

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-538168
(P2024-538168A)

(43)公表日 令和6年10月18日(2024.10.18)

(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 3
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	1 0 0 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
C 1 2 N	15/87 (2006.01)	C 1 2 N	15/87	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全121頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-523142(P2024-523142)	(71)出願人	523459789	フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ セブン, エルエルシー アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ ケンブリッジ パークウェイ 5 5 エイス フロア	
(86)(22)出願日	令和4年10月18日(2022.10.18)	(74)代理人	100078282		
(85)翻訳文提出日	令和6年6月11日(2024.6.11)	(74)代理人	弁理士 山本 秀策		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/078301	(74)代理人	100113413		
(87)国際公開番号	WO2023/069948	(74)代理人	弁理士 森下 夏樹		
(87)国際公開日	令和5年4月27日(2023.4.27)	(74)代理人	100181674	弁理士 飯田 貴敏 100181641 弁理士 石川 大輔 230113332	
(31)優先権主張番号	63/262,690	(74)代理人	弁理士 飯田 貴敏		
(32)優先日	令和3年10月18日(2021.10.18)	(74)代理人	100181641		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	弁理士 石川 大輔		
(31)優先権主張番号	63/304,913	(74)代理人	230113332		
(32)優先日	令和4年1月31日(2022.1.31)	最終頁に続く		最終頁に続く	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	63/373,293				

(54)【発明の名称】 DNA組成物及び関連方法

(57)【要約】
本開示は、例えば、1 0 0塩基対より長い二本鎖構造を形成しない一本鎖の共有結合的に閉環されたDNAを提供する。ssDNAは、エフェクター配列、例えば、治療用タンパク質をコードし得る。ssDNAは、核標的化配列(NTS)を含み得る。いくつかの実施形態では、ssDNAは、それ以外は同様のdsDNAと比較して、自然免疫系の低下した活性化を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

環状 s s DNA を作製する方法であって、

a) 環状 d s DNA を提供する（例えば、生成又は取得する）ことであって、前記環状 d s DNA が、

i) プラスミド骨格を欠き；

i i) 細菌複製起点を欠き；

i i i) 選択可能マーカー、例えば、抗生物質耐性マーカーを欠き；又は

i v) 化学修飾、例えば、糖に対する化学修飾、塩基に対する化学修飾、又は核酸骨格に対する化学修飾を含む、提供する（例えば、生成又は取得する）こと；

10

b) 前記環状 d s DNA の 1 つの鎖に不連続を導入し（例えば、前記環状 d s DNA を、前記 d s DNA におけるニッキング認識部位を認識するニッキングエンドヌクレアーゼ（例えば、N b . B s r D I 又は N b . B p u 1 0 I 又は N t . B s p Q I）と、前記ニッキングエンドヌクレアーゼが前記 d s DNA における前記部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ）、それによって、不連続を有する d s DNA を生成すること；

c) 前記不連続を有する d s DNA を、エキソヌクレアーゼ（例えば、T 7 エキソヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼ I I I）と、前記ニック鎖の分解（例えば、完全な分解）を可能にする条件下で接触させ、

それによって、前記環状 s s DNA を作製すること

20

を含む方法。

【請求項 2】

環状 s s DNA を作製する方法であって、

a) 環状 d s DNA を提供する（例えば、生成又は取得する）こと；

b) 前記環状 d s DNA を、前記 d s DNA におけるニッキング認識部位を認識する N b . B s r D I 又は N t . B s p Q I から選択されるニッキングエンドヌクレアーゼと、前記ニッキングエンドヌクレアーゼが前記 d s DNA における前記部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ、それによって、ニック d s DNA を生成すること；

c) 前記ニック d s DNA を、エキソヌクレアーゼ（例えば、T 7 エキソヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼ I I I）と、前記ニック鎖の分解（例えば、完全な分解）を可能にする条件下で接触させ、

30

それによって、前記環状 s s DNA を作製すること

を含む方法。

【請求項 3】

環状 s s DNA を作製する方法であって、

a) 環状 d s DNA を提供する（例えば、生成又は取得する）こと；

b) 前記環状 d s DNA の 1 つの鎖に不連続を導入し（例えば、前記環状 d s DNA を、前記 d s DNA におけるニッキング認識部位を認識するニッキングエンドヌクレアーゼ（例えば、N b . B s r D I 又は N b . B p u 1 0 I 又は N t . B s p Q I）と、前記ニッキングエンドヌクレアーゼが前記 d s DNA における前記部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ）、それによって、不連続を有するニック d s DNA を生成すること；

40

c) 前記ニック d s DNA を、T 7 エキソヌクレアーゼと、前記ニック鎖の分解（例えば、完全な分解）を可能にする条件下で接触させ、

それによって、前記環状 s s DNA を作製すること

を含む方法。

【請求項 4】

環状 s s DNA を作製する方法であって、

a) 環状 d s DNA を提供する（例えば、生成又は取得する）こと；

b) 前記環状 d s DNA の 1 つの鎖に不連続を導入し（例えば、前記環状 d s DNA を

50

、前記 dsDNA におけるニッキング認識部位を認識するニッキングエンドヌクレアーゼ（例えば、Nb.BsrDI 又は Nb.Bpu10I 又は Nt.BspQI）と、前記ニッキングエンドヌクレアーゼが前記 dsDNA における前記部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ）、それによって、不連続を有するニック dsDNA を生成すること；

c) 前記ニック dsDNA を、エキソヌクレアーゼ（例えば、T7 エキソヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼ III）と、前記ニック鎖の分解（例えば、完全な分解）を可能にする条件下で接触させ、それによって、環状 ssDNA を作製すること、及び

d) 前記環状 ssDNA におけるゲル精製を実施すること

を含む方法。

10

【請求項 5】

前記環状 dsDNA が、

i) プラスミド骨格を欠き；

ii) 細菌複製起点を欠き；

iii) 選択可能マーカー、例えば、抗生物質耐性マーカーを欠き；又は

iv) 化学修飾、例えば、糖に対する化学修飾、塩基に対する化学修飾、又は核酸骨格に対する化学修飾を含む、請求項 2～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

b) が、前記環状 dsDNA を、前記 dsDNA におけるニッキング認識部位を認識する Nb.BsrDI 又は Nt.BspQI から選択されるニッキングエンドヌクレアーゼと、前記ニッキングエンドヌクレアーゼが前記 dsDNA における前記部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ、それによって、ニック dsDNA を生成することを含む、請求項 1 及び 3～5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

c) が、前記ニック dsDNA を、T7 エキソヌクレアーゼと、前記ニック鎖の分解（例えば、完全な分解）を可能にする条件下で接触させることを含む、請求項 1、2、及び 4～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

d) 前記環状 ssDNA におけるゲル精製を実施することをさらに含む、請求項 1～3 及び 5～7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記環状 dsDNA を生成することが、

(i) エフェクター配列を含む核酸（例えば、プラスミド）を提供すること；

(ii) 前記エフェクター配列を含む前記核酸（例えば、プラスミド）の領域を増幅するために PCR を実施することであって、PCR を実施することが、前記プラスミドを、第 1 のエンドヌクレアーゼ認識部位を含む第 1 のプライマー及び第 2 のエンドヌクレアーゼ認識部位及びニッキング認識部位を含む第 2 のプライマーと接触させることであって、前記第 1 のプライマー及び前記第 2 のプライマーが、前記エフェクター配列を増幅する（及び任意に、前記プラスミドの骨格を増幅しない）のに好適な前記プラスミドにおける位置に配置される、接触させること、及び前記プラスミドを、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ（例えば、ハイフィデリティポリメラーゼ、例えば、Q5）と接触させること、及び前記エフェクター配列を含む前記核酸の領域を増幅するのに十分な熱サイクル条件を適用し、それによって、線状 dsDNA を生成することを含む、PCR を実施すること；

40

(iii) 前記エンドヌクレアーゼ認識部位を切断するエンドヌクレアーゼ（例えば、BsaI、KpnI、又は NheI）により線状 dsDNA を消化し、それによって、消化された線状 DNA を生成すること、

(iv) （例えば、前記線状の消化された dsDNA を、リガーゼ、例えば、T4 リガーゼと接触させることによって）前記消化された線状 dsDNA を環状化すること；及び

(v) 前記消化された線状 dsDNA を含む組成物を、エキソヌクレアーゼ（例えば、T5 エキソヌクレアーゼ）と接触させることによって、残りの線状 DNA を消化すること

50

のうちの1つ以上（例えば、2、3、4つ、又は全て）を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

1つ以上の精製工程、例えば、ゲル精製又はDNA精製カラムの使用を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記精製工程が、
前記線状dsDNA；
前記消化された線状dsDNA；
前記環状dsDNA；又は
前記環状ssDNA

10

において実施される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

有機抽出工程（例えば、フェノールクロロホルム抽出工程）を含まない、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

c) が、15～120分間、例えば、20～60分間、例えば、約30分間にわたって、前記ニックdsDNAを、前記エキソヌクレアーゼ（例えば、前記T7エキソヌクレアーゼ）と接触させることを含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記環状dsDNAの1つの鎖に不連続を導入することが、2つの隣接するヌクレオチド間にニックを導入することを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項15】

前記環状dsDNAの1つの鎖に不連続を導入することが、ヌクレオチドを除去することを含み、例えば、ここで、前記ヌクレオチドが、ウラシルである、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖DNA（ssDNA）を含む組成物（例えば、医薬組成物）であって、

a) 前記組成物中の全DNAの質量基準で少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、又は98%、又は99%が、前記共有結合的に閉環されたssDNAである；

30

b) 前記組成物中の全DNAの質量基準で少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%が、完全長である；

c) 前記組成物中のDNAの質量基準で10%、5%、4%、3%、2%、又は1%未満が、二本鎖DNA（dsDNA）である；

d) 前記組成物中のDNAの質量基準で10%、5%、4%、3%、2%、又は1%未満が、線状DNAである；又は

e) 前記組成物中のDNAの質量基準で10%、5%、4%、3%、2%、又は1%未満が、線状ssDNAである

40

のうちの1つ以上である、組成物（例えば、医薬組成物）。

【請求項17】

エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖DNA（ssDNA）を含む、組成物（例えば、医薬組成物）であって、

a) 前記組成物が、クロロホルムを実質的に含まない、例えば、含まない；

b) 前記組成物が、フェノールを実質的に含まない、例えば、含まない；

c) 前記組成物が、フェノール及びクロロホルムを実質的に含まない、例えば、含まない；

d) 前記組成物が、有機溶媒を実質的に含まない、例えば、含まない；又は

e) 前記組成物が、芳香族有機溶媒を実質的に含まない、例えば、含まない

50

のうちの1つ以上である、組成物（例えば、医薬組成物）。

【請求項18】

エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖DNA（ssDNA）を含む組成物（例えば、医薬組成物）であって、

前記ssDNAが、フェノールクロロホルム抽出工程を含まない方法によって生成された、組成物（例えば、医薬組成物）。

【請求項19】

エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖DNA（ssDNA）を含む組成物（例えば、医薬組成物）であって、

a) 前記組成物が、エキソヌクレアーゼIIIを実質的に含まない（例えば、含まない）；

b) 前記組成物が、T7エキソヌクレアーゼを実質的に含まない（例えば、含まない）；又は

c) 前記組成物が、T5エキソヌクレアーゼを実質的に含まない（例えば、含まない）のうちの1つ以上である、組成物（例えば、医薬組成物）。

【請求項20】

少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10mgの、エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖DNA（ssDNA）を含む組成物（例えば、医薬組成物）。

【請求項21】

エフェクター配列を含み、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む環状二本鎖DNA、及び

Nb.BsrDI又はNt.BspQI

を含む、組成物（例えば、医薬組成物又は製造中間体）。

【請求項22】

前記ssDNAが、担体中に配置されない、請求項16～21のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項23】

担体をさらに含む、請求項16～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項24】

前記担体が、脂質ベースの担体である、請求項23に記載の組成物。

【請求項25】

前記脂質ベースの担体が、脂質ナノ粒子（LNP）である、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】

裸での投与用に製剤化される、請求項16～22のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項27】

非経口投与用に製剤化される、請求項16～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項28】

局所投与用に製剤化される、請求項16～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項29】

内毒素、モノヌクレオチド、修飾モノヌクレオチド、二本鎖DNA、DNA断片又は切断、タンパク質（例えば、酵素、例えば、リガーゼ、制限酵素）からなる群から選択される不純物又は副産物を実質的に含まない、請求項16～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項30】

ssDNAを含む組成物の試料を評価する方法であって、条件が満たされるかどうかを決定することを含み、ここで、前記条件が、

a) 前記組成物中の全DNAの質量基準で少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、97%、又は98%、又は99%が、共有結合的に閉環されたssDNAであ

10

20

30

40

50

る；

b) 前記組成物中の全DNAの質量基準で少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%が、完全長である；

c) 前記組成物中のDNAの質量基準で10%、5%、4%、3%、2%、又は1%未満が、二本鎖DNA (dsDNA) である；

d) 前記組成物中のDNAの質量基準で10%、5%、4%、3%、2%、又は1%未満が、線状DNAである；

e) 前記組成物中のDNAの質量基準で10%、5%、4%、3%、2%、又は1%未満が、線状ssDNAである；

f) 前記組成物が、クロロホルムを実質的に含まない、例えば、含まない；

10

g) 前記組成物が、フェノールを実質的に含まない、例えば、含まない；

h) 前記組成物が、フェノール及びクロロホルムを実質的に含まない、例えば、含まない；

i) 前記組成物が、有機溶媒を実質的に含まない、例えば、含まない；

j) 前記組成物が、芳香族有機溶媒を実質的に含まない、例えば、含まない；

k) 前記組成物が、エキソヌクレアーゼIIIを実質的に含まない（例えば、含まない）；

l) 前記組成物が、T7エキソヌクレアーゼを実質的に含まない（例えば、含まない）；及び／又は

m) 前記組成物が、T5エキソヌクレアーゼを実質的に含まない（例えば、含まない）から選択される、方法。

20

【請求項31】

前記条件が満たされる場合、前記組成物における下流の処理工程を実施することをさらに含み、任意に、前記下流の処理工程が、前記組成物を複数の部分に分けること、前記組成物を包装すること、前記組成物にラベルを貼ること、前記組成物を輸送すること、前記組成物を流通させること、前記組成物を貯蔵すること、又は前記組成物を発売することから選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記組成物が、請求項16～29のいずれか一項に記載の組成物である、請求項30又は31に記載の方法。

30

【請求項33】

前記組成物が、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法によって作製された、請求項30～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

エフェクターを対象に送達する方法であって、請求項16～29のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項35】

細胞、組織又は対象における生物学的パラメーターを調節する方法であって、請求項16～29のいずれか一項に記載の組成物を、前記細胞、組織又は対象に投与することを含む方法。

40

【請求項36】

前記ssDNAが、100塩基対より長い二本鎖構造を形成しない、請求項1～35のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項37】

前記ssDNAが、化学修飾、例えば、糖に対する化学修飾、塩基に対する化学修飾、又は核酸骨格に対する化学修飾を含む、請求項1～36のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項38】

前記ssDNAが、バクテリオファージゲノムではない、請求項1～37のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

50

【請求項 39】

前記 ssDNA が、バクテリオファージパッケージング部位を欠いている、請求項 1 ～ 38 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 40】

前記 ssDNA が、バクテリオファージ複製起点を欠いている、請求項 1 ～ 39 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 41】

前記 ssDNA が、バクテリオファージカプシド遺伝子をコードしない、請求項 1 ～ 40 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 42】

前記 ssDNA が、ローリングサークル増幅によって生成されなかった、請求項 1 ～ 41 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 43】

前記 ssDNA が、鎖置換増幅によって生成されなかった、請求項 1 ～ 42 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 44】

前記 ssDNA が、プロテオメラーゼ標的配列を含まない、請求項 1 ～ 43 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 45】

前記 ssDNA が、ヘアピン構造を含まない、請求項 1 ～ 44 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 46】

前記 ssDNA が、第 2 の配列とハイブリダイズする第 1 の配列を含まず、ここで、前記第 1 の配列及び前記第 2 の配列が、少なくとも 5 nt 長であり、前記第 1 の配列及び前記第 2 の配列が、互いに 6 ヌクレオチド未満離れて配置される、請求項 1 ～ 45 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 47】

前記 ssDNA が、二本鎖起源 (DSO) を含まない、請求項 1 ～ 46 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 48】

前記 ssDNA が、核標的化配列 (NTS) をさらに含む、請求項 1 ～ 47 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 49】

前記 ssDNA が、維持配列をさらに含む、請求項 1 ～ 48 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 50】

前記 ssDNA が、第 2 鎖モチーフ (SSM) をさらに含む、請求項 1 ～ 49 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 51】

前記 ssDNA が、20 ～ 20,000 ヌクレオチドを含む、請求項 1 ～ 50 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 52】

前記 ssDNA が、50 ～ 50,000 ヌクレオチドを含む、請求項 1 ～ 51 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 53】

前記 ssDNA が、センス ssDNA 鎖である、請求項 1 ～ 52 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 54】

前記 ssDNA が、アンチセンス ssDNA 鎖である、請求項 1 ～ 53 のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

10

20

30

40

50

【請求項 55】

前記化学修飾が、5-ホルミルシトシン、ホスホロチオエート、7-メチルグアニン、及び5-グルコシルメチルシトシンから選択される共有結合的修飾である、請求項1～54のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 56】

前記エフェクター配列が、治療的に機能的な配列である、請求項1～55のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 57】

前記治療的に機能的な配列が、DNAアプタマー、DNAザイム又はアレルト異的オリゴヌクレオチド(ASO)を含むDNA配列である、請求項56に記載の組成物又は方法。

10

【請求項 58】

前記治療的に機能的な配列が、治療用RNA又はポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結されるプロモーター配列を含む、請求項56に記載の組成物又は方法。

【請求項 59】

前記プロモーター配列が、tRNA、lncRNA、miRNA、rRNA、snRNA、マイクロRNA、siRNA、piRNA、snoRNA、snRNA、exRNA、scaRNA、YRNA、及びhnRNAからなる群から選択される治療用RNAをコードする配列に作動可能に連結される、請求項58に記載の組成物又は方法。

【請求項 60】

前記プロモーター配列が、転写因子；クロマチンリモデリング因子；抗原；ホルモン；酵素（ヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、CRISPRシステムのヌクレアーゼ要素、例えば、Cas9、dCas9、Cas9-ニックアーゼ、Cpf/Cas12aなど）；Crispr連結酵素、例えば、塩基エディター又はプライムエディター；可動遺伝因子タンパク質（例えば、トランスポザーゼ、レトロトランスポザーゼ、リコンビナーゼ、インテグラーゼ）；ジーンライター；ポリメラーゼ；メチラーゼ；デメチラーゼ；アセチラーゼ；デアセチラーゼ；キナーゼ；ホスファターゼ；リガーゼ；デユビキチナーゼ；インテグラーゼ；リコンビナーゼ；トポイソメラーゼ；ジャイレース；ヘリカーゼ；リソソーム酸ヒドロラーゼ；抗体；受容体リガンド；受容体；凝固因子；膜タンパク質；ミトコンドリアタンパク質；核タンパク質；センチリン；ダーピン、及びアドネクチンからなる群から選択される治療用ポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結される、請求項58に記載の組成物又は方法。

20

【請求項 61】

前記ssDNAが、前記第1のエフェクター配列と同じ又は異なる第2のエフェクター配列を含む、請求項1～60のいずれか一項に記載の組成物又は方法。

【請求項 62】

一本鎖DNA(ssDNA)を含むLNPを含む医薬製剤であって、前記ssDNAが、

- (a) 治療用タンパク質をコードし、
- (b) 共有結合的に閉環され、
- (c) 100塩基対より長い二本鎖構造を形成せず、
- (d) 200ヌクレオチド長を超え、
- (e) プロテオメラーゼ標的配列を含まず；

40

ここで、前記医薬製剤が、線状DNA及びタンパク質を実質的に含まない、医薬製剤。

【請求項 63】

前記ssDNAが、40塩基対より長い二本鎖構造を形成しない、請求項62に記載の医薬製剤。

【請求項 64】

前記ssDNAが、前記治療用ポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結されるプロモーター配列を含む、請求項62又は63に記載の医薬製剤。

50

【請求項 6 5】

前記治療用タンパク質が、転写因子、クロマチンリモデリング因子、抗原、ペプチド、ホルモン、酵素、抗体、受容体リガンド、受容体、凝固因子、及び膜タンパク質からなる群から選択される、請求項 6 2～6 4 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 6 6】

前記 ssDNA が、バクテリオファージパッケージング部位及びバクテリオファージ複製起点の一方又は両方を欠き、又は前記 ssDNA が、バクテリオファージカプシド遺伝子をコードしない、請求項 6 2～6 5 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 6 7】

前記 ssDNA が、ローリングサークル増幅によって生成されなかった、請求項 6 2～6 6 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

10

【請求項 6 8】

前記 ssDNA が、鎖置換増幅によって生成されなかった、請求項 6 2～6 7 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 6 9】

前記 ssDNA が、30～40%、40～50%、50～60%、又は60～70%のGC含量を有する、請求項 6 2～6 8 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 7 0】

前記 ssDNA が、核標的化配列（NTS）をさらに含む、請求項 6 2～6 9 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

20

【請求項 7 1】

前記 ssDNA が、維持配列をさらに含む、請求項 6 2～7 0 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 7 2】

前記 ssDNA が、第2鎖モチーフ（SSM）をさらに含む、請求項 6 2～7 1 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 7 3】

前記 ssDNA が、200～3,000ヌクレオチドを含む、請求項 6 2～7 2 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 7 4】

前記 ssDNA が、500～2,000ヌクレオチドを含む、請求項 6 2～7 3 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

30

【請求項 7 5】

前記 ssDNA が、センス ssDNA 鎖である、請求項 6 2～7 4 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 7 6】

前記 ssDNA が、アンチセンス ssDNA 鎖である、請求項 6 2～7 4 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 7 7】

前記 ssDNA が、少なくとも1つのヌクレオチド修飾を含む、請求項 6 2～7 6 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

40

【請求項 7 8】

前記ヌクレオチド修飾が、5-ホルミルシトシンである、請求項 7 7 に記載の医薬製剤。

【請求項 7 9】

非経口投与用に製剤化される、請求項 6 2～7 8 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 8 0】

局所投与用に製剤化される、請求項 6 2～7 8 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 8 1】

内毒素、モノヌクレオチド、修飾モノヌクレオチド、二本鎖DNAのうちの1つ以上を

50

実質的に含まない、請求項 62～80 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 82】

治療用タンパク質を対象に送達する方法であって、請求項 62～81 のいずれか一項に記載の医薬製剤を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 83】

前記 ssDNA の、前記対象のゲノムへの実質的な統合をもたらさない、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

一本鎖 DNA (ssDNA) を含む LNP を含む医薬製剤であって、前記 ssDNA が、

- (a) エフェクター配列を含み、
- (b) 共有結合的に閉環され、
- (c) 40 塩基対より長い二本鎖構造を形成せず、
- (d) 200 ヌクレオチド長を超え、
- (e) プロテオメラーゼ標的配列を含まない、医薬製剤。

【請求項 85】

治療用タンパク質を対象に送達する方法であって、一本鎖 DNA (ssDNA) を含む医薬製剤を前記対象に投与することを含み、前記 ssDNA が、

- (a) エフェクター配列を含み、
- (b) 共有結合的に閉環され、
- (c) 40 塩基対より長い二本鎖構造を形成せず、
- (d) 200 ヌクレオチド長を超え、
- (e) プロテオメラーゼ標的配列を含まない、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2021 年 10 月 18 日に出願された米国特許出願第 63 / 262, 690 号、2022 年 1 月 31 日に出願された米国特許出願第 63 / 304, 913 号、2022 年 8 月 23 日に出願された米国特許出願第 63 / 373, 293 号、及び 2022 年 8 月 31 日に出願された米国特許出願第 63 / 402, 772 号に対する優先権を主張するものであり、上記の出願のそれぞれの全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

満たされていない医療ニーズに対処するための新規な治療法が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

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

【0004】

いくつかの態様では、本開示は、一本鎖 DNA (ssDNA) を含む LNP を含む医薬製剤であって、ssDNA が、(a) 治療用タンパク質をコードし、(b) 共有結合的に閉環され、(c) 100 塩基対より長い二本鎖構造を形成せず、(d) 200 ヌクレオチド長を超え、(e) プロテオメラーゼ標的配列を含まず；ここで、医薬製剤が、線状 DNA 及びタンパク質を実質的に含まない、医薬製剤を提供する。いくつかの実施形態では、ssDNA は、40 塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。

【0005】

いくつかの実施形態では、ssDNA は、治療用ポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結されるプロモーター配列を含む。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質

10

20

30

40

50

は、転写因子、クロマチンリモデリング因子、抗原、ペプチド、ホルモン、酵素、抗体、受容体リガンド、受容体、凝固因子、及び膜タンパク質からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ssDNAは、30～40%、40～50%、50～60%、又は60～70%のGC含量を有する。

【0006】

いくつかの実施形態では、ssDNAは、バクテリオファージパッケージング部位及びバクテリオファージ複製起点の一方又は両方を欠き、又はssDNAは、バクテリオファージカプシド遺伝子をコードしない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、ローリングサークル増幅によって生成されなかった。いくつかの実施形態では、ssDNAは、鎖置換増幅によって生成されなかった。

10

【0007】

いくつかの実施形態では、ssDNAは、核標的化配列（NTS）をさらに含む。いくつかの実施形態では、ssDNAは、維持配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、ssDNAは、第2鎖モチーフ（SSM）をさらに含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、ssDNAは、200～3,000ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ssDNAは、500～2,000ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ssDNAは、センスssDNA鎖である。いくつかの実施形態では、ssDNAは、アンチセンスssDNA鎖である。

【0009】

いくつかの実施形態では、ssDNAは、少なくとも1つのヌクレオチド修飾を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド修飾は、5-ホルミルシトシンである。

20

【0010】

いくつかの実施形態では、医薬製剤は、非経口投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、局所投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、内毒素、モノヌクレオチド、修飾モノヌクレオチド、二本鎖DNAのうちの1つ以上を実質的に含まない。

【0011】

いくつかの態様では、本開示は、治療用タンパク質を対象に送達する方法であって、本明細書に記載される医薬製剤を対象に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、ssDNAの、対象のゲノムへの実質的な統合をもたらさない。

30

【0012】

一態様では、本発明は、エフェクター配列を含む一本鎖DNA（ssDNA）を含む、組成物、例えば、医薬組成物であって、一本鎖DNAが、以下の特性のうちの1つ、2つ又は3つを有する：ssDNAが、共有結合的に閉環され；ssDNAが、100塩基対より長い二本鎖構造を形成せず；ssDNAが、少なくとも1つの共有結合的修飾を含む、組成物、例えば、医薬組成物を特徴とする。

【0013】

ある実施形態では、ssDNAは、エフェクター配列並びに核標的化配列（NTS）、維持配列、及び第2鎖モチーフ（SSM）のうちの1つ、2つ又は3つを有する。一実施形態では、ssDNAは、DNAエフェクター配列を有する。一実施形態では、ssDNAは、DNAエフェクター配列及びNTSを有する。一実施形態では、ssDNAは、DNAエフェクター配列、NTS、及びSSMを有する。一実施形態では、ssDNAは、DNAエフェクター配列、NTS、SSM及び維持配列を有する。一実施形態では、ssDNAは、DNAエフェクター配列、NTS、及び維持配列を有する。一実施形態では、ssDNAは、DNAエフェクター配列、SSM及び維持配列を有する。一実施形態では、ssDNAは、RNA又はタンパク質（ペプチド又はポリペプチド）エフェクターをコードする配列に作動可能に連結されるプロモーターを有する。一実施形態では、ssDNAは、RNA又はタンパク質（ペプチド又はポリペプチド）エフェクター、及びNTSをコードする配列に作動可能に連結されるプロモーターを有する。一実施形態では、ssD

40

50

NAは、RNA又はタンパク質（ペプチド又はポリペプチド）エフェクター、NTS、及びSSMをコードする配列に作動可能に連結されるプロモーターを有する。一実施形態では、ssDNAは、RNA又はタンパク質（ペプチド又はポリペプチド）エフェクター、NTS、SSM及び維持配列をコードする配列に作動可能に連結されるプロモーターを有する。一実施形態では、ssDNAは、RNA又はタンパク質（ペプチド又はポリペプチド）エフェクター、NTS、及び維持配列をコードする配列に作動可能に連結されるプロモーターを有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNAは、エンハンサー、例えば、SV40エンハンサーを含む。いくつかの実施形態では、ssDNAは、2つのエンハンサーを含む。いくつかの実施形態では、エンハンサーの一方又は両方が、SV40エンハンサーである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNAは、NTS、例えば、転写因子に結合するNTS、例えば、NF-κBに結合するNTS、例えば、3NF配列を含む。いくつかの実施形態では、ssDNAは、2、3、又は4つのNTSを含む。いくつかの実施形態では、NTSの1、2、3、又は4つが、3NF配列である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNAは、SMM（例えば、アネロウイルス（Anellovirus）ヘアピン）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNAは、ポリAシグナル、例えば、bGHポリAシグナルを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNAは、プロモーター、例えば、EF1aプロモーターを含む。

10

20

【0014】

いくつかの実施形態では、エンハンサーは、プロモーターの上流に位置する。NTSは、例えば、プロモーターの上流又はポリAシグナルの下流に位置し得る。いくつかの実施形態では、SMM（例えば、アネロウイルス（Anellovirus）ヘアピン）は、プロモーターの上流に位置する。

【0015】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、エンハンサー及びエフェクター配列の間に位置する。いくつかの実施形態では、NTSは、SMM（例えば、アネロウイルスヘアピン）及びプロモーターの間に位置する。いくつかの実施形態では、SMM（例えば、アネロウイルスヘアピン）は、エンハンサー及びプロモーターの間に位置する。いくつかの実施形態では、ポリAシグナルは、エフェクター配列及びNTSの間に位置する。いくつかの実施形態では、ポリAシグナルは、エフェクター配列及びエンハンサーの間に位置する。いくつかの実施形態では、ポリAシグナルは、SMM（例えば、アネロウイルスヘアピン）及びエフェクター配列の間に位置する。いくつかの実施形態では、NTSは、SMM（例えば、アネロウイルスヘアピン）及びポリAシグナルの間に位置する。いくつかの実施形態では、第1のNTS配列は、第2のNTS配列に直接隣接している。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNAは、本明細書における表5に示されるように配置される一連の構成要素を含む。

30

【0016】

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

40

50

【0017】

ある実施形態では、ssDNAは、20～1000ヌクレオチド、20～50ヌクレオチド、100～500ヌクレオチド、500～50,000ヌクレオチド、1,000～50,000ヌクレオチド、2,000～40,000ヌクレオチド、5,000～50,000ヌクレオチド、500～50,000ヌクレオチド、500～25,000ヌクレオチド、1,000～20,000ヌクレオチド、1,000～10,000ヌクレオチド、10,000～60,000ヌクレオチド、1,000～20,000ヌクレオチド、1,000～40,000ヌクレオチド、200～1,000ヌクレオチド、200～2,000ヌクレオチド、200～3,000ヌクレオチド、500～1,000ヌクレオチド、500～2,000ヌクレオチド、500～3,000ヌクレオチド、1,000～2,000ヌクレオチド、1,000～3,000ヌクレオチド、又は2,000～3,000ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、ssDNAは、20～20,000ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ssDNAは、50～50,000ヌクレオチドを含む。

10

【0018】

ある実施形態では、ssDNAは、センスssDNA鎖である。ある実施形態では、ssDNAは、アンチセンスssDNA鎖である。

【0019】

ある実施形態では、ssDNAは、例えば、N⁶-メチルアデノシン(m⁶A、6mA)；5-ホルミルシトシン(5fC、f5C)；5-カルボキシシトシン(ca5C、5caC)；5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC、hm5C)；5-メチルデオキシシトシン(m5dC)；5-メチルシトシン(5mC、m5C)；5'-メチルシトシン；3-メチルシトシン(m3C)；5-メチルピリミジン；8-オキソグアニン(8-oxoG)；ホスホロチオエート；S及びRホスホロチオエート結合；メチルチミン；N³'-P5'ホスホロアミデート(NP)；シクロヘキサン核酸(CeNA)；及びトリクロ-DNA(tcDNA)から選択される、少なくとも1つのヌクレオチド修飾、例えば、共有結合ヌクレオチド修飾を含む。いくつかの実施形態では、ssDNAは、N⁶-メチルアデノシンを含む。いくつかの実施形態では、ssDNAにおけるA位置の大部分は、N⁶-メチルアデノシンである。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド修飾は、ホスホチオエート(phosphothioate)；ボラノホスフェート；1,5-二置換トリアゾール；2'-フルオロ-2'-デオキシヌクレオシド5'-三リン酸；及び7-メチルグアニン；5-グルコシルメチルシトシンから選択される共有結合的修飾である。

20

30

【0020】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド修飾は、塩基修飾である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド修飾は、骨格修飾である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド修飾は、糖修飾である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド修飾は、ペプチドコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド修飾は、タンパク質コンジュゲートを含む。

