(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-516638
(P2025-516638A)
(43)公表日　令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	ＺＺＮＡ	４Ｃ０５７
Ｃ１２Ｎ	*15/88 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/88	Ｚ	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*37/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全129頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-566530(P2024-566530)
(86)(22)出願日　令和5年5月12日(2023.5.12)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月15日(2024.11.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/066950
(87)国際公開番号　WO2023/220729
(87)国際公開日　令和5年11月16日(2023.11.16)
(31)優先権主張番号　63/341,960
(32)優先日　令和4年5月13日(2022.5.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　523459789
フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ セブン，エルエルシー
アメリカ合衆国，マサチューセッツ ０２１４２ ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００ イー
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　二本鎖ＤＮＡ組成物及び関連する方法

(57)【要約】
本開示は、例えば、治療用二本鎖構築物（ＴＤＳＣ）を提供する。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、二本鎖ＤＮＡ領域と、上流閉鎖型末端と、下流閉鎖型末端とを含む。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、化学修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、エンドヌクレアーゼ消化に対して耐性を示し、及び／又は免疫センサー認識に対して耐性を示し、ＴＤＳＣにコードされた異種ペイロードの発現を補助する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）閉鎖型末端である上流ＤＮＡ末端形態；
ｂ）二本鎖領域；
ｃ）閉鎖型末端である下流ＤＮＡ末端形態
を含むＴＤＳＣであって、
前記ＴＤＳＣが１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含み、
１つ以上の化学修飾ヌクレオチドが化学修飾シトシンヌクレオチド及び／又はホスホロチオエート結合を含む、ＴＤＳＣ。
【請求項２】
前記上流ＤＮＡ末端形態及び下流ＤＮＡ末端形態の一方又は両方がループを含む、請求項１に記載のＴＤＳＣ。
【請求項３】
前記上流ＤＮＡ末端形態、前記下流ＤＮＡ末端形態、及び／又は前記二本鎖領域が１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む、請求項１又は２に記載のＴＤＳＣ。
【請求項４】
前記化学修飾ヌクレオチドの１つ以上が、ペプチド又はタンパク質にコンジュゲートしている、請求項１～３のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項５】
前記化学修飾ヌクレオチドの１つ以上がホスホロチオエート結合を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項６】
前記ＴＤＳＣの第１鎖及び第２鎖の各々が１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項７】
前記ＴＤＳＣの第１鎖及び第２鎖の各々が１つ以上のホスホロチオエート結合を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項８】
前記上流及び／又は下流ＤＮＡ末端形態が、各々、少なくとも１、２、３、４、５、又は６個のホスホロチオエート結合を（例えば、前記第１鎖、前記第２鎖、又は前記第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、前記上流及び下流ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチド間に）含む、請求項１～７のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項９】
１つ以上の化学修飾ヌクレオチドが化学修飾シトシンヌクレオチドを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１０】
前記化学修飾シトシンヌクレオチドが前記シトシンの炭素５位に水素以外の置換を有する、請求項９に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１１】
ｉ）プロモーター配列（ここで任意選択で前記プロモーター配列は前記二本鎖領域にある）；
ｉｉ）前記プロモーター配列に作動可能に連結されたペイロード配列（例えば、治療用ペイロード配列）（ここで任意選択で前記ペイロード配列は前記二本鎖領域にある）；
ｉｉｉ）異種機能性配列、例えば、核標的化配列又は調節配列；
ｉｖ）維持配列；及び／又は
ｖ）複製起点
のうちの１つ以上を含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１２】
前記ペイロード配列がポリペプチド（例えば、タンパク質）をコードする、請求項１１

に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１３】
前記ペイロード配列が、機能性ＲＮＡ（例えば、ｍｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、又はｔＲＮＡ）をコードする、請求項１１又は１２に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１４】
前記ペイロード配列が、標的細胞にとって異種である、請求項１１～１３のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１５】
前記ＴＤＳＣが、エンドヌクレアーゼ消化に対して耐性を示す及び／又は免疫センサー認識に対して耐性を示す、請求項１～１４のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１６】
前記上流ＤＮＡ末端形態と前記下流ＤＮＡ末端形態とが同じヌクレオチド配列を有する、請求項１～１５のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１７】
前記上流ＤＮＡ末端形態と前記下流ＤＮＡ末端形態とが異なるヌクレオチド配列を有する、請求項１～１５のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１８】
前記上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方がヘアピンを含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項１９】
前記閉鎖型末端が、ハイブリダイズしない（例えば、二本鎖領域の一部でない）１個以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、４０、又は５０個）のヌクレオチドを含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２０】
前記閉鎖型末端が、ハイブリダイズしないいかなるヌクレオチドも含まない（例えば、前記閉鎖型末端の全てのヌクレオチドが別のヌクレオチドとハイブリダイズしている）、請求項１～１７のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２１】
前記上流ＤＮＡ末端形態、前記下流ＤＮＡ末端形態、又は両方がプロテロメラーゼ配列を含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２２】
前記上流ＤＮＡ末端形態、前記下流ＤＮＡ末端形態、又は両方がプロテロメラーゼ配列を含まない、請求項１～２０のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２３】
前記ＴＤＳＣの糖の８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、又は１００％がデオキシリボース糖である、請求項１～２２のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２４】
前記ＴＤＳＣが（例えば、前記ＴＤＳＣを含む細胞にとって天然のＤＮＡポリメラーゼにより）複製可能である、請求項１～２３のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２５】
前記ＴＤＳＣが複製可能でない、請求項１～２３のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２６】
前記ＴＤＳＣが線状であり、環状化可能である、請求項１～２５のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２７】
前記ＴＤＳＣが線状であり、環状化可能でない、請求項１～２５のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２８】

前記ＴＤＳＣ又はその一部分が、ゲノムに組み込み可能である、請求項１～２７のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項２９】
前記ＴＤＳＣ又はその一部分が、ゲノムに組み込み可能でない、請求項１～２７のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項３０】
前記ＴＤＳＣが、コンカテマー化可能である、請求項１～２９のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項３１】
前記ＴＤＳＣが、コンカテマー化可能でない、請求項１～２９のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ。
【請求項３２】
ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；
ｂ）二本鎖領域；及び
ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態
を含むＴＤＳＣであって、
１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含むＴＤＳＣ。
【請求項３３】
前記上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が開放型末端である、請求項３２に記載のＴＤＳＣ。
【請求項３４】
前記上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が平滑末端又は粘着末端である、請求項３２又は３３に記載のＴＤＳＣ。
【請求項３５】
ａ）各鎖上にホスホロチオエート修飾を含む上流二本鎖平滑末端化ＤＮＡ末端形態（例えば、二本鎖化及び平滑末端化されている上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）；
ｂ）二本鎖領域；及び
ｃ）各鎖上にホスホロチオエート修飾を含む下流二本鎖平滑末端化ＤＮＡ末端形態（例えば、二本鎖化及び平滑末端化されている下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）
を含むＴＤＳＣ。
【請求項３６】
ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；
ｂ）二本鎖領域；
ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態
を含むＴＤＳＣであって、
前記上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び前記下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方がＹ型アダプター構造を含み、
前記ＴＤＳＣが任意選択で１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む、ＴＤＳＣ。
【請求項３７】
ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；
ｂ）二本鎖領域；
ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態
を含むＴＤＳＣであって、
前記上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び前記下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が、核標的化配列、維持配列、又は標的細胞中の内因性ポリペプチドに結合する配列のうちの１つ以上を含む、ＴＤＳＣ。
【請求項３８】
ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；

ｂ）二本鎖領域；
ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態
を含むＴＤＳＣであって、
前記上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び前記下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が、以下の特徴：
ｉ）核酸配列ＴＡＴＣＡＧＣＡＣＡＣＡＡＴＴＧＣＣＣＡＴＴＡＴＡＣＧＣ（配列番号５５）及びＧＣＧＴＡＴＡＡＴＧＧＧＣＡＡＴＴＧＴＧＴＧＣＴＧＡＴＡ（配列番号５６）、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する核酸配列；及び／又は核酸配列ＴＡＴＣＡＧＣＡＣＡＣＡＡＴＡＧＴＣＣＡＴＴＡＴＡＣＧＣ（配列番号５７）及びＧＣＧＴＡＴＡＡＴＧＧＡＣＴＡＴＴＧＴＧＴＧＣＴＧＡＴＡ（配列番号５８）を含まない；
ｉｉ）前記ＴＤＳＣ中のあらゆるヌクレオチドが、前記ＴＤＳＣ中の別のヌクレオチドに結合する；
ｉｉｉ）前記上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、約２８又は５６ヌクレオチド長未満又は約２８又は５６ヌクレオチド長超のループサイズを有する；又は
ｉｖ）前記下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、約２８又は５６ヌクレオチド長未満又は約２８又は５６ヌクレオチド長超のループサイズを有する
のうちの１つ以上を有する、ＴＤＳＣ。
【請求項３９】
エフェクター配列を含む二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を含む医薬組成物であって、
ａ）前記ｄｓＤＮＡがベクター骨格を欠いている、若しくはベクター骨格の実質的な部分を欠いているか、又は非ヒト（例えば、細菌）複製起点を含まず；
ｂ）前記ｄｓＤＮＡがカプシドに封入されていないか、本質的にウイルスタンパク質を持たないか、ウイルスパッケージングシグナルを含まないか、又はウイルスＩＴＲを含まず；
ｃ）前記ｄｓＤＮＡがエキソヌクレアーゼ耐性末端を含み；及び
ｄ）前記ｄｓＤＮＡが少なくとも１つの化学修飾ヌクレオチドを含む、
医薬組成物。
【請求項４０】
請求項１～３８のいずれか一項に記載のＴＤＳＣを含む医薬組成物。
【請求項４１】
前記ｄｓＤＮＡ又はＴＤＳＣが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に含まれている、請求項３９又は４０に記載の医薬組成物。
【請求項４２】
ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；
ｂ）二本鎖領域；
ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態
を含むプロトＴＤＳＣであって、
ここで、
（ｉ）前記プロトＴＤＳＣが１つ以上（例えば、１つ又は２つ）のウラシルヌクレオチドを含むか、又は
（ｉｉ）前記上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が粘着末端を含む、及び／又は前記下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が粘着末端を含む、プロトＴＤＳＣ。
【請求項４３】
標的細胞において異種ペイロードを発現させる方法であって、
（ｉ）標的細胞に請求項１～４１のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ又は組成物を導入することであって、前記ＴＤＳＣの前記二本鎖領域が、異種ペイロードをコードする配列を含むこと；及び
（ｉｉ）前記ＴＤＳＣから前記異種ペイロードを発現させるのに好適な条件下に前記細胞を維持すること（例えば、インキュベートすること）

を含み；
それによって前記標的細胞において前記異種ペイロードを発現させる方法。
【請求項４４】
標的細胞に異種ペイロードを送達する方法であって、
標的細胞に請求項１～４１のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ又は組成物を導入することであって、前記ＴＤＳＣの前記二本鎖領域が、異種ペイロードをコードする配列を含むこと
を含み；
それによって前記標的細胞に前記異種ペイロードを送達する方法。
【請求項４５】
標的細胞の生物学的活性を調節する（例えば、増加させる又は減少させる）方法であって、
（ｉ）標的細胞に請求項１～４１のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ又は組成物を導入することであって、前記ＴＤＳＣの前記二本鎖領域が、前記標的細胞の生物学的活性を調節する異種ペイロードをコードする配列を含むこと；及び
（ｉｉ）前記ＴＤＳＣから前記異種ペイロードを発現させるのに好適な条件下に前記細胞を維持すること（例えば、インキュベートすること）
を含み；
それによって前記標的細胞の前記生物学的活性を調節する方法。
【請求項４６】
治療を必要としている細胞、組織、又は対象を治療する方法であって、
前記細胞、組織、又は対象に請求項１～４１のいずれか一項に記載のＴＤＳＣ又は組成物を投与することであって、前記ＴＤＳＣの前記二本鎖領域が、異種ペイロードをコードする配列を含むこと
を含み；
それによって前記細胞、組織、又は対象を治療する方法。
【請求項４７】
ＴＤＳＣを作成する方法であって、
二本鎖ＤＮＡ分子を、
第１の領域と第２の領域とを含み、前記第１の領域が前記第２の領域にハイブリダイズしている、自己アニーリングしたＤＮＡ分子
にライゲートすることを含み；
それによってＴＤＳＣを生成する方法であって、
任意選択で、前記自己アニーリングしたＤＮＡ分子が、前記第１の領域と前記第２の領域との間にループを更に含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、２０２２年５月１３日に出願された米国仮特許出願第６３／３４１，９６０号に対する優先権を主張するものであり、その内容全体は参照により本明細書に援用される。
【０００２】
配列表
本願には、ＸＭＬ形式で電子的に提出された配列表が含まれ、この配列表は本明細書によって全体として参照により援用される。２０２３年５月１０日に作成された前記ＸＭＬ複製物は、Ｆ２１２８－７００２ＷＯ＿ＳＬ．ｘｍｌという名称であり、サイズが１８３，４３６バイトである。
【背景技術】
【０００３】

満たされていない医療ニーズに対処するための新規な治療法が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００４】

医薬ＤＮＡ組成物、構築物、製剤、このような組成物、構築物及び製剤を使用する方法、並びにそれを作製する方法が、本明細書に記載される。

【０００５】

一態様において、本発明は、治療用二本鎖構築物（「ＴＤＳＣ」）を特徴とする。

【０００６】

列挙される実施形態

１．ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；

ｂ）二本鎖領域；及び

ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態

を含むＴＤＳＣであって、

１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含むＴＤＳＣ。

【０００７】

２．ａ）閉鎖型末端である上流ＤＮＡ末端形態；

ｂ）二本鎖領域；

ｃ）閉鎖型末端である下流ＤＮＡ末端形態

を含むＴＤＳＣであって、

１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含むＴＤＳＣ。

【０００８】

３．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が開放型末端である、実施形態１に記載のＴＤＳＣ。

【０００９】

４．ａ）Ｙ型アダプター構造を含む上流ＤＮＡ末端形態（例えば、上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）；

ｂ）二本鎖領域；及び

ｃ）Ｙ型アダプター構造を含む下流ＤＮＡ末端形態（例えば、下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）

を含むＴＤＳＣであって、

１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含むＴＤＳＣ。

【００１０】

５．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が平滑末端又は粘着末端である、実施形態１又は３に記載のＴＤＳＣ。

【００１１】

６．ａ）各鎖にホスホロチオエート修飾を含む上流二本鎖平滑末端化ＤＮＡ末端形態（例えば、二本鎖化及び平滑末端化されている上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）；

ｂ）二本鎖領域；及び

ｃ）各鎖にホスホロチオエート修飾を含む下流二本鎖平滑末端化ＤＮＡ末端形態（例えば、二本鎖化及び平滑末端化されている下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）

を含むＴＤＳＣであって、

任意選択で１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを更に含むＴＤＳＣ。

【００１２】

７．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が閉鎖型末端である、実施形態１に記載のＴＤＳＣ。

【００１３】

８．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮ

Ａ末端形態の一方又は両方がループを含む、実施形態１～３、５又は７のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００１４】
９．ａ）閉鎖型末端である上流ＤＮＡ末端形態（例えば、上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）；
ｂ）二本鎖領域；
ｃ）閉鎖型末端である下流ＤＮＡ末端形態（例えば、下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）
を含むＴＤＳＣであって、
１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含むＴＤＳＣ。
【００１５】
１０．上流ＤＮＡ末端形態（例えば、上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）が１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む、実施形態１～９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００１６】
１１．下流ＤＮＡ末端形態（例えば、下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）が１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む、実施形態１～１０のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００１７】
１２．化学修飾ヌクレオチドの１つ以上が、骨格、糖、又は塩基に修飾を含む、実施形態１～１１のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００１８】
１３．化学修飾ヌクレオチドの１つ以上がペプチド又はタンパク質にコンジュゲートしている、実施形態１～１２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００１９】
１４．１つ以上の化学修飾ヌクレオチドが化学修飾シトシンヌクレオチド及び／又はホスホロチオエート結合を含む、実施形態１～１３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００２０】
１５．１つ以上の化学修飾ヌクレオチドが化学修飾シトシンヌクレオチドを含む、実施形態１～１４のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００２１】
１６．化学修飾シトシンヌクレオチドがシトシンの炭素５位に水素以外の置換を有する、実施形態１５に記載のＴＤＳＣ。
【００２２】
１７．化学修飾ヌクレオチドの１つ以上がホスホロチオエート結合を含む、実施形態１～１６のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００２３】
１８．ＴＤＳＣの第１鎖及び第２鎖の各々が１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む、実施形態１～１７のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００２４】
１９．ＴＤＳＣの第１鎖及び第２鎖の各々が１つ以上のホスホロチオエート結合を含む、実施形態１～１８のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００２５】
２０．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個のホスホロチオエート結合を（例えば、第１鎖、第２鎖、又は第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチドの間に）含む、実施形態１～１９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００２６】
２１．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、少なくとも３個のホスホロチオ

エート結合を（例えば、第１鎖、第２鎖、又は第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチドの間に）含む、実施形態１～２０のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００２７】

２２．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、少なくとも６個のホスホロチオエート結合を（例えば、第１鎖、第２鎖、又は第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチドの間に）含む、実施形態１～２０のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００２８】

２３．下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個のホスホロチオエート結合を（例えば、第１鎖、第２鎖、又は第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチドの間に）含む、実施形態１～２２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００２９】

２４．下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、少なくとも３個のホスホロチオエート結合を（例えば、第１鎖、第２鎖、又は第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチドの間に）含む、実施形態１～２３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００３０】

２５．下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、少なくとも６個のホスホロチオエート結合を（例えば、第１鎖、第２鎖、又は第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチドの間に）含む、実施形態１～２３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００３１】

２６．上流及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、各々、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個のホスホロチオエート結合を（例えば、第１鎖、第２鎖、又は第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、上流及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチドの間に）含む、実施形態１～２０又は２３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００３２】

２７．上流及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、各々、少なくとも３個のホスホロチオエート結合を（例えば、第１鎖、第２鎖、又は第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、上流及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチドの間に）含む、実施形態１～２１、２３、２４、又は２６のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００３３】

２８．上流及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、各々、少なくとも６個のホスホロチオエート結合を（例えば、第１鎖、第２鎖、又は第１鎖及び第２鎖の両方における、例えば、上流及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の終端側ヌクレオチドの間に）含む、実施形態１～２０、２２、２３、２５、又は２６のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００３４】

２９．化学修飾ヌクレオチドの１つ以上がメチル基を含む、実施形態１～２８のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００３５】
３０．ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；
ｂ）二本鎖領域；
ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態
を含むＴＤＳＣであって、
上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方がＹ型アダプター構造を含む、ＴＤＳＣ。
【００３６】
３１．Ｙ型アダプターが、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＤＧ）及びＤＮＡグリコシラーゼ－リアーゼエンドヌクレアーゼＶＩＩＩ（例えば、ＵＳＥＲ酵素混合物）による切断によって形成される、実施形態３０に記載のＴＤＳＣ。
【００３７】
３２．Ｙ型アダプターが、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオチド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）を含む、実施形態３０又は３１に記載のＴＤＳＣ。
【００３８】
３３．Ｙ型アダプター中のあらゆるヌクレオチドが、化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオチド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）である、実施形態３０～３２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００３９】
３４．ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；
ｂ）二本鎖領域；
ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態
を含むＴＤＳＣであって、
上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が、核標的化配列、維持配列、又は標的細胞中の内因性ポリペプチドに結合する配列のうちの１つ以上を含む、ＴＤＳＣ。
【００４０】
３５．ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；
ｂ）二本鎖領域；
ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態
を含むＴＤＳＣであって、
上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が、以下の特徴：
ｉ）核酸配列ＴＡＴＣＡＧＣＡＣＡＣＡＡＴＴＧＣＣＣＡＴＴＡＴＡＣＧＣ（配列番号５５）及びＧＣＧＴＡＴＡＡＴＧＧＧＣＡＡＴＴＧＴＧＴＧＣＴＧＡＴＡ（配列番号５６）、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する核酸配列；及び／又は核酸配列ＴＡＴＣＡＧＣＡＣＡＣＡＡＴＡＧＴＣＣＡＴＴＡＴＡＣＧＣ（配列番号５７）及びＧＣＧＴＡＴＡＡＴＧＧＡＣＴＡＴＴＧＴＧＴＧＣＴＧＡＴＡ（配列番号５８）を含まない；
ｉｉ）ＴＤＳＣ中のあらゆるヌクレオチドが、ＴＤＳＣ中の別のヌクレオチドに結合する；
ｉｉｉ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、約２８又は５６ヌクレオチド長未満又は約２８又は５６ヌクレオチド長超のループサイズを有する；又は
ｉｖ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、約２８又は５６ヌクレオチド長未満又は約２８又は５６ヌクレオチド長超のループサイズを有する
のうちの１つ以上を有する、ＴＤＳＣ。
【００４１】

３６．ｉ）プロモーター配列（ここで任意選択でプロモーター配列は二本鎖領域にある）；
ｉｉ）プロモーター配列に作動可能に連結されたペイロード配列（例えば、治療用ペイロード配列）（ここで任意選択でペイロード配列は二本鎖領域にある）；
ｉｉｉ）異種機能性配列、例えば、核標的化配列又は調節配列；
ｉｖ）維持配列；及び／又は
ｖ）複製起点
のうちの１つ以上を含む、実施形態１～３５のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００４２】

３７．ｉ、ｉｉ、及びｉｉｉ；
ｉ、ｉｉ、及びｉｖ；
ｉ、ｉｉ、及びｖ；
ｉ、ｉｉ、ｉｉｉ、及びｉｖ；
ｉ、ｉｉ、ｉｉｉ、及びｖ；
ｉ、ｉｉ、ｉｖ、及びｖ；又は
ｉ、ｉｉ、ｉｉｉ、ｉｖ、及びｖ
を含む、実施形態３６に記載のＴＤＳＣ。

【００４３】

３８．核標的化配列が、ＣＴ３配列（例えば、ＡＡＴＴＣＴＣＣＴＣＣＣＣＡＣＣＴＴＣＣＣＣＡＣＣＣＴＣＣＣＣＡ（配列番号５９）の配列）、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態３６又は３７に記載のＴＤＳＣ。

【００４４】

３９．核標的化配列がｈｎＲＮＰＫタンパク質（例えば、ヒトｈｎＲＮＰＫタンパク質）に結合する、実施形態３６～３８のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００４５】

４０．閉鎖型末端の一方又は両方がループを含み、ループの一方又は両方が、表３に列挙されるとおりの核標的化配列、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する核酸配列を含む、実施形態２、７～２９、又は３６～３９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００４６】

４１．閉鎖型末端の一方又は両方がループを含み、ループの一方又は両方が、表３に列挙されるとおりの核内移行タンパク質に結合する核標的化配列を含む、実施形態２、７～２９、又は３６～４０のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００４７】

４２．ペイロード配列が、ポリペプチド（例えば、タンパク質）をコードする、実施形態３６～４１のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００４８】

４３．ペイロード配列が、機能性ＲＮＡ（例えば、ｍｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、又はｔＲＮＡ）をコードする、実施形態３６～４２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００４９】

４４．ペイロード配列が、標的細胞にとって異種である、実施形態３６～４３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００５０】

４５．二本鎖領域が、センス鎖とアンチセンス鎖とを含む、実施形態１～４４のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００５１】

４６．アンチセンス鎖が、１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む、実施形態４５に記載のＴＤＳＣ。

【００５２】

４７．センス鎖が、いかなる化学修飾ヌクレオチドも含まない、実施形態４５又は４６に記載のＴＤＳＣ。
【００５３】
４８．センス鎖が、１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む、実施形態４５又は４６に記載のＴＤＳＣ。
【００５４】
４９．ＴＤＳＣが、エンドヌクレアーゼ消化に対して耐性を示す及び／又は免疫センサー認識に対して耐性を示す、実施形態１～４８のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００５５】
５０．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、エンドヌクレアーゼ消化に対して耐性を示す、実施形態１～４９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００５６】
５１．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、免疫センサー認識に対して耐性を示す、実施形態１～５０のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００５７】
５２．下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、エンドヌクレアーゼ消化に対して耐性を示す、実施形態１～５１のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００５８】
５３．下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、免疫センサー認識に対して耐性を示す、実施形態１～５２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００５９】
５４．二本鎖領域が、エンドヌクレアーゼ消化に対して耐性を示す、実施形態１～５３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００６０】
５５．二本鎖領域が、免疫センサー認識に対して耐性を示す、実施形態１～５４のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００６１】
５６．上流ＤＮＡ末端形態と下流ＤＮＡ末端形態とが同じヌクレオチド配列を有する、実施形態１～５５のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００６２】
５７．上流ＤＮＡ末端形態と下流ＤＮＡ末端形態とが異なるヌクレオチド配列を有する、実施形態１～５５のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００６３】
５８．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態と下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態とが同じ構造を有する、実施形態１～５７のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００６４】
５９．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態と下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態とが異なる構造を有する、実施形態１～５７のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００６５】
６０．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が開放型末端（例えば、平滑末端、粘着末端、又はＹ型アダプター）である、実施形態１、７、８、又は１０～５９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００６６】
６１．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が閉鎖型末端（例えば、ヘアピン）である、実施形態１～３、５、又は７～６０のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００６７】
６２．閉鎖型末端が、ハイブリダイズしない（例えば、二本鎖領域の一部でない）１個

以上（例えば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、４０、又は５０個）のヌクレオチドを含む、実施形態６１に記載のＴＤＳＣ。

【００６８】

６３．閉鎖型末端が、ハイブリダイズしないいかなるヌクレオチドも含まない（例えば、閉鎖型末端の全てのヌクレオチドが別のヌクレオチドとハイブリダイズしている）、実施形態６１に記載のＴＤＳＣ。

【００６９】

６４．上流ＤＮＡ末端形態、下流ＤＮＡ末端形態、又は両方が、少なくとも１つの化学修飾ヌクレオチドを含む、実施形態３０～６３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００７０】

６５．上流ＤＮＡ末端形態及び下流ＤＮＡ末端形態の両方が、センス鎖に少なくとも１つの化学修飾ヌクレオチド及びアンチセンス鎖に少なくとも１つの化学修飾ヌクレオチドを含む、実施形態３０～６４のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００７１】

６６．上流ＤＮＡ末端形態及び下流ＤＮＡ末端形態の両方が、あらゆるセンス鎖位置及びあらゆるアンチセンス鎖位置に化学修飾ヌクレオチドを含む、実施形態３０～６５のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００７２】

６７．上流ＤＮＡ末端形態、下流ＤＮＡ末端形態、又は両方が逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含み、任意選択でｄｓＤＮＡが化学修飾ヌクレオチドを含まない、実施形態３０、３１、３４～４５、４７、又は４９～６３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００７３】

６８．上流ＤＮＡ末端形態、下流ＤＮＡ末端形態、又は両方が、プロテロメラーゼ配列を含まない、実施形態１～６７のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００７４】

６９．上流ＤＮＡ末端形態、下流ＤＮＡ末端形態、又は両方がプロテロメラーゼ配列を含み、任意選択でｄｓＤＮＡが化学修飾ヌクレオチドを含まない、実施形態３０、３１、３４～４５、４７、４９～６３、又は６７のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００７５】

７０．プロテロメラーゼ配列の１つ以上が、（例えば、５’から３’の順番に）核酸配列ＴＡＴＣＡＧＣＡＣＡＣＡＡＴＴＧＣＣＣＡＴＴＡＴＡＣＧＣ（配列番号５５）及びＧＣＧＴＡＴＡＡＴＧＧＧＣＡＡＴＴＧＴＧＴＧＣＴＧＡＴＡ（配列番号５６）、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態６９に記載のＴＤＳＣ。

【００７６】

７１．プロテロメラーゼ配列の１つ以上が、（例えば、５’から３’の順番に）核酸配列ＴＡＴＣＡＧＣＡＣＡＣＡＡＴＡＧＴＣＣＡＴＴＡＴＡＣＧＣ（配列番号５７）及びＧＣＧＴＡＴＡＡＴＧＧＡＣＴＡＴＴＧＴＧＴＧＣＴＧＡＴＡ（配列番号５８）、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態６９又は７０に記載のＴＤＳＣ。

【００７７】

７２．プロテロメラーゼ配列の１つ以上が、（例えば、５’から３’の順番に）核酸配列ＡＣＣＴＡＴＴＴＣＡＧＣＡＴＡＣＴＡＣＧＣ（配列番号６０）及びＧＣＧＴＡＧＴＡＴＧＣＴＧＡＡＡＴＡＧＧＴ（配列番号６１）、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態６９～７１のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００７８】

７３．プロテロメラーゼ配列の１つ以上が、（例えば、５’から３’の順番に）核酸配列ＣＡＣＡＣＡＡＴＴＧＣＣＣＡＴＴＡＴＡＣＧＣＧＣＧＴＡＴＡＡＴＧＧＧＣＡＡＴＴＧＴＧＴＧ（配列番号６２）、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９

５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態６９～７２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００７９】

７４．プロテロメラーゼ配列の１つ以上が、（例えば、５’から３’の順番に）核酸配列：

（ｉ）ＴＡＡＡＴＡＴＡＡＴＴＴＡＡ（配列番号６３）及びＴＴＡＡＡＴＴＡＴＡＴＴＴＡ（配列番号６４）、

（ｉｉ）ＡＡＴＡＴＡＴＡＡＴＣＴＡＡ（配列番号６５）及びＴＴＡＧＡＴＴＡＴＡＴＡＴＴ（配列番号６６）、

（ｉｉｉ）ＴＡＴＴＴＡＴＴＡＴＣＴＴＴ（配列番号６７）及びＡＡＡＧＡＴＡＡＴＡＡＡＴＡ（配列番号６８）、

（ｉｖ）ＡＴＡＴＡＡＴＴＴＴＴＡＡＴＴＡＧＴＡＴＡＧＡＡＴＡＴＧＴＴＡＡ（配列番号６９）及びＴＴＡＡＣＡＴＡＣＴＣＴＡＴＡＣＴＡＡＴＴＡＡＡＡＡＴＴＡＴＡＴ（配列番号７０）、

（ｖ）ＴＡＴＡＡＴＴＴＧＡＴＡＴＴＡＧＴＡＣＡＡＡＴＣＣＣ（配列番号７１）及びＧＧＧＡＴＴＴＧＴＡＣＴＡＡＴＡＴＣＡＡＡＴＴＡＴＡ（配列番号７２）、

（ｖｉ）ＡＴＡＴＡＡＴＡＴＴＴＡＴＴＴＡＧＴＡＣＡＡＡＧＴＴＣ（配列番号７３）及びＧＡＡＣＴＴＴＧＴＡＣＴＡＡＡＴＡＡＡＴＡＴＴＡＴＡＴ（配列番号７４）、

（ｖｉｉ）ＡＴＡＴＡＡＴＴＴＴＴＴＡＴＴＡＧＴＡＴＡＧＡＧＴＡＴ（配列番号７５）及びＡＴＡＣＴＣＴＡＴＡＣＴＡＡＴＡＡＡＡＡＡＡＴＴＡＴＡＴ（配列番号７６）、

（ｖｉｉｉ）ＴＡＡＡＴＡＴＡＡＴＴＴＡＡ（配列番号６３）及びＴＴＡＡＡＴＴＡＴＡＴＴＴＡ（配列番号６４）；又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態６９～７３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００８０】

７５．プロテロメラーゼ配列の１つ以上が更に、（例えば、５’から３’の順番に）核酸配列：

（ｉ）ＴＡＧＴＡＴＡＡＡＡＡＡＣＴＧＴ（配列番号７７）及びＡＣＡＧＴＴＴＴＴＴＡＴＡＣＴＡ（配列番号７８）、

（ｉｉ）ＴＡＧＴＡＴＡＣＡＡＡＡＧＡＴＴ（配列番号７９）及びＡＡＴＣＴＴＴＴＧＴＡＴＡＣＴＡ（配列番号８０）、

（ｉｉｉ）ＴＡＧＴＡＴＡＴＡＴＡＴＣＴＣＴ（配列番号８１）及びＡＧＡＧＡＴＡＴＡＴＡＴＡＣＴＡ（配列番号８２）、又は

（ｖｉｉｉ）ＴＡＧＴＡＴＡＡＡＡＡＡＡＡＴＴ（配列番号８３）及びＡＡＴＴＴＴＴＴＴＴＴＡＴＡＣＴＡ（配列番号８４）；

又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、実施形態６９～７４のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００８１】

７６．プロテロメラーゼ配列が、ＴｅｌＮプロテロメラーゼ、ＲｅｓＴプロテロメラーゼ、Ｔｅｌ　ＰＹ５４プロテロメラーゼ、又はＴｅｌＫプロテロメラーゼ消化によって生成される、実施形態６９～７５のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００８２】

７７．プロテロメラーゼ配列が、ＴｅｌＮプロテロメラーゼ消化によっては生成されない、実施形態６９～７５のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００８３】

７８．プロテロメラーゼ配列が、Ｔｅｌ　ＰＹ５４プロテロメラーゼ消化によっては生成されない、実施形態６９～７５又は７７のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。

【００８４】

７９．プロテロメラーゼ配列が、ＴｅｌＫプロテロメラーゼ消化によっては生成されな

い、実施形態６９～７５、７７、又は７８のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００８５】
８０．プロテロメラーゼ配列が、ＲｅｓＴプロテロメラーゼ消化によっては生成されない、実施形態６９～７５又は７７～７９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００８６】
８１．プロテロメラーゼ配列が約２８又は５６ヌクレオチド長である、実施形態６９～８０のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００８７】
８２．プロテロメラーゼ配列が、２８ヌクレオチド長未満（例えば、１５、２０、２５、２６、２７、又は２８ヌクレオチド長未満）である、実施形態６９～８１のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００８８】
８３．プロテロメラーゼ配列が、約２８ヌクレオチド長（例えば、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、又は３５ヌクレオチド長）～約５６ヌクレオチド長（例えば、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、又は６０ヌクレオチド長）である、実施形態６９～８２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００８９】
８４．プロテロメラーゼ配列が、約５６ヌクレオチド長超（例えば、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６５、７０、７５、８０、９０、又は１００ヌクレオチド長超）である、実施形態６９～８３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００９０】
８５．上流ＤＮＡ末端形態、下流ＤＮＡ末端形態、又は両方がＹ型アダプターを含む、実施形態３０～９４のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００９１】
８６．任意選択でｄｓＤＮＡが化学修飾ヌクレオチドを含まない、実施形態８５に記載のＴＤＳＣ。
【００９２】
８７．プロテロメラーゼ配列が、ＴｅｌＮプロテロメラーゼ又はＲｅｓＴプロテロメラーゼによって認識される第１のプロテロメラーゼ認識配列（ＰＲＳ）及び第２のＰＲＳから生成される、実施形態６９に記載のＴＤＳＣ。
【００９３】
８８．プロテロメラーゼ配列が、Ｔｅｌ　ＰＹ５４プロテロメラーゼ又はＴｅｌＫプロテロメラーゼによって認識される第１のプロテロメラーゼ認識配列（ＰＲＳ）及び第２のＰＲＳから生成される、実施形態６９に記載のＴＤＳＣ。
【００９４】
８９．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が少なくとも１つの化学修飾ヌクレオチドを含む（例えば、あらゆるセンス鎖ヌクレオチド及びあらゆるアンチセンス鎖ヌクレオチドに化学修飾を含む）、実施形態１～８５、８７、又は８８のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００９５】
９０．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態及び下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の一方又は両方が、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオチド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）を含む、実施形態１～８５又は８７～８９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００９６】
９１．二本鎖領域が、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオチド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）を

含む、実施形態１～８５又は８７～９０のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００９７】
９２．二本鎖領域がペイロード配列をコードし、ペイロード配列のアンチセンス鎖が、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオチド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）を含む、実施形態１～８５又は８７～９１のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００９８】
９３．二本鎖領域がペイロード配列をコードし、ペイロード配列のセンス鎖が、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオチド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）を含む、実施形態１～９２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【００９９】
９４．ＴＤＳＣの糖の８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、又は１００％がデオキシリボース糖である、実施形態１～９３のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１００】
９５．ＴＤＳＣが、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、又はｍｉＲＮＡ）をコードする配列を含む、実施形態１～９４のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１０１】
９６．ＴＤＳＣが、ＲＮＡをコードする配列を含まない、実施形態１～９４のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１０２】
９７．ＴＤＳＣが（例えば、ＴＤＳＣを含む細胞にとって天然のＤＮＡポリメラーゼにより）複製可能である、実施形態１～９６のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１０３】
９８．ＴＤＳＣが複製可能でない、実施形態１～９６のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１０４】
９９．ＴＤＳＣが線状であり、環状化可能である、実施形態１～９８のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１０５】
１００．ＴＤＳＣが線状であり、環状化可能でない、実施形態１～９８のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１０６】
１０１．ＴＤＳＣ又はその一部分がゲノムに組み込み可能である、実施形態１～１００のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１０７】
１０２．ＴＤＳＣ又はその一部分がゲノムに組み込み可能でない、実施形態１～１００のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１０８】
１０３．ＴＤＳＣがコンカテマー化可能である、実施形態１～１０２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１０９】
１０４．ＴＤＳＣがコンカテマー化可能でない、実施形態１～１０２のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ。
【０１１０】
１０５．エフェクター配列を含む二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を含む医薬組成物であって、
ａ．ｄｓＤＮＡがベクター骨格を欠いている、若しくはベクター骨格の実質的な部分を

欠いているか、又は非ヒト（例えば、細菌）複製起点を含まず；
ｂ．ｄｓＤＮＡがカプシドに封入されていないか、本質的にウイルスタンパク質を持たないか、ウイルスパッケージングシグナルを含まないか、又はウイルスＩＴＲを含まず；
ｃ．ｄｓＤＮＡがエキソヌクレアーゼ耐性末端を含み；及び
ｄ．ｄｓＤＮＡが少なくとも１つの化学修飾ヌクレオチドを含む、医薬組成物。
【０１１１】
１０６．実施形態１～１０５のいずれか一つに記載のＴＤＳＣを含む医薬組成物。
【０１１２】
１０７．ｄｓＤＮＡ又はＴＤＳＣが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）に含まれている、実施形態１０５又は１０６の医薬組成物。
【０１１３】
１０８．エレクトロポレーション緩衝液を更に含む、実施形態１０５～１０７のいずれか一つに記載の医薬組成物。
【０１１４】
１０９．トランスフェクション試薬を更に含む、実施形態１０５～１０８のいずれか一つに記載の医薬組成物。
【０１１５】
１１０．ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；
ｂ）二本鎖領域；
ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態
を含むプロトＴＤＳＣであって、
プロトＴＤＳＣが１個以上（例えば、１又は２個）のウラシルヌクレオチドを含む、プロトＴＤＳＣ。
【０１１６】
１１１．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が１個以上（例えば、１又は２個）のウラシルヌクレオチドを含む、実施形態１１０に記載のプロトＴＤＳＣ。
【０１１７】
１１２．下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が１個以上（例えば、１又は２個）のウラシルヌクレオチドを含む、実施形態１１０又は１１１に記載のプロトＴＤＳＣ。
【０１１８】
１１３．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態がループ構造を含む、実施形態１１０～１１２のいずれか一つに記載のプロトＴＤＳＣ。
【０１１９】
１１４．下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態がループ構造を含む、実施形態１１０～１１３のいずれか一つに記載のプロトＴＤＳＣ。
【０１２０】
１１５．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオチド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）を含む、実施形態１１０～１１４のいずれか一つに記載のプロトＴＤＳＣ。
【０１２１】
１１６．上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態にあるあらゆるヌクレオチドが、化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオチド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）である、実施形態１１０～１１５のいずれか一つに記載のプロトＴＤＳＣ。
【０１２２】
１１７．下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオ

チド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）を含む、実施形態１１０～１１６のいずれか一つに記載のプロトＴＤＳＣ。

【０１２３】

１１８．下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態にあるあらゆるヌクレオチドが、化学修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド、ボラノホスフェート修飾ヌクレオチド、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチド、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチド、及び／又はメチル化ヌクレオチド）である、実施形態１１０～１１７のいずれか一つに記載のプロトＴＤＳＣ。

【０１２４】

１１９．ａ）上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態；

ｂ）二本鎖領域；

ｃ）下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態

を含むプロトＴＤＳＣであって、

上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が粘着末端を含む、及び／又は下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が粘着末端を含む、プロトＴＤＳＣ。

【０１２５】

１２０．標的細胞において異種ペイロードを発現させる方法であって、

（ｉ）標的細胞に実施形態１～１１９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ又は組成物を導入することであって、ＴＤＳＣの二本鎖領域が、異種ペイロードをコードする配列を含むこと；及び

（ｉｉ）ＴＤＳＣから異種ペイロードを発現させるのに好適な条件下に細胞を維持すること（例えば、インキュベートすること）

を含み；

それによって標的細胞において異種ペイロードを発現させる方法。

【０１２６】

１２１．標的細胞において異種ペイロードを発現させる方法であって、

（ｉ）実施形態１～１１９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ又は組成物を含む標的細胞を提供することであって、ＴＤＳＣの二本鎖領域が、異種ペイロードをコードする配列を含むこと；及び

（ｉｉ）ＴＤＳＣから異種ペイロードを発現させるのに好適な条件下に細胞を維持すること（例えば、インキュベートすること）

を含み；

それによって標的細胞において異種ペイロードを発現させる方法。

【０１２７】

１２２．エキソビボ又はインビボで実施される、実施形態１２０又は１２１に記載の方法。

【０１２８】

１２３．標的細胞に異種ペイロードを送達する方法であって、

標的細胞に実施形態１～１１９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ又は組成物を導入することであって、ＴＤＳＣの二本鎖領域が、異種ペイロードをコードする配列を含むこと

を含み；

それによって標的細胞に異種ペイロードを送達する方法。

【０１２９】

１２４．標的細胞の生物学的活性を調節する（例えば、増加させる又は減少させる）方法であって、

（ｉ）標的細胞に実施形態１～１１９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ又は組成物を導入することであって、ＴＤＳＣの二本鎖領域が、標的細胞の生物学的活性を調節する異種ペイロードをコードする配列を含むこと；及び

（ｉｉ）ＴＤＳＣから異種ペイロードを発現させるのに好適な条件下に細胞を維持する

こと（例えば、インキュベートすること）
を含み；
それによって標的細胞の生物学的活性を調節する方法。
【０１３０】
１２５．標的細胞の生物学的活性を調節する（例えば、増加させる又は減少させる）方法であって、
（ｉ）実施形態１～１１９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ又は組成物を含む標的細胞を提供することであって、ＴＤＳＣの二本鎖領域が、標的細胞の生物学的活性を調節する異種ペイロードをコードする配列を含むこと；及び
（ｉｉ）ＴＤＳＣから異種ペイロードを発現させるのに好適な条件下に細胞を維持すること（例えば、インキュベートすること）
を含み；
それによって標的細胞の生物学的活性を調節する方法。
【０１３１】
１２６．異種ペイロードによって標的細胞の生物学的活性が増加する、実施形態１２４又は１２５に記載の方法。
【０１３２】
１２７．異種ペイロードによって標的細胞の生物学的活性が減少する、実施形態１２４又は１２５に記載の方法。
【０１３３】
１２８．生物学的活性が、細胞成長、細胞代謝、細胞シグナル伝達、細胞運動、特殊化、相互作用、分裂、輸送、恒常性、浸透、又は拡散を含む、実施形態１２４～１２７のいずれか一つに記載の方法。
【０１３４】
１２９．細胞が、動物細胞、例えば、哺乳類細胞、例えば、ヒト細胞である、実施形態１２０～１２８のいずれか一つに記載の方法。
【０１３５】
１３０．治療を必要としている細胞、組織、又は対象を治療する方法であって、
細胞、組織、又は対象に実施形態１～１１９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣ又は組成物を投与することであって、ＴＤＳＣの二本鎖領域が、異種ペイロードをコードする配列を含むこと
を含み；
それによって細胞、組織、又は対象を治療する方法。
【０１３６】
１３１．ＴＤＳＣを作製する方法であって、
（ｉ）二本鎖ＤＮＡ分子を
１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含むループ領域と二本鎖領域とを含むヘアピンＤＮＡ分子
にライゲートすることであって；
それによってライゲートされたｄｓＤＮＡを生成すること；及び
（ｉｉ）ライゲートされたｄｓＤＮＡを、ライゲートされたｄｓＤＮＡからループ領域を切断する酵素と共にインキュベートすること
を含み；
それによってＴＤＳＣを作製する方法。
【０１３７】
１３２．ｄｓＤＮＡを（例えば、工程ｉｉの後に）平滑末端生成酵素（例えば、マングビーンヌクレアーゼ）と共にインキュベートすることを更に含む、実施形態１３１に記載の方法。
【０１３８】
１３３．ライゲートされたｄｓＤＮＡからループ領域を切断する酵素が、ウラシルＤＮ

