

(19)日本国特許庁(JP)

(12) **公表特許公報(A)**

(11) 公表番号

特表2024-520534

(P2024-520534A)

(43)公表日 令和6年5月24日(2024.5.24)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全162頁)	

(21)出願番号	特願2023-573373(P2023-573373)	(71)出願人	523446930
(86)(22)出願日	令和4年5月27日(2022.5.27)		シャンハイ サーコード バイオメッド
(85)翻訳文提出日	令和6年1月19日(2024.1.19)		カンパニー, リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/095749		中華人民共和国, 200131, シャン
(87)国際公開番号	WO2022/247943		ハイ, プートン ニュー ディストリクト
(87)国際公開日	令和4年12月1日(2022.12.1)		, チアフォン ロード, ナンバー8, ル
(31)優先権主張番号	202110594352.4		ーム 901
(32)優先日	令和3年5月28日(2021.5.28)	(74)代理人	100099759
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 青木 篤
	中国(CN)	(74)代理人	100123582
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 三橋 真二
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(	(74)代理人	100117019
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		弁理士 渡辺 陽一
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR	(74)代理人	100141977
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 環状RNAを調製するための構築物及び方法並びにその使用

(57) 【要約】

本発明は、環状 RNA を調製するための構築物及び方法、並びに環状 RNA の使用に関する。特に、本発明は、グループ I イントロンに基づいて環状 RNA を調製するための構築物及び方法、並びに環状 RNA の使用に関する。

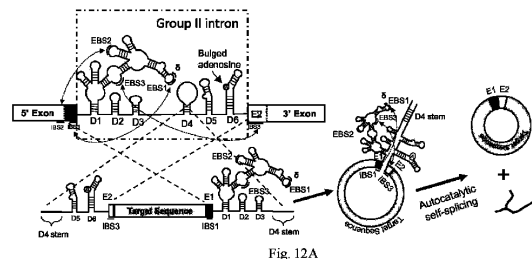


Fig. 12A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E 2) ；
- (c) 標的配列；
- (d) エクソン断片1 (E 1) ；及び
- (e) 5'イントロン断片

を含み、

前記5'イントロン断片及び前記3'イントロン断片は、各々グループⅠⅠイントロンの断片であり、前記5'イントロン断片は、前記グループⅠⅠイントロンにおいて前記3'イントロン断片の5'側に位置し、

前記E 1は、前記グループⅠⅠイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記E 2は、前記グループⅠⅠイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2】

自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E 2) ；
- (c) リンカー配列；
- (d) 標的配列；
- (e) リンカー配列；
- (f) エクソン断片1 (E 1) ；及び
- (g) 5'イントロン断片

を含み、

前記5'イントロン断片及び前記3'イントロン断片は、各々グループⅠⅠイントロンの断片であり、前記5'イントロン断片は、前記グループⅠⅠイントロンにおいて前記3'イントロン断片の5'側に位置し、

前記E 1は、前記グループⅠⅠイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記E 2は、前記グループⅠⅠイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物。

【請求項 3】

自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5'相同アーム；
- (b) 3'イントロン断片；
- (c) エクソン断片2 (E 2) ；
- (d) 標的配列；
- (e) エクソン断片1 (E 1) ；
- (f) 5'イントロン断片；及び
- (g) 3'相同アーム

を含み、

前記 5'イントロン断片及び前記 3'イントロン断片は、各々グループ I イントロンの断片であり、前記 5'イントロン断片は、前記グループ I イントロンにおいて前記 3'イントロン断片の 5'側に位置し、

前記 E 1 は、前記グループ I イントロンの 5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記 E 2 は、前記グループ I イントロンの 3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである

、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項 4】

自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5'相同アーム；
- (b) 3'イントロン断片；
- (c) エクソン断片 2 (E 2) ；
- (d) リンカー配列；
- (e) 標的配列；
- (f) リンカー配列；
- (g) エクソン断片 1 (E 1) ；
- (h) 5'イントロン断片；及び
- (i) 3'相同アーム

20

を含み、

前記 5'イントロン断片及び前記 3'イントロン断片は、各々 2つの断片へのグループ I イントロンの断片であり、前記 5'イントロン断片は、前記グループ I イントロンにおける前記 3'イントロン断片の 5'側に位置し、

前記 E 1 は、前記グループ I イントロンの 5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記 E 2 は、前記グループ I イントロンの 3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

30

前記標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5】

インビトロで自己スプライシング活性を有する、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 6】

前記 E 1 及び／又は前記 E 2 が、0～20ヌクレオチド長、好ましくは0～10ヌクレオチド長、例えば0、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10ヌクレオチド長である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7】

40

前記 5'イントロン断片及び前記 3'イントロン断片が、グループ I イントロンを不対領域で2つの断片にセグメント化することによって得られる、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 8】

前記 5'イントロン断片及び前記 3'イントロン断片が、ドメイン 1 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 9】

前記 5'イントロン断片及び前記 3'イントロン断片が、ドメイン 2 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求

50

項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 0】

前記 5 'イントロン断片及び前記 3 'イントロン断片が、ドメイン 3 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 1】

前記 5 'イントロン断片及び前記 3 'イントロン断片が、ドメイン 4 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 2】

前記 5 'イントロン断片及び前記 3 'イントロン断片が、ドメイン 5 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 3】

前記 5 'イントロン断片及び前記 3 'イントロン断片が、ドメイン 6 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 4】

前記 5 'イントロン断片及び前記 3 'イントロン断片が、ドメイン 1 とドメイン 2 との間の線状領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 5】

前記 5 'イントロン断片及び前記 3 'イントロン断片が、ドメイン 2 とドメイン 3 との間の線状領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 6】

前記 5 'イントロン断片及び前記 3 'イントロン断片が、ドメイン 3 とドメイン 4 との間の線状領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 7】

前記 5 'イントロン断片及び前記 3 'イントロン断片が、ドメイン 4 とドメイン 5 との間の線状領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 8】

前記 5 'イントロン断片及び前記 3 'イントロン断片が、ドメイン 5 とドメイン 6 との間の線状領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 1 9】

前記グループ I イントロンが、その野生型形態と比較して 1 つ以上のヌクレオチドの改変を含み、前記改変が、欠失、置換、及び付加のうちの 1 つ以上から選択される、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 0】

前記改変が、前記グループ I イントロンの 1 つ以上の E B S 配列の改変を含み、前記 E B S 配列が、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも 6 0 % において、標的配列中の対応する長さの 1 つ以上の領域と相補的に対合する、請求項 1 9 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2 1】

前記改変が、E B S 1 及び E B S 3 等の前記グループ I イントロンの前記 2 つの E B S 配列の改変であり、前記 E B S 配列が、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも 6 0 % において、標的配列中の対応する長さの 2 つの領域と相補的に対合し、好ましくは、前記

10

20

30

40

50

2つの領域は、前記標的配列の両端にそれぞれ位置する、請求項19に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項22】

前記改変が、EBS1'及びEBS3'等の前記グループIIイントロンの前記2つのEBS配列の改変であり、前記EBS配列が、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%において、標的配列中の対応する長さの2つの領域と相補的に対合し、好ましくは、前記2つの領域は、前記標的配列の両端にそれぞれ位置する、請求項19に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項23】

前記改変が、前記グループIIイントロンのEBS1及び／若しくはδ配列の改変、又はEBS1'及び／若しくはδ'配列の改変であり、前記EBS1及び／又はδ配列が、前記ヌクレオチドの少なくとも60%上の標的配列中の対応する長さの領域と相補的に対合し、任意に、前記改変が、EBS1及び／又はδ配列並びにその上流配列の改変であり、前記EBS1及び／又はδ配列並びにその上流が、前記ヌクレオチドの少なくとも60%上の標的配列中の対応する長さの領域と相補的に対合する、請求項19に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項24】

前記改変が、ドメイン4におけるイントロンコードタンパク質(IEP)配列の欠失、好ましくはドメイン4の全ての欠失等の、ドメイン4の一部又は全ての欠失を含む、請求項19に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項25】

前記改変が、オープンリーディングフレーム(ORF)の欠失を含む、請求項19に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項26】

前記ポリヌクレオチド構築物が、前記標的配列のほぼ無瘢痕環状RNAを形成することができる、請求項1～25のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項27】

前記ほぼ無瘢痕環状RNAが、1ヌクレオチド長、2ヌクレオチド長、3ヌクレオチド長、4ヌクレオチド長、5ヌクレオチド長、6ヌクレオチド長、7ヌクレオチド長、8ヌクレオチド長、9ヌクレオチド長、10ヌクレオチド長、11ヌクレオチド長、12ヌクレオチド長、13ヌクレオチド長、14ヌクレオチド長、15ヌクレオチド長、16ヌクレオチド長、17ヌクレオチド長、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、又は20ヌクレオチド長以下の瘢痕領域を有する、請求項26に記載のポリヌクレオチド構築物。

30

【請求項28】

前記ポリヌクレオチド構築物が、前記標的配列の無瘢痕環状RNAを形成することができる、請求項1～25のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項29】

E1及びE2が各々0ヌクレオチド長である、請求項1～28のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項30】

前記E1が0ヌクレオチド長である、請求項1～28のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

40

【請求項31】

前記E2が0ヌクレオチド長である、請求項1～28のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項32】

前記グループIIイントロンが、微生物に由来するグループIIイントロンである、請求項1～31のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項33】

前記非コード配列が、配列番号4～6のスペーサー配列、ポリA配列、ポリ-A-C配

50

列、ポリー C 配列、ポリー U 配列、I R E S、リボソーム結合部位、アプタマー配列、RNA 足場、リボスイッチ、自己スプライシングリボザイム以外のリボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O)、足場、低分子 RNA 結合部位、翻訳調節配列、及びタンパク質結合部位からなる群から選択される、請求項 1～32 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 34】

前記グループ I イントロンが、

- (a) 配列番号 33；
- (b) 配列番号 34；
- (c) 配列番号 35；
- (d) 配列番号 36；
- (e) 配列番号 37；
- (f) 配列番号 38；
- (g) 配列番号 39；
- (h) 配列番号 40；及び
- (i) 配列番号 41

10

からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 1～33 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 35】

前記ポリヌクレオチド構築物が RNA ポリヌクレオチド構築物である、請求項 1～34 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項 36】

前記 3' イントロン断片が、

- (a) 配列番号 42 と 95 % 同一の核酸配列；
- (b) 配列番号 42 と 98 % 同一の核酸配列；
- (c) 配列番号 42 と 99 % 同一の核酸配列；
- (d) 配列番号 42；
- (e) 配列番号 43 と 95 % 同一の核酸配列；
- (f) 配列番号 43 と 98 % 同一の核酸配列；
- (g) 配列番号 43 と 99 % 同一の核酸配列；
- (h) 配列番号 43；
- (i) 配列番号 44 と 95 % 同一の核酸配列；
- (j) 配列番号 44 と 98 % 同一の核酸配列；
- (k) 配列番号 44 と 99 % 同一の核酸配列；
- (l) 配列番号 44；
- (m) 配列番号 45 と 95 % 同一の核酸配列；
- (n) 配列番号 45 と 98 % 同一の核酸配列；
- (o) 配列番号 45 と 99 % 同一の核酸配列；
- (p) 配列番号 45；
- (q) 配列番号 46 と 95 % 同一の核酸配列；
- (r) 配列番号 46 と 98 % 同一の核酸配列；
- (s) 配列番号 46 と 99 % 同一の核酸配列；
- (t) 配列番号 46；
- (u) 配列番号 47 と 95 % 同一の核酸配列；
- (v) 配列番号 47 と 98 % 同一の核酸配列；
- (w) 配列番号 47 と 99 % 同一の核酸配列；
- (x) 配列番号 47；
- (y) 配列番号 48 と 95 % 同一の核酸配列；
- (z) 配列番号 48 と 98 % 同一の核酸配列；
- (a a) 配列番号 48 と 99 % 同一の核酸配列；

30

40

50

- (b b) 配列番号 48 の核酸配列；
- (c c) 配列番号 49 と 95 % 同一の核酸配列；
- (d d) 配列番号 49 と 98 % 同一の核酸配列；
- (e e) 配列番号 49 と 99 % 同一の核酸配列；
- (f f) 配列番号 49 ；
- (g g) 配列番号 50 と 95 % 同一の核酸配列；
- (h h) 配列番号 50 と 98 % 同一の核酸配列；
- (i i) 配列番号 50 と 99 % 同一の核酸配列；
- (j j) 配列番号 50 ；
- (k k) 配列番号 51 と 95 % 同一の核酸配列；
- (l l) 配列番号 51 と 98 % 同一の核酸配列；
- (m m) 配列番号 51 と 99 % 同一の核酸配列；
- (n n) 配列番号 51 ；
- (o o) 配列番号 52 と 95 % 同一の核酸配列；
- (p p) 配列番号 52 と 98 % 同一の核酸配列；
- (q q) 配列番号 52 と 99 % 同一の核酸配列；及び
- (r r) 配列番号 52

10

からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 35 に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項 37】

前記 E 2 が、

- (a) 配列番号 53 ；
- (b) 配列番号 54 ；
- (c) 配列番号 55 ；
- (d) 配列番号 56 ；
- (e) 配列番号 57 ；
- (f) 配列番号 58 ；
- (g) 配列番号 59 ；
- (h) 配列番号 60 ；
- (i) 配列番号 61 ；
- (j) 配列番号 62 ；及び
- (k) 配列番号 63

30

からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 35 又は 36 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 38】

前記 E 1 が、

- (a) 配列番号 64 ；
- (b) 配列番号 65 ；
- (c) 配列番号 66 ；
- (d) 配列番号 67 ；
- (e) 配列番号 68 ；
- (f) 配列番号 69 ；
- (g) 配列番号 70 ；
- (h) 配列番号 71 ；
- (i) 配列番号 72 ；
- (j) 配列番号 73 ；及び
- (k) 配列番号 74

40

からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 35 ～ 37 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 39】

50

前記 5'イントロン断片が、

- (a) 配列番号 75 と 95 % 同一の核酸配列；
- (b) 配列番号 75 と 98 % 同一の核酸配列；
- (c) 配列番号 75 と 99 % 同一の核酸配列；
- (d) 配列番号 75 ；
- (e) 配列番号 76 と 95 % 同一の核酸配列；
- (f) 配列番号 76 と 98 % 同一の核酸配列；
- (g) 配列番号 76 と 99 % 同一の核酸配列；
- (h) 配列番号 76 ；
- (i) 配列番号 77 と 95 % 同一の核酸配列； 10
- (j) 配列番号 77 と 98 % 同一の核酸配列；
- (k) 配列番号 77 と 99 % 同一の核酸配列；
- (l) 配列番号 77 ；
- (m) 配列番号 78 と 95 % 同一の核酸配列；
- (n) 配列番号 78 と 98 % 同一の核酸配列；
- (o) 配列番号 78 と 99 % 同一の核酸配列；
- (p) 配列番号 78 ；
- (q) 配列番号 79 と 95 % 同一の核酸配列；
- (r) 配列番号 79 と 98 % 同一の核酸配列；
- (s) 配列番号 79 と 99 % 同一の核酸配列； 20
- (t) 配列番号 79 ；
- (u) 配列番号 80 と 95 % 同一の核酸配列；
- (v) 配列番号 80 と 98 % 同一の核酸配列；
- (w) 配列番号 80 と 99 % 同一の核酸配列；
- (x) 配列番号 80 ；
- (y) 配列番号 81 と 95 % 同一の核酸配列；
- (z) 配列番号 81 と 98 % 同一の核酸配列；
- (a a) 配列番号 81 と 99 % 同一の核酸配列；
- (b b) 配列番号 81 ；
- (c c) 配列番号 82 と 95 % 同一の核酸配列； 30
- (d d) 配列番号 82 と 98 % 同一の核酸配列；
- (e e) 配列番号 82 と 99 % 同一の核酸配列；
- (f f) 配列番号 82 ；
- (g g) 配列番号 83 と 95 % 同一の核酸配列；
- (h h) 配列番号 83 と 98 % 同一の核酸配列；
- (i i) 配列番号 83 と 99 % 同一の核酸配列；
- (j j) 配列番号 83 ；
- (k k) 配列番号 84 と 95 % 同一の核酸配列；
- (l l) 配列番号 84 と 98 % 同一の核酸配列；
- (m m) 配列番号 84 と 99 % 同一の核酸配列； 40
- (n n) 配列番号 84 ；
- (o o) 配列番号 85 と 95 % 同一の核酸配列；
- (p p) 配列番号 85 と 98 % 同一の核酸配列；
- (q q) 配列番号 85 と 99 % 同一の核酸配列；
- (r r) 配列番号 85 ；
- (s s) 配列番号 86 と 95 % 同一の核酸配列；
- (t t) 配列番号 86 と 98 % 同一の核酸配列；
- (u u) 配列番号 86 と 99 % 同一の核酸配列；
- (v v) 配列番号 86 ；
- (w w) 配列番号 87 と 95 % 同一の核酸配列； 50

- (x x) 配列番号 8 7 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (y y) 配列番号 8 7 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (z z) 配列番号 8 7 ;
- (a a a) 配列番号 8 8 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (b b b) 配列番号 8 8 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (c c c) 配列番号 8 8 と 9 9 % 同一の核酸配列 ; 及び
- (d d d) 配列番号 8 8

からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 3 5 ~ 3 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 0】

10

前記 5 ' 相同アームが、配列番号 1 0 5 の核酸配列を含む、請求項 3 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 1】

前記 3 ' 相同アームが、配列番号 1 0 6 の核酸配列を含む、請求項 3 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 2】

前記 5 ' 相同アーム又は 3 ' 相同アームが、1 5 ~ 6 0 ヌクレオチド長である、請求項 3 ~ 4 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 3】

前記 5 ' 相同アーム又は 3 ' 相同アーム配列が、最大 1 0 % の塩基ミスマッチを有する、請求項 3 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。 20

【請求項 4 4】

前記標的配列が、

- (a) 配列番号 8 9 ;
- (b) 配列番号 9 0 ;
- (c) 配列番号 9 1 ;
- (d) 配列番号 9 2 ;
- (e) 配列番号 9 3 ;
- (f) 配列番号 9 4 ;
- (g) 配列番号 9 5 ; 及び
- (h) 配列番号 9 6

30

からなる群から選択される 5 ' アーム配列を含む、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 5】

前記標的配列が、

- (a) 配列番号 9 7 ;
- (b) 配列番号 9 8 ;
- (c) 配列番号 9 9 ;
- (d) 配列番号 1 0 0 ;
- (e) 配列番号 1 0 1 ;
- (f) 配列番号 1 0 2 ;
- (g) 配列番号 1 0 3 ; 及び
- (h) 配列番号 1 0 4

40

からなる群から選択される 3 ' アーム配列を含む、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 6】

前記標的配列が、式 I

$T I - (L) _ n - Z 1 (I)$

〔式中、

T I は、内部リボソーム進入部位 (I R E S) 様ポリヌクレオチド配列又は天然 I R E

50

S 配列を含む操作された翻訳開始要素であり、

Z 1 は、治療用産物をコードする発現配列であり、

L はリンカー配列であり、

A 1 及び B 1 は、RNA ポリヌクレオチドの環状化が可能な一対の配列であり、

n は、0 ～ 2 の整数である]

を含む、請求項 1 ～ 4 5 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 7】

Z 1 が、

- (a) 配列番号 1 0 7 と 9 5 % 同一の核酸配列；
- (b) 配列番号 1 0 7 と 9 8 % 同一の核酸配列；
- (c) 配列番号 1 0 7 と 9 9 % 同一の核酸配列；
- (d) 配列番号 1 0 7 ；
- (e) 配列番号 1 0 8 と 9 5 % 同一の核酸配列；
- (f) 配列番号 1 0 8 と 9 8 % 同一の核酸配列；
- (g) 配列番号 1 0 8 と 9 9 % 同一の核酸配列；
- (h) 配列番号 1 0 8 ；
- (i) 配列番号 1 0 9 と 9 5 % 同一の核酸配列；
- (j) 配列番号 1 0 9 と 9 8 % 同一の核酸配列；
- (k) 配列番号 1 0 9 と 9 9 % 同一の核酸配列；
- (l) 配列番号 1 0 9 ；
- (m) 配列番号 1 1 0 と 9 5 % 同一の核酸配列；
- (n) 配列番号 1 1 0 と 9 8 % 同一の核酸配列；
- (o) 配列番号 1 1 0 と 9 9 % 同一の核酸配列；
- (p) 配列番号 1 1 0 ；
- (q) 配列番号 1 1 1 と 9 5 % 同一の核酸配列；
- (r) 配列番号 1 1 1 と 9 8 % 同一の核酸配列；
- (s) 配列番号 1 1 1 と 9 9 % 同一の核酸配列；
- (t) 配列番号 1 1 1 ；
- (u) 配列番号 1 1 2 と 9 5 % 同一の核酸配列；
- (v) 配列番号 1 1 2 と 9 8 % 同一の核酸配列；
- (w) 配列番号 1 1 2 と 9 9 % 同一の核酸配列；及び
- (x) 配列番号 1 1 2

からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 4 6 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 8】

Z 1 が、

- (a) 配列番号 1 1 3 ；
- (b) 配列番号 1 1 4 ；
- (c) 配列番号 1 1 5 ；
- (d) 配列番号 1 1 6 ；
- (e) 配列番号 1 1 7 ；及び
- (f) 配列番号 1 1 8

からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、請求項 4 6 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 4 9】

改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドを含む、請求項 1 ～ 4 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 0】

1 0 % ～ 1 0 0 % の改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドを含む、請求項 1 ～ 4 9 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

前記改変RNAヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも1つが、m5C（5-メチルシチジン）である、請求項49又は50に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 2】

前記改変RNAヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも1つが、m5U（5-メチルウリジン）である、請求項49又は50に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 3】

前記改変RNAヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも1つが、m6A（N6-メチルアデノシン）である、請求項49又は50に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項 5 4】

前記改変RNAヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも1つが、Y（シュードウリジン）である、請求項49又は50に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 5】

前記改変RNAヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも1つがm1A（1-メチルアデノシン）である、請求項49又は50に記載のポリヌクレオチド構築物。

【請求項 5 6】

前記改変RNAヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドのうちの少なくとも1つが、インビトロ転写（IVT）時に導入される、請求項49～55のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項 5 7】

前記改変ヌクレオシドが、m5C（5-メチルシチジン）、m5U（5-メチルウリジン）、m6A（N6-メチルアデノシン）、s2U（2-チオウリジン）、Y（シュードウリジン）、Um（2'-O-メチルウリジン）、m1A（1-メチルアデノシン）、m2A（2-メチルアデノシン）、Am（2'-O-メチルアデノシン）、ms2 m6A（2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン）、i6A（N6-イソペンテニルアデノシン）、ms2 i6A（2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン）、io6A（N6-（cis-ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）、ms2 io6A（2-メチルチオ-N6-（cis-ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）、g6A（N6-グリシニルカルバモイルアデノシン）、t6A（N6-トレオニルカルバモイルアデノシン）、ms2 t6A（2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン）、m6 t6A（N6-メチル-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン）、hn6A（N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）、ms2 hn6A（2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）、Ar(p)（2'-O-リボシルアデノシン（ホスフェート））、I（イノシン）、m1I（1-メチルイノシン）、m1 hn（1, 2'-O-ジメチルイノシン）、m3C（3-メチルシチジン）、Cm（2'-O-メチルシチジン）、s2C（2-チオシチジン）、ac4C（N4-アセチルシチジン）、（5-ホルミルシチジン）、m5Cm（5, 2'-O-ジメチルシチジン）、ac4Cm（N4-アセチル-2'-O-メチルシチジン）、k2C（リシジン）、m!G（1-メチルグアノシン）、m2G（N2-メチルグアノシン）、m7G（7-メチルグアノシン）、Gm（2'-O-メチルグアノシン）、m22G（N2, N2-ジメチルグアノシン）、m2Gm（N2, 2'-O-ジメチルグアノシン）、m2aGm（N2, N2, 2'-O-トリメチルグアノシン）、Gr(p)（2'-O-リボシルグアノシン（ホスフェート））、yW（ウィブトシン）、oayW（ペルオキシウィブトシン）、OH yW（ヒドロキシウィブトシン）、OH yW*（非改変ヒドロキシウィブトシン）、imG（ウイオシン）、mimG（メチルウイオシン）、Q（トリキューオシン）、oQ（エポキシトリキューオシン）、galQ（ガラクトシルトリキューオシン）、manQ（マンノシルトリキューオシン）、preQo（7-シアノ-7-デアザグアノシン）、preQi（7-アミノメチル-7-デアザグアノシン）、G+（アルカエオシン）、D（ジヒドロウリジン）、m5Um（5, 2'-O-ジメチルウリジン）、s4U（4-チオウ

30

40

50

リジン)、m5s2U(5-メチル-2-チオウリジン)、s2Um(2-チオ-2'-
 0-メチルウリジン)、acp3U(3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリ
 ジン)、ho5U(5-ヒドロキシウリジン)、mo5U(5-メトキシウリジン)、c
 mo5U(ウリジン5-オキシ酢酸)、mcmo5U(ウリジン5-オキシ酢酸メチルエ
 ステル)、chm5U(5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン)、mchm5
 U(5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル)、mcm5U(5-
 メトキシカルボニルメチルウリジン)、mcm5Um(5-メトキシカルボニルメチル-
 2'-0-メチルウリジン)、mcm5s2U(5-メトキシカルボニルメチル-2-チ
 オウリジン)、nm5S2U(5-アミノメチル-2-チオウリジン)、nmn5U(5-
 メチルアミノメチルウリジン)、nmn5s2U(5-メチルアミノメチル-2-チオ
 ウリジン)、nmn5se2U(5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン)、nc
 m5U(5-カルバモイルメチルウリジン)、ncm5Um(5-カルバモイルメチル-
 2'-0-メチルウリジン)、cmnm5U(5-カルボキシメチルアミノメチルウリジ
 ン)、cmnm5Um(5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-0-メチルウリジン
)、cmnm5s2U(5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン)、m6
 2A(N6,N6-ジメチルアデノシン)、Im(2'-0-メチルイノシン)、m4C
 (N4-メチルシチジン)、m4Cm(N4,2'-0-ジメチルシチジン)、hm5C
 (5-ヒドラキシメチルシチジン)、m3U(3-メチルウリジン)、cm5U(5-カ
 ルボキシメチルウリジン)、m6Am(N6,2'-0-ジメチルアデノシン)、m62
 Am(N6,N6,0-2'-トリメチルアデノシン)、m2,7G(N2,7-ジメチ
 ルグアノシン)、m2,2,7G(N2,N2,7-トリメチルグアノシン)、m3Um
 (3,2'-0-ジメチルウリジン)、m5D(5-メチルジヒドロウリジン)、f5C
 m(5-ホルミル-2'-0-メチルシチジン)、m'Gm(l,2'-0-ジメチルグア
 ノシン)、m'Am(l,2'-0-ジメチルアデノシン)、rm5U(5-タウリノメチ
 ルウリジン)、tm5s2U(5-タウリノメチル-2-チオウリジン)、imG-1
 4(4-デメチルウイオシン)、imG2(イソウイオシン)、又はac6A(N6-ア
 セチルアデノシン)、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、2-
 チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュードウリジン、2-チオ
 -シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメ
 チル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニル-ウリジン
 、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチ
 ル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、1-タウリノメチル
 -4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チ
 オ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュードウリジン、1-メ
 チル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウ
 リジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-ジヒドロウリジン、
 2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオ
 -ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオ-シュードウリ
 ジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセ
 チルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシ
 チジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソ
 シチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-シュード
 イソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-
 1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、
 ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼ
 ブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル
 -シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-シュ
 ードイソシチジン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、
 7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-ア
 ザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-

10

20

30

40

50

2, 6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N6, N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ウイオシン、ウィプトシン、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2, N2-ジメチルグアノシン、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオ-グアノシン、N2-メチル-6-チオ-グアノシン、及びN2, N2-ジメチル-6-チオ-グアノシン、5-メチルシトシン、シュードウリジン、及び1-メチルシュードウリジンからなる群から選択される、請求項4又は50に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項58】

請求項1～57のいずれかに記載のポリヌクレオチド構築物によって産生される環状RNA。

【請求項59】

前記標的配列に属さないいずれの他の配列も含まない、例えば、E2配列及びE1配列の全て又は一部を含まない、請求項58に記載の環状RNA。

20

【請求項60】

環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E2) ；
- (c) 標的配列；
- (d) エクソン断片1 (E1) ；及び
- (e) 5'イントロン断片

を含むベクターを調製することを含み、

30

前記5'イントロン断片及び前記3'イントロン断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、前記5'イントロン断片は、前記グループIIイントロンにおいて前記3'イントロン断片の5'側に位置し、

前記E1は、前記グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記E2は、前記グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである

、環状RNAを作製する方法。

40

【請求項61】

環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E2) ；
- (c) リンカー配列；
- (d) 標的配列；
- (e) リンカー配列；
- (f) エクソン断片1 (E1) ；及び
- (g) 5'イントロン断片

50

を含むベクターを調製することを含み、

前記 5'イントロン断片及び前記 3'イントロン断片は、各々グループ I イントロンの断片であり、前記 5'イントロン断片は、前記グループ I イントロンにおいて前記 3'イントロン断片の 5'側に位置し、

前記 E 1 は、前記グループ I イントロンの 5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記 E 2 は、前記グループ I イントロンの 3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、環状 RNA を作製する方法。

10

【請求項 6 2】

環状 RNA を作製する方法であって、5'から 3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5'相同アーム；
- (b) 3'イントロン断片；
- (c) エクソン断片 2 (E 2)；
- (d) 標的配列；
- (e) エクソン断片 1 (E 1)；
- (f) 5'イントロン断片；及び
- (g) 3'相同アーム

20

を含むベクターを調製することを含み、

前記 5'イントロン断片及び前記 3'イントロン断片は、各々グループ I イントロンの断片であり、前記 5'イントロン断片は、前記グループ I イントロンにおいて前記 3'イントロン断片の 5'側に位置し、

前記 E 1 は、前記グループ I イントロンの 5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記 E 2 は、前記グループ I イントロンの 3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、環状 RNA を作製する方法。

30

【請求項 6 3】

環状 RNA を作製する方法であって、5'から 3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5'相同アーム；
- (b) 3'イントロン断片；
- (c) エクソン断片 2 (E 2)；
- (d) リンカー配列；
- (e) 標的配列；
- (f) リンカー配列；
- (g) エクソン断片 1 (E 1)；
- (h) 5'イントロン断片；及び
- (i) 3'相同アーム

40

を含むベクターを調製することを含み、

前記 5'イントロン断片及び前記 3'イントロン断片は、各々グループ I イントロンの断片であり、前記 5'イントロン断片は、前記グループ I イントロンにおいて前記 3'イントロン断片の 5'側に位置し、

前記 E 1 は、前記グループ I イントロンの 5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

前記 E 2 は、前記グループ I イントロンの 3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

50

前記標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、環状RNAを作製する方法。

【請求項64】

細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、(a)請求項58～63のいずれか一項に記載の環状RNAで前記細胞をトランスフェクトすること、又は(b)請求項1～57のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド構築物を自己スプライシング環状化反応に供して環状RNAを形成することと、前記細胞を前記環状RNAでトランスフェクトすることと、を含み、好ましくは、前記細胞は真核細胞である、

細胞においてタンパク質を発現させるための方法。

【請求項65】

細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、(a)請求項58～63のいずれか一項に記載の環状RNAで前記細胞をトランスフェクトすること、又は(b)請求項1～57のいずれか一項に記載の構築物を自己スプライシング環状化反応に供して環状RNAを形成することと、前記細胞を前記環状RNAでトランスフェクトすることと、を含み、好ましくは、前記細胞は、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉系細胞、神経細胞（例えば、髄膜、星状膠細胞、運動ニューロン、後根神経節の細胞及び前角運動ニューロン）、光受容細胞（例えば、桿体及び錐体）、網膜色素上皮細胞、分泌細胞、心臓細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜内層細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、B細胞、T細胞、樹状細胞、マクロファージ、網赤血球、白血球、顆粒球、腫瘍細胞、NK細胞、肝スターレット細胞、HEK293、HEK293T、HeLa、MCF7、PC3、A549、NCI-H727、HCT-116、MCF10A、HPRC、FHC、不死化細胞株、初代細胞、酵母細胞、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、細菌細胞、大腸菌（*Escherichia coli*）、昆虫細胞、スポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）sf9、ミミックsf9、sf21、又はショウジョウバエ（*Drosophila*）S2である、細胞においてタンパク質を発現させるための方法。

【請求項66】

グループIIイントロンを用いて自己スプライシング活性を有する配列を生成するための方法であって、

(a) 前記グループIIイントロンの配列を定義し、任意に、スプライシングアッセイ（線状スプライシング）を使用して、前記グループIIイントロンのインビトロ自己スプライシング活性を検査する工程と、

(b) 前記グループIIイントロンを2つの断片に分割する工程と、

(c) 前記2つのイントロン断片の順序を逆にする工程と、

(d) スプライシングアッセイを使用して、RNAのインビトロ環状化を確認する工程と、

を含む、グループIIイントロンを用いて自己スプライシング活性を有する配列を生成するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2021年5月28日に出願された中国出願第202110594352.4号の利益を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子的に提出された配列表への参照

本出願は、2022年5月27日に作成された101,197バイトのサイズを有する「S2901CCD33CN__Sequence__Listing.txt」と題されたテキストファイルとして本出願と共に提出された配列表を参照により組み込む。

【0003】

本発明は、分子生物学の技術分野に関し、特に、環状RNAを調製するための構築物及び方法、並びに環状RNAの適用に関する。環状RNAは、真核細胞において対象となるタンパク質を発現させるために、又は非コードRNAの形態で対応する機能を果たすために使用され得る。

【背景技術】

【0004】

環状RNA (circRNA) は、ヘッドトゥテール (head-to-tail) ライゲーションによって形成される環状RNA分子のカテゴリーである。近年、環状RNAは、遺伝子転写を調節し、miRNA活性及びRNA結合タンパク質の結合を中和することができ、タンパク質に翻訳される鋳型として使用することもできることが報告されている (Yang, Y., et al., 「Extensive translation of circular RNAs driven by N(6)-methyladenosine,」 Cell Research, 27 (5) : 626-641 (2017); Abe, N., et al., 「Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells,」 Scientific Reports, 5 : 16435 (2015); Gao, X., et al., 「Circular RNA-encoded oncogenic E-cadherin variant promotes glioblastoma tumorigenicity through activation of EGF R-STAT3 signalling,」 Nature Cell Biology, 23 (3) : 278-291 (2021); Pamudurti, NR., et al., 「Translation of CircRNAs,」 Molecular Cell, 66 (1) : 9-21 (2017))。線状RNAと比較して、環状RNAは、その共有結合閉環状ヘッドトゥテール構造がRNA分解系によって容易に認識されないため、より強い安定性を有し、新世代のRNA薬物プラットフォームになる可能性及び見通しを有する。

【0005】

現在、インビトロで環状RNAを調製するための3つの主な方法がある。1つの方法は、核酸リガーゼによって触媒されるRNAライゲーション反応を介して、線状RNAの5'末端及び3'末端をヘッドトゥテール様式で連結し、環状RNAを得ることを伴う。RNAリガーゼは、T4 RNAリガーゼ等の外来タンパク質である。1つの方法は、RNAの5'末端及び3'末端が、シアン化臭素及びモルホリニル誘導体の触媒作用によって連結される化学ライゲーションである。別のより進歩した方法は、リボザイム触媒RNAスプライシングを介してヘッドトゥテール環状RNAを得ることを伴う。自己スプライシング機能を有するリボザイム配列含有発現フレームワークを設計することにより、この方法で環状RNAを発現させる。

【0006】

現在、RNA自己スプライシングが可能なリボザイムは、概ね2つの主要なカテゴリー、すなわちそれぞれグループI及びグループIIイントロンに分けられる。両方のカテゴリーのイントロンが、適切な反応条件下で自己スプライシングし得、2つのRNA断片を一緒に連結することが、文献において報告されている。リボザイムの2つのカテゴリーのスプライシング産物は類似しているが、リボザイム自体の構造及びスプライシング機構はかなり異なる。

【0007】

グループIIイントロンは、9-ヘリックス構造を有し、これは、触媒スプライシング中に反応を引き起こすためにグアノシン-リン酸 (pG-OH) 中の外部ヒドロキシル基を必要とし、グループIIイントロンの両端に位置するエクソンの配列に高度に依存する。

【0008】

グループIIイントロンは、核酸配列内のそれ自身のヒドロキシル基に依存してスプライシングを引き起こす。このスプライシング機構は、スプライソソームによって媒介され

るスプライシング反応により近く、すなわち、高等生物におけるスプライシングをより良好にシミュレートし得る。

【0009】

上記の構造的差異は、グループIイントロンの自己スプライシングが、瘢痕配列としても知られる、より長い元のエクソン配列を必要とすることを決定付けるものである。

【0010】

以前の研究は、環状RNAが、これらの2つのカテゴリーのイントロンリボザイムをそれぞれ使用することによってインビトロで調製され得ることを示しているが、効率は比較的低い(Puttaraju, M. & Been, MD., 「Group I permitted intron-exon (PIE) sequences self-spl

10

【0011】

Wesselhoeft et alの論文は、グループIイントロンを含む構築物を最適化することによってRNA環状化の効率を改善する方法を報告し(Wesselhoeft, RA., et al., 「Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells,」Nature Communications, 9(1):2629(2018))、関連特許出願(国際公開第2019/236673号)は、環状コードRNAの形成のためのグループIイントロン含有構築物を開示している。Wesselhoeft et al. は、グループIイントロンとその両端のエクソンとを再配置し、内部リボソーム進入部位(IRES)を有する対象となるタンパク(POI)をこのフレームワークに構築し、次いで、GTPの存在において自己スプライシング反応によって、POIが翻訳され得る環状コードRNAを得ている。異なるグループIイントロンを選択し、設計及び操作を実施することによって、RNA環状化の効率が改善される。具体的には、この技術では、いくつかの欠失が最初にT4ファージのTd遺伝子において作製され、リボザイム活性を維持するために正確に折り畳まれ得る配列を保持し、イントロン及びエクソンの一部分を含み、次いで、配列が2つの部分に分割され、IRES-POIの5'末端に3'末端イントロン及びエクソン断片2(E2)を構築し、IRES-POIの3'末端にエクソン断片1(E1)及び5'末端イントロンを構築し、GTP及びマグネシウムイオンの存在下で自己スプライシングによって環状RNAを得た。しかしながら、Wesselhoeft et al. は、5'末端及び3'末端スプライス部位が標的遺伝子の挿入により効率的にスプライシングされ得ないことを見出した。この問題に対処するために、Wesselhoeft et al. は、スプライス部位の近くに相補的に対合した「相同アーム」を挿入し、それによってスプライシングの効率を増加させた。更に、既存の文献(Mikheeva, S. et al., (1997), supra)によれば、別のグループIイントロンであるAnabaenaが選択され、そのスプライシング効率がTdイントロンよりも高いことが見出され、スプライシング効率を更に改善するために同様の設計及び操作が行われた。論文は、最終的に、POIが発現フレームワークから効果的に翻訳され得ることを検証している。

20

30

40

【0012】

しかしながら、Wesselhoeft et al. の設計には以下の欠点がある。

1. グループIイントロンを使用する場合、より長い元のエクソン配列が含まれる必要があり、それにより、元の外因性配列(瘢痕配列)が発現産物中に含まれる。標的配列を環状RNAに調製するプロセスにおいて、その後の適用の便宜のために、標的配列に属さない配列を除去することが通常望ましい。

50

2. グループIイントロンは、自己スプライシングのためのエネルギーを提供するためにGTPの関与を必要とする。

一方、以前の文献におけるグループIIイントロンのスプライシング効率は比較的低い(約10%) (Mikheeva, S. et al., (1997), supra)。したがって、当該技術分野において、環状RNAを調製するための改善された構築物及び方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0013】

スクリーニング及び設計最適化を通して、本出願の発明者らは、上記の問題を克服する、グループIIイントロンの自己スプライシングによって環状RNAを調製するための方法論を創出した。

【0014】

したがって、本発明は、インビトロで自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E2)；
- (c) 標的配列；
- (d) エクソン断片1 (E1)；及び
- (e) 5'イントロン断片

を含み、

5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおいて3'イントロン断片の5'側に位置し、

E1は、グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E2は、グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、インビトロで自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物を提供する。

【0015】

本発明はまた、インビトロで自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E2)；
- (c) リンカー配列；
- (d) 標的配列；
- (e) リンカー配列；
- (f) エクソン断片1 (E1)；及び
- (g) 5'イントロン断片

を含み、

5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおいて3'イントロン断片の5'側に位置し、

E1は、グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E2は、グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、インビトロで自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

構築物を提供する。

【0016】

本発明はまた、インビトロで自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5' 相同アーム；
- (b) 3' インترون断片；
- (c) エクソン断片2 (E 2) ；
- (d) 標的配列；
- (e) エクソン断片1 (E 1) ；
- (f) 5' インترون断片；及び
- (g) 3' 相同アーム

10

を含み、

5' インترون断片及び3' インترون断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5' インترون断片は、グループIIイントロンにおいて3' インترون断片の5' 側に位置し、

E 1は、グループIIイントロンの5' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E 2は、グループIIイントロンの3' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、インビトロで自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物を提供する。

20

【0017】

本発明はまた、インビトロで自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5' 相同アーム；
- (b) 3' インترون断片；
- (c) エクソン断片2 (E 2) ；
- (d) リンカー配列；
- (e) 標的配列；
- (f) リンカー配列；
- (g) エクソン断片1 (E 1) ；
- (h) 5' インترون断片；及び
- (i) 3' 相同アーム

30

を含み、

5' インترون断片及び3' インترون断片は、各々2つの断片へのグループIIイントロンの断片であり、5' インترون断片は、グループIIイントロンにおける3' インترون断片の5' 側に位置し、

E 1は、グループIIイントロンの5' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

40

E 2は、グループIIイントロンの3' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、インビトロで自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物を提供する。

【0018】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、RNAポリヌクレオチド構築物である。

【0019】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、インビトロで標的配列の環状R

50

NAを形成することができる。

【0020】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、インビボで標的配列の環状RNAを形成することができる。

【0021】

本発明は、本発明のポリヌクレオチド構築物によって産生される環状RNAを提供する。いくつかの実施形態では、環状RNAは、少なくとも500ヌクレオチド長、少なくとも1,000ヌクレオチド長、又は少なくとも1,500ヌクレオチド長である。

【0022】

本発明は、本発明のポリヌクレオチド構築物を用いて環状RNAを作製する方法を提供する。 10

【0023】

本発明は、環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E2)；
- (c) 標的配列；
- (d) エクソン断片1 (E1)；及び
- (e) 5'イントロン断片

を含むベクターを調製することを含み、 20

5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおいて3'イントロン断片の5'側に位置し、

E1は、グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E2は、グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、方法を提供する。

【0024】 30

本発明はまた、環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E2)；
- (c) リンカー配列；
- (d) 標的配列；
- (e) リンカー配列；
- (f) エクソン断片1 (E1)；及び
- (g) 5'イントロン断片

を含むベクターを調製することを含み、 40

5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおいて3'イントロン断片の5'側に位置し、

E1は、グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E2は、グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、方法を提供する。

【0025】 50

本発明はまた、環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5' 相同アーム；
- (b) 3' インترون断片；
- (c) エクソン断片2 (E 2) ；
- (d) 標的配列；
- (e) エクソン断片1 (E 1) ；
- (f) 5' インترون断片；及び
- (g) 3' 相同アーム

を含むベクターを調製することを含み、

10

5' インترون断片及び3' インترون断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5' インترون断片は、グループIIイントロンにおいて3' インترون断片の5' 側に位置し、

E 1は、グループIIイントロンの5' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E 2は、グループIIイントロンの3' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、方法を提供する。

20

【0026】

本発明はまた、環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5' 相同アーム；
- (b) 3' インترون断片；
- (c) エクソン断片2 (E 2) ；
- (d) リンカー配列；
- (e) 標的配列；
- (f) リンカー配列；
- (g) エクソン断片1 (E 1) ；
- (h) 5' インترون断片；及び
- (i) 3' 相同アーム

30

を含むベクターを調製することを含み、

5' インترون断片及び3' インترون断片は、各々2つの断片へのグループIIイントロンの断片であり、5' インترون断片は、グループIIイントロンにおける3' インترون断片の5' 側に位置し、

E 1は、グループIIイントロンの5' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E 2は、グループIIイントロンの3' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、方法を提供する。

40

【0027】

本発明は、細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、本発明の環状RNAを細胞にトランスフェクトすることを含む、方法を提供する。

【0028】

本発明は、細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、(a) 細胞を本発明の環状RNAでトランスフェクトすること、又は(b) 本発明のポリヌクレオチド構築物を自己スプライシング環状化反応に供して環状RNAを形成することと、細胞を環状RNAでトランスフェクトすることと、を含み、好ましくは、細胞は真核細胞である、方法を提供する。

50

【0029】

本発明は、グループⅡイントロンを使用して自己スプライシング活性を有する配列を生成するための方法であって、

(a) グループⅡイントロンの配列を定義し、任意に、スプライシングアッセイ（線状スプライシング）を使用して、グループⅡイントロンのインビトロ自己スプライシング活性を検査する工程と、

(b) グループⅡイントロンを2つの断片に分割する工程と、

(c) 2つのイントロン断片の順序を逆にする工程と、

(d) スプライシングアッセイを使用して、RNAのインビトロ環状化を確認する工程と、

を含む、方法を提供する。

10

【0030】

本発明の構築物、方法及び適用は、少なくとも以下の利点を有する。

1. 環状RNAは瘢痕配列なしで産生され、これは秩序ある適用に、よりつながる。

2. GTPは、環状RNAを形成するためのポリヌクレオチドの自己スプライシング反応に必要とされない（例えば、いくつかの実施形態では、Mgイオン及びNaイオンのみが必要とされる）；並びに／又は

3. グループⅡイントロンのスプライシング効率は大幅に改善され、10%から約50%に増加し得、更に98%までの最も高いスプライシング効率も達成され得る。

【0031】

20

具体的な実施形態では、E1及び／又はE2は、0～20ヌクレオチド長、好ましくは0～10ヌクレオチド長、例えば0、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10ヌクレオチド長である。

【0032】

特定の実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、不對領域でグループⅡイントロンを2つの断片にセグメント化する。特定の実施形態では、不對領域は、グループⅡイントロンの2つの隣接するドメイン間の線状領域又はドメイン4のステムループ構造のループ領域から選択される。

【0033】

特定の実施形態では、グループⅡイントロンは、その野生型形態と比較して1つ以上のヌクレオチドの改変を含み、改変は、欠失、置換、及び付加のうちの1つ以上から選択される。

30

【0034】

特定の実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片はそれぞれ、互いに相補的な対合配列の1つ以上の対を含む。好ましい実施形態では、相補的に対合した配列は、20ヌクレオチド長より長い。

【0035】

特定の実施形態では、5'イントロン断片及び／又は3'イントロン断片は、プローブ結合配列、MS2結合部位、PP7結合部位、及びストレプトアビジン結合部位の群のうちの1つ以上から選択される1つ以上の親和性タグ配列を含む。

40

【0036】

特定の実施形態では、E1及びE2は0であり、改変は、グループⅡイントロンの1つ以上のEBS配列の改変を含み、その結果、EBS配列がそれぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%で標的配列中の対応する長さの1つ以上の領域と相補的に対合する。EBS配列は、EBS1、EBS2、及びEBS3のうちの1つ以上、好ましくはそれらのうちの任意の2つ、より好ましくはEBS1及びEBS3から選択される。好ましい実施形態では、改変は、グループⅡイントロンの2つのEBS配列、好ましくはEBS1及びEBS3の改変であり、その結果、EBS配列は、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%において、標的配列中の対応する長さの2つの領域と相補的に対合する。好ましい実施形態では、改変は、グループⅡイントロンの2つのEBS配列、好ましくはE

50

B S 1 ' 及び E B S 3 ' の改変であり、その結果、E B S 配列は、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも 60 % において、標的配列中の対応する長さの 2 つの領域と相補的に対合する。好ましい実施形態では、改変は、グループ I イントロンの 2 つの E B S 配列、好ましくは E B S 1 " 及び E B S 3 " の改変であり、その結果、E B S 配列は、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも 60 % において、標的配列中の対応する長さの 2 つの領域と相補的に対合する。別の好ましい実施形態では、改変は、グループ I イントロンの δ 又は δ " 配列の改変であり、 δ 又は δ " 配列は、それぞれ少なくとも 60 % のヌクレオチド位置において、標的配列の対応する長さの領域と相補的に対合する。好ましくは、領域は標的配列の一方の末端に位置する。

【0037】

10

好ましい実施形態では、標的配列中の対応する長さの 2 つの領域は、それぞれ標的配列の両端に位置する。

【0038】

特定の実施形態では、改変は、ドメイン 4 の一部又は全部の欠失、例えばドメイン 4 における I E P 配列の欠失、好ましくはドメイン 4 の全部の欠失である。

【0039】

特定の実施形態では、グループ I イントロンは、微生物に由来するグループ I イントロンである。好ましくは、グループ I イントロンは、インビトロ自己スプライシング活性を有する。特定の実施形態では、グループ I イントロンは、クロストリジウム (*Clostridium*) (例えば、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)) 又はバチルス (*Bacillus*) (例えば、バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*)) 由来のグループ I イントロンである。特定の実施形態では、グループ I イントロンは、配列番号 1 又は 2 のヌクレオチド配列に含まれるグループ I イントロンである。

20

【0040】

特定の実施形態では、タンパク質非コード配列は、配列番号 4 ~ 6 のいずれか等のスペーサー配列、A 及び / 又は T リッチ配列、ポリ A 配列、ポリ A - C 配列、ポリ C 配列、ポリ U 配列、I R E S、リボソーム結合部位、アプタマー配列、RNA 足場、リボスイッチ、自己スプライシングリボザイム以外のリボザイム、小 RNA、翻訳調節配列、並びにタンパク質結合部位の群のうちの 1 つ以上から選択される。

【0041】

30

特定の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、インビトロで標的配列の環状 RNA を形成することができる。

【0042】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、インビボで標的配列の環状 RNA を形成することができる。

【0043】

第 2 の態様では、本発明は、第 1 の態様の構築物によって産生される環状 RNA を提供する。好ましくは、環状 RNA は、標的配列に属さないいずれの他の配列も含まず、例えば、E 2 配列及び E 1 配列を含まない。

【0044】

40

特定の実施形態では、標的配列がタンパク質コード配列である技術的解決策において、環状 RNA は、少なくとも 500 ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも 1,000 ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも 1,500 ヌクレオチド長である。標的配列が非コード RNA である技術的解決策では、標的配列はより短くてもよい。

【0045】

第 3 の態様において、本発明は、細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、第 2 の態様の環状 RNA で細胞をトランスフェクトすることを含む、細胞においてタンパク質を発現させるための方法を提供する。

【0046】

第 4 の態様では、本発明は、細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって

50

、第1の態様の構築物を自己スプライシング環状化反応に供して環状RNAを形成することと、細胞を環状RNAでトランスフェクトすることと、を含む、細胞においてタンパク質を発現させるための方法を提供する。

【0047】

第3及び第4の態様の特定の実施形態では、細胞は真核細胞である。

【0048】

本発明の構築物、方法及び適用は、少なくとも以下の利点を有する。

1. 好ましい技術的解決策では、瘢痕配列を有していない環状RNAを生成することができ、これは、秩序ある適用に、よりつながる。

2. GTPは、環状RNAを形成するための自己スプライシング反応に関与する必要がなく、Mgイオン及びNaイオンのみが提供される必要がある。

3. グループIIイントロンのスプライシング効率は大幅に改善され、10%から約50%に増加し得、更に98%までの最も高いスプライシング効率も達成され得る。

4. 例示的な実施形態

セット1

1. 自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に作動可能に連結された以下の要素：

- (1) 3'イントロン断片；
- (2) エクソン断片2 (E2)；及び
- (3) 標的配列；
- (4) エクソン断片1 (E1)；及び
- (5) 5'イントロン断片

を含み、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、グループIIイントロンを2つの断片に分割することによって得られ、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおいて3'イントロン断片の5'側に位置し、

E1は、グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E2は、グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、空であるか、又はタンパク質コード配列及び／若しくは非コード配列である、インビトロで自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物。

2. E1及び／又はE2が、0～20ヌクレオチド長、好ましくは0～10ヌクレオチド、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10ヌクレオチドである、段落1に記載のポリヌクレオチド構築物。

3. 5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、グループIIイントロンを不對領域で2つの断片にセグメント化することによって得られ、不對領域が、好ましくは、グループIIイントロンの2つの隣接するドメイン間の線状領域又はドメイン4のステムループ構造のループ領域から選択される、段落1に記載のポリヌクレオチド構築物。

4. グループIIイントロンが、その野生型形態と比較して1つ以上のヌクレオチドの改変を含み、改変が、欠失、置換、及び付加のうちの1つ以上から選択される、段落1に記載のポリヌクレオチド構築物。

5. E1及びE2が0であり、改変が、グループIIイントロンの1つ以上のEBS配列の改変を含み、その結果、EBS配列がそれぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%において、標的配列中の対応する長さの1つ以上の領域と相補的に対合する、段落4に記載のポリヌクレオチド構築物。

6. 改変が、EBS1及びEBS3等のグループIIイントロンの2つのEBS配列の改変であり、その結果、EBS配列が、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%において、標的配列中の対応する長さの2つの領域と相補的に対合し、好ましくは、2つの領域は、標的配列の両端にそれぞれ位置する、段落5に記載のポリヌクレオチド構築物。

7. 改変がドメイン4の一部又は全部の欠失、例えばドメイン4中のIEP配列の欠失

10

20

30

40

50

、好ましくはドメイン 4 の全部の欠失を含む、段落 4 に記載のポリヌクレオチド構築物。

8. グループ I イントロンが微生物に由来するグループ I イントロンである、段落 1 に記載のポリヌクレオチド構築物。

9. 非コード配列が、配列番号 4 ～ 6 のスペーサー配列、ポリ A 配列、ポリ A-C 配列、ポリ C 配列、ポリ U 配列、IRES、リボソーム結合部位、アプタマー配列、RNA 足場、リボスイッチ、自己スプライシングリボザイム以外のリボザイム、小 RNA 結合部位、翻訳調節配列、及びタンパク質結合部位のいずれかの群の配列から選択される、段落 1 に記載のポリヌクレオチド構築物。

10. 段落 1 ～ 9 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物によって産生される環状 RNA。

11. 標的配列に属さないいずれの他の配列も含まない、例えば、E2 配列及び E1 配列の全て又は一部を含まない、段落 10 に記載の環状 RNA。

12. 細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、(a) 段落 10 若しくは 11 に記載の環状 RNA を細胞にトランスフェクトすること、又は (b) 段落 1 ～ 9 のいずれかに記載の構築物を自己スプライシング環状化反応に供して環状 RNA を形成することと、細胞に環状 RNA をトランスフェクトすることと、を含み、

好ましくは、細胞は真核細胞である、方法。

セット 2

【0049】

実施形態 1

【0050】

自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5' から 3' に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 3' イントロン断片；
- (b) エクソン断片 2 (E2) ；
- (c) 標的配列；
- (d) エクソン断片 1 (E1) ；及び
- (e) 5' イントロン断片

を含み、

5' イントロン断片及び 3' イントロン断片は、各々グループ I イントロンの断片であり、5' イントロン断片は、グループ I イントロンにおいて 3' イントロン断片の 5' 側に位置し、

E1 は、グループ I イントロンの 5' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上であり、

E2 は、グループ I イントロンの 3' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物。

【0051】

実施形態 2

【0052】

自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5' から 3' に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 3' イントロン断片；
- (b) エクソン断片 2 (E2) ；
- (c) リンカー配列；
- (d) 標的配列；
- (e) リンカー配列；
- (f) エクソン断片 1 (E1) ；及び
- (g) 5' イントロン断片

を含み、

5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおいて3'イントロン断片の5'側に位置し、

E1は、グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E2は、グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物を提供する。

10

【0053】

実施形態3

【0054】

自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5'相同アーム；
- (b) 3'イントロン断片；
- (c) エクソン断片2 (E2)；
- (d) 標的配列；
- (e) エクソン断片1 (E1)；
- (f) 5'イントロン断片；及び
- (g) 3'相同アーム

20

を含み、

5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおいて3'イントロン断片の5'側に位置し、

E1は、グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E2は、グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

30

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物。

【0055】

実施形態4

【0056】

自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5'相同アーム；
- (b) 3'イントロン断片；
- (c) エクソン断片2 (E2)；
- (d) リンカー配列；
- (e) 標的配列；
- (f) リンカー配列；
- (g) エクソン断片1 (E1)；
- (h) 5'イントロン断片；及び
- (i) 3'相同アーム

40

を含み、

5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、各々2つの断片へのグループIIイントロンの断片であり、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおける3'イントロ

50

ン断片の 5' 側に位置し、

E 1 は、グループ I イントロンの 5' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上であり、

E 2 は、グループ I イントロンの 3' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物。

【0057】

実施形態 5

【0058】

インビトロで自己スプライシング活性を有する、実施形態 1～4 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0059】

実施形態 6

【0060】

E 1 及び／又は E 2 が、0～20 ヌクレオチド長、好ましくは 0～10 ヌクレオチド長、例えば 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 ヌクレオチド長である、実施形態 1～5 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0061】

実施形態 7

【0062】

5' イントロン断片及び 3' イントロン断片が、グループ I イントロンを不對領域、例えば、グループ I イントロンの 2 つの隣接するドメイン間の線状領域である不對領域で 2 つの断片にセグメント化することによって得られる、実施形態 1～6 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0063】

実施形態 8

【0064】

5' イントロン断片及び 3' イントロン断片が、ドメイン 1 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態 1～6 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0065】

実施形態 9

【0066】

5' イントロン断片及び 3' イントロン断片が、ドメイン 2 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態 1～6 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0067】

実施形態 10

【0068】

5' イントロン断片及び 3' イントロン断片が、ドメイン 3 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態 1～6 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0069】

実施形態 11

【0070】

5' イントロン断片及び 3' イントロン断片が、ドメイン 4 のステムループ構造のループ領域でグループ I イントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態 1～6 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0071】

10

20

30

40

50

実施形態 1 2

【0072】

5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、ドメイン5のステムループ構造のループ領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態1～6のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0073】

実施形態 1 3

【0074】

5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、ドメイン6のステムループ構造のループ領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態1～6のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【0075】

実施形態 1 4

【0076】

5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、ドメイン1とドメイン2との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態1～6のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0077】

実施形態 1 5

【0078】

5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、ドメイン2とドメイン3との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態1～6のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【0079】

実施形態 1 6

【0080】

5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、ドメイン3とドメイン4との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態1～6のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0081】

30

実施形態 1 7

【0082】

5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、ドメイン4とドメイン5との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態1～6のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0083】

実施形態 1 8

【0084】

5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、ドメイン5とドメイン6との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる、実施形態1～6のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

40

【0085】

実施形態 1 9

【0086】

グループIIイントロンが、その野生型形態と比較して1つ以上のヌクレオチドの改変を含み、改変が、欠失、置換、及び付加のうちの1つ以上から選択される、実施形態1～18のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0087】

実施形態 2 0

【0088】

50

改変が、グループ I イントロンの 1 つ以上の E B S 配列の改変を含み、E B S 配列が、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも 60 % において、標的配列中の対応する長さの 1 つ以上の領域と相補的に対合する、実施形態 19 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0089】

実施形態 21

【0090】

改変が、E B S 1 及び E B S 3 等のグループ I イントロンの 2 つの E B S 配列の改変であり、E B S 配列が、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも 60 % において、標的配列中の対応する長さの 2 つの領域と相補的に対合し、好ましくは、2 つの領域は、標的配列の両端にそれぞれ位置する、実施形態 19 に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【0091】

