書に援用される）実施例７、８、又は９において合成されるようなジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）である。ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、例えば、国際公開第２０１０／０５３５７２号パンフレット（全体が参照により本明細書に援用される）の実施例１４及び１６において合成されるような１，１’－（（２－（４－（２－（（２－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１－イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン－２－オール）（Ｃ１２－２００）である。ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）脂質（３Ｓ、１０Ｒ、１３Ｒ、１７Ｒ）－１０、１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２、３、１４、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエート、例えば、国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレット（全体が参照により本明細書に援用される）からの構造（Ｉ）である。

【０３７４】

ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、カチオン性脂質、イオン化可能なカチオン性脂質、例えば、ｐＨに応じて正荷電若しくは中性形態で存在し得るカチオン性脂質、又は容易にプロトン化され得るアミン含有脂質であり得る。ある実施形態では、カチオン性

脂質は、例えば、生理的条件下で、正に荷電することが可能である脂質である。例示的なカチオン性脂質としては、正電荷を有する１つ以上のアミン基を含む。ある実施形態では、脂質粒子は、中性脂質、イオン化可能なアミン含有脂質、生分解性アルキン脂質、ステロイド、多価不飽和脂質を含むリン脂質、構造脂質（例えば、ステロール）、ＰＥＧ、コレステロール及びポリマーコンジュゲート脂質のうちの１つ以上との配合物中のカチオン性脂質を含む。ある実施形態では、カチオン性脂質は、イオン化可能なカチオン性脂質であり得る。本明細書に開示される例示的なカチオン性脂質は、６．０を超える有効ｐＫａを有し得る。実施形態において、脂質ナノ粒子は、第１のカチオン性脂質と異なる有効ｐＫａ（例えば、第１の有効ｐＫａより高い）を有する第２のカチオン性脂質を含み得る。脂質ナノ粒子は、４０～６０ｍｏｌパーセントのカチオン性脂質、中性脂質、ステロイド、ポリマーコンジュゲート脂質、及び治療剤、例えば、脂質ナノ粒子内に封入されるか又はそれと結合された本明細書に記載される核酸（例えば、ＲＮＡ（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド））を含み得る。ある実施形態では、核酸は、カチオン性脂質と同時に配合される。核酸は、ＬＮＰ、例えば、カチオン性脂質を含むＬＮＰの表面に吸着され得る。ある実施形態では、核酸は、ＬＮＰ、例えば、カチオン性脂質を含むＬＮＰ内に封入され得る。ある実施形態では、脂質ナノ粒子は、例えば、標的化剤で被覆された標的部分を含み得る。実施形態において、ＬＮＰ製剤は、生分解性である。ある実施形態では、本明細書に記載される１つ以上の脂質、例えば、式（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉ）、（ｖｉｉ）及び／又は（ｉｘ）を含む脂質ナノ粒子は、少なくとも１％、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は１００％のＲＮＡ分子を封入する。

【０３７５】

脂質ナノ粒子製剤に使用され得る例示的なイオン化可能な脂質としては、限定はされないが、参照により本明細書に援用される国際公開第２０１９０５１２８９号パンフレットの表１に列挙されるものが挙げられる。さらなる例示的な脂質としては、限定はされないが、以下の式の１つ以上：米国特許出願公開第２０１６／０３１１７５９号明細書のＸ；米国特許出願公開第２０１５０３７６１１５号明細書又は米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１６０１５１２８４号明細書のＩ、ＩＩ又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１７０２１０９６７号明細書のＩ、ＩＡ、ＩＩ、又はＩＩＡ；米国特許出願公開第２０１５０１４００７０号明細書のＩ－ｃ；米国特許出願公開第２０１３／０１７８５４１号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０３０３５８７号明細書又は米国特許出願公開第２０１３／０１２３３３８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／０１４１６７８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／０２３９９２６号明細書のＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、又はＶ；米国特許出願公開第２０１７／０１１９９０４号明細書のＩ；国際公開第２０１７／１１７５２８号パンフレットのＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／０１４９８９４号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１５／００５７３７３号明細書のＡ；国際公開第２０１３／１１６１２６号パンフレットのＡ；米国特許出願公開第２０１３／００９０３７２号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０２７４５２３号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０２７４５０４号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／００５３５７２号明細書のＡ；国際公開第２０１３／０１６０５８号パンフレットのＡ；国際公開第２０１２／１６２２１０号パンフレットのＡ；米国特許出願公開第２００８／０４２９７３号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１２／０１２８７６７０号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、又はＩＶ；米国特許出願公開第２０１４／０２００２５７号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１５／０２０３４４６号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１５／０００５３６３号明細書のＩ又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１４／０３０８３０４号明細書のＩ、ＩＡ、ＩＢ、ＩＣ、ＩＤ、ＩＩ、ＩＩＡ、ＩＩＢ、ＩＩＣ、ＩＩＤ、又はＩＩＩ～ＸＸＩＶ；米国特許出願公開第２０１３／０３３８２１０号明細書の；国

際公開第２００９／１３２１３１号パンフレットのＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、又はＩＶ；米国特許出願公開第２０１２／０１０１１４７８号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１２／００２７７９６号明細書のＩ又はＸＸＸＶ；米国特許出願公開第２０１２／００５８１４４号明細書のＸＩＶ又はＸＶＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０３２３２６９号明細書の；米国特許出願公開第２０１１／０１１７１２５号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１１／０２５６１７５号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／０２０２８７１号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、Ｖ、ＶＩ、ＶＩＩ、ＶＩＩＩ、ＩＸ、Ｘ、ＸＩ、ＸＩＩ；米国特許出願公開第２０１１／００７６３３５号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、Ｖ、ＶＩ、ＶＩＩ、ＶＩＩＩ、Ｘ、ＸＩＩ、ＸＩＩＩ、ＸＩＶ、ＸＶ、又はＸＶＩ；米国特許出願公開第２００６／００８３７８号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１２３３３８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／００６４２４２号明細書のＩ又はＸ－Ａ－Ｙ－Ｚ；米国特許出願公開第２０１３／００２２６４９号明細書のＸＶＩ、ＸＶＩＩ、又はＸＶＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１１６３０７号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１１６３０７号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１０／００６２９６７号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１８９３５１号明細書のＩ～Ｘ；米国特許出願公開第２０１４／００３９０３２号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書のＶ；米国特許出願公開第２０１６／０３１７４５８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１９５９２０号明細書のＩ；米国特許出願公開第１０，２２１，１２７号明細書の５、６、又は１０；国際公開第２０１８／０８１４８０号パンフレットのＩＩＩ－３；国際公開第２０２０／０８１９３８号パンフレットのＩ－５又はＩ－８；米国特許出願公開第９，８６７，８８８号明細書の１８又は２５；米国特許出願公開第２０１９／０１３６２３１号明細書のＡ；国際公開第２０２０／２１９８７６号パンフレットのＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／００２７８０３号明細書の１；米国特許出願公開第２０１９／０２４０３４９号明細書のＯＦ－０２；米国特許出願公開第１０，０８６，０１３号明細書の２３；Ｍｉａｏ　ｅｔ　ａｌ（２０２０）のｃＫＫ－Ｅ１２／Ａ６；国際公開第２０１０／０５３５７２号パンフレットのＣ１２－２００；Ｄａｈｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ（２０１７）の７Ｃ１；Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ　ｅｔ　ａｌの３０４－Ｏ１３又は５０３－Ｏ１３；米国特許第９，７０８，６２８号明細書のＴＳ－Ｐ４Ｃ２；国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレットのＩ；国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレットのＩ；及び国際公開第２０２１／１１３７７７号パンフレットの（１）、（２）、（３）又は（４）が挙げられる。例示的脂質としては、国際公開第２０２１／１１３７７７号パンフレットの表１～表１６のいずれか１つの脂質がさらに挙げられる。

【０３７６】

ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（全体が参照により本明細書に援用される）の実施例９に記載されるようなＭＣ３（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル－４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ又はＭＣ３）である。ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（全体が参照により本明細書に援用される）の実施例１０に記載されるような脂質ＡＴＸ－００２である。ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（全体が参照により本明細書に援用される）の実施例１１に記載されるような（１３Ｚ，１６Ｚ）－Ａ，Ａ－ジメチル－３－ノニルドコサ－１３、１６－ジエン－１－アミン（化合物３２）である。ある実施形態では、イオン化可能な脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（全体が参照により本明細書に援用される）の実施例１２に記載されるような化合物６又は化合物２２である。

【０３７７】

例示的な非カチオン性脂質としては、限定はされないが、ジステアロイル－ｓｎ－グリ

セロ－ホスホエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、モノメチル－ホスファチジルエタノールアミン（１６－Ｏ－モノメチルＰＥなど）、ジメチル－ホスファチジルエタノールアミン（１６－Ｏ－ジメチルＰＥなど）、ｌ８－ｌ－ｔｒａｎｓ　ＰＥ、ｌ－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルセリン（ＤＯＰＳ）、スフィンゴミエリン（ＳＭ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（ＤＭＰＧ）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（ＤＳＰＧ）、ジエルコイルホスファチジルコリン（ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール（ＰＯＰＧ）、ジエライドイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン（ＥＳＭ）、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジセチルホスフェート、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、又はそれらの混合物が挙げられる。他のジアシルホスファチジルコリン及びジアシルホスファチジルエタノールアミンリン脂質も使用され得ることが理解される。これらの脂質中のアシル基は、好ましくは、Ｃ１０～Ｃ２４炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、又はオレオイルである。さらなる例示的な脂質としては、特定の実施形態において、限定はされないが、参照により本明細書に援用される、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．０ｃ０１３８６に記載されるものが挙げられる。このような脂質としては、ある実施形態では、ｍＲＮＡ（例えば、ＤＧＴＳ）との肝臓トランスフェクションを改善することが分かっている植物脂質が挙げられる。

【０３７８】

脂質ナノ粒子に使用するのに好適な非カチオン性脂質の他の例としては、限定はされないが、非リン脂質、例えば、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、パルミチン酸アセチル、リシノール酸グリセロール、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリルポリマー、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキル－アリールサルフェートポリエチルオキシ化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチルアンモニウムブロミド、セラミド、スフィンゴミエリンなどが挙げられる。他の非カチオン性脂質が、国際公開第２０１７／０９９８２３号パンフレット又は米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書（全内容が参照により本明細書に援用される）に記載される。