【0021】

ある実施形態では、エフェクター配列は、治療的に機能的な配列、例えば、機能的な、構造的DNA配列、例えば、DNAアプタマー、DNAザイム又はアレルト異的オリゴヌクレオチド(ASO)である。

40

【0022】

ある実施形態では、エフェクター配列は、プロモーターに作動可能に連結される、治療用(例えば、調節)RNAをコードするDNA配列である。ある実施形態では、RNAは、例えば、tRNA、lncRNA、miRNA、rRNA、snRNA、マイクロRNA、siRNA、piRNA、snoRNA、exRNA、scarNA、YRNA、又はhnRNAであり得る。

【0023】

いくつかの実施形態では、治療的に機能的な配列は、治療用RNA又はポリペプチドを

50

コードする配列に作動可能に連結されるプロモーター配列を含む。ある実施形態では、エフェクター配列は、プロモーターに作動可能に連結される、治療用ペプチド又はポリペプチドをコードするDNA配列である。治療用ペプチド又はポリペプチドは、例えば、DNA結合タンパク質；RNA結合タンパク質；輸送体；転写因子；翻訳因子；リボソームタンパク質；クロマチンリモデリング因子；エピジェネティック修飾因子；抗原；ホルモン；酵素（ヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、CRISPRシステムのヌクレアーゼ要素、例えば、Cas9、dCas9、Cas9-ニックアーゼ、Cpf/Cas12aなど）；Crispr連結酵素、例えば、塩基エディター又はプライムエディター；可動遺伝因子タンパク質（例えば、トランスポザーゼ、レトロトランスポザーゼ、リコンビナーゼ、インテグラーゼ）；ジーンライター（gene writer）；ポリメラーゼ；メチラーゼ；デメチラーゼ；アセチラーゼ；デアセチラーゼ；キナーゼ；ホスファターゼ；リガーゼ；デュピキチナーゼ；プロテアーゼ；インテグラーゼ；リコンビナーゼ；トポイソメラーゼ；ジャイレース；ヘリカーゼ；リソソーム酸ヒドロラーゼ；抗体（例えば、インタクトな抗体、その断片、又はナノボディ）；シグナル伝達ペプチド；受容体リガンド；受容体；凝固因子（clotting factor）；凝固因子（coagulation factor）；構造タンパク質；カスパーゼ；膜タンパク質；ミトコンドリアタンパク質；核タンパク質；タンパク質足場結合剤、例えば、センチリン、ダーピン（darpin）、又はアドネクチンであり得る。

10

【0024】

実施形態では、ssDNAは、複数のエフェクター配列を含み得る。複数の、同じ又は異なるタイプであってもよく、例えば、ssDNAは、構造的DNAであるエフェクター配列及び機能的RNA又はポリペプチドをコードするDNA配列である第2のエフェクター配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ssDNAは、第1のエフェクター配列と同じ又は異なる第2のエフェクター配列を含む。ssDNAは、機能的RNAをコードするDNA配列であるエフェクター配列及び機能的ポリペプチドをコードするDNA配列である第2のエフェクター配列を含み得る。複数のエフェクター配列は、同じタイプの同じ又は異なる配列であり得る。

20

【0025】

いくつかの実施形態では、ssDNAが細胞に導入されるとき、細胞は、ssDNAと同じモル量でssDNAと同じ配列を有するdsDNAと接触された同じタイプの対照細胞と比較して、（例えば、GAPDH mRNAレベルに対して正規化される）より少ないサイトカインmRNAレベル増加を示す。いくつかの実施形態では、サイトカインは、サイトカインIFN- β 、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、又はCXCL10を含む。いくつかの実施形態では、対照細胞のサイトカイン増加は、対照細胞のサイトカイン増加の50%、40%、30%、20%、又は10%未満である。

30

【0026】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNAは、1.6~1.7、1.7~1.8、又は1.63~1.76のA260/A280比を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNAは、0.3~1、1~1.5、1.5~1.8、又は0.34~1.79のA230/A260比を有する。

40

【0027】

実施形態では、ssDNAは、担体中に配置されず、例えば、それは、裸での投与用に製剤化される。

【0028】

実施形態では、ssDNAは、担体、例えば、脂質ベースの担体、例えば、脂質ナノ粒子（LNP）とともに製剤化される。実施形態では、医薬組成物は、担体、例えば、脂質ベースの担体、例えば、LNPをさらに含む。

【0029】

いくつかの実施形態では、ssDNAを含む組成物は、LNPを実質的に含まない（例えば、含まない）。いくつかの実施形態では、ssDNAを含む組成物は、脂質ベースの

50

担体を実質的に含まない（例えば、含まない）。いくつかの実施形態では、ssDNAを含む組成物は、脂質を実質的に含まない（例えば、含まない）。

【0030】

実施形態では、ssDNAは、医薬賦形剤とともに製剤化される。

【0031】

実施形態では、ssDNAは、非経口投与用に製剤化される。

【0032】

実施形態では、医薬組成物は、局所投与用製剤化される。

【0033】

実施形態では、医薬組成物は、例えば、内毒素、モノヌクレオチド、修飾モノヌクレオチド、二本鎖DNA、DNA断片又は切断、及びタンパク質（例えば、酵素、例えば、リガーゼ、制限酵素）からなる群から選択される、不純物又はプロセス副産物を実質的に含まない。環状の、例えば、共有結合的に閉環されたssDNAの場合、医薬組成物は、線状DNAを実質的に含まない。

10

【0034】

本明細書に記載されるいずれかの実施形態では、ssDNAは、共有結合的に閉環され得、例えば、ssDNAは、環状化される。

【0035】

別の態様では、本発明は、エフェクターを、対象、例えば、それを必要とする対象に送達する方法を含む。本方法は、本明細書に記載される、例えば、上記のいずれかの実施形態に記載される組成物を対象に投与することを含む。ある実施形態では、対象は、エフェクターで治療され得る病態を有するかそのような病態であると診断されている。

20

【0036】

別の態様では、本発明は、細胞、組織又は対象における生物学的パラメーターを調節する（例えば、増加させる又は減少させる）方法を含む。本方法は、本明細書に記載される、例えば、上記のいずれかの実施形態に記載される組成物を対象に投与することを含む。実施形態では、生物学的パラメーターは、標的細胞、組織又は対象における対象の遺伝子の遺伝子発現の増加又は減少であり、この増加又は減少は、本明細書に記載されるエフェクター配列によってもたらされる。ある実施形態では、対象は、エフェクターで治療され得る病態を有するかそのような病態であると診断されている。

30

【0037】

別の態様では、本発明は、細胞、組織又は対象を治療する方法を含む。本方法は、それを必要とする細胞、組織又は対象に、本明細書に記載される、例えば、上記のいずれかの実施形態に記載されるssDNA又は構築物を投与することを含む。ある実施形態では、対象は、エフェクターで治療され得る病態を有するかそのような病態であると診断されている。

【0038】

別の態様では、本発明は、エフェクター配列を含むssDNAを含む医薬組成物を作製する方法を特徴とする。本方法は、（a）エフェクター配列並びに、任意に、エフェクター配列に作動可能に連結されるプロモーター、NTS、SSM及び維持配列のうちの1つ以上（例えば、2、3、又は4つ）を含むプラスミドを提供又は生成すること、（b）鋳型としてプラスミドを用いて、エフェクター配列並びに、任意に、エフェクター配列に作動可能に連結されるプロモーター、NTS、SSM及び維持配列のうちの1つ以上（例えば、2、3、又は4つ）を含むssDNAを提供又は生成すること、並びに（c）任意に、ssDNAを環状化することを含む。

40

【0039】

一実施形態では、本方法は、ssDNAを環状化すること（例えば、ssDNAの末端をライゲートすること）を含む。

【0040】

実施形態では、ssDNAは、本明細書に記載される、例えば、上記のいずれかの実

50

形態に記載されるいずれかの ssDNA である。

【0041】

ある実施形態では、工程 (a) は、記載される配列要素のゴールドゲート (gold gate) アセンブリを実施することを含む。

【0042】

ある実施形態では、本方法は、(d) 工程 (b) において作製される ssDNA、又は工程 (c) において作製される環状化された、例えば、共有結合的に閉環された ssDNA を濃縮又は精製することをさらに含む。

【0043】

ある実施形態では、工程 (d) は、内毒素、モノヌクレオチド、修飾モノヌクレオチド、二本鎖 DNA、DNA 断片又は切断、及びタンパク質 (例えば、酵素、例えば、リガーゼ、制限酵素) から選択される 1 つ以上の不純物を、ssDNA から実質的に除去することを含む。環状の、例えば、共有結合的に閉環された ssDNA の場合、線状 DNA が除去される。

10

【0044】

ある実施形態では、本方法は、医薬としての使用のために、工程 (d) の濃縮若しくは精製された ssDNA 又は環状化された ssDNA を製剤化すること、例えば、薬学的に許容される賦形剤とともに、及び／又は担体、例えば、LNP とともに、濃縮若しくは精製された ssDNA 又は環状化された、例えば、共有結合的に閉環された ssDNA を製剤化することをさらに含む。

20

【0045】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるエフェクター配列並びに以下の要素：プロモーター、NTS、SSM、及び維持配列のうちの 1、2、3、又は 4 つを含むプラスミドを特徴とする。

【0046】

いくつかの態様では、本開示は、エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖 DNA (ssDNA) を含む組成物 (例えば、医薬組成物) であって、a) 組成物中の全 DNA の質量基準で少なくとも 70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、又は 98%、又は 99% が、共有結合的に閉環された ssDNA である；b) 組成物中の全 DNA の質量基準で少なくとも 70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% が、完全長である；c) 組成物中の DNA の質量基準で 10%、5%、4%、3%、2%、又は 1% 未満が、二本鎖 DNA (dsDNA) である；d) 組成物中の DNA の質量基準で 10%、5%、4%、3%、2%、又は 1% 未満が、線状 DNA である；又は e) 組成物中の DNA の質量基準で 10%、5%、4%、3%、2%、又は 1% 未満が、線状 ssDNA である、のうちの 1 つ以上である、組成物 (例えば、医薬組成物) を提供する。

30

【0047】

いくつかの態様では、本開示は、エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖 DNA (ssDNA) を含む組成物 (例えば、医薬組成物) であって、a) 組成物が、クロロホルムを実質的に含まない、例えば、含まない；b) 組成物が、フェノールを実質的に含まない、例えば、含まない；c) 組成物が、フェノール及びクロロホルムを実質的に含まない、例えば、含まない；d) 組成物が、有機溶媒を実質的に含まない、例えば、含まない；又は e) 組成物が、芳香族有機溶媒を実質的に含まない、例えば、含まない、のうちの 1 つ以上である、組成物 (例えば、医薬組成物) を提供する。

40

【0048】

いくつかの態様では、本開示は、エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖 DNA (ssDNA) を含む組成物 (例えば、医薬組成物) であって、ssDNA が、フェノール-クロロホルム抽出工程を含まない方法によって生成された、組成物 (例えば、医薬組成物) を提供する。

【0049】

50

いくつかの態様では、本開示は、エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖DNA (ssDNA) を含む組成物 (例えば、医薬組成物) であって、a) 組成物が、エキソヌクレアーゼIIIを実質的に含まない (例えば、含まない) ; b) 組成物が、T7エキソヌクレアーゼを実質的に含まない (例えば、含まない) ; 又はc) 組成物が、T5エキソヌクレアーゼを実質的に含まない (例えば、含まない)、のうちの1つ以上である組成物 (例えば、医薬組成物) を提供する。

【0050】

いくつかの態様では、本開示は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10mgの、エフェクター配列を含む共有結合的に閉環された一本鎖DNA (ssDNA) を含む組成物 (例えば、医薬組成物) を提供する。

10

【0051】

いくつかの態様では、本開示は、エフェクター配列を含み、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む環状二本鎖DNA、及びNb.BsrDI又はNt.BspQIを含む組成物 (例えば、医薬組成物又は製造中間体) を提供する。

【0052】

いくつかの実施形態では、ssDNAは、担体中に配置されない。いくつかの実施形態では、組成物は、担体をさらに含む。いくつかの実施形態では、担体は、脂質ベースの担体である。いくつかの実施形態では、脂質ベースの担体は、脂質ナノ粒子 (LNP) である。いくつかの実施形態では、組成物は、裸での投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、組成物は、非経口投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、組成物は、局所投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、組成物は、内毒素、モノヌクレオチド、修飾モノヌクレオチド、二本鎖DNA、DNA断片又は切断、タンパク質 (例えば、酵素、例えば、リガーゼ、制限酵素) からなる群から選択される不純物又は副産物を実質的に含まない。

20

【0053】

いくつかの態様では、本開示は、環状ssDNAを作製する方法であって、a) 環状dsDNAを提供する (例えば、生成又は取得する) ことであって、環状dsDNAが、i) プラスミド骨格を欠き ; ii) 細菌複製起点を欠き ; iii) 選択可能マーカー、例えば、抗生物質耐性マーカーを欠き ; 及び/又はiv) 化学修飾、例えば、糖に対する化学修飾、塩基に対する化学修飾、又は核酸骨格に対する化学修飾を含む、提供する (例えば、生成又は取得する) こと ; b) 環状dsDNAの1つの鎖に不連続を導入し (例えば、環状dsDNAを、dsDNAにおけるニッキング認識部位を認識するニッキングエンドヌクレアーゼ (例えば、Nb.BsrDI又はNb.Bpu10I又はNt.BspQI) と、ニッキングエンドヌクレアーゼがdsDNAにおける部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ)、それによって、不連続を有するdsDNAを生成すること ; c) 不連続を有するdsDNAを、エキソヌクレアーゼ (例えば、T7エキソヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼIII) と、ニック鎖の分解 (例えば、完全な分解) を可能にする条件下で接触させ、それによって、環状ssDNAを作製することを含む方法を提供する。

30

【0054】

いくつかの態様では、本開示は、環状ssDNAを作製する方法であって、a) 環状dsDNAを提供する (例えば、生成又は取得する) こと ; b) 環状dsDNAを、dsDNAにおけるニッキング認識部位を認識するNb.BsrDI又はNt.BspQIから選択されるニッキングエンドヌクレアーゼと、ニッキングエンドヌクレアーゼがdsDNAにおける部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ、それによって、ニックdsDNAを生成すること ; c) ニックdsDNAを、エキソヌクレアーゼ (例えば、T7エキソヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼIII) と、ニック鎖の分解 (例えば、完全な分解) を可能にする条件下で接触させ、それによって、環状ssDNAを作製することを含む方法を提供する。

40

【0055】

50

いくつかの態様では、本開示は、環状 $ssDNA$ を作製する方法であって、a) 環状 $dsDNA$ を提供する（例えば、生成又は取得する）こと；b) 環状 $dsDNA$ の1つの鎖に不連続を導入し（例えば、環状 $dsDNA$ を、 $dsDNA$ におけるニッキング認識部位を認識するニッキングエンドヌクレアーゼ（例えば、Nb.BsrDI又はNb.Bpu10I又はNt.BspQI）と、ニッキングエンドヌクレアーゼが $dsDNA$ における部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ）、それによって、不連続を有するニック $dsDNA$ を生成すること；c) ニック $dsDNA$ を、T7エキソヌクレアーゼと、ニック鎖の分解（例えば、完全な分解）を可能にする条件下で接触させ、それによって、環状 $ssDNA$ を作製することを含む方法を提供する。

【0056】

いくつかの態様では、本開示は、環状 $ssDNA$ を作製する方法であって、a) 環状 $dsDNA$ を提供する（例えば、生成又は取得する）こと；b) 環状 $dsDNA$ の1つの鎖に不連続を導入し（例えば、環状 $dsDNA$ を、 $dsDNA$ におけるニッキング認識部位を認識するニッキングエンドヌクレアーゼ（例えば、Nb.BsrDI又はNb.Bpu10I又はNt.BspQI）と、ニッキングエンドヌクレアーゼが $dsDNA$ における部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ）、それによって、不連続を有するニック $dsDNA$ を生成すること；c) ニック $dsDNA$ を、エキソヌクレアーゼ（例えば、T7エキソヌクレアーゼ又はエキソヌクレアーゼIII）と、ニック鎖の分解（例えば、完全な分解）を可能にする条件下で接触させ、それによって、環状 $ssDNA$ を作製すること、及びd) 環状 $ssDNA$ におけるゲル精製を実施することを含む方法を提供する。

【0057】

いくつかの実施形態では、環状 $dsDNA$ は、i) プラスミド骨格を欠き；ii) 細菌複製起点を欠き；iii) 選択可能マーカー、例えば、抗生物質耐性マーカーを欠き；及び／又はiv) 化学修飾、例えば、糖に対する化学修飾、塩基に対する化学修飾、又は核酸骨格に対する化学修飾を含む。

【0058】

いくつかの実施形態では、本方法は、環状 $dsDNA$ を、 $dsDNA$ におけるニッキング認識部位を認識するNb.BsrDI又はNt.BspQIから選択されるニッキングエンドヌクレアーゼと、ニッキングエンドヌクレアーゼが $dsDNA$ における部位に切れ目を入れることを可能にする条件下で接触させ、それによって、ニック $dsDNA$ を生成することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、ニック $dsDNA$ を、T7エキソヌクレアーゼと、ニック鎖の分解（例えば、完全な分解）を可能にする条件下で接触させることを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、環状 $ssDNA$ におけるゲル精製を実施することを含む。

【0059】

いくつかの実施形態では、本方法は、環状 $dsDNA$ を生成することを含み、環状 $dsDNA$ を生成することは、(i) エフェクター配列を含む核酸（例えば、プラスミド）を提供すること；(ii) エフェクター配列を含む核酸（例えば、プラスミド）の領域を増幅するためにPCRを実施することであって、PCRを実施することが、プラスミドを、第1のエンドヌクレアーゼ認識部位を含む第1のプライマー及び第2のエンドヌクレアーゼ認識部位及びニッキング認識部位を含む第2のプライマーと接触させることであって、第1のプライマー及び第2のプライマーが、エフェクター配列を増幅する（及び任意に、プラスミドの骨格を増幅しない）のに好適なプラスミドにおける位置に配置される、接触させること、及びプラスミドを、DNA依存性DNAポリメラーゼ（例えば、ハイフィデリティポリメラーゼ、例えば、Q5）と接触させること、及びエフェクター配列を含む核酸の領域を増幅するのに十分な熱サイクル条件を適用し、それによって、線状 $dsDNA$ を生成することを含む、PCRを実施すること；(iii) エンドヌクレアーゼ認識部位を切断するエンドヌクレアーゼ（例えば、BsaI、KpnI、又はNheI）により線状 $dsDNA$ を消化し、それによって、消化された線状DNAを生成すること、(iv)

(例えば、線状の消化された dsDNA を、リガーゼ、例えば、T4 リガーゼと接触させることによって) 消化された線状 dsDNA を環状化すること; 及び (v) 消化された線状 dsDNA を含む組成物を、エキソヌクレアーゼ (例えば、T5 エキソヌクレアーゼ) と接触させることによって、残りの線状 DNA を消化することのうちの 1 つ以上 (例えば、2、3、4 つ、又は全て) を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、本方法は、1 つ以上の精製工程、例えば、ゲル精製又は DNA 精製カラムの使用を含む。いくつかの実施形態では、精製工程は、線状 dsDNA; 消化された線状 dsDNA; 環状 dsDNA; 又は環状 ssDNA において実施される。いくつかの実施形態では、本方法は、有機抽出工程 (例えば、フェノールクロロホルム抽出工程) を含まない。

10

【0061】

いくつかの実施形態では、本方法は、15 ~ 120 分間、例えば、20 ~ 60 分間、例えば、約 30 分間にわたって、ニック dsDNA を、エキソヌクレアーゼ (例えば、T7 エキソヌクレアーゼ) と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、環状 dsDNA の 1 つの鎖に不連続を導入することは、2 つの隣接するヌクレオチド間にニックを導入することを含む。いくつかの実施形態では、環状 dsDNA の 1 つの鎖に不連続を導入することは、ヌクレオチドを除去することを含み、例えば、ここで、ヌクレオチドは、ウラシルである。

【0062】

いくつかの態様では、本開示は、ssDNA を含む組成物の試料を評価する方法であって、条件が満たされるかどうかを決定することを含み、ここで、条件が、a) 組成物中の全 DNA の質量基準で少なくとも 70%、80%、85%、90%、95%、97%、又は 98%、又は 99% が、共有結合的に閉環された ssDNA である; b) 組成物中の全 DNA の質量基準で少なくとも 70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% が、完全長である; c) 組成物中の DNA の質量基準で 10%、5%、4%、3%、2%、又は 1% 未満が、二本鎖 DNA (dsDNA) である; d) 組成物中の DNA の質量基準で 10%、5%、4%、3%、2%、又は 1% 未満が、線状 DNA である; e) 組成物中の DNA の質量基準で 10%、5%、4%、3%、2%、又は 1% 未満が、線状 ssDNA である; f) 組成物が、クロロホルムを実質的に含まない、例えば、含まない; g) 組成物が、フェノールを実質的に含まない、例えば、含まない; h) 組成物が、フェノール及びクロロホルムを実質的に含まない、例えば、含まない; i) 組成物が、有機溶媒を実質的に含まない、例えば、含まない; j) 組成物が、芳香族有機溶媒を実質的に含まない、例えば、含まない; k) 組成物が、エキソヌクレアーゼ I II を実質的に含まない (例えば、含まない); l) 組成物が、T7 エキソヌクレアーゼを実質的に含まない (例えば、含まない); 及び/又は m) 組成物が、T5 エキソヌクレアーゼを実質的に含まない (例えば、含まない) から選択される、方法を提供する。いくつかの実施形態では、条件が満たされる場合、本方法は、組成物における下流の処理工程を実施することを含み、任意に、下流の処理工程が、組成物を複数の部分に分けること、組成物を包装すること、組成物にラベルを貼ること、組成物を輸送すること、組成物を流通させること、組成物を貯蔵すること、又は組成物を発売することから選択される。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に開示される組成物の試料を評価することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に開示される方法によって作製される組成物の試料を評価することを含む。

20

30

40

【0063】

いくつかの実施形態では、ssDNA は、化学修飾、例えば、糖に対する化学修飾、塩基に対する化学修飾、又は核酸骨格に対する化学修飾を含む。いくつかの実施形態では、ssDNA は、バクテリオファージゲノムではない。いくつかの実施形態では、ssDNA は、バクテリオファージパッケージング部位を欠いている。いくつかの実施形態では、ssDNA は、バクテリオファージ複製起点を欠いている。いくつかの実施形態では、s

50

s s DNA は、バクテリオファージカプシド遺伝子をコードしない。いくつかの実施形態では、s s DNA は、ローリングサークル増幅によって生成されなかった。いくつかの実施形態では、s s DNA は、鎖置換増幅によって生成されなかった。いくつかの実施形態では、s s DNA は、は、プロテオメラーゼ標的配列を含まない。いくつかの実施形態では、s s DNA は、ヘアピン構造を含まない。いくつかの実施形態では、s s DNA は、第 2 の配列とハイブリダイズする第 1 の配列を含まず、ここで、第 1 の配列及び第 2 の配列が、少なくとも 5 n t 長であり、第 1 の配列及び第 2 の配列が、互いに 6 ヌクレオチド未満離れて配置される。いくつかの実施形態では、s s DNA は、二本鎖起源 (D S O) を含まない。

【0064】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、5-ホルミルシトシン；ホスホロチオエート；7-メチルグアニン；及び 5-グルコシルメチルシトシンから選択される共有結合的修飾である。

【0065】

定義

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、特定の抗原に特異的に結合し、又は特定の抗原と免疫学的に反応性であり、少なくとも、重鎖の可変ドメインを含み、通常、少なくとも、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含む分子を指す。抗体及びその抗原結合フラグメント、変異体、又は誘導体としては、限定はされないが、ポリクローナル、モノクローナル、多特異的、ヒト、ヒト化、霊長類化、又はキメラ抗体、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二重特異的、三重特異的及び四重特異的抗体、ダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディ）、単ドメイン抗体 (s d A b)、エピトープ結合断片、例えば、F a b、F a b' 及び F (a b')₂、F d、F v s、一本鎖 F v s (s c F v)、r l g G、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 F v s (s d F v)、V L 又は V H ドメインのいずれかを含む断片、F a b 発現ライブラリーによって生成される断片、及び抗イディオタイプ (抗 I d) 抗体が挙げられる。本発明の抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、及び I g Y）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 及び I g A 2）又はサブクラスのものであり得る。さらに、特に断りのない限り、用語「モノクローナル抗体」 (m A b) は、標的タンパク質に特異的に結合することが可能なインタクトな分子並びに抗体断片（例えば、F a b 及び F (a b')₂ 断片など）の両方を含むことを意味する。F a b 及び F (a b')₂ 断片は、インタクトな抗体の F c 断片を欠いている。

【0066】

本明細書で使用される場合、用語「バクテリオファージパッケージング部位」は、パッケージングをビリオンに指向するのに十分なバクテリオファージゲノムにおける核酸配列を指す。バクテリオファージパッケージング部位は、例えば、バクテリオファージ P 1、T 4、T 7、又は λ に由来し得る。

【0067】

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

【0068】

本明細書で使用される場合、本明細書に記載される s s DNA に関連する用語「環状」は、遊離末端を欠いた s s DNA を意味する。環状 s s DNA は、共有結合的に閉環され得、又は非共有結合的相互作用によって遊離 DNA 末端なしで閉環構造を形成し得、例えば、s s DNA は、スプリント、例えば、核酸（例えば、DNA 又は RNA）スプリントを介して、線状 s s DNA の両端と結合し、一緒にまとめるタンパク質などの部分を介して、又は複数のタンパク質の結合（複数のうちの 2 つのそれぞれが、異なる s s DNA 末端に結合し、次に、互いに又は第 3 の部分に結合する）を介して閉鎖されて、DNA 構造を閉鎖し得る。環状という用語は、環状の物理的形態又は分子内構造を欠いた s s DNA

10

20

30

40

50

構造を示唆せず；環状 ssDNA は、分子内二本鎖領域又は他の構造の領域を有し得る。

【0069】

本明細書で使用される場合、ssDNA に関連する用語「共有結合的に閉環される」は、ssDNA が、遊離 5' 又は 3' 末端を欠いた連続鎖であることを意味する。

【0070】

本明細書で使用される場合、用語「エキソヌクレアーゼ III」は、例えば、DNA における末端又はニックにおいて、DNA の 3' 末端からのヌクレオチドの除去を触媒する、大腸菌 (*E. coli*) ゲノムによってコードされるタンパク質エキソヌクレアーゼ III、又はその断片若しくは変異体を指す。いくつかの実施形態では、エキソヌクレアーゼ III は、NCBI 参照配列 NP_416263.1 (全体が参照により本明細書に組み込まれる) で表されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% 又は 98% の同一性を有する配列を有する。

10

【0071】

本明細書で使用される場合、用語「T5 エキソヌクレアーゼ」は、例えば、DNA における末端又はニックにおいて、DNA の 5' 末端からのヌクレオチドの除去を触媒する、T5 バクテリオファージの D15 遺伝子によってコードされるタンパク質、又はその断片若しくは変異体を指す。いくつかの実施形態では、T5 エキソヌクレアーゼは、NCBI 参照配列 YP_006958.1 で表されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% 又は 98% の同一性を有する配列を有する。

【0072】

本明細書で使用される場合、用語「T7 エキソヌクレアーゼ」は、例えば、DNA における末端又はニックにおいて、DNA の 5' 末端からのヌクレオチドの除去を触媒する、T7 バクテリオファージの遺伝子 6 によってコードされるタンパク質、又はその断片若しくは変異体を指す。いくつかの実施形態では、T7 エキソヌクレアーゼは、NCBI 参照配列 NP_041988.1 で表されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% 又は 98% の同一性を有する配列を有する。

20

【0073】

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

30

40

【0074】

本明細書で使用される場合、用語「増加する」及び「減少させる」は、それぞれ、参照

50

と比べて機能、発現、又は活性の指標の量の増加又は減少をもたらす調節を指す。例えば、本明細書に記載される方法における ssDNA の投与の後、本明細書に記載される指標（例えば、遺伝子発現のレベル、又は自然免疫のマーカー）の量は、非修飾 ssDNA と比較した修飾 ssDNA など、投与の前のマーカーの量と比べて、又は対照 ssDNA の投与と比べて少なくとも 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % 又は 98 % 又はそれ以上だけ、対象において増加又は減少され得る。一般に、指標は、投与の後、投与が列挙された影響を有した時点で、例えば、治療レジメンが開始されてから少なくとも 1 日、1 週間、1 か月、3 か月、又は 6 か月後に測定される。

【0075】

本明細書で使用される場合、用語「分子内相補性」は、単一の DNA 鎖内の 2 つの領域が、相補的塩基対を介してハイブリダイズし、及び／又は二本鎖構造を形成する能力を指す。自己相補的である配列の部分がどの程度近いかに応じて、ssDNA は、例えば、ヘアピンループ、接合部、バルジ又は内部ループを形成し得る。

【0076】

本明細書で使用される場合、用語「線状」は、DNA を説明するのに使用される場合、2 つの遊離末端を含む DNA を意味する。線状 DNA は、一本鎖又は二本鎖であり得る。

【0077】

本明細書で使用される場合、用語「維持配列」は、細胞分裂による核内の DNA 分子の保持を可能にするか又は容易にする DNA 配列又はモチーフである。維持配列は、典型的に、クロマチンループを容易にするタンパク質と相互作用することによって核内の DNA の複製及び／又は転写を可能にする。維持配列の例は、足場／マトリックス結合領域（S/MAR 要素）である。

【0078】

本明細書で使用される場合、「核標的化配列」は、標的細胞核内への DNA 侵入を可能にするか又は容易にする DNA 配列である。

【0079】

本明細書で使用される場合、「ニッキング認識部位」は、ニッキングエンドヌクレアーゼによって特異的に認識され、切れ目を入れられる DNA 配列を指す。

【0080】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」又は「医薬製剤」は、ヒト用の医薬としての使用、例えば、ヒト用の予防、診断又は治療用途に適応される組成物又は製剤である。医薬製剤は、薬学的に許容される賦形剤又は希釈剤と組み合わせて、対象の細胞又は組織に対する生物学的効果を有する、例えば、疾患の軽減、治療、又は予防において薬理学的活性又は効果を有する活性薬剤を含む。医薬組成物はまた、予防、診断又は治療用組成物の完成した剤形又は製剤を意味する。

【0081】

本明細書で使用される場合、用語「第 2 鎖モチーフ」又は SSM は、第 2 鎖合成を促進するか又は可能にする ssDNA における配列又は構造モチーフである。SSM は、第 2 鎖の DNA 合成を開始させるタンパク質のための結合部位を含んでいてもよく、及び／又は DNA ポリメラーゼ結合のための適切な向きに DNA を配置する。

【0082】

本明細書で使用される場合、「センス鎖」である ssDNA 配列は、機能性タンパク質をコードする mRNA と同じ配列を有し、転写のための鋳型として機能しない ssDNA である。「アンチセンス鎖」である ssDNA 配列は、機能性タンパク質をコードする mRNA に相補的な配列を有し、及び／又は転写のための鋳型として機能し得る。

【0083】

本明細書で使用される場合、用語「一本鎖 DNA」又は ssDNA は、デオキシリボヌクレオチドの一本鎖からなる DNA 分子を意味する。ssDNA は、折り畳み構造における分子内／鎖内二本鎖モチーフを形成する、対になった自己相補性領域を有し得る。自己

10

20

30

40

50

相補的である配列の部分がどの程度近いかに応じて、ssDNAは、例えば、ヘアピンループ、接合部、バルジ又は内部ループを形成し得る。

【0084】

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

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1-1】本明細書に記載される例示的なssDNAの設計を示す一連の線図である。

（図1A）EF1aプロモーターに作動可能に連結される、複数のエフェクターDNA配列タイプ、この場合、miRNA及びモデルタンパク質（mCherry）を含むssDNA構築物を示す。（図1B）プロモーター及びポリペプチドエフェクター（この場合、モデルタンパク質mCherry）をコードする配列を含むssDNA構築物を示す。

【図1-2】本明細書に記載される例示的なssDNAの設計を示す一連の線図である。

（図1C）核標的化配列、プロモーター、及びRNAエフェクターをコードする配列を含むssDNA構築物を示す。（図1D）プロモーター、ポリペプチドをコードする配列、及び第2鎖モチーフを含むssDNA構築物を示す。（図1E）核標的化配列、ポリペプチドをコードする配列に作動可能に連結されるプロモーター、維持配列、及び第2鎖モチーフを含むssDNA構築物を示す。

【図2】本明細書に記載される環状ssDNAの例示的な産生プロセスの概略図である。

【図3】ブランクウェル（図3）及び構築物029環状ssDNAの調製物（図4）、構築物029環状dsDNA（図5）、構築物001環状dsDNA（図6）、構築物001環状ssDNA調製物#1（図7）、及び構築物001環状ssDNA調製物#2（図8）の、Fragment Analyzerを用いて得られた一連のトレースである。LM：下側マーカー、UM：上側マーカー。