Ａグリコシラーゼ（ＵＤＧ）及びＤＮＡグリコシラーゼ－リアーゼエンドヌクレアーゼＶＩＩＩ（例えば、ＵＳＥＲ酵素混合物）である、実施形態１３１又は１３２に記載の方法。

【０１３９】

１３４．ＴＤＳＣを作製する方法であって、

（ｉ）二本鎖ＤＮＡ分子を

ヘアピンＤＮＡ分子であって、

ループ領域、及び

二本鎖領域

を含み、

１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを、例えば、ループ領域に含むヘアピンＤＮＡ分子

にライゲートすることであって；

それによってライゲートされたｄｓＤＮＡを生成すること；及び

（ｉｉ）ライゲートされたｄｓＤＮＡを、ループ領域を開く又は切断する酵素と共にインキュベートすること

を含み；

それによってＴＤＳＣを作製する方法。

【０１４０】

１３５．ループ領域がウラシルヌクレオチドを含む、実施形態１３４に記載の方法。

【０１４１】

１３６．ループ領域を開く又は切断する酵素が、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＤＧ）及びＤＮＡグリコシラーゼ－リアーゼエンドヌクレアーゼＶＩＩＩ（例えば、ＵＳＥＲ酵素混合物）である、実施形態１３４又は１３５に記載の方法。

【０１４２】

１３７．ＴＤＳＣを作製する方法であって、

二本鎖ＤＮＡ分子を

第１の領域と第２の領域とを含み、第１の領域が第２の領域にハイブリダイズしている、自己アニーリングしたＤＮＡ分子

にライゲートすることを含み；

それによってＴＤＳＣを生成する方法。

【０１４３】

１３８．自己アニーリングしたＤＮＡ分子が、第１の領域と第２の領域との間にループを更に含む、実施形態１３７に記載の方法。

【０１４４】

１３９．ループが、異種機能性配列、例えば、核標的化配列（例えば、ＣＴ３配列）；又は調節配列を含む、実施形態１３８に記載の方法。

【０１４５】

１４０．ループが、表３に列挙されるとおりの核標的化配列、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する核酸配列を含む、実施形態１３８又は１３９に記載の方法。

【０１４６】

１４１．ループが、表３に列挙されるとおりの核内移行タンパク質に結合する核標的化配列を含む、実施形態１３８～１４０のいずれか一つに記載の方法。

【０１４７】

１４２．自己アニーリングしたＤＮＡ分子が、ハイブリダイズしないいかなるヌクレオチドも含まない（例えば、自己アニーリングしたＤＮＡ分子の全てのヌクレオチドが別のヌクレオチドとハイブリダイズしている）、実施形態１３７～１４１のいずれか一つに記載の方法。

【０１４８】

１４３．第２のヘアピンＤＮＡ分子を二本鎖ＤＮＡ分子にライゲートすることを更に含む、実施形態１３１～１４２のいずれか一つに記載の方法であって、第２のヘアピンＤＮＡ分子がループ領域と二本鎖領域とを含み、任意選択で第２のヘアピンＤＮＡ分子がループ領域又は二本鎖領域の一方又は両方に１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む、方法。

【０１４９】

１４４．ＴＤＳＣを作製又は製造する方法であって、

ａ）閉鎖型末端を含むＴＤＳＣ、例えば、本明細書に記載されるＴＤＳＣを提供すること；

ｂ）例えば、実施例１０に記載されるとおり、ＴＤＳＣを二本鎖ＤＮＡエキソヌクレアーゼ、例えば、エキソヌクレアーゼＩＩＩ、例えば、例えば、５０μＬ中５μｇのＤＮＡ当たり１μＬのエキソヌクレアーゼＩＩＩと共に３７℃で１時間インキュベートすること；

ｃ）任意選択で、例えば、実施例１０に記載されるとおり、工程ｂ）で処理したＴＤＳＣを、例えば、シリカメンブレンカラムにより精製すること

を含み、

それによってＴＤＳＣを作製又は製造する方法。

【０１５０】

１４５．ＴＤＳＣを作製又は製造する方法であって、

ａ）プロトＴＤＳＣ、例えば、エキソヌクレアーゼＩＩＩで処理したプロトＴＤＳＣを提供することであって、プロトＴＤＳＣが、ウラシルを各々が含む閉鎖型ＤＮＡ末端形態を含むこと；

ｂ）プロトＴＤＳＣをウラシル除去酵素、例えば、ＵＳＥＲ酵素と共にインキュベートすることであって、例えば、実施例１２に記載されるとおり、例えば、３７℃で１時間にわたる、例えば、１００μＬ中５μｇのＤＮＡに対して３μＬのＵＳＥＲ酵素であること；

ｃ）任意選択で、例えば、実施例１２に記載されるとおり、ＴＤＳＣを一本鎖ＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、マングビーンヌクレアーゼ、例えば、約１００μＬ中５μｇのＤＮＡに対して１０Ｕのマングビーンヌクレアーゼと共に、例えば、３０℃で３０分間インキュベートすること；

ｄ）任意選択で、例えば、実施例１２に記載されるとおり、工程ｃ）で処理したＴＤＳＣを、例えば、シリカメンブレンカラムにより精製すること

を含み、

それによってＴＤＳＣを作製又は製造する方法。

【０１５１】

１４６．例えば、実施例１０に記載されるとおり、例えば、アガロースゲルにより、ＴＤＳＣを分解に関してアッセイすることを更に含む、実施形態１４４又は１４５に記載の方法。

【０１５２】

１４７．分解に関するアッセイに応じて（例えば、分解が所定の値を下回るという決定に応じて）、ＴＤＳＣを放出させること、ＴＤＳＣを容器に入れること、ＴＤＳＣを製剤化すること、又はＴＤＳＣに１つ以上の賦形剤を加えることのうちの１つを実施することを更に含む、実施形態１４６に記載の方法。

【０１５３】

１４８．ＴＤＳＣを作製又は製造する方法であって、

ａ）ＴＤＳＣ、例えば、実施形態１～１１９のいずれか一つに記載のＴＤＳＣを提供すること；

ｂ）ＴＤＳＣの構造が参照構造と一致するかどうかを決定すること

を含み；

それによってＴＤＳＣを作製又は製造する方法。

【０１５４】

１４９．（ｂ）の決定することが、ＴＤＳＣをシーケンシングすることを含む、実施形態１４８に記載の方法。

【０１５５】

１５０．（ｂ）の決定することが、ＴＤＳＣを制限酵素で消化することを含む、実施形態１４８又は１４９に記載の方法。

【０１５６】

１５１．参照構造と一致するＴＤＳＣの構造が、参照構造と同一である、実施形態１４８～１５０のいずれか一つに記載の方法。

【０１５７】

１５２．参照構造と一致するＴＤＳＣの構造が、参照構造と同じ配列を有する、実施形態１４８～１５１のいずれか一つに記載の方法。

【０１５８】

１５３．参照構造と一致するＴＤＳＣの構造が、参照構造と同じ長さを有する、実施形態１４８～１５２のいずれか一つに記載の方法。

【０１５９】

ある実施形態において、ＴＤＳＣは、少なくとも１５ヌクレオチド、少なくとも３０ヌクレオチド、少なくとも５０ヌクレオチド、少なくとも７５ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、少なくとも２００ヌクレオチド、少なくとも３００ヌクレオチド、少なくとも５００ヌクレオチド、少なくとも７５０ヌクレオチド、少なくとも１，０００ヌクレオチド、少なくとも２，０００ヌクレオチド、少なくとも３，０００ヌクレオチド、少なくとも４，０００ヌクレオチド、少なくとも５，０００ヌクレオチド、少なくとも１０，０００ヌクレオチド、少なくとも１５，０００ヌクレオチド、少なくとも２０，０００ヌクレオチド、少なくとも２５，０００ヌクレオチド、少なくとも３０，０００ヌクレオチド、少なくとも３５，０００ヌクレオチド、少なくとも４０，０００ヌクレオチド　少なくとも４５，０００ヌクレオチド、少なくとも５０，０００ヌクレオチド、少なくとも６０，０００ヌクレオチド、又はそれ以上を有する。

【０１６０】

ある実施形態において、ＴＤＳＣは、２０～１０００ヌクレオチド、２０～５０ヌクレオチド、１００～５００ヌクレオチド、５００～５０，０００ヌクレオチド、１，０００～５０，０００ヌクレオチド、２，０００～４０，０００ヌクレオチド、５，０００～５０，０００ヌクレオチド、５００～５０，０００ヌクレオチド、５００～２５，０００ヌクレオチド、１，０００～２０，０００ヌクレオチド、１，０００～１０，０００ヌクレオチド、１０，０００～６０，０００ヌクレオチド、１，０００～２０，０００ヌクレオチド、１，０００～４０，０００ヌクレオチドを有する。

【０１６１】

ある実施形態において、ＴＤＳＣは、例えば、Ｎ６－メチルアデノシン（ｍ６Ａ、６ｍＡ）；５－ホルミルシトシン（５－ホルミル－２’－デオキシシトシン、５ｆＣ、ｆ５Ｃ）；５－カルボキシルシトシン（５－カルボキシル－２’－デオキシシトシン、５－カルボキシシトシン、ｃａ５Ｃ、５ｃａＣ）；５－ヒドロキシメチルシトシン（５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシトシン、５ｈｍＣ、ｈｍ５Ｃ）；５－メチルデオキシシトシン（５－メチルシトシン；５－メチル－２’－デオキシシトシン；ｍ５ｄＣ；５ｍＣ、ｍ５Ｃ）；５’－メチルシトシン；３－メチルシトシン（ｍ３Ｃ）；５－メチルピリミジン；８－オキソグアニン（８－ｏｘｏＧ）；ホスホロチオエート；Ｓ及びＲホスホロチオエート（ｐｈｓｏｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ）結合；メチルチミン；Ｎ３’－Ｐ５’ホスホロアミデート（ＮＰ）から選択される少なくとも１つのヌクレオチド修飾、例えば、共有結合性のヌクレオチド修飾を含む。一部の実施形態において、ヌクレオチド修飾は、塩基修飾である。一部の実施形態において、ヌクレオチド修飾は、骨格修飾である。一部の実施形態において、ヌクレオチド修飾は、糖修飾である。一部の実施形態において、ヌクレオチド修飾は、ペプチドコンジュゲートを含む。一部の実施形態において、ヌクレオチド修飾は、タンパク質コンジュゲートを含む。

【０１６２】
ある実施形態において、エフェクター配列は、プロモーターに作動可能に連結された、治療用ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ又は調節ＲＮＡ）をコードするＤＮＡ配列である。ある実施形態において、ＲＮＡは、例えば、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｅｘＲＮＡ、ｓｃａＲＮＡ、Ｙ　ＲＮＡ、又はｈｎＲＮＡであり得る。
【０１６３】
ある実施形態において、エフェクター配列は、プロモーターに作動可能に連結される、治療用ペプチド又はポリペプチドをコードするＤＮＡ配列である。治療用ペプチド又はポリペプチドは、例えば、ＤＮＡ結合タンパク質；ＲＮＡ結合タンパク質；輸送体；転写因子；翻訳因子；リボソームタンパク質；クロマチンリモデリング因子；エピジェネティック修飾因子；抗原；ホルモン；酵素（ヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、ＣＲＩＳＰＲシステムのヌクレアーゼ要素、例えば、Ｃａｓ９、ｄＣａｓ９、Ｃａｓ９－ニッカーゼ、Ｃｐｆ／Ｃａｓ１２ａなど）；Ｃｒｉｓｐｒ連結酵素、例えば、塩基エディター又はプライムエディター；可動遺伝因子タンパク質（例えば、トランスポザーゼ、レトロトランスポザーゼ、リコンビナーゼ、インテグラーゼ）；ジーンライター（ｇｅｎｅ　ｗｒｉｔｅｒ）ポリペプチド；ポリメラーゼ；メチラーゼ；デメチラーゼ；アセチラーゼ；デアセチラーゼ；キナーゼ；ホスファターゼ；リガーゼ；デユビキチナーゼ；プロテアーゼ；インテグラーゼ；リコンビナーゼ；トポイソメラーゼ；ジャイレース；ヘリカーゼ；リソソーム酸ヒドロラーゼ；抗体（例えば、インタクトな抗体、その断片、又はナノボディ）；シグナル伝達ペプチド；受容体リガンド；受容体；凝固因子（ｃｌｏｔｔｉｎｇ　ｆａｃｔｏｒ）；凝固因子（ｃｏａｇｕｌａｔｉｏｎ　ｆａｃｔｏｒ）；構造タンパク質；カスパーゼ；膜タンパク質；ミトコンドリアタンパク質；核タンパク質；又は改変結合剤、例えば、センチリン、ダーピン（ｄａｒｐｉｎ）、又はアドネクチンであり得る。ある実施形態において、エフェクター配列は、レポータータンパク質をコードするＤＮＡ配列である。
【０１６４】
実施形態において、ＴＤＳＣは、複数のエフェクター配列を含み得る。複数は、同じ又は異なるタイプであってもよく、例えば、ＴＤＳＣは、構造的ＤＮＡであるエフェクター配列及び機能的ＲＮＡ又はポリペプチドをコードするＤＮＡ配列である第２のエフェクター配列を含み得る。ＴＤＳＣは、機能的ＲＮＡをコードするＤＮＡ配列であるエフェクター配列及び機能的ポリペプチドをコードするＤＮＡ配列である第２のエフェクター配列を含み得る。複数のエフェクター配列は、同じタイプの同じ又は異なる配列であり得る。
【０１６５】
実施形態において、ＴＤＳＣは担体中に置かれず、例えば、それはネイキッドで投与するように製剤化される。
【０１６６】
実施形態において、ＴＤＳＣは、担体、例えば、脂質ベースの担体、例えば、ＬＮＰと共に製剤化される。
【０１６７】
実施形態において、ＴＤＳＣは、医薬賦形剤と共に製剤化される。
【０１６８】
実施形態において、ＴＤＳＣは、非経口投与用に製剤化される。
【０１６９】
実施形態において、医薬組成物は、局所投与用に製剤化される。
【０１７０】
実施形態において、医薬組成物は、例えば、エンドトキシン、モノヌクレオチド、化学修飾モノヌクレオチド、ＤＮＡ断片又はトランケーション、及びタンパク質（例えば、酵素、例えば、リガーゼ、制限酵素）からなる群から選択される不純物又はプロセス副産物を実質的に含まない。一部の実施形態において、医薬組成物は、環状ＤＮＡを実質的に含

まない。
【０１７１】
別の態様では、本発明は、エフェクターを、対象、例えば、それを必要とする対象に送達する方法を含む。本方法は、本明細書に記載される、例えば、上記のいずれかの実施形態に記載される組成物を対象に投与することを含む。ある実施形態では、対象は、エフェクターで治療され得る病態を有するかそのような病態であると診断されている。
【０１７２】
別の態様では、本発明は、細胞、組織又は対象における生物学的パラメーターを調節する（例えば、増加させる又は減少させる）方法を含む。本方法は、本明細書に記載される、例えば、上記のいずれかの実施形態に記載される組成物を対象に投与することを含む。実施形態では、生物学的パラメーターは、標的細胞、組織又は対象における対象の遺伝子の遺伝子発現の増加又は減少であり、この増加又は減少は、本明細書に記載されるエフェクター配列によってもたらされる。ある実施形態では、対象は、エフェクターで治療され得る病態を有するかそのような病態であると診断されている。
【０１７３】
別の態様では、本発明は、細胞、組織又は対象を治療する方法を含む。本方法は、それを必要とする細胞、組織又は対象に、本明細書に記載される、例えば、上記のいずれかの実施形態に記載されるＴＤＳＣ又は構築物を投与することを含む。ある実施形態では、対象は、エフェクターで治療され得る病態を有するかそのような病態であると診断されている。
【０１７４】
本開示はまた、本明細書に記載されるＴＤＳＣ及びｄｓＤＮＡ組成物を作製する方法も提供する。ある実施形態において、本方法は、ゴールデンゲートアセンブリを実施することを含む。
【０１７５】
ある実施形態において、本方法は、ＴＤＳＣを濃縮又は精製することを更に含む。
【０１７６】
ある実施形態において、濃縮又は精製することには、エンドトキシン、モノヌクレオチド、化学修飾モノヌクレオチド、一本鎖ＤＮＡ、ＤＮＡ断片又はトランケーション、及びタンパク質（例えば、酵素、例えば、リガーゼ、制限酵素）から選択される１つ以上の不純物をＴＤＳＣから実質的に除去することが含まれる。
【０１７７】
ある実施形態において、本方法は、濃縮又は精製したＴＤＳＣを医薬使用向けに製剤化すること、例えば、ＴＤＳＣを薬学的に許容可能な賦形剤と共に、及び／又は担体、例えば、ＬＮＰと共に製剤化することを更に含む。
【０１７８】
定義
本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、特定の抗原に特異的に結合し、又は特定の抗原と免疫学的に反応性であり、少なくとも、重鎖の可変ドメインを含み、通常、少なくとも、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含む分子を指す。抗体及びその抗原結合フラグメント、変異体、又は誘導体としては、限定はされないが、ポリクローナル、モノクローナル、多特異的、ヒト、ヒト化、霊長類化、又はキメラ抗体、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二重特異的、三重特異的及び四重特異的抗体、ダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディ）、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、エピトープ結合断片、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’及びＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、Ｆｖｓ、一本鎖Ｆｖｓ（ｓｃＦｖ）、ｒｌｇＧ、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Ｆｖｓ（ｓｄＦｖ）、ナノボディ、ＶＬ又はＶＨドメインのいずれかを含む断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって生成される断片、及び抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体が挙げられる。本明細書に記載の抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及び

ＩｇＡ２）又はサブクラスのものであり得る。さらに、特に断りのない限り、用語「モノクローナル抗体」（ｍＡｂ）は、標的タンパク質に特異的に結合することが可能なインタクトな分子並びに抗体断片（例えば、Ｆａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片など）の両方を含むことを意味する。Ｆａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片は、インタクトな抗体のＦｃ断片を欠いている。

【０１７９】

本明細書で使用されるとき、用語「担体」は、細胞内への組成物（例えば、本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸）の輸送又は送達を容易にするか又は促進する化合物、組成物、試薬、又は分子を意味する。例えば、担体は、部分的に又は完全に封入剤であり得る。

【０１８０】

本明細書で使用されるとき、用語「化学修飾ヌクレオチド」は、本明細書でＤＮＡに関連して使用されるとき、標準的なデオキシリボヌクレオチド（即ち、Ｇ、Ｔ、Ｃ、及びＡ）と比べて１つ以上の構造的差異を含むヌクレオチドを指す。化学修飾ヌクレオチドは、化学修飾された核酸塩基、化学修飾された糖、化学修飾されたリン酸ジエステル結合、又はこれらの組み合わせを（標準的なヌクレオチドと比べて）有し得る。特別な作製方法は含意されない；例えば、化学修飾ヌクレオチドは、化学合成によって直接、又は標準的なヌクレオチドを共有結合的に修飾することにより生成し得る。

【０１８１】

本明細書で使用されるとき、用語「化学修飾シトシンヌクレオチド」は、本明細書でＤＮＡに関連して使用されるとき、炭素４が環の６員のうちの１つでない窒素に共有結合的に結合しているような単環式６員環を核酸塩基が含む化学修飾ヌクレオチドを指し、ここで化学修飾シトシンヌクレオチドの核酸塩基は、標準的なシトシン核酸塩基と比べて１つ以上の構造的差異を含む。一部の実施形態において、核酸塩基のＣ－５位は、Ｈ以外の置換を有し得る。特別な作製方法は含意されない。

【０１８２】

本明細書で使用されるとき、用語「閉鎖型末端」は、二本鎖領域の一端に位置するＤＮＡ分子の一部分であって、ＤＮＡ分子のその一部分の範囲内にある全てのヌクレオチドが、いずれの側の隣接ヌクレオチドにも共有結合的に結び付いているものを指す。閉鎖型末端には、一部の実施形態では、別のヌクレオチドにハイブリダイズしない１個以上のヌクレオチドを含むループが含まれ得る。一部の実施形態において、閉鎖型末端のあらゆるヌクレオチドが別のヌクレオチドにハイブリダイズしている。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、第１の閉鎖型末端（例えば、異種目的配列の上流にある）と、第２の閉鎖型末端（例えば、異種目的配列の下流にある）とを含む。

【０１８３】

本明細書で使用されるとき、用語「開放型末端」は、二本鎖領域の一端に位置するＤＮＡ分子の一部分であって、少なくとも１個のヌクレオチド（「終端側ヌクレオチド」）が厳密に１個の他のヌクレオチドに共有結合的に結び付いているものを指す。一部の実施形態において、終端側ヌクレオチドは、遊離５’リン酸を含む。一部の実施形態において、終端側ヌクレオチドは、遊離３’ＯＨを含む。一部の実施形態では、第１のＤＮＡ鎖と第２のＤＮＡ鎖とを含むＴＤＳＣにおいて、開放型末端は、第１のＤＮＡ鎖上に第１の終端側ヌクレオチド及び第２のＤＮＡ鎖上に第２の末端ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、第１の開放型末端（例えば、異種目的配列の上流にある）と第２の開放型末端（例えば、異種目的配列の下流にある）とを含む。一部の実施形態において、開放型末端は、平滑末端、粘着末端、又はＹ型アダプターを含む。

【０１８４】

本明細書で使用されるとき、用語「ＤＮＡ」は、少なくとも２個（例えば、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも５０、少なくとも１００個）の共有結合的に連結したデオキシリボヌクレオチドを含む任意の化合物及び／又は物質を指す。一部の実施形態において、ＤＮＡは単一のオリゴヌクレオチド鎖であり、一方、他の実施形態において、Ｄ

ＮＡは複数のオリゴヌクレオチド鎖を含み、一方、更に他の実施形態においてＤＮＡはオリゴヌクレオチド鎖の一部分である。一部の実施形態において、ＤＮＡは、オリゴヌクレオチド鎖にリン酸ジエステル結合で組み込まれているか、又は組み込まれることのできる化合物及び／又は物質である。一部の実施形態において、ＤＮＡは、標準的なヌクレオチドだけを含む。一部の実施形態において、ＤＮＡは１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ＤＮＡの糖の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％はデオキシリボース糖である。一部の実施形態において、ＤＮＡは、天然の供給源からの単離、相補的な鋳型に基づく重合による（インビボ又はインビトロでの）酵素合成、組換え細胞又はシステムにおける複製、及び化学合成のうちの１つ以上によって調製された。

【０１８５】

本明細書で使用されるとき、用語「ＤＮＡ末端形態」は、ＴＤＳＣの一末端に位置するＤＮＡを含む構造を指す。一部の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は閉鎖型末端を含む。他の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は開放型末端を含む。一部の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は、ヘアピン、ループ、Ｙ型アダプター、平滑末端、又は粘着末端を含む。ＤＮＡ末端形態は、一本鎖領域及び二本鎖領域の一方又は両方を含み得る。ＤＮＡ末端形態は、標準的なヌクレオチド、化学修飾ヌクレオチド、又はこれらの組み合わせを含み得る。一部の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は、３～１００個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、第１の末端に第１のＤＮＡ末端形態を含み、第２の末端に第２のＤＮＡ末端形態を含む。一部の実施形態において、ＴＤＳＣの第１のＤＮＡ末端形態と第２のＤＮＡ末端形態とは、同じ種類である。一部の実施形態において、ＴＤＳＣの第１のＤＮＡ末端形態と第２のＤＮＡ末端形態とは、異なる種類である。

【０１８６】

本明細書で使用されるとき、用語「エキソヌクレアーゼ耐性」は、ＤＮＡについての記載に使用されるとき、ＤＮＡが、それが閉鎖型末端を含む場合に、実施例１０に記載されるエキソヌクレアーゼアッセイで耐性を示し、それが開放型末端（例えば、２つの開放型末端）を含む場合に、実施例１１に記載されるエキソヌクレアーゼアッセイで耐性を示すことを意味する。

【０１８７】

本明細書で使用されるとき、用語「異種」は、第２の要素と関連して第１の要素を説明するのに使用される場合、第１の要素及び第２の要素が、記載されるように配置されて天然に存在しないことを意味する。例えば、異種ポリペプチド、核酸分子、構築物又は配列は、（ａ）それが発現される細胞に固有でない、ポリペプチド、核酸分子又はポリペプチド若しくは核酸分子配列の部分、（ｂ）その天然状態と比べて改変若しくは変異された、ポリペプチド又は核酸分子又はポリペプチド若しくは核酸分子の部分、又は（ｃ）同様の条件下における天然の発現レベルと比較して改変された発現を有する、ポリペプチド又は核酸分子を指す。例えば、異種調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー）は、遺伝子又は核酸分子が通常、天然に発現されるのと異なる方式で遺伝子又は核酸分子を調節するのに使用され得る。別の例において、ポリペプチド又は核酸配列（例えば、ポリペプチドのＤＮＡ結合ドメイン又はポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインをコードする核酸）の異種ドメインは、他のドメインに対して配置され得、又はポリペプチド若しくはそのコード核酸の他のドメイン若しくは部分と比べて、異なる配列であるか又は異なる源に由来し得る。特定の実施形態では、異種核酸分子は、天然の宿主細胞ゲノムで存在し得るが、改変された発現レベルを有するか若しくは異なる配列を有するか又は両方であり得る。他の実施形態では、異種核酸分子は、宿主細胞又は宿主ゲノムに対して内在性でなくてもよいが、その代わりに、形質転換（例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション）によって宿主細胞内に導入されていてもよく、ここで、付加された分子が、宿主ゲノムに統合してもよく、又は染色体外遺伝物質として、一過性（例えば、ｍＲＮＡ）又は２世代以上にわたって半安定的（例えば、エピソームウイルスベクター、プラスミド又は他の自己複製ベクター）のいずれかで存在し得る。

【０１８８】
本明細書で使用されるとき、用語「異種機能性配列」は、隣接する（例えば、直接隣接する）核酸配列にとって異種であり、且つ１つ以上の生物学的機能を有する核酸配列を指す。一部の実施形態において、生物学的機能は、細胞小器官への標的化、例えば、核標的化を含む。一部の実施形態において、異種機能性配列は、核標的化配列又は調節配列を含む。
【０１８９】
本明細書で使用されるとき、用語「増加する」及び「減少させる」は、それぞれ、参照と比べて機能、発現、又は活性の指標の量の増加又は減少をもたらす調節を指す。例えば、本明細書に記載される方法におけるＴＤＳＣの投与の後、本明細書に記載される指標（例えば、遺伝子発現のレベル、又は自然免疫のマーカー）の量は、非修飾ＴＤＳＣと比較した化学修飾核酸を含むＴＤＳＣなど、投与の前のマーカーの量と比べて、又は対照ＴＤＳＣの投与と比べて少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は９８％又はそれ以上だけ、対象において増加又は減少され得る。一般に、指標は、投与の後、投与が列挙された影響を有した時点で、例えば、治療レジメンが開始されてから少なくとも１日、１週間、１か月、３か月、又は６か月後に測定される。
【０１９０】
本明細書で使用されるとき、本明細書に記載されるｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣ又は核酸に関して用語「線状」は、互いにハイブリダイズする（それによって二本鎖領域を形成する）２本のＤＮＡ鎖又は鎖の一部分を含む核酸を意味し、ここでこの構造は、２つの末端を含む。末端は閉鎖型末端であっても、又は開放型末端であってもよい。互いにハイブリダイズする２本の鎖は、部分的に又は完全に相補的であり得る。一部の実施形態において、線状ＴＤＳＣは、変性条件下では環状であるＤＮＡの一本鎖からなり、ここで生理的条件下では、この鎖の第１の一部分が鎖の第２の一部分にハイブリダイズし（それによって二本鎖領域を形成する）、及び線状ＴＤＳＣは、第１のループを含む第１の閉鎖型末端と、第２のループを含む第２の閉鎖型末端とを含む。
【０１９１】
本明細書で使用されるとき、用語「ループ」は、一本鎖である核酸配列を指す。ループは、両方の末端で、「ステム」と称される二本鎖領域によって接続していて、「ステム－ループ」を形成する。
【０１９２】
本明細書で使用されるとき、用語「維持配列」は、細胞分裂による核内のＤＮＡ分子の保持を可能にするか又は容易にするＤＮＡ配列又はモチーフである。維持配列は、典型的に、クロマチンルーピングを容易にするタンパク質と相互作用することによって核内のＤＮＡの複製及び／又は転写を可能にする。維持配列の例は、足場／マトリックス結合領域（Ｓ／ＭＡＲ要素）である。
【０１９３】
本明細書で使用されるとき、「核標的化配列」は、ＤＮＡが標的細胞核内に入ることを可能にする又はそれを容易にするＤＮＡ配列である。一部の実施形態において、核標的化配列は、表３のＤＮＡ配列である。
【０１９４】
本明細書で使用されるとき、「医薬組成物」又は「医薬製剤」は、動物、例えばヒト又は家畜用の医薬としての使用、例えば、非ヒト動物又はヒト用の予防、診断又は治療用途に適応される組成物又は製剤である。医薬製剤は、薬学的に許容される賦形剤又は希釈剤と組み合わせて、対象の細胞又は組織に対する生物学的効果を有する、例えば、疾患の軽減、治療、又は予防において薬理学的活性又は効果を有する活性薬剤を含む。医薬組成物はまた、予防、診断又は治療用組成物の完成した剤形又は製剤を意味する。
【０１９５】

本明細書で使用されるとき、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、同義的に使用され、ペプチド結合によるか、又はペプチド結合以外の手段によって共有結合的に連結したアミノ酸残基を含む化合物を指す。タンパク質又はペプチドは少なくとも２個のアミノ酸を含まなければならず、タンパク質の配列又はペプチドの配列を含むことのできるアミノ酸の最大数に制限は課されない。ポリペプチドには、ペプチド結合によるか、又はペプチド結合以外の手段によって互いにつなぎ合わされた２個以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又はタンパク質が含まれる。本明細書で使用されるとき、この用語は、当該技術分野ではまた一般にペプチド、オリゴペプチド及びオリゴマーとも例えば称される短鎖と、当該技術分野では概してタンパク質と称され、これについては数多くの種類がある更なる長鎖との両方を指す。一部の実施形態において、ポリペプチドは、非標準的なアミノ酸残基を含む。本明細書で使用されるとき、用語「プロテロメラーゼ配列」は、第１のプロテロメラーゼ認識配列（ＰＲＳ）を第２のＰＲＳにつなぎ合わせるプロテロメラーゼによって生み出される能力のあるヌクレオチド配列を指す。一部の実施形態では、プロテロメラーゼ配列は、プロテロメラーゼが関わるプロセスによって生成され、他の実施形態では、プロテロメラーゼ配列は、プロテロメラーゼが関わらないプロセスによって（例えば、固相合成によって）生成された。

【０１９６】

本明細書で使用されるとき、ｄｓＤＮＡの「センス鎖」は、機能性タンパク質をコードするｍＲＮＡ又はプレｍＲＮＡと同じ配列を有するが、転写の鋳型としては働かない鎖である。ｄｓＤＮＡの「アンチセンス鎖」は、機能性タンパク質をコードするｍＲＮＡ又はプレｍＲＮＡと相補的な配列を有する鎖、及び／又は転写の鋳型として働き得る鎖である。

【０１９７】

本明細書で使用されるとき、用語「二本鎖ＤＮＡ」又はｄｓＤＮＡは、互いに塩基対合するデオキシリボヌクレオチドの２本の相補鎖を含むＤＮＡ組成物を意味する。これらの２本の相補鎖は完全な相補性を有してもよく、又は１つ以上のミスマッチを有して、例えば、バルジを形成してもよい。２本の鎖のいずれも、一部の実施形態では、対を成す自己相補性領域を有して折り畳み構造で分子内／鎖内二本鎖モチーフを形成することができ、例えば、ヘアピンループ、ジャンクション、バルジ又は内部ループを形成し得る。一部の実施形態において、ｄｓＤＮＡは１つ又は２つの閉鎖型末端を含む。一部の実施形態において、ｄｓＤＮＡ分子は環状又は線状である。一部の実施形態において（例えば、閉鎖型末端を有するｄｓＤＮＡ分子において）デオキシリボヌクレオチドの２本の相補鎖は、共有結合的に連結されている。

【０１９８】

本明細書で使用されるとき、用語「治療用二本鎖構築物」（「ＴＤＳＣ」）は、ＤＮＡを含む線状構築物であって、少なくとも部分的に二本鎖である構築物を指す。ＴＤＳＣは、プラスミド骨格配列を含まない（例えば、細菌複製起点を含まない）。ＴＤＳＣは、ウイルスカプシド又はウイルスエンベロープを含まない。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは閉鎖型末端又は開放型末端（例えば、平滑末端又は粘着末端）を含む。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、ヒト対象への投与に好適である。

【０１９９】

本明細書で使用されるとき、用語「プロトＴＤＳＣ」は、ＴＤＳＣに変換することのできる構築物を指す。一部の実施形態において、プロトＴＤＳＣは、１つ以上の工程（例えば、切断工程）に供されてＴＤＳＣに変換されることになり得る製造中間体である。一部の実施形態において、プロトＴＤＳＣはＴＤＳＣの定義の範囲内に入り、例えば、プロトＴＤＳＣは第１のＴＤＳＣであり、１つ以上の工程に供されて第２のＴＤＳＣに変換されることになり得る。

【０２００】

本明細書で使用されるとき、用語「終端側ヌクレオチド」は、厳密に１つの他のヌクレオチドと共有結合的に結び付いているヌクレオチドを指す。一部の実施形態において、終

端側ヌクレオチドは、遊離５’リン酸を含む。一部の実施形態において、終端側ヌクレオチドは、遊離３’ＯＨを含む。

【０２０１】

本明細書で使用されるとき、「治療」及び「治療する」は、疾患、病状、又は障害を向上させ、改善し、安定させる（すなわち、悪化させない）、予防するか又は治癒することを意図した、対象の内科的治療を指す。この用語は、積極的治療（疾患、病状、又は障害を改善することを目的とした治療）、原因治療（関連する疾患、病状、又は障害の原因に向けた治療）、緩和医療（症状の軽減に向けた治療）、予防的治療（関連する疾患、病状、又は障害の発生を最小限に抑えるか又は部分的に若しくは完全に抑制することを目的とした治療）；及び支持療法（別の療法を補完するための用いられる治療）を含む。治療は、検出可能か又は検出不能かにかかわらず、疾患又は病態の程度の縮小；疾患又は病態の拡大の防止；疾患又は病態の進行の遅延又は減速；疾患又は病態の改善又は緩和；及び寛解（部分的か又は完全かにかかわらず）も含む。疾患又は病態を「改善する」又は「緩和する」は、治療しない場合の程度又は時間的経過と比較して、疾患、障害、又は病態の程度及び／又は望ましくない臨床症状が、軽減され、及び／又は進行の時間的経過が、遅延又は延長されることを意味する。「治療」はまた、治療を受けない場合の予測生存と比較して、生存を延長することも意味し得る。治療を必要とする者は、病態若しくは障害に既に罹患している者、並びに病態若しくは障害に罹患しやすい者又は病態若しくは障害を予防しようとする者を含む。

【０２０２】

本明細書で使用されるとき、用語「Ｙ型アダプター」は、互いに相補的な（例えば、完全に相補的な）第１の核酸領域と第２の核酸領域とを含む核酸構造を指す；第１及び第２の領域は、ハイブリダイズして二本鎖領域を形成し得る。第１の核酸領域は第３の核酸領域に共有結合的に連結しており、第２の核酸領域は核酸領域に共有結合的に連結しており、第３及び第４の核酸領域は互いに実質的に相補的ではない；第３及び第４の領域は一本鎖であってもよい。第１の核酸領域は第３の核酸領域の３’側にあり、第２の核酸領域は第４の核酸領域の５’側にある。結果として、第３及び第４の領域は、二本鎖領域の同じ側に位置し得る。Ｙ型アダプターは、ＴＤＳＣの一部であり得る。

【図面の簡単な説明】

【０２０３】

【図１Ａ】図１Ａ～１Ｂは、本明細書に記載されるとおりの治療用二本鎖構築物（ＴＤＳＣ）に（例えば、ＴＤＳＣの一方又は両方の末端に）含めることのできる例示的な共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態を示す一連の図である。図１Ａには、ループなし末端（例えば、プロテロメラーゼ配列）、逆方向末端反復（ＩＴＲ）、又はヘアピンを末端に含む例示的ＴＤＳＣが示され、末端は未修飾ヌクレオチド（白色の記号）で構成されることができ、又は化学修飾ヌクレオチド（灰色の記号）を含み得る。化学修飾ヌクレオチドには、例えば、骨格、糖、若しくは塩基において修飾されるヌクレオチド、又はペプチド若しくはタンパク質にコンジュゲートされるヌクレオチドが含まれ得る。一部の例では、ＤＮＡ鎖の両方が未修飾である。一部の例では、ＤＮＡ鎖の両方が化学修飾されている。一部の例では、アンチセンス鎖が化学修飾されている。一部の例では、センス鎖が化学修飾されている。図１Ａの実線の囲み線は、ヘアピンによる共有結合閉鎖型の末端を備えるｄｓＤＮＡ分子、例えば、ホスホロチオエート修飾を含む末端形態を備える線状の共有結合閉鎖型ｄｓＤＮＡ分子を指示している。図１Ａの破線の囲み線は、ループなし末端による共有結合閉鎖型のｄｓＤＮＡ分子、例えば、ＴｅｌＮ末端形態を備える線状の共有結合閉鎖型ｄｓＤＮＡ分子を指示している。

【図１Ｂ】図１Ａ～１Ｂは、本明細書に記載されるとおりの治療用二本鎖構築物（ＴＤＳＣ）に（例えば、ＴＤＳＣの一方又は両方の末端に）含めることのできる例示的な共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態を示す一連の図である。図１Ａには、ループなし末端（例えば、プロテロメラーゼ配列）、逆方向末端反復（ＩＴＲ）、又はヘアピンを末端に含む例示的ＴＤＳＣが示され、末端は未修飾ヌクレオチド（白色の記号）で構成されることができ、

又は化学修飾ヌクレオチド（灰色の記号）を含み得る。化学修飾ヌクレオチドには、例えば、骨格、糖、若しくは塩基において修飾されるヌクレオチド、又はペプチド若しくはタンパク質にコンジュゲートされるヌクレオチドが含まれ得る。一部の例では、ＤＮＡ鎖の両方が未修飾である。一部の例では、ＤＮＡ鎖の両方が化学修飾されている。一部の例では、アンチセンス鎖が化学修飾されている。一部の例では、センス鎖が化学修飾されている。図１Ａの実線の囲み線は、ヘアピンによる共有結合閉鎖型の末端を備えるｄｓＤＮＡ分子、例えば、ホスホロチオエート修飾を含む末端形態を備える線状の共有結合閉鎖型ｄｓＤＮＡ分子を指示している。図１Ａの破線の囲み線は、ループなし末端による共有結合閉鎖型のｄｓＤＮＡ分子、例えば、ＴｅｌＮ末端形態を備える線状の共有結合閉鎖型ｄｓＤＮＡ分子を指示している。

【図２】共有結合閉鎖型でない例示的ＤＮＡ末端形態を（例えば、一方又は両方の末端に）含む例示的ＴＤＳＣを含めた、二本鎖ＤＮＡ構築物を示す一連の図である。かかる例示的ＴＤＳＣは、Ｙ型末端（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、Ｙ型アダプター）を含み得る。ＤＮＡ末端形態は、一部の例では未修飾ヌクレオチド（白色の記号）で構成されてもよい。一部の例では、ＤＮＡ末端形態は化学修飾ヌクレオチド（灰色の記号）を含む。化学修飾ヌクレオチドには、例えば、骨格、糖、若しくは塩基において修飾されているヌクレオチド、又はペプチド若しくはタンパク質にコンジュゲートしているヌクレオチドが含まれ得る。一部の例では、ＤＮＡ鎖の両方の鎖が未修飾である。一部の例では、ＤＮＡ鎖の両方の鎖が化学修飾されている。一部の例では、アンチセンス鎖が化学修飾されている。一部の例では、センス鎖が化学修飾されている。また、右上に、ＤＮＡ末端形態又は化学修飾を欠いている例示的ＤＮＡ構築物（即ち、未修飾二本鎖ＤＮＡ分子）も示される。

【図３】各鎖の終端側ヌクレオチド間に３つのホスホロチオエート修飾を含む平滑末端ＤＮＡ末端形態を含む例示的ＴＤＳＣの生成を示す一連の図である。端的には、ステムの終端側末端にホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含むヘアピン構造をＡ尾部付加後の二本鎖ＤＮＡにライゲートする。このヘアピンには一対のウラシルヌクレオチド（矢印）が含まれている。続いてＵＳＥＲ酵素で処理すると、ウラシル位置で切断が起こってオーバーハングが作り出され、ひいてはそれがヌクレアーゼ（例えば、一本鎖特異的ヌクレアーゼ、例えば、マングビーンヌクレアーゼ）を使用してホスホロチオエート修飾ヌクレオチドまでトリミングされる。図３は、出現順にそれぞれ、配列番号８５及び８６を開示する。

【図４】各鎖の終端側ヌクレオチド間に６つのホスホロチオエート修飾を含む平滑末端ＤＮＡ末端形態を含む例示的ＴＤＳＣの生成を示す一連の図である。端的には、ステムの終端側末端にホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含むヘアピン構造をＡ尾部付加後の二本鎖ＤＮＡにライゲートする。このヘアピンには一対のウラシルヌクレオチド（矢印）が含まれている。続いてＵＳＥＲ酵素で処理すると、ウラシル位置で切断が起こってオーバーハングが作り出され、ひいてはそれがヌクレアーゼ（例えば、一本鎖特異的ヌクレアーゼ、例えば、マングビーンヌクレアーゼ）を使用してホスホロチオエート修飾ヌクレオチドまでトリミングされる。図４は、出現順にそれぞれ、配列番号８７及び８８を開示する。

【図５】各末端にＹ型アダプターＤＮＡ末端形態を含む例示的ＴＤＳＣの生成を示す一連の図である。端的には、ループ領域にウラシルヌクレオチドを含むヘアピン構造をＡ尾部付加後の二本鎖ＤＮＡにライゲートする。ある実施形態において、このループ領域はヌクレオチド間にホスホロチオエート修飾を含む。続いてＵＳＥＲ酵素で処理すると、ループ中のウラシルの切断が起こって２本のハイブリダイズしない鎖となり、これらがｄｓＤＮＡの末端にＹ型アダプター構造を形成する。図５は、出現順にそれぞれ、配列番号８９～９２、９２及び９１を開示する。