改変が、グループ I イントロンの E B S 1 及び／若しくは δ 配列の改変、又は E B S 1' 及び／若しくは δ '' 配列の改変であり、E B S 1 及び／又は δ 配列が、ヌクレオチドの少なくとも 60 % において、標的配列中の対応する長さの領域と相補的に対合し、任意に、改変が、E B S 1 及び／又は δ 配列並びにその上流配列の改変であり、E B S 1 及び／又は δ 配列並びにその上流配列が、ヌクレオチドの少なくとも 60 % において、標的配列中の対応する長さの領域と相補的に対合する、実施形態 19 に記載のポリヌクレオチド構築物。いくつかの実施形態では、標的配列中の対応する長さの領域は、I B S 3、I B S 3'、下流配列を有する I B S 3、又は下流配列を有する I B S 3' である。いくつかの実施形態では、 δ 配列及びその上流は、(a) 改変が、グループ I イントロンの δ 又は δ '' 配列の改変であり、 δ 又は δ '' 配列が、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも 60 % において、標的配列中の対応する長さの領域と相補的に対合し、好ましくは、領域は標的配列の一方の末端に位置すること、からなる群から選択される核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 δ 配列及びその上流は、配列番号 127、(b) 配列番号 128、(c) 配列番号 129、及び (d) 配列番号 130 を含む。いくつかの実施形態では、I B S 3 及びその下流は、(a) 配列番号 131、(b) 配列番号 132、(c) 配列番号 133、及び (d) 配列番号 134 からなる群から選択される核酸配列を含む。

20

【0092】

実施形態 22

【0093】

改変が、ドメイン 4 におけるイントロンコードタンパク質 (I E P) 配列の欠失、好ましくはドメイン 4 の全ての欠失等の、ドメイン 4 の一部又は全ての欠失を含む、実施形態 19 に記載のポリヌクレオチド構築物。

30

【0094】

実施形態 23

【0095】

改変が、オープンリーディングフレーム (O R F) の欠失を含む、実施形態 19 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0096】

実施形態 24

【0097】

ポリヌクレオチド構築物が、標的配列のほぼ無痕環状 R N A を形成することができる、実施形態 1 ~ 23 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

40

【0098】

実施形態 25

【0099】

ほぼ無痕環状 R N A が、1 ヌクレオチド長、2 ヌクレオチド長、3 ヌクレオチド長、4 ヌクレオチド長、5 ヌクレオチド長、6 ヌクレオチド長、7 ヌクレオチド長、8 ヌクレオチド長、9 ヌクレオチド長、10 ヌクレオチド長、11 ヌクレオチド長、12 ヌクレオチド長、13 ヌクレオチド長、14 ヌクレオチド長、15 ヌクレオチド長、16 ヌクレオ

50

チド長、17ヌクレオチド長、18ヌクレオチド長、19ヌクレオチド長、又は20ヌクレオチド長以下の癍痕領域を有する、実施形態24に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0100】

実施形態26

【0101】

ポリヌクレオチド構築物が、標的配列の無癍痕環状RNAを形成することができる、実施形態1～23のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0102】

実施形態27

【0103】

E1及びE2が各々0ヌクレオチド長である、実施形態1～26のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0104】

実施形態28

【0105】

E1が0ヌクレオチド長である、実施形態1～26のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0106】

実施形態29

【0107】

E2が0ヌクレオチド長である、実施形態1～26のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0108】

実施形態30

【0109】

グループIIイントロンが、微生物（例えば、破傷風菌（*Clostridium tetani*）、又はバチルス・チューリンゲンシス（*Bacillus thuringiensis*）等のバチルス（*Bacillus*））に由来するグループIIイントロンである、実施形態1～29のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0110】

実施形態31

【0111】

非コード配列が、配列番号4～6のスペーサー配列、ポリA配列、ポリ-A-C配列、ポリ-C配列、ポリ-U配列、IRES、リボソーム結合部位、アプタマー配列、RNA足場、リボスイッチ、自己スプライシングリボザイム以外のリボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、足場、低分子RNA結合部位、翻訳調節配列、及びタンパク質結合部位からなる群から選択される、実施形態1～30のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0112】

実施形態32

【0113】

グループIIイントロンが、以下からなる群から選択される核酸配列を含む、実施形態1～31のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物：

- (a) 配列番号33；
- (b) 配列番号34；
- (c) 配列番号35；
- (d) 配列番号36；
- (e) 配列番号37；
- (f) 配列番号38；
- (g) 配列番号39；

10

20

30

40

50

(h) 配列番号 40 ; 及び

(i) 配列番号 41。

【0114】

実施形態 32-1

【0115】

グループ I イントロンが、配列番号 33 ~ 配列番号 41 からなる群から選択される核酸配列から本質的になる、実施形態 32 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0116】

実施形態 32-2

【0117】

グループ I イントロンが、配列番号 33 ~ 配列番号 41 からなる群から選択される核酸配列からなる、実施形態 32 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0118】

実施形態 33

【0119】

ポリヌクレオチド構築物が RNA ポリヌクレオチド構築物である、実施形態 1 ~ 32 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0120】

実施形態 34

【0121】

3' イントロン断片が、以下からなる群から選択される核酸配列を含む、実施形態 33 に記載のポリヌクレオチド構築物：

(a) 配列番号 42 と 95 % 同一の核酸配列；

(b) 配列番号 42 と 98 % 同一の核酸配列；

(c) 配列番号 42 と 99 % 同一の核酸配列；

(d) 配列番号 42 ；

(e) 配列番号 43 と 95 % 同一の核酸配列；

(f) 配列番号 43 と 98 % 同一の核酸配列；

(g) 配列番号 43 と 99 % 同一の核酸配列；

(h) 配列番号 43 ；

(i) 配列番号 44 と 95 % 同一の核酸配列；

(j) 配列番号 44 と 98 % 同一の核酸配列；

(k) 配列番号 44 と 99 % 同一の核酸配列；

(l) 配列番号 44 ；

(m) 配列番号 45 と 95 % 同一の核酸配列；

(n) 配列番号 45 と 98 % 同一の核酸配列；

(o) 配列番号 45 と 99 % 同一の核酸配列；

(p) 配列番号 45 ；

(q) 配列番号 46 と 95 % 同一の核酸配列；

(r) 配列番号 46 と 98 % 同一の核酸配列；

(s) 配列番号 46 と 99 % 同一の核酸配列；

(t) 配列番号 46 ；

(u) 配列番号 47 と 95 % 同一の核酸配列；

(v) 配列番号 47 と 98 % 同一の核酸配列；

(w) 配列番号 47 と 99 % 同一の核酸配列；

(x) 配列番号 47 ；

(y) 配列番号 48 と 95 % 同一の核酸配列；

(z) 配列番号 48 と 98 % 同一の核酸配列；

(aa) 配列番号 48 と 99 % 同一の核酸配列；

(bb) 配列番号 48 の核酸配列；

10

20

30

40

50

- (c c) 配列番号 49 と 95 % 同一の核酸配列 ;
- (d d) 配列番号 49 と 98 % 同一の核酸配列 ;
- (e e) 配列番号 49 と 99 % 同一の核酸配列 ;
- (f f) 配列番号 49 ;
- (g g) 配列番号 50 と 95 % 同一の核酸配列 ;
- (h h) 配列番号 50 と 98 % 同一の核酸配列 ;
- (i i) 配列番号 50 と 99 % 同一の核酸配列 ;
- (j j) 配列番号 50 ;
- (k k) 配列番号 51 と 95 % 同一の核酸配列 ;
- (l l) 配列番号 51 と 98 % 同一の核酸配列 ;
- (m m) 配列番号 51 と 99 % 同一の核酸配列 ;
- (n n) 配列番号 51 ;
- (o o) 配列番号 52 と 95 % 同一の核酸配列 ;
- (p p) 配列番号 52 と 98 % 同一の核酸配列 ;
- (q q) 配列番号 52 と 99 % 同一の核酸配列 ; 及び
- (r r) 配列番号 52 。

10

【0122】

実施形態 34-1

【0123】

3'イントロン断片が、配列番号 42 ~ 配列番号 52 のいずれか 1 つと 95 % 同一の核酸配列、配列番号 42 ~ 配列番号 52 のいずれか 1 つと 98 % 同一の核酸配列、配列番号 42 ~ 配列番号 52 のいずれか 1 つと 99 % 同一の核酸配列、及び配列番号 42 ~ 配列番号 52 のいずれか 1 つからなる群から選択される核酸配列から本質的になる、実施形態 34 に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【0124】

実施形態 34-2

【0125】

3'イントロン断片が、配列番号 42 ~ 配列番号 52 のいずれか 1 つと 95 % 同一の核酸配列、配列番号 42 ~ 配列番号 52 のいずれか 1 つと 98 % 同一の核酸配列、配列番号 42 ~ 配列番号 52 のいずれか 1 つと 99 % 同一の核酸配列、及び配列番号 42 ~ 配列番号 52 のいずれか 1 つからなる群から選択される核酸配列からなる、実施形態 34 に記載のポリヌクレオチド構築物。

30

【0126】

実施形態 35

【0127】

E2 が、以下からなる群から選択される核酸配列を含む、実施形態 33 又は 34 に記載のポリヌクレオチド構築物。

- (a) 配列番号 53 ;
- (b) 配列番号 54 ;
- (c) 配列番号 55 ;
- (d) 配列番号 56 。
- (e) 配列番号 57 ;
- (f) 配列番号 58 ;
- (g) 配列番号 59 ;
- (h) 配列番号 60 。
- (i) 配列番号 61 ;
- (j) 配列番号 62 ; 及び
- (k) 配列番号 63 。

40

【0128】

実施形態 35-1

50

【0129】

E 2 が、配列番号 53 ～ 配列番号 63 からなる群から選択される核酸配列から本質的になる、実施形態 35 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0130】

実施形態 35 - 2

【0131】

E 2 が、配列番号 53 ～ 配列番号 63 からなる群から選択される核酸配列からなる、実施形態 35 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0132】

実施形態 36

10

【0133】

E 1 が、以下からなる群から選択される核酸配列を含む、実施形態 33 ～ 35 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物：

- (a) 配列番号 64 ；
- (b) 配列番号 65 ；
- (c) 配列番号 66 ；
- (d) 配列番号 67 。
- (e) 配列番号 68 ；
- (f) 配列番号 69 ；
- (g) 配列番号 70 ；
- (h) 配列番号 71 。
- (i) 配列番号 72 ；
- (j) 配列番号 73 ；及び
- (k) 配列番号 74 。

20

【0134】

実施形態 36 - 1

【0135】

E 1 が、配列番号 64 ～ 配列番号 74 からなる群から選択される核酸配列から本質的になる、実施形態 36 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0136】

30

実施形態 36 - 2

【0137】

E 1 が、配列番号 64 ～ 配列番号 74 からなる群から選択される核酸配列からなる、実施形態 36 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0138】

実施形態 37

【0139】

5'イントロン断片が、以下からなる群から選択される核酸配列を含む、実施形態 33 ～ 36 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物：

- (a) 配列番号 75 と 95 % 同一の核酸配列 ；
- (b) 配列番号 75 と 98 % 同一の核酸配列 ；
- (c) 配列番号 75 と 99 % 同一の核酸配列 ；
- (d) 配列番号 75 ；
- (e) 配列番号 76 と 95 % 同一の核酸配列 ；
- (f) 配列番号 76 と 98 % 同一の核酸配列 ；
- (g) 配列番号 76 と 99 % 同一の核酸配列 ；
- (h) 配列番号 76 ；
- (i) 配列番号 77 と 95 % 同一の核酸配列 ；
- (j) 配列番号 77 と 98 % 同一の核酸配列 ；
- (k) 配列番号 77 と 99 % 同一の核酸配列 ；

40

50

- (l) 配列番号 7 7 ;
- (m) 配列番号 7 8 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (n) 配列番号 7 8 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (o) 配列番号 7 8 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (p) 配列番号 7 8 ;
- (q) 配列番号 7 9 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (r) 配列番号 7 9 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (s) 配列番号 7 9 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (t) 配列番号 7 9 ;
- (u) 配列番号 8 0 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (v) 配列番号 8 0 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (w) 配列番号 8 0 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (x) 配列番号 8 0 ;
- (y) 配列番号 8 1 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (z) 配列番号 8 1 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (a a) 配列番号 8 1 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (b b) 配列番号 8 1 ;
- (c c) 配列番号 8 2 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (d d) 配列番号 8 2 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (e e) 配列番号 8 2 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (f f) 配列番号 8 2 ;
- (g g) 配列番号 8 3 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (h h) 配列番号 8 3 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (i i) 配列番号 8 3 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (j j) 配列番号 8 3 ;
- (k k) 配列番号 8 4 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (l l) 配列番号 8 4 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (m m) 配列番号 8 4 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (n n) 配列番号 8 4 ;
- (o o) 配列番号 8 5 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (p p) 配列番号 8 5 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (q q) 配列番号 8 5 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (r r) 配列番号 8 5 ;
- (s s) 配列番号 8 6 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (t t) 配列番号 8 6 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (u u) 配列番号 8 6 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (v v) 配列番号 8 6 ;
- (w w) 配列番号 8 7 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (x x) 配列番号 8 7 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (y y) 配列番号 8 7 と 9 9 % 同一の核酸配列 ;
- (z z) 配列番号 8 7 ;
- (a a a) 配列番号 8 8 と 9 5 % 同一の核酸配列 ;
- (b b b) 配列番号 8 8 と 9 8 % 同一の核酸配列 ;
- (c c c) 配列番号 8 8 と 9 9 % 同一の核酸配列 ; 及び
- (d d d) 配列番号 8 8 。

10

20

30

40

【 0 1 4 0 】

実施形態 3 7 - 1

【 0 1 4 1 】

5'イントロン断片が、配列番号 7 5 ~ 配列番号 8 8 のいずれか 1 つと 9 5 % 同一の核酸配列、配列番号 7 5 ~ 配列番号 8 8 のいずれか 1 つと 9 8 % 同一の核酸配列、配列番号

50

75～配列番号88のいずれか1つと99%同一の核酸配列、及び配列番号75～配列番号88のいずれか1つからなる群から選択される核酸配列から本質的になる、実施形態37に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0142】

実施形態37-2

【0143】

5'イントロン断片が、配列番号75～配列番号88のいずれか1つと95%同一の核酸配列、配列番号75～配列番号88のいずれか1つと98%同一の核酸配列、配列番号75～配列番号88のいずれか1つと99%同一の核酸配列、及び配列番号75～配列番号88のいずれか1つからなる群から選択される核酸配列からなる、実施形態37に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

【0144】

実施形態38

【0145】

5'相同アームが配列番号105の核酸配列を含む、実施形態3～37のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0146】

実施形態38-1

【0147】

5'相同アームが、配列番号105の核酸配列から本質的になる、実施形態38に記載のポリヌクレオチド構築物。

20

【0148】

実施形態38-2

【0149】

5'相同アームが、配列番号105の核酸配列からなる、実施形態38に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0150】

実施形態39

【0151】

3'相同アームが配列番号106の核酸配列を含む、実施形態3～38のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

30

【0152】

実施形態39-1

【0153】

3'相同アームが、本質的に配列番号106の核酸配列からなる、実施形態39に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0154】

実施形態39-2

【0155】

3'相同アームが配列番号106の核酸配列からなる、実施形態39に記載のポリヌクレオチド構築物。

40

【0156】

実施形態40

【0157】

5'相同アーム又は3'相同アームが15～60ヌクレオチド長である、実施形態3～39のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0158】

実施形態41

【0159】

5'相同アーム又は3'相同アーム配列が、最大10%の塩基ミスマッチを有する、実施

50

形態 3 ～ 4 0 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【 0 1 6 0 】

実施形態 4 2

【 0 1 6 1 】

標的配列が、以下からなる群から選択される 5' アーム配列を含む、実施形態 1 ～ 4 1 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物：

- (a) 配列番号 8 9 ；
- (b) 配列番号 9 0 ；
- (c) 配列番号 9 1 ；
- (d) 配列番号 9 2 ；
- (e) 配列番号 9 3 ；
- (f) 配列番号 9 4 ；
- (g) 配列番号 9 5 ；及び
- (h) 配列番号 9 6 。

10

【 0 1 6 2 】

実施形態 4 3

【 0 1 6 3 】

標的配列が、以下からなる群から選択される 3' アーム配列を含む、実施形態 1 ～ 4 2 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物：

- (a) 配列番号 9 7 ；
- (b) 配列番号 9 8 ；
- (c) 配列番号 9 9 ；
- (d) 配列番号 1 0 0 ；
- (e) 配列番号 1 0 1 ；
- (f) 配列番号 1 0 2 ；
- (g) 配列番号 1 0 3 ；及び
- (h) 配列番号 1 0 4 。

20

【 0 1 6 4 】

実施形態 4 4

【 0 1 6 5 】

30

標的配列が、式 I

$TI - (L)_n - Z1(I)$

[式中、

TI は、内部リボソーム進入部位 (IRES) 様ポリヌクレオチド配列又は天然 IRES 配列を含む操作された翻訳開始要素であり、

Z1 は、治療用産物をコードする発現配列であり、

L はリンカー配列であり、

A1 及び B1 は、RNA ポリヌクレオチドの環状化が可能な一対の配列であり、

n は、0 ～ 2 の整数である]

を含む、実施形態 1 ～ 4 3 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

40

【 0 1 6 6 】

実施形態 4 5

【 0 1 6 7 】

Z1 が、以下からなる群から選択される核酸配列を含む、実施形態 4 4 に記載のポリヌクレオチド構築物：

- (a) 配列番号 1 0 7 と 9 5 % 同一の核酸配列 ；
- (b) 配列番号 1 0 7 と 9 8 % 同一の核酸配列 ；
- (c) 配列番号 1 0 7 と 9 9 % 同一の核酸配列 ；
- (d) 配列番号 1 0 7 ；
- (e) 配列番号 1 0 8 と 9 5 % 同一の核酸配列 ；

50

- (f) 配列番号 108 と 98 % 同一の核酸配列 ;
- (g) 配列番号 108 と 99 % 同一の核酸配列 ;
- (h) 配列番号 108 ;
- (i) 配列番号 109 と 95 % 同一の核酸配列 ;
- (j) 配列番号 109 と 98 % 同一の核酸配列 ;
- (k) 配列番号 109 と 99 % 同一の核酸配列 ;
- (l) 配列番号 109 ;
- (m) 配列番号 110 と 95 % 同一の核酸配列 ;
- (n) 配列番号 110 と 98 % 同一の核酸配列 ;
- (o) 配列番号 110 と 99 % 同一の核酸配列 ;
- (p) 配列番号 110 ;
- (q) 配列番号 111 と 95 % 同一の核酸配列 ;
- (r) 配列番号 111 と 98 % 同一の核酸配列 ;
- (s) 配列番号 111 と 99 % 同一の核酸配列 ;
- (t) 配列番号 111 ;
- (u) 配列番号 112 と 95 % 同一の核酸配列 ;
- (v) 配列番号 112 と 98 % 同一の核酸配列 ;
- (w) 配列番号 112 と 99 % 同一の核酸配列 ;
- (x) 配列番号 112 。

10

20

30

40

50

【0168】

実施形態 45-1

【0169】

Z1 が、配列番号 107 ~ 配列番号 112 のいずれか 1 つと 95 % 同一の核酸配列、配列番号 107 ~ 配列番号 112 のいずれか 1 つと 98 % 同一の核酸配列、配列番号 107 ~ 配列番号 112 のいずれか 1 つと 99 % 同一の核酸配列、及び配列番号 107 ~ 配列番号 112 のいずれか 1 つからなる群から選択される核酸配列から本質的になる、実施形態 45 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0170】

実施形態 45-2

【0171】

Z1 が、配列番号 107 ~ 配列番号 112 のいずれか 1 つと 95 % 同一の核酸配列、配列番号 107 ~ 配列番号 112 のいずれか 1 つと 98 % 同一の核酸配列、配列番号 107 ~ 配列番号 112 のいずれか 1 つと 99 % 同一の核酸配列、及び配列番号 107 ~ 配列番号 112 のいずれか 1 つからなる群から選択される核酸配列からなる、実施形態 45 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0172】

実施形態 46

【0173】

Z1 が、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、実施形態 44 に記載のポリヌクレオチド構築物：

- (a) 配列番号 113 ;
- (b) 配列番号 114 ;
- (c) 配列番号 115 ;
- (d) 配列番号 116 ;
- (e) 配列番号 117 ;
- (f) 配列番号 118 。

【0174】

実施形態 46-1

【0175】

Z1 が、配列番号 113 ~ 配列番号 118 からなる群から選択されるアミノ酸配列をコ

ードする核酸配列から本質的になる、実施形態 4 6 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0176】

実施形態 4 6 - 2

【0177】

Z 1 が、配列番号 1 1 3 ~ 配列番号 1 1 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列からなる、実施形態 4 6 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0178】

実施形態 4 7

【0179】

10 改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドを含む、実施形態 1 ~ 4 6 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0180】

実施形態 4 8

【0181】

10 % ~ 1 0 0 % の改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドを含む、実施形態 1 ~ 4 7 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0182】

実施形態 4 9

【0183】

20 改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも 1 つが m 5 C (5 - メチルシチジン) である、実施形態 4 7 又は 4 8 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0184】

実施形態 5 0

【0185】

改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも 1 つが 5 U (5 - メチルウリジン) である、実施形態 4 7 又は 4 8 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0186】

実施形態 5 1

【0187】

30 改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも 1 つが m 6 A (N 6 - メチルアデノシン) である、実施形態 4 7 又は 4 8 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0188】

実施形態 5 2

【0189】

改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも 1 つが、Y (シュードウリジン) である、実施形態 4 7 又は 4 8 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0190】

実施形態 5 3

【0191】

40 改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも 1 つが m 1 A (1 - メチルアデノシン) である、実施形態 4 7 又は 4 8 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【0192】

実施形態 5 4

【0193】

改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドの少なくとも 1 つがインビトロ転写 (I V T) で導入される、実施形態 4 7 ~ 5 3 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物。

【0194】

実施形態 5 5

【0195】

改変ヌクレオシドが、m5C (5-メチルシチジン)、m5U (5-メチルウリジン)、
 m6A (N6-メチルアデノシン)、s2U (2-チオウリジン)、Y (シュードウリジン)、
 Um (2'-O-メチルウリジン)、m1A (1-メチルアデノシン)、m2A (2-メチルアデノシン)、
 Am (2'-O-メチルアデノシン)、ms2m6A (2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン)、
 i6A (N6-イソペンテニルアデノシン)、ms2i6A (2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン)、
 io6A (N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン)、ms2io6A (2-メチルチオ-N6-
 (cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン)、g6A (N6-グリシニルカルバモイルアデノシン)、
 t6A (N6-トレオニルカルバモイルアデノシン)、ms2t6A (2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン)、
 m6t6A (N6-メチル-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン)、hn6A (N6-ヒドロキシノルバ
 リルカルバモイルアデノシン)、ms2hn6A (2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバ
 リルカルバモイルアデノシン)、Ar(p) (2'-O-リボシルアデノシン (ホスフェート))、I (イ
 ノシン)、m1I (1-メチルイノシン)、m1hn (1, 2'-O-ジメチルイノシン)、m3C (3-メチル
 シチジン)、Cm (2'-O-メチルシチジン)、s2C (2-チオシチジン)、ac4C (N4-アセチルシチ
 ジン)、(5-ホルミルシチジン)、m5Cm (5, 2'-O-ジメチルシチジン)、ac4Cm (N4-アセチル-
 2'-O-メチルシチジン)、k2C (リシジン)、m!G (1-メチルグアノシン)、m2G (N2-メチル
 グアノシン)、m7G (7-メチルグアノシン)、Gm (2'-O-メチルグアノシン)、m22G (N2, N2-
 ジメチルグアノシン)、m2Gm (N2, 2'-O-ジメチルグアノシン)、m2aGm (N2, N2, 2'-O-
 トリメチルグアノシン)、Gr(p) (2'-O-リボシルグアノシン (ホスフェート))、yW (ウィ
 ブトシン)、oayW (ペルオキシウィブトシン)、OHyW (ヒドロキシウィブトシン)、OHyW*
 (非改変ヒドロキシウィブトシン)、imG (ウイオシン)、mimG (メチルウイオシン)、Q (トリ
 キューオシン)、oQ (エポキシトリキューオシン)、galQ (ガラクトシル-トリキューオシン)、
 manQ (マンノシル-トリキューオシン)、preQo (7-シアノ-7-デアザグアノシン)、preQi (7-
 アミノメチル-7-デアザグアノシン)、G+ (アルカエオシン)、D (ジヒドロウリジン)、
 m5Um (5, 2'-O-ジメチルウリジン)、s4U (4-チオウリジン)、m5s2U (5-メチル-2-チ
 オウリジン)、s2Um (2-チオ-2'-O-メチルウリジン)、acp3U (3-(3-アミノ-3-カルボキ
 シプロピル)ウリジン)、ho5U (5-ヒドロキシウリジン)、mo5U (5-メトキシウリジン)、
 cmo5U (ウリジン5-オキシ酢酸)、mcmo5U (ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル)、
 chm5U (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン)、mchm5U (5-(カルボキシヒドロ
 キシメチル)ウリジンメチルエステル)、mcm5U (5-メトキシカルボニルメチルウリジン)、
 mcm5Um (5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン)、mcm5s2U (5-メト
 キシカルボニルメチル-2-チオウリジン)、nm5S2U (5-アミノメチル-2-チオウリジン)、
 mn5U (5-メチルアミノメチルウリジン)、mn5s2U (5-メチルアミノメチル-2-チオウリ
 ジン)、mn5se2U (5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン)、ncm5U (5-カルバモイ
 ルメチルウリジン)、ncm5Um (5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン)、cmnm5U
 (5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン)、cmnm5Um (5-カルボキシメチルアミノ
 メチル-2'-O-メチルウリジン)、cmnm5s2U (5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チ
 オウリジン)、m62A (N6, N6-ジメチルアデノシン)、Im (2'-O-メチルイノシン)、m4C (N4-
 メチルシチジン)、m4Cm (N4, 2'-O-ジメチルシチジン)、hm5C (5-ヒドラキシメチルシ
 チジン)、m3U (3-メチルウリジン)、cm5U (5-カルボキシメチルウリジン)、m6Am (N6, 2'-
 O-ジメチルアデノシン)、m62Am (N6, N6, 0-2'-トリメチルアデノシン)、m2, 7G (N2, 7-
 ジメチルグアノシン)、m2, 2, 7G (N2, N2, 7-トリメチルグアノシン)、m3Um (3, 2

10

20

30

40

50

' - 0 - ジメチルウリジン)、m 5 D (5 - メチルジヒドロウリジン)、f 5 C m (5 -
 ホルミル - 2' - 0 - メチルシチジン)、m' G m (l, 2' - 0 - ジメチルグアノシン)
 、m' A m (l, 2' - 0 - ジメチルアデノシン)、r m 5 U (5 - タウリノメチルウリジ
 ン)、τ m 5 s 2 U (5 - タウリノメチル - 2 - チオウリジン))、i m G - 1 4 (4 -
 デメチルウイオシン)、i m G 2 (イソウイオシン)、又は a c 6 A (N 6 - アセチルア
 デノシン)、ピリジン - 4 - オンリボヌクレオシド、5 - アザ - ウリジン、2 - チオ - 5
 - アザ - ウリジン、2 - チオウリジン、4 - チオ - シュードウリジン、2 - チオ - シュ
 ードウリジン、5 - ヒドロキシウリジン、3 - メチルウリジン、5 - カルボキシメチル - ウ
 リジン、1 - カルボキシメチル - シュードウリジン、5 - プロピニル - ウリジン、1 - プ
 ロピニル - シュードウリジン、5 - タウリノメチルウリジン、1 - タウリノメチル - シュ
 ードウリジン、5 - タウリノメチル - 2 - チオ - ウリジン、l - タウリノメチル - 4 - チ
 オ - ウリジン、5 - メチル - ウリジン、1 - メチル - シュードウリジン、4 - チオ - 1 -
 メチル - シュードウリジン、2 - チオ - 1 - メチル - シュードウリジン、1 - メチル - 1
 - デアザ - シュードウリジン、2 - チオ - 1 - メチル - 1 - デアザ - シュードウリジン、
 ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2 - チオ - ジヒドロウリジン、2 - チオ
 - ジヒドロシュードウリジン、2 - メトキシウリジン、2 - メトキシ - 4 - チオ - ウリジ
 ン、4 - メトキシ - シュードウリジン、4 - メトキシ - 2 - チオ - シュードウリジン、5
 - アザ - シチジン、シュードイソシチジン、3 - メチル - シチジン、N 4 - アセチルシチ
 ジン、5 - ホルミルシチジン、N 4 - メチルシチジン、5 - ヒドロキシメチルシチジン、
 1 - メチル - シュードイソシチジン、ピロロ - シチジン、ピロロ - シュードイソシチジン
 、2 - チオ - シチジン、2 - チオ - 5 - メチル - シチジン、4 - チオ - シュードイソシチ
 ジン、4 - チオ - 1 - メチル - シュードイソシチジン、4 - チオ - 1 - メチル - 1 - デア
 ザ - シュードイソシチジン、1 - メチル - 1 - デアザ - シュードイソシチジン、ゼブラリ
 ン、5 - アザ - ゼブラリン、5 - メチル - ゼブラリン、5 - アザ - 2 - チオ - ゼブラリン
 、2 - チオ - ゼブラリン、2 - メトキシ - シチジン、2 - メトキシ - 5 - メチル - シチジ
 ン、4 - メトキシ - シュードイソシチジン、4 - メトキシ - 1 - メチル - シュードイソシ
 チジン、2 - アミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、7 - デアザ - アデニン、7 - デア
 ザ - 8 - アザ - アデニン、7 - デアザ - 2 - アミノプリン、7 - デアザ - 8 - アザ - 2 -
 アミノプリン、7 - デアザ - 2, 6 - ジアミノプリン、7 - デアザ - 8 - アザ - 2, 6 -
 ジアミノプリン、1 - メチルアデノシン、N 6 - メチルアデノシン、N 6 - イソペンテニ
 ルアデノシン、N 6 - (c i s - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、2 - メチルチ
 オ - N 6 - (c i s - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン、N 6 - グリシニルカルバ
 モイルアデノシン、N 6 - トレオニルカルバモイルアデノシン、2 - メチルチオ - N 6 -
 トレオニルカルバモイルアデノシン、N 6, N 6 - ジメチルアデノシン、7 - メチルアデ
 ニン、2 - メチルチオ - アデニン、2 - メトキシ - アデニン、イノシン、1 - メチル - イ
 ノシン、ウイオシン、ウィプトシン、7 - デアザ - グアノシン、7 - デアザ - 8 - アザ -
 グアノシン、6 - チオ - グアノシン、6 - チオ - 7 - デアザ - グアノシン、6 - チオ - 7
 - デアザ - 8 - アザ - グアノシン、7 - メチル - グアノシン、6 - チオ - 7 - メチル - グ
 アノシン、7 - メチルイノシン、6 - メトキシ - グアノシン、1 - メチルグアノシン、N
 2 - メチルグアノシン、N 2, N 2 - ジメチルグアノシン、8 - オキソ - グアノシン、7
 - メチル - 8 - オキソ - グアノシン、1 - メチル - 6 - チオ - グアノシン、N 2 - メチル
 - 6 - チオ - グアノシン、及び N 2, N 2 - ジメチル - 6 - チオ - グアノシン、5 - メチ
 ルシトシン、シュードウリジン、及び 1 - メチルシュードウリジンからなる群から選択さ
 れる、実施形態 4 7 又は 4 8 に記載のポリヌクレオチド構築物。

10

20

30

40

50

【0196】

実施形態 5 6

【0197】

例えば、環状 RNA は、少なくとも 500 ヌクレオチド長、少なくとも 1,000 ヌク
 レオチド長、又は少なくとも 1,500 ヌクレオチド長である、実施形態 1 ~ 55 のいず
 れか 1 つに記載のポリヌクレオチド構築物によって産生される環状 RNA。

【0198】

実施形態57

【0199】

標的配列に属さないいずれの他の配列も含まない、例えば、E2配列及びE1配列の全て又は一部を含まない、実施形態56の環状RNA。

【0200】

実施形態58

【0201】

環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素

10

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E2) ；
- (c) 標的配列；
- (d) エクソン断片1 (E1) ；及び
- (e) 5'イントロン断片

を含むベクターを調製することを含み、

5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおいて3'イントロン断片の5'側に位置し、

E1は、グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E2は、グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、環状RNAを作製する方法。

20

【0202】

実施形態59

【0203】

環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素

30

- (a) 3'イントロン断片；
- (b) エクソン断片2 (E2) ；
- (c) リンカー配列；
- (d) 標的配列；
- (e) リンカー配列；
- (f) エクソン断片1 (E1) ；
- (g) 5'イントロン断片

を含むベクターを調製することを含み、

5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5'イントロン断片は、グループIIイントロンにおいて3'イントロン断片の5'側に位置し、

E1は、グループIIイントロンの5'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E2は、グループIIイントロンの3'隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、環状RNAを作製する方法。

40

【0204】

実施形態60

【0205】

50

環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5' 相同アーム；
- (b) 3' インترون断片；
- (c) エクソン断片2 (E 2) ；
- (d) 標的配列；
- (e) エクソン断片1 (E 1) ；
- (f) 5' インترون断片；及び
- (g) 3' 相同アーム

を含むベクターを調製することを含み、

10

5' インترون断片及び3' インترون断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5' インترون断片は、グループIIイントロンにおいて3' インترون断片の5' 側に位置し、

E 1は、グループIIイントロンの5' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E 2は、グループIIイントロンの3' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、環状RNAを作製する方法。

20

【0206】

実施形態61

【0207】

環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に、以下の作動可能に連結された要素：

- (a) 5' 相同アーム；
- (b) 3' インترون断片；
- (c) エクソン断片2 (E 2) ；
- (d) リンカー配列；
- (e) 標的配列；
- (f) リンカー配列；
- (g) エクソン断片1 (E 1) ；
- (h) 5' インترون断片；及び
- (i) 3' 相同アーム

を含むベクターを調製することを含み、

30

5' インترون断片及び3' インترون断片は、各々グループIIイントロンの断片であり、5' インترون断片は、グループIIイントロンにおいて3' インترون断片の5' 側に位置し、

E 1は、グループIIイントロンの5' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

E 2は、グループIIイントロンの3' 隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、

40

標的配列は、存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである、環状RNAを作製する方法。

【0208】

実施形態62

【0209】

細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、(a) 実施形態58～61のいずれか1つに記載の環状RNAで細胞をトランスフェクトすること、又は(b) 実施形態1～57のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物を自己スプライシング環状化反応に供して環状RNAを形成することと、細胞を環状RNAでトランスフェクトする

50

ことと、を含み、好ましくは、細胞は真核細胞である、方法。

【0210】

実施形態63

【0211】

細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、(a)実施形態58～61のいずれか1つに記載の環状RNAで細胞をトランスフェクトすること、又は(b)実施形態1～57のいずれか1つに記載の構築物を自己スプライシング環状化反応に供して環状RNAを形成することと、細胞を環状RNAでトランスフェクトすることと、を含み、好ましくは、細胞は、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉系細胞、神経細胞(例えば、髄膜、星状膠細胞、運動ニューロン、後根神経節の細胞及び前角運動ニューロン)、光受容細胞(例えば、桿体及び錐体)、網膜色素上皮細胞、分泌細胞、心臓細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜内層細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、B細胞、T細胞、樹状細胞、マクロファージ、網赤血球、白血球、顆粒球、腫瘍細胞、NK細胞、肝スターレット細胞、HEK293、HEK293T、HeLa、MCF7、PC3、A549、NCI-H727、HCT-116、MCF10A、HPRC、FHC、不死化細胞株、初代細胞、酵母細胞、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、細菌細胞、大腸菌(*Escherichia coli*)、昆虫細胞、スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*) sf9、ミミックSf9、sf21、又はショウジョウバエ(*Drosophila*) S2である、細胞においてタンパク質を発現させるための方法。

10

20

【0212】

実施形態64

【0213】

グループIIイントロンを用いて自己スプライシング活性を有する配列を生成するための方法であって、

(a) グループIIイントロンの配列を定義し、任意に、スプライシングアッセイ(線状スプライシング)を使用して、グループIIイントロンのインビトロ自己スプライシング活性を検査する工程と、

(b) グループIIイントロンを2つの断片に分割する工程と、

(c) 2つのイントロン断片の順序を逆にする工程と、

(d) スプライシングアッセイを使用して、RNAのインビトロ環状化を確認する工程と、

30

を含む、グループIIイントロンを用いて自己スプライシング活性を有する配列を生成するための方法。

【0214】

本発明は、以下の実施形態も包含する。

【0215】

実施形態65

【0216】

5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、互いに相補的な対合した配列の1つ以上の対をそれぞれ含む、先行する実施形態のいずれか1つのポリヌクレオチド構築物、環状RNA又は方法。好ましい実施形態では、相補的に対合した配列は、20ヌクレオチド長より長い。

40

【0217】

実施形態66

【0218】

5'イントロン断片及び／又は3'イントロン断片が、プローブ結合配列、MS2結合部位、PP7結合部位、並びにストレプトアビジン結合部位からなる群から選択される1つ以上の親和性タグ配列を含む、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチ

50

ド構築物、環状RNA、又は方法。

【0219】

実施形態67

【0220】

EB S配列が、EB S 1、EB S 2及びEB S 3のうちの1つ以上、好ましくはそれらのうちの2つ、より好ましくはEB S 1及びEB S 3から選択される、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物、環状RNA、又は方法。

【0221】

実施形態68

【0222】

グループIEイントロンの1つ以上のEB S配列、好ましくはEB S 1及びEB S 3が改変され、EB S配列が、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%において、標的配列中の対応する長さの2つの領域と相補的に対合する、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物、環状RNA、又は方法。好ましい実施形態では、標的配列中の対応する長さの2つの領域は、それぞれ標的配列の両端に位置する。

【0223】

実施形態69

【0224】

ポリヌクレオチド構築物がインビトロで標的配列の環状RNAを形成することができる、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物、環状RNA、又は方法。

【0225】

実施形態70

【0226】

ポリヌクレオチド構築物がインビボで標的配列の環状RNAを形成することができる、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物、環状RNA、又は方法。

【図面の簡単な説明】

【0227】

本発明の実施形態は、様々な図面を参照して説明される。

【0228】

【図1】本発明の方法を紹介するフローチャートであり、天然の自己スプライシングリボザイムから出発して、設計、操作及び最終反応を経て環状RNAを得るプロセスを示す。

【0229】

【図2A】実施例1におけるグループIEイントロンについてのスクリーニングプロセスを示す。(A) Glu cコード配列断片及びE1-グループIEイントロン(自己スプライシングリボザイム)-E2を含むDNA構築物を調製し、このDNA構築物を鋳型として使用してインビトロ転写により線状RNAを調製し、精製した。インビトロ自己スプライシング活性は、線状RNAがインビトロ自己スプライシング反応によって異なるサイズの2つの断片(切り出されたイントロン、及び構築物の残り)を産生する場合に支持される。グループIEイントロン及びその隣接E1及びE2配列は、cRNAzyme構築物を設計するためのcRNAzyme前駆体として使用され得る。(B) cRNAzyme前駆体をスクリーニングするためのインビトロ自己スプライシング反応の条件。

【図2B】実施例1におけるグループIEイントロンについてのスクリーニングプロセスを示す。(A) Glu cコード配列断片及びE1-グループIEイントロン(自己スプライシングリボザイム)-E2を含むDNA構築物を調製し、このDNA構築物を鋳型として使用してインビトロ転写により線状RNAを調製し、精製した。インビトロ自己スプライシング活性は、線状RNAがインビトロ自己スプライシング反応によって異なるサイズの2つの断片(切り出されたイントロン、及び構築物の残り)を産生する場合に支持される。グループIEイントロン及びその隣接E1及びE2配列は、cRNAzyme構築物

10

20

30

40

50

を設計するための cRNAzyme 前駆体として使用され得る。(B) cRNAzyme 前駆体をスクリーニングするためのインビトロ自己スプライシング反応の条件。

【0230】

【図3】実施例1の方法により自己スプライシング活性を有することが確認された2つのグループIIイントロンのゲル電気泳動図である。グループIIイントロンの名称は、それぞれの電気泳動図上に3文字コードでマークした。

【0231】

【図4A】一例としてCteを有するcRNAzyme構築物を設計するスキーム、及び異なるスキーム間の比較実験結果を示す。(A) cRNAzyme構築物設計；(B)異なる位置でII Cteイントロンをセグメント化し、構築物を得た後にゲル電気泳動によって決定された環状化のパーセント；及び(C)異なる方法による環状RNAの形成の成功を検証する実験の結果のグラフ。

10

【図4B】一例としてCteを有するcRNAzyme構築物を設計するスキーム、及び異なるスキーム間の比較実験結果を示す。(A) cRNAzyme構築物設計；(B)異なる位置でII Cteイントロンをセグメント化し、構築物を得た後にゲル電気泳動によって決定された環状化のパーセント；及び(C)異なる方法による環状RNAの形成の成功を検証する実験の結果のグラフ。

【図4C】一例としてCteを有するcRNAzyme構築物を設計するスキーム、及び異なるスキーム間の比較実験結果を示す。(A) cRNAzyme構築物設計；(B)異なる位置でII Cteイントロンをセグメント化し、構築物を得た後にゲル電気泳動によって決定された環状化のパーセント；及び(C)異なる方法による環状RNAの形成の成功を検証する実験の結果のグラフ。

20

【0232】

【図5A】最適化中の異なる条件下で得られた結果を示す。(A) cRNAzyme構築物の環状化のパーセントは、反応の条件及び操作配列を最適化することによって改善されている。(B)例示的な自己スプライシングリボザイムとしてCteを用いた、異なる反応条件下での環状化産物のゲル電気泳動結果のグラフ。下のヒストグラムは、定量化された環状化パーセントPC%を示す(環状化パーセント(PC%) = 環状 / (環状 + 線状) × 100%)。(C)は、例示的なリボザイムとしてのCte及びインサートとしてのウミシイタケルシフェラーゼ(RluC)を有し、異なるスパーサー配列が付加された3つの構築物によって産生された環状化産物のゲル電気泳動図であり、下のヒストグラムは、環状化PC%の定量化パーセントを示す。

30

【図5B】最適化中の異なる条件下で得られた結果を示す。(A) cRNAzyme構築物の環状化のパーセントは、反応の条件及び操作配列を最適化することによって改善されている。(B)例示的な自己スプライシングリボザイムとしてCteを用いた、異なる反応条件下での環状化産物のゲル電気泳動結果のグラフ。下のヒストグラムは、定量化された環状化パーセントPC%を示す(環状化パーセント(PC%) = 環状 / (環状 + 線状) × 100%)。(C)は、例示的なリボザイムとしてのCte及びインサートとしてのウミシイタケルシフェラーゼ(RluC)を有し、異なるスパーサー配列が付加された3つの構築物によって産生された環状化産物のゲル電気泳動図であり、下のヒストグラムは、環状化PC%の定量化パーセントを示す。

40

【図5C】最適化中の異なる条件下で得られた結果を示す。(A) cRNAzyme構築物の環状化のパーセントは、反応の条件及び操作配列を最適化することによって改善されている。(B)例示的な自己スプライシングリボザイムとしてCteを用いた、異なる反応条件下での環状化産物のゲル電気泳動結果のグラフ。下のヒストグラムは、定量化された環状化パーセントPC%を示す(環状化パーセント(PC%) = 環状 / (環状 + 線状) × 100%)。(C)は、例示的なリボザイムとしてのCte及びインサートとしてのウミシイタケルシフェラーゼ(RluC)を有し、異なるスパーサー配列が付加された3つの構築物によって産生された環状化産物のゲル電気泳動図であり、下のヒストグラムは、環状化PC%の定量化パーセントを示す。

50

【0233】

【図6A】瘢痕配列を排除することができる、実施例4で調製された改善された構築物に関する。(A)構築物の構造図。(B)異なるマグネシウムイオン濃度下での3つの標的配列の環状化産物のゲル電気泳動図及び配列決定結果。

【図6B】瘢痕配列を排除することができる、実施例4で調製された改善された構築物に関する。(A)構築物の構造図。(B)異なるマグネシウムイオン濃度下での3つの標的配列の環状化産物のゲル電気泳動図及び配列決定結果。

【0234】

【図7】異なる長さの標的配列の挿入の際に生成された環状RNAのゲル電気泳動の結果を示す。

10

【0235】

【図8A】本発明の構築物及び方法を使用して生成された異なる標的配列の環状RNAの細胞内発現の結果である。(A)「無瘢痕」構築物を標的配列としてのGFPと共に使用して環状RNAを形成し、GFP発現の結果を細胞のトランスフェクション後にウェスタンブロッティングによって検出した。(B)「無瘢痕」構築物を標的配列としてのGlu cと共に使用して環状RNAを形成し、Glu c発現の結果を細胞のトランスフェクション後にマイクロプレートリーダーによって検出した。

【図8B】本発明の構築物及び方法を使用して生成された異なる標的配列の環状RNAの細胞内発現の結果である。(A)「無瘢痕」構築物を標的配列としてのGFPと共に使用して環状RNAを形成し、GFP発現の結果を細胞のトランスフェクション後にウェスタンブロッティングによって検出した。(B)「無瘢痕」構築物を標的配列としてのGlu cと共に使用して環状RNAを形成し、Glu c発現の結果を細胞のトランスフェクション後にマイクロプレートリーダーによって検出した。

20

【0236】

【図9】グループIIイントロンの構造図である。

【0237】

【図10】グループIIイントロンの、(a)分岐経路及び(b)加水分解経路を示す。

【0238】

【図11】グループI及びグループIIイントロンのスプライシング機構を示す。

【0239】

30

【図12A】IBS1とEBS1との間；IBS2とEBS2との間；IBS3とEBS3との間の相互作用に基づいて設計されたほぼ無瘢痕の系の概略図である。自己触媒的自己スプライシンググループIIイントロンは、D4ドメインで2つの断片に分割され、E1、E2、及び標的配列を含有するカスタマイズされたエクソンが、分割されたイントロンの間に挿入される。矢印は、IBS1とEBS1との間；IBS2とEBS2との間；IBS3とEBS3との間の相互作用を示す。

【0240】

【図12B】 δ とIBS3との間の相互作用に基づいて設計されたほぼ無瘢痕の系の設計の概略図である。自己触媒的自己スプライシンググループIIイントロンは、D4ドメインで2つの断片に分割され、E1、E2、及び標的配列を含有するカスタマイズされたエクソンが、分割されたイントロンの間に挿入された。矢印は、IBS1とEBS1との間；IBS2とEBS2との間；及びIBS3と δ との間の相互作用を示す。

40

【0241】

【図12C】IBS1'とEBS1との間の相互作用に基づいて設計された無瘢痕の系の概略図である。自己触媒的自己スプライシンググループIIイントロンは、D4ドメインで2つの断片に分割され、標的配列は、分割されたイントロンの間に挿入される。矢印は、IBS1'とEBS1との間、及びIBS3'とEBS3との間の相互作用を示す。IBS1'は、IBS1と同様の機能を有する標的配列上の領域である。IBS3'は、IBS3と同様の機能を有する標的配列上の領域である。

【0242】

50

【図12D】 δ とIBS3'との間の相互作用に基づいて設計された無瘢痕の系の概略図である。自己触媒的自己スプライシンググループIEイントロンは、D4ドメインで2つの断片に分割され、標的配列は、分割されたイントロンの間に挿入される。矢印は、IBS1'とEBS1との間、及びIBS3'と δ との間の相互作用を示す。

【0243】

【図13】インビトロ合成されたcircRNAをアガロースゲルで分析した結果である。IBS1を変異させて、自己スプライシングを無効にした。IVT後、環状化RNAを、ポリAテーリング及びRNase R処理によって確認した。

【0244】

【図14】異なる方法による環状RNAの成功した形成を検証する実験の結果を示す図4Cの更新された図であり、線状及び環状RNA構築物の図である。

【0245】

【図15】図14のレーン1及びレーン3に示されるcircRNA試料のスプライス接合部にわたるRT-PCRのサンガー配列決定出力を示す。

【0246】

【図16】図6Bの更新された図であり、異なるマグネシウムイオン濃度下での3つの標的配列の構築物、ゲル電気泳動図及び環状化産物の配列決定結果の図を示す。

【0247】

【図17】CVB3 IRESの前に異なるスペーサー領域を用いた環状化効率を示す。

【0248】

【図18】異なるcircRNAzymeバリエーション由来の環状RNAからのルシフェラーゼタンパク発現の発光シグナルを示す。

【0249】

【図19】異なる用量でのcircRNAのトランスフェクション及び翻訳を示す。2つの異なるスペーサーを含有するcircRNAをゲル精製し、24ウェルプレートで培養した3つの細胞株に異なる用量でトランスフェクトし、ルシフェラーゼの活性をトランスフェクションの24時間後に測定した。

【0250】

【図20】異なる遺伝子を含有するcircRNAzymeバリエーションCV4の環状化効率を示す。異なるRNAをインビトロ転写し、インビトロ転写反応において環状化した。遺伝子1: Gluc、遺伝子2: EGFP、遺伝子3: RBD、遺伝子4: RLuc、遺伝子5: Fluc、遺伝子6: saCAs9。

【0251】

【図21】circRNA翻訳の経時変化実験の結果を示す。RLuc遺伝子をコードするcircRNAを293T細胞にトランスフェクトし（各トランスフェクションにおいて500ngのcircRNAを使用した）、ルシフェラーゼ活性をトランスフェクションの6、12及び24時間後に測定した。

【0252】

【図22】細胞にトランスフェクトされた線状mRNA及びcircRNAからの産生を示す。

【0253】

【図23】PIEプロトコル又は新しいCirCodeシステムを使用して生成されたcircRNAと線状mRNAからのタンパク生成の比較である。

【0254】

【図24】IVT後のスピンカラム精製試料からのCVB3-Gluc circRNAのHPLC精製を示す。上のパネルは、それぞれ前駆体、環状及びイントロンRNAのピークを示すHPLCクロマトグラムである。下のパネルは、投入画分及び回収画分のアガロースゲルを示す。

【0255】

【図25】モックトランスフェクションと比較した、未精製circRNA及び精製ci

10

20

30

40

50

rcRNAのトランスフェクションによって引き起こされた細胞死の量を示す。

【0256】

【図26】RIG-I及びIFN- β を誘導することによって自然免疫応答を刺激した未精製circRNAと、精製circRNAとの比較を示す。

【0257】

【図27】circRNAの産生のスケールアップを示す。

【0258】

【図28】HPLCから精製されたCVB3-Gluc circRNAの4つのバッチを、Agilent 2100 Bioanalyzerによるキャピラリー電気泳動を使用して分析したことを示す。

【0259】

【図29】CircRNA-LNP複合体及びCircRNAGluc-LNPの粒子サイズの概略図である。

【0260】

【図30】異なる製剤によるCircRNAGluc-LNPの注射の24時間後のマウス血清中からアッセイしたガウシアルシフェラーゼ活性を示す。

【0261】

【図31】2回の製剤で20 μ gのCircRNAGluc-LNPを筋肉(i.m.)経路で投与したBALB/cマウスの代表的なIVIS画像を示す。相対発光プロットを示し、発光のスケールを示す。

【0262】

【図32】Agilent 2100 Bioanalyzerによるキャピラリー電気泳動(左下)及びアガロースゲル電気泳動を使用して分析した、HPLCから精製したcircRNA-RBD及びcircRNA-RBD二量体を示す。

【0263】

【図33】CircRNARBD-LNP複合体の粒子サイズ及び封入効率を示す。

【0264】

【図34】BALB/cマウスにおけるCircRNARBD-LNPワクチン接種プロセス及び血清収集スケジュールの概略図を示す。

【0265】

【図35】RBD結合B細胞の結果を示す。フローサイトメトリー抗体パネルは、ナイーブB細胞(CD19+IgD+CD27 $^{-}$)、全メモリーB細胞(CD19+CD27+) (交換されていないIgD+集団及び交換されたIgD $^{-}$ 集団を含む)、形質細胞(CD19+IgD $^{-}$ CD38+CD27+)、及び移行B細胞(CD19+IgDdimCD38+)を識別するために設計された。LNP-circRNA-RBPワクチン接種が抗原特異的B細胞の活性化及び増殖を誘導したかどうかを決定するために、本発明者らは、Alexa 647標識RBD(RBD-Alexa 647)を使用してRBD結合B細胞の頻度を測定した。本発明者らは、RBD特異的交換B細胞集団(CD19+CD27+IgD $^{-}$ RBD+)及びRBD特異的非交換メモリーB細胞集団(CD19+CD27+IgD+RBD+)を含むメモリーB細胞(すなわち、CD19+CD27+Bリンパ球)において、RBD特異的リンパ球の大部分が検出されることを見出した。

【0266】

【図36】CircRNARBD-LNPワクチン接種により誘発された抗体応答を示す。血清を追加免疫の2週間後に収集し、RBD特異的IgG1、IgG2a、IgG2cについてELISAによって評価した。

【0267】

【図37】hACE2過剰発現細胞株へのRBD結合の阻害を示す。

【0268】

【図38】IgG2a/IgG1とIgG2c/IgG1との比を示す。

【0269】

10

20

30

40

50

【図39】CircRNA RBD-LNPワクチン接種により誘発された中和抗体応答を示す。偽ウイルス中和力価を、追加免疫の2週間後に収集した血清について評価した。

【0270】

【図40】太線で示すIBS1、IBS2、IBS3、EBS1、EBS2、EBS3を有するグループIIイントロンの概略図を示す。

【0271】

【図41】太字で示すIBS1、IBS2、IBS3、EBS1、EBS2、EBS3及びδを有するグループIIイントロンの構造図である。

【発明を実施するための形態】

【0272】

10

6.1. 定義

本明細書で使用される場合、特定の成分に関して「本質的に含まない」は、特定の成分が組成物中に意図的に配合されていないこと、及び／又は混入物質としてのみ若しくは微量で存在することを意味するために本明細書で使用される。したがって、組成物の任意の意図しない混入から生じる特定の成分の総量は、0.1%を十分に下回り、好ましくは0.05%を下回り、より好ましくは0.01%を下回る。最も好ましいのは、特定の成分の量が標準的な分析方法で検出できない組成物である。

【0273】

本明細書で使用される場合、「a」又は「an」は、1つ以上を意味し得る。特許請求の範囲において使用される場合、単語「含む (comprising)」と併せて使用されるとき、単語「a」又は「an」は、1つ又は1つより多くを意味し得る。

20

【0274】

本明細書で使用される場合、特許請求の範囲における「又は」という用語は、代替物のみを指すことが明示的に示されない限り、又は代替物が相互排他的でない限り、「及び／又は」を意味するために使用されるが、本開示は、代替物のみと「及び／又は」とを指す定義を支持する。本明細書で使用される場合、「別の」又は「追加の」は、少なくとも第2又はそれ以上を意味し得る。

【0275】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、値が、その値を決定するために使用される装置、方法についての誤差の固有の変動、又は研究対象間に存在する変動を含むことを示すために使用される。いくつかの実施形態では、「約」は、変動が、「約」が指す値の±5%、±4%、±3%、±2%、±1%、±0.5%、±0.2%、又は±0.1%であることを意味する。いくつかの実施形態では、「約」は、変動が、「約」が指す値の±1%、±0.5%、±0.2%、又は±0.1%であることを意味する。

30

【0276】

「cRNAzyme」という用語は、本明細書では、自己触媒逆スプライシング反応を介して環状RNAを産生することができる線状リボ核酸 (RNA) を指すために使用される。

【0277】

「cRNAzyme構築物」という用語は、cRNAzyme活性を有する線状RNA構築物である。

40

【0278】

「EBS」という用語は、本明細書では、エクソン領域においてイントロン結合配列 (IBSs) と相互作用し (例えば、相補的対を形成し)、EBS核酸配列内のそれら自身のヒドロキシル基によってスプライシングを誘発するエクソン結合配列を指すために使用される。

【0279】

「EBS1」という用語は、エクソン結合配列1を指すために本明細書で使用される。図9及び図41を参照されたい。

【0280】

50

「EBS2」という用語は、エクソン結合配列2を指すために本明細書で使用される。
図9及び図41を参照されたい。

【0281】

「EBS3」という用語は、エクソン結合配列3を指すために本明細書で使用される。
図9及び図41を参照されたい。

【0282】

「EBS1'」という用語は、本明細書では、IBS1'と相互作用する改変EBS1配列を指すために使用される。EBS1'とIBS1'との間の相互作用は、EBS1とIBS1との間の相互作用と同様である。図12C及び12Dを参照されたい。

【0283】

「EBS3'」という用語は、本明細書では、IBS3'と相互作用する改変EBS3配列を指すために使用される。EBS3'とIBS3'との間の相互作用は、EBS3とIBS3との間の相互作用と同様である。図12Cを参照されたい。

【0284】

「ドメイン1」又は「D1」という用語は、本明細書では、グループIIイントロンのドメイン1のステムループ構造を指すために使用される。「ドメイン2」又は「D2」という用語は、本明細書では、グループIIイントロンのドメイン2のステムループ構造を指すために使用される。「ドメイン3」又は「D3」という用語は、本明細書では、グループIIイントロンのドメイン3のステムループ構造を指すために使用される。「ドメイン4」又は「D4」という用語は、本明細書では、グループIIイントロンのドメイン4のステムループ構造を指すために使用される。「ドメイン5」又は「D5」という用語は、本明細書では、グループIIイントロンのドメイン5のステムループ構造を指すために使用される。「ドメイン6」又は「D6」という用語は、本明細書では、グループIIイントロンのドメイン6のステムループ構造を指すために使用される。ステムループ構造は、RNA二次構造の一種であり、任意の適切なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定することができる。いくつかのプログラムは、最小ギブス自由エネルギーの計算に基づいている。1つのそのようなアルゴリズムの例は、mFoldであり、Zuker and Stiegler (Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133-148) で記載されている。別の例示的なフォールディングアルゴリズムは、重心構造予測アルゴリズムを使用してInstitute for Theoretical Chemistry (University of Vienna) によって開発されたオンラインウェブサーバRNAfoldである（例えば、AR Gruber et al., 2008, Cell 106）。(1): 23-24; and P A Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27 (12): 1151-62)。追加のアルゴリズムは、米国仮特許出願第61/836,080号（代理人整理番号第44790.11.2022; 参照番号BI-2013/004A）に見出すことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。グループIIイントロンは、主に、ドメイン1~6（D1~D6）と呼ばれる6つのステムループ構造を含み、6つのドメインは、EBS1、EBS2、及びEBS3等の複数のエクソン結合配列（EBS）を含む配列に配置される。これらのEBS配列は、エクソン領域中のイントロン結合配列（IBS）と相補的対等で相互作用し、EBS核酸配列内のそれら自身のヒドロキシル基によってスプライシングを誘発する。

【0285】

本明細書で使用される場合、用語「グループIIイントロン」は、グループIIイントロンによってコードされ、類似の二次構造及び三次構造を共有するRNA分子を指すために本明細書で使用される。グループIIイントロンRNA分子は、典型的には6つのドメインを有する。図9及び図41を参照されたい。グループIIイントロンRNAのドメイン4（ドメインIVとしても知られる）は、「グループIIイントロンコードタンパク質」をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0286】