【図4】ブランクウェル（図3）及び構築物029環状ssDNAの調製物（図4）、構築物029環状dsDNA（図5）、構築物001環状dsDNA（図6）、構築物001環状ssDNA調製物#1（図7）、及び構築物001環状ssDNA調製物#2（図8）の、Fragment Analyzerを用いて得られた一連のトレースである。LM：下側マーカー、UM：上側マーカー。

【図5】ブランクウェル（図3）及び構築物029環状ssDNAの調製物（図4）、構築物029環状dsDNA（図5）、構築物001環状dsDNA（図6）、構築物001環状ssDNA調製物#1（図7）、及び構築物001環状ssDNA調製物#2（図8）の、Fragment Analyzerを用いて得られた一連のトレースである。LM：下側マーカー、UM：上側マーカー。

【図6】ブランクウェル（図3）及び構築物029環状ssDNAの調製物（図4）、構築物029環状dsDNA（図5）、構築物001環状dsDNA（図6）、構築物00

1 環状 ssDNA 調製物 # 1 (図 7)、及び構築物 001 環状 ssDNA 調製物 # 2 (図 8) の、Fragment Analyzer を用いて得られた一連のトレースである。LM: 下側マーカー、UM: 上側マーカー。

【図 7】ブランクウェル (図 3) 及び構築物 029 環状 ssDNA の調製物 (図 4)、構築物 029 環状 dsDNA (図 5)、構築物 001 環状 dsDNA (図 6)、構築物 001 環状 ssDNA 調製物 # 1 (図 7)、及び構築物 001 環状 ssDNA 調製物 # 2 (図 8) の、Fragment Analyzer を用いて得られた一連のトレースである。LM: 下側マーカー、UM: 上側マーカー。

【図 8】ブランクウェル (図 3) 及び構築物 029 環状 ssDNA の調製物 (図 4)、構築物 029 環状 dsDNA (図 5)、構築物 001 環状 dsDNA (図 6)、構築物 001 環状 ssDNA 調製物 # 1 (図 7)、及び構築物 001 環状 ssDNA 調製物 # 2 (図 8) の、Fragment Analyzer を用いて得られた一連のトレースである。LM: 下側マーカー、UM: 上側マーカー。

【図 9】1 ng の構築物 001 環状 ssDNA 当たり 7.8 pg の構築物 001 環状 dsDNA を添加したときに得られるトレースである。環状 dsDNA に対応するピークが、矢印で示される。

【図 10】一連の DNA ゲル電気泳動画像を示す。図 10A は、DNA ラダー (レーン 1) 及びニック DNA (レーン 2) を含む DNA ゲルの画像である。ニック DNA 構築物のサイズが、矢印で示される。図 10B は、DNA ラダー (レーン 1) 並びに 16 時間 (レーン 2)、1 時間 (レーン 3)、及び 30 分間 (レーン 4) にわたって 25 °C で T7 エキソヌクレアーゼとともにインキュベートされたニック DNA を含む DNA ゲルの画像である。ssDNA 構築物のサイズが、矢印で示される。

【図 11】エキソヌクレアーゼ I の非存在 (-) 及び存在 (+) 下でインキュベートされた環状 ssDNA 及び線状 ssDNA を示す DNA ゲル電気泳動画像である。環状 ssDNA 調製物は、エキソヌクレアーゼ I による分解に対して耐性があった一方、線状 ssDNA は、エキソヌクレアーゼ I の存在下で分解された。

【図 12A】HEK293 (図 12A)、HepG2 (図 12B)、U2OS (図 12C)、及び HEK a 細胞 (図 12D) における環状 ssDNA 構築物の発現を示す一連のグラフである。環状 ssDNA 構築物の詳細が、表 5 に見られる。x 軸は、レポーター (mCherry) 陽性細胞の割合を示し、y 軸は、構築物 001 プラスミドの発現に対して正規化された、細胞の蛍光強度を示す。「C1」は、構築物 001 に対応し、「C2」は、構築物 002 に対応するなどである。

【図 12B】同上

【図 12C】同上

【図 12D】同上

【図 13】構築物 001 によるリポフェクション後の、mCherry を発現する HEK a 細胞のパーセンテージを示す一連のグラフである。構築物 001 は、環状 ssDNA 及び環状 dsDNA として生成され、ssDNA 又は dsDNA の相対モル濃度が示される (例えば、1 倍、2 倍、又は 4 倍)。図 13A は、リポフェクションの 3 日後の時点で mCherry を発現する HEK a 細胞のパーセンテージを示し、図 13B は、トランスフェクション後 6 時間、1 日、及び 3 日の時点における mCherry + 細胞の平均パーセンテージを示す。

【図 14】構築物 001 によるリポフェクション後の HEK a 細胞における IFN β (図 14A)、IL-6 (図 14B)、CXCL10 (図 14C)、TNF α (図 14D)、及び IL1 β (図 14E) の mRNA レベルを示す一連のグラフである。構築物 001 は、環状 ssDNA 及び環状 dsDNA として生成され、ssDNA 又は dsDNA の相対モル濃度が示される (例えば、1 倍、2 倍、又は 4 倍)。mRNA レベルが、リポフェクタミン (lipofectamine) のみの対照に対して正規化され、GAPDH と比べた mRNA レベルが示される。

【図 15】2 つの形態の構築物 001: 非修飾一本鎖環状 DNA、及び m6A (N⁶-メ

チルアデノシン) DNA 修飾を有する一本鎖環状によるトランスフェクション後の m C h e r r y + 細胞のパーセンテージを示すグラフである。

【図 1 6】構築物 0 0 1 の環状一本鎖 DNA 形態の二次構造予測を示す。構築物 0 0 1 は、以下の配列を有する：

【化 1】

```
ccttcgagaccggctccgggtgcccgctcagtgggcagagcgacatcgcccacagtccccgagaagttggggggagggtcggaattg
aaccgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgctttttcccgagggtgggggagaacc
gtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggttaagtccgtgtgtgttcccgccggcc
tggcctctttacgggttatggccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccagcttgggttgggaagtg
gggtgggagagttcgaggccttgccttaaggagcccccttgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggctggggccgccgcgtgc
gaatctggtggcaccttgcgcctgtctcgtcgttctcgataagtctctagccattaaattttgatgacctgctgcgacgtttttctggcaa
gatagcttctgaaatgcggggccaagatctgcacactggtatttcggtttttggggccgcggcgccgacggggcccgtgctccagcgca
catgttcggcgaggcggggctgcgagcgcgccaccgagaatcgagcggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctgg
cctcgcgcgccgtgtatcgccccgccttggggcgcaaggctggcccgctggcaccagtgtcgtgagcggaagatggccgcttccc
ggcctgctgcaggggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcggtgagtcaccacacaaaggaaaaggccttt
ccgtcctcagccgtcgttcatgtgactccacggagtaccggcgccgtccaggcacctcgattagtctcgagcttttggagtacgtcgtctt
taggttggggggagggggtttatgcgatggagtctccacactgagtggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattct
ccttggaaatttgcctttttgagtttggatcttgggtcatttcaagcctcagacagtgggtcaaagtttttcttccatttcaggtgtcgtgaggatc
cgccaccatggtgagcaaggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgttcaaggtgcacatggagggtcctcgtga
acggccacgagttcgagatcgaggcgaggcgaggcgccctacgaggcgacccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggt
ggccccctgccttgccttgggacatcctgtccccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccgccgacatccccgact
acttgaagctgtccttccccgagggttcaagtgggagcgcggtgatgaacttcgaggacggcgcggtggtgacctgacctaggactcct
ccctgcaggacggcgagttcatctacaagggtgaagctgcgcggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatg
ggctgggaggcctcctccgagcggatgtacccgaggacggcgccctgaaggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacgg
cgccactacgacgtgaggtcaagaccactacaaggccaagaagccgtgcagctgcccggcgccctacaacgtcaacatcaagttgg
acatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgcggaggggccgacctccaccggcggtgacgagct
gtacaagtaagtttaaacccgtgatcagcctcgtgcttctagtccagccatctgttgtttgccccctccccgtgccttcttgacctt
ggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggtg
gggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggctgcaatggctcttcatct
gaggtctcg (配列番号55)
```

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0 0 8 6】

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

【0 0 8 7】

DNA 構築物の要素

本明細書に記載される ssDNA 構築物は、エフェクター配列を、標的細胞、組織又は対象に送達するのに十分な要素を含有する。いくつかの実施形態では、エフェクター配列

は、DNA配列である。いくつかの実施形態では、ssDNAは、エフェクターの発現を駆動し、例えば、プロモーター及びRNA又はポリペプチド、例えば、治療用RNA又はポリペプチドをコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるDNA構築物は、核標的化配列、維持配列、及び第2鎖モチーフのうちの1つ以上をさらに含有する。

【0088】

プロモーター

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

10

【0089】

構成的プロモーターの例としては、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（任意に、RSVエンハンサーとともに）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（任意に、CMVエンハンサーとともに）（例えば、Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)を参照）、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター、及びEF1 α プロモーターが挙げられる。

20

【0090】

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

30

40

【0091】

いくつかの実施形態では、エフェクターをコードする配列の天然プロモーターが使用され得る。他の天然発現制御要素、例えば、エンハンサー要素、ポリアデニル化部位又はコザックコンセンサス配列も使用され得る。

【0092】

いくつかの実施形態では、調節配列は、組織特異的遺伝子発現能力を与える。場合によっては、組織特異的調節配列は、組織特異的な方式で転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。このような組織特異的調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）は、当該技術分野において公知である。例示的な組織特異的調節配列としては、限定はされないが、以下の組織特異的プロモーター：肝臓特異的チロキシン結合グロブリン（T

50

B G) プロモーター、インスリンプロモーター、グルカゴンプロモーター、ソマトスタチンプロモーター、膵臓ポリペプチド (PPY) プロモーター、シナプシン-1 (Syn) プロモーター、クレアチンキナーゼ (MCK) プロモーター、哺乳動物デスミン (DES) プロモーター、 α -ミオシン重鎖 (α -MHC) プロモーター、又は心臓トロポニンT (cTnT) プロモーターが挙げられる。他の例示的なプロモーターとしては、当業者に公知であるものの中でもとりわけ、 β -アクチンプロモーター、B型肝炎ウイルスコアプロモーター、Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996); α -フェトプロテイン (AFP) プロモーター、Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)、骨オステオカルシンプロモーター (Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); 骨シアロタンパク質プロモーター (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996))、CD2プロモーター (Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998)); 免疫グロブリン重鎖プロモーター; T細胞受容体 α -鎖プロモーター、神経細胞、例えばニューロン特異的エノラーゼ (NSE) プロモーター (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993))、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモーター (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991))、及びニューロン特異的 vgf 遺伝子プロモーター (Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995)) が挙げられる。

10

20

【0093】

組織／細胞特異的プロモーターの例が、表1に列挙される：

【0094】

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1: 組織又は細胞特異的プロモーター

組織/細胞	プロモーター	受託番号; ヒトゲノム座標 (hg38)
骨格筋	ACTA1	NM_001100; chr1:229,439,090-229,432,090
黒色腫	TYR	NM_000372; chr11:89,300,750-89,293,750
肝細胞腫	α -フェトプロテイン	NM_001354717; chr4:73,461,175-73,454,175
乳癌	ムチン 1	NM_001371720; chr1:155,197,900-155,190,900
前立腺癌	KLK3	NM_001648; chr19: 50,865,760-50,858,760
神経細胞	ENO2	NM_001975; chr12:6,928,700-6,921,700
低酸素応答	HIF-1 α	NM_001530; chr14:61,753,200-61,746,200
網膜芽細胞腫	E2F1	NM_005225; chr20: 33,691,380-33,684,380
電離放射線	EGR-1	NM_001964; chr5:138,474,303-138,467,303
癌遺伝子	ErbB2	NM_004448; chr17:39,735,530-39,728,530
内皮細胞	vWF	NM_000552; chr12:6,129,670-6,122,670
内皮細胞	FLT-1	NM_002019; chr13:28,500,100-28,493,100
内皮細胞	ICAM-2	NM_001099786; chr17:64,025,630-64,018,630
網膜色素上皮	VMD2	NM_004183; chr11:61,972,630-61,965,630
桿体細胞	RHO	NM_000539; chr3:129,540,350-129,533,350
錐体細胞	赤/緑オプシン (OPN1LW)	NM_020061; chrX:154,164,030-154,157,030
神経節細胞	胸腺細胞抗原 (Thy1)	NM_006288; chr11:119,428,150-119,421,150

【 0 0 9 5 】

【表 1 - 2】

組織/細胞	プロモーター	受託番号; ヒトゲノム座標 (hg38)
T 細胞	TIM3	NM_032782; chr5:157,114,050-157,107,050
T 細胞	FOXP3	NM_014009; chrX:49,269,700-49,262,700
PBMC	Vβ6.7	ENST00000390373.2; chr7:142,493,295-142,486,295
細胞周期	Cdk1	NM_001786; chr10:60,799,850-60,792,850

10

【0096】

エフェクター配列

本明細書に記載される ssDNA 構築物のエフェクター配列は、例えば、遺伝子エディター、塩基エディター、プライムエディター、ジーンライター、可動遺伝因子タンパク質と組み合わせて使用される、例えば、機能的 DNA 配列、例えば、治療的に機能的な DNA 配列；治療用ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質をコードする DNA 配列；治療用 RNA（例えば、ノンコーディング RNA）をコードする DNA 配列；又はゲノム操作のための DNA 鋳型であり得る。

20

【0097】

DNA エフェクター：

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

【0098】

ポリペプチドエフェクター：

治療用ポリペプチドをコードする DNA 配列は、ペプチド、タンパク質、又はそれらの組み合わせである 1 つ以上のエフェクターをコードする DNA 配列であり得る。例えば、DNA 配列は、mRNA をコードする。ペプチド又はタンパク質は、転写因子；クロマチンリモデリング因子；抗原；ホルモン；酵素（ヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、CRISPR システムのヌクレアーゼ要素、例えば、Cas9、dCas9、Cas9-ニックアーゼ、Cpf1/Cas12a など）；Crispr 連結酵素、例えば塩基エディター又はプライムエディター；可動遺伝因子タンパク質（例えば、トランスポザラーゼ、レトロトランスポザラーゼ、リコンビナーゼ、インテグラーゼ）；ジーンライター；ポリメラーゼ；メチラーゼ；デメチラーゼ；アセチラーゼ；デアセチラーゼ；キナーゼ；ホスファターゼ；リガーゼ；デユビキチナーゼ；インテグラーゼ；リコンビナーゼ；トポイソメラーゼ；ジャイレース；ヘリカーゼ；リソソーム酸ヒドロラーゼ）；抗体；受容体リガンド；受容体；凝固因子；膜タンパク質；ミトコンドリアタンパク質；核タンパク質；抗体又は他のタンパク質足場結合剤、例えばセンチリン、ダーピン、若しくはアドネクチンであり得る。例えば、Gebauer & Skerra, 2020, Annual Review of Pharmacology and Toxicology 60:1, 391-415 を参照されたい。

30

40

【0099】

実施形態では、本明細書に記載される ssDNA 構築物又は配列は、ポリペプチドをコードする 1 つ又は複数の配列、例えば、ポリペプチドをコードする 2、3、4、5、6 つ

50

、又はそれ以上の配列を含み得る。複数のうちのそれぞれが、同じ又は異なるタンパク質をコードし得る。例えば、本明細書に記載される ssDNA 構築物又は配列は、複数のタンパク質、例えば、生物学的経路における複数のタンパク質をコードする複数の配列を含み得る。

【0100】

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

【0101】

RNA エフェクター：

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

【0102】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される ssDNA 構築物又は配列は、調節 RNA、例えば、内在性遺伝子及び／又は外来遺伝子の発現を修飾する RNA をコードする 1 つ以上の発現配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される ssDNA 構築物又は配列は、限定はされないが、tRNA、lncRNA、miRNA、rRNA、snRNA、マイクロ RNA、siRNA、piRNA、snRNA、snRNA、exRNA、scaRNA、Y RNA、及び hnRNA などのノンコーディング RNA のような調節核酸に対してアンチセンスである配列を含み得る。一実施形態では、調節核酸は、宿主遺伝子を標的とする。調節核酸は、限定はされないが、内在性遺伝子、例えば、アンチセンス RNA、ガイド RNA にハイブリダイズする核酸、ウイルス DNA 又は RNA などの外因性核酸にハイブリダイズする核酸、RNA にハイブリダイズする核酸、遺伝子転写に干渉する核酸、RNA 翻訳に干渉する核酸、分解に対する標的化などによって、RNA を安定させるか又は RNA を不安定にする核酸、及び DNA 又は RNA 結合因子を調節する核酸を含み得る。一実施形態では、配列は、miRNA である。いくつかの実施形態では、調節核酸は、宿主遺伝子のセンス鎖を標的とする。いくつかの実施形態では、調節核酸は、宿主遺伝子のアンチセンス鎖を標的とする。

【0103】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される ssDNA 構築物又は配列は、ガイド RNA をコードする。ガイド RNA 配列は、一般に、15～30 ヌクレオチド（例えば、17、19、20、21、24 ヌクレオチド）の長さを有し、標的化核酸配列に相補的であるように設計される。カスタム gRNA ジェネレーター及びアルゴリズムは、有効なガイド RNA の設計に使用するために市販されている。遺伝子編集はまた、天然に存在する crRNA-tracrRNA 複合体を模倣し、tracrRNA (ヌクレアーゼに結合

するため）及び少なくとも1つのcrRNA（編集の標的とされる配列にヌクレアーゼを誘導するため）の両方を含有する、操作された（合成）単一RNA分子であるキメラ「シングルガイドRNA」（「sgRNA」）を用いて達成されている。化学修飾sgRNAも、ゲノム編集に有効であることが実証されている；例えば、Hendel et al.（2015）Nature Biotechnol.，985-991を参照されたい。gRNAは、特定のDNA配列（例えば、遺伝子のプロモーター、エンハンサー、サイレンサー、若しくはリプレッサーに隣接するか又はその範囲内の配列）を認識し得る。一実施形態では、gRNAは、遺伝子編集のためのCRISPRシステムの一部として使用される。遺伝子編集のために、本明細書に開示されるssDNA構築物又は配列は、希望の標的DNA配列に対応するガイドRNA配列をコードする1つ又は複数の配列を含むように設計され得；例えば、Cong et al.（2013）Science，339：819-823；Ran et al.（2013）Nature Protocols，8：2281-2308を参照されたい。

10

【0104】

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

20

【0105】

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

【0106】

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

30

【0107】

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

40

【0108】

本明細書に開示されるssDNA構築物又は配列は、標的遺伝子の約5～約30連続ヌクレオチドと同一のマイクロRNA（miRNA）分子をコードし得る。いくつかの実施形態では、miRNA配列は、mRNAを標的とし、ジヌクレオチドAAで開始し、約3

50

0～70%（約30～60%、約40～60%、又は約45%～55%）のGC含量を含み、例えば、標準的なBLAST検索によって決定される際、それが導入される哺乳動物のゲノム中の標的以外のいずれかのヌクレオチド配列に対する高いパーセンテージ同一性を有さない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるssDNA構築物又は配列は、少なくとも1つのmiRNA、例えば、2、3、4、5、6つ、又はそれ以上をコードする。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるssDNA構築物又は配列は、ヌクレオチド配列のいずれか1つに対して少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%のヌクレオチド配列同一性を有するmiRNAをコードする配列又は標的配列に相補的な配列を含む。公知のmiRNA配列のリストは、とりわけ、Wellcome Trust Sanger Institute、Penn Center for Bioinformatics、Memorial Sloan Kettering Cancer Center、及びEuropean Molecule Biology Laboratoryなどの研究機関によって維持されるデータベースにおいて見出され得る。公知の有効なsiRNA配列及び同族結合部位も、関連文献において十分に示されている。RNAi分子は、当該技術分野において公知の技術によって容易に設計される。さらに、有効及び特異的な配列モチーフを発見する機会を増加させる計算ツールがある（例えば、Lagana et al. , Methods Mol. Bio. , 2015, 1269:393-412を参照）。

【0109】

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

【0110】

実施形態では、調節RNAをコードするエフェクター配列は、5000bps未満（例えば、約5000bps、4000bps、3000bps、2000bps、1000bps、900bps、800bps、700bps、600bps、500bps、400bps、300bps、200bps、100bps、50bps、40bps、30bps、20bps、10bps未満、又はそれ以下）の長さを有する。いくつかの実施形態では、エフェクター配列は、独立して又はそれに加えて、10bps超（例えば、少なくとも約10bps、20bps、30bps、40bps、50bps、60bps、70bps、80bps、90bps、100bps、200bps、300bps、400bps、500bps、600bps、700bps、800bps、900bps、1000kb、1.1kb、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4kb、4.1kb、4.2kb、4.3kb、4.4kb、4.5kb、4.6kb、4.7kb、4.8kb、4.9kb、5kb又はそれ以上）の長さを有する。

【0111】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるssDNA構築物又は配列は、本明細

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

【0112】

一実施形態では、ssDNAは、治療的に機能的な構造的DNA配列を含む。一実施形態では、ssDNAは、プロモーター及び本明細書に記載される治療用ペプチド、ポリペ

10

【0113】

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

20

【0114】

DNA鑄型：

30

DNA配列は、ゲノム操作酵素、（ヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、CRISPRシステムのヌクレアーゼ要素、例えば、Cas9、dCas9、aCas9-ニックアーゼ、Cpf/Cas12aなど）、Crispr連結酵素、例えば塩基エディター又はプライムエディター；可動遺伝因子タンパク質（例えば、トランスポザーゼ、レトロトランスポザーゼ、リコンビナーゼ、インテグラーゼ）；ジーンライター；ポリメラーゼ）のための鑄型であり得る。DNA鑄型は、ゲノム操作酵素によって結合される1つ又は複数の配列、例えば、DNA結合ドメイン配列、ガイドRNAによって標的とされる配列、逆方向リピート、逆方向末端リピート、長鎖末端リピート、左末端配列（LTS）、右末端配列（LTR）、非翻訳領域、結合部位（attP、attB、attL、attRなど）、lox部位（loxP、loxBなど）を含み得る。DNA鑄型は、ゲノムにおける配列に相同的な配列、ゲノムにおける配列に非相同的な配列、又はそれらの組み合わせを含み得る。鑄型は、DNA修復、例えば非相同的末端結合、相同的組換え、又はマイクロホモロジー媒介末端結合のための基質であり得る。DNA鑄型は、遺伝子又はRNA、例えば、エンハンサー、プロモーター、タンパク質コード領域、RNAコード領域を発現するための機構を含み得る。いくつかの実施形態では、ゲノム操作酵素によって結合される配列は、ゲノム内に挿入されるか又はゲノム修復のための鑄型として使用される機能的DNA配列のいずれかの側に配置される。いくつかの実施形態では、ゲノム操作酵素によって結合される配列の一方又は両方が、ゲノム内に挿入され、いくつかの実施形態では、それらは挿入されない。実施形態では、本明細書に記載されるssDNA構築物又は配列は、1つ又は複数の機能的鑄型配列、例えば、2、3、4、5、6つ、又はそ

40

50

れ以上の配列を含んでいてもよく、これらは、同じか又は異なり得る。

【0115】

核標的化配列（NTS）

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

10

【0116】

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

【0117】

【表2】

表2: 例示的な核標的化配列

20

ウイルス/非ウイルス	名称	配列
ウイルス	SV40	5'-cccaagaagaagaggaaagtc-3' (配列番号1)
非ウイルス	3NF	5'-ctggggactttccagcctggggactttccagctgggactttccagg-3' (配列番号2)

【0118】

核内輸送タンパク質

いくつかの実施形態では、ssDNA（例えば、本明細書に記載される）は、例えば、核内輸送タンパク質（例えば、表2Bに列挙される核内輸送タンパク質）によって、核内に輸送することが可能である。いくつかの実施形態では、ssDNA（例えば、本明細書に記載される）は、核内輸送タンパク質（例えば、表2Bに列挙される核内輸送タンパク質）によって結合され得る。いくつかの実施形態では、ssDNA（例えば、本明細書に記載される）は、核内輸送タンパク質のための認識配列（例えば、表2Bのいずれか1つの行に列挙される）を含む。いくつかの実施形態では、ssDNA（例えば、本明細書に記載される）は、表2Bに列挙される認識配列、又はそれと少なくとも75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性を有する核酸配列を含む。

30

【0119】

例示的な輸送タンパク質としては、例えば、塩基性ヘリックスループヘリックス（bHLH）タンパク質、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質（hnRNP）アイソフォーム、核因子I（NFY）タンパク質、例えば、表2Bに列挙されるものが挙げられる。いくつかの実施形態では、bHLHタンパク質は、アセチルコリン受容体サブユニット、例えば、 α サブユニット、例えば、CHRNA1、CHRNA2、CHRNA3、CHRNA4、CHRNA5、又はCHRNA7を含む。いくつかの実施形態では、アセチルコリン受容体サブユニットは、 γ 又は ϵ サブユニットを含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、デスミンを含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、hnRNP、例えば、hnRNP A1、hnRNP C、hnRNP K、hnRNP Uを含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、インポーチンを含む。いくつかの実施形態で

40

50

は、輸送タンパク質は、ミオシン軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、N F Iを含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、N F K Bを含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、例えば、N M 2 3 - H 2を含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、O c t 1を含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、O c t 2を含む。

【0120】

いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、S R Fを含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、T E F - 1を含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、A P 2を含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、トロポニン、例えば、トロポニン I、例えば、トロポニン I 2を含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、T T F - 1を含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、R a n 結合タンパク質、例えば、R a n B P 3又はR a n B P 1を含む。いくつかの実施形態では、輸送タンパク質は、ホメオボックス転写因子、例えば、C h x 1 0を含む。

10

【0121】

いくつかの実施形態では、輸送因子は、E - ボックス、D T S（例えば、S V 4 0 D T S又はS M G A D T S）、プロモーター（例えば、S P - Cプロモーター又はh t kプロモーター）、テロメア、A T T Tモチーフ、細胞周期調節ユニット（C C R U）、C T 3 配列、S / M A R、トポイソメラーゼ I I コンセンサス配列、A R S コンセンサス配列、3 N F、ウイルスの複製起点（o r i）（例えば、E B V o r i P 部位）に特異的に結合する。

20

【0122】

30

40

50

【表 2 B - 1】

表 2B: 例示的な核内輸送タンパク質及びそれらの対応する認識配列

核内侵入を 促進する タンパク質	タンパク質 遺伝子 ID	タンパク質の GenBank 受託番号	タンパク質に よって認識され る配列の名称	対応する DNA 認識配列	対応する DNA 認識配列の 配列番号
心臓 α- アクチン	70	NP_005150. 1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA1 アイソ フォーム b	1134	NP_000070. 1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA1 アイソ フォーム a	1134	NP_0010346 12.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 アイソ フォーム 1	1135	NP_000733. 2	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 アイソ フォーム 2	1135	NP_0012693 84.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 アイソ フォーム 3	1135	NP_0013346 34.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 アイソ フォーム 3	1135	NP_0013346 35.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3

【 0 1 2 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 2】

CHRNA2 アイソ フォーム4	1135	NP_0013346 36.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA2 アイソ フォーム4	1135	NP_0013346 37.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA3 アイソ フォーム1	1136	NP_000734. 2	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA3 アイソ フォーム2	1136	NP_0011601 66.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA4 アイソ フォーム1	1137	NP_000735. 1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA4 アイソ フォーム2	1137	NP_0012435 02.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 アイソ フォーム1	1138	NP_000736. 2	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 アイソ フォーム2	1138	NP_0012948 74.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3

【 0 1 2 4】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 3】

CHRNA5 アイソ フォーム3	1138	NP_0013821 00.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 アイソ フォーム4	1138	NP_0013821 01.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 アイソ フォーム5	1138	NP_0013821 02.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 アイソ フォーム6	1138	NP_0013821 03.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA5 アイソ フォーム7	1138	NP_0013821 04.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA7 アイソ フォーム1	1139	NP_000737. 1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA7 アイソ フォーム2	1139	NP_0011773 84.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNE	1145	NP_000071. 1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
CHRNA7	1146	NP_005190. 4	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3

【 0 1 2 5】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 4】

M-クレアチンキナーゼ(MCK)	1158	NP_001815.2	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
デスミンアイソフォーム2	1674	NP_0013696.37.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
デスミンアイソフォーム3	1674	NP_0013696.38.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
デスミンアイソフォーム4	1674	NP_0013696.39.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
デスミンアイソフォーム5	1674	NP_0013696.40.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
デスミンアイソフォーム6	1674	NP_0013696.41.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
デスミンアイソフォーム7	1674	NP_0013696.42.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
デスミンアイソフォーム1	1674	NP_001918.3	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	3
API (Fos)	2353	NP_005243.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'	4
GATA-6	2627	NP_005248.2	SP-Cプロモーター	5'-CAGGGCAGCAGGGGCGAGGTGCCAGCAAGGAAAGGACGGCAGGAAAGACACCCATGGTGAGAAAGTGCAGATGGCCGAGGGCAAGTTTGCTC	5

【 0 1 2 6 】

10

20

30

40

【表 2 B - 5】

hnRNP A1 アイソ フォーム a	3178	NP_002127. 1	ヒト染色体 バンド 11q13 に 由来する dsDNA 配列 (受託番号 AC000353)	AACTACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAGGGCCCTTG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAACAGGCTTCAA AGCCAAAGGGCTTGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCTTCACCTCTGTCCCTCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGGATAG-3'	6
hnRNP A1 アイソ フォーム b	3178	NP_112420. 1	ヒト染色体 バンド 11q13 に 由来する dsDNA 配列 (受託番号 AC000353)	5'-GGCTGGTCTTGAACCTCCTG (A/G) GCTCA (A/G) GTGATCCTCC-3'	6
hnRNP A1 アイソ フォーム a	3178	NP_002127. 1	テロメア (テロメア反復 に結合する)	5'-(TTAGGG)n-3'	7
hnRNP A1 アイソ フォーム b	3178	NP_112420. 1	テロメア (テロメア反復 に結合する)	5'-(TTAGGG)n-3'	7

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 6】

hnRNP A1 アイソ フォーム a	3178	NP_002127. 1	ヒトミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATT 配列モ チーフ	5'-TGCGGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP A1 アイソ フォーム b	3178	NP_112420. 1	ヒトミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATT 配列モ チーフ	5'-TGCGGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP A1 アイソ フォーム a	3178	NP_002127. 1	ヒトミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATT 配列モ チーフ	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGGGTCCAGTCG-5'	9
hnRNP A1 アイソ フォーム b	3178	NP_112420. 1	ヒトミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU)	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGGGTCCAGTCG-5'	9

【 0 1 2 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 7】

hnRNP C アイソ フォーム a	3183	NP_0010709 10.1	内に含まれる ATTT 配列 モチーフ ヒトチミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATTT 配列モ チーフ	5'-TGCGGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP C アイソ フォーム b	3183	NP_0010709 11.1	ヒトチミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATTT 配列モ チーフ	5'-TGCGGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP C アイソ フォーム b	3183	NP_004491. 2	ヒトチミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATTT 配列モ チーフ	5'-TGCGGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8
hnRNP C アイソ フォーム a	3183	NP_112604. 2	ヒトチミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU)	5'-TGCGGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3'	8

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 8】

hnRNP C アイソ フォーム a	3183	NP_0010709 10.1	内に含まれる ATTT 配列モ チーフ ヒトチミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATTT 配列モ チーフ	3'-ACGCCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5'	9
hnRNP C アイソ フォーム b	3183	NP_0010709 11.1	ヒトチミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATTT 配列モ チーフ	3'-ACGCCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5'	9
hnRNP C アイソ フォーム b	3183	NP_004491. 2	ヒトチミジンキ ナーゼ(htk)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATTT 配列モ チーフ	3'-ACGCCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5'	9

【 0 1 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 9】

hmrNP C アイソ フォーム a	3183	NP_112604. 2	ヒトチロジンキ ナーゼ(hik)プ ロモーター、細 胞周期調節ユ ニット(CCRU) 内に含まれる ATT 配列モ チーフ	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5'	9
hmrNP K アイソ フォーム c	3190	NP_0013051 15.1	CT3	5'-AATTCTCTCTCCCCACCTTCCCCACCCCTCCCCA- 3'	10
hmrNP K アイソ フォーム d	3190	NP_0013051 16.1	CT3	5'-AATTCTCTCTCTCCCCACCTTCCCCACCCCTCCCCA- 3'	10
hmrNP K アイソ フォーム b	3190	NP_0013051 17.1	CT3	5'-AATTCTCTCTCTCCCCACCTTCCCCACCCCTCCCCA- 3'	10
hmrNP K アイソ フォーム a	3190	NP_002131. 2	CT3	5'-AATTCTCTCTCTCCCCACCTTCCCCACCCCTCCCCA- 3'	10
hmrNP K アイソ フォーム b	3190	NP_112552. 1	CT3	5'-AATTCTCTCTCTCCCCACCTTCCCCACCCCTCCCCA- 3'	10
hmrNP K アイソ フォーム a	3190	NP_112553. 1	CT3	5'-AATTCTCTCTCTCCCCACCTTCCCCACCCCTCCCCA- 3'	10
hmrNP U (別名 SAF- A)アイソ フォーム b	3192	NP_004492. 2	S/MAR	5'-TATATTTT-3'	11