【図６】本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣに含めることのできる例示的共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態を示す一連の図である。ＤＮＡ形態には、例えば、ヘアピンを含む小型ループアダプター、大型ループアダプター（例えば、ＣＴ３　ｓｓＤＮＡ配列などの１

つ以上の機能性エレメントをその一本鎖ループ領域に含むヘアピンを含む）、及びＤＮＡ末端形態のあらゆるヌクレオチドが別のヌクレオチドにハイブリダイズする、且つ末端が共有結合閉鎖型のループなしアダプターが含まれる。これらの例示的末端形態の各々を、例えば、二本鎖ＤＮＡにライゲートすると、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣの一方の末端が形成されることになり得る。図６は、出現順にそれぞれ、配列番号９３～９５を開示する。

【図７Ａ】エキソヌクレアーゼ処理後のＴＤＳＣを示すアガロースゲルを図示する。

【図７Ｂ】アガロースゲルのレーン３及び４に対応する、６ａと称されるＴＤＳＣを示す。

【図７Ｃ】アガロースゲルのレーン５及び６に対応する、３ａと称されるＴＤＳＣを示す。

【図７Ｄ】アガロースゲルのレーン７及び８に対応する、Ｙａと称されるＴＤＳＣの一方の末端を示す。図７Ｄは、出現順にそれぞれ、配列番号９６及び９７を開示する。

【図８】６つのホスホロチオエート修飾を備える末端形態（Ｐ６形態）の共有結合閉鎖型ＴＤＳＣの生成を示す図である。図８は、出現順にそれぞれ、配列番号９８及び９９を開示する。

【図９】ＴｅｌＮ末端形態を備える共有結合閉鎖型ＴＤＳＣの生成を示す図である。図９は、出現順にそれぞれ、配列番号１００、１００及び１０１を開示する。

【図１０】環状ｄｓＤＮＡ分子の例示的生成方法を示す図である。線状ｄｓＤＮＡ分子を制限酵素（例えば、ＫｐｎＩ）と接触させると、適合性のある粘着末端を作成することができ、次にそれらをライゲーションによって互いにつなぎ合わせることにより、環状ｄｓＤＮＡを生成し得る。図１０は、出現順にそれぞれ、配列番号１０２～１０５を開示する。

【図１１】２５％５－ホルミル－ｄＣＴＰを使用した反応で生成された環状ｄｓＤＮＡのフラグメントアナライザートレースを示す。

【図１２】２５％５－ホルミル－ｄＣＴＰを使用した反応で生成されたホスホロチオエート修飾を含む末端形態を備える共有結合閉鎖型ＴＤＳＣのフラグメントアナライザートレースを示す。

【図１３】２５％５－ホルミル－ｄＣＴＰを使用した反応で生成されたＴｅｌＮ末端形態を備える共有結合閉鎖型ＴＤＳＣのフラグメントアナライザートレースを示す。

【図１４Ａ－１４Ｂ】ＴｅｌＮ末端形態を含む共有結合閉鎖型ＴＤＳＣ（ＴｅｌＮ形態）、各末端形態に６つのホスホロチオエート修飾を備える末端形態を含む共有結合閉鎖型ＴＤＳＣ（Ｐ６形態）、又は環状ｄｓＤＮＡ分子（ｃｄｓＤＮＡ形態）をリポフェクションしたＨＥＫａ細胞におけるレポータータンパク質ｍＣｈｅｒｒｙの発現を示すグラフである。ＴＤＳＣ及び環状ｄｓＤＮＡ分子は、未修飾シトシン又は２５％５－ホルミル－ｄＣＴＰを使用した反応で生成した。図１４Ａは、ｍＣｈｅｒｒｙ発現細胞のパーセンテージを示し、図１４Ｂは、発現細胞のパーセンテージに平均蛍光強度を乗じたものとして定義される総蛍光量を示す。

【図１５Ａ－１５Ｃ】ＴｅｌＮ末端形態を含む共有結合閉鎖型ＴＤＳＣ（ＴｅｌＮ形態）、各末端形態に６つのホスホロチオエート修飾を備える末端形態を含む共有結合閉鎖型ＴＤＳＣ（Ｐ６形態）、又は環状ｄｓＤＮＡ分子（ｃｄｓＤＮＡ形態）をリポフェクションした後のＨＥＫａ細胞におけるＩＦＮβ（図１５Ａ）、ＣＸＣＬ１０（図１５Ｂ）、及びＩＬ６（図１５Ｃ）のｍＲＮＡレベルを示す一連のグラフである。ＴＤＳＣ及び環状ｄｓＤＮＡ分子は、未修飾シトシン又は２５％５－ホルミル－ｄＣＴＰを使用した反応で生成した。ＲＮＡ発現はＧＡＰＤＨで正規化し、方法対照に対する倍数変化として表した（ＤＮＡフリートランスフェクション）。

【図１６Ａ－１６Ｃ】ＴｅｌＮ末端形態を含む共有結合閉鎖型ＴＤＳＣ（ＴｅｌＮ形態）、各末端形態に６つのホスホロチオエート修飾を備える末端形態を含む共有結合閉鎖型ＴＤＳＣ（Ｐ６形態）、又は環状ｄｓＤＮＡ分子（ｃｄｓＤＮＡ形態）をリポフェクションした後のＴＨＰ１細胞におけるＩＦＮβ（図１６Ａ）、ＣＸＣＬ１０（図１６Ｂ）、及び

ＩＬ６（図１６Ｃ）のｍＲＮＡレベルを示す一連のグラフである。ＴＤＳＣ及び環状ｄｓＤＮＡ分子は、未修飾シトシン又は２５％５－ホルミル－ｄＣＴＰを使用した反応で生成した。ＲＮＡ発現はＧＡＰＤＨで正規化し、方法対照（ＤＮＡフリートランスフェクション）に対する倍数変化として表した。

【図１７】ホスホロチオエート化した末端アダプターを含み、及びシトシンのＣ－５位に指示される修飾（即ち、５－ホルミルシトシン、５－カルボキシシトシン、５－メチルシトシン、又は５－ヒドロキシメチルシトシン）を含むＴＤＳＣに対するＨＥＫａ細胞の自然免疫応答を示す散布図である。Ｘ軸は、未修飾シトシンを使用して生成したＴＤＳＣに対するマーカーＩＦＮＢ及びＣＸＣＬ１０の減少の平均倍数変化として定義されるインターフェロンシグナル伝達の減少を表す。Ｙ軸は、未修飾シトシンを使用して生成したＴＤＳＣに対するマーカーＩＬ６及びＴＮＦａの減少の平均倍数変化として定義される炎症性サイトカインシグナル伝達の減少を表す。

【発明を実施するための形態】

【０２０４】

本開示は、例えば、インビボ又はインビトロで、細胞、組織又は対象にエフェクター、例えば、治療エフェクターを提供するための組成物及び方法に関する。エフェクターは、ＤＮＡ配列、ポリペプチド、例えば、治療用タンパク質；又はＲＮＡ、例えば、調節ＲＮＡ又はｍＲＮＡであり得る。

【０２０５】

ＤＮＡ構築物の要素

本明細書に記載されるＴＤＳＣ又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、エフェクター配列を、標的細胞、組織又は対象に送達するのに十分な要素を含有する。一部の実施形態において、エフェクター配列は、ＤＮＡ配列である。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、エフェクターの発現を駆動し、例えば、プロモーター及びＲＮＡ又はポリペプチド、例えば、治療用ＲＮＡ又はポリペプチドをコードする配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＤＮＡ構築物は、核標的化配列及び維持配列のうちの１つ又は両方をさらに含有する。本明細書における実施形態の多くがＴＤＳＣについて言及しているが、適宜、ＴＤＳＣについて言及する実施形態を、ｄｓＤＮＡを含む核酸にも適用し得ることが理解される。

【０２０６】

エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態

本明細書に記載されるｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣ又は核酸は、二本鎖ＤＮＡ分子の各末端にＤＮＡ末端形態を含む。本明細書に記載されるＤＮＡ末端形態は、一部の例では閉鎖型末端を含んでもよく、ここではＤＮＡ末端形態のあらゆるヌクレオチドが、ＤＮＡ末端形態の他の２つのヌクレオチドに共有結合的に結び付いている。他の場合には、本明細書に記載されるＤＮＡ末端形態は、ＤＮＡ末端形態の他の１つのヌクレオチドにのみ共有結合的に結び付いているヌクレオチドを少なくとも１つ含む開放型末端を含む。ＤＮＡ末端形態は、概してエキソヌクレアーゼ耐性を示す。一部の例では、閉鎖型末端（例えば、共有結合閉鎖型末端）を含むＤＮＡ末端形態は、実施例１０に記載されるエキソヌクレアーゼアッセイで耐性を示す。一部の例では、開放型末端（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、Ｙ型アダプター、平滑末端、又は粘着末端など）を含むＤＮＡ末端形態は、実施例１１に記載されるエキソヌクレアーゼアッセイで耐性を示す。

【０２０７】

閉鎖型末端、例えば、ヘアピン

一部の実施形態において、エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態は、ＤＮＡヘアピンを含む。ヘアピンは概して、５’末端及び３’末端の両方で二本鎖ストーク領域に共有結合的に結び付いた一本鎖ループ領域を含む。特定の実施形態において、一本鎖ループ領域は、別のヌクレオチドとハイブリダイズしない１個以上のヌクレオチド（例えば、１～２、２～５、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、又は３５～４０個のヌクレオチド）を含む。例示的ヘアピン構造、及びヘアピンを含む例示

的ＴＤＳＣを図１Ａに示す。

【０２０８】

特定の実施形態において、一本鎖ループ領域は、１つ以上の機能性エレメント（例えば、核内移行配列（例えば、ＣＴ３　ｓｓＤＮＡ配列）、又は調節配列を含む。実施形態において、一本鎖ループ領域に含まれる機能性エレメントは、ＤＮＡ末端形態及び／又はＤＮＡ末端形態を含むＴＤＳＣの１つ以上の他のエレメントにとって異種である。特定の実施形態において、ヘアピンループの一本鎖ループ領域は、約５、１０、１５、２０、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０ヌクレオチド長未満である。

【０２０９】

実施形態において、ヘアピンは、ドギーボーン（ｄｏｇｇｙｂｏｎｅ）構造を有するＴＤＳＣに含まれる。実施形態において、ヘアピンは、プロテロメラーゼ配列（例えば、本明細書に記載されるとおりの）を含む。実施形態において、プロテロメラーゼ配列は、ＴｅｌＮプロテロメラーゼ、ＲｅｓＴプロテロメラーゼ、Ｔｅｌ　ＰＹ５４プロテロメラーゼ、又はＴｅｌＫプロテロメラーゼ消化によって生成される。実施形態において、プロテロメラーゼ配列は、約１５、２０、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０ヌクレオチド長未満である。実施形態において、プロテロメラーゼ配列は、約２８（例えば、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、又は３５）ヌクレオチド長～約５６（例えば、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、又は６０）ヌクレオチド長である。実施形態において、プロテロメラーゼ配列は、約５６ヌクレオチド長超（例えば、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６５、７０、７５、８０、９０、又は１００ヌクレオチド長超）である。

【０２１０】

ヘアピンは、二本鎖ＤＮＡ分子（例えば、本明細書に記載されるとおりのプロトＴＤＳＣ）の一方又は両方の末端に、例えば、ライゲーション（例えば、本明細書に記載されるとおりの）によって結び付けることができる。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、一方又は両方の末端に、ＤＮＡヘアピンループを含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣの上流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態は、ＤＮＡヘアピンループを含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣの下流エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態は、ＤＮＡヘアピンループを含む。

【０２１１】

特定の実施形態において、ＤＮＡヘアピンループは、１つ以上の未修飾ヌクレオチドを含む。実施形態において、ＤＮＡヘアピンループは、完全に未修飾ヌクレオチドからなる。特定の実施形態において、ＤＮＡヘアピンループは、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）を含む。実施形態において、ＤＮＡヘアピンループは、完全に化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）からなる。

【０２１２】

特定の実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの一本鎖ループ領域は、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）を含む。実施形態において、一本鎖ループ領域中のヌクレオチドの少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、又は９９％は、化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）である。実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの一本鎖ループ領域は、完全に化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）からなる。特定の実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの一本鎖ループ領域は、１つ以上の未修飾ヌクレオチドを含む。実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの一本鎖ループ領域は、完全に未修飾ヌクレオチドからなる。

【０２１３】
特定の実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの二本鎖ストーク領域は、１つ以上の未修飾ヌクレオチドを含む。実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの二本鎖ストーク領域は、完全に未修飾ヌクレオチドからなる。特定の実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの二本鎖ストーク領域は、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）を含む。実施形態において、二本鎖ストーク領域中のヌクレオチドの少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、又は９９％は、修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）である。実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの二本鎖ストーク領域は、完全に化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）からなる。
【０２１４】
実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの一本鎖ループ領域は、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）を含み、二本鎖ストーク領域は、１つ以上の未修飾ヌクレオチドを含む。実施形態において、一本鎖ループ領域中のヌクレオチドの少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、又は９９％は、化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）である。実施形態において、ＤＮＡヘアピンループの一本鎖ループ領域は、完全に化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）からなり、二本鎖ストーク領域は、完全に未修飾ヌクレオチドからなる。
【０２１５】
Ｙ型アダプター
一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態は、Ｙ型アダプターを含む。本明細書に記載されるとおり、Ｙ型アダプターは概して、一対の一本鎖ＤＮＡ領域を含み、各々が一端で二本鎖ＤＮＡ領域の鎖に結び付き、それによって「Ｙ」字型を形成する（ここで「Ｙ」の基部は二本鎖ＤＮＡ領域に相当し、「Ｙ」の枝分かれした上部の各々は２つの一本鎖ＤＮＡ領域に相当する）。例示的Ｙ型アダプター構造及びＹ型アダプターを含む例示的ＴＤＳＣを図２に示す。
【０２１６】
一部の実施形態において、Ｙ型アダプターの生成は、切断可能な部分（例えば、ウラシルヌクレオチド）を含む一本鎖領域を含むヘアピンループを二本鎖ＤＮＡ領域の末端に（例えば、ライゲーションによって）結び付けることによる。次に切断可能な部分を（例えば、切断可能な部分の切断能を有する酵素、例えば、ＵＳＥＲ酵素で処理することによって）切断すると、Ｙ型アダプターの２つの一本鎖ＤＮＡ領域を生成することができる。
【０２１７】
特定の実施形態において、Ｙ型アダプターの一本鎖ＤＮＡ領域（例えば、一方又は両方の一本鎖ＤＮＡ領域）は、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）を含む。実施形態において、一本鎖ＤＮＡ領域中のヌクレオチドの少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、又は９９％は、化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）である。実施形態において、Ｙ型アダプターの一本鎖ＤＮＡ領域（例えば、一方又は両方の一本鎖ＤＮＡ領域）は、完全に化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）からなる。特定の実施形態において、Ｙ型アダプターの一本鎖ＤＮＡ領域（例えば、一方又は両方の一本鎖ＤＮＡ領域）は、１つ以上の未修飾ヌクレオチドを含む。
【０２１８】

実施形態において、Ｙ型アダプターの一本鎖ＤＮＡ領域（例えば、一方又は両方の一本鎖ＤＮＡ領域）は、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）を含み、Ｙ型アダプターの二本鎖ＤＮＡ領域は、１つ以上の未修飾ヌクレオチドを含む。実施形態において、１つ又は複数の一本鎖ＤＮＡ領域中のヌクレオチドの少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、又は９９％は、化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）である。実施形態において、Ｙ型アダプターの一本鎖ＤＮＡ領域（例えば、一方又は両方の一本鎖ＤＮＡ領域）は、完全に化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）からなり、Ｙ型アダプターの二本鎖ＤＮＡ領域は、完全に未修飾ヌクレオチドからなる。

【０２１９】

ループなし閉鎖型ＤＮＡ末端形態

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、共有結合閉鎖型の、但しヘアピンループを含まないエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態を含む。例えば、特定の実施形態において、共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態のあらゆるヌクレオチドが別のヌクレオチドにハイブリダイズしている（例えば、図６の例示的「ループなしアダプター」に示されるとおり）。特定の実施形態において、共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態は第１の領域と第２の領域とを含み、ここで第１の領域は、その全体が第２の領域とのハイブリダイズ能を有し（例えば、ここで第１の領域は第２の領域と相補的である）、ここで第１の領域の３’末端は第２の領域の５’末端に共有結合的に結び付いている。実施形態において、本明細書に記載されるとおりの共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態は、本明細書に記載されるとおりのプロトＴＤＳＣの１つの末端に、例えば、ライゲーションによって結び付けることができる。

【０２２０】

開放型ＤＮＡ末端形態

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、共有結合閉鎖型でないエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態を含む。特定の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は、平滑末端（例えば、本明細書に記載されるとおりの１つ以上の化学修飾を含む平滑末端）又は粘着末端（例えば、本明細書に記載されるとおりの１つ以上の化学修飾を含む粘着末端）を含む。

【０２２１】

特定の実施形態において、開放型ＤＮＡ末端形態は、ＤＮＡヘアピンなど、共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態のヌクレアーゼ消化によって生成される。実施形態において、ＤＮＡヘアピンは、各鎖に切断可能な部分（例えば、ウラシルヌクレオチド）を含む二本鎖ストーク領域を含み、次にはこのＤＮＡヘアピンを、切断可能な部分の切断能を有する酵素（例えば、ＵＳＥＲ酵素）と接触させる。実施形態において、この結果、オーバーハングを含む粘着末端が形成されることになる。実施形態において、オーバーハングを酵素（例えば、一本鎖特異的ヌクレアーゼ、例えば、マングビーンヌクレアーゼ）で消化すると、平滑末端が形成される。

【０２２２】

特定の実施形態において、平滑末端を含むＤＮＡ末端形態は、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）を含む。実施形態において、平滑末端を含むＤＮＡ末端形態中のヌクレオチドの少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、又は９９％は、化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）である。実施形態において、平滑末端を含むＤＮＡ末端形態は、完全に化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）からなる。実施形態において、平滑末端を含むＤＮＡ末端形態の終端の塩基対は、化学修飾ヌクレオチド（例え

ば、塩基対の一方又は両方のヌクレオチドが化学修飾されている）、例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。実施形態において、ＤＮＡ末端形態の終端側末端にある複数の塩基対（例えば、２、３、４、５、又は６個の塩基対）は、化学修飾ヌクレオチド（例えば、塩基対の一方又は両方のヌクレオチドが化学修飾されている）、例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ある実施形態において、ＤＮＡ末端形態の終端側末端にある３塩基対は、化学修飾ヌクレオチド（例えば、塩基対の一方又は両方のヌクレオチドが化学修飾されている）、例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ある実施形態において、ＤＮＡ末端形態の終端側末端にある６個の塩基対は、化学修飾ヌクレオチド（例えば、塩基対の一方又は両方のヌクレオチドが化学修飾されている）、例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。

【０２２３】

特定の実施形態において、粘着末端を含むＤＮＡ末端形態は、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）を含む。実施形態において、粘着末端を含むＤＮＡ末端形態中のヌクレオチドの少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、又は９９％は、化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）である。実施形態において、粘着末端を含むＤＮＡ末端形態は、完全に化学修飾ヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド）からなる。実施形態において、粘着末端を含むＤＮＡ末端形態の終端側ヌクレオチドは、化学修飾ヌクレオチド（例えば、塩基対の一方又は両方のヌクレオチドが化学修飾されている）、例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。実施形態において、ＤＮＡ末端形態の粘着末端のオーバーハング領域は、１つ以上の化学修飾ヌクレオチド、例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。

【０２２４】

逆方向末端反復（ＩＴＲ）

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含むエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態を含む。一部の実施形態において、ＩＴＲは、ウイルス、例えば、アデノウイルス又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）からのＩＴＲである。一部の実施形態において、ＩＴＲは、ウイルス、例えば、アデノウイルス又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）からのＩＴＲ配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。特定の実施形態において、ＩＴＲは、複製起点（例えば、ウイルス複製起点）を含む。実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、ＩＴＲ（例えば、本明細書に記載されるとおりの）を各末端に含むエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態を含む。一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、ＩＴＲを含まない。

【０２２５】

プロモーター及び他の調節配列

本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、エフェクター配列に作動可能に連結されるプロモーター（ＲＮＡポリメラーゼ及び転写因子が、転写を開始させるために、直接又は間接的に結合するＤＮＡ配列）を含有し得る。プロモーターは、エフェクター配列に作動可能に連結されて天然に見られ得、又はエフェクター配列に対して異種であり得る。本明細書に記載されるプロモーターは、標的細胞若しくは組織に固有であり得、又は標的細胞若しくは組織に対して異種であり得る。プロモーターは、構成的、誘導性及び／又は組織特異的であり得る。

【０２２６】

構成的プロモーターの例としては、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴ

Ｒプロモーター（任意に、ＲＳＶエンハンサーとともに）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（任意に、ＣＭＶエンハンサーとともに）（例えば、Ｂｏｓｈａｒｔ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，４１：５２１－５３０（１９８５を参照）、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、β－アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、及びＥＦ１αプロモーターが挙げられる。

【０２２７】

誘導性プロモーターは、発現の調節を可能にし、外部から供給される化合物、温度などの環境因子、又は特定の生理学的状態、例えば、急性期、細胞の特定の分化状態の存在によって、又は複製細胞内でのみ調節され得る。誘導性プロモーター及び誘導性システムは、様々な供給源から入手可能である。外部から供給されるプロモーターによって調節される誘導性プロモーターの例としては、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオネイン（ＭＴ）プロモーター、デキサメタゾン（Ｄｅｘ）誘導性マウス乳癌ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター、Ｔ７ポリメラーゼプロモーターシステム（国際公開第９８／１００８８号パンフレット）；エクジソン昆虫プロモーター（Ｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９３：３３４６－３３５１（１９９６））、テトラサイクリン抑制システム（Ｇｏｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：５５４７－５５５１（１９９２））、テトラサイクリン誘導性システム（Ｇｏｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２６８：１７６６－１７６９（１９９５）、Ｈａｒｖｅｙ ｅｔ ａｌ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，２：５１２－５１８（１９９８）も参照）、ＲＵ４８６誘導性システム（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，１５：２３９－２４３（１９９７）及びＷａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，４：４３２－４４１（１９９７））及びラパマイシン誘導性システム（Ｍａｇａｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１００：２８６５－２８７２（１９９７））が挙げられる。

【０２２８】

一部の実施形態において、エフェクターをコードする配列の天然プロモーターが使用され得る。

【０２２９】

一部の実施形態において、調節配列は、組織特異的遺伝子発現能力を与える。場合によっては、組織特異的調節配列は、組織特異的な方式で転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。このような組織特異的調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）は、当該技術分野において公知である。例示的な組織特異的調節配列としては、限定はされないが、以下の組織特異的プロモーター：肝臓特異的チロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）プロモーター、インスリンプロモーター、グルカゴンプロモーター、ソマトスタチンプロモーター、膵臓ポリペプチド（ＰＰＹ）プロモーター、シナプシン－１（Ｓｙｎ）プロモーター、クレアチンキナーゼ（ＭＣＫ）プロモーター、哺乳動物デスミン（ＤＥＳ）プロモーター、α－ミオシン重鎖（ａ－ＭＨＣ）プロモーター、又は心臓トロポニンＴ（ｃＴｎＴ）プロモーターが挙げられる。他の例示的なプロモーターとしては、当業者に公知であるものの中でもとりわけ、β－アクチンプロモーター、Ｂ型肝炎ウイルスコアプロモーター、Ｓａｎｄｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，３：１００２－９（１９９６）；α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）プロモーター、Ａｒｂｕｔｈｎｏｔ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，７：１５０３－１４（１９９６））、骨オステオカルシンプロモーター（Ｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐ．，２４：１８５－９６（１９９７））；骨シアロタンパク質プロモーター（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．，１１：６５４－６４（１９９６））、ＣＤ２プロモーター（Ｈａｎｓａｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６１：１０６３－８（１９９８）；免疫グロブリン重鎖プロモーター；Ｔ細胞受容体α．－鎖プロモーター、神経細胞、例えばニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモーター（Ａｎｄｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．，１３：５０３－１５（１９９３））、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモーター（Ｐｉｃｃｉｏｌｉ

ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：５６１１－５（１９９１））、及びニューロン特異的ｖｇｆ遺伝子プロモーター（Ｐｉｃｃｉｏｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｎ，１５：３７３－８４（１９９５））が挙げられる。

【０２３０】

組織／細胞特異的プロモーターの例が、表１に列挙される：

【０２３１】

【表１－１】

表 1: 組織特異的又は細胞特異的プロモーター

組織/細胞	プロモーター	アクセッション番号; ヒトゲノム座標 (hg38)
骨格筋	ACTA1	NM_001100; chr1:229,439,090-229,432,090
メラノーマ	TYR	NM_000372; chr11:89,300,750-89,293,750
ヘパトーマ	a-フェトプロテイン	NM_001354717; chr4:73,461,175-73,454,175
乳癌	ムチン 1	NM_001371720; chr1:155,197,900-155,190,900
前立腺癌	KLK3	NM_001648; chr19: 50,865,760-50,858,760
神経細胞	ENO2	NM_001975; chr12:6,928,700-6,921,700
低酸素に対する反応	HIF-1α	NM_001530; chr14:61,753,200-61,746,200
網膜芽細胞腫	E2F1	NM_005225; chr20: 33,691,380-33,684,380
電離放射線	EGR-1	NM_001964; chr5:138,474,303-138,467,303
癌遺伝子	ErbB2	NM_004448; chr17:39,735,530-39,728,530
内皮細胞	vWF	NM_000552; chr12:6,129,670-6,122,670

【０２３２】

【表１－２】

内皮細胞	FLT-1	NM_002019; chr13:28,500,100-28,493,100
内皮細胞	ICAM-2	NM_001099786; chr17:64,025,630-64,018,630
網膜色素上皮	VMD2	NM_004183; chr11:61,972,630-61,965,630
桿体細胞	RHO	NM_000539; chr3:129,540,350-129,533,350
錐体細胞	赤/緑オプシン (OPN1LW)	NM_020061; chrX:154,164,030-154,157,030
神経節細胞	胸腺細胞抗原 (Thy1)	NM_006288; chr11:119,428,150-119,421,150
T 細胞	TIM3	NM_032782; chr5:157,114,050-157,107,050
T 細胞	FOXP3	NM_014009; chrX:49,269,700-49,262,700
PBMC	Vβ6.7	ENST00000390373.2; chr7:142,493,295-142,486,295
細胞周期	Cdk1	NM_001786; chr10:60,799,850-60,792,850

【０２３３】

本明細書に記載される構築物にはまた、エンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位又はＫｏｚａｋコンセンサス配列など、他の天然又は異種発現制御エレメントも含まれ得る。

【０２３４】

エフェクター配列

本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸のエフェクター配列は、例えば、機能的ＤＮＡ配列、例えば、治療的に機能的なＤＮＡ配列；治療用ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質をコードするＤＮＡ配列；治療用ＲＮＡ（例えば、ノンコーディングＲＮＡ）をコードするＤＮＡ配列であり得る。

【０２３５】

ＤＮＡエフェクター：

治療的に機能的なＤＮＡ配列は、機能的構造を形成するＤＮＡ配列、例えば、ＤＮＡアプタマー、ＤＮＡザイム又はアレル特異的オリゴヌクレオチド（ＤＮＡ　ＡＳＯ）を含むＤＮＡ配列であり得る。治療的に機能的なＤＮＡ配列は、作動可能に連結されるプロモーターを有さなくてもよい。実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、１つ又は複数の機能的ＤＮＡ配列、例えば、２、３、４、５、６、又はそれ以上の配列を含んでいてもよく、これらは、同じか又は異なり得る。

【０２３６】

ポリペプチドエフェクター：

治療用ポリペプチドをコードするＤＮＡ配列は、ペプチド、タンパク質、又はこれらの組み合わせである１つ以上のエフェクターをコードするＤＮＡ配列であり得る。例えば、ＤＮＡ配列はｍＲＮＡをコードする。ペプチド又はタンパク質は、ＤＮＡ結合タンパク質；ＲＮＡ結合タンパク質；トランスポーター；転写因子；翻訳因子；リボソームタンパク質；クロマチンリモデリング因子；後成的修飾因子；抗原；ホルモン；酵素（ヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、ＣＲＩＳＰＲシステムのヌクレアーゼエレメント、例えば、Ｃａｓ９、ｄＣａｓ９、ａＣａｓ９－ニッカーゼ、Ｃｐｆ／Ｃａｓ１２ａ

など）；Ｃｒｉｓｐｒ連結酵素、例えばベースエディター又はプライムエディター；可動性遺伝エレメントタンパク質（例えば、トランスポザーゼ、レトロトランスポザーゼ、リコンビナーゼ、インテグラーゼ）；ジーンライター；ポリメラーゼ；メチラーゼ；デメチラーゼ；アセチラーゼ；デアセチラーゼ；キナーゼ；ホスファターゼ；リガーゼ；デユビキチナーゼ；プロテアーゼ；インテグラーゼ；リコンビナーゼ；トポイソメラーゼ；ジャイレース；ヘリカーゼ；リソソーム酸ヒドロラーゼ）；抗体（例えば、インタクトな抗体、その断片、又はナノボディ）；シグナル伝達ペプチド；受容体リガンド；受容体；凝固因子（ｃｌｏｔｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ）；凝固因子（ｃｏａｇｕｌａｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ）；構造タンパク質；カスパーゼ；膜タンパク質；ミトコンドリアタンパク質；核タンパク質；センチリン、ＤＡＲＰｉｎ、又はアドネクチンなどの操作された結合体であり得る。例えば、Ｇｅｂａｕｅｒ ＆ Ｓｋｅｒｒａ．２０２０．Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ ６０：１，３９１－４１５を参照のこと。

【０２３７】

実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、ポリペプチドをコードする１つ又は複数の配列、例えば、ポリペプチドをコードする２、３、４、５、６つ、又はそれ以上の配列を含み得る。複数のうちのそれぞれが、同じ又は異なるタンパク質をコードし得る。例えば、本明細書に記載されるＴＤＳＣ又は配列は、複数のタンパク質、例えば、生物学的経路における複数のタンパク質をコードする複数の配列を含み得る。

【０２３８】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣ又は配列は、自己切断性ペプチド、例えば、Ｐ２Ａ、Ｔ２Ａ、Ｅ２Ａ又はＦ２Ａによって隔てられた、ポリペプチドをコードする複数の配列、例えば、ポリペプチドをコードする２、３、４、５、６つ、又はそれ以上の配列を含み得る。自己切断性ペプチドは、１８～２２アミノ酸長であり、２つのポリペプチドが、同じ転写産物中でコードされ得るように、タンパク質翻訳中にリボソームスキッピングを誘導し得る。ポリペプチドのそれぞれが、同じ又は異なるタンパク質をコードし得る。一実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣ又は配列は、プロモーター、続いて、目的の第１のポリペプチドをコードする配列、２Ａ自己切断性ペプチドをコードする配列、目的の第２のポリペプチドをコードする配列、及びポリＡ部分を含み得る。別の実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣ又は配列は、プロモーター、続いて、目的の第１のポリペプチドをコードする配列、第１の２Ａ自己切断性ペプチド、目的の第２のポリペプチド、第２の２Ａ自己切断性ペプチドをコードする配列、目的の第３のポリペプチドをコードする配列及びポリＡ部分を含み得る。

【０２３９】

一部の実施形態において、エフェクターは細胞透過性ポリペプチドを含む。一部の実施形態において、エフェクターは、細胞透過性ポリペプチドと第２のアミノ酸配列とを含む融合タンパク質である。

【０２４０】

ＲＮＡエフェクター：

エフェクター配列は、ノンコーディングＲＮＡ、例えば、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、長鎖ノンコーディングＲＮＡ、ｐｉｗｉ相互作用ＲＮＡ（ｐｉＲＮＡ）、核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）、カハール体低分子特異的ＲＮＡ（ｓｃａＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、ＲＮＡアプタマー、及び核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）のうちの１つ以上をコードするＤＮＡ配列であり得る。

【０２４１】

一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、調節ＲＮＡ、例えば、内在性遺伝子及び／又は外来遺伝子の発現を修飾するＲＮＡをコードする１つ以上の発現配列を含む。一部の実施形態において、本明細書に開示

されるＴＤＳＣ又は配列は、限定はされないが、ｔＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｅｘＲＮＡ、ｓｃａＲＮＡ、Ｙ　ＲＮＡ、及びｈｎＲＮＡなどのノンコーディングＲＮＡのような調節核酸に対してアンチセンスである配列を含み得る。一実施形態では、調節核酸は、宿主遺伝子を標的とする。調節核酸は、限定はされないが、内在性遺伝子、例えば、アンチセンスＲＮＡ、ガイドＲＮＡにハイブリダイズする核酸、ウイルスＤＮＡ又はＲＮＡなどの外因性核酸にハイブリダイズする核酸、ＲＮＡにハイブリダイズする核酸、遺伝子転写に干渉する核酸、ＲＮＡ翻訳に干渉する核酸、分解に対する標的化などによって、ＲＮＡを安定させるか又はＲＮＡを不安定にする核酸、及びＤＮＡ又はＲＮＡ結合因子を調節する核酸を含み得る。一実施形態では、配列は、ｍｉＲＮＡである。一部の実施形態において、調節核酸は、宿主遺伝子のセンス鎖を標的とする。一部の実施形態において、調節核酸は、宿主遺伝子のアンチセンス鎖を標的とする。

【０２４２】

一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、ガイドＲＮＡをコードする。ガイドＲＮＡ配列は、概して、標的化されている核酸配列と相補的な１５～３０ヌクレオチド（例えば、１７、１９、２０、２１、２４ヌクレオチド）の長さを有する配列、及び複合体形成（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ又はヌクレアーゼとの）を促進する領域を有するように設計される。カスタムｇＲＮＡジェネレーター及びアルゴリズムは、有効なガイドＲＮＡの設計に使用するために市販されている。遺伝子編集はまた、天然に存在するｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体を模倣し、ｔｒａｃｒＲＮＡ（ヌクレアーゼに結合するため）及び少なくとも１つのｃｒＲＮＡ（編集の標的とされる配列にヌクレアーゼを誘導するため）の両方を含有する、操作された（合成）単一ＲＮＡ分子であるキメラ「シングルガイドＲＮＡ」（「ｓｇＲＮＡ」）を用いて達成されている。化学修飾ｓｇＲＮＡも、ゲノム編集に有効であることが実証されている；例えば、Ｈｅｎｄｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，９８５－９９１を参照されたい。ｇＲＮＡは、特定のＤＮＡ配列（例えば、遺伝子のプロモーター、エンハンサー、サイレンサー、若しくはリプレッサーに隣接するか又はその範囲内の配列）を認識し得る。一実施形態では、ｇＲＮＡは、遺伝子編集のためのＣＲＩＳＰＲシステムの一部として使用される。遺伝子編集のために、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、所望の標的ＤＮＡ配列に対応するガイドＲＮＡ配列をコードする１つ又は複数の配列を含むように設計され得；例えば、Ｃｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｓｃｉｅｎｃｅ，３３９：８１９－８２３；Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，８：２２８１－２３０８を参照されたい。

【０２４３】

開示されるＴＤＳＣ又は配列は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）の生物学的プロセスを通して遺伝子発現を阻害し得る特定の調節核酸をコードし得る。ＲＮＡｉ分子は、典型的に、１５～５０塩基対（約１８～２５塩基対など）を含有し、細胞内で発現される標的遺伝子中のコード配列と同一（相補的）又はほぼ同一（実質的に相補的）である核酸塩基配列を有するＲＮＡ又はＲＮＡ様構造を含む。このようなＲＮＡｉ分子としては、限定はされないが：低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、短鎖ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、メロデュプレックス（ｍｅｒｏｄｕｐｌｅｘ）、及びダイサー基質（米国特許第８，０８４，５９９号明細書、同第８，３４９，８０９号明細書及び同第８，５１３，２０７号明細書）、ＲＮＡアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＲＮＡ　ＡＳＯ）が挙げられる。

【０２４４】

一実施形態では、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、ｌｎｃＲＮＡのセンス鎖を含む配列を含む。一実施形態では、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、ｌｎｃＲＮＡのアンチセンス鎖をコードする配列を含む。

【０２４５】

本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、内在性遺伝子又は遺伝子産物（例えば、ｍ

ＲＮＡ）の断片に実質的に相補的な、又は完全に相補的な調節核酸をコードし得る。調節核酸は、特定の遺伝子の新たに生成された核内ＲＮＡ転写産物の、転写のためのｍＲＮＡへの成熟を防止するために、イントロン及びエクソンの間の境界において、エクソン間において、又はエクソンに隣接して、配列を補完し得る。特定の遺伝子に相補的な調節核酸は、その遺伝子についてのｍＲＮＡとハイブリダイズし、その翻訳を防止することができる。アンチセンス調節核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はそれらの誘導体若しくはハイブリッドであり得る。一部の実施形態において、調節核酸は、内在性遺伝子又は外来遺伝子の発現の調節に関与するタンパク質に結合し得るタンパク質結合部位を含む。

【０２４６】

本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、目的の転写産物にハイブリダイズする調節核酸をコードし得、例えば、約５～３０ヌクレオチド、約１０～３０ヌクレオチド、又は約１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０若しくはそれ以上のヌクレオチドであり得る。標的とされる転写産物に対する調節核酸の同一性の程度は、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％であるべきである。

【０２４７】

本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、標的遺伝子の約５～約３０連続ヌクレオチドと同一のマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子をコードし得る。一部の実施形態において、ｍｉＲＮＡ配列は、ｍＲＮＡを標的とし、ジヌクレオチドＡＡで開始し、約３０～７０％（約３０～６０％、約４０～６０％、又は約４５％～５５％）のＧＣ含量を含み、例えば、標準的なＢＬＡＳＴ検索によって決定される際、それが導入される哺乳動物のゲノム中の標的以外のいずれかのヌクレオチド配列に対する高いパーセンテージ同一性を有さない。一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、少なくとも１つのｍｉＲＮＡ、例えば、２、３、４、５、６つ、又はそれ以上をコードする。一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、ヌクレオチド配列のいずれか１つに対して少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％ ９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％のヌクレオチド配列同一性を有するｍｉＲＮＡをコードする配列又は標的配列に相補的な配列を含む。公知のｍｉＲＮＡ配列のリストは、とりわけ、Ｗｅｌｌｃｏｍｅ Ｔｒｕｓｔ Ｓａｎｇｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｐｅｎｎ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｓｌｏａｎ Ｋｅｔｔｅｒｉｎｇ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ、及びＥｕｒｏｐｅａｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙなどの研究機関によって維持されるデータベースにおいて見出され得る。公知の有効なｓｉＲＮＡ配列及び同族結合部位も、関連文献において十分に示されている。ＲＮＡｉ分子は、当該技術分野において公知の技術によって容易に設計される。さらに、有効及び特異的な配列モチーフを発見する機会を増加させる計算ツールがある（例えば、Ｌａｇａｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．，２０１５，１２６９：３９３－４１２を参照）。

【０２４８】

本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、遺伝子によってコードされるＲＮＡの発現を調節し得る。複数の遺伝子が、互いに対するある程度の配列相同性を共有し得るため、一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、十分な配列相同性を有する遺伝子のクラスを標的とするように設計され得る。一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、異なる遺伝子標的間で共有されるか又は特定の遺伝子標的に固有である配列に対する相補性を有する配列を含有し得る。一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、いくつかの遺伝子間で相同性を有するＲＮＡ配列の保存領域を標的とし、それによって、遺伝子ファミリー中のいくつかの遺伝子（例えば、異なる遺伝子アイソフォーム、スプライス変異体、突然変異遺伝子など）を標的とするように設計され得る。一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、単一の遺伝子の特定のＲＮＡ配列に固有である配列を標的とするよう

に設計され得る。

【０２４９】

実施形態では、調節ＲＮＡをコードするエフェクター配列は、５０００ｂｐｓ未満（例えば、約５０００ｂｐｓ、４０００ｂｐｓ、３０００ｂｐｓ、２０００ｂｐｓ、１０００ｂｐｓ、９００ｂｐｓ、８００ｂｐｓ、７００ｂｐｓ、６００ｂｐｓ、５００ｂｐｓ、４００ｂｐｓ、３００ｂｐｓ、２００ｂｐｓ、１００ｂｐｓ、５０ｂｐｓ、４０ｂｐｓ、３０ｂｐｓ、２０ｂｐｓ、１０ｂｐｓ未満、又はそれ以下）の長さを有する。一部の実施形態において、エフェクター配列は、独立して又はそれに加えて、１０ｂｐｓ超（例えば、少なくとも約１０ｂｐｓ、２０ｂｐｓ、３０ｂｐｓ、４０ｂｐｓ、５０ｂｐｓ、６０ｂｐｓ、７０ｂｐｓ、８０ｂｐｓ、９０ｂｐｓ、１００ｂｐｓ、２００ｂｐｓ、３００ｂｐｓ、４００ｂｐｓ、５００ｂｐｓ、６００ｂｐｓ、７００ｂｐｓ、８００ｂｐｓ、９００ｂｐｓ、１０００ｋｂ、１．１ｋｂ、１．２ｋｂ、１．３ｋｂ、１．４ｋｂ、１．５ｋｂ、１．６ｋｂ、１．７ｋｂ、１．８ｋｂ、１．９ｋｂ、２ｋｂ、２．１ｋｂ、２．２ｋｂ、２．３ｋｂ、２．４ｋｂ、２．５ｋｂ、２．６ｋｂ、２．７ｋｂ、２．８ｋｂ、２．９ｋｂ、３ｋｂ、３．１ｋｂ、３．２ｋｂ、３．３ｋｂ、３．４ｋｂ、３．５ｋｂ、３．６ｋｂ、３．７ｋｂ、３．８ｋｂ、３．９ｋｂ、４ｋｂ、４．１ｋｂ、４．２ｋｂ、４．３ｋｂ、４．４ｋｂ、４．５ｋｂ、４．６ｋｂ、４．７ｋｂ、４．８ｋｂ、４．９ｋｂ、５ｋｂ又はそれ以上）の長さを有する。

【０２５０】

一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ又は配列は、本明細書において上述される特徴、例えば、１つ以上の構造的ＤＮＡ配列、１つ以上のペプチド又はタンパク質をコードする配列、１つ以上の調節要素をコードする配列、１つ以上の調節核酸をコードする配列、例えば、１つ以上のノンコーディングＲＮＡ、他の発現配列、及び上記の任意の組み合わせのうちの１つ以上を含む。本明細書に記載される構築物は、１つ又は複数のエフェクター配列、例えば、２、３、４、５つ又はそれ以上のエフェクター配列を有し得る。単一の構築物中の複数のエフェクター配列の場合、エフェクター配列は、同じか又は異なり得る。

【０２５１】

一実施形態では、ＴＤＳＣは、治療的に機能的な構造的ＤＮＡ配列を含む。一実施形態では、ＴＤＳＣは、プロモーター及び本明細書に記載される治療用ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質をコードする配列を含む。一実施形態では、ＴＤＳＣは、プロモーター及び本明細書に記載される調節ＲＮＡをコードする配列を含む。