10

20

30

40

50

「IBS」という用語は、エクソン結合配列（EBS）と相互作用してスプライシング部位を位置付けるイントロン結合配列を指すために本明細書で使用する。

【0287】

「IBS1」という用語は、エクソン結合配列1（EBS1）と相互作用してスプライシング部位を位置付けるイントロン結合配列1を指すために本明細書で使用する。

【0288】

「IBS1'」という用語は、本明細書では、IBS1と同様の機能を有する標的配列上の領域を指すために使用される。

【0289】

「IBS2」という用語は、エクソン結合配列2（EBS2）と相互作用してスプライシング部位を位置付けるイントロン結合配列2を指すために本明細書で使用する。

【0290】

「IBS3」という用語は、エクソン結合配列3（EBS3）と相互作用してスプライシング部位を位置付けるイントロン結合配列3を指すために本明細書で使用する。

【0291】

「IBS3'」という用語は、本明細書では、IBS3と同様の機能を有する標的配列上の領域を指すために使用される。

【0292】

「 δ 」（デルタ）という用語は、本明細書では、EBS1のすぐ上流の単一ヌクレオチドであるグループIIイントロンのドメイン1上の領域を指すために使用される。 δ はIBS3と対合し、 δ とIBS3との間の相互作用は δ -IBS3対合と呼ばれる。図41、図12Bを参照のこと。

【0293】

「 δ ''」（デルタ''）という用語は、本明細書では、EBS1'のすぐ上流の単一ヌクレオチドであるグループIIイントロンのドメイン1上の領域を指すために使用される。 δ ''はIBS3'と対合し、 δ ''とIBS3'との間の相互作用は δ ''-IBS3'対合と呼ばれる。図41、図12Dを参照のこと。

【0294】

「IVT」という用語は、本明細書では、RNAポリメラーゼ、リボヌクレオチド、及びDNA鋳型からRNAを合成するための適切な緩衝液条件を使用する、インビトロでRNAを産生するための多用途の方法であるインビトロ転写を指すために使用される。

【0295】

本明細書で 사용되는場合、用語「部分」は、ポリペプチド又はペプチドに関して使用される場合、ポリペプチド又はペプチドの断片を指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又はペプチドの「部分」は、それが由来する全長ポリペプチド又はペプチドの少なくとも1つの機能及び／又は活性を保持する。例えば、いくつかの実施形態では、全長ポリペプチドが所与のリガンドに結合する場合、その全長ポリペプチドの一部も同じリガンドに結合する。

【0296】

「タンパク質」及び「ポリペプチド」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

【0297】

「外因性」という用語は、細胞又は生物におけるタンパク質、遺伝子、核酸、又はポリヌクレオチドに関連して使用される場合、人工的又は天然の手段によって細胞又は生物に導入されたタンパク質、遺伝子、核酸、又はポリヌクレオチドを指し、又は細胞に関連して、この用語は、単離され、続いて人工的又は天然の手段によって細胞集団又は生物に導入された細胞を指す。外因性核酸は、異なる生物若しくは細胞由来であってもよく、又は生物若しくは細胞内に天然に存在する核酸の1つ以上の更なるコピーであってもよい。外因性細胞は、異なる生物由来であってもよく、又は同じ生物由来であってもよい。非限定的な例として、外因性核酸は、それが天然細胞中にある場所とは異なる染色体位置にある

10

20

30

40

50

ものであるか、又はそうでなければ、天然に見出されるものとは異なる核酸配列に隣接しているものである。用語「外因性」は、用語「異種」と互換的に使用される。

【0298】

「発現構築物」又は「発現カセット」は、転写を指示することができる核酸分子を意味するために使用される。発現構築物は、少なくとも、1つ以上の所望の細胞型、組織又は器官における遺伝子発現を指示する1つ以上の転写制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー又はその機能的に等価な構造）を含む。更なる要素（例えば、転写終結シグナル）もまた含まれ得る。

【0299】

「ベクター」又は「構築物」（遺伝子送達系又は遺伝子移入「ビヒクル」と呼ばれることもある）は、インビトロ又はインビボのいずれかで宿主細胞に送達される、ポリヌクレオチド、又は当該ポリヌクレオチドによって発現されるタンパク質を含む高分子又は分子の複合体を指す。

【0300】

ベクターの一般的なタイプである「プラスミド」は、染色体DNAから独立して複製することができる、染色体DNAから分離した染色体外DNA分子である。ある特定の場合には、それは環状及び二本鎖である。

【0301】

用語「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、及び「オリゴヌクレオチド」は、特に明記しない限り、又は文脈が反対のことを示さない限り、本明細書において互換的に使用され、ピリミジン及び／又はプリン塩基、例えば、それぞれシトシン、チミン、及びウラシル、アデニン及びグアニンのポリマー又はオリゴマーを指す（Albert L. Lehninger, Principles of Biochemistry, at 793-800 (Worth Pub. 1982)を参照されたい）。この用語は、任意のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、又はペプチド核酸成分、及びこれらの塩基のメチル化、ヒドロキシメチル化、又はグリコシル化形態等のそれらの任意の化学的バリエーションを包含する。ポリマー又はオリゴマーは、組成が不均一であっても均一であってもよく、天然に存在する供給源から単離されてもよく、又は人工的若しくは合成的に生成されてもよい。更に、核酸は、DNA若しくはRNA、又はそれらの混合物であってもよく、一本鎖又は二本鎖形態（ホモ二本鎖、ヘテロ二本鎖、及びハイブリッド状態を含む）で永続的に又は過渡的に存在してもよい。核酸又は核酸配列は、他の種類の核酸構造、例えば、DNA/RNAヘリックス、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ核酸（例えば、Brasch and Corey, Biochemistry, 4 / (14) : 4503-4510 (2002)及び米国特許第5,034,506号を参照されたい）、ロックド核酸（LNA; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97: 5633-5638 (2000)を参照されたい）、シクロヘキセニル核酸（Wang, Am. Chem., 122: 8595-8602 (2000)を参照されたい）、及び／又はリボザイムを含み得る。「核酸」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、非天然ヌクレオチド、改変ヌクレオチド、及び／又は天然ヌクレオチドと同じ機能を示すことができる非ヌクレオチド構成ブロック（例えば、「ヌクレオチド類似体」）を含む鎖も包含し得る。「DNA配列」という用語は、一連のDNA塩基を含む核酸を指すために本明細書で使用される。

【0302】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に使用され、化学的又は生化学的に改変又は誘導体化されたアミノ酸である少なくとも2つ以上の連続アミノ酸を含むアミノ酸のポリマー形態を指す。本明細書で使用される「ペプチド」という用語は、短いポリペプチドのクラスを指す。ペプチドという用語は、約100アミノ酸までの長さを有するアミノ酸（天然又は非天然）のポリマーを指す場合がある。例えば、ペプチドは、約1～約10、約10～約25、約25～約50、約50～約75、約

75～約100アミノ酸残基長であり得る。いくつかの実施形態では、ペプチドは、約100、約200、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900、約1000、約1250、約1500、約1750、約2000、約2250、約2500、約2750、約3000、約3250、約3500、約3750、約4000、約4250、約4500、約4750、約5000アミノ酸残基長であり得る。

【0303】

本明細書で使用されるヌクレオチド、核酸、ヌクレオシド、及びアミノ酸の命名法は、国際純正・応用化学連合（IUPAC）標準と一致する（例えば、bioinformatics.org/smsylupac.htmlを参照されたい）。

【0304】

核酸配列又はタンパク質配列に言及する場合、用語「同一性」は、2つの配列間の類似性を示すために使用される。配列類似性又は同一性は、限定されないが、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2, 482 (1981), by the sequence identity alignment algorithm of Needleman & Wunsch, J Mol. Biol. 48, 443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), the Best Fit sequence program described by D evereux et al., Nucl. Acid Res. 12, 387-395 (1984) の局所配列同定アルゴリズムを含む当該技術分野で知られている標準的な技術を使用して、又は検査によって決定され得る。別のアルゴリズムは、Altschul et al., J Mol. Biol. 215, 403-410, (1990) and Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873-5877 (1993) に記載されているBLASTアルゴリズムである。特に有用なBLASTプログラムは、Altschul et al., Methods in Enzymology, 266, 460-480 (1996); blast.wustl.edu/blast/README.htmlから入手したWU-BLAST-2プログラムである。WU-BLAST-2は、デフォルト値に任意に設定されるいくつかの検索パラメータを使用している。パラメータは動的な値であり、特定の配列の組成及び対象となる配列が検索される特定のデータベースの組成に応じて、プログラム自体によって定められるが、感度を上げるために値を調整してもよい。更に、追加の有用なアルゴリズムは、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402. によって報告されるようなギャップBLASTである。別段の指示がない限り、同一性パーセントは、本明細書では、インターネットアドレス：blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiで入手可能なアルゴリズムを使用して決定される。

【0305】

「内部リボソーム進入部位」、「内部リボソーム進入部位配列」、「IRES」及び「IRES配列領域」という用語は、本明細書において互換的に使用され、標準的な真核生物キャップ依存性翻訳開始のステップを迂回するウイルス又はヒト細胞RNA（例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）及び／又はcircRNA）のシス要素を指す。大多数の真核生物mRNAによって使用される標準的なキャップ依存的機構は、mRNAの5'末端におけるm⁷Gキャップ、イニシエーターMet-tRNA_{Met}、1ダースを超える開始因子タンパク質、指向性スキニング、及び翻訳的にコンピテントなリボソームを開始コドンに配置するためのGTP加水分解を必要とする。IRESは、典型的には、

翻訳開始複合体結合を媒介し、機能的リボソームの形成を触媒する、長く高度に構造化された5'-UTRから構成される。

【0306】

「IRES様配列」又は「内部リボソーム進入部位様配列」という用語は、天然IRESの機能を示す合成ヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態では、IRES様配列は、リボソーム成分を動員して、キャップ非依存性翻訳を媒介することができる。

【0307】

「コード配列」、「コード配列領域」、「コード領域」、及び「CDS」という用語は、核酸配列に言及する場合、例えば、タンパク質に翻訳される、又は翻訳され得るDNA又はRNA配列の部分を指すために、本明細書において互換的に使用され得る。用語「リーディングフレーム」、「オープンリーディングフレーム」、及び「ORF」は、開始コドン（例えば、ATG）で始まり、いくつかの実施形態では、終止コドン（例えば、TAA、TAG、又はTGA）で終わるヌクレオチド配列を指すために、本明細書において互換的に使用され得る。オープンリーディングフレームは、イントロン及びエクソンを含有し得、したがって、全てのCDSはORFであるが、全てのORFがCDSであるわけではない。

【0308】

「相補的」及び「相補性」という用語は、従来のワトソン-クリック塩基対合又は他の非従来型の対合のいずれかによって互いに水素結合を形成する能力を有する2つの核酸配列又は核酸単量体間の関係を指す。2つの核酸配列間の相補性の程度は、第2の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン-クリック塩基対合）を形成することができる核酸配列中のヌクレオチドのパーセンテージ（例えば、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、及び100%相補的）によって示すことができる。2つの核酸配列は、核酸配列の全ての連続するヌクレオチドが、第2の核酸配列における同じ数の連続するヌクレオチドと水素結合する場合、「完全に相補的」である。2つの核酸配列は、2つの核酸配列間の相補性の程度が、少なくとも8ヌクレオチド（例えば、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、又はそれ以上のヌクレオチド）の領域にわたって少なくとも60%（例えば、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%）である場合、又は2つの核酸配列が、少なくとも中程度のストリンジェンシー条件下で、又はいくつかの実施形態では高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする場合、「実質的に相補的」である。例示的な中程度のストリンジェンシー条件としては、20%ホルムアミド、5%SSC（150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、及び20mg/mL変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中、37°Cで一晩インキュベートした後、1×SSC中、約37~50°Cでフィルターを洗浄すること、又は実質的に類似の条件、例えば、Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4th edition (June 15, 2012)に記載されている中程度のストリンジェンシー条件が挙げられる。高いストリンジェンシー条件は、例えば、（1）50°Cで0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）硫酸ナトリウム（SDS）等の洗浄のための低イオン強度及び高温を使用する条件、（2）ハイブリダイゼーション中に変性剤、例えばホルムアミド、例えば50%（v/v）ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン（PVP）/50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5）と

10

20

30

40

50

750 mM 塩化ナトリウム及び75 mM クエン酸ナトリウムを42℃で使用する条件、又は(3) 50%ホルムアミド、5×SSC (0.75 M NaCl、0.075 M クエン酸ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS、及び10%デキストラン硫酸を42℃で、(i) 42℃で0.2*SSC、(ii) 55℃で50%ホルムアミド、及び(iii) 55℃で0.1*SSC (任意にEDTAと組み合わせて)を使用する条件である。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明は、例えば、ambrook, supra, and Ausubel et al., eds., Short Protocols in Molecular Biology, 5th ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N. J. (2002). に提供されている。

10

【0309】

「ハイブリダイゼーション」又は「ハイブリダイズした」という用語は、核酸配列に言及する場合、相補性を有する配列間及び／又は配列の間で形成される会合である。

【0310】

「制御要素」という用語は、プロモーター領域、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン、複製起点、内部リボソーム進入部位 (IRES)、エンハンサー、スプライス接合部等を集合的に指し、これらは、レシピエント細胞におけるコード配列の複製、転写、転写後プロセッシング、及び翻訳を集合的に提供する。選択されたコード配列が適切な宿主細胞において複製、転写、及び翻訳され得る限り、これらの制御要素の全てが存在する必要はない。

20

【0311】

用語「プロモーター」は、本明細書では、DNA 調節配列を含むヌクレオチド領域を用いるために使用され、この調節配列は、RNA ポリメラーゼに結合し得下流 (3' 方向) コード配列の転写の開始を可能にする遺伝子に由来する。それは、核酸配列の特異的転写を開始するために、調節タンパク質及び分子 (例えば、RNA ポリメラーゼ及び他の転写因子) が結合し得る遺伝子要素を含み得る。「作動可能に配置された」、「作動可能に連結された」、「制御下にある」、及び「転写制御下にある」という句は、プロモーターが、その配列の転写開始及び／又は発現を制御するために、核酸配列に関して正しい機能的配置及び／又は配向にあることを意味する。

30

【0312】

「エンハンサー」とは、プロモーターに近接して配置される場合、エンハンサードメインの非存在下でプロモーターから生じる転写活性と比較して増加した転写活性を付与する核酸配列を意味する。

【0313】

核酸分子に関して「作動可能に連結された」とは、2つ以上の核酸分子 (例えば、転写される核酸分子、プロモーター、及び機能的エフェクター要素) が、核酸分子の転写を可能にするような様式で接続されることを意味する。

【0314】

「相同性」という用語は、2つのポリヌクレオチドの核酸残基間又は2つのポリペプチドのアミノ酸残基間の同一性のパーセントを指す。1つの配列と別の配列との間の対応は、当該技術分野で公知の技術によって決定され得る。例えば、相同性は、配列情報を整理させ、容易に入手可能なコンピュータプログラムを使用することによる、2つのポリペプチド間の配列情報の直接比較によって決定することができる。2つのポリヌクレオチド (例えば、DNA) 又は2つのポリペプチド配列は、上記の方法を使用して決定されるように、ヌクレオチド又はアミノ酸の少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%が、分子の規定された長さにわたってそれぞれ一致する場合、互いに「実質的に相同」である。

40

【0315】

「瘢痕」という用語は、標的配列を除く環状産物中の領域の長さを指す。無瘢痕 c i r

50

RNAは、0ヌクレオチドの瘢痕配列を含む。ほぼ無瘢痕circRNAは、20ヌクレオチド長以下である瘢痕配列を含む。

【0316】

「治療すること」又は「疾患若しくは状態の治療」は、疾患の徴候若しくは症状又は疾患の再発を軽減するために、1つ以上の薬物又は活性剤を患者に投与することを含み得る、プロトコル又は治療計画を実行することを指す。治療の望ましい効果としては、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解、生存率の増加、生活の質の改善又は予後の改善が挙げられる。緩和又は予防は、疾患又は状態の徴候又は症状が現れる前、並びにそれらが現れた後に行われ得る。更に、「治療すること」又は「治療」は、徴候又は症状の完全な緩和を要件とせず、治癒を要件としない。

10

【0317】

本出願全体を通して使用される「治療的利益」又は「治療的に有効な」という用語は、この状態の医学的治療に関して対象の健康を促進又は増強する任意のものを指す。これには、疾患の徴候又は症状の頻度、重症度、又は進行速度の低下が含まれるが、これらに限定されない。例えば、癌の治療は、例えば、腫瘍のサイズの減少、腫瘍の侵襲性の減少、癌の増殖速度の減少、又は転移若しくは再発の速度の減少を伴い得る。癌の治療はまた、癌を有する対象の生存を延長することを指し得る。

【0318】

「薬学的又は薬理学的に許容される」という語句は、必要に応じてヒト等の動物に投与した場合に、有害反応、アレルギー反応、又は他の不都合な反応を生じない分子実体及び組成物を指す。動物（例えば、ヒト）投与のために、調製物は、例えば、FDA Office of Biological Standardsによって要求されるような無菌性、発熱性、全般的安全性、及び純度の基準を満たすべきであることが理解される。

20

【0319】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」としては、任意の及び全ての水性生体適合性溶媒（例えば、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、非経口ビヒクル（例えば、塩化ナトリウム、リンガーデキストロース等））、抗酸化剤、防腐剤（例えば、抗菌剤又は抗真菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス）、等張剤、例えば、当業者に公知であるような材料及びそれらの組み合わせが挙げられる。医薬組成物中の様々な成分のpH及び正確な濃度は、周知のパラメータに従って調整される。

30

【0320】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「約」という用語は、所与の値又は範囲の±10%以内を意味する。ある特定の実施形態では、「約」という用語は、列挙された正確な数を包含する。

【0321】

6.2. リボザイム及びグループIIイントロン

リボザイム自体は、RNA核酸分子のストレッチである。このような核酸配列は酵素活性を有するので、リボザイムと呼ばれる。例えば、いくつかのミトコンドリア又は細菌由来のいくつかのイントロン配列は、スプライセオソームに依存しないスプライシングの発生を直接触媒することができ、「自己スプライシング活性を有するリボザイム」、「自己スプライシングリボザイム」又は「自己スプライシングイントロン」と呼ばれる。タンパク質全くなしでスプライシングを行うことができる自己スプライシングイントロンは、グループI及びグループIIイントロンの両方を含む。上記のように、2つのイントロンは、構造及び自己スプライシング反応の機構において有意に異なる。図10を参照されたい。本発明は、具体的には、グループII自己スプライシングイントロン（単に「グループIIイントロン」とも呼ばれる）に関する。

40

【0322】

自己スプライシングリボザイムを用いて環状RNAを調製する方法は、以下の利点をする。

1) 生物学的及び化学的試薬の使用の減少。リボザイムの使用は、調製中の外因性生物

50

学的産物（例えば、リガーゼ）の混入及び他の化学試薬の混入を効果的に減少させ得る。触媒的自己スプライシングのためにリボザイムを使用する場合、*Tris-HCl* 緩衝液、*Mg* イオン、ナトリウムイオン、及び *GTP* 等の少数の試薬のみが反応系において必要とされる。本発明の場合、*GTP* はまた、グループ *II* イントロンの使用により省略され得る。対照的に、環状 *RNA* を調製するためのライゲーション反応にリガーゼを使用する場合、リガーゼ自体に加えて、一方では、*Tris-HCl* 緩衝液、*KCl*、*DTT*、*EDTA* 及びグリセロール等の対応する化学試薬を酵素の保存のために使用する必要がある、一方では、*Mg* イオン、*DTT* 及び *ATP* 等の化学試薬も反応系に添加する必要がある。試薬の種類を減らすことは、費用を節約し、操作を単純化し得る。

2) 操作が容易。上述のように、反応に必要な試薬の種類が少ないことにより、環状化反応は、*GTP*（グループ *I* 自己スプライシングイントロンの場合のみ）及びイオンを含む緩衝液を *RNA* に添加するのみで、*PCR* 装置において 1 ステップで完了することができる。対照的に、ライゲーション反応に *RNA* リガーゼを使用する場合、少なくとも追加のリガーゼを添加する必要がある。

3) 単純な設計。より大きな分子量を有する環状 *RNA*（例えば、コード配列を含む環状 *RNA*）については、直接ライゲーションの効率は非常に低く、外因性 *DNA* スプリントが通常導入される必要がある、これは *RNA* 及び *DNA* の正確な対合を必要とし、それによって設計及び操作の複雑さを増加させる。

【0323】

図 9 は、グループ *II* イントロンの二次構造の概略図を示す。図 9 に示すように、グループ *II* イントロンは、主に、ドメイン 1～6（*D1*～*D6*）と呼ばれる 6 つのステムループ構造を含み、6 つのドメインは、*EB S1*、*EB S2*、及び *EB S3* 等の複数のエクソン結合配列（*EB S*）を含む配列に配置される。これらの *EB S* 配列は、エクソン領域中のイントロン結合配列（*IB S*）と相補的対等で相互作用し、*EB S* 核酸配列内のそれら自身のヒドロキシル基によってスプライシングを誘発する。このスプライシング機構は、スプライソソームによって媒介されるスプライシング反応により近く、高等生物におけるスプライシングにより類似している。

【0324】

好ましい実施形態では、グループ *II* イントロンは、微生物界（細菌ドメイン）に由来する。特定の実施形態では、グループ *II* イントロンは、クロストリジウム（*Clostridium*）（例えば、破傷風菌（*Clostridium tetani*））又はバチルス（*Bacillus*）（例えば、バチルス・チューリングエンシス（*Bacillus thuringiensis*））に由来する。本発明の鍵は、種々のグループ *II* イントロンに適用可能な構築物及び方法の設計にあることが当業者によって理解される。本発明の実施は、グループ *II* イントロンがインビトロで自己スプライシング環状化活性を有する限り、特定のグループ *II* イントロンタイプに限定されず、これは、従来手段によって当業者により確認され得る。

【0325】

本発明のいくつかの実施形態では、グループ *II* イントロンは、野生型グループ *II* イントロンであっても改変されたグループ *II* イントロンであってもよい。改変されたグループ *II* イントロンは、1 つ以上のヌクレオチドの、置換、欠失及び／又は付加を含む。好ましくは、改変は、グループ *II* イントロンの自己スプライシング活性、特にインビトロ自己スプライシング活性に影響を及ぼさない。

【0326】

6.3. 本発明の構築物

本発明の文脈において、天然の自己スプライシングリボザイムは、自己スプライシングリボザイム又は *cRNAzyme* 前駆体と呼ばれてもよく、再配置及び操作された自己スプライシングリボザイムが、*cRNAzyme* と呼ばれてもよい。更に、標的配列、例えばタンパク質コード配列又はタンパク質非コード配列に連結された *cRNAzyme* は、*cRNAzyme* 構築物、すなわち本発明のポリヌクレオチド構築物と呼ばれる。

【0327】

具体的には、天然のグループⅠイントロン及びその2つの隣接エクソン断片（E1及びE2）からなる配列のストレッチ（E1-イントロン-E2）を二等分することによって、2つの断片、すなわち、構造E1-5'イントロン断片を有する第1の断片、及び構造3'イントロン断片-E2を有する第2の断片が形成される。5'イントロン断片は、元々3'イントロン断片の5'末端に位置し、互いに直接隣接していた。cRNAzymeを構築する場合、第1及び第2の断片は、位置が交換され、再ライゲーションされる。再配置された配列構造は、「3'イントロン断片-E2-E1-5'イントロン断片」である。この構造及び自己スプライシング活性を有する配列はcRNAzymeと呼ばれる。自己スプライシング活性は、好ましくは、自己スプライシングを引き起こし、挿入されたPOI配列に環状RNAを形成させる活性である。自己スプライシング活性は、好ましくは、インビトロで自己スプライシングが起こる活性である。

10

【0328】

cRNAzymeがPOIを触媒して環状RNAを形成するために使用される場合、POIコード配列及び／又は非コード配列を含むPOI配列は、cRNAzymeのE2とE1との間の位置に構築され、それによってcRNAzyme構築物を形成する。cRNAzyme構築物は、RNAに転写され得、次いで、その中に含まれるcRNAzyme構造要素を介して自己スプライシングに供され得、その結果、その中に含まれるPOI配列は、環状RNAを形成する。

【0329】

概して、グループⅠイントロン（cRNAzyme前駆体）に基づいてcRNAzyme構築物を設計する原理は、全長を可能な限り短く保ちながら、環状化の最大パーセントを保存することである。自己スプライシング環状化反応が起こった後、図1に示すように、イントロン部分が切り出される。得られた環状RNA産物は、もはやイントロン部分を含まない。したがって、環状RNA産物は、スプライシング反応なしで線状cRNAzyme構築物構造よりも少ない総ヌクレオチドを有する。これに基づいて、環状RNA産物及びcRNAzyme構築物は、アガロースゲル電気泳動によって区別され得る。本発明の文脈において、環状化のパーセント（PC）は、環状RNAの、線状RNA及び環状RNAの合計に対するパーセンテージとして定義される。具体的な定量方法は、当該技術分野で一般的に使用される半定量方法を採用し、ゲル電気泳動図におけるバンドの強度に従って量を決定した。

20

30

【0330】

上記の原理に基づいて、E1及び／又はE2は、好ましくは、20ヌクレオチド長以下、例えば10ヌクレオチド長以下、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、E1及びE2は0であってもよい。

【0331】

また、上記の原理に基づいて、cRNAzyme構築物において、5'イントロン断片及び／若しくは3'イントロン断片等のイントロン配列、並びに／又はE1及び／若しくはE2等のエクソン配列は、それらの天然に存在する野生型配列と比較して、1つ以上のヌクレオチドの、付加、欠失、及び置換等の1つ以上のヌクレオチドの改変を含み得る。

【0332】

ステムループ構造は、RNA二次構造の一種であり、任意の適切なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定することができる。いくつかのプログラムは、最小ギブス自由エネルギーの計算に基づいている。1つのそのようなアルゴリズムの例は、mFoldであり、Zuker and Stiegler (Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133-148) で記載されている。別の例示的なフォールディングアルゴリズムは、重心構造予測アルゴリズムを使用してInstitute for Theoretical Chemistry (University of Vienna) によって開発されたオンラインウェブサーバRNAfoldである（例えば、AR Gruber et al., 2008, Cell 106）。(1): 23-24; and PA Carr and GM Church, 2009, Natur

40

50

e Biotechnology 27 (12) : 1151-62)。追加のアルゴリズムは、米国仮特許出願第61/836,080号（代理人整理番号第44790.11.2022；参照番号BI-2013/004A）に見出すことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0333】

一実施形態では、配列を短縮するために、配列又はヌクレオチドの一部を、活性に影響を及ぼすことなく欠失させることができる。例えば、グループIIイントロンドメイン4におけるイントロンコードタンパク質（IEP）配列を欠失させてもよい。ドメイン4中のIEP配列又は類似の構造は、全てのグループIIイントロン中に存在し、逆転写酵素活性を有するタンパク質をコードし、これは、イントロンを触媒して、逆転写酵素として作用し、RNA中間体を介してそのゲノム中を移動し得る。この機能は、ゲノム中の天然のグループIIイントロンのレトロトランスポジションに必要であるが、インビトロ転写には必要がない。したがって、ドメイン4におけるこの配列ストレッチの一部又は全部を、本発明の構築物において欠失させてもよい。

10

【0334】

E1及びE2は、典型的には、自己スプライシングのためにイントロン中に含まれるEBS配列と相互作用するIBS配列を含む必要がある。本発明の一実施形態では、E1及びE2配列は0であってもよく、これは最終的な環状RNAが標的配列以外のいかなる配列も含まないという利点を有する。この場合、イントロン中のEBSと対合した「IBS」配列が依然として存在し得ることを確保するために、イントロンのEBS配列は、標的配列中の配列のストレッチと相補的に対合し、それによって相互作用を可能にするように改変される必要がある。言い換えれば、標的配列中の配列のストレッチは、自己スプライシングの完了を確保するためのイントロン中の改変EBS配列と相互作用する「IBS」と見なされる。

20

【0335】

したがって、本発明の一実施形態では、グループIIイントロンは、改変されたグループIIイントロン、特に改変されたEBS領域を有するグループIIイントロンである。改変は、1つ以上のヌクレオチドの、置換、具体的にはEBS領域中の1つ以上のヌクレオチドの置換であってよく、その結果、改変されたEBS領域が標的配列中の対応する長さの領域と相補的に対合する。「相補的に対合する」という表現は、2つの配列が、RNAに転写された後に相補的に対合することができることを意味し、対合は、RNAにおけるG及びUの対合様式を包含する。改変されたEBSは、3～20ヌクレオチド長、好ましくは5～15ヌクレオチド、より好ましくは6～10ヌクレオチド、例えば6、7、8、9又は10ヌクレオチドであってよい。

30

【0336】

改変されたEBSと相補的に対合する標的配列の領域は、EBSとの対合が達成され得、それによって自己スプライシングを促進することができる二次構造を形成する限り、標的配列のどこに存在してもよい。概して、両末端の配列は、E1及びE2が元々位置していた構築物中に位置しており、E1及びE2の位置は、EBSと元々相互作用していたIBS配列の位置でもあるので、標的配列の両末端の配列は、改変EBSの設計の基礎として使用することができる。したがって、特定の実施形態では、改変EBS領域は、改変されたEBS1及びEBS3領域である。特定の実施形態では、改変EBS領域と相補的に対合する標的配列中の領域は、標的配列の3'及び／又は5'末端に位置する。

40

【0337】

この相補的対合の目的は、EBSと、IBSとして作用する標的配列断片との間の相互作用を確保することであるので、相互作用が存在する限り、ある程度のミスマッチは許容され得る。いくつかの実施形態では、改変EBS領域は、ヌクレオチド位置の少なくとも60%、例えば少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは100%において、標的配列中の対応する長さの領域と相補的に対合するか、又は標的配列中の対応する長さの領域の相補的対合配列と少なくとも60%同一、例

50

えば少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは100%同一である。

【0338】

別の実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、互いに相補的な対合配列の1つ以上の対を含み得る。このような対合した配列は、5'イントロン断片と3'イントロン断片との間の空間距離を短縮し、それによって環状化反応を容易にする。好ましい実施形態では、相補的な対合した配列は、少なくとも約20ヌクレオチド長である。

【0339】

構築物中の標的配列は、環状RNAに調製されることが望まれる任意の配列を含み得る。標的配列は、タンパク質コード配列、又はタンパク質非コード配列、又はそれらの組み合わせであってもよい。言い換えれば、様々な要素が標的配列に含まれ得る。タンパク質コード配列は、例えば、機能性タンパク質、抗原性タンパク質、シグナルペプチド、タグタンパク質等から選択される任意のタンパク質をコードし得る。

10

【0340】

例えば、標的配列に含まれるタンパク質非コード配列は、配列の柔軟性を調節し得るスペーサー配列（例えば、ATリッチ配列）であり得る。このようなスペーサー配列は、標的配列中のどこに位置していてもよく、例えば、標的配列の一端、E1及び／又はE2のすぐ隣に位置していてもよい。

【0341】

例えば、標的配列に含まれるタンパク質非コード配列は、内部リボソーム進入部位（IRES）等の翻訳調節配列であってもよい。本発明に利用可能なIRESは、任意の供給源に由来し得る。

20

【0342】

本発明のcRNAzyme構築物及びcRNAzyme構築物は、インタクトな形態で調製され、次いで、転写及び自己スプライシングされて、所望の環状RNAを形成する。

【0343】

6.4. 自己スプライシング反応系

グループIEイントロンの自己スプライシングは、高塩濃度条件下で達成される必要があり、グループEイントロンと比較してGTPの導入を必要としない。

【0344】

本発明の特定の実施形態では、自己スプライシング反応に使用される自己スプライシング緩衝液は、10mM~100mM、例えば10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、及び100mMの二価マグネシウムイオン、例えばMgCl₂を含む。自己スプライシング緩衝液は、10mM~100mM、例えば10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、及び100mMのNaClを含み得る。

30

【0345】

好ましい実施形態では、本発明の自己スプライシング反応は、約5分間~約1時間、例えば、約5分間、約10分間、約15分間、約20分間、約25分間、約30分間、約35分間、約40分間、約45分間、約50分間、約55分間、及び約1時間、インビトロで行われる。

40

好ましい実施形態では、本発明の構築物は、少なくとも30%の環状化率、例えば、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%、及び少なくとも95%の環状化率を達成することができる。

【0346】

6.5. 標的配列

いくつかの実施形態では、標的配列は空である。いくつかの実施形態では、標的配列は、タンパク質コード配列である。いくつかの実施形態では、標的配列は非コード配列である。

【0347】

50

いくつかの実施形態では、標的配列は、治療用産物をコードする。

【0348】

特定の実施形態では、治療用産物は、ポリペプチド、タンパク質、酵素又は抗体である。特定の実施形態では、治療用産物は、1つ以上のポリペプチド、タンパク質、酵素、抗体、又はそれらの組み合わせを含む。

【0349】

特定の実施形態では、このタンパク質又は酵素は、遺伝子変化及び／又はタンパク質調節不全に起因し得る病理学的徴候を伴う疾患に関連する。

【0350】

特定の実施形態では、ポリペプチド又はタンパク質は、細菌、ウイルス、真菌、寄生生物等の微生物、又はそのような微生物の1つ以上の毒素及び／若しくは1つ以上のタンパク質、例えば、表面タンパク質（すなわち、抗原）であり得る疾患原因物質の弱化形態又は死滅形態に類似する。特定の実施形態では、治療用産物は、身体の免疫系を刺激して因子を外來侵入物として認識し、それに対する抗体を産生し、それを破壊し、そしてその記憶を発達させ得る、抗原又は因子である。特定の実施形態では、治療用産物は、ワクチン誘導性記憶を誘導することができ、及び／又は免疫系が迅速に作用して後の遭遇においてこれらの薬剤のいずれかから身体を保護することを可能にする、抗原又は因子である。

【0351】

いくつかの実施形態では、治療用産物は、感染因子に由来する。いくつかの実施形態では、感染因子は、ウイルス株及び細菌株からなる群のメンバーから選択される。

【0352】

本明細書で提供される実施形態のいずれかにおいて、感染因子は、アデノウイルス；単純ヘルペス、1型；単純ヘルペス、2型；脳炎ウイルス、パピローマウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス；エプスタインバーウイルス；ヒトサイトメガロウイルス；ヒトヘルペスウイルス、8型；ヒトパピローマウイルス；BKウイルス；JCウイルス；天然痘；ポリオウイルス；B型肝炎ウイルス；ヒトボカウイルス；パルボウイルスB19；ヒトアストロウイルス；ノーウォークウイルス；コクサッキーウイルス；A型肝炎ウイルス；ポリオウイルス；ライノウイルス；重症急性呼吸器症候群ウイルス；C型肝炎ウイルス；黄熱病ウイルス；デングウイルス；西ナイルウイルス；風疹ウイルス；E型肝炎ウイルス；ヒト免疫不全ウイルス（HIV）；インフルエンザウイルス；グアナリトウイルス；フニンウイルス；ラッサウイルス；マチュポウイルス；サビアウイルス；クリミア・コンゴ出血熱ウイルス；エボラウイルス；マールブルグウイルス；麻疹ウイルス；ムンプスウイルス；パラインフルエンザウイルス；呼吸器合胞体ウイルス（RSV）；ヒトメタニューモウイルス；ヘンドラウイルス；ニパウイルス；狂犬病ウイルス；D型肝炎；ロタウイルス；オルビウイルス；コルチウイルス；バンナウイルス；ヒトエンテロウイルス；ハンタウイルス；西ナイルウイルス；コロナウイルス、サーズ（SARS）関連コロナウイルス（SARS-CoV）、SARS-CoV-2ウイルス（COVID-19関連）；中東呼吸器症候群コロナウイルス；日本脳炎ウイルス；水疱疹；東部馬脳炎；及びインフルエンザウイルスからなる群から選択されるウイルス株である。いくつかの実施形態では、感染因子は、結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、クリンダマイシン耐性クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）、フルオロキノロン耐性クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）（MRSA）、多剤耐性エンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）、多剤耐性エンテロコッカス・フェシウム（*Enterococcus faecium*）、多剤耐性緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、多剤耐性アシネトバクター・バウマニ（*Acinetobacter baumannii*）、及びバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）（VRSA）から選択される細菌株である。

【0353】

いくつかの実施形態では、感染因子は、トリ、ブタ、ウマ、イヌ、ヒト又は非ヒト霊長類に関連する。

10

20

30

40

50

【0354】

いくつかの実施形態では、抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え産生抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、2つの重鎖及び2つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖－重鎖対、イントラボディ、ヘテロコンジュゲート抗体、一価抗体、全長抗体の抗原結合断片、及び上記の融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。このような抗原結合断片としては、単ドメイン抗体（重鎖抗体（VH）又はナノボディの可変ドメイン）、Fab、F(ab')₂S、及びscFv（単鎖可変断片）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0355】

特定の実施形態では、本明細書に開示される核酸（例えば、ポリヌクレオチド）及び核酸配列は、例えば、当業者に公知の任意のコドン最適化技術を介してコドン最適化される（例えば、Quax et al., 2015, Mol Cell 59:149-161による総説を参照されたい）。

【0356】

いくつかの実施形態では、標的配列はアプタマー配列をコードする。いくつかの実施形態では、標的配列は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、小分子、毒素、及び更には生細胞を含む特定の標的に選択的に結合することができる一本鎖DNA又はRNA（ssDNA又はssRNA）分子をコードする。

【0357】

いくつかの実施形態では、標的配列は、化学反応を触媒することができるリボ核酸（RNA）酵素であるリボザイムをコードする。

【0358】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列を標的RNAに特異的に結合し、いくつかの異なる機構を介してタンパク質発現を調節するアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）をコードする。

【0359】

いくつかの実施形態では、標的配列は、内因性標的中のmiRNA結合部位又はタンパク質結合部位と同一性又は相同性を共有する配列の短いストレッチであるデコイをコードする。

【0360】

いくつかの実施形態では、標的配列は、RNA足場をコードし、これは、インビボで、足場のタンパク質ドッキングドメインとそれらの親和性タンパク質酵素融合物との間の相互作用を介して、操作された生物学的経路において酵素を共局在化するように設計されたRNA配列である。

【0361】

6.6. ベクター、線状RNA、前駆体RNA及び環状RNA

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるRNAポリヌクレオチドは、一本鎖RNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは線状RNAである。いくつかの実施形態では、前駆体RNAが本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、提供されるRNAポリヌクレオチドは、ベクターによってコードされる。いくつかの実施形態では、前駆体RNAは、本明細書において提供されるベクターのインビトロ転写によって産生される線状RNAである。

【0362】

いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、環状RNAであるか、又は環状RNAポリヌクレオチドを作製するのに有用である。いくつかの実施形態では、環状RNAが本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、環状RNAは、本明細書において提供されるベクターによって産生される環状RNAである。いくつかの実施形態では、環状RNAは、本明細書で提供される前駆体RNAの環状化によって産生される環状RNAである。

【0363】

環状RNA

環状RNA（「circRNA」又は「cRNA」とも呼ばれる）は、頭部と尾部とが結合した一本鎖RNAである。circRNAは、真核細胞における広範なクラスの非コードRNAとして認識された。典型的には、circRNAは、バックスプライシングによって生成され、非常に安定であることが見出された。

【0364】

いくつかの実施形態では、スプリントライゲーションを用いて環状RNAを産生してもよい。スプリントライゲーションは、線状RNAの2つの末端とハイブリダイズして、ライゲーションのために線状RNAの末端を一緒にするオリゴヌクレオチドスプリントの使用を伴う。デオキシリボ-オリゴヌクレオチド又はリボオリゴヌクレオチドのいずれかであり得るスプリントのハイブリダイゼーションは、ライゲーションのためにRNA末端の5-リン酸及び3-OHを配向させる。その後のライゲーションは、上記のように、化学技術又は酵素技術のいずれかを用いて行うことができる。酵素的ライゲーションは、例えば、T4 DNAリガーゼ（必要なDNAスプリント）、T4 RNAリガーゼ1（必要なRNAスプリント）又はT4 RNAリガーゼ2（DNA又はRNAスプリント）を用いて行うことができる。ハイブリダイズしたスプリント-RNA複合体の構造が酵素活性に干渉する場合、BrCN又はEDC等を用いた化学的ライゲーションは、場合によっては酵素的ライゲーションよりも効率的である（例えば、Dolinnaya et al. Nucleic Acids Res, 21(23):5403-5407 (1993) ; Petkovic et al., Nucleic Acids Res, 43(4):2454-2465 (2015) を参照されたい）。

【0365】

いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド（例えば、環状RNA）は、任意の長さ又はサイズであってもよい。いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、300~10000、400~9000、500~8000、600~7000、700~6000、800~5000、900~5000、1000~5000、1100~5000、1200~5000、1300~5000、1400~5000、及び／又は1500~5000ヌクレオチド長である。

【0366】

いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド（例えば、環状RNA）は、少なくとも300nt、400nt、500nt、600nt、700nt、800nt、900nt、1000nt、1100nt、1200nt、1300nt、1400nt、1500nt、2000nt、2500nt、3000nt、3500nt、4000nt、4500nt、又は5000ntの長さである。いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチドは、3000nt、3500nt、4000nt、4500nt、5000nt、6000nt、7000nt、8000nt、9000nt、又は10000nt以下の長さである。

【0367】

いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド（例えば、環状RNA）は、約300nt、400nt、500nt、600nt、700nt、800nt、900nt、1000nt、1100nt、1200nt、1300nt、1400nt、1500nt、2000nt、2500nt、3000nt、3500nt、4000nt、4500nt、5000nt、6000nt、7000nt、8000nt、9000nt、又は10000ntの長さである。

【0368】

いくつかの実施形態では、RNAポリヌクレオチド（例えば、環状RNA）は、少なくとも500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500又は10000nt

の長さである。RNAポリヌクレオチド（例えば、環状RNA）は、改変されていなくても、部分的に改変されていても、又は完全に改変されていてもよい。

【0369】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、同じ発現配列を含むmRNAよりも高い機能的安定性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、同じ発現配列、5' m^oU改変、最適化されたUTR、キャップ、及び／又はポリAテールを含むmRNAよりも高い機能的安定性を有する。

【0370】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドは、少なくとも5時間、10時間、15時間、20時間の機能的半減期を有する。30時間、40時間、50時間、60時間、70時間又は80時間。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される環状RNAポリヌクレオチドは、5～80、10～70、15～60、及び／又は20～50時間の機能的半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドは、同じタンパク質をコードする同等の線状RNAポリヌクレオチドの機能的半減期より長い（例えば、少なくとも1.5倍長い、少なくとも2倍長い）機能的半減期を有する。いくつかの実施形態では、機能的半減期は、機能的タンパク質合成の検出によって評価することができる。

【0371】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドは、少なくとも5時間、10時間、15時間、20時間、30時間、40時間、50時間、60時間、70時間又は80時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される環状RNAポリヌクレオチドは、5～80、10～70、15～60、及び／又は20～50時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドは、同じタンパク質をコードする同等の線状RNAポリヌクレオチドの半減期より長い（例えば、少なくとも1.5倍長い、少なくとも2倍長い）半減期を有する。

【0372】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、同等の線状mRNAよりも高い発現規模、例えば、細胞へのRNAの投与の24時間後により高い発現規模を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される環状RNAは、同じ発現配列、5' m^oU改変、最適化されたUTR、キャップ、及び／又はポリAテールを含むmRNAよりも高い発現規模を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAは、同等の線状mRNAよりも高い安定性を有し得る。いくつかの実施形態では、これは、1週間にわたって測定された時点で、エレクトロポレーション後のインビトロ又はインビボでの受容体の存在及び密度を測定することによって示され得る。いくつかの実施形態では、これは、qPCR又はISHを介してRNAの存在を測定することによって示され得る。

【0373】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドは、改変RNAヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、改変ヌクレオシドはm⁵C（5-メチルシチジン）である。別の実施形態では、改変ヌクレオシドはm⁵U（5-メチルウリジン）である。別の実施形態では、改変ヌクレオシドはm⁶A（N⁶-メチルアデノシン）である。別の実施形態では、改変ヌクレオシドはs²U（2-チオウリジン）である。別の実施形態では、改変ヌクレオシドはY（シュードウリジン）である。別の実施形態では、改変ヌクレオシドはUm（2'-O-メチルウリジン）である。他の実施形態では、改変ヌクレオシドはm¹A（1-メチルアデノシン）、m²A（2-メチルアデノシン）、Am（2'-O-メチルアデノシン）、m^{s2}m⁶A（2-メチルチオ-N⁶-メチルアデノシン）、i⁶A（N⁶-イソペンテニルアデノシン）、ms²i⁶A（2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデノシン）；i^o⁶A（N⁶-（シス-ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）、ms²i^o⁶A（2-メチルチオ

$-N^6-$ (シス-ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン)、 g^6A (N^6 -グリシナルバモイルアデノシン)、 t^6A (N^6 -トレオニルカルバモイルアデノシン)、 ms^2t^6A (2-メチルチオ- N^6 -トレオニルカルバモイルアデノシン)、 m^6t^6A (N^6 -メチル- N^6 -トレオニルカルバモイルアデノシン)、 hn^6A (N^6 -ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)、 ms^2hn^6A (2-メチルチオ- N^6 -ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)、 $Ar(p)$ (2'-0-リボシルアデノシン (ホスフェート))、 I (イノシン)、 m^1I (1-メチルイノシン)、 m^1hn (1, 2'-0-ジメチルイノシン)、 m^3C (3-メチルシチジン)、 Cm (2'-0-メチルシチジン)、 s^2C (2-チオシチジン)、 ac^4C (N^4 -アセチルシチジン)、(5-ホルミルシチジン)、 m^5Cm (5, 2'-0-ジメチルシチジン)、 ac^4Cm (N^4 -アセチル-2'-0-メチルシチジン)、 k^2C (リシジン)、 m^1G (1-メチルグアノシン)、 m^2G (N^2 -メチルグアノシン)、 m^7G (7-メチルグアノシン)、 Gm (2'-0-メチルグアノシン)、 m^2_2G (N^2 , N^2 -ジメチルグアノシン); m^2Gm (N^2 , 2'-0-ジメチルグアノシン)、 m^2aGm (N^2 , N^2 , 2'-0-トリメチルグアノシン)、 $Gr(p)$ (2'-0-リボシルグアノシン (ホスフェート))、 yW (ワイブトシン)、 $oayW$ (ペルオキシウィブトシン)、 $OHyW$ (ヒドロキシウィブトシン); $OHyW^*$ (過小修飾ヒドロキシワイブトシン)、 IMg (ワイオシン)、 $mimG$ (メチルワイオシン)、 Q (キューオシン)、 oQ (エポキシキューオシン)、 $galQ$ (ガラクトシル-キューオシン)、 $manQ$ (マンノシル-キューオシン)、 $preQo$ (7-シアノ-7-デアザグアノシン)、 $preQi$ (7-アミノメチル-7-デアザグアノシン)、 G^+ (アルカエオシン)、 D (ジヒドロウリジン)、 m^5Um (5, 2'-0-ジメチルウリジン)、 s^4U (4-チオウリジン)、 m^5s^2U (5-メチル-2-チオウリジン)、 s^2Um (2-チオ-2'-0-メチルウリジン)、 acp^3U (3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン)、 ho^5U (5-ヒドロキシウリジン)、 mo^5U (5-メトキシウリジン)、 cmo^5U (ウリジン5-オキシ酢酸)、 $mcmo^5U$ (ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル)、 chm^5U (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン)、 $mchm^5U$ (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル)、 mcm^5U (5-メトキシカルボニルメチルウリジン)、 mcm^5Um (5-メトキシカルボニルメチル-2'-0-メチルウリジン)、 mcm^5s^2U (5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン)、 nm^5s^2U (5-アミノメチル-2-チオウリジン)、 mnm^5U (5-メチルアミノメチルウリジン)、 mnm^5s^2U (5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン)、 mnm^5se^2U (5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン)、 ncm^5U (5-カルバモイルメチルウリジン)、 ncm^5Um (5-カルバモイルメチル-2'-0-メチルウリジン)、 $cmnm^5U$ (5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン)、 $cmnm^5Um$ (5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-0-メチルウリジン)、 $cmnm^5s^2U$ (5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン)、 m^6_2A (N^6 , N^6 -ジメチルアデノシン)、 Im (2'-0-メチルイノシン)、 m^4C (N^4 -メチルシチジン)、 m^4Cm (N^4 , 2'-0-ジメチルシチジン)、 hm^5C (5-ヒドロキシメチルシチジン)、 m^3U (3-メチルウリジン)、 cm^5U (5-カルボキシメチルウリジン)、 m^6Am (N^6 , 2'-0-ジメチルアデノシン)、 m^6_2Am (N^6 , N^6 , 0-2'-トリメチルアデノシン)、 m^2_7G (N^2 , 7-ジメチルグアノシン)、 $m^2_2_7G$ (N^2 , N^2 , 7-トリメチルグアノシン); m^3Um (3, 2'-0-ジメチルウリジン)、 m^5D (5-メチルジヒドロウリジン)、 f^5Cm (5-ホルミル-2'-0-メチルシチジン)、 $m^1Gm(l)$ (l, 2'-0-ジメチルグアノシン)、 $m^1Am(l)$ (l, 2'-0-ジメチルアデノシン); rm^5U (5-タウリノメチルウリジン)、 τm^5s^2U (5-タウリノメチル-2-チオウリジン)、 $imG-14$ (4-デメチルヨシン)、 $imG2$ (イソヨシン)、又は ac^6A (N^6 -アセチルアデノシン) である。

【0374】

いくつかの実施形態では、改変ヌクレオシドは、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド

、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-
 シュードウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチル
 ウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン
 、5-プロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチル
 ウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウ
 リジン、1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル
 -シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル
 -シュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチ
 ル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2
 -チオ-ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジ
 ン、2-メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキ
 シ-2-チオ-シュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メ
 チル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジ
 ン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジ
 ン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチ
 ジン、4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン
 、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ
 -シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン
 、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、
 2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、4-メト
 キシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン
 、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプ
 リン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2, 6-ジアミノプリン
 、7-デアザ-8-アザ-2, 6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチ
 ルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(*cis*-ヒドロキシイソペン
 テニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(*cis*-ヒドロキシイソペンテニル)ア
 デノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トレオニルカルバモイルア
 デノシン、2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N6, N6-ジ
 メチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、2-メトキシ-ア
 デニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ウイオシン、ウィプトシン、7-デアザ-グ
 アノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-
 デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グア
 ノシン、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グア
 ノシン、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2, N2-ジメチルグアノ
 シン、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6
 -チオ-グアノシン、N2-メチル-6-チオ-グアノシン、及びN2, N2-ジメチル
 -6-チオ-グアノシンからなる群から選択される化合物を含み得る。別の実施形態では
 、改変は、5-メチルシトシン、シュードウリジン及び1-メチルシュードウリジンから
 なる群から独立して選択される。

10

20

30

40

50

【0375】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、コドン最適化され得る。コドン最適化
 配列は、治療用産物の発現、安定性及び／又は活性を増加させるために、治療用産物をコ
 ードするポリヌクレオチド中のコドンが置換されているものであってもよい。コドン最適
 化に影響を及ぼす因子としては、以下の1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない
 ：(i) 2つ以上の生物若しくは遺伝子又は合成的に構築されたバイアス表の間のコドン
 バイアスの変動、(ii) 生物、遺伝子又は遺伝子セット内のコドンバイアスの変動の程
 度、(iii) コンテキストを含むコドンの系統的分岐、(iv) それらの解読tRNA
 に従うコドンの変動、(v) トリプレットの全体又は1つの位置のいずれかにおけるGC
 %に従うコドンの変動、(vi) 参照配列（例えば、天然に存在する配列）に対する類似
 性の変動の程度、(vii) コドン頻度カットオフの変動、(viii) DNA配列から

転写される mRNA の構造特性、(i x) コドン置換セットの設計に基づく DNA 配列の機能についての事前知識、及び／又は (x) 各アミノ酸についてのコドンセットの系統の変動。いくつかの実施形態では、コドン最適化ポリヌクレオチドは、リボザイム衝突を最小化し得、及び／又は発現配列と I R E S との間の構造的干渉を制限し得る。

【0376】

いくつかの実施形態では、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物は、5' から 3' に以下の作動可能に連結された要素を含む：(a) 3' イントロン断片；(b) エクソン断片 2 (E 2)；(c) 標的配列；(d) エクソン断片 1 (E 1)；及び (e) 5' イントロン断片。一実施形態では、5' イントロン断片及び 3' イントロン断片は各々、グループ I イントロンの断片である。一実施形態では、5' イントロン断片は、グループ I イントロン中の 3' イントロン断片の 5' 側に位置する。一実施形態では、E 1 は、グループ I イントロンの 5' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上である。一実施形態では、E 2 は、グループ I イントロンの 3' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上であり、標的配列は存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである。

10

【0377】

いくつかの実施形態では、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物は、5' から 3' に以下の作動可能に連結された要素を含む：(a) 3' イントロン断片；(b) エクソン断片 2 (E 2)；(c) リンカー配列；(d) 標的配列；(e) リンカー配列；(f) エクソン断片 1 (E 1)；(g) 5' イントロン断片。一実施形態では、5' イントロン断片及び 3' イントロン断片は各々、グループ I イントロンの断片である。一実施形態では、5' イントロン断片は、グループ I イントロン中の 3' イントロン断片の 5' 側に位置する。一実施形態では、E 1 は、グループ I イントロンの 5' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上である。一実施形態では、E 2 は、グループ I イントロンの 3' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上であり、標的配列は存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである。

20

【0378】

いくつかの実施形態では、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物は、5' から 3' に以下の作動可能に連結された要素を含む：(a) 5' 相同アーム；(b) 3' イントロン断片；(c) エクソン断片 2 (E 2)；(d) 標的配列；(e) エクソン断片 1 (E 1)；(f) 5' イントロン断片；及び (g) 3' 相同アーム。一実施形態では、5' イントロン断片は、グループ I イントロン中の 3' イントロン断片の 5' 側に位置する。一実施形態では、E 1 は、グループ I イントロンの 5' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上である。一実施形態では、E 2 は、グループ I イントロンの 3' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上であり、標的配列は存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである。

30

【0379】

いくつかの実施形態では、自己スプライシング活性を有するポリヌクレオチド構築物は、5' から 3' に以下の作動可能に連結された要素を含む：(a) 5' 相同アーム；(b) 3' イントロン断片；(c) エクソン断片 2 (E 2)；(d) リンカー配列；(e) 標的配列；(f) リンカー配列；(g) エクソン断片 1 (E 1)；(h) 5' イントロン断片；及び (i) 3' 相同アーム。一実施形態では、5' イントロン断片は、グループ I イントロン中の 3' イントロン断片の 5' 側に位置する。一実施形態では、E 1 は、グループ I イントロンの 5' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上である。一実施形態では、E 2 は、グループ I イントロンの 3' 隣接エクソン断片であり、0 ヌクレオチド長以上であり、標的配列は存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである。

40

【0380】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、インビトロで自己スプライシン

50

グ活性を有する。

【0381】

いくつかの実施形態では、E1及び／又はE2は0～20ヌクレオチド長である。好ましい実施形態では、E1及び／又はE2は、0～10ヌクレオチド長である。一実施形態では、E1及び／又はE2は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10ヌクレオチド長である。

【0382】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、不對領域のグループIIイントロンを2つの断片、例えばグループIIイントロンの2つの隣接ドメイン間の線状領域である不對領域にセグメント化することによって得られる。

10

【0383】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン1のステムループ構造のループ領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる。

【0384】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン2のステムループ構造のループ領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる。

【0385】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン3の

20

【0386】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン4のステムループ構造のループ領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる。

【0387】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン5の

30

【0388】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン6のステムループ構造のループ領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる。

【0389】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン1とドメイン2との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる。

【0390】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン2とドメイン3との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる。

40

【0391】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン3とドメイン4との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる。

【0392】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン4とドメイン5との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる。

50

【0393】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片は、ドメイン5とドメイン6との間の線状領域でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる。

【0394】

いくつかの実施形態では、グループIIイントロンは、その野生型形態と比較して1つ以上のヌクレオチドの改変を含み、改変は、欠失、置換、及び付加のうちの1つ以上から選択される。

【0395】

いくつかの実施形態では、改変は、グループIIイントロンの1つ以上のEBS配列の改変を含み、EBS配列は、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%において、標的配列中の対応する長さの1つ以上の領域と相補的に対合する。

10

【0396】

いくつかの実施形態では、改変は、EBS1及びEBS3等のグループIIイントロンの2つのEBS配列の改変であり、EBS配列は、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%において、標的配列中の対応する長さの2つの領域と相補的に対合し、好ましくは、2つの領域は、標的配列の両端にそれぞれ位置する。

20

【0397】

いくつかの実施形態では、改変は、EBS1'及びEBS3'等のグループIIイントロンの2つのEBS配列の改変であり、EBS配列は、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%において、標的配列中の対応する長さの2つの領域と相補的に対合し、好ましくは、2つの領域は、標的配列の両端にそれぞれ位置する。

30

【0398】

いくつかの実施形態では、改変は、グループIIイントロンのEBS1及び／若しくはδ配列の改変、又はEBS1'及び／若しくはδ"配列の改変であり、EBS1及び／又はδ配列は、ヌクレオチドの少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%において標的配列中の対応する長さの領域と相補的に対合し、任意に、改変は、EBS1及び／又はδ配列並びにその上流配列の改変であり、EBS1及び／又はδ配列並びにその上流配列は、ヌクレオチドの少なくとも60%において標的配列中の対応する長さの領域と相補的に対合する。いくつかの実施形態では、標的配列中の対応する長さの領域は、IBS3、IBS3'、下流配列を有するIBS3、又は下流配列を有するIBS3'である。いくつかの実施形態では、δ配列及びその上流は、(a)配列番号127、(b)配列番号128、(c)配列番号129、及び(d)配列番号130からなる群から選択される核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、IBS3及びその下流は、(a)配列番号131、(b)配列番号132、

40

50

(c) 配列番号 133、及び (d) 配列番号 134 からなる群から選択される核酸配列を含む。図 6 及び図 16 を参照されたい。

【0399】

いくつかの実施形態では、改変は、ドメイン 4 の一部又は全部の欠失、例えばドメイン 4 におけるイントロンコードタンパク質 (IEP) 配列の欠失、好ましくはドメイン 4 の全部の欠失を含む。

【0400】

いくつかの実施形態では、改変は、オープンリーディングフレーム (ORF) の欠失を含む。

【0401】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、標的配列のほぼ無瘢痕環状 RNA を形成することができる。

【0402】

いくつかの実施形態では、ほぼ無瘢痕環状 RNA は、1 ヌクレオチド長、2 ヌクレオチド長、3 ヌクレオチド長、4 ヌクレオチド長、5 ヌクレオチド長、6 ヌクレオチド長、7 ヌクレオチド長、8 ヌクレオチド長、9 ヌクレオチド長、10 ヌクレオチド長、11 ヌクレオチド長、12 ヌクレオチド長、13 ヌクレオチド長、14 ヌクレオチド長、15 ヌクレオチド長、16 ヌクレオチド長、17 ヌクレオチド長、18 ヌクレオチド長、19 ヌクレオチド長、又は 20 ヌクレオチド長以下の瘢痕領域を有する。

【0403】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、標的配列の無瘢痕環状 RNA を形成することができる。

【0404】

いくつかの実施形態では、E1 及び E2 は各々 0 ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、E1 は、0 ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、E2 は、0 ヌクレオチド長である。

【0405】

いくつかの実施形態では、グループ II イントロンは、微生物 (例えば、破傷風菌 (*Clostridium tetani*))、又はバチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) 等のバチルス (*Bacillus*) に由来するグループ II イントロンである。

【0406】

いくつかの実施形態では、非コード配列は、配列番号 4~6 のスペーサー配列、ポリ A 配列、ポリ-A-C 配列、ポリ-C 配列、ポリ-U 配列、IRES、リボソーム結合部位、アプタマー配列、RNA 足場、リボスイッチ、自己スプライシングリボザイム以外のリボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、足場、低分子 RNA 結合部位、翻訳調節配列、及びタンパク質結合部位からなる群から選択される。