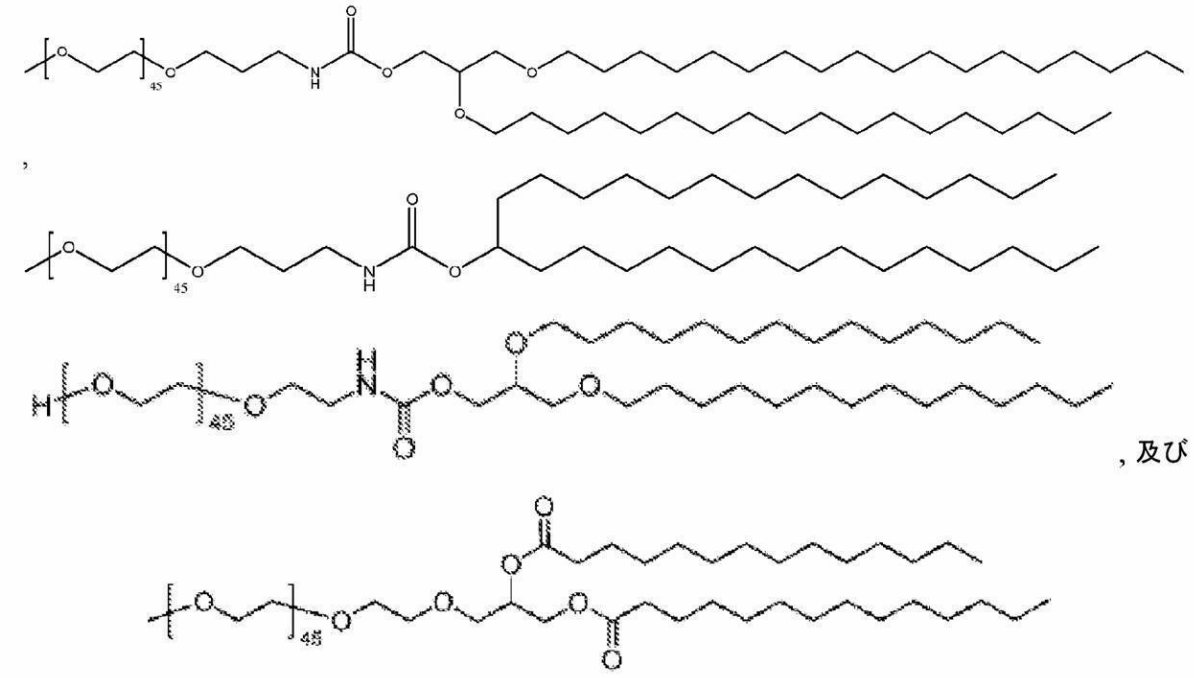
【０３７９】

ある実施形態では、非カチオン性脂質は、オレイン酸又は米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書（全体が参照により本明細書に援用される）の式Ｉ、ＩＩ、若しくはＩＶの化合物である。非カチオン性脂質は、例えば、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～３０％（ｍｏｌ）を占め得る。ある実施形態では、非カチオン性脂質含量は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の５～２０％（ｍｏｌ）又は１０～１５％（ｍｏｌ）である。実施形態において、イオン化可能な脂質対中性脂質のモル比は、約２：１～約８：１の範囲（例えば、約２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、又は８：１）

である。
【０３８０】
ある実施形態では、脂質ナノ粒子は、いずれのリン脂質も含まない。
【０３８１】
ある態様において、脂質ナノ粒子は、膜完全性を提供するために、ステロールなどの成分をさらに含み得る。脂質ナノ粒子に使用され得る１つの例示的なステロールは、コレステロール及びその誘導体である。コレステロール誘導体の非限定的な例としては、極性類似体、例えば、５ａ－コレスタノール、５３－コプロスタノール、コレステリル－（２，－ヒドロキシ）－エチルエーテル、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエーテル、及び６－ケトコレスタノール；非極性類似体、例えば、５ａ－コレスタン、コレステノン、５ａ－コレスタノン、５ｐ－コレスタノン、及びデカン酸コレステリル；及びそれらの混合物が挙げられる。ある実施形態では、コレステロール誘導体は、極性類似体、例えば、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエーテルである。例示的なコレステロール誘導体が、ＰＣＴ公開国際公開第２００９／１２７０６０号パンフレット及び米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書（これらはそれぞれ、全体が参照により本明細書に援用される）に記載される。
【０３８２】
ある実施形態では、ステロールなどの、膜完全性を提供する成分は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０－５０％（ｍｏｌ）（例えば、０～１０％、１０～２０％、２０～３０％、３０～４０％、又は４０～５０％）を占め得る。ある実施形態では、このような成分は、脂質ナノ粒子の総脂質含量の２０～５０％（ｍｏｌ）３０～４０％（ｍｏｌ）である。
【０３８３】
ある実施形態では、脂質ナノ粒子は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又はコンジュゲート脂質分子を含み得る。一般に、これらは、脂質ナノ粒子の凝集を阻害し、及び／又は立体安定化を提供するのに使用される。例示的なコンジュゲート脂質としては、限定はされないが、ＰＥＧ－脂質コンジュゲート、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ポリアミド－脂質コンジュゲート（ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲートなど）、カチオン性ポリマー脂質（ＣＰＬ）コンジュゲート、及びそれらの混合物が挙げられる。ある実施形態では、コンジュゲート脂質分子は、ＰＥＧ－脂質コンジュゲート、例えば、（メトキシポリエチレングリコール）コンジュゲート脂質である。
【０３８４】
例示的なＰＥＧ－脂質コンジュゲートとしては、限定はされないが、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）（ｌ－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）など）、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、ＰＥＧスクシネートジアシルグリセロール（ＰＥＧＳ－ＤＡＧ）（４－０－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－ｌ－０－（ｗ－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）など）、ＰＥＧジアルコキシプロピルカルバム、Ｎ－（カルボニル－メトキシポリエチレングリコール２０００）－ｌ，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンナトリウム塩、又はそれらの混合物が挙げられる。さらなる例示的なＰＥＧ－脂質コンジュゲートが、例えば、米国特許第５，８８５，６ｌ３号明細書、米国特許第６，２８７，５９ｌ号明細書、米国特許出願公開第２００３／００７７８２９号明細書、米国特許出願公開第２００３／００７７８２９号明細書、米国特許出願公開第２００５／０１７５６８２、米国特許出願公開第２００８／００２００５８号明細書、米国特許出願公開第２０１１／０１１７１２５号明細書、米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書、米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書、米国特許出願公開第２０１７／０１１９９０４号明細書、及び米国特許出願第０９９８２３号明細書（これらは全て、全内容が参照により本明細書に援用される）に記載される。ある実施形態では、ＰＥ

Ｇ－脂質は、米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書（全内容が参照により本明細書に援用される）の式ＩＩＩ、ＩＩＩ－ａ－Ｉ、ＩＩＩ－ａ－２、ＩＩＩ－ｂ－１、ＩＩＩ－ｂ－２、又はＶの化合物である。ある実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、米国特許出願公開第２０１５０３７６１１５号明細書又は米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書（これらは両方とも、全内容が参照により本明細書に援用される）の式ＩＩのものである。ある実施形態では、ＰＥＧ－ＤＡＡコンジュゲートは、例えば、ＰＥＧ－ジラウリルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジパルミチルオキシプロピル、又はＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピルであり得る。ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ジラウリルグリセロール、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリセロール、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール、ＰＥＧ－ジラウリルグリカミド、ＰＥＧ－ジミリスチルグリカミド、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリカミド、ＰＥＧ－ジステリルグリカミド、ＰＥＧ－コレステロール（ｌ－［８’－（コレスタ－５－エン－３［β］－オキシ）カルボキサミド－３’，６’－ジオキサオクタニル］カルバモイル－［ω］－メチル－ポリ（エチレングリコール）、ＰＥＧ－ＤＭＢ（３，４－ジテトラデコキシルベンジル－［ω］－メチル－ポリ（エチレングリコール）エーテル）、及び１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］のうちの１つ以上であり得る。ある実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧ、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］を含む。ある実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、

【化４５】



から選択される構造を含む。

【０３８５】

ある実施形態では、ＰＥＧ以外の分子とコンジュゲートされた脂質も、ＰＥＧ－脂質の代わりに使用され得る。例えば、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ポリアミド－脂質コンジュゲート（ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲートなど）、及びカチオン性ポリマー脂質（ＧＰＬ）コンジュゲートが、ＰＥＧ－脂質の代わりに又はそれに加えて使用され得る。

【０３８６】

例示的なコンジュゲート脂質、すなわち、ＰＥＧ－脂質、（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲート及びカチオン性ポリマー－脂質が、国際公開第２０

１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（これらは全て、全内容が参照により本明細書に援用される）の表２に列挙されるＰＣＴ及びＬＩＳ特許出願に記載される。

【０３８７】

ある実施形態では、ＰＥＧ又はコンジュゲート脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～２０％（ｍｏｌ）を占め得る。ある実施形態では、ＰＥＧ又はコンジュゲート脂質含量は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０．５～１０％又は２～５％（ｍｏｌ）である。イオン化可能な脂質、非カチオン性脂質、ステロール、及びＰＥＧ／コンジュゲート脂質のモル比は、必要に応じて変化され得る。例えば、脂質粒子は、組成物のモル又は総重量当たり３０～７０％のイオン化可能な脂質、組成物のモル又は総重量当たり０～６０％のコレステロール、組成物のモル又は総重量当たり０～３０％の非カチオン性脂質及び組成物のモル又は総重量当たり１～１０％のコンジュゲート脂質を含み得る。好ましくは、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり３０～４０％のイオン化可能な脂質、組成物のモル又は総重量当たり４０～５０％のコレステロール、及び組成物のモル又は総重量当たり１０～２０％の非カチオン性脂質を含む。ある他の実施形態において、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり５０～７５％のイオン化可能な脂質、組成物のモル又は総重量当たり２０～４０％のコレステロール、及び、組成物のモル又は総重量当たり５～１０％の非カチオン性脂質及び組成物のモル又は総重量当たり１～１０％のコンジュゲート脂質である。組成物は、組成物のモル又は総重量当たり６０～７０％のイオン化可能な脂質、組成物のモル又は総重量当たり２５～３５％のコレステロール、及び組成物のモル又は総重量当たり５～１０％の非カチオン性脂質を含有し得る。組成物はまた、組成物のモル又は総重量当たり最大で９０％のイオン化可能な脂質及び組成物のモル又は総重量当たり２～１５％の非カチオン性脂質を含有し得る。製剤はまた、例えば、組成物のモル又は総重量当たり８～３０％のイオン化可能な脂質、組成物のモル又は総重量当たり５～３０％の非カチオン性脂質、及び組成物のモル又は総重量当たり０～２０％のコレステロール；組成物のモル又は総重量当たり４～２５％のイオン化可能な脂質、組成物のモル又は総重量当たり４～２５％の非カチオン性脂質、組成物のモル又は総重量当たり２～２５％のコレステロール、組成物のモル又は総重量当たり１０～３５％のコンジュゲート脂質、及び組成物のモル又は総重量当たり５％のコレステロール；又は組成物のモル又は総重量当たり２～３０％のイオン化可能な脂質、組成物のモル又は総重量当たり２～３０％の非カチオン性脂質、組成物のモル又は総重量当たり１～１５％のコレステロール、組成物のモル又は総重量当たり２～３５％のコンジュゲート脂質、及び組成物のモル又は総重量当たり１～２０％のコレステロール；或いは組成物のモル又は総重量当たり最大で９０％のイオン化可能な脂質及び組成物のモル又は総重量当たり２～１０％の非カチオン性脂質、或いは組成物のモル又は総重量当たり１００％のカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子製剤であり得る。ある実施形態では、脂質粒子製剤は、５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化可能な脂質、リン脂質、コレステロール及びＰＥＧ化脂質を含む。ある他の実施形態において、脂質粒子製剤は、６０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化可能な脂質、コレステロール及びＰＥＧ化脂質を含む。

【０３８８】

ある実施形態では、脂質粒子は、イオン化可能な脂質、非カチオン性脂質（例えばリン脂質）、ステロール（例えば、コレステロール）及びＰＥＧ化脂質を含み、ここで、脂質のモル比は、イオン化可能な脂質では２０～７０モルパーセントの範囲であり、目標は４０～６０であり、非カチオン性脂質のモルパーセントは、０～３０の範囲であり、目標は０～１５であり、ステロールのモルパーセントは、２０～７０の範囲であり、目標は３０～５０であり、ＰＥＧ化脂質のモルパーセントは、１～６の範囲であり、目標は２～５である。

