(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0113478
(43) 공개일자 2024년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7016440
(22) 출원일자(국제) 2022년10월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년05월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/078301
(87) 국제공개번호 WO 2023/069948
국제공개일자 2023년04월27일
(30) 우선권주장
63/262,690 2021년10월18일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
플래그쉽 파이어니어링 이노베이션스 VII, 엘엘씨
미국 02142 매사추세츠 케임브리지 케임브리지 파크웨이 55 8쓰 플로어
(72) 발명자
스네이더, 알렉산드라 레이첼
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 스위트 800이
루벤스, 제이콥 로젠블룸
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 스위트 800이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

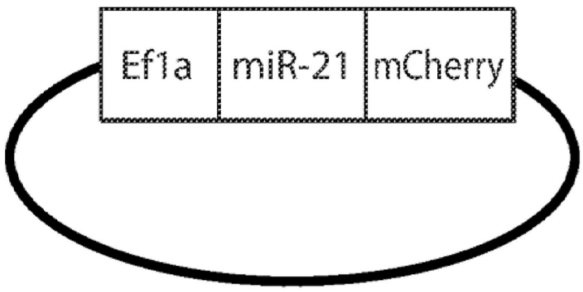
전체 청구항 수 : 총 85 항

(54) 발명의 명칭 **DNA 조성물 및 관련 방법**

(57) 요 약

본 개시 내용은, 예를 들어, 100개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA를 제공한다. ssDNA는 이펙터 서열, 예를 들어 치료용 단백질을 인코딩할 수 있다. ssDNA는 핵 표적화 서열(NTS)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, ssDNA는 다른 유사한 dsDNA와 비교하여 선천성 면역 시스템의 감소된 활성화를 나타낸다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/334 (2013.01)
C12N 2310/336 (2013.01)
C12N 2310/532 (2013.01)

(72) 발명자
푸자르, 나라하리 수반나
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 스위트 800이
깁슨, 몰리 크리센
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 스위트 800이
포트니, 벤자민 앤드류
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 스위트 800이
본 말트잔, 제프리 에이.
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 스위트 800이
브레톤, 카밀로 아얄라
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 캠브리지 파크웨이 55 스위트 800이

(30) 우선권주장
63/304,913 2022년01월31일 미국(US)
63/373,293 2022년08월23일 미국(US)
63/402,772 2022년08월31일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

원형 ssDNA의 제조 방법으로서,

a) 원형 dsDNA를 제공하는(예를 들어, 생성하거나 수득하는) 단계로서, 원형 dsDNA는

i) 플라스미드 백본이 결여되어 있거나;

ii) 세균 복제 기점이 결여되어 있거나;

iii) 선택가능한 마커, 예를 들어 항생제 저항성 마커가 결여되어 있거나;

iv) 화학적 변형, 예를 들어 당에 대한 화학적 변형, 염기에 대한 화학적 변형, 또는 핵산 백본에 대한 화학적 변형을 포함하는, 단계;

b) 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성(discontinuity)을 도입하여(예를 들어, 닉킹 엔도뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 닉킹 엔도뉴클레아제(예를 들어, Nb.BsrDI 또는 Nb.Bpu10I 또는 Nt.BspQI)와 접촉시켜), 불연속성을 갖는 dsDNA를 생성하는 단계;

c) 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 불연속성을 갖는 dsDNA를 엑소뉴클레아제(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제 III)와 접촉시키는 단계

를 포함하며, 이에 의해 원형 ssDNA를 제조하는, 방법.

청구항 2

원형 ssDNA의 제조 방법으로서,

a) 원형 dsDNA를 제공하는(예를 들어, 생성하거나 수득하는) 단계;

b) 닉킹 엔도뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 Nb.BsrDI 또는 Nt.BspQI로부터 선택되는 닉킹 엔도뉴클레아제와 접촉시켜, 닉킹된 dsDNA를 생성하는 단계;

c) 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 닉킹된 dsDNA를 엑소뉴클레아제(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제 III)와 접촉시키는 단계

를 포함하며, 이에 의해 원형 ssDNA를 제조하는, 방법.

청구항 3

원형 ssDNA의 제조 방법으로서,

a) 원형 dsDNA를 제공하는(예를 들어, 생성하거나 수득하는) 단계;

b) 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성을 도입하여(예를 들어, 닉킹 엔도뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 닉킹 엔도뉴클레아제(예를 들어, Nb.BsrDI 또는 Nb.Bpu10I 또는 Nt.BspQI)와 접촉시켜), 불연속성을 갖는 닉킹된 dsDNA를 생성하는 단계;

c) 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 닉킹된 dsDNA를 T7 엑소뉴클레아제와 접촉시키는 단계

를 포함하며, 이에 의해 원형 ssDNA를 제조하는, 방법.

청구항 4

원형 ssDNA의 제조 방법으로서,

a) 원형 dsDNA를 제공하는(예를 들어, 생성하거나 수득하는) 단계;

b) 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성을 도입하여(예를 들어, 닉킹 엔도뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 닉킹 엔도뉴클레아제(예를 들어, Nb.BsrDI 또는 Nb.Bpu10I 또는 Nt.BspQI)와 접촉시켜), 불연속성을 갖는 닉킹된 dsDNA를 생성하는 단계;

c) 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 닉킹된 dsDNA를 엑소뉴클레아제(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제 III)와 접촉시켜, 원형 ssDNA를 제조하는 단계; 및

d) 원형 ssDNA에 대해 겔 정제를 수행하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 원형 dsDNA는

i) 플라스미드 백본이 결여되어 있거나;

ii) 세균 복제 기점이 결여되어 있거나;

iii) 선택가능한 마커, 예를 들어 항생제 저항성 마커가 결여되어 있거나;

iv) 화학적 변형, 예를 들어 당에 대한 화학적 변형, 염기에 대한 화학적 변형, 또는 핵산 백본에 대한 화학적 변형을 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, b)는 닉킹 엔도뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 Nb.BsrDI 또는 Nt.BspQI로부터 선택되는 닉킹 엔도뉴클레아제와 접촉시켜, 닉킹된 dsDNA를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항, 제2항, 및 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, c)는 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 닉킹된 dsDNA를 T7 엑소뉴클레아제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 및 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, d) 원형 ssDNA에 대해 겔 정제를 수행하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 원형 dsDNA를 생성하는 단계는 하기 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4개, 또는 전부)을 포함하는, 방법:

(i) 이펙터 서열을 포함하는 핵산(예를 들어, 플라스미드)을 제공하는 단계;

(ii) 이펙터 서열을 포함하는 핵산(예를 들어, 플라스미드)의 영역을 증폭시키기 위해 PCR을 수행하는 단계로서, PCR을 수행하는 단계는 플라스미드를 제1 엔도뉴클레아제 인식 부위를 포함하는 제1 프라이머 및 제2 엔도뉴클레아제 인식 부위 및 닉킹 인식 부위를 포함하는 제2 프라이머와 접촉시키되, 제1 프라이머 및 제2 프라이머는 플라스미드 상에서 이펙터 서열을 증폭시키기에 적합한(그리고 선택적으로, 플라스미드의 백본을 증폭시키지 않는) 위치에 위치하는 단계, 및 플라스미드를 DNA-의존성 DNA 중합효소(예를 들어, 고신뢰성 중합효소, 예를 들어 Q5)와 접촉시키는 단계, 및 이펙터 서열을 포함하는 핵산의 영역을 증폭시키기에 충분한 열 사이클링 조건을 적용하여, 선형 dsDNA를 생성하는 단계를 포함하는, 단계;

(iii) 선형 dsDNA를 엔도뉴클레아제 인식 부위를 절단하는 엔도뉴클레아제(예를 들어, BsaI, KpnI, 또는 NheI)를 사용하여 분해하여, 분해된 선형 DNA를 생성하는 단계;

(iv) (예를 들어, 분해된 선형 dsDNA를 리가제, 예를 들어 T4 리가제와 접촉시킴으로써) 분해된 선형 dsDNA를 원형화하는 단계; 및

(v) 분해된 선형 dsDNA를 포함하는 조성물을 엑소뉴클레아제(예를 들어, T5 엑소뉴클레아제)와 접촉시켜 잔류 선형 DNA를 분해하는 단계.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 정제 단계, 예를 들어 겔 정제, 또는 DNA 정제 컬럼의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 정제 단계는

선형 dsDNA;

분해된 선형 dsDNA;

원형 dsDNA; 또는

원형 ssDNA

에 대해 수행되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 유기 추출 단계(예를 들어, 페놀-클로로포름 추출 단계)를 포함하지 않는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 지12항 중 어느 한 항에 있어서, c)는 닉킹된 dsDNA를 15 내지 120분, 예를 들어 20 내지 60분, 예를 들어 약 30분 동안 엑소뉴클레아제(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제)와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성을 도입하는 단계는 2개의 인접 뉴클레오티드 사이에 닉을 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성을 도입하는 단계는 뉴클레오티드를 제거하는 단계를 포함하며, 예를 들어 뉴클레오티드는 우라실인, 방법.

청구항 16

조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)로서,

이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하며,

하기 중 하나 이상에 해당하는, 조성물:

a) 조성물 내의 총 DNA의 질량 기준으로 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%, 또는 99%는 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA임;

b) 조성물 내의 총 DNA의 질량 기준으로 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 전장(full length)임;

c) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 이중 가닥 DNA(dsDNA)임;

d) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 선형 DNA임; 또는

e) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 선형 ssDNA임.

청구항 17

조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)로서,

이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하며,

하기 중 하나 이상에 해당하는, 조성물:

a) 조성물에는 클로로포름이 실질적으로 없으며, 예를 들어 클로로포름이 없음;

b) 조성물에는 페놀이 실질적으로 없으며, 예를 들어 페놀이 없음;

c) 조성물에는 페놀 및 클로로포름이 실질적으로 없으며, 예를 들어 페놀 및 클로로포름이 없음;

d) 조성물에는 유기 용매가 실질적으로 없으며, 예를 들어 유기 용매가 없음; 또는

e) 조성물에는 방향족 유기 용매가 실질적으로 없으며, 예를 들어 방향족 유기 용매가 없음.

청구항 18

조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)로서,

이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하며,

ssDNA는 페놀-클로로포름 추출 단계를 포함하지 않는 방법에 의해 생성된, 조성물.

청구항 19

조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)로서,

이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하며,

하기 중 하나 이상에 해당하는, 조성물:

a) 조성물에는 엑소뉴클레아제 III이 실질적으로 없음(예를 들어, 엑소뉴클레아제 III이 없음);

b) 조성물에는 T7 엑소뉴클레아제가 실질적으로 없음(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제가 없음); 또는

c) 조성물에는 T5 엑소뉴클레아제가 실질적으로 없음(예를 들어, T5 엑소뉴클레아제가 없음).

청구항 20

조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)로서,

이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 mg 포함하는, 조성물.

청구항 21

조성물(예를 들어, 약제학적 조성물 또는 제조 중간체)로서,

이펙터 서열을 포함하고 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 원형 이중 가닥 DNA, 및

Nb.BsrDI 또는 Nt.BspQI

를 포함하는, 조성물.

청구항 22

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 담체 내에 배치되지 않는, 조성물.

청구항 23

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 담체는 지질계 담체인, 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 지질계 담체는 지질 나노입자(LNP)인, 조성물.

청구항 26

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 네이키드(naked) 투여용으로 제형화되는, 조성물.

청구항 27

제16항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 비경구 투여용으로 제형화되는, 조성물.

청구항 28

제16항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 국소 투여용으로 제형화되는, 조성물.

청구항 29

제16항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 내독소, 모노뉴클레오티드, 변형된 모노뉴클레오티드, 이중 가닥 DNA, DNA 단편 또는 절단체(truncation), 단백질(예를 들어, 효소, 예를 들어 리가제, 제한 효소)로 구성되는 군으로부터 선택되는 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없는, 조성물.

청구항 30

ssDNA를 포함하는 조성물의 샘플을 평가하는 방법으로서,

하기로부터 선택되는 조건이 만족되는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 방법:

a) 조성물 내의 총 DNA의 질량 기준으로 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 98%, 또는 99%는 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA임;

b) 조성물 내의 총 DNA의 질량 기준으로 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 전장임;

c) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 이중 가닥 DNA(dsDNA)임;

d) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 선형 DNA임;

e) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 선형 ssDNA임;

f) 조성물에는 클로로포름이 실질적으로 없으며, 예를 들어 클로로포름이 없음;

g) 조성물에는 페놀이 실질적으로 없으며, 예를 들어 페놀이 없음;

h) 조성물에는 페놀 및 클로로포름이 실질적으로 없으며, 예를 들어 페놀 및 클로로포름이 없음;

i) 조성물에는 유기 용매가 실질적으로 없으며, 예를 들어 유기 용매가 없음;

j) 조성물에는 방향족 유기 용매가 실질적으로 없으며, 예를 들어 방향족 유기 용매가 없음;

k) 조성물에는 엑소뉴클레아제 III이 실질적으로 없음(예를 들어, 엑소뉴클레아제 III이 없음);

l) 조성물에는 T7 엑소뉴클레아제가 실질적으로 없음(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제가 없음); 및/또는

m) 조성물에는 T5 엑소뉴클레아제가 실질적으로 없음(예를 들어, T5 엑소뉴클레아제가 없음).

청구항 31

제30항에 있어서, 조건이 만족되는 경우, 조성물에 대해 하류 처리(downstream processing) 단계를 수행하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 선택적으로, 하류 처리 단계는 조성물을 부분으로 분배하는 단계, 조성물을 패키징하는 단계, 조성물을 라벨링하는 단계, 조성물을 운송하는 단계, 조성물을 유통하는 단계, 조성물을 보관하는 단계, 또는 조성물을 시장에 출시하는 단계로부터 선택되는, 방법.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 조성물은 제16항 내지 제29항 중 어느 한 항의 조성물인, 방법.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 것인, 방법.

청구항 34

이펙터를 대상체에게 전달하는 방법으로서,

제16항 내지 제29항 중 어느 한 항의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

세포, 조직 또는 대상체에서 생물학적 파라미터를 조절하는 방법으로서,

제16항 내지 제29항 중 어느 한 항의 조성물을 세포, 조직 또는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 100개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는, 조성물 또는 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 화학적 변형, 예를 들어 당에 대한 화학적 변형, 염기에 대한 화학적 변형, 또는 핵산 백본에 대한 화학적 변형을 포함하는, 조성물 또는 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 박테리오파지 게놈이 아닌, 조성물 또는 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 박테리오파지 패키징 부위가 결여되어 있는, 조성물 또는 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 박테리오파지 복제 기점이 결여되어 있는, 조성물 또는 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 박테리오파지 캡시드 유전자를 인코딩하지 않는, 조성물 또는 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 회전환 증폭(rolling circle amplification)에 의해 생성되지 않은 것인, 조성물 또는 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 가닥 변위 증폭에 의해 생성되지 않은 것인, 조성물 또는 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 프로텔로머라제 표적 서열을 포함하지 않는, 조성물 또는 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 헤어핀 구조를 포함하지 않는, 조성물 또는 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 제2 서열과 혼성화되는 제1 서열을 포함하지 않으며, 여기서 제1 서열 및 제2 서열은 적어도 5 nt 길이이고, 제1 서열과 제2 서열은 6개 미만의 뉴클레오티드만큼 서로 떨어져서 위치하는, 조성물 또는 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 이중 가닥 기점(double strand origin, DSO)을 포함하지 않는, 조성물 또는 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 핵 표적화 서열(nuclear targeting sequence, NTS)을 추가로 포함하는, 조성물 또는 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 유지 서열(maintenance sequence)을 추가로 포함하는, 조성물 또는 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 제2 가닥 모티프(second strand motif, SSM)를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 20 내지 20,000개의 뉴클레오티드를 포함하는, 조성물 또는 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 50 내지 50,000개의 뉴클레오티드를 포함하는, 조성물 또는 방법.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 센스 ssDNA 가닥인, 조성물 또는 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 안티센스 ssDNA 가닥인, 조성물 또는 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 화학적 변형은 5-포르밀시토신, 포스포로티오에이트, 7-메틸구아닌, 및 5-글루코실메틸시토신으로부터 선택되는 공유결합 변형인, 조성물 또는 방법.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 서열은 치료적 기능성 서열인, 조성물 또는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 치료적 기능성 서열은, DNA 압타머, DNA효소(DNAzyme) 또는 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오티드(ASO)를 포함하는 DNA 서열인, 조성물 또는 방법.

청구항 58

제56항에 있어서, 치료적 기능성 서열은 치료용 RNA 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함하는, 조성물 또는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 프로모터 서열은 tRNA, lncRNA, miRNA, rRNA, snRNA, microRNA, siRNA, piRNA, snoRNA, snRNA, exRNA, scaRNA, Y RNA, 및 hnRNA로 구성되는 군으로부터 선택되는 치료용 RNA를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결되는, 조성물 또는 방법.

청구항 60

제58항에 있어서, 프로모터 서열은 전사 인자; 염색질 리모델링 인자; 항원; 호르몬; 효소(예컨대, 뉴클레아제, 예를 들어 엔도뉴클레아제, 예를 들어 CRISPR 시스템의 뉴클레아제 요소, 예를 들어 Cas9, dCas9, aCas9-닉카제, Cpf/Cas12a); Crispr-연결된 효소, 예를 들어 염기 에디터 또는 프라임 에디터; 이동성 유전 요소 단백질(예를 들어, 트랜스포사제, 레트로트랜스포사제, 재조합효소, 인테그라제); 유전자 라이터(gene writer); 중합효소; 메틸화효소; 탈메틸화효소; 아세틸화효소; 탈아세틸화효소; 키나제; 포스파타제; 리가제; 데유비퀴티나제; 인테그라제; 재조합효소; 토포이소머라제; 자이라제; 헬리카제; 리소좀산 하이드롤라제; 항체; 수용체 리간드; 수용체; 응혈 인자; 막 단백질; 미토콘드리아 단백질; 핵 단백질; 센티린; 다르핀, 및 애드넥틴으로 구성되는 군으로부터 선택되는 치료용 폴리펩티드를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결되는, 조성물 또는 방법.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 제1 이펙터 서열과 동일하거나 상이한 제2 이펙터 서열을 포함하는, 조성물 또는 방법.

청구항 62

약제학적 제형으로서,

단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하는 LNP를 포함하며, 여기서 ssDNA는

(a) 치료용 단백질을 인코딩하고,

(b) 공유결합으로 닫혀 있고,

(c) 100개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않고,

(d) 200개 초과의 뉴클레오티드 길이이고,

(e) 프로텔로머라제 표적 서열을 포함하지 않으며;

약제학적 제형에 선형 DNA 및 단백질이 실질적으로 없는, 약제학적 제형.

청구항 63

제62항에 있어서, ssDNA는 40개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는, 약제학적 제형.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서, ssDNA는 치료용 폴리펩티드를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 65

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 단백질은 전사 인자, 염색질 리모델링 인자, 항원, 펩티드, 호르몬, 효소, 항체, 수용체 리간드, 수용체, 응혈 인자, 및 막 단백질로 구성되는 군으로부터 선택되는, 약제학적 제형.

청구항 66

제62항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 박테리오파지 패키징 부위 및 박테리오파지 복제 기점 중

하나 또는 둘 다가 결여되어 있거나, ssDNA는 박테리오파지 캡시드 유전자를 인코딩하지 않는, 약제학적 제형.

청구항 67

제62항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 회전환 증폭에 의해 생성되지 않은 것인, 약제학적 제형.

청구항 68

제62항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 가닥 변위 증폭에 의해 생성되지 않은 것인, 약제학적 제형.

청구항 69

제62항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 30 내지 40%, 40 내지 50%, 50 내지 60%, 또는 60 내지 70%의 GC 함량을 갖는, 약제학적 제형.

청구항 70

제62항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 핵 표적화 서열(NTS)을 추가로 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 71

제62항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 유지 서열을 추가로 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 72

제62항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 제2 가닥 모티프(SSM)를 추가로 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 73

제62항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 200 내지 3,000개의 뉴클레오티드를 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 74

제62항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 500 내지 2,000개의 뉴클레오티드를 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 75

제62항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 센스 ssDNA 가닥인, 약제학적 제형.

청구항 76

제62항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 안티센스 ssDNA 가닥인, 약제학적 제형.

청구항 77

제62항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, ssDNA는 적어도 하나의 뉴클레오티드 변형을 포함하는, 약제학적 제형.

청구항 78

제77항에 있어서, 뉴클레오티드 변형은 5-포르밀시토신인, 약제학적 제형.

청구항 79

제62항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 비경구 투여용으로 제형화되는, 약제학적 제형.

청구항 80

제62항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 국소 투여용으로 제형화되는, 약제학적 제형.

청구항 81

제62항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 내독소, 모노뉴클레오티드, 변형된 모노뉴클레오티드, 이중 가닥 DNA 중 하나 이상이 실질적으로 없는, 약제학적 제형.

청구항 82

치료용 단백질을 대상체에게 전달하는 방법으로서,

제62항 내지 제81항 중 어느 한 항의 약제학적 제형을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 대상체의 게놈 내로 ssDNA가 실질적으로 통합되지 않는, 방법.

청구항 84

약제학적 제형으로서,

단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하는 LNP를 포함하며, 여기서 ssDNA는

(a) 이펙터 서열을 포함하고,

(b) 공유결합으로 닫혀 있고,

(c) 40개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않고,

(d) 200개 초과의 뉴클레오티드 길이이고,

(e) 프로텔로머라제 표적 서열을 포함하지 않는,

약제학적 제형.

청구항 85

치료용 단백질을 대상체에게 전달하는 방법으로서,

단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하는 약제학적 제형을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ssDNA는

(a) 이펙터 서열을 포함하고,

(b) 공유결합으로 닫혀 있고,

(c) 40개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않고,

(d) 200개 초과의 뉴클레오티드 길이이고,

(e) 프로텔로머라제 표적 서열을 포함하지 않는,

방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2021년 10월 18일에 출원된 미국 특허 출원 63/262,690, 2022년 1월 31일에 출원된 미국 특허 출원 63/304,913, 2022년 8월 23일에 출원된 미국 특허 출원 63/373,293, 및 2022년 8월 31일에 출원된 미국 특허 출원 63/402,772에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 충족되지 않은 의학적 요구를 해결하기 위해 신규한 치료 방식이 필요하다.

발명의 내용

[0004] 약제학적 DNA 조성물, 작제물, 제제, 이러한 조성물, 작제물 및 제제의 사용 방법, 및 이들의 제조 방법이 본 명세서에 기재된다.

[0005] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 약제학적 제형을 제공하며, 상기 약제학적 제형은 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하는 LNP를 포함하며, 여기서 ssDNA는 (a) 치료용 단백질을 인코딩하고, (b) 공유결합으로 닫혀 있고, (c) 100개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않고, (d) 200개 초과의 뉴클레오티드 길이이고, (e) 프로텔로머라제 표적 서열을 포함하지 않으며; 약제학적 제형에는 선형 DNA 및 단백질이 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, ssDNA는 40개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다.

[0006] 일부 구현예에서, ssDNA는 치료용 폴리펩티드를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료용 단백질은 전사 인자, 염색질 리모델링 인자, 항원, 펩티드, 호르몬, 효소, 항체, 수용체 리간드, 수용체, 응혈 인자, 및 막 단백질로 구성되는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, ssDNA는 30 내지 40%, 40 내지 50%, 50 내지 60%, 또는 60 내지 70%의 GC 함량을 갖는다.

[0007] 일부 구현예에서, ssDNA는 박테리오파지 패키징 부위 및 박테리오파지 복제 기점 중 하나 또는 둘 다가 결여되어 있거나, ssDNA는 박테리오파지 캡시드 유전자를 인코딩하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 회전환 증폭(rolling circle amplification)에 의해 생성되지 않았다. 일부 구현예에서, ssDNA는 가닥 변위 증폭에 의해 생성되지 않았다.

[0008] 일부 구현예에서, ssDNA는 핵 표적화 서열(nuclear targeting sequence, NTS)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 유지 서열(maintenance sequence)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 제2 가닥 모티프(second strand motif, SSM)를 추가로 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, ssDNA는 200 내지 3,000개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 500 내지 2,000개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 센스 ssDNA 가닥이다. 일부 구현예에서, ssDNA는 안티센스 ssDNA 가닥이다.

[0010] 일부 구현예에서, ssDNA는 적어도 하나의 뉴클레오티드 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 변형은 5-포르밀시토신이다.

[0011] 일부 구현예에서, 약제학적 제형은 비경구 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 약제학적 제형은 국소 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 약제학적 제형에는 내독소, 모노뉴클레오티드, 변형된 모노뉴클레오티드, 이중 가닥 DNA 중 하나 이상이 실질적으로 없다.

[0012] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 치료용 단백질을 대상체에게 전달하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 약제학적 제형을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체의 게놈 내로 ssDNA가 실질적으로 통합되지 않는다.

[0013] 일 양태에서, 본 발명은 이펙터 서열을 포함하는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하는 조성물, 예를 들어 약제학적 조성물을 특징으로 하며, 단일 가닥 DNA는 하기 특성들 중 1개, 2개, 또는 3개를 갖는다: ssDNA는 공유결합으로 닫혀 있음; ssDNA는 100개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않음; ssDNA는 적어도 하나의 공유결합 변형을 포함함.

[0014] 일 구현예에서, ssDNA는 이펙터 서열, 및 하기 중 1개, 2개, 또는 3개를 갖는다: 핵 표적화 서열(NTS), 유지 서열, 및 제2 가닥 모티프(SSM). 일 구현예에서, ssDNA는 DNA 이펙터 서열을 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 DNA 이펙터 서열 및 NTS를 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 DNA 이펙터 서열, NTS, 및 SSM을 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 DNA 이펙터 서열, NTS, SSM, 및 유지 서열을 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 DNA 이펙터 서열, NTS, 및 유지 서열을 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 DNA 이펙터 서열, SSM, 및 유지 서열을 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 RNA 또는 단백질(펩티드 또는 폴리펩티드) 이펙터를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 RNA 또는 단백질(펩티드 또는 폴리펩티드) 이펙터를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, 및 NTS를 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 RNA 또는 단백질(펩티드 또는 폴리펩티드) 이펙터를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, NTS, 및 SSM을 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 RNA 또는 단백질(펩티드 또는 폴리펩티드) 이펙터를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, NTS, SSM, 및 유지 서열을 갖는다. 일 구현예에서, ssDNA는 RNA 또는 단백질(펩티드 또는 폴리펩티드) 이펙터를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, NTS, 및 유지 서열을 갖는다. 일

구현예에서, ssDNA는 RNA 또는 단백질(펩티드 또는 폴리펩티드) 이펙터를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, SSM, 및 유지 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 인핸서, 예를 들어 SV40 인핸서를 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 2개의 인핸서를 포함한다. 일부 구현예에서, 인핸서 중 하나 또는 둘 다는 SV40 인핸서이다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 NTS, 예를 들어 전사 인자에 결합하는 NTS, 예를 들어 NF-κB에 결합하는 NTS, 예를 들어 3NF 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 2개, 3개, 또는 4개의 NTS를 포함한다. 일부 구현예에서, NTS 중 1개, 2개, 3개, 또는 4개는 3NF 서열이다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 SMM(예를 들어, 아넬로바이러스 헤어핀)을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 폴리A 신호, 예를 들어 bGH 폴리A 신호를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 프로모터, 예를 들어 EF1a 프로모터를 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 인핸서는 프로모터의 상류에 위치한다. NTS는, 예를 들어 프로모터의 상류에 또는 폴리A 신호의 하류에 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, SMM(예를 들어, 아넬로바이러스 헤어핀)은 프로모터의 상류에 위치한다.

[0016] 일부 구현예에서, 프로모터는 인핸서와 이펙터 서열 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, NTS는 SMM(예를 들어, 아넬로바이러스 헤어핀)과 프로모터 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, SMM(예를 들어, 아넬로바이러스 헤어핀)은 인핸서와 프로모터 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 폴리A 신호는 이펙터 서열과 NTS 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 폴리A 신호는 이펙터 서열과 인핸서 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 폴리A 신호는 SMM(예를 들어, 아넬로바이러스 헤어핀)과 이펙터 서열 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, NTS는 SMM(예를 들어, 아넬로바이러스 헤어핀)과 폴리A 신호 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 제1 NTS 서열은 제2 NTS 서열에 바로 인접한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 본 명세서에서 표 5에 나타낸 바와 같이 배열된 일련의 구성요소들을 포함한다.

[0017] 일 구현예에서, ssDNA는 적어도 15개의 뉴클레오티드, 적어도 30개의 뉴클레오티드, 적어도 50개의 뉴클레오티드, 적어도 75개의 뉴클레오티드, 적어도 100개의 뉴클레오티드, 적어도 200개의 뉴클레오티드, 적어도 300개의 뉴클레오티드, 적어도 500개의 뉴클레오티드, 적어도 750개의 뉴클레오티드, 적어도 1,000개의 뉴클레오티드, 적어도 2,000개의 뉴클레오티드, 적어도 3,000개의 뉴클레오티드, 적어도 4,000개의 뉴클레오티드, 적어도 5,000개의 뉴클레오티드, 적어도 10,000개의 뉴클레오티드, 적어도 15,000개의 뉴클레오티드, 적어도 20,000개의 뉴클레오티드, 적어도 25,000개의 뉴클레오티드, 적어도 30,000개의 뉴클레오티드, 적어도 35,000개의 뉴클레오티드, 적어도 40,000개의 뉴클레오티드, 적어도 45,000개의 뉴클레오티드, 적어도 50,000개의 뉴클레오티드, 적어도 60,000개의 뉴클레오티드, 또는 그 이상을 갖는다.

[0018] 일 구현예에서, ssDNA는 20 내지 1000개의 뉴클레오티드, 20 내지 50개의 뉴클레오티드, 100 내지 500개의 뉴클레오티드, 500 내지 50,000개의 뉴클레오티드, 1,000 내지 50,000개의 뉴클레오티드, 2,000 내지 40,000개의 뉴클레오티드, 5,000 내지 50,000개의 뉴클레오티드, 500 내지 50,000개의 뉴클레오티드, 500 내지 25,000개의 뉴클레오티드, 1,000 내지 20,000개의 뉴클레오티드, 1,000 내지 10,000개의 뉴클레오티드, 10,000 내지 60,000개의 뉴클레오티드, 1,000 내지 20,000개의 뉴클레오티드, 1,000 내지 40,000개의 뉴클레오티드, 200 내지 1,000개의 뉴클레오티드, 200 내지 2,000개의 뉴클레오티드, 200 내지 3,000개의 뉴클레오티드, 500 내지 1,000개의 뉴클레오티드, 500 내지 2,000개의 뉴클레오티드, 500 내지 3,000개의 뉴클레오티드, 1,000 내지 2,000개의 뉴클레오티드, 1,000 내지 3,000개의 뉴클레오티드, 또는 2,000 내지 3,000개의 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 20 내지 20,000개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 50 내지 50,000개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0019] 일 구현예에서, ssDNA는 센스 ssDNA 가닥이다. 일 구현예에서, ssDNA는 안티센스 ssDNA 가닥이다.

[0020] 일 구현예에서, ssDNA는 적어도 하나의 뉴클레오티드 변형, 예를 들어 공유결합 뉴클레오티드 변형, 예를 들어, N6-메틸아데노신(m6A, 6mA); 5-포르밀시토신(5fC, f5C); 5-카르복실시토신(ca5C, 5caC); 5-하이드록시메틸시토신(5hmC, hm5C); 5-메틸데옥시시토신(m5dC); 5-메틸시토신(5mC, m5C); 5'-메틸시토신; 3-메틸시토신(m3C); 5-메틸 피리미딘; 8-옥소구아닌(8-옥소G); 포스포로티오에이트; S 및 R 포스포로티오에이트 결합; 메틸티민; N3'-P5' 포스포로아미데이트(NP); 사이클로헥산 핵산(CeNA); 및 트리사이클로-DNA(tcDNA)로부터 선택되는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 N^6-메틸아데노신을 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA에서의 A 위치의 대부분은 N^6-메틸아데노신이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 변형은, 포스포티오에이트; 보라노-포스페이트; 1,5-이치환된 트리아졸; 2'-플루오로-2'데옥시뉴클레오시드 5'-트리포스페이트; 및 7-메틸구아닌; 5-글루코실메틸시토

신으로부터 선택되는 공유결합 변형이다.

[0021] 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 변형은 염기 변형이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 변형은 백본 변형이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 변형은 당 변형이다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 변형은 펩티드 접합체를 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 변형은 단백질 접합체를 포함한다.

[0022] 일 구현예에서, 이펙터 서열은 치료적 기능성 서열, 예를 들어 기능성의 구조 DNA 서열, 예컨대 DNA 압타머, DNA효소(DNAzyme) 또는 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오티드(ASO)이다.

[0023] 일 구현예에서, 이펙터 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된 치료용(예를 들어, 조절) RNA를 인코딩하는 DNA 서열이다. 일 구현예에서, RNA는, 예를 들어 tRNA, lncRNA, miRNA, rRNA, snRNA, microRNA, siRNA, piRNA, snoRNA, exRNA, scaRNA, Y RNA, 또는 hnRNA일 수 있다.

[0024] 일부 구현예에서, 치료적 기능성 서열은 치료용 RNA 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 이펙터 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된 치료용 펩티드 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열이다. 치료용 펩티드 또는 폴리펩티드는, 예를 들어 DNA 결합 단백질; RNA 결합 단백질; 수송체; 전사 인자; 번역 인자; 리보솜 단백질; 염색질 리모델링 인자; 후성유전학적 변형 인자; 항원; 호르몬; 효소(예컨대, 뉴클레아제, 예를 들어 엔도뉴클레아제, 예를 들어 CRISPR 시스템의 뉴클레아제 요소, 예를 들어 Cas9, dCas9, aCas9-닉카제, Cpf/Cas12a); Crispr-연결된 효소, 예를 들어 염기 에디터 또는 프라임 에디터; 이동성 유전 요소 단백질(예를 들어, 트랜스포사제, 레트로트랜스포사제, 재조합효소, 인테그라제); 유전자 라이터(gene writer); 중합효소; 메틸화효소; 탈메틸화효소; 아세틸화효소; 탈아세틸화효소; 키나제; 포스파타제; 리가제; 데유비퀴티나제; 프로테아제; 인테그라제; 재조합효소; 토포이소머라제; 자이라제; 헬리카제; 리소좀산 하이드롤라제; 항체(예를 들어, 온전한 항체, 이의 단편, 또는 나노바디); 신호전달 펩티드; 수용체 리간드; 수용체; 응혈 인자; 응고 인자; 구조 단백질; 카스파제; 막 단백질; 미토콘드리아 단백질; 핵 단백질; 단백질 스캐폴드 바인더, 예컨대 센티린, 다르핀, 또는 애드넥틴일 수 있다.

[0025] 구현예에서, ssDNA는 복수의 이펙터 서열들을 포함할 수 있다. 복수의 이펙터 서열들은 동일하거나 상이한 유형일 수 있으며, 예를 들어 ssDNA는 구조 DNA인 이펙터 서열, 및 기능성 RNA 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열인 제2 이펙터 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, ssDNA는 제1 이펙터 서열과 동일하거나 상이한 제2 이펙터 서열을 포함한다. ssDNA는 기능성 RNA를 인코딩하는 DNA 서열인 이펙터 서열, 및 기능성 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열인 제2 이펙터 서열을 포함할 수 있다. 복수의 이펙터 서열들은 동일한 유형의 동일하거나 상이한 서열일 수 있다.

[0026] 일부 구현예에서, ssDNA가 세포에 도입될 때, 세포는 ssDNA와 동일한 몰량으로 ssDNA와 동일한 서열을 갖는 dsDNA와 접촉된 동일한 유형의 대조 세포와 비교하여 (예를 들어, GAPDH mRNA 수준에 대해 정규화된) 더 낮은 사이토카인 mRNA 수준 증가를 나타낸다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 사이토카인 IFN-b, IL-6, IL-1b, TNF-a, 또는 CXCL10을 포함한다. 일부 구현예에서, 대조 세포에서의 사이토카인 증가는 대조 세포에서의 사이토카인 증가의 50%, 40%, 30%, 20%, 또는 10% 미만이다.

[0027] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 1.6 내지 1.7, 1.7 내지 1.8. 또는 1.63 내지 1.76의 A260/A280 비를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 0.3 내지 1, 1 내지 1.5, 1.5 내지 1.8, 또는 0.34 내지 1.79의 A230/A260 비를 갖는다.

[0028] 구현예에서, ssDNA는 담체 내에 배치되지 않으며, 예를 들어 네이키드(naked) 투여용으로 제형화된다.

[0029] 구현예에서, ssDNA는 담체, 예를 들어 지질계 담체, 예를 들어 지질 나노입자(LNP)를 사용하여 제형화된다. 구현예에서, 약제학적 조성물은 담체, 예를 들어 지질계 담체, 예를 들어 LNP를 추가로 포함한다.

[0030] 일부 구현예에서, ssDNA를 포함하는 조성물에는 LNP가 실질적으로 없다(예를 들어, LNP가 없다). 일부 구현예에서, ssDNA를 포함하는 조성물에는 지질계 담체가 실질적으로 없다(예를 들어, 지질계 담체가 없다). 일부 구현예에서, ssDNA를 포함하는 조성물에는 지질이 실질적으로 없다(예를 들어, 지질이 없다).

[0031] 구현예에서, ssDNA는 약제학적 부형제를 사용하여 제형화된다.

[0032] 구현예에서, ssDNA는 비경구 투여용으로 제형화된다.

[0033] 구현예에서, 약제학적 조성물은 국소 투여용으로 제형화된다.

[0034] 구현예에서, 약제학적 조성물에는 예를 들어 내독소, 모노뉴클레오티드, 변형된 모노뉴클레오티드, 이중 가닥

DNA, DNA 단편 또는 절단체(truncation), 및 단백질(예를 들어, 효소, 예를 들어 리가제, 제한 효소)로 구성되는 군으로부터 선택되는 불순물 또는 공정 부산물이 실질적으로 없다. 원형, 예를 들어 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA의 경우에, 약제학적 조성물에는 선형 DNA가 실질적으로 없다.

[0035] 본 명세서에 기재된 임의의 구현예에서, ssDNA는 공유결합으로 닫혀 있을 수 있으며, 예를 들어 ssDNA는 원형화된다.

[0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 이펙터를 대상체에게, 예를 들어 이펙터를 필요로 하는 대상체에게 전달하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 본 명세서에 기재된, 예를 들어 상기 임의의 구현예에 기재된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 대상체는 이펙터를 사용하여 치료될 수 있는 질환을 갖거나 이러한 질환으로 진단받은 적이 있다.

[0037] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포, 조직 또는 대상체에서 생물학적 파라미터를 조절하는(예를 들어, 증가 또는 감소시키는) 방법을 포함한다. 상기 방법은 본 명세서에 기재된, 예를 들어 상기 임의의 구현예에 기재된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 구현예에서, 생물학적 파라미터는 표적 세포, 조직 또는 대상체에서 대상 유전자의 유전자 발현이 증가 또는 감소하는 것이며, 이러한 증가 또는 감소는 본 명세서에 기재된 이펙터 서열에 의해 달성된다. 일 구현예에서, 대상체는 이펙터를 사용하여 치료될 수 있는 질환을 갖거나 이러한 질환으로 진단받은 적이 있다.

[0038] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포, 조직 또는 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 본 명세서에 기재된, 예를 들어 상기 임의의 구현예에 기재된 ssDNA 또는 작제물을 이를 필요로 하는 세포, 조직 또는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 대상체는 이펙터를 사용하여 치료될 수 있는 질환을 갖거나 이러한 질환으로 진단받은 적이 있다.

[0039] 또 다른 양태에서, 본 발명은 이펙터 서열을 포함하는 ssDNA를 포함하는 약제학적 조성물의 제조 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 (a) 이펙터 서열, 및 선택적으로, 이펙터 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, NTS, SSM 및 유지 서열 중 하나 이상(예를 들어, 2개, 3개, 또는 4개)을 포함하는 플라스미드를 제공하거나 생성하는 단계, (b) 주형으로서 플라스미드를 사용하여, 이펙터 서열, 및 선택적으로, 이펙터 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, NTS, SSM 및 유지 서열 중 하나 이상(예를 들어, 2개, 3개, 또는 4개)을 포함하는 ssDNA를 제공하거나 생성하는 단계, 및 (c) 선택적으로, ssDNA를 원형화하는 단계를 포함한다.

[0040] 일 구현예에서, 상기 방법은 ssDNA를 원형화하는 단계(예를 들어, 말단부들을 라이게이션하는 단계)를 포함한다.

[0041] 구현예에서, ssDNA는 본 명세서에 기재된, 예를 들어 상기 임의의 구현예에 기재된 임의의 ssDNA이다.

[0042] 일 구현예에서, 단계 (a)는 언급된 서열 요소들의 Golden Gate Assembly를 수행하는 단계를 포함한다.