【 0 1 3 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 1 0】

hnRNP U (別名 SAF-A) アイソフォーム a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-TATAATTT-3'	11
hnRNP U (別名 SAF-A) アイソフォーム b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-(A/G) N (T/C) NNCNNG (T/C) NG (G/T) TN (T/C) N (T/C)-3'	12
hnRNP U (別名 SAF-A) アイソフォーム a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-(A/G) N (T/C) NNCNNG (T/C) NG (G/T) TN (T/C) N (T/C)-3'	12
hnRNP U (別名 SAF-A) アイソフォーム b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3'	13
hnRNP U (別名 SAF-A) アイソフォーム a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3'	13
API (Jun)	3725	NP_002219.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'	4
インボーチンβ1	3837	XP_548162.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCGCTGCCATTCTGGTATGGTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC	14

【 0 1 3 2】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 1 1】

ミオシン 軽鎖 (MLC) 1/3 アイソ フォーム 1f	4632	NP_524144. 1	E-ボックス	TTATAAGGCGCTGGTGTGAGTTTGTGTTTATGCAA GTGCAGCATAAAGGAAACAAATCTACCAGCAC CGGGGCTGTGGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTCCCTACCCCAAGCGGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGTTAATAATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCGCTCTGGGGTTTATATTGCTCTGG TATTCAATGCCAAAGAC-3'	15
ミオシン軽 鎖 (MLC) 1/3 アイソ フォーム 3f	4632	NP_524146. 1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	15
NFI アイソ フォーム 1	4782	NP_0012319 31.1	SP-C プロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTC AACTCACCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGAGGGCCAGGAACAACAGGGCTTCAA AGCCAAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCTTCACCTCTGTCCCCCTCCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	16

【 0 1 3 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 1 2】

NFI アイソ フォーム 3	4782	NP_0012319 33.1	SP-C プロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGCCCCGAGGGCAAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	16
NFI アイソ フォーム 4	4782	NP_0012319 34.1	SP-C プロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGCCCCGAGGGCAAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	16
NFI アイソ フォーム 5	4782	NP_005588. 2	SP-C プロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGCCCCGAGGGCAAAGTTTGCTC AACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAAGGGCCCTTG GGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCCTGGTCACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	16

【 0 1 3 4】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 1 4】

NFKB α 1 ソノオーム 3	4790	NP_0013695 57.1	3NF	5'- CTGGGACCTTTCCAGCCTGGGACCTTTCCAGC TGGGACCTTTCCAGG-3'	2
NFKB α 1 ソノオーム 1	4790	NP_003989. 2	3NF	5'- CTGGGACCTTTCCAGCCTGGGACCTTTCCAGC TGGGACCTTTCCAGG-3'	2
NFKB α 1 ソノオーム 2	4790	NP_0011588 84.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB α 1 ソノオーム 2	4790	NP_0013061 55.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB α 1 ソノオーム 1	4790	NP_0013695 54.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB α 1 ソノオーム 1	4790	NP_0013695 55.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB α 1 ソノオーム 2	4790	NP_0013695 56.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB α 1 ソノオーム 3	4790	NP_0013695 57.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

【 0 1 3 6】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 1 5】

NFKB アイソ フォーム 1	4790	NP_003989.2	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCACTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NFKB アイソ フォーム 2	4790	NP_0011588.84.1	Igk κB モチーフ 5'- GGGGACTTT CC-3'の 5 つの タンデムリピー トからなる断片	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTTCC-3'	17
NFKB アイソ フォーム 2	4790	NP_0013061.55.1	Igk κB モチーフ 5'- GGGGACTTT CC-3'の 5 つの タンデムリピー トからなる断片	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTTCC-3'	17
NFKB アイソ フォーム 1	4790	NP_0013695.54.1	Igk κB モチーフ 5'- GGGGACTTT CC-3'の 5 つの タンデムリピー トからなる断片	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTTCC-3'	17
NFKB アイソ フォーム 1	4790	NP_0013695.55.1	Igk κB モチーフ 5'- GGGGACTTT CC-3'の 5 つの タンデムリピー トからなる断片	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTTCC-3'	17

【 0 1 3 7 】

10

20

30

40

【表 2 B - 1 6】

NFKB アイソ フォーム 2	4790	NP_0013695 56.1	Igk κB モチーフ 5'- GGGGACTTT CC-3'の 5 つの タンデムリピー トからなる断片	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTTCC-3'	17
NFKB アイソ フォーム 3	4790	NP_0013695 57.1	Igk κB モチーフ 5'- GGGGACTTT CC-3'の 5 つの タンデムリピー トからなる断片	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTTCC-3'	17
NFKB アイソ フォーム 1	4790	NP_003989 2	Igk κB モチーフ 5'- GGGGACTTT CC-3'の 5 つの タンデムリピー トからなる断片	5'- GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTTC CGGGGACTTTCCGGGGACTTTTCC-3'	17
NM23-H2 アイソ フォーム a	4831	NP_0010181 47.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NM23-H2 アイソ フォーム a	4831	NP_0010181 48.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 1 7】

NM23-H2 アイソ フォーム a	4831	NP_0010181 49.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NM23-H2 アイソ フォーム b	4831	NP_0011856 11.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
NM23-H2 アイソ フォーム a	4831	NP_002503. 1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) アイソ フォーム 1	5452	NP_0011939 54.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) アイソ フォーム 3	5452	NP_0011939 55.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) アイソ フォーム 4	5452	NP_0012349 23.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) アイソ フォーム 5	5452	NP_0013808 63.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

【 0 1 3 9】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 1 8】

Oct2 (POU2F2) アイ フォーΔ6	5452	NP_0013808 64.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) アイ フォーΔ7	5452	NP_0013808 65.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) アイ フォーΔ8	5452	NP_0013813 05.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) アイ フォーΔ9	5452	NP_0013813 06.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) アイ フォーΔ10	5452	NP_0013813 07.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct2 (POU2F2) アイ フォーΔ2	5452	NP_002689. 1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

【 0 1 4 0 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 1 9】

RanBP1	5902	XP_514990.2	SMGA DTS	5'- AGCAGACCCAGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTGTATTATGCAA GTGCAGCATAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGCTGTGCCACTGAGTCCCTTTTGCATACA TTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTCCCTACCCCCAAGGCGATTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	18
Oct1 (POU2F1) アイ フォーΔ2	5451	NP_001185712.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct1 (POU2F1) アイ フォーΔ3	5451	NP_001185715.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct1 (POU2F1) アイ フォーΔ4	5451	NP_001352777.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
Oct1 (POU2F1) アイ フォーΔ4	5451	NP_001352778.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

【 0 1 4 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 2 0】

Oct1 (POU2F1) アイノ フォーム1	5451	NP_002688. 3	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
SRE アイノ フォーム2	6722	NP_0012789 30.1	SMGA DTS	5'- TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCTT CCCTACCCCAAGCGATTATTGAAAAAACC ACCTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTC AGCTGGCCTTTTATAGGGACTTTGTTTAAAGAA GATCCGCTCTGGGGTTTATATTGCTCTGGTA TTCATGCCAAAGAC-3'	19
SRE アイノ フォーム1	6722	NP_003122. 1	SMGA DTS	5'- TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCTT CCCTACCCCAAGCGATTATTGAAAAAACC ACCTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTC AGCTGGCCTTTTATAGGGACTTTGTTTAAAGAA GATCCGCTCTGGGGTTTATATTGCTCTGGTA TTCATGCCAAAGAC-3'	19
TEF-1 アイノ フォーム2	7008	NP_0011388 70.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
TEF-1 アイノ フォーム1	7008	NP_003207. 1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
AP2 (TFAP2A) アイノ フォームb	7020	NP_0010274 51.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4

【 0 1 4 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 2 1】

AP2 (TFAP2A) アイソ フォームc	7020	NP_0010358 90.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
AP2 (TFAP2A) アイソ フォームa	7020	NP_0013589 95.1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
AP2 (TFAP2B)	7021	NP_003212. 2	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
AP2 (TFAP2C)	7022	NP_003213. 1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
トロポニン1 1	7135	NP_003272. 3	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	20
トロポニン1 2-アイソ フォーム1	7136	NP_0011393 01.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	20
トロポニン1 2-アイソ フォーム2	7136	NP_0011393 13.1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	20
トロポニン1 2-アイソ フォーム1	7136	NP_003273. 1	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	20

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 2 2】

トロポニン I 3	7137	NP_000354. 4	E-ボックス	5'-CANNTG-3'	20
TTF-1 アイソ フォーム 2	7270	NP_0011922 25.1	SP-C プロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGCGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGGCAAGTTTGCTC AACTACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAAGGCCCTTG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAACACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCCTTCACTCTGTCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCCTGGTCAACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	21
TTF-1 アイソ フォーム 1	7270	NP_031370. 2	SP-C プロモーター	5'- CAGGGCAGCAGGGCGCAGGTGCCAGCAAGGAA GGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGA GAAGTGCAGATGGCCCGAGGGGCAAGTTTGCTC AACTACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAA GAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAAGGCCCTTG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCG GTTCTGGAGGGCCAGGAACAACACAGGCTTCAA AGCCAAGGGCTTGGCTGGCACACAGGGGGCTT GGTCCCTTCACTCTGTCCCTCTCCCTACGGAC ACATATAAGACCCCTGGTCAACACCTGGGAGAGG AGGAGAGGAGAGCATAG-3'	21
H2B	8349	NP_003519. 1	SV40 DTS	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC AGAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTC AGCAACCA-3'	4
RanBP3 アイソ フォーム 4	8498	NP_0012877 94.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCC	22

【 0 1 4 4】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 2 3】

					GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTGTGTTATGCAA GTGCAGCATAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGCTGTGGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCAAGGCGATTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGTTTATATGCTCTGG TATTCAATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 アイノ フォーラム a	8498	NP_003615. 2	SMGA DTS		5'- AGGCAGACCCAGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGCT TATAAGGCCTGGTGTGAGTTTGTGTTATGCAA GTGCAGCATAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGCTGTGGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCAAGGCGATTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGTTTATATGCTCTGG TATTCAATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 アイノ フォーラム b	8498	NP_015559. 2	SMGA DTS		5'- AGGCAGACCCAGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTGTGTTATGCAA GTGCAGCATAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGCTGTGGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA	22

【表 2 B - 2 4】

					TTTTCAAATGATAACTCACTCACTACCCACCCCTTCCCTACCCCAAGGCGATTTATTGAAAAACCACTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTAGGGACTTTGTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTATATATTGCTCTGGTATTTCATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 アイノ フォ-Δ d	8498	NP_015561.1	SMGA DTS		5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCGCTGCCATTCTTGGTATGGTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGCTTATAAGGCTGGTGTGAGTTTGTATTGCAAGTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACGGGGCTGTGGCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTCAAATGATAACTCACTCACTACCCACCCCTTCCCTACCCCAAGGCGATTTATTGAAAAACCACTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTAGGGACTTTGTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTATATATTGCTCTGGTATTTCATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 アイノ フォ-Δ X1	8498	XP_006722991.1	SMGA DTS		5'- AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCGCTGCCATTCTTGGTATGGTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGCTTATAAGGCTGGTGTGAGTTTGTATTGCAAGTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACGGGGCTGTGGCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTCAAATGATAACTCACTCACTACCCACCCCTTCCCTACCCCAAGGCGATTTATTGAAAAACCACTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTAGGGACTTTGTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTTATATATTGCTCTGGTATTTCATGCCAAAGAC-3'	22

【 0 1 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 2 5】

RanBP3 アイノ フォーラム XI	8498	XP_0067229 92.1	SMGA DTS	5'- AGCAGACCCAGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGAGGTGTGGACGGAGAGGCCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTGTATTGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGCGATTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAAGCTGGCCTTTTAGGGACTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTATATGCTCTGG TATTCAATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 アイノ フォーラム XI	8498	XP_0115266 95.1	SMGA DTS	5'- AGCAGACCCAGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGAGGTGTGGACGGAGAGGCCCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTGTATTGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTGCAATACA TTTTTCAAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCCAAGCGATTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAAGCTGGCCTTTTAGGGACTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTATATGCTCTGG TATTCAATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 アイノ フォーラム XI	8498	XP_0115266 94.1	SMGA DTS	5'- AGCAGACCCAGGGCCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGAGGTGTGGACGGAGAGGCCCC	22

【 0 1 4 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 2 6】

					GCTGCCATTCTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCTGGTGTGAGTTTGTATTGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	22
RanBP3 ア↑ノ フオーΔ X1	8498	XP_0115266 96.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGCCGCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCTGGTGTGAGTTTGTATTGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA TTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCC CTTCCCTACCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACC GTCAGCTGGCCTTTTAGGGACTTTGTTTAAAG AAGATCCGCCTCTGGGGTTTATATTGCTCTGG TATTCATGCCAAAGAC-3'	22	
RanBP3 ア↑ノ フオーΔ X1	8498	XP_0243075 17.1	SMGA DTS	5'- AGGCAGACCCAGGGCCGCGCATGCAGCAGGGC CTGAGGAGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCC GCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGA GCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGC TTATAAGGCTGGTGTGAGTTTGTATTGCAA GTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCAC CGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACA	22	

【 0 1 4 8】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 2 7】

インボーチン7	10527	NP_006382.1	SMGA DTS	TTTTCAATGATAAAGTCACTCTACCCACCCCTTCCCTACCCCAAGCGGATTTATGAAAAAACCACTTATATGGTAATATTGCTAACACACGTCAGCTGGCTTTTATAGGACTTTGTTAAAGAAGATCCGCTCTGGGTTTATATGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3'	22
Chx10	338917	NP_878314.1	SV40 DTS	5'-AGCAGACCCAGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCGCTGCCATTCTGGTATGGTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGCAGCTTATAAGGCTGGTGTGAGTTTGTATGCAAGTGCAGCATAAAGGAACAAATCTACCAGCACGGGGCTGTGCCACTGAGTCTTTTGCATACATTTTCAATGATAAAGTCACTCTACCCACCCCTTCCCTACCCCAAGCGGATTTATGAAAAAACCACTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAAGCTGGCTTTTATAGGACTTTGTTAAAGAAGATCCGCTCTGGGTTTATATGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3'	4
EBNA-1	3783774	YP_401677.1	EBV oriP 部位	5'-CATGCAGGAAAAAGGACAAAGCAGCGAAAAATTCACGCCCCCTTGGGAGGTGGCGGCATATGCAAAAGGATAGCACTCCCACTCTACTACTGGGTATCATGCTGACTGTATATGCATGAGGATAGCATATGCTACCCGGATACAGATTAGGATAGCATATATCTACCCAGATATAGATTAGGATAGCCTATGCTACCCAGATATAAATTAGGATAGCATATACTACCC	23

【 0 1 4 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 B - 2 8】

				AGATATAGATTAGGATAGCATATGCTACCCAG ATATAGATTAGGATAGCCTATGCTACCCAGAT ATAGATTAGGATAGCATATGCTACCCAGATAT AGATTAGGATAGCATATGCTATCCAGATATTT GGGTAGTATATGCTACCCAGATATAAATTAGG ATAGCATATACTACCTAATCTCTATTAGGATA GCATATGCTACCCGGATACAGATTAGGATAGC ATATACTACCCAGATATAGATTAGGATAGCAT ATGCTACCCAGATATAGATTAGGATAGCCTAT GCTACCCAGATATAAATTAGGATAGCATATAC TACCCAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTA CCCAGATATAGATTAGGATAGCCTATGCTACC CAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTATCCA GATATTTGGGTAGTATATGCTACCCATGGCAA CATTAGCCCAACCGTGTCTCAGCGACCTCGTG AATATGAGGACCAACAACCTGTGCTTGGCGC TCAGGCGCAAGTGTGTAAATTTGTCTCTCCAG ATCGCAGCAATCGCGCCCTATCTTGGCCCGC CCACCTACTTATGCAGGTATTTCCCGGGGTGC CATTAGTGGTTTGTGGGCAAGTGGTTGACC GCAGTGGTTAGCGGGGTACAAATCAGCCAAAGT TATTACACCTTATTTACAGTCCAAAACCGCA GGCGGCGTGTGGGGGTGACGCGTGCCCCCA CTCCACAAATTCAAAAAAAGAGTGGCCACTT GTCCTTGTATAGGCCCTTGGCGTGGAGCC CCGTTTAAATTTTCGGGGGTGTAGAGACAACC AGTGGAGTCCGCTGCTGCGGCGTCCACTCTCT TTCCCTTGTACAAAATAGAGGTAAACAACAT GGTTCACCTGTCTTGGTCCCTGCCTGGGACACA TCTTAATAACCCAGTATCATATTGCAC TAGG ATTATGTGTGCCCATAGCCATAAAATTCGTGTG AGATGGACATCCAGTCTTTACGGCTTGTCCCC ACCCCATGGATTCTCTATTGTTAAAGATATTAG

10

20

30

40

【 0 1 5 0】

【表 2 B - 3 0】

NKX3-1/3- 2アイノ フォーム1	4824	NP_006158. 2	SMGA DTS	5'- TTCAAAATGATAAACTCACTCTACCCACCCCCCTT CCCTACCCCAAGGCGATTATTGAAAAAACCC ACCTATATGGTAATATTGCTAACACACCCGTC AGCTGGCCCTTTTAGGGGACTTTGTTTAAAGAA GATCCGCCCTCTGGGGTTTTATATATTGCTCTGGTA TTCATGCCAAAGAC-3'	19
----------------------------	------	-----------------	----------	---	----

10

20

30

40

【 0 1 5 2】

維持配列

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

50

色体外維持を促進するために、本明細書に記載される ssDNA 又は構築物に組み込まれ得る。一実施形態では、維持配列は、ヒトインターフェロン-β MAR (5' t a t a a t t c a c t g g a a t t t t t t t t g t g t g t a t g g t a t g a c a t a t g g g t t c c c t t t t a t t t t t t a c a t a t a a a t a t a t t t c c c t g t t t t t c t a a a a a a g a a a a a g a t c a t c a t t t t t c c c a t t g t a a a a t g c c a t a t t t t t t t c a t a g g t c a c t t a c a t a - 3') である。実施形態では、本明細書に記載される構築物において有用な S/MAR は、<http://bioinfo.net.in/MARome> において MARome を検索することによって見出すことができ、Narwade et al. 2019. Nucleic Acids Research. Volume 47, Issue 14: 7247-7261 にも記載されている。

10

【0153】

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

20

【0154】

第 2 鎖モチーフ

本明細書に開示される DNA 構築物又は ssDNA 配列は、第 2 鎖モチーフも含み得る。SSM の例は、ウイルス又は可動遺伝因子に由来する。いくつかの実施形態では、SSM は、逆方向リピート又はヘアピン配列、例えば、ウイルス由来、例えば、AAV 由来の逆方向末端リピート (ITR)、又はアネロウイルス複製起点における保存された 8-ヌクレオチドヘアピンである。SSM の例は、以下の表 3 に列挙される：

【0155】

30

40

50

【表 3】

表 3: 例示的な第 2 鎖モチーフ

SSM 名	配列
AAV2 WT ITR- 左	5'cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgc ccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgccaaactccatcactaggggttcct-3' (配列番号 25)
AAV2 WT ITR- 右	5'aggaaccctagtgtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc ccgacgcccgggctttgccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagctgcctgcagg-3' (配列番号 26)
AAV2 修飾 ITR-左	5'cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgccgggcaaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgc ccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgccaa-3' (配列番号 27)
AAV2 修飾 ITR-右	5'ttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggtcggcgacggcggtttgcc ggcgcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagctgcctgcagg-3' (配列番号 28)
アネロ ウイルス ヘアピン- 長鎖	5'cccgaggcggtgcggaaggtgagttacacaccgaagtcaggggcaattcgggctcgggactggccgggctatg ggc-3' (配列番号 29)
アネロ ウイルス ヘアピン- 短鎖	5'- agtttaca-3' (配列番号 30)

10

20

【0156】

いくつかの実施形態では、SSMは、ssDNAの領域に相補的なRNA又はDNAの短鎖配列、例えば、RNAプライマー又はDNAプライマーである。いくつかの実施形態では、プライマーは、本明細書に記載されるssDNAの末端を連結するスプリント配列である。いくつかの実施形態では、RNA又はDNAプライマーは、100、75、50、40、30、25、20、15、10、又は5ヌクレオチド未満である。いくつかの実施形態では、RNA又はDNAプライマーは、5～100ヌクレオチド、10～100ヌクレオチド、20～80ヌクレオチド、20～60ヌクレオチドである。

30

【0157】

他の要素

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

40

【0158】

修飾ヌクレオチド

本明細書に記載されるDNA構築物及び組成物は、線状又は環状、例えば、共有結合的

50

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

【0159】

いくつかの実施形態では、ssDNAは、少なくとも1つの共有結合的修飾を含む。好適な修飾は、Sood et al. 2019. DNAMod: the DNA modification database. J Cheminform 11, 30によって記載されている。DNAModは、DNA修飾の目録を作成し、それらの特性について学習するための単一のソースを提供するオープンソースのデータベース (<https://dnamod.hoffmanlab.org>) である。DNAModは、これらの修飾を容易に閲覧及び検索するためのウェブインターフェースを提供する。このデータベースは、全てのキュレートされる (curated) 修飾DNA塩基の化学特性及び構造、並びに候補化学物質のはるかに大きいリストに注釈を付けている。DNAModは、利用可能なシーケンシング方法の人手によるアノテーション (manual annotation)、自然界におけるそれらの発生の説明を含み、既存の及び推奨された命名法を提供する。本明細書に記載される方法において有用なDNA修飾の例としては、例えば、N6-メチルアデノシン (m6A、6mA)；5-ホルミルシトシン (5fC、f5C)；5-カルボキシシトシン (ca5C、5caC)；5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC、hm5C)；5-メチルデオキシシトシン (m5dC)；5-メチルシトシン (5mC、m5C)；5'-メチルシトシン；3-メチルシトシン (m3C)；5-メチルピリミジン；8-オキソグアニン (8-オキソG)；ホスホロチオエート；S及びRホスホロチオエート結合；メチルチミン；N3'-P5'ホスホロアミデート (NP)；シクロヘキサン核酸 (CeNA)；トリシクロ-DNA (tcDNA) が挙げられる。例えば、Pu et al. 2020. An in-vitro DNA phosphorothioate modification reaction. Mol Microbiol. 113: 452-463；Zheng & Sheng. 2021. Synthesis of N4-methylcytidine (m4C) and N4, N4-dimethylcytidine (m42C) modified RNA. Current Protocols, 1, e248；Ohkubo et al. 2021. Chemical synthesis of modified oligonucleotides containing 5'-amino-5'-deoxy-5'-hydroxymethylthymidine residues. Current Protocols, 1, e70；Bao & Xu. 2021. Observation of Z-DNA structure via the synthesis of oligonucleotide DNA containing 8-ribofluoromethyl-2-deoxyguanosine. Current Protocols, 1, e28；Skakuj et al. 2020. Automated synthesis and purification of guanidine-backbone oligonucleotides. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 81, e110を参照されたい。

【0160】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNA組成物は、Sホスホロチオエート修飾ヌクレオチド結合及びRホスホロチオエート修飾ヌクレオチド結合の一方又は両方を含み得る。一実施形態では、ホスホロチオエート結合は、Iwamoto et

10

20

30

40

50

al, 2017, Nature Biotechnology, Volume 35: 845-851に従って作製される。簡潔に述べると、ヌクレオシド3'-オキサアザホスホリジン誘導体のモノマーは、反復キャッピング及び硫化とともに立体制御オリゴヌクレオチド合成を起こして、立体制御ホスホロチオエート結合を形成する。最終的な試料が、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 及び超高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (UPLC/MS) によって分析されて、修飾の立体化学を決定し得る。ホスホロチオエート結合を含有する核酸はまた市販されている。

【0161】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNA組成物は、例えば、Sergeev and Shaw, 1998, J Am Chem Soc, Volume 120, Issue 37: 9417-9427における方法に従って、1つ以上のボラノリン酸修飾ヌクレオチドを含み得る。簡潔に述べると、いくつかの実施形態では、H-ホスホネート鎖伸長の後、リン酸骨格中の非架橋酸素をボラノ基に置換するホウ素化が続く。最終的な試料が、RP-HPLCによって精製及び分析されて、修飾の立体化学を決定し得る。ボラノリン酸修飾ヌクレオチドはまた市販されている。

10

【0162】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNA組成物は、例えば、Lin et al, 2002, Mol Cell Biol, Volume 22, Issue 3: 704-723における方法に従って作製される1つ以上の5-メチルシトシン修飾ヌクレオチドを含み得る。簡潔に述べると、いくつかの実施形態では、シトシン又はシトシンを含有する配列が、非標識S-アデノシルメチオニン (AdoMet) を用いて、野生型Dnmt3a (GST-3a) タンパク質のグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合とともにインキュベートされる。ヌクレオチドは、HPLCによって精製及び分析されて、ヌクレオチドが適切な位置でメチル化されることを決定し得る。5-メチルシトシン修飾ヌクレオチドはまた市販されている。

20

【0163】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNA組成物は、1つ以上の7-メチルグアニン修飾ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、7-メチルグアニン修飾ヌクレオチドが、Jones and Robins, 1963, Purine nucleosides. III. Methylation studies of certain naturally occurring purine nucleosides, J Am Chem Soc, Volume 85: 193における方法に従って作製される。簡潔に述べると、いくつかの実施形態では、ジメチルスルホキシド中の2'-デオキシグアニンが、ヨウ化メチルで処理される。ヌクレオチドは、HPLCによって精製及び分析されて、ヌクレオチドが適切な位置でメチル化されることを決定し得る。別の実施形態では、7-メチルグアニン修飾ヌクレオチドは、Hendler et al, 1970, Volume 9, Issue 21: 4141-4153、及びKore and Parmar, 2006, Biochemistry, Volume 25, Issue 3: 337-340に記載される方法に従って作製される。簡潔に述べると、いくつかの実施形態では、グアニン5'-ニリン酸の代わりに、水中のグアニン5'-ニリン酸が、硫酸ジメチルに付加されて、7-メチルGDPが得られる。ヌクレオチドは、HPLCによって精製及び分析されて、ヌクレオチドが適切な位置でメチル化されることを決定する。7-メチルグアニン修飾ヌクレオチドはまた市販されている。

30

40

【0164】

実施形態では、本明細書に記載されるssDNA構築物及び組成物は、1~100%の修飾ヌクレオチド、1%~90%の修飾ヌクレオチド、1%~80%の修飾ヌクレオチド、1%~70%の修飾ヌクレオチド、1%~60%の修飾ヌクレオチド、1%~50%の修飾ヌクレオチド、1%~40%の修飾ヌクレオチド、1%~30%の修飾ヌクレオチド、1%~20%の修飾ヌクレオチド、1%~15%の修飾ヌクレオチド、1%~10%の修飾ヌクレオチド、20%~90%の修飾ヌクレオチド、20%~80%の修飾ヌクレオ

50

チドを含む。実施形態では、本明細書に記載される ssDNA 構築物及び組成物は、少なくとも 1 % の修飾ヌクレオチド、少なくとも 5 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 10 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 15 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 20 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 25 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 30 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 40 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 50 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 60 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 70 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 80 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 85 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 90 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 92 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 95 % の修飾ヌクレオチド；少なくとも 97 % の修飾ヌクレオチドを含む。実施形態では、本明細書に記載される ssDNA 構築物及び組成物は、各異なるヌクレオチドの 0 % ~ 100 % の修飾ヌクレオチド、例えば、各構築物について 0 % ~ 100 % の修飾 T ヌクレオチド、0 % ~ 100 % の修飾 A ヌクレオチド、0 % ~ 100 % の修飾 C ヌクレオチド、及び 0 % ~ 100 % の修飾 G ヌクレオチドを含む。実施形態では、本明細書に記載される ssDNA 構築物及び組成物は、各異なるヌクレオチドの 0 ~ 100 %、10 % ~ 100 %、20 % ~ 100 %、30 % ~ 100 %、40 % ~ 100 %、50 % ~ 100 %、60 % ~ 100 %、10 % ~ 50 % の修飾ヌクレオチド、例えば、0 ~ 100 %、10 % ~ 100 %、20 % ~ 100 %、30 % ~ 100 %、40 % ~ 100 %、50 % ~ 100 %、60 % ~ 100 %、10 % ~ 50 % の修飾 T ヌクレオチド；0 ~ 100 %、10 % ~ 100 %、20 % ~ 100 %、30 % ~ 100 %、40 % ~ 100 %、50 % ~ 100 %、60 % ~ 100 %、10 % ~ 50 % の修飾 A ヌクレオチド；0 ~ 100 %、10 % ~ 100 %、20 % ~ 100 %、30 % ~ 100 %、40 % ~ 100 %、50 % ~ 100 %、60 % ~ 100 %、10 % ~ 50 % の修飾 C ヌクレオチド；又は 0 ~ 100 %、10 % ~ 100 %、20 % ~ 100 %、30 % ~ 100 %、40 % ~ 100 %、50 % ~ 100 %、60 % ~ 100 %、10 % ~ 50 % の修飾 G ヌクレオチドを含む。例えば、ssDNA 構築物は、100 % の修飾 T ヌクレオチド、50 % の修飾 A ヌクレオチド、0 % の修飾 C ヌクレオチド、及び 25 % の修飾 G ヌクレオチドを含有し得る。

10

20

30

40

50

【0165】

実施形態では、DNA 修飾、例えば、本明細書に記載される修飾は、全配列を通して；配列の要素、例えば、本明細書に記載される要素内に；5' 末端若しくは 3' 末端において；及び／又は 5' 末端若しくは 3' 末端において最後の 10、8、6、5、4、3、若しくは 2 ヌクレオチド間で、本明細書に記載される ssDNA 組成物に導入され得る。

【0166】

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

【0167】

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

【0168】

いくつかの実施形態では、ssDNAは、ビオチンを実質的に含まない（例えば、含まない）。

【0169】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾ssDNAは、同じ配列の非修飾ssDNAと比較して、宿主組織又は対象におけるDNAセンサーによって低下した認識、例えば、同じ配列の非修飾ssDNAと比較して、宿主組織又は対象におけるDNAセンサーによって、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はそれ以上低下した認識を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾ssDNAは、同じ配列の非修飾ssDNAと比較して、DNAヌクレアーゼによって低下した分解、例えば、非修飾ssDNAと比較して、宿主組織又は対象におけるDNAヌクレアーゼによって、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はそれ以上低下した分解を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾ssDNAは、同じ配列の非修飾ssDNAと比較して、標的／宿主組織又は対象における自然免疫系の低下した活性化、例えば、同じ配列の非修飾ssDNAと比較して、標的／宿主組織又は対象における自然免疫系の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はそれ以上低下した活性化を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾ssDNAは、同じ配列の非修飾ssDNAと比較して、標的／宿主組織又は対象における以下の特性のいずれかを示す：標的細胞のゲノムへの外因性構築物の増加した統合；複製による標的細胞内における増加した保持；低下した二次若しくは三次構造形成；自然免疫センサーとの低下した相互作用；ヌクレアーゼとの低下した相互作用；向上した安定性；向上した寿命；低下した毒性；向上した送達；増加した発現；増加した第2鎖合成；膜間の増加した輸送；又は核DNA結合タンパク質、転写因子、シャペロン、DNAポリメラーゼなどのDNA結合部分への増加した結合。実施形態では、上記に列挙される特性のいずれかが、同じ配列の非修飾ssDNAと比較して、標的／宿主組織又は対象において少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はそれ以上調節される。

10

20

【0170】

DNA構築物の構造

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるssDNA構築物又は配列は、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約30ヌクレオチド、少なくとも約40ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約75ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約500ヌクレオチド、少なくとも約1000ヌクレオチド、少なくとも約2000ヌクレオチド、少なくとも約3000ヌクレオチド、少なくとも約4000ヌクレオチド、少なくとも約5000ヌクレオチド、少なくとも約6000ヌクレオチド、少なくとも約7000ヌクレオチド、少なくとも約8000ヌクレオチド、少なくとも約9000ヌクレオチド、少なくとも約10,000ヌクレオチド、少なくとも約20,000ヌクレオチド、少なくとも約30,000ヌクレオチド、少なくとも約40,000ヌクレオチド、少なくとも約50,000ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるssDNA構築物又は配列のサイズは、有用なポリペプチド又はRNAをコードするのに十分な長さである。

30

40

【0171】

本明細書に記載されるssDNA構築物は、環状であり得、例えば、共有結合的に閉環され得る。

【0172】

本明細書に記載されるssDNA構築物は、分子内相補性又は二本鎖構造の閾値レベル未満を有し得る。一実施形態では、ssDNAは、100、80、70、60、50、40、30、20又は10塩基対より長い50、40、30、20、18、16、14、12、10、8、7、5、4、3、2、又は1つを超える二本鎖領域を含まず、すなわち、