【０２５２】

ある実施形態において、ポリペプチド又はタンパク質をコードするエフェクター配列は、コドン最適化され、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトにおける発現についてコドン最適化される。一般に、コドン最適化は、天然配列の少なくとも１つのコドン（例えば、１つ以上、例えば、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０個、又はそれ以上のコドン；例えば、少なくとも１％、５％、１０％、２０％、２５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％又は１００％）を、天然アミノ酸配列を維持しながらその宿主細胞の遺伝子中でより高い頻度で又は最も高い頻度で使用されるコドンで置き換えることによって、目的の宿主細胞における強化された発現のために核酸配列を修飾することを意味する。コドン使用頻度表は、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｋａｚｕｓａ．ｏｒ．ｊｐ／ｃｏｄｏｎ／で利用可能な「コドン使用頻度データベース（Ｃｏｄｏｎ　Ｕｓａｇｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ）」において入手可能である。これらの表は、多くの方法において適合され得、例えば、Ｎａｋａｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８：２９２を参照されたい。特定の宿主細胞における発現のために特定の配列をコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズム、例えばＧｅｎｅ　Ｆｏｒｇｅも入手可能である。

【０２５３】

核標的化配列（ＮＴＳ）

本明細書に開示されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、細胞の細胞質から核内へのＤＮＡの輸送を容易にする核標的化配列（ＮＴＳ）を含み得る。ＮＴＳは、核膜孔複合体を介して核内にカーゴを輸送するインポーチンに結合するタンパク質（例えば、転写因子、シャペロンなど）への結合部位を含む。実施形態では、ＮＴＳは、一般に機能し得る（例えばＳＶ４０　エンハンサーＮＴＳ）。他の実施形態では、ＮＴＳは、例えば、固有の細胞型において発現される転写因子のための結合部位を含有し、細胞特異的な方式で（例えば、ＳＲＦ、Ｎｋｘ３）、本明細書に記載されるＴＤＳＣを核に標的化し得る、細胞又は組織特異的であってもよい。ＮＴＳは、本明細書に記載されるＴＤＳＣにおける複数の位置、例えば、プロモーターの前及び／又はエフェクター配列の後で、機能的であり得る。

【０２５４】

ＮＴＳは、ウイルス由来又は非ウイルス由来であり得る。ＮＴＳは、例えば、Ｌｅ　Ｇｕｅｎ　ｅｔ　ａｌ．２０２１．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｖｏｌ．２４：４７７－４８６に記載されている。ＮＴＳの例は、表２に開示されている：

【０２５５】

【表２】

表2: 例示的な核標的化配列

ウイルス/非ウイルス	名称	配列
ウイルス	SV40	5’-cccaagaagaagaggaaagtc-3’ (配列番号1)
非ウイルス	3NF	5’-ctggggactttccagcctggggactttccagctgggactttccagg-3’ (配列番号106)

【０２５６】

一部の実施形態において、ＮＴＳは、表２に係る配列、又はそれと少なくとも８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する機能性配列を有する。

【０２５７】

核内移行タンパク質

一部の実施形態において、ｄｓＤＮＡ（例えば、本明細書に記載されるとおりの）を含むＴＤＳＣ又は核酸は、例えば、核内移行タンパク質（例えば、表３に列挙されるとおりの核内移行タンパク質による核内への移行能を有する。一部の実施形態において、ｄｓＤＮＡ（例えば、本明細書に記載されるとおりの）を含むＴＤＳＣ又は核酸は、核内移行タンパク質（例えば、表３に列挙されるとおりの核内移行タンパク質による結合を受けることができる。一部の実施形態において、ｄｓＤＮＡ（例えば、本明細書に記載されるとおりの）を含むＴＤＳＣ又は核酸は、核内移行タンパク質用の認識配列（例えば、表３の任意の単一の行に列挙されるとおりの）を含む。一部の実施形態において、ｄｓＤＮＡ（例えば、本明細書に記載されるとおりの）を含むＴＤＳＣ又は核酸は、表３に列挙されるとおりの認識配列、又はそれと少なくとも７５％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態において、エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣ又は核酸に含まれる）は、表３に列挙されるとおりの認識配列、又はそれと少なくとも７５％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する核酸配列を含む。

【０２５８】

例示的な輸送タンパク質としては、例えば、塩基性ヘリックスループヘリックス（ｂＨＬＨ）タンパク質、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質（ｈｎＲＮＰ）アイソフォーム、核因子Ｉ（ＮＦＩ）タンパク質、例えば、表３に列挙されるものが挙げられる。一部の実施形態において、ｂＨＬＨタンパク質は、アセチルコリン受容体サブユニット、例えば、αサブユニット、例えば、ＣＨＲＮＡ１、ＣＨＲＮＡ２、ＣＨＲＮＡ３、ＣＨＲＮＡ４、Ｃ

ＨＲＮＡ５、又はＣＨＲＮＡ７を含む。一部の実施形態において、アセチルコリン受容体サブユニットは、γ又はεサブユニットを含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、デスミンを含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ｈｎＲＮＰ、例えば、ｈｎＲＮＰ　Ａ１、ｈｎＲＮＰ　Ｃ、ｈｎＲＮＰ　Ｋ、ｈｎＲＮＰ　Ｕを含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、インポーチンを含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ミオシン軽鎖を含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ＮＦＩを含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ＮＦＫＢを含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、例えば、ＮＭ２３－Ｈ２を含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、Ｏｃｔ１を含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、Ｏｃｔ２を含む。

【０２５９】

一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ＳＲＦを含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ＴＥＦ－１を含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ＡＰ２を含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、トロポニン、例えば、トロポニンＩ、例えば、トロポニンＩ　２を含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ＴＴＦ－１を含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、Ｒａｎ結合タンパク質、例えば、ＲａｎＢＰ３又はＲａｎＢＰ１を含む。一部の実施形態において、輸送タンパク質は、ホメオボックス転写因子、例えば、Ｃｈｘ１０を含む。

【０２６０】

一部の実施形態において、輸送因子は、Ｅ－ボックス、ＤＴＳ（例えば、ＳＶ４０　ＤＴＳ又はＳＭＧＡ　ＤＴＳ）、プロモーター（例えば、ＳＰ－Ｃプロモーター又はｈｔｋプロモーター）、テロメア、ＡＴＴＴモチーフ、細胞周期調節ユニット（ＣＣＲＵ）、ＣＴ３配列、Ｓ／ＭＡＲ、トポイソメラーゼＩＩコンセンサス配列、ＡＲＳコンセンサス配列、３ＮＦ、ウイルスの複製起点（ｏｒｉ）（例えば、ＥＢＶ　ｏｒｉＰ部位）に特異的に結合する。

【０２６１】

【表３－１】

表3: 例示的な核内移行タンパク質及びその対応する認識配列

核移行を促進するタンパク質	タンパク質遺伝子ID	タンパク質のGenBankアクセッション番号	タンパク質が認識する配列名	対応するDNA認識配列
心筋αアクチン	70	NP_005150.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA1アイソフォーム$_b$	1134	NP_000070.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA1アイソフォーム$_a$	1134	NP_0010346 12.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA2アイソフォーム$_1$	1135	NP_000733.2	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA2アイソフォーム$_2$	1135	NP_0012693 84.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA2アイソフォーム$_3$	1135	NP_0013346 34.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA2アイソフォーム$_3$	1135	NP_0013346 35.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA2アイソフォーム$_4$	1135	NP_0013346 36.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA2アイソフォーム$_4$	1135	NP_0013346 37.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA3アイソフォーム$_1$	1136	NP_000734.2	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA3アイソフォーム$_2$	1136	NP_0011601 66.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA4アイソフォーム$_1$	1137	NP_000735.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA4アイソフォーム$_2$	1137	NP_0012435 02.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA5アイソフォーム$_1$	1138	NP_000736.2	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA5アイソフォーム$_2$	1138	NP_0012948 74.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'

【０２６２】

【表３－２】

CHRNA5 アイソフォーム3	1138	NP_001382100.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA5 アイソフォーム4	1138	NP_001382101.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA5 アイソフォーム5	1138	NP_001382102.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA5 アイソフォーム6	1138	NP_001382103.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA5 アイソフォーム7	1138	NP_001382104.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA7 アイソフォーム1	1139	NP_000737.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNA7 アイソフォーム2	1139	NP_001177384.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNE	1145	NP_000071.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
CHRNG	1146	NP_005190.4	Eボックス	5'-CANNTG-3'
M-クレアチンキナーゼ (MCK)	1158	NP_001815.2	Eボックス	5'-CANNTG-3'
デスミン アイソフォーム2	1674	NP_001369637.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
デスミン アイソフォーム3	1674	NP_001369638.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
デスミン アイソフォーム4	1674	NP_001369639.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
デスミン アイソフォーム5	1674	NP_001369640.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
デスミン アイソフォーム6	1674	NP_001369641.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
デスミン アイソフォーム7	1674	NP_001369642.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
デスミン アイソフォーム1	1674	NP_001918.3	Eボックス	5'-CANNTG-3'

【０２６３】

【表３－３】

AP1 (Fos)	2353	NP_005243.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'(配列番号107)
GATA-6	2627	NP_005248.2	SP-Cプロモーター	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGAGGA(配列番号108)
hnRNP A1アイソフォームa	3178	NP_002127.1	ヒト染色体バンド11q13からのdsDNA配列(アクセッション番号AC000353)	5'-GGCTGGTCTTGAACTCCTG (A/G) GCTCA (A/G)GTGATCCTCC-3' (配列番号109)
hnRNP A1アイソフォームb	3178	NP_112420.1	ヒト染色体バンド11q13からのdsDNA配列(アクセッション番号AC000353)	5'-GGCTGGTCTTGAACTCCTG (A/G) GCTCA (A/G)GTGATCCTCC-3' (配列番号109)
hnRNP A1アイソフォームa	3178	NP_002127.1	テロメア(テロメアリピートに結合する)	5'-(TTAGGG)n-3'
hnRNP A1アイソフォームb	3178	NP_112420.1	テロメア(テロメアリピートに結合する)	5'-(TTAGGG)n-3'
hnRNP A1アイソフォームa	3178	NP_002127.1	ヒトチミジンキナーゼ(htk)プロモーター,細胞周期制御ユニット(CCRU)内に含まれるATTT配列モチーフ	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (配列番号110)
hnRNP A1アイソフォームb	3178	NP_112420.1	ヒトチミジンキナーゼ(htk)プロモーター,細胞周期制御ユニット(CCRU)内に含まれるATTT配列モチーフ	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (配列番号110)

【０２６４】

【表３－４】

hnRNP A1 アイソフォームa	3178	NP_002127.1	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター， 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (配列番号111)
hnRNP A1 アイソフォームb	3178	NP_112420.1	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター， 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (配列番号111)
hnRNP C アイソフォームa	3183	NP_001070910.1	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター， 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (配列番号110)
hnRNP C アイソフォームb	3183	NP_001070911.1	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター， 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (配列番号110)
hnRNP C アイソフォームb	3183	NP_004491.2	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター， 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	5'-TGCGGcCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (配列番号110)
hnRNP C アイソフォームa	3183	NP_112604.2	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター， 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (配列番号110)

【０２６５】

【表３－５】

hnRNP C アイソフォーム a	3183	NP_0010709 10.1	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター, 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (配列番号 111)
hnRNP C アイソフォーム b	3183	NP_0010709 11.1	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター, 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (配列番号 111)
hnRNP C アイソフォーム b	3183	NP_004491. 2	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター, 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (配列番号 111)
hnRNP C アイソフォーム a	3183	NP_112604. 2	ヒトチミジンキナーゼ (htk) プロモーター, 細胞周期制御ユニット (CCRU) 内に含まれる ATTT配列モチーフ	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (配列番号 111)
hnRNP K アイソフォーム c	3190	NP_0013051 15.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (配列番号 112)
hnRNP K アイソフォーム d	3190	NP_0013051 16.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (配列番号 112)
hnRNP K アイソフォーム b	3190	NP_0013051 17.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (配列番号 112)

【０２６６】

【表３－６】

hnRNP K アイソフォーム a	3190	NP_002131.2	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (配列番号112)
hnRNP K アイソフォーム b	3190	NP_112552.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (配列番号112)
hnRNP K アイソフォーム a	3190	NP_112553.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (配列番号112)
hnRNP U (別名SAF-A) アイソフォーム b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-TATATTT-3'
hnRNP U (別名SAF-A) アイソフォーム a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-TATATTT-3'
hnRNP U (別名SAF-A) アイソフォーム 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' (配列番号113)
hnRNP U (別名SAF-A) アイソフォーム 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' (配列番号113)
hnRNP U (別名SAF-A) アイソフォーム b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3' (配列番号114)
hnRNP U (別名SAF-A) アイソフォーム a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3' (配列番号114)
AP1 (Jun)	3725	NP_002219.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号107)
インポーチンβ1	3837	XP_548162.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGCAGCATAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA

【０２６７】

【表３－７】

					CTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号 115)
ミオシン軽鎖(MLC) 1/3アイソフォーム1f	4632	NP_524144.1	Eボックス		5'-CANNTG-3'
ミオシン軽鎖(MLC) 1/3アイソフォーム3f	4632	NP_524146.1	Eボックス		5'-CANNTG-3'
NFIアイソフォーム1	4782	NP_0012319 31.1	SP-Cプロモーター		5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCA CGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCG AGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGG GGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGG GGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGGG CCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGC ACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTAC GGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (配列番号 108)
NFIアイソフォーム3	4782	NP_0012319 33.1	SP-Cプロモーター		5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCA CGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCG AGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGG GGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGG GGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGGG CCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGC ACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTAC GGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (配列番号 108)
NFIアイソフォーム4	4782	NP_0012319 34.1	SP-Cプロモーター		5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCA CGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCG AGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGG

【０２６８】

【表３－８】

					GGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGG GGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGCTTCGGTTCTGGAGGG CCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGC ACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTAC GGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (配列番号 108)
NFIアイソフォーム5	4782	NP_005588.2	SP-Cプロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCA CGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCG AGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGG GGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGG GGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGCTTCGGTTCTGGAGGG CCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGC ACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTAC GGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (配列番号 108)
NFIアイソフォーム2	4782	NP_995315.1	SP-Cプロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCA CGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCG AGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGG GGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGG GGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGCTTCGGTTCTGGAGGG CCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGC ACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTAC GGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (配列番号 108)
NFKBアイソフォーム2	4790	NP_001158884.1	3NF	5'- CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTT CCAGG-3' (配列番号 116)
NFKBアイソフォーム2	4790	NP_001306155.1	3NF	5'- CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTT CCAGG-3' (配列番号 116)
NFKBアイソフォーム1	4790	NP_001369554.1	3NF	5'- CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTT CCAGG-3' (配列番号 116)

【０２６９】

【表３－９】

NFKB アイソフォーム1	4790	NP_0013695 55.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTT CCAGG-3' (配列番号 116)
NFKB アイソフォーム2	4790	NP_0013695 56.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTT CCAGG-3' (配列番号 116)
NFKB アイソフォーム3	4790	NP_0013695 57.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTT CCAGG-3' (配列番号 116)
NFKB アイソフォーム1	4790	NP_003989. 2	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTTT CCAGG-3' (配列番号 116)
NFKB アイソフォーム2	4790	NP_0011588 84.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
NFKB アイソフォーム2	4790	NP_0013061 55.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
NFKB アイソフォーム1	4790	NP_0013695 54.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
NFKB アイソフォーム1	4790	NP_0013695 55.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
NFKB アイソフォーム2	4790	NP_0013695 56.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
NFKB アイソフォーム3	4790	NP_0013695 57.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT

【０２７０】

【表３－１０】

NFKB アイソフォーム1	4790	NP_003989.2	SV40 DTS	GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号107) 5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号107)
NFKB アイソフォーム2	4790	NP_0011588 84.1	IgκκBモチーフ5'-GGGGACTTTCC-3' (配列番号117)の5つのタンデムリピートからなる断片	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (配列番号118)
NFKB アイソフォーム2	4790	NP_0013061 55.1	IgκκBモチーフ5'-GGGGACTTTCC-3' (配列番号117)の5つのタンデムリピートからなる断片	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (配列番号118)
NFKB アイソフォーム1	4790	NP_0013695 54.1	IgκκBモチーフ5'-GGGGACTTTCC-3' (配列番号117)の5つのタンデムリピートからなる断片	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (配列番号118)
NFKB アイソフォーム1	4790	NP_0013695 55.1	IgκκBモチーフ5'-GGGGACTTTCC-3' (配列番号117)の5つのタンデムリピートからなる断片	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (配列番号118)
NFKB アイソフォーム2	4790	NP_0013695 56.1	IgκκBモチーフ5'-GGGGACTTTCC-3' (配列番号117)の5つのタンデムリピートからなる断片	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (配列番号118)
NFKB アイソフォーム3	4790	NP_0013695 57.1	IgκκBモチーフ5'-GGGGACTTTCC-3' (配列番号117)の5つのタンデムリピートからなる断片	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3' (配列番号118)

【０２７１】

【表３－１１】

NFKB アイソフォーム1	4790	NP_003989.2	Igκ κBモチーフ5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTT(配列番号117)の5つのタンデムリピートからなる断片	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCC-3'(配列番号118)
NM23-H2 アイソフォーム4a	4831	NP_0010181 47.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'(配列番号107)
NM23-H2 アイソフォーム4a	4831	NP_0010181 48.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'(配列番号107)
NM23-H2 アイソフォーム4a	4831	NP_0010181 49.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'(配列番号107)
NM23-H2 アイソフォーム4b	4831	NP_0011856 11.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'(配列番号107)
NM23-H2 アイソフォーム4a	4831	NP_002503.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'(配列番号107)
Oct2 (POU2F2) アイソフォーム1	5452	NP_0011939 54.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'(配列番号107)
Oct2 (POU2F2) アイソフォーム3	5452	NP_0011939 55.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'(配列番号107)

【０２７２】

【表３－１２】

Oct2 (POU2F2) アイソフォーム4	5452	NP_0012349 23.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct2 (POU2F2) アイソフォーム5	5452	NP_0013808 63.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct2 (POU2F2) アイソフォーム6	5452	NP_0013808 64.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct2 (POU2F2) アイソフォーム7	5452	NP_0013808 65.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct2 (POU2F2) アイソフォーム8	5452	NP_0013813 05.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct2 (POU2F2) アイソフォーム9	5452	NP_0013813 06.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct2 (POU2F2) アイソフォーム10	5452	NP_0013813 07.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct2 (POU2F2) アイソフォーム2	5452	NP_002689. 1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
RanBP1	5902	XP_514990. 2	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGG GAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG

【０２７３】

【表３－１３】

				GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTG GGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGT GCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTT GCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA CTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号 115)
Oct1 (POU2F1) アイソフォーム2	5451	NP_0011857 12.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct1 (POU2F1) アイソフォーム3	5451	NP_0011857 15.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct1 (POU2F1) アイソフォーム4	5451	NP_0013527 77.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct1 (POU2F1) アイソフォーム4	5451	NP_0013527 78.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
Oct1 (POU2F1) アイソフォーム1	5451	NP_002688. 3	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号 107)
SRF アイソフォーム2	6722	NP_0012789 30.1	SMGA DTS	5'- TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCC CAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATT GCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTA AAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTC ATGCCAAAGAC-3' (配列番号 119)

【０２７４】

【表３－１４】

SRF アイソフォーム1	6722	NP_003122. 1	SMGA DTS	5'- TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCC CAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATT GCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTA AAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTC ATGCCAAAGAC-3' (配列番号119)
TEF-1 アイソフォーム2	7008	NP_0011388 70.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列 番号107)
TEF-1 アイソフォーム1	7008	NP_003207. 1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列 番号107)
AP2 (TFAP2A) アイソフォームb	7020	NP_0010274 51.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列 番号107)
AP2 (TFAP2A) アイソフォームc	7020	NP_0010358 90.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列 番号107)
AP2 (TFAP2A) アイソフォームa	7020	NP_0013589 95.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列 番号107)
AP2 (TFAP2B)	7021	NP_003212. 2	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列 番号107)
AP2 (TFAP2C)	7022	NP_003213. 1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列 番号107)

【０２７５】

【表３－１５】

トロポニンI1	7135	NP_003272.3	Eボックス	5'-CANNTG-3'
トロポニンI2-アイソフォーム1	7136	NP_001139301.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
トロポニンI2-アイソフォーム2	7136	NP_001139313.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
トロポニンI2-アイソフォーム1	7136	NP_003273.1	Eボックス	5'-CANNTG-3'
トロポニンI3	7137	NP_000354.4	Eボックス	5'-CANNTG-3'
TTF-1 アイソフォーム2	7270	NP_001192225.1	SP-Cプロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCA CGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCG AGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGG GGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGG GGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGGG CCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGC ACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTAC GGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (配列番号108)
TTF-1 アイソフォーム1	7270	NP_031370.2	SP-Cプロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCA CGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCG AGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGG GGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGG GGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGGG CCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGGC ACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTAC GGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (配列番号108)
H2B	8349	NP_003519.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (配列番号107)

【０２７６】

【表３－１６】

RanBP3 アイソフォーム4	8498	NP_001287794.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGG GAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTG GGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGT GCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTT GCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA CTCTACCCACACCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号115)
RanBP3 アイソフォームa	8498	NP_003615.2	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGG GAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTG GGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGT GCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTT GCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA CTCTACCCACACCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号115)
RanBP3 アイソフォームb	8498	NP_015559.2	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGG GAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTG GGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGT GCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTT GCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA CTCTACCCACACCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号115)

【０２７７】

【表３－１７】

RanBP3 アイソフォームd	8498	NP_015561.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGG GAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTG GGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGT GCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTT GCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA CTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号115)
RanBP3 アイソフォームX1	8498	XP_006722991.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGG GAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTG GGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGT GCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTT GCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA CTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号115)
RanBP3 アイソフォームX1	8498	XP_006722992.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGG GAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTG GGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGT GCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTT GCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA CTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号115)

【０２７８】

【表３－１８】

RanBP3 アイソフォームX1	8498	XP_011526695.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号115)
RanBP3 アイソフォームX1	8498	XP_011526669.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号115)
RanBP3 アイソフォームX1	8498	XP_011526696.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (配列番号115)

【０２７９】

【表３－１９】

RanBP3 アイソフォームX1	8498	XP_024307517.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGG GAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTG GGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTATGCAAGT GCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTT GCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA CTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3'（配列番号115）
インポーチン7	10527	NP_006382.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGG GAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTG GGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTATGCAAGT GCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTT GCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCA CTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGA AAAAACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAG CTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCT GGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3'（配列番号115）
Chx10	338917	NP_878314.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'（配列番号107）
EBNA-1	3783774	YP_401677.1	EBV oriP部位	5'- CATGCAGGAAAAGGACAAGCAGCGAAAATTCACGCCCCCT TGGGAGGTGGCGGCATATTGCAAAGGATAGCACTCCCACTC TACTACTGGGTATCATATGCTGACTGTATATGCATGAGGAT AGCATATGCTACCCGGATACAGATTAGGATAGCATATACTA CCCAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTACCCAGATATAG ATTAGGATAGCCTATGCTACCCAGATATAAATTAGGATAGC ATATACTACCCAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTACCC

【０２８０】

【表３－２０】

AGATATAGATTAGGATAGCCTATGCTACCCAGATATAGATT AGGATAGCATATGCTACCCAGATATAGATTAGGATAGCAT ATGCTATCCAGATATTTGGGTAGTATATGCTACCCAGATAT AAATTAGGATAGCATATACTACCCTAAATCTCTATTAGGATA GCATATGCTACCCGGATACAGATTAGGATAGCATATACTAC CCAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTACCCAGATATAGA TTAGGATAGCCTATGCTACCCAGATATAAATTAGGATAGCA TATACTACCCAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTACCCA GATATAGATTAGGATAGCCTATGCTACCCAGATATAGATTA GGATAGCATATGCTATCCAGATATATTTGGGTAGTATATGCTA CCCATGGCAACATTAGCCCACCGTGCTCTCAGCGACCTCGT GAATATGAGGACCAACAACCCTGTGCTTGGCGCTCAGGCG CAAGTGTGTGTAATTTGTCCTCCAGATCGCAGCAATCGCGC CCCTATCTTGGCCCGCCCACCTACTTATGCAGGTATTCCCCG GGGTGCCATTAGTGGTTTTGTGGGCAAGTGGTTTGACCGCA GTGGTTAGCGGGGTTACAATCAGCCAAGTTATTACACCCTT ATTTTACAGTCCAAAACCGCAGGGCGGCGTGTGGGGGCTG ACGCGTGCCCCCACTCCACAATTTCAAAAAAAAGAGTGGC CACTTGTCTTTGTTTATGGGCCCCATTGGCGTGGAGCCCCGT TTAATTTTCGGGGGTGTTAGAGACAACCAGTGGAGTCCGCT GCTGTCGGCGTCCACTCTCTTTCCCCTTGTTACAAATAGAGT GTAACAACATGGTTCACCTGTCTTGGTCCCTGCCTGGGACA CATCTTAATAACCCCAGTATCATATTGCACTAGGATTATGT GTTGCCCATAGCCATAAATTCGTGTGAGATGGACATCCAGT CTTTACGGCTTGTCCCCACCCCATGGATTTCTATTGTTAAAG ATATTCAGAATGTTTCATTCCTACACTAGTATTTATTGCCCA AGGGGTTTGTGAGGGTTATATTGGTGTCATAGCACAATGCC ACCACTGAACCCCCCGTCCAAATTTTATTCTGGGGGCGTCA CCTGAAACCTTGTTTTCGAGCACCTCACATACACCTTACTGT TCACAACTCAGCAGTTATTCTATTAGCTAAACGAAGGAGAA TGAAGAAGCAGGCGAAGATTCAGGAGAGTTCACTGCCCGC TCCTTGATCTTCAGCCACTGCCCTTGTGACTAAAATGGTTCA CTACCCTCGTGGAATCCTGACCCCATGTAAATAAAACCGTG ACAGCTCATGGGTGGGAGATATCGCTGTTCCTTAGGACCC TTTTACTAACCCTAATTCGATAGCATATGCTTCCCGTTGGGT AACATATGCTATTGAATTAGGGTTAGTCTGGATAGTATATA			

【０２８１】

【表３－２１】

				CTACTACCCGGGAAGCATATGCTACCCGTTTAGGGTTAACA AGGGGGCCTTATAAACACTATTGCTAATGCCCTCTTGAGGG TCCGCTTATCGGTAGCTACACAGGCCCCTCTGATTGACGTT GGTGTAGCCTCCCGTAGTCTTCCTGGGCCCCTGGGAGGTAC ATGTCCCCCAGCATTGGTGTAAGAGCTTCAGCCAAGAGTTA CACATAAAGGCAATGTTGTGTTGCAGTCCACAGACTGCAAA GTCTGCTCCAGGATGAAAGCCACTCAGTGTTGGCAAATGTG CACATCCATTTATAAGGATGTCAACTACACAGTCAGAGAACCC CTTTGTGTTTGGTCCCCCCCCGTGTCACATGTGGAACAGGG CCCAGTTGGCAAGTTGTACCAACCAACTGAAGGGATTACAT GCACTGCCCCGC-3' (配列番号 120)
			SMGA DTS	5'- TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCC CAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATT GCTAACACACCCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTA AAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTC ATGCCAAAGAC-3' (配列番号 119)
NKX3-1/3-2 アイソフォーム2	4824	NP_0012432 68.1	SMGA DTS	5'- TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCC CAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATT GCTAACACACCCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTA AAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTC ATGCCAAAGAC-3' (配列番号 119)
NKX3-1/3-2 アイソフォーム1	4824	NP_006158. 2		

【０２８２】

維持配列

本明細書に開示されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、本発明のＴＤＳＣについて、宿主細胞内の連続した一連の細胞分裂及び／又は前駆細胞分化によって、持続性の遺伝子発現を支持するか又は可能にする維持配列を含み得る。実施形態では、維持配列は、核骨格／マトリックス結合領域（Ｓ／ＭＡＲ）である。Ｓ／ＭＡＲ要素は、種間で保存される６０～５００ｂｐの範囲の多様なＡＴリッチ配列であり、中間期に核基質タンパク質にクロマチンを固定すると考えられる（Ｂｏｄｅ　ｅｔ　ａｌ．２００３．Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ　Ｒｅｓ　１１，４３５－４４５。Ｓ／ＭＡＲは、長期の導入遺伝子発

現及び染色体外維持を促進するために、本明細書に記載されるＴＤＳＣに組み込まれ得る。一実施形態において、維持配列は、ヒトインターフェロン－β　ＭＡＲ（５’ｔａｔａａｔｔｃａｃｔｇｇａａｔｔｔｔｔｔｔｇｔｇｔｇｔａｔｇｇｔａｔｇａｃａｔａｔｇｇｇｔｔｃｃｃｔｔｔｔａｔｔｔｔｔｔａｃａｔａｔａａａｔａｔａｔｔｔｃｃｃｔｇｔｔｔｔｔｃｔａａａａａａｇａａａａａｇａｔｃａｔｃａｔｔｔｔｃｃｃａｔｔｇｔａａａａｔｇｃｃａｔａｔｔｔｔｔｔｔｃａｔａｇｇｔｃａｃｔｔａｃａｔａ－３’（配列番号３９））、又はそれと少なくとも８０％、９０％、９５％、又は９８％の同一性を有する機能性配列である。実施形態において、本明細書に記載される構築物に有用なＳ／ＭＡＲは、ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｎｅｔ．ｉｎ／ＭＡＲｏｍｅのＭＡＲｏｍｅを検索することにより見つけ出すことができ、Ｎａｒｗａｄｅ　ｅｔ　ａｌ．２０１９．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．Ｖｏｌｕｍｅ　４７，Ｉｓｓｕｅ　１４：７２４７－７２６１によってもまた記載されている。

【０２８３】

実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞内で複製することが可能である。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、少なくとも１回の細胞分裂によって、宿主細胞、組織又は対象内で維持される。例えば、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、１０、１５、２０、４０、５０回又はそれ以上の細胞分裂によって、宿主細胞、組織又は対象内で維持される。インビトロ細胞分裂は、フローサイトメトリー又は顕微鏡法によって追跡され得る。インビボ細胞分裂は、生体顕微鏡検査によって追跡され得る。

【０２８４】

他の要素

本明細書に開示されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、標的細胞内のその輸送、局所化、転写、翻訳及び／若しくは発現を可能にする、又は非標的細胞内のその分解又は発現の抑制を促進する方式で、エフェクター配列、例えば、エフェクターをコードする配列に作動可能に連結される他の制御要素も含み得る。本明細書で使用されるとき、「作動可能に連結される」配列は、エフェクターをコードする配列と隣接する発現制御配列及びｔｒａｎｓで若しくはエフェクターをコードする配列を制御する距離で作用する発現制御配列の両方を含む。宿主細胞内の遺伝子発現に必要な調節配列の正確な性質は、種、組織又は細胞型の間で変化し得るが、一般に、必要に応じて、ＴＡＴＡボックス、キャッピング配列、ＣＡＡＴ配列、エンハンサー要素などの、転写及び翻訳の開始にそれぞれ関与する５’非転写及び５’非翻訳配列を含み得る。調節配列は、必要に応じて、エンハンサー配列又は上流の活性化因子配列も含み得る。本明細書に記載される構築物は、任意に、５’リーダー又はシグナル配列を含み得る。

【０２８５】

化学修飾ヌクレオチド

本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、（例えば、図１Ａ～２に示すような）核酸塩基、糖、及び／又はリン酸骨格の化学修飾を有し得る。理論に制約されるのを望むものではないが、このような修飾は、分解から（例えば、エキソヌクレアーゼから）又は宿主組織若しくは対象の免疫系からＤＮＡを保護するのに有用であり得る。一般に、化学的に修飾された修飾ヌクレオチドは、非修飾ヌクレオチドと同じ塩基対合特異性を有し、すなわち、修飾アデニン「Ａ」は、チミン「Ｔ」と塩基対合し得る。ピリミジン核酸塩基の１つ以上の原子が、任意に置換されるアミノ、任意に置換されるチオール、任意に置換されるアルキル（例えば、メチル若しくはエチル）、又はハロ（例えば、クロロ若しくはフルオロ）で置き換え又は置換され得る。特定の実施形態では、化学修飾（例えば、１つ以上の修飾）は、糖及びヌクレオシド間結合のそれぞれに存在する。

【０２８６】

一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、少なくとも１つの化学修飾を含む。好適な修飾については、Ｓｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．２０１９．ＤＮＡｍｏｄ：ｔｈｅ　ＤＮＡ　ｍｏｄ

ｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｄａｔａｂａｓｅ．Ｊ Ｃｈｅｍｉｎｆｏｒｍ １１，３０によって記載されている。ＤＮＡｍｏｄは、化学修飾ヌクレオチドを目録化して、その特性に関して学習するための単一の情報源を提供するオープンソースデータベース（ｈｔｔｐｓ：／／ｄｎａｍｏｄ．ｈｏｆｆｍａｎｌａｂ．ｏｒｇ）である。ＤＮＡｍｏｄは、これらの修飾について閲覧及び検索を容易に行うためのウェブインターフェースを提供する。このデータベースでは、全てのキュレートされた化学修飾ＤＮＡ塩基の化学的特性及び構造、並びに化学的実体候補のはるかに大規模なリストについてアノテーションが付けられる。ＤＮＡｍｏｄには、利用可能なシーケンシング方法、自然界でのその存在の説明に関して手動アノテーションが含まれ、既存の及び提案される命名法が提供される。本明細書に記載される方法において有用なＤＮＡに対する化学修飾の例としては、例えば、Ｎ６－メチルアデノシン（ｍ６Ａ、６ｍＡ）；５－ホルミルシトシン（５－ホルミル－２’－デオキシシトシン、５ｆＣ、ｆ５Ｃ）；５－カルボキシルシトシン（５－カルボキシル－２’－デオキシシトシン、５－カルボキシシトシン、ｃａ５Ｃ、５ｃａＣ）；５－ヒドロキシメチルシトシン（５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシトシン、５ｈｍＣ、ｈｍ５Ｃ）；５－メチルデオキシシトシン（５－メチルシトシン；５－メチル－２’－デオキシシトシン；ｍ５ｄＣ；５ｍＣ、ｍ５Ｃ）；５’－メチルシトシン；３－メチルシトシン（ｍ３Ｃ）；２’－フルオロ－２’デオキシヌクレオシド；５－グルコシルメチルシトシン；５－メチルピリミジン；８－オキソグアニン（８－ｏｘｏＧ）；ホスホロチオエート；Ｓ及びＲホスホロチオエート（ｐｈｓｏｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ）結合；メチルチミン；Ｎ３’－Ｐ５’ホスホロアミデート（ＮＰ）；シクロヘキサン核酸（ＣｅＮＡ）；トリシクロ－ＤＮＡ（ｔｃＤＮＡ）が挙げられる。例えば、Ｐｕ ｅｔ ａｌ．２０２０．Ａｎ ｉｎ－ｖｉｔｒｏ ＤＮＡ ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ．Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１１３：４５２－４６３；Ｚｈｅｎｇ ＆ Ｓｈｅｎｇ．２０２１．Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ Ｎ４－ｍｅｔｈｙｌｃｙｔｉｄｉｎｅ（ｍ４Ｃ）ａｎｄ Ｎ４，Ｎ４－ｄｉｍｅｔｈｙｌｃｙｔｉｄｉｎｅ（ｍ４２Ｃ）ｍｏｄｉｆｉｅｄ ＲＮＡ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，１，ｅ２４８；Ｏｈｋｕｂｏ ｅｔ ａｌ．２０２１．Ｃｈｅｍｉｃａｌ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ５’－ａｍｉｎｏ－５’－ｄｅｏｘｙ－５’－ｈｙｄｒｏｘｙｍｅｔｈｙｌｔｈｙｍｉｄｉｎｅ ｒｅｓｉｄｕｅｓ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，１，ｅ７０；Ｂａｏ ＆ Ｘｕ．２０２１．Ｏｂｓｅｒｖａｔｉｏｎ ｏｆ Ｚ－ＤＮＡ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｖｉａ ｔｈｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ＤＮＡ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ８－ｔｒｉｆｌｕｏｒｏｍｅｔｈｙｌ－２－ｄｅｏｘｙｇｕａｎｏｓｉｎｅ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，１，ｅ２８；Ｓｋａｋｕｊｅｔ ａｌ．２０２０．Ａｕｔｏｍａｔｅｄ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｇｕａｎｉｄｉｎｅ－ｂａｃｋｂｏｎｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，８１，ｅ１１０を参照のこと。

【０２８７】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＤＮＡ末端形態（例えば、エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態）は、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、Ｓ及びＲホスホロチオエート修飾ヌクレオチド結合を含み得る。一実施形態では、ホスホロチオエート結合は、Ｉｗａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ，２０１７，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ３５：８４５－８５１に従って作製される。簡潔に述べると、ヌクレオシド３’－オキサアザホスホリジン誘導体のモノマーは、反復キャッピング及び硫化とともに立体制御オリゴヌクレオチド合成を起こして、立体制御ホスホロチオエート結合を形成する。最終的な試料が、逆相高速液体クロマトグラフィー（ＲＰ－ＨＰＬＣ）及び超高速液体クロマトグラフィー質量分析法（ＵＰＬＣ／ＭＳ

）によって分析されて、修飾の立体化学を決定する。ホスホロチオエート結合を含有する核酸はまた市販されている。

【０２８８】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、例えば、Ｓｅｒｇｕｅｅｖ ａｎｄ Ｓｈａｗ，１９９８，Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ，Ｖｏｌｕｍｅ １２０，Ｉｓｓｕｅ ３７：９４１７－９４２７における方法に従って、ボラノリン酸修飾ヌクレオチドを含み得る。簡潔に述べると、Ｈ－ホスホネート鎖伸長の後、リン酸骨格中の非架橋酸素をボラノ基に置換するホウ素化が続く。最終的な試料が、ＲＰ－ＨＰＬＣによって精製及び分析されて、修飾の立体化学を決定する。ボラノリン酸修飾ヌクレオチドはまた市販されている。

【０２８９】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、例えば、Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ，２００２，Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ，Ｖｏｌｕｍｅ ２２，Ｉｓｓｕｅ ３：７０４－７２３における方法に従って作製される、５－メチルシトシン修飾ヌクレオチドを含み得る。簡潔に述べると、シトシン又はシトシンを含有する配列が、非標識Ｓ－アデノシルメチオニン（ＡｄｏＭｅｔ）を用いて、野生型Ｄｎｍｔ３ａ（ＧＳＴ－３ａ）タンパク質のグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ融合とともにインキュベートされる。ヌクレオチドは、ＨＰＬＣによって精製及び分析されて、ヌクレオチドが適切な位置でメチル化されることを決定し得る。５－メチルシトシン修飾ヌクレオチドはまた市販されている。

【０２９０】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチドを含み得る。一実施形態では、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチドが、Ｊｏｎｅｓ ａｎｄ Ｒｏｂｉｎｓ，１９６３，Ｐｕｒｉｎｅ ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ．ＩＩＩ．Ｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ ｓｔｕｄｉｅｓ ｏｆ ｃｅｒｔａｉｎ ｎａｔｕｒａｌｌｙ ｏｃｃｕｒｒｉｎｇ ｐｕｒｉｎｅ ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ，Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ，Ｖｏｌｕｍｅ ８５：１９３における方法に従って作製される。簡潔に述べると、ジメチルスルホキシド中の２’－デオキシグアノシンが、ヨウ化メチルで処理される。ヌクレオチドは、ＨＰＬＣによって精製及び分析されて、ヌクレオチドが適切な位置でメチル化されることを決定する。別の実施形態では、７－メチルグアニン修飾ヌクレオチドは、Ｈｅｎｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ，１９７０，Ｖｏｌｕｍｅ ９，Ｉｓｓｕｅ ２１：４１４１：４１５３、及びＫｏｒｅ ａｎｄ Ｐａｒｍａｒ，２００６，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ２５，Ｉｓｓｕｅ ３：３３７－３４０に記載される方法に従って作製される。簡潔に述べると、グアノシン５’－二リン酸の代わりに、水中のグアニン５’－二リン酸が、硫酸ジメチルに付加されて、７－メチルＧＤＰが得られる。ヌクレオチドは、ＨＰＬＣによって精製及び分析されて、ヌクレオチドが適切な位置でメチル化されることを決定する。７－メチルグアニン修飾ヌクレオチドはまた市販されている。

【０２９１】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、１つ以上のＣｐＧ又はＧｐＣジヌクレオチドにおけるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＡｌｕＩメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＢａｍＨＩメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＣｐＧメチルトランスフェラーゼ（Ｍ．Ｓｓｓｌ）によって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ｄａｍメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＥｃｏＧＩＩメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＥｃｏＲＩメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の

実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＧｐＣメチルトランスフェラーゼ（Ｍ．ＣｖｉＰＩ）によって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＨａｅＩＩＩメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＨｈａＩメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＨｐａＩＩメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＭｓｐＩメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＴａｑＩメチルトランスフェラーゼによって導入されるメチル化を含む。一部の実施形態において、本明細書に記載される方法は、dsDNAをＡｌｕＩメチルトランスフェラーゼ、ＢａｍＨＩメチルトランスフェラーゼ、Ｍ．Ｓｓｓｌ、ｄａｍメチルトランスフェラーゼ、ＥｃｏＧＩＩメチルトランスフェラーゼ、ＥｃｏＲＩメチルトランスフェラーゼ、Ｍ．ＣｖｉＰＩ、ＨａｅＩＩＩメチルトランスフェラーゼ、ＨｈａＩメチルトランスフェラーゼ、ＨｐａＩＩメチルトランスフェラーゼ、ＭｓｐＩメチルトランスフェラーゼ、又はＴａｑＩメチルトランスフェラーゼと接触させることを含む。

【０２９２】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、カルボキシル修飾又はホルミル修飾を含む。

【０２９３】

実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はＴＤＳＣの一方の鎖（例えば、センス鎖又はアンチセンス鎖）は、１～１００％の化学修飾ヌクレオチド、１％～９０％の化学修飾ヌクレオチド、１％～８０％の化学修飾ヌクレオチド、１％～７０％の化学修飾ヌクレオチド、１％～６０％の化学修飾ヌクレオチド、１％～５０％の化学修飾ヌクレオチド、１％～４０％の化学修飾ヌクレオチド、１％～３０％の化学修飾ヌクレオチド、１％～２０％の化学修飾ヌクレオチド、１％～１５％の化学修飾ヌクレオチド、１％～１０％の化学修飾ヌクレオチド、２０％～９０％の化学修飾ヌクレオチド、２０％～８０％の化学修飾ヌクレオチドを含む。実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はＴＤＳＣの一方の鎖（例えば、センス鎖又はアンチセンス鎖）は、少なくとも１％の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも５％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも１０％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも１５％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも２０％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも２５％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも３０％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも４０％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも５０％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも６０％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも７０％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも８０％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも８５％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも９０％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも９２％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも９５％の化学修飾ヌクレオチド；少なくとも９７％の化学修飾ヌクレオチドを含む。実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はＴＤＳＣの一方の鎖（例えば、センス鎖又はアンチセンス鎖）は、０％～１００％の各異なるヌクレオチドに化学修飾ヌクレオチドを含み、例えば、各構築物につき０％～１００％の化学修飾Ｔヌクレオチド、０％～１００％の化学修飾Ａヌクレオチド、０％～１００％の化学修飾Ｃヌクレオチド、及び０％～１００％の化学修飾Ｇヌクレオチドを含む。実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はＴＤＳＣの一方の鎖（例えば、センス鎖又はアンチセンス鎖）は、０～１００％、１０％～１００％、２０％～１００％、３０％～１００％、４０％～１００％、５０％～１００％、６０％～１００％、１０％～５０％の各異なるヌクレオチドに化学修飾ヌクレオチドを含み、例えば、０～１００％、１０％～１００％、２０％～１００％、３０％～１００％、４０％～１００％、５０％～１００％、６０％～１００％、１０％～５０％の化学修飾Ｔヌクレオチド；０～１００％、１０％～１００％、２０％～１００％、３０％～１００％、４０％～１００％、５０％～１００％、６０％～１００％、１０％～５０％の化学修飾Ａヌクレオチド；０～１００％