[0043] 일 구현예에서, 상기 방법은 (d) 단계 (b)에서 제조된 ssDNA, 또는 단계 (c)에서 제조된 원형화된, 예를 들어 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA를 농축 또는 정제하는 단계를 추가로 포함한다.

[0044] 일 구현예에서, 단계 (d)는 내독소, 모노뉴클레오티드, 변형된 모노뉴클레오티드, 이중 가닥 DNA, DNA 단편 또는 절단체, 및 단백질(예를 들어, 효소, 예를 들어 리가제, 제한 효소)로부터 선택되는 하나 이상의 불순물을 ssDNA로부터 실질적으로 제거하는 단계를 포함한다. 원형, 예를 들어 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA의 경우에, 선형 DNA는 제거된다.

[0045] 일 구현예에서, 상기 방법은 약제학적 용도를 위해 단계 (d)의 농축 또는 정제된 ssDNA 또는 원형화된 ssDNA를 제형화하는 단계, 예를 들어, 약제학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 담체, 예를 들어 LNP를 사용하여, 농축 또는 정제된 ssDNA 또는 원형화된, 예를 들어 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA를 제형화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0046] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 이펙터 서열, 및 하기 요소들, 즉 프로모터, NTS, SSM, 및 유지 서열 중 1개, 2개, 3개, 또는 4개를 포함하는 플라스미드를 특징으로 한다.

[0047] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)을 제공하며, 상기 조성물은, 이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하며, 하기 중 하나 이상에 해당한다: a) 조성물 내의 총 DNA의 질량 기준으로 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%, 또는 99%는 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA임; b) 조성물 내의 총 DNA의 질량 기준으로 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98%, 또는 99%는 전장(full length)임; c) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 이중 가닥 DNA(dsDNA)임; d) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 선형 DNA임; 또는 e) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 선형 ssDNA임.

[0048] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)을 제공하며, 상기 조성물은 이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하며, 하기 중 하나 이상에 해당한다: a) 조성물에는 클로로포름이 실질적으로 없으며, 예를 들어 클로로포름이 없음; b) 조성물에는 페놀이 실질적으로 없으며, 예를 들어 페놀이 없음; c) 조성물에는 페놀 및 클로로포름이 실질적으로 없으며, 예를 들어 페놀 및 클로로포름이 없음; d) 조성물에는 유기 용매가 실질적으로 없으며, 예를 들어 유기 용매가 없음; 또는 e) 조성물에는 방향족 유기 용매가 실질적으로 없으며, 예를 들어 방향족 유기 용매가 없음.

[0049] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)을 제공하며, 상기 조성물은 이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하며, 여기서 ssDNA는 페놀-클로로포름 추출 단계를 포함하지 않는 방법에 의해 생성되었다.

[0050] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)을 제공하며, 상기 조성물은 이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 포함하며, 하기 중 하나 이상에 해당한다: a) 조성물에는 엑소뉴클레아제 III이 실질적으로 없음(예를 들어, 엑소뉴클레아제 III이 없음); b) 조성물에는 T7 엑소뉴클레아제가 실질적으로 없음(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제가 없음); 또는 c) 조성물에는 T5 엑소뉴클레아제가 실질적으로 없음(예를 들어, T5 엑소뉴클레아제가 없음).

[0051] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 이펙터 서열을 포함하는, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 mg 포함하는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)을 제공한다.

[0052] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물 또는 제조 중간체)을 제공하며, 상기 조성물은 이펙터 서열을 포함하고 적어도 하나의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 원형 이중 가닥 DNA, 및 Nb.BsrDI 또는 Nt.BspQI를 포함한다.

[0053] 일부 구현예에서, ssDNA는 담체 내에 배치되지 않는다. 일부 구현예에서, 조성물은 담체를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 담체는 지질계 담체이다. 일부 구현예에서, 지질계 담체는 지질 나노입자(LNP)이다. 일부 구현예에서, 조성물은 네이키드 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 조성물은 비경구 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 조성물은 국소 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 조성물에는 내독소, 모노뉴클레오티드, 변형된 모노뉴클레오티드, 이중 가닥 DNA, DNA 단편 또는 절단체, 단백질(예를 들어, 효소, 예를 들어 리가제, 제한 효소)로 구성되는 군으로부터 선택되는 불순물 또는 부산물이 실질적으로 없다.

[0054] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 원형 ssDNA의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 a) 원형 dsDNA를 제공하는(예를 들어, 생성하거나 수득하는) 단계로서, 원형 dsDNA는 i) 플라스미드 백본이 결여되어 있고/있거나; ii) 세균 복제 기점이 결여되어 있고/있거나; iii) 선택가능한 마커, 예를 들어 항생제 저항성 마커가 결여되어 있고/있거나; iv) 화학적 변형, 예를 들어 당에 대한 화학적 변형, 염기에 대한 화학적 변형, 또는 핵산 백본에 대한 화학적 변형을 포함하는, 단계; b) 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성(discontinuity)을 도입하여(예를 들어, 닉킹 엔도뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 닉킹 엔도뉴클레아제(예를 들어, Nb.BsrDI 또는 Nb.Bpu10I 또는 Nt.BspQI)와 접촉시켜), 불연속성을 갖는 dsDNA를 생성하는 단계; c) 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 불연속성을 갖는 dsDNA를 엑소뉴클레아제(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제 III)와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이에 의해 원형 ssDNA를 제조한다.

[0055] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 원형 ssDNA의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 a) 원형 dsDNA를 제공하는(예를 들어, 생성하거나 수득하는) 단계; b) 닉킹 엔도뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 Nb.BsrDI 또는 Nt.BspQI로부터 선택되는 닉킹 엔도뉴클레아제와 접촉시켜, 닉킹된 dsDNA를 생성하는 단계; c) 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 닉킹된 dsDNA를 엑소뉴클레아제(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제 III)와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이에 의해 원형 ssDNA를 제조한다.

[0056] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 원형 ssDNA의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 a) 원형 dsDNA를 제공하는(예를 들어, 생성하거나 수득하는) 단계; b) 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성을 도입하여(예를 들어, 닉킹 엔도

뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 닉킹 엔도뉴클레아제(예를 들어, Nb.BsrDI 또는 Nb.Bpu10I 또는 Nt.BspQI)와 접촉시켜), 불연속성을 갖는 닉킹된 dsDNA를 생성하는 단계; c) 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 닉킹된 dsDNA를 T7 엑소뉴클레아제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이에 의해 원형 ssDNA를 제조한다.

[0057] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 원형 ssDNA의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 a) 원형 dsDNA를 제공하는(예를 들어, 생성하거나 수득하는) 단계; b) 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성을 도입하여(예를 들어, 닉킹 엔도뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 닉킹 엔도뉴클레아제(예를 들어, Nb.BsrDI 또는 Nb.Bpu10I 또는 Nt.BspQI)와 접촉시켜), 불연속성을 갖는 닉킹된 dsDNA를 생성하는 단계; c) 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 닉킹된 dsDNA를 엑소뉴클레아제(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제 III)와 접촉시켜, 원형 ssDNA를 제조하는 단계; 및 d) 원형 ssDNA에 대해 겔 정제를 수행하는 단계를 포함한다.

[0058] 일부 구현예에서, 원형 dsDNA는 i) 플라스미드 백본이 결여되어 있고/있거나; ii) 세균 복제 기점이 결여되어 있고/있거나; iii) 선택가능한 마커, 예를 들어 항생제 저항성 마커가 결여되어 있고/있거나; iv) 화학적 변형, 예를 들어 당에 대한 화학적 변형, 염기에 대한 화학적 변형, 또는 핵산 백본에 대한 화학적 변형을 포함한다.

[0059] 일부 구현예에서, 상기 방법은 닉킹 엔도뉴클레아제가 dsDNA 내의 부위를 닉킹할 수 있게 하는 조건 하에서, 원형 dsDNA를 dsDNA 내의 닉킹 인식 부위를 인식하는 Nb.BsrDI 또는 Nt.BspQI로부터 선택되는 닉킹 엔도뉴클레아제와 접촉시켜, 닉킹된 dsDNA를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 닉킹된 가닥의 분해(예를 들어, 완전 분해)를 가능하게 하는 조건 하에서, 닉킹된 dsDNA를 T7 엑소뉴클레아제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 원형 ssDNA에 대해 겔 정제를 수행하는 단계를 포함한다.

[0060] 일부 구현예에서, 상기 방법은 원형 dsDNA를 생성하는 단계를 포함하며, 여기서 원형 dsDNA를 생성하는 단계는 하기 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4개, 또는 전부)을 포함한다: (i) 이펙터 서열을 포함하는 핵산(예를 들어, 플라스미드)을 제공하는 단계; (ii) 이펙터 서열을 포함하는 핵산(예를 들어, 플라스미드)의 영역을 증폭시키기 위해 PCR을 수행하는 단계로서, PCR을 수행하는 단계는 플라스미드를 제1 엔도뉴클레아제 인식 부위를 포함하는 제1 프라이머 및 제2 엔도뉴클레아제 인식 부위 및 닉킹 인식 부위를 포함하는 제2 프라이머와 접촉시키되, 제1 프라이머 및 제2 프라이머는 플라스미드 상에서 이펙터 서열을 증폭시키기에 적합한(그리고 선택적으로, 플라스미드의 백본을 증폭시키지 않는) 위치에 위치하는 단계, 및 플라스미드를 DNA-의존성 DNA 중합효소(예를 들어, 고신뢰성 중합효소, 예를 들어 Q5)와 접촉시키는 단계, 및 이펙터 서열을 포함하는 핵산의 영역을 증폭시키기에 충분한 열 사이클링 조건을 적용하여, 선형 dsDNA를 생성하는 단계를 포함하는, 단계; (iii) 선형 dsDNA를 엔도뉴클레아제 인식 부위를 절단하는 엔도뉴클레아제(예를 들어, BsaI, KpnI, 또는 NheI)를 사용하여 분해하여, 분해된 선형 DNA를 생성하는 단계; (iv) (예를 들어, 분해된 선형 dsDNA를 리가제, 예를 들어 T4 리가제와 접촉시킴으로써) 분해된 선형 dsDNA를 원형화하는 단계; 및 (v) 분해된 선형 dsDNA를 포함하는 조성물을 엑소뉴클레아제(예를 들어, T5 엑소뉴클레아제)와 접촉시켜 잔류 선형 DNA를 분해하는 단계.

[0061] 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 정제 단계, 예를 들어 겔 정제, 또는 DNA 정제 컬럼의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 정제 단계는 선형 dsDNA; 분해된 선형 dsDNA; 원형 dsDNA; 또는 원형 ssDNA에 대해 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 유기 추출 단계(예를 들어, 페놀-클로로포름 추출 단계)를 포함하지 않는다.

[0062] 일부 구현예에서, 상기 방법은 닉킹된 dsDNA를 15 내지 120분, 예를 들어 20 내지 60분, 예를 들어 약 30분 동안 엑소뉴클레아제(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제)와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성을 도입하는 단계는 2개의 인접 뉴클레오티드 사이에 닉을 도입하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 원형 dsDNA의 한쪽 가닥에 불연속성을 도입하는 단계는 뉴클레오티드를 제거하는 단계를 포함하며, 예를 들어 뉴클레오티드는 우라실이다.

[0063] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 ssDNA를 포함하는 조성물의 샘플을 평가하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기로부터 선택되는 조건이 만족되는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다: a) 조성물 내의 총 DNA의 질량 기준으로 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 98%, 또는 99%는 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA임; b) 조성물 내의 총 DNA의 질량 기준으로 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 전장임; c) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 이중 가닥 DNA(dsDNA)임; d) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 선형 DNA임; e) 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만은 선형 ssDNA임; f) 조성물에는 클로로포름이 실질적으로 없으며, 예를 들

어 클로로포름이 없음; g) 조성물에는 페놀이 실질적으로 없으며, 예를 들어 페놀이 없음; h) 조성물에는 페놀 및 클로로포름이 실질적으로 없으며, 예를 들어 페놀 및 클로로포름이 없음; i) 조성물에는 유기 용매가 실질적으로 없으며, 예를 들어 유기 용매가 없음; j) 조성물에는 방향족 유기 용매가 실질적으로 없으며, 예를 들어 방향족 유기 용매가 없음; k) 조성물에는 엑소뉴클레아제 III이 실질적으로 없음(예를 들어, 엑소뉴클레아제 III이 없음); l) 조성물에는 T7 엑소뉴클레아제가 실질적으로 없음(예를 들어, T7 엑소뉴클레아제가 없음); 및/또는 m) 조성물에는 T5 엑소뉴클레아제가 실질적으로 없음(예를 들어, T5 엑소뉴클레아제가 없음). 일부 구현예에서, 조건이 만족되는 경우, 상기 방법은 조성물에 대해 하류 처리(downstream processing) 단계를 수행하는 단계를 포함하며, 여기서 선택적으로, 하류 처리 단계는 조성물을 부분으로 분배하는 단계, 조성물을 패키징하는 단계, 조성물을 라벨링하는 단계, 조성물을 운송하는 단계, 조성물을 유통하는 단계, 조성물을 보관하는 단계, 또는 조성물을 시장에 출시하는 단계로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 본 명세서에 개시된 조성물의 샘플을 평가하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 본 명세서에 개시된 방법에 의해 제조된 조성물의 샘플을 평가하는 단계를 포함한다.

[0064] 일부 구현예에서, ssDNA는 화학적 변형, 예를 들어 당에 대한 화학적 변형, 염기에 대한 화학적 변형, 또는 핵산 백본에 대한 화학적 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 박테리오파지 게놈이 아니다. 일부 구현예에서, ssDNA는 박테리오파지 패키징 부위가 결여되어 있다. 일부 구현예에서, ssDNA는박테리오파지 복제 기점이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, ssDNA는 박테리오파지 캡시드 유전자를 인코딩하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 회전환 증폭에 의해 생성되지 않았다. 일부 구현예에서, ssDNA는 가닥 변위 증폭에 의해 생성되지 않았다. 일부 구현예에서, ssDNA는 프로텔로머라제 표적 서열을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 헤어핀 구조를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 제2 서열과 혼성화되는 제1 서열을 포함하지 않으며, 여기서 제1 서열 및 제2 서열은 적어도 5 nt 길이이고, 제1 서열과 제2 서열은 6개 미만의 뉴클레오티드만큼 서로 떨어져서 위치한다. 일부 구현예에서, ssDNA는 이중 가닥 기점(DSO)을 포함하지 않는다.

[0065] 일부 구현예에서, 화학적 변형은 5-포르밀시토신, 포스포로티오에이트, 7-메틸구아닌, 및 5-글루코실메틸시토신으로부터 선택되는 공유결합 변형이다.

[0066] 정의

[0067] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "*항체*"는 특정 항원에 특이적으로 결합하거나 특정 항원과 면역학적으로 반응하는 분자를 지칭하고, 적어도 중쇄의 가변 도메인을 포함하고, 통상적으로 적어도 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 포함한다. 항체 및 항원-결합 단편, 이들의 변이체 또는 유도체에는 다중클론, 단일클론, 다중특이성, 인간, 인간화, 영장류화(primatized), 또는 키메라 항체, 이종접합체 항체(예를 들어, 이중특이성, 삼중특이성 및 사중특이성 항체, 디아바디, 트리아바디, 및 테트라바디), 단일-도메인 항체(sdAb), 에피토프-결합 단편, 예를 들어 Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$, Fd, Fvs, 단일쇄 Fv(scFv), r1gG, 단일쇄 항체, 이황화물-연결된 Fv(sdFv), VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성되는 단편, 및 항-이디오타입(항-Id) 항체가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 본 발명의 항체 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류의 면역글로불린 분자일 수 있다. 더욱이, 달리 나타내지 않는 한, 용어 "단일클론 항체"(mAb)는 온전한 분자, 및 표적 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 단편(예컨대, Fab 및 $F(ab')_2$ 단편) 둘 다를 포함하는 것을 의미한다. Fab 및 $F(ab')_2$ 단편에는 온전한 항체의 Fc 단편이 결여되어 있다.

[0068] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "박테리오파지 패키징 부위"는 비리온 내로 직접 패키징하기에 충분한 박테리오파지 게놈에서의 핵산 서열을 지칭한다. 박테리오파지 패키징 부위는, 예를 들어 박테리오파지 P1, T4, T7, 또는 λ로부터 유래될 수 있다.

[0069] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "*담체*"는 세포 내로 조성물(예를 들어, 본 명세서에 기재된 ssDNA)을 수송 또는 전달하는 것을 용이하게 하거나 촉진시키는 화합물, 조성물, 시약, 또는 분자를 의미한다. 예를 들어, 담체는 부분 또는 완전 캡슐화제일 수 있다.

[0070] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 본 명세서에 기재된 ssDNA와 관련하여 용어 "*원형*"은 자유 말단부가 결여되어 있는 ssDNA를 의미한다. 원형 ssDNA는 공유결합으로 닫혀 있을 수 있거나, 비공유결합 상호작용을 통해 자유 DNA 말단부가 없는 닫힌 구조를 형성할 수 있으며, 예를 들어 ssDNA는 스플린트, 예를 들어 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA) 스플린트를 통해, 선형 ssDNA의 양쪽 말단부에 결합하여 이들을 합치는 단백질과 같은 모이어티를 통해, 또는 복수의 단백질들의 결합을 통해 닫힐 수 있으며, 이때 복수의 단백질들 중 2개의 단백질 각각은

상이한 ssDNA 말단부에 결합하고, 이어서 서로 또는 제3 모이어티에 결합하여 DNA 구조를 닫는다. 용어 '원형'은 임의의 분자내 구조가 결여되어 있는 원형 물리적 구성 또는 ssDNA 구조를 의미하지 않으며; 원형 ssDNA는 분자내 이중 가닥 영역 또는 기타 구조의 영역을 가질 수 있다.

[0071] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, ssDNA와 관련하여 용어 "*공유결합으로 닫혀 있는*"은 ssDNA가 자유 5' 또는 3' 말단부가 결여되어 있는 연속 가닥임을 의미한다.

[0072] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "엑소뉴클레아제 III"은 E. 콜리(*E. coli*) 게놈에 의해 인코딩되는 단백질 엑소뉴클레아제 III, 또는 이의 단편 또는 변이체를 지칭하며, 이는 예를 들어 DNA에서의 말단 또는 닉에서, DNA의 3' 말단부로부터 뉴클레오티드를 제거하는 것을 촉매한다. 일부 구현예에서, 엑소뉴클레아제 III은 NCBI 참조 서열 NP_416263.1(이는 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨)에 따른 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0073] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "T5 엑소뉴클레아제"는 T5 박테리오파지의 D15 유전자에 의해 인코딩되는 단백질, 또는 이의 단편 또는 변이체를 지칭하며, 이는 예를 들어 DNA에서의 말단 또는 닉에서, DNA의 5' 말단부로부터 뉴클레오티드를 제거하는 것을 촉매한다. 일부 구현예에서, T5 엑소뉴클레아제는 NCBI 참조 서열 YP_006958.1에 따른 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0074] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "T7 엑소뉴클레아제"는 T7 박테리오파지의 유전자 6에 의해 인코딩되는 단백질, 또는 이의 단편 또는 변이체를 지칭하며, 이는 예를 들어 DNA에서의 말단 또는 닉에서, DNA의 5' 말단부로부터 뉴클레오티드를 제거하는 것을 촉매한다. 일부 구현예에서, T7 엑소뉴클레아제는 NCBI 참조 서열 NP_041988.1에 따른 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 갖는다.

[0075] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "*이종*"은, 제2 요소와 관련하여 제1 요소를 설명하는 데 사용될 때, 설명된 바와 같이 배치된 제1 요소와 제2 요소가 자연에 존재하지 않는다는 것을 의미한다. 예를 들어, 이종 폴리펩티드, 핵산 분자, 작제물 또는 서열은 (a) 발현시키는 세포에 대해 천연이 아닌 폴리펩티드, 핵산 분자, 또는 폴리펩티드 또는 핵산 분자 서열의 부분, (b) 천연 상태에 대해 변경 또는 돌연변이된 폴리펩티드, 핵산 분자, 또는 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 부분, 또는 (c) 유사한 조건 하에서 천연 발현 수준과 비교하여 변경된 발현을 갖는 폴리펩티드 또는 핵산 분자를 지칭한다. 예를 들어, 자연에서 통상적으로 발현되는 유전자 또는 핵산 분자와 상이한 방식으로 유전자 또는 핵산 분자의 발현을 조절하기 위해 이종 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서)이 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, 폴리펩티드 또는 핵산 서열의 이종 도메인(예를 들어, 폴리펩티드의 DNA 결합 도메인, 또는 폴리펩티드의 DNA 결합 도메인을 인코딩하는 핵산)은 다른 도메인에 대해 배치될 수 있거나, 또는 폴리펩티드 또는 이를 인코딩하는 핵산의 다른 도메인 또는 부분에 대해 상이한 서열이거나 상이한 공급원으로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 이종 핵산 분자는 천연 숙주 세포 게놈에 존재할 수 있지만, 발현 수준이 변경되거나 서열이 다르거나, 또는 둘 다일 수 있다. 다른 구현예에서, 이종 핵산 분자는 숙주 세포 또는 숙주 게놈에 대해 내인성일 수 있지만, 대신에 형질전환(예를 들어, 형질감염, 전기천공)에 의해 숙주 세포 내로 도입되었을 수 있으며, 여기서 첨가된 분자는 숙주 게놈 내로 통합될 수 있거나, 일시적으로(예를 들어, mRNA) 또는 하나 초과의 세대 동안 준안정적으로(예를 들어, 에피솜 바이러스 벡터, 플라스미드 또는 다른 자가-복제 벡터) 염색체외 유전 물질로서 존재할 수 있다.

[0076] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "증가하는" 및 "감소하는"은 참조에 비해 측정기준(metric)의 기능, 발현, 또는 활성의 양을 각각 더 많게 또는 더 적게 조절하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 방법에서 ssDNA를 투여한 후, 본 명세서에 기재된 측정기준(예를 들어, 유전자 발현의 수준, 또는 선천 면역의 마커)의 양은 투여 전 마커의 양에 비해, 또는 비변형된 sDNA과 비교하여 변형된 ssDNA와 같은 대조 ssDNA의 투여에 비해, 대상체에서 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 또는 그 이상만큼 증가되거나 감소될 수 있다. 일반적으로, 측정기준은 투여 후, 투여가 상기 언급된 효과를 가진 시점, 예를 들어 치료 요법(treatment regimen)이 시작된 후 적어도 1일, 1주, 1개월, 3개월, 또는 6개월이 경과한 시점에 측정된다.

[0077] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "*분자내 상보성*"은 단일 DNA 가닥 내의 2개의 영역이 상보성 염기쌍을 통해 혼성화되고/되거나 이중 가닥 구조를 형성하는 능력을 지칭한다. 자가-상보성인 서열의 부분이 얼마나 가까이 있는지에 따라, ssDNA는, 예를 들어 헤어핀 루프, 접합부, 돌출부(bulge) 또는 내부 루프를 형성할 수 있다.

[0078] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "선형"은 DNA를 설명하는 데 사용될 때, 2개의 자유 말단부를 포함하는 DNA를 의미한다. 선형 DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0079] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "*유지 서열*"은 세포 분열을 통해 핵 내에 DNA 분자의 유지를 가능하게 하거나 용이하게 하는 DNA 서열 또는 모티프이다. 유지 서열은 통상적으로 염색질 루핑을 용이하게 하는 단백질과 상호작용하여 핵 내에서 DNA의 복제 및/또는 전사를 가능하게 한다. 유지 서열의 한 예는 스캐폴드/기질 부착된 영역(S/MAR 요소)이다.

[0080] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "*핵 표적화 서열*"은 DNA가 표적 세포 핵 내로 진입하는 것을 가능하게 하거나 용이하게 하는 DNA 서열이다.

[0081] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "닉킹 인식 부위"는 닉킹 엔도뉴클레아제에 의해 특이적으로 인식되고 닉킹되는 DNA 서열을 지칭한다.

[0082] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "*약제학적 조성물*" 또는 "*약제학적 제제*"는 인간 약제학적 용도, 예를 들어 인간 예방적, 진단적 또는 치료적 용도로 표시된 조성물 또는 제제이다. 약제학적 제제는 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 희석제와 배합하여 대상체의 세포 또는 조직에 대해 생물학적 효과를 갖는, 예를 들어 약리학적 활성, 또는 질병의 완화, 치료, 또는 예방 효과를 갖는 활성제를 포함한다. 약제학적 조성물은 또한 예방용, 진단용 또는 치료용 조성물의 완성된 투여 형태 또는 제형을 의미한다.

[0083] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "*제2 가닥 모티프*" 또는 SSM은 제2 가닥 합성을 촉진시키거나 가능하게 하는 ssDNA 내의 서열 또는 구조 모티프이다. SSM은, 제2 가닥의 DNA 합성을 개시하고/하거나 DNA 중합효소 결합을 위하여 올바른 배향으로 DNA를 배치하는 단백질에 대한 결합 부위(들)를 포함할 수 있다.

[0084] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "*센스 가닥*"인 ssDNA 서열은, 기능성 단백질을 인코딩하고 전사를 위한 주형 역할을 하지 않는 mRNA와 동일한 서열을 갖는 ssDNA이다. "*안티센스 가닥*"인 ssDNA 서열은, 기능성 단백질을 인코딩하고/하거나 전사를 위한 주형 역할을 할 수 있는 mRNA와 상보적인 서열을 갖는다.

[0085] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "*단일 가닥 DNA*" 또는 ssDNA는 데옥시리보뉴클레오티드의 단일쇄로 구성되는 DNA 분자를 의미한다. ssDNA는 접힌 구성에서 분자내/가닥내 이중 가닥 모티프를 형성하는 자가-상보성의 쌍을 이루는 영역을 가질 수 있다. 자가-상보성인 서열의 부분이 얼마나 가까이 있는지에 따라, ssDNA는, 예를 들어 헤어핀 루프, 접합부, 돌출부 또는 내부 루프를 형성할 수 있다.

[0086] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "치료" 및 "치료하는"은 질병, 병리학적 상태, 또는 장애를 개선, 호전, 안정화(즉, 악화되지 않음), 예방 또는 치유하려는 의도로 행하는 대상체의 의료 관리를 지칭한다. 이 용어는 적극적 치료(질병, 병리학적 상태, 또는 장애를 개선하기 위한 치료), 원인 치료(관련 질병, 병리학적 상태, 또는 장애의 원인에 대한 치료), 고통완화 치료(증상의 완화를 위해 설계된 치료), 예방적 치료(관련 질병, 병리학적 상태, 또는 장애의 발생을 최소화하거나 부분적으로 또는 완전히 억제하기 위한 치료); 및 지지 치료(또 다른 치료법을 보충하기 위해 사용되는 치료)를 포함한다. 치료는 또한, 질병 또는 질환의 정도 감소; 질병 또는 질환의 확산 예방; 질병 또는 질환의 진행 지연 또는 둔화; 질병 또는 질환의 개선 또는 완화; 및 검출 가능 여부와 관계 없이 관해(부분적 또는 전체적)를 포함한다. 질병 또는 질환의 "호전" 또는 "완화"는 치료가 없는 경우의 정도 또는 시간 경과와 비교하여, 질병, 장애, 또는 질환의 정도 및/또는 바람직하지 않은 임상 징후가 감소되고/되거나 진행의 시간 경과가 느려지거나 길어지는 것을 의미한다. "치료"는 또한 치료를 받고 있지 않을 경우 예상되는 생존과 비교하여 생존 기간이 연장되는 것을 의미할 수 있다. 치료가 필요한 이들에는 이미 질환 또는 장애를 앓고 있는 이들뿐 아니라 질환 또는 장애에 걸리기 쉬운 이들 또는 해당 질환 또는 장애를 예방해야 하는 이들이 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0087] 도 1은 본 명세서에 기재된 예시적인 ssDNA의 설계를 나타내는 한 세트의 다이어그램이다. 도 1a는 EF1a 프로모터에 작동가능하게 연결된 복수의 이펙터 DNA 서열 유형들(이 경우, miRNA 및 모델 단백질(mCherry))을 포함하는 ssDNA 작제물을 나타낸다. 도 1b는 프로모터, 및 폴리펩티드 이펙터를 인코딩하는 서열(이 경우, 모델 단백질 mCherry)을 포함하는 ssDNA 작제물을 나타낸다. 도 1c는 핵 표적화 서열, 프로모터, 및 RNA 이펙터를 인코딩하는 서열을 포함하는 ssDNA 작제물을 나타낸다. 도 1d는 프로모터, 폴리펩티드를 인코딩하는 서열, 및 제2 가닥 모티프를 포함하는 ssDNA 작제물을 나타낸다. 도 1e는 핵 표적화 서열, 폴리펩티드를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, 유지 서열, 및 제2 가닥 모티프를 포함하는 ssDNA 작제물을 나타낸다.

도 2는 본 명세서에 기재된 원형 ssDNA의 예시적인 생산 공정의 개략도이다.

도 3 내지 도 8은 블랭크 웰(도 3) 및 CONSTRUCT029 원형 ssDNA(도 4), CONSTRUCT029 원형 dsDNA(도 5), CONSTRUCT001 원형 dsDNA(도 6)의 제제, CONSTRUCT001 원형 ssDNA 제제 #1(도 7), 및 CONSTRUCT001 원형 ssDNA 제제 #2(도 8)에 대해 단편 분석기(Fragment Analyzer)를 사용하여 획득된 한 세트의 트레이스이다. LM: 하한 마커, UM: 상한 마커.

도 9는 1 ng의 CONSTRUCT001 원형 ssDNA당 7.8 pg의 CONSTRUCT001 원형 dsDNA가 스파이킹되었을 때 획득된 트레이스이다. 원형 dsDNA에 상응하는 피크는 화살표로 표시되어 있다.

도 10a 및 도 10b는 한 세트의 DNA 겔 전기영동 이미지를 나타낸다. 도 10a는 DNA 래더(ladder)(레인 1) 및 닉킹된 DNA(레인 2)를 갖는 DNA 겔의 이미지이다. 닉킹된 DNA 작제물의 크기는 화살표로 표시되어 있다. 도 10b는 DNA 래더(레인 1), 및 25℃에서 16시간(레인 2), 1시간(레인 3), 및 30분(레인 4) 동안 T7 엑소뉴클레아제와 인큐베이션된 닉킹된 DNA가 있는 DNA 겔의 이미지이다. ssDNA 작제물의 크기는 화살표로 표시되어 있다.

도 11은 엑소뉴클레아제 I의 부재(-) 및 존재(+) 하에서 인큐베이션된 원형 ssDNA 및 선형 ssDNA를 나타낸 DNA 겔 전기영동 이미지이다. 원형 ssDNA 제제는 엑소뉴클레아제 I에 의한 분해에 대해 저항성을 나타낸 한편, 선형 ssDNA는 엑소뉴클레아제 I의 존재 하에서 분해되었다.

도 12a 내지 도 12d는 HEK293(도 12a), HepG2(도 12b), U2OS(도 12c), 및 HEKa 세포(도 12d)에서의 원형 ssDNA 작제물의 발현을 나타내는 일련의 그래프이다. 원형 ssDNA 작제물의 세부사항은 표 5에서 확인할 수 있다. x-축은 리포터(mCherry)-양성 세포의 비율을 나타내고, y-축은 CONSTRUCT001 플라스미드의 발현에 대해 정규화된, 세포의 형광 강도를 나타낸다. "C1"은 CONSTRUCT001에 상응하고, "C2"는 CONSTRUCT002에 상응하는 등이다.

도 13a 및 도 13b는 CONSTRUCT001에 의한 리포펙션 후에 mCherry를 발현하는 HEKa 세포의 백분율을 나타내는 일련의 그래프이다. CONSTRUCT001을 원형 ssDNA 및 원형 dsDNA로서 생성하였으며, ssDNA 또는 dsDNA의 상대 몰농도가 나타나 있다(예를 들어, 1x, 2x, 또는 4x). 도 13a는 리포펙션 후 3일째에 mCherry를 발현하는 HEKa 세포의 백분율을 나타내고, 도 13b는 형질감염 후 6시간, 1일, 및 3일 경과 시의 $mCherry^{+}$ 세포의 평균 백분율을 나타낸다.

도 14a 내지 도 14e는 CONSTRUCT001에 의한 리포펙션 후 HEKa 세포에서의 IFNβ(도 14a), IL-6(도 14b), CXCL10(도 14c), TNFα(도 14d), 및 IL1B(도 14e)의 mRNA 수준을 나타내는 일련의 그래프이다. CONSTRUCT001을 원형 ssDNA 및 원형 dsDNA로서 생성하였으며, ssDNA 또는 dsDNA의 상대 몰농도가 나타나 있다(예를 들어, 1x, 2x, 또는 4x). mRNA 수준을 Lipofectamine-단독 대조군에 대해 정규화하였으며, GAPDH 대비 mRNA 수준이 나타나 있다.

도 15는 다음 2가지 형태의 CONSTRUCT001에 의한 형질감염 후 $mCherry^{+}$ 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다: 비변형된 단일 가닥 원형 DNA, 및 m6A(N^{6}-메틸아데노신) DNA 변형을 갖는 단일 가닥 DNA.

도 16a 내지 도 16d는 CONSTRUCT001의 원형 단일 가닥 DNA 형태의 2차 구조 예측을 나타낸다. CONSTRUCT001은 하기 서열을 갖는다:

ccttcgagaccggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacgggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcaggtgtcgtgaggatccgccaccatggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgccccctacgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggtggcccccctgcccttcgcctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaagg

cctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtgg
tgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaaga
agaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggccact
acgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgagg
actacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgccactccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaagtttaaacccgctgatcagcctcga
ctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgagg
aaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctg
gggatgcggtgggctctatggctgcaatggctcttcatctgaggtctcg(서열번호 55).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 본 개시 내용은 이펙터, 예를 들어 치료용 이펙터를, 예를 들어 생체내(*in vivo*) 또는 시험관내(*in vitro*)에서, 세포, 조직 또는 대상체에게 제공하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 이펙터는 DNA 서열, 폴리펩티드, 예를 들어 치료용 단백질; 또는 RNA, 예를 들어 조절 RNA 또는 mRNA일 수 있다.

[0089] DNA 작제물의 요소

[0090] 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물은 이펙터 서열을 표적 세포, 조직 또는 대상체에게 전달하기에 충분한 요소들을 함유한다. 일부 구현예에서, 이펙터 서열은 DNA 서열이다. 일부 구현예에서, ssDNA는 이펙터의 발현을 구동시키며, 예를 들어 프로모터, 및 RNA 또는 폴리펩티드, 예를 들어 치료용 RNA 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 DNA 작제물은 핵 표적화 서열, 유지 서열, 및 제2 가닥 모티프 중 하나 이상을 추가로 함유한다.

[0091] *프로모터*

[0092] 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물은 이펙터 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터(전사를 개시하기 위해, RNA 중합효소 및 전사 인자가 직접 또는 간접적으로 결합하는 DNA 서열)를 함유할 수 있다. 프로모터는 이펙터 서열에 작동가능하게 연결된 상태로 천연에서 발견될 수 있거나, 이펙터 서열에 대해 이종일 수 있다. 본 명세서에 기재된 프로모터는 표적 세포 또는 조직에 대해 천연일 수 있거나, 표적 세포 또는 조직에 대해 이종일 수 있다. 프로모터는 구성적, 유도성 및/또는 조직-특이적일 수 있다.

[0093] 구성적 프로모터의 예에는 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터(선택적으로, RSV 인핸서를 가짐), 거대세포바이러스(CMV) 프로모터(선택적으로, CMV 인핸서를 가짐)(예를 들어, 문헌[Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)] 참조), SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제(PGK) 프로모터, 및 EF1알파 프로모터가 포함된다.

[0094] 유도성 프로모터는 발현의 조절을 가능하게 하며, 외인적으로 공급된 화합물, 환경적 인자, 예컨대 온도, 또는 특정 생리학적 상태, 예를 들어 급성 기(acute phase), 세포의 특정 분화 상태의 존재에 의해 조절될 수 있거나, 단지 세포를 복제할 때 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 다양한 공급원으로부터 이용가능하다. 외인적으로 공급되는 프로모터에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예에는 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터, 덱사메타손(Dex)-유도성 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 중합효소 프로모터 시스템(WO 98/10088); 엑디손 곤충 프로모터(No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), 테트라사이클린-억제성 시스템(Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), 테트라사이클린-유도성 시스템(문헌[Gossen et al., Science, 268:1766-1769 (1995)], 또한, 문헌[Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)] 참조), RU486-유도성 시스템(문헌[Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997)] 및 문헌[Wang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997)]) 및 라파마이신-유도성 시스템(Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997))이 포함된다.

[0095] 일부 구현예에서, 이펙터를 인코딩하는 서열에 대한 천연 프로모터가 사용될 수 있다. 다른 천연 발현 제어 요소, 예컨대 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 코작(Kozak) 컨센서스 서열이 또한 사용될 수 있다.

[0096] 일부 구현예에서, 조절 서열은 조직-특이적 유전자 발현 능력을 부여한다. 일부 경우에, 조직-특이적 조절 서열은 조직 특이적 방식으로 전사를 유도하는 조직-특이적 전사 인자에 결합한다. 이러한 조직-특이적 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서 등)은 당업계에 알려져 있다. 예시적인 조직-특이적 조절 서열은 하기 조직-특이적 프로모터를 포함하지만 이로 한정되지 않는다: 간-특이적 티록신 결합 글로불린(TBG) 프로모터, 인슐린 프로모터, 글루카곤 프로모터, 소마토스타틴 프로모터, 췌장 폴리펩티드(PPY) 프로모터, 시냅신-1(Syn) 프로모터,

크레아틴 키나제(MCK) 프로모터, 포유류 데스민(DES) 프로모터, 알파-미오신 중쇄(a-MHC) 프로모터, 또는 심장 트로포닌 T(cTnT) 프로모터. 다른 예시적인 프로모터는 당업자에게 잘 알려져 있을 것들 중에서 특히, 베타-액틴 프로모터, B형 간염 바이러스 코어 프로모터(Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996)); 알파-페토단백질(AFP) 프로모터(Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)), 골 오스테오칼신 프로모터(Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); 골 시알로단백질 프로모터(Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), CD2 프로모터(Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998)); 면역글로불린 중쇄 프로모터; T 세포 수용체알파.-사슬 프로모터, 뉴런성(neuronal), 예컨대 뉴런-특이적 에놀라제(NSE) 프로모터(Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), 신경필라멘트 경쇄 유전자 프로모터(Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)), 및 뉴런-특이적 vgf 유전자 프로모터(Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995))를 포함한다.

[0097] 조직/세포 특이적 프로모터의 예가 표 1에 열거되어 있다:

표 1

[0098] 조직 또는 세포 특이적 프로모터

조직/세포	프로모터	수탁 번호; 인간 게놈 좌표 (hg38)
골격근	ACTA1	NM_001100; chr1:229,439,090-229,432,090
흑색종	TYR	NM_000372; chr11:89,300,750-89,293,750
간암종	a-페토단백질	NM_001354717; chr4:73,461,175-73,454,175
유선 암종	뮤신 1	NM_001371720; chr1:155,197,900-155,190,900
전립선암	KLK3	NM_001648; chr19: 50,865,760-50,858,760
뉴런 세포	ENO2	NM_001975; chr12:6,928,700-6,921,700
저산소증에 대한 반응	HIF-1알파	NM_001530; chr14:61,753,200-61,746,200
망막아세포종	E2F1	NM_005225; chr20: 33,691,380-33,684,380
이온화 방사선	EGR-1	NM_001964; chr5:138,474,303-138,467,303
종양유전자	ErbB2	NM_004448; chr17:39,735,530-39,728,530
내피 세포	vWF	NM_000552; chr12:6,129,670-6,122,670
내피 세포	FLT-1	NM_002019; chr13:28,500,100-28,493,100
내피 세포	ICAM-2	NM_001099786; chr17:64,025,630-64,018,630
망막 색소 상피	VMD2	NM_004183; chr11:61,972,630-61,965,630
간상 세포	RHO	NM_000539; chr3:129,540,350-129,533,350
원추 세포	적색/녹색 옵신 (OPN1LW)	NM_020061; chrX:154,164,030-154,157,030
신경절 세포	흉선세포 항원 (Thy1)	NM_006288; chr11:119,428,150-119,421,150
T 세포	TIM3	NM_032782; chr5:157,114,050-157,107,050
T 세포	FOXP3	NM_014009; chrX:49,269,700-49,262,700
PBMC	Vβ6.7	ENST00000390373.2; chr7:142,493,295-142,486,295
세포 주기	Cdk1	NM_001786; chr10:60,799,850-60,792,850

[0099] *이펙터 서열*

[0100] 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물의 이펙터 서열은, 예를 들어 기능성 DNA 서열, 예를 들어 치료적 기능성 DNA 서열; 치료용 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 DNA 서열; 치료용 RNA(예를 들어, 비-코딩 RNA)를 인코딩하는 DNA 서열; 또는 게놈 조작을 위한 DNA 주형(예를 들어, 유전자 에디터, 염기 에디터, 프라임 에디터, 유전자 라이터, 이동성 유전 요소 단백질과 조합하여 사용됨)일 수 있다.