【0407】

いくつかの実施形態では、グループ II イントロンは、配列番号 33；配列番号 34；配列番号 35；配列番号 36；配列番号 37；配列番号 38；配列番号 39；配列番号 40；及び配列番号 41 からなる群から選択される核酸配列を含む。

【0408】

いくつかの実施形態では、グループ II イントロンは、配列番号 33 と 95% 同一の核酸配列；配列番号 34 と 95% 同一の核酸配列；配列番号 35 と 95% 同一の核酸配列；配列番号 36 と 95% 同一の核酸配列；配列番号 37 と 95% 同一の核酸配列；配列番号 38 と 95% 同一の核酸配列；配列番号 39 と 95% 同一の核酸配列；配列番号 40 と 95% 同一の核酸配列；及び配列番号 41 と 95% 同一の核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む。

【0409】

いくつかの実施形態では、グループ II イントロンは、配列番号 33 と 98% 同一の核酸配列；配列番号 34 と 98% 同一の核酸配列；配列番号 35 と 98% 同一の核酸配列；

10

20

30

40

50

配列番号 36 と 98 % 同一の核酸配列；配列番号 37 と 98 % 同一の核酸配列；配列番号 38 と 98 % 同一の核酸配列；配列番号 39 と 98 % 同一の核酸配列；配列番号 40 と 98 % 同一の核酸配列；及び配列番号 41 と 98 % 同一の核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む。

【0410】

いくつかの実施形態では、グループ II イントロンは、配列番号 33 と 99 % 同一の核酸配列；配列番号 34 と 99 % 同一の核酸配列；配列番号 35 と 99 % 同一の核酸配列；配列番号 36 と 99 % 同一の核酸配列；配列番号 37 と 99 % 同一の核酸配列；配列番号 38 と 99 % 同一の核酸配列；配列番号 39 と 99 % 同一の核酸配列；配列番号 40 と 99 % 同一の核酸配列；及び配列番号 41 と 99 % 同一の核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む。

10

【0411】

いくつかの実施形態では、グループ II イントロンは、表 16 ～ 表 24 から選択される核酸配列を含む。

【0412】

いくつかの実施形態では、グループ II イントロンは、配列番号 33 ～ 配列番号 41 からなる群から選択される核酸配列から本質的になる。

【0413】

いくつかの実施形態では、グループ II イントロンは、配列番号 33 ～ 配列番号 41 からなる群から選択される核酸配列からなる。

20

【0414】

いくつかの実施形態では、グループ II イントロンは、配列番号 33 ～ 配列番号 41 からなる群から選択される核酸配列からなる。

【0415】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、RNA ポリヌクレオチド構築物である。

【0416】

いくつかの実施形態では、3' イントロン断片は、(a) 配列番号 42 と 95 % 同一の核酸配列；(b) 配列番号 42 と 98 % 同一の核酸配列；(c) 配列番号 42 と 99 % 同一の核酸配列；(d) 配列番号 42；(e) 配列番号 43 と 95 % 同一の核酸配列；(f) 配列番号 43 と 98 % 同一の核酸配列；(g) 配列番号 43 と 99 % 同一の核酸配列；(h) 配列番号 43；(i) 配列番号 44 と 95 % 同一の核酸配列；(j) 配列番号 44 と 98 % 同一の核酸配列；(k) 配列番号 44 と 99 % 同一の核酸配列；(l) 配列番号 44；(m) 配列番号 45 と 95 % 同一の核酸配列；(n) 配列番号 45 と 98 % 同一の核酸配列；(o) 配列番号 45 と 99 % 同一の核酸配列；(p) 配列番号 45；(q) 配列番号 46 と 95 % 同一の核酸配列；(r) 配列番号 46 と 98 % 同一の核酸配列；(s) 配列番号 46 と 99 % 同一の核酸配列；(t) 配列番号 46；(u) 配列番号 47 と 95 % 同一の核酸配列；(v) 配列番号 47 と 98 % 同一の核酸配列；(w) 配列番号 47 と 99 % 同一の核酸配列；(x) 配列番号 47；(y) 配列番号 48 と 95 % 同一の核酸配列；(z) 配列番号 48 と 98 % 同一の核酸配列；(aa) 配列番号 48 と 99 % 同一の核酸配列；(bb) 配列番号 48 の核酸配列；(cc) 配列番号 49 と 95 % 同一の核酸配列；(dd) 配列番号 49 と 98 % 同一の核酸配列；(ee) 配列番号 49 と 99 % 同一の核酸配列；(ff) 配列番号 49；(gg) 配列番号 50 と 95 % 同一の核酸配列；(hh) 配列番号 50 と 98 % 同一の核酸配列；(ii) 配列番号 50 と 99 % 同一の核酸配列；(jj) 配列番号 50；(kk) 配列番号 51 と 95 % 同一の核酸配列；(ll) 配列番号 51 と 98 % 同一の核酸配列；(mm) 配列番号 51 と 99 % 同一の核酸配列；(nn) 配列番号 51；(oo) 配列番号 52 と 95 % 同一の核酸配列；(pp) 配列番号 52 と 98 % 同一の核酸配列；(qq) 配列番号 52 と 99 % 同一の核酸配列；及び (rr) 配列番号 52 からなる群から選択される核酸配列を含む。

30

40

【0417】

50

いくつかの実施形態では、3'イントロン断片は、配列番号42～配列番号52のいずれか1つと95%同一の核酸配列、配列番号42～配列番号52のいずれか1つと98%同一の核酸配列、配列番号42～配列番号52のいずれか1つと99%同一の核酸配列、及び配列番号42～配列番号52のいずれか1つからなる群から選択される核酸配列から本質的になる。

【0418】

いくつかの実施形態では、3'イントロン断片は、配列番号42～配列番号52のいずれか1つと95%同一の核酸配列、配列番号42～配列番号52のいずれか1つと98%同一の核酸配列、配列番号42～配列番号52のいずれか1つと99%同一の核酸配列、及び配列番号42～配列番号52のいずれか1つからなる群から選択される核酸配列からなる。

10

【0419】

いくつかの実施形態では、E2は、(a)配列番号53；(b)配列番号54；(c)配列番号55；(d)配列番号56；(e)配列番号57；(f)配列番号58；(g)配列番号59；(h)配列番号60；(i)配列番号61；(j)配列番号62；及び(k)配列番号63からなる群から選択される核酸配列を含む。

【0420】

いくつかの実施形態では、E2は、配列番号53～配列番号63からなる群から選択される核酸配列から本質的になる。

【0421】

いくつかの実施形態では、E2は、配列番号53～配列番号63からなる群から選択される核酸配列からなる。

20

【0422】

いくつかの実施形態では、E1は、配列番号64；配列番号65；配列番号66；配列番号67；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71。配列番号72；配列番号73；及び配列番号74からなる群から選択される核酸配列を含む。

【0423】

いくつかの実施形態では、E1は、配列番号64～配列番号74からなる群から選択される核酸配列から本質的になる。

【0424】

いくつかの実施形態では、E1は、配列番号64～配列番号74からなる群から選択される核酸配列からなる。

30

【0425】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片は、(a)配列番号75と95%同一の核酸配列；(b)配列番号75と98%同一の核酸配列；

【0426】

(c)配列番号75と99%同一の核酸配列；(d)配列番号75；(e)配列番号76と95%同一の核酸配列；(f)配列番号76と98%同一の核酸配列；(g)配列番号76と99%同一の核酸配列；(h)配列番号76；(i)配列番号77と95%同一の核酸配列；(j)配列番号77と98%同一の核酸配列；(k)配列番号77と99%同一の核酸配列；(l)配列番号77；(m)配列番号78と95%同一の核酸配列；(n)配列番号78と98%同一の核酸配列；(o)配列番号78と99%同一の核酸配列；(p)配列番号78；(q)配列番号79と95%同一の核酸配列；(r)配列番号79と98%同一の核酸配列；(s)配列番号79と99%同一の核酸配列；(t)配列番号79；(u)配列番号80と95%同一の核酸配列；(v)配列番号80と98%同一の核酸配列；(w)配列番号80と99%同一の核酸配列；(x)配列番号80；(y)配列番号81と95%同一の核酸配列；(z)配列番号81と98%同一の核酸配列；(a a)配列番号81と99%同一の核酸配列；(b b)配列番号81；(c c)配列番号82と95%同一の核酸配列；(d d)配列番号82と98%同一の核酸配列；(e e)配列番号82と99%同一の核酸配列；(f f)配列番号82；(g g)配列番号83と

40

50

95%同一の核酸配列；(hh)配列番号83と98%同一の核酸配列；(ii)配列番号83と99%同一の核酸配列；(jj)配列番号83；(kk)配列番号84と95%同一の核酸配列；(ll)配列番号84と98%同一の核酸配列；(mm)配列番号84と99%同一の核酸配列；(nn)配列番号84；(oo)配列番号85と95%同一の核酸配列；(pp)配列番号85と98%同一の核酸配列；(qq)配列番号85と99%同一の核酸配列；(rr)配列番号85；(ss)配列番号86と95%同一の核酸配列；(tt)配列番号86と98%同一の核酸配列；(uu)配列番号86と99%同一の核酸配列；(vv)配列番号86；(ww)配列番号87と95%同一の核酸配列；(xx)配列番号87と98%同一の核酸配列；(yy)配列番号87と99%同一の核酸配列；(zz)配列番号87；(aaa)配列番号88と95%同一の核酸配列；(bbb)配列番号88と98%同一の核酸配列；(ccc)配列番号88と99%同一の核酸配列；及び(ddd)配列番号88からなる群から選択される核酸配列を含む。

10

【0427】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片は、配列番号75～配列番号88のいずれか1つと95%同一の核酸配列、配列番号75～配列番号88のいずれか1つと98%同一の核酸配列、配列番号75～配列番号88のいずれか1つと99%同一の核酸配列、及び配列番号75～配列番号88のいずれか1つからなる群から選択される核酸配列から本質的になる。

【0428】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片は、配列番号75～配列番号88のいずれか1つと95%同一の核酸配列、配列番号75～配列番号88のいずれか1つと98%同一の核酸配列、配列番号75～配列番号88のいずれか1つと99%同一の核酸配列、及び配列番号75～配列番号88のいずれか1つからなる群から選択される核酸配列からなる。

20

【0429】

いくつかの実施形態では、5'相同アームは、配列番号105の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、5'相同アームは、配列番号105と95%同一の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、5'相同アームは、配列番号105と98%同一の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、5'相同アームは、配列番号105と99%同一の核酸配列を含む。

30

【0430】

いくつかの実施形態では、5'相同アームは、配列番号105の核酸配列から本質的になる。

【0431】

いくつかの実施形態では、5'相同アームは、配列番号105の核酸配列からなる。

【0432】

いくつかの実施形態では、3'相同アームは、配列番号106の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、3'相同アームは、配列番号106と95%同一の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、3'相同アームは、配列番号106と98%同一の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、3'相同アームは、配列番号106と99%同一の核酸配列を含む。

40

【0433】

いくつかの実施形態では、3'相同アームは、配列番号106の核酸配列から本質的になる。

【0434】

いくつかの実施形態では、3'相同アームは、配列番号106の核酸配列からなる。

【0435】

いくつかの実施形態では、5'相同アーム又は3'相同アームは、15～60ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、5'相同アーム又は3'相同アームは、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、

50

30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、又は60ヌクレオチド長である。

【0436】

いくつかの実施形態では、5'相同アーム又は3'相同アーム配列は、最大1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、又は10%の塩基ミスマッチを有する。

【0437】

いくつかの実施形態では、標的配列は、(a) 配列番号89；(b) 配列番号90；(c) 配列番号91；(d) 配列番号92；(e) 配列番号93；(f) 配列番号94；(g) 配列番号95；及び(h) 配列番号96からなる群から選択される5'アーム配列を含む。

10

【0438】

いくつかの実施形態では、標的配列は、(a) 配列番号97；(b) 配列番号98；(c) 配列番号99；(d) 配列番号100；(e) 配列番号101；(f) 配列番号102；(g) 配列番号103；及び(h) 配列番号104からなる群から選択される3'アーム配列を含む。

【0439】

いくつかの実施形態では、標的配列は、式I：

TI-(L)n-Z1(I) [式中、TIは、内部リボソーム進入部位(IRES)様ポリヌクレオチド配列又は天然IRES配列を含む操作された翻訳開始要素であり、

20

Z1は、治療用産物をコードする発現配列であり、Lはリンカー配列であり、A1及びB1は、RNAポリヌクレオチドの環状化が可能な配列の対であり、nは、0~2から選択される整数である]を含む。

【0440】

いくつかの実施形態では、Z1は、配列番号107と95%同一の核酸配列；配列番号107と98%同一の核酸配列；配列番号107と99%同一の核酸配列；配列番号107；配列番号108と95%同一の核酸配列；配列番号108と98%同一の核酸配列；配列番号108と99%同一の核酸配列；配列番号108；配列番号109と95%同一の核酸配列；配列番号109と98%同一の核酸配列；配列番号109と99%同一の核酸配列；配列番号109；配列番号110と95%同一の核酸配列；配列番号110と98%同一の核酸配列；配列番号110と99%同一の核酸配列；配列番号110；配列番号111と95%同一の核酸配列；配列番号111と98%同一の核酸配列；配列番号111と99%同一の核酸配列；配列番号111；配列番号112と95%同一の核酸配列；配列番号112と98%同一の核酸配列；配列番号112と99%同一の核酸配列；配列番号112からなる群から選択される核酸配列を含む。

30

【0441】

いくつかの実施形態では、Z1は、配列番号107~配列番号112のいずれか1つと95%同一の核酸配列、配列番号107~配列番号112のいずれか1つと98%同一の核酸配列、配列番号107~配列番号112のいずれか1つと99%同一の核酸配列、及び配列番号107~配列番号112のいずれか1つからなる群から選択される核酸配列から本質的になる。

40

【0442】

いくつかの実施形態では、Z1は、配列番号107~配列番号112のいずれか1つと95%同一の核酸配列、配列番号107~配列番号112のいずれか1つと98%同一の核酸配列、配列番号107~配列番号112のいずれか1つと99%同一の核酸配列、及び配列番号107~配列番号112のいずれか1つからなる群から選択される核酸配列からなる。

【0443】

いくつかの実施形態では、Z1は、(a) 配列番号113；(b) 配列番号114；(c) 配列番号115；(d) 配列番号116；(e) 配列番号117；及び(f) 配列番

50

号 1 1 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。

【 0 4 4 4 】

いくつかの実施形態では、Z 1 は、配列番号 1 1 3 ～配列番号 1 1 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列から本質的になる。

【 0 4 4 5 】

いくつかの実施形態では、Z 1 は、配列番号 1 1 3 ～配列番号 1 1 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列からなる。

【 0 4 4 6 】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドを含む。

【 0 4 4 7 】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、10%～100%の改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド構築物は、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドを含む。

【 0 4 4 8 】

いくつかの実施形態では、改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドは、m 5 C (5-メチルシチジン)である。いくつかの実施形態では、改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドのうちの少なくとも1つがm 5 U (5-メチルウリジン)である、実施形態 4 7 又は 4 8 に記載のポリヌクレオチド構築物。

【 0 4 4 9 】

いくつかの実施形態では、改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドは、m 6 A (N 6-メチルアデノシン)である。

【 0 4 5 0 】

いくつかの実施形態では、改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドは、Y (シュドウリジン)である。

【 0 4 5 1 】

いくつかの実施形態では、改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドは、m 1 A (1-メチルアデノシン)である。

【 0 4 5 2 】

いくつかの実施形態では、改変 RNA ヌクレオチド及び／又は改変ヌクレオシドは、インビトロ転写 (I V T) で導入される。

【 0 4 5 3 】

いくつかの実施形態では、改変ヌクレオシドは、m 5 C (5-メチルシチジン)、m 5 U (5-メチルウリジン)、m 6 A (N 6-メチルアデノシン)、s 2 U (2-チオウリジン)、Y (シュドウリジン)、U m (2'-O-メチルウリジン)、m 1 A (1-メチルアデノシン)、m 2 A (2-メチルアデノシン)、A m (2'-O-メチルアデノシン)、m s 2 m 6 A (2-メチルチオ-N 6-メチルアデノシン)、i 6 A (N 6-イソペンテニルアデノシン)、m s 2 i 6 A (2-メチルチオ-N 6 イソペンテニルアデノシン)、i o 6 A (N 6-(c i s-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン)、m s 2 i

10

20

30

40

50

o 6 A (2-メチルチオ-N 6-(c i s-ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン)、
 g 6 A (N 6-グリシニルカルバモイルアデノシン)、t 6 A (N 6-トレオニルカルバ
 モイルアデノシン)、ms 2 t 6 A (2-メチルチオ-N 6-トレオニルカルバモイルア
 デノシン)、m 6 t 6 A (N 6-メチル-N 6-トレオニルカルバモイルアデノシン)、
 hn 6 A (N 6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)、ms 2 hn 6 A (2-
 メチルチオ-N 6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)、Ar (p) (2
 ' - 0-リボシルアデノシン (ホスフェート))、I (イノシン)、m 1 I (1-メチル
 イノシン)、m 1 hn (1, 2' - O-ジメチルイノシン)、m 3 C (3-メチルシチジ
 ン)、Cm (2' - 0-メチルシチジン)、s 2 C (2-チオシチジン)、ac 4 C (N
 4-アセチルシチジン)、(5-ホルミルシチジン)、m 5 Cm (5, 2' - O-ジメチ
 ルシチジン)、ac 4 Cm (N 4-アセチル-2' - O-メチルシチジン)、k 2 C (リ
 シジン)、m ! G (1-メチルグアノシン)、m 2 G (N 2-メチルグアノシン)、m 7
 G (7-メチルグアノシン)、Gm (2' - 0-メチルグアノシン)、m 2 2 G (N 2,
 N 2-ジメチルグアノシン)、m 2 Gm (N 2, 2' - O-ジメチルグアノシン)、m 2
 a Gm (N 2, N 2, 2' - O-トリメチルグアノシン)、Gr (p) (2' - 0-リボシ
 ルグアノシン (ホスフェート))、yW (ウィブトシン)、o a yW (ペルオキシウィブ
 トシン)、OH yW (ヒドロキシウィブトシン)、OH yW* (非改変ヒドロキシウィブ
 トシン)、imG (ウイオシン)、m imG (メチルウイオシン)、Q (トリキューオシ
 ン)、o Q (エポキシトリキューオシン)、gal Q (ガラクトシル-トリキューオシン
)、man Q (マンノシル-トリキューオシン)、pre Q o (7-シアノー-7-デアザ
 グアノシン)、pre Q i (7-アミノメチル-7-デアザグアノシン)、G+ (アルカ
 エオシン)、D (ジヒドロウリジン)、m 5 Um (5, 2' - O-ジメチルウリジン)、
 s 4 U (4-チオウリジン)、m 5 s 2 U (5-メチル-2-チオウリジン)、s 2 Um
 (2-チオ-2' - 0-メチルウリジン)、ac p 3 U (3-(3-アミノ-3-カルボ
 キシプロピル)ウリジン)、ho 5 U (5-ヒドロキシウリジン)、mo 5 U (5-メト
 キシウリジン)、cmo 5 U (ウリジン5-オキシ酢酸)、mcmo 5 U (ウリジン5-
 オキシ酢酸メチルエステル)、chm 5 U (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジ
 ン)、mchm 5 U (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル)
 、mcm 5 U (5-メトキシカルボニルメチルウリジン)、mcm 5 Um (5-メトキシ
 カルボニルメチル-2' - 0-メチルウリジン)、mcm 5 s 2 U (5-メトキシカルボ
 ニルメチル-2-チオウリジン)、nm 5 S 2 U (5-アミノメチル-2-チオウリジン
)、mn 5 U (5-メチルアミノメチルウリジン)、mn 5 s 2 U (5-メチルアミ
 ノメチル-2-チオウリジン)、mn 5 se 2 U (5-メチルアミノメチル-2-セレ
 ノウリジン)、ncm 5 U (5-カルバモイルメチルウリジン)、ncm 5 Um (5-カル
 バモイルメチル-2' - 0-メチルウリジン)、cmnm 5 U (5-カルボキシメチル
 アミノメチルウリジン)、cmnm 5 Um (5-カルボキシメチルアミノメチル-2' -
 0-メチルウリジン)、cmnm 5 s 2 U (5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チ
 オウリジン)、m 6 2 A (N 6, N 6-ジメチルアデノシン)、Im (2' - 0-メチル
 イノシン)、m 4 C (N 4-メチルシチジン)、m 4 Cm (N 4, 2' - 0-ジメチルシ
 チジン)、hm 5 C (5-ヒドラキシメチルシチジン)、m 3 U (3-メチルウリジン)
 、cm 5 U (5-カルボキシメチルウリジン)、m 6 Am (N 6, 2' - O-ジメチルア
 デノシン)、m 6 2 Am (N 6, N 6, 0-2' - 0-トリメチルアデノシン)、m 2, 7 G
 (N 2, 7-ジメチルグアノシン)、m 2, 2, 7 G (N 2, N 2, 7-トリメチルグア
 ノシン)、m 3 Um (3, 2' - 0-ジメチルウリジン)、m 5 D (5-メチルジヒドロ
 ウリジン)、f 5 Cm (5-ホルミル-2' - 0-メチルシチジン)、m' Gm (l, 2' -
 0-ジメチルグアノシン)、m' Am (l, 2' - 0-ジメチルアデノシン)、rm 5 U
 (5-タウリノメチルウリジン)、tm 5 s 2 U (5-タウリノメチル-2-チオウリジ
 ン)、imG-1 4 (4-デメチルウイオシン)、imG 2 (イソウイオシン)、又は
 ac 6 A (N 6-アセチルアデノシン)、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-ア
 ザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオ-シュード

10

20

30

40

50

ウリジン、2-チオ-シュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、
 5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プ
 ロピニル-ウリジン、1-プロピニル-シュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン
 、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン、
 1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュー
 ドウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シュー
 ドウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-
 デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオ-
 ジヒドロウリジン、2-チオ-ジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-
 メトキシ-4-チオ-ウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-
 チオ-シュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シ
 チジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-
 ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピ
 ロロ-シュードイソシチジン、2-チオ-シチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、
 4-チオ-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-
 チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュー
 ドイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-
 アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メ
 トキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、4-メトキシ-
 1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、7-
 デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、
 7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2, 6-ジアミノプリン、7-
 デアザ-8-アザ-2, 6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデ
 ノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)
)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシ
 ン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-トレオニルカルバモイルアデノシ
 ン、2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン、N6, N6-ジメチル
 アデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオ-アデニン、2-メトキシ-アデニン
 、イノシン、1-メチル-イノシン、ウイオシン、ウィプトシン、7-デアザ-グアノシ
 ン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ
 -グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン
 、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グアノシン
 、1-メチルグアノシン、N2-メチルグアノシン、N2, N2-ジメチルグアノシン、
 8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオ
 -グアノシン、N2-メチル-6-チオ-グアノシン、及びN2, N2-ジメチル-6-
 チオ-グアノシン、5-メチルシトシン、シュードウリジン、及び1-メチルシュードウ
 リジンからなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0454】

いくつかの実施形態では、環状RNAは、少なくとも500ヌクレオチド長、少なくと
 も1,000ヌクレオチド長、又は少なくとも1,500ヌクレオチド長である。

【0455】

いくつかの実施形態では、環状RNAは、標的配列に属さないいずれの他の配列も含ま
 ず、例えば、E2配列及びE1配列の全て又は一部を含まない。

【0456】

いくつかの実施形態では、環状RNAを作製する方法であって、5'から3'に作動可能
 に連結された以下の要素を含むベクターを調製することを含む、方法が本明細書に提示さ
 れる：(a) 3'イントロン断片；(b) エクソン断片2 (E2)；(c) 標的配列；(d) エクソン断片1 (E1)；及び(d) 5'イントロン断片。一実施形態では、5'イン
 トロン断片及び3'イントロン断片は各々、グループIEイントロンの断片である。一実
 施形態では、5'イントロン断片は、グループIEイントロン中の3'イントロン断片の5

’側に位置する。一実施形態では、E1は、グループIIイントロンの5’隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上である。一実施形態では、E2は、グループIIイントロンの3’隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、標的配列は存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである。

【0457】

いくつかの実施形態では、環状RNAを作製する方法であって、5’から3’に作動可能に連結された以下の要素を含むベクターを調製することを含む、方法が本明細書に提示される：(a) 3’イントロン断片；(b) エクソン断片2 (E2)；(c) リンカー配列；(d) 標的配列；(e) リンカー配列；(f) エクソン断片1 (E1)；及び(g) 5’イントロン断片。一実施形態では、5’イントロン断片は、グループIIイントロンの3’イントロン断片の5’側に位置する。一実施形態では、E1は、グループIIイントロンの5’隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上である。一実施形態では、E2は、グループIIイントロンの3’隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、標的配列は存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである。

【0458】

いくつかの実施形態では、環状RNAを作製する方法であって、5’から3’に作動可能に連結された以下の要素を含むベクターを調製することを含む、方法が本明細書に提示される：(a) 5’相同アーム；(b) 3’イントロン断片；(c) エクソン断片2 (E2)；(d) 標的配列；(e) エクソン断片1 (E1)；(f) 5’イントロン断片；及び(g) 3’相同アーム。一実施形態では、5’イントロン断片は、グループIIイントロン中の3’イントロン断片の5’側に位置する。一実施形態では、E1は、グループIIイントロンの5’隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上である。一実施形態では、E2は、グループIIイントロンの3’隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、標的配列は存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである。

【0459】

いくつかの実施形態では、環状RNAを作製する方法であって、5’から3’に作動可能に連結された以下の要素を含むベクターを調製することを含む、方法が本明細書に提示される：(a) 5’相同アーム；(b) 3’イントロン断片；(c) エクソン断片2 (E2)；(d) リンカー配列；(e) 標的配列；(f) リンカー配列；(g) エクソン断片1 (E1)；(h) 5’イントロン断片；及び(i) 3’相同アーム。一実施形態では、5’イントロン断片は、グループIIイントロン中の3’イントロン断片の5’側に位置する。一実施形態では、E1は、グループIIイントロンの5’隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上である。一実施形態では、E2は、グループIIイントロンの3’隣接エクソン断片であり、0ヌクレオチド長以上であり、標的配列は存在しないか、又はタンパク質コード配列、非コード配列、若しくはそれらの組み合わせである。

【0460】

いくつかの実施形態では、細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、(a) 実施形態58～61のいずれか1つに記載の環状RNAで細胞をトランスフェクトすること、又は(b) 実施形態1～57のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物を自己スプライシング環状化反応に供して環状RNAを形成することと、細胞を環状RNAでトランスフェクトすることと、を含み、好ましくは、細胞は真核細胞である、方法が本明細書に提示される。

【0461】

いくつかの実施形態では、細胞においてタンパク質を発現させるための方法であって、(a) 実施形態58～61のいずれか1つに記載の環状RNAで細胞をトランスフェクトすること、又は(b) 実施形態1～57のいずれか1つに記載の構築物を自己スプライシング環状化反応に供して環状RNAを形成することと、細胞を環状RNAでトランスフェクトすることと、を含み、好ましくは、細胞は、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞

、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉系細胞、神経細胞（例えば、髄膜、星状膠細胞、運動ニューロン、後根神経節の細胞及び前角運動ニューロン）、光受容細胞（例えば、桿体及び錐体）、網膜色素上皮細胞、分泌細胞、心臓細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜内層細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、B細胞、T細胞、樹状細胞、マクロファージ、網赤血球、白血球、顆粒球、腫瘍細胞、NK細胞、肝スターレット細胞、HEK293、HEK293T、HeLa、MCF7、PC3、A549、NCI-H727、HCT-116、MCF10A、HPRC、FHC、不死化細胞株、初代細胞、酵母細胞、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、細菌細胞、大腸菌 (*Escherichia coli*)、昆虫細胞、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) sf9、ミミックSf9、sf21、又はショウジョウバエ (*Drosophila*) S2である、細胞においてタンパク質を発現させるための方法が本明細書に提示される。

10

【0462】

いくつかの実施形態では、グループIIイントロンを使用して自己スプライシング活性を有する配列を生成するための方法であって、グループIIイントロンの配列を定義する工程と、任意に、スプライシングアッセイ（線状スプライシング）を使用して、グループIIイントロンのインビトロ自己スプライシング活性を検査する工程と、グループIIイントロンを2つの断片に分割し、2つのイントロン断片の順序を逆転させ、スプライシングアッセイを使用してRNAのインビトロ環状化を確認する工程と、を含む、方法が本明細書に提示される。

20

【0463】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び3'イントロン断片が、互いに相補的な対合した配列の1つ以上の対をそれぞれ含む、先行する実施形態のいずれか1つのポリヌクレオチド構築物、環状RNA又は方法。好ましい実施形態では、相補的に対合した配列は、20ヌクレオチド長より長い。

【0464】

いくつかの実施形態では、5'イントロン断片及び／又は3'イントロン断片が、プローブ結合配列、MS2結合部位、PP7結合部位、及びストレプトアビジン結合部位からなる群から選択される1つ以上の親和性タグ配列を含む、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物、環状RNA、又は方法。

30

【0465】

いくつかの実施形態では、EBS配列が、EBS1、EBS2及びEBS3のうちの1つ以上、好ましくはそれらのうちの2つ、より好ましくはEBS1及びEBS3から選択される、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物、環状RNA、又は方法。

【0466】

いくつかの実施形態では、グループIIイントロンの1つ以上のEBS配列、好ましくはEBS1及びEBS3が改変され、EBS配列が、それぞれヌクレオチド位置の少なくとも60%において、標的配列中の対応する長さの2つの領域と相補的に対合する、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物、環状RNA、又は方法。

40

【0467】

好ましい実施形態では、標的配列中の対応する長さの2つの領域は、それぞれ標的配列の両端に位置する。

【0468】

好ましい実施形態では、ポリヌクレオチド構築物がインビトロで標的配列の環状RNAを形成することができる、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築物、環状RNA、又は方法。

【0469】

好ましい実施形態では、ポリヌクレオチド構築物がインビボで標的配列の環状RNAを形成することができる、先行する実施形態のいずれか1つに記載のポリヌクレオチド構築

50

物、環状RNA、又は方法。

【0470】

いくつかの実施形態では、グループIIイントロンは、表16～表24から選択される核酸配列を含む。

6.6.1. 精製

【0471】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは精製タグを含む。好ましい実施形態では、精製タグは、精製マトリックスにコンジュゲートされたオリゴにアニールする15～40 ntのポリヌクレオチドである。精製マトリックスとしては、磁性樹脂又はビーズ、シリコーン樹脂、Sephadex樹脂、親和性樹脂、ナノ粒子、及びナノ材料表面又は被覆表面が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0472】

いくつかの実施形態では、精製タグはイントロンタグである。いくつかの実施形態では、精製タグは5'イントロンタグである。いくつかの実施形態では、精製タグは3'イントロンタグである。

【0473】

本発明の構築物又は方法によって産生される環状RNAは、精製され得る。例えば、精製手段は、酵素処理；クロマトグラフィー（アフィニティーカラムクロマトグラフィー、逆相シリカゲルカラム液体クロマトグラフィー、及びゲル排除液体クロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない）；並びに電気泳動（アガロースゲル電気泳動等のゲル電気泳動、及びキャピラリー電気泳動が挙げられるが、これらに限定されない）からなる群のうちの1つ以上から選択される。

20

【0474】

環状RNA産物で細胞をトランスフェクトする前に、非環状化線状RNA、dsRNA、及び他の望まない成分は、好ましくは、精製プロセスによって可能な限り除去される。線状RNA及びいくつかのdsRNAの両末端のリン酸基は、RIG-1シグナル伝達経路を活性化し、細胞において強い免疫応答を引き起こし、外因性RNAの分解をもたらす。細胞における環状RNAの機能に影響を及ぼす。線状RNAを除去する方法は、RNase Rによる処理等の酵素処理；及び高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等のクロマトグラフィーを含む。末端リン酸基を除去する方法は、仔ウシ腸アルカリホスファターゼ（CIP）等のアルカリホスファターゼの投与及び送達による処理を含む。

30

本発明の構築物又は方法によって産生される環状RNAは、種々の送達系のいずれかを使用して細胞又は動物に送達され得る。例えば、送達系は、リポソーム、ポリエチレンイミン（PEI）、金属有機構造体（MOF）、脂質ナノ粒子（LNP）、ポリカチオン、血液糖タンパク質、赤血球輸送ビヒクル、Auナノ粒子（AuNP）ビヒクル、磁性ナノ粒子ビヒクル、カーボンナノチューブ、グラフェン分子ビヒクル、量子ドット材料ビヒクル、アップコンバージョンナノ粒子、層状複水酸化物材料ビヒクル、シリカナノ粒子、及びリン酸カルシウムの群のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、環状RNAは、例えばリポフェクション又はエレクトロポレーションを用いて細胞にトランスフェクトすることができる。

40

6.6.2. 標的細胞

【0475】

いくつかの実施形態では、標的細胞は、対象となるタンパク質又は酵素が欠損している。例えば、核酸を肝細胞に送達することが望まれる場合、肝細胞が標的細胞を表す。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、差別的に標的細胞をトランスフェクトする（すなわち、非標的細胞をトランスフェクトしない）。本開示の組成物はまた、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉細胞、神経細胞（例えば、髄膜、星状細胞、運動ニューロン、後根神経節の細胞及び脊髄前角運動ニューロン）、光受容体細胞（例えば、桿体及び錐体）、網膜色素上皮細胞、分泌細胞、心臓細胞、脂肪細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、β細胞、下垂体細胞、滑膜表層細

50

胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、B細胞、T細胞、樹状細胞、マクロファージ、網状赤血球、白血球、顆粒球及び腫瘍細胞、NK細胞、肝スターレット細胞、HEK293、HEK293T、HeLa、MCF7、PC3、A549、NCI-H727、HCT-116、MCF10A、HPRC、FHC並びに他の不死化細胞株及び初代細胞株を含むがこれらに限定されない、種々の標的細胞を優先的に標的化するように調製され得、及び／又はこれらにおいて発現され得る。

【0476】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物はまた、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を含むがこれらに限定されない、種々の酵母細胞に対して最適化され得る。

10

【0477】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物はまた、大腸菌 (*Escherichia coli*) を含むがこれらに限定されない、種々の細菌細胞に対して最適化され得る。

【0478】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物はまた、ヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) sf9、Mimics sf9、sf21、ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2 を含むがこれらに限定されない、種々の昆虫細胞に対して最適化され得る。

【0479】

本開示の組成物は、心臓、肺、腎臓、肝臓、及び脾臓等の標的細胞に優先的に分布し、及び／又は最適化されるように調製されてもよい。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、肝臓の細胞に分布して、肝臓の細胞（例えば、肝細胞）による、その中に含まれるcircRNAの送達及びその後の発現を容易にする。標的細胞は、機能的タンパク質又は酵素を産生し、全身的に排出することができる生物学的「リザーバー」又は「デポ」として機能し得る。それにしたがって、本開示の一実施形態では、移入ビヒクルは、肝細胞を標的とすることができ、及び／又は送達時に肝臓の細胞に優先的に分布することができる。一実施形態では、標的肝細胞のトランスフェクション後、ビヒクル中にロードされたcircRNAは翻訳され、機能的タンパク質産物が産生され、排出され、全身に分布する。他の実施形態では、肝細胞以外の細胞（例えば、肺、脾臓、心臓、眼、又は中枢神経系の細胞）は、タンパク質産生のための貯蔵場所として機能し得る。

20

【0480】

一実施形態では、本開示の組成物は、1つ以上の機能的タンパク質及び／又は酵素の、対象の内因性産生を促進する。本開示の実施形態では、移入ビヒクルは、欠損タンパク質又は酵素をコードするcircRNAを含む。そのような組成物の標的組織への分布及びその後のそのような標的細胞のトランスフェクションの際に、移入ビヒクル（例えば、脂質ナノ粒子）にロードされた外因性circRNAは、インビボで翻訳されて、外因的に投与されたcircRNAによってコードされる機能的タンパク質又は酵素（例えば、対象が欠損しているタンパク質又は酵素）を産生し得る。それにしたがって、本開示の組成物は、外因的又は組換え的に調製されたcircRNAを翻訳して内因性翻訳されたタンパク質又は酵素を産生し、それによって機能性タンパク質又は酵素を産生する（及び適用可能な場合にはそれを排出する）対象の能力を利用する。発現又は翻訳されたタンパク質又は酵素はまた、組換え的に調製されたタンパク質又は酵素に多くの場合存在し得ない天然の翻訳後改変をインビボで含むことによって特徴付けられ得、それによって翻訳されたタンパク質又は酵素の免疫原性を更に減少させる。

30

40

【0481】

欠損タンパク質又は酵素をコードするcircRNAの投与は、標的細胞内の特定の細胞小器官に核酸を送達する必要性を回避する。むしろ、標的細胞のトランスフェクション及び標的細胞の細胞質への核酸の送達の際に、移入ビヒクルのcircRNA内容物が翻訳され、機能的タンパク質又は酵素が発現され得る。

【0482】

いくつかの実施形態では、環状RNAは、1つ以上のmiRNA結合部位を含む。いく

50

つかの実施形態では、環状RNAは、1つ以上の非標的細胞又は非標的細胞型（例えば、クッパー細胞）中に存在し、1つ以上の標的細胞又は標的細胞型（例えば、肝細胞）中に存在しないmiRNAによって認識される、1つ以上のmiRNA結合部位を含む。いくつかの実施形態では、環状RNAは、1つ以上の標的細胞又は標的細胞型（例えば、肝細胞）と比較して、1つ以上の非標的細胞又は非標的細胞型（例えば、クッパー細胞）において増加した濃度で存在するmiRNAによって認識される1つ以上のmiRNA結合部位を含む。miRNAは、RNA分子内の相補的配列と対合することによって機能し、遺伝子サイレンシングをもたらすと考えられる。

【0483】

6.6.3. 医薬組成物／投与

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される治療剤を含む組成物（例えば、医薬組成物）が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、治療剤は、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、治療剤は、本明細書で提供されるベクターである。いくつかの実施形態では、治療剤は、本明細書において提供される環状RNA又はベクターを含む細胞である。いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体を更に含む。いくつかの実施形態は、本明細書で提供される組成物は、他の薬学的に活性な薬剤又は薬物と組み合わせて本明細書で提供される治療剤を含む。好ましい実施形態では、医薬組成物は、本明細書で提供される細胞又はその集団を含む。

【0484】

医薬組成物に関して、薬学的に許容される担体は、従来使用された担体のいずれかであり得、物理化学的考慮（例えば、可溶性及び活性薬剤との反応性の欠如）によって、及び投与経路によってのみ制限される。本明細書に記載される薬学的に許容される担体（例えば、ビヒクル、アジュバント、賦形剤、及び希釈剤）は、当業者に周知であり、公けに容易に入手可能である。薬学的に許容される担体は、治療剤に対して化学的に不活性であり、使用条件下で有害な副作用又は毒性を有していないものであることが好ましい。

【0485】

担体の選択は、部分的に、特定の治療剤によって、並びに治療剤を投与するために使用される特定の方法によって決定される。したがって、本明細書で提供される医薬組成物の様々な適切な製剤が存在する。

【0486】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は防腐剤を含む。いくつかの実施形態では、適切な防腐剤としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム及び塩化ベンザルコニウムが挙げられ得る。任意に、2種以上の防腐剤の混合物を使用してもよい。防腐剤又はその混合物は、典型的には、全組成物の約0.0001重量%～約2重量%の量で存在する。

【0487】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、緩衝剤を更に含む。いくつかの実施形態では、適切な緩衝剤は、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、並びに種々の他の酸及び塩を含み得る。任意に、2種以上の緩衝剤の混合物を使用してもよい。緩衝剤又はその混合物は、典型的には、全組成物の約0.001重量%～約4重量%の量で存在する。

【0488】

いくつかの実施形態では、医薬組成物中の治療剤の濃度は、例えば、約1重量%未満、又は少なくとも約1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%、45重量%、若しくは約50重量%以上で変動し得、選択される特定の投与様式に従って、主に流体体積及び粘度によって選択され得る。

【0489】

経口、エアロゾル、非経口（例えば、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、

10

20

30

40

50

及び髄腔内)、並びに局所投与のための以下の製剤は、単に例示的であり、決して限定するものではない。2つ以上の経路を使用して、本明細書で提供される治療剤を投与することができ、場合によっては、特定の経路は、別の経路よりも迅速かつ効果的な応答を提供することができる。

【0490】

経口投与に適した製剤は、(a) 水、生理食塩水、又はオレンジジュース等の希釈剤に溶解された有効量の治療剤等の液体溶液；(b) カプセル剤、サシェ、錠剤、ロゼンジ剤及びトローチ剤であって、固形又は顆粒剤として所定量の有効成分を含有するもの；(c) 散剤；(d) 適切な液体中の懸濁液；及び(e) 適切なエマルジョンを含み得るか、又はそれらからなり得る。液体製剤は、希釈剤例えば、水及びアルコール、例えば、エタノール、ベンジルアルコール及びポリエチレンアルコールを、薬学的に許容される界面活性剤の添加を伴うか又は伴わないかのいずれかで含み得る。カプセル形態は、例えば、界面活性剤、滑沢剤、並びにラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、及びコーンスターチ等の不活性充填剤を含有する通常のハード又はソフトシェルゼラチンタイプのものであり得る。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸、微結晶性セルロース、アカシア、ゼラチン、グアーガム、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、崩壊剤、湿潤剤、防腐剤、香味剤、及び他の薬理学的に適合する賦形剤のうちの1つ以上を含むことができる。ロゼンジ形態は、香味剤、通常スクロース、アカシア又はトラガカントと共に治療剤を含むことができる。パステルは、当該技術分野で公知のような賦形剤に加えて、ゼラチン及びグリセリン等の不活性ベース、又は、スクロース及びアカシア、エマルジョン、ゲル等を含む、治療剤を含むことができる。

10

20

【0491】

非経口投与に適した製剤には、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含有することができる水性及び非水性等張滅菌注射液、並びに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、及び防腐剤を含むことができる水性及び非水性滅菌懸濁液が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書において提供される治療剤は、薬学的担体中の生理学的に許容される希釈剤、例えば滅菌液体又は液体の混合物中で、例えば、水、生理食塩水、水性デキストロース及び関連糖溶液、アルコール、例えばエタノール若しくはヘキサデシルアルコール、グリコール、例えばプロピレングリコール若しくはポリエチレングリコール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、ケタール、例えば2, 2-ジメチル1, 3-ジオキソラン-4-メタノール、エーテル、ポリ(エチレングリコール) 400、油、脂肪酸、脂肪酸エステル若しくはグリセリド、又はアセチル化脂肪酸グリセリド中で、薬学的に許容される界面活性剤、例えば石鹸若しくは洗剤、懸濁化剤、例えばペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース若しくはカルボキシメチルセルロース、又は乳化剤及び他の薬学的アジュバントを添加して又は添加せずに投与することができる。

30

【0492】

いくつかの実施形態では非経口製剤に使用することができる油としては、石油、動物油、植物油、又は合成油が挙げられる。油の具体例としては、ピーナッツ油、ダイズ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油、オリーブ油、ワセリン、及び鉱油が挙げられる。非経口製剤での使用に適した脂肪酸としては、オレイン酸、ステアリン酸、及びイソステアリン酸が挙げられる。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルは、適切な脂肪酸エステルの例である。

40

【0493】

非経口製剤のいくつかの実施形態における使用に好適な石鹸としては、脂肪アルカリ金属、アンモニウム、及びトリエタノールアミン塩が挙げられ、好適な洗浄剤としては、(a) 例えば、ジメチルジアルキルアンモニウムハライド及びアルキルピリジニウムハライド等のカチオン性洗浄剤、(b) 例えば、アルキル、アリール、及びオレフィンスルホネ

50

ート、アルキル、オレフィン、エーテル、及びモノグリセリドスルフェート、及びスルホスクシネート等のアニオン性洗浄剤、(c)例えば、脂肪アミノオキシド、脂肪酸アルカノールアミド、及びポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー等の非イオン性洗浄剤、(d)例えば、アルキル β -アミノプロピオネート、及び2-アルキル-イミダゾリン四級アンモニウム塩等の両性洗浄剤、並びに(e)それらの混合物が挙げられる。

【0494】

いくつかの実施形態では、非経口製剤は、例えば、溶液中に約0.5重量%～約25重量%の治療剤を含有する。防腐剤及び緩衝液を使用してもよい。注射部位での刺激を最小化又は排除するために、このような組成物は、例えば、約12～約17の親水性親油性バランス(HLB)を有する1つ以上の非イオン性界面活性剤を含有し得る。そのような製剤中の界面活性剤の量は、典型的には、例えば、約5重量%～約15重量%の範囲である。適切な界面活性剤としては、ポリエチレングリコール、ソルビタン脂肪酸エステル(例えば、ソルビタンモノオレート)、及びプロピレンオキシドとプロピレングリコールとの縮合によって形成される疎水性塩基とエチレンオキシドとの高分子量付加物が挙げられる。非経口製剤は、アンプル又はバイアル等の単位用量又は複数用量の密封容器に提供することができ、使用直前に注射用の滅菌液体賦形剤、例えば水の添加のみを必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存することができる。即時注射溶液及び懸濁液は、前述した種類の滅菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製することができる。

10

【0495】

いくつかの実施形態では、注射用製剤が本明細書に提供される。注射可能な組成物のための有効な薬学的担体の要件は、当業者に周知である(例えば、Pharmaceuticals and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), and ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed, pages 622-630 (1986)を参照されたい)。

20

【0496】

いくつかの実施形態では、局所製剤が本明細書に提供される。経皮薬物放出に有用なものを含む局所製剤は、本明細書で提供されるある特定の実施形態の文脈において、皮膚への適用に適している。いくつかの実施形態では、治療剤は、単独で、又は他の適切な成分と組み合わせて、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤に作製され得る。これらのエアロゾル製剤は、加圧された許容される噴射剤(例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等)中に配置され得る。それらはまた、ネブライザー又はアトマイザー等の非加圧調製物のための医薬品として製剤化されてもよい。このようなスプレー製剤はまた、粘膜にスプレーするために使用され得る。

30

【0497】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される治療剤は、シクロデキストリン包接複合体等の包接複合体、又はリポソームとして製剤化することができる。リポソームは、治療剤を特定の組織に標的化するのに役立ち得る。リポソームはまた、治療剤の半減期を増加させるために使用され得る。多くの方法が、例えば、Szoka et al, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980)並びに米国特許第4,235,871号、第4,501,728号、第4,837,028号、及び第5,019,369号に記載されているように、リポソームを調製するのに利用可能である。

40

【0498】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される治療剤は、組成物の送達、治療される部位の感作の前に、及びそれを引き起こすのに十分な時間で行われるように、時間放出送達系、遅延放出送達系又は持続放出送達系で製剤化される。そのような系は、治療剤の反復投与を回避することができ、それによって、対象及び医師に対する利便性を増加させ、本明細書に提供されるある特定の組成物実施形態に特に好適であり得る。一実施形態では、本開示の組成物は、その中に含有されるcircRNAの持続放出に好適であるよう

50

に製剤化される。そのような持続放出組成物は、広い投与間隔で対象に都合よく投与することができる。例えば、一実施形態では、本開示の組成物は、1日2回、毎日、又は1日おきに対象に投与される。一実施形態では、本開示の組成物は、週2回、週1回、10日毎、2週間毎、3週間毎、4週間毎、月1回、6週間毎、8週間毎、3カ月毎、4カ月毎、6カ月毎、8カ月毎、9カ月毎、又は年1回、対象に投与される。

【0499】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、持続した時間にわたって標的細胞によって産生される。例えば、タンパク質は、投与後1時間超、4時間超、6時間超、12時間超、24時間超、48時間超、又は72時間超にわたって産生され得る。いくつかの実施形態では、治療用産物は、投与の約6時間後にピークレベルで発現される。いくつかの実施形態では、治療用産物の発現は、少なくとも治療レベルで持続される。いくつかの実施形態では、治療用産物は、投与後1時間超、4時間超、6時間超、12時間超、24時間超、48時間超、又は72時間超にわたって少なくとも治療レベルで発現される。いくつかの実施形態では、治療用産物は、患者の血清又は組織（例えば、肝臓又は肺）において治療レベルで検出可能である。いくつかの実施形態では、検出可能な治療用産物のレベルは、投与後1時間超、4時間超、6時間超、12時間超、24時間超、48時間超、又は72時間超の期間にわたる *circRNA* 組成物からの連続的発現によるものである。

【0500】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、正常な生理学的レベルを超えるレベルで産生される。タンパク質のレベルは、対照と比較して増加し得る。いくつかの実施形態では、対照は、正常な個体又は正常な個体の集団における治療用産物のベースライン生理学的レベルである。他の実施形態では、対照は、関連タンパク質若しくはポリペプチドが欠損している個体、又は関連タンパク質若しくはポリペプチドが欠損している個体の集団における治療用産物のベースライン生理学的レベルである。いくつかの実施形態では、対照は、組成物が投与される個体における関連タンパク質又はポリペプチドの正常レベルであり得る。他の実施形態では、対照は、1つ以上の比較可能な時点での、他の治療的介入時、例えば、対応する治療用産物の直接注射時の治療用産物の発現レベルである。

【0501】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質のレベルは、投与後3日目、4日目、5日目、又は1週間目又はそれ以上で検出可能である。分泌タンパク質のレベルの増加は、血清中及び／又は組織（例えば、肝臓又は肺）中で観察され得る。

【0502】

いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の持続的循環半減期をもたらす。例えば、タンパク質は、タンパク質又はタンパク質をコードする *mRNA* の皮下注射を介して観察される半減期よりも数時間又は数日間長く検出され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質の半減期は、1日、2日、3日、4日、5日、又は1週間以上である。

【0503】

多くのタイプの放出送達系が利用可能であり、当業者に公知である。それらには、ポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシブチル酸、及びポリ無水物等のポリマーベースの系が含まれる。薬物を含む前述のポリマーのマイクロカプセルは、例えば、米国特許第5,075,109号に記載されている。送達系はまた、コレステロール、コレステロールエステル等のステロール、及び脂肪酸又はモノグリセリド、ジグリセリド及びトリグリセリド等の中性脂肪；ヒドロゲル放出系；シラスティック系；ペプチドベースの系；ワックスコーティング；従来の結合剤及び賦形剤を使用する圧縮錠剤；部分的に融合された移植体等を含む脂質である非ポリマー系を含む。具体例としては、限定されるもの

ではないが、(a) 米国特許第 4, 452, 775 号、第 4, 667, 014 号、第 4, 748, 034 号、及び第 5, 239, 660 号に記載されているものなどのマトリック内的形態で活性組成物が含有されている侵食系、並びに (b) 米国特許第 3, 832, 253 号及び第 3, 854, 480 号に記載されているものなどのポリマーから制御された速度で活性成分が浸透する拡散系が挙げられる。更に、ポンプベースのハードウェア送達システムが使用され得、そのいくつかは、移植のために適合される。

【0504】

いくつかの実施形態では、治療剤は、標的化部分への連結部分を介して、直接的又は間接的のいずれかでコンジュゲートされ得る。治療剤を標的化部分にコンジュゲートするための方法は、当該技術分野で公知である。例えば、Wadwa et al., J. Drug Targeting 3:111 (1995) 及び米国特許第 5, 087, 616 号を参照されたい。

10

【0505】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される治療剤は、治療剤が投与される体内に放出される様式が時間及び体内の位置に関して制御されるように、デポー形態に製剤化される (例えば、米国特許第 4, 450, 150 号を参照されたい)。治療剤のデポー形態は、例えば、治療剤及び多孔性又は非多孔性材料 (例えば、ポリマー) を含む移植可能な組成物であり得、治療剤は、材料及び／又は非多孔性材料の分解によって封入されるか、又はその全体にわたって拡散される。次いで、デポーを体内の所望の位置に埋め込み、治療剤を所定の速度で移植植物から放出させる。

20

【0506】

6.6.4. 使用

本発明の構築物又は方法によって産生される環状 RNA は、種々の標的配列に応じて、種々の目的のために使用され得る。例えば、標的配列がタンパク質コード配列を含むか又はそれからなる場合、得られた環状 RNA は、タンパク質発現のために使用され得る。本発明の環状 RNA はまた、miRNA 活性の調節、RNA 結合タンパク質の結合の中和、及びアプタマーの発現等の様々な機能のために使用することができる。

【0507】

7. アッセイ

種々の IRES 様配列バリエント、内因性 IRES 配列バリエント、又はそれらの組み合わせを、真核生物リボソーム翻訳開始複合体を誘引する及び／又は翻訳開始を促進するそれらの能力について試験することができる。以下のアッセイは、IRES 様配列について記載されるが、内因性 IRES 配列、IRES 様配列と内因性 IRES 配列との組み合わせ、1つ以上の IRES 様配列又は内因性 IRES 配列を含む配列について同様に実施され得る。

30

【0508】

7.1. グループ I イントロンの二次構造及び分割部位の決定

ステムループ構造は、RNA 二次構造の一種であり、任意の適切なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定することができる。いくつかのプログラムは、最小ギブス自由エネルギーの計算に基づいている。1つのそのようなアルゴリズムの例は、mFold であり、Zuker and Stiegler (Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133-148) で記載されている。別の例示的なフォールディングアルゴリズムは、重心構造予測アルゴリズムを使用して Institute for Theoretical Chemistry (University of Vienna) によって開発されたオンラインウェブサーバ RNAfold である (例えば、AR Gruber et al., 2008, Cell 106)。 (1): 23-24; and PA Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27 (12): 1151-62)。追加のアルゴリズムは、米国仮特許出願第 61/836, 080 号 (代理人整理番号第 44790.11.2022; 参照番号 BI-2013/004A) に見出すことができ、これは参照により

40

50

本明細書に組み込まれる。グループ I イントロンは、主に、ドメイン 1～6 (D1～D6) と呼ばれる 6 つのステムループ構造を含み、6 つのドメインは、EBS1、EBS2、及び EBS3 等の複数のエクソン結合配列 (EBS) を含む配列に配置される。これらの EBS 配列は、エクソン領域中のイントロン結合配列 (IBS) と相補的対等で相互作用し、EBS 核酸配列内のそれら自身のヒドロキシル基によってスプライシングを誘発する。グループ I イントロンの二次構造の例示的な構造を図 9 に示す。一実施形態では、グループ I イントロンは、オンライン予測ツール又は予測ソフトウェアを使用して同定される。このようなオンライン予測ツールの一例は、オンラインウェブサーバ「<http://webapps2.ucalgary.ca/>」であり、Zimmerly Lab, University of Calgary によって作成されている。

10

【0509】

一実施形態では、自己触媒的自己スプライシンググループ I イントロンは、D1 ドメインで 2 つの断片に分割され、標的配列は、分割されたイントロン断片の間に挿入される。一実施形態では、自己触媒的自己スプライシンググループ I イントロンは、D2 ドメインで 2 つの断片に分割され、標的配列は、分割されたイントロン断片の間に挿入される。一実施形態では、自己触媒的自己スプライシンググループ I イントロンは、D3 ドメインで 2 つの断片に分割され、標的配列は、分割されたイントロン断片の間に挿入される。

【0510】

好ましい実施形態では、自己触媒的自己スプライシンググループ I イントロンは、D4 ドメインで 2 つの断片に分割され、標的配列は、図 12 に示されるように、分割されたイントロン断片の間に挿入される。

20

【0511】

一実施形態では、自己触媒的自己スプライシンググループ I イントロンは、D5 ドメインで 2 つの断片に分割され、標的配列は、分割されたイントロン断片の間に挿入される。一実施形態では、自己触媒的自己スプライシンググループ I イントロンは、D6 ドメインで 2 つの断片に分割され、標的配列は、分割されたイントロン断片の間に挿入される。

【0512】

a. インビトロでの circRNA 産生

前駆体 RNA は、インビトロ転写によって産生され、次いで cRNAzyme 系を介して環状化される。

30

【0513】

本明細書で提供されるベクターは、分子生物学の標準的な技術を使用して作製することができる。例えば、本明細書で提供されるベクターの様々な要素は、細胞から cDNA 及びゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、又はそれを含むことが既知であるベクターからポリヌクレオチドを誘導することによって等、組換え方法を使用して得ることができる。

【0514】

本明細書で提供されるベクターの種々の要素はまた、既知の配列に基づいて、クローニングではなく、合成的に産生され得る。完全な配列は、標準的な方法によって調製された重複オリゴヌクレオチドからアセンブルされ得、また完全な配列にアセンブルされ得る。例えば、Edge, Nature (1981) 292: 756; Nambair et al, Science (1984) 223: 1299; and Jay et al, J. Biol. Chem. (1984) 259: 6311 を参照されたい。

40

【0515】

従って、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を保有するベクターから得られ得るか、又は当該技術分野で公知の種々のオリゴヌクレオチド合成技術（例えば、適宜、部位指向変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術）を使用して、完全に若しくは部分的に合成され得る。所望のベクター要素をコードするヌクレオチド配列を得る 1 つの方法

50

は、従来の自動化ポリヌクレオチド合成機において産生された重複合成オリゴヌクレオチドの相補的セットをアニーリングし、続いて適切なDNAリガーゼを用いてライゲーションし、ライゲーションされたヌクレオチド配列を、PCRを介して増幅することによる。例えば、Jayaraman et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:4084-4088を参照されたい。更に、オリゴヌクレオチド指向合成 (Jones et al, Nature (1986) 54:75-82)、既存のヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド指向変異誘発 (Riechmann et al, Nature (1988) 332:323-327 and Verhoeyen et al., Science (1988) 239:1534-1536)、及びT4 DNAポリメラーゼを使用したギャップオリゴヌクレオチドの酵素的充填 (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:10029-10033)を使用することができる。

10

【0516】

本明細書で提供される前駆体RNAは、ベクターによってコードされる前駆体RNAの転写を許容する条件下で、本明細書で提供されるベクターをインキュベートすることによって生成することができる。例えば、いくつかの実施形態では、前駆体RNAは、その5'二本鎖形成領域及び／又は発現配列の上流にRNAポリメラーゼプロモーターを含む本明細書で提供されるベクターを、インビトロ転写を許容する条件下で適合性RNAポリメラーゼ酵素と共にインキュベートすることによって合成される。いくつかの実施形態では、ベクターは、バクテリオファージRNAポリメラーゼによって細胞内部で、又は宿主RNAポリメラーゼPによって細胞の核内でインキュベートされる。

20

【0517】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるベクターを鋳型（例えば、5'相同領域の上流に配置されたRNAポリメラーゼプロモーターを有する本明細書で提供されるベクター）として使用して、インビトロ転写を行うことによって前駆体RNAを生成する方法が本明細書に提供される。

【0518】

いくつかの実施形態では、得られた前駆体RNAを使用して、環状RNA（例えば、本明細書で提供される環状RNAポリヌクレオチド）を生成することができる。

【0519】

したがって、いくつかの実施形態では、環状RNAを作製する方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に提供されるベクターを鋳型として用いて転写（例えば、ランオフ転写）によって前駆体RNAを合成することと、得られた前駆体RNAを環状化に適した条件下でインキュベートして環状RNAを形成することとを含む。

30

【0520】

いくつかの実施形態では、環状RNAを含む組成物は精製されている。環状RNAは、カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、及びサイズ排除クロマトグラフィー等の当該技術分野で一般的に使用される任意の公知の方法によって精製することができる。いくつかの実施形態では、精製は、以下の工程のうちの1つ以上を含む：ホスファターゼ処理、HPLCサイズ排除精製、及びRNase R消化。いくつかの実施形態では、精製は、以下の工程を順に含む：RNase R消化、ホスファターゼ処理、及びHPLCサイズ排除精製。いくつかの実施形態では、精製は、逆相HPLCを含む。いくつかの実施形態では、精製された組成物は、未精製のRNAよりも少ない二本鎖RNA、DNAスプリント、三リン酸化RNA、ホスファターゼタンパク質、タンパク質リガーゼ、キャッピング酵素及び／又はニックRNAを含有する。