、１０％～１００％、２０％～１００％、３０％～１００％、４０％～１００％、５０％～１００％、６０％～１００％、１０％～５０％の化学修飾Ｃヌクレオチド；又は０～１００％、１０％～１００％、２０％～１００％、３０％～１００％、４０％～１００％、５０％～１００％、６０％～１００％、１０％～５０％の化学修飾Ｇヌクレオチドを含む。例えば、ＴＤＳＣは、１００％の化学修飾Ｔヌクレオチド、５０％の化学修飾Ａヌクレオチド、０％の化学修飾Ｃヌクレオチド、及び２５％の化学修飾Ｇヌクレオチドを含んでいる可能性がある。

【０２９４】

実施形態において、化学修飾ヌクレオチド、例えば、本明細書に記載される修飾は、本明細書に記載されるＴＤＳＣにおいて、配列全体にわたって；配列のエレメント、例えば、本明細書に記載されるエレメントの範囲内に；５’末端又は３’末端に；及び／又は５’末端又は３’末端の最後の１０、８、６、５、４、３、又は２ヌクレオチドの間に導入することができる。

【０２９５】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、一方の鎖にのみ化学修飾ヌクレオチドを含む（例えば、図１Ａに示されるとおり）。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、アンチセンス鎖に化学修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、センス鎖に化学修飾ヌクレオチドを含む。

【０２９６】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、両方の鎖に化学修飾ヌクレオチドを含む（例えば、図１Ａ及び図２に示されるとおり）。特定の実施形態において、両方の鎖が同じ位置に化学修飾を含む（例えば、一方の鎖の化学修飾ヌクレオチドが逆鎖の化学修飾ヌクレオチドと塩基対合している、及び／又は一方の鎖の非化学修飾ヌクレオチドが逆鎖の非化学修飾ヌクレオチドと塩基対合している）。実施形態において、両方の鎖全体が化学修飾ヌクレオチドで構成される。他の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣの２本の鎖は、異なる化学修飾パターンを含む（例えば、一方の鎖の１つ以上の化学修飾ヌクレオチドが他方の鎖の非化学修飾ヌクレオチドと塩基対合している）。実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、両方の鎖が化学修飾されている二本鎖領域を１つ以上含み、及び／又はいずれの鎖も化学修飾されていない二本鎖領域を１つ以上含む。実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、一方の鎖が化学修飾されていて、他方が化学修飾されていない二本鎖領域を１つ以上含む。

【０２９７】

実施形態において、本明細書に記載されるとおりのＴＤＳＣは、各々が１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを（例えば、ＤＮＡ末端形態の一方又は両方の鎖に）含む１つ以上のＤＮＡ末端形態（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態、例えば、共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態又は非共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態）を含む。実施形態において、ＴＤＳＣは、例えば、本明細書に（例えば、図２に）記載されるとおりの、化学修飾ヌクレオチドを含む非共有結合閉鎖型エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態が隣接する二本鎖領域を含む。

【０２９８】

実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、二本鎖構造を形成するＴＤＳＣの一部の能力を妨げる１つ以上の化学修飾を有し、例えば、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、分子内相補性を有する領域中に存在するヌクレオチド上に１つ以上の化学修飾を有する。実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、ＴＤＳＣの非修飾配列と比べて分子内相補性の領域の塩基対合を妨げる１つ以上の化学修飾を有する。一部の実施形態において、本明細書で使用される化学修飾ヌクレオチドは、非修飾ヌクレオチドと塩基対合する非修飾ヌクレオチドの傾向と比較して、化学修飾ヌクレオチドと塩基対合する低下した傾向を有する。一部の実施形態において、本明細書で使用される化学修飾ヌクレオチドは、

修飾ヌクレオチドと比較して、非修飾ヌクレオチドと塩基対合する増加した傾向を有する。

【０２９９】

他の修飾も考えられる。例えば、本明細書に記載される線状ＤＮＡの末端は、例えば、エキソヌクレアーゼからそれらを保護するために化学修飾され得る。例えば、１つ以上のジデオキシヌクレオチド残基が、線状分子の３’末端に付加され得、及び／又は自己相補的オリゴヌクレオチドが、一方又は両方の末端にライゲートされる。例えば、Ｃｈａｎｇ，ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｉｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：４９５９－４９６３；Ｎｅｈｌｓ，ｅｔ ａｔ（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７２：８８６－８８９を参照されたい。

【０３００】

一部の実施形態において、本明細書に記載される化学修飾ＴＤＳＣは、同じ配列の非修飾ＴＤＳＣと比較して、宿主組織又は対象におけるＤＮＡセンサーによって低下した認識、例えば、同じ配列の非修飾ＴＤＳＣと比較して、宿主組織又は対象におけるＤＮＡセンサーによって、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％又はそれ以上低下した認識を示す。一部の実施形態において、本明細書に記載される化学修飾ＴＤＳＣは、同じ配列の非修飾ＴＤＳＣと比較して、ＤＮＡヌクレアーゼによって低下した分解、例えば、非修飾ＴＤＳＣと比較して、宿主組織又は対象におけるＤＮＡヌクレアーゼによって、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％又はそれ以上低下した分解を示す。一部の実施形態において、本明細書に記載される化学修飾ＴＤＳＣは、同じ配列の非修飾ＴＤＳＣと比較して、標的／宿主組織又は対象における自然免疫系の低下した活性化、例えば、同じ配列の非修飾ＴＤＳＣと比較して、標的／宿主組織又は対象における自然免疫系の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％又はそれ以上低下した活性化を示す。

【０３０１】

一部の実施形態において、本明細書に記載される化学修飾ヌクレオチドを含むＴＤＳＣは、化学修飾ヌクレオチドを含まない同じ配列のｄｓＤＮＡ（未修飾ｄｓＤＮＡ）と比較して、標的／宿主組織又は対象において以下の特性のいずれか：標的細胞のゲノムにおける外因性構築物の組み込みの増加；複製を通じた標的細胞における保持率の増加；二次又は三次構造形成の減少；自然免疫センサーとの相互作用の減少；ヌクレアーゼとの相互作用の減少；安定性の亢進；長寿命の亢進；毒性の減少；送達の亢進；発現の増加；膜を越える輸送の増加；核ＤＮＡ結合タンパク質、転写因子、シャペロン、ＤＮＡポリメラーゼなどのＤＮＡ結合部分への結合の増加を呈する。実施形態において、上記に列挙される特性のいずれも、同じ配列の未修飾ｄｓＤＮＡと比較して、標的／宿主組織又は対象において少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％又はそれ以上調節される。

【０３０２】

ＤＮＡ構築物の構造

一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、長さが少なくとも約２０ヌクレオチド、少なくとも約３０ヌクレオチド、少なくとも約４０ヌクレオチド、少なくとも約５０ヌクレオチド、少なくとも約７５ヌクレオチド、少なくとも約１００ヌクレオチド、少なくとも約２００ヌクレオチド、少なくとも約３００ヌクレオチド、少なくとも約５００ヌクレオチド、少なくとも約１０００ヌクレオチド、少なくとも約２０００ヌクレオチド、少なくとも約３０００ヌクレオチド、少なくとも約４０００ヌクレオチド、少なくとも約５０００ヌクレオチド、少なくとも約６０００ヌクレオチド、少なくとも約７０００ヌクレオチド、少なくとも約８０００ヌクレオチド、少なくとも約９０００ヌクレオチド、少なくとも約１０，０００ヌクレオチド、少なくとも約２０，０００ヌクレオチド、少なくとも約３０，０００ヌクレオチド、少なくとも約４０，０００ヌクレオチド、又は少なくとも約５０，０００ヌクレオチドである。

一部の実施形態において、本明細書に開示されるｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣ又は核酸は、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～７５、７５～１００、１００～２００、２００～３００、３００～５００、５００～１０００、１０００～２０００、２０００～３０００、３０００～４０００、４０００～５０００、５０００～６０００、６０００～７０００、７０００～８０００、８０００～９０００、９０００～１０，０００、１０，０００～２０，０００、２０，０００～３０，０００、３０，０００～４０，０００、又は４０，０００～５０，０００ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、本明細書に開示されるＴＤＳＣのサイズは、有用なポリペプチド又はＲＮＡをコードするのに十分な長さである。

【０３０３】

一部の実施形態において、ｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣ又は核酸は、エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態（例えば、本明細書に記載されるとおりの）を含む。一部の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は、少なくとも２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００ヌクレオチド長未満である。一部の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は、２～５、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４０～４５、４５～５０、５０～５５、５５～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、又は９０～１００ヌクレオチド長である。

【０３０４】

一部の実施形態において、ｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣ又は核酸は、エフェクター（例えば、本明細書に記載されるとおりの、例えば、ポリペプチド又はＲＮＡ）をコードする二本鎖領域を、例えば、２つのエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の間に位置して含む。一部の実施形態において、二本鎖領域は、少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１０，０００、２０，０００、３０，０００、４０，０００、又は５０，０００ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、二本鎖領域形態は、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１０，０００、２０，０００、３０，０００、４０，０００、又は５０，０００ヌクレオチド長未満である。一部の実施形態において、二本鎖領域は、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４０～４５、４５～５０、５０～５５、５５～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～２０００、２０００～３０００、３０００～４０００、４０００～５０００、５０００～６０００、６０００～７０００、７０００～８０００、８０００～９０００、９０００～１０，０００、１０，０００～２０，０００、２０，０００～３０，０００、３０，０００～４０，０００、又は４０，０００～５０，０００ヌクレオチド長である。

【０３０５】

本明細書に記載されるＴＤＳＣは、閾値レベル未満の一本鎖構造を有し得る。一実施形態において、ＴＤＳＣは、１００、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０又は１０塩基より長い一本鎖領域を２０、１８、１６、１４、１２、１０、８、７、５、４、３、２、又は１個より多く含むことはなく、例えば、１００、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０又は１０塩基より長い一本鎖領域は含まない。一実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣによって形成される二本鎖領域は、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によって記載されるように決定される。一実施形態では、Ｋｉｎｅｆｏｌｄウェブサイト（ｈｔｔｐ：／／ｋｉｎｅｆｏｌｄ．ｃｕｒｉｅ．ｆｒ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｆｏｒｍ．ｐｌ）は、以下のパラメーターを用いて、本明細書に記載される構築物の二本鎖領域を予測するのに使用される：

・折り畳む配列：「ＤＮＡ配列」を入力及び選択する
・確率的シミュレーション：共転写性折り畳み、３ミリ秒
・シミュレーションされる分子時間：デフォルト
・シュードノット：許容されない
・交絡：交差なし
・乱数シード：１１４５３

【０３０６】

生成

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣ又は核酸は、本明細書に記載される所望のエレメントを含むようにアセンブルしたプラスミドから生成される。プラスミド鋳型は、例えば、複数のＤＮＡ断片をワンポットアセンブリ手法を用いてレシピエントベクターに決められた線状の並び順でアセンブルするためのゴールデンゲートクローニング法を用いてアセンブルすることができる。ゴールデンゲートクローニング法については、Ｍａｒｉｌｌｏｎｎｅｔ ＆ Ｇｒｕｅｔｚｎｅｒ，２０２０，Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ＤＮＡ ａｓｓｅｍｂｌｙ ｕｓｉｎｇ ｇｏｌｄｅｎ ｇａｔｅ ｃｌｏｎｉｎｇ ａｎｄ ｔｈｅ ｈｉｅｒａｒｃｈｉｃａｌ ｍｏｄｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ ｐｉｐｅｌｉｎｅ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１３０：ｅ１１５に記載されている。一部の実施形態において、プラスミド鋳型は、例えば、ヌクレアーゼ（例えば、制限エンドヌクレアーゼ）での消化によるか、又はプラスミド鋳型からの線状核酸配列のＰＣＲ増幅によって（例えば、実施例２に記載されるとおり）線状化される。特定の実施形態において、プラスミド鋳型を線状化すると、本明細書に記載されるとおりのプロトＴＤＳＣ（例えば、一方又は両方の末端にエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態を含まないｄｓＤＮＡを含む線状核酸）が生成される。

【０３０７】

一部の実施形態において、一方の鎖に化学修飾を含むＴＤＳＣ又はプロトＴＤＳＣは、１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含むｄＮＴＰ混合物及びＴＤＳＣ又はプロトＴＤＳＣ配列の一方の鎖を増幅することのできるプライマーを使用した一方の鎖の（例えば、プラスミド鋳型からの）増幅により生成される（例えば、実施例３に記載されるとおり）。特定の実施形態において、逆鎖（例えば、本明細書に、例えば、図１Ａ～図２に記載されるとおりの、例えば、未修飾の鎖又は異なる化学修飾を有する鎖）は、別個の増幅反応で、例えば、未修飾ヌクレオチド又は異なる一組の化学修飾ヌクレオチドを含むｄＮＴＰ混合物、及びＴＤＳＣ又はプロトＴＤＳＣ配列の逆鎖を増幅することのできるプライマーを使用して生成される（例えば、実施例３に記載されるとおり）。

【０３０８】

一部の実施形態において、両鎖に１つ又は複数の同じ化学修飾を含むＴＤＳＣ又はプロトＴＤＳＣは、１つ以上の化学修飾ヌクレオチドを含むｄＮＴＰ混合物及びＴＤＳＣ又はプロトＴＤＳＣ配列の両方の鎖を増幅することのできるプライマーを使用したＴＤＳＣ鎖又はプロトＴＤＳＣ鎖の（例えば、プラスミド鋳型からの）増幅によって生成される（例えば、実施例４に記載されるとおり）。

【０３０９】

一部の実施形態において、プロトＴＤＳＣの一方又は両方の末端に、エキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態（例えば、本明細書に記載されるとおりの）が導入される（例えば、結び付けられる）。特定の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は、プロトＴＤＳＣの末

端にライゲーションによって結び付けられる（例えば、実施例５又は６に記載されるとおり）。実施形態において、ＤＮＡ末端形態（例えば、共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態）をプロトＴＤＳＣに結び付けると（例えば、ライゲートすると）、最終的なＴＤＳＣが生成される。特定の実施形態において、結び付けられたＤＮＡ末端形態のエキソヌクレアーゼ耐性が、例えば、実施例１０及び１１に記載されるとおり、例えば、ＴＤＳＣをエキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼＩＩＩ、ＵＳＥＲ酵素、及び／又はマングビーンヌクレアーゼ）の存在下でインキュベートすることにより確認される。実施形態において、結び付けられたＤＮＡ末端形態のエキソヌクレアーゼ耐性は、例えば、ＴＤＳＣをエキソヌクレアーゼＩＩＩの存在下でインキュベートすることにより確認される。実施形態において、ＤＮＡ末端形態は、平滑末端、粘着末端、又はＹ型アダプター（例えば、本明細書に記載されるとおりの）を含み、結び付けられたＤＮＡ末端形態のエキソヌクレアーゼ耐性は、ＴＤＳＣをエキソヌクレアーゼＩＩＩ及び（例えば、その後に、その前に、又はそれと同時に）マングビーンヌクレアーゼ及び／又はＵＳＥＲ酵素の存在下でインキュベートすることにより確認される。

【０３１０】

特定の実施形態において、ＤＮＡ末端形態は、新生形態でプロトＴＤＳＣの末端に結び付けられる（例えば、実施例５及び図３～図４に記載されるとおり、例えば、非共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態がヘアピンとしてプロトＴＤＳＣに結び付けられてもよい）。続く工程で、新生形態のＤＮＡ末端形態が更に修飾されて（例えば、切断されて）、最終的なＤＮＡ末端形態が生成されることになり得る。例えば、非共有結合閉鎖型ＤＮＡ末端形態は、例えばヌクレアーゼによる新生形態の切断により生成されてもよい。実施形態において、新生形態は、１つ以上のウラシルヌクレオチドを含む。実施形態において、新生形態は、１つ以上のウラシルヌクレオチドでＵＳＥＲ酵素を使用して切断される。一部の実施形態において、オーバーハング又は粘着末端を含む新生形態（例えば、図３～図４に示されるとおり、ＵＳＥＲ酵素切断によって生成される新生形態）は、一本鎖特異的ヌクレアーゼ、例えば、マングビーンヌクレアーゼでの消化により、平滑末端に変換することができる（例えば、実施例５に記載されるとおり）。一部の実施形態において、切断可能な部分（例えば、ウラシルヌクレオチド）をその一本鎖ループ領域に含むヘアピンを含む新生形態は、例えば、実施例７に記載されるとおり、切断可能な部分の（例えば、ＵＳＥＲ酵素による）切断によりＹ型アダプターに変換される。Ｔ

【０３１１】

ＴＤＳＣは、エンドトキシン、モノヌクレオチド、化学修飾モノヌクレオチド、一本鎖ＤＮＡ、環状ＤＮＡ、タンパク質（例えば、酵素、例えば、リガーゼ、制限酵素）、ＤＮＡ断片又はトランケーションからなる群から選択される不純物又は副産物から濃縮又は精製されてもよい。一部の実施形態において、精製されたＴＤＳＣは、プロセス副産物及び不純物、例えば、本明細書に記載されるプロセス副産物又は不純物を実質的に含まない。

【０３１２】

一部の実施形態において、ＴＤＳＣは、例えば、実施例８に記載されるとおり、脂質ベースの担体、例えば、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と共に製剤化される。

【０３１３】

ＴＤＳＣをシーケンシングすることにより、所望の設計された配列を確認し得る。実施形態において、ＴＤＳＣの他の構造解析（例えば、制限酵素分析）を実施してその配列を確認又は検証してもよい。

【０３１４】

医薬組成物

本開示は、１つ以上の薬学的に許容される賦形剤及び／又は担体と組み合わせて、ＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸及び関連する組成物を含む。

【０３１５】

医薬組成物は、任意に、１つ以上のさらなる活性物質、例えば、治療的に及び／又は予防的に活性な物質を含み得る。本発明の医薬組成物は、一般に滅菌であり、及び／又は発

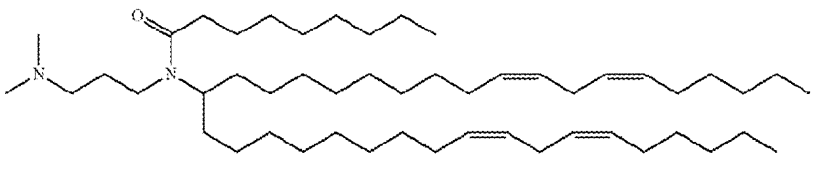
熱物質を含まない。
【０３１６】
本明細書に記載されるＴＤＳＣは、担体なしで製剤化され得、例えば、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、「裸で」宿主細胞、組織又は対象に投与され得る。裸の製剤は、医薬賦形剤又は希釈剤を含み得るが、担体を欠いている。
【０３１７】
薬学的に許容される賦形剤又は希釈剤は、米国食品医薬品局（Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）（ＦＤＡ）によって承認され、参照により本明細書に組み込まれる不活性成分データベースに列挙される有効成分のいずれか１つなどの、本明細書に記載される組成物のためのビヒクル又は媒体として働く不活性物質を含み得る。薬学的に許容される賦形剤又は希釈剤の非限定的な例としては、溶媒、水性溶媒、非水性溶媒、等張化剤、分散媒、抗凍結剤、希釈剤、懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤、乳化剤、保存料、ヒアルロニダーゼ、分散剤、保存料、滑沢剤、造粒剤、崩壊剤、結合剤、酸化防止剤、緩衝剤（例えば、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ））、潤滑剤、油、及びそれらの混合物が挙げられる。
【０３１８】
医薬品の製剤化及び／又は製造における一般的な考慮事項が、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２１ｓｔ ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，２００５（参照により本明細書に組み込まれる）に見出され得る。
【０３１９】
担体
本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸はまた、担体とともに製剤化され、又は含まれ得る。担体及び医薬品の送達の一般的な考慮事項が、例えば、Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ：Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｖａｃｃｉｎｅｓ（Ｌｅｎｅ Ｊｏｒｇｅｎｓｅｎ ａｎｄ Ｈａｎｎｅ Ｍｏｒｃｋ Ｎｉｅｌｓｏｎ，Ｅｄｓ．）Ｗｉｌｅｙ；１ｓｔ ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ２１，２００９）；及びＶａｒｇａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．２０２１．Ｎａｔ Ｂｉｏｍｅｄ Ｅｎｇ ５，９５１－９６７に見出され得る。
【０３２０】
担体の非限定的な例としては、炭水化物担体（例えば、無水物修飾フィトグリコーゲン又はグリコーゲンタイプ材料、ＧａｌＮＡｃ）、ナノ粒子（例えば、ＴＤＳＣ、金ナノ粒子、シリカナノ粒子を封入するか又はそれらに共有結合的に連結されるナノ粒子）、脂質粒子（例えば、リポソーム、脂質ナノ粒子）、カチオン性担体（例えば、カチオン性リポポリマー又はトランスフェクション試薬）、フソソーム、非有核細胞（例えば、エクスビボで分化した網状赤血球）、有核細胞、エキソソーム、タンパク質担体（例えば、ＴＤＳＣに共有結合的に連結されるタンパク質）、ペプチド（例えば、細胞透過性ペプチド）、材料（例えば、酸化グラフェン）、単一の純粋な脂質（例えば、コレステロール）、ＤＮＡオリガミ（例えば、ＤＮＡテトラヘドロン）が挙げられる。
【０３２１】
一実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣ組成物、構築物及びシステムは、リポソーム又は他の同様のベシクル中で製剤化され得る。リポソームは、内部水性区画の周囲にある単層又は多層状脂質二重層及び相対的に不透過性の外側の親油性リン脂質二重層で構成される球状小胞構造である。リポソームは、アニオン性、中性又はカチオン性であり得る。リポソームは、生体適合性、無毒性であり、親水性及び親油性薬物分子の両方を送達することができ、それらの積荷を血漿酵素によって分解から保護することができ、且つ生体膜及び血液脳関門（ＢＢＢ）を通って積荷を輸送できる（例えば、概説についてはＳｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，記事ＩＤ ４６９６７９，１２ページ，２０１１．ｄｏｉ：１０

．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照のこと）。
【０３２２】
小胞は、いくつかの異なる型の脂質から作られ得るが；リン脂質が、薬物担体としてのリポソームを生成するために最も一般的に使用される。多層状小胞脂質の調製のための方法は、当該技術分野で知られている（例えば、多層状小胞脂質の調製に関する教示が、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第６，６９３，０８６号明細書を参照されたい）。小胞形成は、脂質フィルムが水溶液と混合されるときに自然に起こり得るが、それはまた、ホモジナイザー、ソニケーター、又は押し出し装置を使用することによる振盪の形態で力をかけることによって促進され得る（例えば、概説に関してはＳｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，記事ＩＤ ４６９６７９，１２ページ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照のこと）。押し出された脂質は、押し出された脂質の調製に関する教示が、参照により本明細書に組み込まれるＴｅｍｐｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ，１５：６４７－６５２，１９９７において記載されるとおり、サイズを低減するフィルタに通して押し出すことによって調製され得る。
【０３２３】
エキソソームも、本明細書に記載される組成物及びシステムのための薬物送達ビヒクルとして使用され得る。概説に関して、Ｈａ ｅｔ ａｌ．Ｊｕｌｙ ２０１６．Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ Ｂ．Ｖｏｌｕｍｅ ６，Ｉｓｓｕｅ ４，Ｐａｇｅｓ ２８７－２９６；ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ａｐｓｂ．２０１６．０２．００１を参照されたい。
【０３２４】
エクスビボで分化した赤血球もまた、本明細書に記載される薬剤（例えば、ＴＤＳＣ）のための担体として使用され得る。例えば、国際公開第２０１５０７３５８７号パンフレット；国際公開第２０１７１２３６４６号パンフレット；国際公開第２０１７１２３６４４号パンフレット；国際公開第２０１８１０２７４０号パンフレット；国際公開第２０１６１８３４８２号パンフレット；国際公開第２０１５１５３１０２号パンフレット；国際公開第２０１８１５１８２９号パンフレット；国際公開第２０１８００９８３８号パンフレット；Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．２０１４．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１１１（２８）：１０１３１－１０１３６；米国特許第９，６４４，１８０号明細書；Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１７．Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ ８：４２３；Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．２０１４．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１１１（２８）：１０１３１－１０１３６を参照されたい。
【０３２５】
例えば、国際公開第２０１８２０８７２８号パンフレットに記載されるとおりのフソソーム組成物もまた、本明細書に記載されるＴＤＳＣを送達する担体として使用され得る。
【０３２６】
脂質ナノ粒子：
脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、イオン化可能な脂質で作製される担体である。ＬＮＰは、エンドサイトーシスを介して細胞によって取り込まれ、それらの特性は、エンドソーム脱出を可能にし、これは、標的細胞の細胞質内へのカーゴの放出を可能にする。イオン化可能な脂質に加えて、ＬＮＰは、細胞結合を促進するヘルパー脂質、脂質間の隙間を埋めるコレステロール、並びに／又は血清タンパク質によるオプソニン化及び網内系クリアランスを低減するポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含有し得る。脂質ナノ粒子は、一部の実施形態において、１つ以上のイオン性脂質、例えば、非カチオン性脂質（例えば、中性又はアニオン性、若しくは両性脂質）；１つ以上のコンジュゲート脂質（ＰＥＧコンジュゲート脂質又は全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表５に記載されるポリマーにコンジュゲートされた脂質など）；１つ以上のステロール（例えば、コレステロール）；及び、任意に、１つ以上の標的化分子（例えば、コンジュゲート受容体、受容体リガンド、抗体）；又は上記のものの組み合わせ

を含む。
【０３２７】
ナノ粒子製剤（例えば、脂質ナノ粒子）に使用され得る脂質としては、例えば、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレット（参照により組み込まれる）の表４に記載されるものが挙げられ、例えば、脂質含有ナノ粒子は、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表４における脂質の１つ以上を含み得る。脂質ナノ粒子は、追加の要素、例えば、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレット（参照により組み込まれる）の表５に記載されるポリマーなどのポリマーを含み得る。
【０３２８】
一部の実施形態において、コンジュゲート脂質が、存在する場合、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）（ｌ－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）など）、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、ＰＥＧコハク酸ジアシルグリセロール（ＰＥＧＳ－ＤＡＧ）（４－０－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－ｌ－０－（ｗ－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）など）、ＰＥＧジアルコキシプロピルカルバム、Ｎ－（カルボニル－メトキシポリエチレングリコール２０００）－１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンナトリウム塩、及び国際公開第２０１９０５１２８９号パンフレット、ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．０ｃ０１３８６（参照により組み込まれる）の表２に記載されるもの、並びに上記の組み合わせのうちの１つ以上を含み得る。
【０３２９】
一部の実施形態において、脂質ナノ粒子に組み込まれ得るステロールとしては、国際公開第２００９／１２７０６０号パンフレット又は米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書（参照により組み込まれる）に記載されるものなどのコレステロール又はコレステロール誘導体の１つ以上が挙げられる。追加の例示的なステロールとしては、Ｅｙｇｅｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ（２０２０）（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含む植物ステロールが挙げられる。
【０３３０】
一部の実施形態において、脂質粒子は、イオン化性脂質、非カチオン性脂質、粒子の凝集を阻害するコンジュゲート脂質、及びステロールを含む。これらの成分の量は、独立して、及び所望の特性を達成するために変化され得る。例えば、一部の実施形態において、脂質ナノ粒子は、総脂質の約２０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％（他の実施形態では、それは、２０～７０％（ｍｏｌ）、３０～６０％（ｍｏｌ）又は４０～５０％（ｍｏｌ）；脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の約５０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％であり得る）の量のイオン化性脂質、総脂質の約５ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％の量の非カチオン性脂質、総脂質の約０．５ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％の量のコンジュゲート脂質、及び総脂質の約２０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％の量のステロールを含む。総脂質対核酸の比率は、必要に応じて変化され得る。例えば、総脂質対核酸（質量又は重量）比は、約１０：１～約３０：１であり得る。
【０３３１】
一部の実施形態において、脂質対核酸比（質量／質量比；ｗ／ｗ比）は、約１：１～約２５：１、約１０：１～約１４：１、約３：１～約１５：１、約４：１～約１０：１、約５：１～約９：１、又は約６：１～約９：１の範囲内であり得る。脂質及び核酸の量は、所望のＮ／Ｐ比、例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれ以上のＮ／Ｐ比を得るように調整され得る。一般に、脂質ナノ粒子製剤の全脂質含量は、約５ｍｇ／ｍｌ～約３０ｍｇ／ｍＬの範囲であり得る。
【０３３２】
本明細書に記載される組成物、例えば、本明細書に記載される核酸の送達のための脂質

ナノ粒子を形成するために（例えば、他の脂質成分と組み合わせて）使用され得る脂質化合物のいくつかの非限定的な例としては、

【化１】



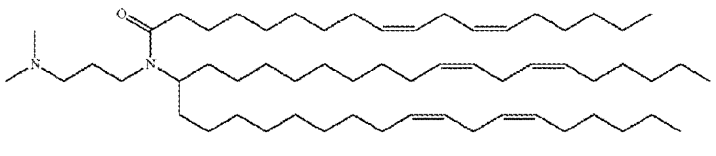
(i)

が挙げられる。

【０３３３】

一部の実施形態において、式（ｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【化２】

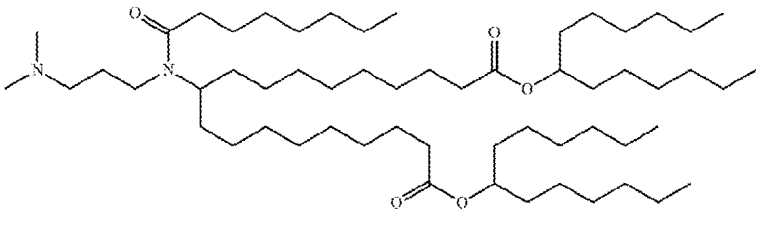


(ii)

【０３３４】

一部の実施形態において、式（ｉｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【化３】

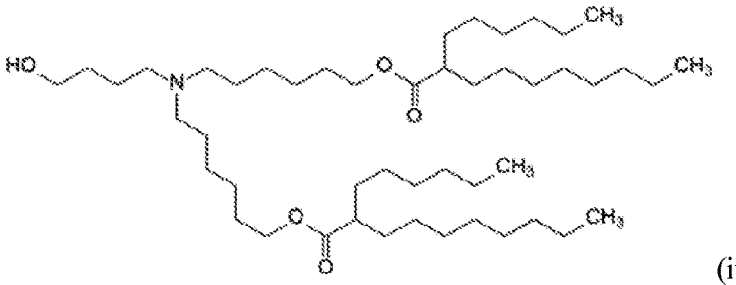


(iii)

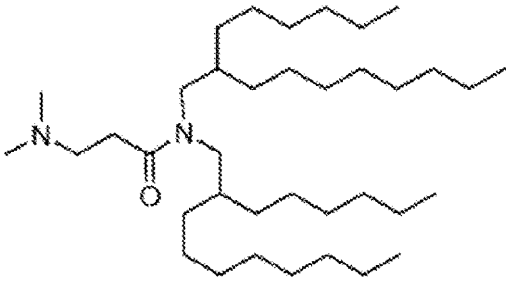
【０３３５】

一部の実施形態において、式（ｉｉｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【化４】



(iv)

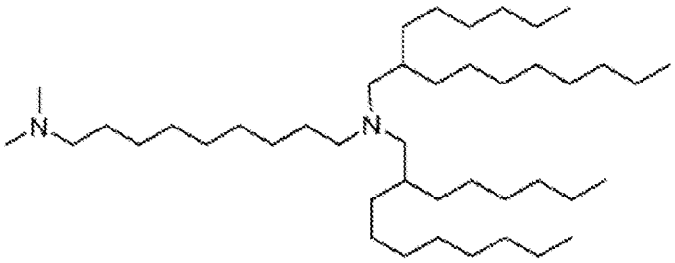


(v)

【０３３６】

一部の実施形態において、式（ｖ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【化５】

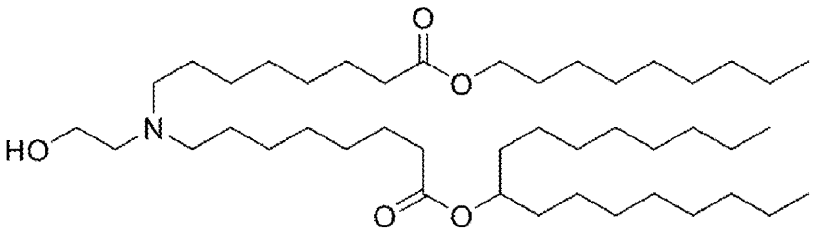


(vi)

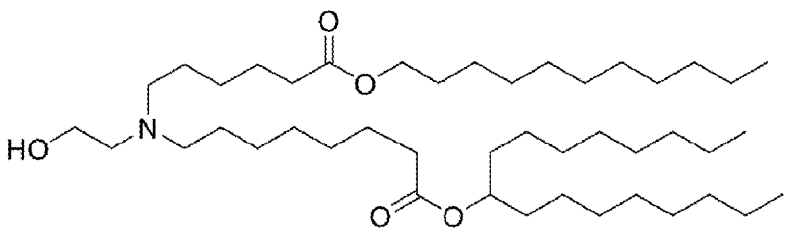
【０３３７】

一部の実施形態において、式（ｖｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【化６】

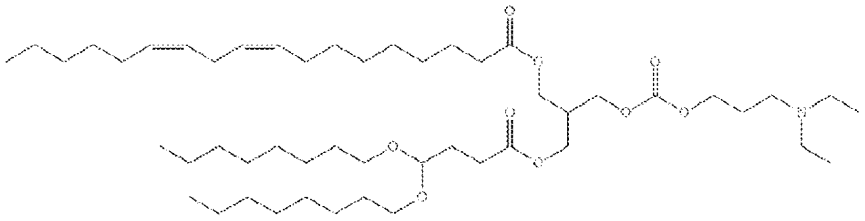


(vii)



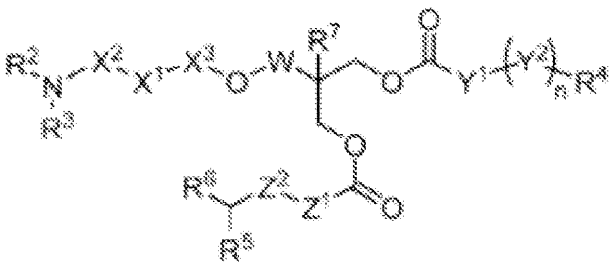
(viii)

【０３３８】
一部の実施形態において、式ｖｉｉ又は（ｖｉｉｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。
【化７】



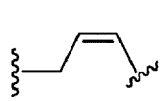
(ix)

【０３３９】
一部の実施形態において、式（ｉｘ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。
【０３４０】
一部の実施形態において、式（ｘ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される：
【化８】

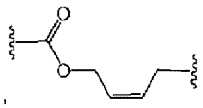


(x)

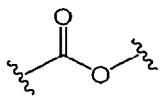
式中、
X^1が、Ｏ、NR^1、又は直接結合であり、X^2が、Ｃ２～５アルキレンであり、X^3が、Ｃ（＝Ｏ）又は直接結合であり、R^1が、Ｈ又はＭｅであり、R^3が、Ｃｉ～３アルキルであり、R^2が、Ｃｉ～３アルキルであり、又はR^2が、それらが結合される窒素原子及びX^2の１～３個の炭素原子と一緒になって、４員、５員、若しくは６員環を形成し、又はX^1が、NR^1であり、R^1及びR^2が、それらが結合される窒素原子と一緒になって、５員若しくは６員環を形成し、又はR^2が、R^3及びそれらが結合される窒素原子と一緒になって、５員、６員、若しくは７員環を形成し、Y^1が、Ｃ２～１２アルキレンであり、Y^2が、
【化９】



（いずれかの配向で）、



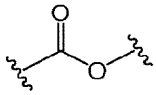
（いずれかの配向で）、



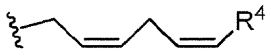
（いずれかの配向で）

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

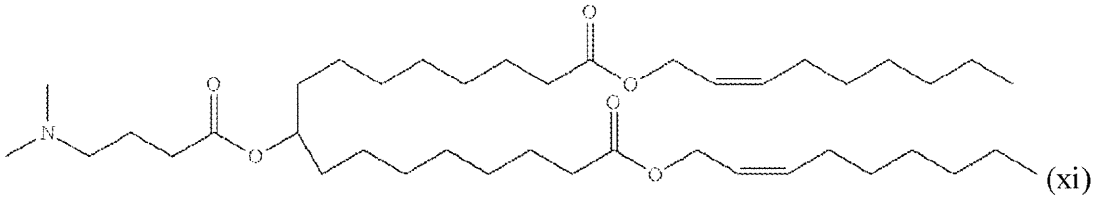
Ｚ^{2}が、
【化１０】



（いずれかの配向で）であるか又は非存在であり、ただし、Ｚ^{1}が直接結合であり、Ｚ^{2}が非存在である場合；
Ｒ^{5}が、Ｃ５～９アルキル又はＣ６～１０アルコキシであり、Ｒ^{6}が、Ｃ５～９アルキル又はＣ６～１０アルコキシであり、Ｗが、メチレン又は直接結合であり、Ｒ^{7}が、Ｈ又はＭｅ、又はその塩であり、ただし、Ｒ^{3}及びＲ^{2}が、Ｃ２アルキルであり、Ｘ^{1}がＯであり、Ｘ^{2}が、直鎖状Ｃ３アルキレンであり、Ｘ^{3}がＣ（＝０）であり、Ｙ^{1}が、直鎖状Ｃｅアルキレンであり、（Ｙ^{2}）ｎ－Ｒ^{4}が、
【化１１】



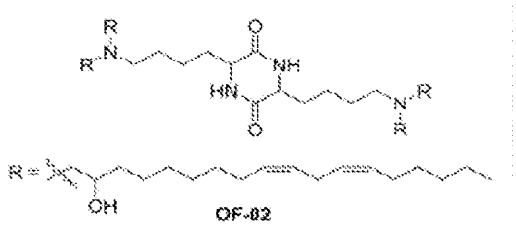
であり、Ｒ^{4}が、直鎖状Ｃ５アルキルであり、Ｚ^{1}が、Ｃ２アルキレンであり、Ｚ^{2}が、非存在であり、Ｗが、メチレンであり、Ｒ^{7}が、Ｈである場合、Ｒ^{5}及びＲ^{6}は、ＣｘアルコキシでＮない。
【化１２】

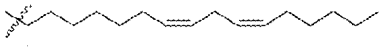


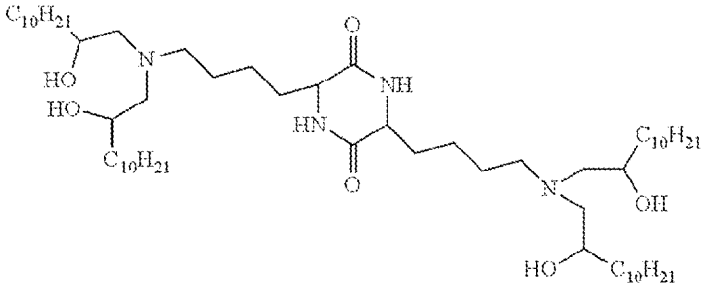
(xi)

【０３４１】
一部の実施形態において、式（ｘｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。
【０３４２】
一部の実施形態において、式（ｘｉｉ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

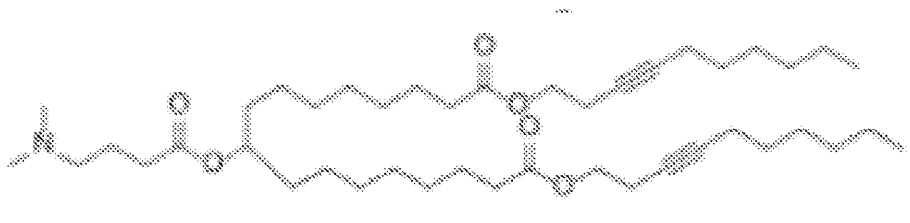
【化１３】



式中、R=  (xii)



(xiii)

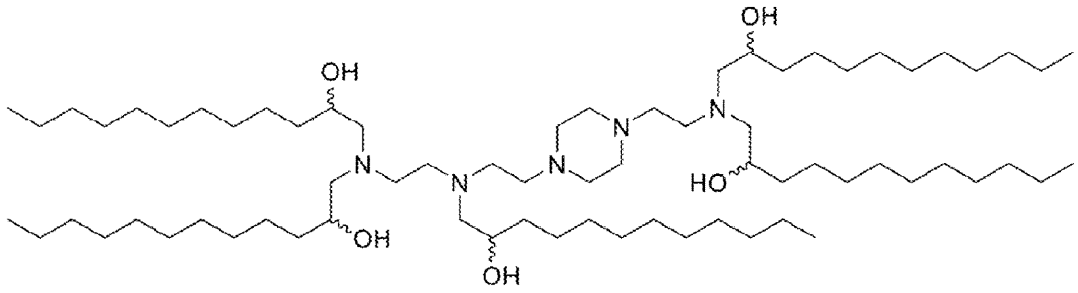


(xiv)

【０３４３】

一部の実施形態において、ＬＮＰは、式（ｘｉｉｉ）の化合物及び式（ｘｉｖ）の化合物を含む。

【化１４】

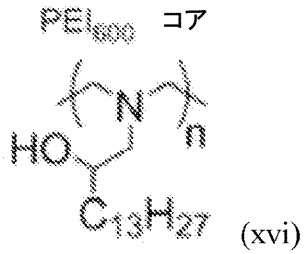


(xv)

【０３４４】

一部の実施形態において、式（ｘｖ）を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

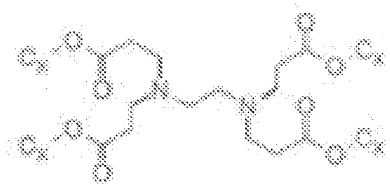
【化１５】



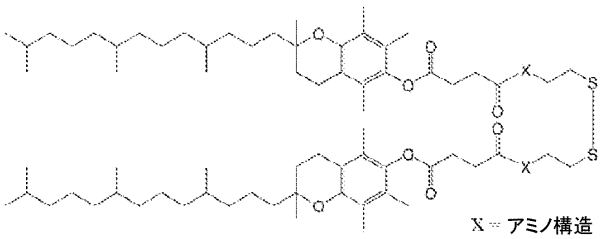
(xvi)

【０３４５】
一部の実施形態において、式（ｘｖｉ）の配合物を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肺内皮細胞に送達するのに使用される。
【０３４６】
一部の実施形態において、式（ｘｖｉｉ）、ｘｖｉｉｉ又はｘｉｘの配合物を含むＬＮＰが、本明細書に記載されるＤＮＡ組成物を、肺内皮細胞に送達するのに使用される。

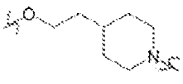
【化１６】



(xvii)