[0101] *DNA 이펙터:*

[0102] 치료적 기능성 DNA 서열은 기능성 구조를 형성하는 DNA 서열, 예를 들어 DNA 압타머, DNA효소 또는 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오티드(DNA ASO)를 포함하는 DNA 서열일 수 있다. 치료적 기능성 DNA 서열은 작동가능하게 연결된 프로모터를 갖지 않을 수 있다. 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 또는 서열은 하나 또는 복수의 기능성 DNA 서열들, 예를 들어 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 그 이상의 서열을 포함할 수 있으며, 이들은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0103] *폴리펩티드 이펙터:*

[0104] 치료용 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA 서열은 펩티드, 단백질, 또는 이들의 조합인 하나 이상의 이펙터를 인코딩하는 DNA 서열일 수 있다. 예를 들어, DNA 서열은 mRNA를 인코딩한다. 펩티드 또는 단백질은 전사 인자; 염색질 리모델링 인자; 항원; 호르몬; 효소(예컨대, 뉴클레아제, 예를 들어 엔도뉴클레아제, 예를 들어 CRISPR 시스템의 뉴클레아제 요소, 예를 들어 Cas9, dCas9, aCas9-닉카제, Cpf/Cas12a); Crispr-연결된 효소, 예를 들어 염기 에디터 또는 프라임 에디터; 이동성 유전 요소 단백질(예를 들어, 트랜스포사제, 레트로트랜스포사제, 재조합효소, 인테그라제); 유전자 라이터; 중합효소; 메틸화효소; 탈메틸화효소; 아세틸화효소; 탈아세틸화효소; 키나제; 포스파타제; 리가제; 데유비퀴티나제; 인테그라제; 재조합효소; 토포이소머라제; 자이라제; 헬리카제; 리소좀산 하이드롤라제; 항체; 수용체 리간드; 수용체; 응혈 인자; 막 단백질; 미토콘드리아 단백질; 핵 단백질; 항체 또는 다른 단백질 스캐폴드 바인더, 예컨대 센티린, 다르핀, 또는 애드넥틴일 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Gebauer & Skerra. 2020. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 60:1, 391-415]을 참조한다.

[0105] 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 또는 서열은 폴리펩티드를 인코딩하는 하나 또는 복수의 서열들, 예를 들어 폴리펩티드를 인코딩하는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 그 이상의 서열을 포함할 수 있다. 복수의 서열 각각은 동일하거나 상이한 단백질을 인코딩할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 또는 서열은 생물학적 경로로 다수의 단백질, 예를 들어 복수의 단백질을 인코딩하는 다수의 서열들을 포함할 수 있다.

[0106] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 또는 서열은 자가-절단 펩티드, 예를 들어 P2A, T2A, E2A 또는 F2A에 의해 분리된, 폴리펩티드를 인코딩하는 복수의 서열들, 예를 들어 폴리펩티드를 인코딩하는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 그 이상의 서열을 포함할 수 있다. 자가-절단 펩티드는 18 내지 22개의 아미노산 길이이며, 단백질 번역 동안 리보솜 스킵핑을 유도하여, 2개의 폴리펩티드가 동일한 전사체에서 인코딩될 수 있다. 각각의 폴리펩티드는 동일하거나 상이한 단백질을 인코딩할 수 있다. 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 또는 서열은 프로모터에 이어서, 관심 제1 폴리펩티드를 인코딩하는 서열, 2A 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 서열, 관심 제2 폴리펩티드를 인코딩하는 서열, 및 폴리A 테일을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 또는 서열은 프로모터에 이어서, 관심 제1 폴리펩티드를 인코딩하는 서열, 제1 2A 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 서열, 관심 제2 폴리펩티드를 인코딩하는 서열, 제2 2A 자가-절단 펩티드를 인코딩하는 서열, 관심 제3 폴리펩티드를 인코딩하는 서열, 및 폴리A 테일을 포함할 수 있다.

[0107] *RNA 이펙터:*

[0108] 이펙터 서열은 비-코딩 RNA, 예를 들어 짧은 간섭 RNA(siRNA), 마이크로RNA(miRNA), 긴 비-코딩 RNA, 피위-상호작용(piwi-interacting) RNA(piRNA), 짧은 핵소체 RNA(snoRNA), 짧은 카잘체(Cajal body)-특이적 RNA(scaRNA), 운반 RNA(tRNA), 리보솜 RNA(rRNA), RNA 압타머, 및 짧은 핵 RNA(snRNA) 중 하나 이상을 인코딩하는 DNA 서열일 수 있다.

[0109] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 조절 RNA, 예를 들어 내인성 유전자 및/또는 외인성 유전자의 발현을 변형시키는 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 발현 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 tRNA, lncRNA, miRNA, rRNA, snRNA, microRNA, siRNA, piRNA, snoRNA, snRNA, exRNA, scaRNA, Y RNA, 및 hnRNA와 같은 그러나 이로 한정되지 않는 비-코딩 RNA와 같은 조절 핵산에 대해 안티센스인 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 조절 핵산은 숙주 유전자를 표적화한다. 조절 핵산은 내인성 유전자에 혼성화되는 핵산, 예를 들어 안티센스 RNA, 가이드 RNA, 외인성 핵산에 혼성화되는 핵산, 예컨대 바이러스 DNA 또는 RNA, RNA에 혼성화되는 핵산, 유전자 전사를 방해하는 핵산, RNA 번역을 방해하는 핵산, RNA를 안정화하거나 RNA를 불안정화하는 핵산(예컨대, 분해를 위한 표적화를 통해), 및 DNA 또는 RNA 결합 인자를 조절하는 핵산을 포함할 수 있지만 이로 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 서열은 miRNA이다. 일부 구현예에서, 조절 핵산은 숙주 유전자의 센스 가닥을 표적화한다. 일부 구현예에서, 조절 핵산은 숙주 유전자의

안티센스 가닥을 표적화한다.

[0110] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 가이드 RNA를 인코딩한다. 가이드 RNA 서열은 일반적으로, 15 내지 30개의 뉴클레오티드(예를 들어, 17, 19, 20, 21, 24개의 뉴클레오티드) 길이를 갖고 표적화된 핵산 서열에 상보적이 되도록 설계된다. 효과적인 가이드 RNA의 설계에 사용하기 위한 맞춤형 gRNA 생성기 및 알고리즘이 구매 가능하다. 유전자 편집은 또한 자연 발생 crRNA-tracrRNA 복합체를 모방하고, (뉴클레아제에 결합하기 위한) tracrRNA 및 (뉴클레아제를 편집을 위하여 표적화된 서열로 가이드하기 위한) 적어도 하나의 crRNA 둘 다를 함유하는 조작된(합성) 단일 RNA 분자인 키메라 "단일 가이드 RNA"("sgRNA")를 사용하여 달성되었다. 화학적으로 변형된 sgRNA가 또한 게놈 편집에 효과적인 것으로 입증되어 있으며; 예를 들어, 문헌[Hendel et al. (2015) Nature Biotechnol., 985-991]을 참조한다. gRNA는 특이적 DNA 서열(예를 들어, 유전자의 프로모터, 인핸서, 사일런서, 또는 리프레서에 인접하거나 그 안에 있는 서열)을 인식할 수 있다. 일 구현예에서, gRNA는 유전자 편집을 위한 CRISPR 시스템의 일부로서 사용된다. 유전자 편집을 목적으로, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 원하는 표적 DNA 서열에 상응하는 가이드 RNA 서열을 인코딩하는 하나 또는 다수의 서열을 포함하도록 설계될 수 있으며, 예를 들어 문헌[Cong et al. (2013) Science, 339:819-823; Ran et al. (2013) Nature Protocols, 8:2281-2308]을 참조한다.

[0111] 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 RNA 간섭(RNAi)의 생물학적 프로세스를 통해 유전자 발현을 억제할 수 있는 특정 조절 핵산을 인코딩할 수 있다. RNAi 분자는, 통상적으로 15 내지 50개의 염기쌍(예컨대, 약 18 내지 25개의 염기쌍)을 함유하고 세포 내에서 발현된 표적 유전자 내의 코딩 서열과 동일하거나(상보적이거나) 거의 동일한(실질적으로 상보적인) 핵염기 서열을 갖는 RNA 또는 RNA-유사 구조를 포함한다. 이러한 RNAi 분자는 짧은 간섭 RNA(siRNA), 이중 가닥 RNA(dsRNA), 마이크로RNA(miRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 메로듀플렉스(meroduplex), 및 다이서 기질(미국 특허 8,084,599 8,349,809 및 8,513,207), RNA 안티센스 올리고뉴클레오티드(RNA ASO)를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0112] 일 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 lncRNA의 센스 가닥을 포함하는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 lncRNA의 안티센스 가닥을 인코딩하는 서열을 포함한다.

[0113] 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 내인성 유전자 또는 유전자 산물(예를 들어, mRNA)의 단편에 실질적으로 상보적이거나 완전히 상보적인 조절 핵산을 인코딩할 수 있다. 조절 핵산은 특정 유전자의 새로 생성된 핵 RNA 전사체가 전사를 위한 mRNA로 성숙되는 것을 방지하기 위해, 인트론과 엑손 사이의 경계에 있거나, 엑손들 사이에 있는, 또는 엑손과 인접한 상보체 서열일 수 있다. 특정 유전자에 상보적인 조절 핵산은 해당 유전자에 대한 mRNA와 혼성화되고 이의 번역을 방지할 수 있다. 안티센스 조절 핵산은 DNA, RNA, 또는 이의 유도체 또는 혼성체일 수 있다. 일부 구현예에서, 조절 핵산은 내인성 유전자 또는 외인성 유전자의 발현의 조절에 참여하는 단백질에 결합할 수 있는 단백질-결합 부위를 포함한다.

[0114] 관심 전사체에 혼성화되는 조절 핵산을 인코딩할 수 있는 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열의 길이는 약 5 내지 30개의 뉴클레오티드, 약 10 내지 30개의 뉴클레오티드, 또는 약 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 또는 그 이상의 뉴클레오티드일 수 있다. 조절 핵산의 표적화된 전사체와의 동일성 정도는 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%여야 한다.

[0115] 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 표적 유전자의 약 5 내지 약 30개의 연속 뉴클레오티드와 동일한 마이크로-RNA(miRNA) 분자를 인코딩할 수 있다. 일부 구현예에서, miRNA 서열은 mRNA를 표적화하고, 디뉴클레오티드 AA를 사용하여 개시되고, 약 30 내지 70%(약 30 내지 60%, 약 40 내지 60%, 또는 약 45% 내지 55%)의 GC-함량을 포함하고, 예를 들어 표준 BLAST 검색에 의해 결정될 때, 도입되는 포유동물의 게놈 내의 표적 이외의 임의의 뉴클레오티드 서열에 대해 높은 % 동일성을 갖지 않는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 적어도 하나의 miRNA, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6개, 또는 그 이상을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 뉴클레오티드 서열들 중 어느 하나와 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 miRNA를 인코딩하는 서열, 또는 표적 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 알려진 miRNA 서열의 목록은 연구 기관, 예컨대 특히, Wellcome Trust Sanger Institute, Penn Center for Bioinformatics, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, and European Molecule Biology Laboratory에 의해 유지되는 데이터베이스에서 찾아볼 수 있다. 알려진 효과적인 siRNA 서열 및 동족 결합 부위가 또한 관련 문헌에 잘 나타나 있다. RNAi 분자는 당업계에 알려진

기술에 의해 용이하게 설계된다. 또한, 효과적이고 특이적인 서열 모티프를 찾을 가능성을 증가시키는 계산 도구가 있다(예를 들어, 문헌[Lagana et al., Methods Mol. Bio., 2015, 1269:393-412] 참조).

[0116] 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 유전자에 의해 인코딩된 RNA의 발현을 조절할 수 있다. 다수의 유전자는 서로 어느 정도의 서열 상동성을 공유할 수 있기 때문에, 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 충분한 서열 상동성을 갖는 한 부류의 유전자들을 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 상이한 유전자 표적들 중에서 공유되거나 특이적 유전자 표적에 고유한 서열들과 상보성을 갖는 서열을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 몇몇 유전자들 사이에 상동성을 갖는 RNA 서열의 보존된 영역을 표적화하여 유전자 패밀리 내의 몇몇 유전자들(예를 들어, 상이한 유전자 아이소형(isoform)들, 스플라이스 변이체들, 돌연변이체 유전자들 등)을 표적화하도록 설계될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 단일 유전자의 특이적 RNA 서열에 고유한 서열을 표적화하도록 설계될 수 있다.

[0117] 구현예에서, 조절 RNA를 인코딩하는 이펙터 서열은 5000 bps 미만(예를 들어, 약 5000 bps, 4000 bps, 3000 bps, 2000 bps, 1000 bps, 900 bps, 800 bps, 700 bps, 600 bps, 500 bps, 400 bps, 300 bps, 200 bps, 100 bps, 50 bps, 40 bps, 30 bps, 20 bps, 10 bps 미만, 또는 그 이하)의 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 이펙터 서열은 독립적으로 또는 추가적으로, 10 bps 초과(예를 들어, 적어도 약 10 bps, 20 bps, 30 bps, 40 bps, 50 bps, 60 bps, 70 bps, 80 bps, 90 bps, 100 bps, 200 bps, 300 bps, 400 bps, 500 bps, 600 bps, 700 bps, 800 bps, 900 bps, 1000 kb, 1.1 kb, 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb, 1.5 kb, 1.6 kb, 1.7 kb, 1.8 kb, 1.9 kb, 2 kb, 2.1 kb, 2.2 kb, 2.3 kb, 2.4 kb, 2.5 kb, 2.6 kb, 2.7 kb, 2.8 kb, 2.9 kb, 3 kb, 3.1 kb, 3.2 kb, 3.3 kb, 3.4 kb, 3.5 kb, 3.6 kb, 3.7 kb, 3.8 kb, 3.9 kb, 4 kb, 4.1 kb, 4.2 kb, 4.3 kb, 4.4 kb, 4.5 kb, 4.6 kb, 4.7 kb, 4.8 kb, 4.9 kb, 5 kb 또는 그 이상)의 길이를 갖는다.

[0118] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 이상에서 기재된 특징부들 중 하나 이상을 포함하며, 예를 들어 하나 이상의 구조 DNA 서열, 하나 이상의 펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 서열, 하나 이상의 조절 요소를 인코딩하는 서열, 하나 이상의 조절 핵산, 예를 들어 하나 이상의 비-코딩 RNA를 인코딩하는 서열, 다른 발현 서열, 및 상기 언급된 것들의 임의의 조합을 포함한다. 본 명세서에 기재된 작제물은 하나 또는 복수의 이펙터 서열들, 예를 들어 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상의 이펙터 서열을 가질 수 있다. 단일 작제물 내의 복수의 이펙터 서열들의 경우에, 이펙터 서열들은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0119] 일 구현예에서, ssDNA는 치료적 기능성인 구조 DNA 서열을 포함한다. 일 구현예에서, ssDNA는 프로모터, 및 본 명세서에 기재된 치료용 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질을 인코딩하는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, ssDNA는 프로모터, 및 본 명세서에 기재된 조절 RNA를 인코딩하는 서열을 포함한다.

[0120] 일부 구현예에서, 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 이펙터 서열은 코돈 최적화되며, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 인간에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다. 일반적으로, 코돈 최적화는 천연 아미노산 서열을 유지하면서 해당 숙주 세포의 유전자에서 더 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 천연 서열의 적어도 하나의 코돈(예를 들어, 하나 이상, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50개, 또는 그 이상의 코돈; 예를 들어, 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%)을 대체함으로써, 관심 숙주 세포에서의 향상된 발현을 위해 핵산 서열을 변형시키는 것을 수반한다. 코돈 사용량 표는, 예를 들어, http://www.kazusa.or.jp/codon/에서 입수 가능한 "Codon Usage Database"에서 이용 가능하다. 이들 표는 다수의 방법으로 수정될 수 있으며, 예를 들어 문헌[Nakamura et al., 2000, Nucl. Acids Res. 28:292]을 참조한다. 특정 숙주 세포 내에서의 발현을 위하여 특정 서열을 코돈 최적화하기 위한 컴퓨터 알고리즘, 예컨대 Gene Forge가 또한 입수 가능하다.

[0121] *DNA 주형:*

[0122] DNA 서열은 게놈 조작 효소(예컨대, 뉴클레아제, 예를 들어 엔도뉴클레아제, 예를 들어 CRISPR 시스템의 뉴클레아제 요소, 예를 들어 Cas9, dCas9, aCas9-닉카제, Cpf/Cas12a), Crispr-연결된 효소, 예를 들어 염기 에디터 또는 프라임 에디터; 이동성 유전 요소 단백질(예를 들어, 트랜스포사제, 레트로트랜스포사제, 재조합효소, 인테그라제); 유전자 라이터; 중합효소)을 위한 주형일 수 있다. DNA 주형은 게놈 조작 효소에 의해 결합되는 하나 또는 다수의 서열, 예컨대 DNA 결합 도메인 서열, 가이드 RNA에 의해 표적화된 서열, 역위 반복부, 역위 말단 반복부, 긴 말단 반복부, 좌측-말단 서열(LTS), 우측-말단 서열(LTR), 비번역 영역, 부착 부위(예컨대, attP, attB, attL, attR), lox 부위(예컨대, LoxP, loxB)를 포함할 수 있다. DNA 주형은 게놈 내의 서열과 상동성인 서열, 게놈 내의 서열과 비상동성인 서열, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 주형은 DNA 수복, 예를

들어 비상동성 말단부 결합, 상동성 재조합, 또는 마이크로상동성 매개 말단부 결합(microhomology mediated end-joining)을 위한 기질일 수 있다. DNA 주형은 유전자 또는 RNA를 발현하기 위한 기구, 예컨대 인핸서, 프로모터, 단백질 코딩 영역, RNA 코딩 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 게놈 조작 효소에 의해 결합되는 서열은 게놈 내로 삽입되거나 게놈 수복을 위한 주형으로서 사용되는 기능성 DNA 서열의 양쪽 상에 배치된다. 일부 구현예에서, 게놈 조작 효소에 의해 결합되는 서열들 중 하나 또는 둘 다가 게놈 내로 삽입되고, 일부 구현예에서는 삽입되지 않는다. 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 또는 서열은 하나 또는 복수의 기능성 주형 서열들, 예를 들어 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 그 이상의 서열을 포함할 수 있으며, 이들은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0123] *핵 표적화 서열(NTS)*

[0124] 본 명세서에 개시된 DNA 작제물 또는 서열은 세포의 세포질로부터 핵 내로 DNA의 수송을 용이하게 하는 핵 표적화 서열(NTS)을 포함할 수 있다. NTS는 핵공 복합체를 통해 핵 내로 카고를 수송하는 임포틴에 결합하는 단백질(예를 들어, 전사 인자, 샤페론 등)에 대한 결합 부위를 포함한다. 구현예에서, NTS는 전반적으로 기능할 수 있다(예를 들어, SV40 인핸서 NTS). 다른 구현예에서, NTS는 세포 또는 조직 특이적일 수 있으며, 예를 들어 고유한 세포 유형에서 발현되는 전사 인자에 대한 결합 부위를 함유하여, 본 명세서에 기재된 ssDNA 서열 또는 작제물을 세포-특이적 방식으로 핵에 대해 표적화할 수 있다(예를 들어, SRF, Nkx3). NTS는 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물 내의 다수의 위치에서, 예를 들어 프로모터 앞, 및/또는 이펙터 서열 뒤에서 기능성일 수 있다.

[0125] NTS는 바이러스-유래 또는 비-바이러스 유래일 수 있다. NTS는, 예를 들어 문헌[Le Guen et al. 2021. Nucleic Acids Vol. 24: 477-486]에 기재되어 있다. NTS의 예가 표 2에 개시되어 있다:

표 2

[0126] 예시적인 핵 표적화 서열

바이러스/비-바이러스	명칭	서열
바이러스	SV40	5'-cccaagaagaagaggaaagtc-3'(서열번호 1)
비-바이러스	3NF	5'-ctggggactttccagcctggggactttccagctgggactttccagg-3'(서열번호 2)

[0127] *핵 유입(nuclear import) 단백질*

[0128] 일부 구현예에서, (예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은) ssDNA는, 예를 들어 핵 유입 단백질(예를 들어, 표 2B에 열거된 바와 같은 핵 유입 단백질)에 의해 핵 내로 유입될 수 있다. 일부 구현예에서, (예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은) ssDNA는 핵 유입 단백질(예를 들어, 표 2B에 열거된 바와 같은 핵 유입 단백질)에 의해 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, (예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은) ssDNA는 (예를 들어, 표 2B의 임의의 단일 행에 열거된 바와 같은) 핵 유입 단백질에 대한 인식 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, (예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은) ssDNA는 표 2B에 열거된 바와 같은 인식 서열, 또는 이와 적어도 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0129] 예시적인 유입 단백질은, 예를 들어 염기성 헬릭스-루프-헬릭스(bHLH) 단백질, 이종 핵 리보핵단백질(hnRNP) 아이소형, 핵 인자 I(NFI) 단백질, 예를 들어 표 2B에 열거된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, bHLH 단백질은 아세틸콜린 수용체 하위단위, 예를 들어 알파 하위단위, 예를 들어 CHRNA1, CHRNA2, CHRNA3, CHRNA4, CHRNA5, 또는 CHRNA7을 포함한다. 일부 구현예에서, 아세틸콜린 수용체 하위단위는 감마 또는 엡실론 하위단위를 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 데스민을 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 hnRNP, 예를 들어 hnRNP A1, hnRNP C, hnRNP K, hnRNP U를 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 임포틴을 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 미오신 경쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 NFI을 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 NFKB를 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 뉴클레오시드 디포스페이트 키나제, 예를 들어 NM23-H2를 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 Oct1을 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 Oct2를 포함한다.

[0130] 일부 구현예에서, 유입 단백질은 SRF를 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 TEF-1을 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 AP2를 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 트로포닌, 예를 들어 트로포닌 I,

예를 들어 트로포닌 I 2를 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 TTF-1을 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 Ran 결합 단백질, 예를 들어 RanBP3 또는 RanBP1을 포함한다. 일부 구현예에서, 유입 단백질은 호메오박스 전사 인자, 예를 들어 Chx10을 포함한다.

[0131] 일부 구현예에서, 유입 인자는 E-박스, DTS(예를 들어, SV40 DTS 또는 SMGA DTS), 프로모터(예를 들어, SP-C 프로모터 또는 htk 프로모터), 텔로미어, ATTT 모티프, 세포 주기 조절 단위(CCRU), CT3 서열, S/MAR, 토포이소머라제 II 컨센서스 서열, ARS 컨센서스 서열, 3NF, 바이러스 ori(예를 들어, EBV oriP 부위)에 특이적으로 결합한다.

[0132] **[표 2B]**

[0133] **예시적인 핵 유입 단백질 및 이들의 상응하는 인식 서열**

[0134]

핵 진입을 용이하게 하는 단백질	단백질 유전자 ID	단백질에 대한 GenBank 수탁 번호	단백질에 의해 인식된 서열의 명칭	상응하는 DNA 인식 서열	상응하는 DNA 인식 서열의 서열번호
심장 알파-액틴	70	NP_005150.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA1 아이소형 b	1134	NP_000070.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA1 아이소형a	1134	NP_001034612.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 아이소형 1	1135	NP_000733.2	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 아이소형 2	1135	NP_001269384.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 아이소형 3	1135	NP_001334634.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 아이소형 3	1135	NP_001334635.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3

[0135]

CHRNA2 아이소형 4	1135	NP_001334636.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 아이소형 4	1135	NP_001334637.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA3 아이소형 1	1136	NP_000734.2	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA3 아이소형 2	1136	NP_001160166.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA4 아이소형 1	1137	NP_000735.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA4 아이소형 2	1137	NP_001243502.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 아이소형 1	1138	NP_000736.2	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 아이소형 2	1138	NP_001294874.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3

[0136]

CHRNA5 아이소형 3	1138	NP_001382100.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 아이소형 4	1138	NP_001382101.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 아이소형 5	1138	NP_001382102.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 아이소형 6	1138	NP_001382103.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 아이소형 7	1138	NP_001382104.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA7 아이소형 1	1139	NP_000737.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA7 아이소형 2	1139	NP_001177384.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNE	1145	NP_000071.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
CHRNG	1146	NP_005190.4	E-박스	5'-CANNTG-3'	3

[0137]

M-크레아틴 키나제 (MCK)	1158	NP_001815.2	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
데스민 아이소형 2	1674	NP_001369637.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
데스민 아이소형 3	1674	NP_001369638.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
데스민 아이소형 4	1674	NP_001369639.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
데스민 아이소형 5	1674	NP_001369640.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
데스민 아이소형 6	1674	NP_001369641.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
데스민 아이소형 7	1674	NP_001369642.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
데스민 아이소형 1	1674	NP_001918.3	E-박스	5'-CANNTG-3'	3
AP1 (Fos)	2353	NP_005243.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'	4
GATA-6	2627	NP_005248.2	SP-C 프로모터	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTC	5

[0138]

				AACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	
hnRNP A1 아이소형 a	3178	NP_002127 .1	인간 염색체 밴드 11q13으로부터의 dsDNA 서열 (수탁 번호 AC000353)	5'-GGCTGGTCTTGAACTCCTG (A/G) GCTCA (A/G) GTGATCCTCC-3'	6
hnRNP A1 아이소형 b	3178	NP_112420 .1	인간 염색체 밴드 11q13으로부터의 dsDNA 서열 (수탁 번호 AC000353)	5'-GGCTGGTCTTGAACTCCTG (A/G) GCTCA (A/G) GTGATCCTCC-3'	6
hnRNP A1 아이소형 a	3178	NP_002127 .1	텔로미어 (텔로미어 반복 부에 결합함)	5'-(TTAGGG)n-3'	7
hnRNP A1 아이소형 b	3178	NP_112420 .1	텔로미어 (텔로미어 반복 부에 결합함)	5'-(TTAGGG)n-3'	7

[0139]

hnRNP A1 아이소형a	3178	NP_002127.1	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP A1 아이소형 b	3178	NP_112420.1	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP A1 아이소형a	3178	NP_002127.1	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5'	9
hnRNP A1 아이소형 b	3178	NP_112420.1	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5'	9

[0140]

			ATTT 서열 모티프		
hnRNP C 아이소형 a	3183	NP_001070910.1	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP C 아이소형 b	3183	NP_001070911.1	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP C 아이소형 b	3183	NP_004491.2	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP C 아이소형 a	3183	NP_112604.2	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터,	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8

[0141]

hnRNP C 아이소형a	3183	NP_001070910.1	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5'	9
hnRNP C 아이소형 b	3183	NP_001070911.1	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5'	9
hnRNP C 아이소형 b	3183	NP_004491.2	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5'	9

[0142]

hnRNP C 아이소형a	3183	NP_112604.2	인간 티미딘 키나제(htk) 프로모터, 세포 주기 조절 단위(CCRU) 내에 함유된 ATTT 서열 모티프	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' 9
hnRNP K 아이소형c	3190	NP_001305115.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' 10
hnRNP K 아이소형 d	3190	NP_001305116.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' 10
hnRNP K 아이소형 b	3190	NP_001305117.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' 10
hnRNP K 아이소형a	3190	NP_002131.2	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' 10
hnRNP K 아이소형 b	3190	NP_112552.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' 10
hnRNP K 아이소형a	3190	NP_112553.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' 10
hnRNP U(AF-A로도 알려짐)	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-TATATTT-3' 11

[0143]

아이소형 b					
hnRNP U(SAF-A로도 알려짐) 아이소형 a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-TATATTT-3'	11
hnRNP U(SAF-A로도 알려짐) 아이소형 b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-(A/G) N (T/C) NNCNNG (T/C) NG (G/T) TN (T/C) N (T/C)-3'	12
hnRNP U(SAF-A로도 알려짐) 아이소형 a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-(A/G) N (T/C) NNCNNG (T/C) NG (G/T) TN (T/C) N (T/C)-3'	12
hnRNP U(SAF-A로도 알려짐) 아이소형 b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3'	13
hnRNP U(SAF-A로도 알려짐) 아이소형 a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3'	13
AP1 (Jun)	3725	NP_002219.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'	4
임포틴 β1	3837	XP_548162.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGGAGGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC	14

[0144]

					TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	
미오신 경쇄 (MLC) 1/3 아이소형 1f	4632	NP_524144.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	15
미오신 경쇄 (MLC) 1/3 아이소형 3f	4632	NP_524146.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	15
NFI 아이소형 1	4782	NP_001231931.1	SP-C 프로모터	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC	16

[0145]

NFI 아이소형 3	4782	NP_001231933.1	SP-C 프로모터	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	16
NFI 아이소형 4	4782	NP_001231934.1	SP-C 프로모터	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	16
NFI 아이소형 5	4782	NP_005588.2	SP-C 프로모터	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG	16

[0146]

				GTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	
NFI 아이소형 2	4782	NP_995315.1	SP-C 프로모터	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	16
NFKB 아이소형 2	4790	NP_001158884.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGC TGGGACTTTCCAGG-3'	2
NFKB 아이소형 2	4790	NP_001306155.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGC TGGGACTTTCCAGG-3'	2
NFKB 아이소형 1	4790	NP_001369554.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGC TGGGACTTTCCAGG-3'	2
NFKB 아이소형 1	4790	NP_001369555.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGC TGGGACTTTCCAGG-3'	2
NFKB 아이소형 2	4790	NP_001369556.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGC TGGGACTTTCCAGG-3'	2

[0147]

NFKB 아이소형 3	4790	NP_001369557.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGGACTTTCCAGC TGGGACTTTCCAGGG-3"	2
NFKB 아이소형 1	4790	NP_003989.2	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGGACTTTCCAGC TGGGACTTTCCAGGG-3"	2
NFKB 아이소형 2	4790	NP_001158884.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB 아이소형 2	4790	NP_001306155.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB 아이소형 1	4790	NP_001369554.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB 아이소형 1	4790	NP_001369555.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB 아이소형 2	4790	NP_001369556.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB 아이소형 3	4790	NP_001369557.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB 아이소형 1	4790	NP_003989.2	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC	4

[0148]

				AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	
NFKB 아이소형 2	4790	NP_001158 884.1	IgK κB 모티프 5'- GGGGACTTTCCGAGGGACTTTCC-3'의 5개의 탠덤 반복부로 구성되는 단편	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'	17
NFKB 아이소형 2	4790	NP_001306 155.1	IgK κB 모티프 5'- GGGGACTTTCC-3'의 5개의 탠덤 반복부로 구성되는 단편	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'	17
NFKB 아이소형 1	4790	NP_001369 554.1	IgK κB 모티프 5'- GGGGACTTTCC-3'의 5개의 탠덤 반복부로 구성되는 단편	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'	17
NFKB 아이소형 1	4790	NP_001369 555.1	IgK κB 모티프 5'- GGGGACTTTCC-3'의 5개의 탠덤 반복부로 구성되는 단편	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'	17

[0149]

NFKB 아이소형 2	4790	NP_001369 556.1	IgK κB 모티프 5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'의 5개의 탠덤 반복부로 구성되는 단편	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'	17
NFKB 아이소형 3	4790	NP_001369 557.1	IgK κB 모티프 5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'의 5개의 탠덤 반복부로 구성되는 단편	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'	17
NFKB 아이소형 1	4790	NP_003989 .2	IgK κB 모티프 5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'의 5개의 탠덤 반복부로 구성되는 단편	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'	17
NM23-H2 아이소형a	4831	NP_001018 147.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'	4
NM23-H2 아이소형a	4831	NP_001018 148.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC	4

[0150]

				AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	
NM23-H2 아이소형 a	4831	NP_001018149.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NM23-H2 아이소형 b	4831	NP_001185611.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NM23-H2 아이소형 a	4831	NP_002503_1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) 아이소형 1	5452	NP_001193954.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) 아이소형 3	5452	NP_001193955.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) 아이소형 4	5452	NP_001234923.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2)	5452	NP_001380863.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

[0151]

아이소형 5					
Oct2 (POU2F 2) 아이소형 6	5452	NP_001380 864.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F 2) 아이소형 7	5452	NP_001380 865.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F 2) 아이소형 8	5452	NP_001381 305.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F 2) 아이소형 9	5452	NP_001381 306.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F 2) 아이소형 10	5452	NP_001381 307.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F 2) 아이소형 2	5452	NP_002689 .1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

[0152]

RanBP1	5902	XP_514990.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	18
Oct1 (POU2F1) 아이소형 2	5451	NP_001185712.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct1 (POU2F1) 아이소형 3	5451	NP_001185715.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct1 (POU2F1) 아이소형 4	5451	NP_001352777.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct1 (POU2F1)	5451	NP_001352778.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

[0153]

아이소형 4					
Oct1 (POU2F 1) 아이소형 1	5451	NP_002688 .3	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
SRF 아이소형 2	6722	NP_001278 930.1	SMGA DTS	5'- TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTT CCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAAACC ACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTC AGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAA GATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTA TTCATGCCAAAGAC-3'	19
SRF 아이소형 1	6722	NP_003122 .1	SMGA DTS	5'- TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTT CCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAAACC ACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTC AGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAA GATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTA TTCATGCCAAAGAC-3'	19
TEF-1 아이소형 2	7008	NP_001138 870.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
TEF-1 아이소형 1	7008	NP_003207 .1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
AP2 (TFAP2 A)	7020	NP_001027 451.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

[0154]

아이소형 b					
AP2 (TFAP2 A) 아이소형c	7020	NP_001035890.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'	4
AP2 (TFAP2 A) 아이소형a	7020	NP_001358995.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'	4
AP2 (TFAP2 B)	7021	NP_003212.2	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'	4
AP2 (TFAP2 C)	7022	NP_003213.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'	4
트로포닌 I 1	7135	NP_003272.3	E-박스	5'-CANNTG-3'	20
트로포닌 I 2 - 아이소형 1	7136	NP_001139301.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	20
트로포닌 I 2 - 아이소형 2	7136	NP_001139313.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	20
트로포닌 I 2 - 아이소형 1	7136	NP_003273.1	E-박스	5'-CANNTG-3'	20

[0155]

트로포닌 I 3	7137	NP_000354.4	E-박스	5'-CANNTG-3'	20
TTF-1 아이소형 2	7270	NP_001192225.1	SP-C 프로모터	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	21
TTF-1 아이소형 1	7270	NP_031370.2	SP-C 프로모터	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	21
H2B	8349	NP_003519.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
RanBP3 아이소형 4	8498	NP_001287794.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGGTGTGGACGGAGGAGGCCC	22

[0156]

				GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'
RanBP3 아이소형a	8498	NP_003615.2	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 아이소형b	8498	NP_015559.2	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTGCATACA	22

[0157]

				TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	
RanBP3 아이소형 d	8498	NP_015561.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 아이소형 X1	8498	XP_006722991.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG	22

[0158]

				AAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	
RanBP3 아이소형 X1	8498	XP_006722 992.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 아이소형 X1	8498	XP_011526 695.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 아이소형 X1	8498	XP_011526 694.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCC	22

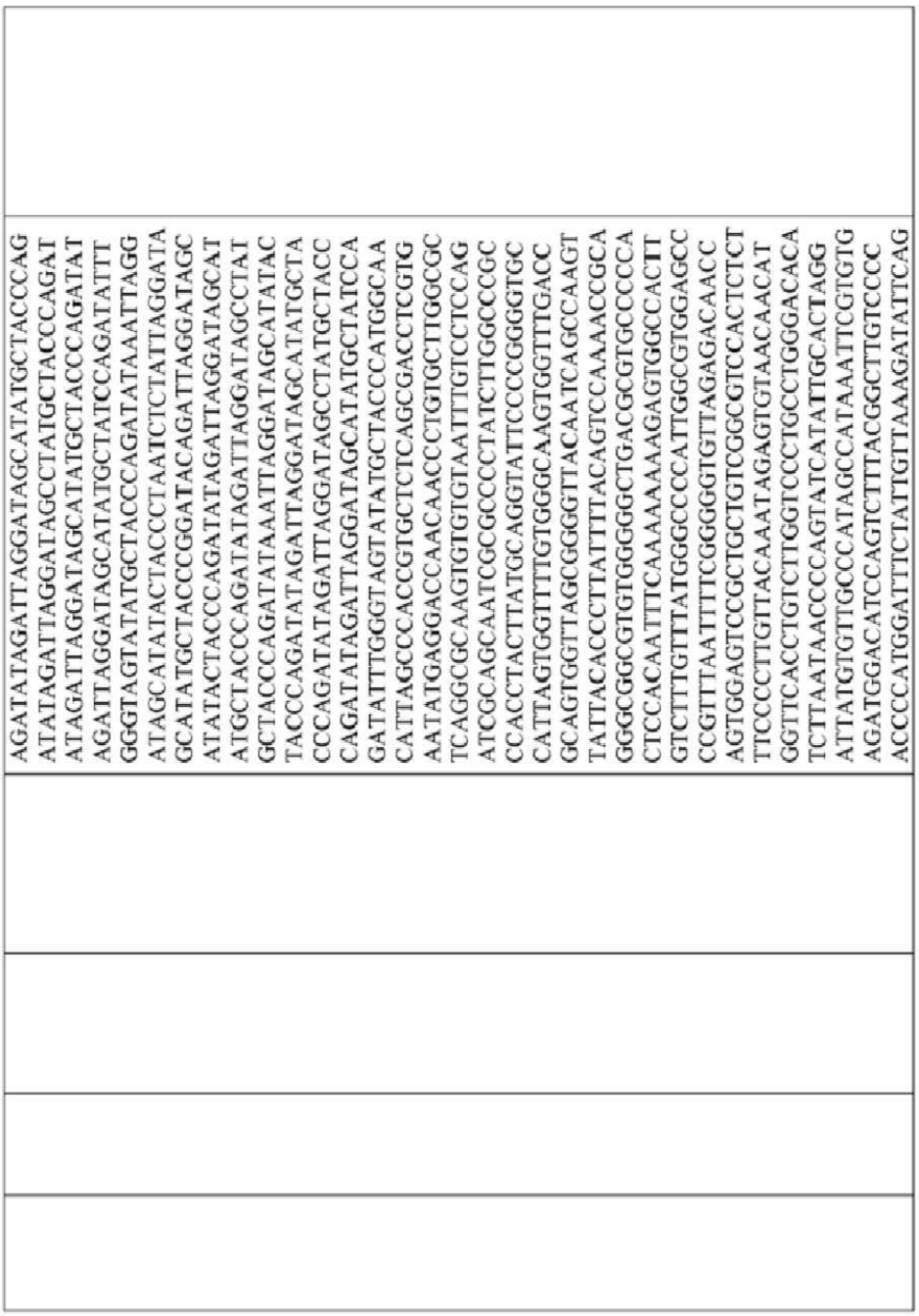
[0159]

				GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGGTTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'
RanBP3 아이소형 X1	8498	XP_011526696.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGGTTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 아이소형 X1	8498	XP_024307517.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA	22

[0160]

					TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'
임포틴 7	10527	NP_006382.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGTGAGTTTTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	22
Chx10	338917	NP_878314.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
EBNA-1	378377 4	YP_401677.1	EBV oriP 부위	5'- CATGCAGGAAAAGGACAAGCAGCGAAAATTC ACGCCCCCTTGGGAGGTGGCGGCATATGCAAA GGATAGCACTCCCACTCTACTACTGGGTATCA TATGCTGACTGTATATGCATGAGGATAGCATA TGCTACCCGGATACAGATTAGGATAGCATATA CTACCCAGATATAGATTAGGATAGCATATGCT ACCCAGATATAGATTAGGATAGCCTATGCTAC CCAGATATAAATTAGGATAGCATATACTACCC	23

[0161]


AGATATAGATTAGGATAGCATATGCTACCCAG
ATATAGATTAGGATAGCCTATGCTACCCAGAT
ATAGATTAGGATAGCATATGCTACCCAGATAT
AGATTAGGATAGCATATGCTATCCAGATATTT
GGGTAGTATATGCTACCCAGATATAAATTAGG
ATAGCATATACTACCCTAATCTCTATTAGGATA
GCATATGCTACCCGGATACAGATTAGGATAGC
ATATACTACCCAGATATAGATTAGGATAGCAT
ATGCTACCCAGATATAGATTAGGATAGCCTAT
GCTACCCAGATATAAATTAGGATAGCATATAC
TACCCAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTA
CCCAGATATAGATTAGGATAGCCTATGCTACC
CAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTATCCA
GATATTTGGGTAGTATATGCTACCCATGGCAA
CATTAGCCCACCGTGCTCTCAGCGACCTCGTG
AATATGAGGACCAACAACCCTGTGCTTGGCGC
TCAGGCGCAAGTGTGTGTAATTTGTCCTCCAG
ATCGCAGCAATCGCGCCCCTATCTTGGCCCGC
CCACCTACTTATGCAGGTATTCCCCGGGGGTGC
CATTAGTGGTTTTGTGGGCAAGTGGTTTGACC
GCAGTGGTTAGCGGGGTTACAATCAGCCAAGT
TATTACACCCTTATTTTACAGTCCAAAACCGCA
GGGCGGCGTGTGGGGGCTGACGCGTGCCCCCA
CTCCACAATTTCAAAAAAAAGAGTGGCCACTT
GTCTTTGTTTATGGGCCCCATTGGCGTGGAGCC
CCGTTTAATTTTCGGGGGGTGTTAGAGACAACC
AGTGGAGTCCGCTGCTGTCGGCGTCCACTCTCT
TTCCCCTTGTTACAAATAGAGTGTAACAACAT
GGTTCACCTGTCTTGGTCCCTGCCTGGGACACA
TCTTAATAACCCCAGTATCATATTGCACTAGG
ATTATGTGTTGCCCATAGCCATAAATTCGTGTG
AGATGGACATCCAGTCTTTACGGCTTGTCCCC
ACCCCATGGATTTCTATTGTTAAAGATATTCAG

[0162]

NKX3-1/3-2 아이소형 2	4824	NP_001243268.1	SMGA DTS	5'- TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTT CCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAAACC ACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTC AGCTGGCCTTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAA	24

NKX3-1/3-2 아이소형 1	4824	NP_006158.2	SMGA DTS	5'-TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3'	GATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3'	19

[0163]

[0164] *유지 서열*

[0165] 본 명세서에 개시된 DNA 작제물 또는 서열은 본 발명의 ssDNA 또는 작제물에 대해 숙주 세포에서 연속적인 라운드의 세포 분열 및/또는 선조체(progenitor) 분화를 통해 지속적인 유전자 발현을 지원하거나 가능하게 하는 유지 서열을 포함할 수 있다. 구현예에서, 유지 서열은 핵 스캐폴드/기질 부착 영역(S/MAR)이다. S/MAR 요소들은 종에 걸쳐 보존되는 60 내지 500 bp 범위의 다양한 AT-풍부 서열이며, 간기(interphase) 동안 핵 기질 단백질에 대해 염색질을 고정하는 것으로 여겨진다(Bode et al. *2003.* Chromosome Res 11, 435-445). S/MAR은 장기간 도입유전자 발현 및 염색체외 유지를 용이하게 하기 위해 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물 내로 도입될 수 있다. 일 구현예에서, 유지 서열은 인간 인터페론-베타 MAR(5'tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttatttttacatataaatatatttccctgtttttctaaaaaagaaaaagatcatcattttcccattgtaaaatgccatatttttttcataggtcacttacata-3')이다. 구현예에서, 본 명세서에 기재된 작제물에 유용한 S/MAR은 http://bioinfo.net.in/MARome에서 MARome을 검색하여 찾을 수 있으며, 이는 문헌 [Narwade et al. 2019. Nucleic Acids Research. Volume 47, Issue 14: 7247-7261]에도 기재되어 있다.