40

【0521】

7.2. 治療用産物の発現レベル及び／又は活性の評価

ポリペプチド、タンパク質、抗体、又は酵素等の治療用産物のレベルは、当該技術分野で公知の、又は本明細書に記載の任意の方法によって決定することができる。例えば、組

50

組織試料中のポリペプチド、タンパク質、抗体、又は酵素等の治療用産物のレベルは、例えば、ノーザンブロッティング、PCR分析、リアルタイムPCR分析、又は当該技術分野で公知若しくは本明細書に記載の任意の他の技術を使用して、試料中のタンパク質の転写されたRNAを評価（例えば、定量）することによって決定することができる。一実施形態では、組織試料中のポリペプチド、タンパク質、抗体、又は酵素等の治療用産物のレベルは、試料中のタンパク質のmRNAを評価する（例えば、定量化する）ことによって決定することができる。組織試料中のポリペプチド、タンパク質、抗体、又は酵素等の治療用産物のレベルはまた、例えば、免疫組織化学的分析、ウェスタンブロッティング、ELISA、免疫沈降、フローサイトメトリー分析、又は当該技術分野で公知若しくは本明細書に記載の任意の他の技術を使用して、試料中の治療用産物のポリペプチド又はタンパク質発現のレベルを評価する（例えば、定量化する）ことによって決定することもできる。特定の実施形態では、タンパク質のレベルは、患者の組織試料中（例えば、ヒト血清中）に存在する治療用産物の量を定量化することができる方法、及び／又はcircRNA若しくはcircRNAを含む製剤による治療後のタンパク質のレベルの補正を検出することができる方法によって決定される。

10

【0522】

7.3. スクリーニングアッセイ

種々のIRES様配列バリエント、内因性IRES配列バリエント、又はそれらの組み合わせを、真核生物リボソーム翻訳開始複合体を誘引する及び／又は翻訳開始を促進するそれらの能力について試験することができる。以下のアッセイは、IRES様配列について記載されるが、内因性IRES配列、IRES様配列と内因性IRES配列との組み合わせ、1つ以上のIRES様配列又は内因性IRES配列を含む配列について同様に実施され得る。

20

【0523】

7.3.1. 発現レベル

例えば、本明細書に開示されるIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエント、又はそれらの組み合わせの、治療用産物の発現レベルに対する効果を評価することができる。いくつかの実施形態では、効果は、無細胞系における、本明細書に開示されるIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエント、又はそれらの組み合わせを含むRNAポリヌクレオチド又は環状RNAのインビトロ翻訳を介して評価され得る。いくつかの実施形態では、効果は、本明細書に開示されるIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエント、又はそれらの組み合わせを含むRNAポリヌクレオチド又は環状RNAによる細胞のトランスフェクション／形質転換、及びRNAポリヌクレオチド又は環状RNAの発現を介して評価され得る。治療用産物の発現レベルは、当該技術分野で公知の及び／又は本明細書に記載の任意の方法、例えば、免疫組織化学的分析、ウェスタンブロッティング、ELISA、免疫沈降、及びフローサイトメトリー分析に従って評価することができる。

30

【0524】

いくつかの実施形態では、治療用産物（例えば、蛍光タンパク質又はルシフェラーゼ等の発現マーカー）の発現レベルに対するそれらの効果に基づいて同定されたIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそれらのバリエント、又はそれらの組み合わせを、インビトロでの治療用産物発現を促進、容易化、又は調節（例えば、増加又は減少）するそれらの能力について更に評価することができる。いくつかの実施形態では、IRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエント、又はそれらの組み合わせは、動物モデルにおいて、インビボでの治療用産物発現を促進、容易化、又は調節（例えば、増加又は減少）するそれらの能力について更に評価され得る。いくつかの実施形態では、IRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエント、又はそれらの組み合わせは、動物モデルにおいて、特定の組織又は器官における治療用産物の発現を促進する、容易にする、又は調節する（例えば、増加又は減少させる）それらの能力について更に評価され得る。

40

【0525】

50

様々なアッセイ又は方法の非限定的な説明例を以下に提供する。

【0526】

インビトロトランスフェクション及び翻訳

【0527】

リポフェクタミン3000 (Invitrogen)等のトランスフェクション剤を使用して、望ましい量の環状RNAを細胞(例えば、原核細胞又は真核細胞)にトランスフェクトすることができる。望ましい量の環状RNAのインビトロ翻訳は、無細胞溶解物中で行われ得る。細胞溶解物を収集して、インキュベーション後のタンパク質発現を分析することができる。

【0528】

ウェスタンブロット

【0529】

本明細書に記載の方法又は技術に従って、本開示のIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエーション、又はそれらの組み合わせを含むRNAポリヌクレオチド又は環状RNAでトランスフェクトされた細胞は、溶解され得る。全細胞溶解物を、例えば、4〜20% Express Plus (商標) PAGEゲル (GeneScript (登録商標))等を用いた電気泳動によって分離する。タンパク質を膜(例えば、PVDF膜)に移して、タンパク質に対する抗体でプローブする。一次抗体に結合する二次抗体を使用して、検出のために膜を染色することができる。既知のGtx、Rsv、CrPV、PSIV、又はTSV IRES等の陽性対照を使用することができる。

【0530】

ルシフェラーゼアッセイ

【0531】

本明細書に記載の方法又は技術に従って、本開示のIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエーション、又はそれらの組み合わせを含むRNAポリヌクレオチド又は環状RNAでトランスフェクトされた細胞は、溶解され得る。発光シグナルを生成するために、Promega (商標)製の二重ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム等のルシフェラーゼレポーターアッセイを使用する。発光は、例えば、Bio-Tek synergy H1によって測定される。

【0532】

フローサイトメトリー

【0533】

本明細書に記載される方法又は技術に従って、本開示のIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエーション、又はそれらの組み合わせを含むRNAポリヌクレオチド又は環状RNAでトランスフェクトされた細胞は、例えば、BD FACSAria IIを使用することによって、フローサイトメトリーのために収集される。シングレットを選択するために、SSC-A対FSC-Aを使用して293T細胞を選択することができる。シングレットの2ラウンドの選択を、SSC-W対FSC-H及びFSC-W対FSC-Hによって使用することができる。FITC-A対FSC-Aは、GFP陽性細胞を選択するために使用され得、発現レベルは、蛍光のレベルによって決定され得る。

【0534】

ELISA

【0535】

ELISAは、Bull World Health Organ. 54(2):129-39(1976)(PMID:798633)に従って行うことができる。

【0536】

任意に、治療用産物は、他の化合物で誘導体化され得、化合物の単離を容易にする誘導体化基を有し得る。誘導体化基の非限定的な例としては、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、緑色蛍光タンパク質、同位体、ポリヒスチジン、磁性ビーズ、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、光活性化可能な架橋剤、又はこれらの任意の組み合

10

20

30

40

50

わせが挙げられる。任意に、治療用産物の発現レベルは、誘導体化基のレベルを測定することによって評価され得る。

【0537】

7.3.2. 生物学的活性

本明細書に開示されるIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエーション、又はそれらの組み合わせの生物学的活性又は機能は、当該技術分野で公知の及び／又は本明細書に記載される任意の方法、例えば、インビボイメージング及びPETに従って評価され得る。例えば、生物学的活性は、腫瘍増殖の阻害を含み得、細胞株由来異種移植片（CDX）及び患者由来異種移植片（PDX）モデル等の動物モデルにおいて評価され得る。

10

【0538】

様々なアッセイ又は方法の非限定的な説明例を以下に提供する。

【0539】

インビボイメージング

【0540】

インビボ発現の検出のために、6～8週齢の雌BALB/cマウスを、本開示のIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエーション、又はそれらの組み合わせを含むRNAポリヌクレオチド又は環状RNA（例えば、ルシフェラーゼをコードする環状RNA）の投与のために使用することができる。投与は、筋肉内（i.m.）、皮下（s.c.）、又は鼻腔内（i.n.）経路を介してもよい。投与後のある特定の時点で、動物にルシフェラーゼ基質を腹腔内（i.p.）注射する。蛍光シグナルを、例えば、IVIS Spectrum装置（PerkinElmer）によって集光する。インビトロイメージングのために、動物由来の脳、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、及び筋肉を含む組織を直ちに収集し、各組織の蛍光シグナルを、例えばIVISイメージャによって測定する。対象となる領域（ROI）内の蛍光シグナルは、例えば、Living Image 3.0を使用することによって定量化される。

20

【0541】

PET

【0542】

腫瘍細胞株を用いてマウス腫瘍異種移植片を形成する。PETスキャンは、本開示のIRES様配列、内因性IRES配列若しくはそのバリエーション、又はそれらの組み合わせを含むRNAポリヌクレオチド又は環状RNAを動物に投与する前及び後に行われる。例えば、PETスキャンは、3.7～7.4 MBq投与の1時間後に行うことができる。第2のPETスキャンは、更なる投与後の適切な時点で行うことができる。

30

【0543】

例えば、このアッセイは、生物学的系において発現された治療用産物の競合的結合能力を評価するために使用され得る。

【0544】

例えば、このアッセイは、生物学的系において発現された治療用産物の酵素能力を評価するために使用され得る。

40

【0545】

例えば、このアッセイは、生物学的系において発現された治療用産物の阻害活性を評価するために使用され得る。

【0546】

精製又は半精製タンパク質を用いて誘導され得るものなどの無細胞系において行われるアッセイは、試験化合物によって媒介される分子標的における変化の迅速な発生及び比較的容易な検出を可能にするように作製され得るという点で、多くの場合「一次」スクリーニングとして好ましい。更に、試験化合物の細胞毒性の作用又は生物学的利用能は、インビトロ系では概ね無視することができ、代わりに、アッセイは、分子標的に対する治療用産物の作用に主に焦点を当てている。

50

【 0 5 4 7 】
配 列
【 0 5 4 8 】
【 表 1 - 1 】

表 1 : 配列表第 1 部

配列 番号	名 称	配 列 :
1	グループIIイ ントロンBth	CAAAGGCTTACCTATCACTAGCGCGACACGTTCCCTAAGTGAAAAGCTTAGGC ACTGTGCGAACTCAACAGTTCAGCAGTGAAGTGTCAATTCTAAGAAGTCAAATGA AGGAGTAACGTCTGGAAGGGCTTCCCTTAATCCTCCGACATGCAGGAAAAGTA GGCAAGTACTGAAGTGTGTGAAGCTCGGTGAAGTGGTTGAAGGTTACCGTA AATTAGTATCTCTAATACGAAAGCTATCCAGCGGTGGATGGTGTAAGTATAG ACCGGAGGTCTATAAAACACTCAAGGTTAGGATGCGCGATGAAGTAGAGGCG ATCGCTAGTAAGCGCAGACGAATCCCTGATGGTACGGGTCTATATCGGGAGG GAATCGAAAGGTTCTCTGACACAAAATAAGTGTGCTACTGTGGGTGAGTAAAA CTCTCCTTTATGAAAGCCCATATATCGTTACAGGCGTTATTAAGGTAGCAGG TCATAGGGGAAACCTAAAAGTGTATGTACAGATAAGAATGACGGAACGTGGT AAGCTGCCGACATGGAGGGCTTGTCTCTTTGAAGTGTTCGAAGGAAAGTCA CAATGAGATTAGTTGTGATATAACTTGGTTAACGGCAGTGAAAGTGGTGGC ACAGTACCGATGAAACGTGTAATGAACGTGGAGGGATAGCCACTAGTCGATT GAAGATTGAAGGTTACTATTGGTTAACATGGTTTCAGTAAGACTAAGAGATG TAATGCTCCAAAGTAATAAGGAGGTTACAGCCCATGTTAAAGAAAACCAAGCT AAGACATAACGAATATTATGATACACAAAAAAGTGTATGACAATTTATACTC GAACAGTCTTAACGGTAACAATTTCTTTCAATTGGAACGATGGAACGCCGT TGCCCGGAAACGGGCGGTACGGTGTGGAGTGGGGGAAAAGCTGGAGATAA TCTCAAAGGCTTACCTATCACTATCGCGACACGTTCCCTAAGTGA
2	グループIIイ ントロンCte _original (* 表 1 の脚 注を参照)。	<u>GCCATACaataaaagtcgaaacgttatcctataagtaagaaagttttaaaattttcttacgaaaagg</u> <u>atagaacttaaaagtctactgttctactaaagtaataagtgaaaatcttatttaagcaaacaccaa</u> <u>gtagctttaagttactaagtcacctacacaaagttttatactactatgcaaaaacttgtagagctaggtaaggtc</u> <u>gtaatccgtgaaagtcggatgcggggctccttaaaagattactatggtaaacataagctaataccattaag</u> <u>atgcgatttatgtattttatactgttaaatattttgtgcttggtggtgataaaaacagttaagatgaagt</u> <u>acttaactggttttggaataattggttggttaaaactaaaacattataaatcgtagtggtacctaaggtaat</u> <u>caaaaataggataggtagaatggaacgtttgatgctgtatatgaagaggtttagtagaacctaggaca</u> <u>cataacgggctcagcaggttcatagtatgctatgatactcagccgggaagtcaattaatttgaaataactc</u> <u>tatggttaacataggagaaagataaaactgagtgagccaagggaacctagtcggtaataagaaagtga</u> <u>agttaaaacaaataaagattttagaatttaatttaattgaacgggaatttaattatgataattaaagtta</u> <u>gacggttataaataaaacatttcaaaataaaacatatccaaattcataaatatagctagatcatatcact</u> <u>agtttaaaaataaataaatcatttcaaatctattaagtaaggtattaataccttacttaataagtaatctca</u> <u>ttacataagagaattactagattagcagacagattcataaaaaactatatcaactaggacaatagaaaat</u> <u>atatttatacaacttcattatcgagcgaacgccttatgcatgaaagtcgcacgtagggtgtagaccaa</u> <u>gcgaaatcctatgcatttaggatagtgagggtatAGCAAA</u>
3	グループIIイ ントロンCte _mut	GCAAGACAATAAAAGTTTGACACGTGATCCTATAAGTAAGAAAAGTTTAAAT TTTCTTACGAAAAGGATAGAACTTAAAGTTCTAACTGTTCTACTAAAGTAATA AGTGAAGTCTTATTTAAAGCAAACAACCAAGTAGCTTTAAGTCTAAGTCCCC TACACAAGTTTTATACTACTATGCAAAACTTGTGAAGCTAGGTAAGGTCGTAA TCCGTGAAAGTCGGATGCGGGGCTCCTTAAAGATTACTATGGTAAACATAAG CTAATCCATTAAGATGCGATTTATATGTATTTTATACTGTTAAATATTTTTGTGC TTGTGGCTTGGTATAAAACAGTTAAGATGAAGTACTTAACTGGTTTTGGAATAA TTGGTTGTTAAACTAAAACATTATAAATCGTTAGTGGATACCTAAGGTAATCAA AAATAGGGATAGGTAGAATGGAACGTTTGATGCTGTATATGAAGAGGTTTGTAGT AGAACCTAGGACACATATACGGGCTCAGCAGGTTCTAGTAGCTATGATACTC AGCCGGAAGTCAATTAATTTTGAATACTTCTATGGTAACATAGGAGAAGGAT AAAAGTGAAGTGAAGCAAGGAACCTAGTCGGTAATAGAAAAGTGAAGTTAAA ACAAATATAAGATTTTGAATTAATTTAATTAATGAACGGAATTAATTTAATGA TATTTAAAGTTAGACGGTTATAAATTAACATTTCAAAATTAACCATATCCAA ATTCTAAATATAGCTAGATCATATCACTAGTTTAAAAATAAATAAATCATTTT AAATTACTATTAAGTAAGGTATTAATACCTTACTTAATAGTAATCTCATTACAT AAGAGAATTACTAGATTAGCAGACAGATTCATAAAAACTATATCAACTAGGAC AATGAAAAATATATTTATACACTTCCTATTATCGAGCGAACGCCTTATGCGATG AAAGTCGCACGTAGGGTGTAGACCAAGCGAAATCCTATGCATTTAGGATAGT GAGGTATAGCAAA

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

(表 1 の続き)

配列番号	名称	配列:
4	スパーサー 配列 1	GCAATAGCCGAAAAACAAAAACAAAAAAACAAAAAAACAAAAAAAC AAAACACA
5	スパーサー 配列 2	AAATTATAATAATTATAATA
6	スパーサー 配列 3	ATGAAACCGGCTCGGATTCCGCCCGCGTGCGCCATCCCCTCAGCTAGCAGGT GTGAGCGGCTTTCTGCCCGCAGTCTCTACACAGCTCAGCATCCTGACGCCTC CTCCCCCTTGCAAGGGCGTGAAGCTACTTCAGACTCTGCTGTGACGACTTGGC CGCCAGGCACCGATCCTCCCCGGTGAGAAGGTCCACGAATCTTACTGCAGAC AGATTTGCTCAGCGCG
7	プローブ 1	CTTTCACCTACTCCTACGAGCACCA
8	プローブ 2	GACCATGCTCCCAAGCAAGATCATG
9	Gluc	ATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGCCCTGATCTGCATCGCTGTGGCCGAGGCCA AGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATCGTGGCCGTGGCCAGCAACTT CGCGACCACGGATCTCGATGCTGACCGCGGGAAGTTGCCCGGCAAGAAGCT GCCGCTGGAGGTGCTCAAAGAGATGGAAGCCAATGCCCGGAAAGCTGGCTG CACCAGGGGCTGTCTGATCTGCCTGTCCACATCAAGTGCACGCCCAAGATG AAGAAGTTCATCCCAGGACGCTGCCACACCTACGAAGGCGACAAAGAGTCCG CACAGGGCGGCATAGGCGAGGCGATCGTCGACATTCTGAGATTCTGGGTT CAAGGACTTGGAGCCCATGGAGCAGTTCATCGCACAGGTCGATCTGTGTGTG GACTGCACAACCTGGCTGCCTCAAAGGGCTTGCCAACGTGCAGTGTTCTGACC TGCTCAAGAAGTGGCTGCCGCAACGCTGTGCGACCTTTGCCAGCAAGATCCA GGGCCAGGTGGACAAGATCAAGGGGGCCGGTGGTGAC
10	Rluc1	ATGGCTTCCAAGGTGTACGACCCCGAGCAACGCAACGCATGATCACTGGGC CTCAGTGGTGGGCTCGCTGCAAGCAAATGAACGTGCTGGACTCCTTCATCAA CTACTATGATTCCGAGAAGCACGCCGAGAACGCCGTGATTTTTCTGCATGGTA ACGCTGCCTCCAGCTACCTGTGGAGGCACGTCGTGCCTCACATCGAGCCCGT GGCTAGATGCATCATCCCTGATCTGATCGGAATGGGTAAGTCCGGCAAGAGC GGGAATGGCTCATATCGCCTCCTGGATCACTACAAGTACCTCACCGCTTGGTT CGAGCTGCTGAACCTTCCAAAGAAAATCATCTTTGTGGGCCACGACTGGGGG GCTTGTCTGGCCTTTCACTACTCCTACGAGCACCAAGACAAGATCAAGGCCAT CGTCCATGCTGAGAGTGTCTGTGGACGTGATCGAGTCCTGGGACGAGTGGCCT GACATCGAGGAGGATATCGCCCTGATCAAGAGCGAAGAGGGCGAGAAAATG GTGCTTGAGAATAACTTCTTCGTCGAGACCATGCTCCCAAGCAAGATCATGCG GAAACTGGAGCCTGAGGAGTTCGCTGCCTACCTGGAGCCATTCAAGGAGAAG GGCGAGGTTAGACGGCCTACCCTCTCCTGGCCTCGCGAGATCCCTCTCGTTA AGGGAGGCAAGCCCGACGTCGTCCAGATTGTCCGCAACTACAACGCCTACCT TCGGGCCAGCGACGATCTGCCTAAGATGTTTCATCGAGTCCGACCTGGGTTT TTTTCCAACGCTATTGTGCGAGGGAGCTAAGAAGTTCCTAACACCGAGTTCGT GAAGGTGAAGGGCCTCCACTTCAGCCAGGAGGACGCTCCAGATGAAATGGGT AAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAA

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

(表 1 の続き)

配列 番号	名称	配列:
11	Rluc2	ATGAAACCGGCTCGGATTCCGCCCGCGTGCGCCATCCCCTCAGCTAGCAGGT GTGAGCGGCTTTCTGCCCGCAGTCTCTACACAGCTCAGCATCCTGACGCCTC CTCCCCCTTGCAAGGGGCGTGAAGCTACTTCAGACTCTGCTGTGACGACTTGGC CGCCAGGCACCGATCCTCCCCGGTGAGAAGGTCCACGAATCTTACTGCAGAC AGATTTGCTCAGCGCGATGGCTTCCAAGGTGTACGACCCCGAGCAACGCAAA CGCATGATCACTGGGCCTCAGTGGTGGGCTCGCTGCAAGCAAATGAACGTGC TGGACTCCTTCATCAACTACTATGATTCCGAGAAGCACGCCGAGAACGCCGT GATTTTTCTGCATGGTAACGCTGCCTCCAGCTACCTGTGGAGGCACGTCGTGC CTCACATCGAGCCCGTGGCTAGATGCATCATCCCTGATCTGATCGGAATGGG TAAGTCCGGCAAGAGCGGGAATGGCTCATATCGCCTCCTGGATCACTACAAG TACCTCACCGCTTGGTTTCGAGCTGCTGAACCTTCCAAAGAAAATCATCTTTGT GGGCCACGACTGGGGGGGCTTGTCTGGCCTTTCACTACTCCTACGAGCACCAA GACAAGATCAAGGCCATCGTCCATGCTGAGAGTGTCTGGACGTGATCGAGT CCTGGGACGAGTGGCCTGACATCGAGGAGGATATCGCCCTGATCAAGAGCGA AGAGGGCGAGAAAATGGTGCTTGAGAATAACTTCTTCGTGAGACCATGCTC CCAAGCAAGATCATGCGGAACTGGAGCCTGAGGAGTTCGCTGCCTACCTGG AGCCATTCAAGGAGAAGGGCGAGGTTAGACGGCCTACCTCTCCTGGCCTCG CGAGATCCCTCTCGTTAAGGGAGGCAAGCCCGACGTCGTCCAGATTGTCCGC AACTACAACGCCTACCTTCGGGCCAGCGACGATCTGCCTAAGATGTTTCATCG AGTCCGACCCTGGGTTCTTTTCCAACGCTATTGTGCGAGGGAGCTAAGAAGTTC CCTAACACCGAGTTCGTGAAGGTGAAGGGCCTCCACTTCAGCCAGGAGGACG CTCCAGATGAAATGGGTAAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAA GAACGAGCAGTAA
12	IRES - Eg FP	AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTTCGTGA CCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACAAACAAA CAAAACAAAACACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGT CTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCC GGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGA CGACCGGGTCCTTTCTTGATAAACCCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGT GCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGG TACTGCCTGATAGGGTGCTTGGGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGC ACCATGAGCACGAATCCTAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCG GGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCT GAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTG ACCACCCTGACCTACGGCGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCG CACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA AGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAACAGCC ACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACTT CAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCA CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTG

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

(表 1 の続き)

配列 番号	名 称	配 列 :
13	IRES-gluc	AGCAGTTTCATCGCACAGGTCGATCTGTGTGTGGACTGCACAACTGGCTGCCT CAAAGGGCTTGCCAACGTGCAGTGTTCTGACCTGCTCAAGAAGTGGCTGCCG CAACGCTGTGCGACCTTTGCCAGCAAGATCCAGGGCCAGGTGGACAAGATCA AGGGGGCCGGTGGTGA CTAACAAACAAACAAACAAACAAACAACTCCCTGTGA GGAAC TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGT TAGTATGAGTGT CGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGA ACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGATAAA CCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAG TAGTGTGGGTGCGCAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGA GTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCAACCATGAGCACGAATCCTAAATG GGAGTCAAAGTTCTGTTTGCCCTGATCTGCATCGCTGTGGCCGAGGCCAAGC CCACCGAGAACAAACGAAGACTTCAACATCGTGGCCGTGGCCAGCAACTTCGC GACCACGGATCTCGATGCTGACCGCGGGAAGTTGCCCGGCAAGAAAGCTGCC GCTGGAGGTGCTCAAAGAGATGGAAGCCAATGCCCGGAAAGCTGGCTGCACC AGGGGCTGTCTGATCTGCCTGTCCACATCAAGTGCACGCCCAAGATGAAGA AGTTTCATCCCAGGACGCTGCCACACCTACGAAGGCGACAAAGAGTCCGCACA GGCGGCGCATAGGCGAGGCGATCGTCGACATTCTGAGATTCTGGGTTCAAG GACTTGAGGCCCATGG
14	アーム1	AATACCTTACTTAATAGTAACAATAGAAAAATC
15	アーム2	AAGCTAGATCATATTACTATTAAGTAAGGTATT
16	cRNAzyme (Cte-Rluc)	AATACCTTACTTAATAGTAACAATAGAAAAATCCTATTATCGAGCGAACGCCTT ATGCGATGAAAGTCGCACGTAGGGTGTAGACCAAGCGAAATCCTATGCATTT AGGATAGTGAGGTATAGCAAAATGGCTTCCAAGGTGTACGACCCCGAGCAAC GCAAACGCATGATCACTGGGCCTCAGTGGTGGGCTCGCTGCAAGCAAAATGAA CGTGTGGACTCCTTCATCACTACTATGATTCCGAGAAGCACGCCGAGAAC GCCGTGATTTTTCTGCATGGTAACGCTGCCTCCAGCTACCTGTGGAGGCACGT CGTGCCTCACATCGAGCCCGTGGCTAGATGCATCATCCCTGATCTGATCGGA ATGGGTAAGTCCGCGCAAGAGCGGGAATGGCTCATATCGCCTCCTGGATCACT ACAAGTACCTCACCGCTTGTTTCGAGCTGCTGAACCTTCCAAAGAAAATCATC TTTGTGGGCCACGACTGGGGGGCTTGTCTGGCCTTTCACTACTCCTACGAGCA CCAAGACAAGATCAAGGCCATCGTCCATGCTGAGAGTGTCTGGACGTGATC GAGTCTGGGACGAGTGGCCTGACATCGAGGAGGATATCGCCCTGATCAAGA GCGAAGAGGGCGAGAAAATGGTGCTTGAGAATAACTTCTTCGTCGAGACCAT GCTCCCAAGCAAGATCATGCGGAAACTGGAGCCTGAGGAGTTCGCTGCCTAC CTGGAGCCATTCAAGGAGAAGGGCGAGGTTAGACGGCCTACCTCTCCTGGC CTCGCGAGATCCCTCTCGTTAAGGGAGGCAAGCCCGACGTCTCCAGATTGT CCGCAACTACAACGCCTACCTTCGGGCCAGCGACGATCTGCCTAAGATGTTT ATCGAGTCCGACCCTGGGTTCTTTTCCAACGCTATTGTGCGAGGGAGCTAAGAA GTTCCCTAACACCGAGTTCGTGAAGGTGAAGGGCCTCCACTTCAGCCAGGAG GACGCTCCAGATGAAATGGGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGC TGAAGAACGAGCAGTAAGCCATACAATAAAAGTGCGAAACGTTATCCTATAAG TAAGAAAGTTTTAAATTTTCTTACGAAAAGGATAGAACTTAAAGTTCTAACT GTTCTACTAAAGTAATAAGTGAATACTTATTTAAAGCAAACAACCAAGTAGC TTTAAGTCTAAGTCCCCTACACAAGTTTTATACTACTATGCAAACTTGTGAAG CTAGGTAAGGTCGTAATCCGTGAAAGTCGGATGCGGGGCTCCTTAAAGATTA CTATGGTAAACATAAGCTAATCCATTAAGATGCGATTTATATGTATTTTATACT GTTAAATATTTTTGTGCTTGTGGCTTGGTATAAAACAGTTAAGATGAAGTACTT AACTGGTTTTGGAATAATTGGTTGTTAACTAAAACATTATAAATCGTTAGTGG ATACCTAAGGTAATCAAAAATAGGGATAGGTAGAATGGAACGTTTGATGCTGT ATATGAAGAGGTTTAGTAGAACCTAGGACACATATACGGGCTCAGCAGGTTCA TAGTAGCTATGATACTCAGCCGGAAGTCAATTAATTTGAAATACTTCTATGGT AACATAGGAGAAGGATAAAACTGAGTGAGCCAAGGAACCTAGTCGGTAATAG AAGCTAGATCATATTACTATTAAGTAAGGTATT

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

(表 1 の続き)

配列番号	名称	配列:
17	グループIIイントロンBth	CAAAGGCUUACCUAUCACUAGCGCGACACGUUCCUAAGUGAAAAGCUUAG GCACUGUCGAACUCAACAGUUCAGCAGUGAACUGUCAUUCUAAGAAGUCA AUGAAGGAGUAACGUCUGGAAGGGCUUCCCUUAAUCCUCCGACAUGCAGG AAAGUAGGCAAGUACUGAACUGUGUGAAGCUCGGUGAAGUCGGUUGAAGG UUACCGUAAAUUAGUAUCUCUAAUACGAAAGCUAUCCAGCGGUGGAUGGU GUAAACUGAUAGACCGGAGGUCUAUAAAACACUCAAGGUUAGGAUUGC UGAACUAGAGGCGAUCGCUAGUAAGCGCAGACGAAUCCUGAUGGUACGG GUCUAUAUUCGGGAGGGAAUCGAAAGGUUCUCUGACACAAUAAGUGUCGC UACUGUGGGUGAGUAAAACUCUCCUUUAUGAAAGCCCAUAUAUCGUUACA GGCGUUUAUAAGGUAGCAGGCUCAUAGGGGAAACCUAAAAGUGUAUGUAC AGAUAAGAAUGACGGAACGUGGUAAAGCUGCCGACAUGGAGGGCUUGUUCU CUUUGAAGUGUUGCCAAGGAAAGUCACAAUGAGAUUAGUUGUCGAUAUAA CUUGGUUUAAACGGCAGUGAAAGUGGUGGCACAGUACCGAUGAAACGUGUA AUGAACGUGGAGGGAUAGCCACUAGUCGAUUGAAGAUUGAAGGUUACUAU UGGUUAACAUGGUUUCGAGUAAGACUAAGAGAUGUAAUGCUCCAAAGUAA UAAGGAGGUUACAGCCCAUGUUAAGAAAACCAAGCUAAGACAUAAACGAU AUUAUGAUACACAAAAAAGUGUAUGACAAUUUAUACUCGAACAGUCUUA CGGUAACAUAUUUCUUAUUGGAAACGAUGGAACGCCGUUGCCCGGAA ACGGGCGCGUACGGUGUGGAGUGGGGGAAGCUGGAGAUAAUCUCAAG GCUUACCUAUCACUAUCGCGACACGUUCCUAAGUGA
18	グループIIイントロンCte _original	GCCAUACAUAUAAAGUGCGAAACGUUAUCCUAUAAGUAAGAAAGUUUUAAA AUUUUCUUACGAAAAGGAUAGAACUUAAAAGUUCUAACUGUUCUACUAAAG UAAUAAGUGAAAAUCUUAUUUAAAAGCAACAACCAAGUAGCUUUAAGUCUA AGUCCCCUACACAAGUUUUAUACUACUAUGCAAAACUUGUGAAGCUAGGU AAGGUCGUAAUCCGUGAAAGUCGGAUGCGGGGCUCUUAAAAGAUUACUA UGGUAAACAUAAAGCUAAUCCAUAUAAAGAUUGCGAUUUUAUGUAUUUUUAUAC UGUUAAAUUUUUUGUGCUUGUGGCUUGGUUAUAAAACAGUUAAGAUGAAG UACUUAACUGGUUUUGGAAUAAUUGGUUGUUAACUAAAACAUUAUAAU CGUUAGUGGAUACCUAAGGUAAUCAAUAAUAGGGAUAGGUAGAAUGGAAC GUUUGAUGCUGUAUAUGAAGAGGUUUAGUAGAACCUAGGACACAUUACG GGCUCAGCAGGUUCAUAGUAGCUAUGAUACUCAGCCGGAAGUCAAUUAAU UUUGAAAUAUCUUCUAUGGUAAAUAGGAGAAGGAUAAAACUGAGUGAGCC AAGGAACCUAGUCGGUAAUAGAAAAGUGGAAGUUAAAACAAUAUAAGAUU UUAGAAUUAAUUUAAUUAUUAAGAACGGAUUAAUUUAAUGAUUUUUAAAGU UAGACGGUUUAUAAUUAACAUUUCAAUUAUAAACCAUAUCCAAAUUCAUA AAUAUAGCUAGAUCAUAUCACUAGUUUAAAAAUAAUAAAUCAUUUCAAAU UACUAUUAAAGUAAGGUAAUUAUACCUUACUUAUAGUAAUCUCAUUACUA AGAGAAUUAUAGAUUAGCAGACAGAUUCAUAAAACUAUAUCAACUAGGA CAUAAGAAAUAUAUUUAUACACUCCUAUUUAUCGAGCGAACGCCUUAUGC GAUGAAAGUCGCACGUAGGGUGUAGACCAAGCGAAAUCCUAUGCAUUUAG GAUAGUGAGGUUAUGCAA

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

(表 1 の続き)

配列番号	名称	配列:
19	グループIIイントロンCte _mut	GCAAGACAAUAAAAGUUUGACACGUGAUCCUAUAAGUAAGAAAGUUUUAAA AUUUUCUUACGAAAAGGAUAGAACUUAAGUUCUAACUGUUCUACUAAAG UAAUAAGUGAAAAUCUUUUUAAAGCAAAACAACCAAGUAGCUUUAAAGUCUA AGUCCCCUACACAAGUUUUUACUACUAUGCAAAACUUGUGAAGCUAGGU AAGGUCGUAAUCCGUGAAAGUCGGAUGCGGGGCUCUUUAAAAGAUUACUA UGGUAAACAUAAGCUAAUCCAUAAGAUGCGAUUUUAUGUAUUUUUAUAC UGUUAAAUAUUUUUGUGCUUGUGGCUUGGUUAUAAAACAGUUAAGAUGAAG UACUUAACUGGUUUUGGAAUAAUUGGUUGUUAACUAAAACAUUAUAAU CGUUAGUGGAUACCUAAGGUAAUCAAUUAAGGGAUAGGUAGAAUGGAAC GUUUAGUGCUGUAUAUGAAGAGGUUUAGUAGAACCUAGGACACAUUACG GGCUCAGCAGGUUCAUAGUAGCUAUGAUACUCAGCCGGAAGUCAAUUAAU UUUGAAAUACUUCUAUGGUAAACAUAGGAGAAGGAUAAAACUGAGUGAGCC AAGGAACCUAGUCGGUAAUAGAAAAGUGGAAGUUAACAAAUUAAGAUU UUAGAAUUAUUUAAUUAUUAAGAACGGAUUAAUUAUUAUGAUUUUAAAGU UAGACGGUUUAUAAAUUAAACAUUUCAAUUAACCAUUAUCCAAAUUCAUA AAUUAUAGCUAGAUCAUAUCACUAGUUUAAAAUAAAUAAUUAUUAUCAAU UACUAAUUAAGUAAGGUAAUAAUACCUUACUUAUUAUGUAAUCUCAUUAACA AGAGAAUUAUAGAUUAGCAGACAGAUUUAUAAUUAUUAUUAUUAUUAUUA CAUUAAGAAAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUA GAUGAAAGUCGCACGUAGGGUGUAGACCAAGCGAAAUCCUAUGCAUUUAG GAUAGUGAGGUUAUAGCAA
20	スペーサー 配列 1	GCAAUAGCCGAAAAACAAAAAACAAAAAAACAAAAAAACAAAAAAAC AAAACACA
21	スペーサー 配列 2	AAAUUAUAAUAAUUAUAAUA
22	スペーサー 配列 3	AUGAAACCGGCUCGGAUUCGCGCCGCGUGCGCCAUCCCCUCAGCUAGCAG GUGUGAGCGGCUUUCUGCCCGCAGUCUCUACACAGCUCAGCAUCCUGACG CCUCCUCCCCUUGCAGGGGCGUGAAGCUACUUCAGACUCUGCUGUGACGA CUUGGCCCGCCAGGCACCGAUCCUCCCGGUGAGAAGGUCCACGAAUCUUA CUGCAGACAGAUUUGCUCAGCGCG
23	プローブ 1	CUUUCACUACUCCUACGAGCACCA
24	プローブ 2	GACCAUGCUCCCAAGCAAGAUCAUG
25	Gluc	AUGGGAGUCAAGUUCUGUUUGCCCUGAUCUGCAUCGCUUGGGCCGAGGC CAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACUUAACAUCGUGGCCGUGGCCAGCAA CUUCGCGACACGGAUCUCGAGUCGACCGCGGGAAGUUGCCCGGCAAGA AGCUGCCGCGUGGAGGUGCUAAAGAGAUUGGAAGCCAAUGCCCGGAAAGCU GGCUGCACCCAGGGGCGUGUCUGAUCUGCCUGUCCACAUCAAGUGCACGCC CAAGAUGAAGAAGUUAUCCAGGACGCGUGCCACACCUACGAAGGCGACAA AGAGUCCGCACAGGGCGGCAUAGGCGAGGCGAUCGUCGACAUUCCUGAGA UUCUGGGUUAAGGACUUGGAGCCCAUGGAGCAGUUAUCGCACAGGUC GAUCUGUGUGUGGACUGCACAACUGGCUGCCUCAAAGGGCUUGCCAACGU GCAGUGUUCUGACCUGCUCAAGAAGUGGCUGCCGCAACGCUUGCGACCU UUGCCAGCAAGAUCAGGGCCAGGUGGACAAGAUAAGGGGGCCGGUGGU GAC

【表 1 - 7】

(表 1 の続き)

配列 番号	名称	配列:
26	Rluc1	AUGGCUUCCAAGGUGUACGACCCCGAGCAACGCAAACGCAUGAUCACUGG GCCUCAGUGGUGGGCUCGCGUCAAGCAAAUGAACGUGCUGGACUCCUUCA UCAACUACUAUGAUUCCGAGAAGCACGCCGAGAACGCCGUGAUUUUUCUG CAUGGUAAACGCUGCCUCCAGCUACCUGUGGAGGCACGUCGUGCCUCACAU CGAGCCCGUGGGCUAGAUGCAUCAUCCUGAUCUGAUCGGAUUGGGUAAGU CCGGCAAGAGCGGGAAUGGCUCAUAUCGCCUCCUGGAUCACUACAAGUAC CUCACCGCUUGGUUCGAGCUGCUGAACCUCUCAAAGAAAAUCAUCUUUGU GGGCCACGACUGGGGGGCUUGUCUGGCCUUCACUACUCCUACGAGCACC AAGACAAGAUCAAGGCCAUUCGUCCAUGCUGAGAGUGUCGUGGACGUGAUC GAGUCCUGGGACGAGUGGCCUGACAUUCGAGGAGGAUAUCGCCUGAUCAA GAGCGAAGAGGGCGAGAAAAUGGUGCUUGAGAAUAACUUCUUCGUCGAGA CCAUGCUCCCAAGCAAGAUAUGCGGAAACUGGAGCCUGAGGAGUUCGCU GCCUACCUGGAGCCAUUCAAGGAGAAGGGCGAGGUUAGACGGCCUACCCU CUCCUGGCCUCGCGAGAUCCUCUCGUUAAGGGAGGCAAGCCCGACGUCG UCCAGAUUGUCCGCAACUACAACGCCUACCUUCGGGCCAGCGACGAUCUG CCUAAGAUGUUCAUUCGAGUCCGACCCUGGGUUCUUUCCAACGCUAUUGU CGAGGGAGCUAAGAAGUUCCCUAACACCGAGUUCGUGAAGGUGAAGGGCC UCCACUUCAGCCAGGAGGACGCUCCAGAUGAAAUGGGUAAGUACAUAAG AGCUUCGUGGAGCGCGUGCUGAAGAACGAGCAGUAA
27	Rluc2	AUGAAACCGGCUCGGAUUCGCGCCGCGUGCGCCAUCCCCUCAGCUAGCAG GUGUGAGCGGCUUUCUGCCCGCAGUCUCUACACAGCUCAGCAUCCUGACG CCUCCUCCCCUUGCAGGGGCGUGAAGCUACUUCAGACUCUGCUGUGACGA CUUGGCCCGCCAGGCACCGAUCCUCCCGGUGAGAAGGUCCACGAAUCUUA CUGCAGACAGAUUUGCUCAGCGCGAUGGCUUCCAAGGUGUACGACCCCGA GCAACGCAAACGCAUGAUCACUGGGCCUCAGUGGUGGGCUCGUGCAAGC AAUGAACGUGCUGGACUCCUUCAUCAACUACUAUGAUUCCGAGAAGCAC GCCGAGAACGCCGUGAUUUUUCUGCAUGGUAACGCUGCCUCCAGCUACCU GUGGAGGCACGUCGUGCCUCACAUUCGAGCCCGUGGCUAGAUGCAUCAUCC CUGAUCUGAUCGGAUUGGGUAAGUCCGGCAAGAGCGGGAAUGGCUCAUAU CGCCUCCUGGAUCACUACAAGUACCUCACCGCUUGGUUCGAGCUGCUGAA CCUCCAAAGAAAAUCAUCUUUGUGGGCCACGACUGGGGGGCUUGUCUGG CCUUUCACUACUCCUACGAGCACCAAGACAAGAUCAAGGCCAUUCGUCCAUG CUGAGAGUGUCGUGGACGUGAUCGAGUCCUGGGACGAGUGGCCUGACAUC GAGGAGGAUAUCGCCUGAUCAAGAGCGAAGAGGGCGAGAAAAUGGUGCU UGAGAAUAACUUCUUCGUCGAGACCAUGCUCCCAAGCAAGAUCAUGCGGA AACUGGAGCCUGAGGAGUUCGUGCCUACCUGGAGCCAUUCAAGGAGAAG GGCGAGGUUAGACGGCCUACCCUCUCCUGGCCUCGCGAGAUCCUCUCGU UAAGGGAGGCAAGCCCGACGUCGUCAGAUUGUCCGCAACUACAACGCCU ACCUUCGGGCCAGCGACGAUCUGCCUAAGAUGUUCAUUCGAGUCCGACCCU GGGUUCUUUCCAACGCUAUUGUCGAGGGAGCUAAGAAGUCCCUAACAC CGAGUUCGUGAAGGUGAAGGGCCUCCACUUCAGCCAGGAGGACGCUCCAG AUGAAAUGGGUAAGUACAUAAGAGCUUCGUGGAGCGCGUGCUGAAGAAC GAGCAGUAA

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

(表 1 の続き)

配列番号	名称	配列:
28	IRES-E _g FP	AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAUCACAUGGUCCUGCUGGAGUUCGU GACCGCCGCGCGGGAUCACUCUCGGAUGGACGAGCUGUACAAGUAACAAA CAAACAAAACAAAAACACUCCCCUGUGAGGAACUACUGUCUUCACGCAGAA AGCGUCUAGCCAUGGCGUUAGUAUGAGUGUCGUGCAGCCUCCAGGACCCC CCCUCCCGGGAGAGCCAUAUGUGGUCUGCGGAACCGGUGAGUACACCGGAA UUGCCAGGACGACCGGGUCCUUUCUUGGAUAAACCCGCUCAUUGCCUGGA GAUUUGGGCGUGCCCCCGCAAGACUGCUAGCCGAGUAGUGUUGGGUCGCG AAAGGCCUUUGUGGUACUGCCUGAUAGGGUGCUUUGCGAGUGCCCCGGGAGG UCUCGUAGACCGUGCACCAUGAGCACGAAUCCUAAAAUGGUGAGCAAGGG CGAGGAGCUGUUCACCGGGGUGGUGCCCAUCCUGGUGCGAGCUGGACGGCG ACGUAAACGGCCACAAGUUCAGCGUGUCCGGCGAGGGCGAGGGCGAUGCC ACCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCUACUGCACCACCGGCAAGCUGCC CGUGCCCUGGGCCACCCUCGUGACCACCCUGACCUACGGCGUGCAGUGCU UCAGCCGCUACCCCGACCACAUGAAGCAGCACGACUUCUUAAGUCCGCCA UGCCCGAAGGCUACGUCCAGGAGCGCACCAUCUUCUUAAGGACGACGGC AACUACAAGACCCGCGCCGAGGUGAAGUUCGAGGGCGACACCCUGGUGAA CCGCAUCGAGCUGAAGGGCAUCGACUUAAGGAGGACGGCAACAUCUUGG GGCACAAGCUGGAGUACAACUACAACAGCCACAACGUCUAUAUCAUGGCCG ACAAGCAGAAGAACGGCAUCAAGGUGAACUUAAGAUCGCCACAACAUCG AGGACGGCAGCGUGCAGCUCGCCGACCACUACCAGCAGAACACCCCCAUCG GCGACGGCCCCGUGCUGCUGCCCGACAACCACUACCUGAGCACCCAGUCC GCCCCG
29	IRES-gluc	AGCAGUUCAUCGCACAGGUCGAUCUGUGUGUGGACUGCACAACUGGCUGC CUCAAAGGGCUUGCCAACGUGCAGUGUUCUGACCUGCUCAAGAAGUGGCU GCCGCAACGCUGUGCGACCUUUGCCAGCAAGAUCAGGGCCAGGUGGACA AGAUC AAGGGGGCCGGUGGUGACUAACAAACAAACAAAACAAACACUCC CCUGUGAGGAACUACUGUCUUCACGCAGAAAGCGUCUAGCCAUGGCGUUA GUAUGAGUGUCGUGCAGCCUCCAGGACCCCCCUCCCGGGAGAGCCAUAAG UGGUCUGCGGAACCGGUGAGUACACCGGAAUUGCCAGGACGACCGGGUCC UUUCUUGGAUAAACCCGCUCAAUGCCUGGAGAUUUGGGCGUGCCCCCGCA AGACUGCUAGCCGAGUAGUGUUGGGUCGCGAAAGGCCUUGUGGUACUGCC UGAUAGGGUGCUUUGCGAGUGCCCCGGGAGGUCUCGUAGACCGUGCACCAU GAGCACGAUCCUAAAAUGGGAGUCAAGUUCUGUUUGCCUGAUCUGCA UCGCGUGUGGCCGAGGCCAAGCCACCGAGAACAACGAAGACUUAACAUCG UGGCCGUGGCCAGCAACUUCGCGACCACGGAUCUCGAUGCUGACCGCGGG AAGUUGCCCGGCAAGAAGCUGCCGUGGAGGUGCUCAAAGAGAUGGAAGC CAAUGCCCGGAAAGCUGGCUGCACCAGGGGCGUGUCUGAUCUGCCUGUCCC ACAUCAAGUGCACGCCCAAGAUGAAGAAGUUCAUCCAGGACGCUGCCACA CCUACGAAGGCGACAAAGAGUCCGCACAGGGCGGCAUAGGCGAGGCGAUC GUCGACAUUCCUGAGAUUCCUGGGUUAAGGACUUGGAGCCCAUGG
30	アーム1	AAUACCUUACUUAUAUAGUAACAAUAGAAAAUC
31	アーム2	AAGCUAGAUCAUUUACUUAUUAAGUAAGGUAAU

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

(表 1 の続き)

配列 番号	名称	配列:
32	cRNAzym e(Cte-Rl uc)	AAUACCUUACUUAUAGUAAACAAUAGAAAAUCCUUAUUAUCGAGCGAACGCC UUAUGCGAUGAAAGUCGCACGUAGGGUGUAGACCAAGCGAAAUCCUAUGC AUUUAGGAUAGUGAGGUUAUAGCAAAAUUGGCUUCCAAGGUGUACGACCCCG AGCAACGCAAACGCAUGAUCACUGGGCCUCAGUGGUGGGCUCGCUGCAAG CAAAUGAACGUGCUGGACUCCUUCAUACAACUACUAUGAUUCCGAGAAGCAC GCCGAGAACGCCGUGAUUUUUUCUGCAUGGUAACGCUGCCUCCAGCUACCU GUGGAGGCACGUCGUGCCUCACAUCGAGCCCGUGGCUAGAUGCAUCAUCC CUGAUCUGAUCGGAUUGGUAAGUCCGGCAAGAGCGGGAAUGGCUCAUUAU CGCCUCCUGGAUCACUACAAGUACCUCACCGCUUGGUUCGAGCUGCUGAA CCUUCCAAAGAAAAUCAUCUUUGUGGGCCACGACUGGGGGGCUUGUCUGG CCUUUCACUACUCCUACGAGCACCAAGACAAGAUCAAGGCCAUCGUCCAUG CUGAGAGUGUCGUGGACGUGAUCGAGUCCUGGGACGAGUGGCCUGACAUC GAGGAGGAUAUUCGCCUGAUC AAGAGCGAAGAGGGCGAGAAAAUUGGUGCU UGAGAAUAACUUCUUCGUCGAGACCAUGCUCCCAAGCAAGAUCAUGCGGA AACUGGAGCCUGAGGAGUUCGUCGCCUACCUGGAGCCAUUCAAGGAGAAG GGCGAGGUUAGACGGCCUACCCUUCUCCUGGCCUCGCGAGAUCUCCUCUCGU UAAGGGAGGCAAGCCCCGACGUCGUCCAGAUUGUCCGCAACUACAACGCCU ACCUUCGGGCCAGCGACGAUCUGCCUAAGAUGUUAUCGAGUCCGACCCU GGGUUCUUUUCCAACGCUAUUGUCGAGGGAGCUAAGAAGUUCCCUAACAC CGAGUUCGUGAAGGUGAAGGGCCUCCACUUCAGCCAGGAGGACGCUCCAG AUGAAAUGGGUAAGUACAUAAGAGCUUCGUGGAGCGCGUGCUGAAGAAC GAGCAGUAAGCCAUACAUAUAAAAGUGCGAAACGUUAUCCUAUAAGUAAGAA AGUUUUAAAAUUUUUCUACGAAAAGGAUAGAACUUAAGUUCUAACUGU UCUACUAAAGUAUAUAGUGAAAAUCUUAUUUAAAGCAAACAACCAAGUAGC UUUAAGUCUAAGUCCCUACACAAGUUUUUAUACUACUAUGCAAAACUUGU GAAGCUAGGUAAAGGUCGUAAUCCGUGAAAGUCGGAUGCGGGGCUCCUUA AAGAUUACUAUGGUAAACAUAAAGCUAAUCCAUAUAGAUGCGAUUUUAUGU AUUUUAUACUGUUAUAUAUUUUUGUGCUUGUGGCUUGGUUAUAAAACAGUU AAGAUGAAGUACUUAACUGGUUUUGGAUAUAUUGGUUGUUAACUAAAAC AUUAUAAAUCGUUAGUGGAUACCUAAGGUAAUCAAAAAUAGGGAUAGGUA GAAUGGAACGUUUGAUGCUGUAUAUGAAGAGGUUUAGUAGAACCUAGGAC ACAUAUACGGGCUCAGCAGGUUCAUAGUAGCUAUGAUACUCAGCCGGAAG UCAAUUAAUUUUGAAAUACUUCUAUGGUAAACAUAGGAGAAGGAUAAAACUG AGUGAGCCAAGGAACCUAGUCGGUAAUAGAAGCUAGAUCAUUUACUAUU AAGUAAGGUUU

10

20

30

* 配列番号2の配列 (Group II intron Cte_original) に
 関して、エクソン由来のヌクレオチドは、大文字によって表される。エクソンからのヌク
 レオチド及びEBS領域と相互作用するヌクレオチドは、下線付きの大文字によって表さ
 れる。グループIIイントロンの6つのドメインは、下線付きの小文字によって表される
 。EBS領域はイタリック体の太字下線付きの小文字によって示される。

【0549】

40

50

【表 2 - 1】

表 2 : グループ I I イントロン配列表 2

配列番号	名称	配列:
33	グループIIイントロン(1)	CUCUCUaaauagcaauuuuaccuuuggagggaagaaaguuauacaggcagucaccuaggguagcu agucuuuaaaaccaauagauugcaucggguuuuaaaaggcaagaccgucaaaauugcgggaaagg gucaacagccguucaguuaccaagucucaggggaaacuuugagauaggccuugcaaaaggguau guauaagcugacggacaguguccuaaccacgagccaaguccuaagucacagauucucug uugauauggagucaguuacagacuaaaugucggucggggaagauuaauucucuaaaga uauagucggaccucuccuuauugggagcuagcgggaugaaugagucacacuggagccgucg ggaaacuaauuuugaugcgaaaguuauuaguuuuggaguuacucgUAAGGUA
34	グループIIイントロン(2)	UGCAUGUGAUGCAGGUCGUGgugcggaucguuccuaagugaaaagcuuaggcaucuu agacaagggaaggccccaauaagauagaacuaaugauucgagagacagaauagauagaguaacg ucuuugaaaauuuucccuaaagucuccgacaugcauu gaaagguaaggauuuuaauuguguga agcucggugaaagacggcugacagauaccguagugaaaaauuguuuaaaccgaaaguccuuu uaguaagagggauguaucacauaggccgggggucgaaaguuauuagguagagauguuaua ugaaaauacugacgaacuuucgaauuaacgagucuaaaccuacacaaucagaaaugauagua aaccauauuuuuguguuugugugagguuaaaguuuuucggcguaugaaacaacuuacagua uuauaggguacugucagcacgcagcucacuaagaggcaccuaaggguaccuauuagugga gaaucauuggaacgaugaaagcucagggacgcagagaaccuacauucuguaagcgguguaa ggaaaaaggaggaaucuaaauuauucuuuuuugagugauagcgauucacuaugagcgugg aaauuauaggaaacuaaaaggagcgaaagggaucuaaauuugagggaaaaagcaauauu gaugggcaagccguauagaaagggaacuuuacuguaacgguuuaguguggggaaaaagcagaga uuauaucaaaaguuuuaccuauacacaaAAGGAGAGAAUUAUUUUUAU
35	グループIIイントロン(3)	CAAAGGCUUACCUAUCACUAGcgcgacacguuccuaagugaaaaagcuuaggcacuguc gaacucaaacaguuucagcagugaaucugucuuuuaagaaagucaaaugaaggaguuacgucg aaggcgcuucccuuaauuccucgacauugcaggaagauaggcaagucacuaagcugugaaagcu cggugaaagucgguuagaaagguuaccguaaaauagauucuaauacgaaagcuauccagcggu ggauuguguaacugauagaccggagucuaauaaaacacucaagguuaggaugcgcgaugaaac uagaggcggaucgcuaguaagcgacagcgaauccugaugguaacgggucuaauucgggaggga aucgaaaggguucucugacacaaaauaagugucgcuacuguggugaguaaaacucuccuuuau gaaagcccauauuacgguuacagcgguuauuaagguagcagggcucauaggggaaacuaaaag uguauguaacagauaagaaugacgggaacgugguuaagcugccgacauaggaggcuuuucucuu ugaaguguuuccaaggaaagucacaaugagauuaguuugcgaauuaacuuuguuuaacggca gugaaagugugugcagacaguuaccgugaacguguaaagaaacgugagggaugaccacuaugc gaauugaagauugaaggguuacuaauugguuaaauuguuuucgaguaagacuaagagauuaug uccaaaaguuauaaggagguuacagcccauguuuaagaaaaacaaagcuuaagacauaacgaaua uuauagauacacaaaaaaguguaugacaaauuauacucgaacagucuuuacgguaacaaauu cuuucaauuugaaacgauggaacgcggaugcccgaaacggcgcuacgguguggaguggg gggaaaaagcuggagauaauucuaaaaggcuuaccuauacacuaucGCGACACGUUCCUAA GUGA
36	グループIIイントロンBth	UUUAUACAAAGUAGUUAUUUgugcgacacguuuuuaaagugugcaaacacgaag uaggaggguuaucaauuuugaugacaacaacggauugacugcaagauaggaaugaaagccguca gguuugagcugaaaacuauuacugauacuuuauuagcaaggcgugauaguagucacaaaau guauugaagcuaggugaaugcggcugaacaaaaccuaagugagaauuacauuagguauaggaua ggucgggagucuaacaaaacauuauugugagaauguccuaacggacuggcgaauuacaggu uuaaaaggauuauuacuuagaauguguaauuugcaacgacgacguauucuaaccgaaaagu aagaguaaaauaauagaaauucggaagaucaaacgaugaggauuaaagauaacaggcuuac agcaagcaccuaaaagauauauguaagcuaagucuuacagaacgugguuagcaagagagacug cacaauugccuacuaacagacaaaggugcauuaaagguuucuaacgaaccaaaauugcuuauu cuugugaaguggggacacaguuaccgacgaagcauguaacaaauguggagggaugauuccua gucuuuguuucguuagaaacuaaaucacuggaauuaacucacaggauccgaguaagauugug acuuuucguuagaaaagggaauuacgugugugaguaacaacaugguuuuguaaucuaguu uuuuaguaauaaaggauaagauuggggcguguaugcgaugaaagucgcacguacagugucaa gcgggggaaaaagaggaauaacuuuaagucuuaccuauccgaacGGAUAAAAAGAAU CCUGCU

10

20

30

40

50

(表 2 の続き)

50

【表 2 - 3】

(表 2 の続き)

配列 番号	名称	配列:
40	グループIIイ ントロン(8)	GGGUAGCAAUAAGGAUgugcgacuuguuaaguuuaacaaaaauuguauaacguuuau uaaugauuuauacauuguauuucaucuuacaauagccuaauuagauaugcauuuaggguaacu uuuuuguauaaagcucuaauuauaaguguaaaacacuuuuaggcuucuuucauaggguuaga gaaaucgaaccaauguaauuaaaacuuugauuguauuaggcauuuaacguugccuugguuaaa ugaagauugaacauaaguauacaaaguaaaauuggaaccuaagggaagaauuguuuuuuguuaag aaacaagguaauaccuaauaacuggcuauuaauuaaaauugcaaggguuuauuguuaaaauaaacua uaggguuagaggguaaaaaggauaauuguuaaaagcgaaugcaauucuguaauuggaauugauagg uauauaccuaacuuugaagagugcugacuuaacauauagauguuaauuuacguuuccgacguaaa uaauguuugagccguauugcuauagaaaguagcacguaacgguuucaaaaggagggaaguccgag aggaccuaccuauucucaacU
41	グループIIイ ントロン(9)	ACUCUAGGUAGACGAGAgugcgacuaguaaaguguuuaauaaauauguggugaaaaac caccagauaaaccuauuauucugagcucuaucggugugcauuuaaaaguaauuuuuuuuguauaaa gcccguuuuaucagguaaaauaaucuuuccauccuaauuaauuauuagauauaaaagggaugg ugagcuauauuacuauggauaagauuuuuuuugaauucacguuugaagcguauuagaguaag uuuuauuuuaaaaggaaaaaaauuaaaauaaauuaaaauuaauuguauaaauaaguuuuu guuuauuuuaauaugggucuuauuuuaauuguaacguauagugaaauccuauuaguaauua agguguuauuaaaauaaacuagguaaggcccaauaaugucuucuaauauagaagaaguucaagu guaaauuuugaauauacauuaguggguaaaaggauauuuuaaaaagcgaauugucucuaauuaau agugagaauaggucuaugacuauuuucgaaaggauugcugacuuaaaauuaauuaauuaauua uauauauauuaauuaauuugagccguaugcgauaaaaucgcacguacggguucuuagagggg gaaagcucgagagggccuaccuauuccacAGACCCUAUGCAGCU