【０３８９】

ある実施形態では、脂質粒子は、５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化可能な脂質／非カチオン性脂質／ステロール／コンジュゲート脂質を含む。

【０３９０】

一態様において、本開示は、リン脂質、レシチン、ホスファチジルコリン及びホスファチジルエタノールアミンを含む脂質ナノ粒子製剤を提供する。

【０３９１】

ある実施形態では、１つ以上のさらなる化合物も含まれ得る。それらの化合物は、別々に投与され得、又はさらなる化合物は、本発明の脂質ナノ粒子に含まれ得る。言い換えると、脂質ナノ粒子は、核酸又は第１の核酸と異なる少なくとも第２の核酸に加えて、他の化合物を含有し得る。限定はされないが、他のさらなる化合物は、小型若しくは大型有機又は無機分子、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、ペプチド、タンパク質、ペプチド類似体及びその誘導体、ペプチド模倣薬、核酸、核酸類似体及び誘導体、生体材料から作製された抽出物、又はそれらの任意の組合せからなる群から選択され得る。

【０３９２】

ある実施形態では、ＬＮＰは、生分解性、イオン化可能な脂質を含む。ある実施形態では、ＬＮＰは、（９Ｚ，ｌ２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，ｌ２－ジエノエート（３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，ｌ２Ｚ）－オクタデカ－９，ｌ２－ジエノエート）とも呼ばれる）又は別のイオン化可能な脂質を含む。例えば、国際公開第２０１９／０６７９９２号パンフレット、国際公開第／２０１７／１７３０５４号パンフレット、国際公開第２０１５／０９５３４０号パンフレット、及び国際公開第２０１４／１３６０８６号パンフレット、並びにその中に提供される参考文献の脂質を参照されたい。ある実施形態では、ＬＮＰ脂質に関するカチオン性及びイオン化可能という用語は、同義的であり、例えば、イオン化可能な脂質は、ｐＨに応じてカチオン性である。

【０３９３】

ある実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、例えば、動的光散乱（ＤＬＳ）によって測定される、数１０ｎｍ～数１００ｎｍであり得る。ある実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、例えば、約４０ｎｍ、４５ｎｍ、５０ｎｍ、５５ｎｍ、６０ｎｍ、６５ｎｍ、７０ｎｍ、７５ｎｍ、８０ｎｍ、８５ｎｍ、９０ｎｍ、９５ｎｍ、１００ｎｍ、１０５ｎｍ、１１０ｎｍ、１１５ｎｍ、１２０ｎｍ、１２５ｎｍ、１３０ｎｍ、１３５ｎｍ、１４０ｎｍ、１４５ｎｍ、又は１５０ｎｍであり得る。ある実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約５０ｎｍ～約１００ｎｍ、約５０ｎｍ～約９０ｎｍ、約５０ｎｍ～約８０ｎｍ、約５０ｎｍ～約７０ｎｍ、約５０ｎｍ～約６０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１００ｎｍ、約６０ｎｍ～約９０ｎｍ、約６０ｎｍ～約８０ｎｍ、約６０ｎｍ～約７０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１００ｎｍ、約７０ｎｍ～約９０ｎｍ、約７０ｎｍ～約８０ｎｍ、約８０ｎｍ～約１００ｎｍ、約８０ｎｍ～約９０ｎｍ、又は約９０ｎｍ～約１００ｎｍであり得る。ある実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約７０ｎｍ～約１００ｎｍであり得る。特定の実施形態において、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約８０ｎｍであり得る。ある実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約１００ｎｍであり得る。ある実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約ｌｍｍ～約５００ｍｍ、約５ｍｍ～約２００ｍｍ、約１０ｍｍ～約１００ｍｍ、約２０ｍｍ～約８０ｍｍ、約２５ｍｍ～約６０ｍｍ、約３０ｍｍ～約５５ｍｍ、約３５ｍｍ～約５０ｍｍ、又は約３８ｍｍ～約４２ｍｍの範囲である。

【０３９４】

ＬＮＰは、ある場合には、比較的均質であり得る。多分散指数は、ＬＮＰの均質性、例えば、脂質ナノ粒子の粒度分布を示すのに使用され得る。小さい（例えば、０．３未満の）多分散指数は、一般に、狭い粒度分布を示す。ＬＮＰは、約０～約０．２５、例えば、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、又は０．２５の多分散指数を有し得る。ある実施形態では、ＬＮＰの多分散指数は、約０

．１０～約０．２０であり得る。
【０３９５】
ＬＮＰのゼータ電位は、組成物の界面動電位を示すのに使用され得る。ある実施形態では、ゼータ電位は、ＬＮＰの表面電荷を表し得る。より高度に荷電された種は、身体内の細胞、組織、及び他の要素と不必要に相互作用し得るため、正又は負の比較的低い電荷を有する脂質ナノ粒子が一般に望ましい。ある実施形態では、ＬＮＰのゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、又は約＋５ｍＶ～約＋１０ｍＶであり得る。
【０３９６】
タンパク質及び／又は核酸の封入の効率は、提供される初期量と比べた、調製後にＬＮＰで封入されるか又は他の形でＬＮＰと結合されるタンパク質及び／又は核酸の量を表す。封入効率は、高い（例えば、ほぼ１００％）のが望ましい。封入効率は、例えば、１つ以上の有機溶媒又は洗浄剤で脂質ナノ粒子を分解する前及び後で脂質ナノ粒子を含有する溶液中のタンパク質又は核酸の量を比較することによって、測定され得る。アニオン交換樹脂が、溶液中の遊離タンパク質又は核酸（例えば、ＲＮＡ）の量を測定するのに使用され得る。蛍光が、溶液中の遊離タンパク質及び／又は核酸（例えば、ＲＮＡ）の量を測定するのに使用され得る。本明細書に記載される脂質ナノ粒子の場合、タンパク質及び／又は核酸の封入効率は、少なくとも５０％、例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。ある実施形態では、封入効率は、少なくとも８０％であり得る。ある実施形態では、封入効率は、少なくとも９０％であり得る。ある実施形態では、封入効率は、少なくとも９５％であり得る。
【０３９７】
ＬＮＰは、任意に、１つ以上のコーティングを含み得る。ある実施形態では、ＬＮＰは、コーティングを有するカプセル、フィルム、又は錠剤に製剤化され得る。本明細書に記載される組成物を含むカプセル、フィルム、又は錠剤は、任意の有用なサイズ、引張り強さ、硬度又は密度を有し得る。
【０３９８】
ＬＮＰの追加的な例示的脂質、製剤、方法、及び特徴付けについては、国際公開第２０２０／０６１４５７号パンフレット及び国際公開第２０２１／１１３７７７号パンフレット（これらの各々は、本明細書において全体として参照により援用される）により教示されている。ＬＮＰのさらなる例示的脂質、製剤、方法、及び特徴付けについては、Ｈｏｕｅｔ ａｌ．Ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｍＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍａｔｅｒ（２０２１）．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４１５７８－０２１－００３５８－０（全体として参照により本明細書に援用される）により教示されている（例えば、Ｈｏｕ ｅｔ ａｌ．の図２の例示的脂質及び脂質誘導体を参照のこと）。
【０３９９】
ある実施形態では、インビトロ又はエクスビボ細胞リポフェクションが、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）又はＴｒａｎｓＩＴ－ｍＲＮＡ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｉｒｕｓ Ｂｉｏ）を用いて行われる。特定の実施形態において、ＬＮＰは、ＧｅｎＶｏｙ＿ＩＬＭイオン化可能な脂質混合物（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ ＮａｎｏＳｙｓｔｅｍｓ）を用いて製剤化される。特定の実施形態において、ＬＮＰは、２，２‐ジリノレイル‐４‐ジメチルアミノエチル‐［１，３］‐ジオキソラン（ＤＬｉｎ‐ＫＣ２‐ＤＭＡ）又はジリノレイルメチル‐４‐ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ又はＭＣ３）を用いて製

剤化され、その製剤及びインビボでの使用が、Ｊａｙａｒａｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔ　Ｅｄ　Ｅｎｇｌ　５１（３４）：８５２９－８５３３（２０１２）（全体が参照により本明細書に援用される）に教示される。

【０４００】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム、例えば、Ｃａｓ９－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、ｇＲＮＡ、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡの送達のために最適化されたＬＮＰ製剤が、国際公開第２０１９０６７９９２号パンフレット及び国際公開第２０１９０６７９１０号パンフレット（両方とも参照により援用される）に記載され、環状ポリリボヌクレオチド及び本明細書に記載される線状ポリリボヌクレオチドの送達のために有用である。

【０４０１】

核酸（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）の送達に有用なさらなる特定のＬＮＰ製剤が、米国特許第８１５８６０１号明細書及び米国特許第８１６８７７５号明細書（両方とも参照により援用される）に記載され、これは、ＯＮＰＡＴＲＯの名称で販売されているパチシラン中で使用される製剤を含む。

【０４０２】

ポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）ＬＮＰの例示的な投与量は、約０．１、０．２５、０．３、０．５、１、２、３、４、５、６、８、１０、又は１００ｍｇ／ｋｇ（ＲＮＡ）を含み得る。ポリリボヌクレオチド（例えば、環状ポリリボヌクレオチド、線状ポリリボヌクレオチド）を含むＡＡＶの例示的な投与量は、約10^{11}、10^{12}、10^{13}、及び10^{14}ｖｇ／ｋｇのＭＯＩを含み得る。

【実施例】

【０４０３】

以下の実施例は、本明細書に記載される組成物及び方法がどのように使用され、作製され、評価され得るかの説明を当業者に提供するために提示され、本開示を純粋に例示するものであることが意図されており、本発明者らが本発明とみなすものの範囲を限定することは意図されていない。

【０４０４】

実施例１：拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシング置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）構築物の設計

本実施例では、より優れた環状化効率を提供するため、拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシング置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）配列の設計を説明する。

【０４０５】

ＤＮＡ構築物の例示的設計を表す概略図を図１Ａ及び図１Ｂに提示する。本実施例において、構築物は、５’から３’へ：グループＩ触媒イントロン断片の３’半分（アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）の３’半分－イントロン）、３’スプライス部位、３’エクソン断片（アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のＥ２）、スペーサーエレメント、ポリヌクレオチドカーゴ、５’エクソン断片（アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のＥ１）、５’スプライス部位、及びグループＩ触媒イントロン断片の５’半分（アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）の５’半分－イントロン）を含む。Ｅ２は、Ｅ１（５’－ＡＣＧＧＡ－３’）（配列番号２）に対する５ヌクレオチドの相補的配列（５’－ＴＣＣＧＴ－３’）（配列番号１）を有する（図１Ａ及び図１Ｂ、Ｅ２及びＥ１上の黒線）。Ｅ２とＥ１との間に拡張されたアニーリング領域を有する構築物を作製するため、Ｅ２からの５ヌクレオチドを、Ｅ１（

【化４６】

TGACCTT (配列番号3) → AGCGTCT (配列番号4)

、太文字は変異配列を表す）の拡張された７ヌクレオチドのアニーリング領域を有するように変異させた（図１Ｂ、Ｅ２及びＥ１上の灰色線、Ｅ２におけるアスタリスクは配列上

の変異を表す）。拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）の置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）からの全アニーリング領域は、１２ヌクレオチドである（Ｅ２；５’－ＴＣＣＧＴＡＧＣＧＴＣＴ－３’（配列番号５）、Ｅ１；５’－ＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡ－３’（配列番号６））（図１Ｂ）。