[0166] 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 포유류 세포, 예를 들어 인간 세포에서 복제할 수 있다.

일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 적어도 1회의 세포 분열을 통해 숙주 세포, 조직 또는 대상체에서 유지된다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 40, 50회 또는 그 이상의 세포 분열을 통해 숙주 세포, 조직 또는 대상체에서 유지된다. 시험관내 세포 분열은 유세포측정 또는 현미경 검사에 의해 추적될 수 있다. 생체내 세포 분열은 생체 현미경 검사에 의해 추적될 수 있다.

[0167] *제2 가닥 모티프*

[0168] 본 명세서에 개시된 DNA 작제물 또는 ssDNA 서열은 또한 제2 가닥 모티프를 포함할 수 있다. SSM의 한 예는 바이러스 또는 이동성 유전 요소로부터 유래된다. 일부 구현예에서, SSM은 역위 반복부 또는 헤어핀 서열, 예를 들어 바이러스로부터의, 예를 들어 AAV로부터의 역위 말단 반복부(ITR), 또는 아넬로바이러스 복제 기점 내 보존된 8-뉴클레오티드 헤어핀이다. SSM의 예가 하기 표 3에 열거되어 있다:

표 3

[0169] 예시적인 제2 가닥 모티프

SSM 명칭	서열
AAV2 WT ITR - 좌측	5'cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct-3'(서열번호 25)
AAV2 WT ITR - 우측	5'aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg-3'(서열번호 26)
AAV2 변형된 ITR - 좌측	5'cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaa-3'(서열번호 27)
AAV2 변형된 ITR - 우측	5'ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg-3'(서열번호 28)
아넬로바이러스 헤어핀 - 긴 것	5'cccgagggcgggtgccgaaggtgagtttacacaccgaagtcaaggggcaattcgggctcgggactggccgggctatgggc-3'(서열번호 29)
아넬로바이러스 헤어핀 - 짧은 것	5'- agtttaca-3'(서열번호 30)

[0170] 일부 구현예에서, SSM은 ssDNA의 영역에 상보적인 RNA 또는 DNA의 짧은 서열, 예를 들어 RNA 프라이머 또는 DNA 프라이머이다. 일부 구현예에서, 프라이머는 본 명세서에 기재된 ssDNA의 말단부들을 연결하는 스플린트 서열이다. 일부 구현예에서, RNA 또는 DNA 프라이머는 100, 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5개 미만의 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, RNA 또는 DNA 프라이머는 5 내지 100개의 뉴클레오티드, 10 내지 100개의 뉴클레오티드, 20 내지 80개의 뉴클레오티드, 20 내지 60개의 뉴클레오티드이다.

[0171] *기타 요소*

[0172] 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 표적 세포에서 이펙터 서열의 수송, 국재화, 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하거나, 비표적 세포에서 그의 분해 또는 발현의 리프레션을 촉진시키는 방식으로, 이펙터 서열, 예를 들어 이펙터를 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결된 다른 제어 효소를 또한 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "작동가능하게 연결된" 서열은, 이펙터를 인코딩하는 서열을 제어하기 위해, 이펙터를 인코딩하는 서열에 인접한 발현 제어 서열, 및 트랜스로 또는 소정 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 둘 다를 포함한다. 숙주 세포에서 유전자 발현을 위해 필요한 조절 서열의 정확한 성질은 종들, 조직들 또는 세포 유형들 사이에서 달라질 수 있지만, 일반적으로 필요에 따라, 각각 전사 및 번역의 개시에 관여하는 5' 비전사 및 5' 비번역 서열, 예컨대 TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열, 인핸서 요소 등을 포함할 수 있다. 조절 서열은 또한 필요에 따라 인핸서 서열 또는 상류 액티베이터 서열을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 작제물은 선택적으로 5' 리더(leader) 또는 신호 서열을 포함할 수 있다.

[0173] 변형된 뉴클레오티드

[0174] 본 명세서에 기재된 DNA 작제물 및 조성물은, 선형 또는 원형(예를 들어, 공유결합으로 닫혀 있음)에 관계없이, 핵염기, 당, 및/또는 포스페이트 백본의 화학적 변형을 가질 수 있다. 이론에 구속되지 않고, 이러한 변형은 (예를 들어, 엑소뉴클레아제로부터의) 분해로부터 또는 숙주 조직 또는 대상체의 면역 시스템으로부터 DNA를 보호하는 데 유용할 수 있다. 일반적으로, 변형된 뉴클레오티드는 비변형된 뉴클레오티드와 동일한 염기쌍 형성

특이성을 가진다. 즉, 변형된 아데닌 "A"는 티민 "T"와 염기쌍을 형성할 수 있다. 피리미딘 핵염기의 하나 이상의 원자는 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 티올, 선택적으로 치환된 알킬(예를 들어, 메틸 또는 에틸), 또는 할로(예를 들어, 클로로 또는 플루오로)로 대체되거나 치환될 수 있다. 특정 구현예에서, 변형(예를 들어, 하나 이상의 변형)이 당 및 뉴클레오시드간 결합 각각에 존재한다.

[0175] 일부 구현예에서, ssDNA는 적어도 하나의 공유결합 변형을 포함한다. 적합한 변형은 문헌[Sood et al. 2019. DNAmod: the DNA modification database. J Cheminform 11, 30]에 기재되어 있다. DNAmod는 DNA 변형을 카탈로그로 나타내고 그들의 특성에 대해 배우도록 단일 소스를 제공하는 오픈-소스 데이터베이스(https://dnamod.hoffmanlab.org)이다. DNAmod는 이들 변형을 통해 용이하게 브라우징하고 검색하도록 웹 인터페이스를 제공한다. 데이터베이스는 모든 엄선된 변형된 DNA 염기, 및 훨씬 더 큰 목록의 후보 화학적 실체의 화학적 특성 및 구조에 대해 주석이 달려 있다. DNAmod는 이용 가능한 서열분석 방법에 대한 매뉴얼 주석, 자연에서의 발생에 대한 설명, 기존 및 제안된 명명법을 제공한다. 본 명세서에 기재된 방법에 유용한 DNA 변형의 예에는, 예를 들어 N6-메틸아데노신(m6A, 6mA); 5-포르밀시토신(5fC, f5C); 5-카르복실시토신(ca5C, 5caC); 5-하이드록시메틸시토신(5hmC, hm5C); 5-메틸데옥시시토신(m5dC); 5-메틸시토신(5mC, m5C); 5'-메틸시토신; 3-메틸시토신(m3C); 5-메틸 피리미딘; 8-옥소구아닌(8-옥소G); 포스포로티오에이트; S 및 R 포스포로티오에이트 결합; 메틸티민; N3'-P5' 포스포로아미데이트(NP); 사이클로헥산 핵산(CeNA); 트리사이클로-DNA(tcDNA)가 포함된다. 예를 들어, 문헌[*Pu et al. 2020. An in-vitro DNA phosphorothioate modification reaction. Mol Microbiol. 113: 452- 463*]; 문헌[*Zheng & Sheng. 2021. Synthesis of N4-methylcytidine (m4C) and N4,N4-dimethylcytidine (m42C) modified RNA. Current Protocols, 1, e248*]; 문헌[*Ohkubo et al. 2021. Chemical synthesis of modified oligonucleotides containing 5′-amino-5′-deoxy-5′-hydroxymethylthymidine residues. Current Protocols, 1, e70*]; 문헌[*Bao & Xu. 2021. Observation of Z-DNA structure via the synthesis of oligonucleotide DNA containing 8-trifluoromethyl-2-deoxyguanosine. Current Protocols, 1, e28*]; 문헌[*Skakujet al. 2020. Automated synthesis and purification of guanidine-backbone oligonucleotides. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 81, e110*]을 참조한다.

[0176] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 조성물은 S 포스포로티오에이트 변형된 뉴클레오티드 결합 및 R 포스포로티오에이트 변형된 뉴클레오티드 결합 중 하나 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 포스포로티오에이트 결합은 문헌[Iwamoto et al, 2017, Nature Biotechnology, Volume 35:845-851]에 따라 제조된다. 간략하게 말하면, 뉴클레오시드 3'-옥사아자포스폴리딘 유도체의 단량체를 반복적 캡핑 및 황화를 이용하여 입체제어된 올리고뉴클레오티드 합성을 거쳐, 입체제어된 포스포로티오에이트 결합을 생성한다. 최종 샘플을 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 및 초고성능 액체 크로마토그래피 질량 분석법(UPLC/MS)에 의해 분석하여 변형의 입체화학을 결정할 수 있다. 포스포로티오에이트 결합을 함유하는 핵산도 구매 가능하다.

[0177] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 조성물은, 예를 들어 문헌[Sergueev and Shaw, 1998, J Am Chem Soc, Volume 120, Issue 37:9417-9427]의 방법에 따라 하나 이상의 보라노포스페이트 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 간략하게 말하면, 일부 구현예에서, H-포스포네이트 사슬 신장에 이어 보론화를 통해, 포스페이트 백본 내에서 비가교(nonbridging) 산소 대신 보라노 기를 치환한다. 최종 샘플을 RP-HPLC에 의해 정제하고 분석하여 변형의 입체화학을 결정할 수 있다. 보라노포스페이트 변형된 뉴클레오티드도 구매 가능하다.

[0178] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 조성물은, 예를 들어 문헌[Lin et al, 2002, Mol Cell Biol, Volume 22, Issue 3:704-723]의 방법에 따라 제조된, 하나 이상의 5-메틸시토신 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 간략하게 말하면, 일부 구현예에서, 시토신, 또는 시토신을 함유하는 서열을 비표지된 S-아데노실메티오닌(AdoMet)을 사용하여 야생형 Dnmt3a(GST-3a) 단백질의 글루타티온 S-트랜스퍼라제 융합체와 함께 인큐베이션한다. 뉴클레오티드를 HPLC에 의해 정제하고 분석하여, 뉴클레오티드가 올바른 위치에서 메틸화됨을 결정할 수 있다. 5-메틸시토신 변형된 뉴클레오티드도 구매 가능하다.

[0179] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 조성물은 하나 이상의 7-메틸구아닌 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 7-메틸구아닌 변형된 뉴클레오티드는 문헌[Jones and Robins, 1963, Purine nucleosides. III. Methylation studies of certain naturally occurring purine nucleosides, J Am Chem Soc, Volume 85:193]의 방법에 따라 제조된다. 간략하게 말하면, 일부 구현예에서, 디메틸 설폭사이드 중 2'-데옥시구아노신을 메틸 요오다이드로 처리한다. 뉴클레오티드를 HPLC에 의해 정제하고 분석하여, 뉴클레오티드가 올바른 위치에서 메틸화됨을 결정할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 7-메틸구아닌 변형된 뉴클레오티드가 문헌[Hendler et al, 1970, Volume 9, Issue 21:4141:4153], 및 문헌[Kore and Parmar, 2006, Biochemistry, Volume 25, Issue 3:337-340]에 기재된 방법에 따라 제조된다. 간략하게 말하면, 일부 구현예에서, 구아노신

5'-디포스페이트 대신에, 물 중 구아닌 5'-디포스페이트를 디메틸 설페이트에 첨가하여 7-메틸 GDP를 생성한다. 뉴클레오티드를 HPLC에 의해 정제하고 분석하여, 뉴클레오티드가 올바른 위치에서 메틸화됨을 결정한다. 7-메틸 구아닌 변형된 뉴클레오티드도 구매 가능하다.

[0180] 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 및 조성물은 1 내지100%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 90%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 80%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 70%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 60%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 50%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 40%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 30%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 20%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 15%의 변형된 뉴클레오티드, 1% 내지 10%의 변형된 뉴클레오티드, 20% 내지 90%의 변형된 뉴클레오티드, 20% 내지 80%의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 및 조성물은 적어도 1%의 변형된 뉴클레오티드, 적어도 5%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 10%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 15%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 20%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 25%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 30%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 40%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 50%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 60%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 70%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 80%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 85%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 90%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 92%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 95%의 변형된 뉴클레오티드; 적어도 97%의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 및 조성물은 각각의 작제물에 대해 0% 내지 100%의 각각의 구별되는 뉴클레오티드, 예를 들어 0% 내지 100%의 변형된 T 뉴클레오티드, 0% 내지 100%의 변형된 A 뉴클레오티드, 0% 내지 100%의 변형된 C 뉴클레오티드, 및 0% 내지 100%의 변형된 G 뉴클레오티드로, 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물 및 조성물은 0 내지 100%, 10% 내지 100%, 20% 내지 100%, 30% 내지 100%, 40% 내지 100%, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 10% 내지 50%의 각각의 구별되는 뉴클레오티드, 예를 들어 0 내지 100%, 10% 내지 100%, 20% 내지 100%, 30% 내지 100%, 40% 내지 100%, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 10% 내지 50%의 변형된 T 뉴클레오티드; 0 내지 100%, 10% 내지 100%, 20% 내지 100%, 30% 내지 100%, 40% 내지 100%, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 10% 내지 50%의 변형된 A 뉴클레오티드; 0 내지 100%, 10% 내지 100%, 20% 내지 100%, 30% 내지 100%, 40% 내지 100%, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 10% 내지 50%의 변형된 C 뉴클레오티드; 또는 0 내지 100%, 10% 내지 100%, 20% 내지 100%, 30% 내지 100%, 40% 내지 100%, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 10% 내지 50%의 변형된 G 뉴클레오티드로, 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, ssDNA 작제물은 100%의 변형된 T 뉴클레오티드, 50%의 변형된 A 뉴클레오티드, 0%의 변형된 C 뉴클레오티드, 및 25%의 변형된 G 뉴클레오티드를 함유할 수 있다.

[0181] 구현예에서, DNA 변형, 예를 들어 본 명세서에 기재된 변형은 전체 서열에 걸쳐; 서열의 요소, 예를 들어 본 명세서에 기재된 요소 내에서; 5'- 또는 3'- 말단부에서; 및/또는 5'- 또는 3'- 말단부의 마지막 10, 8, 6, 5, 4, 3, 또는 2개의 뉴클레오티드 사이에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 조성물 내에 도입될 수 있다.

[0182] 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 이중 가닥 구조를 형성할 수 있는 ssDNA의 능력을 파괴하는 하나 이상의 변형을 가지며, 예를 들어 본 명세서에 기재된 ssDNA는 분자내 상보성을 갖는 영역에 존재하는 뉴클레오티드에 대해 하나 이상의 변형을 갖는다. 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 ssDNA의 비변형된 서열에 비해 분자내 상보성의 영역들의 염기쌍 형성을 파괴하는 하나 이상의 변형을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 사용되는 변형된 뉴클레오티드는 비변형된 뉴틀레오티드와 염기쌍 형성하는 비변형된 뉴클레오티드의 경향과 비교하여, 변형된 뉴클레오티드와의 염기쌍 형성에 대해 감소된 경향을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 사용되는 변형된 뉴클레오티드는, 변형된 뉴클레오티드와 비교하여, 비변형된 뉴클레오티드와의 염기쌍 형성에 대해 증가된 경향을 갖는다.

[0183] 다른 변형이 또한 고려된다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 선형 DNA의 말단부는, 예를 들어 이들을 엑소뉴클레아제로부터 보호하기 위해 변형될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 디데옥시뉴클레오티드 잔기가 선형 분자의 3' 말단에 부가될 수 있고/있거나, 자가-상보성 올리고뉴클레오티드가 한쪽 또는 양쪽 말단부에 라이게이션된다. 예를 들어, 문헌[Chang, et al. (1987) Proc. Nail. Acad. Sci. USA 84:4959- 4963]; 문헌[Nehls, et at (1996) Science 272:886-889]을 참조한다.

[0184] 일부 구현예에서, ssDNA에는 비오틴이 실질적으로 없다(예를 들어, 비오틴이 없다).

[0185] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 변형된 ssDNA는 동일한 서열의 비변형된 ssDNA와 비교하여, 숙주 조직 또는 대상체에서 DNA 센서에 의한 감소된 인식, 예를 들어 동일한 서열의 비변형된 ssDNA와 비교하여, 숙주 조직 또는 대상체에서 DNA 센서에 의해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상 감소된 인식을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 변형된 ssDNA는 동일한 서열의 비변형된 ssDNA와

비교하여, DNA 뉴클레아제에 의한 감소된 분해, 예를 들어 비변형된 ssDNA와 비교하여, 숙주 조직 또는 대상체에서 DNA 뉴클레아제에 의해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상 감소된 분해를 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 변형된 ssDNA는 동일한 서열의 비변형된 ssDNA와 비교하여, 표적/숙주 조직 또는 대상체에서 선천성 면역 시스템의 감소된 활성화, 예를 들어 동일한 서열의 비변형된 ssDNA와 비교하여, 표적/숙주 조직 또는 대상체에서 선천성 면역 시스템의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상 감소된 활성화를 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 변형된 ssDNA는 동일한 서열의 비변형된 ssDNA와 비교하여, 표적/숙주 조직 또는 대상체에서 하기 특성들 중 임의의 것을 나타낸다: 표적 세포의 게놈 내에서 외인성 작제물의 통합의 증가; 복제를 통한 표적 세포에서 유지의 증가; 2차 또는 3차 구조 형성의 증가; 선천성 면역 센서와의 상호작용 감소; 뉴클레아제와의 상호작용 감소; 안정성 향상; 수명 향상; 독성 감소; 전달 향상; 발현 증가; 제2 가닥 합성 증가; 막을 가로지르는 수송 증가; 또는 DNA 결합 모이어티, 예컨대 핵 DNA 결합 단백질, 전사 인자, 샤페론, DNA 중합효소에 대한 결합 증가. 구현예에서, 상기 열거된 특성들 중 임의의 것이 동일한 서열의 비변형된 ssDNA와 비교하여, 표적/숙주 조직 또는 대상체에서 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상 조절된다.

[0186] DNA 작제물의 구조

[0187] 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열은 적어도 약 20개의 뉴클레오티드, 적어도 약 30개의 뉴클레오티드, 적어도 약 40개의 뉴클레오티드, 적어도 약 50개의 뉴클레오티드, 적어도 약 75 뉴클레오티드, 적어도 약 100개의 뉴클레오티드, 적어도 약 200개의 뉴클레오티드, 적어도 약 300개의 뉴클레오티드, 적어도 약 500개의 뉴클레오티드, 적어도 약 1000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 2000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 3000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 4000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 5000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 6000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 7000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 8000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 9000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 10,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 20,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 30,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 40,000개의 뉴클레오티드, 적어도 약 50,000개의 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 ssDNA 작제물 또는 서열의 크기는 유용한 폴리펩티드 또는 RNA를 인코딩하기에 충분한 길이이다.

[0188] 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물은 원형, 예를 들어 공유결합으로 닫혀 있을 수 있다.

[0189] 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물은 임계 수준 미만의 분자내 상보성 또는 이중 가닥 구조를 가질 수 있다. 일 구현예에서, ssDNA는 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 영역을 50, 40, 30, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 7, 5, 4, 3, 2, 또는 1개를 초과하여 포함하지 않는다. 즉, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10개의 염기쌍보다 더 긴 분자내 상보성의 영역을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 21, 14, 15, 18, 또는 20개의 이중 가닥 영역을 포함하며, 예를 들어 여기서 이중 가닥 영역은 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10개 이하의 염기쌍이다. 일 구현예에서, ssDNA는 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 또는 20개의 염기쌍보다 더 긴 임의의 분자내 상보성의 영역을 포함하지 않는다. 예를 들어, ssDNA는 도기본(doggybone) 구조가 아니다. 즉, ssDNA는 주로 이중 가닥의, 말단부가 닫혀 있는 작제물이 아니다.

[0190] 일부 구현예에서, ssDNA는 100개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 80개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 60개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 50개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 45개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 40개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 35개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 30개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 25개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 20개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않는다. 일부 구현예에서, ssDNA는 세포에서 사이클릭 GMP-AMP 합성효소(cGAS)에 의해 인식되는 길이의 이중 가닥성을 포함하지 않는다. 이론에 구속되지 않고, cGAS는 외래 이중 가닥 DNA에 대한 선천 면역을 매개하는 것으로 여겨진다.

[0191] 일부 구현예에서, ssDNA는 제2 서열과 혼성화되는 제1 서열을 포함하지 않으며, 여기서 제1 서열 및 제2 서열은 적어도 5, 10, 15, 20, 또는 25 nt 길이이고, 제1 서열과 제2 서열은 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 미만의 뉴클레오티드만큼 서로 떨어져 위치한다.

[0192] 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA에 의해 형성된 이중 가닥 영역은 문헌[Xayaphoummine et al. 2005. *Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots*. Nucleic Acids Research, Volume 33:W605-610]에 의해 기재된 바와 같이 결정된다. 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 작제물의 이중 가닥 영역을 예측하는 데 Kinefold 웹사이트(http://kinefold.curie.fr/cgi-bin/form.pl)가 하기 파라미터를 사용하여 사용된다:

[0193] ● 접힘 대상 서열(Sequence to fold): "DNA sequence"를 입력하고 선택한다

[0194] ● 확률적 시뮬레이션(Stochastic Simulation): 공동 전사 접힘(Co-transcriptional fold), 3밀리초(3 milliseconds)

[0195] ● 시뮬레이션된 분자 시간(Simulated molecular time): 디폴트(default)

[0196] ● 유사매듭(Pseudoknots): 허용되지 않음(not allowed)

[0197] ● 얽힘(Entanglements): 교차하지 않음(non crossing)

[0198] ● 랜덤 시드(Random seed): 11453

[0199] 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA에 의해 형성된 이중 가닥 영역이 문헌[Lorenz et al. 2011. *ViennaRNA Package 2.0*. Algorithms for Molecular Biology, Volume 6, Article 26]에 기재된 바와 같이 결정된다. 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 작제물의 이중 가닥 영역을 예측하는 데 RNAFold 웹 서버(http://rna.tbi.univie.ac.at//cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi)가 하기 파라미터를 사용하여 사용된다:

[0200] ● 접힘 알고리즘 및 기본 옵션(Fold algorithms and basic options):

[0201] o 최소 자유 에너지(MFE) 및 파티션 기능(Minimum free energy (MFE) and partition function) (디폴트)

[0202] o 고립된 염기 쌍 방지(Avoid isolated base pairs) (디폴트)

[0203] ● 고급 접기 옵션(Advanced folding options):

[0204] o 임의의 경우에 나선의 양쪽에 매달린 에너지(Dangling energies on both sides of a helix in any case) (디폴트)

[0205] o DNA 파라미터(DNA parameters) (Matthews model, 2004)

[0206] o 모양 반응성의 변환 후 의사 에너지를 스택 쌍에 적용(After conversion of SHAPE reactivities, apply pseudo energies to: Stacked pairs)(Deigan et al., 2009) (디폴트)

[0207] o 기울기(m) = 1.9, 절편(b) = -0, 에너지 파라미터를 주어진 온도 = 3으로 재조정(Slope (m) = 1.9; intercept (b) = -0; rescale energy parameters to given temperature = 3) (디폴트)

[0208] o RNA 분자가 원형이라고 가정(Assume RNA molecule to be circular)

[0209] ● 출력 옵션(Output options)

[0210] o 대화형 RNA 2차 구조 플롯(Interactive RNA secondary structure plot) (디폴트)

[0211] o 신뢰도 주석이 있는 RNA 2차 구조 플롯(파티션 함수 접힘만 해당)(RNA secondary structure plots with reliability annotation (partition function folding only)) (디폴트)

[0212] o 산형 플롯(Mountain plot) (디폴트)

[0213] 예시적인, 공유결합으로 닫혀 있는 단일 가닥 DNA의 전산적 접힘(computational folding)이 도 16a 내지 도 16d에 나타나 있다. 이해되는 바와 같이, ssDNA는 유의한 수의 이중 가닥 영역, 예컨대 헤어핀을 갖는 것으로 예측할 수 있다. 그러나, 도 16a 내지 도 16d의 ssDNA는 이중 가닥 DNA가 길고 중단되지 않은 신장이 결여되어 있다. 더 구체적으로, 도 16a 내지 도 16d에서의 가장 긴 중단되지 않은 dsDNA 영역은 16개의 뉴클레오티드 길이 이하이다. 이 작제물은 100개의 염기쌍보다 더 긴 이중 가닥 구조를 형성하지 않을 것으로 예측되며; 오히려, 돌출부, 내부 루프, 및 다른 구조가 더 짧은 이중 가닥 영역들 사이에 배치된다.

[0214] 생산

[0215] 일반적으로, 본 발명의 ssDNA 작제물은 본 명세서에 기재된 원하는 요소들을 수용하도록 조립된 플라스미드로부

터 생산된다. 플라스미드 주형은 원-포트(one-pot) 조립 절차를 사용하여 수용 벡터(recipient vector) 내에서 규정된 선형 순서대로 다수의 DNA 단편의 조립을 위해 Golden Gate 클로닝을 사용하여 조립될 수 있다. Golden Gate 클로닝은 문헌[Marillonnet & Grützner, 2020, *Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline*, Current Protocols in Molecular Biology, 130:e115]에 기재되어 있다. 이어서, 주형을 사용하여, 예를 들어 문헌[Minev et al., 2019, *Rapid in vitro production of single-stranded DNA*, Nucleic Acids Research, Volume 47, Issue 22:11956-11962]에 기재된 바와 같이 Methanol Responsive(MeRPy) PCR을 사용하여 단일 가닥 DNA를 제조한다. ssDNA가 원형인 구현예의 경우, 생성된 ssDNA는, 예를 들어 DNA 리가제를 사용하여 원형화될 수 있다. 예시적인 생산 공정의 계략도가 도 2에 나타나 있다.

[0216] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법 또는 조성물은 닉킹 엔도뉴클레아제를 수반한다. 일부 구현예에서, 엔도뉴클레아제는 자연 발생적이다. 일부 구현예에서, 엔도뉴클레아제는 돌연변이되거나 조작되며, 예를 들어 이중 가닥 절단을 야기하는 효소로부터 유래된다.

[0217] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 Nb.BsrDI의 사용을 포함하거나, 본 명세서에 기재된 조성물은 이를 포함한다. 일부 구현예에서, Nb.BsrDI는 바실루스 스테아로테르모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) D70로부터의 BsrDI 제한 유전자의 큰 하위단위, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, Nb.BsrDI는 Genbank 수탁 번호 ABD15132.1(이는 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨)에 따른 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, Nb.BsrDI는 서열번호 31 및 32로 각각 지정된 하기 서열에 나타낸 부위를 절단한다:

[0218]
```
5′...GCAATGNN...3′
3′...CGTTACNN...5′
```

[0219] 일부 구현예에서, Nb.BsrDI를 이용하는 분해 반응은 rCutSmart™ 완충액(NEB) 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 아세트산칼륨(예를 들어, 50 mM), Tris-아세테이트(예를 들어, 20 mM), 아세트산마그네슘(예를 들어, 10 mM), 또는 재조합 알부민(예를 들어, 100 μg/ml) 중 하나 이상(예를 들어, 전부)을 포함하는 완충액 중에서 수행되며, 여기서 선택적으로, 완충액은 25℃에서 측정될 때 pH = 7.9이다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 30℃ 내지 70℃(예를 들어, 약 37℃ 또는 약 65℃)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 10분 내지 3시간(예를 들어, 약 30분 또는 약 1시간) 동안 수행된다.

[0220] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 Nb.Bpu10I의 사용을 포함하거나, 본 명세서에 기재된 조성물은 이를 포함한다. 일부 구현예에서, Nb.Bpu10I는 바실루스 푸밀루스(*Bacillus pumilus*) RFL10로부터의 야생형 bpu10IRα 또는 돌연변이 유발된 bpu10IRβ 유전자에 의해 인코딩된 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, Nb.Bpu10I는 서열번호 33 및 34로 각각 지정된 하기 서열에 나타낸 부위를 절단한다:

[0221]
```
5′ C C T N A G C 3′
3′ G G A N T↑C G 5′
```

[0222] 일부 구현예에서, Nb.Bpu10I를 이용하는 분해 반응은 R Buffer(ThermoFisher Scientific) 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 Tris-HCl(예를 들어, 10 mM), $MgCl_2$(예를 들어, 10 mM), KCl(예를 들어, 100 mM), 및 BSA(예를 들어, 0.1 mg/mL) 중 하나 이상(예를 들어, 전부)을 포함하는 완충액 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 30℃ 내지 50℃(예를 들어, 약 37℃)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 30분 내지 3시간(예를 들어, 약 1시간) 동안 수행된다.

[0223] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 Nt.BspQI의 사용을 포함하거나, 본 명세서에 기재된 조성물은 이를 포함한다. 일부 구현예에서, Nt.BspQI는 BspQI 제한 효소로부터의 조작된 BspQI 변이체, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, Nt.BspQI는 서열번호 35 및 36으로 각각 지정된 하기 서열에 나타낸 부위를 절단한다:

[0224]


[0225] 일부 구현예에서, Nt.BspQI를 이용하는 분해 반응은 NEBuffer™ r3.1(NEB) 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 NaCl(예를 들어, 100 mM), Tris-HCl(예를 들어, 50 mM), $MgCl_2$(예를 들어, 10 mM), 재조합 알부민(예를 들어, 100 μg/mL) 중 하나 이상(예를 들어, 전부)을 포함하는 완충액 중에서 수행되며, 여기서 선택적으로, 완충액은 25℃에서 측정될 때 pH = 7.9이다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 40℃ 내지 60℃(예를 들어, 약 50℃)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 30분 내지 3시간(예를 들어, 약 1시간) 동안 수행된다.

[0226] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 T7 엑소뉴클레아제의 사용을 포함하거나, 본 명세서에 기재된 조성물은 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T7 엑소뉴클레아제를 이용하는 분해 반응이 NEBuffer™ 4(NEB) 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 아세트산칼륨(예를 들어, 50 mM), Tris-아세테이트(예를 들어, 20 mM), 아세트산마그네슘(예를 들어, 10 mM), 또는 DTT(예를 들어, 1 mM) 중 하나 이상(예를 들어, 전부)을 포함하는 완충액 중에서 수행되며, 여기서 선택적으로, 완충액은 25℃에서 측정될 때 pH = 7.9이다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 20℃ 내지 50℃(예를 들어, 약 25℃ 또는 약 37℃)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 15 내지 120분, 예를 들어 20 내지 60분, 예를 들어 약 30분 동안 수행된다.

[0227] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 T5 엑소뉴클레아제의 사용을 포함하거나, 본 명세서에 기재된 조성물은 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T5 엑소뉴클레아제를 이용하는 분해 반응이 NEBuffer™ 4(NEB) 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 아세트산칼륨(예를 들어, 50 mM), Tris-아세테이트(예를 들어, 20 mM), 아세트산마그네슘(예를 들어, 10 mM), 또는 DTT(예를 들어, 1 mM) 중 하나 이상(예를 들어, 전부)을 포함하는 완충액 중에서 수행되며, 여기서 선택적으로, 완충액은 25℃에서 측정될 때 pH = 7.9이다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 30℃ 내지 50℃(예를 들어, 약 37℃)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 10분 내지 3시간(예를 들어, 약 30분) 동안 수행된다.

[0228] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 엑소뉴클레아제 III의 사용을 포함하거나, 본 명세서에 기재된 조성물은 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 엑소뉴클레아제 III을 이용하는 분해 반응이 NEBuffer™ 1(NEB) 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 비스-Tris-프로판-HCl(예를 들어, 10 mM), $MgCl_2$(예를 들어, 10 mM), 또는 DTT(예를 들어, 1 mM) 중 하나 이상(예를 들어, 전부)을 포함하는 완충액 중에서 수행되며, 여기서 선택적으로, 완충액은 25℃에서 측정될 때 pH = 7이다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 30℃ 내지 50℃(예를 들어, 약 37℃)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 10분 내지 3시간(예를 들어, 약 30분) 동안 수행된다.

[0229] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 고신뢰성 DNA 중합효소, 예를 들어 Q5 고신뢰성 DNA 중합효소(M0491L, New England Biolabs)의 사용을 포함하거나, 본 명세서에 기재된 조성물은 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 중합효소 연쇄 반응이 고신뢰성 DNA 중합효소를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, Q5 고신뢰성 DNA 중합효소를 이용하는 중합효소 연쇄 반응은 Q5 반응 완충액(NEB)을 사용하여 수행된다.

[0230] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 엑소뉴클레아제 I의 사용을 포함하거나, 본 명세서에 기재된 조성물은 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 엑소뉴클레아제 I은 E. 콜리 NM554로부터의 Exo I 유전자의 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 엑소뉴클레아제 I은 (예를 들어, 3'에서 5'으로의 방향으로의) 선형 단일 가닥 DNA으로부터의 뉴클레오티드의 제거를 촉매한다. 일부 구현예에서, 엑소뉴클레아제 I을 이용하는 분해 반응이 엑소뉴클레아제 I 반응 완충액(NEB) 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 글리신-KOH(예를 들어, 67 mM), 또는 $MgCl_2$(예를 들어, 6.7 mM), β-ME(예를 들어, 10 mM)를 포함하는 완충액 중에서 수행되며, 여기서 선택적으로, 완충액은 25℃에서 측정될 때 pH = 9.5이다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 30℃ 내지 50℃(예를 들어, 약 37℃)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 분해 반응은 10분 내지 3시간(예를 들어, 약 30분) 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 원형 ssDNA는 엑소뉴클레아제 I에 의한 분해에 대해 저항성을 나타낸다.

[0231] 일부 구현예에서, 본 명세서에 제공된 원형화 방법의 원형화 효율은 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 그 이상이다.

[0232] ssDNA 또는 원형, 예를 들어 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA는 불순물 또는 부산물로부터 농축 또는 정제될 수

있으며, 이는 내독소, 모노뉴클레오티드, 변형된 모노뉴클레오티드, 이중 가닥 DNA, (원형 산물을 위한) 선형 DNA, 단백질(예를 들어, 효소, 예를 들어 리가제, 제한 효소), DNA 단편 또는 절단체로 구성되는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 정제된 ssDNA에는 공정 부산물 및 불순물, 예를 들어 본 명세서에 기재된 공정 부산물 또는 불순물이 실질적으로 없다.

[0233] ssDNA 또는 원형, 예를 들어 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA는 원하는 설계된 서열을 확인하기 위해 서열분석될 수 있다. 구현예에서, ssDNA의 다른 구조 분석(예를 들어, 제한 효소 분석)이 그의 서열을 확인 또는 검증하기 위해 수행될 수 있다.

[0234] 순도

[0235] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA를 포함하는 조성물은 특정 순도를 갖는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조성물 내의 총 DNA의 질량 기준으로 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%는 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA일 수 있다. 한 예로서, 조성물은, 예를 들어 오염물로서 선형 DNA 또는 원형 dsDNA를 또한 포함할 수 있다.

[0236] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조성물(예를 들어, 원형 ssDNA를 포함하는 조성물, 예를 들어 원형 ssDNA를 포함하는 약제학적 조성물 또는 원형 ssDNA를 포함하는 제조 중간체)에는, 예를 들어 이 섹션에 기재된 바와 같은 하나 이상의 오염물이 없거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법(예를 들어, 원형 ssDNA의 제조 방법)은, 예를 들어 이 섹션에 기재된 바와 같은 하나 이상의 오염물이 없거나 실질적으로 없는 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법(예를 들어, 원형 ssDNA의 제조 방법)은, 예를 들어 이 섹션에 기재된 바와 같은 하나 이상의 오염물을 검정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 배치(batch)에 오염물이 없거나 실질적으로 없다면 배치를 승인하거나 출시하는 단계를 포함한다.

[0237] 일부 구현예에서, 오염물은 비인간 동물 혈청(예를 들어, 소태아 혈청); 효소, 예를 들어 리가제, 중합효소, 또는 분해 효소(digestive enzyme)(예를 들어, 트립신, 콜라게나제, DNase, RNase, 엑소뉴클레아제, 또는 엔도뉴클레아제, 예를 들어 제한 엔도뉴클레아제); 성장 인자; 사이토카인; 항체(예를 들어, 단일클론 항체); 비드(예를 들어, 항체-코팅된 비드); 항생제; 세포 배양 배지; 세포 배양 배지의 성분; 세제(detergent); 단백질, 예를 들어 숙주 세포 단백질; 외래 핵산 서열(예를 들어, 모노뉴클레오티드(예를 들어, 변형된 모노뉴클레오티드), 또는 DNA 단편 또는 절단체; 헬퍼 바이러스 오염물(예를 들어, 감염성 바이러스, 바이러스 DNA, 또는 바이러스 단백질); 또는 용매; 세포 잔해; 세포; 발열원(pyrogen); 진균; 또는 이들의 임의의 조합, 또는 이들 중 임의의 것의 일부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 오염물은 제조 공정 동안 도입된 성분이었다.

[0238] 일부 구현예에서, 오염물은 전염성 해면상 뇌병증(TSE)에 대한 작용인자(agent)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제조 시에 태아 재료가 사용된 조성물에 대해 이 오염물에 대한 검사가 수행된다.

[0239] 일부 구현예에서, 오염물은 동물원성 바이러스, 돼지 써코바이러스(circovirus) 1, 돼지 써코바이러스 2, 또는 돼지 파르보바이러스; 또는 이들의 임의의 조합, 또는 이들 중 임의의 것의 일부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 제조 시에 비인간 동물 재료, 예를 들어 돼지 재료가 사용된 조성물에 대해 이 오염물에 대한 검사가 수행된다.