10

20

【 0 5 5 0 】

30

40

50

【表 3】

表 3 : 3' インترون断片

配列番号	名称	配列:
42	3' インترون断片1 (グループIIイントロンをドメイン4でセグメント化することによって得られる)	CUUUGAGAUGGCCUUGCAAAGGGUAUGGUAUAAGCUGACGGAC AUGGUCCUAACCAACGACGCCAAGUCCUAAGUCAACAGAUUCUUCU GUUGAUUAUGGAUGCAGUUCACAGACUAAAUGUCGGUCGGGGAAG AUGUAUUCUUCUCAUAAGAUUAUGUCGGACCUCUCCUUAUUGGG AGCUAGCGGAUGAAGUGAUGCAACACUGGAGCCGCGUGGGAACUA AUUUGUAUGCGAAAGUAUAUUGAUUAUUGUUUGGAGUACUCG
43	3' インترون断片2 (グループIIイントロンをドメイン4でセグメント化することによって得られる)	GCAUAUAUUGAUGGCCAAGCCGUAUGAAGGGAAACUUUCAUGUACG GUUUAGUGUGGGGGGAAAAGCAGAGAUUAUAUCAAAAGUUUUACC UAUCACAAU
44	3' インترون断片3 (グループIIイントロンをドメイン4でセグメント化することによって得られる)	AUUGGAAACGAUGGGAACGCCGUAUGCCCGGAAACGGGCGCGUAC GGUGUGGAGUGGGGGGAAAAGCUGGAGAUAAUCUCAAGGCUUAC CUAUCACUAU
45	3' インترون断片4 (グループIIイントロンをドメイン4でセグメント化することによって得られる)	GGAUAAAGAUUGGGGCGCUGUAUGCGAUGAAAGUCGCACGUACAGU GUCAAGCGGGGGGAAAAGAUUGGAGAUAAACUUUAAAGUCUUACCUA UCGCAAC
46	3' インترون断片5 (グループIIイントロンをドメイン4でセグメント化することによって得られる)	CUAUUAUCGAGCGAACGCCUUAUGCGAUGAAAGUCGCACGUAGG GUGUAGACCAAGCGAAAUCCUAUGCAUUUAGGAUAGUGAGGUAU
47	3' インترون断片6 (ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	AUAUUAUAUUAUUGAGCCGUAUGCGAUGAAAGUCGCACGUACGGU UCUUAGAGGGGGGAAAAGUCCAAGAGGGCCUACCUAUCUCAAC
48	3' インترون断片7 (ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	AUGUAUAUAUUAUAUUAUUGAGCCGUAUGCGAUGAAAGUCGCACG UACGGUUCUUAGAGGGGGGAAAUCUUAGUAAUAAGACGACCUAUC UCGAC
49	3' インترون断片8 (ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	ACGUAAAUAUUGUUUGAGCCGUAUGCUAUGAAAGUAGCAGCUAC GGUUCUAAGAGGGGGGAAAAGUCCGAGAGGACCUACCUAUCUCAAC
50	3' インترون断片9 (ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	AUAUUAUAUUAUUGAGCCGUAUGCGAUGAAAACUCGCACGUACGGU UCUUAGAGGGGGGAAAAGCUCGAGAGGGCCUACCUAUCUCCAC
51	3' インترون断片10 (ドメイン1でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	GAAUAAUUGGUUGUUAAACUAAAACAUUAUAAAUCGUUAGUGGA UACCUAAGGUAAUCAAUAAUAGGGAUAGGUAGAAUGGAACGUUU GAUGCUGUAUAUGAAGAGGUUUAGUAGAACCUAGGACACAUUA CGGGCUCAGCAGGUUCAUAGUAGCUAUGAUACUCAGCCGGAAGU CAAUUAAUUUUGAAAUAUUCUUAUGGUAACAUAGGAGAAGGAUA AAACUGAGUGAGCCAAGGAACCUAGUCGGUAAUAGAAGCUAGAU CAUAUUACUAUUAAGUAAGGUAAUUAUACCUUACUUAUAGUAA CAUAAGAAAAUCCUAUUAUCGAGCGAACGCCUUAUGCGAUGAAA GUCGCACGUAGGGUGUAGACCAAGCGAAAUCCUAUGCAUUUAGG AUAGUGAGGUUAU
52	3' インترون断片11 (グループIIイントロンをドメイン3でセグメント化することによって得られる)	UACUUCUAUGGUAAACAUAGGAGAAGGAUAAAACUGAGUGAGCCA AGGAACCUAGUCGGUAAUAGAAGCUAGAUCAUAUUACUAUUAAG UAAGGUAAUUAUACCUUACUUAUAGUAACAAUAGAAAAUCCUA UUAUCGAGCGAACGCCUUAUGCGAUGAAAGUCGCACGUAGGGUG UAGACCAAGCGAAAUCCUAUGCAUUUAGGAUAGUGAGGUUAU

10

20

30

40

【 0 5 5 1 】

50

【表 4】

表 4. : E 2

配列番号	配列:
53	UAAGGUA
54	AAGGAG
55	AAGUGA
56	CCUGCU
57	AGCAGU
58	AGCAAA
59	AGAGAA
60	AGCAAA
61	A
62	U
63	AGACCC

10

【0 5 5 2】

【表 5】

表 5. : E 1

配列番号	配列:
64	CUCUCU
65	GUCGUG
66	CAAAGG
67	UUAUUU
68	CCAUGG
69	GCCCUG
70	CGUUGA
71	GCCAUA
72	ACGAGA
73	AAGGAU
74	AGACGAGA

20

30

【0 5 5 3】

40

50

【表 6 - 1】

表 6 : 5' イントロン断片

配列番号	名称	配列:
75	5' イントロン断片1 (グループIIイントロンをドメイン4でセグメント化することによって得られる)	AAAUAGCAAUAUUUACCUUUGGAGGGGAAAAGUUUUCAGGCAUUGC ACCUUGGUAGCUAGUCUUUAAAACCAAUAGAUUGCAUCGGUUUAAA AGGCAAGACCGUCAAAUUGCGGGGAAAGGGGUCAACAGCCGUUCA GUACCAAGUCUCAGGG
76	5' イントロン断片2 (グループIIイントロンをドメイン4でセグメント化することによって得られる)。	GUGCGAAUCGUUCCUAAGUGAAAAGCUUAGGCAUCUAGACAAG GGAAGGCCCAUUAAGAUAGAACUAAUGAUUCGAGAGACAGAAU GAUAGAGUAACGUCUUGAAAUGUUUCCCUAAGUCUCCGACAUG CAUUGAAAGGUAGGAUGUUUAAAUGUGUGAAGCUCGGUGAAGAC GGCUGACAGAUACCGUAGUGAAAAAUGUGUUUUAACCGAAAGUC CUUUUAGUAAGAGGAUGUAUCCCAUAGGCCGGGGUCCGUAAAAG UAUCUAUGGUGAGAAUGUUUAUGAAAUAACUGACGAACUUUCG AAUUAACGAGUCUAUAACCAUACAACAGAAAUGAUAGUAAACC AUUUUUUGUGUUGUGUGUGAGGUUAAGUAAAUUCGCGGCUAUG AACAACCUUACAGUAUUUAUGGUACUGUCUAGCACGCAGGCUCA UAGAAGGCACCUAAGGGUACCAUAUAGUGGAUAGAAUCAUUGGA ACGAUGAAAGCUCAGGACGCAGAGAACCUACAUCUGUGAAGCG GUGGUAAAGGAAAAGGAGGAUCCUAUAACUUAUCUUUUAUUUGAG UGAUAGCGAUGUCAUAGUAGCGUGGAAUUUAUGGAAACAUAAAG GAGCGAAGGGCAUUAAGUCAAUUUUGU
77	5' イントロン断片3 (グループIIイントロンをドメイン4でセグメント化することによって得られる)	GCGCGACACGUUCCUAAGUGAAAAGCUUAGGCACUGUCGAACUC AACAGUUCAGCAGUGAACUGUCAUUCUAAGAAGUCAAAUGAAGG AGUAACGUCUGGAAGGGCUUCCCUAAUCCUCCGACAUAGCAGGA AAGUAGGCAAGUACUGAACUGUGUGAAGCUCGGUGAAGUCGGUU GAAGGUUACCGUAAAUUAGUAUCUCUAUUAACGAAAGCUAUCCAG CGGUGGAUGGUGUAACUGAUAGACCGGAGGUCUAUAAAACACUC AAGGUUAGGAUGCGCGAUGAACUAGAGGCGAUCGCUAGUAAGCG CAGACGAAUCCUGAUGGUACGGGUCUAUAUCGGGAGGGAUUCG AAAGGUUCUCUGACACAAAUAAUGUGUCGCUACUGUGGGUGAGUA AAACUCUCCUUUAUGAAAGCCCAUUAUUCGUUACAGGCGUUAAU AAGGUAGCAGGCUCUAAGGGGAAACCUAAAAGUGUAUGUACAGA UAAGAAUGACGGAACGUGGUAAAGCUGCCGACAUUGGAGGGCUUGU UCUCUUUGAAGUGUUGCCAAGGAAAGUCACAAUGAGAUUAGUUG UCGAUUAACUUGGUUUAACGGCAGUGAAAGUGGUGGCACAGUA CCGAUGAAACGUGUAAUGAACGUGGAGGGAUAGCCACUAGUCGA UUGAAG
78	5' イントロン断片4 (ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	GUGCGACACGUUUCUUUAUAAUGUGGCAAAACACGAAGUAGGAGG GUUAUCAAUUUGAUAGACAACAACGGAUUGACUGCAAGUAGGAAU GAAAGCCGUCAGGUUGAGCUGAAACUACUUAUCUGAUACUCCUA UAUGCAAGGCGUGAUAGUAGUCACAAAUUGUAUGAAGCUAGGUG AAGUCGGCUGAACAAAACCUAAGUGAGAAAUCUAUUGGUAAUGG AUAGGUCGGGAUGCUACAAAACAUUAUGGUGAGAAUGUCCUAA CGGACUGGCGAAUGUACAGGUUUAAAGGAUUAAUUCAUUAGAAA UGUGUAUAUUGUCAACGACGACGCUAUCUACCGAAAAGUAAGAG UAAUUAUAUGAAAUUCGGAAGAUUCUAACGAUGAGGAUGUAAG AUAACAGGCUUACAGCAAGCACCUAAAGAUUAUUGUAUAGCUAA GUCAUUCAGAACGUGGUAAAGCAAGAGACUGUCACAAUAGCCUAC UACAGACAAGGUGCAUAUAAGGUUCUAACGAACCAAAAUUGCU UUAUUCUUGUGAAGGUGGGGACACAGUACCGACGAAGCAUGUAA CAAUGUGGAGGGAUAGUCCCUAGUCUUGUUC

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

(表 6 の続き)

配列番号	名称	配列:
79	5'イントロン断片5(グループIIイントロンをドメイン4でセグメント化することによって得られる)	CAAUAAAAGUGCGAAACGUUAUCCUAUAAGUAAGAAAGUUUUAA AAUUUUUCUUACGAAAAGGAUAGAACUUAAAAGUUCUAACUGUUC UACUAAAAGUAAUAAGUGAAAAUCUUUUAAAAGCAAACAACCAA GUAGCUUUUAAAGUCUAAGUCCCCUACACAAGUUUUUAUACUACUUA GCAAAACUUGUGAAGCUAGGUUAGGUCGUAUCCGUGAAAGUCG GAUGCGGGGCUCCUUAAAAGAUUACUAUGGUAAAACAUAAAGCUAA UCCAUAAGAUAGCGAUUUUAUAUGUAUUUUUAUACUGUUAAAUAUU UUaaUGCUUUaUGgUUGGUUAAAACAGUUUAGAUGAAGUACUUA ACUGGUUUUGGAAUAAUUGGUUGUUAAAACUAAAACAUUAUAAAU CGUUAGUGGAUACCUAAGGUAAUCAAUUUAGGGAUAGGUAGAA UGGAACGUUUGAUGCUGUAUAUGAAGAGGUUUAGUAGAACCUAG GACACAUUAACGGGCUCAGCAGGUUCAUAGUAGCUAUGAUACUC AGCCGGAAGUCAAUUAAUUUUGAAAUACUUCUAUGGUAAACAUAG GAGAAGGAUAAAACUGAGUGAGCCAAGGAACCUAGUCGGUAAUA G
80	5'イントロン断片6(ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	CAAUAAAAGUGCGAAACGUUAUCCUAUAAGUAAGAAAGUUUUAA AAUUUUUCUUACGAAAAGGAUAGAACUUAAAAGUUCUAACUGUUC UACUAAAAGUAAUAAGUGAAAAUCUUUUAAAAGCAAACAACCAA GUAGCUUUUAAAGUCUAAGUCCCCUACACAAGUUUUUAUACUACUUA GCAAAACUUGUGAAGCUAGGUUAGGUCGUAUCCGUGAAAGUCG GAUGCGGGGCUCCUUAAAAGAUUACUAUGGUAAAACAUAAAGCUAA UCCAUAAGAUAGCGAUUUUAUAUGUAUUUUUAUACUGUUAAAUAUU UUUGUGCUUagGGCUUGGUUAAAACAGUUUAGAUGAAGUACUU AACUGGUUUUGGAAUAAUUGGUUGUUAAAACUAAAACAUUAUAAA UCGUUAGUGGAUACCUAAGGUAAUCAAUUUAGGGAUAGGUAGA AUGGAACGUUUGAUGCUGUAUAUGAAGAGGUUUAGUAGAACCUA GGACACAUUAACGGGCUCAGCAGGUUCAUAGUAGCUAUGAUACU CAGCCGGAAGUCAAUUAAUUUUGAAAUACUUCUAUGGUAAACAU GGAGAAGGAUAAAACUGAGUGAGCCAAGGAACCUAGUCGGUAAU AG
81	5'イントロン断片7(ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	CAAUAAAAGUGCGAAACGUUAUCCUAUAAGUAAGAAAGUUUUAA AAUUUUUCUUACGAAAAGGAUAGAACUUAAAAGUUCUAACUGUUC UACUAAAAGUAAUAAGUGAAAAUCUUUUAAAAGCAAACAACCAA GUAGCUUUUAAAGUCUAAGUCCCCUACACAAGUUUUUAUACUACUUA GCAAAACUUGUGAAGCUAGGUUAGGUCGUAUCCGUGAAAGUCG GAUGCGGGGCUCCUUAAAAGAUUACUAUGGUAAAACAUAAAGCUAA UCCAUAAGAUAGCGAUUUUAUAUGUAUUUUUAUACUGUUAAAUAUU UUUGcUcUUcaacgUUGGUUAAAACAGUUUAGAUGAAGUACUUA ACUGGUUUUGGAAUAAUUGGUUGUUAAAACUAAAACAUUAUAAAU CGUUAGUGGAUACCUAAGGUAAUCAAUUUAGGGAUAGGUAGAA UGGAACGUUUGAUGCUGUAUAUGAAGAGGUUUAGUAGAACCUAG GACACAUUAACGGGCUCAGCAGGUUCAUAGUAGCUAUGAUACUC AGCCGGAAGUCAAUUAAUUUUGAAAUACUUCUAUGGUAAACAUAG GAGAAGGAUAAAACUGAGUGAGCCAAGGAACCUAGUCGGUAAUA G

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

(表 6 の続き)

配列番号	名称	配列:
82	5'イントロン断片8(ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	CAAUAAAAGUGCGAAACGUUAUCCUAUAAGUAAGAAAGUUUUAA AAUUUUUCUUACGAAAAGGAUAGAACUUAAGUUCUAACUGUUC UACUAAAGUAAUAAGUGAAAAUCUUAUUUAAAGCAAACAACCAA GUAGCUUUAAAGUCUAAGUCCCCUACACAAGUUUUUAUCUACUAU GCAAAACUUGUGAAGCUAGGUAAGGUCGUAUCCGUGAAAGUCG GAUGCGGGGCUCCUUAAAAGAUUACUAUGGUAAACUAAGCUAA UCCAUAAGAUGCGAUUUUAUGUAUUUUUAUCUGUUAAAUUU UUUUGUGCUUGUGGCUUGGUAUAAAACAGUUAAGAUGAAGUACUU AACUGGUUUUGGAUAUUGGUUGUUAACUAAAACAUUAUAAA UCGUUAAGUGGAUACCUAAGGUAUUAUAAAUAAGGGAUAGGUA AUGGAACGUUUGAUGCUGUAUAUGAAGAGGUUUAGUAAGAACC UAGGACACUAUACGGGCUAGCAGGUUCAUAGUAGCUAUGAUACU CAGCCGGAAGUCAAUUAAUUUUUGAAUACUUCUAUGGUAAACUA GGAGAAGGAUAAAACUGAGUGAGCCAAGGAACCUAGUCGGUAU AG
83	5'イントロン断片9(ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	GUGCGACUAGUAAAGUGCUUAAUAACAAUGUGGUGAAAGCCCAC CAGAUAAACCAUUAUCUGAGCUCAGACGGUAUGCAUUAAGAAGUA AUUCUUUUUGUGUAAAGCCCGUUUAAUUUGGUAACAGACCAACC AACCUAUUAUAAGGAUGGUGAGCUAUUUACUAUGGAUAAAAU UUUUAUGAAUUCACGUUCGAAGCGUAUUAGAGUGAGUUUUUU AGAAGGAAAAAAGUAAAUAAAUAUUAUUUUAUUAACAA UUUUUCGUUUGUUUAUUAUUGGUGCUUAUUAUUUAUGUACGUAU AGUGAAAUCCUAAGGUAGUAAAUAAAGGUGUUAUUAAGUAAACUA GGUAAGCCCAUAAUUAUCUUCUAUAGAUAGUAUGAAGAAGUUC AGUGUAAAUUUGAAUUAUUAUUAGUGGGUAAAGGAUAAUUUAAA AAGCGAAUGUCUCAUUAUUAUAGUGAGAAUAGGUUUUAGACUAA UUCGAAAGAAUGCUGACUUAUUUUUAUUAUUAUUAU
84	5'イントロン断片10(ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	GUGCGACUAGAUAAAGUACUUAUAGCAAUGUGGUGAAAGUCCAC CUGAUAAACCAUAGUCUGAGCUCAGACGGUAUGCAUUAAGAAGUA AUUCUUUUUGUGUAAAGCCCGUUUAAUCUGGUCUAAAGGACCUUC CACCCUAAAUUAUUAAGGGGAGAGCUAAAUACUAAGGAUAAAA UUUUUUUUGAAUUCAGUUUUAAAGCGUAUUAGAGGAAAUUUUU CUAUGAAAAAGAAAGAAUAAAUUUUUUAUUAACUGUAUAAACAA GUUUUCGUUUGUUUAUUAAGUGGGUCUUAUGUUAUAGUACGUAU AGUGGAUCCUAAGGUUAUUAUUAAGGUGUUAUUAAGUAAACUA GGUAAGCCCAUAGUGUCUUCUAUUAUUAUUAUGAAGAAGUUC AUUGUGAAAUUGAAUUAUGCAUUAUGUGGGUAAAGGAUAAUUUAAA AAGCGAAUGUCUCAUUAUUAUAGUGAGAAUAGGUCUAUGACUAA UUCGAAAGAAUGCUGACUUAUUUUUGGUUAUUAUUAUAGCGU
85	5'イントロン断片11(ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)	GUGCGACUUGUUUAAAGUUUUUAAACAAAAAUUGUAUACGUUUUAUUA AUGAUUAUACAUUGUAUUUUAUCUUAACAAUAGCCUAAUUAGAUUA UGCAUUUAGGGUAACUUUUUUGUAUAAAGCUCUAAUUUAUAGUG UAAAUACACUUUUAGGCUUCUUCUAUGGUUAGAGAAAUACGAACC AAUGUAAUUAACUUUGAUGUAUUAGGCAUUUAACGUGUCCUU GGUUAUUAUGAAGAUAAACUAAGUAUACAAAGUAAAUUGGAAC CUAAGGAAGAAUUGUUUUUGUUAAGAAACAAGGUAAUACCUAUA ACUGGCUAUUAUAAAUUUGCAAGGUUUUAUUGUAAAAUAAACUAU AGGUUAGAGGUAAAAGGAUAAUGUAAAAAGCGAAUGCAAUUCUG UAAUGGAUUUGAUAGGGUAUUAUACCUAAGAAAGAGUGUGA CUUACAUUAUAGAUUUUUUACGU

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

(表 6 の続き)

配列 番号	名称	配列:
86	5'イントロン断片12(ドメイン4でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)。	GUGCGACUAGUAAAAGUGUUUAAUAAUAAUGUGGUGAAAACCCAC CAGAUAAACCCAUUAUCUGAGCUCUAUACGGUGUGCAUUAAAAGUA AUUUUUUUGUAUAAAAGCCCGUUUAAUCAGGUAAAUAUCCUUC AUCCUAAUUUAUUCUAUAGAUUAAAAGGAUGGUGAGCUAUUU ACUAUGGAUAAGAUAUUUUUUGAAUUCACGUUUUGAAGCGUAUUAG AGUAAGUUUUAAUUAAAAGGAAAAAAAAAAAUUAAAUAUUUA AAUUAAUUGUAUAAAUAAGUUUUCGUUUUUUUAAUUAUUGGGUCU UAUAAUUAUGUACGUUAUAGUGAAAUCCUAAUGUAGUAAUUAAAGG UGUUAAUAAAUAACUAGGUAAAGCCCAAUAUGUCUUAUAAUA UGAAGAAGUUCAGUGUAAAUUUGAAUAUACAUUAGUGGGUAAA GGAUAAUUUAAAAGCGAAUGUCUCAUAAUAAUAGUGAGAAUAG GUCUAUGACUAAUUCGAAAGAAUGCUGACUAAAAUUAUUAUUA AUAAUAAUUAU
87	5'イントロン断片12(ドメイン1でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)。	CAAUAAAAGUGCGAAACGUUAUCCUUAUAGUAAGAAAGUUUUAA AAUUUUUCUUAACGAAAAGGAUAGAACUUAAGUUCUACUGUUC UACUAAAGUAAUAAGUGAAAAUCUUAUUUAAAGCAAACAACCAA GUAGCUUUAAAGUCUAAGUCCCCUACACAAGUUUUUAUACUACU GCAAAACUUGUGAAGCUAGGUAAAGGUCGUAUCCGUGAAAGUCG GAUGCGGGGCUCUUAAAAGAUUACUUGGUAAACAUAAAGCUAA UCCAUAAGAUGCGAUUUUAUUGUAUUUUUAUACUGUUAAAUAUU UUUGUGCUUGUGGCUUGGUUAAAACAGUUAAGAUGAAGUACUU AACUGGUUUUG
88	5'イントロン断片12(ドメイン3でグループIIイントロンをセグメント化することによって得られる)。	CAAUAAAAGUGCGAAACGUUAUCCUUAUAGUAAGAAAGUUUUAA AAUUUUUCUUAACGAAAAGGAUAGAACUUAAGUUCUACUGUUC UACUAAAGUAAUAAGUGAAAAUCUUAUUUAAAGCAAACAACCAA GUAGCUUUAAAGUCUAAGUCCCCUACACAAGUUUUUAUACUACU GCAAAACUUGUGAAGCUAGGUAAAGGUCGUAUCCGUGAAAGUCG GAUGCGGGGCUCUUAAAAGAUUACUUGGUAAACAUAAAGCUAA UCCAUAAGAUGCGAUUUUAUUGUAUUUUUAUACUGUUAAAUAUU UUUGUGCUUGUGGCUUGGUUAAAACAGUUAAGAUGAAGUACUU AACUGGUUUUGGAUAUUUGGUUGUUAAAACUAAAACAUUAUAAA UCGUUAGUGGAUACCUAAGGUAAUCAAAAAUAGGGAUAGGUAGA A

【 0 5 5 4 】

10

20

30

40

50

【表 10 - 1】

表 10 : 標的配列

配列番号	名称	配列:
107	Gluc	AUGGGAGUCAAGUUCUGUUUGCCUGAUCUGCAUCGCGUGUGGCCGAGGC CAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACUUAACAUCGUGGCCGUGGCCAGCAA CUUCGCGACCGGAGCUCGAUCGUGACCGCGGGAAGUUGCCCGGCAAGAA GCUGCCGCGUGGAGGUGCUCAAAGAGAUGGAAGCCAAUGCCCGGAAAGCUGG CUGCACCGAGGGGCGUGUCGAUCGUGCCUGUCCCAUCAAGUGCACGCCCAA GAUGAAGAAGUUCAUCCAGGACGCGUGCCACACCUACGAAGGCGACAAAGA GUCCGCACAGGGCGGCAUAGGCGAGGCGAUCGUCGACAUUCUGAGAUUCC UGGGUUAAGGACUUGGAGCCCAUGGAGCAGUUAUCGCGACAGGUCGAUCU GUGUGUGGACUGCACAACUGGCUGCCUCAAGGGGCUUGCCAACGUGCAGUG UUCUGACCUGCUCAGAAGUGGCUGCCGCAACGCGUGUGCGACCUUUGCCAG CAAGAUCGAGGGGCCAGGUGGACAAGAUAAGGGGGCCGGUGGUGACUAG
108	EGFP	AUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUUAACCGGGGUGGUGCCCAUCCUGGU CGAGCUGGACGGCGACGUAACCGGCCACAAGUUCAGCGUGUCCGGCGAGGG CGAGGGGCGAUGCCACCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUAUCUGCACCAC CGGCAAGCUGCCCGUGCCCGUGGCCACCCUCGUGACCACCCUGACCUACGG CGUGCAGUGCUUCAGCCGCUACCCCGACCACAUGAAGCAGCACGACUUCUU CAAGUCCGCCAUGCCCGAAGGCUACGUCCAGGAGCGCACCAUCUUCUUA GGACGACGGCAACUACAAGACCCGCGCCGAGGUGAAGUUCGAGGGCGACAC CCUGGUGAACCGCAUCGAGCUGAAGGGCAUCGACUUAAGGAGGACGGCAA CAUCCUGGGGCACAAGCUGGAGUACAACUACAACAGCCACAACGUCUAUUA CAUGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAUCAAGGUGAACUUAAGAUCGCCCA CAACAUCGAGGACGGCAGCGUGCAGCUCGCCGACCACUACCAGCAGAACAC CCCCAUCGGCGACGGCCCCGUGCUGCUGCCCGACAACCACUACCUGAGCAC CCAGUCCGCCUGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAUCACAUGGUCCU GCUGGAGUUCGUGACCGCCGCGGGGAUCACUCUCGGCAUGGACGAGCUGUA CAAGUAG
109	Rluc	AUGGCUUCCAAGGUGUACGACCCCGAGCAACGCAAACGCAUGAUCACUGGG CCUCAGUGGUGGGCUCGCGUGCAAGCAAUAUGAACGUGCUGGACUCCUUAUC AACUACUAUGAUUCCGAGAAGCACGCCGAGAACGCCGUGAUUUUUCUGCAU GGUAACGCUGCCUCCAGCUACCUGUGGAGGCACGUCGUGCCUCACAUCGAG CCCGUGGCUAGAUGCAUCAUCCUGAUCUGAUCGGAUUGGGUAAGUCCGGC AAGAGCGGGAAUGGCUCAUAUCGCCUCCUGGAUCACUACAAGUACCUCACC GCUUGGUUCGAGCUGCUGAACCUUCCAAAGAAAAUCAUCUUUGUGGGCCAC GACUGGGGGGCUUGUCUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCACCAAGACAAG AUCAAGGCCAUUCGUCCAUGCUGAGAGUGUCGUGGACGUGAUCGAGUCCUGG GACGAGUGGCCUGACAUCGAGGAGGAUAUCGCCUGAUAAGAGCGAAGAG GGCGAGAAAAUGGUGCUUGAGAAUAACUUCUUCGUCGAGACCAUGCUCCCA AGCAAGAUCAUGCGGAAACUGGAGCCUGAGGAGUUCGUGCCUACCUGGAG CCAUUAAGGAGAAGGGCGAGGUUAGACGGCCUACCCUCUCCUGGCCUCGC GAGAUCCUCUCGUUAAGGGAGGCAAGCCCGACGUCGUCCAGAUUGUCCGC AACUACAACGCCUACCUUCGGGCCAGCGACGAUCUGCCUAGAUGUUAUC GAGUCCGACCCUGGGUUCUUUCCAACGCUAUUGUCGAGGGAGCUAAGAAG UUCCCUAACACCGAGUUCGUGAAGGUGAAGGGCCUCCACUUCAGCCAGGAG GACGCUCCAGAUGAAUGGUAAGUACAUAAGAGCUUCGUGGAGCGCGUG CUGAAGAACGAGCAGUAA

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

(表 10 の続き)

配列 番号	名称	配列:
110	Fluc	AUGGCCGAUGC UAAGAACA UUAAGAAGGGCCCGUCUCCCUUCUACCCUCUG GAGGAUGGCACCGCUGGCGAGCAGCUGCACAAGGCCAUGAAGAGGU AUGCC CUGGUGCCUGGCACCAUUGCCUUCACCGAUGCCCACAUUGAGGUGGACAUC ACCU AUGCCGAGUACUUCGAGAU GUCUGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAG AGGUACGGCCUGAACACCAACCAACCGCAUCGUGGUGUGCUCUGAGAACUCU CUGCAGUUCUUAUGCCAGUGCUGGGCGCCCGUUCUUCGAGUGGCCGUG GGCCCCUGCUAACGACAUUUACAACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGG CAUUUCUCAGCCUACCGUGGUGUUCGUGUCUAAGAAGGGCCUGCAGAAGAU CCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCUAUCAUCCAGAAGAUCAUCAU AUGGA CUCUAAGACCGACUACCAAGGGCUUCCAGAGCAUGUACACAUUCGUGACAU UCAUCUGCCUCCUGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGCCAGAGUCUUUCGA CAGGGACAAAACCAUUGCCCGUAUCAUGAACAGCUCUGGGUCUACCGGCCU GCCUAAGGGCGUGGCCCGUGCCUCAUCGCACCGCCUGUGUGCGCUUCUCUCA CGCCCCGCGACCCUAUUUUCGGCAACCAAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUUCU GAGCGUGGUGCCAUUCCACCAACGGCUUCGGCAUGUUCACCAACCCUGGGCUA CCUGAUUUUGCGGCUUUCGGGUGGUGCUGAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGC UGUUCUGCGCAGCCUGCAAGACUACAAA AUUCAGUCUGCCUGCUGGUGC CAACCCUGUUCAGCUUCUUCGCUAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACC UGUCUAACCGUCACGAGAUUGCCUCUGGCGGCGCCCCACUGUCUAAGGAGG UGGGCGAAGCCGUGGCCAAGCGCUUUAUCUGCCAGGCAUCCGCCAGGGCU ACGGCCUGACCGAGACAACCAAGCGCAUUCUGAUUACCCAGAGGGCGACG ACAAGCCUGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUGCCAUUCUUCGAGGCCAAGGUGG UGGACCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGAGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGU GUGUGCGCGGCCCUAUGAUUAUGUCCGGCUACGUGAAUAACCCUGAGGCCA CAAACGCCUGAUCGACAAGGACGGCUGGCGACUCUGGCGACAUUGCCU ACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCUGUGGACCGCCUGAAGUCUCUGA UCAAGUACAAGGGCUACCAAGGUGGCCCCAGCCGAGCUGGAGUCUAUCCUGC UGCAGCACCCUAACA UUUUCGACGCGGAGUGGCCGCGCCUGCCGACGACG AUGCCGGCGAGCUGCCUGCCGCGCUGCUGCUGGGAACACGGCAAGACCA UGACCGAGAAGGAGAUUGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUGACAACCGCCA AGAAGCUGCGCGGCGGAGUGGUGUUCGUGGACGAGGUGCCCAAGGGCCUG ACCGGCAAGCUGGACGCGCCGCAAGAUCCGCGAGAUCUGAUCAAGGCUAAG AAAGGCGGCAAGAUCCGCGUGUAA
111	RBD	AUGGACGCCAUGAAACGGGGACUGUGCUGCGUGCUGCUGCUGUGUGGGCGC CGUGUUCGUGUCACCUAGCCGGGUGCAGCCUACCGAGAGCAUCGUGCGGU UCCCUAACAUACAAACCGUGUGUCCAUUCGGCGAGGUGUUAACGCCACCA GAUUCGCCAGCGUGUACGCUUGGAUAGAAAAAGAAUCUCUAAUUGCGUGG CCGAUUACAGCGUGCUGUACAACAGCGCCUCCUUCAGCACCUUCAAGUGCU ACGGCGUGUCCCCACCAAGCUGAACGACCUGUGCUUCACAAUUGUCUACG CCGAUAGCUUCGUGAUUAGAGGCGACGAGGUGAGGCAGAUCGCUCCAGGCC AGACCGGCAAGAUCGCGUAUUAACAACUACAAGCUGCCUGAUGACUUCACAG GAUGUGUGAUCGCCUGGAACAGCAACAACCUAGACAGCAAGGUGGGAGGCA ACUACA AUUACCGUAUAGACUGUUCAGAAAGUCCAACCGUAAGCCCUUCG AGAGAGACAUCAGCACCGAAAUCUACCAAGGCCGCGUCCACCCCUUGCAACG GAGUGGAAGGCUUACAUCGCUACUUCGCCUGCAGAGCUACGGUUUUCAGC CUACCAACGGCGUGGGCUACCAAGCCUACCGCGUGGUUGUGCUGAGCUUCG AGCUGCUGCACGCCCCAGCUACAGUGUGCGGCCCUAAGAAAUCUACCAACC UGGUGAAGAACAAGGGCUAUUACCCCGAGGCCCUAGAGACGGCCAAGCCU ACGUGCGGAAGGACGGCGAAUGGGUCCUGCUCAGCACAUUCCUGGGCAGCU GA

10

20

30

40

50

【表 10 - 3】

(表 10 の続き)

配列 番号	名称	配列:
112	saCAS9	AUGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGUCGGUAUCCACGGAGUCCCAGCAGCC AAGCGGAACUACAUCCUGGGCCUGGACAUCGGCAUACCAGCGUGGGCUAC GGCAUCAUCGACUACGAGACACGGGACGUGAUCCGAGUCCGGCGUGCGGCUG UUCAAAGAGGGCCAACGUGGAAAACAACGAGGGCAGGCGGAGCAAGAGAGGC GCCAGAAGGCUGAAGCGGGCGAGGCGGCAUAGAAUCCAGAGAGUGAAGAAG CUGCUGUUCGACUACAACCUGCUGACCGACACAGCGAGCUGAGCGGCAUC AACCCCUACGAGGGCCAGAGUGAAGGGCCUGAGCCAGAAGCUGAGCGAGGAA GAGUUCUCUGCCGCCUGCUGCACCUGGCCAAGAGAAGAGGGCGUGCACAAC GUGAACGAGGUGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCUGUCCACCAAAGAGCAG AUCAGCCGGAACAGCAAGGCCUGGAAGAGAAAUACGUGGCCGAACUGCAG CUGGAACGGCUGAAGAAAGACGGCGAAGUGCGGGGCAGCAUACAGAUUC AAGACCAGCGACUACGUGAAAGAAGCCAAACAGCUGCUGAAGGUGCAGAAG GCCUACCACCAGCUGGACCAGAGCUUCAUCGACACCUACAUCGACCUGCUG GAAACCCGGCGGACCUACUAUGAGGGACCUGGGCGAGGGCAGCCCCUUCGGC UGGAAGGACAUCAAAGAAUGGUACGAGAUUCUGAUGGGCCACUGCACCUC UCCCCCGAGGAACUGCGGAGCGUGAAGUACGCCUACAACGCCGACCUGUAC AACGCCUGAACGACCUGAACAAUCUCGUGAUCACCAGGACGAGAACGAG AAGCUGGAUAUUAACGAGAAGUUCGAGAUCAUCGAGAACGUGUUAAGCAG AAGAAGAAGCCACCUGAAGCAGAUCCGCAAGAAAUCCUCGUGAACGAA GAGGAUAUUAAGGGCUACAGAGUGACCAGCACCGGCAAGCCCGAGUUCACC AACCUGAAGGUGUACCACGACAUAAGGACAUAUACCGCCCGGAAAGAGAUU AUUGAGAACGCCGAGCUGCUGGAUCAGAUUGCCAAGAUCUGACCAUCUAC CAGAGCAGCGAGGACAUCAGGAAGAACUGACCAAUUGAACUCCGAGCUG ACCCAGGAAGAGAUCCGAGCAGAUUCUUAUUCUGAAGGGCUAUACCGGCACC CACAACCUGAGCCUGAAGGCCAUCAACCUGAUCCUGGACGAGCUGUGGCAC ACCAACGACAACCAGAUCCGCUAUUCUUAACCGGCUGAAGCUGGUGCCCAAG AAGGUGGACCUGUCCCAGCAGAAAGAGAUCCCCACCACCCUGGUGGACGAC UUCAUCCUGAGCCCCGUCGUGAAGAGAAGCUUCAUCCAGAGCAUCAAAGUG AUCAACGCCAUCAUCAAGAAGUACGGCCUGCCCAACGACAUAUUAUCGAG CUGGCCCGCGAGAAGAACUCCAAGGACGCCCAGAAAAUGAUCAACGAGAUG CAGAAGCGGAACCGGCAGACCAACGAGCGGAUCGAGGAAAUCAUCCGGACC ACCGGCAAAGAGAACGCCAAGUACCUGAUCCGAGAAGAUCAAGCUGCACGAC AUGCAGGAAGGCAAGUGCCUGUACAGCCUGGAAGCCAUCCUCUGGAAGAU CUGCUGAACAAACCCCUUAACUAUGAGGUGGACCACAUAUCCCCAGAAGC GUGUCCUUCGACAACAGCUUACAACAAGGUGCUCGUGAAGCAGGAAGAA AACAGCAAGAAGGGCAACCGGACCCCAUUCAGUACCUGAGCAGCAGCGAC AGCAAGAUACGCUACGAAACCUUCAAGAAGCACAUCCUGAAUCUGGCCAAG GGCAAGGGCAGAAUCAGCAAGACCAAGAAAGAGUAUCUGCUGGAAGAACGG GACAUCAACAGGUUCUCCGUGCAGAAAGACUUCAUACCGGAACCUGGUG GAUACCAGAUACGCCACCAGAGGCCUGAUGAACCGUGCUGCGGAGCUACUUC AGAGUGAACAAACCUGGACGUGAAAGUGAAGUCCAUAUUGCGGGCUUCACC AGCUUUCUGCGGCGGAAGUGGAAGUUUAAGAAAGAGCGGAACAAGGGGUAC AAGCACCAACGCCGAGGACGCCUGAUCAUUGCCAACGCCGAUUUCAUCUUC AAAGAGUGGAAGAAACUGGACAAGGCCAAAAAAGUGAUGGAAAACCAGAUG

10

20

30

40

50

【表 10 - 4】

(表 10 の続き)

配列 番号	名称	配列:
		UUCGAGGAAAAGCAGGCCGAGAGCAUGCCCGAGAUCGAAACCGAGCAGGAG UACAAAGAGAUUCUUCUACACCCCCACCAGAUCAAGCACAUUAAGGACUUC AAGGACUACAAGUACAGCCACCGGGUGGACAAGAAGCCUAAUAGAGAGCUG AUUAACGACACCCUGUACUCCACCCGGAAGGACGACAAGGGCAACACCCUG AUCGUGAACAAUCUGAACGGCCUGUACGACAAGGACAAUGACAAGCUGAAA AAGCUGAUCAACAAGAGCCCCGAAAAGCUGCUGAUUGUACCACCACGACCCC CAGACCUACCAGAAACUGAAGCUGAUUAUGGAACAGUACGGCGACGAGAAG AAUCCCCUGUACAAGUACUACGAGGAAACCGGGAACUACCUGACCAAGUAC UCCAAAAAGGACAACGGCCCCGUGAUCAAGAAGAUUAAGUAAUACGGCAAC AAACUGAACGCCCAUCUGGACAUCACCGACGACUACCCCAACAGCAGAAAC AAGGUCGUGAAGCUGUCCUGAAGCCCUACAGAUUCGACGUGUACCUGGAC AAUGGCGUGUACAAGUUCGUGACCGUGAAGAAUCUGGAUGUGAUCAAAAAA GAAAACUACUACGAAGUGAAUAGCAAGUGCUAUGAGGAAGCUAAGAAGCUG AAGAAGAUCAAGCAACCAGGCCGAGUUUAUCGCCUCCUUCUACAACAACGAU CUGAUCAAGAUCAACGGCGAGCUGUAUAGAGUGAUCGGCGUGAACAAACGAC CUGCUGAACCGGAUCGAAGUGAACAUCAUCGACAUCACCUACCGCGAGUAC CUGGAAAACAUGAACGACAAGAGGGCCCCCAGGAUCAUUAAGACAAUCGCC UCCAAGACCCAGAGCAUUAAGAAGUACAGCACAGACAUUCUGGGCAACCUG UAUGAAGUGAAAUCUAAAGAAGCACCCUCAGAUCAUAAAAAGGGCAAAAGG CCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGAUCCUAC CCAUACGAUGUUCAGAUUACGCUUACCAUACGAUGUUCAGAUUACGCU UACCCAUACGAUGUUCAGAUUACGCUAA

10

20

【0558】

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1 : アミノ酸配列

配列番号	名称	配列:
113	Gluc	MGVKVLFALICIAVAEAKPTENNEDFNIVAVASNFATTDLDADRGKLPGKKLPL EVLKEMEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGI GEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCKLGLANVQCSDLLKKWLP QRCATFASKIQGQVDKIKGAGGD
114	EGFP	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKL PVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNHYIMADKQKNGI KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSCKDPNEK RDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK
115	Rluc	MASKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHG NAASSYLWRHVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFE LLNLPKKIIFVGHWDWAGCLAFHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEE DIALIKSEEGEKMVLNFFVETMLPSKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRP TLSPREIPLVKGKPDVVQIVRNYNAYLRASDDLPMKFIESDPGFFSNAIVEG AKKFPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEMCKYIKSFVERVLKNEQ
116	Fluc	MADAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVDITYA EYFEMSURLAEAMKRYGLNTNHRIVVCSNSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDI YNERELLNSMGISQPTVVFVSKKGLQKILNVQKKLPKIIQKIIIMDSKTDYQGFQS MYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSSGSTGLPKGVALPHRTACV RFSHARDPIFGNQIIPDTAILSVPFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEELF LRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVA KRFLHLPGRQGYGLTETTSAILITPEGDDKPGAVGVVPPFEAKVVDLDTGKTLG VNQRGELCVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVD RLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVLEHG KTMTEKIVDYVASQVTTAKKLRGGVVVFDEVPKGLTGKLDARKIREILIAKK GGKIAV
117	RBD	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFAS VYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGSPTKLNDLCFTNVYADSFVIR GDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFR KSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVV VLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL GS
118	saCAS9	MAPKKKRKVGIGHVPAAKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEAN VENNEGRRSKRKGARRLKRHHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARV KGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNKALE EKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVKQAYHQLDQSFID TYIDLLETRRTTYEGPGEPSFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYN ADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEKFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNE EDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIAKILTIYQSSDI QEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAJNLILDELWHTNDNQIAIFNR LKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIEL AREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIIRTGKENAKYLIEKIKLHDMQEG KCLYSLEAIPLEDLLNPNFNYEVDHIIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKKGNR TPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGGRISKTKKEYLLEERDINRFVQKDF INRNLDVTRYATRGLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKER NKGKXKHAEDALIADFIKFKWKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKNRELINDTLYSTRKDDKGNLIVN NLNGLYDKDNDKLLKLKLINKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGDENPLYK YYEETGNLYTKYSKKNNGPVKKIKYGNKLNALHDITDDYPNSRNKVVKLSLK PYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKENYYEVNSKCYEEAKKKKISNQAEFIA SFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLNRIEVNMDITYREYLENMNDKRPRIKITA SKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGRPAATKKAGQAKKKKGSYPYD VPDYAYPYDVPDYAYPYDVPDYA

10

20

30

40

【0 5 5 9】

【表 1 2】

表 1 2 : EBS 1

配列番号	名称	配列:
119	EBS1 配列 1	UAGGGC
120	EBS1 配列 2	UUAUGG
121	EBS1 配列 3	UCAACG
122	EBS1 配列 4	UGUGGC

50

【 0 5 6 0 】

【表 1 3】

表 1 3 : I B S 1

配列番号	名 称	配 列 :
123	IBS1 配列 1	GCCCUG
124	IBS1 配列 2	CCAUGG
125	IBS1 配列 3	CGUUGA
126	IBS1 配列 4	GCCAUA

【 0 5 6 1 】

【表 1 4】

表 1 4 : δ 及びその上流配列

配列番号	名 称	配 列 :
127	δ 及びその上流配列 1	UGUGCU
128	δ 及びその上流配列 2	AAUGCU
129	δ 及びその上流配列 3	UGCUCU
130	δ 及びその上流配列 4	UGUGCU

【 0 5 6 2 】

【表 1 5】

表 1 5 : I B S 3 及びその下流配列

配列番号	名 称	配 列 :
131	IBS3 及びその下流配列 1	AGCAAA
132	IBS3 及びその下流配列 2	AGCAGU
133	IBS3 及びその下流配列 3	AGAGAA
134	IBS3 及びその下流配列 4	AGCAAA

【 0 5 6 3 】

10

20

30

40

50

【表 16 - 1】

表 16 : 真正細菌イントロン

名称	GenBank
A. v. I1	AY057439. 2:1648.. 4444
A. v. I2	NZ_AAAD01000052. 1:[3989.. 5847]
A. v. I3	CP001157. 1:2457039.. 2459231
A. v. I5	CP001157. 1:2471407.. 2473316
Ac. ca. I1	CP001472. 1:3723390.. 3725327
Act. pt. I1	AF369871. 1:[2878.. 4803]
Acv. sp. I1	CP000539. 1:[2353956.. 2355875]
Acy. ma. I1	CP000840. 1:[229001.. 230873]
Ag. r. I1	AP002086. 1:[134014.. 136195]
Ag. ra. I1	CP000629. 1:1749091.. 1750949
Al. ma. I1	CP001103. 3:[2968732.. 2970821]
Alc. vi. I1	CP001896. 1:3347252.. 3349087
Alc. vi. I2	CP001896. 1:961349.. 963350
Alk. or. I1	CP000853. 1:[2108190.. 2110275]
Als. sh. I1	FP929032. 1:[1396482.. 1398884]
Als. sh. I2	FP929032. 1:[3736965.. 3739343]
Als. sh. I3	FP929032. 1:[3352050.. 3354541]
Alx. bo. I1	AM286690. 1:701337.. 704551
Am. de. I1	CP001785. 1:1080266.. 1082151
An. pr. I1	CP001709. 1:88835.. 91175
An. v. I1	CP000121. 1:50858.. 53348
B. a. I1	AE011190. 1:[6579.. 9109]
B. a. I2	AE011190. 1:[30945.. 33835]
B. c. I1	AE016877. 1:[2627659.. 2630017]
B. c. I10	ABDM02000062. 1:[164204.. 166883]
B. c. I11	CP001285. 1:[9919.. 12544]
B. c. I12	CP001186. 1:725163.. 727690
B. c. I14	ABDM02000034. 1:[1922.. 4450]
B. c. I15	ABDL02000005. 1:[20000.. 22547]
B. c. I16	CP000228. 1:228934.. 231746
B. c. I17	CP000228. 1:6219.. 8855
B. c. I18	CP000227. 1:2102949.. 2105487
B. c. I2	AE017194. 1:[3444106.. 3446987]
B. c. I3	AE017194. 1:[3603527.. 3606193]
B. c. I4	AE017195. 1:[32766.. 35608]
B. c. I5	AE017195. 1:84166.. 86938
B. c. I6	DQ889679. 1:178948.. 181808
B. c. I7a	CP000040. 1:462018.. 464610
B. c. I8	CP000764. 1:[3216324.. 3218844]
B. h. I1	BA000004. 3:56387.. 58269
B. me. I1	AB022308. 1:3853.. 6569
B. me. I2	AF142677. 4:34045.. 36400
B. me. I3	CP001983. 1:1833173.. 1836068
B. my. I1	ACMV01000578. 1:1.. 2843
B. pf. I1	CP001879. 1:[169320.. 172131]
B. pf. I2	CP001879. 1:[140094.. 142818]

10

20

30

40

50

【表 16 - 2】

(表 16 の続き)

名称	GenBank
B. pf. I4	CP001879. 1:[132961..135833]
B. ps. I1	ACMX01000035. 1:32580..35423
B. sp. I1	NZ_AA0X01000004. 1:[96386..98244]
B. sp. I2	EF165030. 1:173..2955
B. th. I1	DQ025752. 1:[4351..6956]
B. th. I3	DQ363750. 1:30070..32039
B. th. I5	FM992108. 1:131..3040
B. th. I6	FM992109. 1:370..3180
B. th. I7	FM992111. 1:1064..3765
B. th. I9	CP000485. 1:[3657622..3660287]
Ba. fr. I1	AY515263. 1:[38446..40893]
Ba. t. I1	AE015928. 1:[2871095..2873499]
Ba. t. I2	AE015928. 1:[3241156..3243662]
Ba. t. I3	AE015928. 1:[3254698..3258524]
Ba. t. I4	AE015928. 1:[3254752..3256655]
Ba. vu. I1	CP000139. 1:2745315..2747743
Ba. vu. I2	CP000139. 1:2750217..2752618
Bo. pe. I1	AM902716. 1:1525067..1527603
Br. j. I1	BA000040. 2:2212569..2214373
Br. j. I2	BA000040. 2:2069342..2071253
Br. sp. I1	CP000494. 1:[6816299..6818172]
Brb. br. I1	AP008955. 1:811204..813093
Bu. ce. I1	CP000379. 1:[1630309..1632162]
Bu. ce. I2	AM747721. 1:[1153119..1155033]
Bu. f. I1	NZ_AAAC01000271. 1:[24723..26575]
Bu. f. I2	NZ_AAAC01000248. 1:[41364..43217]
Bu. f. I3	NZ_AAAC01000146. 1:[5817..7672]
Bu. vi. I1	CP000616. 1:[1220693..1222534]
Bu. vi. I2	CP000617. 1:381828..383697
Bu. xe. I1	CP000270. 1:3577975..3579828
Bu. xe. I2	CP000270. 1:[3157292..3159144]
By. fi. I1	FP929036. 1:1233324..1236128
c-Acb. ph. I1	CP001715. 1:[3647982..3649879]
c-Acb. ph. I2	CP001715. 1:2040775..2042757
c-Ku. st. I1	CT573074. 1:62738..64755
c-Mb. ox. I1	FP565575. 1:17703..19629
C. a. I1	AE001437. 1:[3710916..3712835]
C. be. I3	CP000721. 1:[3718265..3720149]
C. bo. I1	CP001083. 1:[3104052..3106759]
C. bo. I2	CP001581. 1:[2642061..2644554]
C. bo. I3	CP000963. 1:[80372..82873]
C. ce. I1	CP001348. 1:[3312256..3314954]
C. cf. I1	FP929037. 1:[497155..499743]
C. d. I1	AM180355. 1:596100..598746
C. d. I2	FN668944. 1:1876301..1878962
C. d. I3	FN668944. 1:4138141..4140922

10

20

30

40

50

【表 16 - 3】

(表 16 の続き)

名称	GenBank
C. kl. I1	AP009049. 1:559484.. 562141
C. pe. I1	AB236336. 1:19829.. 22579
Cc. w. I1	NZ_AADV01000039. 1:[6112.. 8597]
Cc. w. I3	NZ_AADV01000001. 1:413430.. 416144
Cc. w. I5	NZ_AADV02000007. 1:[20418.. 23139]
Cc. w. I6	NZ_AADV02000041. 1:[1790.. 4153]
Cc. w. I7	NZ_AADV02000076. 1:[9489.. 11634]
Cev. ja. I1	CP000934. 1:[3788874.. 3790736]
Ch. lu. I1	CP000096. 1:[751837.. 753995]
Ch. ph. I1	CP001101. 1:1470543.. 1472697
Ch. ph. I2	CP000492. 1:[3012641.. 3014550]
Ci. ro. I1	FN543502. 1:3382345.. 3385222
Ci. ro. I2	FN543502. 1:[3820414.. 3823001]
Co. ca. I1	FP929038. 1:3172164.. 3174036
Cu. me. I1	CP000352. 1:3134534.. 3137479
Cu. me. I2	CP000352. 1:269574.. 272518
Cu. ta. I1	CU633751. 1:[138639.. 140516]
Cu. ta. I2	CU633751. 1:[81150.. 83086]
Cx. sp. I1	X71404. 1:446.. 2898
D. h. I1	CP001336. 1:1633064.. 1638161
D. h. I2	CP001336. 1:1634688.. 1637195
D. h. I3	CP001336. 1:3041150.. 3043051
D. h. I4	AP008230. 1:[5193183.. 5195085]
D. h. I5	AP008230. 1:4383270.. 4385626
D. h. I6	AP008230. 1:[5169112.. 5171014]
D. h. I7	AP008230. 1:[5171857.. 5174375]
Dch. a. I1	CP000089. 1:759875.. 761862
Dh. re. I1	CP001734. 1:751396.. 753288
Dh. re. I2	CP001734. 1:[2610697.. 2612577]
Di. da. I1	CP001654. 1:[814296.. 816881]
Di. ze. I1	CP001655. 1:4627726.. 4629590
Di. ze. I2	CP001655. 1:[788411.. 790997]
Dsf. p. I1	CR522871. 1:[6124.. 8213]
Dsf. p. I2	CR522870. 1:[2856969.. 2859062]
E. c. I10	AB255435. 1:19779.. 21675
E. c. I11	EU935739. 1:16018.. 18678
E. c. I2	X77508. 1:518.. 2408
E. c. I3	CU928162. 2:337804.. 339627
E. c. I4	AB024946. 1:48555.. 50824
E. c. I5	AF074613. 1:58241.. 60646
E. c. I7	AY785243. 1:[414.. 2383]
E. c. I8	AP010910. 1:8403.. 10745
Ef. a. I1	AY248839. 1:1.. 1884
En. ca. I1	FN555436. 1:22093.. 24738
En. f. I3	AE016830. 1:[2249712.. 2252481]
En. fm. I1	NZ_AAAK03000007. 1:10877.. 13634

10

20

30

40

50

【表 16 - 4】

(表 16 の続き)

名称	GenBank
En. fm. I2	DQ321786. 1:12459.. 15138
En. fm. I3	FN424376. 1:[17411.. 20180]
En. fm. I4	AB105543. 1:1.. 2748
Eu. cy. I1	FP929041. 1:418271.. 421021
Eu. re. I1	CP001107. 1:2565508.. 2567889
Eu. re. I2	FP929043. 1:124807.. 126667
Eu. re. I3	CP001107. 1:[2051477.. 2053382]
Eu. si. I1	FP929044. 1:1418369.. 1421172
Eu. si. I2	FP929044. 1:1412093.. 1414472
Fa. pr. I1	FP929046. 1:1416454.. 1418833
Fa. pr. I2	FP929046. 1:829768.. 831634
Fl. jo. I1	CP000685. 1:[4416242.. 4418139]
Fr. sp. I2	CP000820. 1:[3485703.. 3488125]
Fr. sp. I4	CP000820. 1:1651830.. 1653736
Fr. sp. I5	CP000820. 1:4042148.. 4044207
G. v. I1	BA000045. 2:[168850.. 171364]
Gb. k. I2	BA000043. 1:1374694.. 1376580
Gb. sp. I1	CP001638. 1:[1801642.. 1803526]
Gb. sp. I2	CP001638. 1:537253.. 539140
Gb. sp. I3	CP001794. 1:[3211355.. 3213238]
Ge. s. I1	AE017180. 2:1028655.. 1030562
Ge. sp. I1	CP001390. 1:1082503.. 1084403
Ge. ur. I1	CP000698. 1:1525569.. 1527641
Ge. ur. I2	CP000698. 1:242469.. 244398
H. s. I1	CP000947. 1:[614920.. 618334]
Ha. ch. I1	CP000155. 1:4094997.. 4098178
Ha. ch. I2	NC_007645. 1:98723.. 100647
Hi. mo. I1	CP000930. 2:1358641.. 1360524
Hm. ar. I1	CU207211. 1:1002053.. 1004950
Hp. au. I1	CP000875. 1:6105650.. 6108021
Hp. au. I2	CP000875. 1:2316638.. 2319059
Kl. pn. I1	DQ153218. 1:[2031.. 3956]
Kl. pn. I2	EF382672. 1:[189794.. 192188]
Kl. pn. I3	FJ384365. 1:[1787.. 3733]
Kl. pn. I4	AJ971342. 1:[758.. 2678]
Kl. pn. I5	DQ449578. 1:[12052.. 13960]
Kl. pn. I6	FJ876827. 1:[8373.. 10644]
Ko. ol. I1	CP001634. 1:1320274.. 1322269
L. l. I1	U50902. 4:7222.. 9713
La. re. I1	AY911856. 1:603.. 2512
La. sa. I1	CP000233. 1:58703.. 60602
Le. pn. I1	AE017354. 1:[1176062.. 1178351]
Le. pn. I2	CP001828. 1:1305351.. 1307556
Le. pn. I3	CP000675. 2:[2799175.. 2801059]
Ly. sc. I1	CP000817. 1:[3907890.. 3910487]
Ma. mr. I2	CP000471. 1:[2463983.. 2465973]

10

20

30

40

50

【表 16 - 5】

(表 16 の続き)

名称	GenBank
Ma. mr. I3	CP000471. 1:785727.. 787568
Mic. sp. I1	AF339846. 1:29388.. 31287
Mo. th. I1	CP000232. 1:2324936.. 2328581
My. va. I1	CP000511. 1:2360134.. 2362120
N. sp. I1	BA000019. 2:[6207287.. 6209592]
N. sp. I2	BA000020. 2:259212.. 261420
N. sp. I3	BA000020. 2:258243.. 262762
N. sp. I4	AP003604. 1:45422.. 47908
Na. th. I1	CP001034. 1:[2741438.. 2743538]
Na. th. I2	CP001034. 1:[2315203.. 2317117]
Ni. ha. I1	CP000320. 1:[75444.. 77354]
Ns. e. I1	AL954747. 1:2285095.. 2287101
Nv. a. I1	AF079317. 1:43084.. 45661
Nv. a. I2	AF079317. 1:53812.. 56360
O. i. I1	BA000028. 3:[2785523.. 2787411]
O. i. I2	BA000028. 3:[2079836.. 2081783]
Oc. an. I1	CP000758. 1:1790728.. 1792653
OYPI1	AP006628. 2:[388234.. 390749]
P. a. I1	AF323437. 1:1.. 1924
P. ae. I1	AY029772. 1:[3515.. 5441]
P. ae. I2	CP000438. 1:[640489.. 643335]
P. ae. I3	EF611303. 1:15783.. 17632
P. p. I1	AF101076. 1:1.. 1920
P. p. I2	Y18999. 2:752.. 2957
P. p. I3	AE015451. 2:741473.. 743392
P. p. I4	CP000949. 1:[400713.. 403556]
P. p. I5	DQ988162. 1:[2099.. 4689]
P. s. I1	AE016853. 1:[2381076.. 2382906]
P. st. I1	CP000304. 1:1961716.. 1964635
P. st. I2	CP000304. 1:755737.. 757918
Pa. de. I1	CP000491. 1:19065.. 20924
Pbu. ph. I1	CP001043. 1:506909.. 509808
Pbu. ph. I2	CP001046. 1:[235287.. 237481]
Pbu. ph. I3	CP001046. 1:[170095.. 172008]
Pe. th. I1	AP009389. 1:[2583061.. 2585155]
Pe. th. I2	AP009389. 1:2519125.. 2521096
Peb. ca. I1	CP000142. 2:[2649551.. 2651540]
Peb. ca. I2	CP000142. 2:1608371.. 1610304
Pey. ph. I1	CP001110. 1:[398581.. 400415]
Ph. p. I2	CR378677. 1:243610.. 245714
Pht. I. I2	BX571862. 1:232816.. 234697
Pol. sp. I1	CP000316. 1:[4896821.. 4899617]
Pol. sp. I2	CP000316. 1:[5188267.. 5191068]
Pol. sp. I3	CP000316. 1:[4879088.. 4881888]
Pol. sp. I4	CP000316. 1:[970429.. 973227]
Pr. ae. I1	CP001108. 1:85758.. 87667