50

100、80、70、60、50、40、30、20又は10塩基対より長い分子内相補性の領域を含まない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、1、2、3、4、5、7、8、10、21、14、15、18、又は20の二本鎖領域を含み、例えば、二本鎖領域は、100、80、70、60、50、40、30、20又は10以下の塩基対である。一実施形態では、ssDNAは、100、80、70、60、50、40、30、又は20塩基対より長い分子内相補性の領域を含まない。例えば、ssDNAは、ドギーボーン(doggybone)構造ではなく、すなわち、それは、主に、二本鎖の、閉鎖末端構築物ではない。

【0173】

いくつかの実施形態では、ssDNAは、100塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、80塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、60塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、50塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、45塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、40塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、35塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、30塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、25塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、20塩基対より長い二本鎖構造を形成しない。いくつかの実施形態では、ssDNAは、細胞内の環状GMP-AMPシンターゼ(cGAS)によって認識される二本鎖の長さを含まない。理論に制約されるのを望むものではないが、cGASは、外来二本鎖DNAに対する自然免疫を媒介すると考えられる。

【0174】

いくつかの実施形態では、ssDNAは、第2の配列とハイブリダイズする第1の配列を含まず、第1の配列及び第2の配列は、少なくとも5、10、15、20、又は25nt長であり、第1の配列及び第2の配列は、互いに6、5、4、3、2、又は1ヌクレオチド未満離れて配置される。

【0175】

一実施形態では、本明細書に記載されるssDNAによって形成される二本鎖領域は、Xayaphoummine et al. 2005. Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. Nucleic Acids Research, Volume 33:W605-610によって記載されるように決定される。一実施形態では、Kinefoldウェブサイト(<http://kinefold.curie.fr/cgi-bin/form.pl>)は、以下のパラメーターを用いて、本明細書に記載される構築物の二本鎖領域を予測するのに使用される：

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

【0176】

一実施形態では、本明細書に記載されるssDNAによって形成される二本鎖領域は、Lorenz et al. 2011. ViennaRNA Package 2.0. Algorithms for Molecular Biology, Volume 6, Article 26によって記載されるように決定される。一実施形態では、RNAFoldウェブサーバー(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)が、以下のパ

ラメーターを用いて、本明細書に記載される構築物の二本鎖領域を予測するのに使用される：

- ・折り畳みアルゴリズム及び基本オプション：
- ・最小自由エネルギー（MFE）及び分配関数（デフォルト）
- ・分離された塩基対を回避する（デフォルト）

【0177】

- ・高度なフォールディングオプション：
- ・いずれの場合も、らせんの両側におけるダングリングエネルギー（デフォルト）
- ・DNAパラメーター（マシューズモデル、2004）
- ・SHAPE反応性の変換の後、擬似エネルギーを：スタック対に適用する（Deigan et al., 2009）（デフォルト）
- ・傾き（m）= 1.9；切片（b）= -0；所与の温度に対するエネルギーパラメーターをリスケールする = 3（デフォルト）
- ・RNA分子が環状であると仮定する

【0178】

- ・出力オプション
- ・相互作用RNA二次構造プロット（デフォルト）
- ・信頼性アノテーションを用いたRNA二次構造プロット（分配関数フォールディングのみ）（デフォルト）
- ・マウンテンプロット（デフォルト）

【0179】

例示的な一本鎖の共有結合的に閉環されたDNAのコンピュータによるフォールディングが、図16に示される。理解され得るように、ssDNAは、ヘアピンなどのかなりの数の二本鎖領域を有することが予測され得る。しかしながら、図16のssDNAは、二本鎖DNAの長い連続した伸長を欠いている。より特定の、図16における最も長い連続したdsDNA領域は、16ヌクレオチド長以下である。この構築物は、100塩基対より長い二本鎖構造を形成することが予測されず；むしろ、バルジ、内部ループ、及び他の構造が、より短い二本鎖領域の間に配置される。

【0180】

産生

一般に、本発明のssDNA構築物は、本明細書に記載される所望の要素を含有するように組み立てられたプラスミドから産生される。プラスミド鑄型は、ワンポットアセンブリ手順を用いて、レシピエントベクターにおいて規定の線形順序で、複数のDNA断片の組み立てのためにGolden Gateクローニングを用いて組み立てられ得る。Golden Gateクローニングは、Marillonnet & Gruetzner, 2020, Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline, Current Protocols in Molecular Biology, 130:e115に記載されている。次に、鑄型は、例えば、Minev et al., 2019, Rapid in vitro production of single-stranded DNA, Nucleic Acids Research, Volume 47, Issue 22:11956-11962に記載されるように、メタノール応答性（MeRPy）PCRを用いて一本鎖DNAを作製するのに使用される。ssDNAが環状である実施形態では、得られたssDNAは、例えば、DNAリガーゼを用いて環状化され得る。例示的な産生プロセスの概略図が、図2に示される。

【0181】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法又は組成物は、ニッキングエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、天然に存在する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、突然変異又は操作され、例えば、二

10

20

30

40

50

本鎖切断を生じさせる酵素から誘導される。

【0182】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される組成物の使用を含み、又は本明細書に記載される組成物は、Nb. BsrDIを含む。いくつかの実施形態では、Nb. BsrDIは、ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) D70に由来するBsrDI制限遺伝子の大きいサブユニット、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Nb. BsrDIは、Genbank受託番号ABD15132.1(全体が参照により本明細書に組み込まれる)で表されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Nb. BsrDIは、それぞれ配列番号31及び32と示される以下の配列に示される部位において開裂する：

10

【化2】

```
5'...GCAATGNN...3'
3'...CGTTACNN...5'
```

いくつかの実施形態では、Nb. BsrDIを用いる消化反応が、rCutSmart(商標)Buffer(NEB)中で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、酢酸カリウム(例えば、50mM)、トリス酢酸塩(例えば、20mM)、酢酸マグネシウム(例えば、10mM)、又は組換えアルブミン(例えば、100μg/ml)のうちの1つ以上(例えば、全て)を含む緩衝液中で行われ、ここで、任意に、緩衝液は、25℃で測定されるとき、7.9のpHを有する。いくつかの実施形態では、消化反応は、30℃~70℃(例えば、約37℃又は約65℃)で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、10分間~3時間(例えば、約30分間又は約1時間)にわたって行われる。

20

【0183】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される組成物の使用を含み、又は本明細書に記載される組成物は、Nb. Bpu10Iを含む。いくつかの実施形態では、Nb. Bpu10Iは、野生型bpu10IRαによってコードされるアミノ酸配列又はバチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*) RFL10に由来する突然変異bpu10IRβ遺伝子、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Nb. Bpu10Iは、それぞれ配列番号33及び34と示される以下の配列に示される部位において開裂する：

30

【化3】

```
5' C C T N A G C 3'
3' G G A N T C G 5'
```

40

いくつかの実施形態では、Nb. Bpu10Iを用いる消化反応が、R Buffer(ThermoFisher Scientific)中で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、トリス-HCl(例えば、10mM)、MgCl₂(例えば、10mM)、KCl(例えば、100mM)、及びBSA(例えば、0.1mg/ml)のうちの1つ以上(例えば、全て)を含む緩衝液中で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、30℃~50℃(例えば、約37℃)で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、30分間~3時間(例えば、約1時間)にわたって行われる。

【0184】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される組成物

50

の使用を含み、又は本明細書に記載される組成物は、N t . B s p Q Iを含む。いくつかの実施形態では、N t . B s p Q Iは、B s p Q I制限酵素に由来する操作されたB s p Q I変異体、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、N t . B s p Q Iは、それぞれ配列番号35及び36と示される以下の配列に示される部位において開裂する：

【化4】

5'...GCTCTTCN^{*}...3'
3'...CGAGAAGN...5'

10

いくつかの実施形態では、N t . B s p Q Iを用いる消化反応が、N E B u f f e r（商標）r 3 . 1（N E B）中で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、N a C l（例えば、100mM）、トリス-H C l（例えば、50mM）、M g C l₂（例えば、10mM）、組換えアルブミン（例えば、100μg/mL）のうちの1つ以上（例えば、全て）を含む緩衝液中で行われ、ここで、任意に、緩衝液は、25℃で測定されるとき、7.9のpHを有する。いくつかの実施形態では、消化反応は、40℃～60℃（例えば、約50℃）で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、30分間～3時間（例えば、約1時間）にわたって行われる。

【0185】

20

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される組成物の使用を含み、又は本明細書に記載される組成物は、T 7エキソヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、T 7エキソヌクレアーゼを用いる消化反応が、N E B u f f e r（商標）4（N E B）中で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、酢酸カリウム（例えば、50mMで）、トリス酢酸塩（例えば、20mM）、酢酸マグネシウム（例えば、10mM）、又はD T T（例えば、1mM）のうちの1つ以上（例えば、全て）を含む緩衝液中で行われ、ここで、任意に、緩衝液は、25℃で測定されるとき、7.9のpHを有する。いくつかの実施形態では、消化反応は、20℃～50℃（例えば、約25℃又は約37℃）で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、15～120分間、例えば、20～60分間、例えば、約30分間にわたって行われる。

30

【0186】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される組成物の使用を含み、又は本明細書に記載される組成物は、T 5エキソヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、T 5エキソヌクレアーゼを用いる消化反応が、N E B u f f e r（商標）4（N E B）中で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、酢酸カリウム（例えば、50mMで）、トリス酢酸塩（例えば、20mM）、酢酸マグネシウム（例えば、10mM）、又はD T T（例えば、1mM）のうちの1つ以上（例えば、全て）を含む緩衝液中で行われ、ここで、任意に、緩衝液は、25℃で測定されるとき、7.9のpHを有する。いくつかの実施形態では、消化反応は、30℃～50℃（例えば、約37℃）で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、10分間～3時間（例えば、約30分間）にわたって行われる。

40

【0187】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される組成物の使用を含み、又は本明細書に記載される組成物は、エキソヌクレアーゼI I Iを含む。いくつかの実施形態では、エキソヌクレアーゼI I Iを用いる消化反応が、N E B u f f e r（商標）1（N E B）中で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、ビス-トリス-プロパン-H C l（例えば、10mM）、M g C l₂（例えば、10mM）、又はD T T（例えば、1mM）のうちの1つ以上（例えば、全て）を含む緩衝液中で行われ、ここで、任意に、緩衝液は、25℃で測定されるとき、7のpHを有する。いくつかの実施形態では、消化反応は、30℃～50℃（例えば、約37℃）で行われる。いくつかの

50

実施形態では、消化反応は、10分間～3時間（例えば、約30分間）にわたって行われる。

【0188】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される組成物の使用を含み、又は本明細書に記載される組成物は、ハイフィデリティDNAポリメラーゼ、例えば、Q5ハイフィデリティDNAポリメラーゼ（M0491L、New England Biolabs）を含む。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応が、ハイフィデリティDNAポリメラーゼを用いて行われる。いくつかの実施形態では、Q5ハイフィデリティDNAポリメラーゼを用いるポリメラーゼ連鎖反応は、Q5反応緩衝液（NEB）を用いて行われる。

10

【0189】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される組成物の使用を含み、又は本明細書に記載される組成物は、エキソヌクレアーゼIを含む。いくつかの実施形態では、エキソヌクレアーゼIは、大腸菌（E. coli）NM554に由来するExo I遺伝子のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、若しくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、エキソヌクレアーゼIは、（例えば、3'から5'の方向に）線状一本鎖DNAからのヌクレオチドの除去を触媒する。いくつかの実施形態では、エキソヌクレアーゼIを用いる消化反応が、エキソヌクレアーゼI反応緩衝液（NEB）中で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、グリシン-KOH（例えば、67mMで）、又はMgCl₂（例えば、6.7mMで）、β-ME（例えば、10mMで）のうちの1つ以上（例えば、全て）を含む緩衝液中で行われ、ここで、任意に、緩衝液は、25℃で測定されるとき、9.5のpHを有する。いくつかの実施形態では、消化反応は、30℃～50℃（例えば、約37℃）で行われる。いくつかの実施形態では、消化反応は、10分間～3時間（例えば、約30分間）にわたって行われる。いくつかの実施形態では、環状ssDNAは、エキソヌクレアーゼIによる分解に対して耐性がある。

20

【0190】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される環状化方法の環状化効率は、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又はそれ以上である。

30

【0191】

ssDNA又は環状の、例えば、共有結合的に閉環されたssDNAは、濃縮されるか、又は内毒素、モノヌクレオチド、修飾モノヌクレオチド、二本鎖DNA、線状DNA（環状産物のための）、タンパク質（例えば、酵素、例えば、リガーゼ、制限酵素）、DNA断片又は切断からなる群から選択される不純物又は副産物から精製され得る。いくつかの実施形態では、精製されたssDNAは、プロセス副産物及び不純物、例えば、本明細書に記載されるプロセス副産物又は不純物を実質的に含まない。

【0192】

ssDNA又は環状の、例えば、共有結合的に閉環されたssDNAは、所望の設計された配列を確認するために、シーケンシングされ得る。実施形態では、ssDNAの他の構造分析（例えば、制限酵素分析）が、その配列を確認又は検証するために行われ得る。

40

【0193】

純度

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるssDNAを含む組成物は、特定の純度を有する。例えば、いくつかの実施形態では、組成物中の全DNAの質量基準で少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、又は99%が、共有結合的に閉環されたssDNAであり得る。例として、組成物は、例えば、汚染物質として、線状DNA又は環状dsDNAも含み得る。

50

【0194】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組成物（例えば、環状ssDNAを含む組成物、例えば、環状ssDNAを含む医薬組成物又は環状ssDNAを含む製造中間体）は、例えば、この節に記載されるように、1つ以上の汚染物質を含まない又は実質的に含まない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法（例えば、環状ssDNAを作製する方法）は、例えば、この節に記載されるように、1つ以上の汚染物質を含まない又は実質的に含まない組成物をもたらす。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法（例えば、環状ssDNAを作製する方法）は、例えば、この節に記載されるように、1つ以上の汚染物質をアッセイする工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、バッチが、汚染物質を含まない又は実質的に含まない場合、バッチを承認又は発売することを含む。

10

【0195】

いくつかの実施形態では、汚染物質は、非ヒト動物血清（例えば、ウシ胎仔血清）；酵素、例えば、リガーゼ、ポリメラーゼ、若しくは消化酵素（例えば、トリプシン、コラゲナーゼ、DNase、RNase、エキソヌクレアーゼ、若しくはエンドヌクレアーゼ、例えば、制限エンドヌクレアーゼ）；増殖因子；サイトカイン；抗体（例えば、モノクローナル抗体）；ビーズ（例えば、抗体被覆ビーズ）；抗生物質；細胞培養培地；細胞培養培地の成分；洗浄剤；タンパク質、例えば、宿主細胞タンパク質；外来核酸配列（例えば、モノヌクレオチド（例えば、修飾モノヌクレオチド）、又はDNA断片若しくは切断；ヘルパーウイルス汚染物質（例えば、感染性ウイルス、ウイルスDNA、若しくはウイルスタンパク質）；又は溶媒；細胞残屑；細胞；発熱物質；真菌；又はそれらの任意の組み合わせ、又は上記のもののいずれかの部分を含む。いくつかの実施形態では、汚染物質は、製造プロセス中に導入された成分であった。

20

【0196】

いくつかの実施形態では、汚染物質は、伝達性海綿状脳症（TSE）用の薬剤を含む。いくつかの実施形態では、この汚染物質の検査が、ウシ由来物質が製造に使用された組成物において行われる。

【0197】

いくつかの実施形態では、汚染物質は、人畜共通ウイルス、ブタサーコウイルス1、ブタサーコウイルス2、若しくはブタパルボウイルス；又はそれらの任意の組み合わせ、又は上記のもののいずれかの部分を含む。いくつかの実施形態では、この汚染物質の検査が、非ヒト動物由来物質、例えば、ブタ由来物質が製造に使用された組成物において行われる。

30

【0198】

いくつかの実施形態では、汚染物質は、ウイルス又はその部分、例えば、ヒトウイルス；ヒト免疫不全ウイルス（HIV）；HIV-1；HIV-2；B型肝炎ウイルス（HBV）；C型肝炎ウイルス（HCV）；クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）を含むヒトTSE；変異体CJD（vCJD）；梅毒トレポネーマ（*Treponema pallidum*）（梅毒）；ヒトT-リンパ向性ウイルス（HTLV）、HTLV-1、HTLV-2；又はサイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス（例えば、-ヒトヘルペスウイルス-6、-7又は-8（HHV-6、-7及び-8））、JCウイルス、BKウイルス、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、ヒトパルボウイルスB19、ヒトパピローマウイルス（HPV）；アデノウイルス、例えば、アデノウイルスE1；SV40 Large T抗原配列；HPV E6又はE7 DNA；又はそれらの任意の組み合わせ、又は上記のもののいずれかの部分を含む。いくつかの実施形態では、この汚染物質の検査が、ヒトドナー細胞（例えば、白血球リッチ細胞）が製造に使用された組成物において行われる。いくつかの実施形態では、この汚染物質の検査が、細胞バンクにおいて行われる。

40

【0199】

いくつかの実施形態では、汚染物質は、微生物又はその部分；細菌（例えば、グラム陰

50

性菌) ; マイコプラズマ ; スピロプラズマ (例えば、昆虫細胞が使用される場合) ; 細菌毒素 (例えば、内毒素) ; 又は不定因子 (adventitious agent)、例えば、不定ウイルス性因子又は非ウイルス性不定因子、又はそれらの任意の組み合わせ、又は上記のもののいずれかの部分を含む。いくつかの実施形態では、汚染物質は、シミアンウイルス、例えば、シミアンポリオーマウイルスSV40又はシミアンレトロウイルス、又はそれらの任意の組み合わせ、又は上記のもののいずれかの部分を含む。いくつかの実施形態では、汚染物質は、アルボウイルスを含む。いくつかの実施形態では、汚染物質は、バクテリオファージを含む。いくつかの実施形態では、この汚染物質の検査が、細胞バンク、例えば、細菌細胞の細胞バンクにおいて行われる。

【0200】

いくつかの実施形態では、汚染物質は、宿主細胞に由来するDNAを含み、例えば、ここで、宿主細胞は、非発癌性細胞である。いくつかの実施形態では、DNAは、10ng未満/投与のレベルで存在する。いくつかの実施形態では、DNAサイズは、約200ヌクレオチド長未満である。

【0201】

いくつかの実施形態では、汚染物質は、内毒素である。いくつかの実施形態では、内毒素のレベルは、5内毒素単位(EU)未満/kg体重/時であり、例えば、組成物は、経口投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、内毒素のレベルは、0.2EU未満/kg体重/時であり、例えば、組成物は、髄腔内投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、内毒素のレベルは、2.0EU以下/投与/眼であり、例えば、組成物は、眼内への注射若しくは注入用に製剤化され、又は0.5EU以下/mLであり、例えば、組成物は、眼内投与用に製剤化される。

【0202】

いくつかの実施形態では、汚染物質は、有機溶媒、例えば、芳香族有機溶媒、例えば、フェノール又はクロロホルムを含む。

【0203】

いくつかの実施形態では、汚染物質は、全体が参照により本明細書に組み込まれる、Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) – Guidance for Industry (アメリカ合衆国保健福祉省 (U.S. Department of Health and Human Services)、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration)、生物製品評価研究センター (Center for Biologics Evaluation and Research)、January 2020) に記載される汚染物質である。

【0204】

いくつかの実施形態では、組成物は、ポリメラーゼを実質的に含まない (例えば、含まない)。いくつかの実施形態では、組成物は、ローリングサークル増幅を行うポリメラーゼを実質的に含まない (例えば、含まない)。いくつかの実施形態では、組成物は、LNPを実質的に含まない (例えば、含まない)。いくつかの実施形態では、組成物は、ナノ粒子を実質的に含まない (例えば、含まない)。

【0205】

いくつかの実施形態では、組成物は、アガロースを実質的に含まない (例えば、含まない)。いくつかの実施形態では、組成物は、アクリルアミドを実質的に含まない (例えば、含まない)。

【0206】

いくつかの実施形態では、組成物は、ポリペプチドを実質的に含まない (例えば、含まない)。

【0207】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、組成物中の共有結合的に閉環されたssDNAの分子の、他のDNA分子に対する数の比率は、少なくとも10:1、20:1、50:1、80:1、90:1、100:1、200:1、500:1、又は1000:1である。いくつかの実施形態では、組成物は、宿主細胞に由来するDNAを実質的に含まず、例えば、DNAは、10ng未満／投与のレベルで存在する。いくつかの実施形態では、組成物は、約200ヌクレオチド長未満のサイズを有するDNAを実質的に含まない。いくつかの実施形態では、組成物は、個別のヌクレオチドを実質的に含まない。いくつかの実施形態では、組成物中のdsDNAに対する共有結合的に閉環されたssDNAの比率は、少なくとも100:1、200:1、500:1、又は1000:1である。いくつかの実施形態では、組成物中の、質量基準で（又はコピー数基準で）少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、又は99%のDNAが完全長である。

10

【0208】

医薬組成物

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

【0209】

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

【0210】

本明細書に記載されるssDNA又は構築物は、担体なしで製剤化され得、例えば、本明細書に記載されるssDNA又は構築物は、「裸で」宿主細胞、組織又は対象に投与され得る。裸の製剤は、医薬賦形剤又は希釈剤を含み得るが、担体を欠いている。

20

【0211】

薬学的に許容される賦形剤又は希釈剤は、米国食品医薬品局（United States Food and Drug Administration）（FDA）によって承認され、参照により本明細書に組み込まれる不活性成分データベースに列挙される有効成分のいずれか1つなどの、本明細書に記載される組成物のためのビヒクル又は媒体として働く不活性物質を含み得る。薬学的に許容される賦形剤又は希釈剤の非限定的な例としては、溶媒、水性溶媒、非水性溶媒、等張化剤、分散媒、抗凍結剤、希釈剤、懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤、乳化剤、保存料、ヒアルロニダーゼ、分散剤、保存料、滑沢剤、造粒剤、崩壊剤、結合剤、酸化防止剤、緩衝剤（例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS））、潤滑剤、油、及びそれらの混合物が挙げられる。

30

【0212】

医薬品の製剤化及び／又は製造における一般的な考慮事項が、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005（参照により本明細書に組み込まれる）に見出され得る。

【0213】

担体

本明細書に記載されるssDNA又は構築物はまた、担体とともに製剤化され、又は含まれ得る。担体及び医薬品の送達の一般的な考慮事項が、例えば、Delivery Technologies for Biopharmaceuticals: Peptides, Proteins, Nucleic Acids and Vaccines (Lene Jorgensen and Hanne Morck Nielson, Eds.) Wiley; 1st edition (December 21, 2009); 及びVargason et al. 2021. Nat Biomed Eng 5, 951-967に見出され得る。

40

【0214】

担体の非限定的な例としては、炭水化物担体（例えば、無水物修飾フィトグリコーゲン

50

又はグリコーゲンタイプ材料、GalNAc)、ナノ粒子(例えば、ssDNA、金ナノ粒子、シリカナノ粒子を封入するか又はそれらに共有結合的に連結されるナノ粒子)、脂質粒子(例えば、リポソーム、脂質ナノ粒子)、カチオン性担体(例えば、カチオン性リポポリマー又はトランスフェクション試薬)、フソソーム、非有核細胞(例えば、エキスピボで分化した網状赤血球)、有核細胞、エキソソーム、タンパク質担体(例えば、ssDNAに共有結合的に連結されるタンパク質)、ペプチド(例えば、細胞透過性ペプチド)、材料(例えば、酸化グラフェン)、単一の純粋な脂質(例えば、コレステロール)、DNAオリガミ(例えば、DNAテトラヘドロン)が挙げられる。

【0215】

一実施形態では、本明細書に記載されるssDNA組成物、構築物及びシステムは、リポソーム又は他の同様のベシクル中で製剤化され得る。リポソームは、内部水性区画の周囲にある単層又は多層状脂質二重層及び相対的に不透過性の外側の親油性リン脂質二重層で構成される球状小胞構造である。リポソームは、アニオン性、中性又はカチオン性であり得る。リポソームは、生体適合性、無毒性であり、親水性及び親油性薬物分子の両方を送達することができ、それらの積荷を血漿酵素によって分解から保護することができ、且つ生体膜及び血液脳関門(BBB)を通して積荷を輸送できる(例えば、概説については Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, 記事ID 469679, 12ページ, 2011. doi: 10.1155/2011/469679を参照のこと)。

【0216】

小胞は、いくつかの異なる型の脂質から作られ得るが;リン脂質が、薬物担体としてのリポソームを生成するために最も一般的に使用される。多層状小胞脂質の調製のための方法は、当該技術分野で知られている(例えば、多層状小胞脂質の調製に関する教示が、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,693,086号明細書を参照されたい)。小胞形成は、脂質フィルムが水溶液と混合されるときに自然に起こり得るが、それはまた、ホモジナイザー、ソニケーター、又は押し出し装置を使用することによる振盪の形態で力がかかることによって促進され得る(例えば、概説に関しては Spuch and Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, 記事ID 469679, 12ページ, 2011. doi: 10.1155/2011/469679を参照のこと)。押し出された脂質は、押し出された脂質の調製に関する教示が、参照により本明細書に組み込まれる Templeton et al., Nature Biotech, 15:647-652, 1997において記載されるとおり、サイズを低減するフィルタに通して押し出すことによって調製され得る。

【0217】

エキソソームも、本明細書に記載される組成物及びシステムのための薬物送達ビヒクルとして使用され得る。概説に関して、Ha et al. July 2016. Acta Pharmaceutica Sinica B. Volume 6, Issue 4, Pages 287-296; https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001を参照されたい。

【0218】

エキスピボで分化した赤血球もまた、本明細書に記載される薬剤(例えば、ssDNA)のための担体として使用され得る。例えば、国際公開第2015073587号パンフレット;国際公開第2017123646号パンフレット;国際公開第2017123644号パンフレット;国際公開第2018102740号パンフレット;国際公開第2016183482号パンフレット;国際公開第2015153102号パンフレット;国際公開第2018151829号パンフレット;国際公開第2018009838号パンフレット;Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28):10131-10136;米国特許第9,644,180号明細書;Huang et al. 2017. Nature Communications 8:423;Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci

USA. 111 (28) : 10131-10136を参照されたい。

【0219】

例えば、国際公開第2018208728号パンフレットに記載されるとおりのフソソーム組成物もまた、本明細書に記載されるssDNAを送達する担体として使用され得る。

【0220】

脂質ナノ粒子：

脂質ナノ粒子(LNP)は、イオン化可能な脂質で作製される担体である。LNPは、エンドサイトーシスを介して細胞によって取り込まれ、それらの特性は、エンドソーム脱出を可能にし、これは、標的細胞の細胞質内へのカーゴの放出を可能にする。イオン化可能な脂質に加えて、LNPは、細胞結合を促進するヘルパー脂質、脂質間の隙間を埋めるコレステロール、並びに／又は血清タンパク質によるオプソニン化及び網内系クリアランスを低減するポリエチレングリコール(PEG)を含有し得る。脂質ナノ粒子は、いくつかの実施形態では、1つ以上のイオン性脂質、例えば、非カチオン性脂質(例えば、中性又はアニオン性、若しくは両性脂質)；1つ以上のコンジュゲート脂質(PEGコンジュゲート脂質又は全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2019217941号パンフレットの表5に記載されるポリマーにコンジュゲートされた脂質など)；1つ以上のステロール(例えば、コレステロール)；及び、任意に、1つ以上の標的化分子(例えば、コンジュゲート受容体、受容体リガンド、抗体)；又は上記のものの組み合わせを含む。

10

20

【0221】

ナノ粒子製剤(例えば、脂質ナノ粒子)に使用され得る脂質としては、例えば、国際公開第2019217941号パンフレット(参照により組み込まれる)の表4に記載されるものが挙げられ、例えば、脂質含有ナノ粒子は、国際公開第2019217941号パンフレットの表4における脂質の1つ以上を含み得る。脂質ナノ粒子は、追加の要素、例えば、国際公開第2019217941号パンフレット(参照により組み込まれる)の表5に記載されるポリマーなどのポリマーを含み得る。

【0222】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート脂質が、存在する場合、PEG-ジアシルグリセロール(DAG)(1-(モノメトキシポリエチレングリコール)-2,3-ジミリストイルグリセロール(PEG-DMG)など)、PEG-ジアルキルオキシプロピル(DAA)、PEG-リン脂質、PEG-セラミド(Cer)、PEG化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)、PEGコハク酸ジアシルグリセロール(PEGs-DAG)(4-0-(2',3'-ジ(テトラデカノイルオキシ)プロピル)-1-0-(w-メトキシ(ポリエトキシ)エチル)ブタンジオエート(PEG-S-DMG)など)、PEGジアルコキシプロピルカルバム、N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、及び国際公開第2019051289号パンフレット、dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386(参照により組み込まれる)の表2に記載されるもの、並びに上記の組み合わせのうちの1つ以上を含み得る。

30

40

【0223】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子に組み込まれ得るステロールとしては、国際公開第2009/127060号パンフレット又は米国特許出願公開第2010/0130588号明細書(参照により組み込まれる)に記載されるものなどのコレステロール又はコレステロール誘導体の1つ以上が挙げられる。追加の例示的なステロールとしては、Eygeriset al(2020)(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるものを含む植物ステロールが挙げられる。

【0224】

いくつかの実施形態では、脂質粒子は、イオン化性脂質、非カチオン性脂質、粒子の凝

50

集を阻害するコンジュゲート脂質、及びステロールを含む。これらの成分の量は、独立して、及び所望の特性を達成するために変化され得る。例えば、いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、総脂質の約20mol%～約90mol%（他の実施形態では、それは、20～70%（mol）、30～60%（mol）又は40～50%（mol）；脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の約50mol%～約90mol%であり得る）の量のイオン化性脂質、総脂質の約5mol%～約30mol%の量の非カチオン性脂質、総脂質の約0.5mol%～約20mol%の量のコンジュゲート脂質、及び総脂質の約20mol%～約50mol%の量のステロールを含む。総脂質対核酸の比率は、必要に応じて変化され得る。例えば、総脂質対核酸（質量又は重量）比は、約10：1～約30：1であり得る。

10

【0225】

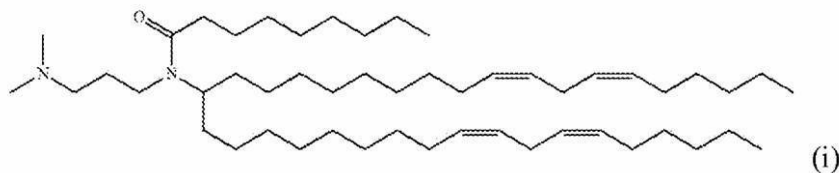
いくつかの実施形態では、脂質対核酸比（質量／質量比；w／w比）は、約1：1～約25：1、約10：1～約14：1、約3：1～約15：1、約4：1～約10：1、約5：1～約9：1、又は約6：1～約9：1の範囲内であり得る。脂質及び核酸の量は、所望のN／P比、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれ以上のN／P比を得るように調整され得る。一般に、脂質ナノ粒子製剤の全脂質含量は、約5mg／mL～約30mg／mLの範囲であり得る。

【0226】

本明細書に記載される組成物、例えば、本明細書に記載される核酸（例えば、RNA）の送達のための脂質ナノ粒子を形成するために（例えば、他の脂質成分と組み合わせて）使用され得る脂質化合物のいくつかの非限定的な例としては、

20

【化5】



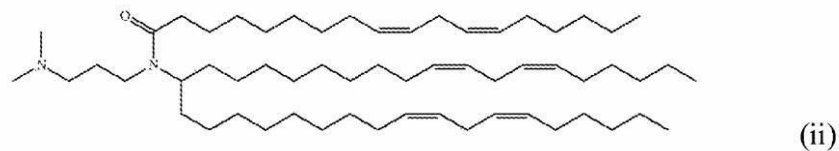
が挙げられ、

【0227】

いくつかの実施形態では、式（i）を含むLNPが、本明細書に記載されるDNA組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

30

【化6】

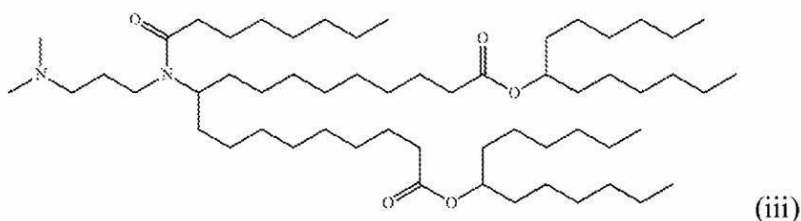


【0228】

いくつかの実施形態では、式（ii）を含むLNPが、本明細書に記載されるDNA組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