[0240] 일부 구현예에서, 오염물은 바이러스 또는 이의 일부분, 예를 들어 인간 바이러스; 인간 면역결핍 바이러스(HIV); HIV-1; HIV-2; B형 간염 바이러스(HBV); C형 간염 바이러스(HCV); 인간 TSE(크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD); 변이체 CJD(vCJD)를 포함함); 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*)(매독); 인간 T-림프영양성 바이러스(HTLV), HTLV-1, HTLV-2; 또는 거대세포바이러스, 인간 헤르페스바이러스(예를 들어, 인간 헤르페스바이러스 -6, -7 또는 -8 (HHV-6, -7 및 -8)), JC 바이러스, BK 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV), 인간 파르보바이러스 B19, 인간 유두종 바이러스(HPV); 아데노바이러스, 예를 들어 아데노바이러스 E1; SV40 큰 T 항원 서열; HPV E6 또는 E7 DNA; 또는 이들의 임의의 조합, 또는 이들 중 임의의 것의 일부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 제조 시에 인간 공여자 세포(예를 들어, 백혈구-풍부 세포)가 사용된 조성물에 대해 이 오염물에 대한 검사가 수행된다. 일부 구현예에서, 세포 뱅크에 대해 이 오염물에 대한 검사가 수행된다.

[0241] 일부 구현예에서, 오염물은 미생물 또는 이의 일부분; 세균(예를 들어, 그람-음성 세균); 미코플라스마; 스피로플라스마(예를 들어, 곤충 세포가 사용될 때); 세균 독소(예를 들어, 내독소); 또는 외래성 작용인자, 예를 들어 외래성 바이러스성 작용인자 또는 외래성 비-바이러스성 작용인자, 또는 이들의 임의의 조합, 또는 이들 중 임의의 것의 일부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 오염물은 시미안 바이러스, 예를 들어 시미안 폴리오마바이

러스 SV40 또는 시미안 레트로바이러스, 또는 이들의 임의의 조합, 또는 이들 중 임의의 것의 일부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 오염물은 아르보바이러스를 포함한다. 일부 구현예에서, 오염물은 박테리오파지를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 뱅크, 예를 들어 세균 세포의 세포 뱅크에 대해 이 오염물에 대한 검사가 수행된다.

[0242] 일부 구현예에서, 오염물은 숙주 세포 유래의 DNA를 포함하며, 예를 들어 여기서 숙주 세포는 비종양원성 세포이다. 일부 구현예에서, DNA는 10 ng/용량 미만의 수준으로 존재한다. 일부 구현예에서, DNA 크기는 약 200개 미만의 뉴클레오티드 길이이다.

[0243] 일부 구현예에서, 오염물은 내독소이다. 일부 구현예에서, 내독소의 수준은 5 내독소 단위(EU)/kg 체중/hr 미만이며, 예를 들어 여기서 조성물은 비경구 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 내독소의 수준은 0.2 EU/kg 체중/hr 미만이며, 예를 들어 여기서 조성물은 수강내 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 내독소의 수준은 2.0 EU/용량/눈 이하이며, 예를 들어 여기서 조성물은 눈 안으로의 매식용 또는 주사용으로 제형화되거나, 0.5 EU/mL 이하이며, 예를 들어 여기서 조성물은 안구내(intraocular) 투여용으로 제형화된다.

[0244] 일부 구현예에서, 오염물은 유기 용매, 예를 들어 방향족 유기 용매, 예를 들어 페놀 또는 클로로포름을 포함한다.

[0245] 일부 구현예에서, 오염물은 문헌[*Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) - Guidance for Industry* (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, January 2020)]에 기재된 오염물이며, 이는 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0246] 일부 구현예에서, 조성물에는 중합효소가 실질적으로 없다(예를 들어, 중합효소가 없다). 일부 구현예에서, 조성물에는 회전환 증폭을 수행하는 중합효소가 실질적으로 없다(예를 들어, 회전환 증폭을 수행하는 중합효소가 없다). 일부 구현예에서, 조성물에는 LNP가 실질적으로 없다(예를 들어, LNP가 없다). 일부 구현예에서, 조성물에는 나노입자가 실질적으로 없다(예를 들어, 나노입자가 없다).

[0247] 일부 구현예에서, 조성물에는 아가로스가 실질적으로 없다(예를 들어, 아가로스가 없다). 일부 구현예에서, 조성물에는 아크릴아미드가 실질적으로 없다(예를 들어, 아크릴아미드가 없다).

[0248] 일부 구현예에서, 조성물에는 폴리펩티드가 실질적으로 없다(예를 들어, 폴리펩티드가 없다).

[0249] 일부 구현예에서, 조성물 내의 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA의 분자 대 다른 DNA 분자의 수의 비는 적어도 10:1, 20:1, 50:1, 80:1, 90:1, 100:1, 200:1, 500:1, 또는 1000:1이다. 일부 구현예에서, 조성물에는 숙주 세포 유래의 DNA가 실질적으로 없으며, 예를 들어 DNA는 10 ng/용량 미만의 수준으로 존재한다. 일부 구현예에서, 조성물에는 약 200개 미만의 뉴클레오티드 길이의 크기를 갖는 DNA가 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 조성물에는 개별 뉴클레오티드가 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 조성물 내의 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA 대 dsDNA의 비는 적어도 100:1, 200:1, 500:1, 또는 1000:1이다. 일부 구현예에서, 조성물 내의 DNA의 질량 기준으로(또는 카피수 기준으로) 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%는 전장이다.

[0250] 약제학적 조성물

[0251] 본 개시 내용은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 담체와 배합된 ssDNA 및 관련 조성물을 포함한다.

[0252] 약제학적 조성물은 선택적으로 하나 이상의 추가의 활성 물질, 예를 들어 치료적으로 그리고/또는 예방적으로 활성인 물질을 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 일반적으로 멸균성 및/또는 무발열성(pyrogen-free)이다.

[0253] 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 담체 없이 제형화될 수 있으며, 예를 들어 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 숙주 세포, 조직 또는 대상체에게 "네이키드(naked)" 상태로 투여될 수 있다. 네이키드 제형은 약제학적 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있지만, 담체는 결여되어 있다.

[0254] 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 희석제는 본 명세서에 기재된 조성물을 위한 비히클 또는 매질로서의 역할을 하는 불활성 물질, 예컨대 미국 식약청(United States Food and Drug Administration, FDA)에 의해 승인되고 Inactive Ingredient Database(이는 본 명세서에 참고로 포함됨)에 열거된 불활성 성분들 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 희석제의 비제한적인 예에는 용매, 수성 용매, 비수성 용매, 장성제(tonicity agent), 분산 매질, 동결방지제, 희석제, 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장제, 증점화제,

유화제, 방부제, 하이알루로니다제, 분산제, 방부제, 윤활제, 과립화제, 붕해제, 결합제, 산화방지제, 완충제(예를 들어, 인산염 완충 식염수(PBS)), 윤활제, 오일, 및 이들의 혼합물이 포함된다.

[0255] 약제학적 작용제의 제형화 및/또는 제조에서의 일반적인 고려사항은, 예를 들어 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005](본 명세서에 참고로 포함됨)에서 찾아볼 수 있다.

[0256] *담체*

[0257] 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 또한 담체를 사용하여 제형화될 수 있거나, 포함될 수 있다. 담체 및 약제학적 작용제의 전달에 대한 일반적인 고려사항은, 예를 들어 문헌[Delivery Technologies for Biopharmaceuticals: Peptides, Proteins, Nucleic Acids and Vaccines (Lene Jorgensen and Hanne Morck Nielson, Eds.) Wiley; 1st edition (December 21, 2009)]; 및 문헌[Vargason et al. 2021. Nat Biomed Eng 5, 951-967]에서 찾아볼 수 있다.

[0258] 담체의 비제한적인 예에는 탄수화물 담체(예를 들어, 무수물-변형된 피토글리코겐 또는 글리코겐-유형 물질, GalNAc), 나노입자(예를 들어, ssDNA를 캡슐화하거나 이것에 공유결합으로 연결된 나노입자, 금 나노입자, 실리카 나노입자), 지질 입자(예를 들어, 리포좀, 지질 나노입자), 양이온성 담체(예를 들어, 양이온성 리포중합체 또는 형질감염 시약), 푸소좀, 무핵 세포(예를 들어, 생체외(*ex vivo*) 분화된 망상적혈구), 유핵 세포, 엑소좀, 단백질 담체(예를 들어, ssDNA에 공유결합으로 연결된 단백질), 펩티드(예를 들어, 세포-침투 펩티드), 재료(예를 들어, 산화그래핀), 단일 순수 지질(예를 들어, 콜레스테롤), DNA 오리가미(origami)(예를 들어, DNA 사면체)가 포함된다.

[0259] 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 조성물, 작제물 및 시스템은 리포좀 또는 다른 유사한 소포(vesicle) 내에 제형화될 수 있다. 리포솜은 내부 수성 구획을 둘러싸고 있는 단층 또는 다층 지질 이중층 및 상대적으로 불침투성인 외부 친유성 인지질 이중층으로 구성된 구형의 소낭 구조이다. 리포솜은 음이온성, 중성 또는 양이온성일 수 있다. 리포솜은 생체 적합성이고 비독성이며, 친수성과 친유성 약물 분자를 둘 모두 전달할 수 있으며, 이들의 카고를 혈장 효소에 의한 분해로부터 보호하고, 생물학적 멤브레인 및 혈액 뇌 장벽(BBB)을 가로질러 이들의 적재물을 수송한다(예를 들어, 검토를 위한 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조).

[0260] 소낭은 몇몇 상이한 유형의 지질로부터 제조될 수 있지만; 인지질은 약물 담체로서 리포솜을 생성하는 데 가장 흔하게 사용된다. 다층 소낭 지질을 제조하기 위한 방법이 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 6,693,086을 참조하며, 다층 소낭 지질 제제에 관한 이의 교시내용은 본 명세서에 참조로 포함됨). 지질 필름이 수용액과 혼합되는 경우에 소낭 형성이 자발적으로 일어날 수 있지만, 이는 또한 균질기, 초음파 분쇄기, 또는 압출 장치를 사용함으로써 진탕 형태로 힘을 인가함으로써 촉진될 수 있다(예를 들어, 검토를 위한 문헌[Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679] 참조). 압출된 지질은 문헌[Templeton et al., Nature Biotech, 15: 647-652, 1997]에 기재된 바와 같이 크기가 감소하는 필터를 통해 압출시킴으로써 제조될 수 있으며, 압출된 지질 제제에 관한 교시내용은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0261] 엑소좀이 또한 본 명세서에 기재된 조성물 및 시스템을 위한 약물 전달 비히클로서 사용될 수 있다. 검토를 위해, 문헌[Ha et al. July 2016. Acta Pharmaceutica Sinica B. Volume 6, Issue 4, Pages 287-296]; https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001을 참조한다.

[0262] 생체외 분화된 적혈구가 또한 본 명세서에 기재된 작용제(예를 들어, ssDNA)를 위한 담체로서 사용될 수 있다. 예를 들어, WO2015073587; WO2017123646; WO2017123644; WO2018102740; WO2016183482; WO2015153102; WO2018151829; WO2018009838; 문헌[Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136]; 미국 특허 9,644,180; 문헌[Huang et al. 2017. Nature Communications 8: 423]; 문헌[Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136]을 참조한다.

[0263] 푸소좀 조성물, 예를 들어 WO2018208728에 기재된 바와 같은 것이 또한 본 명세서에 기재된 ssDNA를 전달하기 위한 담체로서 사용될 수 있다.

[0264] *지질 나노입자:*

[0265] 지질 나노입자(LNP)는 이온화 가능한 지질로 제조된 담체이다. LNP는 세포내이입을 통해 세포에 의해 흡수되며,

이들의 특성은 엔도솜 탈출을 가능하게 하고, 이는 표적 세포의 세포질 내로의 카고 방출을 가능하게 한다. 이온화 가능한 지질에 추가하여, LNP는 세포 결합을 촉진시키기 위해 헬퍼 지질을 함유하고/하거나, 지질들 사이의 갭을 충전하기 위해 콜레스테롤을 함유하고/하거나, 혈청 단백질에 의한 옵소닌화 및 세망내피계 클리어런스를 감소시키기 위해 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자는 하나 이상의 이온성 지질, 예컨대 비양이온성 지질(예를 들어, 중성 또는 음이온성, 또는 쯔비터이온성 지질); 하나 이상의 접합된 지질(예컨대, PEG-접합된 지질 또는 WO2019217941(이는 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨)의 표 5에 기재된 중합체에 접합된 지질); 하나 이상의 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤); 및, 선택적으로, 하나 이상의 표적화 분자(예를 들어, 접합된 수용체, 수용체 리간드, 항체); 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0266] 나노입자 형성에 사용될 수 있는 지질(예를 들어, 지질 나노입자)은 예를 들어 참조로 포함되는 WO2019217941의 표 4에 기재된 것을 포함하며, 예를 들어 지질-함유 나노입자는 WO2019217941의 표 4의 지질 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 지질 나노입자는 추가적인 요소, 예컨대 중합체, 예컨대 참조로 포함되는 WO2019217941의 표 5에 기재된 중합체를 포함할 수 있다.

[0267] 일부 구현예에서, 접합된 지질은 존재하는 경우 PEG-디아실글리세롤(DAG)(예컨대, 1-(모노메톡시-폴리에틸렌글리콜)-2,3-디미리스토일글리세롤(PEG-DMG)), PEG-디알킬옥시프로필(DAA), PEG-인지질, PEG-세라미드(Cer), 페길화 포스파티딜에탄올로아민(PEG-PE), PEG 석시네이트 디아실글리세롤(PEGS-DAG)(예컨대, 4-O-(2',3'-디(테트라데카노일옥시)프로필-1-O-(w-메톡시(폴리에톡시)에틸)부탄디오에이트(PEG-S-DMG)), PEG 디알콕시프로필카르밤, N-(카르보닐-메톡시폴리에틸렌 글리콜 2000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 나트륨 염, 및 WO2019051289의 표 2에 기재된 것(참조로 포함됨), 및 전술한 것들의 조합 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

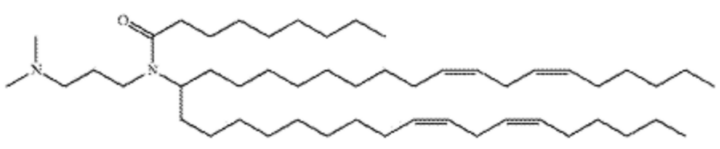
[0268] 일부 구현예에서, 지질 나노입자 내로 혼입될 수 있는 스테롤은 하나 이상의 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 유도체, 예를 들어 참조로 포함되는 WO2009/127060 또는 US2010/0130588에 있는 것을 포함한다. 추가의 예시적인 스테롤은 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Eygeris et al (2020), dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386]에 기재된 것을 포함하는 피토스테롤을 포함한다.

[0269] 일부 구현예에서, 지질 입자는 이온화 가능한 지질, 비양이온성 지질, 입자의 응집을 저해하는 접합된 지질 및 스테롤을 포함한다. 이들 구성성분의 양은 원하는 특성을 달성하기 위해 독립적으로 달라질 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 지질 나노입자는 총 지질의 약 20 내지 약 90 몰%의 양의 이온화 가능한 지질(다른 구현예에서는 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 20 내지 70%(몰), 30 내지 60%(몰) 또는 40 내지 50%(몰); 약 50 몰% 내지 약 90 몰%일 수 있음), 총 지질의 약 5 몰% 내지 약 30 몰%의 양의 비양이온성 지질, 총 지질의 약 0.5 몰% 내지 약 20 몰%의 양의 접합된 지질, 및 총 지질의 약 20 몰% 내지 약 50 몰%의 양의 스테롤을 포함한다. 총 지질 대 핵산의 비율은 원하는 바와 같이 다양할 수 있다. 예를 들어, 총 지질 대 핵산(질량 또는 중량) 비율은 약 10:1 내지 약 30:1일 수 있다.

[0270] 일부 구현예에서, 지질 대 핵산 비율(질량/질량 비율; w/w 비율)은 약 1:1 내지 약 25:1, 약 10:1 내지 약 14:1, 약 3:1 내지 약 15:1, 약 4:1 내지 약 10:1, 약 5:1 내지 약 9:1, 또는 약 6:1 내지 약 9:1의 범위일 수 있다. 지질 및 핵산의 양은 원하는 N/P 비율, 예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 N/P 비율을 제공하도록 조정될 수 있다. 일반적으로, 지질 나노입자 제형의 전체 지질 함량은 약 5 mg/ml 내지 약 30 mg/mL의 범위일 수 있다.

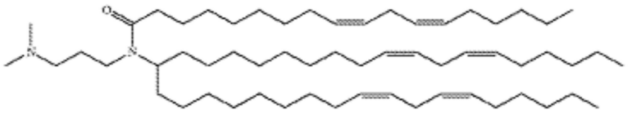
[0271] 본 명세서에 기재된 조성물, 예를 들어 본 명세서에 기재된 핵산(예를 들어, RNA)의 전달을 위한 지질 나노입자를 형성하기 위해 (예를 들어, 다른 지질 성분과 조합하여) 사용될 수 있는 지질 화합물의 일부 비제한적인 예에는 하기가 포함된다:

[0272] [화학식 i]

[0273] 

[0274] 일부 구현예에서, 화학식 i을 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

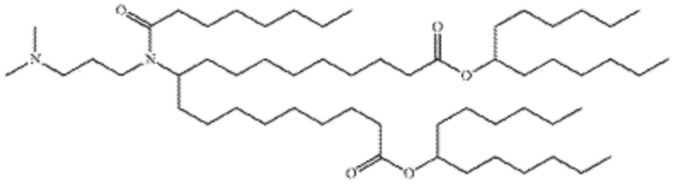
[0275] [화학식 ii]



[0276]

[0277] 일부 구현예에서, 화학식 ii를 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

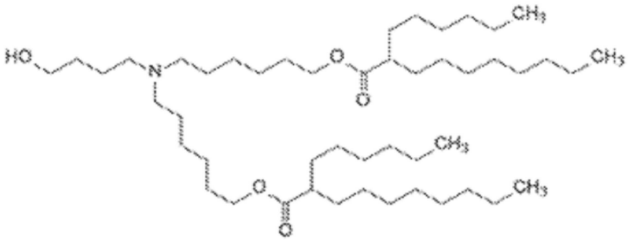
[0278] [화학식 iii]



[0279]

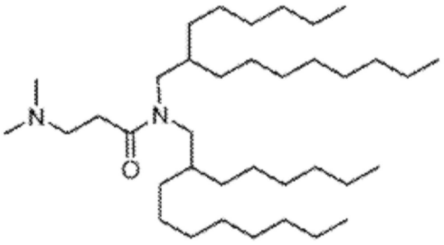
[0280] 일부 구현예에서, 화학식 iii을 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0281] [화학식 iv]



[0282]

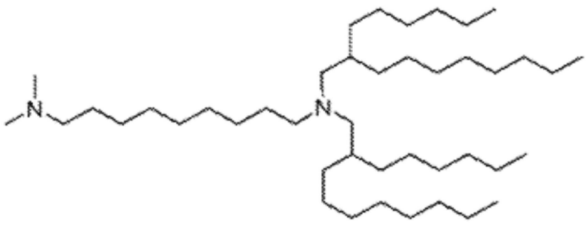
[0283] [화학식 v]



[0284]

[0285] 일부 구현예에서, 화학식 v를 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

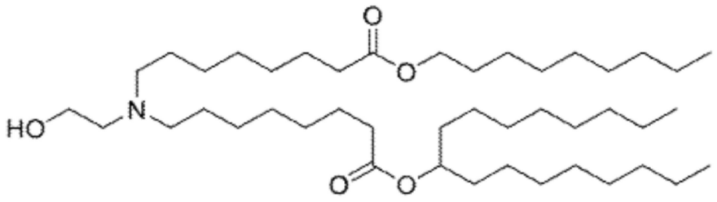
[0286] [화학식 vi]



[0287]

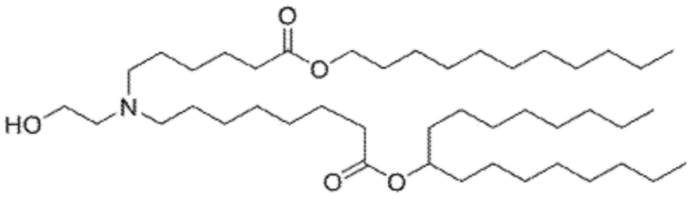
[0288] 일부 구현예에서, 화학식 vi을 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0289] [화학식 vii]



[0290]

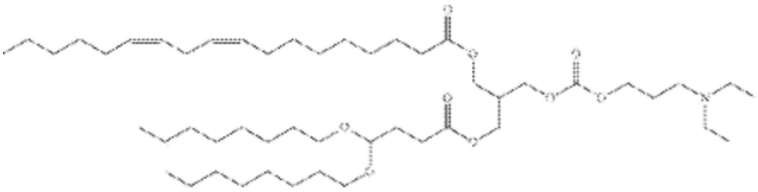
[0291] [화학식 viii]



[0292]

[0293] 일부 구현예에서, 화학식 vii 또는 화학식 viii을 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0294] [화학식 ix]

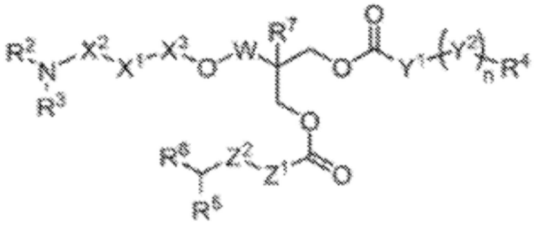


[0295]

[0296] 일부 구현예에서, 화학식 ix를 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0297] 일부 구현예에서, 화학식 x을 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

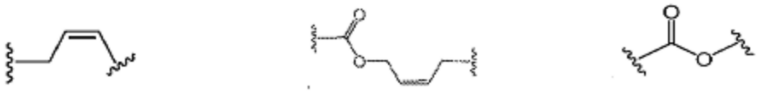
[0298] [화학식 x]



[0299]

[0300] (상기 식에서,

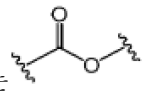
[0301] X^1은 O, NR^1, 또는 직접 결합이고, X^2는 C_{2-5} 알킬렌이고, X^3은 C(=O) 또는 직접 결합이고, R^1은 H 또는 Me이고, R^3은 C_{1-3} 알킬이고, R^2는 C_{1-3} 알킬이거나, R^2는 그것이 부착되어 있는 질소 원자 및 X^2의 1 내지 3개의 탄소 원자와 함께 결합하여 4원, 5원, 또는 6원 고리를 형성하거나, X^1은 NR^1이고, R^1과 R^2는 그들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 결합하여 5원 또는 6원 고리를 형성하거나, R^2는 R^3 및 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 결합하여 5원, 6원, 또는 7원 고리를 형성하고, Y^1은 C_{2-12} 알킬렌이고, Y^2는 하기로부터 선택되고:



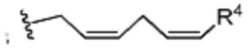
[0302]

[0303] (어느 배향이든), (어느 배향이든), (어느 배향이든),

[0304] n은 0 내지 3이고, R^4는 C_{1-15} 알킬이고, Z^1은 C_{1-6} 알킬렌 또는 직접 결합이고,

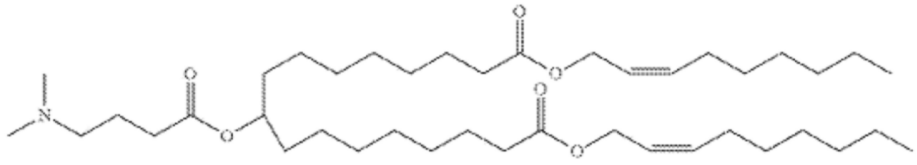
[0305] Z^2는  (어느 배향이든)이거나 부재하되, 단, Z^1이 직접 결합이면, Z^2는 부재하고;

[0306] R^5는 C_{5-9} 알킬 또는 C_{6-10} 알콕시이고, R^6은 C_{5-9} 알킬 또는 C_{6-10} 알콕시이고, W는 메틸렌 또는 직접 결합이고, R^7은 H 또는 Me, 또는 이의 염이되, 단, R^3 및 R^2가 C_2 알킬이고, X^1이 O이고, X^2가 선형 C_3 알킬렌이고, X^3이 C(=O)이고, Y^1이 선형 Ce 알킬렌이고, $(Y^2)_n$-R^4가

[0307] 

[0308] 이고, R^4가 선형 C_5 알킬이고, Z^1이 C_2 알킬렌이고, Z^2가 부재하고, W가 메틸렌이고, R^7이 H인 경우, R^5 및 R^6은 Cx 알콕시가 아님).

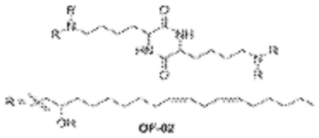
[0309] [화학식 xi]

[0310] 

[0311] 일부 구현예에서, 화학식 xi을 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

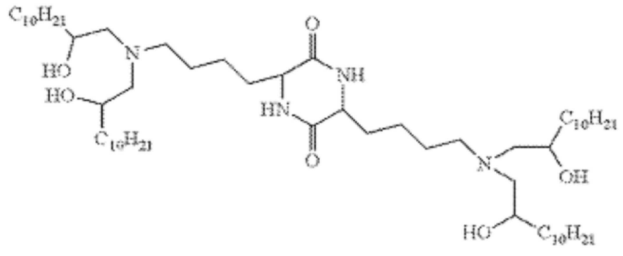
[0312] 일부 구현예에서, 화학식 xii를 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0313] [화학식 xii]

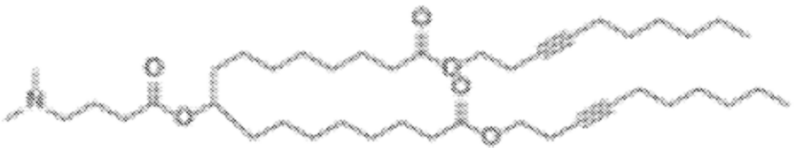
[0314] 

[0315] (여기서, R = )

[0316] [화학식 xiii]

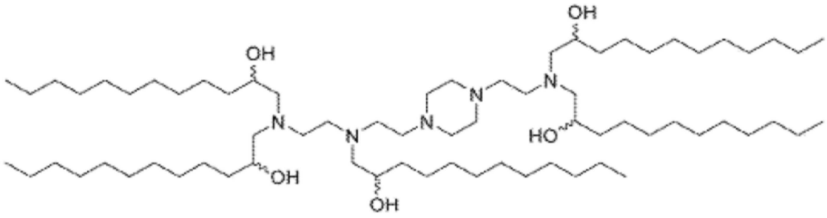
[0317] 

[0318] [화학식 xiv]

[0319] 

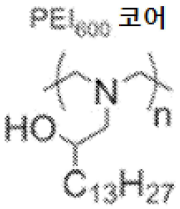
[0320] 일부 구현예에서, LNP는 화학식 xiii의 화합물 및 화학식 xiv의 화합물을 포함한다.

[0321] [화학식 xv]

[0322] 

[0323] 일부 구현예에서, 화학식 xv를 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 간 및/또는 간세포 세포에 전달하는 데 사용된다.

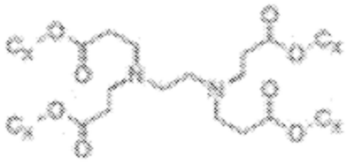
[0324] [화학식 xvi]

[0325] 

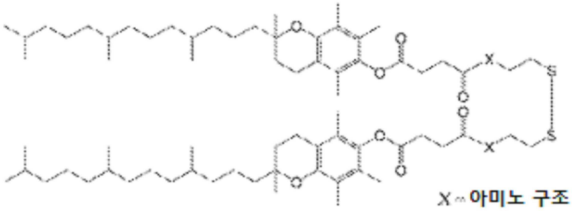
[0326] 일부 구현예에서, 화학식 xvi의 제형을 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 폐 내피 세포에 전달하는 데 사용된다.

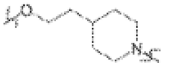
[0327] 일부 구현예에서, 화학식 xvii, 화학식 xviii 또는 화학식 xix의 제형을 포함하는 LNP가 본 명세서에 기재된 DNA 조성물을 폐 내피 세포에 전달하는 데 사용된다.

[0328] [화학식 xvii]

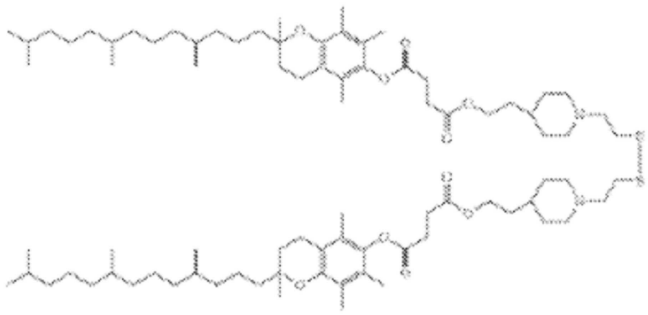
[0329] 

[0330] [화학식 xviii(a)]

[0331] 

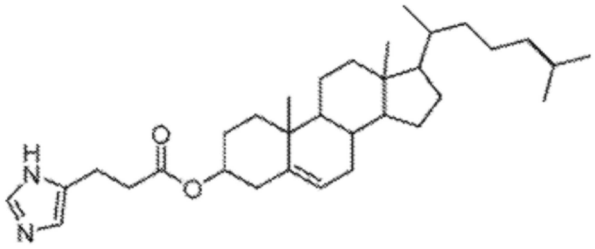
[0332] (여기서, X = )

[0333] [화학식 xviii(b)]



[0334]

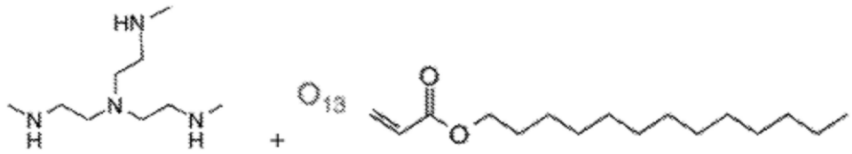
[0335] [화학식 xix]



[0336]

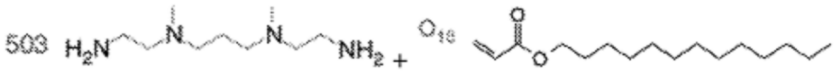
[0337] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조성물, 예를 들어 본 명세서에 기재된 핵산(예를 들어, RNA)의 전달을 위한 지질 나노입자를 형성하기 위해 사용되는 지질 화합물이 하기 반응들 중 하나에 의해 제조된다:

[0338] [화학식 xx(a)]



[0339]

[0340] [화학식 xx(b)]



[0341]

[0342] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조성물(예를 들어, 핵산 또는 단백질)은 이온화 가능한 지질을 포함하는 LNP로 제공된다. 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은, 예를 들어 US9,867,888(전문이 본 명세서에 참조로 포함됨)의 실시예 1에 기재된 바와 같은 헵타데칸-9-일 8-((2-하이드록시에틸)(6-옥소-6-(운데실옥시)헥실)아미노)옥타노에이트(SM-102)이다. 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어 WO2015/095340(전문이 본 명세서에 참조로 포함됨)의 실시예 13에서 합성된 바와 같은 9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트(LP01)이다. 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어 US2012/0027803(전문이 본 명세서에 참조로 포함됨)의 실시예 7, 8 또는 9에서 합성된 바와 같은 디((Z)-논-2-엔-1-일) 9-((4-디메틸아미노)부타노일)옥시)헵타데칸디오에이트(L319)이다. 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어 WO2010/053572(전문이 본 명세서에 참조로 포함됨)의 실시예 14 및 16에서 합성된 바와 같은 1,1'-((2-(4-(2-((2-(비스(2-하이드록시도데실)아미노)에틸)(2-하이드록시도데실)아미노)에틸)피페라진-1-일)에틸)아잔디일)비스(도데칸-2-올)(C12-200)이다. 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은 이미다졸 콜레스테롤 에스테르(ICE) 지질(3S, 10R, 13R, 17R)-10,13-디메틸-17-((R)-6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카하이드로-1H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-일 3-(1H-이미다졸-4-일)프로파노에이트, 예를 들어, WO2020/106946으로부터의 구조 (I)(전문이 본 명세서에 참조로 포함됨)이다.

[0343] 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은 양이온성 지질, 이온화 가능한 양이온성 지질, 예를 들어 pH에 따라 양으로 하전된 형태 또는 중성 형태로 존재할 수 있는 양이온성 지질, 또는 용이하게 양성자화될 수 있는 아민-함

유 지질일 수 있다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질은, 예를 들어 생리학적 조건 하에 양으로 하전될 수 있는 지질이다. 예시적인 양이온성 지질은 양전하를 갖는 하나 이상의 아민기(들)를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 입자는 하나 이상의 중성 지질, 이온화 가능한 아민-함유 지질, 생분해성 알킨 지질, 스테로이드, 고도불포화 지질을 포함하는 인지질, 구조적 지질(예를 들어, 스테롤), PEG, 콜레스테롤 및 중합체 접합된 지질과 제형화된 양이온성 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 양이온성 지질은 이온화 가능한 양이온성 지질일 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 예시적인 양이온성 지질은 6.0 초과의 유효 pKa를 가질 수 있다. 구현예에서, 지질 나노입자는 제1 양이온성 지질과 상이한 유효 pKa(예를 들어, 제1 유효 pKa 초과)를 갖는 제2 양이온성 지질을 포함할 수 있다. 지질 나노입자는 40 내지 60 몰 퍼센트의 양이온성 지질, 중성 지질, 스테로이드, 중합체 접합된 지질, 및 지질 나노입자 내에 캡슐화되거나 지질 나노입자와 회합된 치료제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 핵산(예를 들어, RNA)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 양이온성 지질과 공동-제형화된다. 핵산은 LNP, 예를 들어 양이온성 지질을 포함하는 LNP의 표면에 흡착될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 LNP, 예를 들어 양이온성 지질을 포함하는 LNP에 캡슐화될 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자는, 예를 들어 표적화제로 코팅된 표적화 모이어티를 포함할 수 있다. 구현예에서, LNP 제형은 생분해성이다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 지질, 예를 들어 화학식 I, ii, ii, vii 및/또는 ix을 포함하는 지질 나노입자는 RNA 분자의 적어도 1%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 100%를 캡슐화한다.

[0344] 지질 나노입자 제형에 사용될 수 있는 예시적인 이온화 가능한 지질은 제한 없이 본 명세서에 참조로 포함되는 WO2019051289의 표 1에 열거된 것을 포함한다. 추가의 예시적인 지질은 제한 없이 다음 화학식 중 하나 이상을 포함한다: US2016/0311759의 X; US20150376115 또는 US2016/0376224의 I; US20160151284의 I, II 또는 III; US20170210967의 I, IA, II, 또는 IIA; US20150140070의 I-c; US2013/0178541의 A; US2013/0303587 또는 US2013/0123338의 I; US2015/0141678의 I; US2015/0239926의 II, III, IV, 또는 V; US2017/0119904의 I; WO2017/117528의 I 또는 II; US2012/0149894의 A; US2015/0057373의 A; WO2013/116126의 A; US2013/0090372의 A; US2013/0274523의 A; US2013/0274504의 A; US2013/0053572의 A; WO2013/016058의 A; WO2012/162210의 A; US2008/042973의 I; US2012/01287670의 I, II, III, 또는 IV; US2014/0200257의 I 또는 II; US2015/0203446의 I, II, 또는 III; US2015/0005363의 I 또는 III; US2014/0308304의 I, IA, IB, IC, ID, II, IIA, IIB, IIC, IID, 또는 III-XXIV; US2013/0338210의; WO2009/132131의 I, II, III, 또는 IV; US2012/01011478의 A; US2012/0027796의 I 또는 XXXV; US2012/0058144의 XIV 또는 XVII; US2013/0323269의; US2011/0117125의 I; US2011/0256175의 I, II, 또는 III; US2012/0202871의 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII; US2011/0076335의 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV, 또는 XVI; US2006/008378의 I 또는 II; US2013/0123338의 I; US2015/0064242의 I 또는 X-A-Y-Z; US2013/0022649의 XVI, XVII, 또는 XVIII; US2013/0116307의 I, II, 또는 III; US2013/0116307의 I, II, 또는 III; US2010/0062967의 I 또는 II; US2013/0189351의 I-X; US2014/0039032의 I; US2018/0028664의 V; US2016/0317458의 I; US2013/0195920의 I; US10,221,127의 5, 6, 또는 10; WO2018/081480의 III-3; WO2020/081938의 I-5 또는 I-8; US9,867,888의 18 또는 25; US2019/0136231의 A; WO2020/219876의 II; US2012/0027803의 1; US2019/0240349의 OF-02; US10,086,013의 23; 문헌 [Miao et al (2020)]의 cKK-E12/A6; WO2010/053572의 C12-200; 문헌 [Dahlman et al (2017)]의 7C1; 문헌 [Whitehead et al]의 304-O13 또는 503-O13; US9,708,628의 TS-P4C2; WO2020/106946의 I; WO2020/106946의 I.

[0345] 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은 예를 들어 WO2019051289A9(전문이 본 명세서에 참조로 포함됨)의 실시예 9에 기재된 바와 같은 MC3(6Z,9Z,28Z,31Z)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노) 부타노에이트(DLin-MC3-DMA 또는 MC3)이다. 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은, 예를 들어 WO2019051289A9(전문이 본 명세서에 참조로 포함됨)의 실시예 10에 기재된 바와 같은 지질 ATX-002이다. 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은, 예를 들어 WO2019051289A9(전문이 본 명세서에 참조로 포함됨)의 실시예 11에 기재된 바와 같은 (13Z,16Z)-A,A-디메틸-3-노닐도코사-13,16-디엔-1-아민(화합물 32)이다. 일부 구현예에서, 이온화 가능한 지질은, 예를 들어 WO2019051289A9(전문이 본 명세서에 참조로 포함됨)의 실시예 12에 기재된 바와 같은 화합물 6 또는 화합물 22이다.

[0346] 예시적인 비양이온성 지질은 디스테아로일-sn-글리세로-포스포에탄올아민, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민(POPE), 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메

틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트(DOPE-mal), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 디미리스토일포스포에탄올아민(DMPE), 디스테아로일-포스파티딜-에탄올아민(DSPE), 모노메틸-포스파티딜에탄올아민(예컨대, 16-O-모노메틸 PE), 디메틸- 포스파티딜에탄올아민(예컨대, 16-O-디메틸 PE), 18-1-트랜스 PE, 1-스테아로일-2-올레오일-포스파티디에탄올아민(SOPE), 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 계란 포스파티딜콜린(EPC), 디올레오일포스파티딜세린(DOPS), 스핑고미엘린(SM), 디미리스토일 포스파티딜콜린(DMPC), 디미리스토일 포스파티딜글리세롤(DMPG), 디스테아로일포스파티딜글리세롤(DSPG), 디에루코일포스파티딜콜린(DEPC), 팔미토일올레이올포스파티딜글리세롤(POPG), 디엘라이도일-포스파티딜에탄올아민(DEPE), 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스핑고미엘린, 계란 스핑고미엘린(ESM), 세팔린, 카디오리핀, 포스파티드산, 세레브로사이드, 디세틸포스페이트, 리소포스파티딜콜린, 디리놀레오일포스파티딜콜린, 또는 이의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 디아실포스파티딜콜린 및 디아실포스파티딜에탄올아민 인지질이 또한 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 이들 지질에서 아실기는 바람직하게는 C10-C24 탄소 사슬을 갖는 지방산, 예를 들어 라우로일, 미리스토일, 파이미토일, 스테아로일 또는 올레오일로부터 유래된 아실기이다. 추가의 예시적인 지질은 특정 구현예에서, 제한 없이 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Kim et al. (2020) dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386]에 기재된 것을 포함한다. 이러한 지질은 일부 구현예에서, mRNA(예를 들어, DGTS)를 이용한 간 형질주입을 개선시키는 것으로 밝혀진 식물 지질을 포함한다.

[0347] 지질 나노입자에 사용하기에 적합한 비양이온성 지질의 다른 예는 제한 없이 비인 지질, 예를 들어 스테아릴아민, 도데일아민, 헥사데실아민, 아세틸 팔미테이트, 글리세롤 리시놀레에이트, 헥사데실 스테아레이트, 이소프로필 미리스테이트, 양쪽성 아크릴 중합체, 트리에탄올아민-라우릴 설페이트, 알킬-아릴 설페이트 폴리에틸옥실화 지방산 아미드, 디옥타데실 디메틸 암모늄 브로마이드, 세라마이드 및 스핑고미엘린 등을 포함한다. 다른 비양이온성 지질은 WO2017/099823 또는 미국 특허 공개공보 US2018/0028664에 기재되어 있으며, 그 내용은 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0348] 일부 구현예에서, 비양이온성 지질은 올레산 또는 전문이 본 명세서에 참조로 포함된 US2018/0028664의 화학식 I, II 또는 IV의 화합물이다. 비양이온성 지질은 예를 들어 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 0 내지 30%(몰)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 비양이온성 지질 함량은 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 5 내지 20%(몰) 또는 10 내지 15%(몰)이다. 일 구현예에서, 이온화 가능한 지질 대 중성 지질의 몰 비율은 약 2:1 내지 약 8:1(예를 들어, 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7: 1 또는 8:1)의 범위이다.