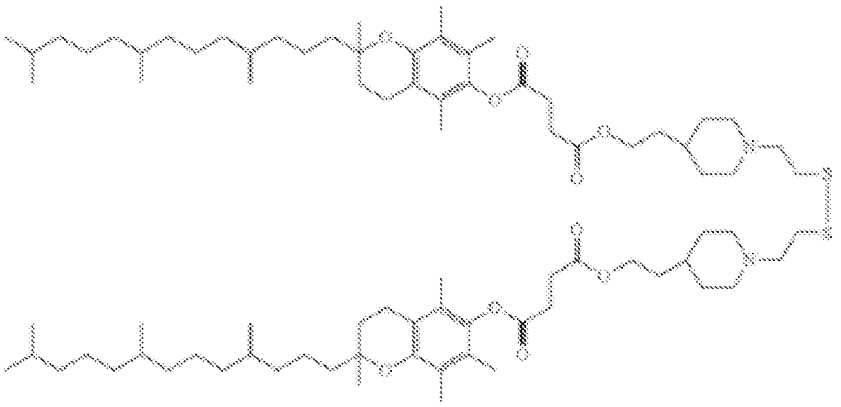


式中、X=

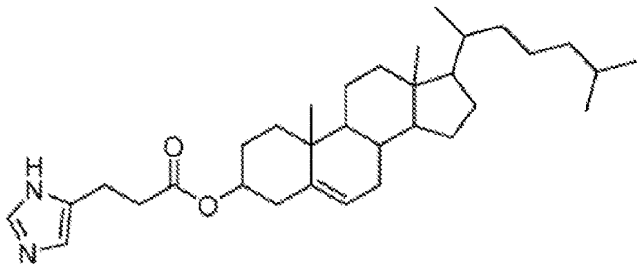


(xviii)

(a)



(xviii)(b)

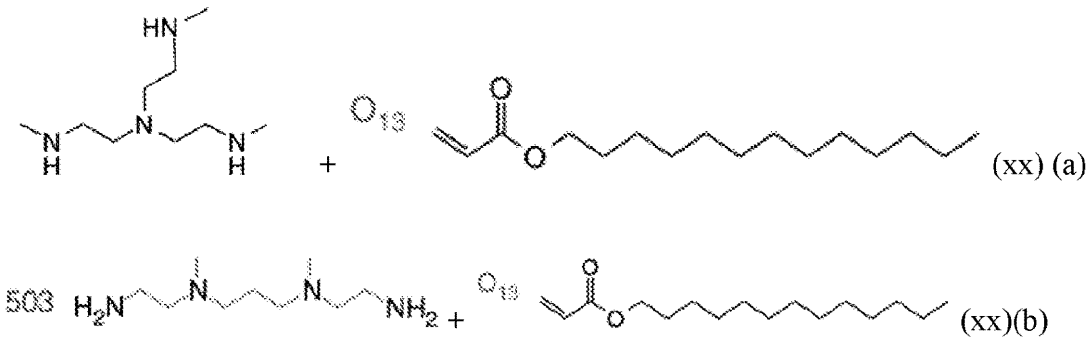


(xix)

【０３４７】

一部の実施形態において、本明細書に記載される組成物、例えば、本明細書に記載される核酸の送達のための脂質ナノ粒子を形成するのに使用される脂質化合物は、以下の反応のうちの１つによって作製される：

【化１７】



【０３４８】

一部の実施形態において、本明細書に記載される組成物（例えば、核酸又はタンパク質）は、イオン化性脂質を含むＬＮＰ中で提供される。一部の実施形態において、イオン化性脂質は、例えば、米国特許第９，８６７，８８８号明細書（全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１に記載されるようなヘプタデカン－９－イル８－（（２－ヒドロキシエチル）（６－オキソ－６－（ウンデシルオキシ）ヘキシル）アミノ）オクタノエート（ＳＭ－１０２）である。一部の実施形態において、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１５／０９５３４０号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１３において合成されるような９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート（ＬＰ０１）である。一部の実施形態において、イオン化性脂質は、例えば、米国特許出願公開第２０１２／００２７８０３号明細書（全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例７、８、又は９において合成されるようなジ（（Ｚ）－ノナ－２－エン－１－イル）９－（（４－ジメチルアミノ）－ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）である。一部の実施形態において、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１０／０５３５７２号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１４及び１６において合成されるような１，１’－（（２－（４－（２－（（２－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１－イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン－２－オール）（Ｃ１２－２００）である。一部の実施形態において、イオン化性脂質は、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）脂質（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－ｌＨ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエート、例えば、国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）からの構造（Ｉ）である。

【０３４９】

一部の実施形態において、イオン化性脂質は、カチオン性脂質、イオン化性カチオン性脂質、例えば、ｐＨに応じて正荷電若しくは中性形態で存在し得るカチオン性脂質、又は容易にプロトン化され得るアミン含有脂質であり得る。一部の実施形態において、カチオン性脂質は、例えば、生理的条件下で、正に荷電することが可能である脂質である。例示的なカチオン性脂質は、正電荷を有する１つ以上のアミン基を含む。一部の実施形態において、脂質粒子は、中性脂質、イオン化性アミン含有脂質、生分解性アルキン脂質、ステロイド、多価不飽和脂質を含むリン脂質、構造脂質（例えば、ステロール）、ＰＥＧ、コレステロール及びポリマーコンジュゲート脂質のうちの１つ以上との配合物中のカチオン性脂質を含む。一部の実施形態において、カチオン性脂質は、イオン化性カチオン性脂質であり得る。本明細書で開示される例示的なカチオン性脂質は、６．０を超える有効ｐＫ

ａを有し得る。実施形態において、脂質ナノ粒子は、第１のカチオン性脂質と異なる有効ｐＫａ（例えば、第１の有効ｐＫａより高い）を有する第２のカチオン性脂質を含み得る。脂質ナノ粒子は、４０～６０ｍｏｌパーセントのカチオン性脂質、中性脂質、ステロイド、ポリマーコンジュゲート脂質、及び治療剤、例えば、脂質ナノ粒子内に封入されるか又はそれと結合された本明細書に記載される核酸を含み得る。一部の実施形態において、核酸は、カチオン性脂質と同時に配合される。核酸は、ＬＮＰ、例えば、カチオン性脂質を含むＬＮＰの表面に吸着され得る。一部の実施形態において、核酸は、ＬＮＰ、例えば、カチオン性脂質を含むＬＮＰ内に封入され得る。一部の実施形態において、脂質ナノ粒子は、例えば、標的化剤で被覆された標的部分を含み得る。実施形態において、ＬＮＰ製剤は、生分解性である。一部の実施形態において、本明細書に記載される１つ以上の脂質、例えば、式（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉ）、（ｖｉｉ）及び／又は（ｉｘ）を含む脂質ナノ粒子は、少なくとも１％、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は１００％の分子ＴＤＳＣを封入する。

【０３５０】

脂質ナノ粒子製剤に使用され得る例示的なイオン化性脂質としては、限定はされないが、国際公開第２０１９０５１２８９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表１に列挙されるものが挙げられる。追加の例示的な脂質としては、限定はされないが、以下の式の１つ以上：米国特許出願公開第２０１６／０３１１７５９号明細書のＸ；米国特許出願公開第２０１５０３７６１１５号明細書又は米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１６０１５１２８４号明細書のＩ、ＩＩ又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１７０２１０９６７号明細書のＩ、ＩＡ、ＩＩ、又はＩＩＡ；米国特許出願公開第２０１５０１４００７０号明細書のＩ－ｃ；米国特許出願公開第２０１３／０１７８５４１号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０３０３５８７又は米国特許出願公開第２０１３／０１２３３３８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／０１４１６７８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／０２３９９２６号明細書のＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、又はＶ；米国特許出願公開第２０１７／０１１９９０４号明細書のＩ；国際公開第２０１７／１１７５２８号パンフレットのＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／０１４９８９４号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１５／００５７３７３号明細書のＡ；国際公開第２０１３／１１６１２６号パンフレットのＡ；米国特許出願公開第２０１３／００９０３７２号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０２７４５２３号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０２７４５０４号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／００５３５７２号明細書のＡ；国際公開第２０１３／０１６０５８号パンフレットのＡ；国際公開第２０１２／１６２２１０号パンフレットのＡ；米国特許出願公開第２００８／０４２９７３号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１２／０１２８７６７０号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、又はＩＶ；米国特許出願公開第２０１４／０２００２５７号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１５／０２０３４４６号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１５／０００５３６３号明細書のＩ又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１４／０３０８３０４号明細書のＩ、ＩＡ、ＩＢ、ＩＣ、ＩＤ、ＩＩ、ＩＩＡ、ＩＩＢ、ＩＩＣ、ＩＩＤ、又はＩＩＩ～ＸＸＩＶ；米国特許出願公開第２０１３／０３３８２１０号明細書の；国際公開第２００９／１３２１３１号パンフレットのＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、又はＩＶ；米国特許出願公開第２０１２／０１０１１４７８号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１２／００２７７９６号明細書のＩ又はＸＸＸＶ；米国特許出願公開第２０１２／００５８１４４号明細書のＸＩＶ又はＸＶＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０３２３２６９号明細書の；米国特許出願公開第２０１１／０１１７１２５号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１１／０２５６１７５号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／０２０２８７１号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、Ｖ、ＶＩ、ＶＩＩ、ＶＩＩＩ、ＩＸ、Ｘ、ＸＩ、ＸＩＩ；米国特許出願公開第２０１１／００７６３３５号明細書のＩ、ＩＩ、Ｉ

ＩＩ、ＩＶ、Ｖ、ＶＩ、ＶＩＩ、ＶＩＩＩ、Ｘ、ＸＩＩ、ＸＩＩＩ、ＸＩＶ、ＸＶ、又はＸＶＩ；米国特許出願公開第２００６／００８３７８号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１２３３３８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／００６４２４２号明細書のＩ又はＸ－Ａ－Ｙ－Ｚ；米国特許出願公開第２０１３／００２２６４９号明細書のＸＶＩ、ＸＶＩＩ、又はＸＶＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１１６３０７号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１１６３０７号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１０／００６２９６７号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１８９３５１号明細書のＩ～Ｘ；米国特許出願公開第２０１４／００３９０３２号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書のＶ；米国特許出願公開第２０１６／０３１７４５８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１９５９２０号明細書のＩ；米国特許第１０，２２１，１２７号明細書の５、６、又は１０；国際公開第２０１８／０８１４８０号パンフレットのＩＩＩ－３；国際公開第２０２０／０８１９３８号パンフレットのＩ－５又はＩ－８；米国特許第９，８６７，８８８号明細書の１８又は２５；米国特許出願公開第２０１９／０１３６２３１号明細書のＡ；国際公開第２０２０／２１９８７６号パンフレットのＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／００２７８０３号明細書の１；米国特許出願公開第２０１９／０２４０３４９号明細書のＯＦ－０２；米国特許第１０，０８６，０１３号明細書の２３；Ｍｉａｏ　ｅｔ　ａｌ（２０２０）のｃＫＫ－Ｅ１２／Ａ６；国際公開第２０１０／０５３５７２号パンフレットのＣ１２－２００；Ｄａｈｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ（２０１７）の７Ｃ１；Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ　ｅｔ　ａｌの３０４－Ｏ１３又は５０３－Ｏ１３；米国特許第９，７０８，６２８号明細書のＴＳ－Ｐ４Ｃ２；国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレットのＩ；国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレットのＩが挙げられる。

【０３５１】

一部の実施形態において、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例９に記載されるようなＭＣ３（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３ｌＺ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３ｌ－テトラエン－ｌ９－イル－４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ又はＭＣ３）である。一部の実施形態において、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１０に記載されるような脂質ＡＴＸ－００２である。一部の実施形態において、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１１に記載されるような（ｌ３Ｚ，ｌ６Ｚ）－Ａ，Ａ－ジメチル－３－ノニルドコサ－ｌ３，ｌ６－ジエン－ｌ－アミン（化合物３２）である。一部の実施形態において、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１２に記載されるような化合物６又は化合物２２である。

【０３５２】

例示的な非カチオン性脂質としては、限定はされないが、ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルホスホエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、モノメチル－ホスファチジルエタノールアミン（１６－Ｏ－モノメチルＰＥなど）、ジメチル－ホスファチジルエタノールアミン（１６

－Ｏ－ジメチルＰＥなど）、ｌ８－ｌ－ｔｒａｎｓ　ＰＥ、ｌ－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルセリン（ＤＯＰＳ）、スフィンゴミエリン（ＳＭ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（ＤＭＰＧ）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（ＤＳＰＧ）、ジエルコイルホスファチジルコリン（ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール（ＰＯＰＧ）、ジエライドイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン（ＥＳＭ）、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジセチルホスフェート、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、又はそれらの混合物が挙げられる。他のジアシルホスファチジルコリン及びジアシルホスファチジルエタノールアミンリン脂質も使用され得ることが理解される。これらの脂質中のアシル基は、好ましくは、Ｃ１０～Ｃ２４炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、又はオレオイルである。追加の例示的な脂質としては、特定の実施形態では、限定はされないが、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．０ｃ０１３８６（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものが挙げられる。このような脂質としては、一部の実施形態において、ｍＲＮＡ（例えば、ＤＧＴＳ）との肝臓トランスフェクションを改善することが分かっている植物脂質が挙げられる。

【０３５３】

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

【０３５４】

一部の実施形態において、非カチオン性脂質は、オレイン酸又は米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書（全体が参照により本明細書に組み込まれる）の式Ｉ、ＩＩ、若しくはＩＶの化合物である。非カチオン性脂質は、例えば、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～３０％（ｍｏｌ）を占め得る。一部の実施形態において、非カチオン性脂質含量は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の５～２０％（ｍｏｌ）又は１０～１５％（ｍｏｌ）である。実施形態において、イオン化性脂質対中性脂質のモル比は、約２：１～約８：１の範囲（例えば、約２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、又は８：１）である。

【０３５５】

一部の実施形態において、脂質ナノ粒子は、いずれのリン脂質も含まない。

【０３５６】

いくつかの態様では、脂質ナノ粒子は、膜完全性を提供するために、ステロールなどの成分をさらに含み得る。脂質ナノ粒子に使用され得る１つの例示的なステロールは、コレステロール及びその誘導体である。コレステロール誘導体の非限定的な例としては、極性類似体、例えば、５ａ－コレスタノール、５３－コプロスタノール、コレステリル－（２’－ヒドロキシ）－エチルエーテル、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエーテル、及び６－ケトコレスタノール；非極性類似体、例えば、５ａ－コレスタン、コレステノン、５ａ－コレスタノン、５ｐ－コレスタノン、及びデカン酸コレステリル；及びそ

れらの混合物が挙げられる。一部の実施形態において、コレステロール誘導体は、極性類似体、例えば、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエーテルである。例示的なコレステロール誘導体が、ＰＣＴ公開国際公開第２００９／１２７０６０号パンフレット及び米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書（これらはそれぞれ、全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される。

【０３５７】

一部の実施形態において、ステロールなどの、膜完全性を提供する成分は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～５０％（ｍｏｌ）（例えば、０～１０％、１０～２０％、２０～３０％、３０～４０％、又は４０～５０％）を占め得る。一部の実施形態において、そのような成分は、脂質ナノ粒子の総脂質含量の２０～５０％（ｍｏｌ）３０～４０％（ｍｏｌ）である。

【０３５８】

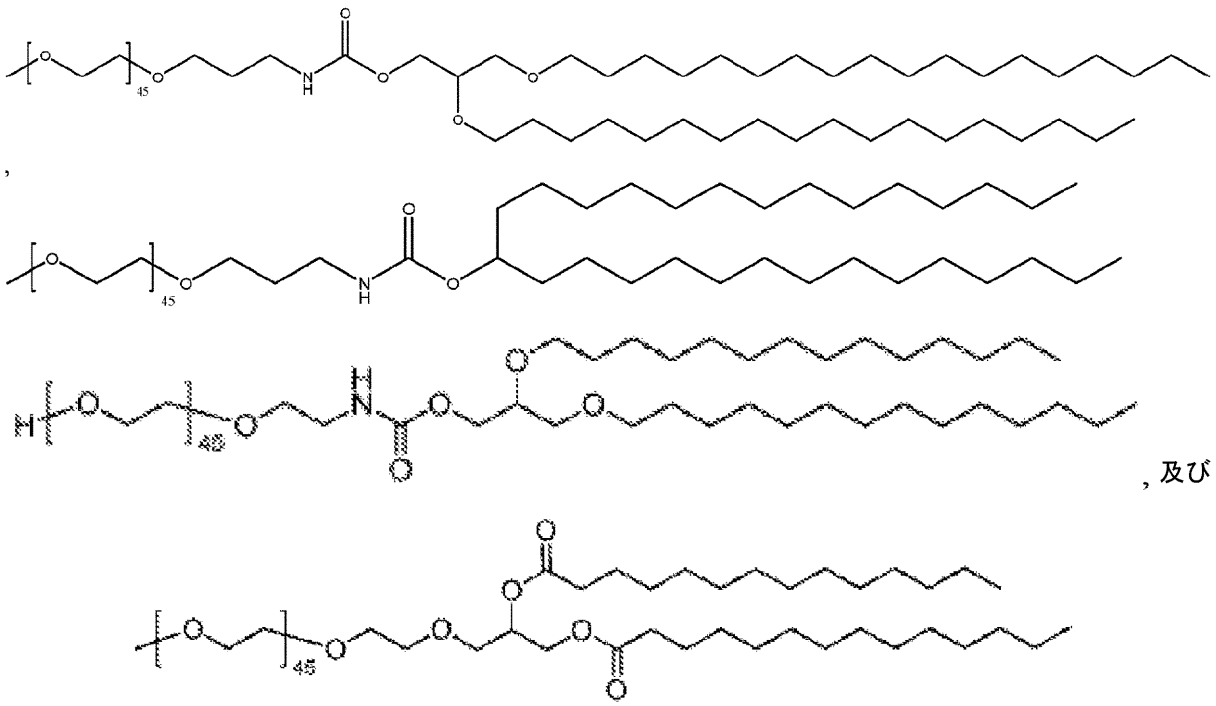
一部の実施形態において、脂質ナノ粒子は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又はコンジュゲート脂質分子を含み得る。一般に、これらは、脂質ナノ粒子の凝集を阻害し、及び／又は立体安定化を提供するのに使用される。例示的なコンジュゲート脂質としては、限定はされないが、ＰＥＧ－脂質コンジュゲート、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ポリアミド－脂質コンジュゲート（ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲートなど）、カチオン性ポリマー脂質（ＣＰＬ）コンジュゲート、及びそれらの混合物が挙げられる。一部の実施形態において、コンジュゲート脂質分子は、ＰＥＧ－脂質コンジュゲート、例えば、（メトキシポリエチレングリコール）コンジュゲート脂質である。

【０３５９】

例示的なＰＥＧ－脂質コンジュゲートとしては、限定はされないが、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）（ｌ－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）など）、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、ＰＥＧコハク酸ジアシルグリセロール（ＰＥＧＳ－ＤＡＧ）（４－０－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－ｌ－０－（ｗ－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）など）、ＰＥＧジアルコキシプロピルカルバム、Ｎ－（カルボニル－メトキシポリエチレングリコール２０００）－ｌ，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミンナトリウム塩、又はそれらの混合物が挙げられる。追加の例示的なＰＥＧ－脂質コンジュゲートが、例えば、米国特許第５，８８５，６ｌ３号明細書、米国特許第６，２８７，５９１号明細書、米国特許出願公開第２００３／００７７８２９号明細書、米国特許出願公開第２００３／００７７８２９号明細書、米国特許出願公開第２００５／０１７５６８２号明細書、米国特許出願公開第２００８／００２００５８号明細書、米国特許出願公開第２０１１／０１１７１２５号明細書、米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書、米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書、米国特許出願公開第２０１７／０１１９９０４号明細書、及び米国特許出願第０９９８２３号明細書（これらは全て、全内容が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される。一部の実施形態において、ＰＥＧ－脂質は、米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書（全内容が参照により本明細書に組み込まれる）の式ＩＩＩ、ＩＩＩ－ａ－Ｉ、ＩＩＩ－ａ－２、ＩＩＩ－ｂ－１、ＩＩＩ－ｂ－２、又はＶの化合物である。一部の実施形態において、ＰＥＧ－脂質は、米国特許出願公開第２０１５０３７６１１５号明細書又は米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書（これらは両方とも、全内容が参照により本明細書に組み込まれる）の式ＩＩのものである。一部の実施形態において、ＰＥＧ－ＤＡＡコンジュゲートは、例えば、ＰＥＧ－ジラウリルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジパルミチルオキシプロピル、又はＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピルであり得る。ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ジラウリルグリセロール、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリセロール、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール、ＰＥＧ－ジラウリルグリカミド、ＰＥＧ－ジミリスチルグリカミド、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリ

カミド、ＰＥＧ－ジステリルグリカミド、ＰＥＧ－コレステロール（ｌ－［８’－（コレスタ－５－エン－３［β］－オキシ）カルボキサミド－３’，６’－ジオキサオクタニル］カルバモイル－［ω］－メチル－ポリ（エチレングリコール）、ＰＥＧ－ＤＭＢ（３，４－ジテトラデコキシルベンジル－［ω］－メチル－ポリ（エチレングリコール）エーテル）、及び１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］のうちの１つ以上であり得る。一部の実施形態において、ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧ、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］を含む。一部の実施形態において、ＰＥＧ－脂質は、

【化１８】



から選択される構造を含む。

【０３６０】

一部の実施形態において、ＰＥＧ以外の分子とコンジュゲートされた脂質も、ＰＥＧ－脂質の代わりに使用され得る。例えば、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ポリアミド－脂質コンジュゲート（ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲートなど）、及びカチオン性ポリマー脂質（ＧＰＬ）コンジュゲートが、ＰＥＧ－脂質の代わりに又はそれに加えて使用され得る。

【０３６１】

例示的なコンジュゲート脂質、すなわち、ＰＥＧ－脂質、（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲート及びカチオン性ポリマー脂質が、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（これらは全て、全内容が参照により本明細書に組み込まれる）の表２に列挙されるＰＣＴ及びＬＩＳ特許出願に記載される。

【０３６２】

一部の実施形態において、ＰＥＧ又はコンジュゲート脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～２０％（ｍｏｌ）を占め得る。一部の実施形態において、ＰＥＧ又はコンジュゲート脂質含量は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０．５～１０％又は２～５％（ｍｏｌ）である。イオン化性脂質、非カチオン性脂質、ステロール、及びＰＥＧ／コンジュゲート脂質のモル比は、必要に応じて変化され得る。例えば、脂質粒子は、組成物のモル又は総重量当たり３０～７０％のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり０～６０％のコレステロール、組成物のモル又は総重量当たり０～３０％の非カチオン性脂

質及び組成物のモル又は総重量当たり１～１０％のコンジュゲート脂質を含み得る。好ましくは、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり３０～４０％のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり４０～５０％のコレステロール、及び組成物のモル又は総重量当たり１０～２０％の非カチオン性脂質を含む。いくつかの他の実施形態では、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり５０～７５％のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり２０～４０％のコレステロール、及び組成物のモル又は総重量当たり５～１０％の非カチオン性脂質及び組成物のモル又は総重量当たり１～１０％のコンジュゲート脂質である。組成物は、組成物のモル又は総重量当たり６０～７０％のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり２５～３５％のコレステロール、及び組成物のモル又は総重量当たり５～１０％の非カチオン性脂質を含有し得る。組成物はまた、組成物のモル又は総重量当たり最大で９０％のイオン化性脂質及び組成物のモル又は総重量当たり２～１５％の非カチオン性脂質を含有し得る。製剤はまた、例えば、組成物のモル又は総重量当たり８～３０％のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり５～３０％の非カチオン性脂質、及び組成物のモル又は総重量当たり０～２０％のコレステロール；組成物のモル又は総重量当たり４～２５％のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり４～２５％の非カチオン性脂質、組成物のモル又は総重量当たり２～２５％のコレステロール、組成物のモル又は総重量当たり１０～３５％のコンジュゲート脂質、及び組成物のモル又は総重量当たり５％のコレステロール；又は組成物のモル又は総重量当たり２～３０％のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり２～３０％の非カチオン性脂質、組成物のモル又は総重量当たり１～１５％のコレステロール、組成物のモル又は総重量当たり２～３５％のコンジュゲート脂質、及び組成物のモル又は総重量当たり１～２０％のコレステロール；或いは組成物のモル又は総重量当たり最大で９０％のイオン化性脂質及び組成物のモル又は総重量当たり２～１０％の非カチオン性脂質、或いは組成物のモル又は総重量当たり１００％のカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子製剤であり得る。一部の実施形態において、脂質粒子製剤は、５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化性脂質、リン脂質、コレステロール及びＰＥＧ化脂質を含む。いくつかの他の実施形態では、脂質粒子製剤は、６０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化性脂質、コレステロール及びＰＥＧ化脂質を含む。

【０３６３】

一部の実施形態において、脂質粒子は、イオン化性脂質、非カチオン性脂質（例えばリン脂質）、ステロール（例えば、コレステロール）及びＰＥＧ化脂質を含み、ここで、脂質のモル比は、イオン化性脂質では２０～７０モルパーセントの範囲であり、目標は４０～６０であり、非カチオン性脂質のモルパーセントは、０～３０の範囲であり、目標は０～１５であり、ステロールのモルパーセントは、２０～７０の範囲であり、目標は３０～５０であり、ＰＥＧ化脂質のモルパーセントは、１～６の範囲であり、目標は２～５である。

【０３６４】

一部の実施形態において、脂質粒子は、５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化性脂質／非カチオン性脂質／ステロール／コンジュゲート脂質を含む。

【０３６５】

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

【０３６６】

一部の実施形態において、１つ以上の追加の化合物も含まれ得る。それらの化合物は、別々に投与され得、又は追加の化合物は、本発明の脂質ナノ粒子に含まれ得る。言い換えると、脂質ナノ粒子は、核酸又は第１の核酸と異なる少なくとも第２の核酸に加えて、他の化合物を含有し得る。限定はされないが、他の追加の化合物は、小型若しくは大型有機又は無機分子、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖類、ペプチド、タンパク質、ペプチド類似体及びその誘導体、ペプチド模倣薬、核酸、核酸類似体及びその誘導体、生体材料から作製された抽出物、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され得る。

【０３６７】
一部の実施形態において、ＬＮＰは、標的化ドメインの付加によって特定の組織に指向される。例えば、生物学的リガンドが、ＬＮＰの表面に提示されて、同族受容体を提示する細胞との相互作用を促進し、それによって、受容体との結合及び細胞が受容体を発現する組織へのカーゴ送達を駆動し得る。一部の実施形態において、生物学的リガンドは、肝臓への送達を駆動するリガンドであり得、例えば、ＧａｌＮＡｃを提示するＬＮＰは、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）を提示する肝細胞への核酸カーゴの送達をもたらす。Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １８（７）：１３５７－１３６４（２０１０）の論文は、観察可能なＬＮＰカーゴ効果（例えば、上記のＡｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．２０１０の図６を参照）についてＡＳＧＰＲに依存的なＬＮＰを得るための、ＰＥＧ－脂質に対する３価ＧａｌＮＡｃリガンドのコンジュゲーション（ＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ－ＤＳＧ）を教示している。例えば、葉酸塩、トランスフェリン、又は抗体を組み込む他のリガンド提示ＬＮＰ製剤は、国際公開第２０１７２２３１３５号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）、さらには、その中に使用される参考文献、すなわち、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 ＵＳＡ．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；及びＰｅｅｒ及びＬｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１１ １８：１１２７－１１３３に記載される。

【０３６８】
一部の実施形態において、ＬＮＰは、従来の成分、例えば、イオン化性カチオン性脂質、両親媒性リン脂質、コレステロール及びポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）脂質を含む製剤への器官選択的ターゲティング（Ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ＯＲｇａｎ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ）（ＳＯＲＴ）分子の付加によって、組織特異的活性のために選択される。Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌ １５（４）：３１３－３２０（２０２０）の教示は、補助的な「ＳＯＲＴ」成分の付加が、インビボＲＮＡ送達プロファイルを正確に改変し、ＳＯＲＴ分子のパーセンテージ及び生物物理的特性に応じて、組織特異的（例えば、肺、肝臓、脾臓）遺伝子送達及び編集を媒介することを実証している。

【０３６９】
一部の実施形態において、ＬＮＰは、生分解性、イオン化性脂質を含む。一部の実施形態において、ＬＮＰは、（９Ｚ，ｌ２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，ｌ２－ジエノエート（３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，ｌ２Ｚ）－オクタデカ－９，ｌ２－

ジエノエート）とも呼ばれる）又は別のイオン化性脂質を含む。例えば、国際公開第２０１９／０６７９９２号パンフレット、国際公開第／２０１７／１７３０５４号パンフレット、国際公開第２０１５／０９５３４０号パンフレット、及び国際公開第２０１４／１３６０８６号パンフレット、並びにその中に提供される参考文献の脂質を参照されたい。一部の実施形態において、ＬＮＰ脂質に関するカチオン性及びイオン化性という用語は、同義的であり、例えば、イオン化性脂質は、ｐＨに応じてカチオン性である。

【０３７０】

一部の実施形態において、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、例えば、動的光散乱（ＤＬＳ）によって測定される、数１０ｎｍ～数１００ｎｍであり得る。一部の実施形態において、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、例えば、約４０ｎｍ、４５ｎｍ、５０ｎｍ、５５ｎｍ、６０ｎｍ、６５ｎｍ、７０ｎｍ、７５ｎｍ、８０ｎｍ、８５ｎｍ、９０ｎｍ、９５ｎｍ、１００ｎｍ、１０５ｎｍ、１１０ｎｍ、１１５ｎｍ、１２０ｎｍ、１２５ｎｍ、１３０ｎｍ、１３５ｎｍ、１４０ｎｍ、１４５ｎｍ、又は１５０ｎｍであり得る。一部の実施形態において、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約５０ｎｍ～約１００ｎｍ、約５０ｎｍ～約９０ｎｍ、約５０ｎｍ～約８０ｎｍ、約５０ｎｍ～約７０ｎｍ、約５０ｎｍ～約６０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１００ｎｍ、約６０ｎｍ～約９０ｎｍ、約６０ｎｍ～約８０ｎｍ、約６０ｎｍ～約７０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１００ｎｍ、約７０ｎｍ～約９０ｎｍ、約７０ｎｍ～約８０ｎｍ、約８０ｎｍ～約１００ｎｍ、約８０ｎｍ～約９０ｎｍ、又は約９０ｎｍ～約１００ｎｍであり得る。一部の実施形態において、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約７０ｎｍ～約１００ｎｍであり得る。特定の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約８０ｎｍであり得る。一部の実施形態において、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約１００ｎｍであり得る。一部の実施形態において、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ直径は、約ｌｍｍ～約５００ｍｍ、約５ｍｍ～約２００ｍｍ、約１０ｍｍ～約１００ｍｍ、約２０ｍｍ～約８０ｍｍ、約２５ｍｍ～約６０ｍｍ、約３０ｍｍ～約５５ｍｍ、約３５ｍｍ～約５０ｍｍ、又は約３８ｍｍ～約４２ｍｍの範囲である。

【０３７１】

ＬＮＰは、ある場合には、比較的均質であり得る。多分散指数は、ＬＮＰの均質性、例えば、脂質ナノ粒子の粒度分布を示すのに使用され得る。小さい（例えば、０．３未満の）多分散指数は、一般に、狭い粒度分布を示す。ＬＮＰは、約０～約０．２５、例えば、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４、又は０．２５の多分散指数を有し得る。一部の実施形態において、ＬＮＰの多分散指数は、約０．１０～約０．２０であり得る。

【０３７２】

ＬＮＰのゼータ電位は、組成物の界面動電位を示すのに使用され得る。一部の実施形態において、ゼータ電位は、ＬＮＰの表面電荷を表し得る。より高度に荷電された種は、身体内の細胞、組織、及び他の要素と不必要に相互作用し得るため、正又は負の比較的低い電荷を有する脂質ナノ粒子が一般に望ましい。一部の実施形態において、ＬＮＰのゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、又は約＋５ｍＶ～約＋１０ｍＶであり得る。

【０３７３】

タンパク質及び／又は核酸の封入の効率は、提供される初期量と比べた、調製後にＬＮＰで封入されるか又は他の形でＬＮＰと結合されるタンパク質及び／又は核酸の量を表す。封入効率は、高い（例えば、ほぼ１００％）のが望ましい。封入効率は、例えば、１つ以上の有機溶媒又は洗浄剤で脂質ナノ粒子を分解する前及び後で脂質ナノ粒子を含有する

溶液中のタンパク質及び／又は核酸の量を比較することによって、測定され得る。アニオン交換樹脂が、溶液中の遊離タンパク質又は核酸の量を測定するのに使用され得る。蛍光が、溶液中の遊離タンパク質及び／又は核酸の量を測定するのに使用され得る。本明細書に記載される脂質ナノ粒子の場合、タンパク質及び／又は核酸の封入効率は、少なくとも５０％、例えば５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。一部の実施形態において、封入効率は、少なくとも８０％であり得る。一部の実施形態において、封入効率は、少なくとも９０％であり得る。一部の実施形態において、封入効率は、少なくとも９５％であり得る。

【０３７４】

ＬＮＰは、任意選択により、１つ以上のコーティングを含み得る。一部の実施形態において、ＬＮＰは、コーティングを有するカプセル、フィルム、又は錠剤に製剤化され得る。本明細書に記載される組成物を含むカプセル、フィルム、又は錠剤は、任意の有用なサイズ、引張り強さ、硬度又は密度を有し得る。

【０３７５】

ＬＮＰの追加の例示的な脂質、製剤、方法、及び特性評価が、国際公開第２０２００６１４５７号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）によって教示される。Ｈｏｕ ｅｔ ａｌ．Ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｍＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍａｔｅｒ（２０２１）．ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４１５７８－０２１－００３５８－０も参照されたい。

【０３７６】

一部の実施形態において、インビトロ又はエクスビボ細胞リポフェクションが、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）又はＴｒａｎｓＩＴ－ｍＲＮＡ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｉｒｕｓ Ｂｉｏ）を用いて行われる。特定の実施形態では、ＬＮＰは、ＧｅｎＶｏｙ＿ＩＬＭイオン化性脂質混合物（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ ＮａｎｏＳｙｓｔｅｍｓ）を用いて製剤化される。特定の実施形態では、ＬＮＰは、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）又はジリノレイルメチル－４－ジメチルアミノブチレート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ又はＭＣ３）を用いて製剤化され、その製剤及びインビボでの使用が、Ｊａｙａｒａｍａｎ ｅｔ ａｌ．Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ ５１（３４）：８５２９－８５３３（２０１２）（全体が参照により本明細書に組み込まれる）に教示される。

【０３７７】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム、例えば、Ｃａｓ９－ｇＲＮＡ ＲＮＰ、ｇＲＮＡ、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡの送達のために最適化されたＬＮＰ製剤が、国際公開第２０１９０６７９９２号パンフレット及び国際公開第２０１９０６７９１０号パンフレット（両方とも参照により組み込まれる）に記載される。

【０３７８】

核酸の送達に有用な追加の特定のＬＮＰ製剤が、米国特許第８１５８６０１号明細書及び米国特許第８１６８７７５号明細書（両方とも参照により組み込まれる）に記載され、これは、ＯＮＰＡＴＴＲＯの名称で販売されているパチシラン中で使用される製剤を含む。

【０３７９】

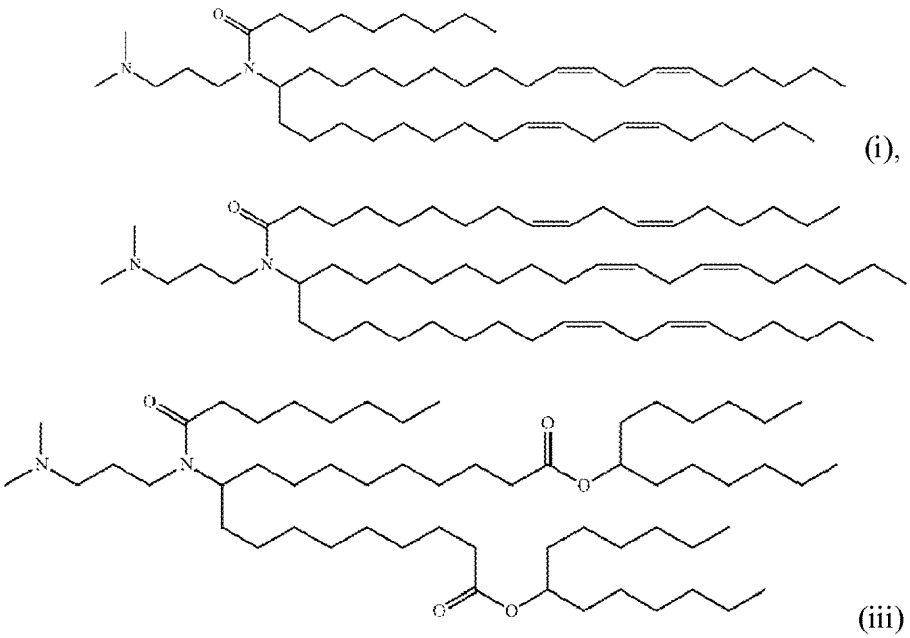
ＬＮＰとともに本明細書に記載されるＤＮＡの例示的な投与量は、約０．１、０．２５、０．３、０．５、１、２、３、４、５、６、８、１０、又は１００ｍｇ／ｋｇ（ＤＮＡ）を含み得る。

【０３８０】

以下の実施形態が考えられる：

Ａ．本明細書に記載されるＴＤＳＣ構築物、配列又は組成物を含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）。

Ｂ．カチオン性脂質を含む、実施形態Ａに記載のＬＮＰ。
Ｃ．カチオン性脂質が、
【化１９】



(i),

(ii), 又は

(iii)

で表される構造を有する、実施形態Ｂに記載のＬＮＰ。
Ｄ．１つ以上の中性脂質、例えば、ＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥ、ＳＭ、ステロイド、例えば、コレステロール、及び／又は１つ以上のポリマーコンジュゲート脂質、例えば、ペグ化脂質、例えば、ＰＥＧ－ＤＡＧ、ＰＥＧ－ＰＥ、ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ、ＰＥＧ－ｃｅｒ又はＰＥＧジアルキルオキシプロピルカルバメートをさらに含む、実施形態Ａ～Ｃのいずれかに記載のＬＮＰ。
【０３８１】
実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣを含むＬＮＰ製剤は、標的化エフェクターによる表面装飾によって、所望の細胞型に標的化され得る。このような標的化エフェクターとしては、例えば、標的細胞に結合する細胞特異的受容体リガンド；抗体又は標的細胞に対する他の結合剤；セントリン；細胞透過性ペプチド；エンドソーム脱出を可能にするペプチド（例えば、ＧＡＬＡ、ＫＡＬＡ）が挙げられる。概説に関して、例えば、Ｔａｉ　＆　Ｇａｏ．２０１７．Ａｄｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ　Ｒｅｖ．１１０－１１１：１５７－１６８の表１及び２を参照されたい。
【０３８２】
実施形態では、本明細書に記載されるＴＤＳＣを含むＬＮＰ製剤は、アジュバントと共投与され得、例えば、アジュバントと同じ製剤中で共送達され得る。
【０３８３】
投与経路
本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、任意の好適な経路によって細胞、組織又は対象に導入される。
【０３８４】
（例えば、エクスビボでの）標的細胞又は組織への投与は、当該技術分野において公知の方法、例えば、トランスフェクション、例えば、試薬（例えば、リポソーム、リン酸カルシウム）を用いた一過性若しくは安定トランスフェクション又は物理的手段（例えば、エレクトロポレーション、遺伝子銃、マイクロインジェクション、マイクロ流体せん断、細胞スクイージング）によって行われ得る。他の方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｒａｄ　ｅｔ　ａｌ．２０２１．Ａｄｖ．Ｍａｔｅｒ．３３：２００５３

６３に記載されている。
【０３８５】
対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト対象への投与は、非経口（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、又は頭蓋内）経路によって；局所投与、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）投与又は経皮（ｔｒａｎｓｃｕｔａｎｅｏｕｓ）投与によって行われ得る。他の好適な経路としては、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入（例えば、エアロゾルを介した）、口腔（例えば、舌下）、膣内、髄腔内、眼内、経皮、血管内皮内（ｉｎｔｒａｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ）、子宮内（又は卵内）、胸膜内、脳内、関節内、局所、リンパ管内が挙げられる。直接の組織又は器官注入（例えば、肝臓、眼、骨格筋、心筋、横隔膜、筋肉若しくは脳への）も含まれる。
【０３８６】
用途
本明細書に記載されるＴＤＳＣ、又はｄｓＤＮＡをコードする核酸は、対象、例えば、ヒト又は非ヒト動物のための治療又は医療用途において使用され得る。本明細書で提供される医薬組成物の説明は、主に、ヒトへの投与に好適な医薬組成物に関するが、このような組成物が、一般に、任意の他の動物への投与に好適であることが、当業者によって理解されるであろう。対象は、任意の動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト又は非ヒト哺乳動物であり得る。実施形態では、対象は、脊椎動物（例えば、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、又は両生類）である。実施形態では、対象はヒトである。実施形態では、本方法の対象は、非ヒト哺乳動物である。実施形態では、対象は、非ヒト哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類（例えば、サル、類人猿）、有蹄動物（例えば、ウシ、水牛、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ラクダ、ラマ、アルパカ、シカ、ウマ、ロバ）、肉食動物（例えば、イヌ、ネコ）、げっ歯類（例えば、ラット、マウス）、又はウサギ目の動物（例えば、ウサギ）である。実施形態では、対象は、鳥類、例えば、鳥類分類群のキジ目（Ｇａｌｌｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、キジ、ウズラ）、カモ目（Ａｎｓｅｒｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、アヒル、ガチョウ）、古顎類（Ｐａｌｅａｏｇｎａｔｈａｅ）（例えば、ダチョウ、エミュー）、ハト目（Ｃｏｌｕｍｂｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、ハト（ｐｉｇｅｏｎ）、ハト（ｄｏｖｅ））、又はオウム目（Ｐｓｉｔｔａｃｉｆｏｒｍｅｓ）（例えば、オウム）のメンバーである。実施形態では、対象は、無脊椎動物、例えば、節足動物（例えば、昆虫、クモ形類、甲殻類）、線虫、環形動物、寄生蠕虫、又は軟体動物である。
【０３８７】
一部の実施形態において、本明細書に記載されるＤＮＡは、約０．１～１００ｍｇ／ｋｇのＤＮＡの用量で提供される。
【０３８８】
一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、少なくとも２、３、４、５、６日又は１週間；少なくとも８、９、１０、１２、１４日又は２週間；少なくとも１６、１８、２０日又は３週間；少なくとも２２、２４、２５、２７、２８日又は１か月；少なくとも２か月、３か月、４か月、５か月、６か月又はそれ以上；１週間～６か月、１か月～６か月、３か月～６か月の期間にわたって、宿主細胞、組織又は対象に対して、エフェクターの生物学的効果、例えば、治療用ポリペプチドの発現を与える。
【０３８９】
一部の実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、エフェクターの生物学的効果、例えば、治療用ポリペプチドの発現を宿主細胞、組織又は対象に対し、宿主細胞が少なくとも１回細胞分裂する期間にわたって付与する。
【０３９０】
実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣを使用して、エフェクター、例えば、本明細書に記載されるエフェクターを細胞、組織又は対象に送達することができる。
【０３９１】
実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、細胞、組織又は対象における生

物学的パラメーターを調節する（例えば、増加又は減少させる）のに使用され得る。生物学的パラメーターは、標的細胞、組織又は対象における対象の遺伝子の遺伝子発現の増加又は減少であり得る。

【０３９２】

実施形態において、本明細書に記載されるＴＤＳＣは、本明細書に記載されるＴＤＳＣを、このような細胞、組織又は対象に投与することによって、それを必要とする細胞、組織又は対象を治療するのに使用され得る。