【０４０６】

ＲＮＡ構造を、ＲＮＡ構造予測ツールのＲＮＡフォールド（ｒｎａ．ｔｂｉ．ｕｎｉｖｉｅ．ａｃ．ａｔ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＲＮＡＷｅｂＳｕｉｔｅ／ＲＮＡｆｏｌｄ．ｃｇｉ）によって評価した。配列の修飾によってもたらされたＥ２－Ｅ１相互作用の増強が、適切なＥ２－Ｅ１相互作用及び自己スプライシングイントロン構造の凝集をもたらす（図２Ａ及び２Ｂ）。

【０４０７】

５ヌクレオチドのアニーリング領域（Ａｎａｂａｅｎａ１）及び拡張されたアニーリング領域を伴うアニーリング配列（Ａｎａｂａｅｎａ２）を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥを有する構築物を、環状化効率を比較するために設計した。Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ，ｅｔ　ａｌ．２０１８（Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．９：２６２９）に記載のアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ構築物（Ａｎａｂａｅｎａ３）も比較のために使用した。本実施例において、構築物を、スペーサーエレメントとしてのｐｏｌｙＡ５０、並びにポリヌクレオチドカーゴとしてのＥＭＣＶ内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）及びＯＲＦの組み合わせを含むように設計した。２つの異なるＯＲＦについて試験した：Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ（Ｇｌｕｃ）ＯＲＦ（５５８ヌクレオチド）及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ＯＲＦ（３８２２ｎｔ）。環状ＲＮＡのサイズは、ＧｌｕｃＯＲＦの場合は１．２Ｋｂであり、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ＯＲＦの場合は４．５Ｋｂであった。

【０４０８】

７．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＤＮＡ鋳型からのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、非修飾線状ＲＮＡを合成した。デオキシリボヌクレアーゼで２０分間処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去した。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製した。自己スプライシングが転写中に生じ；追加的な反応は必要でなかった。自己スプライシング効率を監視するため、２００ｎｇのカラム精製したインビトロ転写ＲＮＡをゲル負荷緩衝液ＩＩ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ，ＡＭ８５４６Ｇ）と混合し、９５℃で３分間加熱し、次に氷上で３分間インキュベートした。次に、サンプルを６％尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動（尿素ＰＡＧＥ）によって分離し、ゲル染色を用いてＲＮＡバンドを染色し、画像処理システムを用いて可視化した。

【０４０９】

アニーリング配列の５ヌクレオチドから１２ヌクレオチドへの拡張により、環状化効率が最大２倍増加し、Ａｎａｂａｅｎａ３が１．２Ｋｂの環状ＲＮＡの場合、同様の環状化効率が示された（図３Ａ）。４．５Ｋｂの環状ＲＮＡの場合、拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ２）は、Ａｎａｂａｅｎａ３と比較して４０％優れ、且つ５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ１）より３倍高い環状化効率を示した（図３Ｂ）。

【０４１０】

拡張されたＥ２－Ｅ１アニーリング配列を有するように設計されたアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ２）は、環状ＲＮＡのサイズと無関係に５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ１）より２～３倍優れた環状化効率を示した。これは、環状化することが容易な１．２Ｋｂの構築物と類似する環状化効率、及び環状化困難な４．５Ｋｂの構築物に対して４０％優れた環状化効率を示す。

【０４１１】

実施例２：拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡからのタンパク質発現
本実施例では、拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡからのタンパク質発現を実証する。

【０４１２】
本実施例において、５ヌクレオチドのアニーリング領域（Ａｎａｂａｅｎａ１）及び拡張されたアニーリング配列（Ａｎａｂａｅｎａ２）を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥを有する構築物を、タンパク質発現を比較するため、実施例１に記載のように設計した。本実施例において、構築物は、スペーサーエレメントとしてのｐｏｌｙＡ５０、並びにポリヌクレオチドカーゴとしてのＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ及びＯＲＦの組み合わせを含むように設計した。２つの異なるＯＲＦについて試験した：Ｇｌｕｃ（５５８ｎｔｓ）及びＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質（３８２２ｎｔｓ）。また、実施例１に記載されるＡｎａｂａｅｎａ３を比較のために試験した。

【０４１３】
７．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、線状ＲＮＡを合成した。デオキシリボヌクレアーゼで２０分間処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去した。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製した。Ｇｌｕｃをコードする環状ＲＮＡを、尿素ＰＡＧＥによって精製し、緩衝液（０．５Ｍ酢酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ）で溶出させ、エタノール沈殿し、ＲＮＡｓｅフリー水に再懸濁した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２からのスパイクタンパク質をコードする環状ＲＮＡを逆相クロマトグラフィーによって精製し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌフィルター（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用する限外濾過を通じて、画分に対して、クエン酸ナトリウム、次に水と緩衝液交換した。

【０４１４】
Ｇｌｕｃをコードする環状ＲＮＡの発現を比較するため、Ａｎａｂａｅｎａ１及びＡｎａｂａｅｎａ２によって生成される環状ＲＮＡを調製した。比較のため、Ａｎａｂａｅｎａ３によって生成される環状ＲＮＡも調製した。ヒーラ細胞（９６ウェルプレート内で１０，０００細胞／ウェル）に、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸトランスフェクション試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を製造業者のプロトコルに従って使用して、０．１ピコモルの精製された環状ＲＮＡをトランスフェクトした。細胞培地を収集し、２４時間、４８時間及び７２時間の時点で新しい培地と交換し、Ｇｌｕｃ活性を測定した。Ｇｌｕｃ活性を測定するため、１０μｌの収集した細胞培地を白色９６ウェルプレートに移し、生物発光レポーターアッセイ系を製造業者の使用説明書に従って使用した（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｇａｕｓｓｉａ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｆｌａｓｈ（登録商標）アッセイキット、１６１５８、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。プレートをルミノメーター装置（Ｐｒｏｍｅｇａ）において読み取った。

【０４１５】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をコードする環状ＲＮＡの発現を比較するため、５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ１）及び拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ２）によって生成される環状ＲＮＡを調製した。比較のため、Ａｎａｂａｅｎａ３によって生成される環状ＲＮＡも調製した。ヒーラ細胞（６ウェルプレート内で１，２００，０００細胞／ウェル）に、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）トランスフェクション剤を製造業者の使用説明書に従って使用して、４ピコモルの精製された環状ＲＮＡをトランスフェクトした。４８時間のトランスフェクション後、トリプシン処理によって細胞を収集し、冷たい無血清培地に再懸濁した。次に、細胞を抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ抗体で１時間染色し、続いて抗マウスＩｇＧ１抗体ＡＦ６４７とともに３０分間インキュベ

ートした。染色集団をフローサイトメトリーによって測定した。

【０４１６】

拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ２）によって生成された環状ＲＮＡは、ポリヌクレオチドカーゴとしてＧｌｕｃをコードする場合、５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ１）によって生成された環状ＲＮＡ及びＡｎａｂａｅｎａ３によって生成された環状ＲＮＡの場合と同様の発現を示した（図４）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をコードする環状ＲＮＡの場合、Ａｎａｂａｅｎａ２によって生成された環状ＲＮＡは、Ａｎａｂａｅｎａ３によって生成された環状ＲＮＡより約３倍優れた発現及びＡｎａｂａｅｎａ１によって生成された環状ＲＮＡより５０％多い発現を示した（図５）。

【０４１７】

実施例３：アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥにおける環状化効率に対するアニーリング領域の長さの効果

本実施例では、アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥにおける環状化効率に対するアニーリング領域の長さの効果を実証する。

【０４１８】

上の実施例１において、発明者らは、Ｅ２配列を変異させることによりアニーリング領域を５ヌクレオチドから１２ヌクレオチドに拡張することにより、アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥの環状化効率が増強されることを示した。

【０４１９】

環状化効率に対するアニーリング領域の長さの効果を調べるため、３つの追加的な構築物を、Ｅ２に相補的であるＥ１の５’末端に追加的配列：（１）５ヌクレオチド拡張（５’－ＣＧＴＴＴ－３’）（配列番号７）、（２）１０ヌクレオチド拡張（５’－ＡＣＧＡＣＣＧＴＴＴ－３’）（配列番号８）、及び（３）１５ヌクレオチド拡張（５’－ＣＣＣＡＣＡＣＧＡＣＣＧＴＴＴ－３’）（配列番号９）を含めることにより、Ｅ２とＥ１との間にさらなる拡張されたアニーリング領域を有するように設計した。Ｅ２における相補的配列はそれぞれ、５ヌクレオチド拡張（５’－ＡＡＡＣＧ－３’）（配列番号１０）、１０ヌクレオチド拡張（５’－ＡＡＡＣＧＧＴＣＧＴ－３’）（配列番号１１）、又は１５ヌクレオチド拡張（５’－ＡＡＡＣＧＧＴＣＧＴＧＴＧＧＧ－３’）（配列番号１２）である。全アニーリング配列はそれぞれ、１７ヌクレオチド、２２ヌクレオチド、又は２７ヌクレオチドである。Ｅ２とＥ１との間に拡張されたアニーリング領域を伴うＤＮＡ構築物の例示的設計を表す概略図を図６に提示する。

【０４２０】

環状化効率を比較するため、拡張されたアニーリング配列（Ａｎａｂａｅｎａ２）及び拡張されたアニーリング領域（５ヌクレオチド拡張、１０ヌクレオチド拡張及び１５ヌクレオチド拡張）を有する構築物を設計した。本実施例において、構築物を、スペーサーエレメントとしてのｐｏｌｙＡ５０、並びにポリヌクレオチドカーゴとしてのＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ及びＧｌｕｃの組み合わせを含むように設計した。

【０４２１】

７．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、線状ＲＮＡを合成した。デオキシリボヌクレアーゼで２０分間処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去した。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製した。

【０４２２】

自己スプライシングが転写中に生じ；追加的な反応は必要でなかった。自己スプライシング効率を監視するため、２００ｎｇのカラム精製したインビトロ転写ＲＮＡをゲル負荷緩衝液ＩＩ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ，ＡＭ８５４６Ｇ）と混合し、９５℃で３分間加熱し、次に氷上で３分間インキュベートした。次に、サンプルを６％尿素ＰＡＧＥによって分離し、ゲル染色を用いてＲＮＡバンドを染色し、画像処理システムを用いて可視化