40

【化7】

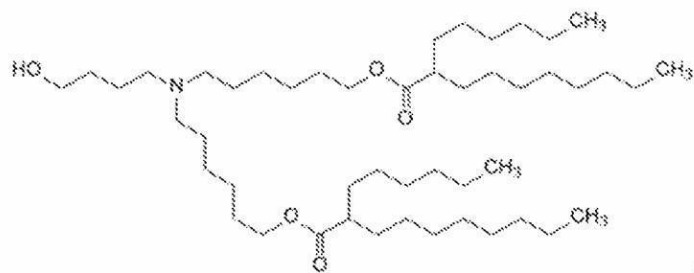


50

【 0 2 2 9 】

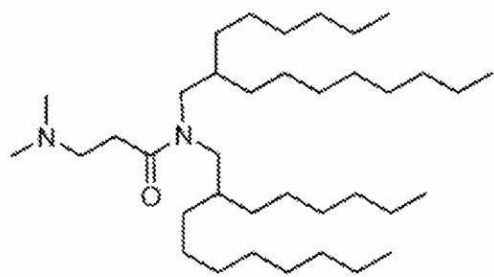
いくつかの実施形態では、式 (i i i) を含む L N P が、本明細書に記載される D N A 組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【 化 8 】



(iv)

10



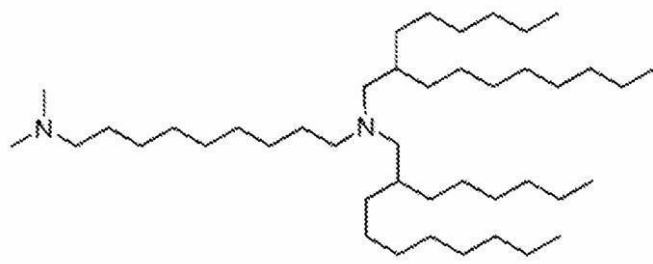
(v)

20

【 0 2 3 0 】

いくつかの実施形態では、式 (v) を含む L N P が、本明細書に記載される D N A 組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【 化 9 】



(vi)

30

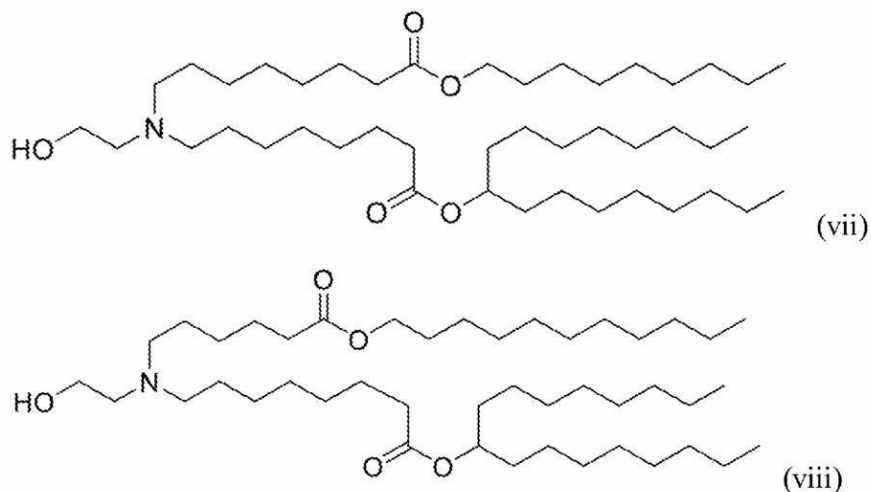
【 0 2 3 1 】

いくつかの実施形態では、式 (v i) を含む L N P が、本明細書に記載される D N A 組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

40

50

【化 1 0】

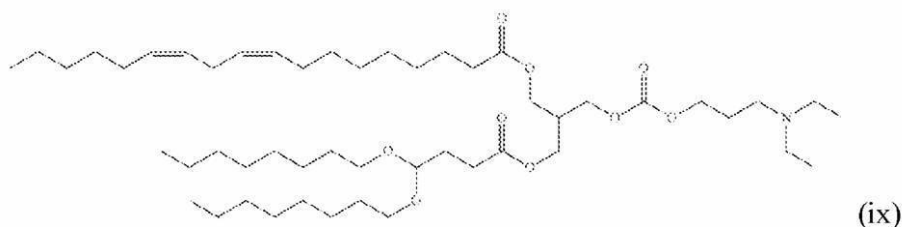


10

【 0 2 3 2】

いくつかの実施形態では、式 v i i 又は (v i i i) を含む L N P が、本明細書に記載される D N A 組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【化 1 1】



20

【 0 2 3 3】

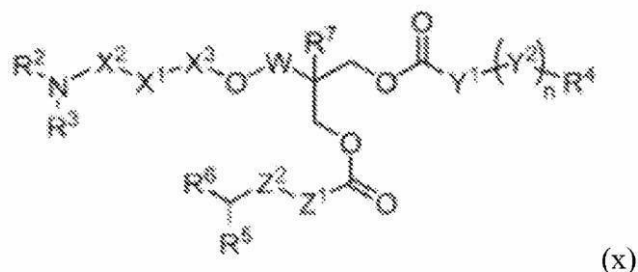
いくつかの実施形態では、式 (i x) を含む L N P が、本明細書に記載される D N A 組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

30

【 0 2 3 4】

いくつかの実施形態では、式 (x) を含む L N P が、本明細書に記載される D N A 組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される：

【化 1 2】



40

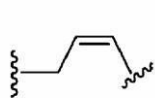
式中、

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

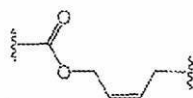
50

一緒になって、5員、6員、若しくは7員環を形成し、 Y^1 が、C2～12アルキレンであり、 Y^2 が、

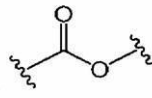
【化13】



(いずれかの配向で)、



(いずれかの配向で)、



(いずれかの配向で)

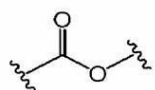
から選択され、

n が、0～3であり、 R^4 が、C1～15アルキルであり、 Z^1 が、C1～6アルキレン又は直接結合であり、

10

Z^2 が、

【化14】

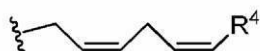


(いずれかの配向で)であるか又は非存在であり、ただし、 Z^1 が直接結合であり、 Z^2 が非存在である場合；

20

R^5 が、C5～9アルキル又はC6～10アルコキシであり、 R^6 が、C5～9アルキル又はC6～10アルコキシであり、 W が、メチレン又は直接結合であり、 R^7 が、H又はMe、又はその塩であり、ただし、 R^3 及び R^2 が、C2アルキルであり、 X^1 がOであり、 X^2 が、直鎖状C3アルキレンであり、 X^3 がC(=O)であり、 Y^1 が、直鎖状C e アルキレンであり、 $(Y^2)_n - R^4$ が、

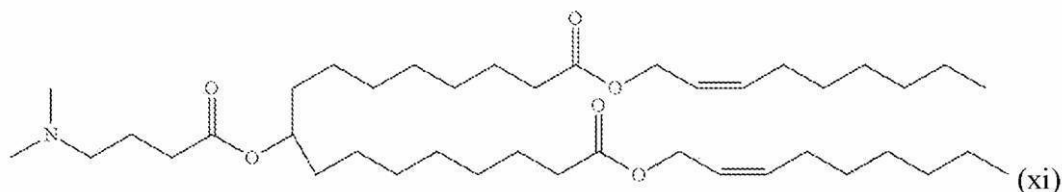
【化15】



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

30

【化16】



40

【0235】

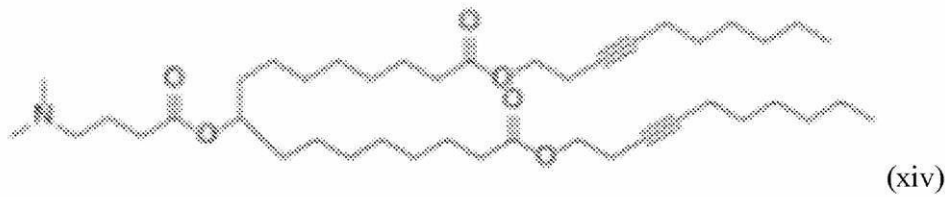
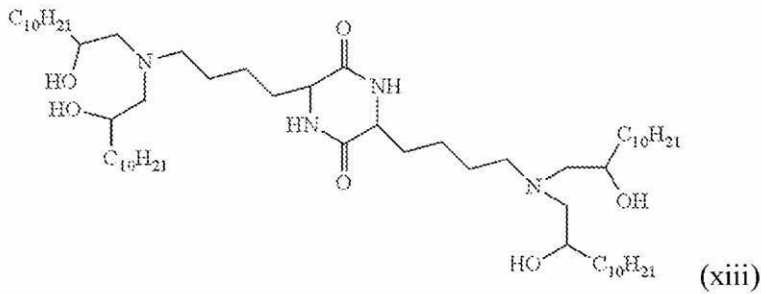
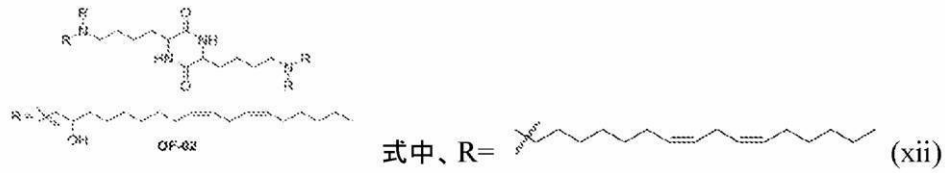
いくつかの実施形態では、式(x i)を含むLNPが、本明細書に記載されるDNA組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【0236】

いくつかの実施形態では、式(x i i)を含むLNPが、本明細書に記載されるDNA組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

50

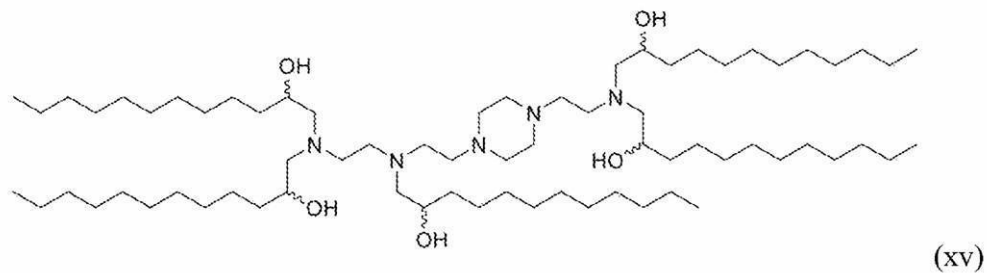
【化 1 7】



【 0 2 3 7】

いくつかの実施形態では、LNPは、式 (x i i i) の化合物及び式 (x i v) の化合物を含む。

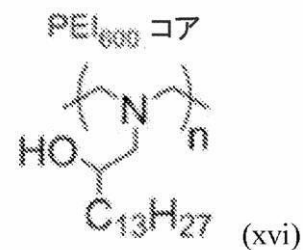
【化 1 8】



【 0 2 3 8】

いくつかの実施形態では、式 (x v) を含む LNP が、本明細書に記載される DNA 組成物を、肝臓及び／又は肝細胞に送達するのに使用される。

【化 1 9】



【 0 2 3 9】

いくつかの実施形態では、式 (x v i) の配合物を含む LNP が、本明細書に記載され

10

20

30

40

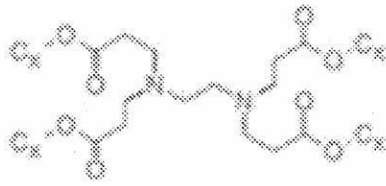
50

るDNA組成物を、肺内皮細胞に送達するのに使用される。

【0240】

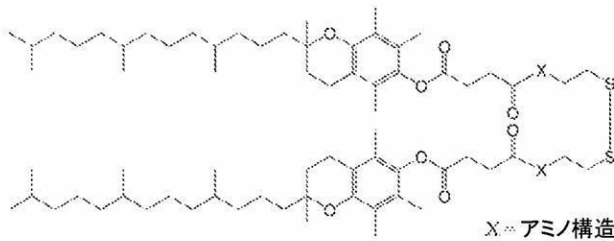
いくつかの実施形態では、式(xvii)、xviii又はxixの配合物を含むLNPが、本明細書に記載されるDNA組成物を、肺内皮細胞に送達するのに使用される。

【化20】



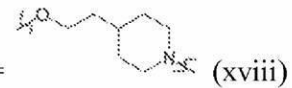
(xvii)

10



X-アミノ構造

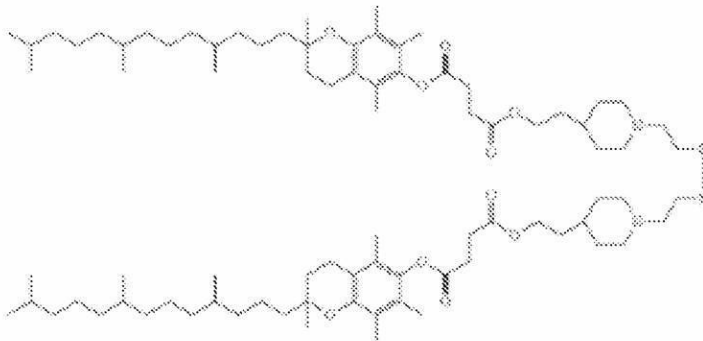
式中、X=



(xviii)

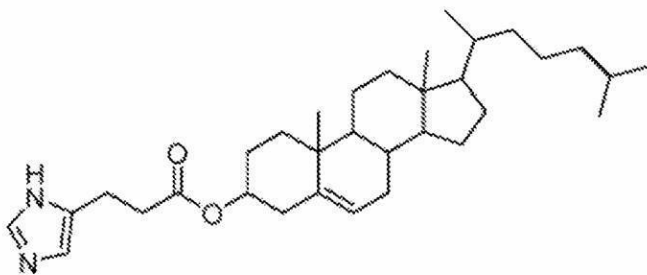
(a)

20



(xviii)(b)

30



(xix)

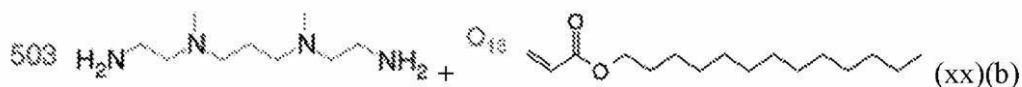
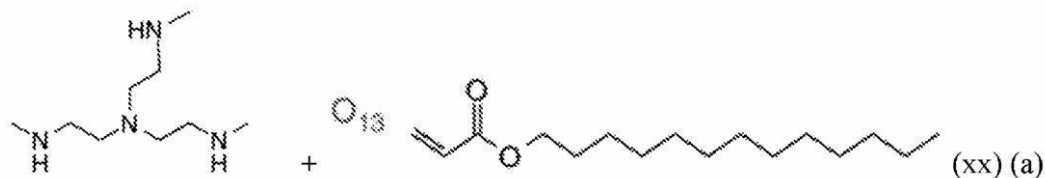
【0241】

40

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

50

【化 2 1】



10

【0 2 4 2】

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

20

30

【0 2 4 3】

いくつかの実施形態では、イオン化性脂質は、カチオン性脂質、イオン化性カチオン性脂質、例えば、pHに応じて正荷電若しくは中性形態で存在し得るカチオン性脂質、又は容易にプロトン化され得るアミン含有脂質であり得る。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、例えば、生理的条件下で、正に荷電することが可能である脂質である。例示的なカチオン性脂質は、正電荷を有する1つ以上のアミン基を含む。いくつかの実施形態では、脂質粒子は、中性脂質、イオン化性アミン含有脂質、生分解性アルキン脂質、ステロイド、多価不飽和脂質を含むリン脂質、構造脂質（例えば、ステロール）、PEG、コレステロール及びポリマーコンジュゲート脂質のうちの1つ以上との配合物中のカチオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、イオン化性カチオン性脂質であり得る。本明細書で開示される例示的なカチオン性脂質は、6.0を超える有効pKaを有し得る。実施形態において、脂質ナノ粒子は、第1のカチオン性脂質と異なる有効

40

50

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

10

【0244】

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

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

【0245】

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

【0246】

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

ーオージメチルPEなど)、18-*l*-trans PE、1-ステアロイル-2-オレ
オイル-ホスファチジルエタノールアミン(SOPE)、水素化大豆ホスファチジルコリ
ン(HSPC)、卵ホスファチジルコリン(EPC)、ジオレオイルホスファチジルセリ
ン(DOPS)、スフィンゴミエリン(SM)、ジミリストイルホスファチジルコリン(
DMPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)、ジステアロイル
ホスファチジルグリセロール(DSPG)、ジェルコイルホスファチジルコリン(DEP
C)、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール(POPG)、ジェライドイ
ル-ホスファチジルエタノールアミン(DEPE)、レシチン、ホスファチジルエタノ
ールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン
、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン(ESM)
、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジセチルホスフェ
ート、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、又はそれらの混
合物が挙げられる。他のジアシルホスファチジルコリン及びジアシルホスファチジルエタ
ノールアミンリン脂質も使用され得ることが理解される。これらの脂質中のアシル基は、
好ましくは、C10~C24炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基、例えば、ラウロ
イル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、又はオレオイルである。追加の例示
的な脂質としては、特定の実施形態では、限定はされないが、Kim et al. (2
020) dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01
386 (参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるものが挙げられる。このよう
な脂質としては、いくつかの実施形態では、mRNA (例えば、DGT S) との肝臓トラ
ンスフェクションを改善することが分かっている植物脂質が挙げられる。

10

20

【0247】

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

30

【0248】

いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、オレイン酸又は米国特許出願公開第2
018/0028664号明細書(全体が参照により本明細書に組み込まれる)の式I、
II、若しくはIVの化合物である。非カチオン性脂質は、例えば、脂質ナノ粒子中に存
在する総脂質の0~30%(mol)を占め得る。いくつかの実施形態では、非カチオン
性脂質含量は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の5~20%(mol)又は10~15
%(mol)である。実施形態において、イオン化性脂質対中性脂質のモル比は、約2:
1~約8:1の範囲(例えば、約2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、又
は8:1)である。

40

【0249】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、いずれのリン脂質も含まない。

【0250】

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

50

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

【0251】

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

10

【0252】

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

20

【0253】

例示的なPEG-脂質コンジュゲートとしては、限定はされないが、PEG-ジアシルグリセロール（DAG）（1-（モノメトキシポリエチレングリコール）-2,3-ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG）など）、PEG-ジアルキルオキシプロピル（DAA）、PEG-リン脂質、PEG-セラミド（Cer）、peg化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）、PEGコハク酸ジアシルグリセロール（PEG-S-DAG）（4-0-（2',3'-ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル）-1-0-（w-メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（PEG-S-DMG）など）、PEGジアルコキシプロピルカルバム、N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール2000）-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、又はそれらの混合物が挙げられる。追加の例示的なPEG-脂質コンジュゲートが、例えば、米国特許第5,885,613号明細書、米国特許第6,287,591号明細書、米国特許出願公開第2003/0077829号明細書、米国特許出願公開第2003/0077829号明細書、米国特許出願公開第2005/0175682号明細書、米国特許出願公開第2008/0020058号明細書、米国特許出願公開第2011/0117125号明細書、米国特許出願公開第2010/0130588号明細書、米国特許出願公開第2016/0376224号明細書、米国特許出願公開第2017/0119904号明細書、及び米国特許出願第099823号明細書（これらは全て、全内容が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、米国特許出願公開第2018/0028664号明細書（全内容が参照により本明細書に組み込まれる）の式III、III-a-1、III-a-2、III-b-1、III-b-2、又はVの化合物である。いくつかの実施形態では、PEG-脂質は、米国特許出願公開第20150376115号明細書又は米国特許出願公開第2016/0376224号明細書（これらは両方とも、全内容が参照により本明細書に組み込まれる）の式IIのものである。いくつかの実施形態では、PEG-DAAコンジュゲートは、例えば、PEG-ジラウリルオキシプロピル、PEG-ジミリスチルオキシプロピル、PEG-ジパルミチルオキシプロピル、又はPEG-ジステアリルオキシプロピルであり得る。PEG-脂質は、PEG-DMG、PEG-ジラウリルグリセロール、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステリルグリセロール、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリ

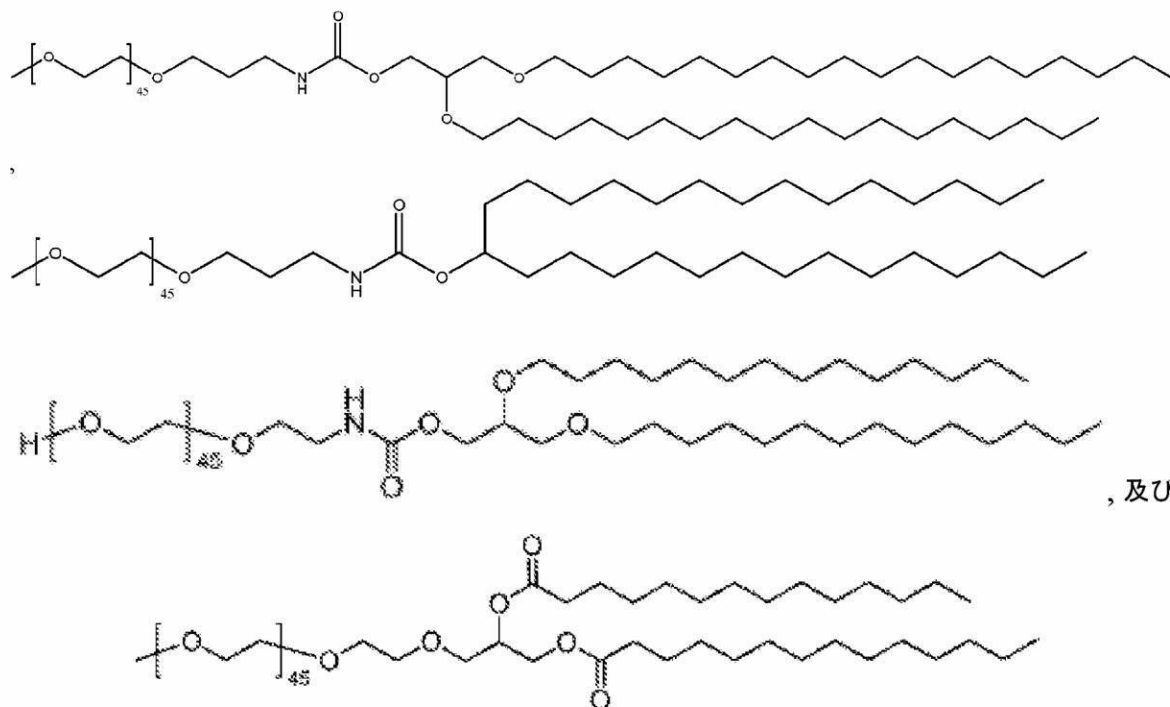
30

40

50

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

【化22】



から選択される構造を含む。

【0254】

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

【0255】

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

【0256】

いくつかの実施形態では、PEG又はコンジュゲート脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の0～20%（mol）を占め得る。いくつかの実施形態では、PEG又はコンジュゲート脂質含量は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の0.5～10%又は2～5%（mol）である。イオン化性脂質、非カチオン性脂質、ステロール、及びPEG/コンジュゲート脂質のモル比は、必要に応じて変化され得る。例えば、脂質粒子は、組成物のモル又は総重量当たり30～70%のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり0～60%のコレステロール、組成物のモル又は総重量当たり0～30%の非カチオン性脂

質及び組成物のモル又は総重量当たり1～10%のコンジュゲート脂質を含み得る。好ましくは、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり30～40%のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり40～50%のコレステロール、及び組成物のモル又は総重量当たり10～20%の非カチオン性脂質を含む。いくつかの他の実施形態では、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり50～75%のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり20～40%のコレステロール、及び組成物のモル又は総重量当たり5～10%の非カチオン性脂質及び組成物のモル又は総重量当たり1～10%のコンジュゲート脂質である。組成物は、組成物のモル又は総重量当たり60～70%のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり25～35%のコレステロール、及び組成物のモル又は総重量当たり5～10%の非カチオン性脂質を含有し得る。組成物はまた、組成物のモル又は総重量当たり最大で90%のイオン化性脂質及び組成物のモル又は総重量当たり2～15%の非カチオン性脂質を含有し得る。製剤はまた、例えば、組成物のモル又は総重量当たり8～30%のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり5～30%の非カチオン性脂質、及び組成物のモル又は総重量当たり0～20%のコレステロール；組成物のモル又は総重量当たり4～25%のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり4～25%の非カチオン性脂質、組成物のモル又は総重量当たり2～25%のコレステロール、組成物のモル又は総重量当たり10～35%のコンジュゲート脂質、及び組成物のモル又は総重量当たり5%のコレステロール；又は組成物のモル又は総重量当たり2～30%のイオン化性脂質、組成物のモル又は総重量当たり2～30%の非カチオン性脂質、組成物のモル又は総重量当たり1～15%のコレステロール、組成物のモル又は総重量当たり2～35%のコンジュゲート脂質、及び組成物のモル又は総重量当たり1～20%のコレステロール；或いは組成物のモル又は総重量当たり最大で90%のイオン化性脂質及び組成物のモル又は総重量当たり2～10%の非カチオン性脂質、或いは組成物のモル又は総重量当たり100%のカチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子製剤であり得る。いくつかの実施形態では、脂質粒子製剤は、50：10：38.5：1.5のモル比で、イオン化性脂質、リン脂質、コレステロール及びPEG化脂質を含む。いくつかの他の実施形態では、脂質粒子製剤は、60：38.5：1.5のモル比で、イオン化性脂質、コレステロール及びPEG化脂質を含む。

10

20

【0257】

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

30

【0258】

いくつかの実施形態では、脂質粒子は、50：10：38.5：1.5のモル比で、イオン化性脂質／非カチオン性脂質／ステロール／コンジュゲート脂質を含む。

【0259】

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

40

【0260】

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

50

【0261】

いくつかの実施形態では、LNPは、標的化ドメインの付加によって特定の組織に指向される。例えば、生物学的リガンドが、LNPの表面に提示されて、同族受容体を提示する細胞との相互作用を促進し、それによって、受容体との結合及び細胞が受容体を発現する組織へのカーゴ送達を駆動し得る。いくつかの実施形態では、生物学的リガンドは、肝臓への送達を駆動するリガンドであり得、例えば、GalNAcを提示するLNPは、アジア糖タンパク質受容体(ASGPR)を提示する肝細胞への核酸カーゴの送達をもたらす。Akinc et al. Mol Ther 18(7):1357-1364(2010)の論文は、観察可能なLNPカーゴ効果(例えば、上記のAkinc et al. 2010の図6を参照)についてASGPRに依存的なLNPを得るための、PEG-脂質に対する3価GalNAcリガンドのコンジュゲーション(GalNAc-PEG-DSG)を教示している。例えば、葉酸塩、トランスフェリン、又は抗体を組み込む他のリガンド提示LNP製剤は、国際公開第2017223135号パンフレット(全体が参照により本明細書に組み込まれる)、さらには、その中に使用される参考文献、すなわち、Kolhatkar et al., Curr Drug Discov Technol. 2011 8:197-206; Musacchio and Torchilin, Front Biosci. 2011 16:1388-1412; Yu et al., Mol Membr Biol. 2010 27:286-298; Patil et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2008 25:1-61; Benoit et al., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Zhao et al., Expert Opin Drug Deliv. 2008 5:309-319; Akinc et al., Mol Ther. 2010 18:1357-1364; Srinivasan et al., Methods Mol Biol. 2012 820:105-116; Ben-Arie et al., Methods Mol Biol. 2012 757:497-507; Peer 2010 J Control Release. 20:63-68; Peer et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 104:4095-4100; Kim et al., Methods Mol Biol. 2011 721:339-353; Subramanya et al., Mol Ther. 2010 18:2028-2037; Song et al., Nat Biotechnol. 2005 23:709-717; Peer et al., Science. 2008 319:627-630; 及びPeer及びLieberman, Gene Ther. 2011 18:1127-1133に記載される。

【0262】

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

【0263】

いくつかの実施形態では、LNPは、生分解性、イオン化性脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、(9Z, 12Z)-3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート(3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-

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

【0264】

いくつかの実施形態では、LNP製剤の平均LNP直径は、例えば、動的光散乱(DLS)によって測定される、数10nm~数100nmであり得る。いくつかの実施形態では、LNP製剤の平均LNP直径は、約40nm~約150nm、例えば、約40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm、又は150nmであり得る。いくつかの実施形態では、LNP製剤の平均LNP直径は、約50nm~約100nm、約50nm~約90nm、約50nm~約80nm、約50nm~約70nm、約50nm~約60nm、約60nm~約100nm、約60nm~約90nm、約60nm~約80nm、約60nm~約70nm、約70nm~約100nm、約70nm~約90nm、約70nm~約80nm、約80nm~約100nm、約80nm~約90nm、又は約90nm~約100nmであり得る。いくつかの実施形態では、LNP製剤の平均LNP直径は、約70nm~約100nmであり得る。特定の実施形態では、LNP製剤の平均LNP直径は、約80nmであり得る。いくつかの実施形態では、LNP製剤の平均LNP直径は、約100nmであり得る。いくつかの実施形態では、LNP製剤の平均LNP直径は、約1mm~約500mm、約5mm~約200mm、約10mm~約100mm、約20mm~約80mm、約25mm~約60mm、約30mm~約55mm、約35mm~約50mm、又は約38mm~約42mmの範囲である。

【0265】

LNPは、ある場合には、比較的均質であり得る。多分散指数は、LNPの均質性、例えば、脂質ナノ粒子の粒度分布を示すのに使用され得る。小さい(例えば、0.3未満の)多分散指数は、一般に、狭い粒度分布を示す。LNPは、約0~約0.25、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、又は0.25の多分散指数を有し得る。いくつかの実施形態では、LNPの多分散指数は、約0.10~約0.20であり得る。

【0266】

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

【0267】

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

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

10

【0268】

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

【0269】

LNPの追加の例示的な脂質、製剤、方法、及び特性評価が、国際公開第2020061457号パンフレット（全体が参照により本明細書に組み込まれる）によって教示される。Hou et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nat Rev Mater (2021). <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>も参照されたい。

20

【0270】

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

30

【0271】

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

【0272】

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

40

【0273】

LNPとともに本明細書に記載されるDNAの例示的な投与量は、約0.1、0.25、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、又は100mg/kg (DNA) を含み得る。

【0274】

以下の実施形態が考えられる：

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

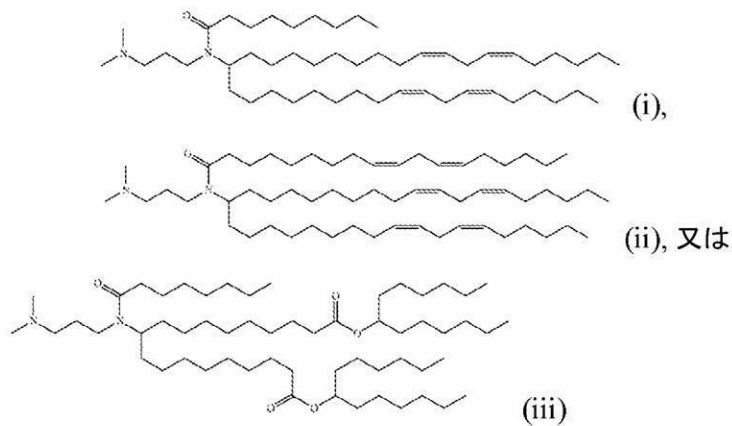
50

N P)。

B．カチオン性脂質を含む、実施形態 A に記載の L N P。

C．カチオン性脂質が、

【化 2 3】



10

で表される構造を有する、実施形態 B に記載の L N P。

D．1つ以上の中性脂質、例えば、D S P C、D P P C、D M P C、D O P C、P O P C、D O P E、S M、ステロイド、例えば、コレステロール、及び／又は1つ以上のポリマーコンジュゲート脂質、例えば、PEG化脂質、例えば、P E G - D A G、P E G - P E、P E G - S - D A G、P E G - c e r 又は P E G ジアルキルオキシプロピルカルバメート

20

をさらに含む、実施形態 A ～ C のいずれかに記載の L N P。

【0 2 7 5】

実施形態では、本明細書に記載される s s D N A 又は構築物を含む L N P 製剤は、標的化エフェクターによる表面装飾によって、所望の細胞型に標的化され得る。このような標的化エフェクターとしては、例えば、標的細胞に結合する細胞特異的受容体リガンド；抗体又は標的細胞に対する他の結合剤；セントリン；細胞透過性ペプチド；エンドソーム脱出を可能にするペプチド（例えば、G A L A、K A L A）が挙げられる。概説に関して、例えば、T a i & G a o . 2 0 1 7 . A d v D r u g D e l i v R e v . 1 1 0 - 1 1 1 : 1 5 7 - 1 6 8 の表 1 及び 2 を参照されたい。

30

【0 2 7 6】

実施形態では、本明細書に記載される s s D N A 又は構築物を含む L N P 製剤は、アジュバントと共投与され得、例えば、アジュバントと同じ製剤中で共送達され得る。