[0349] 일부 구현예에서, 지질 나노입자는 임의의 인지질을 포함하지 않는다.

[0350] 일부 양태에서, 지질 나노입자는 막 무결성을 제공하기 위해 스테롤과 같은 구성성분을 추가로 포함할 수 있다. 지질 나노입자에 사용될 수 있는 하나의 예시적인 스테롤은 콜레스테롤 및 이의 유도체이다. 콜레스테롤 유도체의 비제한적인 예는 극성 유사체, 예컨대 5a-초이에스타놀(choiestanol), 53-코프로스타놀, 초이에스테릴-(2'-하이드록시)-에틸 에테르, 초이에스테릴-(4'-하이드록시)-부틸 에테르 및 6-케토콜레스타놀; 비극성 유사체, 예컨대 5a-콜레스탄, 콜레스테논, 5a-콜레스타논, 5p-콜레스타논 및 콜레스테릴 데카노에이트; 및 이들의 혼합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 콜레스테롤 유도체는 극성 유사체, 예를 들어 초이에스테릴-(4'-하이드록시)-부틸 에테르이다. 예시적인 콜레스테롤 유도체는 PCT 공개공보 WO2009/127060 및 미국 특허 공개공보 US2010/0130588에 기재되어 있으며, 이들 각각은 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.

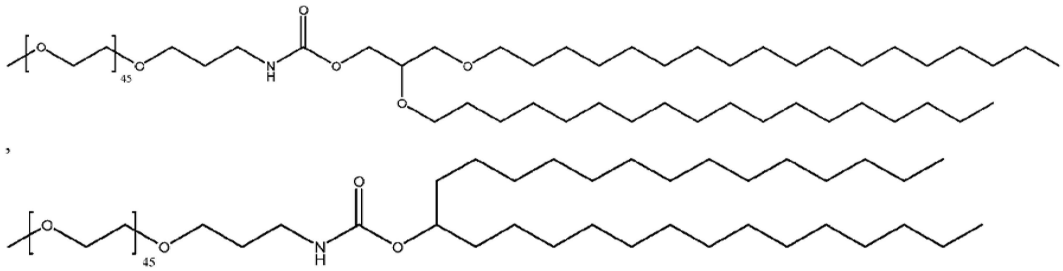
[0351] 일부 구현예에서, 막 무결성을 제공하는 구성성분, 예컨대 스테롤은 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 0 내지 50%(몰)(예를 들어, 0 내지 10%, 10 내지 20%, 20 내지 30%, 30 내지 40% 또는 40 내지 50%)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 구성성분은 지질 나노입자의 총 지질 함량의 20 내지 50%(몰) 30 내지 40%(몰)이다.

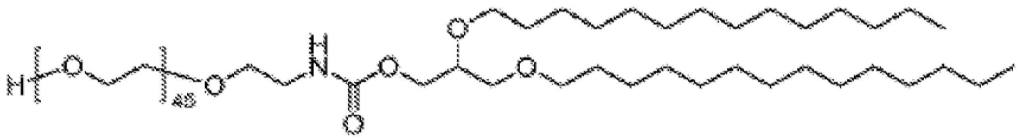
[0352] 일부 구현예에서, 지질 나노입자는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 접합된 지질 분자를 포함할 수 있다. 일반적으로, 이들은 지질 나노입자의 응집을 억제하고/하거나 입체 안정화를 제공하는 데 사용된다. 예시적인 접합된 지질은 PEG-지질 접합체, 폴리옥사졸린(POZ)-지질 접합체, 폴리아미드-지질 접합체(예컨대, ATTA-지질 접합체), 양이온성-중합체 지질(CPL) 접합체, 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 접합된 지질 분자는 PEG-지질 접합체, 예를 들어 (메톡시 폴리에틸렌 글리콜)-접합된 지질이다.

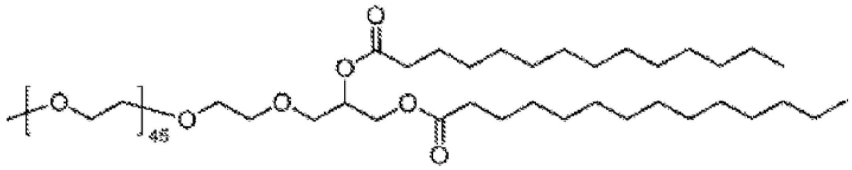
[0353] 예시적인 PEG-지질 접합체는 PEG-디아실글리세롤(DAG)(예컨대, 1-(모노메톡시-폴리에틸렌글리콜)-2,3-디미리스토일글리세롤(PEG-DMG)), PEG-디알킬옥시프로필(DAA), PEG-인지질, PEG-세라마이드(Cer), 페길화 포스파티딜에탄올로아민(PEG-PE), PEG 석시네이트 디아실글리세롤(PEGS-DAG)(예컨대, 4-O-(2',3'-디(테트라데카노일옥시)프로필-1-O-(w-메톡시(폴리에톡시)에틸) 부탄디오에이트(PEG-S-DMG)), PEG 디알콕시프로필카르밤, N-(카보닐-메톡

시폴리에틸렌 글리콜 2000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 나트륨 염, 또는 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 추가의 예시적인 PEG-지질 접합체는, 예를 들어 이의 모든 내용이 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 US5,885,613, US6,287,591, US2003/0077829, US2003/0077829, US2005/0175682, US2008/0020058, US2011/0117125, US2010/0130588, US2016/0376224, US2017/0119904, 및 US/099823에 기재되어 있다.

[0354] 일부 구현예에서, PEG-지질은 이의 모든 내용이 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 US2018/0028664의 화학식 III, III-a-I, III-a-2, III-b-1, III-b-2 또는 V의 화합물이다. 일부 구현예에서, PEG-지질은 이들 둘 모두의 내용이 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 US20150376115 또는 US2016/0376224의 화학식 II이다. 일부 구현예에서, PEG-DAA 접합체는 예를 들어 PEG-디라우릴옥시프로필, PEG-디미리스틸옥시프로필, PEG-디팔미틸옥시프로필, 또는 PEG-디스테아릴옥시프로필일 수 있다. PEG-지질은 PEG-DMG, PEG-디라우릴글리세롤, PEG-디팔미토일글리세롤, PEG-디스테릴글리세롤, PEG-디라우릴글리카미드, PEG-디미리스틸글리카미드, PEG-디팔미토일글리카미드, PEG-디스테릴글리카미드, PEG-콜레스테롤(1-[8'-(콜레스트-5-엔-3[베타]-옥시)카복사미도-3',6'-디옥사옥타닐]카바모일-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜), PEG-DMB(3,4-디테트라데콕실벤질-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜) 에테르), 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] 중 하나 이상일 수 있다. 일부 구현예에서, PEG-지질은 PEG-DMG, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]를 포함한다. 일부 구현예에서, PEG-지질은 다음으로부터 선택되는 구조를 포함한다:

[0355] 
,


, 및



[0356]

[0357] 일부 구현예에서, PEG 이외의 분자와 접합된 지질이 또한 PEG-지질 대신에 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리옥사졸린(POZ)-지질 접합체, 폴리아미드-지질 접합체(예를 들어, ATTA-지질 접합체), 및 양이온성-중합체 지질(GPL) 접합체가 PEG-지질 대신에 또는 이에 첨가하여 사용될 수 있다.

[0358] 예시적인 접합된 지질, 즉 PEG-지질, (POZ)-지질 접합체, ATTA-지질 접합체 및 양이온성 중합체-지질은 이의 모든 내용이 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 WO2019051289A9의 표 2에 열거된 PCT 및 LIS 특허 출원에 기재되어 있다.

[0359] 일부 구현예에서, PEG 또는 접합된 지질은 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 0 내지 20%(몰)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PEG 또는 접합된 지질 함량은 지질 나노입자에 존재하는 총 지질의 0.5 내지 10% 또는 2 내지 5%(몰)이다. 이온화 가능한 지질, 비양이온성 지질, 스테롤 및 PEG/접합된 지질의 몰비는 필요에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 지질 입자는 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 30 내지 70%의 이온화 가능한 지질, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 0 내지 60%의 콜레스테롤, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 0 내지 30%의 비양이온성 지질, 및 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 1 내지 10%의 접합된 지질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 30 내지 40%의 이온화 가능한 지질, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 40 내지 50%의 콜레스테롤, 및 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 10 내지 20%의 비양이온성 지질을 포함한다. 일부 다

른 구현예에서, 조성물은 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 50 내지 75%의 이온화 가능한 지질, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 20 내지 40%의 콜레스테롤, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 5 내지 10%의 비양이온성 지질, 및 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 1 내지 10%의 접합된 지질이다. 조성물은 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 60 내지 70%의 이온화 가능한 지질, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 25 내지 35%의 콜레스테롤, 및 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 5 내지 10%의 비양이온성 지질을 함유할 수 있다. 조성물은 또한 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 최대 90%의 이온화 가능한 지질, 및 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 2 내지 15%의 비양이온성 지질을 함유할 수 있다. 제형은 또한 예를 들어 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 8 내지 30%의 이온화 가능한 지질, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 5 내지 30%의 비양이온성 지질, 및 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 0 내지 20%의 콜레스테롤; 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 4 내지 25%의 이온화 가능한 지질, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 4 내지 25%의 비양이온성 지질, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 2 내지 25%의 콜레스테롤, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 10 내지 35%의 접합된 지질, 및 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 5%의 콜레스테롤; 또는 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 2 내지 30%의 이온화 가능한 지질, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 2 내지 30%의 비양이온성 지질, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 1 내지 15%의 콜레스테롤, 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 2 내지 35%의 접합 지질, 및 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 1 내지 20%의 콜레스테롤; 또는 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 심지어 최대 90%의 이온화 가능한 지질, 및 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 2 내지 10%의 비양이온성 지질, 또는 몰 또는 조성물의 총 중량 대비 심지어 최대 100%의 양이온성 지질을 포함하는, 지질 나노입자 제형일 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 입자 제형은 이온화 가능한 지질, 인지질, 콜레스테롤 및 PEG화 지질을 50:10:38.5:1.5의 몰비로 포함한다. 일부 다른 구현예에서, 지질 입자 제형은 이온화 가능한 지질, 콜레스테롤 및 PEG화 지질을 60:38.5:1.5의 몰비로 포함한다.

[0360] 일부 구현예에서, 지질 입자는 이온화 가능한 지질, 비양이온성 지질(예를 들어, 인지질), 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤) 및 PEG화 지질을 포함하고, 여기서 지질의 몰비는 이온화 가능한 지질에 대해 20 몰퍼센트 내지 70 몰퍼센트의 범위이고 표적은 40 몰퍼센트 내지 60 몰퍼센트 범위이며, 비양이온성 지질의 몰 퍼센트는 0 내지 30의 범위이고 표적은 0 내지 15의 범위이며, 스테롤의 몰 퍼센트는 20 내지 70의 범위이고 표적은 30 내지 50의 범위이며, PEG화 지질의 몰 퍼센트는 1 내지 6의 범위이고 표적은 2 내지 5의 범위이다.

[0361] 일부 구현예에서, 지질 입자는 50:10:38.5:1.5의 몰비로 이온화 가능한 지질/비양이온성 지질/스테롤/접합된 지질을 포함한다.

[0362] 일 양태에서, 본 개시내용은 인지질, 레시틴, 포스파티딜콜린 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 나노입자 제형을 제공한다.

[0363] 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 화합물이 또한 포함될 수 있다. 이들 화합물은 별도로 투여될 수 있거나, 추가 화합물이 본 발명의 지질 나노입자에 포함될 수 있다. 즉, 지질 나노입자는 핵산 외에 다른 화합물, 또는 제1 핵산과 상이한 적어도 제2 핵산을 함유할 수 있다. 제한 없이, 다른 추가 화합물은 작거나 큰 유기 또는 무기 분자, 단당류, 이당류, 삼당류, 올리고당류, 다당류, 펩타이드, 단백질, 펩타이드 유사체 및 이의 유도체, 펩타이드모방체, 핵산, 핵산 유사체 및 유도체, 생물학적 물질로부터 제조된 추출물, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0364] 일부 구현예에서, LNP는 표적화 도메인의 첨가에 의해 특이적 조직으로 지시된다. 예를 들어, 생물학적 리간드는 동족 수용체를 표시하는 세포와의 상호작용을 향상시키기 위해 LNP의 표면 상에 표시될 수 있으며, 따라서 세포가 수용체를 발현하는 조직과의 회합 및 조직에 대한 카고 전달을 구동할 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 리간드는 간으로의 전달을 구동하는 리간드일 수 있고, 예를 들어 GalNAc를 표시하는 LNP는 아시알로당단백질 수용체(ASGPR)를 표시하는 간세포에 대한 핵산 카고의 전달을 초래한다. 문헌[Akinc et al. Mol Ther 18(7):1357-1364 (2010)]의 연구는 관찰 가능한 LNP 카고 효과에 대해 ASGPR에 의존하는 LNP를 생성하기 위한 PEG-지질(GalNAc-PEG-DSG)에 대한 3가 GalNAc 리간드의 접합을 교시한다(예를 들어, 상기의 문헌[Akinc et al. 2010]의 도 6 참조). 예를 들어, 엽산, 트랜스페린 또는 항체를 혼입하는 다른 리간드-표시 LNP 제형은, 그 안에 사용된 참조 문헌, 즉 Kolhatkar et al., Curr Drug Discov Technol. 2011 8:197-206; Musacchio and Torchilin, Front Biosci. 2011 16:1388-1412; Yu et al., Mol Membr Biol. 2010 27:286-298; Patil et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2008 25:1-61; Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Zhao et al., Expert Opin Drug Deliv. 2008 5:309-319; Akinc et al., Mol Ther. 2010 18:1357-1364; Srinivasan et al., Methods Mol Biol. 2012 820:105-116; Ben-Arie et al., Methods Mol Biol. 2012 757:497-507; Peer 2010 J Control Release. 20:63-68; Peer et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:4095-4100; Kim et al., Methods Mol Biol. 2011 721:339-353; Subramanya et al., Mol Ther. 2010

18:2028-2037; Song et al., Nat Biotechnol. 2005 23:709-717; Peer et al., Science. 2008 319:627-630; 및 Peer and Lieberman, Gene Ther. 2011 18:1127-1133에 더하여, 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 WO2017223135에 논의되어 있다.

[0365] 일부 구현예에서, LNP는 전통적인 구성성분, 예컨대 이온화 가능한 양이온성 지질, 양친매성 인지질, 콜레스테롤 및 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 지질을 포함하는 제형에 선택적 ORgan 표적화(SORT) 분자를 첨가함으로써 조직 특이적 활성에 대해 선택된다. 문헌[Cheng et al. Nat Nanotechnol 15(4):313-320 (2020)]의 교시는 보충 "SORT" 구성성분의 첨가가 생체 내 RNA 전달 프로파일을 정확하게 변경하고 SORT 분자의 백분율 및 생물물리학적 특성의 함수로서 조직 특이적(예를 들어, 폐, 간, 비장) 유전자 전달 및 편집을 매개함을 보여준다.

[0366] 일부 구현예에서, LNP는 생분해성, 이온화 가능한 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, LNP는 또한 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트)라고 하는 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트, 또는 다른 이온화 가능한 지질을 포함한다. 예를 들어, WO2019/067992, WO/2017/173054, WO2015/095340 및 WO2014/136086, 뿐만 아니라 그 안에 제공된 참조문헌의 지질을 참조한다. 일부 구현예에서, LNP 지질과 관련하여 양이온성 및 이온 가능한이란 용어는 상호교환 가능하며, 예를 들어 이온화 가능한 지질은 pH에 따라 양이온성이다.

[0367] 일부 구현예에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 예를 들어 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된 수십 nm 내지 수백 nm일 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 40 nm 내지 약 150 nm, 예컨대 약 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm 또는 150 nm일 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 50 nm 내지 약 100 nm, 약 50 nm 내지 약 90 nm, 약 50 nm 내지 약 80 nm, 약 50 nm 내지 약 70 nm, 약 50 nm 내지 약 60 nm, 약 60 nm 내지 약 100 nm, 약 60 nm 내지 약 90 nm, 약 60 nm 내지 약 80 nm, 약 60 nm 내지 약 70 nm, 약 70 nm 내지 약 100 nm, 약 70 nm 내지 약 90 nm, 약 70 nm 내지 약 80 nm, 약 80 nm 내지 약 100 nm, 약 80 nm 내지 약 90 nm, 또는 약 90 nm 내지 약 100 nm일 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 70 nm 내지 약 100 nm일 수 있다. 특정 구현예에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 80 nm일 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 100 nm일 수 있다. 일부 구현예에서, LNP 제형의 평균 LNP 직경은 약 l mm 내지 약 500 mm, 약 5 mm 내지 약 200 mm, 약 10 mm 내지 약 100 mm, 약 20 mm 내지 약 80 mm, 약 25 mm 내지 약 60 mm, 약 30 mm 내지 약 55 mm, 약 35 mm 내지 약 50 mm, 또는 약 38 mm 내지 약 42 mm의 범위이다.

[0368] 일부 경우에, LNP는 비교적 균질할 수 있다. 다분산 지수는 LNP의 균질성, 예를 들어 지질 나노입자의 입자 크기 분포를 나타내는 데 사용될 수 있다. 작은(예를 들어, 0.3 미만) 다분산 지수는 일반적으로 좁은 입자 크기 분포를 나타낸다. LNP는 약 0 내지 약 0.25, 예컨대 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24 또는 0.25의 다분산 지수를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, LNP의 다분산 지수는 약 0.10 내지 약 0.20일 수 있다.

[0369] LNP의 제타 전위는 조성물의 계면 동전위를 나타내기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 제타 전위는 LNP의 표면 전하를 나타낼 수 있다. 더 고도로 하전된 종은 신체의 세포, 조직 및 기타 요소와 바람직하지 않게 상호작용할 수 있기 때문에, 상대적으로 낮은 전하(양전하 또는 음전하)를 갖는 지질 나노입자가 일반적으로 바람직하다. 일부 구현예에서, LNP의 제타 전위는 약 -10 mV 내지 약 +20 mV, 약 -10 mV 내지 약 +15 mV, 약 -10 mV 내지 약 +10 mV, 약 -10 mV 내지 약 +5 mV, 약 -10 mV 내지 약 0 mV, 약 -10 mV 내지 약 -5 mV, 약 -5 mV 내지 약 +20 mV, 약 -5 mV 내지 약 +15 mV, 약 -5 mV 내지 약 +10 mV, 약 -5 mV 내지 약 +5 mV, 약 -5 mV 내지 약 0 mV, 약 0 mV 내지 약 +20 mV, 약 0 mV 내지 약 +15 mV, 약 0 mV 내지 약 +10 mV, 약 0 mV 내지 약 +5 mV, 약 +5 mV 내지 약 +20 mV, 약 +5 mV 내지 약 +15 mV, 또는 약 +5 mV 내지 약 +10 mV일 수 있다.

[0370] 단백질 및/또는 핵산의 캡슐화 효율은 제공된 초기 양에 대한, 캡슐화되거나 다르게 제조 후 LNP와 연관되는 단백질 및/또는 핵산의 양을 나타낸다. 캡슐화 효율은 높은 것이 바람직하다(예를 들어, 100%에 가까운 것). 캡슐화 효율은, 예를 들어 지질 나노입자를 하나 이상의 유기 용매 또는 세제로 분해하기 전후에 지질 나노입자를 함유하는 용액 중 단백질 또는 핵산의 양을 비교함으로써 측정될 수 있다. 음이온 교환 수지는 용액 중 유리 단백질 또는 핵산(예를 들어, RNA)의 양을 측정하는 데 사용될 수 있다. 형광은 용액 중 유리 단백질 및/또는 핵산(예를 들어, RNA)의 양을 측정하는 데 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 지질 나노입자에 대해, 단백질 및/또는 핵산의 캡슐화 효율은 적어도 50%, 예를 들어 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 캡슐화 효율은 적어도 80%일 수 있다. 일부 구현예에서, 캡슐화 효율은 적어도 90%일 수 있다. 일부 구현예에서, 캡슐화 효율은 적어도 95%일 수 있다.

[0371] LNP는 선택적으로 하나 이상의 코팅을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, LNP는 코팅을 갖는 캡슐, 필름 또는 테이블(table)로 제형화될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물을 포함하는 캡슐, 필름 또는 정제는 임의의 유용한 크기, 인장 강도, 경도 또는 밀도를 가질 수 있다.

[0372] 추가의 예시적인 지질, 제형, 방법 및 LNP의 특성화는 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 WO2020061457에 교시되어 있다.

[0373] 또한, 문헌[Hou et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nat Rev Mater (2021)](https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0)을 참조한다.

[0374] 일부 구현예에서, 시험관 내 또는 생체 외 세포 리포펙션은 Lipofectamine MessengerMax(Thermo Fisher) 또는 TransIT-mRNA 형질주입 시약(Mirus Bio)을 사용하여 수행된다. 특정 구현예에서, LNP는 GenVoy_ILM 이온화 가능한 지질 혼합물(Precision NanoSystems)을 사용하여 제형화된다. 특정 구현예에서, LNP는 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA) 또는 디리놀레일메틸-4-디메틸아미노부티레이트(DLin-MC3-DMA 또는 MC3)를 사용하여 제형화되고, 이의 제형 및 생체 내 사용은 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Jayaraman et al. Angew Chem Int Ed Engl 51(34):8529-8533 (2012)]에 교시되어 있다.

[0375] CRISPR-Cas 시스템, 예를 들어 Cas9-gRNA RNP, gRNA, Cas9 mRNA의 전달을 위해 최적화된 LNP 제형은 둘 다 참조로 포함되는 WO2019067992 및 WO2019067910에 기재되어 있다.

[0376] 핵산 전달에 유용한 추가의 특이적 LNP 제형은 둘 다 참조로 포함되는 US8158601 및 US8168775에 기재되어 있으며, 이는 ONPATTRO라는 이름으로 판매되는 파티시란에 사용되는 제형을 포함한다.

[0377] LNP를 사용한 본 명세서에 기재된 DNA의 예시적인 투여는 약 0.1, 0.25, 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 또는 100 mg/kg(DNA)을 포함할 수 있다.

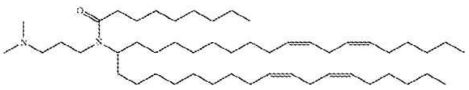
[0378] 하기 구현예가 고려된다:

[0379] A. 본 명세서에 기재된 ssDNA 작제물, 서열 또는 조성물을 포함하는 지질 나노입자(LNP).

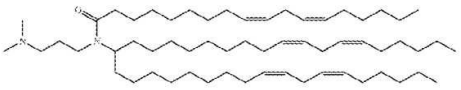
[0380] B. 양이온성 지질을 포함하는, 구현예 A의 LNP.

[0381] C. 양이온성 지질이 하기에 따른 구조를 갖는, 구현예 B의 LNP:

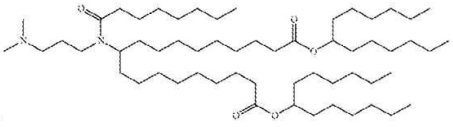
[0382] [화학식 i]

[0383] ,

[0384] [화학식 ii]

[0385] , 또는

[0386] [화학식 iii]

[0387] .

[0388] D. 하나 이상의 중성 지질, 예를 들어 DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE, SM, 스테로이드, 예를 들어 콜레스테롤, 및/또는 하나 이상의 중합체 접합된 지질, 예를 들어 PEG화된 지질, 예를 들어 PEG-DAG, PEG-PE, PEG-S-DAG, PEG-cer 또는 PEG 디알콕시프로필카르바메이트를 추가로 포함하는, 구현예 A 내지 구현예 C 중 어느 하나의 LNP.

[0389] 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물을 포함하는 LNP 제제가 표적화 이펙터(targeting effector)를 사용한 표면 장식에 의해 원하는 세포 유형에 표적화될 수 있다. 그러한 표적화 이펙터는, 예를 들어 표적 세포에 결합하는 세포 특이적 수용체 리간드; 표적 세포에 대한 항체 또는 다른 바인더; 센티린; 세포 침투 펩티드; 엔도솜 탈출을 가능하게 하는 펩티드(예를 들어, GALA, KALA)를 포함한다. 예를 들어, 검토를 위해 문헌 [Tai & Gao. 2017. Adv Drug Deliv Rev. 110-111:157-168]의 표 1 및 표 2를 참조한다.

[0390] 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물을 포함하는 LNP 제제가 애쥬번트와 공동투여될, 예를 들어 애쥬번트와의 동일한 제제로 공동전달될 수 있다.

[0391] *투여 경로*

[0392] 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물이 임의의 적합한 경로에 의해 세포, 조직 또는 대상체 내로 도입된다.

[0393] 표적 세포 또는 조직에 대한 (예를 들어, 생체외) 투여는 당업계에 알려진 방법에 의해 행해질 수 있으며, 이러한 방법에는, 이를 테면 형질감염, 예를 들어 시약(예를 들어, 리포좀, 인산칼슘) 또는 물리적 수단(예를 들어, 전기천공, 유전자 총, 현미주사, 미소유체 전단, 세포 압착)을 사용한 일시적 또는 안정적 형질감염을 들 수 있다. 다른 방법이, 예를 들어 문헌[Rad et al. 2021. Adv. Mater. 33:2005363]에 기재되어 있으며, 이는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0394] 대상체, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 인간 대상체에 대한 투여는 비경구(예를 들어, 정맥내, 근육내, 복막내, 피하, 두개내) 경로에 의해; 국소 투여, 경진피(transdermal) 투여 또는 경피(transcutaneous) 투여에 의해 행해질 수 있다. 다른 적합한 경로는 경구, 직장, 경점막, 비강내, 흡입(예를 들어, 에어로졸을 통해), 협측(예를 들어, 설하), 질내, 수강내, 안구내, 경진피, 내피내, 자궁내(또는 난내(in ovo)), 흉막내, 뇌내, 관절내, 국소, 림프내를 포함한다. (예를 들어, 간, 눈, 골격근, 심장근, 횡격막, 근육 또는 뇌에 대한) 직접 조직 또는 기관 주사가 또한 포함된다.

[0395] 게놈 내로의 통합

[0396] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는, 세포 내로 도입될 때, 세포의 게놈 내로 통합된다. 다른 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는, 세포 내로 도입될 때, 세포의 게놈 내로 통합되지 않는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 대상체에게 투여되는 ssDNA의 카피의 약 0.0001%, 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 또는 2% 미만의 빈도로 대상체의 게놈 내로 통합된다.

[0397] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 상동성 아암(arm)을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 2개의 상동성 아암을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 참조 인간 게놈 hg38의 임의의 15-뉴클레오티드 부분과 70%, 80%, 또는 90% 초과의 동일성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 참조 인간 게놈 hg38의 임의의 15-뉴클레오티드 부분과 70% 초과의 동일성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 참조 인간 게놈 hg38의 임의의 25-뉴클레오티드 부분과 70%, 80%, 90%, 95% 초과의 동일성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 참조 인간 게놈 hg38의 임의의 50-뉴클레오티드 부분과 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 98% 초과의 동일성을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 참조 인간 게놈 hg38의 임의의 100-뉴클레오티드 부분과 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 초과의 동일성을 포함하지 않는다.

[0398] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 상동성-유도 수복(HDR)을 위한 주형이 아니다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 미세상동성-매개 말단부 결합(MMEJ)에 참여하지 않는다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA는 DNA 수복에 참여하지 않는다.

[0399] 일부 구현예에서, 제형은 뉴클레아제(예를 들어, CRISPR 뉴클레아제, 예를 들어 단일 가닥 또는 이중 가닥 절단을 생성하는 CRISPR 뉴클레아제)를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 제형은 게놈 내로의 ssDNA의 통합을 촉진하는 단백질을 포함하지 않으며, 예를 들어 여기서 단백질은 재조합효소 또는 인테그라제를 포함한다.

[0400] 응용

[0401] 본 명세서에 기재된 ssDNA 및 작제물은 대상체, 예를 들어 인간을 위한 치료적 또는 건강 응용에 사용될 수 있다. 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물에 대한 설명이 주로 인간에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물에 대한 것이지만, 그러한 조성물은 일반적으로 임의의 다른 동물에게 투여하기에 적합하다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 대상체는 임의의 동물, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 인간 또는 비인간 포유동물일 수 있다. 구현예에서, 대상체는 척추동물(예를 들어, 포유동물, 조류, 어류, 파충류, 또는 양서류)이다. 특정

구현예에서, 대상체는 인간이다. 구현예에서, 상기 방법의 대상체는 비인간 포유동물이다. 구현예에서, 대상체는 비인간 포유동물, 예컨대 비인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 유인원), 유제류(ungulate)(예를 들어, 소, 버팔로, 양, 염소, 돼지, 낙타, 라마, 알파카, 사슴, 말, 원숭이), 육식 동물(carnivore)(예를 들어, 개, 고양이), 설치류(예를 들어, 래트, 마우스), 또는 토끼목(lagomorph)(예를 들어, 토끼)이다. 구현예에서, 대상체는 조류, 예컨대 조류 분류군(avian taxa) 닭목(Galliformes)(예를 들어, 닭, 칠면조, 꿩, 메추라기), 기러기목(Anseriformes)(예를 들어, 오리, 기러기류(geese)), 고악류(Paleaognathae)(예를 들어, 타조, 에뮤), 비둘기목(Columbiformes)(예를 들어, 비둘기(pigeon, dove)), 또는 앵무목(Psittaciformes)(예를 들어, 앵무새)의 구성원이다. 구현예에서, 대상체는 무척추동물, 예컨대 절지동물(예를 들어, 곤충, 거미류, 갑각류), 선충류, 환형동물, 연충, 또는 연체동물이다.

[0402] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 적어도 2, 3, 4, 5, 6일 또는 1주; 적어도 8, 9, 10, 12, 14일 또는 2주; 적어도 16, 18, 20일 또는 3주; 적어도 22, 24, 25, 27, 28일 또는 1개월; 적어도 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 그 이상; 1주 내지 6개월, 1개월 내지 6개월, 3개월 내지 6개월의 기간에 걸쳐 숙주 세포, 조직 또는 대상체에 대한 이펙터의 생물학적 효과, 예를 들어 치료용 폴리펩티드의 발현을 부여한다.

[0403] 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 이펙터, 예를 들어 본 명세서에 기재된 이펙터를 세포, 조직 또는 대상체에게 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0404] 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 세포, 조직 또는 대상체에서 생물학적 파라미터를 조절하는 데(예를 들어, 증가시키거나 감소시키는 데) 사용될 수 있다. 생물학적 파라미터는 표적 세포, 조직 또는 대상체에서의 대상 유전자의 유전자 발현의 증가 또는 감소일 수 있다.

[0405] 구현예에서, 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물은 본 명세서에 기재된 ssDNA 또는 작제물을 그러한 세포, 조직 또는 대상체에게 투여함으로써 이를 필요로 하는 세포, 조직 또는 대상체를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0406] 실시예

[0407] *실시예 1: 공유결합으로 닫혀 있는 ssDNA를 위한 플라스미드 주형의 설계 및 조립*

[0408] 이 실시예는 ssDNA 작제물을 위한 플라스미드 주형을 생성하는 방법을 기재한다. 이 실시예에서는, 다음 특정 서열 성분들을 사용하여 작제물 주형이 설계된다:

[0409] ● 프로모터 Efla:

[0410] 5'ggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggc
gcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttt
ttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattactt
ccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgctt
gagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatt
tttgatgacctgctgcgacgcttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcg
acggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctc
tggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggcc
ctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgctt
catgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcga
tggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggt
tcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtga-3'(서열번호 37)

[0411] ● 모델/마커 단백질(mCherry)을 인코딩하는 이펙터 서열:

[0412] 5'atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgaga
tcgagggcgagggcgagggccgcccctacgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggtggcccccctgcccttcgcctgggacatcctgtccc
ctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtga
tgaacttcgaggacggcggcgtggtgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttccct
ccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggc
tgaagctgaaggacggcggccactacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgtcaacatcaagt
tggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgccactccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaa-

3'(서열번호 38)

[0413] *선택적 항목:*

[0414] ● NTS: SV40 인핸서: 5'-cccaagaagaagaggaaagtc-3'(서열번호 1)

[0415] ● 유지 서열: 인간 인터페론-β MAR

[0416] 5'tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttatttttttacatataaatatatttccctgtttttctaaaaaagaaaaagatcatcattttcccattgtaaaatgccatatttttttcataggtcacttacata3'(서열번호 39)

[0417] ● 제2 가닥 모티프: AAV2 야생형 ITR

[0418] 5'aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg-3'(서열번호 26)

[0419] 표준 DNA 설계 조작 소프트웨어를 사용하여 이들 요소를 가지고 플라스미드 주형을 설계한다. 공개된 프로토콜 및 구매 가능한 키트에 따라 Golden Gate Assembly를 통해 조립을 수행한다(Marillonnet & Grütznер. 2020. Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. Current Protocols in Molecular Biology.130:e115; Golden Gate Assembly Protocol for Using NEB Golden Gate Assembly Mix (E1600) (New England Biolabs)). 설계된 작제물의 Golden Gate Assembly를 120 bp 길이의 일련의 프라이머들을 사용하여 수행하며, 이때 프라이머의 처음 30 bp는 관련 인접 단편에 매칭되고, 다음 60 bb는 새로운 서열을 인코딩하고, 마지막 30 bp는 표적 서열에 어닐링된다. 단편이 최종 작제물 설계에 조립되고(NEB Golden Gate Assembly Kit), 제조자 프로토콜에 따라 생거 서열분석(Sanger Sequencing)(Sigma Aldrich)에 의해 서열이 확인된다.

[0420] *실시예 2: 원형 ssDNA으로의 플라스미드 DNA의 변환*

[0421] 이 실시예는 문헌[Minev et al., 2019, *Rapid in vitro production of single-stranded DNA*, Nucleic Acids Research, Volume 47, Issue 22:11956-11962](이는 본 명세서에 참고로 포함됨)에서의 방법에 따라, 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 주형으로부터의 ssDNA의 생성을 기재한다. 간략하게 말하면, 메탄올-반응성 중합체를 갖는 정방향 프라이머를 사용한 PCR은 변성 조건 하에서 변형된 가닥의 선택적 침전을 가능하게 하는 태깅된 증폭을 생성한다. 비변형된 염기 및 변형된 염기가 이들 방법을 사용하여 작제물 내로 도입될 수 있다.

[0422] 최종 샘플을 NanoDrop을 사용하여 분석하여 순도 및 농도를 결정한다. 작제물의 서열을 제조자 프로토콜(Illumina)에 따라 차세대 서열분석으로 검증한다.

[0423] *실시예 3: 원형화된 ssDNA의 생성*

[0424] 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조된 선형 ssDNA 작제물은 DNA 리가제, 예컨대 Ampligase® Thermostable DNA Ligase(Lucigen, MA023E-Ampligase® Thermostable DNA Ligase) 또는 CircLigase™ II ssDNA Ligase(Lucigen, MA298E-CircLigase-II-ssDNA-Ligase)를 사용하여 원형화되며, 예를 들어 공유결합으로 닫힌다. 앰플리가제는 상보적 DNA 서열 상에서 서로 인접한 어닐링되는 DNA 말단부들을 라이게이션하는 한편, CircLigase II ssDNA Ligase는 상보적 서열의 부재 하에서 ssDNA의 말단부들을 라이게이션한다. 라이게이션 후에 남아 있는 선형 DNA 작제물은 엑소뉴클레아제 I 및 엑소뉴클레아제 III으로 처리함으로써 제거된다. 출발 물질 및 수득된 생성물의 아가로스 겔 전기영동을 수행하여, DNA 작제물이 원형화됨을 확인한다.

[0425] *실시예 4: LNP를 사용한 원형 ssDNA의 제형화*

[0426] 이 실시예는 앞선 실시예에 기재된 바와 같이 제조된 작제물을 지질 나노입자를 사용하여 제형화하는 방법을 기재한다.

[0427] 핵산 작제물을 문헌[Chen et al. 2012. *J Am Chem Soc*. Volume 134, Issue 16:6948-6951]의 방법에 따라 미소유체 장치를 통해 지질 성분과 배합한다. 간략하게 말하면, 미소유체 장치를 표준 리소그래피 절차에 따라 폴리디메틸실록산(PDMS) 중에서 제조한다(McDonald & Whitesides. 2002. Accounts *Chem Res* Volume 35, Issue 7:491-499). 통상적으로 양이온성 지질, 콜레스테롤, 헬퍼 지질, 폴리에틸렌 글리콜 변형된 지질, 및 표적화 모이어티 접합을 용이하게 하는 지질(선택적)을 함유하는 지질 성분들을 90% 에탄올 중에서 배합하고 가용화한다. 핵산 작제물을 완충액 중에 용해시킨다. 핵산 용액, 지질 용액, 및 인산염 완충 식염수(PBS)를 미소유체 장치 내로 주입한다. 새로 제조된 LNP를 MWCO가 3.5 kD인 막을 사용하여 PBS 완충액에 대해 투석하여 에탄올을 제거

하고 완충액을 교환한다.

[0428] LNP를 동적 광산란(DLS)(ZetaPALS, Brookhaven Instruments, 미국 뉴욕 소재, 15-mW 레이저, 입사 빔 676 nm)을 사용하여 유효 직경, 다분산도, 및 제타 전위의 관점에서 특성화하고, 제조 프로토콜에 따라 Quant-iT™ OliGreen® ssDNA Assay Kit(ThermoFisher Scientific, O11492)를 사용하여 총 핵산 농도를 결정한다.

[0429] *실시예 5: 시험관내에서 세포에서의 선천성 면역 반응의 평가*

[0430] 이 실시예는 유전자 발현을 시험하는 방법뿐만 아니라, 배양된 세포의 선천성 면역 반응에 대한 작제물의 효과를 결정하는 방법을 기재한다.

[0431] 실험 작제물을 상기 실시예 1 내지 실시예 4에서와 같이 제조한다. 작제물 및 대조군을 다수의 농도에서 전기천공을 통해 HEK, 각질세포, 대식세포, T 세포 및 상피 세포로부터 선택되는 세포에 투여한다. 전기천공 후에, 세포를 최종 배양 베셀(vessel)에 옮긴다. LNP를 사용하여 제형화된 작제물을 웰 플레이트 내의 세포에 직접 투여한다.

[0432] 형광 리포터 mCherry를 인코딩하는 작제물의 발현을 결정하기 위해, 세포를 먼저 PBS로 세척한 후, 유세포측정 분석을 수행한다. 모든 유세포측정을 Miltenyi에 의한 MACSQuant VYB 상에서 수행한다. mCherry 신호의 검출을 위해, 황색 레이저(파장 561 nm)가 여기를 위해 사용되고, 615/620 nm 방출 필터가 사용된다. 각 샘플마다 20,000개의 사건을 기록하고, Flowjo V.9.0 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석한다. 세포를 먼저 FSC-A 및 SSC-A 도표 상에서 게이팅하여 세포 잔해를 제거한다. 이 집단을 FSC-A 및 FSC-H 도표 상에서 추가로 플롯팅하여 단일 세포 집단으로 국한시킨다. 마지막으로, 형광 신호 발현 세포와 형광 신호 비발현 세포 사이의 이변량 도표를 사용하여 발현 세포의 백분율을 결정한다. 발현 세포들의 분포를 사용하여 각 세포 내에서의 발현 수준을 결정한다. 다수의 시점에 발현 분석을 수행한다.

[0433] 문헌[Jakobsen et al . 2013. *Proc Natl Acad Sci USA* Volume 110, Issue 48:E4571-80]에 기재된 바와 같이, qPCR을 세포에 대해 수행하여, 시험 세포에서 IFN-b의 RNA 수준을 결정한다. 간략하게 말하면, qPCR에 사용되는 프로브-프라이머 세트는 인간 IFN-b(ThermoFisher, Hs01077958_s1) 및 b-액틴(ThermoFisher, Hs00357333_g1)이다. 이들 분석을 프리-메이드(pre-made) Taqman 검정 및 RNA-to-Ct 1 단계 키트(Applied Biosystems)를 사용하여 수행한다. RNA 발현을 b-액틴에 대해 그리고 관련 비처리 대조군에 대해 정규화한다. 데이터는 생물학적 반복시험물로부터의 평균 ± SEM으로서 기재된다.

[0434] 제조자 프로토콜에 따라 세포 상층액에 대해 ELISA를 수행하여, 분비된 IFN-b 수준을 결정한다.

[0435] *실시예 6. 원형 단일 가닥 DNA(ssDNA)의 제조*

[0436] 이 실시예는 원형 ssDNA의 제조를 보여준다.