した。
【０４２３】
Ｅ２とＥ１との間のアニーリング領域のさらなる拡張（５ｎｔの拡張、１０ｎｔの拡張、又は１５ｎｔの拡張）は、拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ２）と同等の環状化効率を示した（図７）。アニーリング領域の１５ヌクレオチド拡張は、Ａｎａｂａｅｎａ２と比較して、３０％のより優れた環状化効率を示した（図７）。このデータは、Ｅ２－Ｅ１相互作用が効率的な環状化にとって重要であり、アニーリング領域をさらに拡張することにより、環状化効率が増加し得ることを示す。
【０４２４】
実施例４：拡張されたアニーリング配列を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡからのタンパク質発現
本実施例では、拡張されたアニーリング配列を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡからのタンパク質発現を実証する。
【０４２５】
本実施例において、拡張されたアニーリング配列を有する構築物（Ａｎａｂａｅｎａ２）及び拡張されたアニーリング領域（５ヌクレオチド拡張、１０ヌクレオチド拡張、及び１５ヌクレオチド拡張）を有する構築物を、実施例３に記載のとおりに設計して、タンパク質発現を比較した。本実施例では、構築物を、スペーサーエレメントとしてのｐｏｌｙＡ５０、並びにポリヌクレオチドカーゴとしてのＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ及びＧｌｕｃの組み合わせを含むように設計した。
【０４２６】
７．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、線状ＲＮＡを合成した。デオキシリボヌクレアーゼで２０分間処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去した。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製した。Ｇｌｕｃをコードする環状ＲＮＡを、尿素ＰＡＧＥによって精製し、緩衝液（０．５Ｍ酢酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ）で溶出させ、エタノール沈殿し、ＲＮＡｓｅフリー水に再懸濁した。
【０４２７】
Ｇｌｕｃをコードする環状ＲＮＡの発現を比較するため、Ａｎａｂａｅｎａ２及びさらに拡張されたアニーリング領域（５ヌクレオチド拡張、１０ヌクレオチド拡張、又は１５ヌクレオチド拡張）を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡを、実施例３に記載のとおりに調製した。ヒーラ細胞（９６ウェルプレート内で１０，０００細胞／ウェル）に、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸトランスフェクション剤を製造業者の使用説明書に従って使用して、０．１ピコモルの精製された環状ＲＮＡをトランスフェクトした。トランスフェクタントを、各時点において別々に調製した。６時間、２４時間及び４８時間の時点で、培地を収集した。Ｇｌｕｃ活性を測定するため、１０μｌの収集した細胞培地を白色９６ウェルプレートに移し、生物発光レポーターアッセイ系を製造業者の使用説明書に従って使用した（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｇａｕｓｓｉａ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ｆｌａｓｈ（登録商標）アッセイキット、１６１５８、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。プレートをルミノメーター装置（Ｐｒｏｍｅｇａ）において読み取った。
【０４２８】
さらに拡張されたアニーリング領域（５ｎｔの拡張、１０ｎｔの拡張、又は１５ｎｔの拡張）を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡは、Ａｎａｂａｅｎａ２によって生成された環状ＲＮＡの場合に対して類似の又は優れた発現を示した（図８）。例えば、１５ヌクレオチド拡張（全体で２７ヌクレオチド）を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡは、１２ヌクレオチ

ドの拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ２）より３倍高い発現を示した。このデータは、アニーリング領域の拡張が環状化効率だけでなく発現にとって重要であることを示す。

【０４２９】

実施例５：拡張されたアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）自己スプライシング置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）の設計

本実施例では、拡張されたアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）自己スプライシング置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）の設計について説明する。

【０４３０】

ＤＮＡ構築物の例示的設計を表す概略図を図９Ａ及び図９Ｂに提示する。

【０４３１】

本実施例において、構築物は、５’から３’へ：グループＩ触媒イントロン断片の３’半分（テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）の３’半分－イントロン）、３’スプライス部位、３’エクソン断片（テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のＥ２）、スペーサーエレメント、ポリヌクレオチドカーゴ、５’エクソン断片（テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）のＥ１）、５’スプライス部位、及びグループＩ触媒イントロン断片の５’半分（テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）の５’半分－イントロン）を含む。Ｅ２は、ヘリックスＰ１０を形成する５’半分－イントロン（５’－ＴＡＣＣＴＴ－３’）（配列番号１４）に対する６ヌクレオチドの相補的配列（５’－ＡＡＧＧＴＡ－３’）（配列番号１３）を有する（図９、Ｅ１及び５’半分－イントロン上の黒線）。Ｅ２及び５’半分－イントロンの間に拡張されたアニーリング領域を有する構築物を作製するため、６ヌクレオチドをＥ２におけるアニーリング領域の３’末端に付加した（５’－ＡＡＴＡＴＴ－３’（配列番号１５）、図９Ａ及び図９Ｂにおける Ｅ２上の灰色ボックス）。拡張されたアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥからの全アニーリング領域は、１２ヌクレオチドである（Ｅ２；

【化４７】

5’- AAGGTA**AATATT**-3’ (配列番号16)

、５’イントロン；

【化４８】

5’- **AATATT**TACCTT-3’ (配列番号17)

、太文字は拡張されたアニーリング領域を表す）（図９Ｂ）。

【０４３２】

ＲＮＡ構造を、ＲＮＡ構造予測ツールのＲＮＡフォールド（ｒｎａ．ｔｂｉ．ｕｎｉｖｉｅ．ａｃ．ａｔ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＲＮＡＷｅｂＳｕｉｔｅ／ＲＮＡｆｏｌｄ．ｃｇｉ）によって評価した。追加的配列によるＥ２－５’半分－イントロン相互作用の増強が、適切なヘリックスＰ１０の形成及び自己スプライシングイントロン構造の凝集をもたらした（図１０Ａ及び１０Ｂ）。

【０４３３】

環状化効率を比較するため、６ヌクレオチドのアニーリング領域（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ１）及び拡張されたアニーリング配列（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ２）を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）置換イントロン－エクソンを有する構築物を設計した。本実施例において、構築物を、スペーサーエレメントとしてのｐｏｌｙＡ５０、並びにポリヌクレオチドカーゴとしてのＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ及びｈＥＰＯ　ＯＲＦの組み合わせを含むように設計した。環状ＲＮＡのサイズは、１．２Ｋｂであった。

【０４３４】

７．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、線状ＲＮＡを合成した。デオキシリボヌクレアーゼで２０分間処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去した。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製した。

【０４３５】

自己スプライシングが転写中に生じ；追加的な反応は必要でなかった。環状化効率を監視するため、２００ｎｇのカラム精製したインビトロ転写ＲＮＡをゲル負荷緩衝液ＩＩ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ，ＡＭ８５４６Ｇ）と混合し、９５℃で３分間加熱し、次に氷上で３分間インキュベートした。次に、サンプルを６％尿素ＰＡＧＥによって分離し、ゲル染色を用いてＲＮＡバンドを染色し、画像処理システムを用いて可視化した。アニーリング配列の６ヌクレオチドから１２ヌクレオチドへの拡張（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ２）は、６ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥ（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ１）と類似する環状化効率を示した（図１１）。このデータは、テトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥにおけるアニーリング配列の拡張により、環状化が破壊されなかったことを示す。

【０４３６】

実施例６：拡張されたアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）ＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡからのタンパク質発現

本実施例では、拡張されたアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡからのタンパク質発現について説明する。

【０４３７】

タンパク質発現を比較するため、６ヌクレオチドのアニーリング領域（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ１）及び拡張されたアニーリング配列（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ２）を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）自己スプライシングＰＩＥを有するＤＮＡ構築物を実施例５に記載のとおりに設計した。構築物は、スペーサーエレメントとしてのｐｏｌｙＡ５０、並びにポリヌクレオチドカーゴとしてのＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ及びＧｌｕｃ　ＯＲＦの組み合わせを含むように設計する。

【０４３８】

７．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、線状ＲＮＡを合成する。デオキシリボヌクレアーゼで処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去する。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製する。Ｇｌｕｃをコードする環状ＲＮＡを、尿素ＰＡＧＥによって精製し、緩衝液（０．５Ｍ酢酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ）で溶出させ、エタノール沈殿し、ＲＮＡｓｅフリー水に再懸濁する。

【０４３９】

Ｇｌｕｃをコードする環状ＲＮＡの発現を比較するため、６ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）ＰＩＥ（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ１）及び拡張されたアニーリング領域を伴うテトラヒメナ属（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ）ＰＩＥ（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ２）によって生成された環状ＲＮＡを、上記のとおりに調製する。ヒーラ細胞（９６ウェルプレート内で１０，０００細胞／ウェル）に、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）トランスフェクション剤を製造業者の使用説明書に従って使用して、０．１ピコモルの精製された環状ＲＮＡをトランスフェクトする。トランスフェクタントを、各時点において別々に調製する。６時間、２４時間及び４８時間の時点で、培地を収集する。Ｇｌｕｃ活性を測定するため、収集した細胞培地を白色９６ウェルプレートに移し、生物発光レポーターアッセイ系を製造業者の使用説明書に従って使用する。プレートをルミノメーター装置において読み取る。

【０４４０】

実施例７：拡張されたアニーリング領域を伴うＴ４ファージ自己スプライシング置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）の設計

本実施例では、拡張されたアニーリング領域を伴うＴ４ファージ自己スプライシングＰＩＥの設計について説明する。

【０４４１】

ＤＮＡ構築物の例示的設計を表す概略図を図１２Ａ及び図１２Ｂに提示する。構築物は、５’から３’へ：グループＩ触媒イントロン断片の３’半分（Ｔ４ファージの３’半分－イントロン）、３’スプライス部位、３’エクソン断片（Ｔ４ファージのＥ２）、スペーサーエレメント、ポリヌクレオチドカーゴ、５’エクソン断片（Ｔ４ファージのＥ１）、５’スプライス部位、及びグループＩ触媒イントロン断片の５’半分（Ｔ４ファージの５’半分－イントロン）を含む。Ｅ２は、ヘリックスＰ１０を形成する５’半分－イントロン（５’－ＡＧ－３’）に対する２ヌクレオチドの相補的配列（５’－ＣＴ－３’）を有する（図１２Ａ及び図１２Ｂ、Ｅ２及び５’半分－イントロン上の黒線）。Ｅ２及び５’半分－イントロンの間に拡張されたアニーリング領域を有する構築物を作製するため、Ｅ２からの４ヌクレオチドを、５’半分－イントロン（

【化４９】

5’-**ACCG**T-3’ (配列番号18) → 5’-**CAAT**T-3’ (配列番号19)

、太文字は変異配列を表す）を有する拡張された５ヌクレオチドのアニーリング領域を有するように変異させた。拡張されたアニーリング領域を伴うＴ４ファージＰＩＥからの全アニーリング領域は、７ヌクレオチドである（Ｅ２；

【化５０】

5’-CT**CAATT**-3’ (配列番号20)

、５’半分－イントロン；

【化５１】

5’-**AATTG**AG -3’ (配列番号21)

、太文字は拡張されたアニーリング配列を表す）（図１２Ａ及び図１２Ｂ）。

【０４４２】

環状化効率を比較するため、２ヌクレオチドのアニーリング領域（Ｔ４ファージ１）及び拡張されたアニーリング領域（Ｔ４ファージ２）を伴うＴ４ファージＰＩＥを有する構築物を設計した。本実施例において、構築物を、スペーサーエレメントとしてのｐｏｌｙＡ５０、ポリヌクレオチドカーゴとしてのＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ及びＧｌｕｃ　ＯＲＦの組み合わせを含むように設計した。環状ＲＮＡのサイズは１．２Ｋであった。

【０４４３】

７．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、線状ＲＮＡを合成した。デオキシリボヌクレアーゼで処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去した。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製した。

【０４４４】

自己スプライシングが転写中に生じたが；追加的な反応は必要でない。環状化効率を監視するため、２００ｎｇのカラム精製したインビトロ転写ＲＮＡをゲル負荷緩衝液ＩＩ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ，ＡＭ８５４６Ｇ）と混合し、９５℃で３分間加熱し、次に氷上で３分間インキュベートした。次に、サンプルを６％尿素ＰＡＧＥによって分離し、ゲル染色を用いてＲＮＡバンドを染色し、画像処理システムを用いて可視化した。

【０４４５】

アニーリング配列の拡張（Ｔ４ファージ２）は、６ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うＴ４ファージ自己スプライシングＰＩＥ（Ｔ４ファージ１）と類似する環状化効率を示した（図１３）。このデータは、Ｔ４ファージ自己スプライシングＰＩＥにおけるアニーリング配列の拡張により、環状化が破壊されなかったことを示す。