【0 2 7 7】

投与経路

本明細書に記載される s s D N A 又は構築物は、任意の好適な経路によって細胞、組織又は対象に導入される。

【0 2 7 8】

（例えば、エキスピボでの）標的細胞又は組織への投与は、当該技術分野において公知の方法、例えば、トランスフェクション、例えば、試薬（例えば、リポソーム、リン酸カルシウム）を用いた一過性若しくは安定トランスフェクション又は物理的手段（例えば、エレクトロポレーション、遺伝子銃、マイクロインジェクション、マイクロ流体せん断、細胞スクイーミング）によって行われ得る。他の方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、R a d e t a l . 2 0 2 1 . A d v . M a t e r . 3 3 : 2 0 0 5 3 6 3 に記載されている。

40

【0 2 7 9】

対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト対象への投与は、非経口（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、頭蓋内）経路によって；局所投与、経皮（t r a n s d e r m a l ）投与又は経皮（t r a n s c u t a n e o u s ）投与によって行われ得る。他の好適な

50

経路としては、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入（例えば、エアロゾルを介した）、口腔（例えば、舌下）、膈内、髄腔内、眼内、経皮、血管内皮内（*intra endothelial*）、子宮内（又は卵内）、胸膜内、脳内、関節内、局所、リンパ管内が挙げられる。直接の組織又は器官注入（例えば、肝臓、眼、骨格筋、心筋、横隔膜、筋肉若しくは脳への）も含まれる。

【0280】

ゲノムへの統合

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、細胞内に導入される場合、細胞のゲノムに統合する。他の実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、細胞内に導入される場合、細胞のゲノムに統合しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、対象に投与される *ssDNA* のコピーの約 0.0001%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、又は 2% 未満の頻度で、対象のゲノムに統合する。

10

【0281】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、相同性アームを含まない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、2つの相同性アームを含まない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、参照ヒトゲノム *hg38* の任意の 15 ヌクレオチド部分との 70%、80%、又は 90% を超える同一性を含まない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、参照ヒトゲノム *hg38* の任意の 15 ヌクレオチド部分との 70% を超える同一性を含まない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、参照ヒトゲノム *hg38* の任意の 25 ヌクレオチド部分との 70%、80%、90%、95% を超える同一性を含まない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、参照ヒトゲノム *hg38* の任意の 50 ヌクレオチド部分との 70%、80%、90%、95%、又は 98% を超える同一性を含まない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、参照ヒトゲノム *hg38* の任意の 100 ヌクレオチド部分との 70%、80%、90%、95%、98%、又は 99% を超える同一性を含まない。

20

【0282】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、相同組換え修復（*HDR*）のための鋳型ではない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、マイクロホモロジー媒介末端結合（*MMEJ*）に関与しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される *ssDNA* は、*DNA* 修復に関与しない。

30

【0283】

いくつかの実施形態では、製剤は、ヌクレアーゼ（例えば、*CRISPR* ヌクレアーゼ、例えば、一本鎖又は二本鎖切断を生じる *CRISPR* ヌクレアーゼ）を含まない。いくつかの実施形態では、製剤は、ゲノムへの *ssDNA* の統合を促進するタンパク質を含まず、例えば、タンパク質は、リコンビナーゼ又はインテグラーゼを含む。

【0284】

用途

本明細書に記載される *ssDNA* 及び構築物は、対象、例えば、ヒトのための治療又は医療用途において使用され得る。本明細書で提供される医薬組成物の説明は、主に、ヒトへの投与に好適な医薬組成物に関するが、このような組成物が、一般に、任意の他の動物への投与に好適であることが、当業者によって理解されるであろう。対象は、任意の動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト又は非ヒト哺乳動物であり得る。実施形態では、対象は、脊椎動物（例えば、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、又は両生類）である。実施形態では、対象はヒトである。実施形態では、本方法の対象は、非ヒト哺乳動物である。実施形態では、対象は、非ヒト哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類（例えば、サル、類人猿）、有蹄動物（例えば、ウシ、水牛、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ラクダ、ラマ、アルパカ、シカ、ウマ、ロバ）、肉食動物（例えば、イヌ、ネコ）、げっ歯類（例えば、ラット、マウス）、又はウサギ目の動物（例えば、ウサギ）である。実施形態では、対象は、鳥類、例えば

40

50

、鳥類分類群のキジ目 (G a l l i f o r m e s) (例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、キジ、ウズラ)、カモ目 (A n s e r i f o r m e s) (例えば、アヒル、ガチョウ)、古顎類 (P a l e a o g n a t h a e) (例えば、ダチョウ、エミュー)、ハト目 (C o l u m b i f o r m e s) (例えば、ハト (p i g e o n)、ハト (d o v e))、又はオウム目 (P s i t t a c i f o r m e s) (例えば、オウム) のメンバーである。実施形態では、対象は、無脊椎動物、例えば、節足動物 (例えば、昆虫、クモ形類、甲殻類)、線虫、環形動物、寄生蠕虫、又は軟体動物である。

【0285】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される s s D N A 又は構築物は、少なくとも 2、3、4、5、6 日又は 1 週間；少なくとも 8、9、10、12、14 日又は 2 週間；少なくとも 16、18、20 日又は 3 週間；少なくとも 22、24、25、27、28 日又は 1 か月；少なくとも 2 か月、3 か月、4 か月、5 か月、6 か月又はそれ以上；1 週間～6 か月、1 か月～6 か月、3 か月～6 か月の期間にわたって、宿主細胞、組織又は対象に対して、エフェクターの生物学的効果、例えば、治療用ポリペプチドの発現を与える。

10

【0286】

実施形態では、本明細書に記載される s s D N A 又は構築物は、エフェクター、例えば、本明細書に記載されるエフェクターを、細胞、組織又は対象に送達するのに使用され得る。

【0287】

実施形態では、本明細書に記載される s s D N A 又は構築物は、細胞、組織又は対象における生物学的パラメーターを調節する (例えば、増加又は減少させる) のに使用され得る。生物学的パラメーターは、標的細胞、組織又は対象における対象の遺伝子の遺伝子発現の増加又は減少であり得る。

20

【0288】

実施形態では、本明細書に記載される s s D N A 又は構築物は、本明細書に記載される s s D N A 又は構築物を、このような細胞、組織又は対象に投与することによって、それを必要とする細胞、組織又は対象を治療するのに使用され得る。

【実施例】

【0289】

実施例 1：共有結合的に閉環された s s D N A のためのプラスミド鑄型の設計及び組み立て

30

この実施例は、s s D N A 構築物のためのプラスミド鑄型を作製する方法を説明する。この実施例では、構築物鑄型が、以下の特定の配列構成要素を用いて設計される。

・プロモーター E f 1 a：

【化24】

```
5'ggctccgggtgcccgtcagtgggcagagcgacatgccacagtcgccgagaagtgggggggaggggtcggcaattgaa  
ccgggtgcctagagaagggtggcgccgggtaaacgtgggaaagtgtgtgtactggctccgccttttccgagggtggggga  
gaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgcccgcagaacacaggtaagtgcctgtgtgg  
ttccgcggggcctggcctctttacgggttatggcccttgctgccttgaattactccacctggctgcagtagctgattctgatccc  
gagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgccgttaaggagcccccttcgctcgtgtgagttgagggcctgg  
cctggggcgctggggccgcccgtgcgaatcgtgtggcaccttcgcgcctgtctcgtcttctcgataagttctagccatttaaaa  
ttttgatgacctgctgcgacgtttttttctggcaagatagcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactgggtatttcggttttgg  
ggccgcggggcgccgacggggcccgctgcgtccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgccggccaccgag  
aatcggaacgggggtagtctcaagctggccggcctgctgtgtgctgctgcgcgcgcgtgtatgcccgccctgggcg  
gcaaggctggcccggtcgccaccagttcggtgagcgggaaagatggccgcttcccgccctgctgcagggagctcaaaatgg  
aggacgcggcgctcgggagagcgggcggtgagtcacccacacaaaggaaaaggccttccgtctcagccgtcgtctcat  
gtgactccacggagtaacggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttggagtagctcgtctttaggttggggga  
gggggtttatgcgatggagtgtccccacactgagtggtgggagactgaagtaggcccagcttggcacttgatgaattctccttgg  
atttgcctttttgagtttgatcttggctcattctcaagcctcagacagtgggtcaaaatttttcttcatttcaggtgtcgtga-3'
```

(配列番号37)

40

50

・モデル／マーカータンパク質（mCherry）をコードするエフェクター配列：
【化25】

5'atggtgagcaagggcgaggaggataaacatggccatcatcaaggagttcatgcgttcaagggtgcacatggagggtccgtg
aacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcccccctacgagggcaccagaccgccaagctgaagggtga
ccaaggggtggcccccctgcccctgcctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccgg
ccgacatccccgactactgaagctgtccttccccgaggggttcaagtgggagcgcggtgatgaacttcgaggacggcgcggtg
gtgaccgtgacccaggactcctcccctgcaggacggcgagttcatctacaagggtgaagctgcgcggcaccacttccccctccga
cggcccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctcctccgagcggtatgtaccccgaggacggcgccctgaagg
gagatcaagcagagggtgaagctgaaggacggcgccactacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaag
cccgtgcagctgcccggcgccctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctccacaacgaggactacaccatcgtggaaca
gtacgaacgcgcggaggggccgactccaccggcgcatggacgagctgtacaagtaa-3' (配列番号38)

10

任意：

・NTS：SV40エンハンサー：5' - c c c a a g a a g a a g a g g a a a g t
c - 3' (配列番号1)

・維持配列：ヒトインターフェロン-β MAR 5'
t a t a a t t c a c t g g a a t t t t t t t g t g t g t a t g g t a t g a c a t
a t g g g t t c c c t t t t a t t t t t t a c a t a t a a a t a t a t t t c c c
t g t t t t t c t a a a a a a g a a a a a g a t c a t c a t t t t t c c c a t t g
t a a a a t g c c a t a t t t t t t t c a t a g g t c a c t t a c a t a 3' (配
列番号39)

20

・第2鎖モチーフ：AAV2野生型ITR 5'
a g g a a c c c c t a g t g a t g g a g t t g g c c a c t c c c t c t c t g c g
c g c t c g c t c g c t c a c t g a g g c c g g g c g a c c a a a g g t c g c c
c g a c g c c c g g g c t t t g c c c g g g c g g c c t c a g t g a g c g a g c
g a g c g c g c a g c t g c c t g c a g g - 3' (配列番号26)

【0290】

プラスミド鑄型が、標準的なDNA設計操作ソフトウェアを用いてこれらの要素により
設計される。組み立てが、公開されたプロトコル及び市販のキット（Marillon
et & Gruetzner, 2020. Synthetic DNA assembly
using golden gate cloning and the hier
archical modular cloning pipeline. Current
Protocols in Molecular Biology. 130:e11
5; Golden Gate Assembly Protocol for Usi
ng NEB Golden Gate Assembly Mix (E1600) (N
ew England Biolabs))に従って、Golden Gate Ass
emblyによって行われる。設計された構築物のGolden Gateアセンブリが
、関連する隣接断片に一致する最初の30bp、新たな配列をコードする次の60bp、
及び標的配列にアニールする最後の30bpを含む120bpの長さの一連のプライマー
を用いて行われる。断片が、最終的な構築物設計へと組み立てられ（NEB Golde
n Gate Assembly Kit）、配列が、製造業者のプロトコルに従ってS
anger Sequencing (Sigma Aldrich)によって確認される。
【0291】

30

40

実施例2：プラスミドDNAから環状ssDNAへの変換

この実施例は、参照により本明細書に組み込まれる、Minev et al., 20
19, Rapid in vitro production of single-s
tranded DNA, Nucleic Acids Research, Volum
e 47, Issue 22: 11956-11962における方法に従って、実施例1
に記載されるように調製される鑄型からのssDNAの生成を説明する。簡潔に述べると
、メタノール応答性ポリマーを有するフォワードプライマーを用いたPCRは、変性条件

50

下で修飾鎖の選択的沈殿を可能にするタグ付きアンプリコンを生成する。非修飾及び修飾塩基が、これらの方法を用いて構築物に組み込まれ得る。

【0292】

最終的な試料が、純度及び濃度を決定するために、NanoDropを用いて分析される。構築物の配列は、製造業者のプロトコル（Illumina）に従って次世代シーケンシングにより確認される。

【0293】

実施例3：環状化ssDNAの生成

実施例2に記載されるように作製される線状ssDNA構築物は、DNAリガーゼ、例えば、Ampligase（登録商標）Thermostable DNAリガーゼ（Lucigen、MA023E-Ampligase（登録商標）Thermostable DNAリガーゼ）又はCircLigase（商標）II ssDNAリガーゼ（Lucigen、MA298E-CircLigase-II-ssDNA-リガーゼ）を用いて、環状化され、例えば、共有結合的に閉環される。Ampligaseが、相補的DNA配列において互いに隣接してアニールされるDNA末端をライゲートする一方、CircLigase II ssDNAリガーゼは、相補的配列の非存在下でssDNAの末端をライゲートする。ライゲーション後に残っている線状DNA構築物は、エキソヌクレアーゼI及びエキソヌクレアーゼIIIで処理することによって除去される。出発生成物及び得られる生成物のアガロースゲル電気泳動が、DNA構築物が環状化されることを確認するために行われる。

【0294】

実施例4：LNPによる環状ssDNAの製剤化

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

【0295】

核酸構築物が、Chen et al., 2012, J Am Chem Soc. Volume 134, Issue 16: 6948-6951の方法に従って、マイクロ流体デバイスによって脂質成分と組み合わせられる。簡潔に述べると、マイクロ流体デバイスは、標準的なリソグラフィ手順（McDonald & Whitesides, 2002, Accounts Chem Res Volume 35, Issue 7: 491-499）に従って、ポリジメチルシロキサン（PDMS）中で製造される。典型的に、カチオン性脂質、コレステロール、ヘルパー脂質、ポリエチレングリコール修飾脂質、及び標的部分コンジュゲーションを促進する脂質（任意）を含有する脂質成分が、90%のエタノール中で組み合わせられ、可溶化される。核酸構築物は、緩衝液に溶解される。核酸溶液、脂質溶液、及びリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が、マイクロ流体デバイス中に注入される。新たに調製されたLNPが、3.5 kDのMWCOを有する膜を用いてPBS緩衝液に対して透析されて、エタノール及び交換緩衝液が除去される。

【0296】

LNPは、動的光散乱（DLS）（ZetaPALS, Brookhaven Instruments, NY、15mWレーザー、入射ビーム676nm）を用いて、有効直径、多分散性、及びゼータ電位に関して特性評価され；総核酸濃度が、製造業者のプロトコル（ThermoFisher Scientific, 011492）に従って、Quant-iT（商標）Oligreen（登録商標）ssDNA Assay Kitを用いて決定される。

【0297】

実施例5：インビトロでの細胞内の自然免疫応答の評価

この実施例は、遺伝子発現を試験する方法、並びに培養細胞の自然免疫応答に対する構築物の影響を決定する方法を説明する。

【0298】

実験構築物が、上記の実施例1～4と同様に調製される。構築物及び対照は、HEK、

ケラチノサイト、マクロファージ、T細胞及び上皮細胞から選択される細胞に、複数の濃度で、エレクトロポレーションによって投与される。エレクトロポレーションの後、細胞は、最終的な培養容器に移される。LNPを用いて製剤化される構築物は、ウェルプレートにおいて細胞に直接投与される。

【0299】

蛍光レポーターmCherryをコードする構築物の発現を決定するために、細胞が、フローサイトメトリー分析の前に、PBSで最初に洗浄される。全てのフローサイトメトリーが、Miltenyi製のMACSQuant VYBにおいて行われる。mCherryシグナルの検出のために、黄色レーザー（波長561nm）が、励起のために使用され、615/620nmの発光フィルタが使用される。20,000の事象が、各試料について記録され、データが、Flowjo V.9.0ソフトウェアを用いて分析される。細胞が、FSC-A及びSSC-Aプロットにおいて最初にゲーティングされて、細胞残屑が除去される。集団が、単一細胞集団を囲むように、FSC-A及びFSC-Hプロットにおいてさらにプロットされる。最後に、蛍光シグナル発現細胞と非発現細胞との間の二変量プロットを使用して、発現細胞のパーセンテージを決定する。発現細胞の分布を使用して、各細胞内の発現のレベルを決定する。発現分析が、複数の時点で行われる。

【0300】

Jakobsen et al. 2013. Proc Natl Acad Sci USA Volume 110, Issue 48: E4571-80に記載されるように、試験細胞におけるIFN- β のRNAレベルを決定するために、qPCRが、細胞において行われる。簡潔に述べると、qPCRにおいて使用されるプローブプライマーセットは、ヒトIFN- β (ThermoFisher, Hs01077958_s1) 及び β -アクチン (ThermoFisher, Hs00357333_g1) である。分析は、予め作製されたTaqmanアッセイ及びRNA-to-Ct one step kit (Applied Biosystems) を用いて行われる。qPCRは、MX3005システム (Stratagene) において行われる。RNA発現が、 β -アクチン及び関連する非処理の対照に対して正規化される。データが、生物学的反復からの平均 $\pm$ SEMとして表される。

【0301】

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

【0302】

実施例6．環状一本鎖DNA (ssDNA) の調製

この実施例は、環状ssDNAの調製を実証する。

【0303】

プラスミドDNA (1ng/50ulのPCR反応) を、Q5ポリメラーゼ (M0494L, New England Biolabs) を用いたPCR増幅のための鋳型として使用した。他の市販のポリメラーゼも使用され得る。プラスミドに相補的な配列を含有することに加えて、プライマーは、下流のプロセスにおいて有用なさらなる配列を含有していた：

a. ニッキング酵素認識配列；

b. 制限酵素消化後にDNAにおける粘着末端を生成し、DNA環状化を容易にするのに使用される、制限酵素認識配列（例えば、BsaI、KpnI、又はNheI）；及び

c. 制限酵素消化効率を高めるためのさらなる塩基（例えば、5'-CCGTGGTCCTTC-3'）（配列番号40）。

【0304】

PCR産物を、DNA精製カラム (M0494L, Zymo Research) を用いて精製した。制限酵素認識配列に対応する制限酵素、例えば、BsaI-HF-V2 (R3733L, New England Biolabs) を用いて、一晚の反応においてDNAを消化した。次に、DNAを、DNA精製カラムを用いて精製した。

【0305】

消化されたDNAを、室温で1時間にわたってT4 DNAリガーゼ（M0202M、New England Biolabs）を用いて環状化した。非環状化DNAを、37℃で1時間にわたってT5エキソヌクレアーゼ（M0663L、New England Biolabs）とともにDNAをインキュベートすることによって分解した。T5エキソヌクレアーゼを用いて、線状dsDNAを消化したが、環状dsDNAを消化しなかった。DNAを、DNA精製カラムを用いて精製した。他の同様の方法、例えばアガロースゲル精製も使用され得る。

【0306】

環状dsDNAを、ニッキングエンドヌクレアーゼ（例えばNb.BsrDI、R0648L、New England Biolabs）とともにインキュベートした。このエンドヌクレアーゼは、配列特異的であり、dsDNA分子における1つの鎖のみを切断する。ニックDNA鎖を、25℃で30分間にわたってT7エキソヌクレアーゼ（New England Biolabs、M0263）とともにDNAをインキュベートすることによって除去した。エキソヌクレアーゼIII（M0206、New England Biolabs）も、例えば、37℃で30分間にわたって使用され得る。エキソヌクレアーゼとのDNAのインキュベーションは、実施例7にさらに詳細に記載されている。反応物の試料を、アガロースゲルにおいて泳動させて、環状ssDNAの生成を確認した（ニックDNAは、環状ssDNAよりゆっくりと泳動する）。環状ssDNAを、精製カラム（Oligo Clean & Concentrator、D4061、Zymo Research）又はアガロースゲル精製（3kbの場合、Long ssDNA Gel Extraction Kit、DS640、DiagnoCine）を用いて直接精製した。本明細書に記載される方法によって調製される環状ssDNAが、エキソヌクレアーゼIによる分解に対して耐性があることが示された一方、線状ssDNAは、エキソヌクレアーゼIによって分解された（図11）。

【0307】

一本鎖及び二本鎖DNA形態の両方の組成物及び純度の分析を、CRISPR Discovery Kit（DNF-930-K1000CP）を用いて、Agilent 5300 Fragment Analyzerにおいて行った。挿入色素（intercalating dye）とともにdsDNAインレットバッファー及び電気泳動ゲルを、毎日新たに調製した一方、鋳油オーバーレイを含むマーカーレー及びキャピラリーコンディショニング溶液を、毎月新たに調製した。緩衝液を、製造業者の仕様に従って調製した。一本鎖DNA試料を、1ng/μLの最終濃度になるまで水で希釈し、二本鎖DNA試料を、100pg/μLの最終濃度になるまで水で希釈した。各試料ウェルについて、2μLのDNA試料を、22μLの希釈緩衝液（0.1倍のTE）に加え、各試料を、2～4レプリケートで泳動させ、1つのウェルをMDK DNAラダーに使用した。試料を、CRISPR Discovery Method（CRP-910-33）のデフォルト設定を用いて、機器コントローラーソフトウェアによって泳動させた。

【0308】

試料のトレースを、ProSize Data Analysis Software v4.0.2.7を用いて分析した。ピーク分析条件を、15の「ピーク幅（sec）」及び75の「最小ピーク高さ（RFU）」、3の追加の谷点（Extra Valley Point）数に設定し、「谷間のベースライン（Valley to Valley Baseline）？」をオフにした。手動のベースラインを、下側マーカーから-2分及び上側マーカーから+2分に設定した。ピークを、これらの条件下でソフトウェアによって自動的に検出し、例えば、広いピーク、ピーク肩、又は狭いピーク範囲内の複数のピークのため、手動の調整が必要とされた場合を除いて、ソフトウェアによってピーク幅を選択した。

【0309】

2つの構築物（構築物029）及び（構築物001）の環状ssDNA及び環状dsD

NAを精製し、この実施例に記載される方法を用いて分析した。各DNA調製物を、Fragment Analyzerにおいて4×レプリケートで分析し、試料トレースが、図3～9に示される。

【0310】

顕著なピークは、以下を含む：

- ・下側マーカー（LM）＝1 bp、
- ・19 bpにおける残差ピーク（このピークは、ブランクウェルにも存在し、DNA調製物に由来しなかったため、最終的なピーク定量化値において考慮されなかった）、
- ・一次ピーク、
- ・二次ピーク（不純物）、及び
- ・上側マーカー（UM）＝6000 bp

10

【0311】

ブランクウェルのトレースは、19 bpのみににおけるピークの存在を示す（図3）。構築物029環状ssDNAを、全ピーク面積の98.8%で定量化した（n＝4；図4；表4）。構築物029環状dsDNA、構築物001環状dsDNA、構築物001環状ssDNA調製物#1、及び構築物001環状ssDNA調製物#2をそれぞれ、100%のそれぞれの試料で定量化し、すなわち、不純物は検出されなかった（n＝4；図5～8）。

【0312】

環状ssDNA調製物中の環状dsDNA汚染の特定を評価するために、1 ngの構築物001環状ssDNA当たり7.8 pgの構築物001環状dsDNAを添加し、ピークが容易に区別され得る最も低い濃度を調べた。環状dsDNAに対応するピークが、赤色の矢印で示される（図9）。不純物の分解は、>6 pg / uLであった。

20

【0313】

【表4】

表4. 構築物029環状ssDNAの相対ピーク定量化。

ピーク	サイズ (bp)	% (濃度)				
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	AVG
1	1 (LM)					
2	263	0.3	0.9	0.9		
3	272	0.4			1.1	
4	325	99.3	98.4	98.4	98.9	98.8
5	472	0	0.7	0.7		
6	6000 (UM)					

30

LM: 下側マーカー、UM: 上側マーカー

【0314】

要約すると、この実施例は、プラスミドDNAからの高純度を有する環状ssDNAの成功した調製を説明する。

40

【0315】

実施例7. エキソヌクレアーゼとのDNAのインキュベーション

この実施例は、ニック環状dsDNAに対するエキソヌクレアーゼIII及びT7エキソヌクレアーゼの影響を説明する。上述されるように、本明細書に記載される特定の製造方法は、ニック環状dsDNAを、これらのエキソヌクレアーゼのうちの1つで処理して、ニック鎖を除去し、環状ssDNAを生成することを含む。これらの酵素は、一般に、線状又はニックDNAに対して特異的であると考えられるが、この実施例は、これらの酵素が、環状ssDNAに対していくらかの活性を有することを実証する。この実施例は、高いレベルの環状ssDNAを保ちながらニックDNAの量を減少させる好適な消化条件を示す。

50

【0316】

100 μ l の 1 $\times$ r C u t S m a r t 緩衝液 (N E B、B 6 0 0 4 S) 中の 7.2 μ g の環状 d s D N A に、37 $^{\circ}$ C で 30 分間にわたって 20 単位の N b . B s r D I (N E B、R 0 6 4 8 L) を用いて切れ目を入れた。酵素を、20 分間にわたって 80 $^{\circ}$ C で反応物をインキュベートすることによって加熱不活性化した。図 10 A は、D N A ゲル電気泳動によって視覚化されるニック D N A 構築物を示す。25 $^{\circ}$ C で 30 分間 (図 10 B ; レーン 4)、1 時間 (図 10 B ; レーン 3) 16 時間 (図 10 B ; レーン 2) にわたって 7.5 単位の T 7 エキソヌクレアーゼ (N E B、M 0 2 6 3 L) とともに 50 μ l の試料 (3.6 μ g の D N A) をインキュベートすることによって、ニック D N A を、s s D N A に変換した。30 分間のインキュベーションは、検出可能なニック D N A の損失及び多量の環状 s s D N A の持続をもたらした。対照的に、T 7 エキソヌクレアーゼとの 16 時間のインキュベーション期間は、環状一本鎖 D N A のいくつかの分解をもたらした。

10

【0317】

この実施例はまた、線状及び環状 d s D N A に対するエキソヌクレアーゼ I の影響を説明する。図 11 は、構築物 001 の線状及び環状 s s D N A 形態のエキソヌクレアーゼ I による分解を示す。本明細書における方法によって調製される環状 s s D N A は、エキソヌクレアーゼ I による分解に対して耐性があることが示された一方、線状 s s D N A は、エキソヌクレアーゼ I によって分解された。これは、治療用構築物の細胞内分解を含む、D N A の細胞内分解に本来寄与するエキソヌクレアーゼに対する環状 D N A の一般的な耐性を強調している。

20

【0318】

実施例 8 : インビトロでのレポーター遺伝子発現の評価

この実施例は、培養細胞における環状 s s D N A 構築物を用いた成功した遺伝子発現を説明する。

【0319】

実験構築物を、上記の実施例 1 ~ 4 と同様に調製した。この実施例において使用される環状 s s D N A 構築物及び対照は、表 5 に列挙される。構築物及び対照を、複数の濃度で、Neon Transfection System (ThermoFisher、M P K 5 0 0 0) を用いてエレクトロポレーションによって投与した。レシピエント細胞株は、HEK a ケラチノサイト (米国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) (ATCC)、P C S - 2 0 0 - 0 1 1)、H e p G 2 肝細胞 (ATCC、H B - 8 0 6 5)、U 2 O S 骨肉腫細胞 (ATCC、H T B - 9 6)、及び H E K 2 9 3 上皮細胞 (ATCC、C R L - 1 5 7 3) を含んでいた。エレクトロポレーション実験では、約 5×10^6 個の細胞を、D P B S 緩衝液中で 30 ms にわたって 1500 ボルトでエレクトロポレートした。エレクトロポレーションの後、細胞を、最終的な培養容器に移した。L N P を用いて製剤化される構築物を、ウェルプレートにおいて細胞に直接投与した。

30

【0320】

40

50

【表 5】

表 5. 配列要素の異なる組み合わせを有する環状一本鎖 DNA 構築物。「C001」は、構築物 001 に対応し、「C002」は、構築物 002 に対応するなどである。

名称	長さ (nt)	5'要素A	5'要素B	プロモーター	導入 遺伝子	ポリA シグナル	3'要素A	3'要素B	3'要素C
C001	2191			EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位		
C002	2263	SV40 エンハンサー		EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位		
C003	2301	3NF		EF1a	mCherry	bGH	3NF	ニックング部 位	
C010	2304	アネロウイル スヘアピン		EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位		
C024	2416	アネロウイル スヘアピン	3NF	EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位	3NF	
C025	2376	SV40 エンハンサー	アネロ ウイルス ヘアピン	EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位		
C027	2191			EF1a	mCherry (no ATG)	bGH	ニックング 部位		
C028	1012				mCherry	bGH	ニックング 部位		
C029	787				mCherry		ニックング 部位		
C030	2380	SV40 エンハンサー		EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位	SV40 エンハンサー	
C031	2258			EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位	SV40 エンハンサー	
C037	2299			EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位	アネロウイル スヘアピン	
C038	2462	アネロウイル スヘアピン		EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位	アネロウイル スヘアピン	
C040	2534	アネロウイル スヘアピン	SV40 エンハンサ ー	EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位	アネロウイル スヘアピン	
C041	2416	3NF		EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位	3NF	アネロウイル スヘアピン
C042	2554	アネロウイル スヘアピン	3NF	EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位	3NF	アネロウイル スヘアピン
C043	2420	3NF	3NF	EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位	3NF	3NF
C044	2308	3NF	3NF	EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位		
C045	2237	3NF		EF1a	mCherry	bGH	ニックング 部位		

【0321】

また、実験構築物及び対照を、脂質トランスフェクション（リポフェクション）によつて投与した。DNAのためのリポフェクションを、製造業者の指示に従って、HEKa、HepG2、HEK293、及びU2OS細胞内でLipofectamine3000トランスフェクション試薬（# L3000001、ThermoFisher）を用いて行った。1：2：3の比率のDNA：P3000：Lipofectamine3000を、全てのDNA構築物及び対照に使用した。10,000個の細胞を、トランスフェクションの1日前に96ウェルプレートの各ウェル内に予め播種した。細胞がほぼ80～90%のコンフルエンスに達するまで、トランスフェクションを行った。96ウェルプレートの各ウェルについて、3×Lipofectamine3000を、5uLのOpti-MEM（商標）I Reduced Serum Medium（# 3198507

0、ThermoFisher) 中で最初に希釈した。DNAを、2×P3000試薬とともに5uLのOpti-MEM (商標) I Reduced Serum Medium中で希釈した。次に、DNAを、Opti-MEM (商標) I Reduced Serum Mediumを含有するLipofectamine 3000に加え、ピペット操作によって穏やかに混合した。室温で15分間インキュベートした後、DNA-Lipofectamine 3000複合体を、ウェルの異なる領域に滴下する方式で、完全培養培地とともに標的細胞に加えた。プレートを、前後左右に穏やかに揺動させて、DNA-Lipofectamine 3000複合体を均一に分配した。トランスフェクションの後、細胞を、CO₂組織培養インキュベータ中でインキュベートし、培養培地を、トランスフェクションの6～8時間後に交換した。

10

【0322】

蛍光レポーターmCherryをコードする構築物の発現を決定するために、細胞を、フローサイトメトリー分析の前に、PBSで最初に洗浄した。全てのフローサイトメトリーを、Miltenyi製のMACSQuant VYBにおいて行った。mCherryシグナルの検出のために、黄色レーザー (波長561nm) を、励起のために使用し、615/620nmの発光フィルタを使用した。20,000の事象を、各試料について記録し、データを、Flowjo V. 9.0ソフトウェアを用いて分析した。細胞を、FSC-A及びSSC-Aプロットにおいて最初にゲーティングして、細胞残屑を除去した。集団を、単一細胞集団を囲むように、FSC-A及びFSC-Hプロットにおいてさらにプロットした。最後に、蛍光シグナル発現細胞と非発現細胞との間の二変量プロットを使用して、発現細胞のパーセンテージを決定した。発現細胞の分布を使用して、各細胞内の発現のレベルを決定した。発現分析を、複数の時点で行った。

20

【0323】

図12A～12Dは、HEK293、HepG2、U2OS、及びHEKa細胞のそれぞれにおける環状ssDNA構築物の発現を示す。構築物001プラスミドの発現に対して正規化された、レポーター陽性細胞の割合 (X軸) とこのような細胞の蛍光強度 (Y軸) との間に、正の相関が観察された。これらの結果は、複数の異なる配列要素 (表5) を有する環状ssDNAが、同様の発現プロファイルでレポーター遺伝子 (mCherry) を発現することを実証する。

【0324】

実施例9：インビトロでの細胞内の自然免疫応答の評価

この実施例は、培養細胞の自然免疫応答に対する環状ssDNA構築物の影響を説明する。

30

【0325】

実験構築物を、上記の実施例1～4と同様に調製し、次に、上記の実施例8と同様に細胞に投与した。試験細胞におけるサイトカインIFN- β 、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、及びCXCL10のRNAレベルを決定するために、qPCRを、細胞において行った。簡潔に述べると、qPCRにおいて使用されるプローブプライマーセットは、ヒトIFN- β (フォワード配列：CTTGGAATTCCTACAAAGAAGCAGC (配列番号41)；リバーズ配列：TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA) (配列番号42)；ヒトIL-6 (フォワード配列：AGACAGCCACTCACCTCTTTCAG (配列番号43)；リバーズ配列：TTCTGCCAGTGCCCTCTTTGCTG (配列番号44)；ヒトIL-1 β (フォワード配列：CCACAGACCTTCCAGGAGAAATG (配列番号45)；リバーズ配列：GTGCAGTTTCAGTGAATCGTACAGG (配列番号46)；ヒトTNF- α (フォワード配列：CTCTTCTGCTGCTGCACTTTTG (配列番号47)；リバーズ配列：ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC (配列番号48)；ヒトCXCL10 (フォワード配列：GGTGAGAAAGAGATGTCTGAATCC (配列番号49)；リバーズ配列：GTCCATCCTTGGAAAGCACTGCA (配列番号50)；ヒトCCL20 (フォワード配列：AAGTTGTCTGTGTGCGCAAAATCC (配列番号51