[0437] 플라스미드 DNA(1 ng/50 ul PCR 반응물)를 Q5 중합효소(M0494L, New England Biolabs)를 사용하는 PCR 증폭을 위한 주형으로서 사용하였다. 다른 구매 가능한 중합효소가 또한 사용될 수 있다. 플라스미드에 상보적인 서열을 함유하는 것에 추가하여, 프라이머는 하류 프로세스에 유용한 다음과 같은 추가의 서열을 함유하였다:

[0438] a. 닉킹 효소(들) 인식 서열;

[0439] b. 제한 효소 분해 후에 DNA 내에 점착성 말단부(sticky-end)를 생성하고 DNA 원형화를 용이하게 하는 데 사용되는 제한 효소 인식 서열(예를 들어, BsaI, KpnI, 또는 NheI); 및

[0440] c. 제한 효소 분해 효율을 증가시키기 위한 추가의 염기(예를 들어, 5'-CCGTGGTCCTTC-3')(서열번호 40) .

[0441] PCR 산물을 DNA 정제 컬럼(M0494L, Zymo Research)을 사용하여 정제하였다. 제한 효소 인식 서열, 예를 들어 BsaI-HF-V2(R3733L, New England Biolabs)에 상응하는 제한 효소를 사용하여, 하룻밤 반응으로 DNA를 분해하였다. 이어서, DNA 정제 컬럼을 사용하여 DNA를 정제하였다.

[0442] 분해된 DNA를 실온에서 1시간 동안 T4 DNA 리가제(M0202M, New England Biolabs)를 사용하여 원형화하였다. 비원형화된 DNA를 37℃에서 1시간 동안 T5 엑소뉴클레아제(M0663L, New England Biolabs)와 함께 DNA를 인큐베이션하여 분해하였다. T5 엑소뉴클레아제를 사용하여 선형 dsDNA는 분해하였지만, 원형 dsDNA는 그렇지 않았다. DNA 정제 컬럼을 사용하여 DNA를 정제하였다. 다른 유사한 방법이 또한 사용될 수 있으며, 이에는, 예를 들어 아가로스 겔 정제가 있다.

[0443] 원형 dsDNA를 닉킹 엔도뉴클레아제(예를 들어, Nb.BsrDI, R0648L, New England Biolabs)와 함께 인큐베이션하

였다. 이 엔도뉴클레아제는 서열 특이적이고, dsDNA 분자 상의 한쪽 가닥만을 절단한다. 닉킹된 DNA 가닥을 25℃에서 30분 동안 T7 엑소뉴클레아제(New England Biolabs, M0263)와 함께 DNA를 인큐베이션하여 제거하였다. 엑소뉴클레아제 III(M0206, New England Biolabs)이 또한, 예를 들어 37℃에서 30분 동안 사용될 수 있다. 엑소뉴클레아제와의 DNA의 인큐베이션은 실시예 7에 추가로 상세히 기재되어 있다. 반응물의 샘플을 아가로스 겔 내에서 전개하여 원형 ssDNA의 생성을 검증하였다(닉킹된 DNA는 원형 ssDNA보다 더 느리게 전개됨). 원형 ssDNA를 정제 컬럼(Oligo Clean & Concentrator, D4061. Zymo Research) 또는 아가로스 겔 정제(3 kb에 대해서는 Long ssDNA Gel Extraction Kit, DS640, DiagnoCine)를 사용하여 직접 정제하였다. 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 원형 ssDNA는 엑소뉴클레아제 I에 의한 분해에 대해 저항성을 나타내는 것을 밝혀진 한편, 선형 ssDNA는 엑소뉴클레아제 I에 의해 분해되었다(도 11).

[0444] 단일 가닥 및 이중 가닥 DNA 형태 둘 다의 조성 및 순도의 분석을 CRISPR Discovery Kit(DNF-930-K1000CP)를 사용하여 Agilent 5300 Fragment Analyzer 상에서 수행하였다. dsDNA 주입 완충액, 및 삽입 염료를 갖는 전개 겔은 매일 새로 제조한 한편, 최소한의 오일 오버레이를 갖는 마커 트레이 및 모세관 컨디셔닝 용액은 매달 새로 제조하였다. 제조자의 사양에 따라 완충액을 제조하였다. 단일 가닥 DNA 샘플을 1 ng/uL의 최종 농도가 되도록 물 중에 희석시키고, 이중 가닥 DNA 샘플을 100 pg/uL의 최종 농도가 되도록 물 중에 희석시켰다. 각 샘플 웰마다, 2 uL의 DNA 샘플을 22 uL의 희석 완충액(Dilution Buffer)(0.1X TE)에 첨가하고, 각각의 샘플을 2 내지 4개의 반복시험물을 사용하여 전개하였으며, 이때 하나의 웰은 MDK DNA 래더를 위해 사용하였다. CRISPR Discovery Method(CRP-910-33)의 디폴트 설정치를 사용하여 기기 제어기 소프트웨어를 통해 샘플을 전개하였다.

[0445] ProSize Data Analysis Software v4.0.2.7을 사용하여 샘플 트레이스를 분석하였다. 피크 분석 조건을 'Peak Width (sec)'는 15로, 그리고 'Min. peak height (RFU)'는 75로, # Extra Valley Points는 3으로, 그리고 'Valley to Valley Baseline?'은 turned off로 설정하였다. 수동 기저선은 하부 마커로부터 -2분으로 그리고 상부 마커로부터 +2분으로 설정하였다. 이들 조건 하에서 소프트웨어에 의해 피크를 자동으로 검출하고; 폭넓은 피크, 피크 숄더로 인해, 또는 좁은 크기 범위 내의 다수의 피크로 인해 수동 조정을 필요로 하는 경우를 제외하고는 소프트웨어에 의해 피크 폭을 선택하였다.

[0446] 2개의 작제물(CONSTRUCT029) 및 (CONSTRUCT001)의 원형 ssDNA 및 원형 dsDNA를 이 실시예에 기재된 방법을 사용하여 정제하고 분석하였다. 각각의 DNA 제제를 단편 분석기 상에서 4x 반복시험물에서 분석하였으며, 샘플 트레이스가 도 3 내지 도 9에 나타나 있다.

[0447] 주목할 만한 피크는 하기를 포함한다:

[0448] ● 하부 마커(LM) = 1 bp,

[0449] ● 19 bp에서의 잔기 피크(이 피크는 또한 블랭크 웰에 존재하고, DNA 제제로부터 유래되지 않았으며, 이에 따라 최종 피크 정량화 값에서 고려되지 않았음),

[0450] ● 1차 피크,

[0451] ● 2차 피크(불순물), 및

[0452] ● 상부 마커(UM) = 6000 bp

[0453] 블랭크 웰의 트레이스는 단지 19 bp에서만 피크의 존재를 나타낸다(도 3). CONSTRUCT029 원형 ssDNA는 총 피크 면적의 98.8%로 정량화되었다(n=4; 도 4; 표 4). CONSTRUCT029 원형 dsDNA, CONSTRUCT001 원형 dsDNA, CONSTRUCT001 원형 ssDNA 제제 #1, 및 CONSTRUCT001 원형 ssDNA 제제 #2 각각은 각각의 샘플의 100%로 각각 정량화되었으며, 즉, 불순물이 검출되지 않았다(n=4; 도 5 내지 도 8).

[0454] 원형 ssDNA 제제에서의 원형 dsDNA 오염의 확인을 평가하기 위해, 1 ng의 CONSTRUCT001 원형 ssDNA당 7.8 pg의 CONSTRUCT001 원형 dsDNA를 스파이킹하였는데, 이때 시험된 최저 농도에서 피크들은 신뢰성 있게 구별될 수 있었다. 원형 dsDNA에 상응하는 피크는 적색 화살표로 표시되어 있다(도 9). 불순물 분해능은 >6 pg/uL였다.

표 4

[0455] CONSTRUCT029 원형 ssDNA의 상대 피크 정량화.

피크	크기 (bp)	% (농도)				
1	1 (LM)	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	AVG
2	263	0.3	0.9	0.9		

3	272	0.4			1.1	
4	325	99.3	98.4	98.4	98.9	98.8
5	472	0	0.7	0.7		
6	6000 (UM)					

[0456] LM: 하부 마커, UM: 상부 마커

[0457] 요약하면, 이 실시예는 플라스미드 DNA로부터 고순도를 갖는 원형 ssDNA의 성공적인 제제를 기재한다.

[0458] *실시예 7. 엑소뉴클레아제와의 DNA의 인큐베이션*

[0459] 이 실시예는 닉킹된 원형 dsDNA에 대한 엑소뉴클레아제 III 및 T7 엑소뉴클레아제의 효과를 기재한다. 상기에 기재된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 특정 제조 방법은 닉킹된 원형 dsDNA를 이들 엑소뉴클레아제 중 하나로 처리하여 닉킹된 가닥을 제거하여, 원형 ssDNA를 생성하는 단계를 수반한다. 이들 효소는 일반적으로 선형 또는 닉킹된 DNA에 특이적인 것으로 여겨지지만, 이 실시예는 이들 효소가 또한 원형 ssDNA에 대해 약간의 활성을 갖는다는 것을 보여준다. 이 실시예는 고수준의 원형 ssDNA를 제시하면서, 닉킹된 DNA의 양을 감소시키는 적합한 분해 조건을 예시한다.

[0460] 100 μl의 1X rCutSmart 완충액(NEB, B6004S) 중 7.2 μg의 원형 dsDNA를 37℃에서 30분 동안 20 단위의 Nb.BsrDI(NEB, R0648L)를 사용하여 닉킹하였다. 반응물을 80℃에서 20분 동안 인큐베이션함으로써 효소를 열 불활성화하였다. 도 10a는 DNA 겔 전기영동을 통해 시각화된 바와 같은 닉킹된 DNA 작제물을 나타낸다. 50 μl(3.6 μg의 DNA)의 샘플을 7.5 단위의 T7 엑소뉴클레아제(NEB, M0263L)와 함께 25℃에서 30분(도 10b; 레인 4), 1시간(도 10b; 레인 3) 16시간(도 10b; 레인 2) 동안 인큐베이션함으로써, 닉킹된 DNA를 ssDNA로 변환시켰다. 30분간의 인큐베이션은 검출 가능한 닉킹된 DNA의 손실 및 높은 양의 원형 ssDNA의 지속성을 가져왔다. 대조적으로, T7 엑소뉴클레아제와의 16시간의 인큐베이션 기간은 원형 단일 가닥 DNA의 약간의 분해로 이어졌다.

[0461] 이 실시예는 또한 선형 및 원형 dsDNA에 대한 엑소뉴클레아제 I의 효과를 기재한다. 도 11은 CONSTRUCT001의 선형 및 원형 ssDNA 형태의 엑소뉴클레아제 I 분해를 나타낸다. 본 명세서의 방법에 의해 제조된 원형 ssDNA는 엑소뉴클레아제 I에 의한 분해에 대해 저항성을 나타내는 것을 밝혀진 한편, 선형 ssDNA는 엑소뉴클레아제 I에 의해 분해되었다. 이는 엑소뉴클레아제에 대한 원형 DNA의 일반적인 저항성을 강조하며, 이는 그렇지 않으면 DNA (치료용 작제물을 포함함)의 세포내 분해에 기여한다.

[0462] *실시예 8: 시험관내에서의 리포터 유전자 발현의 평가*

[0463] 이 실시예는 배양된 세포에서의 원형 ssDNA 작제물을 사용한 성공적인 유전자 발현을 기재한다.

[0464] 실험 작제물을 상기 실시예 1 내지 실시예 4에서와 같이 제조하였다. 이 실시예에 사용된 원형 ssDNA 작제물 및 대조군이 표 5에 열거되어 있다. 작제물 및 대조군을 다수의 농도로 Neon Transfection System(ThermoFisher, MPK5000)을 사용하여 전기천공을 통해 투여하였다. 수용 세포주는 HEKa 각질세포(American Type Culture Collection(ATCC), PCS-200-011), HepG2 간세포(ATCC, HB-8065), U2OS 골육종 세포(ATCC, HTB-96), 및 HEK293 상피 세포(ATCC, CRL-1573)를 포함하였다. 전기천공 실험을 위해, 대략 5 x 10^6개의 세포를 DPBS 완충액 중에서 30 ms 동안 1500 볼트로 전기천공하였다. 전기천공 후에, 세포를 최종 배양 베셀에 옮겼다. LNP를 사용하여 제형화된 작제물을 웰 플레이트 내의 세포에 직접 투여하였다.

표 5

[0465] 서열 요소들의 구별되는 조합들을 갖는 원형 단일 가닥 DNA 작제물. "C001"은 CONSTRUCT001에 상응하고, "C002"는 CONSTRUCT002에 상응하는 등이다.

명칭	길이 (nt)	5' 요소 A	5' 요소 B	프로모터	도입유전자	폴리A 신호	3' 요소 A	3' 요소 B	3' 요소 C
C001	2191			EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)		
C002	2263	SV40 인핸서		EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)		
C003	2301	3NF		EF1a	mCherry	bGH	3NF	닉킹 부위(들)	

C010	2304	아넬로바이러스 헤어핀		EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)		
C024	2416	아넬로바이러스 헤어핀	3NF	EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)	3NF	
C025	2376	SV40 인핸서	아넬로바이러스 헤어핀	EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)		
C027	2191			EF1a	mCherry (ATG 없음)	bGH	닉킹 부위(들)		
C028	1012				mCherry	bGH	닉킹 부위(들)		
C029	787				mCherry		닉킹 부위(들)		
C030	2380	SV40 인핸서		EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)	SV40 인핸서	
C031	2258			EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)	SV40 인핸서	
C037	2299			EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)	아넬로바이러스 헤어핀	
C038	2462	아넬로바이러스 헤어핀		EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)	아넬로바이러스 헤어핀	
C040	2534	아넬로바이러스 헤어핀	SV40 인핸서	EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)	아넬로바이러스 헤어핀	
C041	2416	3NF		EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)	3NF	아넬로바이러스 헤어핀
C042	2554	아넬로바이러스 헤어핀	3NF	EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)	3NF	아넬로바이러스 헤어핀
C043	2420	3NF	3NF	EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)	3NF	3NF
C044	2308	3NF	3NF	EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)		
C045	2237	3NF		EF1a	mCherry	bGH	닉킹 부위(들)		

[0466] 실험 작제물 및 대조군을 또한 지질 형질감염(리포펙션)을 통해 투여하였다. 제조자의 설명서에 따라 HEKa, HepG2, HEK293, 및 U2OS 세포에서 Lipofectamine3000 형질감염 시약(# L3000001, ThermoFisher)을 사용하여 DNA에 대한 리포펙션을 수행하였다. 1:2:3 비의 DNA:P3000:Lipofectamine3000을 모든 DNA 작제물 및 대조군에 대해 사용하였다. 10,000개의 세포를 형질감염 전 1일 시점에 96웰 플레이트의 각 웰 내로 미리 시딩하였다. 세포가 대략 80 내지 90% 컨플루언스에 도달하였을 때 형질감염을 수행하였다. 96웰 플레이트의 각 웰에 대해, 3X Lipofectamine3000을 먼저 5 uL의 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium(#31985070, ThermoFisher) 중에 희석시켰다. DNA를 2X P3000 시약을 함유하는 5 uL의 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium 중에 희석시켰다. 이어서, DNA를 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium을 함유하는 Lipofectamine3000에 첨가하고, 피펫팅에 의해 온화하게 혼합하였다. 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후에, DNA-Lipofectamine3000 복합체를 웰의 상이한 영역에 적하식으로 완전 배양 배지를 갖는 표적 세포에 첨가하였다. 플레이트를 앞뒤로 그리고 좌우로 온화하게 흔들어서 DNA-Lipofectamine3000 복합체를 균일하게 분포시켰다. 형질감염 후, 세포를 CO_2 조직 배양 인큐베이터 내에서 인큐베이션하고, 형질감염 후 6 내지 8시간 시점에 배양 배지를 교체하였다.

[0467] 형광 리포터 mCherry를 인코딩하는 작제물의 발현을 결정하기 위해, 세포를 먼저 PBS로 세척한 후, 유세포측정 분석을 수행하였다. 모든 유세포측정을 Miltenyi에 의한 MACSQuant VYB 상에서 수행하였다. mCherry 신호의 검출을 위해, 황색 레이저(파장 561 nm)가 여기를 위해 사용되고, 615/620 nm 방출 필터가 사용되었다. 각 샘플마다 20,000개의 사건을 기록하고, Flowjo V.9.0 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다. 세포를 먼저 FSC-A 및 SSC-A 도표 상에서 게이팅하여 세포 잔해를 제거하였다. 이 집단을 FSC-A 및 FSC-H 도표 상에서 추가로 플롯팅하여 단일 세포 집단으로 국한시켰다. 마지막으로, 형광 신호 발현 세포와 형광 신호 비발현 세포 사이의 이변량 도표를 사용하여 발현 세포의 백분율을 결정하였다. 발현 세포들의 분포를 사용하여 각 세포 내에서의 발현 수준을 결정하였다. 다수의 시점에 발현 분석을 수행하였다.

[0468] 도 12a 내지 도 12d는 각각 HEK293, HepG2, U2OS, 및 HEKa 세포에서의 원형 ssDNA 작제물의 발현을 나타낸다. CONSTRUCT001 플라스미드의 발현에 대해 정규화될 때, 리포터-양성 세포의 비율(X-축)과 그러한 세포의 형광 강

도(Y-축) 사이에 양의 상관관계가 관찰되었다. 이들 결과는 다수의 상이한 서열 요소들(표 5)을 갖는 원형 ssDNA가 유사한 발현 프로파일을 갖는 리포터 유전자(mCherry)를 발현함을 입증한다.

[0469] *실시예 9: 시험관내에서 세포에서의 선천성 면역 반응의 평가*

[0470] 이 실시예는 배양된 세포의 선천성 면역 반응에 대한 원형 ssDNA 작제물의 효과를 기재한다.

[0471] 실험 작제물을 상기 실시예 1 내지 실시예 4에서와 같이 제조하고, 이어서 상기 실시예 8에서와 같이 세포에 투여하였다. qPCR을 세포에 대해 수행하여, 시험 세포에서 사이토카인 IFN-b, IL-6, IL-1b, TNF-a, 및 CXCL10의 RNA 수준을 결정하였다. 간략하게 말하면, qPCR에 사용된 프로브-프라이머 세트는 인간 IFN-b(정방향 서열: CTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGC(서열번호 41); 역방향 서열: TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA)(서열번호 42); 인간 IL-6(정방향 서열: AGACAGCCACTCACCTCTTCAG(서열번호 43); 역방향 서열: TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG(서열번호 44)); 인간 IL-1b(정방향 서열: CCACAGACCTTCCAGGAGAATG(서열번호 45); 역방향 서열: GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG(서열번호 46)); 인간 TNF-a(정방향 서열: CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG(서열번호 47); 역방향 서열: ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC(서열번호 48)); 인간 CXCL10(정방향 서열: GGTGAGAAGAGATGTCTGAATCC(서열번호 49); 역방향 서열: GTCCATCCTTGGAAGCACTGCA(서열번호 50)); 인간 CCL20(정방향 서열: AAGTTGTCTGTGTGCGCAAATCC(서열번호 51); 역방향 서열: CCATTCCAGAAAAGCCACAGTTTT(서열번호 52)), 인간 GAPDH(정방향 서열: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG(서열번호 53); 역방향 서열: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA(서열번호 54))였다. Life Technologies Corporation으로부터의 SYBR Select Master Mix와 함께 QuantStudio7 Flex Real-time PCR System을 사용하여 분석을 수행하였다. RNA 발현을 GAPDH에 대해 정규화하고, 관련 비처리된 대조군 대비 배수 변화(fold-change)로서 표현하였다.

[0472] 원형 ssDNA 및 원형 dsDNA로서 생성되고, 리포펙션을 통해 HEKa 세포에 전달된, CONSTRUCT001(이는 도입유전자 mCherry를 포함함)의 발현 및 면역원성이 도 13a 및 도 13b와 도 14a 내지 도 14e에 나타나 있다. $mCherry^{+}$ 세포의 비율에 의해 정의될 때, 동일한 몰농도("1x") 및 동일한 질량("2x")의 원형 dsDNA보다 더 낮은 수준으로 원형 ssDNA가 발현되었다(도 13a 및 도 13b). 역으로, 도 14a 내지 도 14e에 나타낸 바와 같이, 동일한 몰량 및 질량의 원형 ssDNA는 인터페론(즉, IFN-B) 및 전염증성 사이토카인 및 케모카인(예를 들어, IL-6)의 감소된 생성에 의해 입증된 바와 같이, 원형 dsDNA보다 상당히 덜 면역원성이었다. 이들 결과는 원형 dsDNA에 비해 원형 ssDNA의 감소된 선천 면역원성을 입증한다.

[0473] *실시예 10. 화학적 변형을 갖는 원형 단일 가닥 DNA(ssDNA)의 제조.*

[0474] 이 실시예는 화학적 변형을 갖는 원형 ssDNA의 제조 및 발현 프로파일링을 기재한다.

[0475] 50 ul의 1x CutSmart 완충액(NEB, B6004) 중에서 4 ug의 원형 dsDNA 및 20 단위의 Nb.BsrDI(NEB, R0648)를 혼합함으로써 DNA를 닉킹하였다. 반응물을 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0476] 150 μl의 메틸트랜스퍼라제 반응 믹스(최종 농도가 160 μM이 되는 S-아데노실메티오닌과 20 단위의 EcoGII 메틸트랜스퍼라제(NEB, M0603))를 1X CutSmart 완충액 중에서 닉킹된 DNA에 첨가하여 DNA를 메틸화하였다. 반응물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0477] 앞서 기재된 바와 같이 Zymo DNA 정제 컬럼을 사용하여 DNA를 정제하였다. 50 μl의 1x CutSmart 완충액 중에서 4 μg의 DNA를 15 단위의 T7 엑소뉴클레아제(NEB, M0263)와 배합하고, 반응물을 25 ℃에서 30분 동안 인큐베이션함으로써, 닉킹된 원형 메틸화 dsDNA를 메틸화된 원형 ssDNA 형태로 변환시켰다. DNA를 앞서 기재된 바와 같이 겔 전기영동에 의해 정제하였다.

[0478] 도 15는 다음 2가지 형태의 CONSTRUCT001의 발현을 나타낸다: 비변형된 단일 가닥 원형 DNA, 및 m6A(N^{6}-메틸아데노신) DNA 변형을 갖는 단일 가닥 DNA. 화학적으로 변형된 원형 단일 가닥 DNA는 형질감염된 세포에서의 mCherry 리포터의 발현에 의해 입증된 바와 같이, 검출 가능한 기능을 유지하였다. 이 결과는 원형 ssDNA로부터의 도입유전자 발현이 화학적 변형에 의해 영향을 받을 수 있음을 나타낸다.

[0479] *실시예 11: DNA 2차 구조의 전산적 예측.*

[0480] 이 실시예는 원형 ssDNA의 2차 구조의 모델링을 기재한다.

[0481] 본 명세서에 기재된 ssDNA에 의해 형성된 이중 가닥 영역이 문헌[Lorenz et al. 2011. *ViennaRNA Package 2.0*. Algorithms for Molecular Biology, Volume 6, Article 26]에 기재된 바와 같이 결정되었다. RNAFold 웹 서버(http://rna.tbi.univie.ac.at//cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi)를 사용하여 본 명세서에 기재된 CONSTRUCT001의 이중 가닥 영역을 예측하였다. 간략하게 말하면, 디폴트로 "fold algorithms" 및 "basic

options"를 사용하여, 최소 자유 에너지에 기초하여 CONSTRUCT001의 2차 구조를 모델링하였다. "DNA" 및 "circular" 파라미터의 선택을 제외하고, 디폴트로 "advanced folding options"를 사용하였다.

[0482] 도 16a 내지 도 16d는 원형 ssDNA로서 CONSTRUCT001에 대해 생성된 구조 예측을 나타낸다. 16개의 연속 염기쌍을 초과하는 이중 가닥성의 영역은 예측되지 않았다. 이러한 결과는 생리학적 조건 하에서 선천성 면역 반응의 자극과 관련된 이중 가닥성의 긴 영역이 결여되어 있는 원형 ssDNA 작제물이 생성될 수 있음을 시사한다(문헌 [Luecke et al. 2017. *EMBO Reports* Volume 18, Issue 10:1707-1715] 참조).

[0483] *실시예 12: cssDNA 작제물의 순도 수준*

[0484] 실시예 1 내지 실시예 4에 기재된 바와 같이 원형 단일 가닥 DNA 작제물을 생성하였다. 이들의 수준 및 순도를 결정하였다. 순도는 흡광도 비, 구체적으로는 A260/A280 및 A230/A260을 사용하여 결정하였다(표 6).

표 6

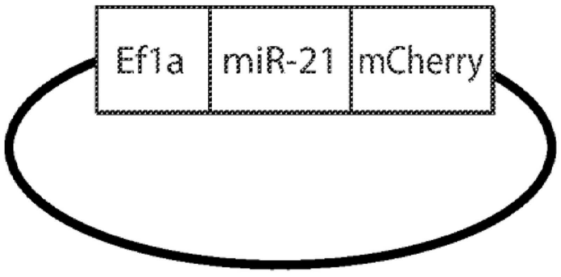
[0485] 원형 단일 가닥 DNA 작제물의 센스(SEN) 및 안티센스(ANS) 가닥의 순도 측정치

작제물	ng/ul	총 ug	260/280 비	230/260 비
C001-circSS-SEN	46.3	2.3	1.69	1.79
C001-circSS-SEN	18.6	1.9	1.63	0.89
C001-circSS-ANS	49	7.1	1.76	0.34
C029-circSS-SEN	51.9	5.7	1.72	1.68
C029-circSS-ANS	46.1	5.3	1.63	1.64

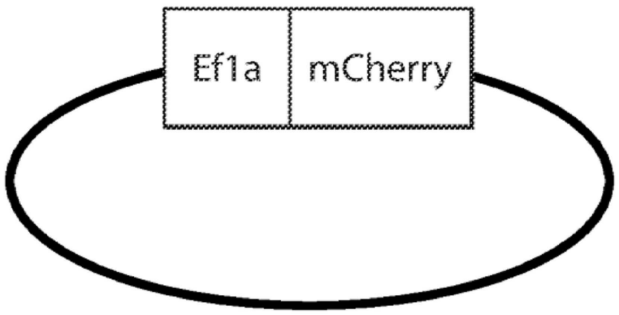
[0486] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별적인 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 참고로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 지시된 것처럼 그와 동일한 정도로 전체적으로 참고로 포함된다. 본 명세서의 용어와 도입된 참고문헌의 용어 사이에 충돌이 있는 경우, 본 명세서의 용어가 우선된다.

도면

도면1a



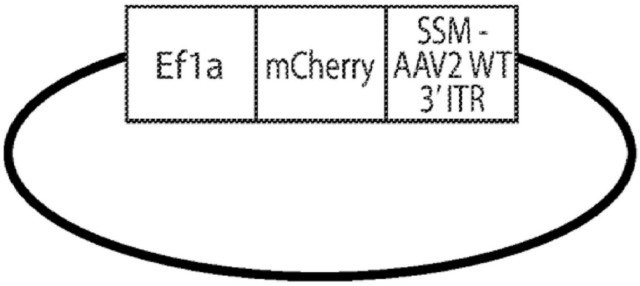
도면1b



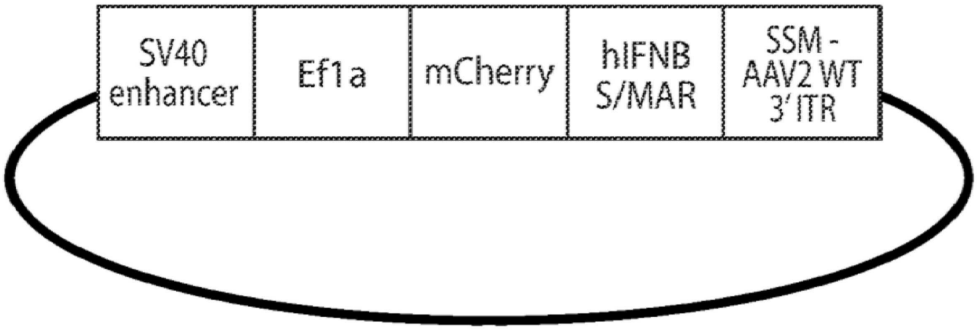
도면1c



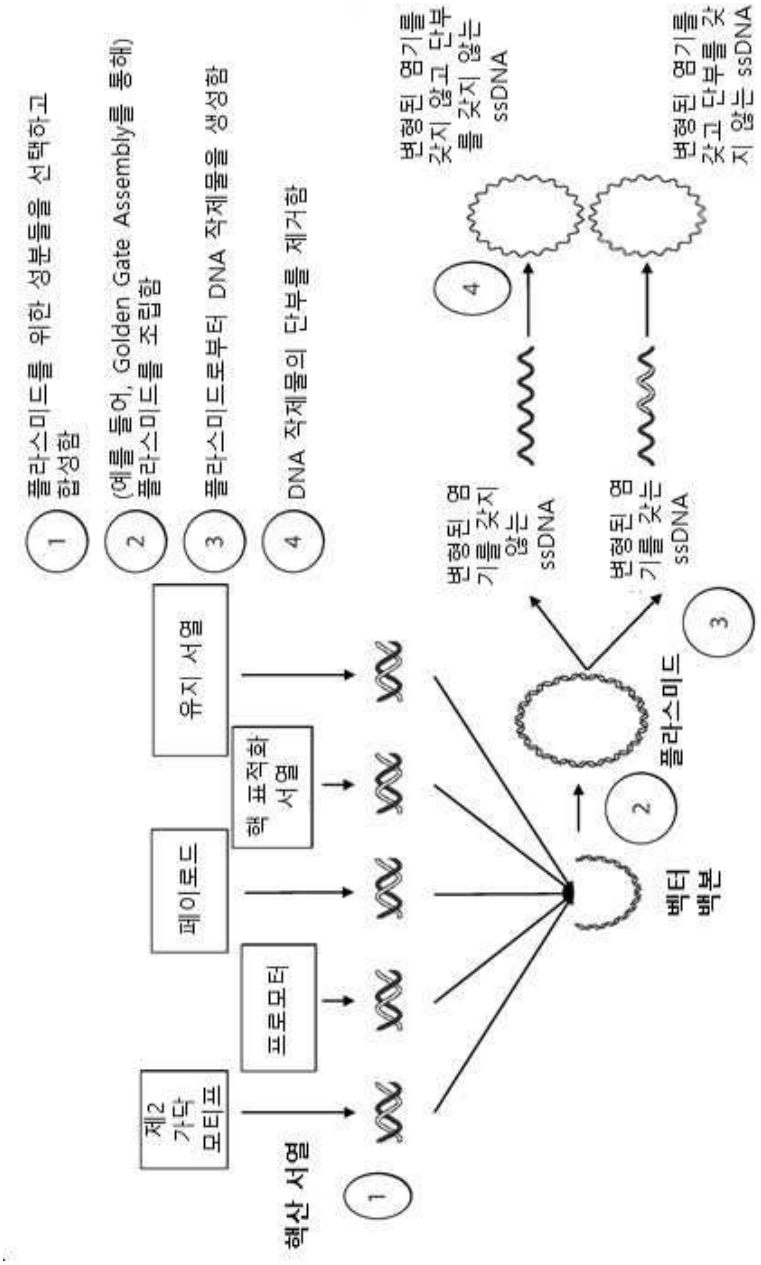
도면1d



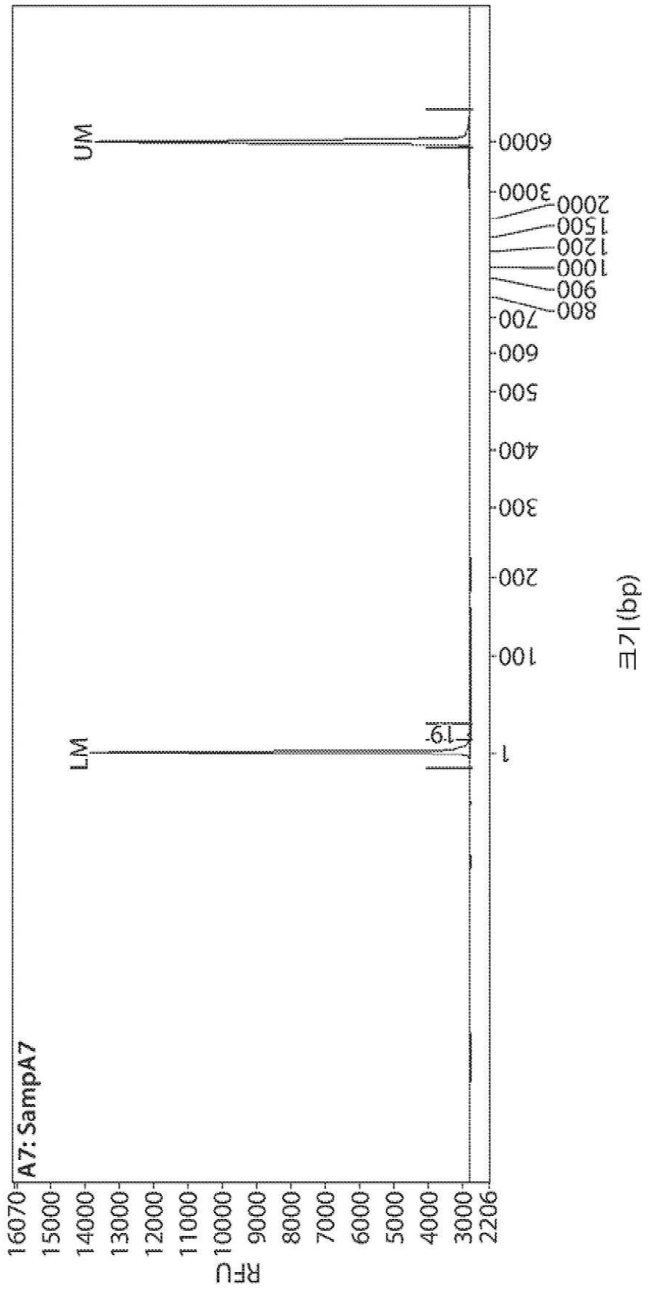
도면1e



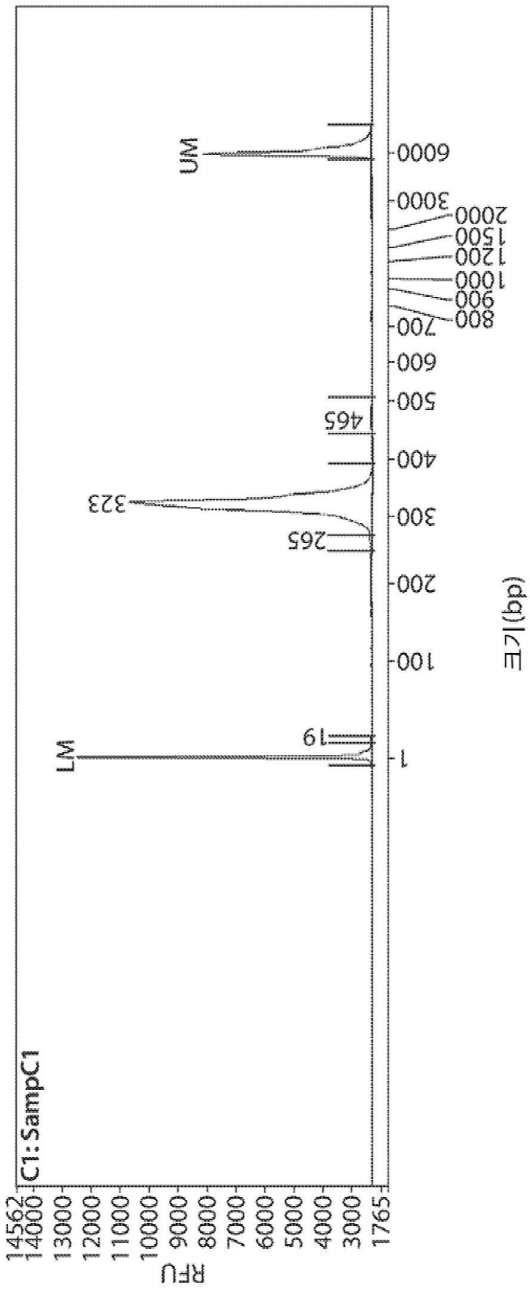
도면2


① 플라스미드를 위한 성분들을 선택하고 합성함
② (예를 들어, Golden Gate Assembly를 통해) 플라스미드를 조립함
③ 플라스미드로부터 DNA 작제물을 생성함
④ DNA 작제물의 단부를 제거함
핵산 서열
제2 가닥 모티프
프로모터
페이로드
핵 표적화 서열
유지 서열
벡터 백본
플라스미드
변형된 염기를 갖지 않는 ssDNA
변형된 염기를 갖는 ssDNA
변형된 염기를 갖지 않고 단부를 갖지 않는 ssDNA
변형된 염기를 갖고 단부를 갖지 않는 ssDNA

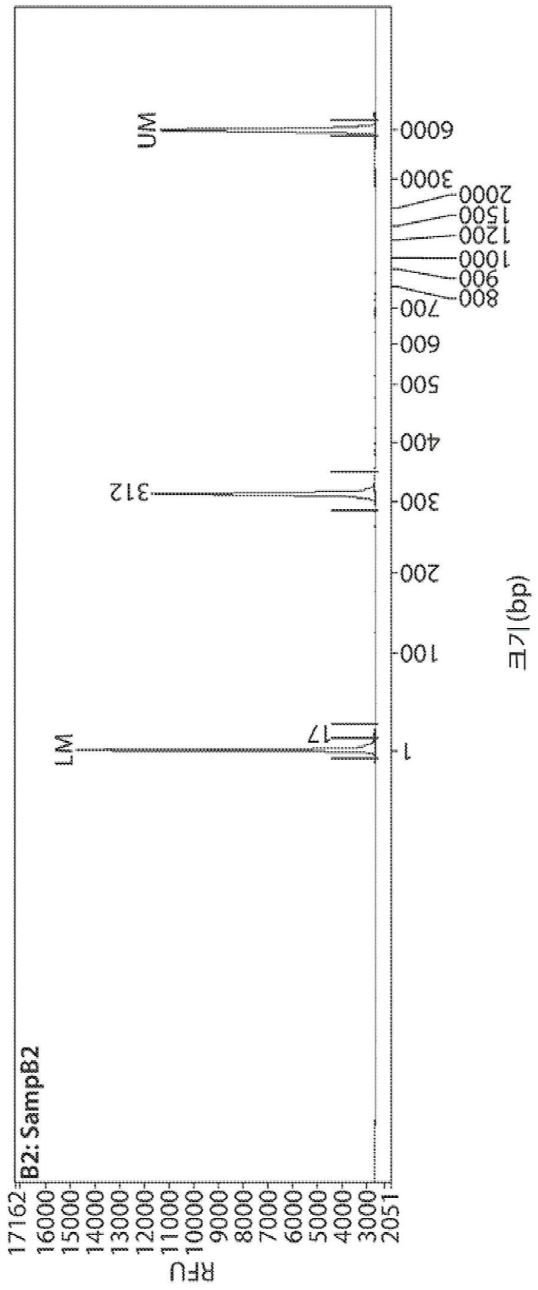
도면3


A7: SampA7
RFU
16070
15000
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2206
LM
UM
19
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1200
1500
2000
3000
6000
크기(bp)

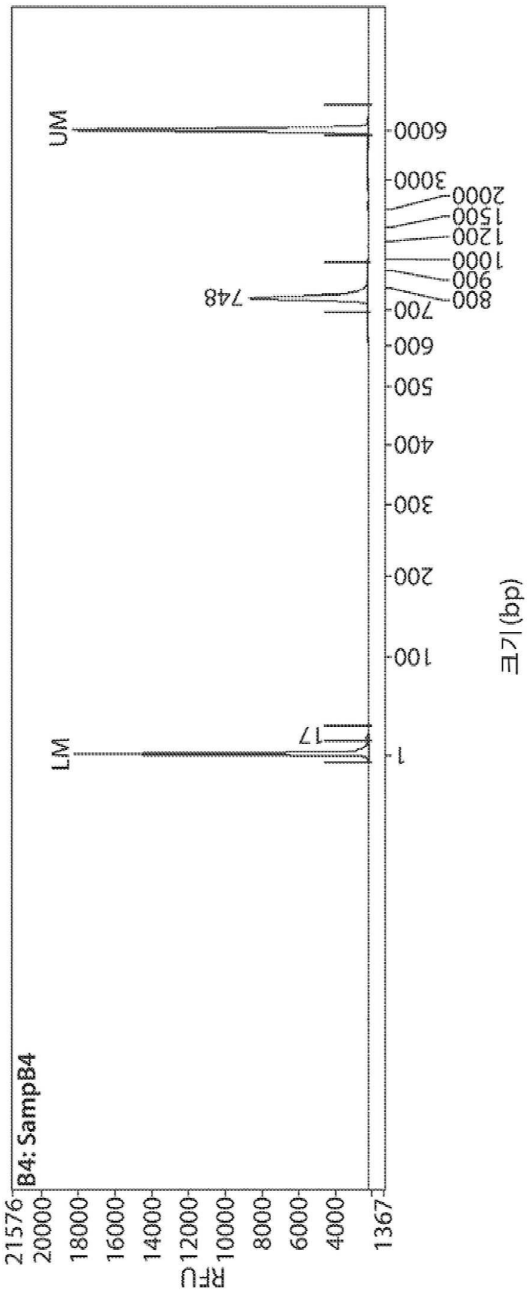
도면4


C1:SampC1
RFU
14562
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
1765
LM
UM
19
265
323
465
크기(bp)
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1200
1500
2000
3000
6000