【０４４６】

実施例８：拡張されたアニーリング領域を伴うＴ４ファージ自己スプライシングＰＩＥによって生成された環状ＲＮＡからのタンパク質発現

本実施例では、拡張されたアニーリング領域を伴うＴ４ファージ自己スプライシングＰＩＥによって生成される環状ＲＮＡの発現について説明する。

【０４４７】

タンパク質発現を比較するため、２ヌクレオチドのアニーリング領域（Ｔ４ファージ１）及び拡張されたアニーリング配列（Ｔ４ファージ２）を伴うＴ４ファージＰＩＥを有するＤＮＡ構築物を、実施例７に記載のとおりに設計する。本実施例において、構築物は、スペーサーエレメントとしてのｐｏｌｙＡ５０、並びにポリヌクレオチドカーゴとしてのＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ及びＧｌｕｃ　ＯＲＦの組み合わせを含むように設計する。

【０４４８】

７．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、線状ＲＮＡを合成する。デオキシリボヌクレアーゼで処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去する。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製する。Ｇｌｕｃをコードする環状ＲＮＡを、尿素ＰＡＧＥによって精製し、緩衝液（０．５Ｍ酢酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ）で溶出させ、エタノール沈殿し、ＲＮＡｓｅフリー水に再懸濁する。

【０４４９】

Ｇｌｕｃをコードする環状ＲＮＡの発現を比較するため、２ヌクレオチドのアニーリング領域を有するＴ４ファージＰＩＥ（Ｔ４ファージ１）及び拡張されたアニーリング領域を伴うＴ４ファージＰＩＥ（Ｔ４ファージ（ｐａｇｅ）２）によって生成される環状ＲＮＡを、上記のとおりに調製する。ヒーラ細胞（９６ウェルプレート内で１０，０００細胞／ウェル）に、ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ（登録商標）ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）トランスフェクション剤を製造業者の使用説明書に従って使用して、０．１ピコモルの精製された環状ＲＮＡをトランスフェクトする。トランスフェクタントを、各時点において別々に調製する。６時間、２４時間及び４８時間の時点で、培地を収集する。Ｇｌｕｃ活性を測定するため、収集した細胞培地を白色９６ウェルプレートに移し、生物発光レポーターアッセイ系を製造業者の使用説明書に従って使用する。プレートをルミノメーター装置において読み取る。

【０４５０】

実施例９：拡張されたアニーリング領域を伴う自己スプライシング置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）構築物の設計

本実施例では、より優れた環状化効率を提供するための、拡張されたアニーリング領域を伴う様々な自己スプライシング置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）配列の設計について説明する。

【０４５１】

ＤＮＡ構築物の例示的設計を表す概略図を図１４Ａ及び図１４Ｂに提示する。本実施例において、構築物は、５’から３’へ：グループＩ触媒イントロン断片の３’半分（３’半分－イントロン）、３’スプライス部位、３’エクソン断片（Ｅ２）、スペーサーエレメント、ポリヌクレオチドカーゴ、５’エクソン断片（Ｅ１）、５’スプライス部位、及びグループＩ触媒イントロン断片の５’半分（５’半分－イントロン）を含む。

【０４５２】

異なるグループＩイントロンは、異なる長さの相補的配列を有する（図１９）。例えば、シネココッカス・エロンガタス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｌｏｎｇａｔｕｓ）ＰＣＣ６３０１のＥ２は、シネココッカス・エロンガタス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ

ｅｌｏｎｇａｔｕｓ）ＰＣＣ６３０１のＥ１に対する７ヌクレオチドの相補的配列を有し；アナベナ・アゾラエ（Ａｎａｂａｅｎａ　ａｚｏｌｌａｅ）、アナベナ・シリンドリカ（Ａｎａｂａｅｎａ　ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ）、及びスキトネマ・ホフマンニ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ　ｈｏｆｍａｎｎｉ）のＥ２はそれぞれ、アナベナ・アゾラエ（Ａｎａｂａｅｎａ　ａｚｏｌｌａｅ）、アナベナ・シリンドリカ（Ａｎａｂａｅｎａ　ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ）、及びスキトネマ・ホフマンニ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ　ｈｏｆｍａｎｎｉ）のＥ１に対する５ヌクレオチドの相補的配列を有する。Ｅ２とＥ１との間に拡張されたアニーリング領域を有する構築物を作製するため、Ｅ２における配列を、図１９に記載のとおりのＥ１を伴う拡張されたアニーリング領域を有するように変異させた。拡張されたアニーリング領域を伴うグループＩ置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）からの全アニーリング領域は、１７ヌクレオチドである。

【０４５３】

図１９からの元の（１）アニーリング領域及び拡張された（２）アニーリング領域は次のとおりである：

Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ１　ＴＣＣＧＣＴＧＡＣＴＧＴＡＡＡＧＧ（配列番号９２）

Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ２　ＴＣＣＧＣＴＧＣＧＴＣＴＡＣＣＧＴ（配列番号９３）

Ａｎａｂａｅｎａ　ａｚｏｌｌａｅ１　ＴＣＣＧＴＴＧＡＣＴＧＴＡＡＡＡＡ（配列番号９４）

Ａｎａｂａｅｎａ　ａｚｏｌｌａｅ２　ＴＣＣＧＴＡＧＣＧＴＣＴＡＣＣＡＴ（配列番号９５）

Ａｎａｂａｅｎａ　ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ１　ＴＣＣＧＴＴＧＡＣＣＴＴＡＡＡＣＧ（配列番号９６）

Ａｎａｂａｅｎａ　ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ２　ＴＣＣＧＴＡＧＣＧＴＣＴＡＣＣＡＴ（配列番号９７）

Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ１　ＣＣＣＧＡＡＧＧＴＣＡＧＴＧＧＴＴ（配列番号９８）

Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ２　ＣＣＣＧＡＣＧＡＧＣＴＡＣＣＡＧＧ（配列番号９９）

【０４５４】

ＲＮＡ構造を、ＲＮＡ構造予測ツールのＲＮＡフォールド（ｒｎａ．ｔｂｉ．ｕｎｉｖｉｅ．ａｃ．ａｔ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＲＮＡＷｅｂＳｕｉｔｅ／ＲＮＡｆｏｌｄ．ｃｇｉ）によって評価した。配列の修飾によってもたらされたＥ２－Ｅ１相互作用の増強が、適切なＥ２－Ｅ１相互作用及び自己スプライシングイントロン構造の凝集をもたらす（図１５Ａ～１５Ｂ、図１６Ａ～１６Ｂ、図１７Ａ～１７Ｂ、及び図１８Ａ～１８Ｂ）。

【０４５５】

環状化効率を比較するため、元のアニーリング領域を伴うＰＩＥ及び拡張されたアニーリング領域を伴うアニーリング配列を有する構築物を設計した。比較のため、Ａｎａｂａｅｎａ１構築物及びＡｎａｂａｅｎａ２構築物も使用した。本実施例において、構築物を、スペーサーエレメント、並びにポリヌクレオチドカーゴとしてのＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ及び３８２２ヌクレオチドＯＲＦの組み合わせを含むように設計した。環状ＲＮＡのサイズは、４．５Ｋｂであった。

【０４５６】

１２．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＤＮＡ鋳型からのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、非修飾線状ＲＮＡを合成した。デオキシリボヌクレアーゼで２０分間処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去した。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製した。自己スプライシングが転写中に生じ；追加的な反応は必要でなかった。自己スプライシング効率を監視するため、カラム精製したインビトロ転写ＲＮＡを、ＨＰＬＣを通じてアニオン交換（ＡＥＸ）カラム上で分離させた。線状ピーク及び環状ピークのパーセンテージを測定し、環状化効率を元のアニーリング領域を伴うＰＩＥを有する構築物の場合で正規化した。

【０４５７】

アニーリング配列の拡張は、環状化効率を、アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）（Ａｎａｂａｅｎａ２）、シネココッカス・エロンガタス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｅｌｏｎｇａｔｕｓ）ＰＣＣ６３０１（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ２）、及びアナベナ・シリンドリカ（Ａｎａｂａｅｎａ ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ）（アナベナ・シリンドリカ（Ａｎａｂａｅｎａ ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ）２）の場合に最大５倍、アナベナ・アゾラエ（Ａｎａｂａｅｎａ ａｚｏｌｌａｅ）（アナベナ・アゾラエ（Ａｎａｂａｅｎａ ａｚｏｌｌａｅ）２）の場合に最大１０倍増加させたが、スキトネマ・ホフマンニ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ ｈｏｆｍａｎｎｉ）（スキトネマ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ）２）の場合、環状化効率の増加は認められなかった（図２０）。これは、環状化効率が、アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）イントロンについての本明細書に記載される場合と同じ又は類似する方法を用いて他のグループＩイントロンを修飾することによって増加し得ることを示す。

【０４５８】

実施例１０：末端間相互作用を増強するための、拡張されたステム領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシング置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）構築物の設計

本実施例では、末端間相互作用を増強することによってより優れた環状化効率を提供するための、拡張されたステム領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）自己スプライシング置換イントロン－エクソン（ＰＩＥ）配列の設計について説明する。

【０４５９】

ＤＮＡ構築物の例示的設計を表す概略図を図２１Ｂに提示する。本実施例において、構築物は、５’から３’へ：グループＩ触媒イントロン断片の３’半分（Ａｎａｂａｅｎａ３’半分－イントロン）、３’スプライス部位、３’エクソン断片（アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）Ｅ２）、スペーサーエレメント、ポリヌクレオチドカーゴ、５’エクソン断片（アナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）Ｅ１）、５’スプライス部位、及びグループＩ触媒イントロン断片の５’半分（Ａｎａｂａｅｎａ５’半分－イントロン）を含む。拡張されたステム領域を有する構築物の２つのバージョンを設計した。Ａｎａｂａｅｎａ４の設計においては、追加的なステム領域（５’－ＧＵＡＡＧＵＵ－３’）を隣同士に配置した。Ａｎａｂａｅｎａ５の設計においては、Ｐ６ｂにおけるバルジ領域で満たしてステムを作製した。

【０４６０】

１２．５ｍＭのＮＴＰの存在下でＤＮＡ鋳型からのＴ７ ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写により、非修飾線状ＲＮＡを合成した。デオキシリボヌクレアーゼで２０分間処理することにより、鋳型ＤＮＡを除去した。合成された線状ＲＮＡを、ＲＮＡクリーンアップキット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｔ２０５０）で精製した。自己スプライシングが転写中に生じ；追加的な反応は必要でなかった。自己スプライシング効率を監視するため、カラム精製したインビトロ転写ＲＮＡを、ＨＰＬＣを通じてアニオン交換（ＡＥＸ）カラム上で分離させた。線状ピーク及び環状ピークのパーセンテージを測定し、環状化効率を対応する元の構築物の場合で正規化した。

【０４６１】

拡張されたステム領域を有する構築物は、拡張されたアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ２）を有する構築物及び５ヌクレオチドのアニーリング領域を伴うアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）ＰＩＥ（Ａｎａｂａｅｎａ１）を有する構築物と同等の環状化効率を示した（図２２）。

シネココッカス・エロンガタス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｅｌｏｎｇａｔｕｓ）ＰＣＣ６３０１：３’半分－イントロン Ｅ２

【化５２】

TAAACAACTAACAGCTTTAGAAGGTGCAGAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGATTCAGCCGAG
GGTAAAGGGATAGTCCAATTCTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGCGAAAGTTGCAGAGAGAATGA
AAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGAGGGTTCGAGTCCCTCCGCCCCCA (配列番号80)