40

50

); リバース配列: CCATTCCAGAAAAGCCACAGTTTT (配列番号52))、ヒトGAPDH (フォワード配列: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG (配列番号53)); リバース配列: ACCACCCCTGTTGCTGTAGCCAA (配列番号54))であった。分析を、Life Technologies Corporation製のSYBR Select Master Mixを用いて、Quant Studio 7 Flex Real-time PCR Systemを用いて行った。RNA発現を、GAPDHに対して正規化し、関連する非処理の対照と比べた倍率変化として表した。

【0326】

環状ssDNA及び環状dsDNAとして生成され、リポフェクションによってHEK a細胞に送達される構築物001 (導入遺伝子mCherryを含む)の発現及び免疫原性が、図13A~13B及び14A~14Eに示される。環状ssDNAが、mCherry+細胞の割合によって規定されるように、環状dsDNAの等しいモル濃度(「1倍」)及び等しい質量(「2倍」)より低いレベルで発現された(図13A~13B)。逆に、図14A~14Eに示されるように、環状ssDNAの等しいモル濃度及び質量は、インターフェロン(すなわち、IFN- β)及び炎症性サイトカイン及びケモカイン(例えば、IL-6)の低下した産生から明らかなように、環状dsDNAよりかなり低い免疫原性であった。これらの結果は、環状dsDNAと比べて環状ssDNAの低下した自然免疫原性を実証する。

【0327】

実施例10. 化学修飾を有する環状一本鎖DNA(ssDNA)の調製

この実施例は、化学修飾を有する環状ssDNAの調製及び発現プロファイリングを説明する。

【0328】

4 μ gの環状dsDNA及び20単位のNb.BsrDI(NEB、R0648)を、50 μ lの1 $\times$ CutSmart緩衝液(NEB、B6004)中で混合することによって、DNAに切れ目を入れた。反応物を、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。

【0329】

150 μ lのメチルトランスフェラーゼ反応混合物(S-アデノシルメチオニンを、160 μ Mの最終濃度になるまで及び20単位のEcoGIIメチルトランスフェラーゼ(NEB、M0603))を1 $\times$ CutSmart緩衝液中のニックDNAに加えることによって、DNAをメチル化した。反応物を、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。

【0330】

DNAを、上述されるようにZymo DNA精製カラムを用いて精製した。ニック環状メチル化dsDNAを、4 μ gのDNAを、50 μ lの1 $\times$ CutSmart緩衝液中の15単位のT7エキソヌクレアーゼ(NEB、M0263)と組み合わせて、反応物を25 $^{\circ}$ Cで30分間にわたってインキュベートすることによって、メチル化環状ssDNA形態に変換した。DNAを、上述されるように、ゲル電気泳動によって精製した。

【0331】

図15は、2つの形態の構築物001: 非修飾一本鎖環状DNA、及びm6A(N⁶-メチルアデノシン)DNA修飾を有する一本鎖環状の発現を示す。トランスフェクトされた細胞内におけるmCherryレポーターの発現から明らかなように、化学修飾環状一本鎖DNAは、検出可能な機能を保持していた。この結果は、環状ssDNAからの導入遺伝子発現が、化学修飾によって影響され得ることを示す。

【0332】

実施例11: DNA二次構造のコンピュータによる予測

この実施例は、環状ssDNAの二次構造のモデリングを説明する。

【0333】

本明細書に記載されるssDNAによって形成される二本鎖領域を、Lorenz et al., 2011. ViennaRNA Package 2.0. Algorithm

10

20

30

40

50

ms for Molecular Biology, Volume 6、Article 26によって記載されるように決定した。RNAFoldウェブサーバー (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) を用いて、本明細書に記載される構築物001の二本鎖領域を予測した。簡潔に述べると、デフォルトの「折り畳みアルゴリズム」及び「基本オプション」を用いて、最小自由エネルギーに基づいて、構築物001の二次構造をモデル化した。「DNA」及び「環状」パラメーターの選択を除いて、デフォルトの「高度なフォールディングオプション」を使用した。

【0334】

図16は、環状ssDNAとしての構築物001の得られる構造の予測を示す。16連続塩基対を超える二本鎖の領域は予測されなかった。この結果は、生理学的条件下で、自然免疫応答の刺激と関連する二本鎖の長鎖領域を欠く環状ssDNA構築物が生成され得ることを示唆する (Luecke et al. 2017. EMBO Reports Volume 18, Issue 10: 1707-1715を参照)。

【0335】

実施例12：cssDNA構築物の純度レベル

環状一本鎖DNA構築物を、実施例1～4に記載されるように生成した。それらのレベル及び純度を決定した。純度を、吸光度比、特に、A260/A280及びA230/A260を用いて決定した (表6)。

【0336】

【表6】

表6. 環状一本鎖DNA構築物のセンス(SEN)及びアンチセンス(ANS)鎖の純度測定。

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

【0337】

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

10

20

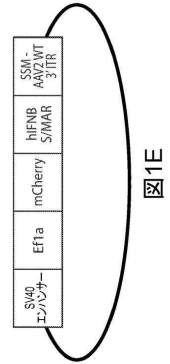
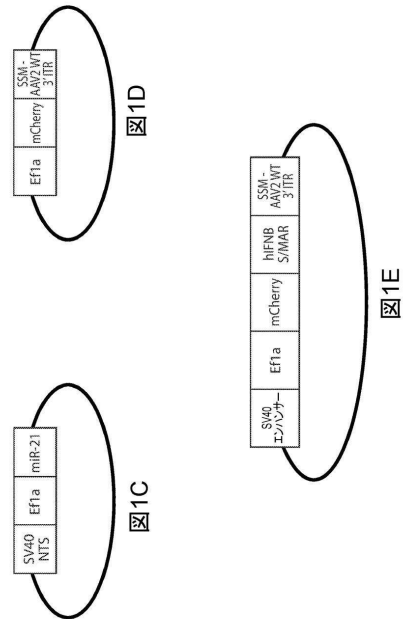
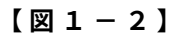
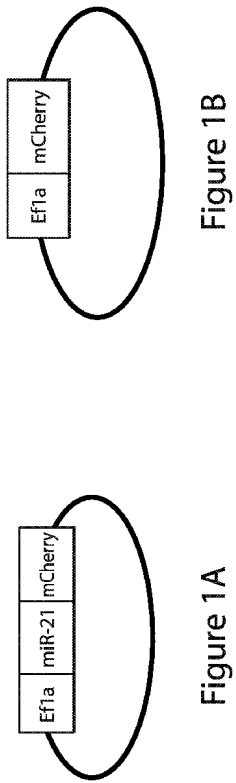
30

40

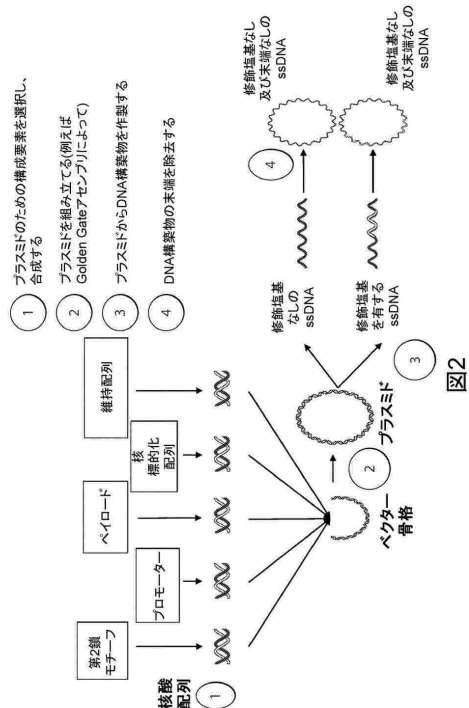
50

【図面】

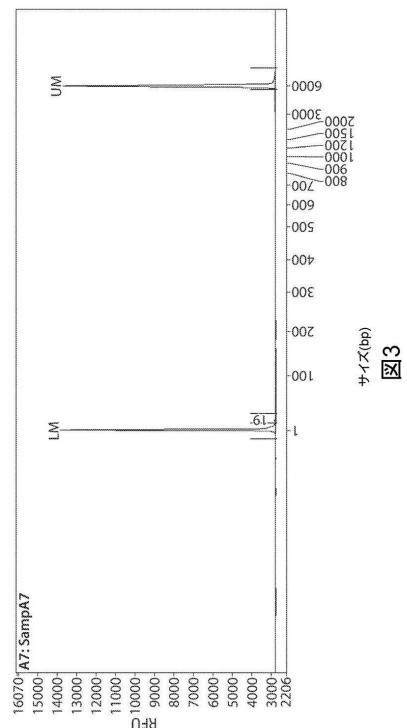
【圖 1 - 1】



【圖 2】



【圖 3】



10

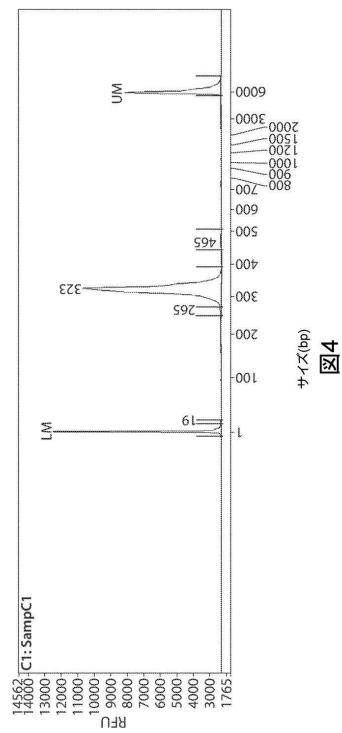
20

30

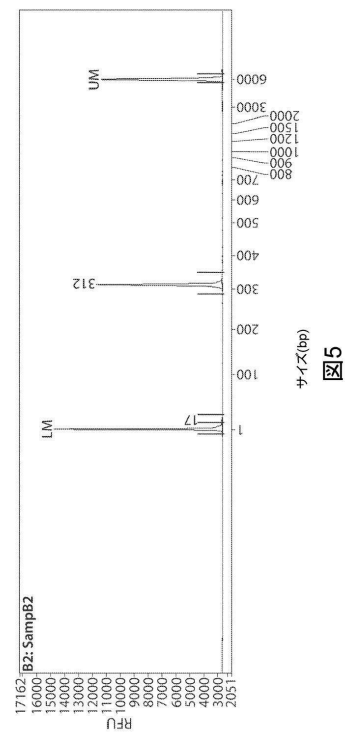
40

50

【図 4】



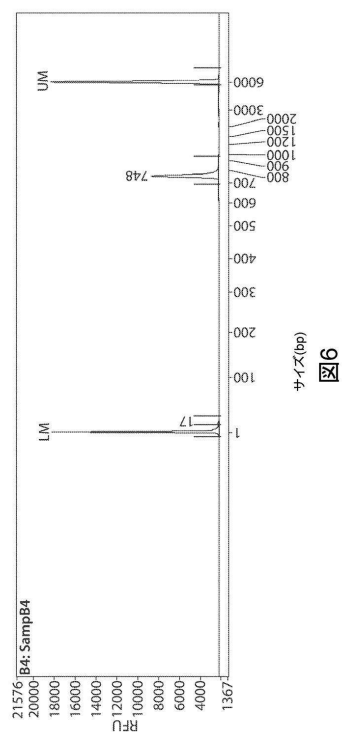
【図 5】



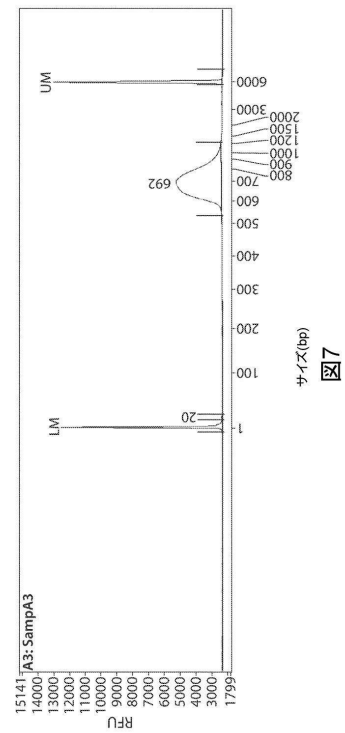
10

20

【図 6】



【図 7】

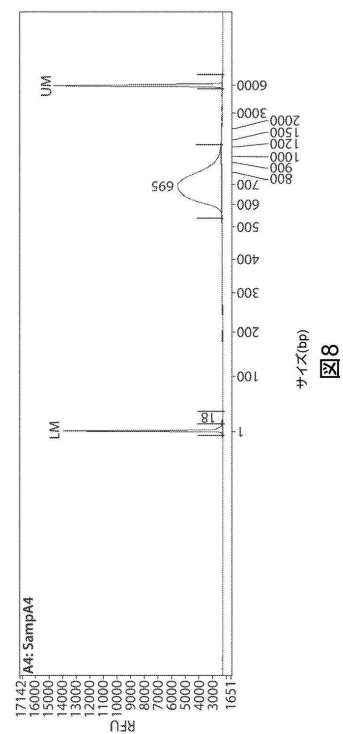


30

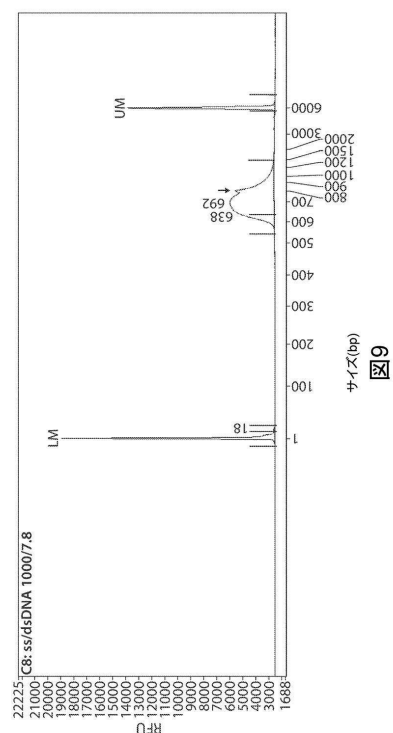
40

50

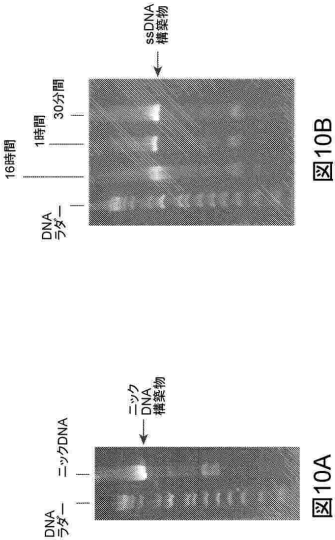
【図 8】



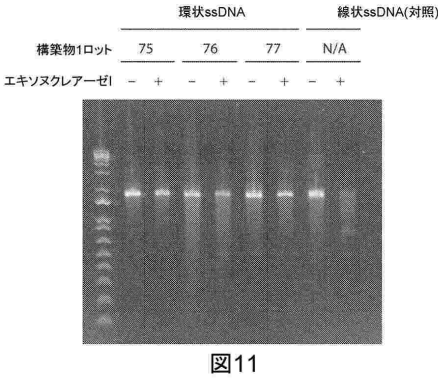
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

20

30

40

50

【図 13 A】

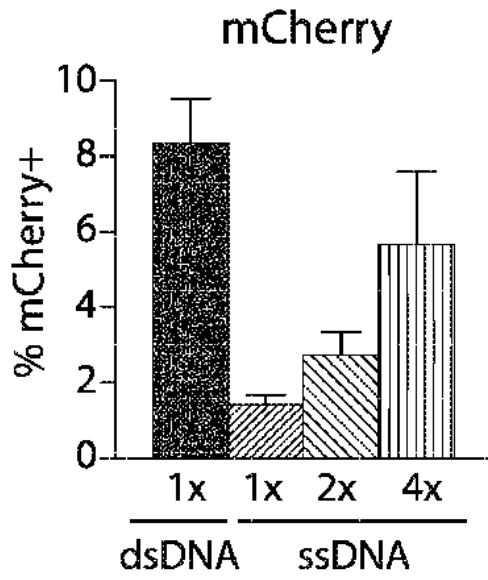


Figure 13A

【図 13 B】

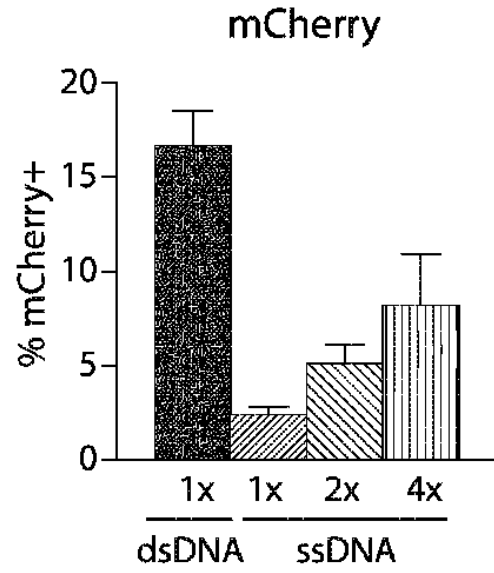
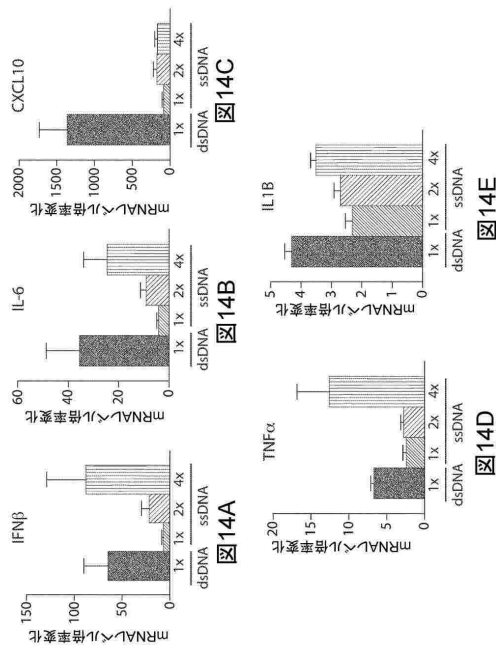


Figure 13B

【図 14】



【図 15】

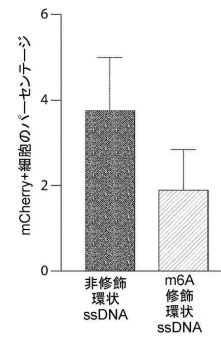


図15

10

20

30

40

50

【図 16 - 1】

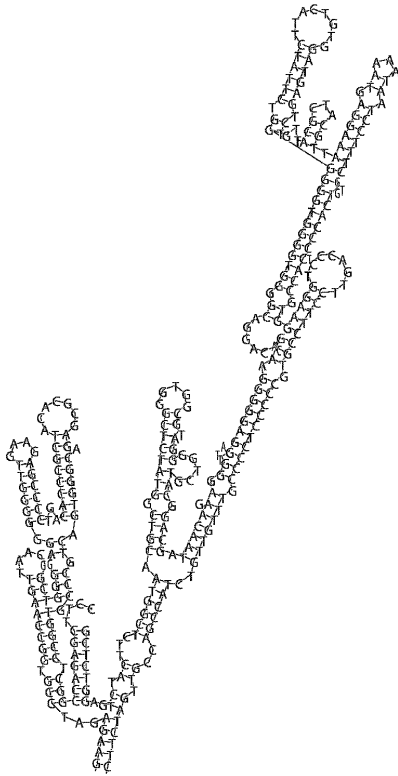


Figure 16-1

【図 16 - 2】

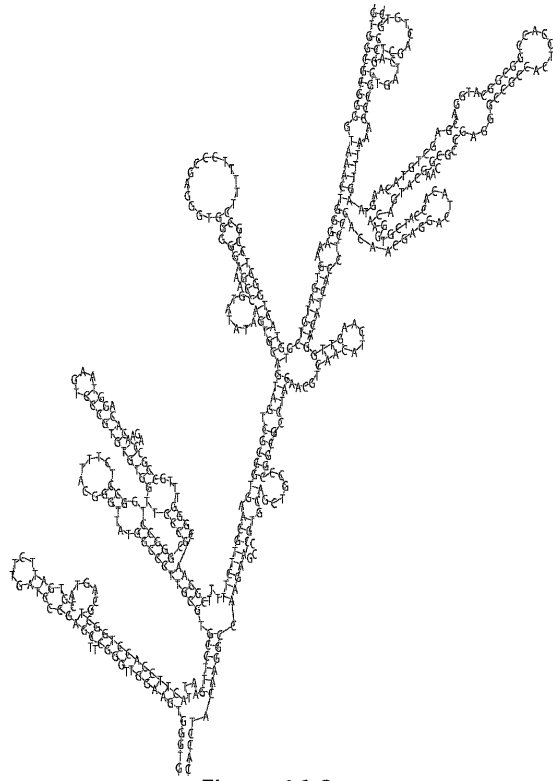


Figure 16-2

10

20

【図 16 - 3】

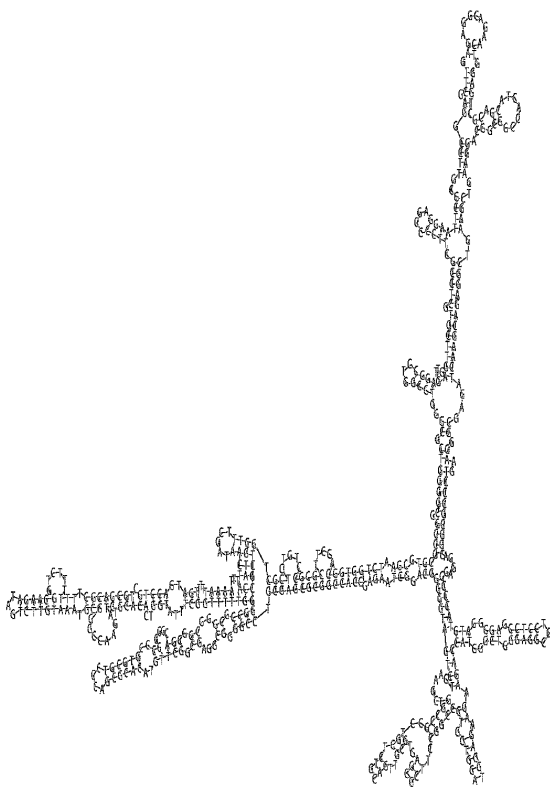


Figure 16-3

【図 16 - 4】

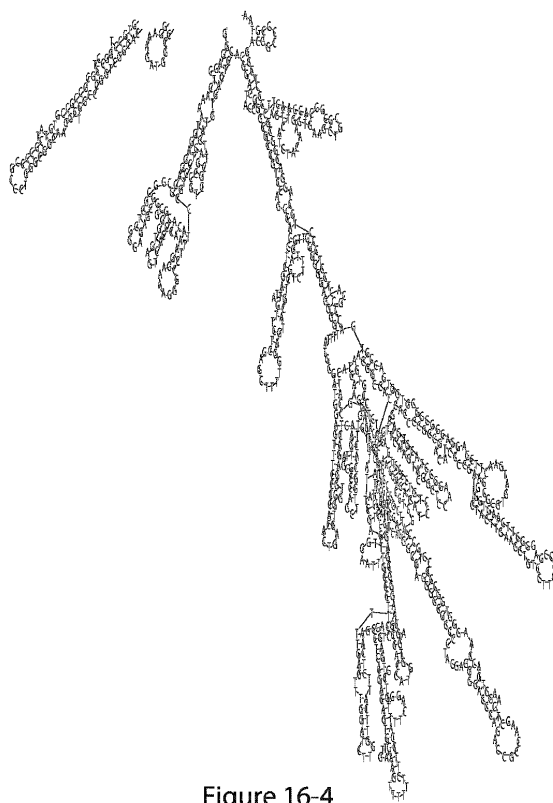


Figure 16-4

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/78301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 15/11, C12P 19/34 (2023.01)

ADD. C12N 15/81 (2023.01)

CPC - INV. C12N 15/111

ADD. C12Q 2525/307, C12Q 2521/501, C12N 2310/532

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)

See Search History document

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

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2020/123795 A2 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS V, INC.) 18 June 2020 (18.06.2020); pg 1, ln 19-22; pg 2, ln 3-4, 8-10; pg 6, ln 18-19; pg 8, ln 1-3, 24; pg 73, ln 6-7; pg 79, ln 25-27; pg 90, ln 25-26; pg 114, ln 15-16; pg 131, ln 1-2, 7; pg 313, ln 21; pg 314, ln 18-20; pg 356, ln 25-26; pg 357, ln 32-33; pg 364, ln 5-8; pg 363, ln 18-20; pg 364, ln 12-14; pg 391, ln 32-34; pg 414, ln 1-3	16-19, 20, (22-25)/(16-20), 62-64, 84-85 1-5, 21, (22-25)/(21)
X	WO 2010/094040 A1 (EPICENTRE TECHNOLOGIES CORPORATION) 19 August 2010 (19.08.2010); abstract; pg 15, ln 2-6; pg 49, ln 20-23; claim 18	30-31
Y	ZHANG et al. Engineering BspQI Nicking Enzymes and Application of N.BspQI in DNA Labeling and Production of Single-strand DNA. Protein Expression and Purification. February 2010, Vol. 89, No. 2, pages 226-234; abstract	1-2, 4, 5/(2, 4), 21, (22-25)/21
Y	US 2021/0139971 A1 (AXBIO INC.) 13 May 2021 (13.05.2021); abstract; para [0120], [0406]	3, 5/(3)

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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 January 2023 (

Date of mailing of the international search report

FEB 23 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/78301

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-15, 26-29, 32-61, 65-83
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
--See Supplemental Box --

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/78301

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-5, 30-32, 85, directed to a method of making a circular, ssDNA, evaluating a sample of a composition comprising ssDNA and delivering a therapeutic protein to a subject.

Group II, claims 16-25, 62-64, 84, directed to a pharmaceutical composition.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a method of making a circular, ssDNA, evaluating a sample of a composition comprising ssDNA and delivering a therapeutic protein to a subject, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a pharmaceutical composition, that is not required by Group I.

Common technical features:

Groups I-II share the common technical feature of:

a composition comprising:

a covalently closed, single stranded DNA (ssDNA) comprising an effector sequence, wherein one or more of the following conditions is satisfied:

- a) at least 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 98%, or 99% by mass of total DNA in the composition is the covalently closed ssDNA;
- b) at least 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% by mass of total DNA in the composition is full length;
- c) less than 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, or 1% by mass of DNA in the composition is double stranded DNA (dsDNA);
- d) less than 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, or 1% by mass of DNA in the composition is linear DNA;
- e) less than 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, or 1% by mass of DNA in the composition is linear ssDNA;
- f) the composition is substantially free of, e.g., is free of, chloroform;
- g) the composition is substantially free of, e.g., is free of, phenol;
- h) the composition is substantially free of, e.g., is free of, phenol and chloroform;
- i) the composition is substantially free of, e.g., is free of, organic solvents;
- j) the composition is substantially free of, e.g., is free of, aromatic organic solvents;
- k) the composition is substantially free of (e.g., is free of) Exonuclease III;
- l) the composition is substantially free of (e.g., is free of) T7 Exonuclease; and/or
- m) the composition is substantially free of (e.g., is free of) T5 Exonuclease;

a pharmaceutical formulation comprising a single stranded DNA (ssDNA), wherein the ssDNA:

- (a) comprises an effector sequence,
- (b) is covalently closed,
- (c) does not form a double stranded structure longer than 40 base pairs,
- (d) is more than 200 nucleotides in length, and
- (e) does not comprise a protomerase target sequence.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because these shared technical features are obvious over WO 2010/094040 A1 to Epicentre Technologies Corporation (hereinafter "Epicentre") in view of US 2019/0211361 A1 to Flagship Pioneering Innovations V, Inc. (hereinafter "Flagship").

Epicentre discloses a method of evaluating a sample of a composition (abstract - "The invention provides ligation reaction mixtures, methods, and kits for improved template-independent intramolecular ligation (circularization) of linear ssDNA"; pg 49, ln 20-23 - "The effects of magnesium and manganese divalent cations on intramolecular ligation were evaluated using the linear ssDNA oligonucleotide pYRTP.5 substrate that was poorly ligated in EXAMPLE 4 and the highly adenylated form of CIRCLIGASE™ ssDNA Ligase (purified from the new clone)"; comprising ssDNA (abstract - "The invention provides ligation reaction mixtures, methods, and kits for improved template-independent intramolecular ligation (circularization) of linear ssDNA"), the method comprising determining whether a condition is satisfied, wherein the condition is chosen from: a) at least 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 98%, or 99% by mass of total DNA in the composition is the covalently closed ssDNA (pg 15, ln 2-6 - "Surprisingly and unexpectedly, addition of betaine to the ligation reaction mixture resulted in approximately 100% circularization of this very difficult-to-ligate linear ssDNA substrate, compared to < 5% circularization of this substrate by the lowly adenylated enzyme in the Standard Ligation Reaction Mixture").

Epicentre does not teach a pharmaceutical formulation comprising a single stranded DNA (ssDNA), wherein the ssDNA:

- (a) comprises an effector sequence,
- (b) is covalently closed,
- (c) does not form a double stranded structure longer than 40 base pairs,
- (d) is more than 200 nucleotides in length, and
- (e) does not comprise a protomerase target sequence.

—See next Supplemental Box —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/78301

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Flagship discloses a pharmaceutical formulation (abstract - "This invention relates generally to pharmaceutical compositions and preparations of curons and uses thereof") comprising: an LNP (para [0538] - "the composition or synthetic curon described herein may further comprise a nanoparticle"; para [0504] - "the composition further comprises a carrier component, e.g., a microparticle, liposome, vesicle") comprising a single stranded DNA (ssDNA) (para [0361] - "Animal circular single-stranded DNA viruses generally refer to a subgroup of single strand DNA (ssDNA) viruses, which infect eukaryotic non-plant hosts, and have a circular genome"), wherein the ssDNA:

(a) encodes a therapeutic protein (para [0407] - "the genetic element comprises a sequence that encodes a protein"; para [0069] - "wherein the exogenous effector encodes a therapeutic agent, e.g., a therapeutic peptide or polypeptide or a therapeutic nucleic acid"),
 (b) is covalently closed (para [0361] - "Animal circular single-stranded DNA viruses generally refer to a subgroup of single strand DNA (ssDNA) viruses, which infect eukaryotic non-plant hosts, and have a circular genome"),
 (d) is more than 200 nucleotides in length (para [0078] - "wherein the sequence encoding the exogenous effector has a size of about 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1500, or 1500-2000 nucleotides"), and
 (e) does not comprise a protelomerase target sequence (Flagship does not disclose a protelomerase target sequence or its components of a central telo palindrome of 22 bp and two 14-bp flanking sequences comprising inverted repeats);
 wherein the pharmaceutical formulation is substantially free of linear DNA and protein (para [0178] - "the pharmaceutical composition has a contaminant level below a predetermined reference value, e.g., is substantially free of contaminants"; para [0338] - "the curon is purified, e.g., it is separated from its original source and/or substantially free (>50%, >60%, >70%, >80%, >90%) of other components").
 Flagship does not expressly disclose (c) does not form a double stranded structure longer than 40 base pairs. However, one of ordinary skill in the art would have further optimized using routine experiments, to identify the exact value for the number of base pairs capable of forming double stranded DNA, and exclude such sequences from the design.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of Item 4 above: claims 6-15, 26-29, 33-61, 65-83 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10	Z
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115	Z
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	

(32)優先日 令和4年8月23日(2022.8.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/402,772

(32)優先日 令和4年8月31日(2022.8.31)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

弁護士 山本 健策

(72)発明者 スナイダー, アレクサンドラ レイチェル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 55, スイート 800イー

(72)発明者 ルーベンス, ジェイコブ ローゼンブラム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 55, スイート 800イー

(72)発明者 プジャール, ナラハリ スバンナ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 55, スイート 800イー

(72)発明者 ギブソン, モリー クリサン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 55, スイート 800イー

(72)発明者 ポートニー, ベンジャミン アンドリュウ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 55, スイート 800イー

(72)発明者 ヴォン マルツァーン, ジェフリー エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 55, スイート 800イー

(72)発明者 プレトン, カミーロ アヤラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジ パークウェイ 55, スイート 800イー

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ42

4C084 AA13 MA24 MA38 MA55 NA13 NA20 ZB211 ZB212

4C086 AA01 AA04 EA16 MA01 MA04 MA24 MA38 MA55 NA13 NA20
ZB21