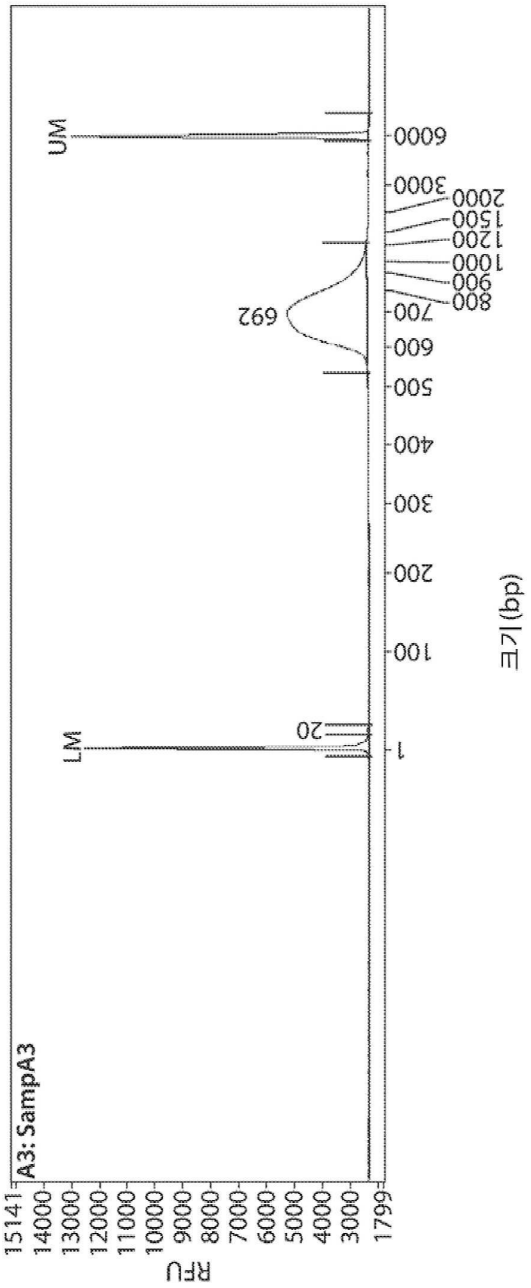
도면5


B2: SampB2
RFU
17162
16000
15000
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2051
LM
17
UM
312
크기(bp)
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1200
1500
2000
3000
6000

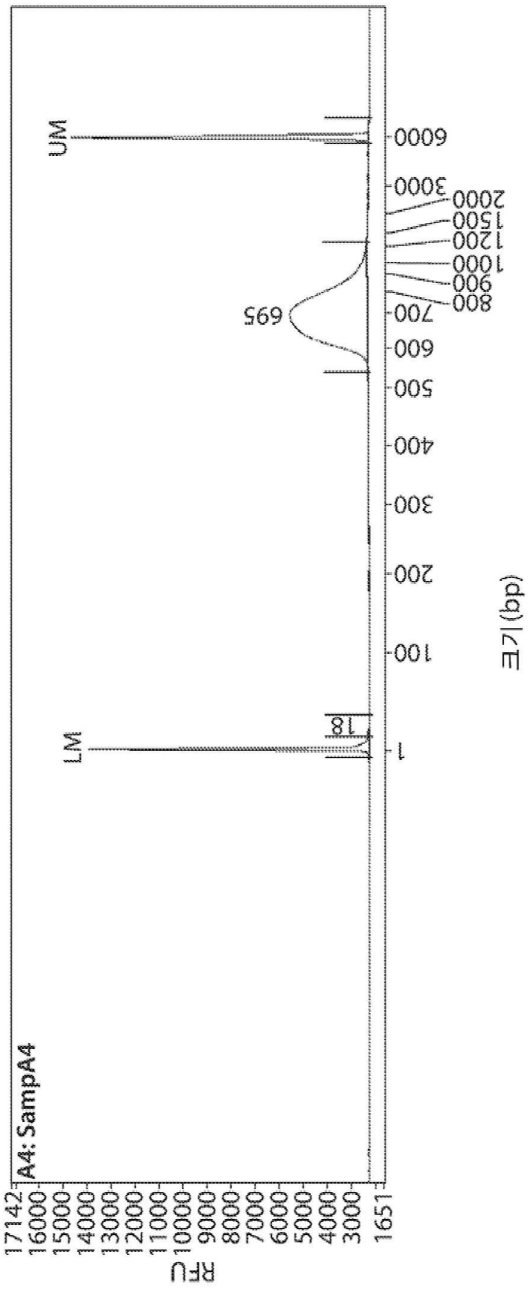
도면6


B4: SampB4
RFU
21576
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
1367
크기 (bp)
6000
3000
2000
1500
1200
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
1
UM
LM
748
17

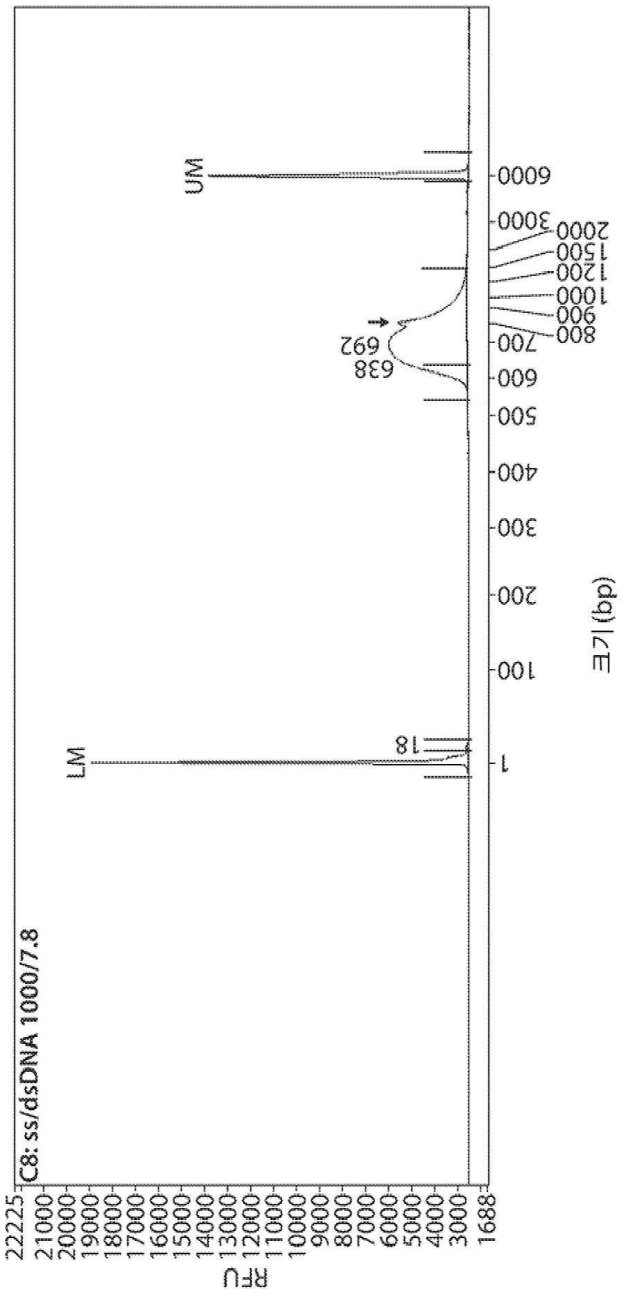
도면7


A3: SampA3
RFU
15141
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
1799
LM
UM
20
692
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1200
1500
2000
3000
6000
크기(bp)

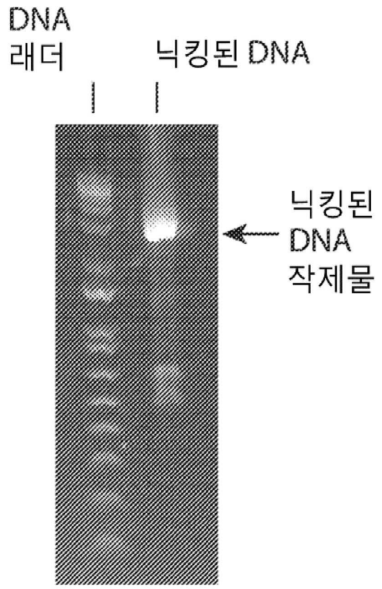
도면8


A4: SampA4
RFU
17142
16000
15000
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
1651
LM
18
UM
695
크기 (bp)
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1200
1500
2000
3000
6000

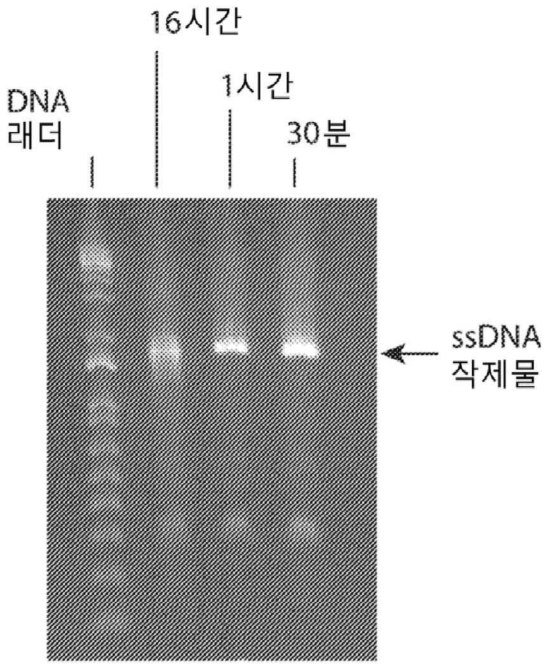
도면9


C8: ss/dsDNA 1000/7.8
RFU
22225
21000
20000
19000
18000
17000
16000
15000
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
1688
WT
UM
18
638
692
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1200
1500
2000
3000
6000
크기(bp)

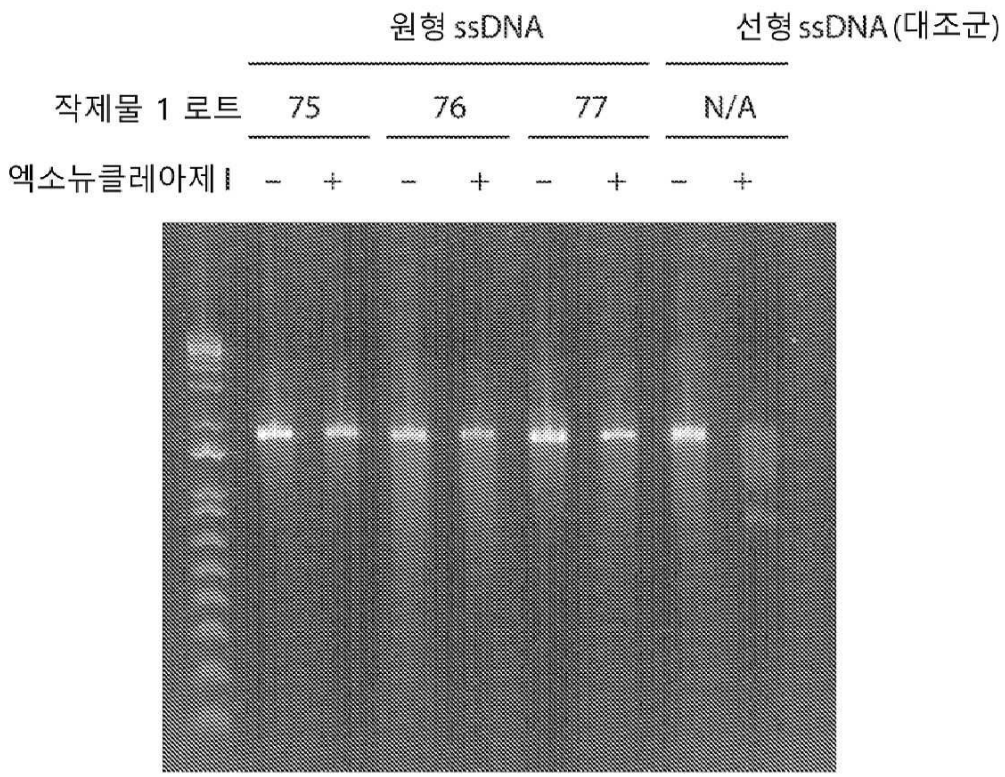
도면10a



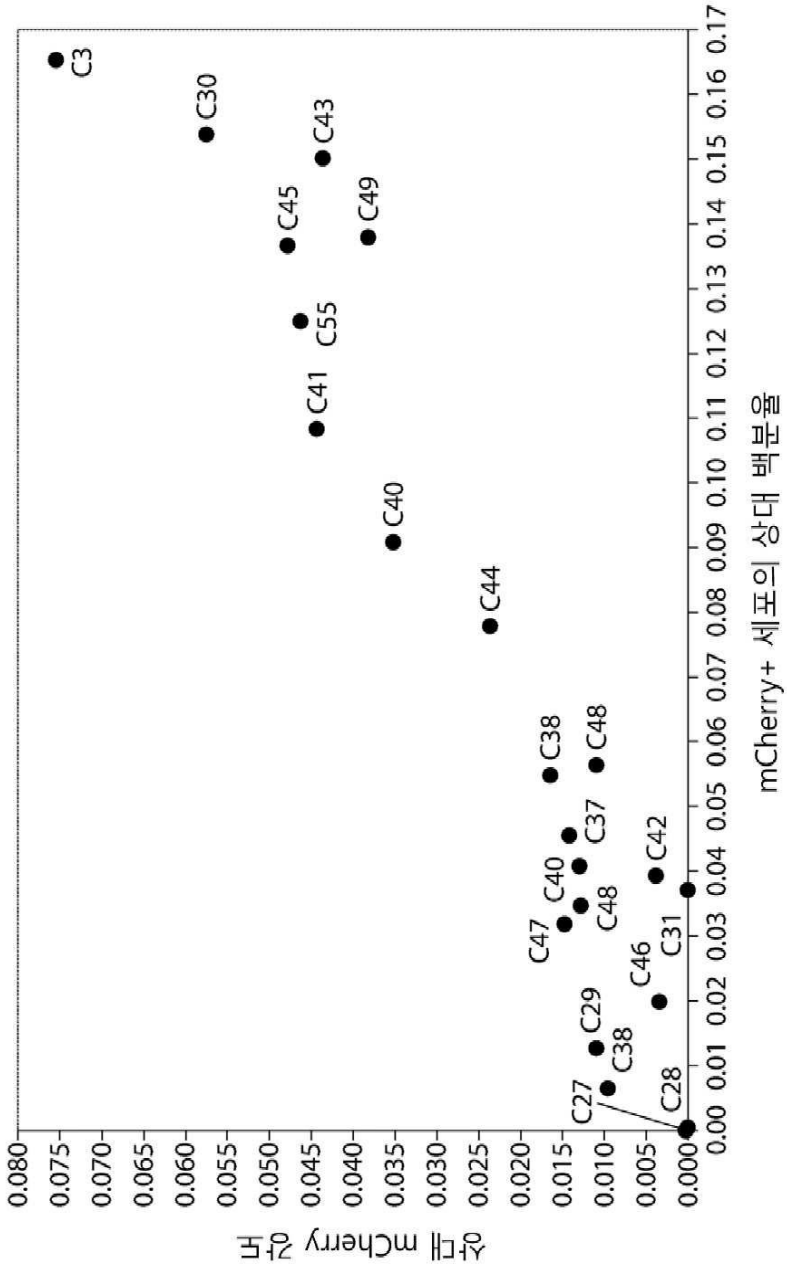
도면10b



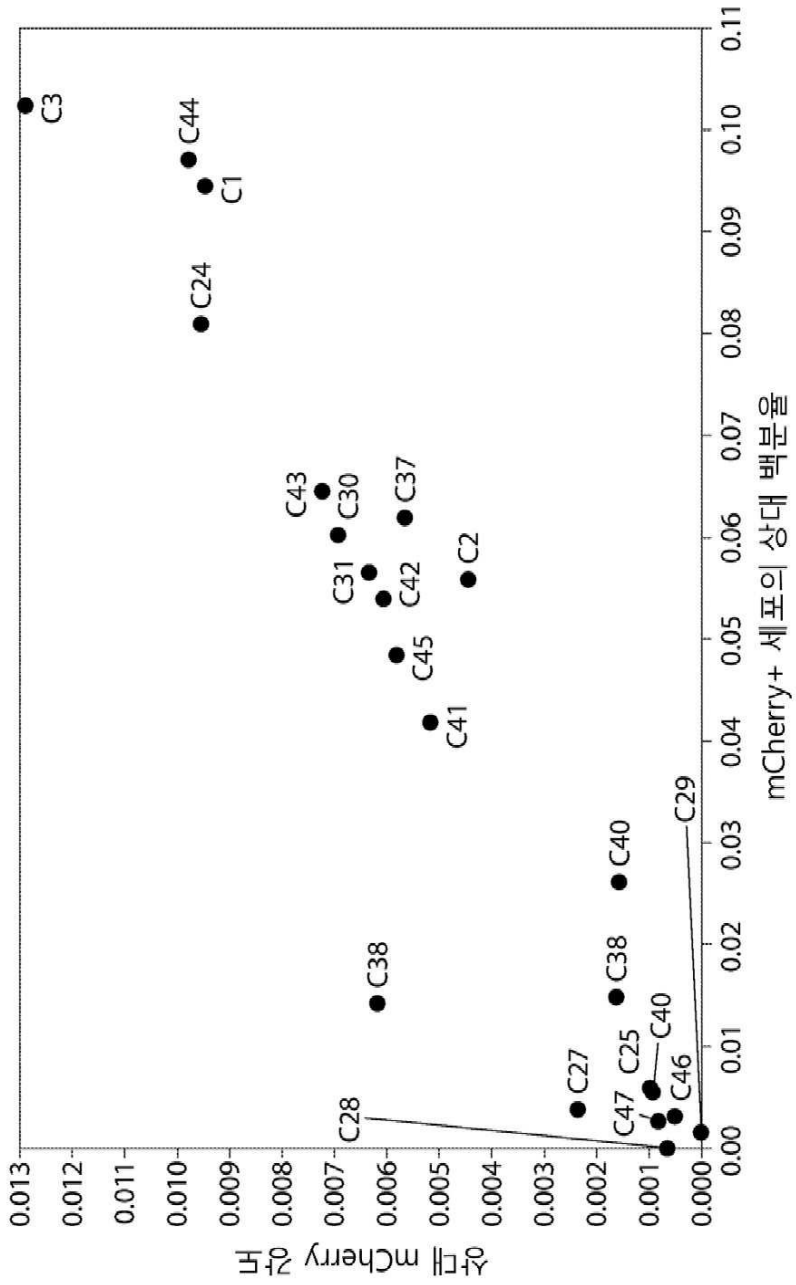
도면11



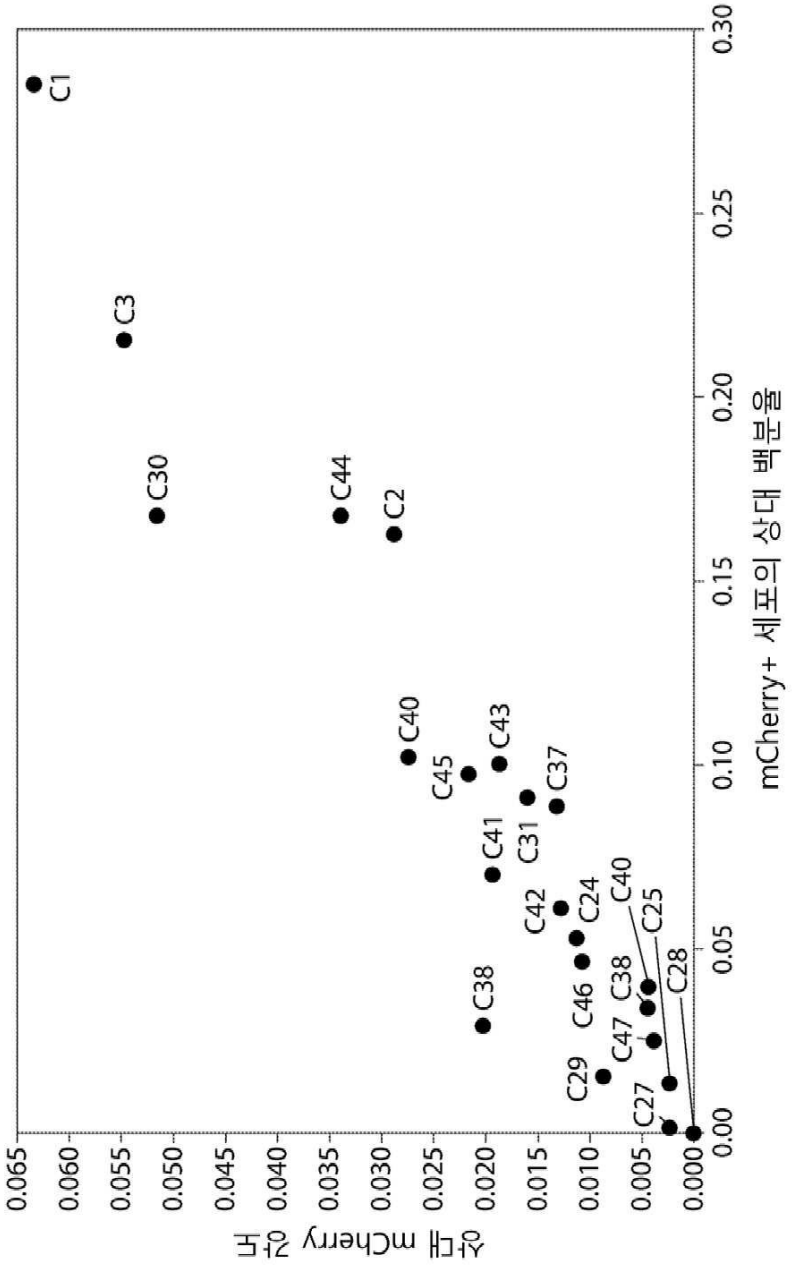
도면12a


C3
C30
C43
C45
C49
C55
C41
C40
C44
C38
C48
C37
C42
C40
C48
C47
C31
C46
C29
C38
C27
C28
0.000
0.005
0.010
0.015
0.020
0.025
0.030
0.035
0.040
0.045
0.050
0.055
0.060
0.065
0.070
0.075
0.080
0.00 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
mCherry+ 세포의 상대 백분율
mCherry 양성 세포의 분획

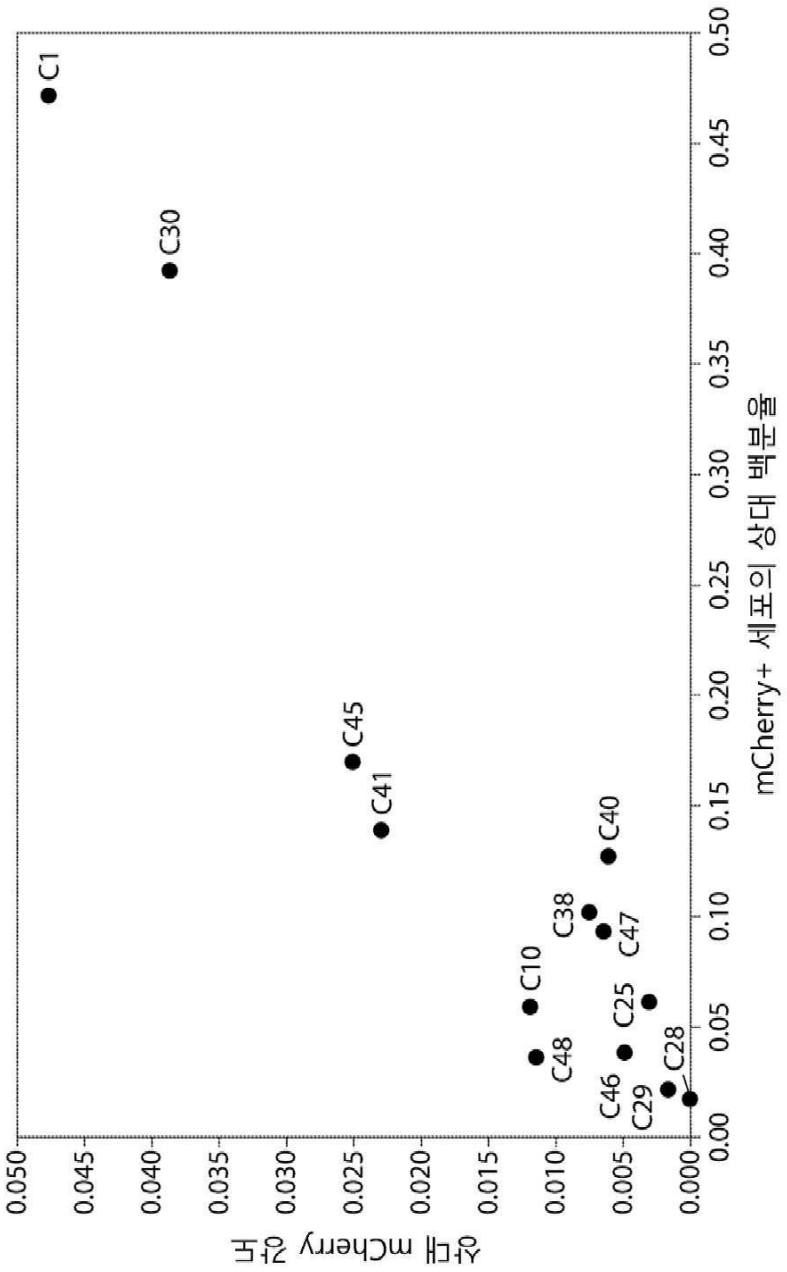
도면12b


mCherry+ 세포의 상대 백분율
상대 mCherry 양
0.00
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
0.07
0.08
0.09
0.10
0.11
0.000
0.001
0.002
0.003
0.004
0.005
0.006
0.007
0.008
0.009
0.010
0.011
0.012
0.013
C3
C44
C1
C24
C43
C30
C37
C31
C42
C2
C45
C41
C29
C40
C38
C38
C40
C27
C25
C46
C47
C28

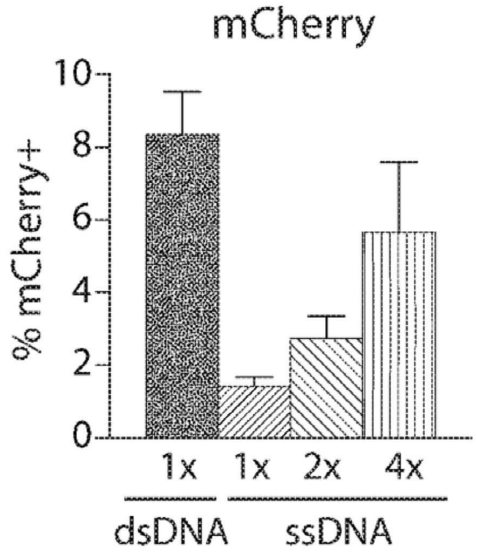
도면12c


C1
C3
C30
C44
C2
C40
C45
C43
C37
C41
C31
C42
C24
C40
C25
C38
C28
C46
C38
C47
C29
C27
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30
mCherry+ 세포의 상대 백분율
0.000
0.005
0.010
0.015
0.020
0.025
0.030
0.035
0.040
0.045
0.050
0.055
0.060
0.065
mCherry 양성 세포의 상대 백분율

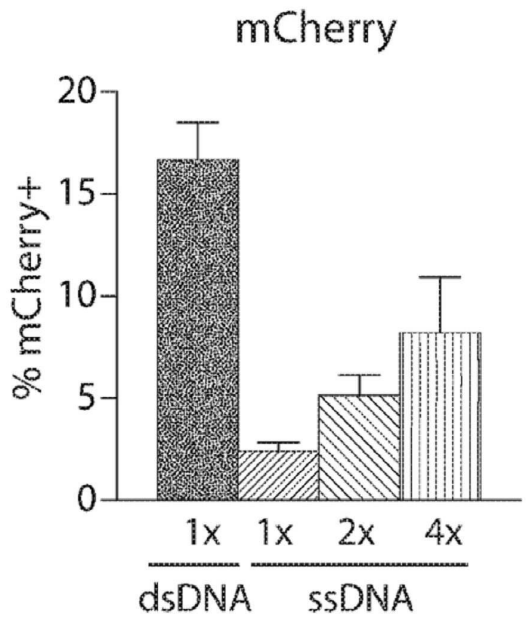
도면12d


C1
C30
C45
C41
C40
C38
C47
C10
C25
C48
C28
C46
C29
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30
0.35
0.40
0.45
0.50
mCherry+ 세포의 상대 백분율
0.050
0.045
0.040
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
상대 mCherry 강도

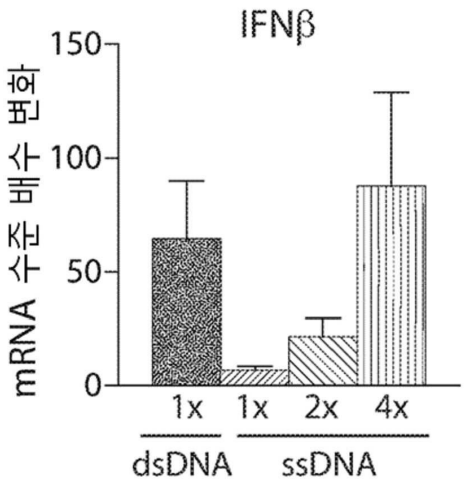
도면13a


mCherry
% mCherry+
10
8
6
4
2
0
1x
1x
2x
4x
dsDNA
ssDNA

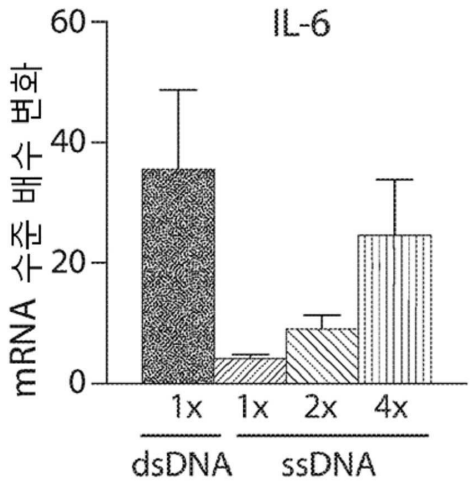
도면13b


mCherry
% mCherry+
20
15
10
5
0
1x
1x
2x
4x
dsDNA
ssDNA

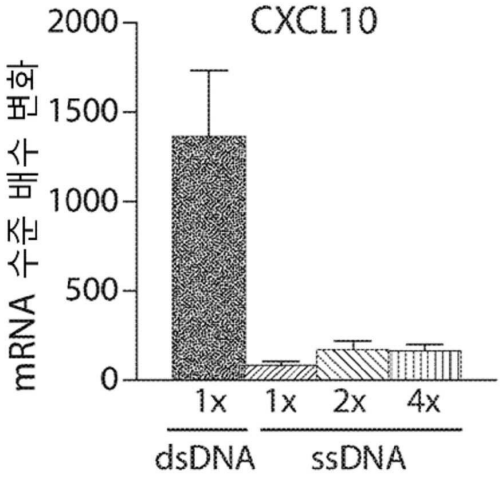
도면14a



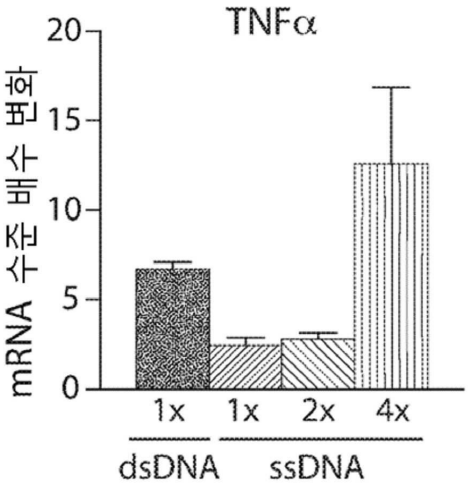
도면14b



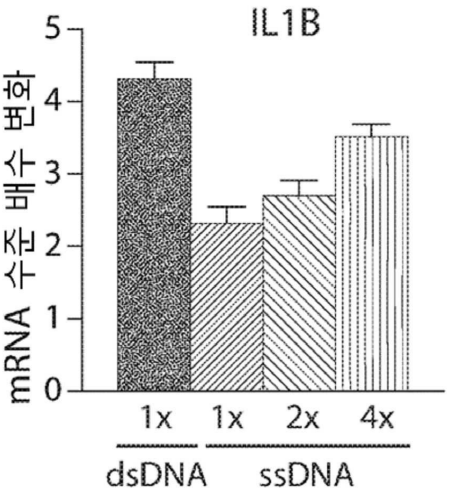
도면14c



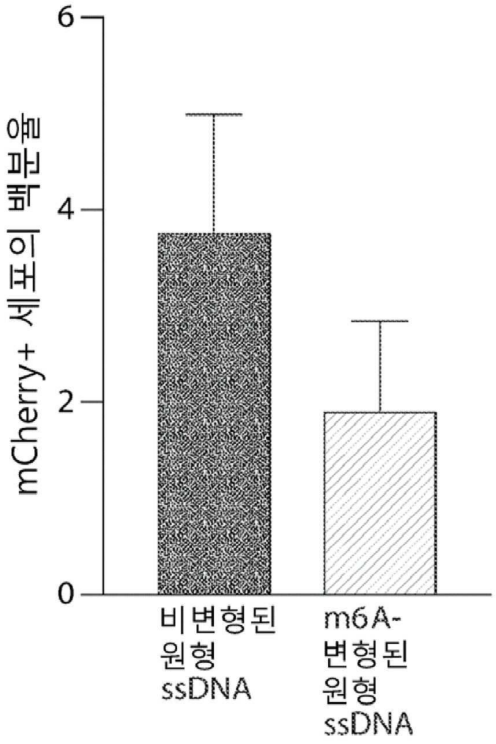
도면14d


TNFα
mRNA 수준 배수 변화
20
15
10
5
0
1x
1x
2x
4x
dsDNA
ssDNA

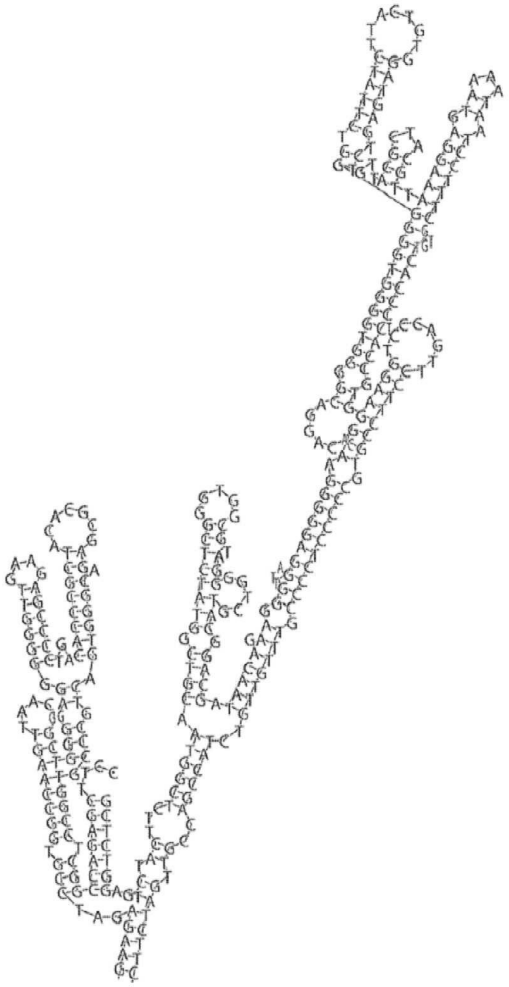
도면14e


IL1B
mRNA 수준 배수 변화
5
4
3
2
1
0
1x
1x
2x
4x
dsDNA
ssDNA

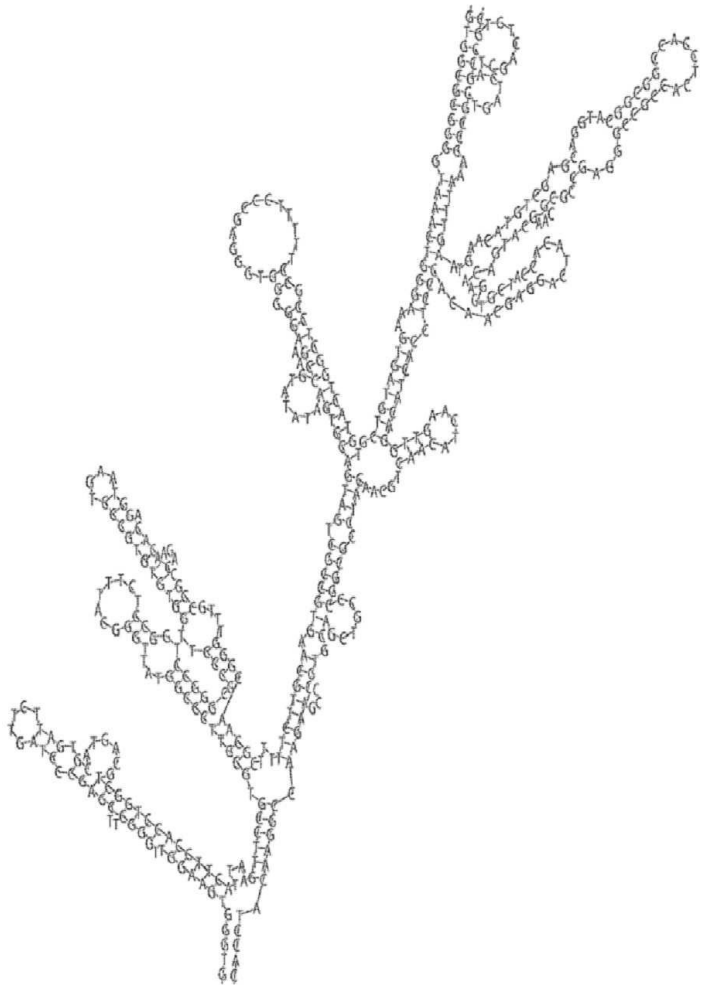
도면15



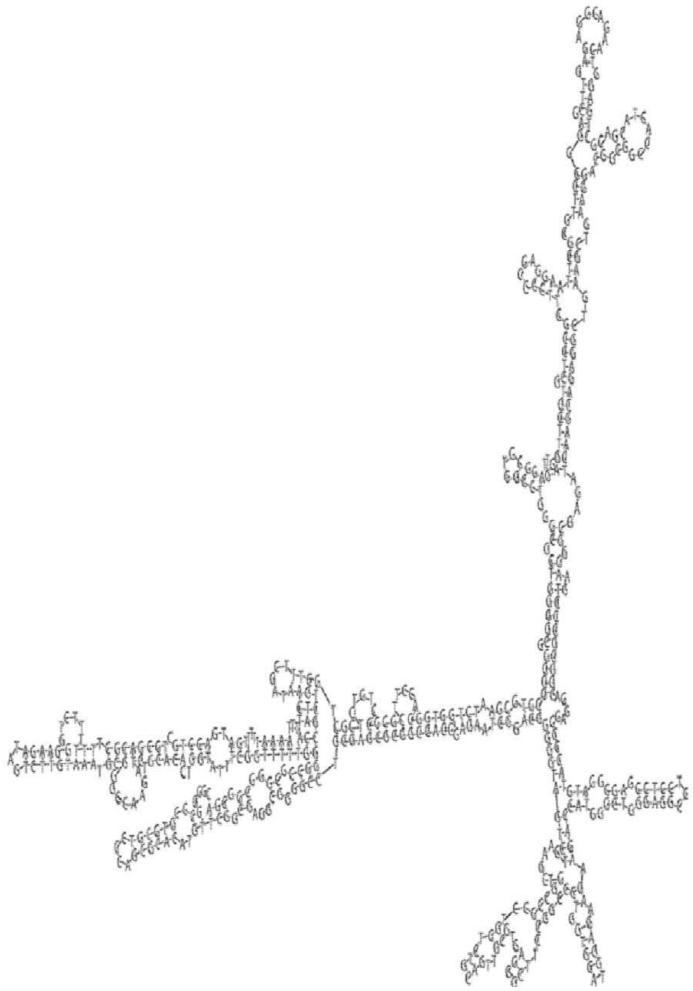
도면16a



도면16b



도면16c



도면16d