10

20

30

40

50

【表 16 - 6】

(表 16 の続き)

名称	GenBank
Pr. ae. I2	CP001108. 1:[682112.. 684268]
Pr. ae. I3	CP001108. 1:[2285675.. 2287507]
Pr. ae. I4	CP001108. 1:688308.. 690474
Pr. ae. I5	CP001108. 1:[670818.. 672686]
Pr. vi. I1	CP000607. 1:169617.. 171449
Ps. tu. I1	AAOH01000003. 1:353461.. 355380
Pt. mo. I1	CP000879. 1:[1358317.. 1360205]
Pv. r. I1	AY887109. 1:[1698.. 3623]
R. pi. I1	CP001068. 1:3298333.. 3301217
R. so. I1	CU694389. 1:[49404.. 51259]
Re. sp. I1	NZ_AA0E01000010. 1:129694.. 133129
Rh. op. I1	AP011115. 1:[3108320.. 3110812]
Rh. sp. I1	CP000432. 1:[23005.. 25058]
Ro. in. I1	FP929050. 1:3738659.. 3740507
Ro. in. I2	FP929049. 1:12968.. 14828
Ru. cm. I1	FP929052. 1:1525395.. 1528189
Ru. to. I1	FP929055. 1:1244183.. 1246940
Ru. to. I2	FP929055. 1:2325690.. 2327580
S. ag. I1	AJ292930. 1:182.. 2038
S. ag. I2	AE014217. 1:10188.. 12210
S. eq. I1	FM204884. 1:[1986162.. 1988470]
S. eq. I2	FM204884. 1:[1951740.. 1954234]
S. eq. I3	FM204884. 1:[1968250.. 1970644]
S. mi. I1	FN568063. 1:[1124531.. 1126388]
S. pn. I1	AF030367. 1:833.. 2754
S. pn. I2	FM211187. 1:[1246152.. 1248657]
S. py. I1	CP000262. 1:[1657366.. 1659841]
Sa. en. I1	AM932669. 1:[2406.. 4331]
Sb. mo. I1	CP001779. 1:734656.. 737020
Sb. mo. I2	CP001779. 1:[752270.. 754744]
Se. ma. I1	BX664015. 1:[172056.. 173964]
Se. ma. I2	AF453998. 2:[1526.. 3496]
Se. ma. I3	AY884051. 1:[2933.. 4858]
Sg. ce. I1	AM746676. 1:[9205316.. 9207294]
Sh. ba. I1	CP000563. 1:[2699774.. 2701938]
Sh. ba. I2	CP000563. 1:2137684.. 2139633
Sh. ba. I3	CP000891. 1:[1164604.. 1166759]
Sh. fr. I1	CP000447. 1:4148493.. 4150650
Sh. pi. I1	CP000472. 1:4966032.. 4968192
Sh. se. I1	CP000821. 1:3108662.. 3110815
Sh. sp. I1	CP000446. 1:[2526748.. 2528903]
Sh. sp. I2	CP000444. 1:645848.. 649292
Shg. dy. I1	CP000035. 1:[29397.. 31222]
Shg. f. I1	CP001383. 1:[1091555.. 1093825]
Sm. av. I1	BA000030. 4:[264494.. 266721]
So. us. I2	CP000473. 1:3231872.. 3233814

10

20

30

40

50

【表 1 6 - 7】

(表 1 6 の続き)

名称	GenBank
So. us. I3	CP000473. 1:[9594438. . 9596378]
So. us. I4	CP000473. 1:2550504. . 2552417
Sp. wi. I1	CP000701. 1:[78388. . 80930]
Sr. md. I1	CP000740. 1:[1030234. . 1032118]
Sr. me. I1	Y11597. 2:1. . 1518
Sr. me. I2	AE006469. 1:[1065612. . 1067822]
Sr. me. I5	EF066650. 1:146809. . 148801
Sy. wo. I1	CP000448. 1:170134. . 172134
Sy. wo. I2	CP000448. 1:[2254240. . 2256141]
Syb. fu. I1	CP000478. 1:3922427. . 3924309
Syb. th. I1	AP006840. 1:1010793. . 1012672
T. e. I2	CP000393. 1:5587083. . 5589603
T. e. I3	CP000393. 1:[680421. . 682946]
T. e. I4	CP000393. 1:[675663. . 678216]
T. e. I5	CP000393. 1:6034823. . 6037198
T. e. I6	CP000393. 1:[7378688. . 7381311]
T. e. I7	CP000393. 1:[7258498. . 7263621]
T. e. I8	CP000393. 1:[7261005. . 7263468]
Ta. it. I1	CP001936. 1:[2442736. . 2444647]
Ta. ps. I1	CP000924. 1:45196. . 47107
Ta. sp. I1	CP000923. 1:774653. . 776564
Ta. sp. I2	CP000923. 1:1286631. . 1288551
Tc. po. I1	CP002028. 1:264953. . 267042
Th. e. I1	BA000039. 2:27344. . 30566
Th. e. I3	BA000039. 2:[91363. . 93748]
Th. e. I7	BA000039. 2:624954. . 627338
Tm. sp. I1	FP475956. 1:[3005251. . 3007161]
UB. I1	AY691909. 1:[2430. . 4342]
UMB. I1	AY075117. 1:120. . 2136
Vi. an. I1	NZ_AAOJ01000008. 1:[2856. . 5011]
Vi. ch. I1	EU116440. 1:[1769. . 3745]
Vi. ha. I1	CP000789. 1:2600607. . 2602762
Vi. ha. I2	CP000790. 1:1339722. . 1341882
Vi. ha. I3	CP000789. 1:[2438671. . 2440560]
Vi. vu. I1	GQ292873. 1:3620. . 5549
Wo. sp. I1	CP001391. 1:130825. . 133124
Wo. sp. I3	AE017196. 1:950978. . 953271
Wo. sp. I6	AM999887. 1:[177114. . 178961]
Wo. sp. I7	AM999887. 1:[284826. . 286812]
X. f. I1	AE003849. 1:1691283. . 1693684
Zu. pr. I1	CP001650. 1:[4279634. . 4281497]
Zu. pr. I2	CP001650. 1:3589332. . 3591217

10

20

30

40

【 0 5 6 4】

【表 1 7】

表 1 7 : 古細菌イントロン

名称	GenBank
M. a. I1	AE011073. 1:4279.. 6431
M. a. I5	AE011130. 1:[2949.. 4823]
M. b. I1	CP000099. 1:2122631.. 2124795
M. m. I1	AE013515. 1:3337.. 5483
Mc. b. I1	CP000300. 1:800706.. 803724
Me. hu. I1	NC_007796. 1:3055567.. 3057700
Me. hu. I2	NC_007796. 1:[1521394.. 1523527]
UA. I1	AY714843. 1:21625.. 23730
UA. I10	FP565147. 1:[502990.. 504827]
UA. I2	AY714849. 1:[14494.. 16717]
UA. I3	AY714856. 1:10054.. 11891
UA. I4	AY714820. 1:20258.. 22206
UA. I6	FP565147. 1:2174430.. 2176370
UA. I7	FP565147. 1:[1619711.. 1621720]
UA. I8	FP565147. 1:2238167.. 2240107
UA. I9	FP565147. 1:[2809849.. 2811954]

10

20

【0 5 6 5】

【表 1 8】

表 1 8 : O R F のないイントロン

名称	GenBank
B. c. I13	CP001187. 1:[155442.. 156188]
B. c. I7b	CP000040. 1:3829.. 4655
B. th. I2	DQ025752. 1:[16908.. 17856]
Bu. xe. I3	CP000270. 1:[790064.. 790889]
C. pe. I2	DQ787115. 1:1.. 834
M. a. I6	AE010299. 1:[4030024.. 4030645]
OYPI2	AP006628. 2:[544682.. 545416]
Th. e. I11	BA000039. 2:1683646.. 1684491
Th. e. I2	BA000039. 2:27972.. 28810
Th. e. I4	BA000039. 2:219750.. 220594
Th. e. I5	BA000039. 2:[245778.. 246623]
Th. e. I6	BA000039. 2:444131.. 445814
Th. e. I9	BA000039. 2:1159085.. 1159922

30

【0 5 6 6】

【表 1 9】

表 1 9 : T w i n t r o n (外側イントロン)

名称	GenBank
Ba. t. I3	AE015928. 1:[3254698.. 3258524]
D. h. I1	CP001336. 1:1633064.. 1638161
N. sp. I3	BA000020. 2:258243.. 262762
T. e. I7	CP000393. 1:[7258498.. 7263621]
Th. e. I1	BA000039. 2:27344.. 30566
Th. e. I6	BA000039. 2:44413

40

【0 5 6 7】

50

【表 2 0】

表 2 0 : T w i n t r o n (内部イントロン)

名 称	GenBank
Ba. t. I4	AE015928. 1:[3254752.. 3256655]
D. h. I2	CP001336. 1:1634688.. 1637195
N. sp. I2	BA000020. 2:259212.. 261420
T. e. I8	CP000393. 1:[7261005.. 7263468]
Th. e. I2	BA000039. 2:27972.. 28810

【 0 5 6 8】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2 1 : ミトコンドリアイントロン

種	Genbank
シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	X98300
ダイズ (<i>Glycine max</i>)	U09988
エノテラ・ベルテリアーナ (<i>Oenothera berteriana</i>)	M63034
ソラマメ (<i>Vicia faba</i>)	M30176
トウモロコシ (<i>Zea mays</i>)	U09987
ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>)	M68929
ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>)	M68929
ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>)	M68929
ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>)	M68929
ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>)	M68929
ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>)	M68929
ゼニゴケ (<i>Marchantia polymorpha</i>)	M68929
クサシャジクモ (<i>Chara vulgaris</i>)	AY267353
メソステグマ・ビリデ (<i>Mesostigma viride</i>)	NC_008240
アマノリ属ブルブレア (<i>Porphyra purpurea</i>)	AF114794
アマノリ属ブルブレア (<i>Porphyra purpurea</i>)	AF114794
バブロワ・ルテリイ (<i>Pavlova lutheri</i>)	AF045691
ピラエラ・リトラリス (<i>Pylaiella littoralis</i>)	Z48620
ピラエラ・リトラリス (<i>Pylaiella littoralis</i>)	Z48620
ピラエラ・リトラリス (<i>Pylaiella littoralis</i>)	Z72500
ピラエラ・リトラリス (<i>Pylaiella littoralis</i>)	Z72500
ピラエラ・リトラリス (<i>Pylaiella littoralis</i>)	Z72500
タラシオシラ・シュードナナ (<i>Thalassiosira pseudoana</i>)	NC_007405
ロドモナス・サリナ (<i>Rhodomonas salina</i>)	NC_002572
ロドモナス・サリナ (<i>Rhodomonas salina</i>)	NC_002572
カワリミズカビ (<i>Allomyces macrogynus</i>)	U41288
リゾフィジウム属 (<i>Rhizophyidum</i>) 種 136	NC_003053
アカパンカビ (<i>Neurospora crassa</i>)	X14669
ポドスポラ・アンセリナ (<i>Podospira anserina</i>)	X55026
ポドスポラ・アンセリナ (<i>Podospira anserina</i>)	X55026
ポドスポラ・アンセリナ (<i>Podospira anserina</i>)	X55026
ポドスポラ・コマタ (<i>Podospira comata</i>)	Z69899
ポドスポラ・クルビコラ (<i>Podospira curvicolla</i>)	Z69898
ベンツリア・イナエクアリス (<i>Venturia inaequalis</i>)	AF004559
カンジダ・パラプシローシス (<i>Candida parapsilosis</i>)	NC_005253
カンジダ・ステラータ (<i>Candida stellata</i>)	NC_005972
クレイベロマイセス・ラクティス (<i>Kluyveromyces lactis</i>)	X57546
サッカロミセス・セレビシエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	V00694
サッカロミセス・セレビシエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	V00694
シゾサッカロミセス・ボンベ (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) EF2	X54421
シゾサッカロミセス・ボンベ (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	AJ251292
シゾサッカロミセス・ボンベ (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	AJ251293
シゾサッカロミセス・オクスポルス (<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>)	NC_004312
アモエビジウム・パラシクム (<i>Amoebidium parasiticum</i>)	AF538043

【 0 5 6 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 2 2 : 葉緑体イントロン

種	Genbank
ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum)	NC_001879
ゼニゴケ (Marchantia polymorpha)	X04465
セネデスムス・オブリクス (Scenedesmus obliquus)	P19593
オオシスタセア (Oocystacea) 種	S05341
ブリオシス・マキシマ (Bryopsis maxima)	X55877
ピレノモナス・サリナ (Pyrenomonas salina)	X81356
ユーグレナ・グラシリス (Euglena gracilis)	X70810
ユーグレナ・グラシリス (Euglena gracilis)	X70810
ユーグレナ・デセス (Euglena deces)	Z99833
ユーグレナ・ミトシリンドラセア (Euglena myxocylindracea)	Z99835
ユーグレナ・ビリディス (Euglena viridis)	Z99836
レポキンクリス・ブエッチリ (Lepocinclis buetschlii)	Z99834

10

20

30

40

50

【 0 5 7 0 】

【表 2 3 - 1】

表 2 3 : 細菌イントロン断片

名称	Genbank
A. sp. F1	U13767(3012~4881)
B. c. F1	NC_004722(2621273~2621348)
B. h. F1	AP001513(82798~82923)
B. h. F2	AP001509(236458~236855)
B. h. F3	AP001518(279207~279280)
B. j. F1	AF322013(11219~12768)
B. j. F2	AF322013(61716~62201)
B. j. F3	AF322013(64129~65049)
B. j. F4	AF322012(109786~110508)
B. j. F5	AF322012(~112711~113404)
B. the. F1	AE016936(56021~57802)
B. t. F1	AF547282(134~220)
B. c. F2	NC_005957(2284679~2284770)
C. g. F1	AP005279(216855~216940)
C. t. F1	AE015940(57392~57706)
E. f. F1	AF242872(5457~6118)
E. c. F1	X60106(205~727)
E. c. F2	D37919(1~1122)
E. c. F3	D37918(154~1590)
E. c. F4	AF044501(1631~1823)
E. c. F5	AE005360(2258~2450)
E. c. F6	AP002557(72163~72355)
E. c. F7	AF044503(8964~9122)
E. c. F8	AE016771(291635~291731)
E. c. F9	Y16016(83~1186)
Ma. sp. F2	NZ_AAAN01000054(6215~6748)
Ma. sp. F3	NZ_AAAN01000014(13~1609)
Ma. sp. F4	NZ_AAAN01000039(3099~3260)
Ma. sp. F5	NZ_AAAN01000139(22445~23847)
Ma. sp. F6	NZ_AAAN01000041(1963~3050)
M. lo. F1	AP003008(75689~76468)
M. b. F1	NZ_AAAR01001642(2313~2979)
M. le. F1	AL583918(25817~26960)
M. le. F2	AL583918(~200511~201270)
M. t. F1	AE006920(~407~1042)
P. al. F1	AF323438(1952~2634)
P. l. F1	BX571862BX571862(231958~235010)
P. p. F3	AF134348(~720~1494)
P. p. F4	AF006691(~19530~20220)
P. p. F5	AE016790(208013~209185)
P. p. F6	AF134348(825~1494)
P. p. F7	AJ245436(17048~17349)
P. sp. F1	X98999(4224~4418)
P. st. F1	AF039534(682~936)

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 2】

(表 2 3 の続き)

名称	Genbank
R. e. F1	AF176227(9216~10069)
R. e. F2	U80928(223116~224119)
R. e. F3	U80928(101332~101767)
R. sp. F1	AE000069(5461~6042)
S. a. F1	AP005021(264494~266317)
S. f. F1	D26468(3211~3612)
S. f. F2	AF348706(29835~31623)
S. f. F3	AF348706(151605~153082)
S. me. F1	AL603645(28607~30146)
S. o. F1	AE015645(2404~2930)
S. p. F1	AE007346(102~289)
S. p. F2	AE007409(11094-)~AE007410(-89)
S. p. F3	AE007372(5515~5697)
S. p. F4	AE007369(7460~7914)
S. p. F5	AE008434(1474~1963)
S. p. F6	AE008536(21~327)
S. p. F7	AE008467(9532~9877)
S. p. F8	AE007478(241~316)
S. p. F9	AE008471(9510~9837)
S. c. F1	AL049661(11519~11956)
Th. e. F1	AP005374(215166~215259)
Th. e. F2	AP005374(216672~217080)
Tr. e. F1	NZ_AAAU01000017(18413~20506)
Tr. 2. F2	NZ_AAAU01000002(9475~10805)
Tr. e. F3	NZ_AAAU01000059(16240~17497)
Tr. e. F4	NZ_AAAU01000021(53554~54961)
Tr. e. F5	NZ_AAAU01000021(55017~56144)
Tr. e. F6	NZ_AAAU01000021(56303~58137)
Tr. e. F7	NZ_AAAU01000021(58441~59419)
Tr. e. F11	NZ_AAAU01000039(19166~20116)
Y. e. F1	AF336309(40186~40488)
Y. p. F1	AF074611(54417~55543)

10

20

30

【0 5 7 1】

【表 2 4】

表 2 4 : 古細菌イントロン断片

名称	Genbank
M. a. I1-F1	AE011130(6248~7525)
M. a. I1-F2	AE010979(6611~7239)
M. a. I2-F1	AE011130(7526~9438)
M. a. I3-F1	AE011185(5745~7226)
M. a. I6-F1	AE010902(10030~10335)
M. a. F1	AE010964(6933~8146)
M. a. F2	AE010848(4041~4124)
M. a. F3	AE011134(6345~7286)
M. a. F4	AE010979(3887~6610)
M. b. F1	NZ_AAAR01001642(2313~2979)
M. b. F2	NZ_AAAR01001590(749~2058)
M. b. F3	NZ_AAAR01001948(294~620)

40

50

【実施例】

【0572】

本発明のより完全な理解及び適用のために、本発明は、実施例及び図面を参照して以下に詳細に説明され、実施例は、本発明を説明することのみを意図し、本発明の範囲を限定することを意図しない。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって具体的に規定される。

【0573】

8. 1. 実施例1. グループIIイントロンのスクリーニング

本実施例は、天然のグループIIイントロンのインビトロ自己スプライシング能を確認する方法に関する。

【0574】

第1に、DNA配列が、グループIIイントロン (Genewiz, Suzhou) の天然配列に従って直接合成され、合成された配列は、グループIIイントロン配列自体に加えて、天然に存在する隣接エクソンE1及びE2配列、特にグループIIイントロンに直接隣接するエクソン中のイントロン結合領域の全て又は一部を含んでいた。DNA配列を、分子生物学的方法によって、Rluc (ウミシイタケルシフェラーゼ) のコード配列、T7プロモーター及びT7ターミネーターを含む改変発現ベクターpsicheck-2 (Promega, C8021) にクローニングした。具体的には、psicheck-2を単一のエンドヌクレアーゼであるXhoI (New England Biolabs (NEB)) で消化した後、合成したDNA配列を、Rlucの3'下流に位置するDNAシームレスアセンブリ法 (Abclonal Technology, Wuhan) を用いて酵素消化したベクターにクローニングして、対応する構築物を得た。この発現ベクターの骨格は、T7プロモーター及びT7ターミネーターを含むpsicheck-2であった。

【0575】

T7プロモーター及びT7ターミネーターのユニバーサルプライマーを用いて上記ベクターに対してPCR増幅を行い、転写のための鋳型DNAを得た。PCR反応条件は、95℃で30秒間、60℃で20秒間、及び72℃で60秒間、23~25サイクルであった。PCR増幅して得られた鋳型DNAを体積比1:1のフェノールクロロホルムで抽出した後、2.5倍体積の無水エタノールで沈殿させて精製した。

【0576】

精製した鋳型DNAを、T7 RNAポリメラーゼ (NEB又はPromega) によってインビトロで転写し、転写反応を、製造業者の説明書によって推奨される条件に従って行った。転写産物をDNアーゼIにより37℃で30分間消化して、PCR鋳型を分解した。次いで、転写産物をカラム精製によって精製して、高純度RNAを得た。

【0577】

カラム精製した転写RNAを、自己スプライシング反応のために自己スプライシング緩衝液 (10、20、50又は100mM MgCl₂、50mM NaCl、40mM Tris-HCl、pH=7.5) に添加した。反応条件は、95℃で1分、75℃~45℃ (-0.5℃で15秒/サイクル、合計60サイクル)、緩衝液を加えて45℃で保持、45℃で5分、53℃で15~30分とした (図2B参照)。インビトロで自己スプライシング反応が起こった後、200ngの産物を1.5%の濃度でアガロースゲル上での電気泳動分析に使用して、グループIIイントロンの自己スプライシング効率を検出した。

【0578】

自己スプライシングが首尾よく起こった場合、異なるサイズの2つのRNAが産生される。スプライシングされていないRNAはサイズがより大きく、ゲル電気泳動図の上部にあり、スプライシングされたRNAはサイズがより小さく、ゲル電気泳動図の下部にある。例えば、図3は、上述の方法によって同定された、自己スプライシングを行い得る2つのグループIIイントロン、すなわち、バチルス・チューリングエンシス (Bacillus thu

10

20

30

40

50

ringiensis) 由来のグループ I イントロン B t h 及びクロストリジウム・テタニ (C l o s t r i d i u m t e t a n i) 由来のグループ I イントロン C t e の電気泳動結果を示す (図 3) 。図 3 中の矢印は、それぞれ、電気泳動によって分離されたスプライシングされていない R N A 及びスプライシングされた R N A を示す。この実施例の方法によって確認されたグループ I イントロン及びその隣接エクソン配列 (例えば、それぞれ、B t h 及び C t e のグループ I イントロン並びにそれらの隣接 E 1 の 6 ヌクレオチド及び隣接 E 2 の 6 ヌクレオチドを含む、配列番号 1 又は配列番号 2) を、c R N A z y m e 前駆体とも呼ばれる自己スプライシングリボザイム構築物 c R N A z y m e の調製のための前駆体として使用した。

【0579】

10

8. 2. 実施例 2. グループ I イントロンを含む発現構築物の調製

スクリーニングによって得られた自己スプライシング特性を有するグループ I イントロン c R N A z y m e 前駆体に基づいて、自己スプライシングリボザイム c R N A z y m e 構築物を更に調製した。上記のように、c R N A z y m e 構築物を設計するための全般的な原理は、イントロン配列並びに E 1 及び E 2 配列の全長が可能な限り短く、環状化率が可能な限り高いことである。

【0580】

本実施例は、実施例 1 においてスクリーニングされた C t e c R N A z y m e 前駆体を用いて c R N A z y m e 構築物を設計及び調製するプロセスを詳細に記載する。

【0581】

20

C t e c R N A z y m e 前駆体配列 (配列番号 2、合計 1, 028 ヌクレオチド長、C t e イントロン自体及び両端に 6 ヌクレオチドのエクソン配列を含む、すなわち、E 1 及び E 2 の両方が 6 ヌクレオチド長である) に基づいて、ドメイン 4 中の 310 ヌクレオチドのイントロンコードタンパク質 (I E P) 配列 (配列番号 2 のヌクレオチド位置 625 ~ 934) を欠失させ、正確に折りたたまれ、自己スプライシング活性を維持することができ、両端に数個のエクソン部分 (各々 6 n t、すなわち、I B S 1 及び I B S 3) を含む配列を保持し、それによって E 1 - C t e Δ I E P - E 2 配列を得た。次いで、E 1 - C t e Δ I E P - E 2 配列をイントロンの内側の位置で分割した。セグメント化後の 2 つの断片の位置を交換し、E 1 及び 5' イントロン断片からなる第 1 の断片をインサート R l u c の 3' 末端に構築し、3' イントロン断片及び E 2 からなる第 2 の断片をインサート R l u c の 5' 末端に構築した。これに基づいて、新たに形成された断片の 5' 末端に A A T A C C T T A C T T A A T A G T A A C A A T A G A A A A T C (配列番号 14) を挿入し、3' 末端に A A G C T A G A T C A T A T T A C T A T T A A G T A A G G T A T T (配列番号 15) を挿入して、c R N A z y m e _ C t e 構築物を得た。配列番号 14 及び配列番号 15 の 2 つの挿入された配列は、5' 及び 3' スプライス部位を互いに近づけ、スプライシング効率を改善するための「相同アーム」として機能した。イントロンをセグメント化する場合、3 つの異なるセグメント化位置が試みられ、これらは、それぞれ、ドメイン 1 (369 位と 370 位との間)、ドメイン 3 (560 位と 561 位との間)、及びドメイン 4 (825 位と 826 位との間) のループ領域に位置した。このようにして 3 つの c R N A z y m e が形成され、それぞれ c R N A z y m e _ C t e V 1、c R N A z y m e _ C t e V 2、及び c R N A z y m e _ C t e V 3 と名付けられた。得られた c R N A z y m e の環状化活性を試験するために、カチオンの存在下において、自己スプライシング環状化反応をインビトロで行った。図 4 b から分かるように、異なる位置でセグメント化した後のスプライシング効果は異なり、その中で、第 3 のセグメント化方法 (V 3) が最良のスプライシング効果を有し、後続の実験で使用された。この構築物の配列を配列番号 16 に示した。

30

40

【0582】

断片サイズに基づいて、図 4 b のゲル電気泳動図において円としてマークされたバンドは、環状 R N A を表すと考えた。配列を R T - P C R 及びサンガー配列決定によって検証し、バンドが E 1 E 2 接合部にわたる配列であることを決定し、これにより E 1 及び E 2

50

と一緒に連結されていたことを証明した。しかし、このバンドはまた、逆スプライシングされた転写産物又は他の配列由来であり得るので、これが環状RNAであることは確認されなかった。環状RNAの形成の成功を確認するために、以下の3つの方法を使用して、環状RNAのヘッド-トゥ-テール共有結合閉鎖の特徴に基づいてその構造を検証した（図4c）。

【0583】

方法I

【0584】

Cte中のスプライス部位を、同じ長さであるが環状化を達成することができない線状RNA対照として、その環状化能を失うように変異させた。具体的には、配列番号2のスプライス部位（ヌクレオチド1～26）を変異させて、3位のCをAに、5位のTをGに、17位のGをTに、18位のCをTに、21位のAをCに、26位のTをGに変化させた。この変異が環状化能を破壊することを意図したものであり、異なる数、位置、及びタイプの他の変異も同様の目標を達成するために行われ得ることが当業者によって理解されるであろう。変異したCteをCte-mut（配列番号3）と称した。次いで、ポリ（A）ポリメラーゼを使用して、この変異した線状RNAにポリAテールを付加した。環状RNAはヘッド-トゥ-テール（head-to-tail）様式で閉じられ、3'末端を有していないので、テール化することができないが、線状RNAは、この反応を通じて数百のアデニレートが付加することができ、テール化前後のRNAサイズの変化は、アガロースゲル電気泳動によって解析することができる。

【0585】

具体的な工程は以下の通りであった。

（1）精製した環状RNA又は対照の線状RNAをポリ（A）テーリング酵素（NEB）によってテーリングし、反応条件は37℃で30分間であった。

（2）RNAをカラム精製に供した。

【0586】

図4cの上パネルに示すように、レーン3及び4は、ポリAテールが付加された産物であり、一方、レーン1及び2は、ポリAテールが付加されていない産物であった。環状化なしの場合、Cte及びCte-mutに基づくcRNAzyme前駆体RNAのバンドは全て、ポリA付加反応の後に上方にシフトし、分子がより大きくなり、ポリAが首尾よく付加されたことを示した。対照的に、環状RNAであると推定されるバンドは、ポリA付加反応あり及びなしで、実質的に同じ位置及び同じサイズであった。

【0587】

方法II

【0588】

消化は、RNase Rを用いて行った。RNase Rは、線状RNA分子を分解し得る3'-5'エキソリボヌクレアーゼであり、閉ループ構造を有する環状RNAは分解することができない。RNAの消化は、アガロースゲル電気泳動によって同定することができる。

【0589】

具体的な工程は以下の通りであった。

（1）精製した環状RNA又は対照の線状RNAをポリ（A）テーリング酵素（NEB）によってテーリングし、反応条件は37℃で30分間であった。

（2）RNase R（Lucigen）を添加して線状RNAを消化し、反応条件は37℃で30分間であった。

（3）RNAをカラム精製に供した。

【0590】

図4Cの上パネルに示すように、レーン5及び6はRNase R処理後の結果であり、レーン1～4はRNase R処理なしの結果である。より大きな線状RNAバンドはRNase R処理後に消失したが（レーン5及び6）、レーン5の環状RNAであると

推定されるバンドは依然として存在していたことがわかる。

【0591】

方法ⅠⅠⅠ

【0592】

消化は、RNase Hを用いて行った。RNase Hは、ハイブリッドDNA-RNA鎖中のRNAを特異的に加水分解し得るエンドリボヌクレアーゼである。線状RNA及び環状RNAは構造が異なるため、同じDNAプローブに結合した後、RNase Hによって異なる長さの断片に切断され得る。アガロースゲル電気泳動によって、切断によって生成されたRNA断片の長さを解析して、RNAの元の構造を推測することができる。具体的には、環状RNAについては、2つのDNAプローブを使用してRNAに結合させ、次いで産物を切断して2つのバンドを得た。対照的に、環状化はなかったが、依然として線状性があった場合、同じ方法は3つのバンドをもたらすことになる。

10

(1) アニリング反応により、RNAにDNAプローブを結合させた。反応を95℃で2分間行い、次いでゆっくりと段階的に25℃に冷却した。プローブ配列を配列番号7及び8に示した。

(2) DNA/RNA二本鎖をRNase H (NEB) で消化し、反応条件は37℃で30分間であった。

(3) RNAをカラム精製した。図4Cの下パネルに示されるように、本願の産物について2つのバンドが得られた。

【0593】

20

上記3つの方法によって得られた結果全てにより、環状RNAの形成成功を確認し、構築されたcRNAzyme__Cteの環状化活性を検証した。

【0594】

8.3. 実施例3. 反応系の最適化及び構築物の操作による自己スプライシング効率の改善

最終的な環状RNA収量を増加させるために、環状化のパーセントを改善することが最初に必要であった(図5a)。本発明者らは、2つの態様から発現構築物の環状化のパーセントを最適化した。

【0595】

反応条件の最適化

30

【0596】

本発明者らは、様々なイオン濃度(50mM及び100mM NaCl; 2mM、5mM、10mM、及び20mMのMg²⁺)及び様々な反応時間(5分、15分、及び30分)の組み合わせを反応系で試し、最適な反応系を決定した。

【0597】

20mM Mg²⁺及び50mM NaClの反応系で15分間及び30分間反応させることにより、環状化のパーセントを既存の30%から60%以上に増加させることができることが分かった(図5B)。

【0598】

配列最適化

40

【0599】

配列を、RNA二次構造に従って更に操作した。具体的には、異なる標的配列の挿入後、いくつかの配列は、構造的理路のために効率的にスプライシングされ得ない。この場合、スプライシング効率は、構造の柔軟性を増加させるために標的配列中にいくつかのスペーサー配列を組み込むことによって改善され、例えば、スペーサー配列はATリッチ配列であってもよい。

【0600】

実施例2に基づいて、3つの異なるスペーサー配列、すなわち配列番号4のスペーサー配列1、配列番号5のスペーサー配列2、及び配列番号6のスペーサー配列3を分子クロニングによってcRNAzyme__Cte中のRlucの前に挿入し、3つの更なる最

50

適化された構築物を得た。3つのスパーサー配列保有前駆体RNAを、実施例2で同定された最適な自己スプライシング反応系（10mM Mg、50mM NaCl、30分の反応時間）においてインビトロで環状化した。図5cの結果から、3つのスパーサー配列を付加した後の環状化のパーセントは、それぞれ約60%、80%、及び98%であったことが分かる（図5c）。

【0601】

8.4. 実施例4. 瘢痕配列を含まない「無瘢痕」環状RNAの調製

前述の方法を用いて得られた環状RNAは、少数の非標的配列（すなわち、エクソンE1及びE2由来の配列）をなお含む。これらの配列を除去するために、構築物を更に操作してもよい。

【0602】

cRNAzyme構築物を調製する場合、標的配列の両方の末端は、より短い長さを有するE2及びE1であり、これらは、それぞれ、グループIIイントロンの隣接エクソン領域のイントロン結合配列（IBS）に由来し、概ね、0～20ヌクレオチド長であった。環状RNAの形成において、エクソン配列E1及びE2などの、標的配列以外の配列を含むことは望ましくなかった。E1及びE2が直接除去される場合、自己スプライシング環状化プロセスは、イントロン中のEBS又はδ配列と相互作用するIBS配列の欠如により影響を受ける。本発明者らは、標的配列の一部を直接「IBS」配列とみなし、イントロン中のEBS又はδを改変して、EBSが「IBS」とみなされる標的配列中の領域と相互作用することを可能にすることを創造的に想定した。このような方法は、cRNAzyme構築物が自己スプライシング機能を有することを確保しながら、エクソン配列E1及びE2への依存性を排除し、構築物及び最終環状化産物からエクソン配列を除去することができる。

【0603】

更にCteリボザイムを例として、本実施例におけるcRNAzyme構築物の設計概念を、異なる標的配列（GFP、Glu及び2Aペプチド）を用いて説明した。

【0604】

各標的配列の両端の6ヌクレオチドの配列に基づいて、グループIIイントロン中のEBS1及びEBS1の上流配列（δを含む）を、2つの6ヌクレオチド配列と少なくとも部分的に相補的に対合する配列にそれぞれ置換した。具体的には、EBS1の上流配列（δを含む）を標的配列の5'末端の6ヌクレオチドと直線状態（例えば、cRNAzyme構築物の自己スプライシング環状化前の状態）で相補的に対合させ、EBS1を標的配列の3'末端の6ヌクレオチドと直線状態で相補的に対合させた。特定の改変配列を図6Bの右パネルに更新して示し、3つの異なる標的配列のために設計された改変EBS1及びEBS1の上流配列（δを含む）を示した。特に、操作されたEBS1及びEBS1の上流配列（δを含む）は、「IBS1」及び「IBS3」として機能する標的配列断片と完全に相補的に対合する必要はなかった。ある特定のパーセンテージのミスマッチ、又はAとG、GとU等のわずかにロバスト性の低い対合が許容され得る。概して、グループIIイントロン中の対応する配列を置換するために使用されるEBS1及びEBS1の上流配列（δを含む）は、ヌクレオチド位置の少なくとも60%において、標的配列中の対応する領域と相補的に対合したか、又は標的配列中の対応する領域の相補的対合配列と少なくとも60%同一であった。

【0605】

電気泳動の結果から、異なる標的配列（GFP、Glu及び2Aペプチド）を使用した場合、この操作方法によって環状RNAが効率的に生成されたことが分かる（図6B、左）。サンガー配列決定結果によって、そのような操作が外因性瘢痕配列を完全に排除し得ることが確認された（図6B、右）。図6Bに示されるように、上記のように改変されたEBS及びEBS1の上流配列（δを含む）を有するcRNAzyme構築物が環状化された後、標的配列の両端（それぞれ「IBS1」及び「IBS3」として機能する、影付きの6ヌクレオチド配列の2つのストレッチ）は、ヘッド-トゥ-テール様式で直接接

10

20

30

40

50

続され、配列は、もはや E 1 及び E 2 によって分離されず、これは、生成された環状 RNA のその後の適用により有益である。このようにして操作された構築物を「無瘢痕」構築物と称し、環状化後の環状 RNA を「無瘢痕」RNA と称した。

8. 5. 実施例 5. 異なる長さの標的配列の環状化結果

【0606】

実施例 2 及び 3 の方法に基づいて、本発明者らは、異なる長さの標的断片を更に試験した。これらの標的断片は 555 ヌクレオチドの G l u c であり、そのヌクレオチド配列は配列番号 9 に示される通りであった。それぞれに、R l u c 1 は 936 塩基であり、その塩基配列は配列番号 10 に示される通りであり、R l u c 2 は 1, 160 塩基であり、その塩基配列は配列番号 11 に示される通りであった。G l u c 及び R l u c 1 構築物には

10

【0607】

試験した全ての断片が効率的に自己スプライシングを行い、環状 RNA 産物をもたらすことが見出された（図 7）。

【0608】

8. 6. 実施例 6. 本発明の構築物を用いた対象となる遺伝子の発現

これに基づいて、異なる標的配列の環状 RNA 産物での細胞のトランスフェクション後のそれらの発現を更に試験した。

【0609】

線状 RNA によって引き起こされるイムノグラデーション (immunodegradation) を最小限にするために、RNA 産物をトランスフェクション前に以下の 3 つの工程で処理した。

20

(1) R N a s e R 処理を行い、線状 RNA を消化した。反応条件は、37℃で 30 分間であった。

(2) 小さな線状 RNA を除去するために H P L C 精製を行った。H P L C 条件：ゲル排除クロマトグラフィーカラム：W a t e r s X b r i d g e（登録商標）B E H 450 A、カラム温度：40℃、流速：1分/ml、溶出条件：0～30分、100%バッファ A（10mM T r i s、0.5mM E D T A、及び D E P C 処理水で調製）。線状 RNA の両末端のリン酸基を除去するために C I P 処理を行った。反応条件は、Q u i c k C I P（N E B）を添加し、37℃で 30 分間反応させるものであった。

30

【0610】

リポ R N A m a x（I n v i t r o g e n）を用いて、供給元の説明書に従ったトランスフェクション条件下で 24 時間、標的 RNA をトランスフェクトした。

【0611】

実施例 2 及び 3 の構築方法（スパーサー配列 2 を使用）を使用し、実施例 4 に記載の改変を実施して無瘢痕環状化を達成して、異なる標的配列を試験した。タンパク質発現の検出を容易にするために、I R E S - G F P（配列番号 12）及び I R E S - G l u c（配列番号 13）を含む蛍光タンパク質コード配列を含む、構築物を構築した。I R E S の付加は、キャップ非依存性非標準翻訳を開始し得、環状 RNA 中のコード配列のタンパク質への翻訳を可能にする。

40

【0612】

異なる標的配列について、異なる方法を使用してタンパク質発現を検出した。

【0613】

翻訳産物が G F P である場合、蛍光を顕微鏡下で観察し、細胞を R I P A 溶解溶液（B e y o t i m e）で溶解し、次いで、タンパク質発現をウェスタンブロットティングによって検出した。本発明の方法により G F P の発現が得られることが確認された（図 8 A）。

【0614】

翻訳産物がルシフェラーゼである場合、細胞をまず P a s s i v e l y s i s s o l u t i o n（P r o m e g a）で溶解し、次いでルシフェラーゼ検出キット（P r o m

50

e g a) を使用してマイクロプレートリーダーによってタンパク質発現を検出した。本発明の方法によりG l u cタンパク質の発現が得られることが確認された(図8 B)。

8. 7. 実施例7. インビトロでの環状RNAの設計及び産生

【0615】

環状RNAを効率的に産生するために、本発明者らは、主に細菌ゲノム及びオルガネラゲノムにおいて見出される可動性遺伝因子であるグループIIイントロンによる自己触媒スプライシング反応を利用する(Lambowitz, A. M., and Zimmerly, S. (2011). Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. Cold Spring Harb Perspect Biol 3, a003616)。全てのグループIIイントロンは6つの構造ドメイン(D1~D6)を有し、そのうちドメイン1(D1)は最大ドメインであり、スプライシング特異性を決定するためのいくつかの短いエクソン結合部位(EBS)を含有する(図12A)。ドメイン2及び3は、活性なイントロン構造を組み立て、スプライシング反応を刺激するのに重要な役割を果たすが、D4は、マチュラーゼのORFを含有する長いループを有するステムループ構造である。高度に保存されたD5は、自己スプライシングのための活性部位の中心であり(Rybak-Wolf et al. (2015). Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. Mol Cell 58, 870-885.)、一方、D6は分岐部位としてバルジアデノシンを含有する(図12A)。グループIIイントロンのインビトロ自己スプライシングは、イントロンRNA構造及びMg²⁺の正確な折り畳みのみを必要とするが(Peebles, C. L. et al. (1986). A self-splicing RNA excises an intron lariat. Cell 44, 213-223)、インビボスプライシングはマチュラーゼの補助を必要とする(Pyle, A. M. (2016). Group II Intron Self-Splicing. Annu Rev Biophys 45, 183-205)。

【0616】

このドメイン配置に基づいて、本発明者らは、D4において、破傷風菌(Clostridium tetani)の表層タンパク質からグループII自己スプライシングイントロンを分割し(McNeil, B. A., Simon, D. M., and Zimmerly, S. (2014). Alternative splicing of a group II intron in a surface layer protein gene in Clostridium tetani. Nucleic Acids Res 42, 1959-1969)、イントロンの上流D5-D6及び下流D1-D2-D3に隣接するカスタマイズされたエクソンを含有する分割イントロン系を生成した。D4ステムの一部を分離し、得られたRNAの各末端に配置し、それによって相補的構造を形成して、活性イントロンの折り畳みを助けた(図12A、緑色の線)。2つの短い6 nt配列、IBS3(イントロン結合部位3)及びIBS1を、イントロンのEBS3及びEBS1との長距離相互作用を提供するために、イントロン及びカスタマイズされたエクソンの各接合部に含めた。インビトロランオフ転写の際に、得られたRNA前駆体は、グループIIイントロンによって自己スプライシングされて、カスタマイズされたエクソンの環状RNA及び分枝イントロンRNAを産生し得る。対象となる遺伝子(GOI)の上流にIRES配列を含めることによって、得られた環状RNAは、キャップ非依存性翻訳を介してタンパク質合成を指示するmRNAとして機能することができる(図12A)。本発明者らは、この系を環状コードRNA(CirCode)と名付けた。これは、タンパク質翻訳のための任意の所与のcircRNAを産生するための全般的なプラットフォームとして役立ち得る。

【0617】

この設計を検証するために、本発明者らは、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子のIR

ES及びORFをカスタマイズされたエクソンに含め、このD5-D5-エクソン-D1を翻訳した。本発明者らは、得られたRNA前駆体が実際にインビトロで自己スプライシングされて、circRNAに対応する余分なバンドを生成することができるが、(IBS1での)スプライス接合部の変異はcircRNAを産生できないことを見出した(図1B)。本発明者らは更に、2つの異なる方法を使用して、前駆体RNAの下での追加のバンドが実際にcircRNAであることを確認した。なぜなら、それは、ポリAポリメラーゼによるテーリング反応によって伸長させることができず、RNase R処理による消化に耐性であるからである(図13)。更に、本発明者らは、ゲルからcircRNAを精製し、RNase H消化(図14)及び接合部の直接配列決定(図15)を使用して環状同一性を確認した。最後に、本発明者らは、IVT工程(方法を参照されたい)後に環状化緩衝液中の異なる濃度のMgCl₂及びNaClを使用して反応条件を最適化し、50~100mM NaClと共に10~20mM Mg²⁺を使用することが、RNA環状化に最適な反応条件であることを見出した(図5B)。本発明者らはまた、環状化緩衝液がMg²⁺を含有しない場合であっても、ある特定の程度のRNA環状化(約30%)を観察し、これはおそらく、RNA環状化が24mM MgCl₂を含有するIVT緩衝液中で共転写的に起こったためである。

10

【0618】

circRNA産生及び翻訳のプラットフォーム最適化

【0619】

circRNA産生のためにグループイントロンを使用する以前の自己スプライシング系もまた、T4バクテリオファージ又はアナベナ由来の外来配列を最終産物に導入した。この「瘢痕」配列は、通常、約80~180nt長であり、これは、標的circRNAの設計柔軟性を制限し、薬物開発中に何らかの望まない効果を導入し得る。本発明者らの最初の設計は、イントロン-エクソン認識のために2つの短い配列(IBS1及びIBS3)を使用し、これは12ntのより短い瘢痕を残す。瘢痕配列による潜在的な干渉を低減するために、本発明者らは、D1ドメインのエクソン結合部位を変更し、EBS1及びEBS3がそれぞれ環状エクソンの3'及び5'末端と塩基対を形成するようにすることによって、設計を更に改変した(図16、左)。この新しい設計は、外来配列を含まない「無瘢痕circRNA」の生成を可能にした。唯一の配列要件は、環状RNAの設計を完全にプログラム可能にする環状エクソンの5'末端における「AG」である。本発明者らは、EGFP及びRluc-P2Aをコードする2つの異なるcircRNAを生成することによってこの設計を検証し(図16、右)、異なるイオン条件での無瘢痕circRNAの効率的な環状化を観察した。circRNAの無瘢痕自己スプライシングを、最終circRNA産物の配列決定によって更に確認した(図16、右の下)。要約すると、本発明者らは、任意の配列の無瘢痕circRNAを効率的に産生することができるCirCode系を操作し、circRNAを異なる治療ツールとして使用するための全般的なプラットフォームを提供した。

20

30

【0620】

PIE法を使用する以前の研究は、IRESの前の短いスペーサー領域の付加が、IRESの正しい折り畳み及び／又はイントロンの活性構造を補助し得ることを示唆したので(Wesselhoeft, R. A. et al., 2018, supra)、本発明者らは、環状エクソンの各末端にスペーサー配列のいくつかのバージョンを導入して、それらの環状化効果を最適化した(図17)。本発明者らは、異なるスペーサーが実際に、47%(SP5について)~83%(SP4について)の範囲のRNA環状化効率に影響を及ぼすことを見出した。更に、本発明者らは、異なるスペーサーを有する2つのcircRNAを異なる用量で3つの細胞株にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性アッセイによって判断されるように、タンパク質産生の用量依存的増加を観察した(図18)。興味深いことに、翻訳効率に対するスペーサー配列の効果は、かなり穏やかであり、circRNA用量及び細胞株に依存するようであった。本発明者らは、circRNAトランスフェクション時のタンパク質産生の時間経過を更に調べ、活性タンパク質がトランスフ

40

50

エクシオン後6時間で検出され、24時間で発現の発現ピークに達することができることを見出した(図19)。

【0621】

8.8. 実施例8. *circRNA*は、タンパク質産生の延長を媒介する。

環状*mRNA*の主な利点は、遊離末端を欠くことによるそれらの優れた安定性であり、したがって、*circRNA*は、線状対応物と比較して、タンパク質発現のための良好な貯蔵寿命を有することになる。これを直接試験するために、本発明者らは、ガウシアルシフェラーゼ(*Gluc*)をコードする線状*mRNA*及び環状*mRNA*の両方を合成し、それらを並行して純水中、室温で異なる日数保存した後、それらを293T細胞にトランスフェクトした。本発明者らは、タンパク質翻訳を指示する*circRNA*の活性が2週間の間に本質的に変化しないのに対して、線状*mRNA*は貯蔵の3日目までにその活性の約半分以上を失うことを見出し(図3A)、*circRNA*が室温で安定に貯蔵され得ることを示唆した。加えて、本発明者らは、細胞にトランスフェクトされると、線状*mRNA*からのタンパク質産生は2日目に>80%で急速に減少したが、*circRNA*からの翻訳は5~7日間続くことを見出した(図3B)。延長されたタンパク質翻訳はまた、逆スプライシングされた*circRNA*レポーターを使用した本発明者らの以前の結果と一致している(Wang, Y., and Wang, Z. (2015). Efficient backsplicing produces translatable circular *mRNAs*. *RNA* 21, 172-179)。この実験において、*circRNA*からのタンパク質産生も最後に抑制され得ることも注目に値する。なぜなら、本発明者らは実験の週全体の間に培養培地を交換しなかったからである(図16)。

10

20

【0622】

本発明者らは更に、PIEプロトコル又は新しい*CirCode*システムを使用して産生された線状*mRNA*及び*circRNA*からのタンパク質産生を比較した。キャッピングされた線状*mRNA*及び非改変線状*mRNA*を、*Gluc*の同じコード配列を有するIVTを使用して生成し、CVB3 IRES及び*Gluc* ORFを含有する2種類の*circRNA*と並行して293T細胞にトランスフェクトした。本発明者らは、線状*mRNA*と比較して、両方の*circRNA*からのタンパク質のよりロバストな発現を見出し(図23、上)、これは、PIE *circRNA*を使用した以前の報告を支持する(Wesselhoeft, R. A. et al., 2018, supra)。おそらく*circRNA*の優れた安定性のために、本発明者らが6日間にわたって蓄積ルシフェラーゼ活性を測定すると、*circRNA*においてタンパク質産生の更に大きな増加が観察された(図23、底部)。加えて、2つの異なるプロトコルから生成された*circRNA*は、直接タンパク質翻訳において同様の能力を示した(図24)。

30

【0623】

8.9. 実施例9. 精製*circRNA*は、標的タンパク質のロバストな翻訳を指示することができる。

HPLCによる*dsRNA*の除去は、免疫活性化を排除することができ、線状ヌクレオシド改変*mRNA*の翻訳を改善するので、*mRNA*純度は、タンパク質産生及び自然免疫の誘導にとって重要な因子であることが見出された(Kariko, K. et al., (2011). Generating the optimal *mRNA* for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding *mRNA*. *Nucleic Acids Res* 39, e142)。しかしながら、*circRNA*の免疫原性についてはいくつかの議論がある。初期の報告は、インビトロで合成された*circRNA*が、線状*RNA*よりも細胞性免疫応答を誘導する傾向があることを示唆したが(Chen, Y. G. et al., (2017). Sensing Self and Foreign Circular *RNAs* by Intron Identity. *Mol Cell* 67, 228-238 e225)、後に、*dsRN*

40

50

A、線状RNA断片及び三リン酸RNAを含む、IVT及び環状化反応の副産物からのcircRNAの精製が、circRNAの細胞毒性及び免疫原性を排除し得ることが報告された(Wesselhoeft, R. A. et al., (2019). RNA Circularization Diminishes Immunogenicity and Can Extend Translation Duration In Vivo. Mol Cell 74, 508–520 e504; Breuer, J. et al., (2022). What goes around comes around: artificial circular RNAs bypass cellular antiviral responses. Mol Ther Nucleic Acids)。最近の研究はまた、異なる方法によって産生されたcircRNAが異なる免疫原性を示したので、配列同一性及び構造がcircRNAの細胞性免疫の主な決定因子であることを示唆した(Liu, C. X. et al., (2022). RNA circles with minimized immunogenicity as potent PKR inhibitors. Mol Cell 82, 420–434 e426.)。CirCodeプラットフォームを使用して産生されたcircRNAが自然免疫反応及び細胞毒性を誘導することができるかどうかを調べるために、本発明者らは、ゲル精製又はHPLCでcircRNAを精製し(図3D)、circRNAがcircRNAのトランスフェクション時に細胞性免疫反応を誘導することができるかどうかを測定した。本発明者らは、未精製circRNAのトランスフェクションが有意な量の細胞死を引き起こす一方で、精製circRNAは、モックトランスフェクションと比較して検出可能な細胞毒性を示さないことを見出した(図25)。加えて、RIG-I及びIFN- β 1(インターフェロン- β 1)を誘導することによって自然免疫反応を刺激した未精製circRNAと比較して、精製circRNAは免疫原性を有意に低下させ(図26)、circRNAの免疫原性が主にIVT反応からの副産物によって引き起こされたという以前の観察を支持した(Wesselhoeft, R. A. et al., 2019, supra)。

10

20

30

40

50

【0624】

8.10. 実施例10. LNP封入circRNAは、マウスにおける口バストなタンパク質産生を指示する。

circRNAの治療用途のための重要な疑問は、circRNAの産生を確実にスケールアップすることができるかどうか、及び異なる産生バッチ間の再現性がどのようになるかである。CirCodeプラットフォームは、RNAリガーゼ又は追加のコアクチベーターの関与なしにRNA環状化のために自己スプライシングイントロンを使用するので、スケールアップ手順は比較的単純である。この系のスケラビリティを試験するために、本発明者らは、IVT及び環状化反応系を(20 μ lから1mlに)50倍に拡大し、高い環状化効率(約70%)は本質的に変化しないままであるが、RNA産物の総量は単一反応で7.5mgに達することを見出した(図27)。加えて、本発明者らは、circRNAのIVT/環状化及びHPLC精製が、異なるバッチ間で高度に再現可能であることを見出し(図28)、circRNAのインビボ適用の基礎を築いた。

【0625】

本発明者らは更に、脂質ナノ粒子(LNP)で封入されたcircRNAをそれらのインビボ送達のために生成した(図29)。水溶液中のcircRNAを、DMG-PEG2000及びコレステロール(方法を参照されたい)等の他の脂質成分とナノ粒子を形成するイオン化可能なカチオン性脂質によって充填し、約80nmの有効直径で約95%の封入効率を達成した。本発明者らは、GlucをコードするcircRNAを封入するために本発明者らの製剤中の3つの異なるイオン化可能なカチオン性脂質を試験し、得られたLNPを筋肉内(IM)又は腹腔内(IP)注射によってBALB/cマウスに注射した(各実験群についてn=3)。異なるイオン化可能なカチオン性脂質(MC3、SM-102及びALC-0315)を使用する3つの製剤をこの実験で試験した。ルシフェラーゼの発現を、血清を用いたルシフェラーゼ発光アッセイ(図30)又は動物の生物発光イ

メーキング（図31）のいずれかを用いてアッセイした。本発明者らは、LNP-circRNAの2つの異なる製剤からルシフェラーゼのロバストな発現を見出し、本発明者らの手順を通じて産生されたcircRNAがインビボタンパク質発現を確実に誘導できることを示唆した。

【0626】

8.11. 実施例11. SARS-CoV-2に対する潜在的なcircRNAワクチンの作製

本発明者らは更に、mRNAワクチンを産生するために潜在的に使用することができる、SARS-CoV-2のSタンパク由来の受容体結合ドメイン（RBD）をコードするcircRNAを操作することによって、mRNA療法におけるcircRNAの適用を試験した。以前の報告に基づいて、2つの異なる抗原設計をcircRNAに構築した（図32上）（Dai, L., and Gao, G. F. (2021). Viral targets for vaccines against COVID-19. Nat Rev Immunol 21, 73–82）。最初のものは、RBDの三量体化を可能にするT4フィブリチン由来のフォルドンと融合した単一のRBDを使用した（Meier, S., et al., (2004). Foldon, the natural trimerization domain of T4 fibrin, dissociates into a monomeric A-state form containing a stable beta-hairpin: atomic details of trimer dissociation and local beta-hairpin stability from residual dipolar couplings. J Mol Biol 344, 1051–1069）。他方は、パイロット研究において強力な抗体産生を誘導することが示されたRBD二量体を使用したものである（Dai, L. et al., (2020). A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. Cell 182, 722–733 e711; Dai, L. et al., 2021, supra）。本発明者らは、改変IRESを有する両方のタンパク質のコード配列を設計し、circRNAベクターを構築した。得られたcircRNAの産生及び精製を検証し（図32、左下）、circRNAにコードされるタンパク質の翻訳を、293細胞にトランスフェクトすることによって更に検証し、ウェスタンブロット抗原産生によって検出した（図32、右下）。

【0627】

本発明者らは、2つの異なる製剤を使用してLNP-circRNA粒子を生成し、90～100nmの典型的なナノ粒子サイズで高い封入効率（>90%）を達成した（図33は、SM-102製剤を使用した代表的な結果を示す）。LNP-circRNAをBALB/cマウスに2回の別々のIM注射で接種し、更なる分析のために各接種の2週間後に血液試料を採取した（図34）。本発明者らは、いくつかの製剤及びcircRNA設計を試験したが、公開されている結果とのより良好な比較のために、SM-102製剤を使用したLNP-circRNA-RBPからの結果を示した。フローサイトメトリーを使用して、本発明者らは、メモリーB細胞（すなわち、CD19+CD27+Bリンパ球）の大部分が、2回目の接種の2週間後にRBD抗体の強い発現を有することを見出し（図35、図36）、これは、抗原によって誘導される長期にわたる免疫応答を示すものであった。特に、>70%のCD19+CD27+B細胞がRBD特異的抗体（すなわち、RBD+）を発現し、約50%のCD19+CD27+B細胞もIgD+RBD+であり（図36）、強い抗体応答が示唆された。対照として、LNP単独の注射はRBD抗体の活性化を誘導せず、接種時の特異的応答を示唆している。

【0628】

マウス血清中のRBD抗体の活性を試験するために、本発明者らは次に抗体ブロッキングアッセイを行って、マウス血清が、ACE2を安定に発現する293 T細胞への蛍光標識RBDの結合をブロック（遮断）することができるかどうかを調べた（図37）。本

発明者らは、血清が適度な希釈（１：２０）で全てのＲＢＤバリエーションの細胞表面への結合を効果的に遮断できることを見出した。本発明者らがかなり高い濃度のＲＢＤ（０．５ μg／ml）を使用したことを考えると、この防御は非常に印象的である。非常に高い希釈比（１：２００）であっても、血清は野生型ＲＢＤの結合を依然として完全に遮断し、DeltaバリエーションのＲＢＤの結合を有意に減少させた。しかしながら、血清はオミクロンＲＢＤの結合を遮断せず、これは、野生型Ｓタンパク質に基づく現在のｍＲＮＡワクチンがオミクロンバリエーションに対する防御において弱いという知見と一致する。

【０６２９】

本発明者らは更に、各接種後にＲＤＢに対する中和抗体の力価を測定し、ＲＢＤに対するIgG産生の口バストな産生を見出した（図３８～図３９）。抗体力価は、第１のショットの２週間後に１０５に近く、第２のショット後に１０８近くに達し、これは、同様の製剤でLNP封入線状mRNAを使用した、又は別のcircRNA設計を使用した報告されたマウス結果よりも少なくとも１０倍高い。加えて、IgG２／IgG１の比は約０．７５であり、これは線状mRNAワクチンを用いて以前に報告されたものと同様である。最後に、本発明者らは、SARS-CoV-2偽ウイルスについての防御アッセイを使用して抗体力価を測定し、１０５に近い力価での強力な防御を見出した（図４０）。まとめると、マウスモデルにおける本発明者らの予備データは、CircCodeプラットフォームが、SARS-CoV-2に対するcircRNAワクチンの設計及び生成において強力な性能を有し、これが他のウイルス病原体のためのワクチン開発に潜在的に拡大され得ることを示唆した。

【０６３０】

プラスミド構築

【０６３１】

破傷風菌（Clostridium tetani）（CTE）及びIRES配列中のグループIIイントロンの断片をGENEWIZから化学合成し、異なるタンパク質コード断片をPCRによって増幅した。これらの断片を、T7 RNAポリメラーゼプロモーター及びターミネーターを含むNheI及びXbaI消化骨格に、Gibsonアセンブリによってクローニングした。

【０６３２】

RNA合成及び環状化

【０６３３】

非改変NTPの存在下でT7 RibomAX（商標）Large-Scale RNA Production System（Promega、P1320）を使用して、XbaI消化した線状化プラスミドDNA鋳型からRNAをインビトロ転写した。DNアーゼI処理後、RNA産物をRNA Clean and Concentrator Kit（ZYMO research、R1013）でカラム精製して、IVT緩衝液中の過剰なNTP及び他の塩、並びにIVT中に生成された可能性のある小RNA断片を除去した。いくつかの実験では、精製RNAを新しい環状化緩衝液中で更に環状化した。RNAを最初に75℃に5分間加熱し、急速に45℃に冷却し、その後、示されたマグネシウム及びナトリウムを含む緩衝液を最終濃度：50mM Tris-HCl（pH7.5）、50／100mM NaCl、0～40mM MgCl₂まで添加し、次いで、環状化のために示された時間53℃で加熱した。マグネシウム及びナトリウムの濃度並びに53℃でのインキュベーション時間を含む最良の最適化された反応条件を更なる実験のために選択した。