【０３９３】

実施形態において、ＴＤＳＣは、リンパ球（例えば、Ｔ細胞又は単球）、癌細胞（例えば、骨肉腫細胞）、ＨＥＫ２９３細胞、肝細胞、又は表皮細胞（例えば、ケラチノサイト）から選択される細胞にエフェクターを送達する。

【実施例】

【０３９４】

実施例１：線状ＴＤＳＣ用のプラスミド鋳型の設計及びアセンブリ

本例は、化学修飾された線状ＴＤＳＣ構築物用のプラスミド鋳型をどのように作成すればよいかについて記載する。本例では、構築物鋳型は、以下の特異的配列成分で設計される：

・プロモーターＥｆ１ａ：

【化２０】

5’ggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggtttttgggggccgcgggcggcgacgggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccgggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggagggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtga-3’

(配列番号37)

・モデル／マーカータンパク質（ｍＣｈｅｒｒｙ）をコードするエフェクター配列：

【化２１】

5’atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgcccctacgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggtggccccctgcccttcgcctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaaggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggccactacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgccactccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaa-3’（配列番号38）

【０３９５】

任意選択で、この構築物はまた、ＮＴＳ又は維持配列、例えば、

・ＮＴＳ：ＳＶ４０エンハンサー：５’－ｃｃｃａａｇａａｇａａｇａｇｇａａａｇｔｃ－３’（配列番号１）

・維持配列：ヒトインターフェロン－β　ＭＡＲ
５’ｔａｔａａｔｔｃａｃｔｇｇａａｔｔｔｔｔｔｔｇｔｇｔｇｔａｔｇｇｔａｔｇａｃａｔａｔｇｇｇｔｔｃｃｃｔｔｔｔａｔｔｔｔｔｔａｃａｔａｔａａａｔａｔａｔｔｔｃｃｃｔｇｔｔｔｔｔｔｃｔａａａａａａｇａａａａａｇａｔｃａｔｃａｔｔｔｔｃｃｃａｔｔｇｔａａａａｔｇｃｃａｔａｔｔｔｔｔｔｔｃａｔａｇｇｔｃａｃｔｔａｃａｔａ３’（配列番号１２１）
の一方又は両方も含み得る。
・ポリＡ部位：
【化２２】

5’ctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttt
cctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaaggg
ggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatgg3’（配列番号122）

【０３９６】
プラスミド鋳型が、標準的なＤＮＡ設計操作ソフトウェアを用いてこれらの要素により設計される。組み立てが、公開されたプロトコル及び市販のキット（Ｍａｒｉｌｌｏｎｎｅｔ　＆　Ｇｒｕｅｔｚｎｅｒ．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））に従って、Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ　Ａｓｓｅｍｂｌｙによって行われる。設計された構築物のＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅアセンブリが、関連する隣接断片に一致する最初の３０ｂｐ、新たな配列をコードする次の６０ｂｐ、及び標的配列にアニールする最後の３０ｂｐを含む１２０ｂｐの長さの一連のプライマーを用いて行われる。断片が、最終的な構築物設計へと組み立てられ（ＮＥＢ　Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ｋｉｔ）、配列が、製造業者のプロトコルに従ってＳａｎｇｅｒ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）によって確認される。
【０３９７】
実施例２：プラスミドＤＮＡから未修飾ＴＤＳＣへの変換
本例は、化学修飾ヌクレオチドのない、線状ｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣの作成について記載する。本例では、線状ｄｓＤＮＡは、実施例１のプラスミドからＰｒｉｍｅＳＴＡＲ（登録商標）Ｍａｘ　ＤＮＡポリメラーゼを製造業者のプロトコルに従い使用して作られる（Ｔａｋａｒａ、Ｒ０４５Ｑ）。ｄｓＤＮＡをＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）ゲル及びＰＣＲクリーンアップを製造業者のプロトコルに従い使用して精製し（Ｔａｋａｒａ、７４０６０９）、ｄｓＤＮＡの濃度をＱｕｂｉｔ（商標）１×ｄｓＤＮＡ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅにより製造業者のプロトコルに従い決定する（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｑ３３２６５）。
【０３９８】
実施例３：プラスミドＤＮＡから、センス鎖又はアンチセンス鎖のみが化学修飾されたＴＤＳＣへの変換
本例は、センス鎖又はアンチセンス鎖への化学修飾のみを有する線状ｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣの作成について記載する。Ｍｉｎｅｖ　ｅｔ　ａｌ．，２０１９，Ｒａｐｉｄ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｓｉｎｇｌｅ　ｓｔｒａｎｄｅｄ　ＤＮＡ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅ　４７，Ｉｓｓｕｅ　２２：１１９５６－１１９６２（これは参照により本明細書に援用される）の方法に従い、実施例１のプラスミド構築物を線状ｓｓＤＮＡに変換する。簡潔に言えば、化学修飾ヌクレオチドである５－メチルシトシン（５ｍＣ）を標準的なアデニン（ｄＡＴＰ）、グアニン（ｄＧＴＰ）、及びチミン（ｄＴＴＰ）と混合することにより、化学修飾鎖を作

成するためのＰＣＲ用のｄＮＴＰミックスを作成する。メタノール反応性ポリマーを担持するフォワードプライマーによるＰＣＲで、変性条件下での化学修飾鎖の選択的沈殿を可能にするタグが付加されたアンプリコンが生じる。センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかである線状ｓｓＤＮＡの濃度をＱｕｂｉｔ（商標）ｓｓＤＮＡアッセイキットにより製造業者のプロトコルに従い決定する（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｑ１０２１２）。

【０３９９】

相補鎖は、ｓｓＤＮＡを対応するプライマー及び未修飾ヌクレオチドを含むＰＣＲミックスと共にインキュベートすることにより作成される。このｄｓＤＮＡを、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）ゲル及びＰＣＲクリーンアップを製造業者のプロトコルに従い使用して精製し（Ｔａｋａｒａ、７４０６０９）、ｄｓＤＮＡの濃度をＱｕｂｉｔ（商標）１×ｄｓＤＮＡ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅにより製造業者のプロトコルに従い決定する（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｑ３３２６５）。

【０４００】

実施例４：プラスミドＤＮＡから、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方が化学修飾されたＴＤＳＣへの変換

本例は、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方に化学修飾ヌクレオチドを含む線状ｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣの作成について記載する。５－メチルシトシン（５ｍＣ）をｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、及びｄＴＴＰと混合してＰＣＲ用のｄＮＴＰミックスを作成することにより、実施例１のプラスミド構築物を化学修飾された線状ｄｓＤＮＡに変換する。ｄＮＴＰミックスをＰｒｉｍｅＳＴＡＲ（登録商標）Ｍａｘ　ＤＮＡポリメラーゼと共に製造業者のプロトコルに従い使用する（Ｔａｋａｒａ、Ｒ０４５Ｑ）。ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）ゲル及びＰＣＲクリーンアップを製造業者のプロトコルに従い使用してｄｓＤＮＡを精製し（Ｔａｋａｒａ、７４０６０９）、ｄｓＤＮＡの濃度をＱｕｂｉｔ（商標）１×ｄｓＤＮＡ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅにより製造業者のプロトコルに従い決定する（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｑ３３２６５）。

【０４０１】

実施例５：ＴＤＳＣの末端への化学修飾ヌクレオチドを含むエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の付加

本例は、構築物の両方の末端に化学修飾ヌクレオチドを含む実施例２～４の線状ｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣの作成について記載する。

【０４０２】

以下の配列を有するカスタムのアダプターを、化学修飾ヌクレオチドを含むように設計する：

【化２３】

5’-

C*C*C*GAGGCGGUACGAGCCACACGTACTAC**GCTCGTACCGCCUC*G*G*G**T-3’

（配列番号85）

（＊はホスホロチオエート結合を指示し、太字のヌクレオチドは相補的である）。実施例２～４のいずれかからの線状ｄｓＤＮＡをＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）Ｕｌｔｒａ（商標）ＩＩ末端修復／ｄＡ尾部付加モジュールで製造業者のプロトコルに従い処理する（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｅ７５４６）。このキットを使用すると、鋳型化されていないアデニンが線状ｄｓＤＮＡにおけるセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方の３’末端に付加される。次に、このカスタムのアダプターをＡ尾部付加後のｄｓＤＮＡに、ＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）Ｕｌｔｒａ（商標）ＩＩライゲーションモジュールを製造業者のプロトコルに従い使用してライゲートする（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｅ７５９５）。各末端にアダプター分子を有しないｄｓＤＮＡ構築物を除去するため、製造業者のプロトコルに従いｄｓＤＮＡをエキソヌクレアーゼＶＩＩＩで処理し、トラ

ンケートする（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｍ０５４５Ｓ）。ホスホロチオエート結合を含まないアダプターの残留片を除去するため、ｄｓＤＮＡをＵＳＥＲ（登録商標）酵素と共に製造業者のプロトコルに従いインキュベートして、アダプターにおけるウラシルヌクレオチドを除去する（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｍ５５０５）。次にｄｓＤＮＡをマングビーンヌクレアーゼで処理することによりアダプターから一本鎖ＤＮＡオーバーハングを除去し、末端にホスホロチオエート修飾を備える平滑末端化したｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣを作成する（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｍ０２５０）。

【０４０３】

ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）ゲル及びＰＣＲクリーンアップを製造業者のプロトコルに従い使用してｄｓＤＮＡを精製し（Ｔａｋａｒａ、７４０６０９）、ｄｓＤＮＡの濃度をＱｕｂｉｔ（商標）１×ｄｓＤＮＡ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅにより製造業者のプロトコルに従い決定する（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｑ３３２６５）。

【０４０４】

実施例６：ＴＤＳＣの末端へのループ構造を含むエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の付加

本例は、構築物の各末端にループ構造を備える実施例２～４の線状ｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣの作成について記載する。

【０４０５】

以下の配列を有するカスタムのアダプターを、化学修飾ヌクレオチドを含むように設計する：

【化２４】

5’-

CCCGGGCGGAAGAGCCACACGTACTAC**GCTCTTCCGCCCGGG**T-3’（配列番号93）

（太字のヌクレオチドは相補的である）。実施例２～４のいずれかからの線状ｄｓＤＮＡをＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）Ｕｌｔｒａ（商標）ＩＩ末端修復／ｄＡ尾部付加モジュールで製造業者のプロトコルに従い処理する（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｅ７５４６）。このキットを使用すると、鋳型化されていないアデニンが線状ｄｓＤＮＡにおけるセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方の３’末端に付加される。次に、このカスタムのアダプターをＡ尾部付加後のｄｓＤＮＡに、ＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）Ｕｌｔｒａ（商標）ＩＩライゲーションモジュールを製造業者のプロトコルに従い使用してライゲートする（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｅ７５９５）。各末端にアダプター分子を有しないｄｓＤＮＡ構築物を除去するため、製造業者のプロトコルに従いｄｓＤＮＡをエキソヌクレアーゼＶＩＩＩで処理し、トランケートする（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｍ０５４５Ｓ）。

【０４０６】

ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）ゲル及びＰＣＲクリーンアップを製造業者のプロトコルに従い使用してｄｓＤＮＡを精製し（Ｔａｋａｒａ、７４０６０９）、ｄｓＤＮＡの濃度をＱｕｂｉｔ（商標）１×ｄｓＤＮＡ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅにより製造業者のプロトコルに従い決定する（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｑ３３２６５）。

【０４０７】

実施例７：ＴＤＳＣの末端へのＹ型アダプターを含むエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態の付加

本例は、構築物の各末端にＹ型アダプターを備える実施例２～４のいずれかの線状ｄｓＤＮＡを含むＴＤＳＣの作成について記載する。

【０４０８】

以下の配列を有するカスタムのアダプターを、化学修飾ヌクレオチドを含むように設計する：

【化２５】

5’-

CCCGGGCGGA*C*A*G*C*A*CUC*A*C*G*A*C***TCCGCCCGGG**T-3’（配列番号89）

（＊はホスホロチオエート結合を指示し、太字のヌクレオチドは相補的である）。実施例２～４のいずれかからの線状ｄｓＤＮＡをＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）Ｕｌｔｒａ（商標）ＩＩ末端修復／ｄＡ尾部付加モジュールで製造業者のプロトコルに従い処理する（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｅ７５４６）。このキットを使用すると、鋳型化されていないアデニンが線状ｄｓＤＮＡにおけるセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方の３’末端に付加される。次に、このカスタムのアダプターをＡ尾部付加後のｄｓＤＮＡに、ＮＥＢＮｅｘｔ（登録商標）Ｕｌｔｒａ（商標）ＩＩライゲーションモジュールを製造業者のプロトコルに従い使用してライゲートする（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｅ７５９５）。各末端にアダプター分子を有しないｄｓＤＮＡ構築物を除去するため、製造業者のプロトコルに従いｄｓＤＮＡをエキソヌクレアーゼＶＩＩＩで処理し、トランケートする（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｍ０５４５Ｓ）。ループを線状ｓｓＤＮＡ鎖に変換するため、ｄｓＤＮＡをＵＳＥＲ（登録商標）酵素と共に製造業者のプロトコルに従いインキュベートして、アダプターにおけるウラシルヌクレオチドを除去する（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｍ５５０５）。

【０４０９】

ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（登録商標）ゲル及びＰＣＲクリーンアップを製造業者のプロトコルに従い使用してｄｓＤＮＡを精製し（Ｔａｋａｒａ、７４０６０９）、ｄｓＤＮＡの濃度をＱｕｂｉｔ（商標）１×ｄｓＤＮＡ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅにより製造業者のプロトコルに従い決定する（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、Ｑ３３２６５）。

【０４１０】

実施例８：ＬＮＰによるＴＤＳＣの製剤化

この実施例は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を用いて先の実施例において記載されるように作製される構築物を製剤化する方法を説明する。

【０４１１】

核酸構築物が、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１２．Ｊ　Ａｍ　Ｃｈｅｍ　Ｓｏｃ．Ｖｏｌｕｍｅ　１３４，Ｉｓｓｕｅ　１６：６９４８－６９５１の方法に従って、マイクロ流体デバイスによって脂質成分と組み合わされる。簡潔に述べると、マイクロ流体デバイスは、標準的なリソグラフィー手順（ＭｃＤｏｎａｌｄ　＆　Ｗｈｉｔｅｓｉｄｅｓ．２００２．Ａｃｃｏｕｎｔｓ　Ｃｈｅｍ　Ｒｅｓ　Ｖｏｌｕｍｅ　３５，Ｉｓｓｕｅ　７：４９１－４９９）に従って、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）中で製造される。典型的に、カチオン性脂質、コレステロール、ヘルパー脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及び標的部分コンジュゲーションを促進する脂質（任意）を含有する脂質成分が、９０％のエタノール中で組み合わされ、可溶化される。核酸構築物は、緩衝液に溶解される。核酸溶液、脂質溶液、及びリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）が、マイクロ流体デバイス中に注入される。新たに調製されたＬＮＰが、３．５ｋＤのＭＷＣＯを有する膜を用いてＰＢＳ緩衝液に対して透析されて、エタノール及び交換緩衝液が除去される。

【０４１２】

ＬＮＰは、動的光散乱（ＤＬＳ）（ＺｅｔａＰＡＬＳ、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、ＮＹ、１５ｍＷレーザー、入射ビーム６７６ｎｍ）を用いて有効直径、多分散性、及びゼータ電位の点で特徴付けられ；及び総核酸濃度は、粒子を溶解させ、及びＱｕａｎｔ－ｉＴ（商標）１×ｄｓＤＮＡアッセイキット、高感度（ＨＳ）及び広域（ＢＲ）を製造業者のプロトコルに従い使用することにより決定される（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｑ３３２３２）。

【０４１３】

実施例９：細胞における発現及び自然免疫応答のインビトロ評価

本例は、遺伝子発現をどのように試験すればよいか、並びにＴＤＳＣが培養細胞の自然免疫応答に及ぼす効果をどのように決定すればよいかについて記載する。

【０４１４】

上記の実施例２～７にあるように実験用ＴＤＳＣ構築物を調製する。ＨＥＫ、ケラチノサイト、マクロファージ、Ｔ細胞及び上皮細胞から選択される細胞に、構築物及び対照をエレクトロポレーションによって複数の濃度で投与する。並行して未処理対照試料のランを行ってもよい。エレクトロポレーション後、細胞を最終的な培養ベッセルに移す。ＬＮＰで製剤化した構築物をウェルプレート内の細胞に直接投与する。

【０４１５】

蛍光レポーターｍＣｈｅｒｒｙをコードする構築物の発現を決定するために、細胞が、フローサイトメトリー分析の前に、ＰＢＳで最初に洗浄される。全てのフローサイトメトリーが、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ製のＭＡＣＳＱｕａｎｔ　ＶＹＢにおいて行われる。ｍＣｈｅｒｒｙシグナルの検出のために、黄色レーザー（波長５６１ｎｍ）が、励起のために使用され、６１５／６２０ｎｍの発光フィルタが使用される。２０，０００の事象が、各試料について記録され、データが、Ｆｌｏｗｊｏ　Ｖ．９．０ソフトウェアを用いて分析される。細胞が、ＦＳＣ－Ａ及びＳＳＣ－Ａプロットにおいて最初にゲーティングされて、細胞残屑が除去される。集団が、単一細胞集団を囲むように、ＦＳＣ－Ａ及びＦＳＣ－Ｈプロットにおいてさらにプロットされる。最後に、蛍光シグナル発現細胞と非発現細胞との間の二変量プロットを使用して、発現細胞のパーセンテージを決定する。発現細胞の分布を使用して、各細胞内の発現のレベルを決定する。発現分析が、複数の時点で行われる。

【０４１６】

Ｊａｋｏｂｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１３．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　Ｖｏｌｕｍｅ　１１０，Ｉｓｓｕｅ　４８：Ｅ４５７１－８０に記載されるように、試験細胞におけるＩＦＮ－ｂのＲＮＡレベルを決定するために、ｑＰＣＲが、細胞において行われる。簡潔に述べると、ｑＰＣＲにおいて使用されるプローブ－プライマーセットは、ヒトＩＦＮ－ｂ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｈｓ０１０７７９５８＿ｓ１）及びｂ－アクチン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｈｓ００３５７３３３＿ｇ１）である。分析は、予め作製されたＴａｑｍａｎアッセイ及びＲＮＡ－ｔｏ－Ｃｔ　ｏｎｅ　ｓｔｅｐ　ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて行われる。ｑＰＣＲは、ＭＸ３００５システム（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）において行われる。ＲＮＡ発現が、ｂ－アクチン及び関連する非処理の対照に対して正規化される。データが、生物学的反復からの平均±ＳＥＭとして表される。

【０４１７】

ＥＬＩＳＡが、ＩＦＮ－ｂの分泌レベルを決定するために、製造業者のプロトコルに従って、細胞上清において行われる。

【０４１８】

実施例１０．閉鎖型末端を含むＴＤＳＣについてのエキソヌクレアーゼ耐性の決定

本例は、閉鎖型末端を含むＴＤＳＣ（例えば、アダプターをライゲートした線状ｄｓＤＮＡ構築物）がエキソヌクレアーゼＩＩＩ（Ｍ０２０６、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）耐性を示すかどうかをどのように試験すればよいかについて記載する。ＴＤＳＣは、非ヌクレアーゼ対照の次に試験する。非ヌクレアーゼ対照は、目的のＴＤＳＣと同一の配列のＤＮＡを含んでいるが、但しそれが、ＴＤＳＣにエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態を付加するために用いられる、しかし混合物にアダプターオリゴヌクレオチドを加えないアダプターライゲーションプロトコルを受けたものである点は異なる。５０μＬ中５μｇのＤＮＡにつき１μＬのエキソヌクレアーゼＩＩＩ（１００単位／ｕＬの出発濃度）を加える。チューブを良く混合し、スピンダウンする。これらのチューブについてサーモサイクラーで３７℃で１時間のランを実行し、７０℃で３０分間熱失活させる。

【０４１９】

試料をＮｕｃｌｅｏｓｐｉｎ（登録商標）ゲル及びＰＣＲクリーンアップキット（カタ

ログ番号７４０６０９、Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ）で真空マニホールドを使用して製造業者のプロトコルに従い精製する。簡潔に言えば、溶出緩衝液を７０℃に加温する。２倍容量のＮＴＩ結合緩衝液を１倍容量のＥｘｏ　ＩＩＩ処理ＤＮＡに加える。試料を一様に分布するまで混合し、室温に５分間放置する。真空マニホールド上のカラムを固定し、バルブを開放し、真空をオンにする。３７５μＬ　ＤＮＡ－ＮＴＩミックスを２×カラムに加え、各カラムに完全に通過させる。７００μＬのＮＴＣ洗浄緩衝液を２回加える。真空マニホールドからカラムを取り外し、コレクションチューブに入れる。アセンブリを１１，０００×ｇで１分間遠心する。カラムを新しい低結合性微量遠心管に入れ、２５μＬの予め温めた緩衝液を加え、このアセンブリを７０℃で５分間インキュベートする。アセンブリを１１，０００×ｇで１分間遠心する。２回目のインキュベーション及び溶出工程を繰り返す。収集されたＤＮＡをｄｓＤＮＡ　ＢＲ　Ｑｕｂｉｔ（Ｑ３２８５０、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によりＱｕｂｉｔ　４蛍光光度計（Ｑ３３２２６、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で製造業者のプロトコルに従い定量化する。

【０４２０】

試料をＥ－Ｇｅｌ　ＥＸ、１％アガロースゲル（Ｇ４０２０２１、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の個々のウェルにウェル当たり１６ｎｇのＤＮＡの量でロードする。ラダー（１０４８８０９０、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）は２μｌでゲルの最も左側のレーンにロードする。ゲルのランは、Ｅ－Ｇｅｌ　Ｐｏｗｅｒ　Ｓｎａｐ電気泳動システムで製造業者のプロトコルに従い実行する（Ｇ８１００、Ｇ８２００、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。ゲルのラン後、エキソヌクレアーゼ耐性ＴＤＳＣは、完全長ＤＮＡ＋閉鎖型アダプター配列に対応する分子量のところに見える。ＴＤＳＣは、当該レーンでゲルに現れる産物の少なくとも９５％が完全長ＴＤＳＣに対応する場合、このアッセイでエキソヌクレアーゼ耐性であると見なされることになる。

【０４２１】

実施例１１．開放型末端（例えば、２つの開放型末端）を含むＴＤＳＣについてのエキソヌクレアーゼ耐性の決定

本例は、開放型末端を含むＴＤＳＣ（例えば、アダプターをライゲートした線状ｄｓＤＮＡ構築物）がエキソヌクレアーゼＩＩＩ（Ｍ０２０６、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）耐性を示すかどうかをどのように試験すればよいかについて記載する。ＴＤＳＣは、非ヌクレアーゼ対照の次に試験する。非ヌクレアーゼ対照は、目的のＴＤＳＣと同一の配列のＤＮＡを含んでいるが、但しそれが、ＴＤＳＣにエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態を付加するために用いられる、しかし混合物にアダプターオリゴヌクレオチドを加えないアダプターライゲーションプロトコルを受けたものである点は異なる。２０ｕｌ反応液中２００ｎｇのＤＮＡ（１０ｎｇ／ｕｌ）につき２単位のエキソヌクレアーゼＩＩＩを加える。チューブを良く混合し、スピンダウンする。これらのチューブについてサーモサイクラーで３７℃で３０分間のランを実行する。

【０４２２】

試料をＥ－Ｇｅｌ　ＥＸ、１％アガロースゲル（Ｇ４０２０２１、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の個々のウェルにウェル当たり２０ｎｇのＤＮＡの量でロードする。ラダー（１０４８８０９０、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）は２μｌでゲルの最も左側のレーンにロードする。ゲルのランは、Ｅ－Ｇｅｌ　Ｐｏｗｅｒ　Ｓｎａｐ電気泳動システムで製造業者のプロトコルに従い実行する（Ｇ８１００、Ｇ８２００、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。ゲルのラン後、エキソヌクレアーゼ耐性ＴＤＳＣは、完全長ＤＮＡ＋閉鎖型アダプター配列に対応する分子量のところに見える。ＴＤＳＣは、当該レーンでゲルに現れる産物の少なくとも９５％が完全長ＴＤＳＣに対応する場合、このアッセイでエキソヌクレアーゼ耐性であると見なされることになる。

【０４２３】

４つの試料：「Ｃｔ」と称される対照（未修飾）ＴＤＳＣ；各鎖の５’末端及び３’末端の各々に６つのホスホロチオエート結合を含む「６ａ」と称されるＴＤＳＣ（図７Ｂに図示される）；各鎖の５’末端及び３’末端の各々に３つのホスホロチオエート結合を含む「３ａ」と称されるＴＤＳＣ（図７Ｃに図示される）；及び各Ｙ型アダプターが各鎖の末端に６つのホスホロチオエート結合を含む同一のＹ型アダプターを各末端に含む「Ｙａ」と称されるＴＤＳＣ（図７Ｄに図示される）に関して、本実施例のエキソヌクレアーゼＩＩＩ消化プロトコルを実施した。図７Ａに示されるとおり、対照ＤＮＡ「Ｃｔ」は消化されたが、一方、ホスホロチオエート修飾ありの３つのＴＤＳＣは、エキソヌクレアーゼＩＩＩ消化に対して耐性を示した。

【０４２４】

実施例１２：開放型末端を含むＴＤＳＣの製造

本例は、開放型末端を含むＴＤＳＣ（例えば、ホスホロチオエート結合を含む）を、ＵＳＥＲ（Ｍ５５０５、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）及びマングビーンヌクレアーゼ（Ｍ０２５０、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）処理工程を用いてどのように生成すればよいかについて記載する。このプロセスは、閉鎖型末端を含むプロトＴＤＳＣから始まる。プロトＴＤＳＣは、非ヌクレアーゼ対照の次に処理される。非ヌクレアーゼ対照は、ＴＤＳＣと同一の配列のＤＮＡを含んでいるが、但しそれが、ＴＤＳＣにエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態を付加するために用いられる、しかし混合物にアダプターオリゴヌクレオチドを加えないアダプターライゲーションプロトコルを受けたものである点は異なる。

【０４２５】

これらのプロトＴＤＳＣ試料は、初めに、実施例１０に記載されるとおりのエキソヌクレアーゼＩＩＩ耐性を確認する工程を通じて処理される。１００μＬ中の実施例１０からの精製した試料からの５μｇのＤＮＡに３μＬのＵＳＥＲ酵素を加える。ＵＳＥＲ処理によってループに位置するウラシルが除去されることにより、閉鎖型末端が開いてＹ型アダプター様構造が形成される。試料を３７℃で１時間インキュベートする。１μＬのマングビーンヌクレアーゼ（１０Ｕ／μＬ）を各チューブに加える。試料を３０℃で３０分間インキュベートする。マングビーンヌクレアーゼにより一本鎖ＤＮＡが分解され、平滑末端化したＴＤＳＣが生じる。

【０４２６】

試料をＮｕｃｌｅｏｓｐｉｎ（登録商標）ゲル及びＰＣＲクリーンアップキット（７４０６０９、Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ）で真空マニホールドを使用して製造業者のプロトコルに従い精製する。簡潔に言えば、溶出緩衝液を７０℃に加温する。２倍容量のＮＴＩ結合緩衝液を１倍容量のＵＳＥＲ／ＭＢＮ処理後のＤＮＡに加える。試料を一様に分布するまで混合し、室温に５分間放置する。真空マニホールド上のカラムを固定し、バルブを開放し、真空をオンにする。カラムにＤＮＡ－ＮＴＩミックスを加え、各カラムに完全に通過させる。７００μＬのＮＴＣ洗浄緩衝液を２回加える。真空マニホールドからカラムを取り外し、コレクションチューブに入れる。アセンブリを１１，０００×ｇで１分間遠心する。カラムを新しい低結合性チューブに入れ、２５μＬの予め温めた緩衝液を加え、アセンブリを７０℃で５分間インキュベートする。アセンブリを１１，０００×ｇで１分間遠心する。２回目のインキュベーション及び溶出工程を繰り返す。収集されたＤＮＡをｄｓＤＮＡ ＢＲ Ｑｕｂｉｔ（Ｑ３２８５０、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によりＱｕｂｉｔ ４蛍光光度計（Ｑ３３２２６、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で製造業者のプロトコルに従い定量化する。

【０４２７】

ＴＤＳＣが生成されたことを確かめるため、試料をＥ－Ｇｅｌ ＥＸ、１％アガロースゲル（Ｇ４０２０２１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の個々のウェルにウェル当たり１６ｎｇのＤＮＡの量でロードする。ラダー（１０４８８０９０、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）は２μｌでゲルの最も左側のレーンにロードする。ゲルのランは、Ｅ－Ｇｅｌ Ｐｏｗｅｒ Ｓｎａｐ電気泳動システムで

製造業者のプロトコルに従い実行する（Ｇ８１００、Ｇ８２００、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。ゲルのラン後、ＴＤＳＣは、完全長ＤＮＡ＋アダプター配列に対応する分子量のところに見える。

【０４２８】

実施例１３：Ｙ型アダプターを含むＴＤＳＣの製造

本例は、開放型末端形態を作成するためにＵＳＥＲ（Ｍ５５０５、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）を使用して、Ｙ型アダプター末端修飾線状ｄｓＤＮＡ構築物）を含むＴＤＳＣをどのように生成すればよいかについて記載する。このプロセスは、閉鎖型末端を含むプロトＴＤＳＣで始める。プロトＴＤＳＣは、非ヌクレアーゼ対照の次に試験する。非ヌクレアーゼ対照は、ＴＤＳＣと同一の配列のＤＮＡを含んでいるが、但しそれが、ＴＤＳＣにエキソヌクレアーゼ耐性ＤＮＡ末端形態を付加するために用いられる、しかし混合物にアダプターオリゴヌクレオチドを加えないアダプターライゲーションプロトコルを受けたものである点は異なる。

【０４２９】

これらのプロトＴＤＳＣ試料は、初めに、実施例１０に記載されるとおり、エキソヌクレアーゼＩＩＩ耐性を確認する工程を通じて処理される。１００μＬ中の実施例１０からの精製した試料からの５μｇのＤＮＡに３μＬのＵＳＥＲ酵素を加える。試料を３７℃で１時間インキュベートする。ＵＳＥＲ処理によってループに位置するウラシルが除去されることにより、閉鎖型末端が開いてＹ型アダプターが形成され、Ｙ型アダプター末端形態を含むＴＤＳＣが生じる。

【０４３０】

試料をＮｕｃｌｅｏｓｐｉｎ（登録商標）ゲル及びＰＣＲクリーンアップキット（７４０６０９、Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ）で真空マニホールドを使用して製造業者のプロトコルに従い精製する。簡潔に言えば、溶出緩衝液を７０℃に加温する。２倍容量のＮＴＩ結合緩衝液を１倍容量のＵＳＥＲ／ＭＢＮ処理後のＤＮＡに加える。試料を一様に分布するまで混合し、室温に５分間放置する。真空マニホールド上のカラムを固定し、バルブを開放し、真空をオンにする。カラムにＤＮＡ－ＮＴＩミックスを加え、各カラムに完全に通過させる。７００μＬのＮＴＣ洗浄緩衝液を２回加える。真空マニホールドからカラムを取り外し、コレクションチューブに入れる。アセンブリを１１，０００×ｇで１分間遠心する。カラムを新しい低結合性チューブに入れ、２５μＬの予め温めた緩衝液を加え、このアセンブリを７０℃で５分間インキュベートする。アセンブリを１１，０００×ｇで１分間遠心する。２回目のインキュベーション及び溶出工程を繰り返す。収集されたＤＮＡをｄｓＤＮＡ ＢＲ Ｑｕｂｉｔ（Ｑ３２８５０、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によりＱｕｂｉｔ ４蛍光光度計（Ｑ３３２２６、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で製造業者のプロトコルに従い定量化する。

【０４３１】

最終的な末端形態が作成されていることを実証するため、ＵＳＥＲ処理したＤＮＡの少量のアリコートを５０μＬの反応液中５μｇのＤＮＡにつき１μＬのエキソヌクレアーゼＩＩＩで処理する。最終的な末端形態の作成に成功した場合には、アリコートのＴＤＳＣがエキソヌクレアーゼＩＩＩによって分解されることになる。

【０４３２】

試料をＥ－Ｇｅｌ ＥＸ、１％アガロースゲル（Ｇ４０２０２１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の個々のウェルにウェル当たり１６ｎｇのＤＮＡの量でロードする。ラダー（１０４８８０９０、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）は２μｌでゲルの最も左側のレーンにロードする。ゲルのランは、Ｅ－Ｇｅｌ Ｐｏｗｅｒ Ｓｎａｐ電気泳動システムで製造業者のプロトコルに従い実行する（Ｇ８１００、Ｇ８２００、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。ゲルのラン後、Ｙ型アダプターが付加されたＴＤＳＣは、完全長ＤＮＡ＋アダプター配列に対応する分子量のところにあるが、一方、エキソヌクレアーゼＩＩＩ処理後のＹ型アダプターが付加されたＤＮＡ形態は、ゲル上に見られない。

【０４３３】

実施例１４：二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）分子の生成用プラスミド鋳型の設計及びアセンブリ

本例は、ｄｓＤＮＡ分子、例えば、ＴＤＳＣ用のプラスミド鋳型の生成について記載する。本例では、以下の特異的配列成分を有する構築物鋳型を設計した。

・プロモーターＥｆ１ａ：

【化２６】

5’ggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttttgggggccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtga-3’（配列番号37）

・モデル／マーカータンパク質（ｍＣｈｅｒｒｙ）をコードするエフェクター配列：

【化２７】

5’atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgcccctacgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggtggccccctgcccttcgcctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggccactacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgccactccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaa-3’（配列番号38）

【０４３４】

任意選択：

・ＮＴＳ：ＳＶ４０エンハンサー：５’－ｃｃｃａａｇａａｇａａｇａｇｇａａａｇｔｃ－３’（配列番号１）

・維持配列：ヒトインターフェロン－β　ＭＡＲ

５’ｔａｔａａｔｔｃａｃｔｇｇａａｔｔｔｔｔｔｔｇｔｇｔｇｔａｔｇｇｔａｔｇａｃａｔａｔｇｇｇｔｔｃｃｃｔｔｔｔａｔｔｔｔｔｔａｃａｔａｔａａａｔａｔａｔｔｔｃｃｃｔｇｔｔｔｔｔｔｃｔａａａａａａｇａａａａａｇａｔｃａｔｃａｔｔｔｔｃｃｃａｔｔｇｔａａａａｔｇｃｃａｔａｔｔｔｔｔｔｔｃａｔａｇｇｔｃａｃｔｔａｃａｔａ３’（配列番号３９）

・第２鎖モチーフ：ＡＡＶ２野生型ＩＴＲ

５’ａｇｇａａｃｃｃｃｔａｇｔｇａｔｇｇａｇｔｔｇｇｃｃａｃｔｃｃｃｔｃｔｃｔｇｃｇｃｇｃｔｃｇｃｔｃｇｃｔｃａｃｔｇａｇｇｃｃｇｇｇｃｇａｃｃａａａｇｇｔｃｇｃｃｃｇａｃｇｃｃｃｇｇｇｃｔｔｔｇｃｃｃｇｇｇｃｇｇｃｃｔｃａｇｔｇａｇｃｇａｇｃｇａｇｃｇｃｇｃａｇｃｔｇｃｃｔｇｃａｇｇ－３’（配列番号２６）

【０４３５】
標準的なＤＮＡ設計操作ソフトウェアを使用して、これらのエレメントでプラスミド鋳型を設計した。設計し終えたところで、ＰＣＲ増幅で鋳型として使用するため、プラスミドを供給業者（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）に注文した。
【０４３６】
実施例１５：化学修飾を有するＴＤＳＣの生成
本実施例は、５－ホルミル－２’－デオキシシトシン（５－ホルミルシトシン）など、化学修飾を有するシトシンが含まれた二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）分子、例えば、ＴＤＳＣの調製を実証する。
【０４３７】
プラスミドＤＮＡ（１０ｎｇ／５０ｕｌ　ＰＣＲ反応）を、ＫＯＤポリメラーゼ（７１０８６４、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）又はＫＯＤ　Ｘｔｒｅｍｅ（ＫＯＤＸ）ポリメラーゼ（７１９７５３、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を使用したＰＣＲ増幅用の鋳型として使用した。他の市販のポリメラーゼもまた使用し得る。使用した製品バージョンを、マスターミックスフォーマットというよりむしろ、その構成成分に分けることにより、修飾ヌクレオチドと標準ｄＮＴＰとの比が正確であることを確実にした。各酵素についてのＰＣＲ反応条件には、以下が含まれる：
ａ．ＫＯＤ酵素について、２ｍＭの最終濃度の$MgSO_4$。
ｂ．１００ｍＭ　ｄＮＴＰ溶液セット（Ｎ０４４６、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）、２００μＭの最終濃度。
ｃ．修飾デオキシヌクレオシド三リン酸（例えば、５－ホルミル－ｄＣＴＰ、Ｎ－２０６４、Ｔｒｉｌｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を、合計２００μＭとなるように（即ち、２００μＭ　ｄＡＴＰ、２００μＭ　ｄＣＴＰ、２００μＭ　ｄＴＴＰ、及び２００μＭ　ｄＧＴＰ）、そのコグネイトｄＮＴＰに対して様々な比で加えた。このように、反応を２５％の取込み率で設計すれば、５０μＭ修飾ヌクレオチド及び１５０μＭ未修飾ヌクレオチドとなり得る。
ｄ．３００μＭの最終濃度のフォワード及びリバースプライマー。
【０４３８】
共有結合閉鎖型ＴＤＳＣの合成について、プライマーは、ライゲーション効率向上のためのリン酸基又はＴｅｌＮ認識配列のいずれかを含んだ。
【０４３９】
環状二本鎖ＤＮＡ形態の合成のため、プラスミドに相補的な配列を含んだことに加えて、プライマーは、下流処理において有用な追加の配列：
ａ．１つ又は複数のニッキング酵素の認識配列；
ｂ．制限酵素消化後のＤＮＡの粘着末端の作成及びＤＮＡ環状化の促進に使用される、制限酵素認識配列（例えば、ＢｓａＩ、ＫｐｎＩ、又はＮｈｅＩ）；及び
ｃ．制限酵素消化効率を増加させるための追加の塩基（例えば、５’－ＣＣＧＴＧＧＴＣＣＴＴＣ－３’）（配列番号４０）
を含んだ。
【０４４０】
いずれの形態についても、ＰＣＲ産物は標準的なＤＮＡ精製カラムを使用して精製した。
【０４４１】
図８は、ホスホロチオエート修飾を含む末端形態を備える共有結合閉鎖型ＴＤＳＣの生成を示す。ホスホロチオエート修飾を含む末端形態（ホスホロチオエート末端形態）を備えるＴＤＳＣについては、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｕｌｔｒａ　ＩＩ末端修復／ｄＡ尾部付加緩衝液（８μＬ）及び酵素（３μＬ）ミックス（Ｅ７５４６Ｌ）に、初めに２０℃で３０分間、次に６５℃で３０分間、１回の反応につき５０μＬ中最大１０μｇのＰＣＲ　ＤＮＡを加えた。氷上で短時間冷却した後、ライゲーションミックス（３０μＬ）、ライゲーションエンハンサー（１μＬ）、及びライゲートしようとするＤＮＡアダプターを含有する

３μＬの１００μＭ溶液を含めたＮＥＢＮｅｘｔ　Ｕｌｔｒａ　ＩＩライゲーションモジュール成分を加えた。この反応液を１時間超、但し典型的には一晩インキュベートした。次にライゲーション後のＰＣＲ－アダプター溶液をＮｕｃｌｅｏｓｐｉｎ　Ｍｉｄｉカラムにより精製し、Ｎａｎｏｄｒｏｐにより定量化し、任意のライゲートされなかったＰＣＲをＥｘｏＩＩＩ（ＮＥＢ　Ｍ０２０６）によって３７℃で１時間クリーンアップした。

【０４４２】

図９は、ＴｅｌＮ末端形態を備える共有結合閉鎖型ＴＤＳＣの生成を示す。ＴｅｌＮ末端形態を備えるＴＤＳＣについては、１μｇのＰＣＲ　ＤＮＡを、４μＬ　１０×ＴｈｅｒｍｏＰｏｌ緩衝液、２μＬ　ＴｅｌＮプロテロメラーゼ（Ｍ０６５１、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を含有する４０μＬ反応液中３０℃で１時間インキュベートした。次にＴｅｌＮ修飾されたＤＮＡをＺｙｍｏ　ＤＣＣ－１００カラムにより精製し、Ｎａｎｏｄｒｏｐにより定量化し、任意の修飾されなかったＰＣＲをＥｘｏＩＩＩ（ＮＥＢ　Ｍ０２０６）によって３７℃で１時間クリーンアップした。

【０４４３】

図１０は、環状ｄｓＤＮＡ分子の生成を示す。環状ｄｓＤＮＡ分子の合成については、ＤＮＡを一晩反応液中にて、制限酵素認識配列に対応する制限酵素、例えば、ＫｐｎＩ－ＨＦ－Ｖ２（Ｒ３１４２、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して消化した。次にＤＮＡをＤＮＡ精製カラムを使用して精製した。消化したＤＮＡをＴ３　ＤＮＡリガーゼ（Ｍ０３１７、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して２６℃で１時間環状化した。ＤＮＡをＴ５エキソヌクレアーゼ（Ｍ０６６３Ｌ、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）と共に３７℃で１時間インキュベートすることにより、環状化されなかったＤＮＡを分解させた。環状ｄｓＤＮＡでなく、線状ｄｓＤＮＡを消化するため、Ｔ５エキソヌクレアーゼを使用した。ＤＮＡ精製カラムを使用してＤＮＡを精製した。他の類似の方法、例えば、アガロースゲル精製もまた使用し得る。

【０４４４】

得られた二本鎖ＤＮＡ形態の組成及び純度の分析をＡｇｉｌｅｎｔ　５３００フラグメントアナライザーでＣＲＩＳＰＲ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙキット（ＤＮＦ－９３０－Ｋ１０００ＣＰ）を使用して実施した。ｄｓＤＮＡ流入緩衝液及びインターカレート色素を含む泳動用ゲルを毎日新鮮に調製し、一方、鉱油オーバーレイ及びキャピラリーコンディショニング溶液を含むマーカートレイを毎月新鮮に調製した。これらの緩衝液は、製造業者の仕様書に合わせて調製した。環状二本鎖ＤＮＡ試料を１００ｐｇ／ｕＬの最終濃度となるように水で希釈した。各サンプルウェルにつき、２２ｕＬの希釈緩衝液（０．１×ＴＥ）に２ｕＬのＤＮＡ試料を加え、各試料のランは２～４レプリケートで実行し、１ウェルをＭＤＫ　ＤＮＡラダーに使用した。試料のランは、測定器制御ソフトウェアによってＣＲＩＳＰＲ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｍｅｔｈｏｄ（ＣＲＰ－９１０－３３）のデフォルト設定を使用して実行した。

【０４４５】

ＰｒｏＳｉｚｅデータ分析ソフトウェアｖ４．０．２．７を使用して試料トレースを分析した。ｄｓＤＮＡのピーク分析条件は、「Ｐｅａｋ　Ｗｉｄｔｈ（ｓｅｃ）」を５及び「Ｍｉｎ．ｐｅａｋ　ｈｅｉｇｈｔ（ＲＦＵ）」を５０、＃　Ｅｘｔｒａ　Ｖａｌｌｅｙ　Ｐｏｉｎｔｓを３、及び「Ｖａｌｌｅｙ　ｔｏ　Ｖａｌｌｅｙ　Ｂａｓｅｌｉｎｅ？」を有効という標準的な条件に設定した。手動ベースラインは、低い方のマーカーから－２分及び高い方のマーカーまで＋２分に設定した。幅広のピーク、ピークの肩、又は狭いサイズ範囲内での複数のピークに起因して手動調整が必要な例を除けば、ピークはソフトウェアによりこれらの条件下で自動検出され、ピーク幅はソフトウェアにより選択された。