シネココッカス・エロンガタス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｌｏｎｇａｔｕｓ）ＰＣＣ６３０１：Ｅ１　５’半分－イントロン
ＡＣＧＧＴＡＧＡＣＧＣＡＧＣＧＧＡＣＴＴＡＧＡＡＡＡＣＴＧＧＧＣＣＴＣＧＡＴＣＧＣＧＡＡＡＧＧＧＡＴＣＧＡＧＴＧＧＣＡＧＣＴＣＴＣＡＡＡＣＴＣＡＧＧＧＡＡＡＣＣＴＡＡＡＡＣＴＴＴＡＡＡＣＡＴＴＭＡＡＧＴＣＡＴＧＧＣＡＡＴＣＣＴＧＡＧＣＣＡＡＧＣＴＡＡＡＧＣ（配列番号８１）

アナベナ・アゾラエ（Ａｎａｂａｅｎａ　ａｚｏｌｌａｅ）：３’半分－イントロン　Ｅ２
【化５３】

TTAAACTCAAAATTTAAAATCCCAAATTCAAAATTCCGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC
CCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCTGAAGTTGCTGAAGCAACAA
GGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCGTTGACTGTAAAAAGTCGTGGGGGGTTCAAGTC
CCCCCACCCCC (配列番号82)

アナベナ・アゾラエ（Ａｎａｂａｅｎａ　ａｚｏｌｌａｅ）：Ｅ１　５’半分－イントロン
【化５４】

ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTTAAGTGGAAGCTCTCAAA
TTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCAGAAAATTTAGACTTGA
GATTTGATTTTGGAG (配列番号83)

アナベナ・シリンドリカ（Ａｎａｂａｅｎａ　ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ）：３’半分－イントロン　Ｅ２
【化５５】

GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCT
AACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTTAAAGCCTGAAGTTGTGCAAGCAACAAGGC
AACAGTGAAAGCTGTGGAAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGGGGGGTTCAAGTCCCCC
CACCCCC (配列番号84)

アナベナ・シリンドリカ（Ａｎａｂａｅｎａ　ｃｙｌｉｎｄｒｉｃａ）：Ｅ１　５’半分－イントロン
【化５６】

ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTCAAGTGGAAGCTCTCAA
ATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCGGAAATTTTAGAATCA
AGATTTTATTTT (配列番号85)

スキトネマ・ホフマンニ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ　ｈｏｆｍａｎｎｉ）：３’半分－イントロン　Ｅ２
【化５７】

AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGA
CAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGG
TCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA (配列番号86)

スキトネマ・ホフマンニ（Ｓｃｙｔｏｎｅｍａ　ｈｏｆｍａｎｎｉ）：Ｅ１　５’半分－イントロン

【化５８】

AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGA
CAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGG
TCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA (配列番号87)

Ａｎａｂａｅｎａ４：３’半分－イントロン　Ｅ２

【化５９】

AACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAA
CGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGG
AGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA (配列番号88)

Ａｎａｂａｅｎａ４：Ｅ１　５’半分－イントロン

【化６０】

AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAG
GGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAG
TAAGTT (配列番号89)

Ａｎａｂａｅｎａ５：３’半分－イントロン　Ｅ２

【化６１】

AACAACAGATAACTTACTAGTTACTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC
AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAA
TGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA (配列番号90)

Ａｎａｂａｅｎａ５：Ｅ１　５’半分－イントロン

ＡＧＡＣＧＣＴＡＣＧＧＡＣＴＴＡＡＡＴＡＡＴＴＧＡＧＣＣＴＴＡＧＡＧＡＡＧＡＡＡ
ＴＴＣＴＴＴＡＡＧＴＧＧＡＴＧＣＴＣＴＣＡＡＡＣＴＣＡＧＧＧＡＡＡＣＣＴＡＡＡＴ
ＣＴＡＧＣＴＡＴＡＧＡＣＡＡＧＧＣＡＡＴＣＣＴＧＡＧＣＣＡＡＧＣＣＧＡＡＧＴＡＧ
ＴＡＡＴＴＡＧＴＡＡＧＴＴ（配列番号９１）

【０４６２】

他の実施形態

本発明がその特定の実施形態と関連させて記載されている一方で、それがさらなる修飾が可能であり、本願が、一般に本発明の原理に従う、また本発明に関連する当該技術分野に含まれる既知又は通例の慣習の範囲内である本発明からのそうした逸脱を含む、本発明のあらゆるバリエーション、使用、又は適応を包含することが意図され、以前に記載された本質的特徴に適用してもよく、そして請求項の範囲内に従うことは理解されるであろう。他の実施形態は、請求項の範囲内である。

【図面】

【図１】

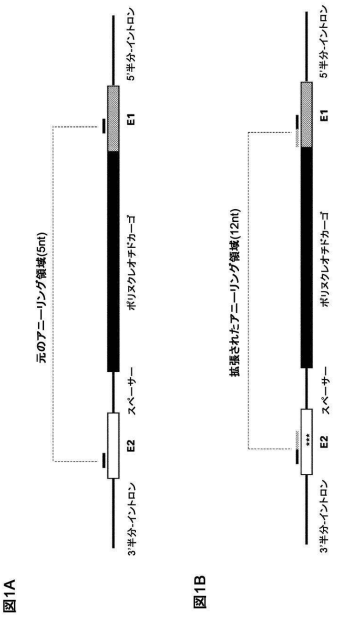


図1A　図1B

【図２】

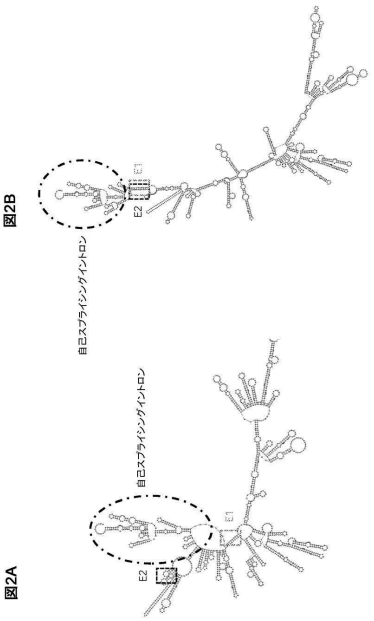


図2B　図2A

【図３】

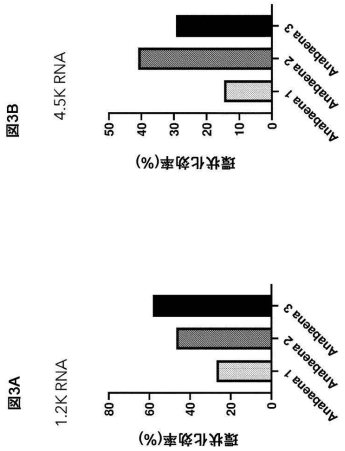


図3A　図3B

【図４】

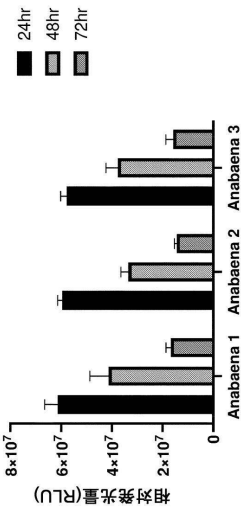
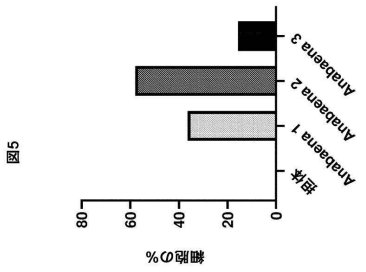
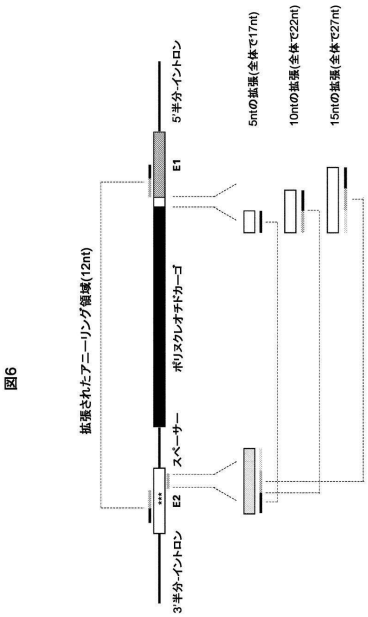


図4

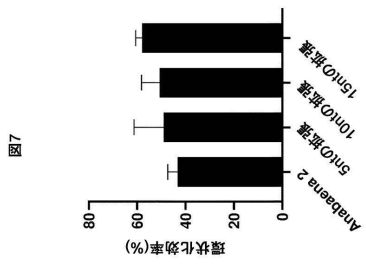
【図５】


図5
細胞の%
0
20
40
60
80
担体
Anabaena 1
Anabaena 2
Anabaena 3

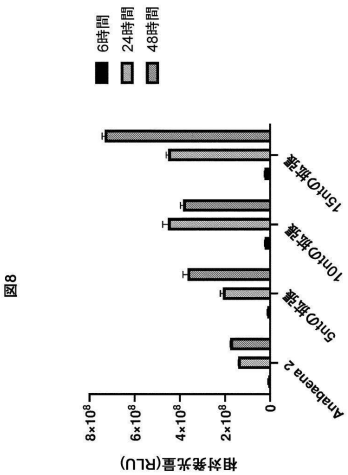
【図６】


図6
拡張されたアニーリング領域(12nt)
3'半分-イントロン
E2
スペーサー
ポリヌクレオチドカーゴ
E1
5'半分-イントロン
5ntの拡張(全体で17nt)
10ntの拡張(全体で22nt)
15ntの拡張(全体で27nt)

【図７】


図7
環状化効率(%)
0
20
40
60
80
Anabaena 2
5ntの拡張
10ntの拡張
15ntの拡張

【図８】


図8
相対発光量(RLU)
0
2×10^8
4×10^8
6×10^8
8×10^8
6時間
24時間
48時間
Anabaena 2
5ntの拡張
10ntの拡張
15ntの拡張