【０６３４】

実施例１４．CircRNA同定

【０６３５】

ポリAテーリング及びRNase R処理のために、IVTからの全RNAをRNAクリーナアップカラムによって精製し、次いで、製造元の説明書に従って大腸菌（E. coli）ポリAポリメラーゼ（NEB、M0276S）で処理した。この工程では、スプラ

イシングされていないRNA前駆体の遊離末端にポリAテールを付加する。ポリAテーリング後、精製したRNAを、製造業者の説明書に従ってRNase Rエキソリボヌクレアーゼ (Lucigen、RNR07520) によって消化し、濃縮されたcircRNAをカラムによって精製した。

【0636】

RNase Hニッキングアッセイのために、本発明者らは、24nt ssDNAプローブを1:20の比でインキュベートし、RNase R濃縮circRNAを65℃で5分間加熱した。RNase H緩衝液をDNA-RNA混合物に直ちに添加した。次いで、混合物をゆっくりと室温まで冷却する。アニーリング後、RNase H (Thermo Scientific、EN0201) を37℃で20分かけて混合物に添加した。ssDNAプローブの配列は5'-TGGTGCTCGTAGGAGTAGTGAAAG-3'である。

10

【0637】

RNAゲル電気泳動及び精製

【0638】

RNAを、120Vで、氷冷DEPC処理MOPS緩衝液を使用して、低融点アガロースゲル (sigma Aldrich、A4018) 上で泳動した。電気泳動後、circRNAレーンを切断し、Zymoclean Gel RNA Recovery Kit (ZYMO research、R1011) で精製した。トランスフェクションの前に、カラム精製したcircRNAをホスファターゼ (NEB、M0525S) で処理して、免疫原性を生じ得る潜在的な5'リン酸を除去した。

20

【0639】

circRNAからの翻訳産物の測定

【0640】

トランスフェクションの1日前に細胞を24ウェルプレートに播種した。製造業者のマニュアルに従ってLipofectamine Messenger Max (Invitrogen、LMRNA001) を使用して、精製circRNAを細胞にトランスフェクトする。トランスフェクション後、細胞を37℃で24時間培養した。Dual-Luciferase (登録商標) Reporter Assay System (Promega、E1910) を用いた発光アッセイのために、細胞溶解及び上清を回収した。

30

【0641】

環状RNAのRT-PCR

【0642】

IVT後にカラム精製したRNAをアガロースゲルで電気泳動した。circRNAに対応するバンドを切り出し、Zymoclean Gel RNA Extraction Kit (Zymogen、R1011) を使用して抽出した。ランダムプライマー (TAKARA、RR037B) と共にPrimeScript RT Reagent Kitを使用して、精製したRNAをcDNAに逆転写し、続いて、スプライス接合部にわたって転写産物を増幅することができるプライマーを用いてPCRを行った。PCR産物をサンガー配列決定して、環状RNAのバックスプライシング (backsplicing) を確認した。

40

【0643】

環状RNAのHPLC精製

【0644】

高品質circRNAを得るために、IVTからスピンカラム精製したDNase I処理RNAを高速液体クロマトグラフィーで分離した。SHIMADZ LC-20A (京都) を用いた半調製のために、40µgのRNAを、4.6×300mmサイズ排除カラム (Waters XBridge、BEH450A、450Å孔径、3.5µm粒径) 上にロードし、10mM Tris、1mM EDTA、75mM PB、pH7.4を含有する移動相を用いて、25℃、流速0.5ml/分で溶出した。Sepure S

50

DS-30 (Suzhou, China) での完全調製のために、5 mg の RNA を、流速 10 ml / 分、25 °C で、10 mM の Tris、1 mM の EDTA、75 mM の PB、pH 7.4 を含有する移動相を有する 30 × 300 mm の SEC カラム (Sepax、SRT SEC-1000A、孔径 1000 Å、粒径 5.0 μm、Suzhou、中国) に各々ロードした。画分を示したように回収し、アガロースゲル電気泳動で証拠にした。

【0645】

キャピラリー電気泳動による環状 RNA の分析

【0646】

HPLC から精製した環状 RNA を、Agilent 2100 Bioanalyzer を用いたキャピラリー電気泳動で、RNA モードで更に分析した。試料を適切な濃度に希釈し、製造元の説明書に従って分析した。

【0647】

LNP 製造プロセス

【0648】

環状 RNA を、以前に記載されたように、NanoAssembler Ignite システムを介して脂質ナノ粒子中に封入した (Corbett, K. S. et al., (2020) SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. Nature 586, 567-571; Polack, F. P. et al., (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. N Engl J Med 383, 2603-2615.)。簡単に記載すると、circRNA の pH 4.0 の水溶液を、異なるイオン化可能なカチオン性脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、DMG-PEG 2000 及びコレステロールを含有する、エタノールに溶解した脂質混合物と迅速に混合する。脂質混合物の比は、製剤 1 については MC3 : DSPC : コレステロール : PEG-2000 = 50 : 10 : 38.5 : 1.5、製剤 2 については SM-102 : DSPC : コレステロール : PEG-2000 = 50 : 10 : 38.5 : 1.5、及び製剤 3 については ALC-0315 : DSPC : コレステロール : ALC-0159 = 46.3 : 9.4 : 42.7 : 1.6 である。次いで、得られた LNP 混合物を PBS に対して透析し、更なる適用のために 0.5 μg / μl の濃度で -80 °C で保存した。

【0649】

マウスへの LNP-circRNA の投与

【0650】

8 週齢の雌 BALB / C マウスを Shanghai Model Organisms Center から購入した。PBS 中の 20 μg の CircRNA-LNP を、3 / 10 インスリンシリンジ (BD biosciences) を用いてマウスに筋肉内投与した。LNP の投与の 24 時間後に血清を収集し、50 μl の血清をインビトロでのルシフェラーゼ活性アッセイに使用した。IVIS Spectrum (Roper Scientific) を用いて生物発光イメージングを行った。Gluc-LNP 注射の 24 時間後、2 mg / kg の Coelenterazine (MedChemExpress、MCE) をマウスに腹腔内投与した。次いで、マウスを、2.5 % イソフルラン (RWD Life Science Co.) でチャンバ内に基質を受容した後に麻酔し、ノーズコーンを介して 2 % イソフルランで維持しながらイメージングプラットフォーム上に配置した。基質注射の 5 分後に 30 秒の曝露時間でマウスをイメージングして、シグナルが効果的かつ十分に撮影されたことを確認した。

【0651】

免疫原性試験のために、8 週齢の雌性 BALB / c マウス (Shanghai Model Organisms Center, lnc) を使用した。10 μg の CircRNA-RBD-LNP を 50 μl の 1 × PBS に希釈し、プライムショット及び追加免

10

20

30

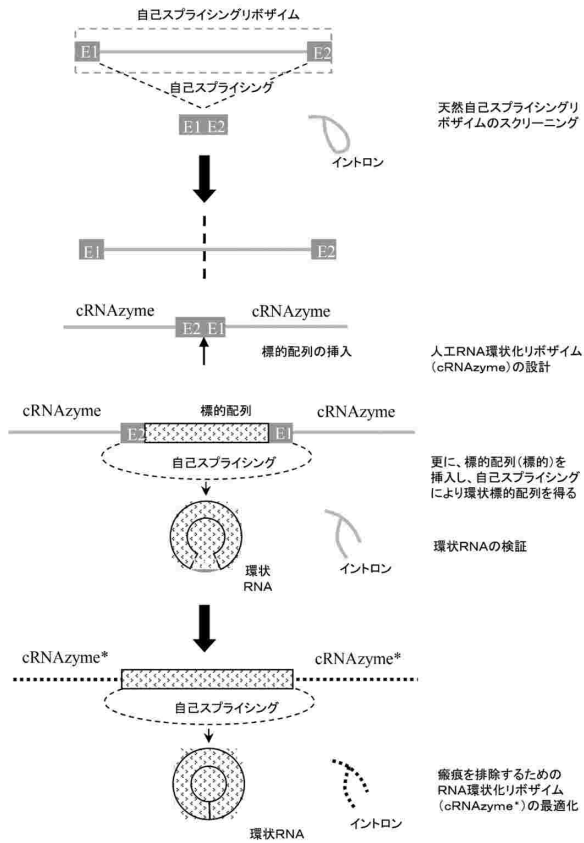
40

50

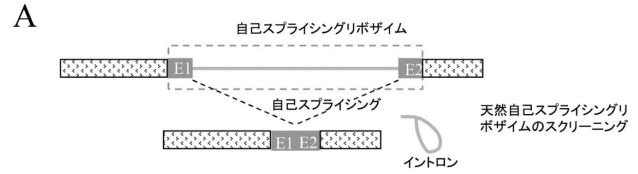
疫ショットの両方のために同じマウスの後肢に筋肉内投与した。対照群のマウスには、PBS及び空のLNPを与えた。プライムショット及び追加免疫ショットの2週間後に血液サンプルを採取した。免疫染色及びフローサイトメトリーのために、終点（追加免疫の2週間後）においてもマウス脾臓を採取した。

【図面】

【図 1】



【図 2 A】

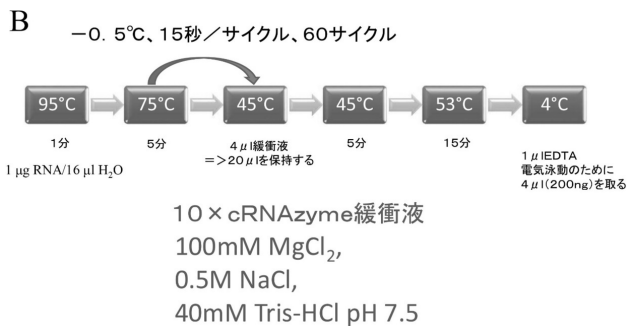


10

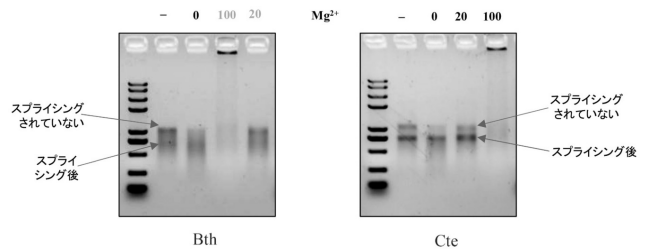
20

30

【図 2 B】



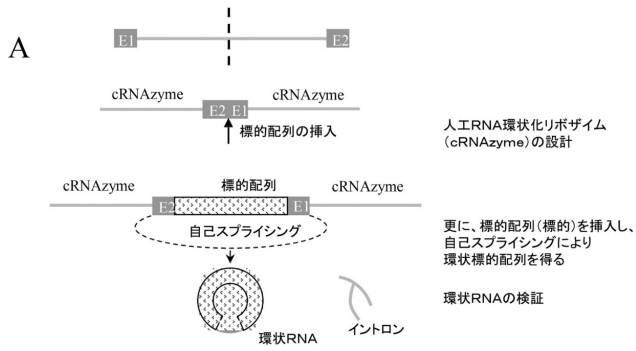
【図 3】



40

50

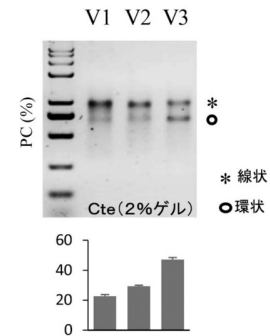
【図 4 A】



【図 4 B】

B

Cteを例にとると、異なる位置で分割することによってcRNAzymeを設計した (インサートはRlucであった)

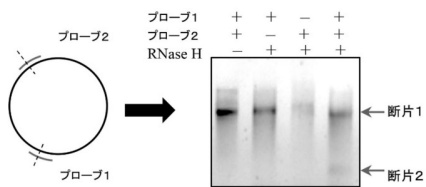
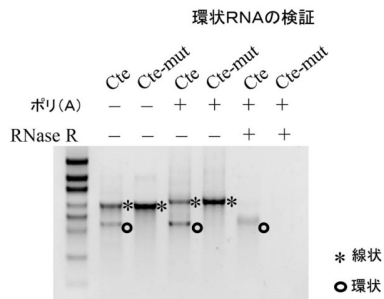


環状化のパーセント (PC%) = 環状 / (環状 + 線状) × 100%

10

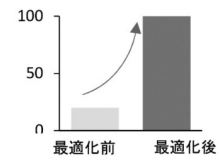
【図 4 C】

C



【図 5 A】

A



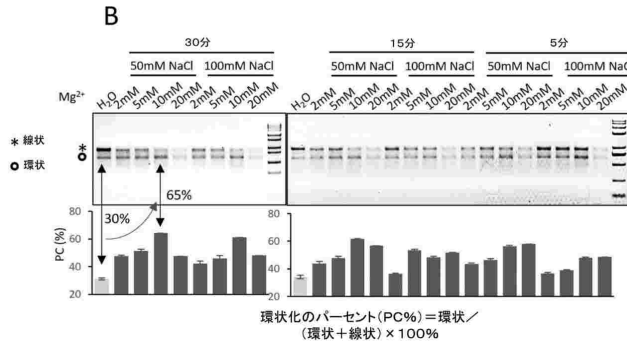
20

30

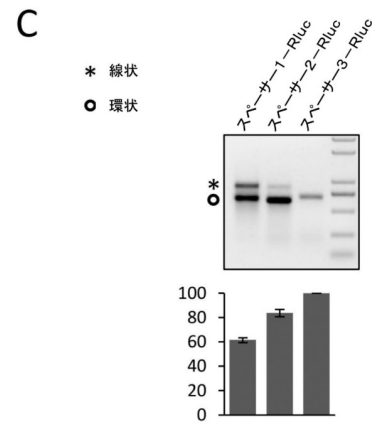
40

50

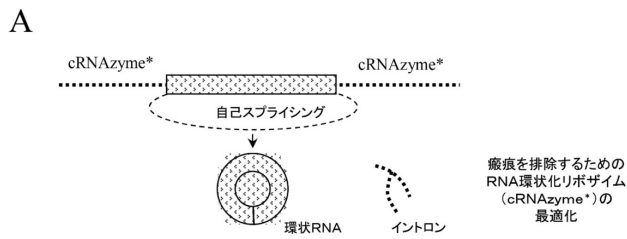
【図 5 B】



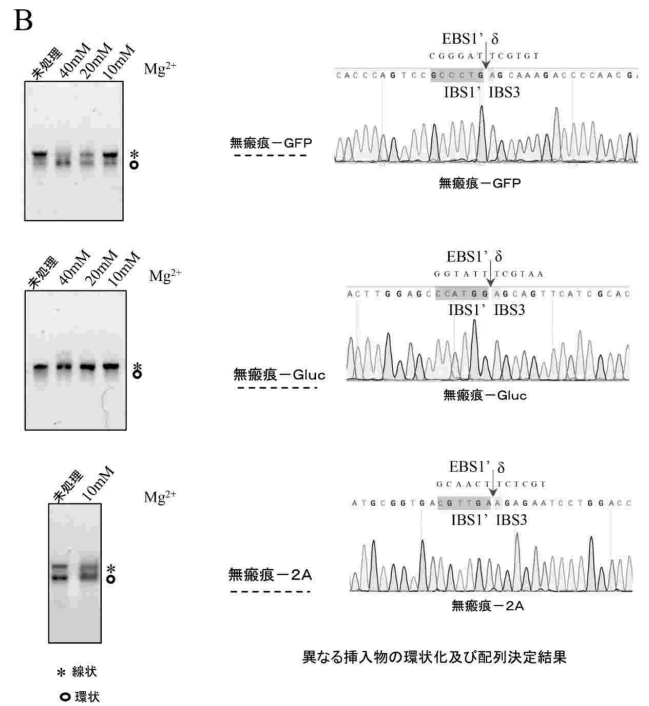
【図 5 C】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

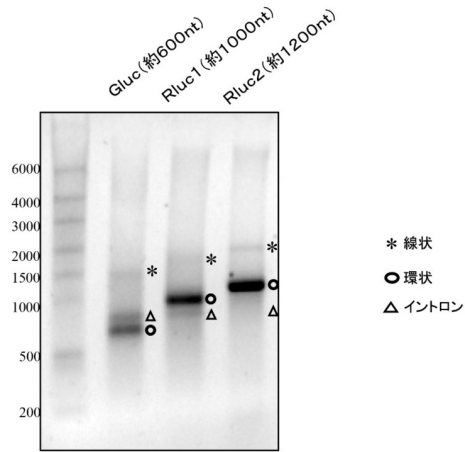
20

30

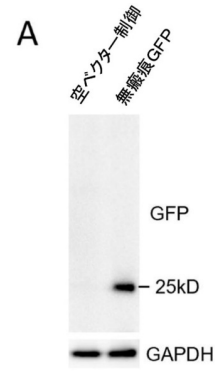
40

50

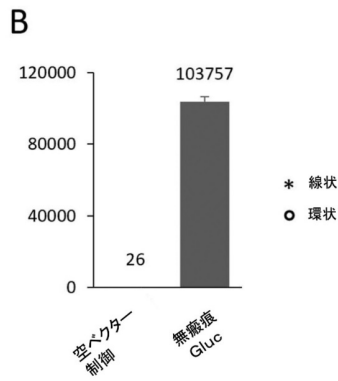
【図 7】



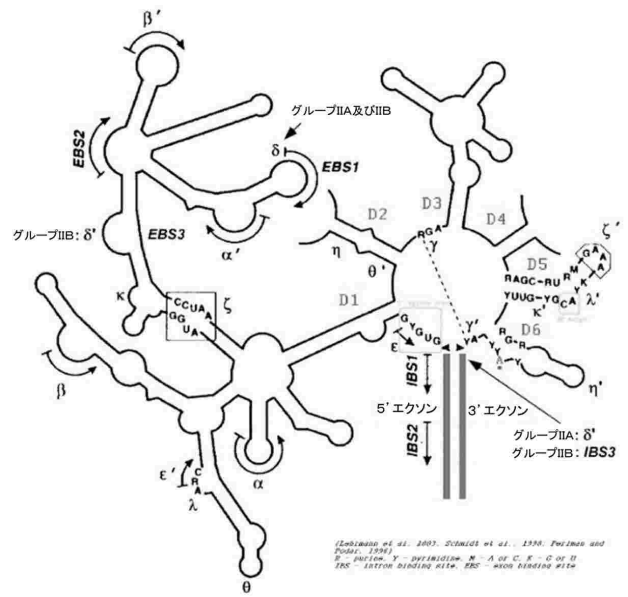
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9】



10

20

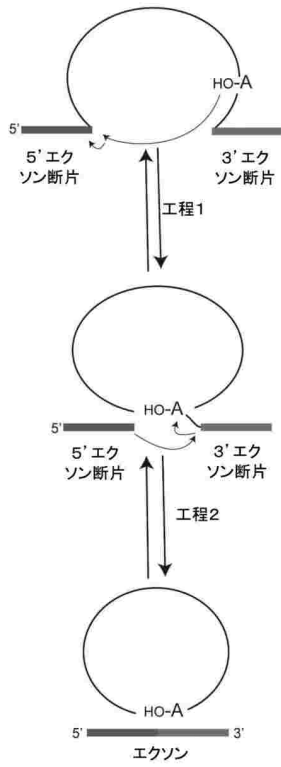
30

40

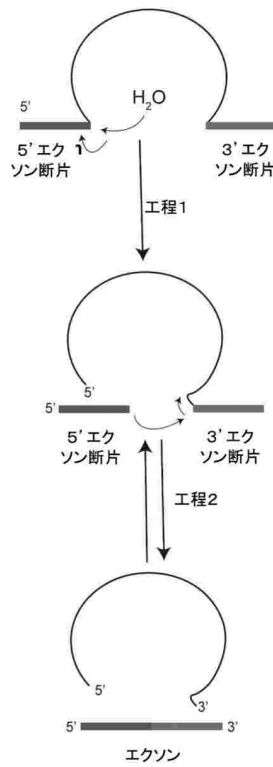
50

【図 10】

a. 分岐経路

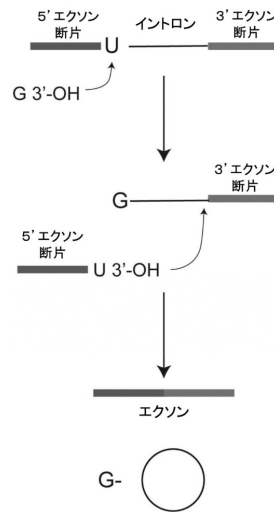


b. 加水分解経路

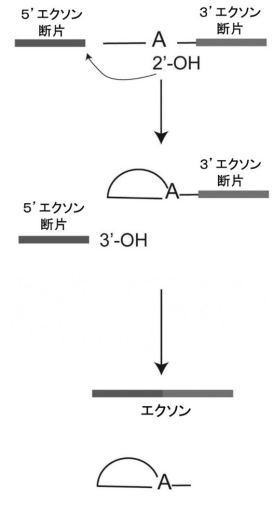


【図 11】

グループIイントロン



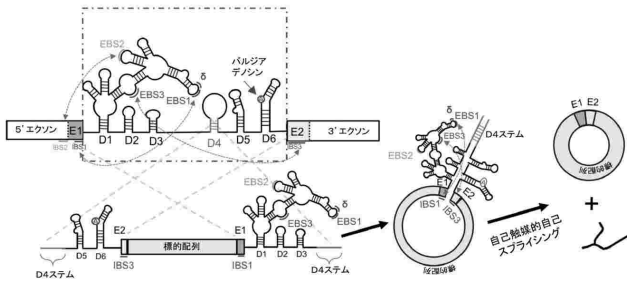
グループIIイントロン



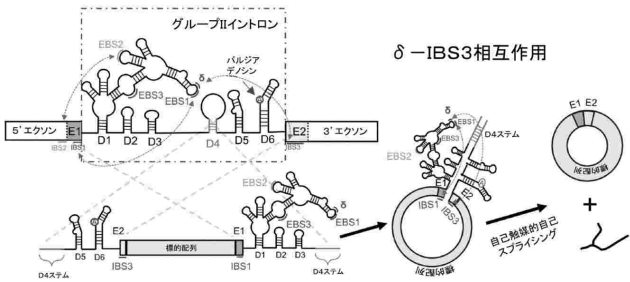
10

20

【図 12 A】



【図 12 B】

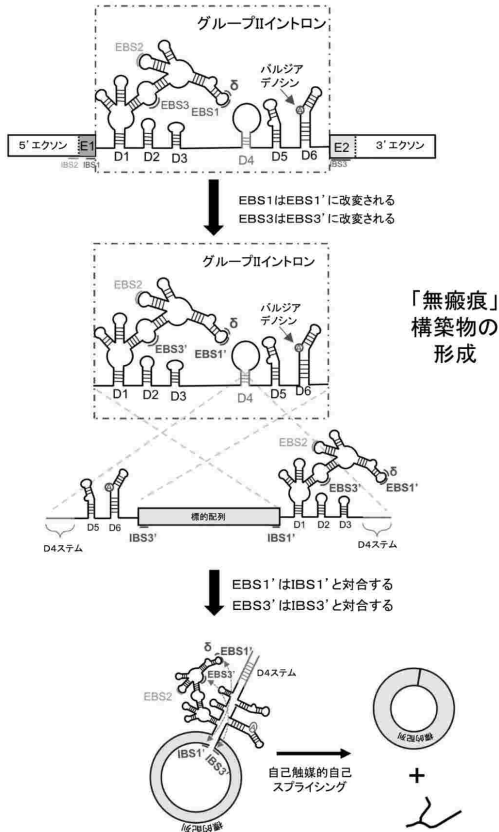


30

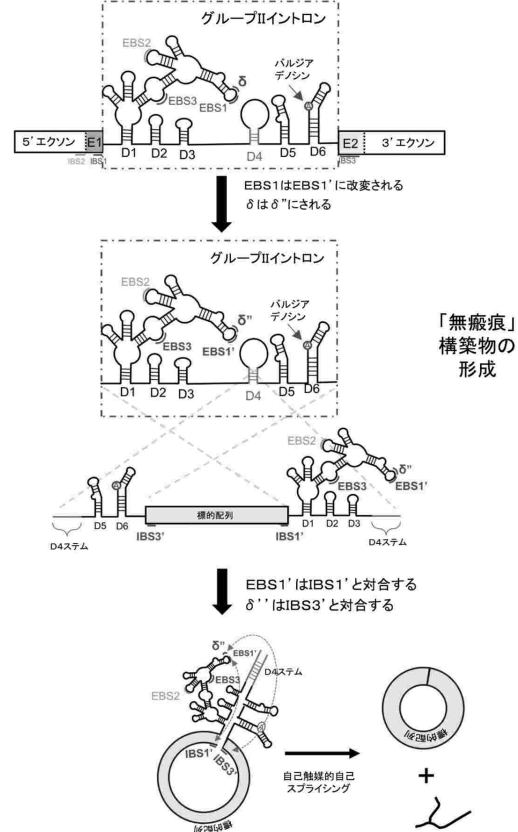
40

50

【図 1 2 C】



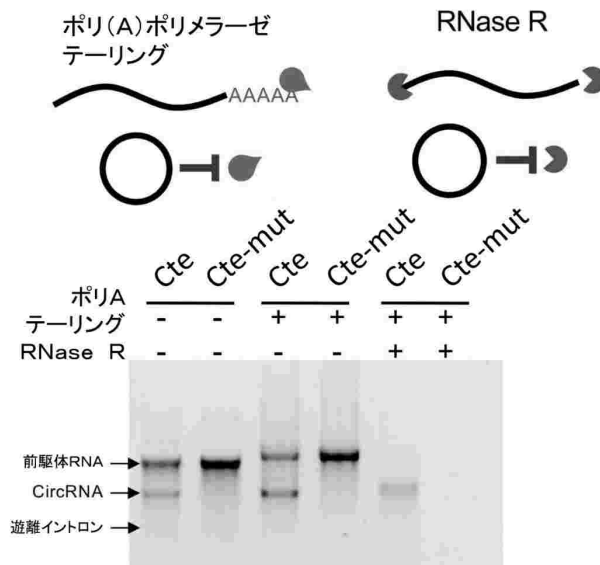
【図 1 2 D】



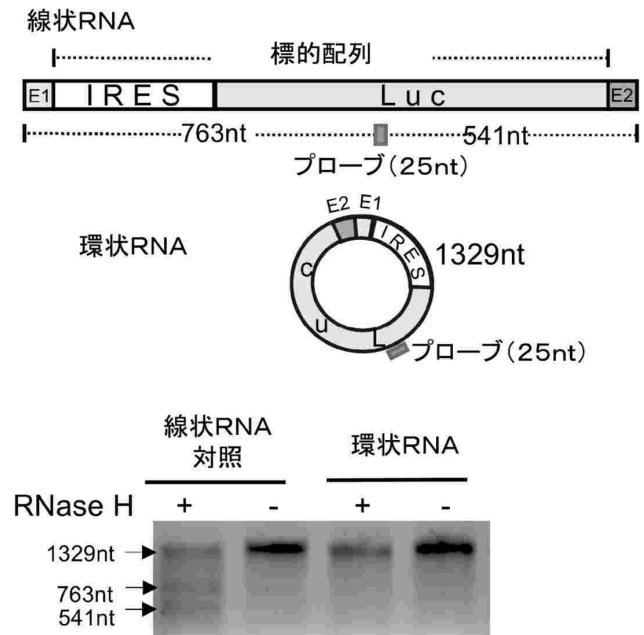
10

20

【図 1 3】



【図 1 4】

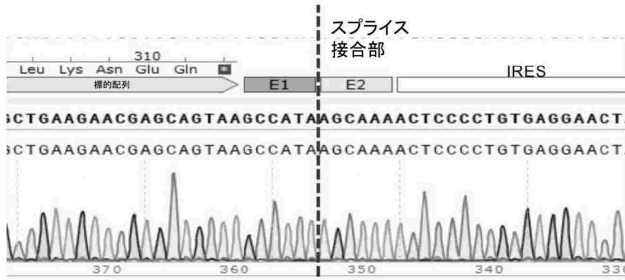


30

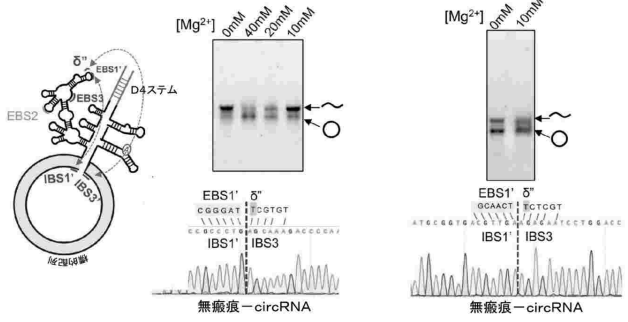
40

50

【図 15】

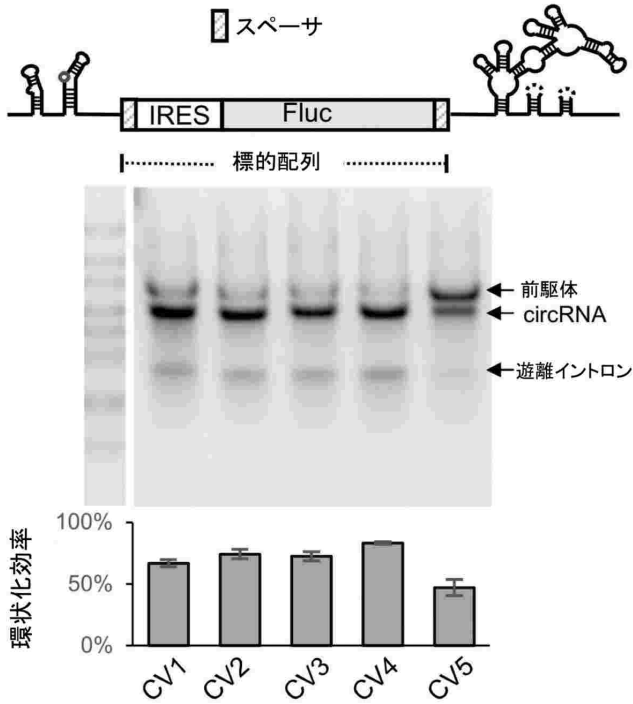


【図 16】

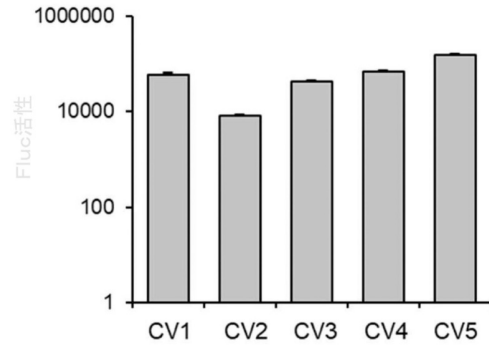


10

【図 17】



【図 18】



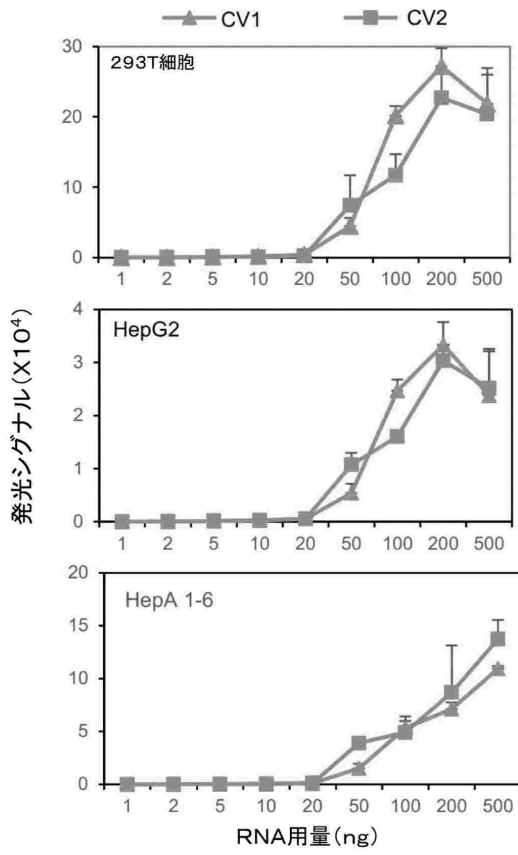
20

30

40

50

【図 19】



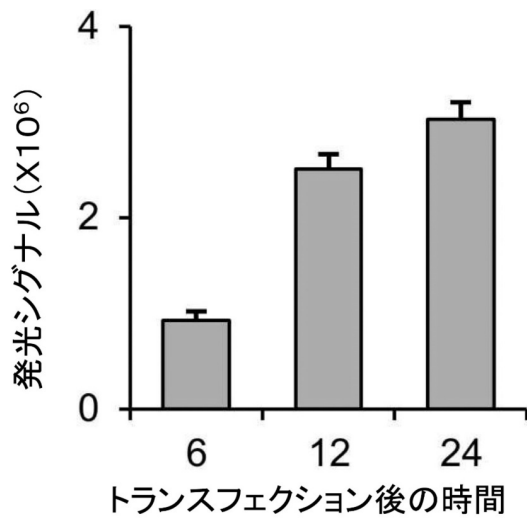
【図 20】



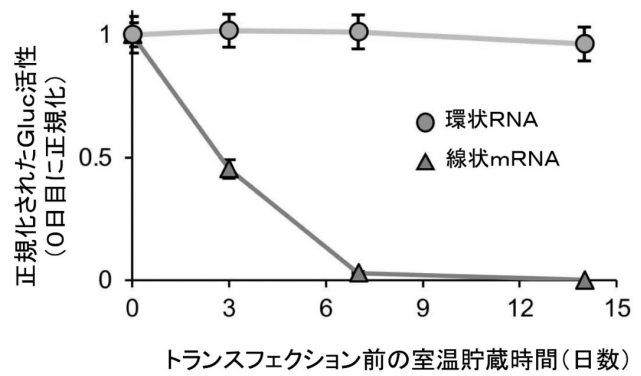
10

20

【図 21-1】



【図 21-2】

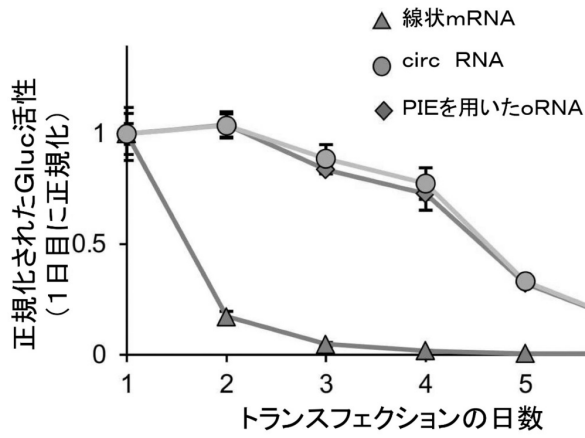


30

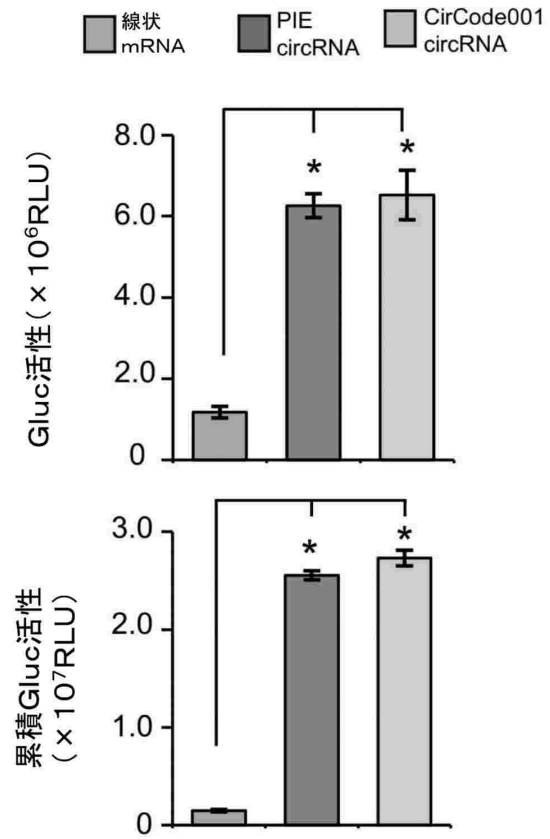
40

50

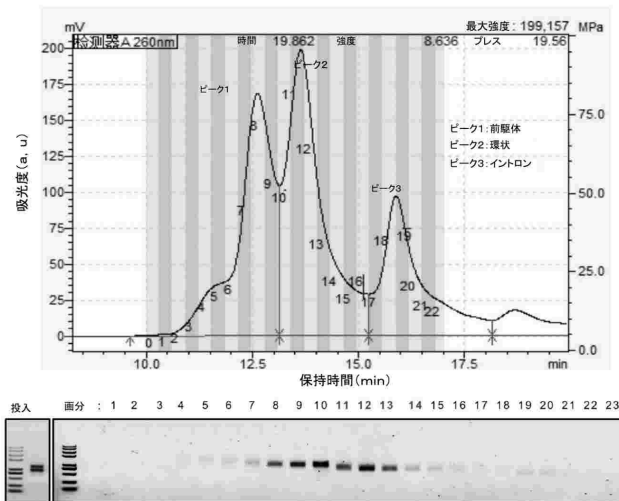
【図 2 2】



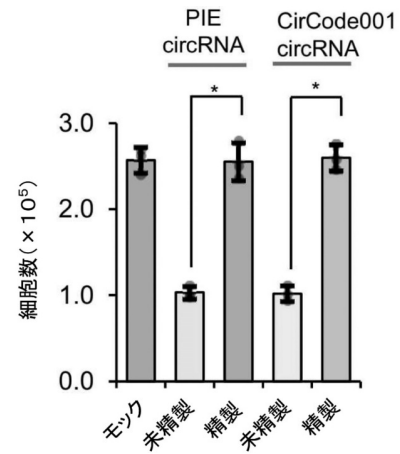
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



10

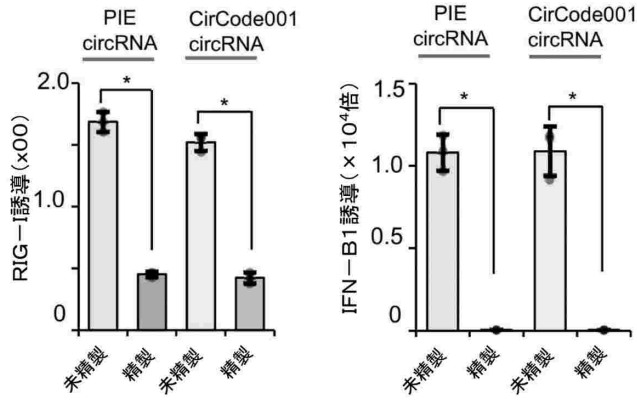
20

30

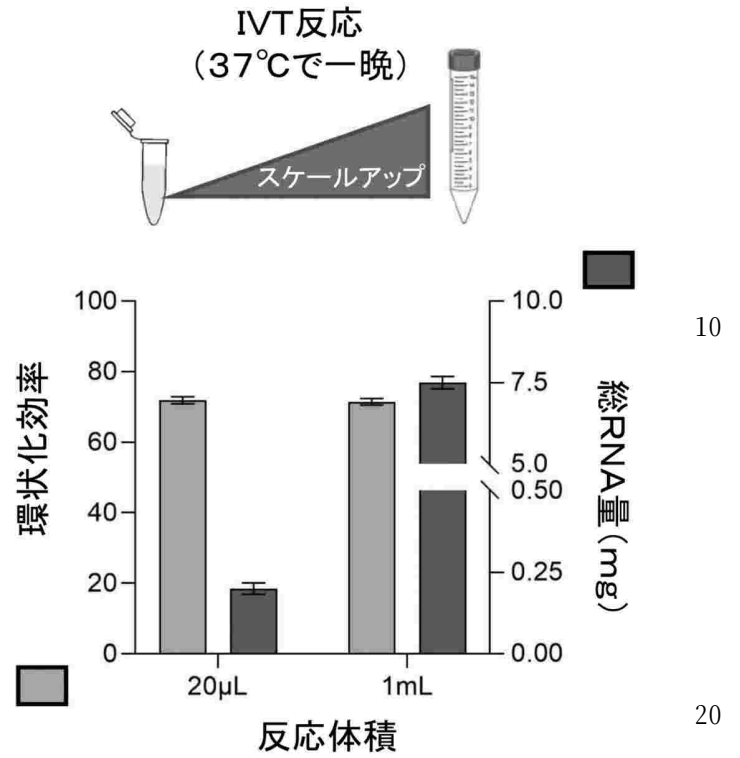
40

50

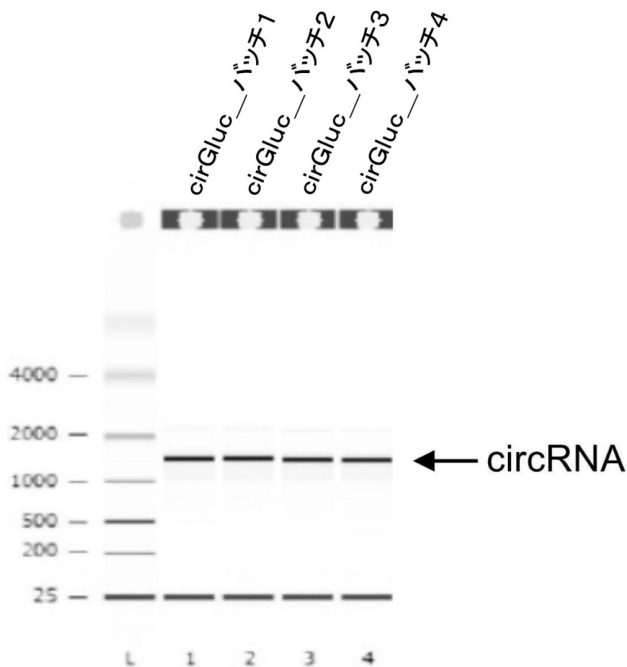
【図 2 6】



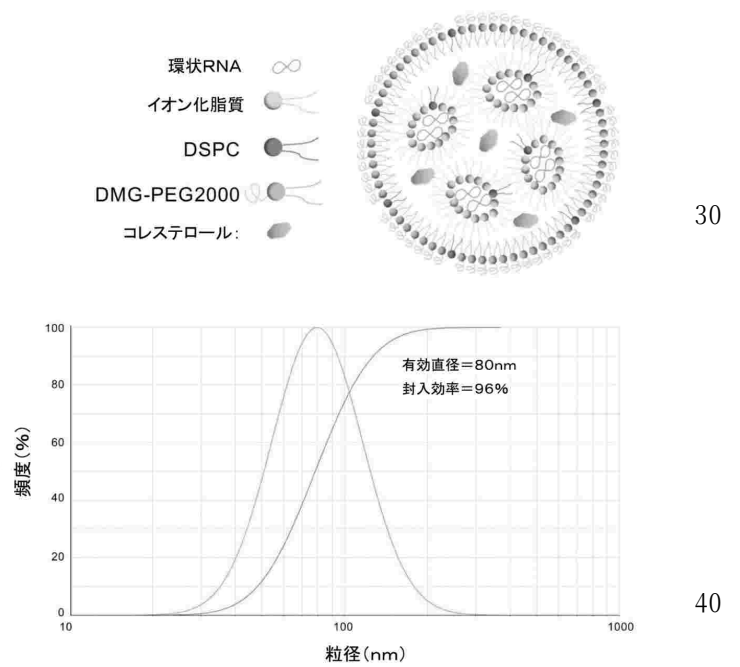
【図 2 7】



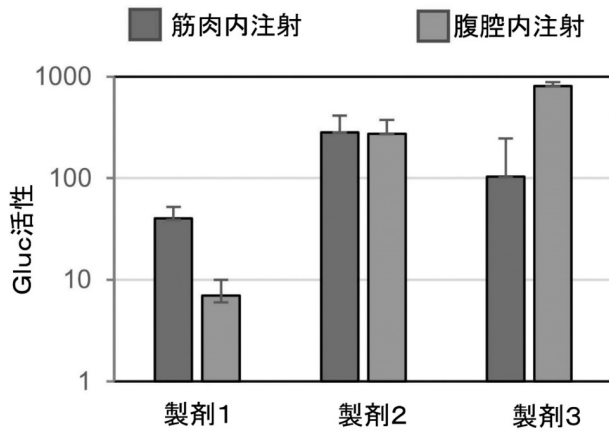
【図 2 8】



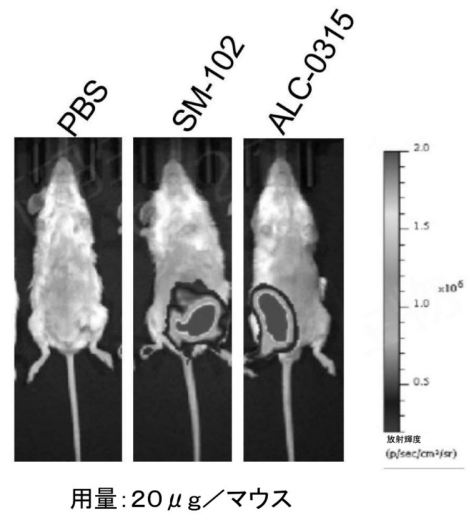
【図 2 9】



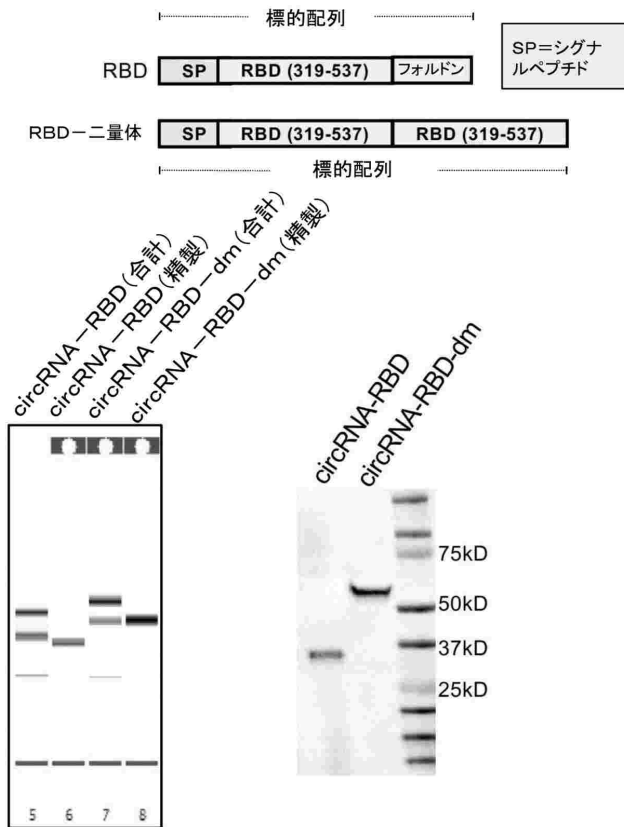
【図 3 0】



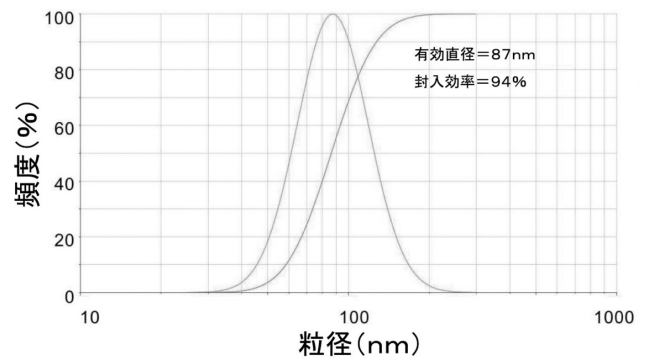
【図 3 1】



【図 3 2】



【図 3 3】



10

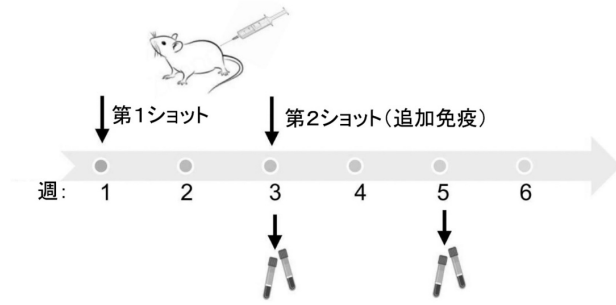
20

30

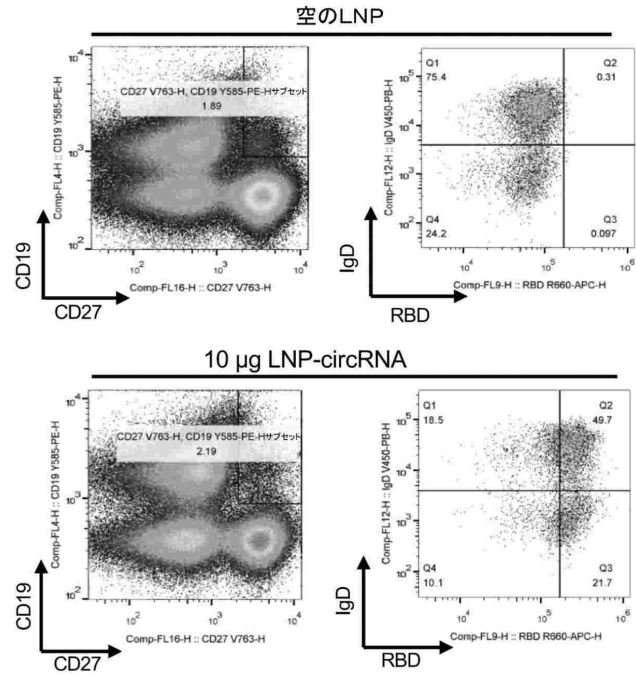
40

50

【図 3 4】



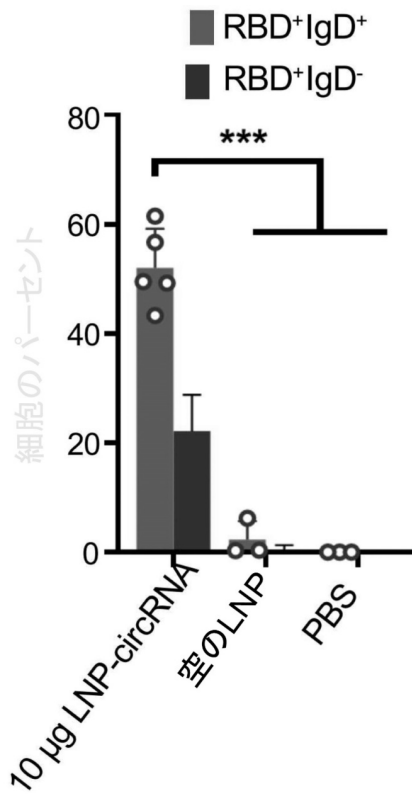
【図 3 5】



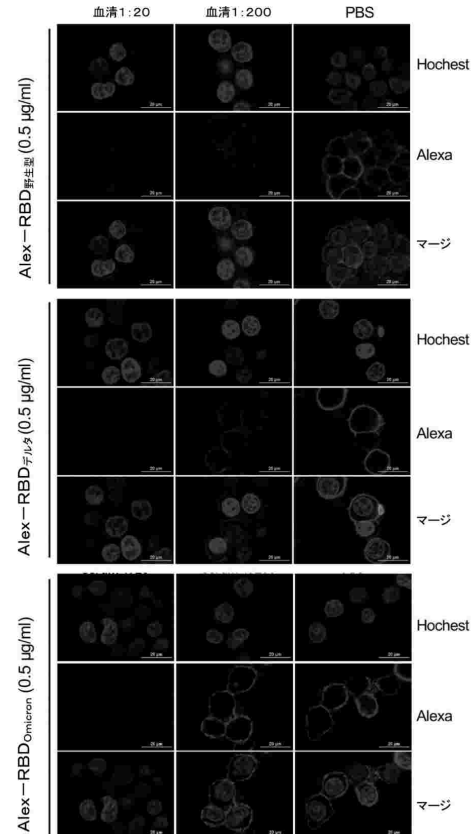
10

20

【図 3 6】



【図 3 7】

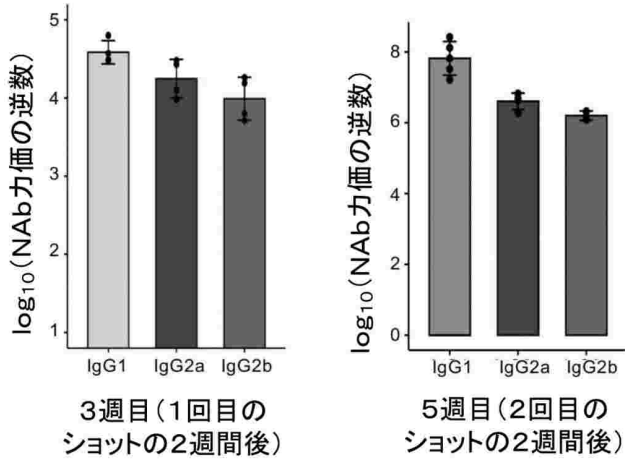


30

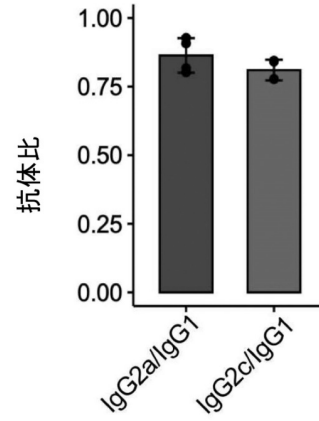
40

50

【図 3 8】

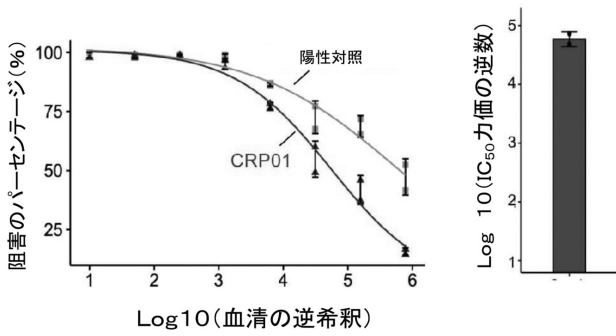


【図 3 9】

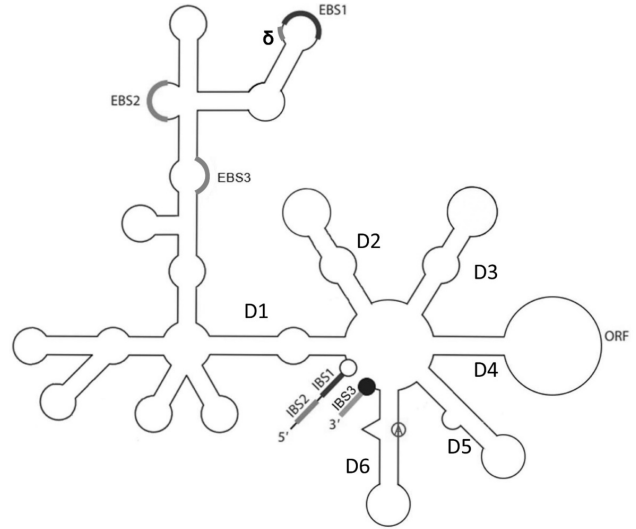


10

【図 4 0】



【図 4 1】



20

30

【配列表】

2024520534000001.app

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CN2022/095749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/67 A61K48/00 C12N15/79
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 A61K

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, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 780 272 A (JARRELL KEVIN A [US]) 14 July 1998 (1998-07-14)	1, 5-7, 16, 17, 26-32, 58-60, 64-66
Y	column 2, line 40 - column 25, line 21; claims 1-45; examples 1-11	2-4, 8-15, 18-25, 33-57, 61-63
X	----- WO 98/40519 A1 (UNIV BOSTON [US]) 17 September 1998 (1998-09-17) page 3, line 18 - page 33, line 25; examples 1-21 ----- -/--	1, 5-7, 16, 17, 26-32, 58-60, 64-66

☒ 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

30 September 2022

Date of mailing of the international search report

10/10/2022

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

Authorized officer

Westphal-Daniel, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/095749

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CN2022/095749

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIKHEEVA S ET AL: "Use of an engineered ribozyme to produce a circular human exon", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 25, no. 24, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 5085-5094, XP002137476, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/25.24.5085 cited in the application the whole document -----	1, 5-7, 16, 17, 26-32, 58-60, 64-66
X	SONJA PETKOVIC ET AL: "RNA circularization strategies in vivo and in vitro", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 43, no. 4, 6 February 2015 (2015-02-06), pages 2454-2465, XP055488942, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkv045 the whole document -----	58, 59
Y	WO 2019/236673 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 12 December 2019 (2019-12-12) cited in the application paragraph [0005] - paragraph [0169]; claims 1-62; examples 1, 2 -----	2-4, 8-15, 18-25, 33-57, 61-63
Y	R. ALEXANDER WESSELHOEFT ET AL: "Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 9, no. 1, 1 December 2018 (2018-12-01), XP055622155, UK ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/s41467-018-05096-6 cited in the application the whole document -----	2-4, 8-15, 18-25, 33-57, 61-63
A	WO 2017/222911 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; CHANG HOWARD Y [US] ET AL.) 28 December 2017 (2017-12-28) page 2, line 7 - page 66, line 13 -----	1-66
4 A	WO 2021/041541 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 4 March 2021 (2021-03-04) paragraph [0008] - paragraph [0188] -----	1-66
2	----- -/--	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CN2022/095749

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAROCHE-JOHNSTON FÉLIX ET AL: "Bacterial group II introns generate genetic diversity by circularization and trans-splicing from a population of intron-invaded mRNAs", PLOS GENETICS, vol. 14, no. 11, 21 November 2018 (2018-11-21), page e1007792, XP055962248, DOI: 10.1371/journal.pgen.1007792 Retrieved from the Internet: URL:https://journals.plos.org/plosgenetics/article/file?id=10.1371/journal.pgen.1007792&type=printable> the whole document -----	1-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CN2022/095749

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5780272 A	14-07-1998	US 5498531 A	12-03-1996
		US 5780272 A	14-07-1998
		WO 9507351 A1	16-03-1995
WO 9840519 A1	17-09-1998	AU 6700598 A	29-09-1998
		US 6150141 A	21-11-2000
		WO 9840519 A1	17-09-1998
WO 2019236673 A1	12-12-2019	AU 2019280583 A1	03-12-2020
		BR 112020024292 A2	02-03-2021
		CA 3100276 A1	12-12-2019
		CN 112399860 A	23-02-2021
		EP 3801639 A1	14-04-2021
		IL 279157 A	31-01-2021
		JP 2021526792 A	11-10-2021
		KR 20210018323 A	17-02-2021
		SG 11202011162R A	30-12-2020
		US 2020080106 A1	12-03-2020
		US 2021198688 A1	01-07-2021
		US 2021363540 A1	25-11-2021
		US 2021403944 A1	30-12-2021
		US 2022025395 A1	27-01-2022
		WO 2019236673 A1	12-12-2019
WO 2017222911 A1	28-12-2017	AU 2017280943 A1	17-01-2019
		CA 3028682 A1	28-12-2017
		EP 3472193 A1	24-04-2019
		US 2019345503 A1	14-11-2019
		WO 2017222911 A1	28-12-2017
WO 2021041541 A1	04-03-2021	AU 2020337918 A1	03-03-2022
		CA 3146883 A1	04-03-2021
		CN 114430776 A	03-05-2022
		EP 4022069 A1	06-07-2022
		US 2022288176 A1	15-09-2022
		WO 2021041541 A1	04-03-2021

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,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,
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,J
O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(74)代理人 100196977

弁理士 上原 路子

(72)発明者 ヤン ユン

中華人民共和国, 200131, シャンハイ, プートン ニュー ディストリクト, チアフォン ロ
ード, ナンバー 8, ルーム 901

(72)発明者 ワン ツォーフォン

中華人民共和国, 200131, シャンハイ, プートン ニュー ディストリクト, チアフォン ロ
ード, ナンバー 8, ルーム 901

F ターム (参考) 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44