【０４４６】

図１１～図１３は、５’シトシン修飾を備えるｄｓＤＮＡ形態のフラグメントアナライザートレースを示す。図１１は、２５％５－ホルミルシトシンを使用した反応で生成して上記に記載されるとおり精製した環状ｄｓＤＮＡ構築物を示す。図１２～図１３は、２５％５－ホルミルシトシンを使用した反応で生成して上記に記載されるとおり精製した、ホ

スホロチオエート末端形態（図１２）及びＴｅｌＮ末端形態（図１３）を備える線状共有結合閉鎖型ｄｓＤＮＡ構築物を示す。各トレース中、単一のピーク（矢印で指示される）が明らかに見える。これらの結果は、複数のＴＤＳＣ形態を、化学修飾ヌクレオチド（例えば、５－ホルミルシトシン）を含むものを含め、生成して精製し得ることを指示している。

【０４４７】

実施例１６：ＴＤＳＣ遺伝子発現のインビトロ評価

本例は、培養細胞での化学修飾ＴＤＳＣを使用した遺伝子発現の検出及び定量化を実証する。

【０４４８】

実験構築物及び対照を、脂質トランスフェクション（リポフェクション）によって投与した。ＤＮＡのためのリポフェクションを、製造業者の指示に従って、ＨＥＫａ細胞内でＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００トランスフェクション試薬（＃　Ｌ３０００００１、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を用いて行った。１：２：３の比率のＤＮＡ：Ｐ３０００：Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００を、全てのＤＮＡ構築物及び対照に使用した。１０，０００個の細胞を、トランスフェクションの１日前に９６ウェルプレートの各ウェル内に予め播種した。細胞がほぼ８０～９０％のコンフルエンスに達するまで、トランスフェクションを行った。９６ウェルプレートの各ウェルについて、３×Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００を、５ｕＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ（商標）Ｉ　Ｒｅｄｕｃｅｄ　Ｓｅｒｕｍ　Ｍｅｄｉｕｍ（＃３１９８５０７０、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）中で最初に希釈した。ＤＮＡを、２×Ｐ３０００試薬とともに５ｕＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ（商標）Ｉ　Ｒｅｄｕｃｅｄ　Ｓｅｒｕｍ　Ｍｅｄｉｕｍ中で希釈した。次に、ＤＮＡを、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（商標）Ｉ　Ｒｅｄｕｃｅｄ　Ｓｅｒｕｍ　Ｍｅｄｉｕｍを含有するＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００に加え、ピペット操作によって穏やかに混合した。室温で１５分間インキュベートした後、ＤＮＡ－Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００複合体を、ウェルの異なる領域に滴下する方式で、完全培養培地とともに標的細胞に加えた。プレートを、前後左右に穏やかに揺動させて、ＤＮＡ－Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ３０００複合体を均一に分配した。トランスフェクションの後、細胞を、CO_2組織培養インキュベータ中でインキュベートし、培養培地を、トランスフェクションの６～８時間後に交換した。

【０４４９】

蛍光レポーターｍＣｈｅｒｒｙをコードする構築物の発現を決定するために、細胞を、フローサイトメトリー分析の前に、ＰＢＳで最初に洗浄した。全てのフローサイトメトリーを、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ製のＭＡＣＳＱｕａｎｔ　ＶＹＢにおいて行った。ｍＣｈｅｒｒｙシグナルの検出のために、黄色レーザー（波長５６１ｎｍ）を、励起のために使用し、６１５／６２０ｎｍの発光フィルタを使用した。２０，０００の事象を、各試料について記録し、データを、Ｆｌｏｗｊｏ　Ｖ．９．０ソフトウェアを用いて分析した。細胞を、ＦＳＣ－Ａ及びＳＳＣ－Ａプロットにおいて最初にゲーティングして、細胞残屑を除去した。集団を、単一細胞集団を囲むように、ＦＳＣ－Ａ及びＦＳＣ－Ｈプロットにおいてさらにプロットした。最後に、蛍光シグナル発現細胞と非発現細胞との間の二変量プロットを使用して、発現細胞のパーセンテージを決定した。発現細胞の分布を使用して、各細胞内の発現のレベルを決定した。発現分析を、複数の時点で行った。

【０４５０】

図１４Ａ～図１４Ｂは、化学修飾あり又はなしで生成した複数のＴＤＳＣ構築物が、レポーター遺伝子の発現を可能にすることを示している。ＨＥＫａ細胞において、３つの異なる構造－環状二本鎖、ホスホロチオエート末端形態を備える共有結合閉鎖型ＴＤＳＣ、及びＴｅｌＮ末端形態を備える共有結合閉鎖型ＴＤＳＣ－を備えるｄｓＤＮＡで、レポータータンパク質ｍＣｈｅｒｒｙの検出可能な発現が生じた。実施例１５に記載されるとおりの、デオキシシトシンを５－ホルミルシトシンに少なくとも部分的に置き換えたＤＮＡ分子はまた、ｍＣｈｅｒｒｙを発現する細胞の比率が同様であることにより定義されるとおり、機能も保持した。これらの結果は、様々な異なる末端形態を備えるＴＤＳＣを転写

することができ、化学修飾されているときであっても、タンパク質産物を生じたことを実証している。

【０４５１】

実施例１７：ＴＤＳＣが細胞の自然免疫応答に及ぼす効果のインビトロ評価。

本例は、化学修飾ｄｓＤＮＡ構築物、例えば、ＴＤＳＣが培養細胞の自然免疫応答に及ぼす効果について記載する。

【０４５２】

実験用構築物を上記の実施例１５にあるとおり調製し、次に上記の実施例１６にあるとおり細胞に投与した。細胞に関してｑＰＣＲを実施して、ヒトＩＦＮＬ１、ＣＸＣＬ８、ＴＮＦ、ＩＬ１７Ｂ、ＩＬ６、ＩＦＮＢ１、ＣＣＬ２、ＩＬ２３、ＩＬ１７Ｅ、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ１、ＣＣＬ５、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ５、ＩＬ３３、ＩＬ１Ａ、ＣＸＣＬ２、ＩＬ１７Ｃ、及びＩＬ１８を含めた炎症誘発性サイトカインパネルのＲＮＡレベルを決定した。ヒトＧＡＰＤＨを分析の内因性対照として使用した。プライマー配列については、添付の表４を参照することができる。簡潔に言えば、ＰｉｃｏＰｕｒｅ　ＲＮＡ単離キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　＃ＫＩＴ０２０４）を製造業者の指示に従い使用して細胞からｍＲＮＡを抽出した。ＲＮＡ　ｔｏ　ｃＤＮＡ　ＥｃｏＤｒｙ（商標）プレミックス（オリゴｄＴ）（Ｔａｋａｒａ＃６３９５４２）キットを製造業者の指示に従い使用してｃＤＮＡを合成した。ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ７　ＦｌｅｘリアルタイムＰＣＲシステムをＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社のＳＹＢＲ　Ｓｅｌｅｃｔマスターミックスと共に使用して分析を実施した。ＲＮＡ発現はＧＡＰＤＨで正規化し、方法対照（ＤＮＡ不含のリポフェクション試薬）に対する倍数変化として表した。

【０４５３】

【表４－１】

表4. 免疫マーカーのqPCR定量化に使用したプライマー配列。

遺伝子名	5'-配列-3'	配列番号
h-GAPDH-F	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	41
h-GAPDH-R	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	42
h-IL6-F	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	43
h-IL6-R	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG	44
h-CXCL10-F	GGTGAGAAGAGATGTCTGAATCC	45
h-CXCL10-R	GTCCATCCTTGGAAGCACTGCA	46
h-IL33-F	GCCTGTCAACAGCAGTCTACTG	47
h-IL33-R	TGTGCTTAGAGAAGCAAGATACTC	48
h-IFNL1-F	AACTGGGAAGGGCTGCCACATT	49
h-IFNL1-R	GGAAGACAGGAGAGCTGCAACT	50
h-IFNB1-F	CTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGC	51
h-IFNB1-R	TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA	52
h-CXCL1-F	AGCTTGCCTCAATCCTGCATCC	53
h-CXCL1-R	TCCTTCAGGAACAGCCACCAGT	54
h-IL1A-F	TGTATGTGACTGCCCAAGATGAAG	123
h-IL1A-R	AGAGGAGGTTGGTCTCACTACC	124
h-CXCL8-F	GAGAGTGATTGAGAGTGGACCAC	125
h-CXCL8-R	CACAACCCTCTGCACCCAGTTT	126
h-CCL2-F	AGAATCACCAGCAGCAAGTGTCC	127

【０４５４】

【表４－２】

h-CCL2-R	TCCTGAACCCACTTCTGCTTGG	128
h-CCL5-F	CCTGCTGCTTTGCCTACATTGC	129
h-CCL5-R	ACACACTTGGCGGTTCTTTCGG	130
h-CXCL2-F	GGCAGAAAGCTTGTCTCAACCC	131
h-CXCL2-R	CTCCTTCAGGAACAGCCACCAA	132
h-TNF-F	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	133
h-TNF-R	ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC	134
h-IL23A-F	GAGCCTTCTCTGCTCCCTGATA	135
h-IL23A-R	GACTGAGGCTTGGAATCTGCTG	136
h-IL1B-F	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	137
h-IL1B-R	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG	138
h-IL17C-F	GCCCTCAGCTACGACCCAGTG	139
h-IL17C-R	AGCTTCTGTGGATAGCGGTCCT	140
h-IL17B-F	GCTGTGGATGTCCAACAAGAGG	141
h-IL17B-R	TCCTGCATGGTGAAGGGGTTCA	142
h-IL17E-F	AACCGCCACCCAGAGTCCTGT	143
h-IL17E-R	ACAGGCAACGGGCGTGGTACA	144
h-IL5-F	GGAATAGGCACACTGGAGAGTC	145
h-IL5-R	CTCTCCGTCTTTCTTCTCCACAC	146
h-IL18-F	GATAGCCAGCCTAGAGGTATGG	147
h-IL18-R	CCTTGATGTTATCAGGAGGATTCA	148

【０４５５】

図１５Ａ～図１５Ｃ及び図１６Ａ～図１６Ｃは、５－ホルミルシトシンあり又はなしで生成したＴＤＳＣに対するＨＥＫａ（図１５Ａ～図１５Ｃ）及びＴＨＰ１細胞（図１６Ａ～図１６Ｃ）の自然免疫応答を示す。ＨＥＫａ細胞及びＴＨＰ１細胞の両方において、３つの異なる構造－環状二本鎖、ホスホロチオエート末端形態を備える線状ＴＤＳＣ、及びＴｅｌＮ末端形態を備える線状ＴＤＳＣ－を備えるｄｓＤＮＡで、サイトカインＩＦＮＢ、ＣＸＣＬ１０、及びＩＬ６の発現が検出可能であることにより定義されるとおり、測定可能な自然免疫応答が生じた。共有結合閉鎖型ＴＤＳＣについては、シトシンを５－ホルミルシトシンに部分的に置き換えると、ＨＥＫａ細胞及びＴＨＰ１細胞の両方で、ＩＦＮＢ、ＣＸＣＬ１０、及びＩＬ６発現が減少したことにより定義されるとおり免疫応答が減少した。これらの結果は、ＴＤＳＣの末端形態構造及び化学修飾（例えば、５－ホルミルシトシン）の存在の両方が、機能性タンパク質産物をコードする能力は保持しながらも、二本鎖ＤＮＡに対する自然免疫応答に影響を及ぼし得ることを実証している。

【０４５６】

図１７は、ホスホロチオエート化した末端アダプターを備えた、シトシンの炭素５（Ｃ－５）位に様々な修飾を含む共有結合閉鎖型ＴＤＳＣに対するＨＥＫａ細胞の自然免疫応答を示す。異なる化学修飾ｄｓＤＮＡ分子毎に自然免疫応答を散布図として可視化しており、ここではＸ軸が、マーカーＩＦＮＢ及びＣＸＣＬ１０についての未修飾シトシンを含むＴＤＳＣと比べた倍数変化の減少平均値として定義されるインターフェロンシグナル伝達の減少を表し、Ｙ軸が、マーカーＩＬ６及びＴＮＦａの低下の未修飾シトシンを含むＴ

ＤＳＣと比べた倍数変化の減少平均値として定義される炎症性サイトカインシグナル伝達の減少を表す。これらの結果は、ＴＤＳＣのシトシンのＣ－５位に特定の化学修飾を取り込むと、免疫コンピテント細胞株におけるｄｓＤＮＡに対する自然免疫応答が減少し得ることを実証している。

【０４５７】

本明細書に引用される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個々の刊行物、特許、又は特許出願が、参照により組み込まれることが具体的に及び個別に示されるのと同程度に、全体が参照により組み込まれる。本明細書における用語と組み込まれる参照文献における用語との間に矛盾がある場合、本明細書における用語が優先される。

【図面】

【図１Ａ】

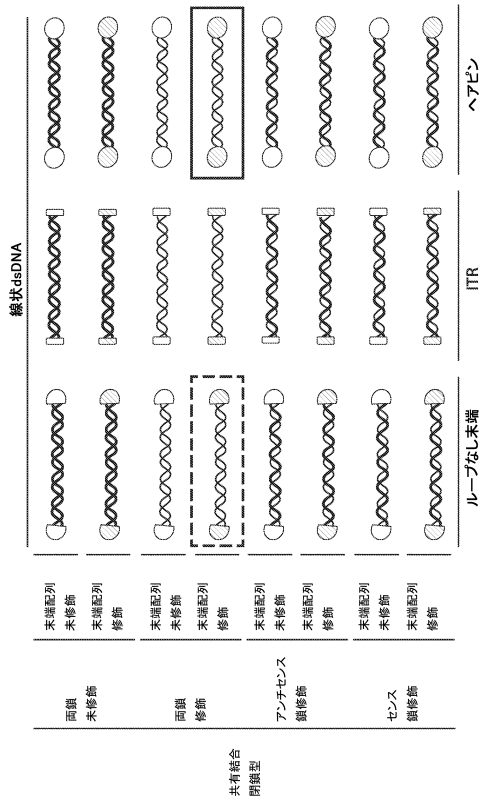


図1A

【図１Ｂ】

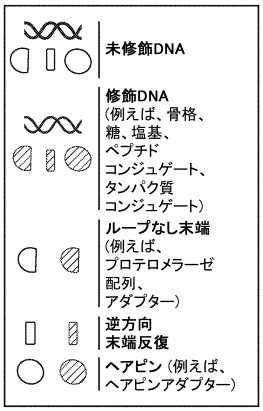


図1B

【図２】

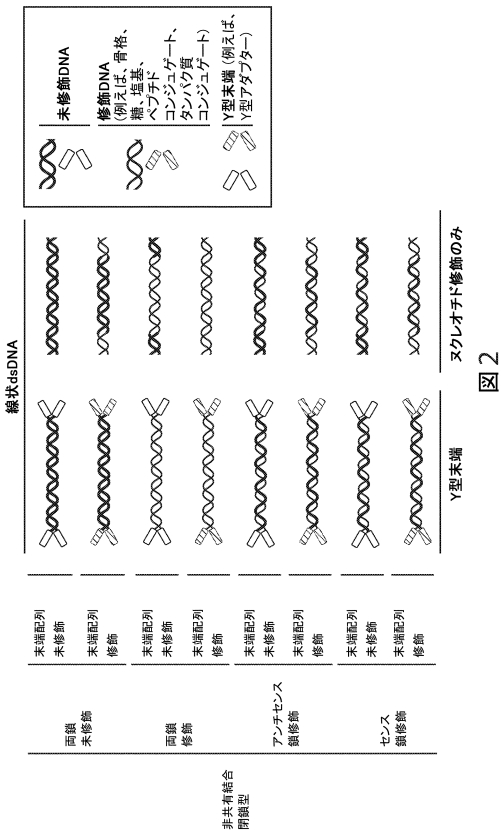


図２

【図３】

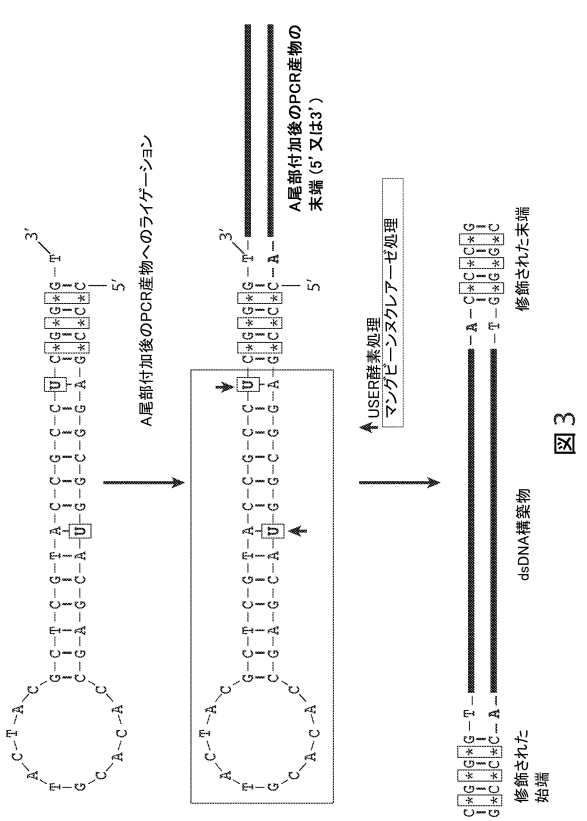


図３

【図４】

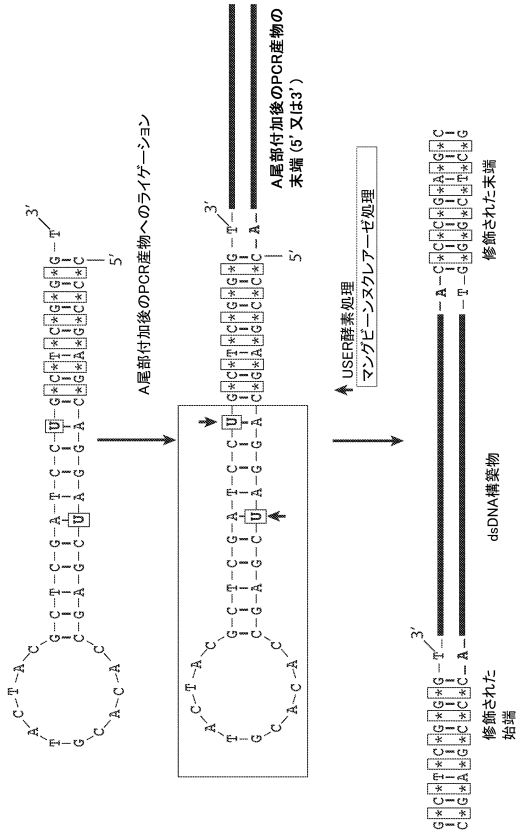


図４

【図５】

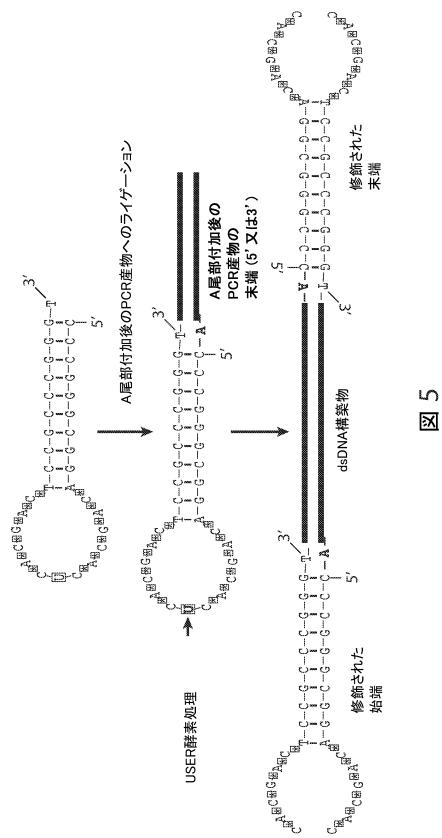


図５

【図６】

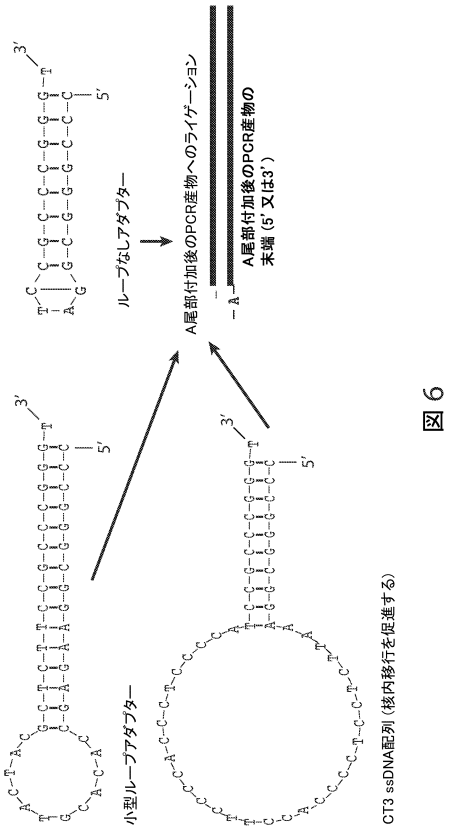


図６

【図７Ａ】

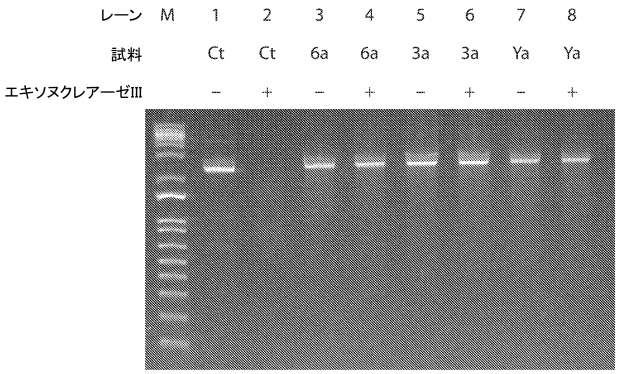


図7A

【図７Ｂ】



図7B

【図７Ｃ】

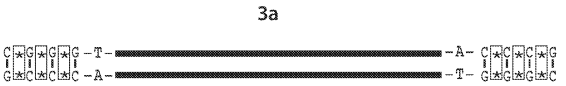


図7C

【図７Ｄ】

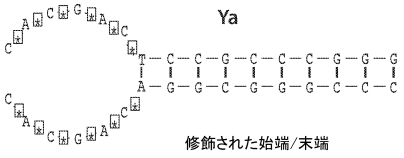


図 7D

【図８】

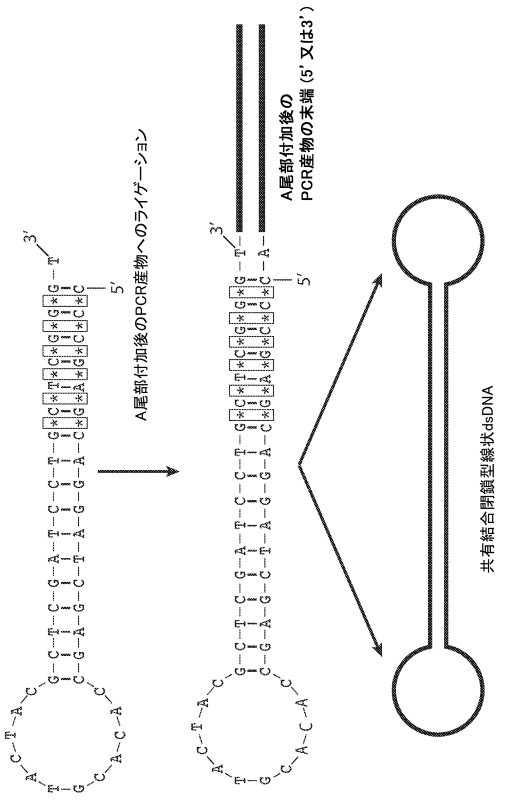


図 8

【図９】

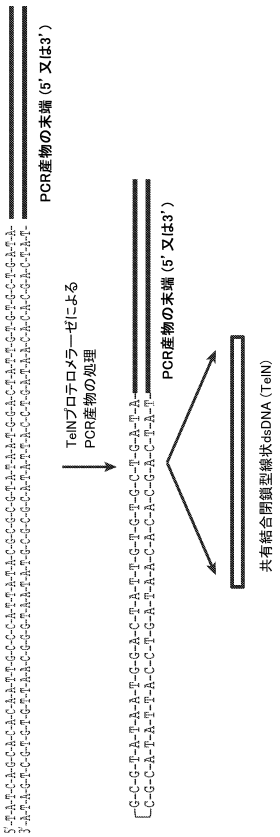


図 9

【図１０】

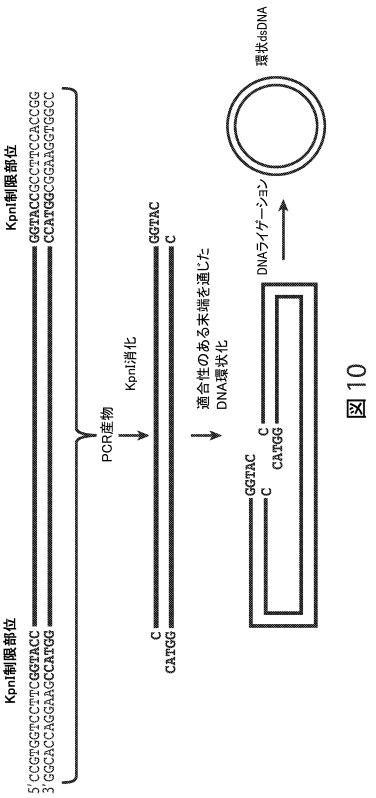


図 10

【図１１】

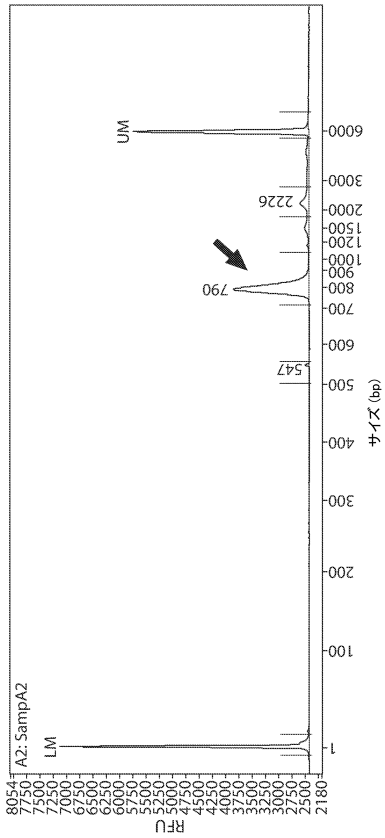


図 11

【図１２】

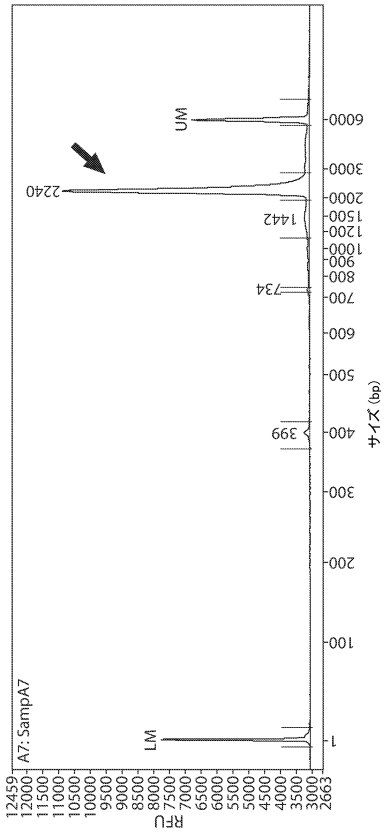


図 12

【図１３】

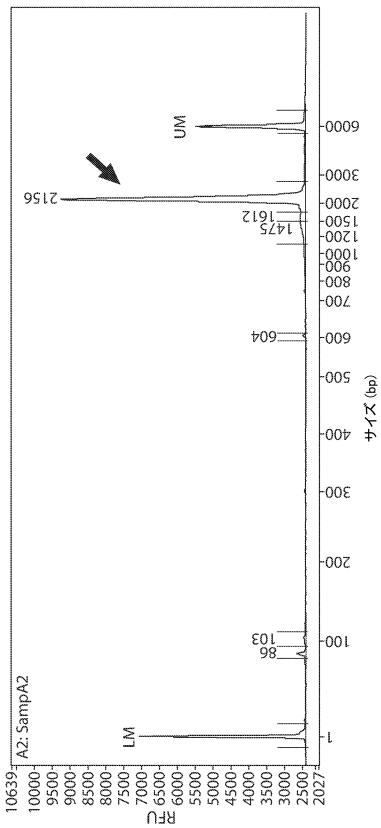


図 13

【図１４Ａ－１４Ｂ】

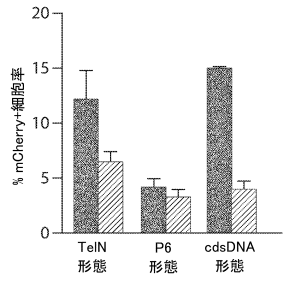


図 14A

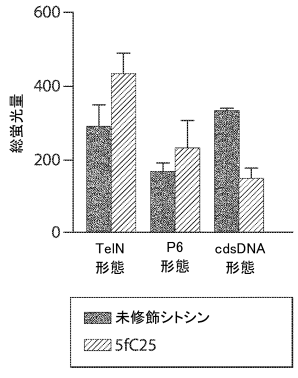


図 14B

【図１５Ａ－１５Ｃ】

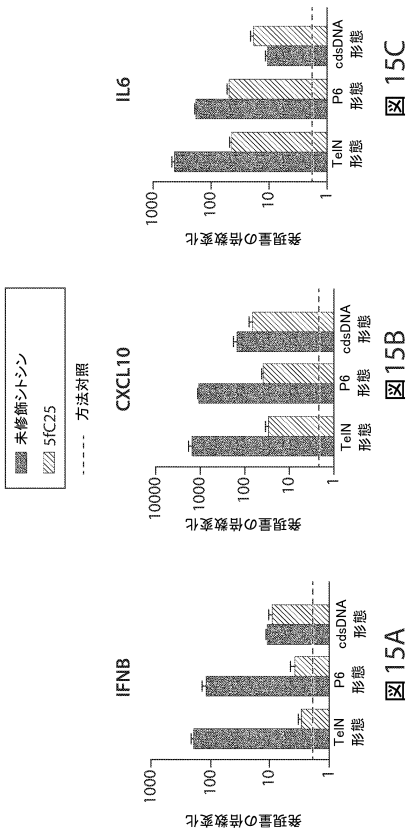


図15C
図15B
図15A

【図１６Ａ－１６Ｃ】

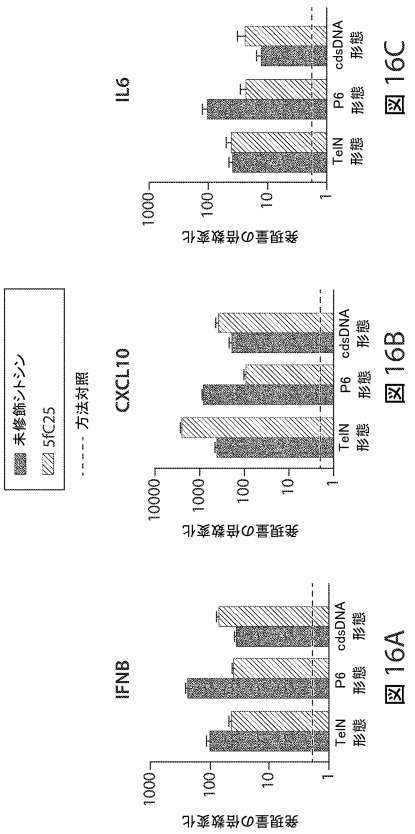


図16C
図16B
図16A

【図１７】

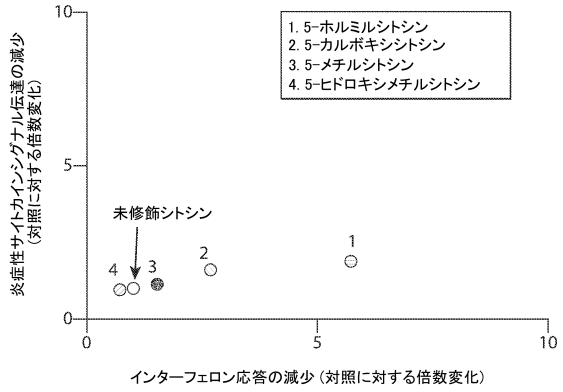


図17

【配列表】

<u>20255166380000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066950

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/64 C12N15/85
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/152147 A1 (TYRIS THERAPEUTICS S L [ES]) 5 August 2021 (2021-08-05) pages 2, 4; claims 1-15; figure 2; examples 1,2 page 7 - page 11 page 14 - page 17 page 26 - page 27 -----	1-31, 39-41, 43-46
A	WO 2022/058755 A1 (LIGHTBIO LTD [GB]) 24 March 2022 (2022-03-24) page 18; claims 1-6,11,14; figures 5-7,10; table 1 ----- -/--	1-31, 39-41, 43-46

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 October 2023	07/12/2023

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066950

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KUMAR AJAY: "Binding of Dumbbell Oligonucleotides to MoMuLV Reverse Transcriptase: Inhibitory Properties of RNase H Activity", E-JOURNAL OF CHEMISTRY, vol. 7, no. 3, January 2010 (2010-01), pages 701-708, XP093086635, IN ISSN: 0973-4945, DOI: 10.1155/2010/616512 Retrieved from the Internet: URL:https://downloads.hindawi.com/journals/jchem/2010/616512.pdf> page 701 - page 702; table 1 -----	1-31, 39-41, 43-46
A	WO 2016/195598 A1 (NAT UNIV SINGAPORE [SG]) 8 December 2016 (2016-12-08) page 35 - page 36; figures 1,7 -----	1-31, 39-41, 43-46
A	WO 2018/033730 A1 (TOUCHLIGHT IP LTD [GB]) 22 February 2018 (2018-02-22) claims 11-14; figures 12,14 -----	1-31, 39-41, 43-46
A	EP 3 769 769 A1 (UNIV NAT CORP TOKYO MEDICAL & DENTAL [JP]) 27 January 2021 (2021-01-27) paragraph [0089]; figures 7,8,10 -----	1-31, 39-41, 43-46
A	WAN LIQI ET AL: "5-Methylcytosine Substantially Enhances the Thermal Stability of DNA Minidumbbells", CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, vol. 27, no. 22, 26 January 2021 (2021-01-26), pages 6740-6747, XP093086690, DE ISSN: 0947-6539, DOI: 10.1002/chem.202005410 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/chem.202005410> table 1 -/--	1-31, 39-41, 43-46

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066950

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& Liqi Wan ET AL: "Supporting information: 5-Methylcytosine Substantially Enhances the Thermal Stability of DNA Minidumbbells", Chemistry - A European Journal, 26 January 2021 (2021-01-26), XP093086819, Retrieved from the Internet: URL:https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1002/chem.202005410&file=chem202005410-sup-0001-misc_information.pdf [retrieved on 2023-09-28] figures S10-S15	
A	WO 2021/078947 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LTD [GB]) 29 April 2021 (2021-04-29) paragraphs [0028], [0033], [0041]; claim 1; figures 1-6	1-31, 39-41, 43-46
A	ASAMI YUTARO ET AL: "Efficient Gene Suppression by DNA/DNA Double-Stranded Oligonucleotide In Vivo", MOLECULAR THERAPY, vol. 29, no. 2, 7 December 2020 (2020-12-07), pages 838-847, XP055834158, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.10.017 figure 1	1-31, 39-41, 43-46
A	NANCE KELLIE D ET AL: "Cytidine acetylation yields a hypoinflammatory synthetic messenger RNA", CELL CHEMICAL BIOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 29, no. 2, 22 July 2021 (2021-07-22), page 312, XP086965412, ISSN: 2451-9456, DOI: 10.1016/J.CHEMBIOL.2021.07.003 [retrieved on 2021-08-25] figure 1	1-31, 39-41, 43-46

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/066950

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/066950

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

1-31, 39-41, 43-46(all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2023/066950

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-31, 39-41, 43-46(all partially)

A TDSC comprising: a) an upstream DNA end form which is a closed end; b) a double stranded region; c) a downstream DNA end form which is a closed end, wherein the TDSC comprises one or more chemically modified nucleotides, wherein one or more chemically modified nucleotides comprise a chemically modified cytosine nucleotide.

---

2. claims: 1-31, 39-41, 43-46(all partially)

A TDSC comprising: a) an upstream DNA end form which is a closed end; b) a double stranded region; c) a downstream DNA end form which is a closed end, wherein the TDSC comprises one or more chemically modified nucleotides, wherein one or more chemically modified nucleotides comprise a phosphorothioate bond.

---

3. claims: 32-34

A TDSC comprising: a) an upstream exonuclease-resistant DNA end form; b) a double stranded region; and c) a downstream exonuclease-resistant DNA end form, wherein the TDSC comprises one or more chemically modified nucleotides.

---

4. claims: 35(completely); 39-41, 43-46(partially)

A TDSC comprising: a) an upstream double stranded, blunt-ended DNA end form (e.g., an upstream exonuclease-resistant DNA end form that is double stranded and blunt-ended) comprising a phosphorothioate modification on each strand; b) a double stranded region; and c) a downstream double stranded, blunt-ended DNA end form (e.g., a downstream exonuclease-resistant DNA end form that is double stranded and blunt-ended) comprising a phosphorothioate modification on each strand.

---

5. claims: 36(completely); 39-41, 43-46(partially)

A TDSC comprising: a) an upstream exonuclease-resistant DNA end form; b) a double stranded region; c) a downstream exonuclease-resistant DNA end form, wherein one or both of the upstream exonuclease-resistant DNA end form and the downstream exonuclease-resistant DNA end form comprises a Y-adaptor configuration, optionally wherein the TDSC comprises one or more chemically modified nucleotides.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

6. claims: 37(completely); 39-41, 43-46(partially)

A TDSC comprising: a) an upstream exonuclease-resistant DNA end form; b) a double stranded region; c) a downstream exonuclease-resistant DNA end form, wherein one or both of the upstream exonuclease-resistant DNA end form and the downstream exonuclease-resistant DNA end form comprises one or more of: a nuclear targeting sequence, a maintenance sequence, or a sequence that binds an endogenous polypeptide in a target cell.

---

7. claims: 38(completely); 39-41, 43-46(partially)

A TDSC comprising: a) an upstream exonuclease-resistant DNA end form; b) a double stranded region;c) a downstream exonuclease-resistant DNA end form, wherein one or both of the upstream exonuclease-resistant DNA end form and the downstream exonuclease-resistant DNA end form have one or more of the following characteristics: i) does not comprise the nucleic acid sequences TATCAGCACACAATTGCCCATTATACGC (SEQ ID NO: 55) and GCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATA (SEQ ID NO: 56), or nucleic acid sequences having at least 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity thereto; and/or the nucleic acid sequences TATCAGCACACAATAGTCCATTATACGC (SEQ ID NO: 57) and GCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA (SEQ ID NO: 58); ii) every nucleotide in the TDSC binds another nucleotide in the TDSC; iii) the upstream exonuclease-resistant DNA end form has a loop size of less than about 28 or 56 nucleotides in length or greater than about 28 or 56 nucleotides in length; or iv) the downstream exonuclease-resistant DNA end form has a loop size of less than about 28 or 56 nucleotides in length or greater than about 28 or 56 nucleotides in length.

---

8. claim: 42

A proto-TDSC comprising: a) an upstream exonuclease-resistant DNA end form; b) a double stranded region; c) a downstream exonuclease-resistant DNA end form, wherein: (i) the proto-TDSC comprises one or more (e.g., 1 or 2) uracil nucleotides, or (ii) the upstream exonuclease-resistant DNA end form comprises a sticky end, and/or wherein the downstream exonuclease-resistant DNA end form comprises a sticky end.

---

9. claim: 47

A method of making a TDSC, the method comprising ligating: a double-stranded DNA molecule toa self-annealed DNA molecule comprising a first region and a second region, wherein the first region is hybridized to the second region;thereby producing a TDSC, optionally wherein the self-annealed DNA

International Application No. PCT/US2023/066950

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

molecule further comprises a loop between the first region and the second region.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/066950

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021152147 A1	05-08-2021	AU 2021213927 A1	28-07-2022
		CA 3164390 A1	05-08-2021
		CN 115003829 A	02-09-2022
		EP 4097253 A1	07-12-2022
		JP 2023511992 A	23-03-2023
		KR 20220133999 A	05-10-2022
		US 2023323343 A1	12-10-2023
		WO 2021152147 A1	05-08-2021
WO 2022058755 A1	24-03-2022	AU 2021344868 A1	18-05-2023
		CA 3195897 A1	24-03-2022
		CN 116615546 A	18-08-2023
		EP 4214321 A1	26-07-2023
		IL 301407 A	01-05-2023
		JP 2023542347 A	06-10-2023
		KR 20230074507 A	30-05-2023
		US 2023357790 A1	09-11-2023
		WO 2022058755 A1	24-03-2022
WO 2016195598 A1	08-12-2016	US 2018171354 A1	21-06-2018
		WO 2016195598 A1	08-12-2016
WO 2018033730 A1	22-02-2018	CN 109844134 A	04-06-2019
		CN 116732145 A	12-09-2023
		DK 3500682 T3	24-08-2020
		EP 3500682 A1	26-06-2019
		EP 3763823 A1	13-01-2021
		ES 2813324 T3	23-03-2021
		LT 3500682 T	26-10-2020
		US 2019185924 A1	20-06-2019
		US 2023272461 A1	31-08-2023
		WO 2018033730 A1	22-02-2018
EP 3769769 A1	27-01-2021	EP 3769769 A1	27-01-2021
		JP 7333079 B2	24-08-2023
		JP WO2019181946 A1	11-03-2021
		US 2021010000 A1	14-01-2021
		WO 2019181946 A1	26-09-2019
WO 2021078947 A1	29-04-2021	AU 2020370740 A1	30-09-2021
		CA 3131183 A1	29-04-2021
		CN 113939590 A	14-01-2022
		EP 3918066 A1	08-12-2021
		IL 286593 A	01-12-2021
		JP 2022553471 A	23-12-2022
		KR 20220088632 A	28-06-2022
		SG 11202110571Y A	28-10-2021
		US 2022259587 A1	18-08-2022
		WO 2021078947 A1	29-04-2021

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	105	
A61K 9/51 (2006.01)		A61K	9/51		
A61K 47/62 (2017.01)		A61K	47/62		
C07H 21/04 (2006.01)		C07H	21/04	ZCSP	
A61K 31/713 (2006.01)		A61K	31/713		

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

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 スナイダー， アレクサンドラ レイチェル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー
(72)発明者 ルーベンス， ジェイコブ ローゼンブラム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー
(72)発明者 ブレトン， カミーロ アヤラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

Fターム（参考） 4C057 BB02 BB05 DD03 MM01 MM04 MM05
4C076 AA65 AA95 CC03 CC26 CC41 DD49 DD63 DD70 EE23 EE59
4C084 AA13 MA38 NA05 NA13 ZB081 ZB211
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA38 NA05 NA13 ZB08 ZB21