【図９】

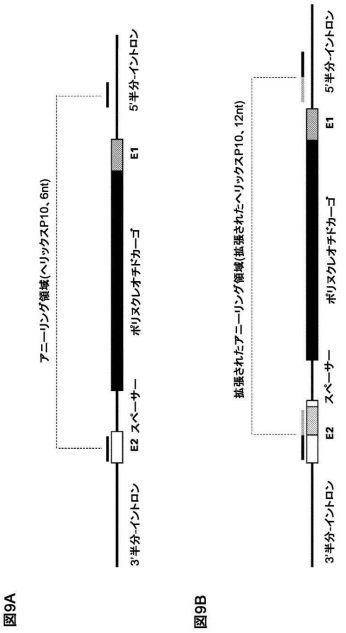


図9A

図9B

【図１０】

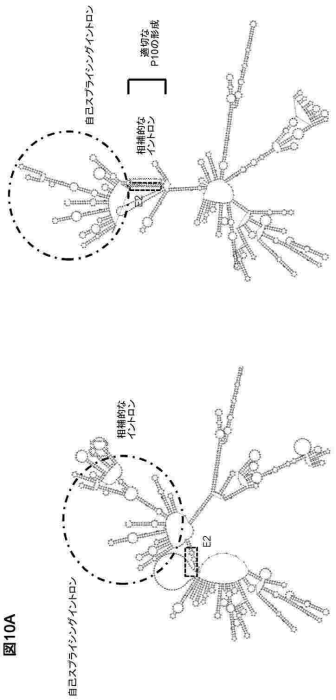


図10B

図10A

【図１１】

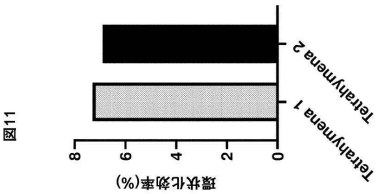


図11

【図１２】

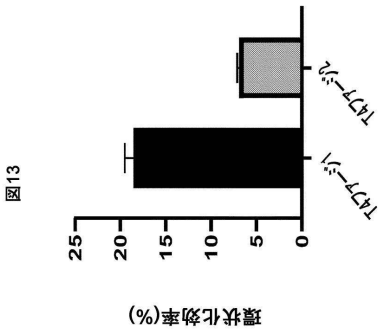


図12A

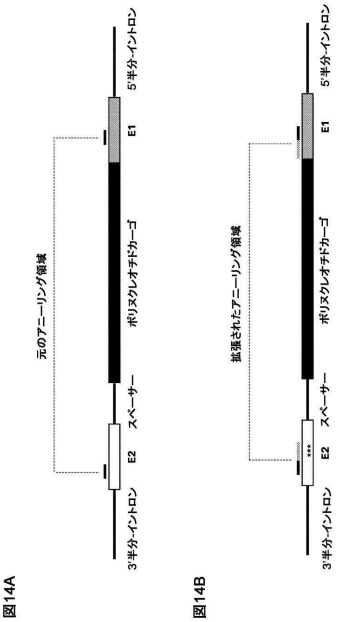


図12B

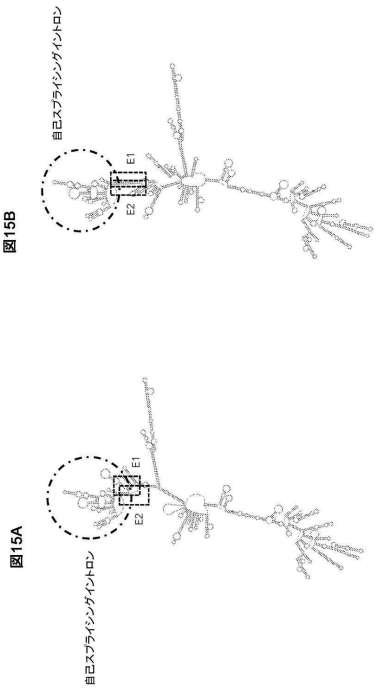
【図１３】



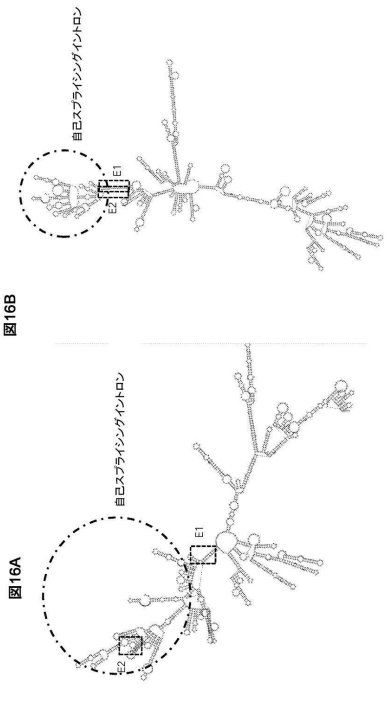
【図１４】



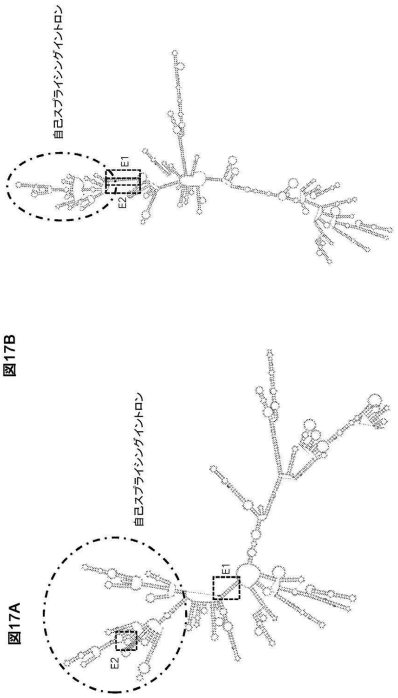
【図１５】



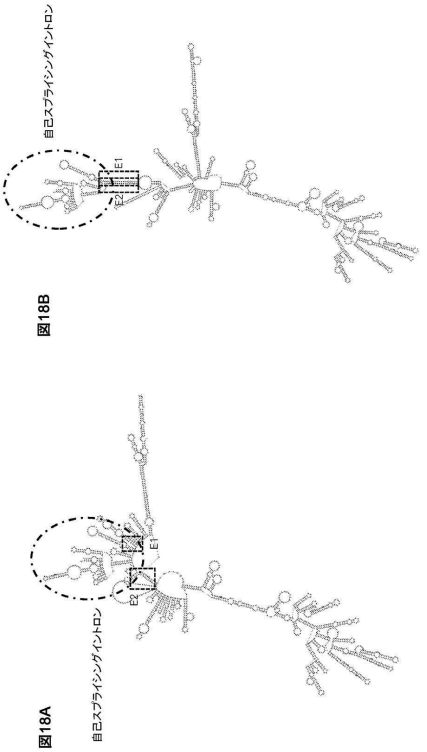
【図１６】



【図１７】



【図１８】

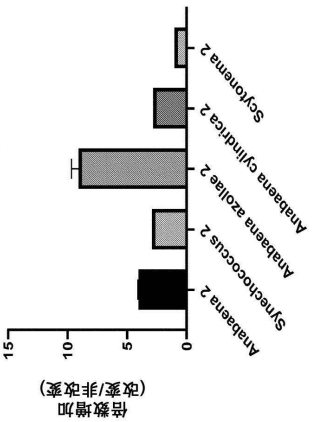


【図１９】

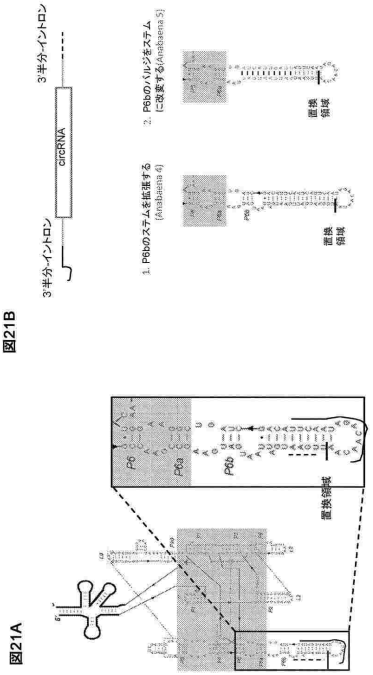
図19

生物	改変	元	拡張された
シネココッカス・エロンガタス (Synechococcus elongatus)	Synechococcus 1 **TCCGCTG**ACTGTAAAGG Synechococcus 2 **TCCGCTG**CGTCTA*CCGT*	7nts	17nts
アナベナ・アゾラエ (Anabaena azollae)	Anabaena azollae 1 **TCCGT**TGACTGTAAAAA Anabaena azollae 2 **TCCGT***A*GCGTCTA*CCAT*	5nts	17nts
アナベナ・シリンドリカ (Anabaena cylindrica)	Anabaena cylindrica 1 **TCCGT**TGACCTTAAACG Anabaena cylindrica 2 **TCCGT***A*GCGTCTA*CCAT*	5nts	17nts
スキトネマ・ホフマンニ (Scytonema hofmanni)	Scytonema 1 **CCCGA**AGGTCAGTGGTT Scytonema 2 **CCCGA***CGAGCTACCAGG*	5nts	17nts

【図２０】



【図２１】


3'半分イントロン
circRNA
3'半分イントロン
1. PBbのステムを拡張する (Anabaena 4)
2. PBbのバルジをステム に変える(Anabaena 5)
置換領域
置換領域
PB
PA
PB
PA
PB
PA

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/043808

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/67
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/084371 A1 (MITOPROD [FR]; PLANE GUILLAUME [FR]) 29 July 2010 (2010-07-29)	1-51
A	WO 2020/198403 A2 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI LLC [US]) 1 October 2020 (2020-10-01)	1-51
A	WO 2020/181013 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI LLC [US]) 10 September 2020 (2020-09-10)	1-51

-/--

[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
12 January 2023	27/01/2023

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	Bassias, Ioannis

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/043808

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. PUTTARAJU ET AL: "Group I permuted intron-exon (PIE) sequences self-splice to produce circular exons", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 20, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 5357-5364, XP055622176, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/20.20.5357 -----	1-51
A	SONJA PETKOVIC ET AL: "RNA circularization strategies in vivo and in vitro", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 43, no. 4, 6 February 2015 (2015-02-06), pages 2454-2465, XP055488942, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkv045 -----	1-51
A	HOLDT LESCA M ET AL: "Molecular roles and function of circular RNAs in eukaryotic cells", CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHAUSER VERLAG, HEIDELBERG, DE, vol. 75, no. 6, 7 November 2017 (2017-11-07), pages 1071-1098, XP036427340, ISSN: 1420-682X, DOI: 10.1007/S00018-017-2688-5 [retrieved on 2017-11-07] -----	1-51
A	CHEN LING-LING: "The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs", NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 21, no. 8, 4 May 2020 (2020-05-04), pages 475-490, XP037198627, ISSN: 1471-0072, DOI: 10.1038/S41580-020-0243-Y [retrieved on 2020-05-04] -----	1-51
A	FORD E. ET AL: "Synthesis of circular RNA in bacteria and yeast using RNA cyclase ribozymes derived from a group I intron of phage T4.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 91, no. 8, 12 April 1994 (1994-04-12) , pages 3117-3121, XP055896315, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.91.8.3117 -----	1-51

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/043808

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

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

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 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:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/043808

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010084371 A1	29-07-2010	NONE	
WO 2020198403 A2	01-10-2020	AU 2020245548 A1	21-10-2021
		CA 3131319 A1	01-10-2020
		CN 113661242 A	16-11-2021
		EP 3946466 A2	09-02-2022
		IL 286621 A	01-12-2021
		JP 2022527763 A	06-06-2022
		KR 20210142678 A	25-11-2021
		WO 2020198403 A2	01-10-2020
WO 2020181013 A1	10-09-2020	AU 2020233404 A1	16-09-2021
		CA 3128626 A1	10-09-2020
		CN 113544269 A	22-10-2021
		EP 3935162 A1	12-01-2022
		IL 285906 A	31-10-2021
		JP 2022523794 A	26-04-2022
		KR 20210135265 A	12-11-2021
		MA 55206 A	12-01-2022
		US 2022143062 A1	12-05-2022
		WO 2020181013 A1	10-09-2020

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

フロントページの続き

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,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士　山本 健策

(72)発明者　ダドキン， ヴァディム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア

(72)発明者　ペク， キ ヨン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア

(72)発明者　デ ブール， アレクサンドラ ソフィー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア

(72)発明者　ネルソン， ジェニファー エー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア

Ｆターム（参考）　4B064　AG01 CA02 CA10 CA19 DA20